ELBIO LEIGUEZ JUNIOR

**ESTUDO DOS FATORES ENVOLVIDOS NA FORMAÇÃO DE CORPÚSCULOS
LIPÍDICOS, INDUZIDO POR UMA FOSFOLIPASE A₂, ISOLADA DO VENENO DE
SERPENTE: SÍNTESE E METABOLISMO DE LIPÍDEOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

São Paulo
2015

ELBIO LEIGUEZ JUNIOR

**ESTUDO DOS FATORES ENVOLVIDOS NA FORMAÇÃO DE CORPÚSCULOS
LIPÍDICOS, INDUZIDO POR UMA FOSFOLIPASE A₂, ISOLADA DO VENENO DE
SERPENTE: SÍNTESE E METABOLISMO DE LIPÍDEOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Imunologia

Orientadora: Profa. Dra. Catarina de Fátima Pereira Teixeira

Versão Original.

São Paulo
2015

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Leiguez Junior, Elbio.

Estudo dos fatores envolvidos na formação de corpúsculos lipídicos, induzido por uma fosfolipase A_2 , isolada do veneno de serpente: síntese e metabolismo de lipídeos / Elbio Leiguez Junior. -- São Paulo, 2015.

Orientador: Profa. Dra. Catarina de Fátima Pereira Teixeira.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Imunologia. Área de concentração: Imunologia. Linha de pesquisa: Mecanismo de ação de venenos e toxinas animais.

Versão do título para o inglês: Study of factors involved in lipid droplets formation induced by a phospholipase A_2 isolated from snake venom: synthesis and metabolism of lipids.

1. Fosfolipase A_2 2. Corpúsculos lipídicos 3. Macrófagos 4. Monócitos 5. Inflamação 6. Ácidos Graxos I. Teixeira, Profa. Dra. Catarina de Fátima Pereira II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Imunologia III. Título.

ICB/SBIB0209/2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Elbio Leiguez Junior.

Título da Tese: Estudo dos fatores envolvidos na formação de corpúsculos lipídicos, induzido por uma fosfolipase A₂, isolada do veneno de serpente: síntese e metabolismo de lipídeos .

Orientador(a): Profa. Dra. Catarina de Fátima Pereira Teixeira.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

() Aprovado(a)

() Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - CEP. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone :(55) (011) 3091.7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **94** nas fls. **91** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) Catarina de Fátima Pereira Teixeira, Coordenador(a) da Linha de pesquisa **Estudo dos fatores envolvidos na formação de corpúsculos lipídicos, induzido por uma fosfolipase A2, isolada do veneno de serpente: síntese e metabolismo de lipídeos** do qual participam o(s) alunos **Elbio Leiguez Junior**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela *COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS* (CEUA) em **23.11.2010, com validade de 3 anos.**

São Paulo, 25 de novembro de 2010.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador
CEUA - ICB/USP

Prof. Dr. ARIEL MARIANO SILBER
Secretário-suplente
CEUA - ICB/USP

Centro de Hemoterapia y Hemodonación
de Castilla y León

Dr. Jesús Balsine Rodríguez

Instituto de Biología y
Genética Molecular
C/ Sanz y Forés s/n
47003 Valladolid

Valladolid, 14 de mayo de 2010.

Estimado Dr. Jesús Balsine Rodríguez:

Me han remitido su solicitud para colaboración en el proyecto titulado: **"Estudio por espectrometría de masas del perfil lipídómico de macrófagos humanos polarizados"**, mediante el uso de leucocitos de sangre periférica de donantes sanos, obtenidos de las capas leucoplaquetarias procesadas en este Centro de Hemoterapia y que no tienen utilidad transfusional.

En principio, esta solicitud nos parece oportuna, por lo que podríamos entregarle estas capas leucoplaquetarias para destinarlas a la investigación que usted propone.

Dichos productos serían de donantes anónimos y para cumplir con la reglamentación precisa en investigación, considero oportuno su propuesta de transmitir esta decisión a la Comisión de Bioética del Consejo Superior de Investigaciones Científicas para su aprobación.

El Centro deberá tener conocimiento de los trabajos que se publiquen como consecuencia de este proyecto donde se utilicen estas muestras, así como que se cite la procedencia de los mismos.

En espera de sus noticias para terminar de concretar los detalles de esta colaboración, que confiamos sea de utilidad para ambas instituciones, le saluda atentamente,

Dra. Sonia Pérez.

Responsable de Área de Biobanco

Paseo de Filipinos, s/n. 47007 Valladolid
Tfno.: 983 41 88 23 - Fax: 983 41 08 23

www.chemcyl.com

AGRADECIMENTOS

Manifesto meus sinceros agradecimentos as pessoas, instituições e órgão de fomento que impulsionaram o início e o desenvolvimento deste trabalho.

À Prof^a. Dr^a. Catarina de Fátima Pereira Teixeira (Instituto Butantan), pela orientação, disponibilidade, compreensão, pelo incansável incentivo às minhas ideias, respeito, confiança, e amizade. Nesse duro mundo da ciência, peço licença à E. Hemingway nesta paráfrase: A única coisa capaz de nos estragar um dia são pessoas, mas se pudermos evitar encontros, os dias não têm limites. As pessoas são sempre limitadoras da felicidade, exceto aquelas poucas, como assim posso te chamar minha amiga.

Ao Instituto de Ciências Biomédicas (USP) e ao Laboratório de Farmacologia (Instituto Butantan), pela oportunidade de realizar este trabalho, por meio de sua estrutura.

Ao Prof. Dr. Jesús Balsinde (Instituto de Biología y Genética Molecular – Valladolid-España), pelo modo atencioso como me recebeu em seu laboratório e pela relevante contribuição para este estudo.

À Dra. Cristina Maria Fernandes (Instituto Butantan), pela amizade, pelo apoio e pelo entusiasmo e incentivo.

À Dra. Vanessa Moreira por ser um exemplo em determinação.

Às técnicas Elisa e Renata (Laboratório de Farmacologia – Instituto Butantan), pelo profissionalismo e por toda a ajuda em todos esses anos.

À querida Eni, secretária do programa de pós graduação em Imunologia ICB/USP, só tenho a agradecer por toda ajuda e carinho ao longo desses anos de doutoramento.

Como futuro cientista, tenho que reconhecer que, acima de todas as coisas, assim como o tempo, vocês me acompanham, como velhos amigos, como velhos irmãos, no trabalho ou para que ele possa ser feito. Agradeço em especial a Karina Cristina Giannotti pela incansável ajuda, à minhas queridas Mariana do Nascimento e Neide Galvão do Nascimento obrigado por todo o carinho e respeito que vocês sempre me ofertaram, além da ajuda na batalha do dia a dia. Ao Marlos Cortez Sampaio o meu muito obrigado pela boa convivência ao longo dessa jornada.

Aos grandes Marcio Hideki Matsubara e Juan Pablo Rodriguez, presentes em momentos cruciais, amigos leais, incondicionais, generosos... obrigado!

Obrigado aos meus sogros, pessoas tão retas e tão dignas que sempre me apoiaram e torceram por mim.

À minha esposa, Liza, minha guerreira incansável. Luto para ser melhor a cada dia para ser digno de conviver com você. Te amo!!!!

Aos meus pais, Genilce e Elbio, que me ensinaram o valor da garra, do trabalho e da determinação. Trabalharam para que eu pudesse realizar os meus sonhos. Obrigado pelo financiamento paralelo às pesquisas, pelas expectativas, pela confiança e por terem me ensinado a querer, ir atrás e nunca desistir.

À FAPESP (Processo 2010/06345-1) e a CAPES pelo apoio financeiro concedido durante a execução deste projeto de doutorado

*Não se pode ensinar coisa alguma a alguém,
pode-se apenas auxiliá-lo a descobrir por si mesmo.*

Galileu Galilei

RESUMO

LEIGUEZ JUNIOR, E. **Estudo dos fatores envolvidos na formação de corpúsculos lipídicos, induzido por uma fosfolipase A₂, isolada do veneno de serpente: síntese e metabolismo de lipídeos**. 2015. 130 f. Tese (Doutorado em Imunologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Neste estudo foram investigados os efeitos da MT-III, uma sFLA₂ de veneno, em macrófagos murinos (MΦ), quanto à: i) ativação e expressão dos receptores PPAR-γ, PPAR-β/δ e CD36 e a participação destes e das enzimas DGAT, ACAT e FAS na formação de corpúsculos lipídicos (CLs), ii) participação dos PPAR-γ e do PPAR-β/δ na expressão da PLIN2, iii) participação do CD36 na expressão da COX-2 e síntese da PGE₂, iv) participação do receptor TLR2 e da molécula adaptadora MyD88 na formação de CLs, síntese de eicosanoides e citocinas, e v) liberação do ácido palmítico e oleico. Em monócitos humanos (MN), foram avaliados os efeitos da MT-III, quanto à: i) formação de CLs, ii) ação sobre fosfolípidos de membrana, perfil de ácidos graxos liberados e metabolismo lipídico, iii) importância da reacilação de ácidos graxos na formação de CLs e iv) expressão das enzimas envolvidas na lipogênese. A MT-III induziu, em MΦ, a ativação e aumento dos teores proteicos dos receptores PPAR-γ, PPAR-δ/β e CD36. A inibição dos receptores PPAR-γ e/ou PPAR-β/δ e das enzimas DGAT, ACAT e FAS reduziu significativamente a formação de CLs, induzida pela MT-III. O bloqueio do receptor PPAR-β/δ, mas não do PPAR-γ, aboliu a expressão da PLIN2, induzida pela MT-III. A inibição do receptor CD36 reduziu a expressão de COX-2, sem modificar a liberação de PGE₂, induzida pela MT-III. A deleção do TLR2 ou da molécula adaptadora MyD88 aboliu a formação de CLs, síntese das citocinas IL-1β e IL-10 e da PGE₂, sob estímulo da MT-III, porém, somente a deleção do TLR2 aboliu a síntese de PGD₂, PGJ₂ e LTB₄. Ainda, esta sFLA₂ causou a liberação do ácido palmítico e oleico. Em MN, a MT-III induziu aumento do número de CLs, liberação de ácidos graxos saturados, mono e poli-insaturados e dos níveis de triacilglicerol, colesterol e lisofosfolípidos. Além disso, a triacina C, inibidor do processo de reacilação de ácidos graxos, causou uma redução significativa do número de CLs, induzida pela MT-III. Ainda, a MT-III não causou aumento da expressão das enzimas envolvidas na lipogênese. Em conjunto, os dados permitem concluir que a formação de CLs, induzida pela MT-III, em MΦs é dependente do PPAR-β/δ e CD36, das enzimas DGAT, ACAT e FAS. O receptor TLR2 e a molécula adaptadora MyD88 são essenciais para a formação de CLs e síntese da IL-1β, IL-10 e PGE₂, mas apenas o TLR2 é importante para a síntese de PGD₂, PGJ₂ e LTB₄, sob ação da MT-III. Em MN, a MT-III

reproduziu os efeitos desencadeados em macrófagos murinos, como a formação de CLs, além de causar aumento dos níveis de ácidos graxos livres, triacilglicerol, colesterol e lisofosfolípidos. A reacilação de ácidos graxos, mas não a lipogênese, é relevante para a formação de CLs, induzida pela MT-III. Dada a homologia entre FLA₂s ofídicas e as sFLA₂s inflamatórias do grupo IIA, de mamíferos, estes resultados ampliam o conhecimento das ações de fosfolípases A₂ secretadas sobre células fagocíticas, no que se refere aos mecanismos relacionados ao acúmulo de lipídeos.

Palavras-chave: Fosfolipase A₂. Corpúsculos lipídicos. Macrófagos. Monócitos. Inflamação. Ácidos graxos.

ABSTRACT

LEIGUEZ JUNIOR, E. **Study of factors involved in lipid droplets formation induced by a phospholipase A₂ isoleted from snake venom: synthesis and metabolism of lipids.** 2015. 130 p. Ph. D. thesis (Immunology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

In this study we investigated the effects of MT-III, a secreted phospholipase A₂ (sPLA₂) from snake venom, in murine macrophages (MΦ) with focus on: i) activation and expression of PPAR-γ, PPAR-β/δ and CD36 receptors and participation of these receptors and of DGAT, ACAT and FAS enzymes in lipid droplets (LDs) formation, ii) involvement of PPAR-γ and PPAR-β/δ in PLIN2 protein expression, iii) participation of CD36 in COX-2 protein expression and PGE₂ biosynthesis, iv) participation of TLR2 receptor and MyD88 adaptor molecule in LDs formation and synthesis of lipid mediators and cytokines, and v) the release of palmitic and oleic fatty acids. Moreover, the effects of MT-III were investigated in human monocytes (MN), with focus on: i) LDs formation, ii) hydrolysis of membrane phospholipids, profile of released fatty acids and lipid metabolism, iii) importance of fatty acid reacylation to LDs formation, and iv) expression of enzymes involved in lipogenesis. Results showed that stimulation of MΦ with MT-III caused activation and increase of protein expression of PPAR-γ, PPAR-δ/β and CD36 receptors. MT-III-induced formation of LDs was significantly reduced by pharmacological inhibition of PPAR-γ and PPAR-β/δ receptors, DGAT, ACAT and FAS enzymes. PPAR-β/δ, but not PPAR-γ receptor was essential to PLIN2 protein expression stimulated by MT-III. Inhibition of CD36 receptor reduced COX-2 protein expression, but did not alter PGE₂ release induced by MT-III. TLR2/MyD88 pathway was essential for LDs formation, IL-1β, IL-10 and PGE₂ synthesis, under MT-III stimulus. However, only TLR2 was important for biosynthesis of PGD₂, PGJ₂ and LTB₄. Moreover, MT-III caused release of palmitic and oleic fatty acids. In MN, MT-III induced LDs formation, release of saturated, mono- and poly-unsaturated fatty acids and increased levels of triacylglycerol, cholesterol and lysophospholipids. Moreover, inhibition of fatty acid reacylation by triacsin C significantly reduced LDs formation induced by MT-III. This phospholipase A₂ did not modify the expression of enzymes involved in lipogenesis. In conclusion, the data shows that LDs formation induced by MT-III in MΦs is dependent on PPAR-β/δ, CD36, DGAT, ACAT and FAS enzymes. TLR2 receptor and MyD88 adaptor molecule are essential for LDs formation and synthesis of IL-1β, IL-10 and PGE₂, but only TLR2 is important for PGD₂, PGJ₂ and LTB₄ synthesis induced by MT-III. In MN, MT-III reproduced the effects triggered in murine macrophages, such as LDs formation and increase of

free fatty acids, triacylglycerol, cholesterol and lysophospholipids levels. Reacylation of fatty acids, but not lipogenesis, is relevant for LDs formation induced by MT-III. Given the homology between PLA₂s from snake venom and inflammatory sPLA₂s from Group IIA of mammals, these results extend the knowledge of the actions of secreted phospholipase A₂ on phagocytic cells, mainly those related to mechanisms of lipid accumulation.

Keywords: Phospholipase A₂. Lipid droplets. Macrophage. Monocyte. Inflammation. Fat acid.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1A - Ativação do receptor e fator de transcrição PPAR-γ induzida pela MT-III em macrófagos	41
Figura 1B - Ativação do receptor e fator de transcrição PPAR-δ/β induzida pela MT-III em macrófagos	42
Figura 2 - Efeito do composto GW9662 e GSK0660 na expressão proteica da PLIN2 induzida pela MT-III em macrófagos	44
Figura 3 - Efeito dos compostos GW9662 e GSK0660 na formação de corpúsculos lipídicos, induzida pela MT-III, em macrófagos	46
Figura 4 Efeito da MT-III na expressão proteica de PPAR-γ e PPAR-δ/β em macrófagos	48
Figura 5 Efeito do composto GSK0660 e GW9662 na liberação da PGE₂, induzida pela MT-III, em macrófagos	49
Figura 6 Efeito do composto GSK0660 e GW9662 na expressão proteica da COX2, induzida pela MT-III, em macrófagos	51
Figura 7 Efeitos da MT-III na expressão proteica do CD36 em macrófagos ..	52
Figura 8 Efeito do composto SSO na formação de corpúsculos lipídicos, induzida pela MT-III, em macrófagos	53
Figura 9 Efeito do SSO na expressão proteica da COX2, induzida pela MT-III, em macrófagos	54
Figura 10 Efeito do composto SSO na liberação da PGE₂, induzida pela MT-III, em macrófagos	55
Figura 11 Efeito dos compostos A-922500 e TMP-153 na formação de corpúsculos lipídicos, induzida pela MT-III, em macrófagos	56
Figura 12 Efeito do composto C75 na formação de corpúsculos lipídicos, induzida pela MT-III, em macrófagos	57
Figura 13 Efeito da MT-III na ativação do fator de transcrição SREBP2, em macrófagos	58
Figura 14 Participação do receptor TLR2 e da molécula adaptadora MyD88 na liberação de PGE₂, PGD₂, PGJ₂ e LTB₄ induzida pela MT-III, em macrófagos	60

Figura 15 Envolvimento do receptor TLR2 e da molécula adaptadora MyD88 no aumento do teor proteico da COX-2, induzido pela MT-III, em macrófagos	61
Figura 16 Papel do receptor TLR2 e da molécula adaptadora MyD88 na liberação da IL-1β e IL-10, induzida pela MT-III, em macrófagos	62
Figura 17 Envolvimento do receptor TLR2 e da molécula adaptadora MyD88 na formação de corpúsculos lipídicos, induzida pela MT-III, em macrófagos	63
Figura 18 Efeito da MT-III na distribuição da PLIN2, em macrófagos	65
Figura 19 Efeito da MT-III na liberação de ácidos graxos saturado e moninsaturado, em macrófagos peritoneais	66
Figura 20A Efeito da MT-III na biogênese de corpúsculos lipídicos, em monócitos humanos	68
Figura 20B Efeito da MT-III na biogênese de corpúsculos lipídicos, em monócitos humanos	69
Figura 21 Efeito da MT-III e MT-II na expressão do RNA mensageiro para PLIN2, em monócitos humanos	71
Figura 22.1 Quantificação dos níveis de CE, TAG e DAG em monócitos humanos estimulados pela MT-III ou MT-II	73
Figura 22.2 Quantificação dos níveis de CE, TAG e DAG em monócitos humanos estimulados pela MT-III ou MT-II	74
Figura 23. Efeito da MT-III na concentração de ácidos graxos livres intracelulares em monócitos humanos	76
Figura 24 Análise dos níveis de ácidos graxos presentes em fosfolípidos de membrana, em monócitos humanos estimulados pela MT-III ou MT-II	78
Figura 25A. Efeito da MT-III e/ou MT-II sobre as espécies de glicerofosfolípidos PE, PC ou PI da membrana celular ligados ao ácido araquidônico	81
Figura 25B. Efeito da MT-III e/ou MT-II sobre diferentes espécies de glicerofosfolípidos da membrana celular ligados ao ácido araquidônico	82
Figura 26. Efeito da MT-III e/ou MT-II na formação de lisofosfolípidos	84
Figura 27A Efeito da MT-III e da MT-II na expressão genes envolvidos na síntese de ácidos graxos, em monócitos humanos	86

Figura 27B Efeito da MT-III e da MT-II na expressão genes envolvidos na síntese de ácidos graxos, em monócitos humanos	87
Figura 28 Representação esquemática dos mecanismos e fatores envolvidos na formação de corpúsculos lipídicos e síntese de mediadores, induzida pela MT-III em macrófagos	103

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
1.1 Corpúsculos lipídicos: considerações gerais	23
1.2. Monócitos/Macrófagos: considerações gerais	26
2 OBJETIVOS	29
3 MATERIAL E MÉTODOS	31
3.1 Animais	31
3.2 Monócito Humanos	31
3.3 Fosfolipase A₂	31
3.4 Ensaio da Redução do brometo de 3, 4,5-dimetiltiazol – 2il 2,5- difenil tetrazol (MTT)	32
3.5 Quantificação dos corpúsculos lipídicos	32
3.5.1 Coloração fluorescente dos Corpúsculos Lipídicos	33
3.6 Determinação da localização dos receptores e/ou fatores de transcrição PPAR-γ e PPAR-δ/β por imunofluorescência	33
3.7 Análise por <i>Western blotting</i>	34
3.8 Determinação da concentração de PGE₂, PGD₂ e LTB₄ por ensaio imunoenzimático (EIA)	34
3.9 Extração de RNA e análise por reação em cadeia da polimerase por transcrição reversa em tempo real	35
3.10 Análise de ácidos graxos metilados e dos fosfolipideos e lisofosfolipideos de membrana por cromatografia gasosa/espectrofotômetro de massa ou por HPLC/ espectrofotômetro de massa, respectivamente.....	36
3.11 Liberação do ácido palmítico e oleico em monócitos	38
3.12 Intervenções Farmacológicas	39
3.13 Análise estatística	39
4 RESULTADOS	40

4.1 Ativação dos fatores de transcrição PPAR-γ e PPAR-δ/β induzida pela MT-III em macrófagos	40
4.2 Participação dos receptores e fatores de transcrição PPAR-γ e PPAR-δ/β na expressão proteica da perilipina 2 (PLIN2) induzida pela MT-III em macrófagos	43
4.3 Participação dos receptores e fatores de transcrição PPAR-γ e PPAR-δ/β na formação de corpúsculos lipídicos induzida pela MT-III em macrófagos	45
4.4 Efeito da miotoxina III (MT-III) na expressão proteica dos receptores PPAR-γ e PPAR-δ/β em macrófagos	47
4.5 Envolvimento dos receptores e fatores de transcrição PPAR-γ e PPAR-δ/β na liberação da prostaglandina E2 induzida pela MT-III em macrófagos ..	49
4.6 Participação dos receptores e fatores de transcrição PPAR-γ e PPAR-δ/β no aumento do teor proteico da COX-2, induzido pela MT-III em macrófagos	50
4.7 Efeito da miotoxina III (MT-III) na expressão proteica do receptor CD36, em macrófagos	52
4.8 Efeito do antagonista do receptor CD36 (SSO) na formação de corpúsculos lipídicos induzida pela MT-III, em macrófagos	53
4.9 Efeito do antagonista do receptor CD36 (SSO) no aumento do teor proteico da COX-2, induzido pela MT-III em macrófagos	54
4.10 Efeito do antagonista do receptor CD36 (SSO) na liberação da prostaglandina E2, induzida pela MT-III, em macrófagos	55
4.11 Efeito da inibição das enzimas DGAT e ACAT na formação de corpúsculos lipídicos induzida pela MT-III em macrófagos	56
4.12 Efeito do composto C75 na formação de corpúsculos lipídicos induzida pela MT-III em macrófagos	57
4.13 Efeito da MT-III na ativação do fator de transcrição SREBP2, em macrófagos	58
4.14 Participação do receptor TLR2 e da molécula adaptadora MyD88 na liberação de PGE2, PGD2, PGJ2 e LTB4 induzida pela MT-III, em macrófagos	59
4.15 Envolvimento do receptor TLR2 e da molécula adaptadora MyD88 no aumento do teor proteico da COX2, induzido pela MT-III, em macrófagos	61
4.16 Papel do receptor TLR2 e da molécula MyD88 na liberação das citocinas IL-1β e IL-10, induzida pela MT-III, em macrófagos	62

4.17 Participação do receptor TLR2 e da molécula adaptadora MyD88 na formação de corpúsculos lipídicos induzida pela MT-III, em macrófagos	63
4.18 Papel do receptor TLR2 e da molécula adaptadora MyD88 na distribuição da PLIN2 em macrófagos estimulados pela MT-III	64
4.19 Efeito da MT-III na liberação do ácido palmítico e oleico a partir de macrófagos peritoneais	66
4.20 Efeito da MT-III na formação de corpúsculos lipídicos em monócitos humanos e a participação do processo de reacilação de ácidos graxos nesse efeito	67
4.21 Efeito da MT-III e MT-II na expressão da PLIN2 e a participação do processo de reacilação de ácidos graxos nesse efeito	70
4.22 Efeito da fosfolipase A2 MT-III e da proteína homóloga, MT-II no acúmulo de lipídeos neutros em monócitos humanos	72
4.23 Efeito da MT-III na concentração de ácidos graxos livres intracelulares em monócitos humanos. Participação da fosfolipase A2 citosólica neste efeito..	75
4.24 Efeito das fosfolipases A2 MT-III e MT-II na redução de ácidos graxos presentes em fosfolipídeos de membrana em monócitos humanos	77
4.25 Efeito das fosfolipases A2 MT-III e MT-II sobre as espécies de glicerofosfolipídeos de membrana celular fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilcolina (PC) e fosfatidilinositol (PI) associados ao ácido araquidônico	79
4.26 Efeito das fosfolipases A2 MT-III e MT-II na formação de lisofosfolipídeos	83
4.27 Efeito da MT-III e MT-II na expressão genes envolvidos na síntese de ácidos graxos, em monócitos humanos	85
5 DISCUSSÃO	88
6 CONCLUSÕES	101
REFERÊNCIAS	104
ANEXO.....	119

1 INTRODUÇÃO

O acúmulo excessivo de lipídeos em diversos tecidos e em células imunocompetentes está relacionado a uma variedade de patologias, tais como a obesidade, a diabetes do tipo II e a aterosclerose (GREENBERG et al., 2011; LIBBY et al., 2010; OLOFSSON et al., 2011; PAUL et al., 2008b). A aterosclerose é uma doença de natureza inflamatória, responsável por um número crescente de mortes, em todo o mundo, que acarreta problemas socioeconômicos graves. Esta doença é caracterizada pela disfunção do endotélio e de elementos circulantes no sangue, com a produção de agentes inflamatórios e aumento do conteúdo lipídico na parede das artérias e no interior de células fagocíticas (GALKIN; LEY, 2009; LIBBY et al., 2010). O aumento do número de inclusões lipídicas em células fagocíticas, tal como nos macrófagos, resulta na diferenciação destas células em macrófagos espumosos, característicos do processo aterosclerótico (CHOUDHURY et al., 2005; PAUL et al., 2008). A etiopatogenia da aterosclerose não é conhecida e tem sido o foco de muitos estudos (FEBBRAIO et al., 2000; GOSLING et al., 1999; KUSUNOKI et al., 2001). Nesse sentido, foi demonstrado que as fosfolipases A₂ (FLA₂s) são encontradas em níveis aumentados durante o processo aterosclerótico e exercem múltiplas atividades proaterogênicas na parede dos vasos (KIMURA-MATSUMOTO et al., 2008; MURAKAMI; KUDO, 2003; ROSENGREN et al., 2006). No entanto, o papel dessas enzimas na síntese e no acúmulo de lipídeos em macrófagos ainda não é conhecido.

As FLA₂s constituem uma ampla família de enzimas, com inúmeras funções biológicas, que abrangem desde a síntese e o reparo de membranas até à geração de segundos mensageiros, envolvidos em processos biológicos e transdução de sinais (BROWN et al., 2003; VALENTIN; LAMBEAU, 2000). Estas enzimas são abundantes na natureza e estão presentes em altas concentrações nos venenos de serpentes, abelhas e vespas e no suco pancreático de mamíferos (HARRIS, 1991). As FLA₂s hidrolisam a ligação acil-éster, na posição *sn*-2 de fosfolipídios, gerando ácidos graxos livres, tais como o ácido araquidônico (AA), o ácido oleico (AO) e lisofosfolipídios, tal como o liso-PAF (VALENTIN; LAMBEAU, 2000). A reação de hidrólise é dependente de íons cálcio e a unidade catalítica da enzima é constituída pelos aminoácidos His 48, Asp 99 e uma molécula de água (RIZZO et al., 2000).

A superfamília das fosfolipases A₂ foi dividida em FLA₂s secretadas (sFLA₂) e FLA₂ intracelulares, sendo estas últimas representadas pelas enzima citosólicas (cFLA₂), independentes de Ca⁺² (iFLA₂), acetil-hidrolases do fator ativador de plaquetas (PAF-AH) e as

fosfolipases lisossomais (SCHALOSKE; DENNIS, 2006). Recentemente, as FLA₂s foram divididas em 15 grupos, com diversos subgrupos, de acordo com cinco critérios físico-químicos, que compreendem a localização celular, seqüência de aminoácidos, peso molecular, presença de pontes dissulfeto intramoleculares e necessidade de cálcio para a atividade enzimática (BROWN et al., 2003; DAVIDSON; DENNIS, 1990; HEINRIKSON et al., 1977; MURAKAMI et al., 2011; RIZZO et al., 2000; SIX; DENNIS, 2000; SCHALOSKE; DENNIS, 2006).

Os grupos mais estudados são o II, IV, VI, VII e o VIII. O grupo II, de interesse neste estudo, será melhor detalhado adiante, sendo que os demais grupos terão suas características gerais descritas a seguir. O grupo IV compreende as FLA₂ citosólicas, que são enzimas de alto peso molecular (61 a 114 kDa) e encontradas na fração citosólica de diversos tipos celulares. Estas FLA₂s apresentam resíduos de serina (Ser228 e Ser549) no sítio catalítico e expressam atividade enzimática na presença de concentrações mínimas de cálcio. Contudo, este íon é importante para a translocação da enzima para as membranas intracelulares (ABE et al., 1998; EVANS et al., 2001; 2004; HIRABAYASHI et al., 1999; HIRAOKA et al., 2002; PETERS-GOLDEN et al., 1996). Dentre as cFLA₂s, são conhecidas seis isoenzimas: - α -, - β -, - γ -, - δ -, - ϵ e - ζ -, sendo que a cFLA₂ α é a mais estudada e expressa constitutivamente em muitos tipos celulares e tecidos (HERBERT et al., 2009; MURAKAMI e KUDO, 2002; MURAKAMI et al., 2011).

As FLA₂s independentes de Ca²⁺ (iFLA₂s) pertencem ao grupo VI e contém cerca de 120 aminoácidos (84 a 90 kDa). As enzimas deste grupo estão localizadas intracelularmente e não dependem do cálcio para exercerem atividade catalítica. São conhecidas pelo menos seis isoenzimas da iFLA₂ (- β -, - γ -, - δ -, - ϵ -, - ζ e - η), além de algumas variantes originadas por *splicing* alternativo (JENKINS et al., 2004; SIX e DENNIS, 2000). As funções fisiológicas exercidas por estas enzimas estão relacionadas, principalmente, ao fornecimento de ácido araquidônico, para a remodelagem e a manutenção de membranas celulares. Além disso, estas enzimas estão envolvidas nos processos de síntese de eicosanóides, na apoptose e no *clearence* de células apoptóticas por macrófagos (ATSUMI et al., 2000; MURAKAMI et al., 2005; PEREZ et al., 2004; 2006; RICKARD et al., 2005; WINSTEAD et al., 2000). As FLA₂s dos Grupos VII e VIII compreendem enzimas com 26 a 45 kDa e são do tipo secretada e citosólica, respectivamente. Estas FLA₂s são denominadas de acetil-hidrolases do fator ativador de plaquetas (PAF-AH) e catalisam a hidrólise deste mediador e de outros fosfolipídios pró-inflamatórios, na posição *sn*-2. Quatro isoformas distintas desta enzima foram caracterizadas: isoformas Ia, Ib, II e eritrocitária. As PAF-AHs foram identificadas no plasma humano e no tecido cerebral bovino (CHAKRABORTI, 2003; MURAKAMI et al., 1997).

As fosfolipases A₂ secretadas (sFLA₂s), escopo deste estudo, compreendem o grupo de

enzimas mais amplamente estudado. Características relevantes estão conservadas neste grupo, tais como: baixo peso molecular, termoestabilidade, presença de uma alfa hélice anfipática amino-terminal, uma alça de ligação ao cálcio e um grande número de pontes dissulfídicas intramoleculares (MUKHERJEE et al., 1994; RIZZO et al., 2000). Alguns de seus efeitos, na função celular, são dependentes da liberação de derivados do ácido araquidônico e de lisofosfolipídeos (RIZZO et al., 2000). Outros efeitos estão associados à ligação da enzima a receptores específicos de membranas, descritos como do tipo M (muscular) e N (neuronal). Os receptores do tipo N foram os primeiros a serem identificados e estão presentes em grandes quantidades em membranas do tecido cerebral de ratos e ligam-se com alta afinidade a uma variedade de FLA₂s neurotóxicas. Este tipo de receptor parece ser crucial para efeito neurotóxico destas FLA₂s. Os receptores do tipo M foram identificados, inicialmente, em músculo esquelético de coelhos. (LAMBEAU et al., 2005) e posteriormente encontrados em neutrófilos, monócitos e macrófagos alveolares humanos (SILLIMAN et al., 2002).

Vários estudos versam sobre a participação das sFLA₂s dos mamíferos em patologias de origem inflamatória, tal como a síndrome do desconforto respiratório no adulto, o choque séptico, a pancreatite aguda (KIM et al., 1995; VADAS, 1984; VADAS e PRUZANSKI, 1986), as doenças autoimunes (artrite reumatóide, doença de Chrohn e colite ulcerativa) (HAAPAMAKI et al., 1998; 1999; LIN et al., 1996), além da asma brônquica e rinite alérgica (CHILTON et al., 1996; MURAKAMI et al., 2011; STADEL et al., 1994).

Como citado anteriormente, as evidências da literatura apontam a participação das fosfolipases A₂ secretadas (sFLA₂), de mamíferos, no desencadeamento e progressão do processo aterosclerótico. A literatura mostra que as sFLA₂ do grupo II, V e X exercem múltiplas atividades proaterogênicas na parede dos vasos (KIMURA-MATSUMOTO et al., 2008; MURAKAMI e KUDO, 2003; ROSENGREN et al., 2006). Estas fosfolipases podem gerar mediadores lipídicos, tais como os eicosanóides, hidrolisar a lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e convertê-las em partículas mais proaterogênicas. Essas enzimas, especificamente as sFLA₂ do grupo IIA, estão expressas de modo constitutivo em artérias normais; durante a aterosclerose, porém, são encontradas em concentrações elevadas no tecido vascular e no plasma (HUI, 2012). Além disso, o aumento na expressão dessas enzimas, em macrófagos, causou um aumento na lesão aterosclerótica (GHESQUIERE et al., 2005). Neste sentido, a literatura mostra que o macrófago é uma célula relevante para a formação, progressão e patogenicidade das placas ateroscleróticas, e representa, portanto, um importante alvo terapêutico (CHOUDHURY et al., 2005). Em lesões ateroscleróticas estabelecidas, os macrófagos são importantes para o desenvolvimento da lesão, especificamente na ruptura das placas (GALIS et al., 1994). Como

mentionado anteriormente, o acúmulo de lipídeos nestas células, na forma de corpúsculos lipídicos, causa a sua diferenciação em células espumosas (LIBBY et al., 2010; PAUL et al., 2008). Este fenômeno caracteriza o início da aterosclerose, enquanto a liberação de quimiocinas, citocinas e espécies reativas de oxigênio, por este tipo celular, viabiliza a progressão da doença (CHOUDHURY et al., 2005). Diante disso, os estudos voltados para o conhecimento das ações das sFLA₂, do grupo IIA, sobre este tipo, revestem-se de importância.

Os venenos de serpentes do gênero *Bothrops* contêm concentrações elevadas de sFLA₂, que apresentam homologia estrutural e funcional com as FLA₂s de mamíferos, encontradas em fluidos inflamatórios (DAVIDSON e DENNIS, 1990; SCOTT et al., 1990). Desse modo, as sFLA₂ isoladas de venenos de serpentes podem constituir ferramentas úteis para o estudo das ações de sFLA₂s de mamíferos.

A partir do veneno da serpente *Bothrops asper*, da América Central, foram isoladas quatro miotoxinas com estrutura de fosfolipase A₂, denominadas MT-I a IV. Duas delas, contendo uma aspartato na posição 49 (Asp-49), são cataliticamente ativas (MT-I e MT-III) e as outras duas (MT-II e MT-IV) são homólogas, contêm uma lisina na posição 49 (Lys-49) e não apresentam atividade catalítica (GUTIÉRREZ; LOMONTE, 1995, 1997; LOMONTE; CARMONA, 1992;). Apesar das diferenças na atividade catalítica, tanto as Asp-49 quanto as Lys-49 apresentam uma potente atividade miotóxica. As proteínas Lys-49 mantêm a capacidade lesiva em membranas biológicas e sintéticas, por um mecanismo independente de cálcio (DIAZ et al., 1991). No caso da MT-II, foi demonstrado que uma região específica, da porção C-terminal desta proteína, que compreende os resíduos de aminoácidos 115 a 129, está associada aos efeitos miotóxicos e citotóxicos da mesma (LOMONTE et al., 1994; PÁRAMO et al., 1998). Apesar das diferenças quanto a atividade enzimática, tanto a MT-II (Lys-49), quanto a MT-III (Asp49) induzem reação inflamatória marcante, caracterizada por edema e infiltrado leucocitário (CHAVES et al., 1998; GUTIERREZ et al., 1986; LOMONTE e GUTIERREZ, 1989; LOMONTE et al., 1993; ZULIANI et al., 2005a), acompanhados da liberação de eicosanóides (leucotrieno B₄, tromboxano A₂, prostaglandina E₂ e D₂), com aumento da expressão protéica da ciclooxygenase-2 e liberação de citocinas de perfil Th1 (fator de necrose tumoral alfa, interleucina-1 e interleucina-6) no foco inflamatório, em diferentes modelos experimentais in vivo (MOREIRA et al., 2008; ZULIANI et al., 2005a). Em modelos experimentais in vitro, essas proteínas ativam funções dos macrófagos, tais como a produção de agentes microbicidas e a fagocitose (ZULIANI et al., 2005b). Ainda, foi demonstrado que a MT-III induziu o aumento na formação de corpúsculos lipídicos, em macrófagos peritoneais murinos isolados, dependente da ativação de proteínas sinalizadoras (PKC, PI3K e p38MAPK), além do aumento da expressão

proteica da PLIN2 (LEIGUEZ et al., 2011). Recentemente, demonstramos que a MT-II foi capaz de induzir a formação de corpúsculos lipídicos, embora com o dobro da concentração utilizada para MT-III, demonstrando assim, um papel da atividade enzimática nesse efeito. A literatura aponta que o processo de reacilação do ácido araquidônico, ácido graxo poli-insaturado, liberado por ação enzimática de fosfolipases A₂, tem um papel importante na biogênese dessas organelas citoplasmáticas (GUIJAS et al., 2012). Desse modo, estudos voltados para a análise de produtos oriundos da ação enzimática de fosfolipases A₂, bem como a metabolização dos ácidos graxos liberados, permitirá uma melhor compreensão dos mecanismos desencadeados por essa classe de enzimas.

Corpúsculos lipídicos: considerações gerais

Os corpúsculos lipídicos são inclusões citoplasmáticas, não ligadas à membrana, ricas em proteolipídeos, relativamente heterogêneas em relação ao tamanho e à composição. Estas inclusões estão envolvidas no armazenamento e no transporte de lipídeos neutros, tais como triglicerídeos e ésteres de colesterol (GALLI et al., 1985; GREENBERG et al., 2011; WELLER et al., 1999). Em adição, a formação dos corpúsculos lipídicos é rapidamente induzida em processos inflamatórios. Do ponto de vista estrutural, os corpúsculos lipídicos são formações osmiofílicas, envoltos por uma monocamada fosfolipídica que circunda um núcleo rico em lipídeos neutros, tal como ésteres de esterol ou triacilglicerol (WALTHER e FARESE, 2012; WELLER *et al.*, 1999).

Os mecanismos relacionados à biogênese dos corpúsculos lipídicos ainda não foram completamente esclarecidos. Há indícios de que os corpúsculos lipídicos sejam formados em membranas microssomais isoladas, derivadas do RE e do complexo de Golgi (CG), sem a participação da membrana plasmática como sítio de formação (MARCHESAN et al., 2003). Entretanto, há indícios de que essas inclusões sejam formadas na membrana plasmática, uma vez que foi evidenciado o acúmulo de triacilglicerol na membrana de adipócitos (OST *et al.*, 2005). A literatura aponta, ainda, as membranas do retículo endoplasmático como o sítio mais provável para a biogênese dos corpúsculos lipídicos (WALTHER e FARESE, 2012; WOLLINS et al., 2006). Este modelo tem boa aceitação, pelo fato do retículo endoplasmático conter as principais enzimas responsáveis pela síntese de lipídeos neutros. Neste contexto, nossos estudos anteriores demonstraram, por meio da microscopia eletrônica de transmissão, dilatações no retículo endoplasmático de macrófagos estimulados com a MT-III-sFLA₂ (LEIGUEZ et al., 2011). Estes dados sugerem uma possível ativação desta organela.

Além de mediadores inflamatórios (BOZZA et al., 2011), os corpúsculos lipídicos compartimentalizam um grupo diversificado de proteínas (WALTHER; FARESE, 2012). Dentre estas, estão as proteínas da família PAT (*Perilipin Amino-Terminal*). Recentemente, foi unificada a nomenclatura referente a esta família, com base nos genes e na sequência comum entre as proteínas da família. Desse modo, estas proteínas receberam o nome de PERILIPIN (PLIN), seguido de numeração sequencial. As proteínas, desta família têm sido amplamente estudadas; estão presentes na superfície dos corpúsculos lipídicos e compreendem a perilipina 1 (PLIN1), a ADRP (*adipocyte differentiation-related protein*) ou PLIN2 e a TIP47 (*tail interacting protein 47*) ou PLIN3. Em adição, outras duas proteínas, a S3-12 (PLIN4) e a LSDP5 (PLIN5), foram incluídas nesta família (LONDOS et al., 2005).

Dentre as proteínas da família PAT, a PLIN2 é a principal proteína estrutural, associada aos corpúsculos lipídicos, encontrados em diferentes tipos celulares, em particular os macrófagos (BRASAEMLE et al., 1997; LARIGAUDERIE et al., 2004; ROBENEK et al., 2005) e as células espumosas, presentes em lesões ateroscleróticas (WANG et al., 1999; PAUL et al., 2008b). Essa proteína é constitutiva e está localizada nas membranas. Esta localização viabiliza a captação de ácidos graxos de cadeia longa, pelo aumento da velocidade deste processo (GAO et al., 1999; ROBENECK et al., 2006). A PLIN2 foi identificada como uma proteína relacionada à diferenciação de adipócitos (JIANG et al., 1992) com elevado grau de homologia com a porção N-terminal da perilipina (BRASAEMLE et al., 2007; LONDOS et al., 1999). Os níveis de PLIN2 pode ser regulado pós traducionalmente pelo sistema proteassômico (EDVARDSSON et al., 2006; XU et al., 2005). Por outro lado, foi demonstrado, recentemente, que o aumento dos níveis de RNA mensageiro para a PLIN2 está ligado diretamente ao aumento dos níveis de RNA mensageiro para citocinas pró-inflamatórias tal como o TNF- α , a MCP-1 e a IL-6 (CHEN et al., 2009). Desse modo, essa proteína figura como um importante alvo terapêutico em patologias de origem inflamatória, resultantes do desequilíbrio lipídico.

Como citado anteriormente, a composição lipídica dos corpúsculos lipídicos é representada, basicamente, pelo triacilglicerol e o colesterol. Desse modo, os estudos iniciais consideravam estas inclusões lipídicas apenas como reservatórios energético celular (MURPHY, 2001). A literatura aponta que a síntese de triacilglicerol, em corpúsculos lipídicos isolados, está relacionada à presença de enzimas como a acil-coenzima A sintetase (DGAT) e a DGAT2, que ativam e esterificam ácidos graxos (FUJIMOTO et al., 2007; KUERSCHNER et al., 2008), assim como a ACAT (acil-CoA:colesterol aciltransferase), envolvida na esterificação de colesterol, que leva à formação e estoque de ésteres de colesterol nos corpúsculos lipídicos

(SEKIYA et al., 2011; WALTHER; FARESE, 2012). Neste sentido, os corpúsculos lipídicos figuram como organelas importantes no metabolismo e homeostasia lipídica.

Além dessas enzimas, é conhecido que diferentes fatores de transcrição e/ou receptores estão envolvidos na formação dos corpúsculos lipídicos (ALMEIDA et al. 2009). Os PPARs (*peroxisome proliferator-activated receptors*) são fatores de transcrição da família dos receptores nucleares, envolvidos na homeostasia lipídica, no estoque e na oxidação intracelular de ácidos graxos. Estes receptores apresentam 3 isoformas, descritas até o presente: o PPAR- α ou NR1C1, o PPAR- δ , também conhecido como PPAR- β ou NR1C2 e o PPAR- γ , ou NR1C3. Dentre os fatores endógenos que ativam os receptores PPARs, foram descritos componentes oxidados de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e de lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDLs), além de ácidos graxos insaturados e eicosanóides (BESINGER; TONTONNOZ, 2008; CASTRILLO; TONTONNOZ, 2004; GIGUÈRE, 1999; MANDARD; PATSOURIS, 2013). Desse modo, o envolvimento das sFLA₂s na ativação dos receptores PPARs é plausível e deve ser investigado.

A ativação de genes específicos, pelo PPAR, depende da associação do mesmo ao ácido 9-cis retinóico (BESINGER; TONTONNOZ, 2008; MANDARD; PATSOURIS, 2013), podendo resultar no aumento da expressão de proteínas envolvidas no metabolismo lipídico, como a PLIN2 e o receptor CD36. Este receptor pertence a família dos receptores *scavengers*, principais elementos responsáveis pela captação de lipídeos, em macrófagos e formação de células espumosas (FEBBRAIO et al., 2000; NAKATA et al., 1999). O CD36 é um receptor *scavenger* do tipo B, presente em células dendríticas, plaquetas, linfócitos, células endoteliais da microcirculação, tecido adiposo e monócitos/macrofágos (MINEO; SHAUL, 2012; MURPHY et al., 2005). Este receptor reconhece uma grande variedade de ligantes, incluindo a lipoproteína oxidada de densidade baixa (oxLDL), fosfolipídeos aniônicos, células apoptóticas, colágeno e ácidos graxos de cadeia longa (GE; ELGHETANY, 2005; IBRAHIMI et al., 1999; VALACCHI et al., 2011). Neste contexto, apesar da relevância dos receptores PPARs e CD36, para a captação e para o metabolismo lipídico, ainda não se conhece o efeito das sFLA₂ sobre tais receptores e a sua repercussão na formação de corpúsculos lipídicos.

É conhecido que a MT-III-sFLA₂, escopo deste estudo, induz alterações no retículo endoplasmático (RE) de macrófagos, o que nos sugere uma ativação dessa organelas sob efeito da FLA₂ (LEIGUEZ, 2011). O RE exerce um importante papel na síntese e na homeostasia lipídica, além de ser considerado sítio para a biogênese de corpúsculos lipídicos (FAGONE; JACKOWSKI, 2009; MARCHESAN et al., 2003). O estresse do retículo endoplasmático altera a homeostasia lipídica (ZHANG; KAUFMAN, 2008) e desencadeia a ativação de fatores de

transcrição envolvidos no aumento da expressão de genes responsáveis pela síntese de colesterol e triacilglicerol, denominados de proteínas ligantes de elementos reguladores de esterol (*sterol regulatory element binding proteins* - SREBPs). Estes fatores são sintetizados como precursores inativos, ligados à membrana do retículo endoplasmático (RE) (EDWARDS et al., 2000; GOLDSTEIN et al., 2006). Uma vez que o SREBP-2 é responsável pelo desencadeamento da síntese do colesterol, constituinte dos corpúsculos lipídicos, este fator representa um importante alvo de investigação para o entendimento do acúmulo intracelular de lipídeos induzido pela MT-III.

Em síntese, o conjunto de informações acima demonstra que os corpúsculos lipídicos são organelas dinâmicas, que integram o metabolismo lipídico, a produção de mediadores inflamatórios, o tráfego de membranas e a sinalização intracelular (MARTIN; PARTON, 2006; WAN et al., 2007). A partir dessas considerações, torna-se relevante avaliar os mecanismos desencadeados por uma fosfolipase A₂ na formação de corpúsculos lipídicos em macrófagos.

Monócitos/Macrófagos: considerações gerais

Os monócitos/macrófagos têm a sua gênese na medula óssea, a partir de uma célula progenitora, comum aos neutrófilos – a unidade formadora de colônia granulócito-macrófago (CFU-GM). A primeira célula dessa linhagem é o monoblasto, ainda pouco diferenciado, que origina o pro-monócito. Esta célula apresenta capacidade pinocítica e expressa receptores característicos de macrófagos, como o receptor para a porção Fc da IgG e C3b. Os pró-monócitos dividem-se e originam os monócitos, que permanecem na medula óssea por 24 horas e depois migram para a circulação sangüínea, sob a forma de monócitos circulantes. No homem, os monócitos possuem meia vida de 70 horas e no camundongo, de 18 horas. Essas células migram constantemente para os diferentes tecidos e cavidades, onde se diferenciam em macrófagos teciduais e adquirem propriedades funcionais tecido-específicas, permanecendo como células residentes (AUGER; ROSS, 1992; GEISSMANN et al., 2010; HAMILTON; ANDERSON, 2004; JOHNSTON, 1988; WYNN et al., 2013).

Os monócitos representam uma população heterogênea de células que difere em morfologia, fenótipo e função (ZIEGLER-HEITBROCK et al., 1996; ZIEGLER-HEITBROCK et al., 2010). Em particular, as diferenças na expressão das moléculas de CD14 (parte do receptor de lipopolissacarídeo) e CD16 (Receptor Fcγ III) foram inicialmente utilizadas para definir os três subgrupos de monócitos do sangue periférico: os denominados "clássicos", CD14⁺⁺CD16⁻ e "não clássicos", CD14⁺CD16⁺⁺, os quais compreendem cerca 10 % de todos os monócitos e uma fração menor do intermediário CD14⁺⁺CD16⁺ (ZIEGLER-HEITBROCK et al., 2010). Os

monócitos CD14⁺CD16⁺⁺ são considerados inflamatórios e com atividade citotóxica em células tumorais, pela capacidade de sintetizar espécies reativas de nitrogênio e oxigênio, citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- α e IL-12, além de expressar níveis elevados do receptor CCR2, da citocina MCP-1 (SZAFLARSKA et al., 2004).

Durante o processo inflamatório, ocorre aumento no número de monócitos circulantes (METCALF, 1971), que é acompanhado pela migração destas células para o foco da lesão, determinada por diversas moléculas de adesão e multiregulada (van FURTH et al., 1973; WYNN et al., 2013). No sítio inflamatório, o macrófago passa por um processo de ativação, por meio de seus receptores, que o capacita a desenvolver quimiotaxia, fagocitose, processamento e apresentação de antígenos, lise de parasitas intracelulares e atividade anti-tumoral. No desempenho de suas funções, estas células liberam uma grande quantidade de enzimas hidrolíticas, agentes oxidantes, microbicidas além de liberar mediadores inflamatórios, tais como os eicosanóides e as citocinas (GRAF et al., 1999; POLIOT et al., 1998; STEFATER et al., 2011; STOY, 2001; YU et al., 1998; WYNN et al., 2013).

À semelhança dos monócitos, os macrófagos exercem suas diversas ações por meio de receptores, presentes na membrana. Na membrana dos macrófagos são encontrados receptores para mediadores endógenos, como os receptores opióides (μ , δ e κ), adrenérgicos (α e β), para cininas (B1 e B2), para mediadores lipídicos, como a PGE₂, LTB₄ e PAF (EP1 a 4, BLT, PAFR) e citocinas, receptores de células apoptóticas (“scavengers” das classes A e B – SRA, e SRB e CD36) ou de lipoproteína oxidada (“scavenger” das classes A - SRA). Os receptores envolvidos na função microbicida, compreendem os receptores para porção Fc da IgG (Fc γ R), receptores para frações do complemento (CR1, CR3 e C1q) e receptores para açúcares (manose e β -glucano) (ABRASS et al., 1985; ADEREM & UNDERHILL, 1999; BONISCHNETZLER et al., 2009; CHUANG et al., 1995; GAVERIAUX et al., 1995; MILES et al., 1996; WYNN et al., 2013). Ainda, estas células apresentam importantes receptores conhecidos como PRRs (*Pattern recognition receptors*). Os PRRs estão envolvidos no reconhecimento de padrões moleculares específicos, ligados a patógenos (PAMPs) e a padrões moleculares associados a danos (DAMPs). Esses receptores diferem entre si quanto i) à estrutura, ii) à localização, iii) aos ligantes que reconhecem e iv) à ativação de cascatas de sinalização intracelulares que desencadeiam. Essas cascatas intracelulares estão envolvidas na regulação da transcrição de genes, ativação celular, como a proliferação, produção de citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas e moléculas anti-virais (TAKEUCHI; AKIRA, 2010). Ainda, os PRRs podem ser divididos em cinco subfamílias distintas: receptores de lectina tipo C (CLRs), receptores do tipo NOD (NLRs), receptores do tipo RIG-1 (RLRs), os receptores do tipo AIM2

(ALRs) e os receptores do tipo Toll ou *Toll-like* (TLRs). Os receptores *Toll like* Receptores *Toll-like* são, provavelmente, os PRRs melhor estudados e participam da primeira linha de defesa do hospedeiro contra agentes patogênicos ou lesivos (O'NEILL, 2006). Até o presente, 10 TLRs foram identificados em humanos e 12 em camundongos (TAKEUCHI; AKIRA, 2010; WANG et al., 2014). Todos os TLRs apresentam o domínio intracelular TIR, que é responsável pelo recrutamento de moléculas adaptadoras, que medeiam a transdução de sinal para a ativação de fatores de transcrição nuclear. A literatura mostra que quatro moléculas adaptadoras - MyD88, Mal ou TIRAP, TRIF e TRAM - interagem com o domínio TIR, para iniciar a sinalização dos TLRs. No entanto, apesar do reconhecimento de diferentes ligantes, com exceção do TLR3, todos os receptores *Toll*, compartilham uma via de sinalização dependente da molécula adaptadora MyD88. Assim, o TLR3 sinaliza apenas via TRIF, enquanto o TLR4 sinaliza por meio das moléculas MyD88, Mal, TRIF e TRAM e os receptores TLR-5, -7, -8 e -9, sinalizam apenas via MyD88 (NICOLAOU; ERRIDGE, 2010). A sinalização proveniente da molécula adaptadora MyD88 ativa proteínas sinalizadoras da família MAP kinase e o fator de transcrição NF-kB, o que acarreta aumento da síntese de quimiocinas, citocinas pró-inflamatórias e de mediadores lipídicos (HUANG; POPE, 2010). Os TLRs são expressos principalmente em células da primeira linha de defesa do hospedeiro, tais como os neutrófilos, células dendríticas e macrófagos, nas quais atuam como sensores primários de uma gama diversificada de estímulos endógenos e exógenos (ADEREM; ULEVITCH, 2000; KAWAI; AKIRA, 2007; MEDZHITOV et al., 1997). O aumento da expressão dos receptores TLR2 e TLR4 na placa aterosclerótica e o envolvimento do receptor TLR2 na progressão da mesma, foram relatados anteriormente (EDFELDT et al., 2002; LIU et al., 2008). Além disso, foi demonstrada a participação dos receptores TLR2 e TLR4 na formação de corpúsculos lipídicos e na diferenciação dos macrófagos em células espumosas (ALMEIDA et al., 2009; CAO et al., 2007; CHOI et al., 2009; FUNK et al., 1993; D'AVILA et al., 2006). Em adição, foi demonstrado, em macrófagos, que o TLR2 é capaz de regular o aumento da expressão do fator de transcrição PPAR- γ (ALMEIDA et al., 2009), que regula a expressão de proteínas envolvidas na captação de lipídeos nestas células. Recentemente, foi demonstrada a capacidade dos ácidos graxos livres ativarem, principalmente, os receptores TLR2 e TLR4 (BONI-SCHNETZLER et al., 2009; LEE et al., 2004; SHI et al., 2006; NGUYEN et al., 2007). Contudo, não há estudos do envolvimento desses receptores na resposta inflamatória induzida por fosfolipases A₂. Neste sentido, torna-se imprescindível avaliar a participação desses receptores na formação de corpúsculos lipídicos e na síntese de mediadores lipídicos e citocinas induzidos pela MT-III em macrófagos e monócitos.

2 OBJETIVOS

Gerais

Este estudo tem por objetivo avaliar a participação de fatores da homeostasia lipídica na formação de corpúsculos lipídicos e produção de mediadores pró-inflamatórios, induzidos pela MT-III, uma fosfolipase A₂ de veneno ofídico, em macrófagos murinos. Além disso, evidenciar a ação desta fosfolipase A₂ em monócitos humanos, quanto à formação de corpúsculos lipídicos, liberação de ácidos graxos e dos produtos provenientes desta ação.

Específicos

A partir de ensaios *in vitro*, foram avaliados os efeitos da MT-III:

- Em macrófagos murinos, quanto:
 - ✓ à participação dos receptores e fatores de transcrição PPAR- γ e $-\beta/\delta$ na formação de corpúsculos lipídicos e na expressão da PLIN2;
 - ✓ à expressão e ativação dos receptores e fatores de transcrição PPAR- γ e $-\beta/\delta$;
 - ✓ participação do receptor *scavenger* CD36 na formação de corpúsculos lipídicos e na síntese de PGE₂;
 - ✓ à expressão proteica do receptor *scavenger* CD36;
 - ✓ à participação das enzimas diacilglicerol aciltransferase - DAGT e da acil-colesterol-acil transferase, envolvidas na síntese de triacilglicerol e colesterol, respectivamente, na formação de corpúsculos lipídicos;
 - ✓ à ativação do fator de transcrição SREBP-2;
 - ✓ à participação do receptor *toll-like* 2 (TLR2) e da proteína adaptadora MyD88, na formação de corpúsculos lipídicos, na expressão e distribuição da PLIN2 e produção dos mediadores lipídicos PGE₂, PGD₂ e LTB₄ e das citocinas IL-1 β e IL-10.
 - ✓ à liberação dos ácidos graxos palmítico e oleico.
- Em monócitos humanos, quanto:
 - ✓ à formação de corpúsculos lipídicos;

- ✓ ao aumento dos níveis intracelulares dos lipídeos neutros diacilglicerol, triacilglicerol e colesterol;
- ✓ composição de ácidos graxos dos lipídeos neutros;
- ✓ à participação do processo de reacilação de ácidos graxos na formação de corpúsculos lipídico e expressão da PLIN2;
- ✓ à ação sobre fosfolipídeos de membrana, quanto ao conteúdo e composição de ácidos graxos;
- ✓ às alterações dos níveis de ácidos graxos livres e à participação de fosfolipase A₂ citosólica neste efeito;
- ✓ à ação sobre espécies de glicerofosfolipídeos de membrana celular fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilcolina (PC) e fosfatidilinositol (PI) associados ao ácido araquidônico;
- ✓ à formação de lisofosfatidiletanolamina (LPE), lisofosfatidilcolina (PC) e lisofosfatidilinositol (PI);
- ✓ expressão gênica das enzimas FAS (ácido graxo sintase), SCD (desaturase estearoil-CoA), ELOVL6 (alongase de ácidos graxos de cadeia muito longa), ACC (carboxilase acetil-CoA) e para os fatores de transcrição SREBP-1c (proteína 1c ligadora do elemento regulado por esteróis) e SREBP-2 (*proteína 2 ligadora do elemento regulado por esteróis*) essenciais para a síntese de triacilglicerol e colesterol, respectivamente.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais: Foram utilizados camundongos da linhagem Swiss ou da linhagem C57BL/6 ou C57BL/6 TLR2^{-/-} ou MyD88^{-/-}, machos, de peso compreendido entre 18 a 20 g, mantidos sob temperatura e período de luz controlados, com água e alimentação *ad libitum* até o momento dos experimentos (Comitê ética Protocolo: 744/11).

Obtenção dos macrófagos peritoneais de camundongos: Os macrófagos foram obtidos da cavidade peritoneal após 96 horas da injeção i.p. de 1 mL de solução estéril de tioglicolato (3%). Para a coleta das células, os animais foram mortos por exposição a concentrações tóxicas de CO₂ e a cavidade peritoneal lavada com 3 mL de solução salina tamponada com fosfato (PBS, NaCl 14 mM, NaH₂PO₄H₂O 2 mM, Na₂HPO₄12H₂O 7 mM, pH 7,2). O lavado, coletado, foi centrifugado a 129 x g por 6 minutos e o sobrenadante descartado. Uma alíquota do lavado foi colhida para a determinação do número de macrófagos peritoneais, em hemocítômetro de Neubauer, ao microscópio de luz, após diluição (1:20, v/v) em líquido de Turk (0,2% de cristal violeta em 30% de ácido acético). A seguir, o precipitado celular foi ressuspensionado em PBS e foram efetuadas as diluições necessárias para cada ensaio.

Adesão dos macrófagos peritoneais de camundongos: Os macrófagos foram coletados como descrito no item 4.1 e a suspensão de macrófagos foi ajustada para 2×10^5 cels/50 mL. Lamínulas de vidro foram colocadas em microplacas de cultura celular de 24 poços e, sobre essas lamínulas, ~~será~~ foram adicionados 50 mL de PBS contendo 2×10^5 macrófagos, mantidos a 37 °C e 5% CO₂, por 30 minutos, para aderência.

3.2 Monócito Humanos - foram isolados de doadores voluntários saudáveis obtidos no Centro de Hemoterapia y Hemodonación de Castilla y León (Valladolid, Espanha). O termo de consentimento foi obtido de cada doador. As células do sangue foram diluídas em PBS (1:1), e então alíquotas foram aplicadas sobre uma camada de Ficoll-Paque e centrifugado a 750 g por 30 min. A camada celular mononuclear foi recuperado e lavado três vezes com PBS, ressuspensas em meio RPMI 1640 suplementado com 40 g/ml de gentamicina. A seguir, os monócitos foram aderidos em placas de petri estéreis, por 2 h, a 37 °C e 5% CO₂ em atmosfera úmida. As células não aderentes foram removidas por lavagens com PBS e os monócitos aderidos foram estimulados com os diferentes estímulos após 18h.

3.3 Fosfolipase A₂: A fosfolipase A₂ miotóxica, MT-III (FLA₂-Asp-49), isolada do veneno da serpente *Bothrops asper*, ~~será~~ foi fornecida pelos Drs. José Maria Gutiérrez e Bruno Lomonte,

do Instituto Clodomiro Picado, da Universidade da Costa Rica, Costa Rica. A toxina MT-III foi purificada de acordo com a metodologia proposta por KAISER et al., (1990) e liofilizada. A homogeneidade foi comprovada por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), sob condições redutoras (LAEMMLI, 1970). A ausência de endotoxinas foi avaliada no lote da MT-III utilizado por meio do teste quantitativo de LAL [41], que revelou níveis indetectáveis de endotoxinas ($< 0,125$ EU/ml) (em anexo).

Amostra da MT-III, do lote utilizado neste estudo, foi aplicada em Gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) sob condições redutoras. Observa-se uma única banda de peso 12 kDa.

3.4 Ensaio da Redução do brometo de 3, 4,5-dimetiltiazol – 2il 2,5- difenil tetrazol (MTT):

A atividade metabólica das células foi avaliada pelo método da redução do MTT. Após cada período de incubação com os diferentes compostos, em diferentes concentrações, ou RPMI apenas (controle), as células foram centrifugadas a $129 \times g$, por 6 minutos e o sobrenadante de cada amostra foi retirado. A seguir, foram acrescentados, em cada poço, 90 μ L de meio RPMI e 10 μ L de MTT, em solução a 5 mg/mL, tamponada. Em seguida, as células foram incubadas a 37 °C, em estufa a 5% de CO₂, por 3 horas. Para dissolver os cristais de formazan, oriundos da redução do MTT, pelas células viáveis, foram adicionados 100 μ L de dimetil sulfóxido (DMSO). A seguir, efetuou-se a leitura da densidade ótica (D.O.), a 540 nm. A atividade metabólica foi definida como a porcentagem de diminuição da D.O., observada nas células submetidas à ação dos agentes, em relação aos macrófagos controles.

3.5 Quantificação dos corpúsculos lipídicos: Os macrófagos, aderidos às lamínulas de vidro,

como descrito no item 4.1, foram fixados com 1 mL de formaldeído tamponado (3,7%), por 15 minutos. Posteriormente, as lamínulas, foram lavadas e adicionadas de 50 μ L de tampão fosfato (0,2M)/lamínula, seguido de 50 μ L de tetróxido de ósmio a 2%, por 30 minutos. Após lavagem em água destilada, as lamínulas foram imersas em 1% de tiocarboxidrazida, por 5 minutos e novamente lavadas em tampão cacodilato. Posteriormente, as lamínulas foram coradas com tetróxido de ósmio, a 1%, por 3 minutos e lavadas em água destilada. A seguir, as lamínulas foram montadas em lâminas de microscópio. Os corpúsculos lipídicos, formados no interior dos macrófagos, foram contados, em um total de 50 células por campo, sob o microscópio de contraste de fase.

3.5.1 Coloração fluorescente dos Corpúsculos Lipídicos

Os monócitos foram plaqueados em lamínulas de vidro e após 18h foram estimulados com a MT-III (0,4 μ M), por 1 ou 6 h. A seguir, as células foram lavadas com PBS e fixadas com 1 ml de paraformaldeído a 4% em PBS, por 20 min. Após, o paraformaldeído foi removido por lavagens com PBS (3x) e corados com Nile Red (solução mãe 1mg/mL em DMSO – uso 1:200 em PBS) e DAPI (1 μ g/mL), por 10 min. As lamínulas foram montadas em lâminas para microscopia com antifade *Fluoromount G* (Life Technology) e analisadas sob o microscópio confocal Leica TCSSP5.

3.6 Determinação da localização dos receptores e/ou fatores de transcrição PPAR- γ e PPAR- δ/β por imunofluorescência

As lamínulas, contendo macrófagos aderidos, incubados ou não com a MT-III, foram lavadas, duas vezes, em tampão fosfato 0,1M (PB), por 5 min. Após lavagem, as lamínulas foram fixadas com para-formaldeído a 2%, diluído em tampão fosfato (PB) 0,1 M: Triton X-100 0,2% (v/v), por 20 min. Após fixação, as lamínulas foram lavadas, por três vezes, em tampão PB 0,1 M, por 5 min, a frio. A seguir, as lamínulas foram bloqueadas com albumina bovina (BSA) 1%, diluída em tampão PB 0,1 M: Triton X-100 0,2% (v/v), por 30 min, a 37 °C. A seguir, os macrófagos presentes nas lamínulas foram incubados com anticorpo primário de coelho anti- PPAR- γ ou anti- PPAR- δ/β de camundongo (Santa Cruz Biotechnology), na diluição 1:200 (v/v), em tampão PB 0,1 M com BSA 1% e Triton X-100 0,2% (v/v), por 1 h, a 37 °C. A seguir, as lamínulas foram lavadas três vezes, em tampão PB 0,1 M e os macrófagos presentes nas lamínulas foram incubados com anticorpo secundário complexado com Alexa Fluor 488, anti-coelho, na diluição 1:300 (v/v), em tampão PB 0,1 M : BSA (1%) e Triton X-100 0,2%,

por 1 h, a temperatura ambiente. Após três lavagens, em tampão PB 0,1 M, por 5 min cada, as lamínulas foram incubadas com o marcador nuclear iodeto de propídeo, diluído em fluoromount G a 1:200 (v/v), à temperatura ambiente. As lamínulas foram montadas em lâminas para microscopia e analisadas ao microscópio de varredura laser confocal Zeiss LSM 510 Meta.

3.7 Análise por *Western blotting*: Macrófagos, aderidos a placas de 12 poços, foram incubados com MT-III (0,4 μ M) ou RPMI (controle) por diferentes períodos de tempo. Para a determinação do teor proteico dos receptores PPAR- γ , PPAR- β/δ , CD36, da proteína PLIN2 e do fator de transcrição SREBP-2, os macrófagos foram ressuspensos em 80 μ L de tampão Laemmli, pH 7,4 e fervido durante 10 min. Foram separados 50 μ L para a dosagem de proteínas. A seguir, 25 μ L de cada amostra, com quantidades de proteínas que variaram de 50 a 250 μ g, foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida 10% e lauril sulfato de sódio 0.1% (SDS – PAGE), para a detecção das proteínas de interesse. Para tanto, uma amperagem constante de 25mA e voltagem de 100-190 V foram aplicados durante 2 h, aproximadamente. Posteriormente, as bandas protéicas foram transferidas eletroforéticamente, em sistema molhado, para uma membrana de nitrocelulose, aplicando-se uma amperagem constante de 150 mA e voltagem de 100 V, durante 2 h. Os sítios inespecíficos foram bloqueados com albumina 5% em TBS contendo 0.1% de Tween-20, pH 7,4), durante 1h. A seguir, as membranas foram incubadas com os anticorpos primários (Santa Cruz) anti-PPAR- γ ou - PPAR- β/δ , ou CD36 (R&D Systems), ou anti-SREBP-2 (ABCAM), durante 18 h a 4 °C ou (Research Diagnostic) anti-PLIN2 por 1 h, a temperatura ambiente. Para o controle do *Western blotting*, as membranas foram incubadas também com anticorpo monoclonal anti- β -actina (Sigma Aldrich). Em seguida, foram adicionados os segundos anticorpos, conjugados à peroxidase (Amersham Pharmacia Biotech). As bandas imunoreativas foram reveladas por quimiluminescência, com solução de luminol (Amersham Pharmacia Biotech) e, em seguida, reveladas em filme (Amersham Pharmacia Biotech), em câmara escura. As densidades das bandas foram analisadas no Densitômetro GS 800 (Bio Rad Laboratories), empregando o *software Molecular Analyst* (Bio Rad Laboratories).

3.8 Determinação da concentração de PGE₂, PGD₂, PGJ₂ e LTB₄ por ensaio imunoenzimático (EIA)

A quantificação da PGE₂, PGD₂, PGJ₂ e do LTB₄ foi realizada por ensaio imunoenzimático (EIA), utilizando-se um kit comercial (Cayman Chemicals). Após a incubação das células com a toxina, em concentração não-citotóxica (0,4 μ M) ou meio de cultura RPMI

apenas (controle negativo), as microplacas foram centrifugadas a 200 g por 10 minutos e os sobrenadantes coletados. Aliquotas, contendo 50 µL de cada amostra foram adicionadas a microplacas de 96 poços e incubadas com igual volume do prostanóide conjugado à acetilcolinesterase e antisoro específico de coelho. Após a adição do substrato, a absorbância das amostras foi determinada em espectrofotômetro (Labsystem Multiscan®) a 405 nm e as concentrações estimadas a partir da curva padrão específica, em concentrações representadas em pg/mL.

3.9 Extração de RNA e análise por reação em cadeia da polimerase por transcrição reversa em tempo real

A detecção do RNAm das proteínas de interesse foram realizadas por meio da reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa em tempo real (qPCR). Para tanto, 5×10^6 monócitos humanos/ml incubados com MT-III ou RPMI foram homogeneizados com Trizol, à temperatura ambiente.. Após, as amostras foram precipitadas com 100 µL de clorofórmio e centrifugadas a 12.000 x g, por 15 min, a 4 °C, para a separação do RNA total e de proteínas. A fase aquosa, contendo o RNA, foi removida e precipitada com 250 µL de álcool isopropílico, durante 15min, a 4 °C. As amostras foram centrifugadas a 12.000 x g por 15 min, a 4 °C e os precipitados foram lavados com etanol 75%. Após nova centrifugação (8000 x g, 5 min, a 4 °C), o álcool foi removido e os precipitados secos, à temperatura ambiente. As amostras foram solubilizadas em água tratada com dietilpirocarbonato (DEPC) e a concentração e pureza do RNA total calculadas por espectrofotometria, a 260 nm e por meio da relação A_{260}/A_{280} , respectivamente.

Ensaio de qPCR: Para a geração do cDNA, por transcrição reversa, 1 µg de RNA total foi incubado com 1 µL de Oligo dTs (0,05µg/µL), 1 µL de SuperScript™ II Reverse Transcriptase e completado para 20 µL com água DEPC e as amostras colocadas no termociclador por 10 minutos a 70 °C, 50 min a 42 °C, 15 min a 70 °C e 20 min a 37 °C. Para o PCR quantitativo, 20 ng dos cDNAs, 10µL de *SYBR Green* (concentrado 2X) e 450 nM das oligossondas de interesse, mencionadas na tabela abaixo, foram amplificados utilizando-se 1 µL da enzima Taq DNA polimerase 2,5 U, MgCl a 1,25mM, dNTPs Mix, a 0,2mM, e em um volume final de 20µL por poço. Todas as reações de amplificação, utilizando o *SYBR Green* qPCR supermix, foram realizadas em termociclador (Applied Biosystems - Onestep plus) e compostas de controles negativos.

A análise da amplificação gênica, pela PCR em tempo real, foi realizada utilizando-se a

forma de quantificação relativa (LIVAK e SCHMITTGEN, 2001). A partir dos valores de C_T encontrados, foi calculado o valor de $2^{-\Delta\Delta C_t}$:

$$2^{-\Delta\Delta C_t} = \frac{(1+E)^{-\Delta C_t} \text{ do gene alvo}}{(1+E)^{-\Delta C_t} \text{ do gene controle}}$$

onde E = eficiência da reação de PCR;

ΔC_t do gene alvo = diferença entre o valor de C_T da amostra desconhecida e da amostra controle para este gene;

ΔC_t do gene controle = diferença entre o valor de C_T da amostra desconhecida e da amostra controle para este gene.

Primers específicos para cada gene Humano: acetil-CoA carboxilase (ACC) - 5'-tcacacctgaagaccttaaagcc-3' (sense) e 5'-agccacactgctgtactg-3' (nonsense); sintase de ácidos graxos (FAS) - 5'-acagcggggaatgggtact-3' (sense) e 5'-gactggtacaacgagcggat-3' (nonsense); estearoil-CoA desaturase (SCD) - 5'-ttcctacctgcaagtctacacc-3' (sense) e 5'-ccgagctttgtaagagcgg-3' (nonsense); elongase de ácidos graxos de cadeia longa (ELOVL6) - 5'-aacagcaaaagttgtaactgagg-3' (sense) e 5'-tcgaagagcaccgaatatactga -3' (nonsense); PLIN2 5'-ttgcagttgccaatacctatgc-3' (sense) e 5'-ccagtcacagtagtcgtcaca-3. Camundongo: PLIN2 5'-ctgtctaccaagctctgctc-3' (sense) e 5'-cgatgcttctcttcactcc-3' (nonsense).

Todas as amplificações foram realizadas com a curva de dissociação, “melting”, a qual será realizada para verificar a especificidade da amplificação e confirmar a ausência de formação de dímeros de oligossondas ou qualquer outro produto inespecífico.

3.10 Análise de ácidos graxos metilados por cromatografia gasosa acoplada ao espectrofotômetro de massa e dos fosfolídeos e lisofosfolídeos de membrana por HPLC/ espectrofotômetro de massa

Após as incubações, as células foram lavadas duas vezes com PBS e então as células (1×10^7 de monócitos humanos) foram raspadas em água deionizada gelada e sonicada duas vezes, por 15 segundos. Antes da extração e separação das classes de lipídeos, padrões internos foram adicionados. Foi adicionado para os fosfolídeos totais - 10 nmol de 1,2-diheptadecanoil-sn-glicerol-3-fosfocolina, para triacilglicerol (TAG) e diacilglicerol (DAG) - 10 nmol de 1,2,3-triheptadecanoilglicerol, para colesterol ester (CE) - 30 nmol decolesteril tridecanoato e para os ácidos graxos livres (AGLs) 20 nmol de ácido oleico. Os lipídeos totais foram extraídos de acordo com Bligh e Dyer (1959) e o extrato de lipídeos resultante foi separado por cromatografia

em camada delgada usando n-hexano / éter dietílico / ácido acético (70:30:1, v/v) como fase móvel. Os pontos correspondentes às diferentes classes lipídicas foram raspadas e os fosfolípidos foram extraídos, a partir da sílica, com 800 µl de metanol seguido de 800 µl de clorofórmio/metanol (1:2, v/v) e 500 µl clorofórmio/metanol (2:1, v/v). CE, TAG, DAG e AGLs, foram extraídas com 1 ml de clorofórmio/metanol (1:1, v/v) seguido de 1 ml de clorofórmio/metanol (2:1, v/v). Glicerolípidos foram transmetilados com 500 µl de 0,5 M de KOH em metanol, por 30 min a 37 °C. Para neutralizar, 500 µl de HCl (0,5 M) foi adicionado. Os ésteres de colesterol foram transmetilados com 400 µl de propionato de metilo e 600 µl de KOH (0,84 M em metanol) por 1 h, a 37 °C. Após, 50 µl de ácido acético e 1 ml de água deionizada foram adicionados para neutralizar a reação. A seguir, os ácidos graxos metilados foram extraídos com 2 ml de n-hexano.

A análise dos ácidos graxos metilados foi realizada em um cromatógrafo a gás *Agilent®* 7890A acoplado a um detector de massa seletivo 5975C da *Agilent®* operado em modo de impacto de elétrons (70 eV) e equipado com um automatizador de amostras *Agilent®* 7693 e coluna Agilent DB23 (60 m de comprimento x 250 µm diâmetro interno x 0,15 µm de espessura de filme) nas condições descritas anteriormente com uma ligeira modificação catiónica do processo para melhorar a separação dos ésteres metílicos dos ácidos graxos. De modo rápido, a temperatura foi mantida a 50 °C durante 1 min, elevada para 175 °C a uma taxa de 25 °C/min, aumentada para 215 °C a uma taxa de 1,5 °C/min, com a rampa final a 235 °C a uma taxa de 10 °C/min. A temperatura final foi mantida por 5 min e o tempo de funcionamento foi de 39,67 min. A análise dos dados foi realizada no *software* da *Agilent* MSD G1701EA *Productivity Chemstation*.

Para a quantificação dos fosfolípidos e dos lisofosfolípidos de membrana em monócitos sob efeito da fosfolipase A₂ em estudo, o extracto celular correspondente a 5.10⁶ células foi utilizado para estas análises. Os padrões internos para os fosfolípidos foram 600 pmol de 1,2-dipentadecanoil-sn-glicero-3-fosfocolina, 1,2-dilauroil-sn-glicero-3-fosfo-etanolamina e 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-phosphoinositol adicionados antes da extração dos lípidos, de acordo com o método de Bligh e Dyer (ASTUDILLO et al, 2011). Após a evaporação do solvente orgânico sob vácuo, 80 µl de extrato dos lípidos foi dissolvido em 100 µl de metanol / água 9:1 e injetados em um High-Performance Cromatógrafo Líquido equipado com uma bomba de binário Hitachi LaChrom Elite L-2130 em conjunto com um amostrador automático Hitachi L -2200 (Merck). A coluna foi uma Supelcosil LC-18 (250 x 2,1 mm, 5 µm de tamanho de partícula) protegido com um Supelguard LC-18 (20 x 2,1 mm) do cartucho de guarda (Sigma-Aldrich). A fase móvel foi usado em um gradiente de solvente A (hidróxido de amônio/ metanol

/ água / n-hexano 32%, 87,5: 10,5: 1,5: 0,5, v / v / v / v) e solvente B (metanol / n-hexano / hidróxido de amônio 32%; 87,5; 12; 0,5, v / v / v). Um solvente complementar C (metanol / água, 9:1, v / v) foi utilizado para lavar a coluna entre as amostras. O gradiente foi iniciado a 100% de solvente A; foi diminuído para 65% de solvente A e 35% de solvente B em 20 min, a 10% de solvente A e 90% de solvente B em 5 min e a 0% de solvente A e 100% de solvente B em um adicional de 5 min.

PE e PI foram detectados em modo de ionização negativo em uma corrente capilar configurada a 3500 V nos primeiros 25 min iniciais da corrida cromatográfica $[M - H]^-$. As espécies de PC foram detectados sobre a segunda metade do processo cromatográfico em modo de ionização positivo ao longo do intervalo de eluição de 25 a 35 minutos no modo de ionização positivo, como $[M + H]^+$, com uma corrente capilar configurada a -3500 V. A determinação dos fosfolípidos foi realizada através de experimentos de espectrometria de massa *en tandem* (MS / MS) com o método MRM (multiple reaction monitoring) (Balgoma et al., 2010a). Os lisofosfolídeos foram determinados de modo similar, utilizando 200 pmol dos padrões 1-tridecanoil-sn-glicero-3-fosfocholina e 1-miristoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina.

A quantificação foi realizada por integração dos picos cromatográficos de espécies de fosfolípidos ou lisofosfolídeos previamente identificadas comparando com uma curva de calibração externa feita com padrões analíticos.

3.11 Liberação do ácido palmítico e oleico em macrófagos

Os macrófagos foram pré-incubados com 0,1 $\mu\text{Ci/ml}$ de $[^{14}\text{C}]$ ácido palmítico ou $[^{14}\text{C}]$ ácido oleico, por 18 h. A seguir, as células foram lavadas quatro vezes com PBS contendo 0,5% de albumina para remover o ácido graxo não incorporado. Após, as células foram estimuladas com a MT-III (0,4 μM), por 6 h, e então raspadas com 0,1% de Triton X-100 em PBS e uma alíquota de 400 μL foi misturado ao líquido de cintilação (3 mL). O sobrenadante foi coletado e centrifugado a 130 g e uma alíquota de 500 μL foi misturado ao líquido de cintilação (3 mL). A análise foi realizada em um contador de radioatividade. O valor obtido no sobrenadante (liberado) somado ao valor obtido nas células obteve-se o total de ácido graxo marcado. Para se obter a quantidade de ácido palmítico ou oleico liberado foi realizado a divisão do valor obtido no sobrenadante das células incubadas ou não com a MT-III pelo valor total (sobrenadante + célula).

3.12 Intervenções Farmacológicas : Para avaliar a participação dos receptores e ou fatores de

transcrição PPAR- γ e PPAR- β/δ , bem como da enzima ácido graxo-sintase, no aumento da expressão proteica da PLIN2 e na formação de corpúsculos lipídicos, respectivamente, induzidos pela MT-III-sFLA₂, foram utilizados antagonistas e inibidores específicos.

Abaixo estão indicados os compostos, as concentrações e o tempo de incubação utilizados antes da adição da MT-III:

- ✓ GW9662 (10 μ M), por 1 hora, antagonista do receptor PPAR- γ (ZHANG *et al.*, 2004);
- ✓ GSK660 (10 μ M), por 1 hora, antagonista do receptor PPAR- β/δ ;
- ✓ C75(1 μ M), por 30 min, inibidor a ácido graxo sintase (MATTOS *et al.*, 2001);
- ✓ A-922500 (100 nM), por 1 hora, inibidor da enzima DGAT – ZAHO *et al.*, 2008; KING *et al.*, 2009;
- ✓ TMP-153 (100 nM), por 1 horas, inibidor da enzima ACAT – SUGIYAMA *et al.*, 1995.
- ✓ Sulfosuccinimidil oleato de sódio (S.S.O – 25 μ M), por 30 min, inibidor da captação de ácido graxo pelo receptor CD36 (HARMON *et al.*, 1991).
- ✓ Triacsina C (3 μ M), por 30 min, inibidor da reacilação de ácido graxo (GUIJAS *et al.*, 2012).

3.13 Análise estatística: Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão (E.P.M.). Foi empregada a análise de variância (Two Way ANOVA), com elementos repetidos, ou *t*-Student. Nível de significância adotado: 0,05 ($p < 0,05$).

4 RESULTADOS

4.1 Ativação dos fatores de transcrição PPAR- γ e PPAR- δ/β induzida pela MT-III em macrófagos

Para avaliar a capacidade da MT-III ativar os receptores e fatores de transcrição PPAR- γ e PPAR- δ/β , os macrófagos, aderidos a lamínulas de vidro, foram incubados com a MT-III (0,4 μ M), ou RPMI apenas (controle), por 3 ou 12 horas. A seguir, os macrófagos foram processados para a marcação desses fatores por imunofluorescência. Os fatores PPAR- γ e PPAR- δ/β foram marcados em verde e o núcleo em vermelho.

A Figura 1A ilustra a marcação para o PPAR- γ (em verde) em macrófagos controles. Não houve co-localização desse fator com o núcleo (em vermelho), nos dois períodos de tempo avaliados. Em macrófagos incubados com a MT-III (0,4 μ M), por 3 horas, observou-se a marcação para o PPAR- γ , colocalizada com a marcação do núcleo, indicando a migração desse fator para a região nuclear. No entanto, após 12 horas de incubação com a MT-III, não foi observada a marcação do PPAR- γ colocalizada com a do núcleo.

A Figura 1B ilustra macrófagos incubados com RPMI (controle) e imunomarcados para PPAR- δ/β . Nesta condição, não se observou marcação deste fator colocalizada com a marcação do núcleo, após 3 ou 12 horas de incubação. No entanto, a incubação das células com a MT-III (0,4 μ M) causou uma forte marcação desse fator, colocalizada com a marcação do núcleo, a partir da 3^o hora e mantida até a 12^o hora, indicando a migração do mesmo para o núcleo celular.

Figura 1A Ativação do receptor e fator de transcrição PPAR- γ induzida pela MT-III em macrófagos. Macrófagos coletados da cavidade peritoneal de camundongos *Swiss* machos, 96h após a injeção de tioglicolato a 3 %, aderidos a lamínulas de vidro foram incubados com RPMI (controle) ou com a MT-III (0,4 μ M), por 3 ou 12 horas a 37 °C a 5% CO₂. A seguir, as células foram marcadas com anti-PPAR- γ complexado com fluoróforo ALEXA488. Os núcleos foram corados com iodeto de propídeo e a análise efetuada sob microscópio confocal, como descrito em Material e Métodos.

Figura 1B Ativação do receptor e fator de transcrição PPAR- δ/β induzida pela MT-III em macrófagos. Macrófagos coletados da cavidade peritoneal de camundongos *Swiss* machos, 96 h após a injeção de tioglicolato a 3 %, aderidos a lamínulas de vidro foram incubados com RPMI (controle) ou com a MT-III (0,4 μ M), por 3 ou 12 horas a 37 °C a 5% CO₂. A seguir, as células foram marcadas com anticorpo anti-PPAR- δ/β complexado com fluoróforo ALEXA488. Os núcleos foram corados com iodeto de propídeo e análise sob microscópio confocal, como descrito em Material e Métodos.

4.2 Participação dos receptores e fatores de transcrição PPAR- γ e PPAR- δ/β na expressão proteica da perilipina 2 (PLIN2) induzida pela MT-III em macrófagos

Para avaliar a participação dos receptores e/ou fatores de transcrição PPAR- γ e PPAR- δ/β na expressão proteica da PLIN2, induzida pela MT-III, os macrófagos (2×10^6 células), aderidos a microplacas de 12 poços, foram pré-incubados com o composto GW9662 (10 μ M), antagonista do receptor PPAR- γ , ou GSK0660 (10 μ M), antagonista do receptor PPAR- δ/β , ou com o veículo de ambos (>1 % DMSO/RPMI) ou RPMI apenas (controles negativos), por 1 hora e, então, estimulados com a MT-III (0,4 μ M), por 6 horas.

A Figura 2A mostra as bandas imunorreativas para a proteína PLIN2 ou para β -actina, em macrófagos controles ou estimulados pela MT-III. As bandas imunorreativas, correspondentes à PLIN2, foram detectadas tanto em macrófagos controles, quanto naqueles incubados com a MT-III, no período avaliado. No entanto, a análise densitométrica demonstrou que a intensidade das bandas imunorreativas para PLIN2, em homogenatos de macrófagos incubados com a MT-III (Figura 2B), foi significativamente maior (72%) em relação ao respectivo controle (RPMI). A incubação prévia dos macrófagos com o composto GW9662 não afetou a expressão proteica da PLIN2, em macrófagos controles, nem alterou a expressão induzida pela MT-III. No entanto, o tratamento prévio dos macrófagos com o GKS0660 aboliu o aumento do teor proteico da PLIN2 induzido por essa fosfolipase A₂.

Figura 2 Efeito da PLIN2 induzida pela MT-III em macrófagos. Os macrófagos peritoneais (2x10⁶ células), aderidos a placas de 12 poços, foram incubados com GW9662 (10 μM) ou GSK0660 (10 μM), ou veículo (>1 % DMSO/RPMI), por 1 hora. Após este período, os macrófagos foram incubados com a MT-III, por 6 horas, a 37 °C e 5% CO₂. **(A)**: Bandas imunorreativas representativas do *Western blotting* com anticorpo policlonal anti-PLIN2 (1:2000) e anticorpo monoclonal anti-β-actina (1:2000); **(B)**: Quantificação, por densitometria, das bandas da PLIN2, normalizadas a partir das bandas de β-actina. Os dados representam a média ± E.P.M. de 3-4 animais. * $p < 0,05$ em relação ao respectivo controle. # $p < 0,05$ em relação à MT-III+veículo (ANOVA).

4.3 Participação dos receptores e fatores de transcrição PPAR- γ e PPAR- δ/β na formação de corpúsculos lipídicos induzida pela MT-III em macrófagos

Para avaliar a participação dos receptores PPAR- γ e PPAR- δ/β na formação de corpúsculos lipídicos induzida pela MT-III, os macrófagos, aderidos a lamínulas de vidro, foram pré-incubados, por 1 hora, com o composto GW9662 (10 μ M), antagonista do receptor PPAR- γ , ou com o composto GSK0660 (10 μ M), antagonista do receptor PPAR- δ/β ou com o veículo de ambos (>1 % DMSO/ RPMI) ou RPMI apenas (controles negativos) e então estimulados com a MT-III (0,4 μ M) por 12 horas.

A Figura 3 mostra que os macrófagos incubados com RPMI, por 12 horas, na ausência ou presença dos veículos, apresentaram média de $2,37 \pm 0,19$ CLs/célula. A incubação com a MT-III, na concentração de 0,4 μ M, por 12 h, causou a formação de $7,02 \pm 0,33$ CLs/célula, que foi significativamente maior que os controles. A presença do veículo não alterou significativamente a formação de corpúsculos lipídicos induzida pela MT-III. Quando os macrófagos controles foram tratados com os compostos GW9662 ou GSK0660 (10 μ M), por 1 hora, não houve alteração do número basal de CLs ($2,39 \pm 0,08$ CLs/célula). Por outro lado, em células pré-tratadas com o composto GW9662 (10 μ M) e estimuladas com a MT-III, ocorreu uma redução significativa do número de corpúsculos lipídicos que foi de 74%, em relação ao controle positivo (MT-III). No entanto, o composto GSK0660, por sua vez, aboliu a formação de corpúsculos lipídicos induzida pela MT-III.

Figura 3 Efeito dos compostos GW9662 e GSK0660 na formação de corpúsculos lipídicos, induzida pela MT-III, em macrófagos. Os macrófagos coletados da cavidade peritoneal, 96 h após a injeção de tioglicolato a 3%, aderidos a lamínulas de vidro e cultivados em RPMI, foram incubados com GW9662 ou GSK0660 nas concentrações indicadas acima, ou com o veículo (>1 % DMSO/RPMI), por 1 hora. Após este período, os macrófagos foram incubados com a MT-III, por 12 horas a 37 °C e 5% CO₂. Os corpúsculos lipídicos foram corados com tetróxido de ósmio e quantificados sob microscópio de contraste de fase. Os dados representam a média ± EPM de 3-5 animais. * $p < 0,05$ em relação aos respectivos controles, # $p < 0,05$ em relação à MT-III+veículo (ANOVA).

4.4 Efeito da miotoxina III (MT-III) na expressão proteica dos receptores PPAR- γ e PPAR- δ/β em macrófagos

O teor proteico dos receptores PPAR- γ ou PPAR- δ/β foi analisado em macrófagos peritoneais isolados em cultura, após 1, 6, 12 e 24 horas da incubação com a MT-III (0.4 μ M) ou RPMI apenas (controle negativo).

As Figuras 4A e 4C mostram as bandas imunorreativas para PPAR- γ ou PPAR- δ/β , respectivamente, ou para β -actina, em macrófagos controles ou incubados com a MT-III. As bandas proteicas, correspondentes ao PPAR- γ ou ao PPAR- δ/β , foram detectadas tanto em células controles quanto naquelas incubadas com a MT-III, em todos os períodos avaliados. No entanto, a análise densitométrica demonstrou que a intensidade das bandas imunorreativas para PPAR- γ , ou para PPAR- δ/β , em homogenatos de macrófagos incubados com a MT-III (Figuras 4B e 4D, respectivamente) foram significativamente maiores que as dos respectivos controles, em todos os períodos de tempo analisados. Os aumentos percentuais médios, obtidos, foram de 45% para o PPAR- γ e de 74% para o PPAR- δ/β . Não houve diferença significativa entre ambos os receptores avaliados, no que se refere à magnitude do aumento do teor proteico, nos diferentes períodos de tempo estudados.

Figura 4 Efeito da MT-III na expressão proteica de PPAR-γ e PPAR-δ/β em macrófagos.

Macrófagos peritoneais (2×10^6 células), aderidos a placas de 12 poços, foram incubados com a MT-III (0,4 μM) ou meio de cultura apenas (Controle), por 1, 6, 12 e 24 horas, a 37 °C e 5% de CO₂. **(A)** e **(C)**: Bandas imunoreativas representativas do *Western blotting* com anticorpo policlonal anti-PPAR-γ ou PPAR-δ/β (1:500), respectivamente e anticorpo monoclonal anti-β-actina (1:2000).; **(B)** e **(D)**: Quantificação, por densitometria, das bandas de PPAR-γ ou PPAR-δ/β, respectivamente, normalizadas a partir das bandas de β-actina. Os dados representam a média ± E.P.M. de 4-5 animais. * $p < 0,05$ em relação aos respectivos controles (ANOVA).

4.5 Envolvimento dos receptores e fatores de transcrição PPAR- γ e PPAR- δ/β na liberação da prostaglandina E₂ induzida pela MT-III em macrófagos

Para avaliar a participação dos receptores e fatores de transcrição PPAR- γ e PPAR- δ/β na liberação da prostaglandina E₂ (PGE₂) induzida pela MT-III, os macrófagos (2×10^6 células), aderidos a microplacas de 12 poços, foram pré-incubados com o composto GW9662 (10 μ M), antagonista do receptor PPAR- γ , ou GSK0660 (10 μ M), antagonista do receptor PPAR- δ/β , ou com RPMI acrescido do veículo de ambos (>1 % DMSO - controle negativo), por 1 hora e então estimulados com a MT-III (0,4 μ M) por 6 horas.

A Figura 3 mostra que os macrófagos controles apresentaram uma liberação basal de $8233 \pm 418,2$ pg/mL de PGE₂ após 6 horas de incubação. A adição da MT-III causou aumento significativo da liberação desse prostanóide em 118%, se comparado ao controle negativo. O tratamento prévio dos macrófagos com GW9662 (10 μ M), antagonista do PPAR- γ , não alterou a liberação basal, nem o aumento da PGE₂ induzido pela MT-III. No entanto, o tratamento dos macrófagos com GSK0660 (10 μ M), antagonista do receptor PPAR- δ/β , reduziu, significativamente, em 16,67%, a liberação de PGE₂ induzida pela MT-III.

Figura 5 Efeito do composto GSK0660 e GW9662 na liberação da PGE₂, induzida pela MT-III, em macrófagos. Os macrófagos peritoneais (2×10^6 células), aderidos a placas de 12 poços, foram incubados com GW9662 (10 μ M) ou GSK0660 (10 μ M), ou com veículo (>1 % DMSO/RPMI), por 1 hora. Após este período, os macrófagos foram incubados com a MT-III, por 6 horas, a 37 °C e 5% CO₂. A seguir, os sobrenadantes de cada grupo foram coletados e os níveis da PGE₂ foram quantificados por ensaio imunoenzimático. Os dados representam a média $\pm$ E.P.M. de 3-4 animais. * $p < 0,05$ em relação ao respectivo controle negativo. # $p < 0,05$ em relação a MT-III (ANOVA).

4.6 Participação dos receptores e fatores de transcrição PPAR- γ e PPAR- δ/β no aumento do teor proteico da COX-2, induzido pela MT-III em macrófagos

Para avaliar a participação dos receptores e fatores de transcrição PPAR- γ e PPAR- δ/β no aumento do teor proteico da COX-2, induzida pela MT-III, os macrófagos peritoneais (2×10^6 células), aderidos a microplacas de 12 poços, foram pré-incubados com o composto GW9662 (10 μ M), antagonista do receptor PPAR- γ , ou GSK0660 (10 μ M), antagonista do receptor PPAR- δ/β , ou com RPMI acrescido do veículo de ambos (>1 % DMSO/ RPMI – controle negativo), por 1 hora e, então, estimulados com a MT-III (0,4 μ M) por 6 horas.

A Figura 6A mostra bandas imunorreativas para COX-2, obtidas a partir do precipitado celular dos macrófagos incubados com a MT-III ou meio de cultura apenas (controle). As bandas proteicas para COX-2 foram identificadas em todos os precipitados celulares analisados. No entanto, a análise densitométrica demonstrou que a intensidade das bandas imunorreativas para COX-2, em macrófagos incubados com a MT-III ($0,3730 \pm 0,022$), foi significativamente maior quando comparada ao respectivo controle ($0,1834 \pm 0,009$). O tratamento prévio dos macrófagos com GW9662 (10 μ M), antagonista do PPAR- γ , ou GSK0660 (10 μ M), antagonista do receptor PPAR- δ/β , não alterou, de modo significativo, a expressão proteica basal da COX-2 nem o aumento induzido pela MT-III (figura 6B).

Figura 6 Efeito do composto GSK0660 e GW9662 na expressão proteica da COX2, induzida pela MT-III, em macrófagos. Os macrófagos peritoneais (2×10^6 células), aderidos a placas de 12 poços, foram incubados com GW9662 (10 μ M) ou GSK0660 (10 μ M), ou veículo (>1 % DMSO/RPMI), por 1 hora. Após este período, os macrófagos foram incubados com a MT-III, por 6 horas a 37 °C e 5% CO₂. **(A)**: Bandas imunorreativas representativas do *Western blotting* com anticorpo poli clonal anti-COX-2 (1:2000) e anticorpo monoclonal anti-β-actina (1:4000); **(B)**: Quantificação, por densitometria, das bandas da COX-2 normalizadas a partir das bandas de β-actina. Os dados representam a média $\pm$ E.P.M. de 4-5 animais. * $p < 0,05$ em relação ao respectivo controle (ANOVA).

4.7 Efeito da miotoxina III (MT-III) na expressão proteica do receptor CD36, em macrófagos

O teor proteico do receptor *scavenger* CD36 foi analisada em macrófagos peritoneais isolados, em cultura, após 6, 12 e 24 horas da incubação com a MT-III (0.4 μ M) ou RPMI apenas (controle negativo).

As Figuras 7A e 7C mostram as bandas imunorreativas para CD36, respectivamente, ou para β -actina, em macrófagos controles ou incubados com a MT-III. As bandas proteicas, correspondentes ao CD36, foram fracamente detectadas em células controles se comparadas àquelas incubadas com a MT-III, por 6 e 12 horas. A análise densitométrica demonstrou que a intensidade das bandas imunorreativas para CD36, em homogenatos de macrófagos incubados com a MT-III (Figuras 7B e 7D, respectivamente) foram significativamente maiores que as dos respectivos controles, em todos os períodos de tempo analisados. Os aumentos percentuais médios obtidos, foram de 77 e 27% para o CD36, em macrófagos incubados com a MT-III, por 6 e 12 horas, respectivamente.

Figura 7 Efeitos da MT-III na expressão proteica do CD36 em macrófagos. Os macrófagos peritoneais (2×10^6 células), aderidos a placas de 12 poços, foram incubados com a MT-III (0,4 μ M) ou meio de cultura apenas (Controle), por 6, 12 e 24 horas, a 37 °C e 5% de CO₂. (A): Bandas imunorreativas representativas do *Western blotting* com anticorpo policlonal anti-CD36 (1:1000) e anticorpo monoclonal anti- β -actina (1:2000); (B): Quantificação, por densitometria, das bandas do CD36, normalizadas a partir das bandas de β -actina. Os dados representam a média $\pm$ E.P.M. de 4-5 animais. * $p < 0,05$ em relação ao controle e & $p < 0,05$ em relação a MT-III 6h (ANOVA).

4.8 Efeito do antagonista do receptor CD36 (SSO) na formação de corpúsculos lipídicos induzida pela MT-III, em macrófagos

Para avaliar a participação do receptor CD36 na formação de corpúsculos lipídicos induzida pela MT-III, os macrófagos, aderidos a lamínulas de vidro, foram pré-incubados, por 30 minutos, com o composto oleato de sulfosuccinimidil sódico (SSO) 25 μ M, antagonista do receptor CD36, ou com RPMI acrescido do veículo (>1 % DMSO/RPMI) e então estimulados com a MT-III (0,4 μ M) por 12 horas.

A Figura 8 mostra que os macrófagos incubados com RPMI, por 12 horas, na ausência ou presença do veículo, apresentaram média de $1,24 \pm 0,14$ CLs/célula. A incubação com a MT-III, na concentração de 0,4 μ M, por 12 h, causou a formação de $5,21 \pm 0,8$ CLs/célula, que foi significativamente maior que os controles. A presença do veículo não alterou significativamente a formação de corpúsculos lipídicos induzida pela MT-III. Quando os macrófagos controles foram tratados com o composto S.S.O- 25 μ M, por 30 minutos, não houve alteração do número basal de CLs ($0,82 \pm 0,20$ CLs/célula). Por outro lado, este pré-tratamento das células aboliu a formação de corpúsculos lipídicos induzida pela MT-III.

Figura 8 Efeito do composto SSO na formação de corpúsculos lipídicos, induzida pela MT-III, em macrófagos. Os macrófagos coletados da cavidade peritoneal, 96 h após a injeção de tioglicolato a 3%, aderidos a lamínulas de vidro e cultivados em RPMI, foram incubados com SSO (25 μ M), ou com RPMI acrescido do veículo (>1 % DMSO/RPMI), por 30 minutos. Após este período, os macrófagos foram incubados com a MT-III, por 12 horas a 37 °C e 5% CO₂. Os corpúsculos lipídicos foram corados com tetróxido de ósmio e quantificados sob microscópio de contraste de fase. Os dados representam a média $\pm$ EPM de 3-5 animais. * $p < 0,05$ em relação ao controle, # $p < 0,05$ em relação a MT-III (ANOVA).

4.9 Efeito do antagonista do receptor CD36 (SSO) no aumento do teor proteico da COX-2, induzido pela MT-III em macrófagos

Para avaliar a participação do receptor CD36 no aumento do teor proteico da COX-2, induzido pela MT-III, os macrófagos peritoneais (2×10^6 células), aderidos a microplacas de 12 poços, foram pré-incubados com o composto SSO (25 μ M), antagonista do receptor CD36 ou com o RPMI acrescido do veículo (>1 % DMSO), por 30 minutos e, então, estimulados com a MT-III (0,4 μ M) por 6 horas.

A Figura 9A mostra bandas imunorreativas para COX-2, obtidas a partir do precipitado celular dos macrófagos incubados com a MT-III, ou RPMI acrescido do veículo (controle). A análise densitométrica (figura 9B) demonstra que a intensidade das bandas imunorreativas para COX-2, em macrófagos incubados com a MT-III ($0,4946 \pm 0,02$), foi significativamente maior que o respectivo controle ($0,1761 \pm 0,003$). O tratamento prévio dos macrófagos com SOS (25 μ M) reduziu significativamente (35 %) a expressão de COX2 em macrófagos estimulados pela MT-III, em comparação ao controle.

Figura 9 Efeito do SSO na expressão proteica da COX2, induzida pela MT-III, em macrófagos. Macrófagos peritoneais (2×10^6 células), aderidos a placas de 12 poços, foram incubados com SOS (25 μ M), ou RPMI acrescido do veículo (>1 % DMSO/RPMI), por 30 minutos. Após este período, os macrófagos foram incubados com a MT-III, por 6 horas a 37 °C e 5% CO₂. **(A)**: Bandas imunorreativas representativas do *Western blotting* com anticorpo poli-clonal anti-COX-2 (1:2000) e anticorpo monoclonal anti-β-actina (1:4000); **(B)**: Quantificação, por densitometria, das bandas da COX-2 normalizadas a partir das bandas de β-actina. Os dados representam a média±E.P.M. de 4-5 animais. * $p < 0,05$ em relação ao controle, # $p < 0,05$ em relação a MT-III/veículo (ANOVA).

4.10 Efeito do antagonista do receptor CD36 (SSO) na liberação da prostaglandina E₂, induzida pela MT-III, em macrófagos

Para avaliar a participação do receptor CD36 na liberação da prostaglandina E₂ (PGE₂) induzida pela MT-III, os macrófagos (2×10^6 células), aderidos a microplacas de 12 poços, foram pré-incubados com o composto SSO (25 μ M) ou com RPMI acrescido do veículo (>1 % DMSO), por 30 minutos e então estimulados com a MT-III (0,4 μ M) por 6 horas.

A Figura 10 mostra que os macrófagos controles apresentaram uma liberação basal de 8891 ± 1859 pg/mL de PGE₂, após 6 horas de incubação. A adição da MT-III causou aumento significativo da liberação desse prostanóide, em 117%, se comparado ao controle. O tratamento prévio dos macrófagos com SOS (25 μ M), antagonista do CD36, não alterou a liberação basal, nem o aumento da PGE₂ induzido pela MT-III.

Figura 10 Efeito do
macrófagos.

foram incubados
30 minutos. A

horas, a 37 °C e 5% CO₂. A seguir, os sobrenadantes de cada grupo foram coletados e os níveis da PGE₂ foram quantificados por ensaio imunoenzimático. Os dados representam a média $\pm$ E.P.M. de 3-4 animais. * $p < 0,05$ em relação ao respectivo controle (ANOVA).

MT-III, em
12 poços,
DMSO), por
T-III, por 6

4.11 Efeito da inibição das enzimas DGAT e ACAT na formação de corpúsculos lipídicos induzida pela MT-III em macrófagos

Para avaliar a participação das enzimas DGAT e ACAT, na formação de corpúsculos lipídicos induzida pela MT-III, macrófagos aderidos a lamínulas de vidro, foram pré-incubados, por 1 hora, com os compostos A-922500 (100 nM), inibidor da enzima DGAT, ou TMP-153 (100 nM), inibidor da enzima ACAT, ou com o RPMI acrescido do veículo (>1 % DMSO) e então estimulados com a MT-III (0,4 μ M) por 12 horas.

A Figura 11 mostra que os macrófagos incubados com RPMI, por 12 horas, na ausência ou presença do veículo, apresentaram média de $2,12 \pm 0,07$ CLs/célula. A incubação com a MT-III, na concentração de 0,4 μ M, por 12 h, causou a formação de $6,48 \pm 0,8$ CLs/célula, que foi significativamente maior que os controles. A presença do veículo não alterou significativamente este número. O tratamento prévio dos macrófagos com o composto A-922500 ou com o composto TMP-153 (100 μ M), por 1 hora, não causou alteração significativa no número basal de CLs ($1,39 \pm 0,14$ CLs/célula). No entanto, o tratamento dos macrófagos com o composto A-922500, aboliu o efeito induzido pela MT-III. O tratamento com o composto TMP-153 causou redução significativa da formação de corpúsculos lipídicos induzida pela MT-III, em média de 77,06 %, em relação ao controle (MT-III).

Figura 11 Efeito dos co
induzida pela

peritoneal, 96 h após a injeção de endotoxina a 0,7%, aderidos a lamínulas de vidro e cultivados em RPMI, foram incubados com A-922500 ou TMP-153 na concentração indicada acima, ou com RPMI acrescido do veículo (>1 % DMSO), por 1 hora. Após este período, os macrófagos foram incubados com a MT-III, por 12 horas a 37 °C e 5% CO₂. Os corpúsculos lipídicos foram corados com tetróxido de ósmio e quantificados sob microscopia de contraste de fase. Os dados representam a média $\pm$ EPM de 3-5 animais. * $p < 0,05$ em relação ao controle; # $p < 0,05$ em relação a MT-III (ANOVA).

rpúsculos lipídicos,

etados da cavidade

4.12. Efeito do composto C75 na formação de corpúsculos lipídicos induzida pela MT-III em macrófagos

Para avaliar o envolvimento da enzima ácido graxo sintase na formação de corpúsculos lipídicos (CLs) induzida pela MT-III, os macrófagos (2×10^5 células), aderidos a lamínulas de vidro, foram pré-incubados com o composto C75 ($1 \mu\text{M}$), inibidor a enzima ácido graxo sintase, ou com RPMI acrescido do veículo ($>1\%$ DMSO), por 1 hora e, então, estimulados com a MT-III ($0,4 \mu\text{M}$) por 12 horas.

A Figura 12 mostra que os macrófagos incubados com RPMI, por 12 horas, na ausência ou presença do veículo, apresentaram média de $1,66 \pm 0,14$ CLs/célula. A incubação com a MT-III, na concentração de $0,4 \mu\text{M}$, por 12 h, causou a formação de $3,74 \pm 0,26$ CLs/célula, que foi significativamente maior que os controles. A presença do veículo não alterou significativamente a formação de corpúsculos lipídicos induzida pela MT-III. Quando os macrófagos controles foram tratados com o composto C75 ($1 \mu\text{M}$), por 1 hora, não houve alteração do número basal de CLs ($1,50 \pm 0,27$ CLs/célula). O tratamento prévio dos macrófagos com composto aboliu a formação de corpúsculos lipídicos induzida pela MT-III.

Figura 12 Efeito do composto C75 na formação de corpúsculos lipídicos, induzida pela MT-III, em macrófagos. Os macrófagos, coletados da cavidade peritoneal, 96 h após a injeção de tioglicolato a 3%, aderidos a lamínulas de vidro e cultivados em RPMI, foram incubados com C75 ($1 \mu\text{M}$), ou veículo ($>1\%$ DMSO/RPMI), por 1 hora. Após este período, os macrófagos foram incubados com a MT-III, por 12 horas, a 37°C e $5\% \text{CO}_2$. Os corpúsculos lipídicos foram corados com tetróxido de ósmio e quantificados sob o microscópio de contraste de fase. Os dados representam a média $\pm$ EPM de 3-5 animais. * $p < 0,05$ em relação ao controle; # $p < 0,05$ em relação a MT-III (ANOVA).

4.13 Efeito da MT-III na ativação do fator de transcrição SREBP2, em macrófagos

Os níveis proteicos do fator de transcrição SREBP2 ativo foram analisados em macrófagos peritoneais em cultura, após 1, 6, 12 e 24 horas de incubação com a MT-III (0.4 μ M) ou RPMI apenas (controle). A Figura 13A mostra as bandas imunorreativas para SREBP2 ativo e para β -actina, em macrófagos controles ou incubados com a MT-III. As bandas proteicas, correspondentes ao SREBP2 ativo (55 kDa), foram detectadas tanto em precipitados controles, quanto naqueles incubados com a MT-III. No entanto, a análise densitométrica demonstrou que após 24 horas de incubação com a MT-III (Figura 13B), a intensidade das bandas imunorreativas para SREBP2 ativo foi significativamente maior em relação ao controle, com aumento percentual de 548%. Nos demais períodos de tempo, de incubação com a MT-III, não houve diferença significativa em relação ao controle.

Figura 13 Efeito da MT-III na ativação do fator de transcrição SREBP2, em macrófagos.

Macrófagos peritoneais (2×10^6 células), aderidos a placas de 12 poços, foram incubados com a MT-III (0,4 μ M) ou meio de cultura apenas (Controle), por 1, 6, 12 ou 24 horas, a 37 °C e 5% de CO₂. (A): Bandas imunorreativas representativas do *Western blotting* com anticorpo poli clonal anti-SREBP2 ativo (1:1000) e anticorpo monoclonal anti- β -actina (1:4000); (B): Quantificação, por densitometria, das bandas de SREBP2 ativo normalizadas a partir das bandas de β -actina. Os dados representam a média $\pm$ E.P.M. de 4-5 animais. * $p < 0,05$ em relação ao controle (ANOVA).

4.14 Participação do receptor TLR2 e da molécula adaptadora MyD88 na liberação de PGE₂, PGD₂, PGJ₂ e LTB₄ induzida pela MT-III, em macrófagos

Para avaliar a participação do receptor TLR2 e da molécula adaptadora MyD88 na liberação dos mediadores lipídicos PGE₂, PGD₂, PGJ₂ e LTB₄, macrófagos obtidos da cavidade peritoneal de camundongos C57BL/6 (WT), C57BL/6 TLR2^{-/-} ou C57BL/6 MyD88^{-/-} foram incubados com meio de cultura apenas (controle) ou com a MT-III (0.4 µM) por 6 horas.

A Figura 14 mostra que a MT-III induziu aumento significativo da liberação de PGE₂ (34741 ± 1817), PGD₂ (39,25 ± 3,08), PGJ₂ (3412 ± 682,8) e LTB₄ (177,2±35,26) em macrófagos WT, em relação aos controles, incubados com RPMI (4769±2339), (13,58±0, 9725), (1062±11,09) e (50,63±13,04), respectivamente. No entanto, a MT-III foi incapaz de induzir, de modo significativo, a liberação de PGE₂, PGD₂, PGJ₂ e LTB₄ a partir de macrófagos TLR2^{-/-}, se comparado ao respectivos controles. Além disso, a MT-III não causou a liberação de PGE₂ em macrófagos MyD88^{-/-}, porém induziu a liberação de PGD₂, PGJ₂ e LTB₄, em níveis semelhantes aos detectados em macrófagos WT, estimulados pela MT-III.

Figura 14 Participação do receptor TLR2 e da molécula adaptadora MyD88 na liberação de PGE₂, PGD₂, PGJ₂ e LTB₄ induzida pela MT-III, em macrófagos. Os macrófagos, coletados da cavidade peritoneal de camundongos C57BL/6 (WT), C57BL/6 TLR2^{-/-} ou C57BL/6 MyD88^{-/-}, aderidos a placas de 12 poços, foram incubados com RPMI (controle) ou MT-III (0,4 μM), por 6 horas, a 37 °C e 5% CO₂. Os mediadores lipídicos (A) PGE₂, (B) PGD₂, (C) PGJ₂ e (D) LTB₄, presentes nos sobrenadantes de cada grupo experimental, foram quantificados por ensaio imunoenzimático. Os dados representam a média ± EPM de 3-5 animais. **p*<0,05 em relação ao controle; #*p*<0,05 em relação à MT-III (ANOVA).

4.15 Envolvimento do receptor TLR2 e da molécula adaptadora MyD88 no aumento do teor proteico da COX2, induzido pela MT-III, em macrófagos

Para verificar o envolvimento do receptor TLR2 e da molécula adaptadora MyD88 no aumento do teor proteico da COX-2, induzida pela MT-III, os macrófagos (2×10^6 células) obtidos da cavidade peritoneal de camundongos C57BL/6 (WT), C57BL/6 TLR2^{-/-} ou C57BL/6 MyD88^{-/-}, aderidos a placa de 12 poços, foram incubados com meio de cultura apenas (controle) ou com a MT-III (0.4 μ M), por 6 horas.

A Figura 15A mostra bandas imunorreativas para COX-2, obtidas a partir do precipitado celular dos macrófagos WT, TLR2^{-/-} e MyD88^{-/-} estimulados com a MT-III ou meio de cultura apenas (controle). As bandas proteicas para COX-2 foram identificadas em todos os precipitados celulares analisados. No entanto, a análise densitométrica (figura 15B) demonstra que a intensidade das bandas imunorreativas para COX-2, em macrófagos WT incubados com a MT-III (0,700 $\pm$ 0.104), foi significativamente maior, se comparado ao respectivo controle (0,244 $\pm$ 0,020). No entanto, a MT-III foi incapaz de induzir aumento do teor proteico da COX-2 em macrófagos TLR2^{-/-} e MyD88^{-/-}, em comparação aos respectivos controles.

Figura 15 Envolvimento do receptor TLR2 e da molécula adaptadora MyD88 no aumento do teor proteico da COX-2, induzido pela MT-III, em macrófagos. Os macrófagos, coletados da cavidade peritoneal de camundongos machos C57BL/6 (WT), C57BL/6 TLR2^{-/-} ou C57BL/6 MyD88^{-/-}, aderidos a placas de 12 poços e cultivados em RPMI, foram incubados com a MT-III, por 6 horas a 37 °C e 5% CO₂. **(A)**: Bandas imunorreativas representativas do *Western blotting* com anticorpo poli clonal anti-COX-2 (1:2000) e anticorpo monoclonal anti-β-actina (1:4000); **(B)**: Quantificação, por densitometria, das bandas de COX-2 normalizadas a partir das bandas de β-actina. Os dados representam a média $\pm$ E.P.M. de 4-5 animais. * $p < 0,05$ em relação ao controle; # $p < 0,05$ em relação a MT-III (ANOVA).

4.16 Papel do receptor TLR2 e da molécula MyD88 na liberação das citocinas IL-1 β e IL-10, induzida pela MT-III, em macrófagos

Para investigar o papel do receptor TLR2 e da molécula adaptadora MyD88 na liberação das citocinas IL-1 β e IL-10, induzida pela MT-III, os macrófagos (2×10^6 células) obtidos da cavidade peritoneal de camundongos C57BL/6 (WT), C57BL/6 TLR2^{-/-} ou C57BL/6 MyD88^{-/-}, aderidos a placa de 12 poços, foram incubados com meio de cultura apenas (controle) ou com a MT-III (0.4 μ M), por 6 horas.

A Figura 16 A mostra que a MT-III induziu, de modo significativo, o aumento da liberação da IL-1 β ($1342 \pm 159,2$ pg/mL) a partir de macrófagos WT, em relação ao controle ($19,94 \pm 0,034$ pg/mL). A figura 16 B, mostra que, de modo semelhante, a MT-III causou aumento significativo da liberação da IL-10 ($177,6 \pm 6,015$ pg/mL), a partir de macrófagos WT, se comparado ao controle ($101,8 \pm 20,98$ pg/mL). No entanto, não ocorreu aumento significativo da liberação de ambas citocinas, em macrófagos TLR2^{-/-} ou MyD88^{-/-}, estimulados pela MT-III, em relação aos respectivos controles.

Figura 16 Papel do receptor TLR2 e da molécula adaptadora MyD88 na liberação da IL-1 β e IL-10, induzida pela MT-III, em macrófagos. Macrófagos, coletados da cavidade peritoneal de camundongos machos C57BL/6 (WT), C57BL/6 TLR2^{-/-} ou C57BL/6 MyD88^{-/-}, aderidos a placas de 12 poços, cultivados em RPMI ou incubados com a MT-III (0,4 μ M), por 6 horas, a 37 °C e 5% CO₂. (A) A IL-1 β ou (B) IL-10, presentes nos sobrenadantes de cada grupo experimental, foram quantificadas por ensaio imunoenzimático. Os dados representam a média $\pm$ EPM de 3-5 animais. * $p < 0,05$ em relação ao controle; # $p < 0,05$ em relação a MT-III (ANOVA).

4.17 Participação do receptor TLR2 e da molécula adaptadora MyD88 na formação de corpúsculos lipídicos induzida pela MT-III, em macrófagos

Considerando que os receptores TLR, principalmente o TLR2 e o TLR4, além de reconhecerem padrões moleculares ligados a patógenos, são ativados por ácidos graxos livres, avaliou-se a participação do receptor TLR2 e da molécula adaptadora MyD88, na formação de corpúsculos lipídicos induzida pela MT-III. Para tanto, macrófagos obtidos da cavidade peritoneal de camundongos C57BL/6 selvagens (WT), C57BL/6 TLR2^{-/-} ou C57BL/6 MyD88^{-/-} foram incubados com meio de cultura apenas (controle) ou com a MT-III (0.4 μ M), por 1 ou 12 horas.

A Figura 17 mostra o número de corpúsculos lipídicos em macrófagos de animais WT ou TLR2^{-/-} ou MyD88^{-/-}, após estímulo com a MT-III ou RPMI. Em macrófagos obtidos de animais WT e estimulados com RPMI apenas, detectou-se um número médio de $1,28 \pm 0,13$ CLs/célula. A estimulação dessas células com a MT-III, por 6 ou 12 horas, causou um aumento significativo do número corpúsculos lipídicos, que foi em média de $2,86 \pm 0,33$ CLs/célula. No entanto, em macrófagos TLR2^{-/-} ou MyD88^{-/-}, estimulados pela MT-III, por 1 ou 12 horas, o número de corpúsculos lipídicos não foi estatisticamente diferente daqueles detectados nos respectivos controles e significativamente menores que os detectados em macrófagos WT, incubados com a MT-III.

Figura 17 Envolvimento do receptor TLR2 e da molécula adaptadora MyD88 na formação de corpúsculos lipídicos, induzida pela MT-III, em macrófagos. Macrófagos, coletados da cavidade peritoneal de camundongos machos C57BL/6 (WT) ou C57BL/6 TLR2^{-/-} ou C57BL/6 MyD88^{-/-}, 96 h após a injeção de tioglicolato a 3 %, aderidos a lamínulas de vidro e cultivados em RPMI, foram incubados com a MT-III, por 1 ou 12 horas, a 37 °C e 5% CO₂. Os corpúsculos lipídicos foram corados com tetróxido de ósmio e quantificados sob microscopia de contraste de fase. Os dados representam a média $\pm$ EPM de 3-5 animais. * $p < 0,05$ em relação ao controle; # $p < 0,05$ em relação a MT-III (ANOVA).

4.18 Papel do receptor TLR2 e da molécula adaptadora MyD88 na distribuição da PLIN2 em macrófagos estimulados pela MT-III

Para avaliar o envolvimento do receptor TLR2 e da molécula adaptadora MyD88 na distribuição da proteína PLIN2, os macrófagos (2×10^5 células), obtidos da cavidade peritoneal de camundongos C57BL/6 (WT), C57BL/6 TLR2^{-/-} ou C57BL/6 MyD88^{-/-}, aderidos a lamínulas de vidro, foram incubados com meio de cultura apenas (controle) ou com a MT-III (0.4 μ M), por 6 horas. A seguir, as células foram imunomarcadas para PLIN2 com anti-PLIN2 complexado ao fluoróforo FITC e os corpúsculos lipídicos foram corados com corante fluorescente para lipídeo neutro (Nile Red), conforme descrito em Material e Métodos.

A figura 18 ilustra uma marcação de *pools* intracelulares da proteína PLIN2 (em verde), que colocaram com a marcação dos corpúsculos lipídicos (em vermelho), em macrófagos WT incubados com a MT-III, se comparados aos macrófagos controles (RPMI), nos quais não se observou marcação para a proteína PLIN2 e para os corpúsculos lipídicos. Em macrófagos TLR2^{-/-} ou MyD88^{-/-} controles (RPMI) não se observou a presença de *pools* intracelulares da proteína PLIN2, nem a formação de corpúsculos lipídicos. Da mesma forma, não foi possível observar a formação dos *pools* intracelulares da PLIN2, nem a formação de corpúsculos lipídicos em macrófagos TLR2^{-/-} ou MyD88^{-/-}, estimulados pela MT-III. Ainda, não houve marcação, para PLIN2, em macrófagos WT, incubados com a MT-III, quando utilizada IgG não relacionada.

Figura 18 Efeito da MT-III na distribuição da PLIN2, em macrófagos. Macrófagos, coletados da cavidade peritoneal de camundongos machos C57BL/6 (WT), C57BL/6 TLR2^{-/-}, ou C57BL/6 MyD88^{-/-}, 96h após a injeção de tioglicolato a 3%, aderidos a lamínulas de vidro, foram incubados com RPMI (controle) ou com a MT-III, por 6 horas, a 37 °C e 5% CO₂. A seguir, as células foram marcadas com anticorpo anti-PLIN2, ou com IgG inespecífica de mesmo isótipo, complexado com fluoróforo FITC. Os corpúsculos lipídicos foram corados com Nile Red e analisados sob microscopia confocal.

4.19 Efeito da MT-III na liberação do ácido palmítico e oleico a partir de macrófagos peritoneais

Para avaliar a capacidade da MT-III induzir a liberação dos ácidos graxos palmítico e oleico, macrófagos obtidos da cavidade peritoneal de camundongos C57BL/6 foram incubados com o ácido graxo palmítico e/ou oleico, marcados com radioisótopos, conforme descrito em Material e Métodos, e então estimulados com a MT-III ou RPMI (controle), por 6 h.

A figura 19 mostra que a MT-III causou a liberação significativa do ácido palmítico e oleico, a partir de macrófagos peritoneais, com percentual de 5 e 15 %, respectivamente, em relação aos respectivos controles.

Figura

macrófagos peritoneais. Macrófagos, coletados da cavidade peritoneal de camundongos machos C57BL/6, aderidos a placas de 12 poços e cultivados em RPMI, foram incubados por 18 horas com (A) ácido palmítico [^{14}C]16:0 ou (B) ácido oleico [^{14}C]18:1 (0,1 $\mu\text{Ci/mL}$) e então estimulados com a MT-III (0,4 μM) ou com RPMI (controle), por 6 h, a 37 °C, a 5% CO_2 . A liberação dos ácidos graxos foi quantificado em um contador de radioatividade levando em consideração a quantidade dos ácidos graxos marcados presentes no meio de cultivo e nas células estimuladas, ou não, com a MT-III. Os dados representam a média $\pm$ E.P.M. 6 amostras/tratamento * $p < 0,05$ em relação aos respectivos controles (ANOVA).

4.20 Efeito da MT-III na formação de corpúsculos lipídicos em monócitos humanos e a participação do processo de reacilação de ácidos graxos nesse efeito

Considerando os resultados anteriores, que demonstraram que a MT-II não induziu aumento dos níveis de lipídeos neutros em monócitos humano, avaliou-se o efeito da MT-III, apenas, na formação de corpúsculos lipídicos nessas células. Para verificar o efeito da MT-III na biogênese de corpúsculos lipídicos em monócitos humanos e a importância do processo de reacilação dos ácidos graxos nesse efeito, essas células foram aderidas a lamínulas de vidro e tratadas com o composto Triacsina C, por 30 minutos, ou com o veículo apenas (controle negativo) e então incubadas com a MT-III (0.4 μ M), por 1 e 6 horas. A seguir, as células foram fixadas e coradas, para a visualização dos corpúsculos lipídicos.

Na figura 20A e 20B observa-se, em vermelho (Nile Red), a marcação para os corpúsculos lipídicos e, em azul (DAPI), para os núcleos. Assim, observa-se um aumento do número de corpúsculos lipídicos (em vermelho) em monócitos humanos incubados com a MT-III (0.4 μ M), por 1 e 6 horas, quando comparado aos respectivos controles. O tratamento prévio dos monócitos com Triacsina C (3 μ M), inibidor das enzimas envolvidas na reacilação de ácidos graxos, por 30 minutos, reduziu a formação de corpúsculos lipídicos, induzida pela MT-III nos períodos de tempo avaliados.

Figura 20A Efeito da MT-III na biogênese de corpúsculos lipídicos, em monócitos humanos. Monócitos do sangue periférico, aderidos a lamínulas de vidro foram incubados com RPMI (controle) ou com a MT-III, por 1h, a 37 °C e a 5% CO₂. A seguir, as células foram incubadas com Nile Red (vermelho), marcador dos corpúsculos lipídicos. Os núcleos foram corados com DAPI (azul) e a análise efetuada sob microscópio confocal.

Figura 20B Efeito da MT-III na biogênese de corpúsculos lipídicos, em monócitos humanos. Monócitos do sangue periférico, aderidos a laminulas de vidro foram incubados com RPMI (controle) ou com a MT-III, por 6 h, a 37 °C e a 5% CO₂. A seguir, as células foram incubadas com Nile Red (vermelho), marcador dos corpúsculos lipídicos. Os núcleos foram corados com DAPI (azul) e a análise efetuada sob microscópio confocal.

4.21 Efeito da MT-III e MT-II na expressão da PLIN2 e a participação do processo de reacilação de ácidos graxos nesse efeito

Para verificar a capacidade da MT-III e/ou MT-II induzir aumento da expressão da PLIN2, bem como investigar a participação do processo de realicação de ácidos graxos nesse efeito, monócitos humanos foram isolados do sangue periférico de doadores voluntários saudáveis obtidos no Centro de Hemoterapia y Hemodonación de Castilla y León (Valladolid, Espanha) conforme descrito em Material e Métodos. As células foram aderidas a placas de petri e então incubadas com meio de cultura apenas (controle) ou com a MT-III ou MT-II (0.4 μ M), por 1 e 6 horas, em células previamente tratadas com o composto Triacsina C, por 30 minutos, ou com o veículo apenas. A seguir, as células foram coletadas com trizol e processadas para a quantificação dos níveis de RNA mensageiro para PLIN2.

A figura 21A e 21B mostra que a MT-III e a MT-II induziram aumento dos níveis de RNA mensageiro para PLIN2, nos períodos de tempo avaliados. Além disso, é possível observar que a magnitude da expressão gênica da PLIN2 induzida pela MT-II é 50% menor do que a detectada para a MT-III. Ainda, o tratamento prévio dos monócitos com Triacsina C, inibidor do processo de reacilação de ácidos graxos, não afetou a expressão da PLIN2 (figura 21C), induzida pelas duas isoformas de fosfolipase A₂ estudadas (figura 21C).

Figura 21 Efeito da MT-III e MT-II na expressão do RNA mensageiro para PLIN2, em monócitos humanos. Os monócitos do sangue periférico, aderidos a placas de petri foram incubados com RPMI (controle) ou com a MT-III ou MT-II (0,4 μ M), por 1 e 6h a 37 °C a 5% CO₂. Em A e B: expressão do RNA mensageiro para PLIN2 em monócitos estimulados pela MT-III ou MT-II, por 1 e 6 horas, respectivamente. Em C: expressão do RNA mensageiro para PLIN2 em monócitos pré-tratados com Triacsina C (3 μ M) por 30 min e então estimulados pela MT-III ou MT-II. A produção do RNA mensageiro que codifica para a PLIN2 foi avaliado por rt-PCR em tempo real, utilizando-se o sistema de detecção por SYBR Green e primers específicos para PLIN2 ou para ciclofilina, como controle da produção de RNA mensageiro como descrito em Material e Métodos. * $p < 0,05$ em relação ao controle; # $p < 0,05$ em relação a MT-III (ANOVA).

4.22 Efeito da fosfolipase A₂ MT-III e da proteína homóloga, MT-II no acúmulo de lipídeos neutros em monócitos humanos

Para avaliar a capacidade de fosfolipases A₂ ofídicas induzirem acúmulo de lipídeos neutros (triacilglicerol, colesterol e diacilglicerol) em monócitos humanos e investigar o papel da atividade enzimática nesse efeito, foram estudadas a MT-III, cataliticamente ativa e a MT-II, sem atividade enzimática. Para tanto, monócitos humanos, isolados do sangue periférico de doadores saudáveis voluntários, foram aderidos a placa de petri e então incubados com meio de cultura apenas (controle), ou com a MT-III (Asp 49) ou MT-II (Lys 49) (0.4 µM), por 1 e 6 horas. Após separação e extração, os lipídeos foram quantificados por cromatografia gasosa/espectrometria de massa, conforme descrito em Material e Métodos.

A figura 22.1 e 22.2 mostra que a MT-III, mas não a MT-II, induz aumento dos níveis de colesterol e triacilglicerol, em torno de 150,04 e 134,43 %, respectivamente, no período de 1 hora de incubação, e 64,6 e 81,4 %, no período de 6h, respectivamente, em relação aos respectivos controles. O colesterol e o triacilglicerol, cujos níveis foram aumentados em monócitos incubados com a MT-III, eram constituídos, em células controles, dos seguintes ácidos graxos: mirístico (14_0), palmítico (16_0), palmitoleico (16_1 n-7), esteárico (18_0), oleico (18_1 n-9), vacênico (18_1 n-7), linoleico (18_2 n-6) e araquidônico (20_4 n-6). Quando as células foram incubadas com a MT-III, por 1 h, ocorreu aumento dos seguintes ácidos graxos em colesterol e triacilglicerol: palmítico (16_0), palmitoleico (16_1 n-7), esteárico (18_0), oleico (18_1 n-7) e linoleico (18_2 n-6). Na 6^a hora de incubação com a MT-III, além dos ácidos graxos aumentados em colesterol e triacilglicerol na 1^a h, observou-se aumento dos níveis do ácido araquidônico (20_4 n-6) em triacilglicerol. Os níveis de diacilglicerol não foram alterados em nenhum dos períodos de tempo avaliados.

Figura 22.1 Quantificação dos níveis de CE, TAG e DAG em monócitos humanos estimulados pela MT-III ou MT-II. As células foram incubadas com MT-III ou MT-II (0,4 μ M) ou RPMI (controle) por 1 h. A seguir, os ácidos graxos presentes no CE, TAG e DAG foram analisados por cromatografia gasosa/espectrometria de massa, após a metilação dos mesmos. Os painéis A; C e E mostram o total de CE, TAG e DAG, respectivamente, em células controles e em células tratadas com os diferentes estímulos. Os painéis B; D e F mostram o perfil de ácidos graxos que compõe cada classe de lipídeos CE, TAG e DAG, em células controle, tratadas com os diferentes estímulos, respectivamente. Os dados representam a média $\pm$ E.P.M. de seis amostras/tratamento. * $p < 0,05$ em relação aos respectivos controles (ANOVA).

Figura 22.2 Quantificação dos níveis de CE, TAG e DAG em monócitos humanos estimulados pela MT-III ou MT-II. As células foram incubadas com MT-III ou MT-II (0,4 μ M) ou RPMI (controle) por 6 h. A seguir, os ácidos graxos presentes no CE, TAG e DAG foram analisados por cromatografia gasosa/espectrometria de massa após a metilação dos mesmos. Os painéis A, C e E mostram o total de CE, TAG e DAG, respectivamente, em células controles e em células tratadas com os diferentes estímulos. Os painéis B, D e F mostram o perfil de ácidos graxos que compõe cada classe de lipídeos CE, TAG e DAG, em células controle versus tratadas com os diferentes estímulos, respectivamente. Os dados representam a média $\pm$ E.P.M. de 6 amostras/tratamento. * $p < 0,05$ em relação aos respectivos controles (ANOVA).

4.23 Efeito da MT-III na concentração de ácidos graxos livres intracelulares em monócitos humanos. Participação da fosfolipase A₂ citosólica neste efeito

Os níveis de ácidos graxos livres (AGLs) intracelulares foram avaliados em monócitos humanos, aderidos a placas de petri, incubados com RPMI, acrescido do veículo, ou previamente tratados, por 1 h, com Pyr2 (1 μ M), inibidor da fosfolipase A₂ citosólica (controles) ou MT-III (0.4 μ M), por 6h, ou previamente tratados com Pyr2 (1 μ M), por 1 h e estimulados a seguir pela MT-III (0.4 μ M), por 6 h. A seguir, os ácidos graxos livres foram separados, extraídos e quantificados e identificados por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massa. Os monócitos humanos foram isolados do sangue periférico de doadores voluntários saudáveis como descrito em Material e Métodos.

A figura 23A mostra o aumento significativo da concentração intracelular dos AGLs, induzida pela MT-III, em monócitos humanos, se comparado aos dos grupos controles. O aumento porcentual dos ácidos graxos monoinsaturados, ácido palmitoleico (16:1) e oleico (18:1) foi de 104 e 218 %, respectivamente, dos ácidos poli-insaturados como o ácido linoleico (18:2), eicosadienóico (20:2), eicosatrienóico (20:3), araquidônico (20:4), eicosapentaenoico (20:5), adrenico (22:4), docosapentaenoico (22:5) e docosahexaenoico (22:6) foi 362, 455, 763, 249, 119, 349, 245 e 184 %, respectivamente, em relação aos respectivos controles. O tratamento prévio dos monócitos com Pyr2 somente, não alterou significativamente os níveis de ácidos graxos livres, quando comparado ao grupo controle. No entanto, o pré-tratamento com Pyr2, reduziu a liberação, induzida pela MT-III, dos ácidos graxos monoinsaturados como o ácido palmitoleico (16:1) e oleico (18:1) em 34 e 31 % e dos ácidos poli-insaturados como ácido linoleico (18:2), eicosadienóico (20:2), eicosatrienóico (20:3), araquidônico (20:4), eicosapentaenoico (20:5), adrenico (22:4), docosapentaenoico (22:5) e docosahexaenoico (22:6) em 29, 45, 37, 29, 46, 41, 39 e 38 %, respectivamente.

A figura 23B mostra o aumento significativo dos AGLs totais, em monócitos incubados com a MT-III, se comparados aos controles, porém não se observou uma redução significativa dos ácidos graxos livres intracelulares totais em monócitos tratados com Pyr2 e então estimulados com a MT-III, quando comparado com a MT-III somente.

Figura 23. Efeito da MT-III na concentração de ácidos graxos livres intracelulares em monócitos humanos. Os monócitos humanos foram pré-incubados com Pyr2 (1 μ M) ou seu veículo (controle), por 1h, ou MT-III (0,4 μ M), por 6h, ou previamente tratados com Pyr2 (1 μ M), por 1 h, seguido de estímulo pela MT-III (0,4 μ M), por 6h. A quantificação dos ácidos graxos livres intracelulares foi realizada por HPLC/espectrometria de massa conforme descrito em Material e Métodos. Os dados representam a média $\pm$ E.P.M. de seis amostras/tratamento. * $p < 0,05$ em relação aos controles e # $p < 0,05$ em relação a MT-III (ANOVA).

4.24 Efeito das fosfolipases A₂ MT-III e MT-II na redução de ácidos graxos presentes em fosfolípidos de membrana em monócitos humanos

Para avaliar o efeito da MT-III e da MT-II na redução de ácidos graxos presentes em fosfolípidos de membrana de monócitos humanos isolados, aderidos a placa de petri e então incubados com meio de cultura apenas (controle) ou com a MT-III (Asp 49) ou MT-II (Lys 49) (0.4 μ M), por 1 e 6 horas. Após separação e extração, os lipídeos foram quantificados e identificados por cromatografia gasosa/espectrometria de massa. Foram analisados os seguintes ácidos graxos: mirístico (14_0), palmítico (16_0), palmitoleico (16_1 n-7), esteárico (18_0), oleico (18_1 n-9), vacênico (18_1 n-7), linoleico (18_2 n-6), eicosenóico (20_1 n-9), eicosatrienóico (20_3 n-6), araquidônico (20_4 n-6), adrênico (22_4 n-6) e Ácido Docosahexaenóico (22_6 n-3).

A figura 24 mostra que a MT-III causou redução significativa de ácidos graxos saturados, monoinsaturados e poli-insaturados, de fosfolípidos de membrana, em comparação ao controle e à MT-II. O ácidos graxos saturados, cujos níveis foram reduzidos em monócitos estimulados pela MT-III, por 1 e 6h, foram o ácido palmítico (16:0) e o esteárico (18:0); os monoinsaturados, compreenderam os ácidos palmitoleico (16_1n-7), oleico (18_1n-9) e vacênico (18_1 n-7) e os poliinsaturados, foram os ácidos linoleico (18_2n-6), eicosadienóico (20_2n-6), eicosatrienóico (20_3n-6), araquidônico (20_4n-6) e ácido docosahexaenóico (22_6 n-3).

Figura 24 Análise dos níveis de ácidos graxos presentes em fosfolípidos de membrana, em monócitos humanos estimulados pela MT-III ou MT-II. As células foram incubadas com MT-III ou MT-II (0,4 μ M) por 1 h (A e B) ou 6 h (C e D). A seguir, os ácidos graxos presentes em fosfolípidos de membrana foram metilados e analisados por cromatografia gasosa/espectrometria de massa como descrito em Material e Métodos. Os painéis A e C mostram a porcentagem de ácidos graxos saturados (AGS), monoinsaturados (AGMI) e poli-insaturados (AGP) reduzidos em células estimuladas pela MT-III e/ou MT-II. Os painéis B e D mostram os diferentes ácidos graxos que compõem os fosfolípidos de membranas e o efeito da MT-III e MT-II sobre os mesmos. Os dados representam a média $\pm$ E.P.M. de seis amostras/tratamento. * $p < 0,05$ em relação aos respectivos controles. (ANOVA).

4.25 Efeito das fosfolipases A₂ MT-III e MT-II sobre as espécies de glicerofosfolipídeos de membrana celular fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilcolina (PC) e fosfatidilinositol (PI) associados ao ácido araquidônico

Para determinar a especificidade da ação das fosfolipases A₂ MT-III e/ou MT-II sobre os glicerofosfolipídeos da membrana plasmática (PE, PC e PI), foi realizada a quantificação do ácido araquidônico associado a PE, PC ou PI por cromatografia líquida de alta performance acoplada a espectrometria de massa. Para tanto, monócitos humanos (5×10^6 célula) foram aderidos a placa de petri e então incubados com meio de cultura apenas (controle), ou com a MT-III (Asp 49), ou MT-II (Lys 49) (0.4 μ M), por 1 e 6 horas. Os monócitos foram isolados do sangue periférico de doadores voluntários saudáveis, conforme descrito em Material e Métodos.

A figura 25A mostra a ação da MT-III ou da MT-II, após 1 h de incubação, na liberação do ácido araquidônico (AA) dos fosfolipídeos de membrana PE, PC ou PI, em monócitos humanos. O painel (I) mostra que a MT-III causou a liberação significativa do AA dos fosfolipídeos do tipo PE (18:2/20:4), PE (18:1/20:4), PE(18:0/20:4) e dos plasmalogênios de PE(P-18:1/20:4) e PE(P-18:0/20:4), se comparado aos respectivos controles. A MT-II, por sua vez, induziu a liberação de AA dos fosfolipídeos do tipo PE (18:1/20:4) e PE(18:0/20:4) e do plasmalogênio PE (P-18:0/20:4), quando comparado aos respectivos controles. O painel (II) mostra a ação da MT-III ou da MT-II sobre os fosfolipídeos do tipo PC. A MT-III induziu a liberação de AA da ligação éter do fosfolipídeo PC(o-16:1/20:4), PC(o-16:0/20:4), PC(o-18:2/20:4), PC(o-18:1/20:4) e PC(o-18:0/20:4) e da ligação éster PC(o-16:1/20:4), PC(18:2/20:4), PC(18:1/20:4), PC(18:0/20:4) e PC(20:4/20:4) se comparado aos respectivos controles. Por outro lado, a MT-II não foi capaz de reduzir o AA dos fosfolipídeos do tipo PC. O painel (III) mostra que a MT-III, mas não a MT-II causou a liberação significativa do AA dos fosfolipídeos do tipo PI(16:0/20:4), PI(18:1/20:4) e PI(18:0/20:4) quando comparado aos respectivos controles. A MT-II, por sua vez, não causou a liberação do AA dos fosfolipídeos do tipo PI.

A figura 25B mostra a ação da MT-III ou da MT-II, por 6 h, na liberação do ácido araquidônico (AA) dos fosfolipídeos PE, PC ou PI da membrana de monócitos humanos. O painel (I) mostra que a MT-III causou a liberação significativa do AA dos fosfolipídeos do tipo PE (18:2/20:4), PE(18:1/20:4), PE(18:0/20:4) e dos plasmalogênios de PE(P-18:1/20:4), se comparado aos respectivos controles. A MT-II, por sua vez, induziu significativamente a liberação do AA, da ligação éster, dos fosfolipídeos do tipo PE(18:1/20:4) e PE(18:0/20:4), quando comparado aos respectivos controles. O painel (II) mostra a ação da MT-III ou MT-II

sobre os fosfolipídeos do tipo PC. A MT-III induziu a liberação de AA da ligação éter do fosfolipídeo PC(o-16:1/20:4), PC(o-16:0/20:4), PC(o-18:2/20:4), PC(o-18:1/20:4) e PC(o-18:0/20:4) e da ligação éster PC(16:1/20:4), PC(18:2/20:4), PC(18:1/20:4), PC(18:0/20:4) e PC(20:4/20:4). A MT-II, por sua vez, reduziu o teor de AA somente da ligação éter do fosfolipídeo PC(o-18:2/20:4), quando comparado ao respectivo controle. O painel (III) mostra que a MT-III causou a liberação do AA da ligação éster dos fosfolipídeos do tipo PI(16:0/20:4), PI(18:1/20:4) e PI(18:0/20:4). A MT-II, por sua vez, não causou a liberação do AA dos fosfolipídeos do tipo PI.

Figura 25A. Efeito da MT-III e/ou MT-II sobre as espécies de glicerofosfolídeos PE, PC ou PI da membrana celular ligados ao ácido araquidônico. Os monócitos foram incubados com MT-III ou MT-II (0,4 μ M) ou com RPMI apenas (células controle), por 1 h. Os painéis I, II e III mostra a ação da MT-III e/ou MT-II, por 1 h, sobre a fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilcolina (PC) ou fosfatidilinositol (PI) ligados ao ácido araquidônico, respectivamente. A quantificação do ácido araquidônico e a identificação dos diferentes glicerofosfolídeos foi determinado por HPLC/espectrometria de massa. Os dados representam a média $\pm$ E.P.M. de seis amostras/tratamento. * $p < 0,05$ em relação aos respectivos controles (ANOVA).

Figura 25B. Efeito da MT-III e/ou MT-II sobre diferentes espécies de glicerofosfolipídeos da membrana celular ligados ao ácido araquidônico. Os monócitos foram incubados com MT-III ou MT-II (0,4 μ M) ou com RPMI apenas (células controle), por 6 h. O painel I, II e III mostra a ação da MT-III e/ou MT-II, por 1 h, sobre a fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilcolina (PC) ou fosfatidilinositol (PI) ligados ao ácido araquidônico, respectivamente. A quantificação do ácido araquidônico e a identificação dos diferentes glicerofosfolipídeos foram determinados por HPLC/espectrometria de massa. Os dados representam a média $\pm$ E.P.M. de 6 amostras/tratamento. * $p < 0,05$ em relação aos respectivos controles. (ANOVA).

4.26 Efeito das fosfolipases A₂ MT-III e MT-II na formação de lisofosfolídeos

Para investigar a capacidade da MT-III e da MT-II induzirem a formação de lisofosfolídeos do tipo lisofosfatidiletanolamina (LPE), lisofosfatidilcolina (LPC) e lisofosfatidilinositol (LPI), os monócitos humanos (5×10^6 células) foram aderidos a placa de petri e então incubadas com meio de cultura apenas (controle) ou com a MT-III (Asp 49) ou MT-II (Lys 49) ($0.4 \mu\text{M}$), por 1 e 6 horas. A quantificação dos diferentes lisofosfolídeos, citados anteriormente, foi realizada por cromatografia líquida de alta performance acoplada a espectrometria de massa.

A figura 26 mostra o aumento da formação de lisofosfatidiletanolamina (LPE), lisofosfatidilcolina (LPC) e lisofosfatidilinositol (LPI), em monócitos incubados com a MT-III, mas não com a MT-II. A figura 26 A mostra o aumento significativo dos níveis de plasmógenos de lisofosfatidiletanolamina do tipo LPE(p-16:0), LPE(p-18:1) e LPE(p-18:0) e ligados por ligação éster a diferentes ácidos graxos LPE(16:1), LPE(16:0), LPE(18:1), LPE(18:0), LPE(20:2) e LPE(20:1), após 6h da incubação das células com a MT-III, quando comparado ao controle. A figura 24B mostra aumento significativo na concentração total de LPE em monócitos incubados com a MT-III, mas não com a MT-II, se comparado ao controle. A figura 26C mostra o aumento significativo dos níveis de plasmógenos de lisofosfatidilcolina do tipo LPC(p-18:0), de LPC ligados por ligação éter a ácidos graxos LPC(o-16:1), LPC(o-16:0) e LPC(o-18:0) e LPC ligados por ligação éster a ácidos graxos LPC(16:1), LPC(16:0), LPC(18:2), LPC(18:1), LPC(18:0), LPC(20:5), LPC(20:4), LPC(20:3), LPC(20:2), LPC(20:1), LPC(22:6), LPC(22:5) e LPC(22:4), após 6h da incubação dos monócitos humanos com a MT-III, mas não com a MT-II, quando comparado ao controle. A figura 26D mostra aumento significativo na concentração total de LPC em monócitos incubados com a MT-III, mas não com a MT-II, se comparado ao controle. A figura 27E mostra o aumento significativo dos níveis de lisofosfatidilinositol ligados a ácidos graxos por ligação éster LPI(16:0), LPI(18:1) e LPI(18:0), após 6h da incubação dos monócitos com a MT-III, mas não com a MT-II, quando comparado ao controle. A figura 27F mostra aumento significativo na concentração total de LPI em monócitos incubados com a MT-III, mas não com a MT-II, se comparado ao controle.

Figura 26. Efeito da MT-III e/ou MT-II na formação de lisofosfolipídeos. Os monócitos foram incubados com MT-III ou MT-II (0,4 μ M) ou com RPMI apenas (células controle), por 6 h. Os painéis A, C e E mostram a ação da MT-III e/ou MT-II, por 6 h, na formação de lisofosfatidiletanolamina (LPE), lisofosfatidilcolina (PC) ou lisofosfatidilinositol (PI) ligados por ligações éter ou éster a diferentes ácidos graxos, respectivamente. Os painéis B, D e F mostram a concentração total de lisofosfatidiletanolamina (LPE), lisofosfatidilcolina (PC) ou lisofosfatidilinositol (PI), respectivamente. A identificação e quantificação dos diferentes lisofosfolipídeos foi determinado por HPLC/espectrometria de massa. Os dados representam a média $\pm$ E.P.M. de seis amostras/tratamentos. * $p < 0,05$ em relação aos respectivos controles. (ANOVA).

4.27 Efeito da MT-III e MT-II na expressão genes envolvidos na síntese de ácidos graxos, em monócitos humanos.

Para verificar a capacidade das MT-III e MT-II induzirem aumento da expressão das enzimas envolvidas na síntese dos ácidos graxos: FASN (*fatty acid synthase*), SCD (*stearoyl-CoA desaturase*), ELOVL6 (*very long-chain fatty acid elongase*), ACC (*acetyl-CoA carboxylase α*), ou do fator de transcrição envolvido na síntese de triacilglicerol e colesterol SREBP-1c e -2 (*sterol regulatory elemento-binding protein-1c e -2*), respectivamente, monócitos humanos foram aderidos a placas de petri e então incubados com meio de cultura apenas (controle) ou com a MT-III ou MT-II (0.4 μ M), por 1 e 6 horas. A seguir, as células foram coletadas com trizol e processadas para a quantificação dos níveis de RNA mensageiro para as enzimas e fatores descritos acima.

Na figura 27A mostra que a MT-III e a MT-II não induziram aumento da expressão das enzimas envolvidas na síntese de ácidos graxos, nem dos fatores de transcrição implicados na regulação da síntese de triacilglicerol e colesterol, em monócitos estimulados por 1 hora.

Na figura 27B observa-se que a MT-III e a MT-II causaram redução significativa da expressão das enzimas envolvidas na síntese de ácidos graxos e do fator de transcrição implicado na regulação da síntese de triacilglicerol com porcentual médio de 50 %, para ambas, em monócitos estimulados por 6 horas, em comparação ao controle.

Figura 27A Efeito da MT-III e da MT-II na expressão genes envolvidos na síntese de ácidos graxos, em monócitos humanos. Monócitos do sangue periférico, aderidos a placas de petri foram incubados com RPMI (controle) ou com a MT-III ou MT-II (0,4 μ M), por 1 h, a 37 °C e a 5% CO₂. A produção do RNA mensageiro que codifica para cada gene, acima citado, foi avaliado por rt-PCR em tempo real, utilizando-se o sistema de detecção por SYBR Green e primers específicos para FASN (*fatty acid synthase*), SREBP-1c e -2 (*sterol regulatory elemento-binding protein-1c e -2*), SCD (*stearoyl-CoA desaturase*), ELOVL6 (*very long-chain fatty acid elongase*), ACC (*acetyl-CoA carboxylase α*) ou para ciclofilina, como controle da produção de RNA mensageiro.

Figura 27B Efeito da MT-III e da MT-II na expressão genes envolvidos na síntese de ácidos graxos, em monócitos humanos. Monócitos do sangue periférico, aderidos a placas de petri foram incubados com RPMI (controle) ou com a MT-III ou MT-II (0,4 μ M), por 6h, a 37 °C e a 5% CO₂. A produção do RNA mensageiro que codifica para cada gene, acima citado, foi avaliado por rt-PCR em tempo real, utilizando-se o sistema de detecção por SYBR Green e primers específicos para FASN (*fatty acid synthase*), SREBP-1c e -2 (*sterol regulatory elemento-binding protein-1c e -2*), SCD (*stearoyl-CoA desaturase*), ELOVL6 (*very long-chain fatty acid elongase*), ACC (*acetyl-CoA carboxylase α*) ou para ciclofilina, como controle da produção de RNA mensageiro. * $p < 0,05$ em relação ao controle (ANOVA).

5 DISCUSSÃO

O acúmulo de lipídeos em células fagocíticas, como monócitos e macrófagos, é responsável pela diferenciação destes tipos celulares em células espumosas e representa uma das etapas iniciais do desenvolvimento da aterosclerose (LIBBY et al., 2010; PAUL et al., 2008). Neste sentido, essas células tem sido alvo de inúmeros estudos, no intuito de reconhecer os indutores e os mecanismos envolvidos nesse processo. Vale ressaltar, que além do processo aterosclerótico, as células espumosas estão presentes em outras doenças de natureza inflamatória, tal como artrite reumatoide, diabetes, glomerulonefritis e em resposta a infecção por patógenos (DUSHKIN, 2011), sugerindo uma importante relação entre o metabolismo lipídico e o processo inflamatório. Neste estudo, investigou-se a ativação e a expressão de diferentes fatores envolvidos no acúmulo de lipídeos em células fagocíticas, induzido pela MT-III, uma fosfolipase A₂ secretada, isolada de veneno da serpente *Bothrops asper* e o papel desses fatores na resposta imune inata desencadeada por essa fosfolipase A₂.

Os receptores e fatores de transcrição da família dos PPARs (receptores ativados por proliferadores de peroxissomas) são elementos importante para a manutenção da homeostasia lipídica (CASTRILLO; TONTONNOZ, 2004) e ativados por mediadores lipídicos e ácidos graxos livres (DESVERGNE; WAHLI, 1999). Neste sentido, foi avaliada a ativação dos receptores e fatores de transcrição PPAR- γ e PPAR- β/δ em macrófagos estimulados pela MT-III. Os resultados deste estudo mostraram que a MT-III induziu o recrutamento do PPAR- γ e do PPAR- β/δ para o núcleo o que indica a ativação desses fatores. Vale ressaltar que a ativação do receptor PPAR- β/δ no núcleo, foi mais pronunciada e prolongada do que aquela do receptor PPAR- γ . Até o presente, não há relatos na literatura que demonstrem a capacidade de uma fosfolipase A₂ secretada, do grupo IIA, induzir *per se* a ativação desses fatores. Em apoio aos dados do presente estudo, foi demonstrado que macrófagos estimulados por LDL, modificado por uma fosfolipase A₂ do veneno da serpente *Naja mossambica*, induziu a ativação dos receptores PPAR- β/δ e PPAR- γ , sendo a ativação do PPAR- β/δ mais pronunciada que a do PPAR- γ , em macrófagos (NAMGALADZE et al., 2010). Ainda, ALAOUI-EL-AZHER et al. (2002) demonstraram que o ácido araquidônico ativa o PPAR- γ em macrófagos alveolares. Uma vez que a MT-III induz a liberação do ácido araquidônico, a partir de macrófagos (MOREIRA et al., 2008), sugere-se que este e outros ácidos graxos, oriundos da ação da MT-III, tenham um papel importante na ativação desses fatores.

A literatura aponta o envolvimento dos receptores PPAR- γ e PPAR- β/δ , em particular, na formação de corpúsculos lipídicos e na regulação da expressão da PLIN2, proteína

envolvida na captação de ácidos graxos e diferenciação de macrófagos em células espumosas (ALMEIDA et al., 2009; SCHADINGER et al., 2005; VOSPER et al., 2001). Uma vez que o antagonista do receptor PPAR- β/δ aboliu tanto a formação dos corpúsculos lipídicos quanto o aumento da expressão proteica da PLIN2, estimulada pela MT-III. Os resultados do presente estudo indicam que o receptor PPAR- β/δ tem um papel fundamental para a formação de corpúsculos lipídicos induzida pela MT-III e que este papel está relacionado à estimulação da síntese da PLIN2. Em relação ao PPAR- γ , foi demonstrado que o antagonista desse receptor causou redução significativa da formação de corpúsculos lipídicos, induzida pela MT-III. No entanto, ao contrário da literatura (LIU et al., 2010; MOTOMURA et al., 2006), o bloqueio do receptor PPAR- γ não alterou o aumento do teor proteico da PLIN2, induzida pela MT-III. Desse modo, estes dados indicam que a participação deste receptor, no aumento do número de corpúsculos lipídicos induzido pela MT-III, não está relacionado à regulação da PLIN2. Além disso, os resultados demonstraram que a MT-III induziu um aumento significativo do teor proteico dos receptores PPAR- γ e PPAR- β/δ indicando o mecanismo adicional, induzido pela MT-III, para a formação de corpúsculos lipídicos e células espumosas.

Os corpúsculos lipídicos (CLs) são organelas citoplasmáticas consideradas plataformas de síntese de mediadores lipídicos (ARAÚJO-SANTOS et al., 2010; D'AVILA et al., 2006; RANGEL MORENO et al., 2002). Considerando os resultados obtidos anteriormente, quanto à participação dos receptores PPAR- γ e PPAR- β/δ na formação dos CLs, avaliou-se a repercussão desses efeitos na síntese de PGE₂ e na expressão proteica da COX-2, induzidos pela MT-III. A inibição do PPAR- β/δ , mas não do PPAR- γ , reduziu a liberação de PGE₂ estimulada pela MT-III, por um mecanismo independente da COX-2. Esses dados indicam o envolvimento do receptor PPAR- β/δ na liberação de PGE₂, induzida por essa fosfolipase A₂. Uma vez que a inibição deste receptor aboliu a formação de CLs, é plausível supor que essas inclusões lipídicas constituam plataformas importantes para a biossíntese de PGE₂, estimulada pela MT-III, em macrófagos, sendo esse processo regulado pelo PPAR- β/δ . Em apoio a esta hipótese, foi demonstrado que os CLs compartimentalizam o sistema enzimático COX e PGE sintase, fundamentais para a biossíntese de PGE₂ em macrófagos murinos (ARAÚJO-SANTOS et al., 2010).

Um outro fator importante, regulado pelos receptores nucleares PPARs, em macrófagos, pertence à família dos receptores *scavengers*, do tipo B, denominado CD36. Este receptor reconhece e internaliza ácidos graxos de cadeia longa (DROVER et al., 2008; GE; ELGHETANY, 2005; IBRAHIMI et al., 1999) e está envolvido na formação de células espumosas (FEBBRAIO et al., 2000; NAKATA et al., 1999). Diante disto, a análise do teor

proteico do receptor CD36, em macrófagos estimulados pela MT-III mostrou que esta enzima induziu o aumento da expressão deste receptor, a partir da 6^a hora de incubação, que foi mantida até a 12^a hora. Em apoio a esses dados, considerando que os ácidos palmítico e oleico induzem aumento dos teores proteicos do CD36, em hepatócitos de rato e monócitos humanos (CHABOWSKI et al., 2013; GAO et al., 2012), os resultados do presente estudo, que demonstraram a capacidade da MT-III induzir a liberação do ácido palmítico e oleico, a partir de macrófagos peritoneais murinos, sugerem fortemente que esses ácidos graxos estejam envolvidos na indução da expressão do CD36 estimulada por esta fosfolipase A₂. Em adição, os dados deste estudo mostraram que a inibição desse receptor aboliu a formação de corpúsculos lipídicos, induzida pela MT-III, indicando que o aumento do teor proteico e a ativação do receptor CD36 representam mecanismos importantes para a formação de CLs, induzida por essa fosfolipase A₂. Esses dados estão de acordo com a literatura, que relaciona o aumento dos níveis proteicos de CD36 ao aumento do conteúdo lipídico intracelular em macrófagos (LEE et al., 2009). Ainda, a literatura mostra que a ativação desse receptor acarreta o aumento dos teores proteicos da COX-2 e síntese de prostaglandina E₂ (PGE₂) (BUJOLD et al., 2009; KUDA et al., 2011). Neste sentido, os dados obtidos demonstraram que a inibição do receptor CD36 causou redução significativa da expressão de COX-2, induzida pela MT-III, indicando o envolvimento deste receptor, neste efeito da MT-III. No entanto, o aumento dos níveis de PGE₂, induzido por esta fosfolipase A₂, não foi alterado, no período de tempo avaliado. É conhecido que além de induzir aumento do teor proteico da COX-2, a MT-III causa aumento da atividade enzimática da isoforma constitutiva COX-1 (MOREIRA et al., 2008). Desta forma, este dado reforça a hipótese de que a COX-1 seja a responsável pelos níveis elevados de PGE₂, induzidos pela MT-III, em macrófagos pré-tratados com o antagonista do receptor CD36. Ainda, considerando que não houve inibição completa da expressão da COX-2, a participação desta isoforma, na síntese de PGE₂, não pode ser descartada.

A biogênese de CLs também está associada à ação de diferentes enzimas relacionadas à síntese de lipídeos (HARRIS et al., 2011; MATSUDA et al., 2009; MCFIE et al., 2011; QUITTNAT et al., 2004). Recentemente, a literatura demonstrou o envolvimento das enzimas DGAT e ACAT na formação de corpúsculos lipídicos (HARRIS et al., 2011; MATSUDA et al., 2009; MCFIE et al., 2011; QUITTNAT et al., 2004). Estas enzimas são responsáveis pela síntese de triacilglicerol e colesterol, respectivamente, que são os principais constituintes dos corpúsculos lipídicos (BARTZ et al., 2007; BECKMAN, 2006; GALLI et al., 1985; MARTIN; PARTON, 2006; WELLER et al., 1999). Neste contexto, os resultados deste

estudo mostraram que tanto a inibição da enzima DGAT, quanto da ACAT, aboliu a formação de corpúsculos lipídicos induzida pela MT-III. Estes dados implicam a participação dessas enzimas na formação de corpúsculos lipídicos, induzida pela MT-III e corroboram a literatura citada acima. Ainda, foi demonstrado que agonistas do receptor PPAR- γ são capazes de induzir a expressão da enzima DGAT e, conseqüentemente, aumentar os estoques de triacilglicerol (KOLIWAD et al., 2010). Desse modo, é plausível supor que na presente condição experimental, a redução da formação de corpúsculos lipídicos, induzida pelo bloqueio do PPAR- γ , tenha sido mediada, ao menos em parte, pela redução da expressão desta enzima. Ainda, os dados deste estudo mostraram que a inibição da enzima ácido graxo sintase aboliu a formação de corpúsculos lipídicos induzida pela MT-III, indicando a sua participação na biogênese de corpúsculos lipídicos estimulada pela fosfolipase A₂. O envolvimento da ácido graxo sintase também foi demonstrada na formação de corpúsculos lipídicos induzida por *Trypanosoma cruzi*, *Mycobacterium leprae*, *Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guérin* e pelo vírus da dengue em leucócitos (D'AVILA et al., 2006, 2008; SAMSA et al., 2009), o que reforça a importância dos ácidos graxos para a formação dessas inclusões lipídicas. Neste contexto, foi de interesse investigar a ação da MT-III sobre um importante fator de transcrição, denominado SRBP2, que está envolvido no processo de lipogênese, por regular positivamente a expressão de enzimas envolvidas na síntese de colesterol (EBERLÉ et al., 2004). Os resultados obtidos mostraram que a MT-III induziu a ativação deste fator na 24^o hora de incubação. Estes dados sugerem que essa fosfolipase A₂ estimula o processo de lipogênese em macrófagos, em períodos mais tardios de sua ação. Este efeito pode representar um mecanismo de amplificação de sua ação estimulatória para a formação de corpúsculos lipídicos, por estar associado, diretamente, ao aumento da síntese de colesterol, um dos principais componentes dos CLs. Até o presente, esta é a primeira demonstração da capacidade de uma fosfolipase A₂ secretada induzir ativação do fator SREBP2. Ainda, neste contexto, vale considerar os relatos da literatura de que o ácido oleico induz a ativação do SREBP2 em adipócitos, após estimulação por 24 horas (BAUER et al., 2011). Desse modo, é provável que o ácido oleico, liberado pela MT-III, tenha um papel na ativação do fator SREBP2, na presente condição experimental.

As evidências da literatura apontam que os receptores *Toll like* (TLRs) reconhecem e traduzem o sinal proveniente de ácidos graxos livres, em respostas celulares (BONISCHNETZLER et al., 2009; NGUYEN et al., 2007; SHI et al., 2006). Recentemente, foi demonstrado que o ácido palmítico, mostrado aqui ser liberado pela MT-III, é capaz de ativar o receptor TLR2 (HUANG et al., 2012). Este receptor sinaliza, principalmente, por meio da

molécula adaptadora MyD88 e está envolvido na formação de corpúsculos lipídicos e ativação de macrófagos presentes na lesão aterosclerótica (EDFELDT et al., 2002; MULLICK et al., 2006; XU et al., 2001). Diante disso, investigou-se o papel desse receptor e da molécula adaptadora MyD88 na formação de corpúsculos lipídicos e na expressão proteica da PLIN2, estimulados pela MT-III. A deleção tanto do receptor TLR2, quanto da molécula MyD88, aboliu a biogênese de corpúsculos lipídicos induzida pela MT-III, em relação a macrófagos obtidos de animais selvagens, estimulados pela mesma. De outra parte, em macrófagos MyD88^{-/-} não foi observado o aumento do teor proteico da PLIN2, após estímulo pela fosfolipase A₂, porém em células TLR2^{-/-}, o seu efeito não foi alterado. Estes dados indicam um papel relevante do TLR2 e da molécula MyD88 para a formação de corpúsculos lipídicos. Os dados apontam, ainda, que esta molécula adaptadora, mas não o TLR2, é importante também para sinalizar para o aumento da expressão proteica da PLIN2 e sugerem, portanto, que outro subtipo de receptor *Toll like* inicia a transdução de sinal para este efeito da MT-III. É conhecido que a ativação do receptor TLR4 induz aumento da expressão de PLIN2 (FEINGOLD et al., 2010). Portanto, é provável que este receptor seja ativado pela MT-III e tenha um papel nesse efeito. Os dados do presente estudo estão de acordo com a literatura que demonstra o papel do receptor TLR2 e da molécula MyD88 no acúmulo de lipídeos, em macrófagos (BJÖRKBÄCKA, 2004; NICOLAOU; ERRIDGE, 2010; TOBIAS; CURTISS, 2007). Até onde pode ser verificado, esta é a primeira demonstração do envolvimento do receptor do tipo *Toll like* no efeito desencadeado por uma fosfolipase A₂ secretada.

A análise da distribuição da PLIN2, mostrou que não houve a formação de *pools* intracelulares dessa proteína em macrófagos TLR2^{-/-} ou MyD88^{-/-} estimulados pela MT-III, em comparação aos macrófagos selvagens. Portanto, a formação de corpúsculos lipídicos, mediada pelo receptor TLR2, deve decorrer da ativação de mecanismos de mobilização intracelular da proteína PLIN2, sob estímulo da MT-III. Estes dados sugerem que a molécula MyD88, além de regular o aumento do teor proteico da PLIN2, participa da via responsável pelo recrutamento dessa proteína, sob a ação da MT-III. Os processos intracelulares envolvidos no recrutamento da PLIN2, induzida pela MT-III, não foram ainda investigados. É conhecido que além dos PAMPs (padrões moleculares associados a patógenos) e dos ácidos graxos livres, os TLRs reconhecem moléculas do próprio, originadas a partir de um dano celular, conhecidos como DAMPs (padrões moleculares associados ao dano) (BONISCHNETZLER et al., 2009; KAWASAKI; KAWAI, 2014; NGUYEN et al., 2007; SHI et al., 2006). Neste sentido, foi demonstrado que a hidrólise da membrana de mitocôndrias liberadas de plaquetas, por fosfolipases A₂ secretadas humanas, do grupo IIA, além de induzir a síntese

de mediadores lipídicos pró-inflamatórios, libera DNA mitocondrial, um reconhecido DAMP (BOUDREAU et al., 2014). Desse modo, o papel deste DAMP, na ativação do TLR2 induzida pela MT-III, em macrófagos, não pode ser descartada. Foi sugerido, recentemente, que a ativação dos TLR2 e TLR4, por toxinas isoladas de veneno de escorpião, deve-se à geração de DAMPs, que os autores denominaram de VAMPs (padrões moleculares associados a venenos) (ZOCCAL et al., 2014). Esses dados demonstram a capacidade de toxinas isoladas de venenos animais ativarem os receptores do tipo *Toll*, por meio da geração de padrões moleculares associados ao dano celular.

A seguir, tendo em conta a importância dos corpúsculos lipídicos para a biossíntese dos mediadores lipídicos e a capacidade da MT-III induzir aumento da liberação desses mediadores (MOREIRA et al., 2008), avaliou-se o envolvimento do TLR2 e da molécula MyD88 na liberação dos eicosanóides PGE₂, PGD₂, PGJ₂ e LTB₄. A deleção do receptor TLR2, bem como da molécula MyD88, aboliu a liberação de PGE₂, estimulada pela MT-III. Além disso, em macrófagos TLR2^{-/-}, mas não com MyD88^{-/-}, não foi observado o aumento da liberação da PGD₂, PGJ₂ e do LTB₄ induzido por essa fosfolipase A₂. Estes resultados indicam que o receptor TLR2 é essencial para a liberação de PGE₂, PGJ₂ e PGD₂, enquanto a molécula MyD88 é fundamental somente para a liberação de PGE₂, induzida pela MT-III. Diante desses dados, foi verificada a contribuição do TLR2 e da MyD88 na expressão da COX-2, enzima chave para a síntese de prostanóides. Tanto em macrófagos TLR2^{-/-}, quanto em MyD88^{-/-}, não ocorreu aumento da expressão proteica da COX-2, indicando um importante papel de ambos para a expressão da COX-2, estimulada pela MT-III. Considerando os dados aqui apresentados, sugere-se que a COX-2 seja a principal via de biossíntese de PGE₂, enquanto a produção de PGD₂ e PGJ₂ pode estar associada às vias biosintéticas da COX-1 e COX-2. Consistente com esta hipótese, é conhecida a capacidade de MT-III induzir aumento da atividade de COX-1, juntamente com o aumento dos teores proteicos e da atividade da COX-2, em macrófagos (MOREIRA et al., 2008). Há evidências na literatura sobre a importância do receptor TLR2 e da molécula MyD88 na produção de mediadores lipídicos e no aumento da expressão da COX-2 (ALMEIDA et al., 2009; BARRENSCHEE et al., 2010; MITSUNARI et al., 2006), porém, esta é a primeira demonstração do envolvimento de um receptor da família dos TLRs no controle da biossíntese e liberação de eicosanóides induzida por uma fosfolipase A₂ secretada. De modo similar, esta é a primeira demonstração da produção de uma prostaglandina resolutive (SURH et al., 2011), decorrente de estímulo por uma fosfolipase A₂ secretada e iniciada via ativação do receptor TLR2.

Uma vez que MT-III induz a liberação de citocinas (ZULIANI et al., 2005a), foi investigado o papel do receptor TLR2 e da molécula MyD88 na liberação das citocinas IL-1 β e IL-10, em macrófagos estimulados por essa fosfolipase A₂. Os resultados obtidos mostraram que em macrófagos, o receptor TLR2 via MyD88, é a via relevante para a liberação de IL-1 β e IL-10, sob estímulo pela MT-III. Neste sentido, a literatura demonstra a participação do receptor TLR2, na liberação das citocinas IL-1 β e IL-10, em macrófagos estimulados por LDL minimamente modificado, o que reforça a hipótese de que os lipídeos, não provenientes de patógenos, ativam este tipo de receptor e elicitam uma resposta imune (CHÁVEZ-SÁNCHEZ et al., 2010). Ainda, é possível sugerir que o aumento da síntese de IL-10, observado em macrófagos WT, estimulados pela MT-III, regule a síntese de PGE₂ induzida por esta fosfolipase A₂. Este mecanismo regulatório foi demonstrado em macrófagos estimulados por LPS e INF- γ (SHIBATA et al., 2005). Desse modo, em função do perfil de mediadores regulados pelo receptor TLR2, sob estímulo da MT-III, estes dados indicam um importante papel do TLR2, via molécula MyD88, tanto no desencadeamento da resposta inflamatória, quanto na regulação desse processo, em macrófagos estimulados por essa fosfolipase A₂.

Diante dos dados aqui apresentados e considerando que as fosfolipases A₂ secretadas, do grupo IIA, são enzimas encontradas em níveis elevados no plasma de pacientes que apresentam doenças associadas ao desencadeamento da síndrome metabólica, como diabetes e aterosclerose (HUI et al., 2012), investigou-se a ação da MT-III na formação de corpúsculos lipídicos em monócitos humanos, bem como o perfil de lipídeos acumulados nestas células. Os resultados mostraram que a MT-III induziu aumento da formação de corpúsculos lipídicos em monócitos após 1 e 6 h de incubação. A inibição das enzimas acil-CoA sintase-1, -3 e -4, responsáveis pela incorporação de ácidos graxos de cadeia longa a lipídeos neutros (PÉREZ-CHACÓN et al., 2009), pela triacsina C, reduziu, de modo marcante, o número de corpúsculos lipídicos, induzido pela MT-III. Esta redução sugere a participação de ácidos graxos de cadeia longa, como o araquidônico (AA), na biogênese de corpúsculos lipídicos. Esses resultados corroboram a literatura, que demonstra a importância do processo de reacilação dos ácidos graxos de cadeia longa, tal como o AA, para o aumento do conteúdo intracelular de lipídeos (GUIJAS et al., 2012). Ainda, no presente estudo, o acúmulo de lipídeos, causado pela MT-III, foi acompanhado do aumento pelo aumento dos níveis de RNA mensageiro para PLIN2, proteína está relacionada à biogênese de corpúsculos lipídicos e formação de macrófagos espumosos (BRASAEMLE et al., 1997; LARIGAUDERIE et al.,

2004; PAUL et al., 2008b; WANG et al., 1999). Ainda, curiosamente, os resultados deste estudo mostraram que o tratamento dos monócitos com triacsina C não impediu o aumento da expressão da PLIN2, o que sugere que a MT-III induz aumento da expressão de PLIN2 via ativação de um receptor ou aceptor capaz de reconhecer a MT-III, ou os metabolitos provenientes da sua ação em fosfolípidos de membrana. Neste sentido, o presente estudo, demonstrou que a MT-III induz a liberação do ácido oleico a partir de macrófagos murinos e/ou monócitos humanos. É conhecido que este ácido graxo tem a capacidade de induzir aumento da expressão da PLIN2, em células de fígado de linhagem NMuLi, por ativar os receptores nucleares PPARs do tipo γ e δ/β (FAN et al., 2009). Desse modo, sugere-se que o ácido oleico seja importante para a indução da expressão da PLIN2, em monócitos humanos, por meio da ativação dos receptores da família dos PPARs. Vale ressaltar, que os resultados obtidos em macrófagos murinos, estimulados pela MT-III, quanto a formação de corpúsculos lipídicos e expressão da PLIN2, foram reproduzidos em monócitos humanos, confirmando que esta fosfolipase A_2 oídica constitui uma ferramenta científica apropriada para evidenciar os mecanismos desencadeados por essa classe de enzimas quanto ao acúmulo de lipídeos em células imunocompetentes.

A literatura aponta que a formação de corpúsculos lipídicos está relacionada, diretamente, ao aumento dos níveis de lipídeos neutros, como o triacilglicerol e o colesterol (FUJIMOTO et al., 2007; KUERSCHNER et al., 2008). Neste sentido, os dados do presente estudo demonstrando o aumento dos níveis de colesterol e triacilglicerol, no mesmo período de tempo, ora observado, para o aumento do número de corpúsculos lipídicos, induzido pela MT-III, indicam a relação entre essas inclusões e o aumento dos níveis intracelulares de lipídeos neutros. Nesta condição experimental, o triacilglicerol apresentou aumento dos níveis do ácido araquidônico em sua composição. Considerando que os corpúsculos lipídicos são constituídos principalmente de triacilglicerol (BARTZ et al., 2007; BECKMAN, 2006; GALLI et al., 1985; MARTIN; PARTON, 2005; WELLER et al., 1999;), este dado indica que estas inclusões são sítios de metabolização deste importante ácido graxo e reforçam os dados anteriores deste estudo, que sugerem um papel importante dos corpúsculos lipídicos na síntese de eicosanoides, induzida pela MT-III. Como mencionado na Introdução deste trabalho, o veneno de *Bothrops asper* contém uma proteína homóloga de fosfolipases A_2 , porém desprovida de atividade catalítica, denominada de MT-II. Apesar disso, esta proteína a semelhança da MT-III apresenta atividade miotóxica e pró-inflamatória, diferindo, em alguns casos, somente na magnitude do efeito. No presente estudo, a MT-II, apesar de não causar aumento dos níveis de triacilglicerol e colesterol, induziu aumento da expressão de PLIN2,

indicando que este efeito não é dependente, exclusivamente, dos produtos provenientes da ação catalítica de fosfolipase A₂.

De outra parte, a análise dos ácidos graxos presentes nos fosfolípidos de membrana, em monócitos estimulados pela MT-III, evidenciou uma diminuição dos mesmos ácidos graxos, que foram detectados, em níveis elevados, nas moléculas de colesterol e triacilglicerol, sugerindo que o aumento dos níveis de lípidos neutros, no meio intracelular, seja decorrente da ação enzimática da MT-III sobre os fosfolípidos de membrana. Ainda, considerando que a reacilação é um importante processo implicado no acúmulo de lípidos, os resultados do presente estudo demonstraram que a inibição desse processo causou a diminuição da formação dos corpúsculos lipídicos estimulados pela MT-III, o que indica que o processo de reacilação é relevante para o acúmulo de lípidos estimulado pela fosfolipase A₂. Além disso, foi verificado aumento significativo de ácidos graxos livres intracelulares (AGLi) mono e poli-insaturados, nas células incubadas com a MT-III. A inibição da fosfolipase A₂ citosólica (cFLA₂), conhecida por aumentar os níveis de AGLi (ASAI et al., 2003), não alterou o aumento de AGLi totais induzido pela MT-III. No entanto, a inibição da cFLA₂ causou uma alteração qualitativa dos AGLi, tais como os ácidos monoinsaturados palmitoleico (16:1) e oleico (18:1), os ácidos poli-insaturados linoleico (18:2), eicosadienóico (20:2), eicosatrienóico (20:3), araquidônico (20:4), eicosapentaenoico (20:5), adrenico (22:4), docosapentaenoico (22:5) e docosahexaenoico (22:6). Considerando dados anteriores, que mostraram que esta isoforma de fosfolipase A₂ intracelular contribui para a formação de corpúsculos lipídicos, induzida pela MT-III (LEIGUEZ et al., 2011), estes dados apontaram os principais ácidos graxos, oriundos da ação da cFLA₂, que são relevantes para a formação dessas inclusões lipídicas, em células estimuladas pela MT-III. Ainda, os AGLi, além de favorecer a síntese de mediadores lipídicos, ativam fatores intracelulares, envolvidos no acúmulo e no metabolismo de lípidos, tais como fatores de transcrição da família dos PPARs, que demonstramos, neste estudo, serem importantes para a formação de corpúsculos lipídicos em macrófagos. Desse modo, pode-se sugerir que os AGLi sejam componentes relevantes na ativação celular estimulada pela MT-III e representem um dos mecanismos relacionados à formação de corpúsculos lipídicos e produção de mediadores lipídicos, induzidos pela MT-III, em macrófagos.

Em adição, para melhor compreender as ações da MT-III, avaliamos o seu efeito sobre os diferentes fosfolípidos presentes na membrana de monócitos humanos, tal como a fosfatidiletanolamina (PE), a fosfatidilcolina (PC) e o fosfatidilinositol (PI), os quais contém o ácido araquidônico em sua estrutura. Os dados mostraram que a espécie PC foi extremamente

reduzida na membrana de monócitos incubados com a MT-III, mas não com a MT-II. É conhecido que as fosfolipases A_2 secretadas (sPLA $_2$) se ligam às interfaces aniônicas com maior afinidade do que às neutras como a da PC (BAYBURT et al., 1993; HAN et al., 1999). No entanto, verificou-se que fosfolipases A_2 do GV e de veneno de serpente contêm alguns resíduos de triptofano, alguns dos quais estão localizados em suas superfícies de ligação interfacial, enquanto que as sFLA $_2$ s do Grupo IIA, de mamíferos, não apresentam tal aminoácido (KIM et al., 2002; KODURI et al., 1998). Estes resíduos de aminoácidos podem constituir determinantes estruturais que permitem à MT-III ligar-se a membrana celular e efetuar a hidrólise. Além disso, observamos que MT-III reduziu os níveis de AA associados tanto a PE quanto a PI. As moléculas de PE e PI estão localizadas na porção citosólica da membrana, o que nos sugere a internalização da MT-III e/ou a ativação de fosfolipases A_2 intracelulares nesse efeito desta fosfolipase A_2 . Embora não tenha sido descrito a presença de receptores para FLA $_2$ em monócitos humanos, a interação da MT-III com algum receptor ou aceptor não pode ser descartada. Os dados do presente estudo demonstraram também que a ação da MT-III sobre PE, PC e PI gerou aumento da formação de lisofosfolípeos, tal como lisofosfatidiletanolamina (LPE), lisofosfatidilcolina (LPC) e lisofosfatidilinositol (LPI). A formação desses lisofosfolípeos foi recentemente descrita em células de músculo esquelético incubado com uma outra fosfolipase A_2 , isolada do veneno de *Bothrops asper*, denominada MT-I, cataliticamente ativa (FERNANDEZ et al., 2013). De acordo com estes autores, os lisofosfolípeos, por atuarem como detergentes, podem diminuir a viabilidade celular e seriam, portanto os responsáveis pelo efeito miotóxico daquela fosfolipase A_2 . No entanto, no presente estudo, não ocorreu alteração da viabilidade celular em monócitos humanos, incubados com a concentração de estudo da MT-III. Desta forma, os dados ora obtidos sugerem que, sob a ação da MT-III, os lisofosfolípeos formados sejam reacilados, rapidamente, originando fosfolípeos de membrana para a reconstituição da membrana celular (CORDA et al., 2002). De outra parte, o aumento da formação de lisofosfolípeos pode favorecer a interação os mesmos com seus receptores, presentes na superfície celular, desencadeando a ativação do processo inflamatório (GRALER; GOETZL, 2002; MEYER ZU HERINGDORF; JAKOBS, 2007). No entanto, a contribuição destes receptores na resposta inflamatória, induzida pela MT-III, não foi investigada.

Os ácidos graxos, incorporados aos corpúsculos lipídicos, que não derivam de fontes exógenas, são originados de processos de neossíntese e/ou do rearranjo de fosfolípeos de membrana, regulado por fosfolipases A_2 (GUBERN et al., 2009). No presente estudo, foi detectado aumento do níveis do ácido palmítico e palmitoleico, nas frações de colesterol e

triacilglicerol, na 1ª hora de estímulo com a MT-III. O ácido palmitoleico é considerado um marcador da neossíntese de ácidos graxos, em células e tecidos (CAO et al., 2008), sugerindo que este seja um dos mecanismos envolvidos na ação da MT-III para a formação de corpúsculos lipídicos. A síntese de ácidos graxos, em células de mamíferos, envolve uma série de enzimas que agem sequencialmente, que são a acetil-CoA carboxilase, ácido graxo sintase, estearoil-CoA desaturase e a elongase de ácidos graxos de cadeia longa. Esta via é controlada pelos fatores de transcrição SREBP-1 (*proteína-1c ligadora do elemento regulado por esteróis*) e -2 (*proteína-2 ligadora do elemento regulado por esteróis*) (SHIMANO, 2001; HORTON et al., 2003). Os resultados do presente estudo mostraram que a MT-III não afetou a expressão gênica destas enzimas e destes fatores de transcrição. Porém, na 6ª hora de incubação com a MT-III ocorreu diminuição significativa da expressão dessas enzimas, o que reforça a hipótese de que o aumento do conteúdo lipídico intracelular seja decorrente da reacilação dos ácidos graxos provenientes da atividade catalítica da MT-III sobre os fosfolípidos de membrana e não da neossíntese de lipídeos. Ainda, a diminuição da expressão das enzimas e fatores, ora observada, pode ser uma resposta ao aumento excessivo do conteúdo de lipídeos no meio intracelular. Até onde pode ser verificado, esta é a primeira demonstração dos mecanismos relacionados ao acúmulo de lipídeos, desencadeados por uma fosfolipase A₂ secretada, do grupo IIA, em monócitos humanos. Ainda, o fato da MT-III ativar esse tipo celular e desencadear eventos observados em doenças como obesidade, diabetes e aterosclerose, torna esta toxina uma ferramenta útil para os estudos voltados à compreensão de doenças relacionadas à síndrome metabólica.

Em conjunto, os resultados aqui apresentados evidenciaram mecanismos importantes para a formação de corpúsculos lipídicos induzida pela MT-III, uma fosfolipase A₂ secretada, isolada de veneno de serpente. Assim sendo, verificou-se que a MT-III induz aumento da expressão dos receptores PPAR- γ , PPAR- β/δ e CD36, em macrófagos peritoneais murinos. Além disso, induz a ativação dos fatores de transcrição PPAR- γ , PPAR- δ/β e SREBP2. A inibição farmacológica dos receptores PPAR- γ , PPAR- β/δ e CD36, bem como das enzimas DGAT, ACAT e ácido graxo sintase, reduziu a formação de corpúsculos lipídicos induzida pela MT-III, indicando a participação desses fatores no efeito da fosfolipase A₂ em estudo. O antagonista do receptor PPAR- β/δ , mas não o do PPAR- γ , aboliu a expressão proteica da PLIN2, induzida pela MT-III, sugerindo que o PPAR- β/δ seja importante para este efeito. Além disso, foi demonstrado o envolvimento do receptor TLR2 e da molécula adaptadora MyD88 na formação de corpúsculos lipídicos, na distribuição da proteína PLIN2 e na síntese das citocinas IL-1 β e IL-10, em macrófagos peritoneais murinos estimulados pela MT-III.

Ainda, a ativação do receptor TLR2 via MyD88, foi essencial para a liberação de PGE₂ e somente a ativação de TLR2 foi relevante para a biosíntese de PGD₂, PGJ₂ e LTB₄, em células estimuladas pela MT-III. À semelhança da ação em macrófagos murinos, a MT-III induziu aumento da formação de corpúsculos lipídicos e a expressão proteica da PLIN2, em monócitos humanos isolados. A análise lipidômica destas células evidenciou que a MT-III atua sobre os fosfolípidos de membrana, causando redução dos ácidos graxos saturados, monoinsaturados e poliinsaturados da mesma indicando a importância da atividade catalítica para esta ação. A metabolização desses ácidos graxos acarretou aumento dos níveis intracelulares de colesterol e triacilglicerol. Nestas células, o aumento dos níveis citoplasmáticos de lípidos neutros correlacionou-se ao aumento do número de corpúsculos lipídicos. Além disso, foi observado o aumento dos níveis de ácidos graxos livres intracelulares, em monócitos incubados com a MT-III, que não foi dependente da ativação da fosfolipase A₂ citosólica. A atividade enzimática da MT-III é relevante para a liberação de ácidos graxos, que repercutiu no acúmulo de triacilglicerol e colesterol, em monócitos. Além disso, a MT-III atua sobre os fosfolípidos de membrana fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilcolina (PC) e fosfatidilinositol (PI) associados ao ácido araquidônico. Esta ação da MT-III foi acompanhada do aumento dos níveis de lisofosfolípidos do tipo lisofosfatidiletanolamina (LPE), lisofosfatidilcolina (LPC) e lisofosfatidilinositol (LPI). Além disso, a reacilação dos ácidos graxos, liberados pela ação da MT-III sobre os fosfolípidos de membrana, é essencial para o aumento do número de corpúsculos lipídicos, uma vez que a MT-III não causou aumento da expressão de enzimas relacionadas à síntese de ácidos graxos (lipogênese). Em síntese, considerando a homologia das fosfolipases A₂ secretadas, do grupo IIA, encontradas nos venenos de serpentes, com as fosfolipases A₂ secretadas de mamíferos, os resultados obtidos neste estudo contribuem para o conhecimento das ações e dos mecanismos desencadeados por esta importante classe de enzimas, no que tange ao acúmulo de lípidos em células fagocíticas e abre novas perspectivas no estudo da ativação da resposta imune inata desencadeada por ácidos graxos endógenos e em doenças nas quais a resposta inflamatória e o desequilíbrio lipídico tenham um papel preponderante, como a aterosclerose. Neste contexto, consideramos que a análise lipidômica efetuada ampliou o conhecimento do metabolismo de ácidos graxos, em células fagocíticas, sob o estímulo por fosfolipases A₂ secretadas.

No que se refere ao envenenamento causado por serpentes do gênero *Bothrops*, que apresentam teores elevados de fosfolipases A₂ em sua composição, este trabalho amplia o conhecimento das ações desse importante componente quanto às vias de ativação da resposta

inflamatória, que representa um processo marcante na fisiopatologia do envenenamento botrópico.

6 CONCLUSÕES

I - A MT-III induziu em macrófagos murinos:

- Expressão e ativação dos PPAR- γ e PPAR- β/δ (fatores de transcrição);
- ativação do fator de transcrição SREBP2 na 24^a h;
- expressão do receptor CD36 e da proteína COX-2;
- produção dos mediadores lipídicos PGE₂, PGD₂, PGJ₂ e LTB₄;
- produção das citocinas IL-1 β e IL-10;
- liberação dos ácidos graxos palmítico e oleico.

II – Em macrófagos murinos estimulados pela MT-III

- a formação de corpúsculos lipídicos é dependente dos receptores PPAR- γ , PPAR- β/δ , CD36 e TLR2/MyD88, bem como das enzimas DGAT, ACAT e ácido graxo sintase;
- a expressão da PLIN2 é dependente da ativação do receptor PPAR- β/δ , mas não do PPAR- γ ;
- a expressão da COX-2 é dependente dos receptores TLR2/MyD88 e do CD36, mas não dos receptores e fatores de transcrição PPAR- γ e PPAR- β/δ ;
- a síntese de PGE₂ é dependente da ativação do PPAR- β/δ e da ativação do TLR2/MyD88, mas não do PPAR- γ e nem do receptor CD36;
- a produção das prostaglandinas PGD₂, PGJ₂ e LTB₄ é dependente da ativação do TLR2, mas não da molécula adaptadora MyD88;
- a produção das citocinas IL-1 β e IL-10 é dependente da ativação do receptor TLR2/MyD88.

A MT-III induziu em monócitos humanos:

- aumento da biogênese de corpúsculos lipídicos;
- aumento dos níveis do RNA mensageiro para a PLN2;
- aumento dos níveis intracelulares do triacilglicerol e colesterol;

- aumento dos níveis de ácidos graxos livres. A fosfolipase A₂ citosólica participa da liberação dos ácidos graxos monoinsaturados palmitoleico (16:1) e oleico (18:1), os ácidos poli-insaturados ácido linoleico (18:2), eicosadienóico (20:2), eicosatrienóico (20:3), araquidônico (20:4), eicosapentaenoico (20:5), adrenico (22:4), docosapentaenoico (22:5) e docosahexaenoico (22:6), porém não interfere na liberação total de ácidos graxos livres intracelulares.
- redução dos níveis do RNA mensageiro para as enzimas ácido graxo sintase, desaturase estearoil-CoA, alongase de ácidos graxos de cadeia muito longa, carboxilase acetil-CoA e para os fatores de transcrição SREBP-1c e SREBP-2;
- liberação do ácido araquidônico dos fosfolípidos de membrana fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE) e fosfatidilinositol (PI);
- formação de lisofosfolípidos do tipo lisofosfatidilcolina (LPC), lisofosfatidiletanolamina (LPE) e lisofosfatidilinositol (LPI).

Figura 28. Representação esquemática dos mecanismos e fatores envolvidos na formação de corpúsculos lipídicos e síntese mediadores, induzida pela MT-III, em macrófagos. A MT-III atua sobre os fosfolípidos de membrana gerando lisofosfolípidos (LPC, LPE e LPI) e ácidos graxos livres, que são ligantes de receptores de membrana, como o TLR2, CD36 e dos receptores e fatores de transcrição citoplasmáticos PPARs. Desse modo, A MT-III induz a ativação dos fatores de transcrição PPAR- γ , PPAR- δ/β e SREBP2, além de aumentar os teores proteicos dos PPARs e do CD36. Os receptores PPAR- γ , PPAR- β/δ , TLR2/MyD88 e CD36 e as enzimas DGAT, ACAT e ácido graxo sintase são relevantes para a formação de corpúsculos lipídicos induzida pela MT-III. O receptor PPAR- β/δ , mas não o do PPAR- γ , está envolvido na expressão proteica da PLIN2, induzida pela MT-III. Ainda, o receptor CD36 e o TLR2/MyD88 são essenciais para a expressão da COX-2, induzida pela MT-III. Além disso, o TLR2 e a molécula adaptadora MyD88 participam do recrutamento da proteína PLIN2 e da síntese das citocinas IL-1 β e IL-10, estimulados pela MT-III. Ainda, a ativação do receptor TLR2, pela MT-III, foi essencial para a liberação de PGE₂, PGD₂, PGJ₂ e LTB₄, enquanto a molécula MyD88 foi fundamental apenas para a liberação de PGE₂.

REFERÊNCIAS*

- ABE, T.; SAKAMOTO, K.; MITA, S.; KAMOHARA, H.; HIRANO, Y.; KUWAHARA, N.; OGAWA, M. Surgical trauma induces group II phospholipase A2 production by neutrophils at a local site after surgery. **Clin. Biochem.**, v. 31, p. 101-106, 1998.
- ABRASS, C. K.; O'CONNOR, S. W.; SCARPACE, P. J.; ABRASS, I. B. Characterization of the beta-adrenergic receptor of the rat peritoneal macrophage. **J. Immunol.**, v. 135, p. 1338-1341, 1985.
- ADEREM, A.; ULEVITCH, R. J. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. **Nature**, v. 406, p. 782-787, 2000.
- ADEREM, A.; UNDERHILL, D. M. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 17, p. 593-623, 1999.
- ALAOUI-EL-AZHER, M.; WU, Y.; HAVET, N.; ISRAËL, A.; LILIENBAUM, A.; TOUQUI, L. Arachidonic acid differentially affects basal and lipopolysaccharide-induced sPLA(2)-IIA expression in alveolar macrophages through NF-kappaB and PPAR-gamma-dependent pathways. **Mol. Pharmacol.**, v. 61, p. 786-794, 2002.
- ALMEIDA, P. E.; SILVA, A. R.; MAYA-MONTEIRO, C. M.; TÖRÖCSIK, D.; D'AVILA, H.; DEZSÖ, B.; MAGALHÃES, K. G.; CASTRO-FARIA-NETO, H. C.; NAGY, L.; BOZZA, P. T. Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guérin infection induces TLR2-dependent peroxisome proliferator-activated receptor gamma expression and activation: functions in inflammation, lipid metabolism, and pathogenesis. **J. Immunol.**, v. 183, p. 1337-1345, 2009.
- ASAI, K.; HIRABAYASHI, T.; HOUJOU, T.; UOZUMI, N.; TAGUCHI, R.; SHIMIZU, T. Human group IVC phospholipase A2 (cPLA2). Roles in the membrane remodeling and activation induced by oxidative stress. **J. Biol. Chem.**, v. 278, p. 8809-8814, 2003.
- ASTUDILLO, A.M.; PEREZ-CHACON, G.; MEANA, C.; BALGOMA, D.; POL, A.; DEL POZO, M.A.; BALBOA, M. A.; BALSINDE, J. Altered arachidonate distribution in macrophages from caveolin-1 null mice leading to reduced eicosanoid synthesis. **J Biol Chem**, v. 286, p. 35299-35307, 2011.
- ATSUMI, G.; MURAKAMI, M.; KOJIMA, K.; HADANO, A.; TAJIMA, M.; KUDO, I. Distinct roles of two intracellular phospholipase A2s in fatty acid release in the cell death pathway. Proteolytic fragment of type IVA cytosolic phospholipase A2alpha inhibits stimulus-induced arachidonate release, whereas that of type VI Ca2+-independent phospholipase A2 augments spontaneous fatty acid release. **J. Biol. Chem.**, v. 275, p. 18248-18258, 2000.
- AUGER, M.J.; ROSS, J.A.; In: LEWIS, C.E. & McGEE, J.O'D.; ed. **The natural immune system: the macrophage**. IRL Press, Oxford, Ne York, Tokio, 1992 p. 1-57.
- BARRENSCHEE, M.; LEX, D.; UHLIG, S. Effects of the TLR2 agonists MALP-2 and Pam3Cys in isolated mouse lungs. **PLoS One**, v.5, p.e13889, 2010.
- BARRENSCHEE, M.; LEX, D.; UHLIG, S. Effects of the TLR2 agonists MALP-2 and Pam3Cys in isolated mouse lungs. **PLOS ONE**, v. 5, p. E13889, 2010.
- BARTZ, R.; LI, W. H.; VENABLES, B.; ZEHMER, J. K.; ROTH, M. R.; WELTI, R.; ANDERSON, R. G.; LIU, P.; CHAPMAN, K. D. Lipidomics reveals that adiposomes store ether lipids and mediate
- De acordo com:
ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 6023: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

phospholipid traffic. **J. Lipid Res.**, v. 48, p. 837-847, 2007.

BAUER, S.; WANNINGER, J.; SCHMIDHOFER, S.; WEIGERT, J.; NEUMEIER, M.; DORN, C.; HELLERBRAND, C.; ZIMARA, N.; SCHÄFFLER, A.; ASLANIDIS, C.; BUECHLER, C. Sterol regulatory element-binding protein 2 (SREBP2) activation after excess triglyceride storage induces chemerin in hypertrophic adipocytes. **Endocrinology**, v. 152, p. 26-35, 2011.

BAYBURT, T.; YU, B. Z.; LIN, H. K.; BROWNING, J.; JAIN, M. K.; GELB, M. H. Human nonpancreatic secreted phospholipase A2: interfacial parameters, substrate specificities, and competitive inhibitors. **Biochemistry**, v. 32, p. 573-582, 1993.

BECKMAN, M. Cell biology. Great balls of fat. **Science**, v. 311, p. 1232-1234, 2006.

BENSINGER, S.J.; TONTONOZ, P. Integration of metabolism and inflammation by lipid-activated nuclear receptors. **Nature**, v. 454, p. 470-477, 2008.

BJORKBACKA, H.; KUNJATHOOR, V. V.; MOORE, K. J.; KOEHN, S.; ORDIJA, C. M.; LEE, M. A.; MEANS, T.; HALMEN, K.; LUSTER, A. D.; GOLENBOCK, D. T.; FREEMAN, M. W. Reduced atherosclerosis in MyD88-null mice links elevated serum cholesterol levels to activation of innate immunity signaling pathways. **Nat. Med.**, v. 10, p. 416-421, 2004.

Bligh, E. G., and W. J. Dyer. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Can. J. Biochem. Physiol.**, v. 37, p. 911-917, 1959.

BÖNI-SCHNETZLER, M.; BOLLER, S.; DEBRAY, S.; BOUZAKRI, K.; MEIER, D. T.; PRAZAK, R.; KERR-CONTE, J.; PATTOU, F.; EHSES, J. A.; SCHUIT, F. C.; DONATH, M. Y. Free fatty acids induce a proinflammatory response in islets via the abundantly expressed interleukin-1 receptor I. **Endocrinology**, v. 50, p. 5218-5229, 2009.

BOUDREAU, L. H.; DUCHEZ, A. C.; CLOUTIER, N.; SOULET, D.; MARTIN, N.; BOLLINGER, J.; PARÉ, A.; ROUSSEAU, M.; NAIKA, G. S.; LÉVESQUE, T.; LAFLAMME, C.; MARCOUX, G.; LAMBEAU, G.; FARNDAL, R. W.; POULIOT, M.; HAMZEH-COGNASSE, H.; COGNASSE, F.; GARRAUD, O.; NIGROVIC, P. A.; GUDERLEY, H.; LACROIX, S.; THIBAUT, L.; SEMPLE, J. W.; GELB, M. H.; BOILARD, E. Platelets release mitochondria serving as substrate for bactericidal group IIA-secreted phospholipase A2 to promote inflammation. **Blood**, v. 124, p. 2173-2183, 2014.

BOZZA, P. T.; BAKKER-ABREU, I.; NAVARRO-XAVIER, R. A.; BANDEIRA-MELO, C. Lipid body function in eicosanoid synthesis: an update. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**, v. 85, p. 205-213, 2011.

BRASAEMLE, D. L. Thematic review series: adipocyte biology. The perilipin family of structural lipid droplet proteins: stabilization of lipid droplets and control of lipolysis. **J. Lipid. Res.**, v. 48, p. 2547-2559, 2007.

BRASAEMLE, D. L.; BARBER, T.; WOLINS, N. E.; SERRERO, G.; BLANCHETTE-MACKIE, E. J.; LONDOS, C. Adipose differentiation-related protein is an ubiquitously expressed lipid storage droplet-associated protein. **J. Lipid. Res.**, v. 38, p. 2249-2263, 1997.

BROWN, W. J.; CHAMBERS, K.; DOODY, A. Phospholipase A2 (PLA2) enzymes in membrane trafficking: mediators of membrane shape and function. **Traffic**, v. 4, p. 214-221, 2003.

BUJOLD, K.; RHAINDS, D.; JOSSART, C.; FEBBRAIO, M.; MARLEAU, S.; ONG, H. CD36-mediated cholesterol efflux is associated with PPARγ activation via a MAPK-dependent COX-2 pathway in macrophages. **Cardiovascular Research**, v. 83, p. 457-464, 2009.

CAO, F.; CASTRILLO, A.; TONTONNOZ, P.; RE, F.; BYRNE, G. I. Chlamydia pneumoniae--induced macrophage foam cell formation is mediated by Toll-like receptor 2. **Infect. Immun.**, v. 75, p. 753–759, 2007.

CAO, H.; GERHOLD, K.; MAYERS, J. R.; WIEST, M. M.; WATKINS, S. M.; HOTAMISLIGIL, G. S. Identification of a lipokine, a lipid hormone linking adipose tissue to systemic metabolism. **Cell.**, v. 134, p. 933-944, 2008.

CASTRILLO, A.; TONTONNOZ, P. Nuclear receptors in macrophage biology: at the crossroads of lipid metabolism and inflammation. **Annu. Rev. Cell Dev. Biol.**, v. 20, p. 455–480, 2004.

CHABOWSKI, A.; ŻENDZIAN-PIOTROWSKA, M.; KONSTANTYNOWICZ, K.; PANKIEWICZ, W.; MIKŁOSZ, A.; ŁUKASZUK, B.; GÓRSKI, J. Fatty acid transporters involved in the palmitate and oleate induced insulin resistance in primary rat hepatocytes. **Acta Physiol. (Oxf)**, v. 207, p. 346-57, 2013.

CHABOWSKI, A.; ŻENDZIAN-PIOTROWSKA, M.; KONSTANTYNOWICZ, K.; PANKIEWICZ, W.; MIKŁOSZ, A.; ŁUKASZUK, B.; GÓRSKI, J. Fatty acid transporters involved in the palmitate and oleate induced insulin resistance in primary rat hepatocytes. **Acta Physiol (Oxf)**, v. 207, p. 346-357, 2013.

CHAKRABORTI, S. Phospholipase A(2) isoforms: a perspective. **Cell Signal.**, v. 15, p. 637- 665, 2003.

CHAVES, F.; LEON, G.; ALVARADO, V. H.; GUTIÉRREZ, J. M. Pharmacological modulation of edema induced by Lys-49 and Asp-49 myotoxic phospholipases A2 isolated from the venom of the snake Bothrops asper (terciopelo). **Toxicon.**, v. 36, p. 1861-1869, 1998.

CHÁVEZ-SÁNCHEZ, L.; CHÁVEZ-RUEDA, K.; LEGORRETA-HAQUET, M. V.; ZENTENO, E.; LEDESMA-SOTO, Y.; MONTOYA-DÍAZ, E.; TESORO-CRUZ, E.; MADRID-MILLER, A.; BLANCO-FAVELA, F. The activation of CD14, TLR4, and TLR2 by mmLDL induces IL-1 β , IL-6, and IL-10 secretion in human monocytes and macrophages. **Lipids Health Dis.**, v. 9, p. 117, 2010.

CHEN, F. L.; YANG, Z. H.; WANG, X. C.; LIU, Y.; YANG, Y. H.; LI, L. X.; LIANG, W. C.; ZHOU, W. B.; HU, R. M. Adipophilin affects the expression of TNF-alpha, MCP-1, and IL-6 in THP-1 macrophages. **Mol Cell Biochem.**, v. 337, p. 193-199, 2009.

CHILTON, F. H.; AVERILL, F. J.; HUBBARD, W. C.; FONTEH, A. N.; TRIGGIANI, M.; LIU, M. C. Antigen-induced generation of lyso-phospholipids in human airways. **J. Exp. Med.**, v. 183, p. 2235-2245, 1996.

CHOI, S. H.; HARKEWICZ, R.; LEE, J. H.; BOULLIER, A.; ALMAZAN, F.; LI, A. C.; WITZTUM, J. L.; BAE, Y. S.; MILLER, Y. I. Lipoprotein accumulation in macrophages via toll-like receptor-4-dependent fluid phase uptake. **Circ. Res.**, v. 104, p. 1355-1563, 2009.

CHOUDHURY, R. P.; LEE, J. M.; GREAVES, D. R. Mechanisms of disease: macrophage-derived foam cells emerging as therapeutic targets in atherosclerosis. **Nat Clin Pract Cardiovasc Med.**, 2:309-315, 2005.Review

CHUANG, T. K.; KILLAM, K. F. JR.; CHUANG, L. F.; KUNG, H. F.; SHENG, W. S.; CHAO, C. C.; YU, L.; CHUANG, R. Y. Mu opioid receptor gene expression in immune cells. **Biophys. Res. Commun.**, v. 216, p. 922-930, 1995.

COLGAN, S. M.; HASHIMI, A. A.; AUSTIN, R. C. Endoplasmic reticulum stress and lipid dysregulation. **Expert. Rev. Mol. Med.**, v. 3, p. 13:e4, 2011.

CORDA, D.; IURISCI, C.; BERRIE, C. P. Biological activities and metabolism of the lysophosphoinositides and glycerophosphoinositols, *Biochim. Biophys. Acta*, v. 1582, p. 52–69, 2002.

D'AVILA, H.; MELO, R. C.; PARREIRA, G. G.; WERNECK-BARROSO, E.; CASTRO-FARIA-NETO, H. C.; BOZZA, P. T. Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guérin induces TLR2-mediated formation of lipid bodies: intracellular domains for eicosanoid synthesis in vivo. *J. Immunol.*, v. 176, p. 3087-3097, 2006.

D'AVILA, H.; ROQUE, N. R.; CARDOSO, R. M.; CASTRO-FARIA-NETO, H. C.; MELO, R. C.; BOZZA, P. T. Neutrophils recruited to the site of Mycobacterium bovis BCG infection undergo apoptosis and modulate lipid body biogenesis and prostaglandin E production by macrophages. *Cell Microbiol.*, v. 10, p. 2589-2604, 2008.

DAVIDSON, F. F.; DENNIS, E. A. Evolutionary relationships and implications for the regulation of phospholipase A2 from snake venom to human secreted forms. *J. Mol. Evol.*, v. 31, p. 228-238, 1990.

DESVERGNE, B.; WAHLI, W. Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. *Endocr Rev.* v. 20, p. 649-688, 1999.

DROVER, V. A.; NGUYEN, D. V.; BASTIE, C. C.; DARLINGTON, Y. F.; ABUMRAD, N. A.; PESSIN, J. E.; LONDON, E.; SAHOO, D.; PHILLIPS, M. C. CD36 mediates both cellular uptake of very long chain fatty acids and their intestinal absorption in mice. *J. Biol. Chem.*, v. 283, p. 13108-13115, 2008.

DUSHKIN, M. I. Macrophage/foam cell is an attribute of inflammation: mechanisms of formation and functional role. *Biochemistry (Mosc)*, v. 77, p. 327-338.

EBERLÉ, D.; HEGARTY, B.; BOSSARD, P.; FERRÉ, P.; FOUFELLE, F. SREBP transcription factors: master regulators of lipid homeostasis. *Biochimie*, v. 86, p. 839-848, 2004.

EDFELDT, K.; SWEDENBORG, J.; HANSSON, G. K.; YAN, Z. Q. Expression of toll-like receptors in human atherosclerotic lesions: a possible pathway for plaque activation. *Circulation*, v. 105, p. 1158–1161, 2002.

EDVARDSSON, U.; LJUNGBERG, A.; LINDÉN, D.; WILLIAM-OLSSON, L.; PEILOT-SJÖGREN, H.; AHNMARK, A.; OSCARSSON, J. PPAR α activation increases triglyceride mass and adipose differentiation-related protein in hepatocytes. *J. Lipid. Res.*, v. 47, p. 329-340, 2006.

EDWARDS, P. A.; TABOR, D.; KAST, H. R.; VENKATESWARAN, A. Regulation of gene expression by SREBP and SCAP. *Biochim Biophys Acta.*, v. 1529, p. 103-113, 2000.

EVANS, J. H.; GERBER, S. H.; MURRAY, D.; LESLIE, C. C. The calcium binding loops of the cytosolic phospholipase A2 C2 domain specify targeting to Golgi and ER in live cells. *Mol. Biol. Cell.*, v. 15, p. 371-383, 2004.

FAGONE, P.; JACKOWSKI, S. Membrane phospholipid synthesis and endoplasmic reticulum function. *J Lipid Res.*, Suppl, v. 50, p. 311-316, 2009.

FAN, B.; IKUYAMA, S.; GU, J. Q.; WEI, P.; OYAMA, J.; INOUCHI, T.; NISHIMURA, J. Oleic acid-induced ADRP expression requires both AP-1 and PPAR response elements, and is reduced by Pycnogenol through mRNA degradation in NMuLi liver cells. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, v. 297, p:E112-123, 2009.

FARESE R.V.; WALTHER, T. C. Lipid droplets finally get a little R-E-S-P-E-C-T. *CELL*, **139**:855-860, 2009.

FEBBRAIO, M.; PODREZ, E. A.; SMITH, J. D.; HAJJAR, D. P.; HAZEN, S. L.; HOFF, H. F.; SHARMA, K.; SILVERSTEIN, R. L. Targeted disruption of the class B scavenger receptor CD36 protects against atherosclerotic lesion development in mice. **J Clin Invest.**, v. 105, p.1049-1056, 2000.

FEBBRAIO, M.; PODREZ, E. A.; SMITH, J. D.; HAJJAR, D. P.; HAZEN, S. L.; HOFF, H. F.; SHARMA, K.; SILVERSTEIN, R. L. Targeted disruption of the class B scavenger receptor CD36 protects against atherosclerotic lesion development in mice. **J Clin Invest.**, v.105, p. 1049-1056, 2000.

FEINGOLD, K. R.; KAZEMI, M. R.; MAGRA, A. L.; MCDONALD, C. M.; CHUI, L. G.; SHIGENAGA, J. K.; PATZEK, S. M.; CHAN, Z. W.; LONDOS, C.; GRUNFELD, C. ADRP/ADFP and Mall expression are increased in macrophages treated with TLR agonists. **Atherosclerosis**, v. 209, p. 81–88, 2010.

FERNÁNDEZ, J.; CACCIN, P.; KOSTER, G.; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J. M.; MONTECUCCO, C.; POSTLE, A. D. Muscle phospholipid hydrolysis by Bothrops asper Asp49 and Lys49 phospholipase A₂ myotoxins--distinct mechanisms of action. **FEBS J.**, v. 280, p. 3878-3886, 2013.

FUJIMOTO, Y.; ITABE, H.; KINOSHITA, T.; HOMMA, K. J.; ONODUKA, J.; MORI, M.; YAMAGUCHI, S.; MAKITA, M.; HIGASHI, Y.; YAMASHITA, A.; TAKANO, T. Involvement of ACSL in local synthesis of neutral lipids in cytoplasmic lipid droplets in human hepatocyte HuH7. **J. Lipid Res.**, v. 48, p. 1280-1292, 2007.

FUNK, J. L.; FEINGOLD, K. R.; MOSER, A. H.; GRUNFELD, C. Lipopolysaccharide stimulation of RAW 264.7 macrophages induces lipid accumulation and foam cell formation. **Atherosclerosis**, v. 98, p. 67-82, 1993.

GALIS, Z. S.; SUKHOVA, G. K.; LARK, M. W.; LIBBY, P. Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques. **J Clin Invest.**, v. 94, p. 2493-2503, 1994.

GALKINA, E.; LEY, K. Immune and inflammatory mechanisms of atherosclerosis. **Annu Rev Immunol.**, v. 27, p. 165-197, 2009.

GALLI, S.; DVORAK, A. M.; PETERS, S. P.; SCHULMAN, E. S.; MACGLASHAN, D. W.; ISOMURA, V.; PYRE, K.; HARVEY, V. S.; LICHTENSTEIN, L. M.; DVORAK, H. F. 1985 In: BAILEY, J. M. (Ed.). **Prostaglandin, Leukotrienes and Lipoxins**. New York: Plenum Press, p. 221-239.

GAO, D.; PARARASA, C.; DUNSTON, C. R.; BAILEY, C. J.; GRIFFITHS, H. R. Palmitate promotes monocyte atherogenicity via de novo ceramide synthesis. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 53, p. 796-806, 2012.

GAVÉRIAUX, C.; PELUSO, J.; SIMONIN, F.; LAFERET, J.; KIFFER, B. **FEBS Lett.**, **369**:272–276, 1995.

GE, Y.; ELGHETANY, M. T. CD36: a multiligand molecule. **Lab Hematol.**, v. 11, p. 31–37, 2005.

GE, Y.; ELGHETANY, M. T. CD36: a multiligand molecule. **Lab Hematol.** v.11, p. 31-37, 2005.

GEISSMANN, F.; MANZ, M. G.; JUNG, S.; SIEWEKE, M. H.; MERAD, M.; LEY, K. Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. **Science.**, v. 327, p. 656-661, 2010.

GHSQUIERE, S. A.; GIJBELS, M. J.; ANTHONSEN, M.; VAN GORP, P. J.; VAN DER MADE, I.; JOHANSEN, B.; HOFKER, M. H.; DE WINTHER, M. P. Macrophage-specific overexpression of

group IIa sPLA2 increases atherosclerosis and enhances collagen deposition. **J. Lipid Res.**, v. 46, p. 201–210, 2005.

GIGUÈRE, V. Orphan nuclear receptors: from gene to function. **Endocr. Rev.**, v. 20, p. 689–725, 1999.

GOLDSTEIN, J. L.; DEBOSE-BOYD, R. A.; BROWN, M. S. Protein sensors for membrane sterols. *Cell*, v. 124, p. 35–46, 2006.

GOSLING, J.; SLAYMAKER, S.; GU, L.; TSENG, S.; ZLOT, C. H.; YOUNG, S. G.; ROLLINS, B. J.; CHARO, I. F. B. MCP-1 deficiency reduces susceptibility to atherosclerosis in mice that overexpress human apolipoprotein B. **J Clin Invest.**, v.103, p. 773–778, 1999.

GRAF, B. A.; NAZARENKO, D. A.; BORRELLO, M. A.; ROBERTS, L. J.; MORROW, J. D.; PALIS, J.; PHIPPS, R. P. Biphenotypic B/macrophage cells express COX-1 and up-regulate COX-2 expression and prostaglandin E(2) production in response to pro-inflammatory signals. **Eur. J. Immunol.**, v. 29, p. 3793–3803, 1999.

GRÄLER M, H.; GOETZL, E. J. Lysophospholipids and their G protein-coupled receptors in inflammation and immunity. **Biochim Biophys Acta.**, v. 1582, p. 168–174, 2002.

GREENBERG, A. S.; COLEMAN, R. A.; KRAEMER, F. B.; MCMANAMAN, J. L.; OBIN, M. S.; PURI, V.; YAN, Q. W.; MIYOSHI, H.; MASHEK, D. G. The role of lipid droplets in metabolic disease in rodents and humans. **J. Clin. Invest.**, v. 121, p. 2102–2110, 2011.

GUBERN, A.; BARCELÓ-TORNS, M.; CASAS, J.; BARNEDA, D.; MASGRAU, R.; PICATOSTE, F.; BALSINDE, J.; BALBOA, M. A.; CLARO, E. Lipid droplet biogenesis induced by stress involves triacylglycerol synthesis that depends on group VIA phospholipase A₂. **J. Biol. Chem.**, v. 284, p. 5697 – 5708, 2009.

GUIJAS, C.; PÉREZ-CHACÓN, G.; ASTUDILLO, A. M.; RUBIO, J. M.; GIL-DE-GÓMEZ, L.; BALBOA, M. A.; BALSINDE, J. Simultaneous activation of p38 and JNK by arachidonic acid stimulates the cytosolic phospholipase A2-dependent synthesis of lipid droplets in human monocytes. **J. Lipid Res.**, v. 53, p. 2343–54, 2012.

GUTIERREZ, J. M.; CHAVES, F.; CERDAS, L. Inflammatory infiltrate in skeletal muscle injected with Bothrops asper venom. **Rev. Biol. Trop.**, v. 34, p. 209–219, 1986.

GUTIERREZ, J. M.; LOMONTE, B. Phospholipase A2 myotoxins from Bothrops snake venoms. **Toxicon**, v. 33, p. 1405–1424, 1995.

GUTIERREZ, J. M.; LOMONTE, B. Venom A2 Enzymes. Structure, Function and Mechanism. Chichester: John Wiley e Sons, 1997. p. 321–352.

HAAPAMAKI, M. M.; GRONROOS, J. M.; NURMI, H.; ALANEN, K.; NEVALAINEN, T. J. Phospholipase A2 in serum and colonic mucosa in ulcerative colitis. **J. Clin. Lab. Invest.**, v. 59, p. 279–287, 1999.

HAAPAMAKI, M. M.; GRONROOS, J. M.; NURMI, H.; SODERLUND, K.; PEURAVUORI, H.; ALANEN, K.; NEVALAINEN, T. J. Elevated group II phospholipase A2 mass concentration in serum and colonic mucosa in Crohn's disease. **J. Clin. Chem. Lab. Med.**, v. 36, p. 751–755, 1998.

HAMILTON, J. A.; ANDERSON, G. P. GM-CSF Biology. **Growth Factors**, v. 22, p. 225–231, 2004.

HAN, S. K.; KIM, K. P.; KODURI, R.; BITTOVA, L.; MUNOZ, N. M.; LEFF, A. R.; WILTON, D. C.; GELB, M. H.; CHO, W.; Roles of Trp31 in high membrane binding and proinflammatory activity

of human group V phospholipase A2. **J Biol Chem**, v. 274, p. 11881-11888, 1999.

HARMON, C. M.; LUCE, P.; BETH, A. H.; ABUMRAD, N. A. Labeling of adipocyte membranes by sulfo-N-succinimidyl derivatives of long-chain fatty acids: inhibition of fatty acid transport. **J Membr Biol.**, v. 121, p. 261-268, 1991.

HARRIS, C. A.; HAAS, J. T.; STREEPER, R. S.; STONE, S. J.; KUMARI, M.; YANG, K.; HAN, X.; BROWNELL, N.; GROSS, R. W.; ZECHNER, R.; FARESE, R. V JR. DGAT enzymes are required for triacylglycerol synthesis and lipid droplets in adipocytes. **J Lipid Res.**, v. 52, p. 657-667, 2011.

HEINRIKSON, R. L.; KRUEGER, E. T.; KEIM, P. S. Amino acid sequence of phospholipase A2- α from the venom of *Crotalus adamanteus*. A new classification of phospholipases A2 based upon structural determinants. **J. Biol. Chem.**, v. 252, p. 4913-4921, 1977.

HERBERT, S. P.; ODELL, A. F.; PONNAMBALAM, S.; WALKER, J. H. Activation of cytosolic phospholipase A2- α as a novel mechanism regulating endothelial cell cycle progression and angiogenesis. **J. Biol.Chem.**, v. 284, p. 5784-5796, 2009.

HIRABAYASHI, T.; KUME, K.; HIROSE, K.; YOKOMIZO, T.; IINO, M.; ITOH, H.; SHIMIZU, T. Critical duration of intracellular Ca²⁺ response required for continuous translocation and activation of cytosolic phospholipase A2. **J. Biol. Chem.**, v. 274, p. 163-169, 1999.

HIRAOKA, M.; ABE, A.; SHAYMAN, J. A. Cloning and characterization of a lysosomal phospholipase A2, 1-O-acylceramide synthase. **J. Biol. Chem.**, v. 277, p. 10090-10099, 2002.

HORTON, J. D.; SHAH, N. A.; WARRINGTON, J. A.; ANDERSON, N. N.; PARK, S. W.; BROWN, M. S.; GOLDSTEIN, J. L. Combined analysis of oligonucleotide microarray data from transgenic and knockout mice identifies direct SREBP target genes. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 100, p. 12027-12032, 2003.

HUANG, Q.; POPE, R. M. Toll-like receptor signaling: a potential link among rheumatoid arthritis, systemic lupus, and atherosclerosis. **J. Leukoc. Biol.**, v. 88, p. 253-262, 2010.

HUANG, S.; RUTKOWSKY, J. M.; SNODGRASS, R. G.; ONO-MOORE, K. D.; SCHNEIDER, D. A.; NEWMAN, J. W.; ADAMS, S. H.; HWANG, D. H. Saturated fatty acids activate TLR-mediated proinflammatory signaling pathways. **J Lipid Res.**, v. 53, p. 2002-2013, 2012.

HUI, D. Y. Phospholipase A₂ enzymes in metabolic and cardiovascular diseases. **Curr. Opin. Lipidol.**, v. 23, p. 235-240, 2012.

IBRAHIMI, A.; BONEN, A.; BLINN, W. D.; HAJRI, T.; LI, X.; ZHONG, K.; CAMERON, R.; ABUMRAD, N. A. Muscle-specific overexpression of FAT/CD36 enhances fatty acid oxidation by contracting muscle, reduces plasma triglycerides and fatty acids, and increases plasma glucose and insulin. **J Biol Chem.**, v. 274, p. 26761-26766, 1999.

JENKINS, C. M.; MANCUSO, D. J.; YAN, W.; SIMS, H. F.; GIBSON, B.; GROSS, R.W. Identification, cloning, expression, and purification of three novel human calcium-independent phospholipase A2 family members possessing triacylglycerol lipase and acylglycerol transacylase activities. **J. Biol. Chem.**, v. 279, p. 48968-48975, 2004.

JIANG, H. P.; SERRERO, G. Isolation and characterization of a full-length cDNA coding for an adipose differentiation-related protein. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 89, p. 7856-7860, 1992.

JOHNSTON, R. B. JR. N. Current concepts: immunology. Monocytes and macrophages. **Engl. J. Med.**, v. 318, p. 747-52, 1988.

- KAISER, I. I.; GUTIERREZ, J. M.; PLUMMER, D.; AIRD, S. D.; ODELL, G. D. The amino acid sequence of a myotoxic phospholipase from the venom of *Bothrops asper*. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 278, p. 319-25, 1990.
- KAWAI, T.; AKIRA, S. TLR signaling. **Semin. Immunol.**, v. 19, p. 24-32, 2007.
- KAWASAKI, T.; KAWAI, T. Toll-like receptor signaling pathways. **Front Immunol.**, v.5, p.461 1-8, 2014.
- KIM, D. K.; FUKUDA, T.; THOMPSON, B. T.; COCKRILL, B.; HALES, C.; BONVENTRE, J. V. Bronchoalveolar lavage fluid phospholipase A2 activities are increased in human adult respiratory distress syndrome. **Am. J. Physiol.**, v. 269, p. 109-118, 1995.
- KIM, Y. J.; KIM, K. P.; HAN, S. K.; MUNOZ, N. M.; ZHU, X.; SANO, H.; LEFF, A. R.; CHO, W. Group V phospholipase A2 induces leukotriene biosynthesis in human neutrophils through the activation of group IVA phospholipase A2. **J Biol Chem**, v. 277, p. 36479-36488, 2002.
- KIMURA-MATSUMOTO, M.; ISHIKAWA, Y.; KOMIYAMA, K.; TSURUTA, T.; MURAKAMI, M.; MASUDA, S.; AKASAKA, Y.; ITO, K.; ISHIGURO, S.; MORITA, H.; SATO, S.; ISHII, T. Expression of secretory phospholipase A2s in human atherosclerosis development. **Atherosclerosis**, v. 196, p. 81-91, 2008.
- KING, A. J.; SEGRETI, J. A.; LARSON, K. J.; SOUERS, A. J.; KYM, P. R.; REILLY, R. M.; ZHAO, G.; MITTELSTADT, S. W.; COX, B. F. Diacylglycerol acyltransferase 1 inhibition lowers serum triglycerides in the Zucker fatty rat and the hyperlipidemic hamster. **J Pharmacol Exp Ther.**, v. 330, p. 526-531, 2009.
- KODURI, R. S.; BAKER, S. F.; SNITKO, Y.; HAN, S.K.; CHO, W.; WILTON, D.C.; GELB, M.H. Action of human group IIa secreted phospholipase A2 on cell membranes. Vesicle but not heparinoid binding determines rate of fatty acid release by exogenously added enzyme. **J Biol Chem**, v. 273, p. 32142-32153, 1998.
- KOLIWAD, S. K.; STREEPER, R. S.; MONETTI, M.; CORNELISSEN, I.; CHAN, L.; TERAYAMA, K.; NAYLOR, S.; RAO, M.; HUBBARD, B.; FARESE, R.V. JR. DGAT1-dependent triacylglycerol storage by macrophages protects mice from diet-induced insulin resistance and inflammation. **J. Clin Invest.**, v. 120, p. 756-767, 2010.
- KUDA, O.; JENKINS, C. M.; SKINNER, J. R.; MOON, S. H.; SU, X.; GROSS, R. W.; ABUMRAD, N. A. CD36 protein is involved in store-operated calcium flux, phospholipase A2 activation, and production of prostaglandin E2. **J. Biol. Chem.**, v. 286, p. 17785-17795, 2011.
- KUERSCHNER, L.; MOESSINGER, C.; THIELE, C. Imaging of lipid biosynthesis: how a neutral lipid enters lipid droplets. **Traffic**, v. 9, p. 338-352, 2008.
- KUSUNOKI, J.; HANSOTY, D. K.; ARAGANE, K.; FALLON, J. T.; BADIMON, J. J.; FISHER, E. A. Acyl-CoA:cholesterol acyltransferase inhibition reduces atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. **Circulation**, v. 103, p. 2604-2609, 2001.
- LAMBEAU, G.; MARONE, G.; TRIGGINANI, M. Activation of cytokine production by secreted phospholipase A2 in human lung macrophages expressing the M-type receptor. **J. Immunol.**, v. 174, p. 464-474, 2005.
- LARIGAUDERIE, G.; FURMAN, C.; JAYE, M.; LASSELIN, C.; COPIN, C.; FRUCHART, J. C.; CASTRO, G.; ROUIS, M. Adipophilin enhances lipid accumulation and prevents lipid efflux from THP-1 macrophages: potential role in atherogenesis. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 24, p. 504-510, 2004.

LEE, J. Y.; ZHAO, L.; YOUN, H. S.; WEATHERILL, A. R.; TAPPING, R.; FENG, L.; LEE, W. H.; FITZGERALD, K. A.; HWANG, D. H. Saturated fatty acid activates but polyunsaturated fatty acid inhibits Toll-like receptor 2 dimerized with Toll-like receptor 6 or 1. **J. Biol. Chem.**, v. 279, p. 16971–16979, 2004.

LEE, T. S.; LIN, C. Y.; TSAI, J. Y.; WU, Y. L.; SU, K. H.; LU, K. Y.; HSIAO, S. H.; PAN, C. C.; KOU, Y. R.; HSU, Y. P.; HO, L. T. Resistin increases lipid accumulation by affecting class A scavenger receptor, CD36 and ATP-binding cassette transporter-A1 in macrophages. **Life Sci.**, v. 84, p. 97-104, 2009.

LEIGUEZ, E.; ZULIANI, J.P.; CIANCIARULLO, A. M.; FERNANDES, C. M.; GUTIÉRREZ, J. M.; TEIXEIRA, C. A group IIA-secreted phospholipase A2 from snake venom induces lipid body formation in macrophages: the roles of intracellular phospholipases A2 and distinct signaling pathways. **J. Leukoc Biol.**, v. 90, p. 155-166, 2011.

LIBBY, P.; OKAMOTO, Y.; ROCHA, V. Z.; FOLCO, E. Inflammation in atherosclerosis: transition from theory to practice. **Circ. J.**, v. 74, p. 213-20, 2010.

LIN, M. K.; FAREWELL, V.; VADAS, P.; BOOKMAN, A. A.; KEYSTONE, E. C.; PRUZANSKI, W. Secretory phospholipase A2 as an index of disease activity in rheumatoid arthritis. Prospective double blind study of 212 patients. **J. Rheumatol.**, v. 23, p. 1162-1166, 1996.

LIU, Q.; DAI, Z.; LIU, Z.; LIU, X.; TANG, C.; WANG, Z.; YI, G.; LIU, L.; JIANG, Z.; YANG, Y.; YUAN, Z. Oxidized low-density lipoprotein activates adipophilin through ERK1/2 signal pathway in RAW264.7 cells. **Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)**, v. 42, p. 635-645, 2010.

LIU, X.; UKAI, T.; YUMOTO, H.; DAVEY, M.; GOSWAMI, S.; GIBSON, F. C. 3RD.; GENCO, C. A. Toll-like receptor 2 plays a critical role in the progression of atherosclerosis that is independent of dietary lipids. **Atherosclerosis**, v. 196, p. 146-154, 2008.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods.**, v. 25, p. 402-408, 2001.

LOMONTE, B.; CARMONA, E. Comp. Individual expression patterns of myotoxin isoforms in the venom of the snake *Bothrops asper*. **Biochem. Physiol. B.**, v. 102, p. 325-329, 1992.

LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J. M. A new muscle damaging toxin, myotoxin II, from the venom of the snake *Bothrops asper* (terciopelo). **Toxicon.**, v. 27, p. 725-733, 1989.

LOMONTE, B.; MORENO, E.; TARKOWSKI, A.; HANSON, L. A.; MACCARANA, M. Neutralizing interaction between heparins and myotoxin II, a lysine 49 phospholipase A2 from *Bothrops asper* snake venom. Identification of a heparin-binding and cytolytic toxin region by the use of synthetic peptides and molecular modeling. **J. Biol. Chem.**, v. 269, v. 29867-29873, 1994.

LOMONTE, B.; TARKOWSKI, A.; HANSON, L. A. Host response to *Bothrops asper* snake venom. Analysis of edema formation, inflammatory cells, and cytokine release in a mouse model. **Inflammation.**, v. 17, p. 93-105, 1993.

LONDOS, C.; SZTALRYD, C.; TANSEY, J. T.; KIMMEL, A. R. Role of PAT proteins in lipid metabolism. **Biochimie.**, v. 87, p. 45-49, 2005.

MANDARD, S.; PATSOURIS, D. Nuclear control of the inflammatory response in mammals by peroxisome proliferator-activated receptors. **PPAR Res.**, v. 2013, p. 613-864, 2013.

MARCHESAN, D.; RUTBERG, M.; ANDERSSON, L.; ASP, L.; LARSSON, T.; BORÉN, J.; JOHANSSON, B. R.; OLOFSSON, S. O. A phospholipase D-dependent process forms lipid droplets containing caveolin, adipocyte differentiation-related protein, and vimentin in a cell-free system. **J.**

Biol. Chem., v. 278, p. 27293-27300, 2003.

MARTIN, S.; PARTON, R.G. Lipid droplets: a unified view of a dynamic organelle. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, v. 7, p. 373-378, 2006.

MATSUDA, D.; OHSHIRO, T.; OHBA, M.; JIANG, W.; HONG, B.; SI, S.; TOMODA, H. The molecular target of rubimallin in the inhibition of lipid droplet accumulation in macrophages. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 32, p. 1317-1320, 2009.

MATTOS, K. A.; OLIVEIRA, V. G.; D'AVILA, H.; RODRIGUES, L. S.; PINHEIRO, R. O.; SARNO, E. N.; PESSOLANI, M. C.; BOZZA, P. T. TLR6-driven lipid droplets in Mycobacterium leprae-infected Schwann cells: immunoinflammatory platforms associated with bacterial persistence. **J. Immunol.**, v. 187, p. 2548-2558, 2011.

MCFIE, P. J.; BANMAN, S. L.; KARY, S.; STONE, S. J. Murine diacylglycerol acyltransferase-2 (DGAT2) can catalyze triacylglycerol synthesis and promote lipid droplet formation independent of its localization to the endoplasmic reticulum. **J Biol Chem.**, v. 286, p. 28235-28246, 2011.

MEDZHITOV, R.; PRESTON-HURLBURT, P.; JANEWAY, JR. C. A. A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. **Nature**, v. 388, p. 394-397, 1997.

METCALF, D. Transformation of granulocytes to macrophages in bone marrow colonies in vitro. **J. Cell. Physiol.**, v. 77, p. 277-80, 1971.

MEYER ZU HERINGDORF, D.; JAKOBS, K. H. Lysophospholipid receptors: signalling, pharmacology and regulation by lysophospholipid metabolism. **Biochim Biophys Acta.**, v. 1768, p. 923-940, 2007.

MILES, B. A.; LAFUSE, W. P.; ZWILLING, B. S. Binding of alpha-adrenergic receptors stimulates the anti-mycobacterial activity of murine peritoneal macrophages. **J. Neuroimmunol.**, v. 71, p. 19-24, 1996.

MINEO, C.; SHAUL, P. W. Functions of scavenger receptor class B, type I in atherosclerosis. **Curr. Opin. Lipidol.**, v. 23, p. 487-493, 2012.

MITSUNARI, M.; YOSHIDA, S.; SHOJI, T.; TSUKIHARA, S.; IWABE, T.; HARADA, T.; TERAOKA, N. Macrophage-activating lipopeptide-2 induces cyclooxygenase-2 and prostaglandin E(2) via toll-like receptor 2 in human placental trophoblast cells. **J Reprod Immunol.**, v. 72, p. 46-59, 2006.

MOREIRA, V.; GUTIÉRREZ, J. M.; SOARES, A. M.; ZAMUNÉR, S. R.; PURGATTO, E.; TEIXEIRA, C. F. Secretory phospholipases A(2) isolated from Bothrops asper and from Crotalus durissus terrificus snake venoms induce distinct mechanisms for biosynthesis of prostaglandins E2 and D2 and expression of cyclooxygenases. **Toxicon**, v. 52, p. 428-439, 2008.

MOTOMURA, W.; INOUE, M.; OHTAKE, T.; TAKAHASHI, N.; NAGAMINE, M.; TANNO, S.; KOHGO, Y.; OKUMURA, T. Up-regulation of ADRP in fatty liver in human and liver steatosis in mice fed with high fat diet. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 340, n. 4, p. 1111-1118, 2006.

MUKHERJEE, A. B.; MIELE, L.; PATTABIRAMAN, N. Phospholipase A2 enzymes: regulation and physiological role. **Biochem. Pharmacol.**, v. 48, n. 1, p. 1-10, 1994.

MULLICK, A. E.; TOBIAS, P. S.; CURTISS, L. K. Toll-like receptors and atherosclerosis: key contributors in disease and health? **Immunol Res.**, v. 34, p. 193-209, 2006.

MURAKAMI, M.; KUDO, I. New phospholipase A(2) isozymes with a potential role in atherosclerosis. **Curr. Opin. Lipidol.**, v. 14, p. 431-436, 2003.

- MURAKAMI, M.; KUDO, I. Phospholipase A2. **J. Biochem.**, v. 131, p. 285-292, 2002.
- MURAKAMI, M.; MASUDA, S.; UEDA-SEMMYO, K.; YODA, E.; KUWATA, H.; TAKANEZAWA, Y.; AOKI, J.; ARAI, H.; SUMIMOTO, H.; ISHIKAWA, Y.; ISHII, T.; NAKATANI, Y.; KUDO, I. Group VIB Ca²⁺-independent phospholipase A2 γ promotes cellular membrane hydrolysis and prostaglandin production in a manner distinct from other intracellular phospholipases A2. **J. Biol. Chem.**, v. 280, p. 14028-14041, 2005.
- MURAKAMI, M.; NAKATANI, Y.; ATSUMI, G.; INOUE, K.; KUDO, I. Regulatory functions of phospholipase A2. **Rev. Immunol.**, v. 17, p. 225-283, 1997.
- MURAKAMI, M.; TAKETOMI, Y.; MIKI, Y.; SATO, H.; HIRABAYASHI, T.; YAMAMOTO, K. Recent progress in phospholipase A₂ research: from cells to animals to humans. **Prog. Lipid Res.**, v. 50, p. 152-192, 2011.
- MURPHY, D. J. The biogenesis and functions of lipid bodies in animals, plants and microorganisms. **Prog. Lipid Res.**, v. 40, p. 325-438, 2001.
- MURPHY, J. E.; TEDBURY, P. R.; HOMER-VANNIASINKAM, S.; WALKER, J. H.; PONNAMBALAM, S. Biochemistry and cell biology of mammalian scavenger receptors. **Atherosclerosis**, v. 182, p. 1-15, 2005.
- NAKATA, A.; NAKAGAWA, Y.; NISHIDA, M.; NOZAKI, S.; MIYAGAWA, J.; NAKAGAWA, T.; TAMURA, R.; MATSUMOTO, K.; KAMEDA-TAKEMURA, K.; YAMASHITA, S.; MATSUZAWA, Y. CD36, a novel receptor for oxidized low-density lipoproteins, is highly expressed on lipid-laden macrophages in human atherosclerotic aorta. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 19, p. 1333-1339, 1999.
- NAMGALADZE, D.; MORBITZER, D.; VON KNETHEN, A.; BRÜNE, B. Phospholipase A2-modified low-density lipoprotein activates macrophage peroxisome proliferator-activated receptors. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 30, p. 313-320, 2010.
- NGUYEN, M. T.; FAVELYUKIS, S.; NGUYEN, A. K.; REICHART, D.; SCOTT, P. A.; JENN A, LIU-BRYAN, R.; GLASS, C. K.; NEELS, J. G.; OLEFSKY, J. M. A subpopulation of macrophages infiltrates hypertrophic adipose tissue and is activated by free fatty acids via Toll-like receptors 2 and 4 and JNK-dependent pathways. **J. Biol. Chem.** v. 282, p. 35279-35292, 2007.
- NICOLAOU, G.; ERRIDGE, C. Toll-like receptor-dependent lipid body formation in macrophage foam cell formation. **Curr. Opin. Lipidol.**, v. 21, p. 427-433, 2010.
- O'Neill, L. A. DisSARMing Toll-like receptor signaling. **Nat. Immunol.**, v. 7, p. 1023-1025, 2006.
- OLOFSSON, S. O.; ANDERSSON, L.; HÅVERSEN, L.; OLSSON, C.; MYHRE, S.; RUTBERG, M.; MOBINI R.; LI, L.; LU, E.; BORÉN, J.; BOSTRÖM, P. The formation of lipid droplets: possible role in the development of insulin resistance/type 2 diabetes. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.**, v. 85, p. 215-218, 2011.
- OST, A.; ORTEGREN, U.; GUSTAVSSON, J.; NYSTROM, F. H.; STRÅLFORS, P. Triacylglycerol is synthesized in a specific subclass of caveolae in primary adipocytes. **J. Biol. Chem.**, v. 280, p. 5-8, 2005.
- PARAMO, L.; LOMONTE, B.; PIZARRO-CERDA, J.; BENGOCHEA, J. A.; GORVEL, J. P.; MORENO, E. Bactericidal activity of Lys49 and Asp49 myotoxic phospholipases A2 from Bothrops

asper snake venom--synthetic Lys49 myotoxin II-(115-129)-peptide identifies its bactericidal region. *Eur.J. Biochem.*, v. 253, p. 452-461, 1998.

PAUL, A., CHAN, L., BICKEL, P.E. The PAT family of lipid droplet proteins in heart and vascular cells. **Curr. Hypertens. Rep.**, v. 10, p. 461-466, 2008.

Paul, A., Chang, B. H., Li, L., Yechoor, V. K., Chan, L. Deficiency of adipose differentiation-related protein impairs foam cell formation and protects against atherosclerosis. **Circ. Res.** v. 102, p. 1492–1501, 2008b.

PÉREZ-CHACÓN, G.; ASTUDILLO, A. M.; BALGOMA, D.; BALBOA, M. A.; BALSINDE, J. Control of free arachidonic acid levels by phospholipases A2 and lysophospholipid acyltransferases. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1791, p. 1103-1113, 2009.

PÉREZ, R.; BALBOA, M. A.; BALSINDE, J. Involvement of group VIA calcium-independent phospholipase A2 in macrophage engulfment of hydrogen peroxide-treated U937 cells. **J. Immunol.**, v. 176, p. 2555-2561, 2006.

PÉREZ, R.; MELERO, R.; BALBOA, M. A.; BALSINDE, J. Role of group VIA calcium-independent phospholipase A2 in arachidonic acid release, phospholipid fatty acid incorporation, and apoptosis in U937 cells responding to hydrogen peroxide. **J. Biol. Chem.**, v. 279, p. 40385-40391, 2004.

PETERS-GOLDEN, M.; SONG, K.; MARSHALL, T.; BROCK, T. Translocation of cytosolic phospholipase A2 to the nuclear envelope elicits topographically localized phospholipid hydrolysis. **Biochem. J.**, v. 318, p. 797-803, 1996.

POLIOT, M.; GILBERT, C.; BORGEAT, P.; POUBELLE, P.E.; BOURGOIN, S.; CREMION, C.; MACLOUF, J.; MCCOLL, S.R.; NACCACHE, P.H. Expression and activity of prostaglandin endoperoxide synthase-2 in agonist-activated human neutrophils. **Faseb J.**, v. 12, p. 1109-23, 1998.

QUITTNAT, F.; NISHIKAWA, Y.; STEDMAN, T. T.; VOELKER, D. R.; CHOI, J. Y.; ZAHN, M. M.; MURPHY, R. C.; BARKLEY, R. M.; PYPAERT, M.; JOINER, K. A.; COPPENS, I. On the biogenesis of lipid bodies in ancient eukaryotes: synthesis of triacylglycerols by a Toxoplasma DGAT1-related enzyme. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v., 138, p. 107-112, 2004.

RANGEL MORENO, J.; ESTRADA GARCÍA, I.; DE LA LUZ GARCÍA HERNÁNDEZ, M.; AGUILAR LEON, D.; MARQUEZ, R.; HERNÁNDEZ PANDO, R. The role of prostaglandin E2 in the immunopathogenesis of experimental pulmonary tuberculosis. **Immunology**, v. 106, p. 257-266, 2002.

RICKARD, A.; PORTELL, C.; KELL, P. J.; VINSON, S. M.; MCHOWAT, J. Protease-activated receptor stimulation activates a Ca²⁺-independent phospholipase A2 in bladder microvascular endothelial cells **Am. J. Physiol. Renal Physiol.**, v. 288, p. F714-721, 2005.

RIZZO, M. T.; NGUYEN, E.; ALDO-BENSON, M.; LAMBEAU, G. Secreted phospholipase A(2) induces vascular endothelial cell migration. **Blood**, v. 96, p. 3809-3815, 2000.

ROBENEK, H.; HOFNAGEL, O.; BUERS, I.; ROBENEK, M. J.; TROYER, D.; SEVERS, N. J. Adipophilin-enriched domains in the ER membrane are sites of lipid droplet biogenesis. **J. Cell Sci.**, v. 119, p. 4215-4224, 2006.

ROBENEK, H.; ROBENEK, M. J.; BUERS, I.; LORKOWSKI, S.; HOFNAGEL, O.; TROYER, D.; SEVERS, N. J. Lipid droplets gain PAT family proteins by interaction with specialized plasma membrane domains. **J. Biol. Chem.**, v. 280, p. 26330-26338, 2005.

ROSENGREN, B.; JÖNSSON-RYLANDER, A. C.; PEILOT, H.; CAMEJO, G.; HURT-CAMEJO, E.

Distinctiveness of secretory phospholipase A2 group IIA and V suggesting unique roles in atherosclerosis. **Biochim.Biophys.Acta**, v. 1761, p. 1301–1308, 2006.

SAMSA, M. M.; MONDOTTE, J. A.; IGLESIAS, N. G.; ASSUNÇÃO-MIRANDA, I.; BARBOSA-LIMA, G.; DA POIAN, A. T.; BOZZA, P. T.; GAMARNIK, A. V. Dengue virus capsid protein usurps lipid droplets for viral particle formation. **PLOS Pathog.**, v. 5, p. E1000632, 2009.

SCHADINGER, S. E.; BUCHER, N. L.; SCHREIBER, B. M.; FARMER, S. R. PPARgamma2 regulates lipogenesis and lipid accumulation in steatotic hepatocytes. **Am J Physiol Endocrinol Metab.**, v. 288, p. 1195-1205, 2005.

SCHALOSKE, R. H.; DENNIS, E. A. The phospholipase A2 superfamily and its group numbering system. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1761, p. 1246-1259, 2006.

SCOTT, D. L.; WHITE, S. P.; OTWINOWSKI, Z.; YUAN, W.; GELB, M. H.; SIGLER, P. B. Interfacial catalysis: the mechanism of phospholipase A2. **Science**, v. 250, p. 1541-1566, 1990.

SEKIYA, M.; OSUGA, J.; IGARASHI, M.; OKAZAKI, H.; ISHIBASHI, S. The role of neutral cholesterol ester hydrolysis in macrophage foam cells. **J. Atheroscler. Thromb.**, v. 18, p. 359-364, 2011.

SHI, H.; KOKOEVA, M. V.; INOUE, K.; TZAMELI, I.; YIN, H.; FLIER, J. S. TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. **J. Clin. Invest.**, v. 116, p. 3015–3025, 2006.

SHIBATA, Y.; NISHIYAMA, A.; OHATA, H.; GABBARD, J.; MYRVIK, Q. N.; HENRIKSEN, R. A. Differential effects of IL-10 on prostaglandin H synthase-2 expression and prostaglandin E2 biosynthesis between spleen and bone marrow macrophages. **J. Leukoc. Biol.**, v. 77, p. 544-551, 2005.

SHIMANO, H. Sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs): transcriptional regulators of lipid synthetic genes. **Prog. Lipid Res.**, v. 40, p. 439-452, 2001.

SILLIMAN, C. C.; MOORE, E. E.; ZALLEN, G.; GONZALEZ, R.; JOHNSON, J. L.; ELZI, D. J.; MENG, X.; HANASAKI, K.; ISHIZAKI, J.; ARITA, H.; AO, L.; ENGLAND, K. M.; BANERJEE, A. Presence of the M-type sPLA(2) receptor on neutrophils and its role in elastase release and adhesion. **Am. J. Physiol. Cell. Physiol.**, v. 283, p. C1102-1113, 2002.

SIX, D. A.; DENNIS, E. A. The expanding superfamily of phospholipase A(2) enzymes: classification and characterization. **Biochem. Biophys. Acta.**, v. 1488, p. 1-19, 2000.

STADEL, J.M.; HOYLE, K.; NACLERIO, R.M.; ROSHAK, A.; CHILTON, F.H. Characterization of phospholipase A2 from human nasal lavage. **Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.**, v. 11, p. 108-13, 1994.

STEFATER, J. A. 3RD, REN, S.; LANG, R. A.; DUFFIELD, J. S. Metchnikoff's policemen: macrophages in development, homeostasis and regeneration. **Trends Mol. Med.**, v. 17, p. 743-752, 2011.

STOY, N. Macrophage biology and pathobiology in the evolution of immune responses: a functional analysis. **Pathobiology**, v. 69, p. 179-211, 2001.

SUGIYAMA, Y.; ISHIKAWA, E.; ODAKA, H.; MIKI, N.; TAWADA, H.; IKEDA, H. TMP-153, a novel ACAT inhibitor, inhibits cholesterol absorption and lowers plasma cholesterol in rats and hamsters. **Atherosclerosis**, v. 113, p. 71-78, 1995.

- SURH, Y. J.; NA, H. K.; PARK, J. M.; LEE, H. N.; KIM, W.; YOON, I. S.; KIM, D. D. 15-Deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J₂, an electrophilic lipid mediator of anti-inflammatory and pro-resolving signaling. **Biochem Pharmacol.**, v. 82, p. 1335-1351, 2011.
- SZAFLARSKA, A.; BAJ-KRZYWORZEKA, M.; SIEDLAR, M.; WEGLARCZYK, K.; RUGGIERO, I.; HAJTO, B.; ZEMBALA, M. Antitumour response of CD14⁺ /CD16⁺ monocyte subpopulation. **Exp. Haematol.**, v. 32, p. 748–755, 2004.
- TAKEUCHI, O.; AKIRA, S. Pattern recognition receptors and inflammation. **Cell**. **140**:805-20, 2010.
- TAN, N. S.; MICHALIK, L.; NOY, N.; YASMIN, R.; PACOT, C.; HEIM, M.; FLÜHMANN, B.; DESVERGNE, B.; WAHLI, W. Critical roles of PPAR beta/delta in keratinocyte response to inflammation. **Genes Dev.**, v. 15, p. 3263–3277, 2001.
- TOBIAS, P. S.; CURTISS, L. K. Toll-like receptors in atherosclerosis. **Biochem. Soc. Trans.**, v. 35, p. 1453-1455, 2007.
- VADAS, P. Elevated plasma phospholipase A2 levels: correlation with the hemodynamic and pulmonary changes in gram-negative septic shock. **J. Lab. Clin. Med.**, v. 104, p. 873-877, 1984.
- VADAS, P.; PRUZANSKI, W. Role of secretory phospholipases A2 in the pathobiology of disease. **Lab. Invest.**, v. 55, p. 391-404, 1986.
- VALACCHI, G.; STICOZZI, C.; LIM, Y.; PECORELLI, A. Scavenger receptor class B type I: a multifunctional receptor. **Ann. N. Y. Acad. Sci.** v. 1229, p. E1-7, 2011.
- VALENTIN, E.; LAMBEAU, G. What can venom phospholipases A(2) tell us about the functional diversity of mammalian secreted phospholipases A(2)? **Biochimie**, v. 82, p. 815-31, 2000.
- VAN FURTH, R.; DIESELHOFF-DEN, DULK. M. C.; MATTIE, H. Quantitative study on the production and kinetics of mononuclear phagocytes during an acute inflammatory reaction **J. Exp. Med.**, v. 138, p. 1314-1330, 1973.
- VOSPER, H.; PATEL, L.; GRAHAM, T. L.; KHOUDOLI, G. A.; HILL, A.; MACPHEE, C. H.; PINTO, I.; SMITH, S. A.; SUCKLING, K. E.; WOLF, C. R.; PALMER, C. N. The peroxisome proliferator-activated receptor delta promotes lipid accumulation in human macrophages. **J. Biol. Chem.**, v. 276, p. 44258–44265, 2001.
- WALTHER, T. C.; FARESE, R.V. JR. Lipid droplets and cellular lipid metabolism. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 81, p. 687-714, 2012.
- WAN H. C.; MELO, R. C.; JIN, Z.; DVORAK, A. M.; WELLER, P. F. **FASEB J.**, v. 21, p. 167-178, 2007.
- WANG, J. Q.; JEELALL, Y. S.; FERGUSON, L. L.; HORIKAWA, K. Toll-Like Receptors and Cancer: MYD88 Mutation and Inflammation. **Front Immunol.**, v. 5, p. 367, 2014.
- WANG, X.; REAPE, T. J.; LI, X.; RAYNER, K.; WEBB, C. L.; BURNAND, K. G.; LYSKO, P. G. Induced expression of adipophilin mRNA in human macrophages stimulated with oxidized low-density lipoprotein and in atherosclerotic lesions. **FEBS Lett.**, v. 462, p. 145-150, 1999.
- WELLER, P. F.; BOZZA, P. T.; YU, W.; DVORAK, A. M. Cytoplasmic lipid bodies in eosinophils: central roles in eicosanoid generation. **Int. Arch. Allergy Immunol.**, v. 118, p. 450-452, 1999.
- WINSTEAD, M. V.; BALSINDE, J.; DENNIS, E. A. Calcium-independent phospholipase A(2): structure and function. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1488, p. 28-39, 2000.

WOLINS, N. E.; BRASAEMLE, D. L.; BICKEL, P. E. A proposed model of fat packaging by exchangeable lipid droplet proteins. **FEBS Lett.**, v. 580, p. 5484-5491, 2006.

WYNN, T. A.; CHAWLA, A.; POLLARD, J. W. Macrophage biology in development, homeostasis and disease. **Nature.**, v. 496, p. 445-455, 2013.

XU, G.; SZTALRYD, C.; LU, X.; TANSEY, J. T.; GAN, J.; DORWARD, H.; KIMMEL, A. R.; LONDOS, C. Post-translational regulation of adipose differentiation-related protein by the ubiquitin/proteasome pathway. **J. Biol. Chem.**, v. 280, p. 42841-42847, 2005.

XU, X. H.; SHAH, P. K.; FAURE, E.; EQUILS, O.; THOMAS, L.; FISHBEIN, M. C.; LUTHRINGER, D.; XU, X. P.; RAJAVASHISTH, T. B.; YANO, J.; KAUL, S.; ARDITI, M. Toll-like receptor-4 is expressed by macrophages in murine and human lipid-rich atherosclerotic plaques and upregulated by oxidized LDL. **Circulation**, v. 104, p. 3103-3108, 2001.

YU, W.; BOZZA, P. T.; TZIZIK, D. M.; GRAY, J. P.; CASSARA, J.; DVORAK, A. M.; WELLER, P. F. Interleukin-13 increases prostaglandin E2 (PGE2) production by normal human polymorphonuclear neutrophils by enhancing cyclooxygenase 2 (COX-2) gene expression. **Inflamm. Res.**, v. 47, p. 167-173, 1998.

ZHANG, M.; FRITSCHKE, K. L. Fatty acid-mediated inhibition of IL-12 production by murine macrophages is independent of PPARgamma. **Br. J. Nutr.**, v. 91, p. 733-739, 2004.

ZHAO, G.; SOUERS, A. J.; VOORBACH, M.; FALLS, H. D.; DROZ, B.; BRODJIAN, S.; LAU, Y. Y.; IYENGAR, R. R.; GAO, J.; JUDD, A. S.; WAGAW, S. H.; RAVN, M. M.; ENGSTROM, K. M.; LYNCH, J. K.; MULHERN, M. M.; FREEMAN, J.; DAYTON, B. D.; WANG, X.; GRIHALDE, N.; FRY, D.; BENO, D. W.; MARSH, K. C.; SU, Z.; DIAZ, G. J.; COLLINS, C. A.; SHAM, H.; REILLY, R. M.; BRUNE, M. E.; KYM, P. R. Validation of diacyl glycerolacyltransferase I as a novel target for the treatment of obesity and dyslipidemia using a potent and selective small molecule inhibitor. **J. Med. Chem.**, v. 51, p. 380-3, 2008.

ZIEGLER-HEITBROCK, L. Heterogeneity of human blood monocytes: the CD14⁺/CD16⁺ subpopulation. **Immunol. Today**, v. 17, p. 424-428, 1996.

ZIEGLER-HEITBROCK, L.; ANCUTA, P.; CROWE, S.; DALOD, M.; GRAU, V.; HART, D. N.; LEENEN, P. J.; LIU, Y. J.; MACPHERSON, G.; RANDOLPH, G. J.; SCHERBERICH, J.; SCHMITZ, J.; SHORTMAN, K.; SOZZANI, S.; STROBL, H.; ZEMBALA, M.; AUSTYN, J. M.; LUTZ, M. B. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. **Blood**, v. 116, p. 74-80, 2010.

ZOCCAL, K. F.; BITENCOURT, C. D. A. S.; PAULA-SILVA, F. W.; SORGI, C. A.; DE CASTRO FIGUEIREDO BORDON, K.; ARANTES, E. C.; FACCIOLO, L. H. TLR2, TLR4 and CD14 Recognize Venom-Associated Molecular Patterns from *Tityus serrulatus* to Induce Macrophage-Derived Inflammatory Mediators. **PLoS One**, v. 9, p. e88174, 2014.

ZULIANI, J. P.; FERNANDES, C. M.; ZAMUNER, S. R.; GUTIÉRREZ, J. M.; TEIXEIRA, C. F. Inflammatory events induced by Lys-49 and Asp-49 phospholipases A2 isolated from *Bothrops asper* snake venom: role of catalytic activity. **Toxicon**, v. 45, p. 335-346, 2005a.

ZULIANI, J. P.; GUTIERREZ, J. M.; CASAIS E SILVA, L. L.; SAMPAIO, S. C.; TEIXEIRA, C. F. P. Activation of cellular functions in macrophages by venom secretory Asp-49 and Lys-49 phospholipases A(2). **Toxicon**, v. 46, p. 523-532, 2005b.

ANEXO

Critical Role of TLR2 and MyD88 for Functional Response of Macrophages to a Group IIA-Secreted Phospholipase A₂ from Snake Venom

Elbio Leiguez¹, Karina Cristina Giannotti¹, Vanessa Moreira¹, Márcio Hideki Matsubara¹, José María Gutiérrez², Bruno Lomonte², Juan Pablo Rodríguez^{3,4}, Jesús Balsinde⁴, Catarina Teixeira^{1*}

¹ Laboratório de Farmacologia, Instituto Butantan, São Paulo, São Paulo State, Brazil, ² Instituto Clodomiro Picado, Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica, San José, San José, Costa Rica, ³ Laboratorio de Investigación en Proteínas – FACENA-Universidad Nacional del Nordeste, Corrientes, Corrientes, Argentina, ⁴ The eicosanoid research division, Instituto de Biología y Genética Molecular, Valladolid, Valladolid, Spain

Abstract

The snake venom MT-III is a group IIA secreted phospholipase A₂ (sPLA₂) enzyme with functional and structural similarities with mammalian pro-inflammatory sPLA₂s of the same group. Previously, we demonstrated that MT-III directly activates the innate inflammatory response of macrophages, including release of inflammatory mediators and formation of lipid droplets (LDs). However, the mechanisms coordinating these processes remain unclear. In the present study, by using TLR2^{-/-} or MyD88^{-/-} or C57BL/6 (WT) male mice, we report that TLR2 and MyD88 signaling have a critical role in MT-III-induced inflammatory response in macrophages. MT-III caused a marked release of PGE₂, PGD₂, PGJ₂, IL-1β and IL-10 and increased the number of LDs in WT macrophages. In MT-III-stimulated TLR2^{-/-} macrophages, formation of LDs and release of eicosanoids and cytokines were abrogated. In MyD88^{-/-} macrophages, MT-III-induced release of PGE₂, IL-1β and IL-10 was abrogated, but release of PGD₂ and PGJ₂ was maintained. In addition, COX-2 protein expression seen in MT-III-stimulated WT macrophages was abolished in both TLR2^{-/-} and MyD88^{-/-} cells, while perilipin 2 expression was abolished only in MyD88^{-/-} cells. We further demonstrated a reduction of saturated, monounsaturated and polyunsaturated fatty acids and a release of the TLR2 agonists palmitic and oleic acid from MT-III-stimulated WT macrophages compared with WT control cells, thus suggesting these fatty acids as major messengers for MT-III-induced engagement of TLR2/MyD88 signaling. Collectively, our findings identify for the first time a TLR2 and MyD88-dependent mechanism that underlies group IIA sPLA₂-induced inflammatory response in macrophages.

Citation: Leiguez E, Giannotti KC, Moreira V, Matsubara MH, Gutiérrez JM, et al. (2014) Critical Role of TLR2 and MyD88 for Functional Response of Macrophages to a Group IIA-Secreted Phospholipase A₂ from Snake Venom. PLoS ONE 9(4): e93741. doi:10.1371/journal.pone.0093741

Editor: Patricia T. Bozza, Fundação Oswaldo Cruz, Brazil

Received: November 21, 2013; **Accepted:** March 6, 2014; **Published:** April 9, 2014

Copyright: © 2014 Leiguez 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 investigation was supported by research grants from FAPESP, São Paulo, Brazil (www.fapesp.br), grants 11/21341-5 and 10/06345-1, INCTTOX, São Paulo, Brazil (www.incttox.com.br), grant 573790/2008-6, CNPq PQ, Brazil (www.cnpq.br), grant 306920/2011-5, Brazil, Spanish Ministry of Science and Innovation, Spain (http://web.micinn.es/), grant BFU2010-18826. 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: cteixeir@usp.br

Introduction

Secreted phospholipases A₂ (sPLA₂s) are enzymes that hydrolyse glycerophospholipids at the *sn*-2 position of the glycerol backbone in a calcium-dependent manner, releasing fatty acids and lysophospholipids. These enzymes are members of the PLA₂ superfamily, which is widely distributed in nature, and 15 groups and subgroups have been described, including five categories termed secreted PLA₂, cytosolic PLA₂, Ca²⁺ independent PLA₂, the platelet-activating factor acetylhydrolase, and lysosomal PLA₂ [1]. Among them, group IIA sPLA₂ includes mammalian inflammatory-type and Viperid snake venom sPLA₂s [2,3]. Besides their relevant role in cell membrane physiology, mammalian group IIA sPLA₂s are recognized as important paracrine and autocrine players in inflammatory processes by their ability to release fatty acids from cell membranes, leading to subsequent production of pro-inflammatory mediators such as prostaglandins, leukotrienes [1]. Accordingly, sPLA₂ enzymes, particularly group IIA sPLA₂s, have been implicated in the pathophysiology of several inflam-

matory diseases, such as atherosclerosis, inflammatory bowel disease, asthma and arthritis [4,5,6].

Besides structural homology, snake venom group IIA sPLA₂s share functional features with mammalian group IIA sPLA₂s, owing to their ability to induce inflammatory events in both *in vivo* and *in vitro* experimental models [7]. sPLA₂s are abundant components in the proteomes of snake venoms from *Bothrops* genus [8] and have been associated with the prominent local inflammatory effects induced by these venoms. An Asp49 sPLA₂, named myotoxin-III (MT-III), has been purified from *Bothrops asper* snake venom [9]. This group IIA sPLA₂ has been reported to induce inflammatory events in *in vivo* experimental models [10,11]. Furthermore, this venom sPLA₂ exhibits the ability to directly activate inflammatory functions in isolated macrophages, such as increased phagocytic capacity, release of cytokines [11,12], up-regulation of lipid mediator cascade, with release of prostaglandins [13], and increased formation of lipid droplets (LDs) [14], which are organelles implicated in the differentiation of macrophages

into foam cells. However, the initial steps leading to this sPLA₂-induced activation of macrophages are still unknown.

Macrophages are pivotal cells in innate immune responses. Activation of these cells initiates cascades of events that lead to acute inflammatory processes and the switch from the acute to the resolutive phase of inflammation, by releasing resolutive mediators, such as PGJ₂ and IL-10 [15,16]. In addition, macrophages are relevant cells in the development of many chronic inflammatory diseases, such as atherosclerosis. Macrophages loaded with LDs, termed foam cells, constitute an early hallmark of atherosclerotic lesion formation and a major cell source of inflammatory mediators [17,18].

The macrophage innate response is initiated by activation of diverse membrane recognition receptors, such as the Toll-like receptors (TLRs). Nowadays, at least 13 TLRs have been described, each of them with a degree of specificity for various endogenous and exogenous ligands, eliciting different, but sometimes overlapping, immune responses [19,20]. In inflammatory processes, recognition of pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) by TLRs except TLR3 activates cell-signaling pathways mediated by the MyD88 [20]. Other kinds of stimuli, named endogenous damage-associated molecular patterns (DAMPs), are also capable of activating MyD88-dependent innate immune signaling by TLRs [21]. Some of the well-characterized DAMPs include: fibronectins [22], heat-shock proteins [23], pro-inflammatory cytokines from the monocyte-macrophage system [24], and free fatty acids (FFA) [25]. Among the TLRs, TLR2 constitutes a molecular link between elevated circulating FFA and inflammation [26–28]. TLR2 binds lipid-based structures via their long-chain saturated FFA moieties [25,29], triggering inflammatory responses through MyD88 signaling [30]. Although TLRs are critical receptors directing specific inflammatory programs in macrophages, the involvement of TLR2 and MyD88 adaptor molecule signaling pathways in the activation of macrophages by group IIA sPLA₂ remains unknown. The understanding of the mechanism(s) involved in sPLA₂s-induced activation of a pivotal immune innate cell, such as the macrophage, shall provide valuable information on new targets to confront the inflammatory diseases where group IIA sPLA₂s enzymes are involved.

In the present study the involvement of TLR2 and MyD88 adaptor molecule in the signaling cascade (inflammatory signaling) elicited by MT-III in macrophages was investigated. To test this possibility, the effects of MT-III in macrophages from wild-type (WT) C57BL/6 mice, TLR2 gene knockout (TLR2^{-/-}) mice and MyD88 gene knockout (MyD88^{-/-}) were evaluated in terms of PGE₂, PGD₂, PGJ₂, IL-1 β and IL-10 biosynthesis, LDs formation, COX-2 and perilipin-2 expression and release of free fatty acids. Herein, we present the first evidence that TLR2 and MyD88 adaptor molecule are implicated in the inflammatory response triggered by a group IIA sPLA₂ enzyme in macrophages. Engagement of TLR2/MyD88 signaling pathway by the venom sPLA₂ MT-III coordinates events related to both initiation and resolution of the inflammatory response in macrophages. Our observations also suggest that saturated free fatty acids are major agonists for engagement of TLR2/MyD88 pathway induced by this group IIA sPLA₂.

Materials and Methods

Ethics Statement

This study includes experiments with macrophages collected from pathogen-free 5-week-old wild type (WT), MyD88^{-/-} and TLR2^{-/-} mice (all on a C57BL/6 genetic background). These animals were bred in animal facilities at the University of São

Paulo and were housed in a temperature-controlled room (22–24°C) with a 12 h light-dark cycle and fresh water and food ad libitum until used. All experimental procedures involving these animals were performed in accordance with the procedures laid down by the Universities Federation for Animal Welfare and were approved by the Animal Experimentation Ethics Committee of University of São Paulo (São Paulo, Brazil; Reference No 94/2010).

Chemicals and Reagents

Hema-3 stain from Biochemical Sciences (Swedesboro, NJ, USA). MTT and L-glutamine were obtained from USB (Cleveland, OH, USA). E-toxate LAL kit and mouse mAb anti- β -actin was purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) and guinea pig polyclonal antibody anti-mouse perilipin-2 (PLIN2) from Research Diagnostics (Flanders, NJ, USA). PGE₂ and PGD₂ enzyme immunoassay kits and polyclonal antibodies against COX-2 were purchased from Cayman Company, Ann Arbor, MI, USA. 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J₂ (PGJ₂) and IL-10 and IL-1 β enzyme immunoassay kits were purchased from Enzo Life Sciences (Ann Arbor, MI, USA) and eBioscience, Inc. (San Diego, CA, USA), respectively. Secondary antibodies, anti-mouse and anti-guinea pig, conjugated to HRP and nitrocellulose membrane, were obtained from GE Healthcare (Buckinghamshire, UK). Gentamicin was purchased from Schering-Plough (Whitehouse Station, NJ, USA) and DMSO from Amresco (Solon, OH, USA). RPMI 1640, thiocarbonylhydrazide, and Osmium tetroxide (OsO₄) were purchased from Sigma-Aldrich and RPMI from Life Technologies (São Paulo, SP, Brazil). Chloroform and methanol (HPLC grade) were purchased from Fisher Scientific (Hampton, NH), and [1–14C] palmitic acid and oleic acid from Perkin Elmer (Waltham, MA). Silicagel thin layer chromatography plates were purchased from Macherey-Nagel (Düren, Germany). Thioglycolate was obtained from Merck (Darmstadt, Germany) and all salts used were purchased from Sigma-Aldrich.

Phospholipase A₂ (PLA₂)

Aspartate-49 sPLA₂ named MT-III (Uniprot accession no.: P20474) from *B. asper* venom was purified by ion-exchange chromatography on CM-Sephadex C-25, using a KCl gradient from 0 to 0.75 M at pH 7.0 as described [2], followed by RP-HPLC on a semipreparative C8 column (Vydac; 10×250 mm, 5 μ m particle size) eluted at a flow rate of 2.5 ml/min with a gradient of acetonitrile (0–70%, containing 0.1% trifluoroacetic acid) over 30 min. Homogeneity was verified by SDS-PAGE, run under reducing conditions, in which a single band of ~14 kDa was observed. The complete amino acid sequence of this enzyme has been described previously [31,32]. The absence of endotoxin contamination in the MT-III batches used was demonstrated by performing the quantitative LAL test [33], which revealed undetectable levels of endotoxin (<0.125 EU/mL).

Macrophages Harvesting and Stimulation

Animals were killed under CO₂ atmosphere and cells were then harvested by washing peritoneal cavities with 3 mL apyrogenic phosphate buffered saline (PBS), pH 7.2. Aliquots of the washes were used for total cell counts in a Neubauer chamber, after dilution (1:20, v/v) in Turk solution (0.2% crystal violet dye in 30% acetic acid). Differential cell counts were performed on smears stained with Hema3. More than 95% of the cell population consisted of macrophages, as determined by conventional morphological criteria. The remaining wash volumes were centrifuged at 129×g for 6 min (4°C), supernatants were discarded and cell pellets were appropriately diluted and maintained in serum-free

RPMI 1640 medium, supplemented with 2 mM L-glutamine and 40 µg/mL gentamicin sulfate at 37°C with 5% CO₂, and processed according to the experimental protocols used, as follows: 1) 1×10⁶ macrophages/well were seeded in 12 wells culture plates and maintained in culture medium for 24 h before stimulation, and then used for Western blotting analysis of COX-2 and perilipin-2 protein expression; 2) 2×10⁵ macrophages, harvested 4 days after i.p. injection of 1 mL 3% thioglycolate, were seeded on glass coverslips and incubated in culture medium for 30 min for adhesion, followed by washing with PBS, and then used for LDs evaluation; 3) 1×10⁷ macrophages were seeded in cell culture dish, maintained in culture medium for 18 h, and used for gas chromatography/mass spectrometry analysis of fatty acid methyl esters; 4) 2×10⁵ macrophages/well were seeded in 12 well culture plates, maintained with culture medium for 30 min for adhesion and then incubated with exogenous [1-¹⁴C] Oleic or [1-¹⁴C] Palmitic acid (1 µM; 0.25 µCi/ml) for 18 h at 37°C. Cells were then scraped with 0.1% Triton X-100 in PBS and supernatants were removed and total ¹⁴C-radioactivity levels were determined by scintillation counting. After each of the above described procedures, cells were stimulated with MT-III diluted in RPMI 1640 medium in a final concentration of 0.4 µM or RPMI 1640 medium alone (control) for selected periods of time and maintained at 37°C in a humidified atmosphere (5% CO₂).

Quantification of Eicosanoids and Cytokines

Prostaglandins (PGE₂, PGD₂ and PGJ₂) and cytokines (IL-1β and IL-10) were quantified in supernatants from macrophages cultures by using commercially available enzyme immune assay kits, performed according to instructions of the manufacturer.

Lipid Droplet (LD) Staining and Quantification

Analysis of LD numbers was performed in osmium-stained cells. In brief, macrophages adhered to glass coverslips were fixed in 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.2) for 15 min and stained with OsO₄. The coverslips were then rinsed in 0.1 M phosphate buffer, stained with 1% OsO₄ (30 min), rinsed in deionized H₂O, immersed in 1.0% thiocarbonylhydrazide (5 min), rinsed again in 0.1 M phosphate buffer, re-stained with 1% OsO₄ (3 min), rinsed with H₂O, and then dried and mounted [42]. The morphology of the fixed cells was observed, and round intracellular osmiophilic structures were identified as LDs, which were then counted under phase-contrast microscopy using the 100× objective lens in 50 consecutively scanned leukocytes in each coverslip.

Western Blotting for COX-2 and Perilipin-2

COX-2 and perilipin-2 protein levels in cultured macrophages were detected by Western blotting. Aliquots of MT-III-stimulated and non-stimulated cells (1.5×10⁵ cells) were lysed with 100 µL sample buffer (0.5 M Tris-HCl, pH 6.8, 20% SDS, 1% glycerol, 1 M β-mercapto ethanol, 0.1% bromophenol blue) and boiled for 10 min. Samples were resolved by SDS-PAGE on 10% bis-acrylamide gels overlaid with a 5% stacking gel. Proteins were then transferred to nitrocellulose membranes using a Mini Trans-Blot (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, USA). The membranes were blocked for 1 h with 5% nonfat dry milk in Tris-buffered saline (TBS) (20 mM Tris, 100 mM NaCl, and 0.5% Tween 20, pH 7.2), and incubated with primary antibodies against COX-2 (1:1000 dilution), perilipin-2 (1:2000) and β-actin (1:3000) for 1 h. They were then washed and incubated with the appropriate secondary antibody conjugated to horseradish peroxidase. The immunoreactive bands were detected by the entry-level peroxidase substrate for enhanced chemiluminescence (ECL),

according to the instructions of the manufacturer (GE Healthcare). Band densities were quantified with a GS 700 densitometer (Bio-Rad Laboratories) using the image analysis software Molecular Analyst (Bio-Rad Laboratories).

Gas Chromatography/mass Spectrometry Analysis of Fatty Acid Methyl Esters

A cell extract was used and, before extraction, 10 nmol of 1,2,3-triheptadecanoylglycerol was added as internal standard. Then, total lipids were extracted according to the Bligh and Dyer method [34], and glycerolipids were transmethylated with 500 µl of 0.5 M KOH in methanol for 60 min at 37°C. For neutralization, 500 µl of 0.5 M HCl were added and the extraction of fatty acid methyl esters was performed with 1 ml of n-hexane twice. Analysis of fatty acid methyl esters was carried out in a Agilent 7890A gas chromatograph coupled to an Agilent 5975C mass-selective detector operated in electron impact mode (EI, 70 eV), equipped with an Agilent 7693 autosampler and an Agilent DB23 column (60 m length×250 µm internal diameter×0.15 µm film thickness) under the following conditions: oven temperature was held at 50°C for 1 min, then increased to 175°C at a rate of 25°C/min, then increased to 215°C at a rate of 1.5°C/min, and the final ramp being reached at 235°C at a rate of 10°C/min. The final temperature was maintained for 5 min, and the run time was 39.67 min. Data analysis was carried out with the Agilent G1701EA MSD Productivity Chemstation software, revision E.02.00, and the quantification of fatty acid methyl esters was achieved by integration of chromatographic peaks comparing with authentic analytical standards [35,36]. The fatty acids evaluated are indicated below in table 1.

Quantification of Fatty Acids (FA) Released

The cells were placed in serum-free medium and exposed to exogenous [¹⁴C] Oleic or [¹⁴C] Palmitic acid (1 µM; 0.25 µCi/ml) for 18 h at 37°C. Afterward, the cells were washed four times with PBS containing 0.5% albumin to remove the fatty acids that had not been incorporated, and next stimulated with MT-III or RPMI medium only (control) for 6 h. Cells were scraped with 0.1% Triton X-100 in PBS, supernatants were removed, and total ¹⁴C-radioactivity levels were determined by scintillation counting.

Statistical Analysis

Data are expressed as the mean ± standard error of mean (S.E.M) of at least three animals. Multiple comparisons among groups were performed using one-way ANOVA and Tukey test as a post-test. Differences between experimental groups were considered significant for *P*-values <0.05. All statistic tests were performed using Prism version 5 software (GraphPad, San Diego, CA).

Results

Prostaglandin Production Induced by MT-III Requires Distinct TLR Signaling Pathways

Prostaglandins are produced in abundance at sites of inflammation and regulate many aspects of the inflammatory response. Prostaglandins such as PGE₂ and PGD₂ have well-defined roles in acute inflammation, such as the regulation of blood flow and edema formation, cytokine generation, and leukocyte migration [37,38]. In contrast to these lipid mediators, PGJ₂, which is a PGD₂-derived prostanoid, has been described as a resolutive mediator, which is involved in the switch from the acute into the regenerative phases of inflammatory processes [16]. We have

Table 1. Fatty acid nomenclature.

Abbreviation	Systematic Name	Common name
16_0	Hexadecanoic Acid	Palmitic acid
18_0	Octadecanoic Acid	stearic acid
18_1 n-9	9-Octadecenoic Acid	oleic acid
18_1 n-7	11-Octadecenoic Acid	cis-vaccenic acid
18_2 n-6	9,12-Octadecadienoic Acid	Linoleic acid
20_1 n-9	11-Eicosenoic Acid	Gondoic Acid
20_2 n-6	11,14-Eicosadienoic Acid	none
20_3 n-6	8,11,14-Eicosatrienoic Acid	Dihomo-gamma-linolenic acid
20_4 n-6	5,8,11,14-Eicosatetraenoic Acid	Arachidonic acid
22_5 n-6	4,7,10,13,16-Docosapentaenoic Acid	Osbond Acid
22_5 n-3	7,10,13,16,19-Docosapentaenoic Acid	Clupanodonic Acid
22_6 n-3	4,7,10,13,16,19-Docosahexaenoic Acid	Cervonic Acid

doi:10.1371/journal.pone.0093741.t001

previously reported that the sPLA₂ MT-III elicits the biosynthesis of prostaglandins in isolated peritoneal macrophages [13]. These relevant cells of the innate immune system sense danger signals via recognition receptors such as TLRs, and then initiate a coordinated inflammatory response. However, whether TLR pathways, particularly TLR2 and MyD88 adaptor molecule activation, are required for this and other MT-III-induced effects in macrophages is unknown, and deserve further investigation. Therefore, we initially evaluated the involvement of TLR2 and MyD88 signaling in MT-III-induced PGE₂, PGD₂ and PGJ₂ production in TLR2- and MyD88- deficient macrophages. Results presented in Figure 1 (A–C) show that PGE₂ levels were significantly increased in MT-III-stimulated macrophages collected from WT mice. This MT-III- induced PGE₂ release was impaired in macrophages obtained either from TLR2^{−/−} or MyD88^{−/−} mice. Notably, sPLA₂ MT-III failed to induce PGD₂ and PGJ₂ production in TLR2^{−/−}, but did induce production of these mediators in MyD88^{−/−} macrophages when compared with MT-III- stimulated WT cells. These observations prompted us to consider that TLR2 signaling is engaged for the biosynthesis of PGE₂, PGD₂ and PGJ₂ in macrophages under stimuli by MT-III. However, the TLR2 via MyD88 adaptor molecule pathway operates only for biosynthesis of PGE₂, whereas production of PGD₂ and PGJ₂ occurs through an adaptor molecule other than MyD88. Of note, these findings further suggest that upon activation by the sPLA₂ MT-III, TLR2 and MyD88 signaling pathways can coordinate macrophage responses related to both the development and resolution steps of inflammation.

Up-regulation of COX-2 Protein Expression Induced by MT-III is Dependent on TLR2 via MyD88 Signaling Pathway

Activation of TLR2 via MyD88-mediated signaling leads to activation of transcription factors such as NF- κ B, AP-1 and IRF, which in turn play an important role in gene transcription of several molecules involved in the inflammatory response, such as cytokines and cyclooxygenase-2 (COX-2) [39–42]. Prostaglandins are produced by cyclooxygenases, which occur in constitutive (COX-1) and inducible (COX-2) forms [6]. We have previously demonstrated that MT-III up-regulates COX-2 protein expression in peritoneal macrophages and that this isoform is responsible for the increased levels of prostaglandins induced by this sPLA₂ [13].

However, the involvement of TLR2 and MyD88 signaling pathway in this process is unknown. The potential role of TLR2 and MyD88 signaling in MT-III-induced COX-2 protein expression was then analyzed. Figure 1 (D) shows that TLR2^{−/−} and MyD88^{−/−} macrophages stimulated by MT-III did not present the increased COX-2 protein expression seen in MT-III-stimulated WT macrophages. These data clearly indicate that TLR2 and MyD88 are essential to this effect induced by the sPLA₂ MT-III, constituting a key step in the onset of MT-III-induced activation of macrophages. Participation of MyD88 signaling in this MT-III-induced effect is consistent with previous reports by others that activation of this adaptor molecule signals for gene expression of COX-2 [19,43].

TLR2 via MyD88 Signaling Pathway is Required for MT-III-induced Production of IL-1 β and IL-10 in Macrophages

IL-1 β and IL-10 are relevant mediators involved in triggering and down-regulation of inflammatory processes, respectively [44,45]. Despite the distinct roles played by these two cytokines in inflammation, the production of these mediators has been shown to be regulated by TLR2 and MyD88 signaling [46]. The ability of MT-III to induce the release of inflammatory cytokines, such as IL-1 β , has been previously demonstrated [12]. However, whether this MT-III- induced event is coordinated by TLR2 and MyD88 pathways is unknown. Moreover, neither the ability of MT-III to induce release of IL-10 by macrophages nor the participation of TLR2 and MyD88 pathways in this effect has been investigated. We therefore explored the potential role of TLR2 and MyD88 signaling in MT-III-induced synthesis of these cytokines. As demonstrated in Figure 2 (A–B), stimulation of WT macrophages with MT-III induced a significant release of IL-1 β and IL-10 from these cells. However, stimulation of TLR2^{−/−} and MyD88^{−/−} macrophages by MT-III did not result in an increased release of these two cytokines as compared with MT-III-stimulated WT macrophages. These data confirm previous observations on the ability of MT-III to induce the release of IL-1 β and additionally evidenced the capacity of this sPLA₂ to induce the release of IL-10. Furthermore, these data implicate the TLR2 via MyD88 signaling pathway in the generation of IL-1 β and IL-10 induced by MT-III in macrophages.

Figure 1. TLR2 and Myd88 signaling pathways are involved in MT-III-induced prostanoind biosynthesis and COX-2 protein expression. Wild type (WT) or TLR2^{-/-} or MyD88^{-/-} peritoneal macrophages were incubated with MT-III (0.4 μM) or RPMI (control) for 6 h. PGE₂ (A), PGD₂ (B) and PGJ₂ (C) concentrations were quantified in culture supernatants by EIA commercial kits; (D) Western blotting immunoreactive bands of COX-2 and β-actin (loading control) representative of at least three samples/experimental group; (E) Densitometric analysis of immunoreactive COX-2 band intensities. Densities (in arbitrary units) were normalized with those of β-actin. Results are expressed as mean ± SEM from 3–6 animals. **p*<0.05 as compared with control cells; #*p*<0.05 as compared with MT-III-stimulated cells. doi:10.1371/journal.pone.0093741.g001

Figure 2. TLR2 and MyD88 signaling pathways are relevant for MT-III-induced IL-1β and IL-10 release. Wild type (WT) or TLR2^{-/-} or MyD88^{-/-} peritoneal macrophages were incubated with MT-III (0.4 μM) or RPMI (control) for 6 h. IL-1β (A) and IL-10 (B) concentrations were quantified in culture supernatants by EIA commercial kits. Results are expressed as mean ± SEM from 3–6 animals. **p*<0.05 as compared with control group; #*p*<0.05 as compared with MT-III-stimulated WT cells. doi:10.1371/journal.pone.0093741.g002

TLR2 via MyD88 is a Critical Pathway for MT-III-induced LD Formation

It has been demonstrated that LDs formation in leukocytes is a highly regulated event that depends on the interaction of cellular receptors with their ligands. These organelles were shown to be involved in the synthesis of inflammatory mediators and are markers of leukocyte activation [47,48]. Moreover, the role of TLRs-mediated pathogen recognition and activation in the mechanism of LDs formation has been demonstrated by others [48,49]. We have recently shown that MT-III induces the formation of LDs in macrophages [14]. However, the mechanisms underlying this MT-III-induced effect remain unclear. To further understand this issue we investigated the involvement of TLR2 and MyD88 signaling. As demonstrated in Figure 3A, the sPLA₂ MT-III failed to induce LDs formation in macrophages from both TLR2^{-/-} and MyD88^{-/-} mice when compared with macrophages from WT mice, at both time intervals evaluated. These findings identify TLR2 via MyD88 adaptor molecule as an essential signaling pathway regulating LD biogenesis induced by the venom sPLA₂ MT-III in macrophages. Considering that LD-laden macrophages constitute the foam cells seen at the sites of atherosclerotic lesion, in which levels of the sPLA₂s are increased, our present findings suggest that activation of TLR2/MyD88-mediated signaling pathway is likely to be an important mechanism that accounts for foam cell formation stimulated by group IIA sPLA₂s.

Requirement of TLR2 and/or MyD88 Signaling for MT-III-induced Perilipin-2 up- Regulation and Mobilization

Perilipin-2 has long been reported as a pivotal protein for neutral lipid accumulation that serves as scaffolding during LD formation in diverse cell types, including macrophages [50,51]. This protein is constitutively and ubiquitously expressed in macrophages as a major component of intracellular LDs [50,52–54]. Moreover, the expression of perilin-2 can be up-regulated during inflammatory processes [51,55,56]. Consistent with these properties, perilipin-2 has been used as a marker of lipid loading and LD assembly in inflammatory cells [57]. Accumulating evidence indicates that activation of the Toll like receptors triggers foam cell formation and increase of perilipin-2 protein expression [49,58,59]. In macrophages, MT-III has been shown to up-regulate perilipin-2 protein expression and to trigger mobilization of constitutive perilipin-2 to form new LDs in macrophages [14]. On this basis, we assessed the involvement of TLR2 and MyD88 in perilipin-2 protein expression induced by MT-III in macrophages for 6 h. As demonstrated in Figure 3B, following MT-III stimulation of WT macrophages, there is a significant increase of perilipin-2 protein expression in comparison with RPMI-stimulated WT macrophages. This increased protein expression was observed in TLR2^{-/-} macrophages stimulated by MT-III when compared with WT macrophages. Conversely, MyD88^{-/-} macrophages stimulated by this sPLA₂ were unable to up-regulate perilipin-2 protein expression as compared to WT macrophages. These data indicate that perilipin-2 protein expression induced by MT-III is dependent on MyD88 pathway, but not on TLR2 activation. Next we evaluated the potential role of TLR2 and MyD88 signaling in subcellular mobilization of perilipin-2 induced by MT-III. As illustrated in Figure 4, WT macrophages stimulated

Figure 3. TLR2 and MyD88 are required for lipid droplet formation, but only MyD88 is relevant to perilipin-2 protein expression induced by MT-III. Wild type (WT) or TLR2^{-/-} or MyD88^{-/-} peritoneal macrophages were incubated either with MT-III (0.4 μM) or RPMI (control) for 6 or 12 h. (A) Lipid droplets numbers; (B) Western blotting immunoreactive bands of perilipin-2 (PLIN2) and β-actin (loading control); (C) Densitometric analysis of immunoreactive PLIN2 band intensities. Densities (in arbitrary units) were normalized with those of β-actin. Results are expressed as mean ± SEM from 3–6 animals. **p*<0.05 as compared with control group; #*p*<0.05 as compared with MT-III-stimulated WT cells. doi:10.1371/journal.pone.0093741.g003

by MT-III exhibited strong fluorescent staining (green) for perilipin-2, with a punctate cytoplasmic pattern, which was absent in RPMI-stimulated control cells. Fluorescent Nile Red-labeled LDs were also visualized after MT-III-induced stimulation and were virtually absent in non-stimulated WT macrophages. After stimulation with MT-III, cytoplasmic-stained perilipin-2 matched perfectly with Nile Red- marked neutral lipid inclusions. As expected, no significant staining was detected in WT control macrophages. However, this phenomenon was not observed in macrophages from TLR2^{-/-} or MyD88^{-/-} mice, demonstrating that perilipin-2 subcellular distribution induced by MT-III is dependent on TLR2 and MyD88 signaling pathway in a tight correlation with the regulation of MT-III-induced LD formation by TLR2/MyD88 pathway.

MT-III Releases Free Fatty Acids from Macrophages

To better understand the mechanisms underlying activation of TLR2 and MyD88 signaling by MT-III in macrophages, we analyzed the ability of this sPLA₂ to generate free fatty acids, which are recognized as efficient agonists of TLRs, mainly TLR2 [25,28,29,60]. The total fatty acid profile was then analyzed in MT-III-stimulated macrophages by measuring fatty acid methyl esters using gas chromatography mass spectrometry coupled. Figure 5A shows that stimulation of WT macrophages with the sPLA₂ MT-III resulted in a remarkable reduction of fatty acids presumably due to the action of this enzyme on membrane phospholipids. Large decreases were observed in palmitic, stearic, oleic, and particularly in arachidonic acid, which clearly generated a pool of intracellular free fatty acids, that must be reorganized in order to keep intact the cellular homeostasis. To accomplish this, two of the possible underlying mechanisms are: 1) lipid droplet formation and 2) excretion of fatty acids into the extracellular environment. In order to test this latter hypothesis, we previously added labeled free fatty acids (palmitic and oleic acid) to the peritoneal macrophage culture and let them to incorporate; then we determined the blink per minute in a radioactivity counter. Figure 5B shows that higher amounts of palmitic and oleic acids were found in culture supernatants of MT-III-stimulated WT macrophages than in controls, suggesting that these FFA may consequently stimulate the Toll like receptors by an autocrine mechanism.

Discussion

Group IIA secreted PLA₂ enzymes are considered important players in inflammatory process owing to their ability to induce the biosynthesis of second messengers that stimulate innate responses of inflammatory cells, including macrophages. As TLRs are recognized to trigger a pro-inflammatory program in macrophages and respond to exogenous molecules and host-derived endogenous ligands [20,61], in the present study we investigated the participation of TLR2 and MyD88 adaptor molecule in the stimulatory effects of the venom sPLA₂ MT-III in macrophages.

The data presented herein indicate a major role for TLR2 in MT-III-induced production of inflammatory mediators by macrophages, since the production of PGE₂, PGD₂ and PGJ₂ induced by MT-III was abrogated in TLR2^{-/-} macrophages, indicating the engagement of TLR2 upon stimulus by this sPLA₂. To our knowledge, this is the first demonstration that TLR2 pathway is activated by a secreted PLA₂ enzyme leading to biosynthesis of lipid mediators. Reports from literature have shown that endogenous Group V and Group X sPLA₂s are capable to amplify signaling through TLR2 and TLR4/MyD88 in cells stimulated by the pathogen- activated molecular patterns

Pam3CSK4 and LPS, leading to biosynthesis of eicosanoids in mast cells and macrophages, respectively [31,69]. Furthermore, we found that the adaptor molecule MyD88 plays a role in MT-III-induced production of PGE₂, since the release of this mediator was abrogated in MyD88^{-/-} macrophages stimulated by MT-III. However, the increment of PGD₂ and PGJ₂ induced by MT-III was not altered in MyD88^{-/-} macrophages, suggesting that their synthesis is triggered through an adaptor molecule other than MyD88, in the present experimental condition. This is the first demonstration that a secreted group IIA PLA₂ directly activates macrophages to release PGJ₂. Noteworthy, the present findings also evidence, for the first time, that the production of a resolutive mediator is regulated by the TLR2 pathway.

A previous report of our group demonstrated that, similarly to mammalian GIIA sPLA₂s [70], MT-III up-regulates COX-2 protein expression, a critical enzyme for PGs production in macrophages [13]. We herein extended the understanding of this mechanism by showing that MT-III up-regulates COX-2 expression via TLR2 and MyD88 signaling pathways in macrophages, based on the inability of TLR2^{-/-} and MyD88^{-/-} macrophages to express COX-2 in response to MT-III stimulus. Taking these data into account, and considering results showing that MyD88 adaptor molecule is involved in MT-III-induced production of PGE₂, but not PGD₂ or PGJ₂, it is suggested that COX-2 is the major PGE₂ biosynthetic pathway, whereas production of PGD₂ and PGJ₂ may be associated to both COX-2 and COX-1 biosynthetic pathways. Consistent with this hypothesis, a previous report has shown the ability of MT-III to induce an increment in the activity of COX-1 along with expression of COX-2 in macrophages [13].

The ability of sPLA₂s, including MT-III, to induce the release of cytokines has been previously demonstrated [12,71]. The data presented herein demonstrate that this sPLA₂ induces the release of IL-10 and IL-1β in a process mediated by TLR2/MyD88 signaling pathway. These findings also bring additional evidence that engagement of TLR2/MyD88 signaling pathway coordinates both the acute and resolutive responses in macrophages upon stimulation by the sPLA₂ MT-III. Furthermore, increased IL-10 biosynthesis, observed in MT-III-stimulated WT macrophages, suggests that in our experimental conditions this cytokine regulates the synthesis of PGE₂ via TLR2/MyD88 pathway activation, as a tight regulation of PGE₂ biosynthesis by IL-10 has been previously demonstrated in macrophages [62–64].

LDs are cytoplasmic inclusions found in numerous immune cells associated with inflammation [51,54,65], such as foam macrophages, which are major cells of atherosclerotic lesions [66]. We recently demonstrated that MT-III induces LDs formation, recruitment and increased expression of the LD scaffold protein perilipin-2 in macrophages [14]. The results obtained herein demonstrate, for the first time, that TLR2 and MyD88 are essential elements for LD formation induced by MT-III, since TLR2^{-/-} and MyD88^{-/-} macrophages failed to respond with increased numbers of LDs. These results are in agreement with previous reports by others showing that TLR2/MyD88 pathway is involved in LDs formation in leukocytes [47–49]. On the other hand, our data further demonstrate that TLR2 deletion does not affect the ability of MT-III to induce a significant increase of perilipin-2 protein expression, but inhibits its capacity to mobilize constitutive perilipin-2 in the cytosol, evidencing that although not signaling for up regulation of perilipin-2 expression, this receptor is engaged for its recruitment, triggering an important mechanism for LD formation. In contrast, MyD88 deleted cells blocked MT-III- induced expression and mobilization of perilipin-2, implying the participation of this adaptor molecule in this effect. Therefore,

Figure 4. TLR2 and MyD88 are essential for MT-III-induced perilipin-2 (PLIN2) subcellular distribution. Wild Type (WT), $TLR2^{-/-}$ or $MyD88^{-/-}$ peritoneal macrophages were incubated with RPMI (control) or MT-III (0.4 μ M) for 6 h and labeled for both lipid droplets (fluorescent Nile red) and anti-PLIN2 (FITC-conjugated immunocomplex). Merged image shows localization of PLIN2 to lipid droplets in WT macrophages. Cell nuclei were stained with propidium iodide. IgG control was included and showed negative stain. The micrographs are representative of at least three samples/experimental group.
doi:10.1371/journal.pone.0093741.g004

activation of a TLR other than TLR2 is involved in MT-III-induced expression of perilipin-2. To our knowledge, this is the first demonstration of participation of TLR2 and MyD88 pathways in the mechanisms leading to LDs formation induced by group IIA sPLA₂, and that MyD88 is a crucial adaptor molecule mediating perilipin-2 expression and mobilization induced by this class of enzymes. Experimental studies have previously demonstrated that TLRs, particularly TLR2 via MyD88-dependent pathway, have relevant roles in the differentiation of recruited monocytes into lipid-laden macrophages (foam cells), and ultimately to the development of atherosclerotic lesions

[67,68]. Considering the reported increased expression of group IIA sPLA₂s at the site of atherosclerotic lesions [9], our present findings may shed light on the early mechanisms involved in the ability of sPLA₂s to induce formation of foam macrophages.

The mechanisms by which MT-III activates TLR2 were not presently investigated. It has been shown that a free fatty acid (FFA)-rich microenvironment leads to the activation of TLR2 [28,60]. Moreover, there are data demonstrating that products of cleavage of membrane phospholipids by sPLA₂s, including saturated fatty acids, lysophosphatidylcholine and lysophosphatidylserine, are able to activate this receptor [60,72,73,74]. In this

Figure 5. MT-III affects macrophage fatty acid content causing the release of palmitic and oleic acids. (A) The profile of major fatty acids in peritoneal macrophages from WT mice stimulated with MT-III (0.4 μ M) (gray bars) or RPMI (control) (open bars) for 6 h was determined by GC-MS after converting the glyceryl fatty acid into fatty acid methyl esters. (B) Peritoneal macrophages were incubated with 1 μ M [14 C]palmitic acid or (C) [14 C]oleic acid for 18 h. Afterward, [14 C]palmitic acid or [14 C]oleic acid incorporation was measured in macrophages and their supernatants 6 h after stimulation with either MT-III or RPMI (control) as described in Materials and Methods. The 14 C radioactivity incorporated is expressed as a percentage of the radioactivity originally added to the cells. Results are expressed as means $\pm$ SEM from 3–6 animals. * p <0.05 as compared with the corresponding control.

doi:10.1371/journal.pone.0093741.g005

context, we herein demonstrate that MT-III reduced the levels of saturated FFA, such as palmitic and stearic acid, as well as monounsaturated and polyunsaturated fatty acids in macrophages. Decreased levels of both palmitic and oleic acids correlated with increased amounts of these fatty acids in the extracellular medium, indicating that they are released from macrophages upon the action of MT-III, thus allowing their interaction with surface membrane receptors. On this basis, we suggest that, in the present experimental conditions, saturated FFAs resulting from the catalytic action of MT-III on membrane phospholipids are autocrine ligands for TLR2, which then triggers an inflammatory program in macrophages, via pathways dependent on MyD88. However, participation of lysophospholipids in this mechanism cannot be ruled out. In support of our hypothesis, when catalytic activity of MT-III is inhibited, increments in LD formation are abrogated [14]. In addition, the involvement of TLR2 in the release of the cytokines IL-1 β and IL-10 induced by minimally modified LDL in macrophages has been previously described [46]. In conclusion, we provide evidence of a critical role for TLR2 and MyD88 adaptor molecule in mediating sPLA₂-induced inflamma-

tory responses in macrophages. We have shown for the first time that the TLR2 and Myd88 adaptor molecule are involved in cellular and molecular inflammatory processes triggered by the venom sPLA₂ MT-III in macrophages, that include the production of eicosanoids and cytokines and the formation of LDs, as well as an increased expression of COX-2 and perilipin-2 mobilization and expression. Interestingly, these findings indicate that TLR2, via MyD88 adaptor molecule, links sPLA₂s with LD and foam cell formation. Moreover, we speculate that saturated free fatty acids released by MT-III enzyme activity from phospholipids in the macrophage membrane, are autocrinally recognized by TLR2, thereby initiating an inflammatory signaling cascade in macrophages. Altogether, these findings amplify the current knowledge on the mechanisms involved in the stimulatory effects of Group IIA sPLA₂s in macrophages, specially those that trigger inflammatory events, including foam cell formation, which is a hallmark of atherosclerosis. Such a mechanism may contribute to the identification of useful new targets for the development of novel therapeutic strategies for inflammatory diseases related to lipid imbalance where group IIA sPLA₂s enzymes are involved.

Acknowledgments

The authors acknowledge Renata Hage do Amaral for technical assistance and Dr. Henrique Krambeck Rofatto (Butantan Institute), for supporting confocal laser scanning microscopy analysis.

References

- Schaloske RH, Dennis EA (2006) The phospholipase A₂ superfamily and its group numbering system. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1761: 1246–1259.
- Kaiser II, Gutierrez JM, Plummer D, Aird SD, Odell GV (1990) The amino acid sequence of a myotoxic phospholipase from the venom of *Bothrops asper*. *Arch Biochem Biophys* 278: 319–325.
- Kini RM (1997) Phospholipase A₂ - A complex multifunctional protein puzzle. In: *Venom phospholipase A₂ enzymes. structure, function and mechanism*. New York: Wiley J and Sons, 1.
- Yedgar S, Cohen Y, Shoseyov D (2006) Control of phospholipase A₂ activities for the treatment of inflammatory conditions. *Biochim Biophys Acta* 1761: 1373–1382.
- Triggiani M, Granata F, Giannattasio G, Marone G (2005) Secretory phospholipases A₂ in inflammatory and allergic diseases: not just enzymes. *J Allergy Clin Immunol* 116: 1000–1006.
- Karabina SA, Gora S, Atout R, Ninio E (2010) Extracellular phospholipases in atherosclerosis. *Biochimie* 92: 594–600.
- Teixeira C, Cury Y, Moreira V, Picolob G, Chaves F, Huwiler, AG (2009) Inflammation induced by *Bothrops asper* venom. *Toxicon* 54: 988–997.
- Calvete JJ (2011) Proteomics in Venom Research: a Focus on PLA₂ Molecules. *Acta Chim Slov* 58: 629–637.
- Gutiérrez JM, Lomonte B (1995) Phospholipase A₂ myotoxins from *Bothrops* snake venoms. *Toxicon* 33: 1405–1424.
- Chaves F, Leon G, Alvarado VH, Gutierrez JM (1998) Pharmacological modulation of edema induced by Lys-49 and Asp-49 myotoxic phospholipases A₂ isolated from the venom of the snake *Bothrops asper* (terciopelo). *Toxicon* 36: 1861–1869.
- Zuliani JP, Fernandes CM, Zamuner SR, Gutierrez JM, Teixeira CF (2005) Inflammatory events induced by Lys-49 and Asp-49 phospholipases A₂ isolated from *Bothrops asper* snake venom: role of catalytic activity. *Toxicon* 45: 335–346.
- Zuliani JP, Gutierrez JM, Casais e Silva LL, Coccuzzo Sampaio S, Lomonte B, et al. (2005) Activation of cellular functions in macrophages by venom secretory Asp-49 and Lys-49 phospholipases A₂. *Toxicon* 46: 523–532.
- Moreira V, Gutierrez JM, Soares AM, Zamuner SR, Purgatto E, et al. (2008) Secretory phospholipases A₂ isolated from *Bothrops asper* and from *Crotalus durissus terrificus* snake venoms induce distinct mechanisms for biosynthesis of prostaglandins E₂ and D₂ and expression of cyclooxygenases. *Toxicon* 52: 428–439.
- Leiguez E, Zuliani JP, Cianciarullo AM, Fernandes CM, Gutierrez JM, et al. (2011) A group IIA-secreted phospholipase A₂ from snake venom induces lipid body formation in macrophages: the roles of intracellular phospholipases A₂ and distinct signaling pathways. *J Leukoc Biol* 90: 155–166.
- Mosser DM, Edwards JP (2008) Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol* 8: 958–969.
- Surh YJ, Na HK, Park JM, Lee HN, Kim W, et al. (2011) 15-Deoxy-Delta(1)(2), (1)(4)-prostaglandin J(2), an electrophilic lipid mediator of anti-inflammatory and pro-resolving signaling. *Biochem Pharmacol* 82: 1335–1351.
- Ghesquiere SA, Gijbels MJ, Anthonen M, van Gorp PJ, van der Made I, et al. (2005) Macrophage-specific overexpression of group IIA sPLA₂ increases atherosclerosis and enhances collagen deposition. *J Lipid Res* 46: 201–210.
- Choudhury RP, Lee JM, Greaves DR (2005) Mechanisms of disease: macrophage-derived foam cells emerging as therapeutic targets in atherosclerosis. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 2: 309–315.
- O'Neill LA (2008) The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: 10 years of progress. *Immunol Rev* 226: 10–18.
- Takeuchi O, Akira S (2010) Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* 140: 805–820.
- Dinarello, C A. (2009) Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annu Rev Immunol* 27: 519–550.
- Okamura Y, Watari M, Jerud ES, Young DW, Ishizaka ST, et al 3rd. (2001) The extra domain A of fibronectin activates Toll-like receptor 4. *J Biol Chem* 276: 10229–10233.
- Wallin RP, Lundqvist A, More SH, von Bonin A, Kiessling R, et al. (2002) Heat-shock proteins as activators of the innate immune system. *Trends Immunol* 23: 130–135.
- Yu L, Wang L, Chen S (2012) Exogenous or endogenous Toll-like receptor ligands: which is the MVP in tumorigenesis? *Cell Mol Life Sci* 69: 935–949.
- Lee JY, Zhao L, Youn HS, Weatherill AR, Tapping R, et al. (2004) Saturated fatty acid activates but polyunsaturated fatty acid inhibits Toll-like receptor 2 dimerized with Toll-like receptor 6 or 1. *J Biol Chem* 279: 16971–16979.
- Shi H, Kokoeva MV, Inouye K, Tzameli I, Yin H, et al. (2006) TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. *J Clin Invest* 116: 3015–3025.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: CT EL JB JMG BL. Performed the experiments: EL KCG VM MHM JPR. Analyzed the data: CT EL KCG VM MHM JPR. Contributed reagents/materials/analysis tools: CT JB JMG BL. Wrote the paper: EL CT JB JMG BL.

- Song MJ, Kim KH, Yoon JM, Kim JB (2006) Activation of Toll-like receptor 4 is associated with insulin resistance in adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 346: 739–745.
- Nguyen MT, Favelyukis S, Nguyen AK, Reichart D, Scott PA, et al. (2007) A subpopulation of macrophages infiltrates hypertrophic adipose tissue and is activated by free fatty acids via Toll-like receptors 2 and 4 and JNK-dependent pathways. *J Biol Chem* 282: 35279–35292.
- Lee JY, Sohn KH, Rhee SH, Hwang D (2001) Saturated fatty acids, but not unsaturated fatty acids, induce the expression of cyclooxygenase-2 mediated through Toll-like receptor 4. *J Biol Chem* 276: 16683–16689.
- Boni-Schnetzler M, Boller S, Debray S, Bouzakri K, Meier DT, et al. (2009) Free fatty acids induce a proinflammatory response in islets via the abundantly expressed interleukin-1 receptor I. *Endocrinology* 150: 5218–5229.
- Kikawada E, Bonventre JV, Arm JP (2007) Group V secretory PLA₂ regulates TLR2- dependent eicosanoid generation in mouse mast cells through amplification of ERK and cPLA₂alpha activation. *Blood* 110: 561–567.
- Diaz-Oreiro C, Gutierrez JM (1997) Chemical modification of histidine and lysine residues of myotoxic phospholipases A₂ isolated from *Bothrops asper* and *Bothrops godmani* snake venoms: effects on enzymatic and pharmacological properties. *Toxicon* 35: 241–252.
- Takayama K, Mitchell DH, Din ZZ, Mukerjee P, Li C, et al. (1994) Monomeric Re lipopolysaccharide from *Escherichia coli* is more active than the aggregated form in the *Limulus* amoebocyte lysate assay and in inducing Egr-1 mRNA in murine peritoneal macrophages. *J Biol Chem* 269: 2241–2244.
- Bligh EG, Dyer WJ (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol* 37: 911–917.
- Astudillo AM, Pérez-Chacón G, Balgoma D, Gil-de-Gómez L, Ruipérez V, et al. (2011) Influence of cellular arachidonic acid levels on phospholipid remodeling and CoA-independent transacylase activity in human monocytes and U937 cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1811: 97–103.
- Guijas C, Perez-Chacon G, Astudillo AM, Rubio JM, Gil-de-Gomez L, et al. (2012) Simultaneous activation of p38 and JNK by arachidonic acid stimulates the cytosolic phospholipase A2-dependent synthesis of lipid droplets in human monocytes. *J Lipid Res* 53: 2343–2354.
- Hata AN, Breyer RM (2004) Pharmacology and signaling of prostaglandin receptors: multiple roles in inflammation and immune modulation. *Pharmacol Ther* 103: 147–166.
- Hirata T, Narumiya S (2012) Prostanoids as regulators of innate and adaptive immunity. *Adv Immunol* 116: 143–174.
- Adachi O, Kawai T, Takeda K, Matsumoto M, Tsutsui H, et al. (1998) Targeted disruption of the MyD88 gene results in loss of IL-1- and IL-18-mediated function. *Immunity* 9: 143–150.
- Casanova JL, Abel L, Quintana-Murci L (2011) Human TLRs and IL-1Rs in host defense: natural insights from evolutionary, epidemiological, and clinical genetics. *Annu Rev Immunol* 29: 447–491.
- Lin SC, Lo YC, Wu H (2010) Helical assembly in the MyD88-IRAK4-IRAK2 complex in TLR/IL-1R signalling. *Nature* 465: 885–890.
- Loures FV, Pina A, Felonato M, Fierotti C, de Araujo EF, et al. (2011) MyD88 signaling is required for efficient innate and adaptive immune responses to *Paracoccidioides brasiliensis* infection. *Infect Immun* 79: 2470–2480.
- McGettrick AF, O'Neill LA (2007) Toll-like receptors: key activators of leukocytes and regulator of haematopoiesis. *Br J Haematol* 139: 185–193.
- Sims JE, Smith DE (2010) The IL-1 family: regulators of immunity. *Nat Rev Immunol* 10: 89–102.
- Han X, Boisvert WA (2012) The Role of IL-10 in Atherosclerosis, Atherogenesis, Prof. Sampath Parthasarathy (Ed.), ISBN: 978–953–307–992–9, InTech, Available from: <http://www.intechopen.com/books/atherogenesis/the-role-of-il-10-in-atherosclerosis>.
- Chavez-Sanchez L, Chavez-Rueda K, Legorreta-Haquet MV, Zenteno E, Ledesma-Soto Y, et al. (2010) The activation of CD14, TLR4, and TLR2 by mmLDL induces IL-1beta, IL-6, and IL-10 secretion in human monocytes and macrophages. *Lipids Health Dis* 9: 117.
- Pacheco P, Bozza FA, Gomes RN, Bozza M, Weller PF, et al. (2002) Lipopolysaccharide-induced leukocyte lipid body formation in vivo: innate immunity elicited intracellular Loci involved in eicosanoid metabolism. *J Immunol* 169: 6498–6506.
- D'Avila H, Melo RC, Parreira GG, Werneck-Barroso E, Castro-Faria-Neto HC, et al. (2006) *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin induces TLR2-mediated formation of lipid bodies: intracellular domains for eicosanoid synthesis in vivo. *J Immunol* 176: 3087–3097.
- Nicolaou G, Erridge C (2010) Toll-like receptor-dependent lipid body formation in macrophage foam cell formation. *Curr Opin Lipidol* 21: 427–433.

50. Brasaemle DL, Barber T, Wolins NE, Serrero G, Blanchette-Mackie EJ, et al. (1997) Adipose differentiation-related protein is an ubiquitously expressed lipid storage droplet-associated protein. *J Lipid Res* 38: 2249–2263.
51. Larigauderie G, Furman C, Jaye M, Lasselin C, Copin C, et al. (2004) Adipophilin enhances lipid accumulation and prevents lipid efflux from THP-1 macrophages: potential role in atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24: 504–510.
52. Heid HW, Moll R, Schwetlick I, Rackwitz HR, Keenan TW (1998) Adipophilin is a specific marker of lipid accumulation in diverse cell types and diseases. *Cell Tissue Res* 294: 309–321.
53. Persson J, Degerman E, Nilsson J, Lindholm MW (2007) Perilipin and adipophilin expression in lipid loaded macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 363: 1020–1026.
54. Robenek H, Robenek MJ, Troyer D (2005) PAT family proteins pervade lipid droplet cores. *J Lipid Res* 46: 1331–1338.
55. Corsini E, Sheasgreen J, Marinovich M, Galli CL (2002) Use of differential display-polymerase chain reaction to identify genes selectively modulated by chemical allergens in reconstituted human epidermis. *Toxicol In Vitro* 16: 427–431.
56. Sarov-Blat L, Kiss RS, Haidar B, Kavaslar N, Jaye M, et al. (2007) Predominance of a proinflammatory phenotype in monocyte-derived macrophages from subjects with low plasma HDL-cholesterol. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27: 1115–1122.
57. Brasaemle DL, Dolios G, Shapiro L, Wang R (2004) Proteomic analysis of proteins associated with lipid droplets of basal and lipolytically stimulated 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem* 279: 46835–46842.
58. Feingold KR, Kazemi MR, Magra AL, McDonald CM, Chui LG, et al. (2010) ADRP/ADFP and Mall expression are increased in macrophages treated with TLR agonists. *Atherosclerosis* 209: 81–88.
59. Wang J, Si Y, Wu C, Sun L, Ma Y, et al. (2012) Lipopolysaccharide promotes lipid accumulation in human adventitial fibroblasts via TLR4-NF- κ B pathway. *Lipids Health Dis* 11: 139.
60. Huang S, Rutkowsky JM, Snodgrass RG, Ono-Moore KD, Schneider DA, et al. (2012) Saturated fatty acids activate TLR-mediated proinflammatory signaling pathways. *J Lipid Res* 53: 2002–2013.
61. Iwata H, Nagai R (2012) Novel immune signals and atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep* 14: 484–490.
62. MacKenzie KF, Clark K, Naqvi S, McGuire VA, Noehren G, et al. (2013) PGE(2) induces macrophage IL-10 production and a regulatory-like phenotype via a protein kinase A-SIK-CRTC3 pathway. *J Immunol* 190: 565–577.
63. Nemeth K, Leelahavanichkul A, Yuen PS, Mayer B, Parmelee A, et al. (2009) Bone marrow stromal cells attenuate sepsis via prostaglandin E(2)-dependent reprogramming of host macrophages to increase their interleukin-10 production. *Nat Med* 15: 42–49.
64. Heusinkveld M, de Vos van Steenwijk PJ, Goedemans R, Ramwadhoebe TH, Gorter A, et al. (2011) M2 macrophages induced by prostaglandin E2 and IL-6 from cervical carcinoma are switched to activated M1 macrophages by CD4+ Th1 cells. *J Immunol* 187: 1157–1165.
65. Krahmer N, Farese Jr RV, Walther TC (2013) Balancing the fat: lipid droplets and human disease. *EMBO Mol Med* 5: 905–915.
66. Ley K, Miller YI, Hedrick CC (2011) Monocyte and macrophage dynamics during atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 31: 1506–1516.
67. Cole JE, Mitra AT, Monaco C (2010) Treating atherosclerosis: the potential of Toll-like receptors as therapeutic targets. *Expert Rev Cardiovasc Ther* 8: 1619–1635.
68. Liu Y, Yu H, Zhang Y, Zhao Y (2008) TLRs are important inflammatory factors in atherosclerosis and may be a therapeutic target. *Med Hypotheses* 70: 314–316.
69. Shridas P, Bailey WM, Talbott KR, Oslund RC, Gelb MH, et al. (2011) Group X secretory phospholipase A₂ enhances TLR4 signaling in macrophages. *J Immunol* 187: 482–9.
70. Bryant KJ, Bidgood MJ, Lei PW, Taberner M, Salom C, et al. (2011) A bifunctional role for group IIA secreted phospholipase A₂ in human rheumatoid fibroblast-like synovocyte arachidonic acid metabolism. *J Biol Chem* 286: 2492–503.
71. Granata F, Petraroli A, Boilard E, Bezzine S, Bollinger J, et al. (2005) Activation of cytokine production by secreted phospholipase A₂ in human lung macrophages expressing the M-type receptor. *J Immunol* 174: 464–474.
72. Magalhães K, Almeida PE, Atella G, Maya-Monteiro CM, Castro-Faria-Neto H, et al. (2010) Schistosomal-derived lysophosphatidylcholine are involved in eosinophil activation and recruitment through Toll-like receptor-2-dependent mechanisms. *J Infect Dis.*, 202: 1369–79.
73. Frasch SC, Bratton DL (2012) Emerging roles for lysophosphatidylserine in resolution of inflammation. *Prog Lipid Res.*, 51: 199–207.
74. Carneiro AB, Iaciura BM, Nohara LL, Lopes CD, Veas EM, et al. (2013) Lysophosphatidylcholine triggers TLR2- and TLR4-mediated signaling pathways but counteracts LPS-induced NO synthesis in peritoneal macrophages by inhibiting NF- κ B translocation and MAPK/ERK phosphorylation. *PLoS One* 8:e76233.