KARINA CRISTINA GIANNOTTI

ESTUDO DOS EFEITOS DE DUAS FOSFOLIPASES A₂ (MT-III e BthTx-II) ISOLADAS DO VENENOS DE SERPENTES *Bothrops* EM CÉLULAS DE MÚSCULO LISO VASCULAR EM CULTURA: FORMAÇÃO DE CORPÚSCULOS LIPÍDICOS E MECANISMOS ENVOLVIDOS

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
2017**

KARINA CRISTINA GIANNOTTI

ESTUDO DOS EFEITOS DE DUAS FOSFOLIPASES A₂ (MT-III e BthTx-II) ISOLADAS DO VENENOS DE SERPENTES *Bothrops* EM CÉLULAS DE MÚSCULO LISO VASCULAR EM CULTURA: FORMAÇÃO DE CORPÚSCULOS LIPÍDICOS E MECANISMOS ENVOLVIDOS

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: Dra. Catarina de Fátima
Pereira Teixeira**

Versão original

**São Paulo
2017**

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

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Giannotti, Karina Cristina

Estudo dos efeitos de duas fosfolipases A2 (MT-III e BthTx-II) isoladas do venenos de serpentes Bothrops em células de músculo liso vascular em cultura: formação de corpúsculos lipídicos e mecanismos envolvidos / Karina Cristina Giannotti; orientador Catarina de Fátima Pereira Teixeira. -- São Paulo, 2017.

141 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Corpúsculo lipídico. 2. Célula de músculo liso vascular. 3. Fosfolipases A2. I. Teixeira, Catarina de Fátima Pereira, orientador. II. Título.

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

Candidato(a): Karina Cristina Giannotti

Título da Tese: Estudo dos efeitos de duas fosfolipases A2 (MT-III e BthTx-II) isoladas do venenos de serpentes *Bothrops* em células de músculo liso vascular em cultura: formação de corpúsculos lipídicos e mecanismos envolvidos

Orientador(a): 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:

OTTO VON GUERICKE
UNIVERSITÄT
MAGDEBURG

MEDIZINISCHE
FAKULTÄT

Medizinische Fakultät, Leipziger Str. 44, 39120 Magdeburg

KLINIK FÜR KARDIOLOGIE
UND ANGIOLOGIE

Prof. Dr. med.
Rüdiger C. Braun-Dullaeus
Director

r.braun-dullaeus@med.ovgu.de
Telefon: +49 391 67-13203
Telefax: +49 391 67-13202
www.kardiologie-magdeburg.de

Dr. rer. nat. Sönke Weinert
Laboratory supervisor

Otto-von-Guericke-Universität
Medizinische Fakultät
Leipziger Str. 44
39120 Magdeburg

Soenke.weinert@med.ovgu.de
Telefon: +49 391 67-24740
Telefax: +49 391 67-24745

To whom it may concern

Ihre Zeichen, Ihre Nachricht vom: Unsere Zeichen: Durchwahl: Datum: 25.11.2016

Dear Sir or Madam,

I would like to recommend Mrs. Karina Cristina Giannotti, born 16th April 1987 in Sao Paulo Brazil. In 2015 Mrs. Giannotti had contacted me regarding certain assays using vascular smooth muscle cells, which we had published in 2013. She wanted to make use of our methodological expertise and apply the established methods in our lab to her own scientific question. She had prepared a proposal with a quite ambitious working plan and subsequently was able to get successfully funded by the FAPESP, the Sao Paulo research foundation, for a three months stay here in my laboratory.

During her stay as visiting scientist in our lab, the team and I became acquainted with her as an excellent researcher. Her curious mind and her working ethics allowed her to learn quickly and to conduct the proposed experiments with a minimum of assistance. Mrs. Giannotti was able to work in the team as well as independently. At the end of her stay, she was a fully integrated member of our team and able to conduct all necessary working steps, cell culture of primary smooth muscle cells, advanced widefield fluorescent microscopy, RNA isolation, cDNA synthesis, primer design and quantitative real-time PCR, on her own. Therefore, I can only recommend Mrs. Giannotti as a diligent, responsible and capable colleague to you. I would not hesitate to offer Mrs. Giannotti a postdoc position in my lab after her PhD-thesis will be finished.

Beside her professional qualification, the team and I had also the opportunity to enjoy her great personality. I would describe her as a kind, steady and even-tempered person, who can easily integrate into a conversation and a team without being objectionable.

In summary, Mrs. Giannotti is a hardworking and promising colleague with a great personality. I recommend her as coworker or employer without any hesitation.

Yours sincerely,

Professor Dr. med. Rüdiger C. Braun-Dullaeus
Director of the Division of Cardiology and Angiology
Magdeburg University, Germany

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP · Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000
Comissão de Ética no Uso de Animais - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que a solicitação de licença de uso de animais intitulada "*Estudo dos efeitos de uma fosfolipase A2 (MT-III) isolada do veneno da serpente Bothrops asper em células de músculo liso vascular em cultura: formação de corpúsculos lipídicos e mecanismos envolvidos*", registrada sob nº 102, nas fls. 36, do livro 3, foi analisada e aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA-ICB/USP) em 25/08/2015.

Por esta licença, estão autorizados a manipular animais dentro dos limites do projeto proposto e no âmbito da Lei Federal nº 11.794, o Dr.(Dra.) **Catarina de Fátima Pereira Teixeira** (Investigador Principal) e os membros da equipe: *Elbio Leiguez Junior, Karina Cristina Giannotti*. Esta licença de uso de animais expira em 25/08/2019.

Havendo interesse na renovação da proposta, a solicitação deverá ser protocolada pela secretaria da CEUA-ICB/USP até o último dia de validade da atual proposta. Após essa data, uma nova proposta deverá ser encaminhada.

CERTIFICATE

We hereby certify that permission for the use of animals was granted to the research proposal "*Study on effects of a phospholipase A2 isolated from Bothrops asper snake venom on vascular smooth muscle cells: lipid droplets formation and mechanisms involved*", registered as **Number 102**, in pages 36, of book 3, by the local ETHICS COMMITTEE ON THE USE OF ANIMALS (CEUA-ICB/USP) in 8/25/2015.

Under this license, **Catarina de Fátima Pereira Teixeira** (Principal Investigator) and team members *Elbio Leiguez Junior, Karina Cristina Giannotti* are authorized to make use of animals within the limits of the research proposal presented to this committee and of the Brazilian Federal Law nº 11.794.

This license expires in 8/25/2019. In case the investigators wish to renew this license, this must be presented to CEUA-ICB/USP before the last day of validity of the present license. After such date, a new research proposal must be presented.

São Paulo, 27 de agosto de 2015.

Prof. Dr. Anderson de Sá Nunes
Coordenador CEUA-ICB/USP

Eliane Aparecida G. M. Nascimento
Secretária CEUA-ICB/USP

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO BUTANTAN

Av. Dr. Vital Brazil, 1500, CEP 05503-900, São Paulo, SP, Brazil
Telefone: (55) (011) 2627-9585 - Fax: (55) (011) 2627-9505
ceuaib@butantan.gov.br

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Estudo dos efeitos de uma fosfolipase A2 (MT-III) isolada do veneno da serpente *Bothrops asper* em células de músculo liso vascular em cultura: formação de corpúsculos lipídicos e mecanismos envolvidos", **protocolo nº 1024/13**, sob a responsabilidade de Catarina de Fátima Pereira Teixeira e Karina Cristina Giannotti - que envolve a criação e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica - está de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto 6.899, de 15 de julho de 2009 e de normas complementares, bem como está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO INSTITUTO BUTANTAN (CEUAIB) em reunião de 19/6/2013.

Vigência do Projeto:	Nº de animais/espécie
06/2013 - 02/2017 Laboratório de Farmacologia	55 ratos Wistar 250-300g (M)

São Paulo, 20 de junho de 2013

Dr. Marcelo L. Santoro
Coordenador da CEUAIB

*Trabalho realizado na Unidade de Inflamação do Laboratório de
Farmacologia do Instituto Butantan, com auxílio da
Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível
Superior (CAPES) e da Fundação de Amparo a Pesquisa do
Estado de São Paulo (FAPESP).- Processos 2013/22610-5,
2014/18549-1 e 2016/14046-0*

DEDICATÓRIA

*Aos **meus pais**, por todo apoio emocional e financeiro, pela confiança, pelo carinho e principalmente por entenderem a minha ausência em muitos momentos. Obrigada por me ajudarem a alcançar o meu sonho. Sem vocês, certamente eu teria desistido!!! Vocês representam em minha vida, os melhores exemplos de honestidade, conhecimento, competência e dedicação.*

Amo vocês!!

*À **minha irmã**, querida amiga e companheira, por procurar sempre me compreender e me apoiar incondicionalmente. Obrigada pela paciência, pelos conselhos e por todos os bons momentos em sua casa. Amo você querida irmã.*

AGRADECIMENTOS

*À minha orientadora **Dra. Catarina Teixeira**, pela oportunidade, por toda confiança e força dedicada para que este trabalho fosse concluído. Obrigada por sempre procurar dar asas as minhas idéias e por ter me ensinado a arte da escrita científica. Obrigada pela infinita paciência. Ainda, agradeço imensamente por ter insistido para que eu fosse para a Alemanha e por ter me proporcionado viver essa experiência única. Muito Obrigada!*

*Aos **Drs. Soenke Weinert e Rudiger Braun-Dullaeus** (Universidade de Magdeburgo, Alemanha) por terem me dado a oportunidade de realizar parte de meu projeto em seu laboratório. Ao Dr. Weinert meu muito obrigada pelos tours ao longo da cidade e pelas experiências únicas em sua casa, cheias de tradições alemãs. Muito obrigada!! Me senti em casa!!*

*Aos alunos e técnicos da Universidade de Magdeburgo na Alemanha, **Soenke, Senad, Johannes, Claudia Bär, Claudia Zufelde e Nicolas** por todas as risadas, pizzas/almoços, feiras de natal e vinho quente. Muito obrigada por terem me proporcionado uma estadia tranqüila, agradável e cheia de risadas e diversão.*

*À **Dra. Sylvia Mendes Carneiro** (Laboratório de Biologia Celular/IBU), por ter me orientado no início de minha carreira acadêmica, ainda na graduação, por todos os ensinamentos, bons conselhos e por ter me ensinado a ser uma pessoa trabalhadora, séria e com ética acima de tudo.*

*À **Dra. Suely Sampaio Vilela** e aos **Drs. Bruno Lomonte e José Maria Gutiérrez**, pela doação das toxinas MT-III e BthTx-II utilizadas neste estudo.*

*À **Dra Marta M. Antoniazzi** e ao **Dr. Carlos Jared** (Biologia Celular/IBU) por possibilitar o uso do microscópio eletrônico LEO 906E.*

*À amiga e técnica do microscópio eletrônico de transmissão (Biologia Celular/IBU) **Simone Gonçalves Jared**, amiga essa conquista é tão minha quanto sua!!! Obrigada por sua valiosa amizade ao longo desses quase 12 anos de Instituto Butantan e por todos os almoços, sempre cheios de conselhos e risadas. Ainda, agradeço por sua ajuda para capturar as imagens e operar o microscópio eletrônico LEO 906E.*

*À grande amiga **Dra. Vanessa Moreira**, pela disposição em ajudar sempre que necessário, pelas conversas, conselhos e principalmente por sua forma empolgante e dedicada de trabalhar, sempre exemplares e contagiantes.*

*À **Dra. Cristina Fernandes** por sempre tirar minhas dúvidas sobre farmacologia e me ajudar a solucionar os problemas que encontrei ao longo do doutorado. Obrigada por sempre ser tão didática, prestativa e gentil.*

*À **Mariana Viana**, Cotton, por toda a ajuda nos experimentos e por toda a amizade e paciência, principalmente nos meus dias de crise, sempre dando bons conselhos, contando histórias engraçadas e fazendo todo possível para tornar os dias da inflamação mais alegres.*

*À amiga **Neide Galvão do Nascimento**, Neidecão, obrigada por toda ajuda, conselhos e risadas sempre garantidas ao seu lado. Foi um prazer e uma honra poder conviver com você durante esses anos. Aprendi muito com você!!! Te admiro!!!! Ainda, obrigada por estar sempre disponível para me ajudar nos experimentos!!!*

*À **Renata Hage Amaral**, Rezilda, por toda ajuda nos diversos Western blottings, por todas as soluções e principalmente por toda amizade e carinho desprendidos ao longo desses anos. Seus conselhos foram muito valiosos para mim!!!! Muito obrigada amiga querida!!!*

*À **Ana Eduarda Zulim de Carvalho** pela ajuda na padronização da cultura de CMLVs, logo no início de meu doutorado, pelas mãos, que muito me ajudaram, pelas risadas e histórias compartilhadas e principalmente por pegar firme nos papers comigo. Muito obrigada Ana!!!*

*Ao **Márcio Hideki Matsubara** pelas intermináveis e proveitosas discussões científicas, pela infinita disponibilidade e principalmente por seu olhar sempre criterioso, muito útil para fazer correções e sugestões, muito bem-vindas, para que o trabalho fosse melhorado.*

*À **Marina Nogueira**, mais conhecida como Maraina (FCF-USP), pela ajuda no experimento de análise dos ácidos graxos e por sempre ser uma amiga presente, em todos os momentos, bons e ruins da minha vida. Me orgulho muito da pessoa e da pesquisadora*

que você se tornou. Obrigada por todos os almoços, gargalhadas e histórias!! Sem você essa vida acadêmica seria bem mais difícil!!! Amiga pra levar pra vida!!

À **Priscila Signor Motta**, Presci, por todas as risadas, conselhos e por trazer mais alegria ao nosso dia-a-dia no Laboratório. Obrigada por ser meu “tira-dúvidas” do inglês!!! rs.

Ao **Marlos Cortez Sampaio**, por ter me cedido minha primeira garrafinha de cultura e por ter me ensinado os primórdios da cultura de células. Muito obrigada!

Ao **Elbio Leiguez Junior**, por ter compartilhado comigo, ao longo de meu mestrado, o universo dos CLs e por ter me ensinado a maior parte das técnicas que sei fazer. Muito obrigada!

Aos amigos do Laboratório de Farmacologia **Natália Fernanda** e **Lucas** por toda a amizade, cafés da manhã e conversas, sempre muito agradáveis e cheias de bons conselhos. Muito obrigada amizades!!!!

À todos os **amigos e alunos do Laboratório de Farmacologia/IBU**. Obrigada pelo convívio e pela amizade.

Aos **pesquisadores e funcionários do laboratório de Farmacologia**, do Instituto Butantan, Norma, Cristina, Regina, Walquíria, Solange, Ana Leonor, Isaltino, Paulo, Fernando, Lanfranco, Benedito, Maria Cristina, Maria Aparecida (Binha), Elisa, Eleonora, Juliana, Otacília, Márcio, Ana, Andréia, Eliene, Antônio e Jorge pela boa convivência ao longo desses anos.

À **Eni**, secretária da pós-graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB/USP), pela disposição em resolver os meus problemas e pelo respeito com que sempre me tratou.

À **Pós-graduação em Imunologia** do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB/USP), pela oportunidade de realizar este trabalho.

Ao **Instituto Butantan**, minha segunda casa, que tão bem me acolheu ao longo desses quase 12 anos. Este é o lugar onde eu aprendi a amar e admirar a ciência e que me fez crescer tanto como pessoa quanto profissional. Muito obrigada pela possibilidade de realizar este trabalho.

*“The road to success is
always under construction”*

Lily Tomlin

RESUMO

GIANNOTTI, K. C. **Estudo dos efeitos de duas fosfolipases A₂ (MT-III e BthTx-II) isoladas do veneno de serpentes *Bothrops* em células de músculo liso vascular em cultura: formação de corpúsculos lipídicos e mecanismos envolvidos.** 2017. 141 f. Tese (Doutorado em: Imunologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

As fosfolipases A₂ secretadas (sFLA₂) de veneno de serpente apresentam homologia estrutural e funcional com sFLA₂s de mamíferos, cujos níveis estão elevados em doenças como a aterosclerose. Nesta doença, as células de músculo liso vascular (CMLVs) acumulam lipídeos sob a forma de corpúsculos lipídicos (CLs) e se diferenciam em células espumosas. Porém, o papel das sFLA₂s neste fenômeno não é conhecido. O presente estudo teve por objetivo avaliar os efeitos das fosfolipases A₂ MT-III, cataliticamente ativa e da BthTx-II, destituída de atividade catalítica, em CMLVs, com ênfase na formação de CLs e a participação de fatores relacionados a homeostasia lipídica. Os resultados obtidos demonstraram que tanto a MT-III, quanto a BthTx-II, induziram a formação de CLs em CMLVs de fenótipo sintético, mas não contrátil. Ainda, a BthTx-II, mas não a MT-III, induziu o aumento do teor protéico da PLIN2. Por outro lado, nenhuma das FLA₂s induziu alteração do teor protéico de PLIN3. Ambas as PLINs foram recrutadas para os CLs em células incubadas com as FLA₂s ofídicas. Ainda, a MT-III e a BthTx-II induziram o aumento da expressão protéica dos receptores *scavengers* SR-A1 e LOX-1. Entretanto, apenas a BthTx-II induziu aumento do receptor CD36. Entretanto, estes receptores não participam da formação de CLs induzida pelas sFLA₂s. Ainda, as FLA₂s aumentaram a expressão e a ativação dos receptores PPAR-γ e PPAR β/δ. O bloqueio destes e das enzimas de síntese de lipídios ACAT (acil-CoA:colesterol aciltransferase) e DGAT (diacil-glicerol aciltransferase) aboliu a formação de CLs em CMLVs incubadas com as FLA₂s. A BthTx-II e a MT-III induziram aumento do teor protéico da COX-2, mas não da COX-1. Estes sistemas enzimáticos colocalizaram com os CLs. Entretanto, os produtos destas vias não participam da formação de CLs induzida pelas FLA₂s. O mesmo resultado foi obtido quando as células foram tratadas com o inibidor da cFLA₂. Entretanto, o pré-tratamento das CMLVs com o inibidor da iFLA₂ em CMLVs incubadas com a BthTx-II reduziu a formação dessas inclusões. Da mesma forma, a inibição da proteína PI3K, envolvida no processo de macropinocitose, reduziu a formação de CLs em CMLVs incubadas com ambas FLA₂s. Em adição, a MT-III e a BthTx-II induziram a liberação das citocinas IL-6, MCP-1 e fractalcina e dos eicosanóides PGE₂, PGI₂ e TXA₂ e a co-localização da PGE₂ com os CLs. Finalmente, CMLVs incubadas com a MT-III exibiram aumento da atividade fagocítica e a expressão gênica de marcadores de macrófagos (CD68 e MAC2). Em conclusão, as sFLA₂s MT-III e BthTx-II, induzem a formação de CMLVs espumosas. Para tanto, estas FLA₂s recrutam diferentes fatores envolvidos na síntese e acúmulo de lipídios. Nessa condição, os CLs constituem um local de síntese de prostaglandinas. Em adição, a atividade catalítica não é relevante para a formação de CLs induzida por FLA₂s ofídicas. Ainda, a MT-III induziu a diferenciação de CMLVs para um fenótipo de macrófago, com capacidade fagocítica.

Palavras-chave: Fosfolipase A₂. Corpúsculo lipídico. Célula de músculo liso vascular.

ABSTRACT

GIANNOTTI, K. C. **Study on the effects of two phospholipases A₂ (MT-III and BthTx-II) isolated from Bothrops snake venoms in vascular smooth muscle cells: lipid droplets formation and mechanisms involved.** 2017. 141 p. Ph. D. thesis (Immunology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

Bothrops snake venom GIIA secreted phospholipases A₂ (sPLA₂s) share structural and functional features with mammalian GIIA sPLA₂s, which are highly expressed during inflammatory diseases, such as atherosclerosis. In this disease, vascular smooth muscle cells (VSMCs) are loaded with lipids in form of lipid droplets (LDs) and differentiate into foam cells. However, the role of these enzymes in this process is still unknown. The aim of this study was to evaluate the effects of the snake venom PLA₂ MT-III, with catalytic activity and BthTx-II, devoid of enzymatic activity, in VSMCs, with focus on LDs formation and mechanisms involved in this effect. Results here obtained demonstrate that both MT-III and BthTx-II were able to induce LDs formation in VSMCs in synthetic, but not contractile phenotype. Moreover, BthTx-II, but not MT-III, increased PLIN2 protein expression. In contrast, these PLA₂s did not modify PLIN3 protein content. Both perilipins were recruited to LDs in cells stimulated either with MT-III or BthTx-II. In addition, BthTx-II, but not MT-III, induced CD36 protein expression. Both PLA₂s up-regulated SR-A1 and LOX-1 protein expression. However, these receptors were not involved in LDs formation induced by these venom PLA₂s. Both MT-III and BthTx-II up-regulated and activated PPAR-γ e PPAR β/δ transcription factors. Moreover, blockage of these receptors as well as the enzymes DGAT (acyl CoA:diacylglycerol acyltransferase) and ACAT (acyl-coenzyme A (CoA):cholesterol acyltransferase) abolished LD formation in VSMCs incubated with either MT-III or BthTx-II. Both PLA₂s increased COX-2, but not COX-1 protein expression. Both COX-1 and COX-2 colocalized to LDs. However, the products from these two pathways are not involved in LDs formation. Same result was obtained when cells were incubated with an inhibitor of cPLA₂. However, pre-treatment of cells with iPLA₂ inhibitor reduced LDs formation induced by BthTx-II, but not MT-III. Inhibition of PI3K, a signaling protein relevant for macropinocytosis, also reduced LDs formation in VSMCs incubated with both PLA₂s. These PLA₂s induced release of IL-6, MCP-1, fractalkine, PGE₂, PGI₂ and TXA₂. PGE₂ was shown colocalized to LDs upon stimulation by both PLA₂s. Finally, MT-III induced phagocytic activity and gene expression of CD68 and MAC-2 molecules, both recognized as macrophages markers. In conclusion, data here obtained indicate that MT-III and BthTx-II are able to induce formation of foam VSMCs and recruitment of distinct factors involved in synthesis and storage of lipids in these cells. In this condition, LDs constitute sites for synthesis of prostaglandins. Moreover, our findings show the ability of MT-III to modulate VSMCs functions, leading them to a phenotypic switch to macrophage-like cells. The catalytic activity is not relevant to ophidic sPLA₂-induced LDs formation.

Keywords: Phospholipase A₂. Lipid droplets. Vascular smooth muscle cell.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática de um CL modificado.....	31
Figura 2 - Mudança de fenótipo em CMLVs.....	32
Figura 3 - Características da formação e as consequências da formação de CMLVs espumosas durante o processo aterogênico.....	35
Figura 4 - Marcação da proteína α -actina, do fator Von Willebrand e da proteína CD90 em células obtidas da artéria aorta de ratos.....	51
Figura 5 - Caracterização das células de músculo liso vascular de cultura primária da artéria aorta de ratos.....	52
Figura 6 - Efeito da MT-III e da BthTx-II na atividade metabólica de CMLVs.....	53
Figura 7 - Formação de CLs pela ação de diferentes concentrações de MT-III (A) e BthTx-II (B) em CMLVs.....	54
Figura 8 - Decurso temporal da formação de CLs induzida pela MT-III (A) e BthTx-II (B) em CMLVs.....	55
Figura 9 - Fotomicrografias de CMLVs em cultura, evidenciando a formação de CLs induzida pela MT-III e pela BthTx-II.....	56
Figura 10 - Imagem ultraestrutural de CMLV incubado com meio de cultura DMEM (A) ou com a MT-III (0,4 μ M) (B e C) ou BthTx-II (D e E).....	58
Figura 11 - Efeito da MT-III e da BthTx-II no número de CLs em CMLVs em fenótipo contrátil.....	59
Figura 12 - Expressão protéica da proteína PLIN2 em CMLVs estimuladas pela MT-III e BthTx-II.....	60
Figura 13 - Efeito da MT-III e da BthTx-II na localização da proteína PLIN2 em CMLVs.	62
Figura 14 - Expressão protéica da proteína PLIN3 em CMLVs estimuladas pelas MT-III e BthTx-II.....	64
Figura 15 - Efeito da MT-III e da BthTx-II na localização da proteína PLIN3 em CMLVs.....	66
Figura 16 - Efeito das MT-III e da BthTx-II na expressão protéica do receptor scavenger CD36 em CMLVs.....	68
Figura 17 - Efeito das MT-III e da BthTx-II na expressão protéica dos receptores scavengers SR-A1 e LOX-1 em CMLVs.....	69

Figura 18 - Efeito dos compostos SS0, fucoidina, dextrana e carragenina formação de CLs induzida pela MT-III e BthTx-II em CMLVs.....	71
Figura 19 - Efeito da MT-III e da BthTx-II na expressão protéica dos PPAR- γ e β/δ em CMLVs.....	73
Figura 20 (A) - Efeito da MT-III e da BthTx-II na ativação do PPAR- γ em CMLVs..	75
Figura 20 (B) - Efeito da MT-III e da BthTx-II na ativação do PPAR- β/δ em CMLVs	76
Figura 21 - Efeito dos compostos GW9662 e GSK0660 na formação de CLs induzida pela MT-III e BthTx-II em CMLVs.....	78
Figura 22 - Efeito dos compostos A922500 e TMP-153 na formação de CLs induzida pela MT-III e BthTx-II em CMLVs.....	80
Figura 23 - Liberação de ácidos graxos por CMLVs estimuladas com a MT-III e com a BthTx-II. As CMLVs foram incubadas com DMEM (controle) ou MT-III (0,4 μ M), ou com a BthTx-II (0,8 μ M) por 3 h ou 12 h.....	82
Figura 24 - Efeito dos compostos Pyr-2 α e Bel na formação de CLs induzida pela MT-III e BthTx-II em CMLVs.....	84
Figura 25 - Efeito do composto KH064 na formação de CLs induzida pela MT-III e BthTx-II em CMLVs.....	86
Figura 26 - Efeito do composto dinasore na formação de CLs induzida pela MT-III e BthTx-II em CMLVs.....	88
Figura 27 - Efeito dos compostos Wortmanina e LY294002 na formação de CLs induzida pela MT-III e BthTx-II em CMLVs.....	90
Figura 28 - Efeito das MT-III e da BthTx-II na expressão protéica das proteínas de efluxo ABCA1 e ABCG1 em CMLVs.....	92
Figura 29 - Decurso temporal do efeito da MT-III e da BthTx-II na liberação de IL-1 β , IL-6, TNF- α , MCP-1 e fractalcina por CMLVs.....	94
Figura 30 - Efeito da MT-III e da BthTx-II na expressão protéica das COX-1 e -2 em CMLVs.....	96
Figura 31 - Efeito da MT-III e da BthTx-II na distribuição e localização do sistema ciclooxygenase 1 em CMLVs.....	98
Figura 32 - Efeito da MT-III e da BthTx-II na distribuição e localização de enzimas do sistema ciclooxygenase 2 em CMLVs.....	99
Figura 33 - Liberação de PGE2, PGI2 e TXA2 induzida pela MT-III e pela BthTx-II em CMLVs.....	101

Figura 34 - Efeito da MT-III e da BthTx-II na distribuição e localização da PGE ₂ em CMLVs.....	103
Figura 35 - Efeito dos compostos Valeril Salicilato e NS-398 na formação de CLs induzida pela MT-III e BthTx-II em CMLVs.....	105
Figura 36 - A MT-III induz a atividade fagocítica em CMLVs.....	106
Figura 37 - Efeito da MT-III na expressão de genes relacionados a macrófagos em CMLVs em CMLVs.....	107
Figura 38 - Esquema representativo dos efeitos da MT-III e da BthTx-II, em células de músculo liso vascular, para a formação de corpúsculos lipídicos e mecanismos envolvidos.....	121

LISTA DAS PRINCIPAIS ABREVIATURAS

AA – Ácido araquidônico

ABCA1 - Transportador de ligação de ATP A1

ACAT- Acil-CoA:colesterol aciltransferase

COX – Ciclooxigenase

CL- Corpúsculo lipídico

DAG – Diacilglicerol

DGAT- Acil-CoA:diacilglicerol aciltransferase

PLIN - Perilipina (1, 2, 3, 4, 5 e 6)

E.P.M. - Erro padrão da média

FLA2 - Fosfolipase A2

PGE2 – Prostaglandina E2

PGI2 – Prostaciclina

IL - Interleucina

IFN- γ - Interferon-gama

LOX-1 - Receptor lectina-*like* para a LDL oxidada

MAPK - Proteína quinase ativada por mitógenos

MCP-1 - Monocyte chemotactic protein-1 ou (Chemokine motif ligant 2 CCL2)

PKC - Proteína quinase C

PI3K - Fosfatidilinositol 3-quinase

REG- Retículo endoplasmático granular

SR-A1 – Receptor *scavenger* do tipo A1

TAG - Triacilglicerol

TNF- α - Fator de necrose tumoral-alfa

TXA2 - Tromboxano A2

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	23
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	24
2.1 Fosfolipases A ₂	24
2.2 Considerações gerais sobre os Corpúsculos Lipídicos.....	28
2.3 Célula de músculo liso vascular (CMLV).....	31
3 OBJETIVOS.....	38
3.1 Gerais.....	38
3.2 Específicos.....	38
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	40
4.1. Animais.....	40
4.2 Obtenção das CMLVs de aorta de ratos.....	40
4.2.1 <i>Cultivo das CMLVs.....</i>	<i>40</i>
4.2.2 <i>Subcultivo das CMLVs.....</i>	<i>41</i>
4.2.3 <i>Fosfolipase A2.....</i>	<i>41</i>
4.3 Ensaio da redução do brometo de 3, 4,5-dimetiltiazol – 2il 2,5- difeniltetrazol (MTT).....	42
4.4 Quantificação e caracterização dos corpúsculos lipídicos.....	42
4.4.1 <i>Marcação com tetróxido de ósmio (OsO₄).....</i>	<i>42</i>
4.4.2 <i>Microscopia eletrônica de transmissão.....</i>	<i>43</i>
4.5 Imunomarcação das proteínas PLIN2 e 3.....	43
4.6 Intervenções Farmacológicas ou Imunológicas.....	44

4.7 Análises por Western blotting.....	45
4.8 Determinação da concentração de PGE ₂ , PGI ₂ e TXA ₂	46
4.9 Determinação da localização da COX-1, COX-2 e da PGE ₂ e de lipídios neutros por imunocitoquímica.....	46
4.10 Quantificação da fagocitose.....	47
4.11 Determinação da expressão gênica de marcadores de macrófagos e CMLVs. Ensaio de qPCR.....	47
4.12 Análise de ácidos graxos.....	48
4.13 Análise estatística.....	49
5 RESULTADOS.....	50
5.1 Expressão de α -actina em células de músculo liso vascular em cultura.....	50
5.2 Efeito das toxinas MT-III e BthTx-II na viabilidade de células de músculo liso vascular.....	53
5.3 Formação de CLs induzida pela MT-III e BthTx-II em CMLVs isoladas.....	54
5.4 Decurso temporal da formação de CLs induzida pelas MT-III e BthTx-II em CMLVs.....	55
5.5 Análise ultraestrutural das CMLVs estimuladas pela MT-III e BthTx-II.....	57
5.6 Importância do fenótipo para a formação de CLs em CMLVs incubadas com a MT-III e BthTx-II	59
5.7 Efeito da MT-III e da BthTx-II na expressão protéica da PLIN2 em CMLVs.....	60
5.8 Efeito da MT-III e da BthTx-II na distribuição intracelular da PLIN2 em CMLVs.....	61
5.9 Efeito da MT-III e da BthTx-II na expressão protéica da PLIN3 em CMLVs.....	63
5.10 Efeito da MT-III e da BthTx-II na distribuição intracelular da PLIN3 em CMLVs.....	65

5.11 Efeito da MT-III e da BthTx-II na expressão protéica dos receptores CD36, SR-A1 e LOX-1 em CMLVs.....	67
5.12 Efeito dos compostos SSO, fucoidina, dextran sulfato de sódio e carragenina na formação de CLs induzida pela MT-III e BthTx-II em CMLVs.....	70
5.13 Efeito da MT-III e da BthTx-II na expressão protéica dos receptores PPAR- γ e β/δ em CMLVs.....	72
5.14 Ativação dos PPAR- γ e β/δ em CMLVs incubadas com a MT-III e BthTx-II.....	74
5.15 Efeito dos compostos GW9662 e GSK0660 na formação de CLs induzida pela MT-III e BthTx-II em CMLVs.....	77
5.16 Efeito dos compostos A922500 e TMP-153 na formação de CLs induzida pela MT-III e BthTx-II em CMLVs.....	79
5.17 Efeito das FLA2s MT-III e BthTx-II na liberação de ácidos graxos em CMLVs.....	81
5.18 Efeito dos compostos Bel e Pyr-2ana formação de CLs induzida pela MT-III e BthTx-II em CMLVs.....	83
5.19 Efeito do composto KH064 na formação de CLs induzida pela MT-III e BthTx-II em CMLVs.....	85
5.20 Efeito do dinasore na formação de CLs induzida pela MT-III e BthTx-II em CMLVs.....	87
5.21 Efeito dos compostos wortmanina e LY294002 na formação de CLs induzida pela MT-III e BthTx-II em CMLVs.....	89
5.22 Efeito da MT-III e da BthTx-II na expressão protéica das proteínas de efluxo ABCA1 e ABCG1 em CMLVs.....	91
5.23 Efeito da MT-III na produção de citocinas por CMLVs.....	93
5.24 Efeito da MT-III e da BthTx-II na expressão protéica da COX-1 e da COX-2 em CMLVs.....	95
5.25 Distribuição da COX-1 e -2 em CMLVs estimuladas pela MT-III e BthTx-II.....	97
5.26 Efeito da MT-III e da BthTx-II na produção da PGE ₂ , PGI ₂ e TXA ₂ por CMLVs.....	100

5.27 Distribuição da PGE2 em CMLVs estimuladas pela MT-III e BthTx-II.....	102
5.28 Efeito dos compostos Valeril salicilato e NS-398 na formação de CLs induzida pela MT-III e BthTx-II em CMLVs.....	104
5.29 Efeito da MT-III na atividade fagocítica de CMLVs.....	106
5.30 Efeito da MT-III na abundância de mRNA relacionado à CMLVs e macrófagos.....	107
6 DISCUSSÃO.....	108
7 CONCLUSÕES.....	122
REFERÊNCIAS.....	123
ANEXO A -	141

1 INTRODUÇÃO

As fosfolipases A_2 secretadas (sFLA₂s) são enzimas abundantes na natureza, sendo encontradas tanto em fluidos e tecidos de mamíferos, quanto em venenos de serpentes, abelhas e vespas (MURAKAMI; KUDO, 2003). Os venenos de serpentes do gênero *Bothrops* contêm concentrações elevadas de sFLA₂s, que apresentam homologia estrutural e funcional com as sFLA₂s de mamíferos, encontradas em fluidos inflamatórios. A MT-III, uma sFLA₂ isolada do veneno da serpente *Bothrops asper*, induz a liberação de mediadores inflamatórios e ativa funções de macrófagos. Dentre estas funções, esta sFLA₂ induz, nestas células, aumento da formação de corpúsculos lipídicos e da expressão protéica da perilipina 2 (PLIN2), uma proteína relevante para a formação de corpúsculos lipídicos e o influxo de lipídeos. Os corpúsculos lipídicos são organelas encontradas em células denominadas espumosas e estão relacionados, principalmente, a processos inflamatórios e à síntese de mediadores lipídicos, por conterem, em seu interior, enzimas dos sistemas ciclooxigenase (COX) e 5-lipoxigenase (5-LO). Ainda, estas organelas possuem proteínas quinases em seu interior e estão envolvidas na sinalização celular de diversos processos celulares (BOZZA et al., 1996; 1997).

Classicamente, o principal tipo celular envolvido na formação de células espumosas são os macrófagos, entretanto, as células de músculo liso vascular (CMLVs) também apresentam uma elevada capacidade de acumular lipídios e de transformarem-se em células espumosas, que sintetizam níveis elevados de fatores amplificadores da aterosclerose, incluindo citocinas e quimiocinas. Ainda, durante esta doença, as CMLVs expressam níveis elevados de FLA₂s do grupo IIA (HURT-CAMEJO, 1997). Contudo, as ações deste grupo de enzimas, nestas células, não são conhecidas e o seu papel no desenvolvimento da aterosclerose não foi esclarecido. Tomando essas informações em conjunto e considerando a homologia funcional e estrutural da MT-III com as sFLA₂s do GIIA inflamatórias, estudos voltados para a capacidade da MT-III induzir a formação de CLs e os efeitos desta sFLA₂ em fatores relacionados à captação, síntese e efluxo de lipídios, em CMLVs, revestem-se de importância. Neste contexto, o detalhamento dos mecanismos de ação da MT-III poderá favorecer a compreensão das ações da família de sFLA₂s em processos intracelulares, que regulam a funcionalidade das CMLVs, elementos importantes para a formação da placa ateromatosa e progressão da aterosclerose.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Fosfolipases A₂

As FLA₂s constituem uma ampla família de enzimas, com inúmeras funções biológicas, que compreendem desde a síntese e o reparo de membranas, até a geração de segundos mensageiros, envolvidos em processos biológicos e transdução de sinais (BROWN et al., 2003, GUIJAS et al., 2014; VALENTIN; LAMBEAU, 2000). Estas enzimas estão presentes no reino vegetal e animal e são encontradas em altas concentrações nos venenos de serpentes, abelhas e vespas (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 oléico e lisofosfolipídios, 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 enzimas citosólicas (cFLA₂), independentes de Ca⁺² (iFLA₂), acetil-hidrolases do fator ativador de plaquetas (PAF-AH) e as fosfolipases lisossomais (SCHALOSKE; DENNIS, 2006). Em adição, foi demonstrada a existência de uma interação funcional entre as FLA₂s secretadas e as FLA₂s intracelulares (cFLA₂ e iFLA₂), através de mecanismos de *feedback* positivo, para a produção de mediadores inflamatórios e na resposta celular a diversos agentes inflamatórios como citocinas e eicosanóides (ANTHONSEN et al., 2001; BALSINDE et al., 1998; CHAKRABORTI, 2003; MOREIRA et al., 2008). Da mesma forma, a interação funcional entre as sFLA₂s secretadas também foi relatada em condições inflamatórias, sendo que as sFLA₂s do grupo IB, induziram a expressão e secreção das FLA₂s do GIIA (KITSIOULI et al., 2009).

A família das fosfolipases A₂ citosólicas é constituída por seis isoformas, com pesos moleculares que variam entre 60 a 85 kDa, sendo encontradas no citoplasma das células. Estas enzimas são ativadas na presença de concentrações milimolares de cálcio e possuem preferência por grupamentos de colina, da porção *sn*-2 de

fosfolipídios de membrana e pelo ácido araquidônico. Desta forma, estas enzimas possuem papel essencial na cascata de sinalização de prostanoídes (DENNIS et al., 2011).

O grupo VIA de fosfolipases A_2 independentes de cálcio é o mais amplamente descrito dentre as iFLA₂s e, diferentemente das cFLA₂s, essas enzimas não requerem cálcio para exercerem sua função e não possuem especificidade para substratos. Ainda, as iFLA₂s possuem maior peso molecular (55-146 kDa) e atividades de lisofosfolipase, transacilase e tioesterase (JENKINS et al., 2006; LIO; DENNIS, 1998). Atualmente, estão descritas seis isoformas de iFLA₂s (A-F), que são encontradas tanto no citosol, quanto em membranas celulares, retículo endoplasmático e membrana mitocondrial, sendo relacionadas, principalmente, ao remodelamento lipídico (BAULANDE et al., 2001).

Recentemente, as FLA₂s foram classificadas em 15 grupos, denominados de I a XV, com diversos subgrupos, de acordo com vários critérios físico-químicos (BROWN et al., 2003; DAVIDSON; DENNIS, 1990; HEINRIKSON et al., 1977; RIZZO et al., 2000; SCHALOSKE; DENNIS, 2006; SIX; DENNIS, 2000). Nesta classificação, as fosfolipases A_2 , de interesse no presente estudo, estão inseridas no grupo II, subgrupo IIA. Este subgrupo compreende as fosfolipases A_2 secretadas (sFLA₂s) encontradas em venenos de serpentes da família Viperidae (subfamílias Viperinae e Crotalinae) e no fluido sinovial e exsudato inflamatório humanos, bem como em plaquetas e mastócitos de mamíferos (MURAKAMI et al., 1995; TAKAYAMA et al., 1991). 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). A literatura mostra que as sFLA₂s dos grupos II, V e X participam de inúmeros processos inflamatórios. Dentre eles, destaca-se a atividade proaterogênica na parede dos vasos (GUIJAS et al., 2014; JAULMES et al., 2006; KIMURA-MATSUMOTO et al., 2008; MURAKAMI; KUDO, 2003; PRUZANSKI et al., 2015; ROSENGREN et al., 2006). Estas atividades são atribuídas à capacidade destas enzimas gerarem mediadores lipídicos pró-inflamatórios, como os eicosanóides e hidrolisarem lipoproteínas de baixa densidade (LDL), convertendo-as em partículas proaterogênicas.

A **aterosclerose** é uma doença de natureza inflamatória, responsável por um número crescente de mortes, ao redor do mundo e acarreta problemas socioeconômicos graves. Esta doença é caracterizada pela disfunção do endotélio, de células musculares lisas vasculares e de elementos circulantes do sangue, com a produção de agentes inflamatórios e aumento do conteúdo lipídico no citoplasma de macrófagos e de células musculares lisas dos vasos sanguíneos (GALKINA; LEY, 2009; LIBBY et al., 2010). O aumento do número de inclusões lipídicas (corpúsculos lipídicos), em tais células, resulta na diferenciação das mesmas em células espumosas, que são características do processo aterosclerótico (CHOUDHURY et al., 2005; MA et al., 2011; RONG et al., 2003). 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). Apesar das fosfolipases A₂ (FLA_{2s}) do GIIA serem encontradas em níveis aumentados durante o processo aterosclerótico e exercerem múltiplas atividades proaterogênicas na parede dos vasos (GUIJAS et al., 2014; KIMURA-MATSUMOTO et al., 2008; MURAKAMI e KUDO, 2003; PRUZANSKI et al., 2015; ROSENGREN et al., 2006), o seu papel na síntese e no acúmulo de lipídios, em células musculares lisas vasculares (CMLVs), ainda não foi esclarecido e demanda estudos a respeito.

As FLA_{2s} do grupo IIA são expressas de modo constitutivo em artérias normais, porém, durante a aterosclerose, estas enzimas são encontradas em concentrações elevadas no tecido vascular e no plasma. Alguns dos efeitos destas proteínas, na função celular, são dependentes da liberação de derivados do ácido araquidônico (AA) e de lisofosfolipídeos (RIZZO et al., 2000); outros estão associados à ligação das mesmas a receptores específicos de membranas celulares, descritos como do tipo M (muscular) e N (neuronal). As isoformas de sFLA_{2s}, predominantes em células musculares lisas, pertencem ao grupo IIA (HURT-CAMEJO, 1997) e sua síntese é estimulada por citocinas inflamatórias, como as interleucinas-1 e -6 (IL-1 e IL-6) e o fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α). Jaulmes et al. (2005; 2006) demonstraram que estas sFLA_{2s} induzem aumento de sua própria expressão em CMLVs, tendo sido descrito que estas enzimas desempenham funções parácrinas e autócrinas nestas células, de modo independente de sua atividade catalítica, associadas à interação com o receptor do tipo M e/ou proteoglicanos.

Os venenos de serpentes do gênero *Bothrops* contêm concentrações elevadas de sFLA₂s, que apresentam homologia estrutural e funcional com as sFLA₂s do grupo IIA de mamíferos, encontradas em fluidos inflamatórios (DAVIDSON; DENNIS, 1990; SCOTT et al., 1990). Desse modo, as sFLA₂s, isoladas de venenos de serpentes, constituem ferramentas úteis para o estudo das ações de sFLA₂s do grupo IIA de mamíferos. Além disso, os venenos ofídicos apresentam concentrações variáveis de proteínas homólogas de FLA₂s, destituídas de atividade catalítica, porém com atividades biológicas potentes.

A partir do veneno da serpente *Bothrops asper*, da América Central, foi isolada uma miotoxina com estrutura de fosfolipase A₂, enzimaticamente ativa, denominada de MT-III (GUTIÉRREZ; LOMONTE, 1995; 1997). A MT-III, uma sFLA₂ Asp49, além da ação miotóxica, induz efeito inflamatório marcante, caracterizado por edema e infiltrado leucocitário (CHAVES et al., 1998; GUTIERREZ et al., 1986; LOMONTE; GUTIERREZ, 1989; LOMONTE et al., 1993; ZULIANI et al., 2005a), liberação de eicosanóides (leucotrieno B₄, tromboxano A₂, prostaglandina E₂ e D₂), aumento da expressão protéica da ciclooxigenase-2 e liberação de citocinas de perfil Th1 (TNF- α , IL-1 e IL-6), no foco inflamatório, em diferentes modelos experimentais *in vivo* (MOREIRA et al., 2008; ZULIANI et al., 2005a). Em modelos experimentais *in vitro*, esta miotoxina ativa funções dos macrófagos, tais como a produção de agentes microbicidas e a fagocitose (ZULIANI et al., 2005b). Além disso, a estimulação destas células pela MT-III, causou a liberação de AA, substrato para a síntese de mediadores lipídicos (MOREIRA et al., 2008). Leiguez et al. (2011) demonstraram, ainda, que a MT-III induz o aumento na formação de corpúsculos lipídicos, em macrófagos peritoneais isolados, dependente da ativação de proteínas sinalizadoras, como a PKC, PI3K e p38MAPK e do receptor TLR2. Além disso, a MT-III induziu o aumento da expressão da perilipina 2 (PLIN2) (LEIGUEZ, 2011; LEIGUEZ et al., 2014), uma proteína envolvida na captação de ácidos graxos de cadeia longa e na formação dessas inclusões, bem como na liberação de ácido palmítico e oléico a partir dessas células (LEIGUEZ et al., 2014). Estes dados sugerem que as fosfolipases A₂ sejam fatores determinantes no desequilíbrio lipídico em macrófagos. Contudo, as ações da MT-III em outros tipos celulares, capazes de acumular lipídeos, como as CMLVs, e os fatores envolvidos nesse fenômeno, necessitam ser investigados, justificando estudos a este respeito.

A partir do veneno da serpente *Bothrops jararacussu*, foi isolada uma sFLA₂ Asp49 miotóxica, denominada BthTx-II. Curiosamente, embora conserve os resíduos catalíticos responsáveis pela coordenação e ligação ao Ca²⁺, esta sFLA₂ Asp49 é destituída de atividade catalítica (SANTOS et al., 2011). Diferentemente de outras fosfolipases A₂ Asp49 clássicas, o sítio de ligação ao cálcio, da BthTx-II, é distorcido. Além disso, esta sFLA₂ possui uma grande quantidade de cargas positivas na região C terminal. Este padrão de cargas positivas é bastante comum em homólogos de FLA₂ Lys49, destituídos de atividade catalítica, porém, com atividades biológicas. Acredita-se que esta característica contribua para o mecanismo de miotoxicidade destes homólogos (BABU, GOWDA, 1994; FALCONI et al., 2000; MURAKAMI et al., 2001). Ainda, no caso da BthTx-II, foi demonstrado que a região entre os resíduos Tir112 e Pro121, da molécula, é a responsável por seu efeito miotóxico (FRANCIS et al., 1991; PEREIRA et al., 1998). A BthTx-II, além de miotóxica, apresenta efeito inflamatório e ativa a hemólise e a agregação plaquetária (BONFIM et al., 2009; FULY et al., 2004; HOMSI-BRANDEBURGO et al., 1988).

A partir de estudos que demonstraram que as sFLA₂ do grupo IIA são as principais isoformas de FLA₂s secretadas por células de músculo liso vascular e sabendo que estas enzimas podem ter atividades paracrinas e autócrinas, independentes, ou não, de sua atividade catalítica, justifica-se avaliar a ação da MT-III e da FLA₂ BthTx-II, destituída de atividade catalítica, quanto à formação de corpúsculos lipídicos (CLs) em CMLVs. Este estudo poderá elucidar também a contribuição da atividade catalítica de sFLA₂s para a formação de CMLVs espumosas.

2.2 Considerações gerais sobre os Corpúsculos Lipídicos

Os corpúsculos lipídicos são inclusões citoplasmáticas, não ligadas à membrana, ricas em proteolipídios, relativamente heterogêneas quanto ao tamanho e à composição, cuja formação é rapidamente induzida em processos inflamatórios. Essas inclusões estão envolvidas na regulação do homeostasia lipídica, sinalização celular, distribuição de proteínas e regulação da transcrição gênica (ARRESE et al., 2014; POL et al., 2014; TAN et al., 2014; WELTE, 2015). O corpúsculo lipídico é considerado uma das maiores estruturas celulares, sendo constituído por agregados

macromoleculares. Esta organela é envolta por uma monocamada de fosfolípidos anfipáticos, glicolípídios e/ou esteróis, que circunda um núcleo hidrofóbico, constituído de lípidios neutros, sendo os principais o triacilglicerol (TAG), diacilglicerol (DAG) e ésteres de colesterol (Fig.1) (CHABAN; CANDELIA, 2014).

Além de ácidos graxos esterificados, como o AA, os CLs compartimentalizam um grupo diversificado de proteínas. Dentre estas, estão as proteínas da família perilipina (PLIN), amplamente estudadas e presentes na superfície dos CLs. As proteínas da família PLIN atuam na captação de ácidos graxos e estão envolvidas na formação de células espumosas (GAO; SERRERO, 1999; LONDOS et al., 2005). Dentre as proteínas da família PLIN, a PLIN2 é a principal proteína estrutural associada aos corpúsculos lipídicos. Esta proteína é constitutiva e está localizada na membrana plasmática, tendo sido demonstrado que a PLIN2 interage com os CLs a partir de seus domínios N- e C-terminais (KOHR et al., 2014). Ainda, da mesma forma que a PLIN2, a PLIN3 está presente em diversos tipos celulares. Entretanto, diferentemente da PLIN2, a PLIN3 encontra-se no citoplasma das células, onde interage com outras organelas intracelulares e proteínas e, sob estímulo por ácidos graxos, liga-se, rapidamente, aos CLs e facilita a incorporação de lípidios nestas inclusões (WOLINS et al., 2001). Em mamíferos, os CLs estão presentes, de modo constitutivo, em muitos tipos celulares, como leucócitos, fibroblastos e CMLVs (BRASAEMLE et al., 1997; DVORAK et al., 1983; GALLI et al., 1985; LARIGAUDERIE et al., 2004; ROBENEK et al., 2005), porém o número dessas inclusões torna-se aumentado, nestas células, durante processos inflamatórios.

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, derivadas do retículo endoplasmático (RE) e do complexo de Golgi (CG). Entretanto, é possível que os corpúsculos lipídicos também sejam formados na membrana plasmática, pois foi evidenciado um acúmulo de triacilglicerol na membrana plasmática de adipócitos e este ácido graxo pode ser precursor destas inclusões lipídicas (OST et al., 2005). Embora ocorram divergências entre autores, a literatura aponta as membranas do retículo endoplasmático como o sítio mais provável para a biogênese dos corpúsculos lipídicos. Este modelo pressupõe que os corpúsculos lipídicos se origine a partir de um núcleo convexo, formado de lípidios neutros, entre as membranas do retículo endoplasmático. Este agregado se expandiria, sendo finalmente liberado no

citoplasma, envolto por uma única membrana de fosfolípidios, oriunda do retículo endoplasmático (WOLLINS et al., 2006). No entanto, uma vez que não foram observados pontos de aparente continuidade entre as estruturas do retículo endoplasmático e os corpúsculos lipídicos, em monócitos humanos, este modelo não é universalmente aceito (ROBENEK et al., 2006)

A gênese de corpúsculos lipídicos é um fenômeno rápido e altamente regulado, na vigência de um estímulo. Diversos estudos demonstraram que a formação destas inclusões lipídicas envolve a ativação de segundos mensageiros, tais como as proteínas das famílias da proteína quinase C (PKC), fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K), p38MAPK e ERK 1/2 (BANDEIRA-MELO et al., 2001; BOZZA et al., 1996; BOZZA; BANDEIRA-MELO, 2005; LEIGUEZ et al., 2011; WELLER et al., 1991) além das fosfolipases A_2 intracelulares, como a $cFLA_2$ e a $iFLA_2$ (GUBERN et al., 2008; GUBERN et al., 2009; LEIGUEZ et al., 2011; MOREIRA et al., 2009). Desta forma, justifica-se avaliar o envolvimento de segundos mensageiros ativados pela MT-III e pela BthTx-II, quanto a formação de corpúsculos lipídicos, em CMLVs.

Além de segundos mensageiros, as $sFLA_2$ figuram como reguladores críticos da biogênese de CLs: (1) por sua ação provedora de ácidos graxos livres, a partir de fosfolípidios de membrana, para a síntese de lipídios neutros (AKIBA et al., 2003; GUBERN et al., 2009; LEIGUEZ *et al.*, 2011) e (2) como modificadoras de partículas contendo fosfolípidios, facilitando a sua captação e internalização pelas células (BOYANOVSKY et al., 2005; HANASAKI et al., 2002). A partir das considerações acima e em função da capacidade das fosfolipases A_2 liberarem ácidos graxos, matéria-prima para a formação de CLs e de induzirem a formação de CLs em macrófagos (LEIGUEZ et al., 2011), é plausível supor que estas enzimas estimulem a formação dos CLs em outros tipos celulares, como as CMLVs.

Figura 1 - Representação esquemática de um CL (modificada de Olofsson et al., 2008).

2.3 Célula de músculo liso vascular (CMLV)

As CMLVs são células altamente especializadas, que representam o principal componente da túnica média da parede dos vasos. Sua principal função fisiológica é manter o tônus vascular, a partir da contração e relaxamento, em resposta a uma variedade de estímulos metabólicos e hormonais, bem como a integridade dos vasos, por sua capacidade de proliferação e síntese de matriz extracelular (OWENS, 1995; OWENS et al., 2004).

As CMLVs têm origem complexa, pois derivam de diferentes precursores, durante o desenvolvimento do embrião. As CMLVs de artérias coronárias, por exemplo, são derivadas do revestimento do epicárdio, de origem mesodérmica. Em contraste, as células de músculo liso do arco aórtico têm como origem provável, o neuroectoderma, enquanto as células da aorta descendente se originam, predominantemente, do mesenquima local (GITTENBERGER-DE GROOT et al., 1999). Durante o desenvolvimento, as CMLVs apresentam taxas elevadas de proliferação (COOK et al., 1994) e de síntese de componentes de matriz extracelular, incluindo colágeno, elastina, proteoglicanos, caderinas e integrinas. Uma vez diferenciada em célula contrátil, a CMLV prolifera a uma velocidade extremamente baixa, exibe baixa atividade sintética e expressa um repertório exclusivo de proteínas contráteis, canais iônicos e moléculas de sinalização, envolvidos na função contrátil (OWENS, 1995). Em seu fenótipo contrátil as CMLVs, apresentam forma alongada e fusiforme, com feixes de filamentos abundantes no citoplasma e pequeno número de organelas, como o RE, o CG e ribossomos. Em condições fisiopatológicas, as CMLVs podem sofrer alterações profundas e

reversíveis do fenótipo, com redução da expressão de proteínas contráteis, aumento da taxa de proliferação e de síntese de matriz extracelular, proteases, citocinas e quimiocinas, que caracterizam o fenótipo denominado sintético (CAMPBELL; CAMPBELL 1994; HOOFNAGLE et al., 2006; OWENS et al., 2004; WORTH et al., 2001). Estas mudanças ocorrem, principalmente, em resposta a lesões vasculares ou em doenças de natureza inflamatória, dentre as quais a aterosclerose (CHAABANE et al., 2014; OWENS, 1995,). As CMLVs em estado sintético, apresentam uma forma menos alongada e morfologia cubóide, referida como epitelióide ou rombóide (HAO et al., 2003). Do ponto de vista ultraestrutural, neste fenótipo, as CMLVs apresentam um número elevado de organelas, compatível com o aumento das taxas de proliferação, migração e de síntese de componentes da matriz extracelular. Além disso, observa-se queda da expressão de α -actina de músculo liso, miosina de cadeia pesada e de esmotelina, marcadores das CMLVs de fenótipo contrátil (Figura 2).

Figura 2 - Mudança de fenótipo em CMLVs. As CMLVs maduras são capazes de alternar seu fenótipo entre um estado dito diferenciado/contrátil e um dediferenciado/sintético. A célula à direita representa uma CMLV de fenótipo contrátil, que tem como principal característica a abundância de fibras contráteis e pouca capacidade secretória. A célula à esquerda (fenótipo sintético) possui, como principal característica, a capacidade de responder a injúrias vasculares através de proliferação, migração e remodelamento da matriz extracelular para reparo da parede dos vasos (Milewicz et al., 2010).

No que se refere à formação de células espumosas, embora os macrófagos sejam classicamente reconhecidos como as principais células que originam as células espumosas, durante a aterosclerose (CHOUDHURY et al., 2005), as CMLVs também têm a capacidade de transformarem-se em células espumosas e exercem papel relevante nessa doença (ALLAVERDIAN et al., 2014; HERRING; SMITH

1996). À semelhança dos macrófagos, as CMLVs humanas, de ratos e de coelhos expressam uma variedade de receptores de captação de colesterol, incluindo os receptores de lipoproteína de baixa densidade (LDL) (MERICKSKAY et al., 2000) e de lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL) (LI et al., 1996), os receptores *scavengers* CD36 (MACK; OWENS, 1999) e do tipo I e II (MADSEN et al., 1998) e o receptor CXCL16/SR-PSOX (*scavenger receptor for phosphatidylserine and oxidized lipoprotein*) (ADAM et al., 2000). Neste sentido, foi demonstrado que citocinas aterogênicas, como a IL-1 β , o TNF- α e o fator estimulador de colônia de macrófago (MCSF), causam um aumento da expressão de receptores de LDL e VLDL, em CMLVs (ADAM et al., 2000; LI et al., 1996; MERICKSKAY et al., 2000). O aumento da expressão destes receptores possibilita a formação de células espumosas (MANABE; OWENS, 2001). Em adição, uma família de receptores nucleares, denominados de Receptores Ativados por Proliferador de Peroxissoma (PPARs), está associada à regulação do metabolismo lipídico em CMLVs. Os PPARs são fatores de transcrição envolvidos no estoque e 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 os componentes oxidados de LDL e VLDLs, além de ácidos graxos insaturados e eicosanóides (BESINGER; TONTONNOZ, 2008; CASTRILLO; TONTONNOZ, 2004). Neste contexto, a ativação destes receptores pode favorecer a formação de corpúsculos lipídicos, como demonstrado por ALMEIDA et al. (2009). Desse modo, o envolvimento das sFLA₂s na ativação desses receptores é plausível e deve ser investigado. A ativação de genes específicos, pelos PPARs, depende da associação do mesmo ao ácido 9-cis retinóico (BESINGER; TONTONNOZ, 2008) e resulta na expressão da PLIN2 e do receptor CD36 (FEBBRAIO et al., 2000; NAKATA et al., 1999).

Os receptores *scavengers* são amplamente reconhecidos como elementos chave para a formação de células espumosas. Dentre este grupo, destacam-se os receptores CD36, SR-A1 e LOX-1 (*lectin-like oxidized low-density lipoprotein- LOX-1*). O receptor CD36 ou SR-B2 é um receptor *scavenger* do tipo B, presente em células dendríticas, células endoteliais da microcirculação, tecido adiposo, macrófagos e CMLVs (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 (IBRAHIMI et al., 1999; GE; ELGHETANY, 2005). Além disso, foi demonstrado o envolvimento deste receptor na formação de CMLVs espumosas, sob estímulo pelo ácido oléico (MA et al., 2011). Por sua vez, o receptor SR-A1 é abundante em macrófagos, células endoteliais e CMLVs, durante o processo de estresse oxidativo (MIETUS-SNYDER, et al., 1997; ZANI et al., 2015). Este receptor possui capacidade de se ligar a partículas de LDL acetiladas ou oxidadas, tendo sido demonstrado que camundongos desprovidos de SR-A1 apresentam uma redução de 50 a 70% na captação destas partículas (KAMADA et al., 2001; SUZUKI et al., 1997). Ainda, estes animais apresentaram redução significativa no desenvolvimento da lesão aterosclerótica, diminuição da resposta pró-inflamatória, da apoptose de macrófagos e da necrose celular, com conseqüente melhora na estabilização da placa aterosclerótica (MAKINEN et al., 2010; MANNING-TOBIN et al., 2009). O LOX-1, por sua vez, foi inicialmente identificado como o principal receptor para LDL oxidada, sendo constituído por uma proteína de membrana do tipo II, com estrutura típica de lectina do tipo-C, na porção extracelular C-terminal. Este receptor pode ser clivado por proteases, liberando a forma solúvel do LOX-1 (CHEN et al., 2002). Seus resíduos C-terminais e uma série de resíduos positivamente carregados, do seu domínio lectina, são essenciais para a ligação ao LDL oxidado. Sob condições normais, a produção deste receptor é baixa. Entretanto, sob condições inflamatórias, citocinas como o TNF- α , a IL-1 β e o IFN- γ induzem um aumento expressivo da produção deste receptor (SAWAMURA et al., 1997; XU et al., 2013). Níveis elevados deste receptor são observados principalmente em CMLVs da região da íntima e em macrófagos, encontrados na placa aterosclerótica avançada. Neste contexto, apesar da relevância dos receptores PPARs e dos receptores *scavengers* CD36, SR-A1 e LOX-1, para a captação e o metabolismo lipídico em CMLVs, ainda não se conhece o efeito das sFLA₂s GIIA sobre os mesmos e a sua repercussão na formação de CMLVs espumosas.

Em adição, estudos recentes demonstraram que CMLVs aórticas, espumosas, com excesso de colesterol, assumem um fenótipo típico de macrófago, mostrando um declínio marcante na expressão de genes relacionados ao fenótipo contrátil, como os da alfa actina de célula de músculo liso e miosina de cadeia pesada, enquanto a expressão de marcadores de macrófagos (CD68 e MAC2) torna-se aumentada (VENGRENYUK et al., 2015). Neste sentido, estudos

demonstraram que cerca de 40% das células positivas para CD68, em lesões ateroscleróticas avançadas, originam-se de CMLVs (ALLAHVERDIAN et al., 2014). Ainda, a literatura descreve que estas células, com fenótipo de macrófago, exercem funções de macrófagos, como a fagocitose de partículas celulares e/ou células apoptóticas e contribuem para a remoção de células mortas e *debris* celulares durante processos inflamatórios (LACOLLEY et al., 2014; WEINERT et al., 2013). Esta informação é de suma importância, já que as CMLVs representam o principal tipo celular da parede dos vasos e exercem um importante papel na eliminação de células apoptóticas, quando os fagócitos profissionais não exercem suas funções de modo adequado (SCHRIJVERS et al., 2005). A forma pelo qual este fenômeno ocorre ainda é pouco compreendida, entretanto, estudos sugerem que o receptor de fosfatidilserina esteja relacionado a este processo (KOLB et al., 2007).

As consequências da formação de CMLVs espumosas, para a progressão da placa ateromatosa, são inúmeras. Neste sentido, sabe-se que o acúmulo excessivo de colesterol pode levar à morte de CMLVs espumosas, promovendo aumento da migração e proliferação de CMLVs adjacentes à região da íntima. Ainda, a apoptose e a morte dessas células deflagra um processo inflamatório, com o recrutamento de células circulantes, sendo este processo mediado por quimiocinas, como a MCP-1 e a fractalcina (SCHAUB et al., 2000).

Figura 3 - Características da formação e as consequências da formação de CMLVs espumosas durante o processo aterogênico. Na região da íntima, CMLVs adquirem um fenótipo sintético, secretando proteoglicanas e matriz extracelular. Esta matriz celular facilita a retenção de lipoproteínas nesses locais e induz aumento de receptores específicos para a captação de lipoproteínas e uma diminuição de proteínas relacionadas ao efluxo de lipídios, propiciando a formação das CMLVs espumosas. O acúmulo excessivo de colesterol nas CMLVs induz a morte destas células e acarreta o recrutamento de células circulantes, pela liberação de quimiocinas como a MCP-1 e fractalcina e de outros agentes pró-inflamatórios. Adaptado de Johnson, et al., 2014.

Além de citocinas e quimiocinas, as CMLVs sintetizam mediadores lipídicos, especialmente os eicosanoides, com atividades fisiológicas e fisiopatológicas. A PGI_2 é o principal eicosanóide liberado por CMLVs. Este mediador é tipicamente cardioprotetor, por ser um potente inibidor de ativação de leucócitos e da adesão e agregação plaquetária. Ainda, este mediador regula a proliferação, a migração e a contração de CMLVs (SAQIB; KARIGAR, 2008). A PGE_2 , por sua vez, medeia uma série de funções vasculares, que incluem a regulação do tônus vascular, da função trombótica e da resposta inflamatória (FUENTES et al., 2002; MURAKAMI et al., 2000). Por outro lado, a tromboxa A_2 (TXA_2), produzida por plaquetas, endotélio e CMLVs, possui atividade pró-coagulante e vasoconstritora (COLEMAN et al., 1990). A literatura demonstra que a biosíntese de PGE_2 , PGI_2 e de TXA_2 se encontra aumentada em pacientes com aterosclerose (COLEMAN et al., 1990; SAQIB; KARIGAR, 2008; XIAO et al., 2001) e que estes mediadores contribuem para a resposta inflamatória associada à esta doença.

A síntese de eicosanoides decorre do metabolismo do AA, a partir da ação das enzimas da ciclooxigenase. O AA, por sua vez, é originário da hidrólise de fosfolipídios pelas enzimas fosfolipase A_2 , sendo as do subgrupo IIA as isoformas mais abundantes nas CMLVs (HURT-CAMEJO et al., 1997). Dentre as ciclooxigenases, a COX-1 é uma isoforma constitutiva, expressa em uma série de tecidos e envolvida na manutenção de diversas funções fisiológicas, como proteção da mucosa gástrica e agregação plaquetária. Ainda, uma outra isoforma, a COX-2, é induzível em processos inflamatórios e constitutiva em alguns tecidos. Esta isoforma é rapidamente induzida em resposta a fatores de crescimento, promotores de tumores, hormônios e citocinas. As CMLVs expressam a COX-1 em condições fisiológicas, em que os níveis de COX-2 são indetectáveis. Neste sentido, foi demonstrado que as CMLVs expressam COX-2, quando presentes em lesões ateroscleróticas (RIMARACHIN et al., 1994; STEMME et al., 2000). Dada a importância do sistema das ciclooxigenases para a produção de mediadores lipídicos, justifica-se avaliar o papel das COXs na ação desencadeada pela MT-III e pela Bthtx-II, em CMLVs.

O conjunto de informações acima, aponta a plasticidade das CMLVs e a sua capacidade de proliferação e de transformação em elementos importantes para o desenvolvimento e evolução de processos fisiopatológicos, de natureza inflamatória, que afetam os vasos sanguíneos, como a aterosclerose. Desse modo, considerando

a capacidade dessas células apresentarem um aumento da expressão de FLA₂ secretadas, durante a aterosclerose, o conhecimento das ações desta classe de enzimas em CMLVs é de suma importância para o melhor entendimento dos processos que regem o desenvolvimento e/ou a progressão desta doença. Neste contexto, as sFLA₂s de venenos ofídicos constituem ferramentas científicas relevantes.

3 OBJETIVOS

3.1 Gerais:

Este estudo tem por objetivo avaliar os efeitos das fosfolipases A_2 MT-III, cataliticamente ativa e da BthTx-II, destituída de atividade catalítica, em células de músculo liso vascular, com ênfase na formação de CLs e mecanismos envolvidos neste efeito.

3.2 Específicos:

A partir de ensaios *in vitro*, serão avaliados os efeitos da MT-III e da BthTx-II, em CMLVs de aorta de rato, em cultura, quanto:

1. à formação de corpúsculos lipídicos, do ponto de vista da relação concentração-efeito e o decurso temporal desse efeito;
2. à importância do fenótipo para a formação de CMLVs espumosas;
3. à expressão protéica e a distribuição das perilipinas PLIN2 e PLIN3;
4. à expressão protéica dos receptores *scavengers* CD36, SR-A1 e LOX-1 e à sua participação na formação de CLs;
5. à expressão protéica e a ativação dos receptores PPAR- γ e $-\beta/\delta$;
6. à participação dos receptores PPAR- γ e $-\beta/\delta$, das COX-1 e 2, das enzimas DAGT e ACAT, das FLA₂s intracelulares e da FLA₂ secretada do GIIA, na formação de CLs, a partir de intervenções farmacológicas;
7. à participação dos processos de endocitose mediada por receptor e da macropinocitose na formação de CLs;
8. à liberação de ácidos graxos de membrana;
9. à expressão protéica das proteínas de efluxo de lipídios, ABCA1 e ABCG1;

10. à liberação das citocinas TNF- α , IL-1, IL-6 e das quimiocinas MCP-1 e fractalcina.
11. à expressão protéica e distribuição das ciclooxigenases 1 e 2;
12. à liberação das prostaglandinas PGE₂, PGI₂ e da TXA₂;
13. à distribuição intracelular da PGE₂;
14. à capacidade da MT-III induzir a capacidade de fagocitose e a expressão gênica de proteínas marcadoras de macrófagos, em CMLVs.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais:

Foram utilizados ratos *Wistar*, machos, de peso compreendido entre 200 e 230 gramas, obtidos do Biotério Central do Instituto Butantan, mantidos sob temperatura e períodos de luz controlados, com água e alimentação *ad libitum*. O protocolo de utilização destes animais recebeu aprovação pelas Comissões de Ética do Uso de Animais de Experimentação do Instituto Butantan e do Instituto de Ciências Biomédicas, da Universidade de São Paulo, com protocolos de número 1024/13 e 102, respectivamente.

4.2 Obtenção das CMLVs de aorta de ratos:

A obtenção das CMLVs foi realizada de acordo com o método de Wada et al. (1999). Primeiramente, os animais foram mortos em atmosfera de CO₂, para a dissecação da artéria aorta, em condições assépticas. A seguir, foi realizada a retirada do tecido conjuntivo e as aortas foram submetidas à digestão, em solução contendo collagenase do tipo IV (1 mg/mL), em meio de cultura DMEM, durante 1 h, a 37 °C. As aortas foram lavadas com solução fosfato salina tamponada (PBS) e, após serem seccionadas, foram colocadas em placas de cultura de 12 poços, com fundo chato e incubadas em estufa a 37 °C e 5% de CO₂, para a migração das células para o suporte. Após o período de 5 dias, as células foram destacadas das placas, com auxílio de solução de tripsina 0,05% e cultivadas em garrafas de 75 cm² (Corning). As células obtidas foram marcadas para as proteínas alfa actina (Abcam), para confirmar a predominância de células musculares lisas. Ainda, para controle da população celular predominante, foram utilizados anticorpos anti-Von Willebrand e CD90 (Abcam), para marcação de células endoteliais e fibroblastos, respectivamente.

4.2.1 Cultivo das CMLVs:

As células foram cultivadas em frascos de poliestireno de 75 cm² (COSTAR), contendo 5 mL de meio de cultura DMEM (SIGMA), suplementado com soro fetal

bovino (SFB) 10%, gentamicina (40 µg/mL) e L-glutamina (2 mM/L) e mantidas em incubadora, em atmosfera de 5% de CO₂, a 37 °C. O meio de cultura foi trocado a cada 48 h e as CMLVs foram, então, subcultivadas. Para tanto, o meio de cultura DMEM foi aspirado com pipeta Pasteur e as CMLVs foram lavadas com 2 mL de uma solução salina balanceada (EBSS). Em seguida, 8mL de uma solução de tripsina 0.25%/EDTA 0.02% foram adicionados ao frasco de cultura, que retornou à estufa de cultura (5% CO₂), a 37 °C, por um período de até 3 min. Decorrido este período, as CMLVs foram observadas ao microscópio de luz invertida (Carl Zeiss), para a verificação do destacamento das mesmas. A seguir, as CMLVs, tripsinizadas e homogeneizadas, foram colocadas em um tubo de 50 mL (Corning) e centrifugadas a 200 x g, por 10 min. O sobrenadante foi descartado e as CMLVs foram ressuspensas em meio DMEM/SFB. A partir daí, as CMLVs foram semeadas em frascos de cultura de 150 cm², com meio DMEM/SFB, previamente ambientalizado na estufa de cultura.

4.2.2 Subcultivo das CMLVs:

Para tanto, as CMLVs foram destacadas dos frascos com uma solução de tripsina 0.25%/EDTA 0.02%. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e as CMLVs ressuspensas em meio DMEM, em um volume fixo (1 mL). A seguir, uma alíquota de 10 µL da suspensão celular foi diluída em 90 µL de azul de Tripán (0,1%), para a contagem do número total de células, em microscópio de luz e determinação da viabilidade celular, pela técnica de exclusão. A partir desses parâmetros, foram feitas as diluições apropriadas para a aplicação das CMLVs nas placas e cultivo celular. Todos os ensaios para estudo das ações da MT-III e da BthTx-II foram realizados com CMLVs entre a 5ª e 8ª passagem (fenótipo sintético).

4.2.3 Fosfolipase A₂:

A fosfolipase A₂ MT-III (FLA₂-Asp-49), isolada do veneno da serpente *Bothrops asper*, foi fornecida pelo Dr. José Maria Gutiérrez, do Instituto Clodomiro Picado, da Universidade da Costa Rica, Costa Rica. A MT-III foi purificada de acordo com a metodologia proposta por KAISER et al., (1990) e liofilizada. A FLA₂ BthTx-II, foi fornecida pela Dra. Suely Sampaio Vilela, da Universidade de São Paulo- Ribeirão

Preto. A BthTx-II foi obtida a partir do veneno de *Bothrops jararacussu*, segundo o método descrito por HOMSI-BRANDEBURGO et al. (1988), modificado por CINTRA et al. (1993) e liofilizada. A homogeneidade das FLA₂s foi comprovada por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), sob condições redutoras (LAEMMLI, 1970).

4.3 Ensaio da redução do brometo de 3, 4, 5-dimetiltiazol – 2il 2,5- difeniltetrazol (MTT):

A atividade metabólica das CMLVs foi avaliada pelo método da redução do MTT. Após cada período de incubação (1, 3, 6, 12, 24 e 48 h) com a MT-III, ou BthTx-II ou DMEM apenas (controle), as células foram centrifugadas a 129 x g, por 6 min e o sobrenadante de cada amostra foi retirado. A seguir, foram acrescentados, a cada poço, 90 µL de meio DMEM e 10 µL de MTT (5 mg/mL, tamponado). Em seguida, as células foram incubadas a 37 °C, em estufa a 5% de CO₂, por 3 h. Para dissolver os cristais de formazan, oriundos da redução do MTT, pelas células viáveis, foram adicionados 100 µL de dimetil sulfóxido (DMSO). A seguir, foi efetuada a leitura da densidade ótica (D.O.), a 540 nm, em espectrofotômetro Multiskan (Labsystems). A atividade metabólica foi definida como a porcentagem de diminuição da D.O., observada em CMLVs submetidas à ação dos agentes, em relação às células controles.

4.4 Quantificação e caracterização dos corpúsculos lipídicos

4.4.1 Marcação com tetróxido de ósmio (OsO₄):

As CMLVs, aderidas a lamínulas de vidro, incubadas ou não com a MT-III ou BthTx-II ou meio de cultura, por diferentes períodos de tempo, foram fixadas com 250 µL de formaldeído tamponado (3,7%), por 15 min. Posteriormente, as lamínulas foram lavadas e adicionadas de 50 mL de tampão fosfato (0,2 M)/lamínula e de 50 mL de tetróxido de ósmio a 2% em PBS, por 30 min. Após lavagem em água destilada, as lamínulas foram imersas em 1% de tiocarboxihidrazida, por 5 min e lavadas em tampão fosfato 0,1 M. Posteriormente, as lamínulas foram coradas com 50 µL tetróxido de ósmio, a 1 %, por 3 min e lavadas em água destilada. A seguir, as

lamínulas foram montadas em lâminas para microscopia de luz. Os corpúsculos lipídicos, formados no interior das CMLVs, foram contados em um total de 50 células/campo, sob o microscópio de contraste de fase.

4.4.2 Microscopia eletrônica de transmissão:

As CMLVs, em suspensão (5×10^6 células), incubadas ou não com a MT-III, ou BthTx-II, por diferentes períodos de tempo, foram fixadas em glutaraldeído 2,5%, em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4, contendo 3,5% de sacarose, por 2 h, à temperatura ambiente. Uma vez fixadas, as CMLVs foram lavadas no mesmo tampão fosfato e pós-fixadas com tetróxido de ósmio 1%, por 2 h. Após três lavagens de 5 min cada, em tampão fosfato 0,1 M, as células foram desidratadas com concentrações crescentes de etanol (50 a 100%), terminando em óxido de propileno. A seguir, as células foram embebidas em solução de óxido de propileno e resina Spurr, na diluição de 1:1 (v/v), por 18 h. Em seguida, esta mistura foi substituída por resina pura, onde as células permaneceram por 4 h. Uma vez incluídas, as amostras foram mantidas em estufa a 60 °C, por 72 h, para a polimerização da resina. Para a localização da área onde se encontram as células, cortes semifinos, de 1 µm de espessura, foram obtidos em ultramicrotomo Leica Ultracult UCT® e corados com uma solução aquosa de borato de sódio 1%, preparada em solução aquosa de azul de toluidina 25%, para observação ao microscópio de luz. Identificada a região, no mesmo micrótomo foram realizados cortes ultrafinos, prateados, de cerca de 60 nm de espessura. Estes cortes foram resgatados em telas de cobre e contrastados com acetato de uranila a 2%, em água destilada, por 5 min, seguida por citrato de chumbo a 0,5%, em água destilada, por 10 min. A análise do material foi realizada sob o microscópio eletrônico LEO 906E.

4.5 Imunomarcação das proteínas PLIN2 e 3:

As lamínulas, contendo CMLVs aderidas, incubadas ou não com a MT-III, ou BthTx-II, foram lavadas duas vezes em tampão fosfato 0,1 M (PB), por 5 min. Após essa lavagem, as lamínulas foram fixadas com 250 µL de formaldeído 2%, diluído em tampão PB 0,1 M: triton X-100 0,2% (v:v), por 15 min, à temperatura ambiente. Após a 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 1% de albumina bovina (BSA), diluída em tampão PB 0,1 M: triton X-100 0,2%, por 2 h, à temperatura ambiente. A seguir, as lamínulas foram incubadas com anticorpo primário de cobaia, anti-PLIN2 (Diagnostics Research) ou anti-PLIN3 (Diagnostics Research), em tampão PB 0,1 M: triton X-100 0,2%, durante 1 h, à temperatura ambiente. Após três lavagens em tampão PB 0,1 M, por 5 min, as lamínulas foram incubadas com anticorpo secundário Fab de jumento anti-cobaia, conjugado ao fluoróforo AlexaFluor488 (Life Technology), na diluição 1:250 (v/v), em tampão PB 0,1 M: triton X-100 0,2%, durante 90 min, à temperatura ambiente. A seguir, as lamínulas foram montadas com solução de fluoromount G 1:2000 (v/v), em lâminas para microscopia e analisadas ao microscópio de varredura laser confocal Zeiss LSM 510 Meta.

4.6 Intervenções Farmacológicas ou Imunológicas:

Para avaliar a participação dos receptores PPAR- γ , PPAR- β/δ , CD36, SRA-1, LOX-1 e das enzimas, acil-coenzima A sintetase (DAGT) e acil-coenzima A: colesterol aciltransferase (ACAT), envolvidas na síntese de triacilglicerol e colesterol, bem como da iFLA₂, cFLA₂ e GIIA FLA₂, respectivamente, na formação de corpúsculos lipídicos, induzidos pela MT-III ou BthTx-II, foram utilizados antagonistas e/ou inibidores específicos. As concentrações dos inibidores e dos antagonistas, empregados neste estudo, foram baseadas naquelas descritas na literatura, após a comprovação de ausência de efeito citotóxico, pela análise de seus efeitos na viabilidade celular. Abaixo estão indicados os compostos, as concentrações e o tempo de incubação utilizados antes da adição da MT-III ou da BthTx-II ou DMEM;

- GW9662 (10 μ M), antagonista do receptor PPAR- γ , por 1 h (ALMEIDA et al., 2009);
- GSK660 (10 μ M), antagonista do receptor PPAR- β/δ , por 1 h (HALL et al., 2007);
- SSO (250 μ M), inibidor do receptor scavenger CD36 (MA et al., 2011);
- Carragenina kapa (250 μ M), ligante de LOX-1, por 1 h, por 1 h (THUM; BORLAK, 2008);
- Fucoidina (250 μ M), ligante de SR-A, por 1 h (TODT et al., 2008);
- Dextrana sulfato de sódio (250 μ M), ligante de SR-A, por 1 h (TODT et al., 2008);
- A-922500 (100 nM), inibidor da enzima DGAT, por 1 h (KING et al., 2009);

- TMP-153 (1000 nM), inibidor da enzima ACAT, por 1 h (SUGIYAMA et al., 1995).
- Bel (5 μ M), inibidor da fosfolipase A₂ independente de cálcio, por 1 h (MOON et al., 2008);
- Pyr-2 α (5 μ M), inibidor da fosfolipase A₂ citosólica, por 1 h (MOON et al., 2008);
- Valeril Salicilato (30 μ M), inibidor da COX-1, por 1 h (LEIGUEZ et al., 2011);
- NS-398 (10 μ M), inibidor da COX-2, por 1 h (MIETUS-SNYDER et al., 2000).
- LY294002 (100 Mm), inibidor da PI3K, por 1 h (CHELLAN et al., 2016)
- Wortmanina (2 μ M), inibidor da PI3K, por 1 h (CHELLAN et al., 2016)
- Dinasore (100 μ M), inibidor de endocitose, por 1 h (CHELLAN et al., 2014)

4.7 Análises por Western blotting:

Para a determinação da expressão protéica do receptor CD36, SR-A1, LOX-1, das PLIN2 e 3, das proteínas de efluxo de lipídios ABCA1 e ABCG1, dos PPAR- γ e β/δ e das COX-1 e COX-2, as CMLVs foram incubadas com MT-III ou BthTx-II ou DMEM e, a seguir, retiradas das placas, por raspagem, e centrifugadas a 200 x g. O precipitado celular foi resuspenso em 100 μ L de tampão Laemmli, pH 7,4 e fervido durante 10 min. A partir da suspensão obtida, foram separados 50 μ L para a dosagem de proteínas. A seguir, 25 μ L de cada amostra, com concentração de proteínas entre 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 de cada proteína em análise. Para tanto, uma amperagem constante de 25 mA e voltagem de 100-190 V foi aplicada 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 60 V, durante 2 h. Os sítios inespecíficos foram bloqueados com leite desnatado (solução de Molico 5% em TBS contendo 0.1% de Tween-20, pH 7,4), durante 1 h. A seguir, as membranas foram incubadas com os anticorpos primários (Santa Cruz) das proteínas em análise (anti-CD36: 1:1000; anti-SRA1: 1:1000; anti-LOX-1: 1:650; anti-ABCA1: 1:650; anti-ABCG1: 1:650, anti-PPAR- γ : 1:1000, anti-PPAR- β/δ : 1:1000; anti-PLIN2: 1:2000; anti-PLIN3: 1:1500; anti-COX-1: 1:1000; anti-COX-2: 1:500), durante 2 h, a 4 °C. 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 (Armestham Pharmacia Biotech). As bandas imunoreativas foram reveladas por quimiluminescência, com solução de luminol (Armestham Pharmacia Biotech) e, em seguida, detectadas e analisadas pelo sistema ImageQuant LAS 4000 mini (GE Healthcare).

4.8 Determinação da concentração de PGE₂, PGI₂ e TXA₂:

A determinação das concentrações de PGE₂, PGI₂ e TXA₂, nos sobrenadantes de culturas de CMLVs, foi realizada através de ensaio imunoenzimático (PRADELLES et al., 1985). Para tanto, foi utilizado *kit* comercial para detecção dos eicosanóides (Cayman Co.). Os ensaios foram conduzidos de acordo com as instruções do fabricante.

4.9 Determinação da localização da COX-1, COX-2 e da PGE₂ e de lipídios neutros por imunocitoquímica:

As lamínulas, contendo CMLVs aderidas, incubadas ou não com a MT-III ou BthTx-II, foram lavadas, duas vezes, em tampão fosfato (PB) 0,1 M, por 5 min. Após lavagem, as lamínulas foram fixadas com solução de EDAC (1-etil-3-(3-dimetilamina-propil) carbodiimida) a 0,25%, diluída em HBSS, sem cálcio ou magnésio, por 10 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, por 10 min, à temperatura ambiente e, então, incubadas com anticorpo primário anti-COX-1 ou anti-COX-2 ou anti-PGE₂ (Cayman Chemical), na diluição 1:100 (v/v), em tampão PB 0,1 M, por 1 h, à temperatura ambiente. Após três lavagens de 5 min, em tampão PB 0,1 M, as lamínulas foram incubadas com anticorpo secundário Alexa Fluor 488, anti-Ac primário de coelho ou camundongo, na diluição 1:300 (v/v), em solução de Nile Red (1:200), em tampão PB 0,1 M, durante 60 min, à temperatura ambiente, em câmara escura. Após três lavagens em tampão PB 0,1 M, por 5 min, as lamínulas foram incubadas com solução de fluoromount G 1:2000 (v/v) e colocadas em lâminas para microscopia e analisadas ao microscópio de varredura laser confocal Zeiss LSM 510 Meta.

4.10 Quantificação da fagocitose:

Após o tratamento das CMLVs com concentrações não citotóxicas de MT-III por 12, 24 ou 48 h, as células foram expostas a esferas fluorescentes (0.5 μ m Flouresbrite, Poly Sciences), por um período de 6 h. A seguir, as células foram lavadas três vezes com PBS e marcadas com Hoechst 33342 (1:1000), 20 min, à temperatura ambiente. A aquisição dos dados foi realizada através do microscópio automatizado Zeiss Axiovert 200 m, seguida por quantificação automática, computadorizada, utilizando o programa de análise CellProfiler.

4.11 Determinação da expressão gênica dos marcadores de macrófagos e CMLVs.

Análise por reação em cadeia da polimerase por transcrição reversa em tempo real (qPCR):

O precipitado celular contendo CMLVs incubadas com a MT-III ou meio de cultura (controle), foi homogeneizado com Trizol e incubado por 10 min, à temperatura ambiente. Após esse período, as amostras foram precipitadas com 100 μ L de clorofórmio e centrifugadas a 12000 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 μ L de álcool isopropílico e 5 μ L de glicogênio, durante 30 min, a 4 °C. As amostras foram então centrifugadas a 12000 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 o precipitado seco, à temperatura ambiente, por 15 min. As amostras foram ressuspensas em água tratada com dietil pirocarbonato (DEPC). A concentração do RNA total foi determinada por espectrofotometria, a 260 nm e a pureza foi calculada pela relação A260/A280. Para a remoção do DNA genômico, o RNA total extraído foi incubado, por 15 min, com uma solução contendo 0,5 μ L de desoxiribonuclease I purificada (DNase), 0,5 μ L de solução tampão DNase 10 x e completado para 10 μ L com água DEPC. O bloqueio da reação foi realizado com EDTA, 25 mM, por 10 min, a 65 °C. Para a geração do cDNA, por transcrição reversa, 0,5 μ g de RNA total foi incubado com 1 μ L de oligo dTs (0,05 μ g/ μ L), 1 μ L de superscriptTM II reverse transcriptase e completado para 20 μ L com água DEPC. A seguir, as amostras colocadas no termociclador por 10 min, 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, 10 µL 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 1,25 mM, dNTPs Mix, a 0,2 mM, e em um volume final de 20 µL 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.

	Sense	Antisense
CD68	TCCCTTACGGACAGCTTACC	AGGACCAGGCCAATGATGAG
MAC2	TTGAGAGCGGCAAACCATTC	AGTTGGCTGATTTCCCTGAG
Alfa actina	AGGGAGTGATGGTTGGAATG	GGTGATGATGCCGTGTTCTA
SM-22α	CCAGACTGTTGACCTCTTTG	CTGTGAACTCCCTCTTATGC
Miosina de cadeia pesada	AGTCTGAGTCCCCGAGCATCC	CAGCGCATCAATGCCAACCG
GAPDH	ACCACAGTCCATGCCATCAC	TCCACCACCCTGTTGCTTA

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 CT encontrados, foi calculado o valor de $2^{-\Delta\Delta Ct}$:

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

onde E = eficiência da reação de PCR;

ΔCt do gene alvo = diferença entre o valor de CT da amostra desconhecida e da amostra controle para este gene; ΔCt do gene controle = diferença entre o valor de CT da amostra desconhecida e da amostra controle para este gene. Todas as amplificações foram realizadas com a curva de dissociação, “melting”, para verificar a especificidade da amplificação e confirmar a ausência de formação de dímeros de oligossondas ou qualquer outro produto inespecífico.

4.12 Análise de ácidos graxos:

Após o tratamento das CMLVs com concentrações não citotóxicas de MT-III e BthTx-II por 3 e 12 h as amostras foram esterilizadas e extraídas. Para tanto, as CMLVs incubadas com as sFLA₂s ou com meio de cultura (controle) foram coletadas com o auxílio de *scrapers*, em solução de PBS. A seguir, as amostras foram agitadas em vórtex, por 15 s e colocadas em banho-maria, a 100 °C, por 5 min. Após

resfriamento das amostras, foram adicionados 2 ml de BF₃-Metanol 14%, seguido de agitação em vórtex por 15 s. A seguir, as amostras foram colocadas novamente em banho-maria, a 100 °C, por 5 min. Após o resfriamento, foi adicionado 1 ml de isooctano e as amostras foram agitadas vigorosamente por 30 s. A seguir, foram adicionados 5 ml de solução saturada de NaCl e as amostras foram homogeneizadas levemente, por inversão. A camada de isooctano foi transferida para um microtubo de 1,5 mL e foi evaporado com nitrogênio gasoso. As amostras foram ressuspensas em 500 µL de isooctano e um volume de 200 µL dessa solução foi utilizado para análise por cromatografia gasosa.

4.13 Análise estatística:

Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão (E.P.M.). Foi empregada a análise de variância (ANOVA), seguida por comparações múltiplas pelo método de Tukey. A homocedasticidade de todas as amostras foi verificada previamente. O nível de significância adotado foi de 0,05 ($p < 0,05$).

5 RESULTADOS:

5.1 Expressão de α -actina em células de músculo liso vascular em cultura

Inicialmente, procurou-se confirmar o tipo celular isolado das artérias aortas de ratos, a partir da análise da presença de α -actina, proteína reconhecida como um marcador de células de músculo liso (METZ et al., 2012). As CMLVs isoladas da artéria aorta em 1ª passagem, foram aderidas às lamínulas de vidro e processadas para marcação da proteína α -actina, do fator Von Willebrand (marcador de células endoteliais) e da proteína CD90 (marcador de fibroblastos), por imunocitoquímica. A Figura 4 ilustra a marcação da α -actina em verde (AlexaFluor488) e marcação do núcleo em vermelho (iodeto de propídio). As lamínulas foram analisadas por microscopia confocal com objetiva de 40 x e no mesmo plano. Como mostra a Figura 4, as lamínulas, com células de primeira passagem, apresentaram forte marcação para a proteína α -actina, em toda a sua extensão, indicando a predominância de células musculares lisas vasculares. A análise morfológica das culturas confirmou que a população celular predominante é de células musculares lisas, dada a morfologia alongada e fusiforme, característica destas células. Como esperado, não foi observada marcação para o fator Von Willebrand e nem para a proteína CD90 (Figura 4B e C).

A Figura 5A mostra a população de células isoladas, que foram submetidas à análise por citometria de fluxo. Nesta figura, é possível observar a presença de apenas uma população de células (100%). A Figura 5B ilustra as porcentagens da intensidade de fluorescência para a proteína α -actina (n=1 representativo), nas células isoladas. Nesta figura, observa-se a presença da marcação para a α -actina na maioria das células analisadas (97,6%), evidenciando a presença de uma população homogênea de células musculares lisas, nas culturas.

Figura 4 - Marcação da proteína α -actina, do fator Von Willebrand e da proteína CD90 em células obtidas da artéria aorta de ratos. As células obtidas da aorta foram aderidas às lâminulas de vidro e incubadas com anticorpo primário anti- α -actina (a) ou anti-Von Willebrand (b) ou anti-CD90 (c) e com anticorpo secundário conjugado ao AlexaFluor488 (verde) ou com iodeto de propídio (vermelho), por 1 h, a 37 °C. A seguir, as lâminas foram analisadas em microscópio confocal em aumento de 40 x.

A

B

Figura 5 - Caracterização das células de músculo liso vascular de cultura primária da artéria aorta de ratos. As CMLVs, na 1ª passagem, foram incubadas com anticorpos anti- α -actina e submetidas a análise por citometria de fluxo. (A) Dot-plot representativo do tamanho e granulosidade da população celular analisada (B) Dot-plot representativo da mediana de intensidade de fluorescência, em células incubadas com anticorpo anti- α -actina, conjugado ao AlexaFluor488.

5.2 Efeito das toxinas MT-III e BthTx-II na viabilidade de células de músculo liso vascular

Para este estudo, células de músculo liso vacular (5×10^3 células/poço) foram incubadas com a MT-III, ou a BthTx-II (0,4 ou 0,8 μ M), ou DMEM, baixa concentração de glicose (controle), por 1, 6, 12, 24 ou 48 h e a viabilidade celular foi avaliada pela determinação da atividade oxidativa mitocondrial, pelo ensaio de redução do MTT. As concentrações de MT-III e da BthTx-II, utilizadas nestes ensaios, tiveram por base estudos anteriores deste laboratório, que demonstraram a ação estimulatória de fosfolipases A_2 botrópicas, em macrófagos, para a formação de CLs e produção de mediadores inflamatórios (GIANNOTTI et al., 2012; LEIGUEZ et al., 2011; MOREIRA et al., 2008).

A figura 6 mostra que as CMLVs, incubadas tanto com a MT-III (Fig. 6A), quanto com a BthTx-II (Fig. 6B), não apresentaram modificação da atividade oxidativa mitocondrial, nos períodos de tempo avaliados, em comparação às células controle, incubadas com DMEM, apenas.

Figura 6 - Efeito da MT-III e da BthTx-II na atividade metabólica de CMLVs. As CMLVs, isoladas de artérias aorta de ratos e cultivadas em placas de 96 poços, foram incubadas com a MT-III ou BthTx-II (0,4 ou 0,8 μ M), ou DMEM (controle), por 1, 3, 6, 12, 24 ou 48 h, a 37 °C e 5% de CO_2 . A atividade metabólica foi determinada pelo ensaio de redução do MTT, como descrito em Material e Métodos. Os dados representam a média $\pm$ E.P.M de 3-5 animais. Os resultados estão expressos como a porcentagem da atividade metabólica celular, tendo o valor do controle representado como 100% de atividade (ANOVA).

5.3 Formação de CLs induzida pela MT-III e BthTx-II em CMLVs isoladas

A formação CLs foi avaliada após a incubação de CMLVs com concentrações não citotóxicas da MT-III, ou BthTx-II (0,2; 0,4 ou 0,8 μ M), ou DMEM (controle), por 1 h. A figura 7 mostra que as CMLVs controles, incubadas apenas com DMEM, apresentaram um número médio de $0,1 \pm 0,04$ CLs/célula. A MT-III (A), nas concentrações de 0,4 e 0,8 μ M causou um aumento significativo da formação de CLs, em relação aos controles, com formação de $4,67 \pm 1,0$ e $10,75 \pm 0,9$ CLs/célula, respectivamente, após 1 h de incubação, não tendo sido verificado este efeito na concentração de 0,2 μ M. A BthTx-II (B), por sua vez, induziu a formação de CLs, em CMLVs, apenas na concentração de 0,8 μ M ($8,14 \pm 2,18$), em relação às células controle ($0,46 \pm 0,24$). A partir destes dados, foram selecionadas as concentrações de 0,4 μ M para a MT-III e de 0,8 μ M para a BthTx-II, para os estudos subsequentes.

Figura 7 - Formação de CLs pela ação de diferentes concentrações de MT-III (A) e BthTx-II (B) em CMLVs. As CMLVs, isoladas de artérias aorta de ratos, foram incubadas com a MT-III ou com a BthTx-II, nas concentrações indicadas acima, ou com DMEM (controle) por 1 h. Os CLs foram corados com tetróxido de ósmio e quantificados sob microscópio de contraste de fase, como descrito em Material e Métodos. Os dados representam a média $\pm$ E.P.M de 4 a 6 animais. * $p < 0,05$ em relação ao DMEM (ANOVA).

5.4 Decurso temporal da formação de CLs induzida pelas MT-III e BthTx-II em CMLVs

O decurso temporal da formação de CLs foi analisada após a incubação das CMLVs em cultura, com a MT-III (0,4 μ M), ou BthTx-II (0,8 μ M), ou DMEM (controle), por 1, 3, 6 ou 12 h. A Figura 8 mostra que as CMLVs incubadas apenas com DMEM (controle) apresentaram, em média, $0,11 \pm 0,44$ CLs/célula, no intervalo de tempo estudado. A MT-III, na concentração de 0,4 μ M, causou um aumento significativo no número de CLs, em relação aos controles, com a formação de $4,6 \pm 1,0$; $4,82 \pm 0,3$; $20,4 \pm 3,5$; $21,7 \pm 3,6$ CLs/célula, após 1, 3, 6 e 12 h de incubação, respectivamente (A). O efeito máximo foi observado na 6^a h. A BthTx-II (B), na concentração de 0,8 μ M, causou um aumento significativo no número de CLs em relação aos controles ($0,4 \pm 0,04$), com a formação de $9,8 \pm 1,4$; $13,3 \pm 1,9$; $19,4 \pm 1,6$; $23,8 \pm 4,0$ CLs/célula, após 1, 3, 6 e 12h de incubação, respectivamente. O efeito máximo foi observado na 6^a h. A figura 9 ilustra a formação de CLs, em CMLVs controles, ou incubadas com a MT-III (0,4 μ M), ou com a BthTx-II (0,8 μ M), por 1 (A), 6 (B) ou 12 h (C). As fotomicrografias das CMLVs controles mostram um número reduzido de CLs. No entanto, em CMLVs incubadas com a MT-III, ou com a BthTx-II, observa-se um número aumentado dessas inclusões.

Figura 8 - Decurso temporal da formação de CLs induzida pela MT-III (A) e BthTx-II (B) em CMLVs. As CMLVs isoladas de artérias aorta de ratos e aderidas a lamínulas de vidro, foram incubadas a MT-III (0,4 μ M) ou BthTx-II (0,8 μ M) ou DMEM (controle), por 1, 3, 6 ou 12 h. Os CLs foram corados com tetróxido de ósmio e quantificados sob microscópio de contraste de fase como descrito em Material e Métodos. Os dados representam a média $\pm$ E.P.M de 4-6 animais. * $p < 0,05$ em relação ao DMEM (controle), # $p < 0,05$ em relação as células incubadas com a BthTx-II por 1 e 3 h (ANOVA).

Figura 9 - Fotomicrografias de CMLVs em cultura, evidenciando a formação de CLs induzida pela MT-III e pela BthTx-II. CMLVs, isoladas de artérias aorta de ratos e aderidas a lamínulas de vidro foram incubadas com a MT-III (0,4 μ M) ou BthTx-II (0,8 μ M) ou DMEM (controle), por 1 (A), 6 (B) ou 12 h (C). Os CLs foram corados com tetróxido de ósmio e estão indicados pelas setas. Em células controles observa-se um número reduzido de CLs. Em CMLVs estimuladas pela MT-III, ou pela BthTx-II, por 1, 6 ou 12 h, observa-se um número aumentado de CLs em comparação ao controle. Aumento: 1000 x.

5.5 Análise ultraestrutural das CMLVs estimuladas pela MT-III e BthTx-II

Para a análise ultraestrutural dos CLs, formados na vigência de ação das toxinas (6 h), as CMLVs foram preparadas para microscopia eletrônica de transmissão. A figura 10A ilustra uma CMLV do grupo controle, com núcleo bem evidente. As figuras 10B e C ilustram CMLVs que foram incubadas com a MT-III (0,4 μ M), apresentando um número aumentado de CLs, localizados principalmente na periferia celular. As figuras 10D e E ilustram a formação de CLs induzida pela BthTx-II (0,8 μ M). Nesta condição, os CLs apresentaram-se fracamente eletrondensos e mostram uma associação íntima com mitocôndrias e o retículo endoplasmático granular. Essa associação entre CLs e RE também foi observada em CLs induzidos pela MT-III. Ainda, no período de tempo avaliado, foi observada uma expansão de regiões do retículo endoplasmático em células incubadas com ambas as toxinas (figura 10C e D).

Figura 10 - Imagem ultraestrutural de CMLV incubado com meio de cultura DMEM (A) ou com a MT-III (0,4 μM) (B e C) ou BthTx-II (D e E). (A): CMLV controle, destituída de CLs. Em B e C: CMLV sob ação da MT-III, apresentando CLs fracamente eletrondensos, em interação com o retículo endoplasmático (REG) e mitocôndrias (M). Em D e E: CMLVs incubadas com a BthTx-II, apresentando CLs fracamente eletrondensos e dilatação de REG e interação com mitocôndrias (M). N: Núcleo; CL: Corpúsculo lipídico. Barra (A) 1 μm e (B) = 2 μm .

5.6 Importância do fenótipo para a formação de CLs em CMLVs incubadas com a MT-III e BthTx-II

Uma vez que as CMLVs em fenótipo sintético, mas não contrátil, apresentam capacidade proliferativa e de acúmulo de lipídios (CAMPBELL et al., 1985) e que as CMLVs, em fenótipo sintético, responderam às sFLA₂s ofídicas com o aumento da formação de CLs (Fig.11), foi avaliada a resposta das CMLVs em fenótipo contrátil para a formação CLs. Para tanto, CMLVs em fenótipo contrátil (passagem zero), foram incubadas com MT-III (0,4 μ M), ou BthTx-II (0,8 μ M), ou DMEM (controle), por 3, 6 e 12 h. A figura 11 mostra que as CMLVs controles, incubadas apenas com DMEM, apresentaram um número médio de $0,18 \pm 0,01$ CLs/célula. Nem a MT-III, nem a BthTx-II causaram alteração do número de CLs, em células de fenótipo contrátil, em comparação às células controle, nos períodos de tempo estudados.

Figura 11 - Efeito da MT-III e da BthTx-II no número de CLs em CMLVs em fenótipo contrátil. A. Perfil temporal da formação de corpúsculos lipídicos em CMLVs em fenótipo contrátil, incubadas com a MT-III (0,4 μ g/mL), ou BthTx-II (0,8 μ g/mL), ou DMEM (controle) pelos períodos de tempo indicados acima. Os CLs foram corados com tetróxido de ósmio e quantificados em microscópio de contraste de fase, como descrito em Material e Métodos. Os dados representam a média $\pm$ EPM de 3-5 animais. B. Fotomicrografias das CMLVs de fenótipo contrátil incubadas com DMEM (B), ou MT-III (0,4 μ M) (C), ou BthTx-II (0,8 μ M) (D) por 12 h (ANOVA).

5.7 Efeito da MT-III e da BthTx-II na expressão proteica da PLIN2 em CMLVs

A expressão proteica da PLIN2, foi avaliada em CMLVs incubadas com a MT-III (0,4 μ M), ou BthTx-II (0,8 μ M), ou DMEM (controle), por 1, 3, 6 ou 12 h. A figura 12 (A) mostra bandas imunorreativas, representativas da expressão de PLIN2 e de β -actina, em CMLVs controles ou incubadas com a MT-III. A análise da intensidade das bandas imunorreativas para a PLIN2 não apontou diferença, em relação às respectivas células controles, em nenhum dos períodos de tempo estudados (Fig. 12B). Da mesma forma, quando as células foram incubadas com a BthTx-II (Fig. 12C) não foi observada alteração das bandas imunorreativas para a PLIN2 em comparação ao controle. A análise densitométrica destas bandas, representada na figura 12(D), confirmou estes resultados.

Figura 12 - Expressão protéica da proteína PLIN2 em CMLVs estimuladas pela MT-III e BthTx-II. CMLVs isoladas de artérias aorta de ratos e aderidas a placas de cultura de 12 poços, foram incubadas com a MT-III (0,4 μ M), ou BthTx-II (0,8 μ M), ou com DMEM (controle), nos períodos de tempo indicados acima. (A e B): Bandas imunorreativas representativas do *W. blotting* com anticorpo policlonal anti-PLIN2 e anti- β -actina, (C e D): Quantificação, por densitometria, das bandas de PLIN2, normalizadas a partir das bandas de β -actina. Os dados representam a média $\pm$ E.P.M. de 3-4 animais (ANOVA).

5.8 Efeito da MT-III e da BthTx-II na distribuição intracelular da PLIN2 em CMLVs

A distribuição da PLIN2 e sua possível associação aos CLs foi analisada por imunofluorescência, em CMLVs aderidas a lamínulas de vidro, incubadas com a MT-III (0,4 μ M), ou BthTx-II (0,8 μ M), ou DMEM (controle), por 12 h. A figura 13 ilustra a marcação dos lipídios neutros, indicadora de corpúsculos lipídicos, em vermelho, e da proteína PLIN2, em verde. As lâminas foram analisadas sob objetiva de 40 x. A figura 13 ilustra as CMLVs controles, após 12 h de incubação com DMEM. Nestes, observou-se uma marcação difusa para os lipídios neutros e para a PLIN2, no citoplasma. Quando as células foram incubadas com a MT-III, ou com a BthTx-II, por 12 h, observou-se marcação intensa e pontual da proteína estrutural PLIN2, sob forma de *pools*, localizados no citoplasma e um aumento da marcação para lipídios neutros/CLs. A sobreposição das imagens demonstrou uma co-localização dos lipídios neutros/CLs com a proteína PLIN2, no período de tempo estudado.

Figura 13 - Efeito da MT-III e da BthTx-II na localização da proteína PLIN2 em CMLVs. CMLVs isoladas de artérias aorta de ratos e aderidas a lâminulas de vidro, foram estimuladas com DMEM (controle), ou MT-III (0,4 μ M), ou BthTx-II (0,8 μ M), por 12 h. A seguir, as CMLVs foram incubadas com anticorpo anti-PLIN2 e com anticorpo secundário conjugado ao FITC (verde), por 1 h, a 37 °C e após, com o NileRed (vermelho), por 1 h. As lâminas foram analisadas sob microscópio confocal (aumento de 40 x).

5.9 Efeito da MT-III e da BthTx-II na expressão protéica da PLIN3 em CMLVs

A expressão protéica da PLIN3, uma proteína citoplasmática e estruturalmente semelhante à PLIN2, foi avaliada por *Western blotting* a partir de CMLVs em cultura. Para isso, CMLVs, aderidas a placas de cultura, foram incubadas com a MT-III (0,4 μ M), ou BthTx-II (0,8 μ M), ou DMEM (controle), por 1, 3, 6 ou 12 h. As figuras 14 (A e B) mostram bandas imunorreativas, representativas da expressão de PLIN3 e de β -actina, em CMLVs controles, ou incubadas com a MT-III (A), ou BthTx-II (B), durante 1, 3, 6 ou 12 h. A análise da intensidade das bandas imunorreativas para a PLIN3 não apontou diferença entre as bandas, em células incubadas com a MT-III, em relação às respectivas células controles, em nenhum dos períodos de tempo estudados. O mesmo foi observado, quando as células foram incubadas com a BthTx-II, em comparação aos controles. A análise densitométrica das bandas, representada nas figuras 14 (C) e (D), confirmou que não houve diferença significativa na expressão protéica da PLIN3 entre células tratadas com as FLA₂, em comparação aos respectivos controles.

Figura 14 - Expressão protéica da proteína PLIN3 em CMLVs estimuladas pelas MT-III e BthTx-II. CMLVs isoladas de artérias aorta de ratos foram aderidas a placas de cultura de 12 poços, e incubadas com a MT-III (0,4 μ M), ou BthTx-II (0,8 μ M), ou com DMEM (controle), nos períodos de tempo indicados acima. (A e B): Bandas imunorreativas representativas do *W. blotting* com anticorpo policlonal anti-PLIN3 e anti- β -actina, (C e D): Quantificação, por densitometria, das bandas da PLIN2, normalizadas a partir das bandas de β -actina. Os dados representam a média $\pm$ E.P.M. de 3-4 animais (ANOVA).

5.10 Efeito da MT-III e da BthTx-II na distribuição intracelular da PLIN3 em CMLVs

A distribuição da proteína PLIN3 e sua possível associação aos CLs foi analisada por imunofluorescência, em CMLVs aderidas a lamínulas de vidro, incubadas com a MT-III (0,4 μ M), ou BthTx-II (0,8 μ M), ou DMEM (controle), por 12 h. A figura 15 ilustra a marcação dos lipídios neutros, indicador de corpúsculos lipídicos, em vermelho, e da proteína PLIN3 em verde. Em CMLVs controles, incubadas com DMEM, por 12 h, pode ser observada ausência de marcação para os lipídios neutros e uma fraca marcação para a PLIN3, no citoplasma. Quando as células foram incubadas com a MT-III, ou com a BthTx-II, por 12 h, observou-se marcação intensa e pontual da PLIN3, na forma de *pools* (agregados) no citoplasma e marcação significativa de lipídios neutros/CLs. A sobreposição das imagens demonstrou uma co-localização dos lipídios neutros/CLs com a proteína PLIN3, no período de tempo estudado.

Figura 15 - Efeito da MT-III e da BthTx-II na localização da proteína PLIN3 em CMLVs. CMLVs isoladas de artérias aorta de ratos e aderidas a laminulas de vidro, foram estimuladas com DMEM (controle) ou MT-III (0,4 μ M) ou BthTx-II (0,8 μ M), por 12 h. A seguir, as CMLVs foram incubadas com anticorpo anti-PLIN3 e com anticorpo secundário conjugado ao FITC (verde), por 1 h, a 37 °C e após, com o NileRed (vermelho), por 1 h. As lâminas foram analisadas sob o microscópio confocal (aumento de 40 x).

5.11 Efeito da MT-III e da BthTx-II na expressão protéica dos receptores CD36, SR-A1 e LOX-1 em CMLVs

Para avaliar os possíveis mecanismos que poderiam contribuir para a captação de lipídios pelas CMLVs e formação de CLs, foi investigada a expressão protéica dos receptores *scavenger* CD36, SR-A1 e LOX-1 por *Western blotting*. Para tanto, as CMLVs foram incubadas com a MT-III (0,4 μ M), ou com a BthTx-II (0,8 μ M), ou com DMEM (controle), durante 1, 3, 6 ou 12 h. A Figura 16 (A) representa as bandas imunorreativas para o CD36, em células incubadas com a MT-III, em que não se observa diferença nas bandas de CMLVs incubadas com a FLA₂, em relação aos controles, entre 1 e 12 h. Entretanto, quando estas células foram incubadas com a BthTx-II, foi observado aumento da banda de CD36, na 12^a h de incubação com a toxina, se comparado às células controles (B). A análise densitométrica dessas bandas, representada na Figura 16 (C e D), confirma que as intensidades das mesmas não foram significativamente diferentes, em CMLVs incubadas com a MT-III, em comparação aos respectivos controles, em todos os períodos de tempo testados. Em células incubadas com a BthTx-II, a análise densitométrica mostrou o aumento da intensidade da banda para o CD36 na 12^a h, que foi significativo em relação ao respectivo controle.

A Figura 17 (A) representa as bandas imunorreativas para o SR-A1, em células incubadas com a MT-III, onde se observa que houve aumento nas bandas imunorreativas para este receptor em CMLVs incubadas com a FLA₂, em relação aos controles, apenas na 12^a h de incubação. Quando as células foram incubadas com a BthTx-II, foi observado aumento da banda imunorreativa para o SR-A1, nas 3^a e 12^a h de incubação, se comparado às células controles (Figura 17B). A análise densitométrica destas bandas, representada na Figura 17 (C), mostrou que a intensidade das mesmas foi significativamente maior, em CMLVs incubadas com a MT-III, por 12h, mas não em 1, 3 ou 6 h, em comparação aos respectivos controles. Em células incubadas com a BthTx-II (Figura 17D), a análise densitométrica confirmou o aumento significativo das intensidades das bandas para o SR-A1, nas 3^a e 12^a h, em relação aos respectivos controles.

A Figura 17 (E) representa as bandas imunorreativas para o LOX-1, em células incubadas com a MT-III, onde se observa um aumento da intensidade das bandas, após 3 e 6 h de incubação. Entretanto, quando essas células foram

incubadas com a BthTx-II, ocorreu aumento da banda de LOX-1, na 3^a e 12^a h de incubação, se comparado às células controles (Figura 17F). A análise densitométrica dessas bandas, confirmou esses dados, indicando um aumento significativo da expressão desse receptor na 3^a e 6^a h de incubação com a MT-III e nas 3^a e 12^a h de incubação com a BthTx-II (Figura 17H).

Figura 16 - Efeito das MT-III e da BthTx-II na expressão protéica do receptor scavenger CD36 em CMLVs. As CMLVs isoladas de artérias aorta de ratos e aderidas a placas de cultura de 12 poços, foram incubadas com a MT-III (0,4 μ M), ou BthTx-II (0,8 μ M), ou com DMEM (controle), nos períodos de tempo indicados acima. (A e B): Bandas imunorreativas representativas do *W. blotting* com anticorpo policlonal anti- CD36 e anti- β -actina, (C e D): Quantificação, por densitometria, das bandas de CD36, normalizadas a partir das bandas de β -actina. Os dados representam a média $\pm$ E.P.M. de 3-4 animais. * $p < 0,05$ em relação ao DMEM (controle) (ANOVA).

Figura 17 - Efeito das MT-III e da BthTx-II na expressão protéica dos receptores scavengers SR-A1 e LOX-1 em CMLVs. As CMLVs isoladas de artérias aorta de ratos e aderidas a placas de cultura de 12 poços, foram incubadas com a MT-III (0,4 μ M), ou BthTx-II (0,8 μ M), ou com DMEM (controle), nos períodos de tempo indicados acima. (A, B, E e F): Bandas imunorreativas representativas do *W. blotting* com anticorpo policlonal anti- SR-A1 ou anti-LOX-1 e anti- β -actina, (C, D, G, H): Quantificação, por densitometria, das bandas de SR-A1 e LOX-1, normalizadas a partir das bandas de β -actina. Os dados representam a média $\pm$ E.P.M. de 3-4 animais. * $p < 0,05$ em relação ao DMEM (controle) (ANOVA).

5.12 Efeito dos compostos SSO, fucoidina, dextrana e carragenina na formação de CLs induzida pela MT-III e BthTx-II em CMLVs

Para verificar a participação dos receptores scavengers CD36, SR-A1 e LOX-1, na formação de CLs induzida pelas toxinas MT-III e BthTx-II, as CMLVs foram pré-tratadas com inibidor específicos destes receptores, o composto SSO (250 μ M), inibidor do CD36, ou fucoidina e dextran sulfato de sódio (250 μ M), inibidores do receptor SR-A1, ou carragenina (250 μ M), inibidor do receptor LOX-1, ou veículos (controle), durante 1 h. A seguir, as células foram incubadas com a MT-III (0,4 μ M) ou BthTx-II (0,8 μ M) ou DMEM, por 12 h. Nas condições experimentais deste estudo, esses compostos e seus veículos não acarretaram alterações significativas da viabilidade celular ($> 90\%$ de células viáveis, ensaio do MTT) (dados não demonstrados). A Figura 18 mostra que as CMLVs controles, incubadas com o veículo, apresentaram em média $0,18 \pm 0,05$ CLs/célula. A incubação das células com a MT-III, na concentração de 0,4 μ M, por 12 h, na presença do veículo (controle positivo), causou a formação de $49,9 \pm 1,1$ CLs/célula, que foi significativamente maior que o observado no controle basal. Quando as células foram incubadas com a BthTx-II (0,8 μ M) por 12 h na presença do veículo, também houve um aumento do número de CLs (52,3 CLs/célula). Quando as CMLVs foram pré-tratadas com os compostos SSO ou fucoidina ou dextran sulfato de sódio ou carragenina, por 1 h, não houve alteração do número basal de CLs ($0,20 \pm 0,1$ CLs/célula). Da mesma maneira, o pré-tratamento das células com estes compostos não alterou a formação de CLs induzida pela MT-III, nem pela BthTx-II, em relação às células incubadas com as mesmas e pré-tratadas com o veículo (controle positivo).

Figura 18 - Efeito dos compostos SSO, fucoidina, dextrana e carragenina na formação de CLs induzida pela MT-III e BthTx-II em CMLVs. CMLVs isoladas de artérias aorta de ratos e aderidas a lamínulas de vidro, foram incubadas com o composto SSO (250 μ M), ou fucoidina (250 μ M), ou dextran sulfato de sódio (250 μ M), ou carragenina-kapa (250 μ M). A seguir, as lamínulas foram estimuladas com DMEM (controle), ou MT-III (0,4 μ M), ou BthTx-II (0,8 μ M) ou seu veículo (<1% de DMSO), por 12 h, a 37 °C e 5% CO₂. A seguir, os CLs foram corados com tetróxido de ósmio e quantificados sob o microscópio de contraste de fase como descrito em Material e Métodos. Os dados representam a média $\pm$ E.P.M de 3-5 animais. *p<0,05 em relação ao DMEM (controle negativo) (ANOVA).

5.13 Efeito da MT-III e da BthTx-II na expressão proteica dos receptores PPAR- γ e β/δ em CMLVs

A expressão proteica do fator de transcrição nuclear PPAR- γ e PPAR- β/δ foi avaliada por *Western blotting*. Para tanto, as CMLVs foram incubadas com a MT-III (0,4 μ M), ou com a BthTx-II (0,8 μ M), ou com DMEM (controle), durante 1, 3, 6 ou 12 h. A Figura 19 (A) representa as bandas imunorreativas para o PPAR- γ , em células incubadas com a MT-III, onde se observa diferença nas bandas de CMLVs incubadas com esta FLA₂, em relação aos controles, nos períodos de tempo de 3 e 6 h. Entretanto, quando estas células foram incubadas com a BthTx-II (19B), foi observado aumento da banda imunorreativa para o PPAR- γ , apenas na 6^a h de incubação com esta proteína, se comparado às células controles. A análise densitométrica dessas bandas, representada na Figura 19 (C), mostra um aumento significativo da expressão de PPAR- γ , nas 3^a e 6^a h de incubação, mas não na 1^a e 12^a h, em CMLVs incubadas com a MT-III, em comparação aos respectivos controles. Em células incubadas com a BthTx-II (figura 19D), a análise densitométrica mostrou o aumento significativo da intensidade da banda imunorreativa para o PPAR- γ apenas na 6^a h de incubação, em relação ao respectivo controle. A Figura 19 (E) representa as bandas imunorreativas para o PPAR- β/δ , em células incubadas com a MT-III, onde se observa que houve aumento nas bandas imunorreativas para o PPAR- β/δ em CMLVs incubadas com esta FLA₂, em relação aos controles, entre a 1^a e 3^a h. No caso da incubação com a BthTx-II, foi observado aumento da banda imunorreativa para o PPAR- β/δ , na 1^a e 6^a h de incubação com a FLA₂, se comparado às células controles (F). A análise densitométrica dessas bandas, representada na Figura 19 (G), confirma que as intensidades das mesmas foi significativamente maior, em CMLVs incubadas com a MT-III, em comparação aos respectivos controles, nos períodos de 1 e 3 h. Em células incubadas com a BthTx-II (H), a análise densitométrica mostrou o aumento significativo da intensidade da banda para o PPAR- β/δ nas 1^a e 6^a h, em relação aos respectivos controles.

Figura 19 - Efeito da MT-III e da BthTx-II na expressão proteica dos PPAR- γ e β/δ em CMLVs. CMLVs isoladas de artérias aorta de ratos e aderidas a placas de cultura de 12 poços, foram incubadas com a MT-III (0,4 μ M), ou BthTx-II (0,8 μ M), ou com DMEM (controle), nos períodos de tempo indicados acima. (A, B, E e F): Bandas imunorreativas representativas do *W. blotting* com anticorpo policlonal anti-PPAR- γ ou β/δ e anti- β -actina, (C, D, G e H): Quantificação, por densitometria, das bandas da PPAR- γ ou β/δ , normalizadas a partir das bandas de β -actina. Os dados representam a média $\pm$ E.P.M. de 3-4 animais (ANOVA).

5.14 Ativação dos PPAR- γ e β/δ em CMLVs incubadas com a MT-III e BthTx-II

Tendo sido observado um aumento do teor proteico tanto do PPAR- γ , quanto do PPAR- β/δ , o próximo passo deste estudo foi avaliar se estes fatores se encontravam ativos nas CMLVs incubadas com as FLA₂s. Para tanto, as CMLVs (1×10^4 células), aderidas a lamínulas, foram incubadas com a MT-III (0,4 μ M), ou BthTx-II (0,8 μ M), ou com meio de cultura apenas (DMEM), por 1 h (PPAR- β/δ) ou 6 h (PPAR- γ), seguido de ensaio de imunofluorescência. A figura 20 ilustra a marcação do núcleo, em vermelho e do PPAR- γ em verde. A figura 20 (A) ilustra as CMLVs controles, após 1 h de incubação com DMEM. Nestas, observou-se uma marcação dispersa para o PPAR- γ , no citoplasma. Quando as células foram incubadas com a MT-III, ou com a BthTx-II, por 1 h, observou-se uma marcação pontual para o PPAR- γ , diferentemente do observado no controle. A sobreposição das imagens evidenciou a colocação do PPAR- γ com o núcleo celular, corado em vermelho, evidenciando a migração deste fator para o núcleo. O mesmo ocorreu em células incubadas por 6 h com a MT-III e com a BthTx-II, em que foi observada a colocação do PPAR- β/δ com o núcleo das células (Figura 20B).

Figura 20 (A) - Efeito da MT-III e da BthTx-II na ativação do PPAR- γ em CMLVs. CMLVs isoladas de artérias aorta de ratos e aderidas a lamínulas de vidro, foram estimuladas com DMEM (controle), ou MT-III (0,4 μ M), ou BthTx-II (0,8 μ M), por 6 h. A seguir, as CMLVs foram incubadas com anticorpo anti-PPAR- γ e com anticorpo secundário conjugado ao AlexaFluor488 (verde), por 1 h, a 37 °C e após, com o iodeto de propídio (vermelho), por 1 h. As lâminas foram analisadas sob microscópio confocal (aumento de 40 x).

Figura 20 (B) - Efeito da MT-III e da BthTx-II na ativação do PPAR- β/δ em CMLVs. CMLVs, isoladas de artérias aorta de ratos e aderidas a lâminulas de vidro, foram estimuladas com DMEM (controle), ou MT-III (0,4 μ M), ou BthTx-II (0,8 μ M), por 1 h. A seguir, as CMLVs foram incubadas com anticorpo anti-PPAR- β/δ e com anticorpo secundário conjugado ao AlexaFluor488 (verde), por 1 h, a 37 °C e após, com o iodeto de propídio (vermelho), por 1 h. As lâminas foram analisadas sob microscópio confocal (aumento de 40 x).

5.15 Efeito dos compostos GW9662 e GSK0660 na formação de CLs induzida pela MT-III e BthTx-II em CMLVs

Para verificar a participação dos fatores de transcrição PPAR γ e β/δ , na formação de CLs induzida pela MT-III ou BthTx-II, as CMLVs foram pré-tratadas com inibidores específicos, o composto GW9662 (100 nm), inibidor do PPAR γ ou o composto GSK0660 (100 nM), inibidor do PPAR- β/δ , ou veículo (controle), durante 1 h. A seguir, as células foram incubadas com a MT-III (0,4 μ M), ou BthTx-II (0,8 μ M), ou DMEM, por 12 h. Nas condições experimentais deste estudo, esses compostos e seus veículos não acarretaram alterações significativas da viabilidade celular (> 90% de células viáveis, ensaio do MTT) (dados não demonstrados). A Figura 21 mostra que as CMLVs controle, incubadas na presença do veículo, apresentaram em média $0,18 \pm 0,05$ CLs/célula. A incubação das células com a MT-III, na concentração de 0,4 μ M, por 12 h, na presença do veículo (controle positivo), causou a formação de $47,9 \pm 1,1$ CLs/célula, que foi significativamente maior que o observado no controle basal. Quando as células foram incubadas com a BthTx-II (0,8 μ M), por 12 h, na presença do veículo, também houve um aumento do número de CLs (39,3 CL/célula) em relação ao controle basal. Quando as CMLVs foram tratadas com o composto GW9662, ou com o composto GSK0660, por 1 h e estimuladas com DMEM, não houve alteração do número basal de CLs ($0,20 \pm 0,1$ CLs/célula). O pré-tratamento das células com ambos os compostos (1 h) aboliu o efeito da MT-III e da BthTx-II, em relação às células incubadas com as mesmas e pré-tratadas com o veículo (controle positivo). O número médio de CLs nos grupos tratados com os inibidores e tratados com a MT-III ou BthTx-II não diferiu daqueles das células tratadas com os inibidores e estimuladas com DMEM.

Figura 21 - Efeito dos compostos GW9662 e GSK0660 na formação de CLs induzida pela MT-III e BthTx-II em CMLVs. CMLVs isoladas de artérias aorta de ratos e aderidas à lamínulas de vidro, foram incubadas com os compostos GW9662 (10 nM) ou GSK0660 (100 nM) ou seu veículo (< 1% de DMSO) durante 1h. A seguir, as lamínulas foram estimuladas com DMEM (controle) ou MT-III (0,4 μ M) ou BthTx-II (0,8 μ M), por 12 h, a 37 °C e 5% CO₂. A seguir, os CLs foram corados com tetróxido de ósmio e quantificados sob o microscópio de contraste de fase como descrito em Material e Métodos. Os dados representam a média $\pm$ E.P.M de 3-5 animais. * p <0,05 em relação ao DMEM (controle negativo) # p <0,05 em relação ao controle (veículo) (ANOVA).

5.16 Efeito dos compostos A922500 e TMP-153 na formação de CLs induzida pela MT-III e BthTx-II em CMLVs

Para verificar a participação das enzimas DGAT ou ACAT, na formação de CLs induzida pela MT-III ou BthTx-II, as CMLVs foram pré-tratadas com inibidores específicos, o composto A922500 (100 nM), inibidor da DGAT, ou TMP-153 (1000 nM), inibidor da ACAT, ou veículo (controle), durante 1 h. A seguir, as células foram incubadas com a MT-III (0,4 μ M), ou BthTx-II (0,8 μ M) ou DMEM, por 12 h. Nas condições experimentais deste estudo, esses compostos e seus veículos não acarretaram alterações significativas da viabilidade celular (> 90% de células viáveis, ensaio do MTT) (dados não demonstrados). A Figura 22 mostra que as CMLVs controles, incubadas com o veículo, apresentaram, em média, $0,18 \pm 0,05$ CLs/célula. A incubação das células com a MT-III, na concentração de 0,4 μ M, por 12 h, na presença do veículo (controle positivo), causou a formação de $47,9 \pm 1,1$ CLs/célula, que foi significativamente maior que o observado no controle basal. Quando as células foram incubadas com a BthTx-II (0,8 μ M), por 12 h, na presença do veículo (controle positivo), também houve um aumento significativo do número de CLs (39,3 CLs/célula), em relação ao controle basal. Quando as CMLVs foram tratadas com os compostos A922500 ou TMP-153, por 1 h e estimuladas com DMEM, não houve alteração do número basal de CLs ($0,20 \pm 0,1$ CLs/célula). O pré-tratamento das células com ambos os compostos aboliu a formação de corpúsculos lipídicos, induzida tanto pela MT-III, quanto pela BthTx-II, em relação às células incubadas com as mesmas e pré-tratadas com o veículo (controle positivo). Não houve diferença significativa do número de CLs entre os grupos tratados com os inibidores e estimulados com as FLA₂s e os grupos tratados com os inibidores e estimulados com DMEM.

Figura 22 - Efeito dos compostos A922500 e TMP-153 na formação de CLs induzida pela MT-III e BthTx-II em CMLVs. CMLVs foram isoladas de artérias aorta de ratos e aderidas a lamínulas de vidro. A seguir, as células foram incubadas com os compostos A922500 (100 nM) ou TMP-153 (1000 nM) ou seu veículo (< 1% de DMSO) durante 1h. A seguir, as lamínulas foram estimuladas com DMEM (controle), ou MT-III (0,4 µM), ou BthTx-II (0,8 µM), por 12 h, a 37 °C e 5% CO₂. Os CLs foram corados com tetróxido de ósmio e quantificados sob o microscópio de contraste de fase, como descrito em Material e Métodos. Os dados representam a média ± E.P.M de 3-5 animais. *p<0,05 em relação ao DMEM (controle negativo) #p<0,05 em relação ao controle positivo (MT-III) &p<0,05 em relação ao positivo (BthTx-II) (ANOVA).

5.17 Efeito das FLA₂s MT-III e BthTx-II na liberação de ácidos graxos em CMLVs

Neste estudo foram caracterizados os principais ácidos graxos, liberados pelas CMLVs sob estímulo das duas FLA₂s ofídicas. Para tanto, CMLVs foram incubadas com a MT-III, ou com a BthTx-II, ou com meio de cultura apenas (controle) por 3 e 12 h. Os lipídeos foram quantificados e identificados por espectrometria de massa. Foram analisados os seguintes ácidos graxos: mirístico (14_0), palmítico (16_0), palmitoleico (16_1), esteárico (18_0), oléico (18_1), linoléico (18_2), eicosenóico (20_1), eicosatrienóico (20_3) e araquidônico (20_4). A figura 23 mostra que a MT-III causou a liberação do ácido graxo monoinsaturado oléico (18_1) e do poliinsaturado ácido linoleico (18_2), na 3^a h de incubação, de forma significativa em comparação às células controles. Ainda, esta sFLA₂ induziu a liberação de ácido oléico na 12^a h. Quando as CMLVs foram incubadas com a BthTx-II, foi observada produção de ácido oléico e linoléico apenas na 12^a h de incubação, que foi significativa em relação as células controle. Na 3^a h de incubação com esta proteína, não foi observada produção de nenhum dos ácidos graxos analisados.

Figura 23 - Liberação de ácidos graxos por CMLVs estimuladas com a MT-III e com a BthTx-II. As CMLVs foram incubadas com DMEM (controle) ou MT-III (0,4 μ M), ou com a BthTx-II (0,8 μ M) por 3 h ou 12 h. A quantificação dos ácidos graxos liberados foi realizada por espectrometria de massa, conforme descrito em Material e Métodos. Os dados representam a média $\pm$ E.P.M. de cinco amostras/tratamento. * $p < 0,05$ em relação às células controles.

5.18 Efeito dos compostos Bel e Pyr-2 α na formação de CLs induzida pela MT-III e BthTx-II em CMLVs

A partir das evidências da literatura de uma interação funcional entre as FLA₂s secretadas e as FLA₂s intracelulares (cFLA₂ e iFLA₂), foi verificada a participação das fosfolipases A₂, intracelulares, na formação de CLs induzida pelas MT-III e BthTx-II. Para tanto, as CMLVs foram pré-tratadas com o composto pirrolidina-2 α (5 μ M), inibidor da FLA₂ citosólica, ou Bel (5 μ M), inibidor da FLA₂ independente de cálcio, ou veículo (< 1% de DMSO) (controle), durante 1 h. A seguir, as células foram incubadas com a MT-III (0,4 μ M), ou BthTx-II (0,8 μ M), ou DMEM, por 12 h. Nas condições experimentais deste estudo, esses compostos e seus veículos não acarretaram alterações significativas da viabilidade celular (>90% de células viáveis, ensaio do MTT) (dados não demonstrados). A Figura 24 mostra que as CMLVs controle, incubadas com o veículo, apresentaram em média $1,7 \pm 0,8$ CLs/célula. A incubação das células com a MT-III, na concentração de 0,4 μ M, por 12 h, na presença do veículo (controle positivo), causou a formação de $25,28 \pm 9,1$ CLs/célula, que foi significativamente maior que o observado no controle basal. Quando as células foram incubadas com a BthTx-II (0,8 μ M), por 12 h, na presença do veículo (controle positivo), também houve um aumento significativo do número de CLs ($25,5 \pm 8,9$ CL/célula), em relação ao controle basal. Quando as CMLVs foram tratadas com os compostos Pyr-2 α ou Bel e estimuladas com DMEM, apenas, não foi observada alteração da formação de CLs, em comparação ao controle basal. Quando as células foram pré-tratadas com o composto Pyr-2 α e incubadas com a MT-III, ou com a BthTx-II, não houve alteração da formação de CLs induzida por estas FLA₂s, em comparação ao controle positivo. De forma semelhante, quando as células foram pré-tratadas com o composto Bel e incubadas com a MT-III, não houve alteração da formação de CLs induzida por esta FLA₂, em relação às CMLVs estimuladas com a MT-III. Entretanto, quando as células foram pré-tratadas com o composto Bel e incubadas com a BthTx-II, houve redução significativa, da ordem de 76%, da formação de CLs induzida por esta FLA₂.

Figura 24 - Efeito dos compostos Pyr-2α e Bel na formação de CLs induzida pela MT-III e BthTx-II em CMLVs. CMLVs foram isoladas de artérias aorta de ratos, aderidas a lamínulas de vidro e incubadas com os compostos Pyr-2α (5μM) ou Bel (5 μM) ou seu veículo (< 1% de DMSO) durante 1h. A seguir, as células foram estimuladas com DMEM (controle) ou MT-III (0,4 μM) ou BthTx-II (0,8 μM), por 12 h, a 37 °C e 5 % CO₂. Os CLs foram corados com tetróxido de ósmio e quantificados sob o microscópio de contraste de fase, como descrito em Material e Métodos. Os dados representam a média ± E.P.M de 3-5 animais. *p<0,05 em relação ao DMEM (controle basal) #p<0,05 em relação ao controle (veículo- BthTx-II) (ANOVA).

5.19 Efeito do composto KH064 na formação de CLs induzida pela MT-III e BthTx-II em CMLVs

Sabe-se que as CMLVs, presentes em lesões ateroscleróticas, expressam níveis elevados de FLA₂s do GIIA (HURT-CAMEJO et al., 1997). Para verificar a participação dessas enzimas na formação de CLs induzida pelas MT-III e BthTx-II, as CMLVs foram pré-tratadas com inibidor KH064 (10 µM) ou seu veículo (controle), durante 1 h. A seguir, as células foram incubadas com a MT-III (0,4 µM) ou BthTx-II (0,8 µM) ou DMEM, por 12 h. Nas condições experimentais deste estudo, este composto e seu veículo não acarretou alterações significativas da viabilidade celular (> 90% de células viáveis, ensaio do MTT) (dados não demonstrados). A Figura 25 mostra que as CMLVs controle, incubadas com o veículo, apresentaram em média $0,18 \pm 0,05$ CLs/célula. A incubação das células com a MT-III, na concentração de 0,4 µM, por 12 h, na presença do veículo (controle positivo), causou a formação de $39,9 \pm 1,1$ CLs/célula, que foi significativamente maior que o observado no controle basal. Quando as células foram incubadas com a BthTx-II (0,8 µM), por 12 h, na presença do veículo, também houve um aumento do número de CLs (46,7 CL/célula). Quando as CMLVs foram pré-tratadas com o composto KH064, por 1 h, não houve alteração do número basal de CLs ($0,45 \pm 0,2$ CLs/célula). Da mesma maneira, o pré-tratamento das células com este composto não alterou a formação de CLs induzida pela MT-III, nem pela BthTx-II, se comparado às células incubadas com as mesmas e pré-tratadas com o veículo (controle positivo).

Figura 25 - Efeito do composto KH064 na formação de CLs induzida pela MT-III e BthTx-II em CMLVs. CMLVs isoladas de artérias aorta de ratos e aderidas a lamínulas de vidro, foram incubadas com o composto KH064 por 1 h e estimuladas com DMEM (controle), ou MT-III (0,4 μ M), ou BthTx-II (0,8 μ M), ou seu veículo (<1% de DMSO), por 12 h, a 37 °C e 5 %CO₂. A seguir, os CLs foram corados com tetróxido de ósmio e quantificados sob o microscópio de contraste de fase, como descrito em Material e Métodos. Os dados representam a média $\pm$ E.P.M de 3-5 animais. *p<0,05 em relação ao DMEM (controle negativo) (ANOVA).

5.20 Efeito do composto dinasor na formação de CLs induzida pela MT-III e BthTx-II em CMLVs

Para verificar a participação do processo de endocitose na formação de CLs induzida pelas sFLA₂s ofídicas, as CMLVs foram pré-tratadas com o composto dinasor (100 μ M), um inibidor da proteína do citoesqueleto dinamina conhecido por bloquear completamente a endocitose mediada por receptores, ou seu veículo (controle), durante 1 h. A seguir, as células foram incubadas com a MT-III (0,4 μ M), ou BthTx-II (0,8 μ M), ou DMEM, por 12 h. Nas condições experimentais deste estudo, este composto e seu veículo não acarretou alterações significativas da viabilidade celular (> 90% de células viáveis, ensaio do MTT) (dados não demonstrados). A Figura 26 mostra que as CMLVs controle, incubadas com o veículo, apresentaram em média $0,36 \pm 0,05$ CLs/célula. A incubação das células com a MT-III, na concentração de 0,4 μ M, por 12 h, na presença do veículo (controle positivo), causou a formação de $26,6 \pm 1,1$ CLs/célula, que foi significativamente maior que o observado no controle basal. Quando as células foram incubadas com a BthTx-II (0,8 μ M) por 12 h na presença do veículo, também houve um aumento do número de CLs (26,8 CL/célula). Quando as CMLVs foram pré-tratadas com o composto dinasor, por 1 h, não houve alteração do número basal de CLs ($0,48 \pm 0,3$ CLs/célula). Da mesma maneira, o pré-tratamento das células com este composto não alterou a formação de CLs induzida nem pela MT-III, nem pela BthTx-II, em relação às células incubadas com as mesmas e pré-tratadas com o veículo (controle positivo).

Figura 26 - Efeito do composto dinasore na formação de CLs induzida pela MT-III e BthTx-II em CMLVs. CMLVs isoladas de artérias aorta de ratos e aderidas a laminulas de vidro, foram incubadas com o composto dinasore (100 μ M) por 1 h e estimuladas com DMEM (controle), ou MT-III (0,4 μ M), ou BthTx-II (0,8 μ M), ou seu veículo (<1% de DMSO), por 12 h, a 37 °C e 5% CO₂. A seguir, os CLs foram corados com tetróxido de ósmio e quantificados sob o microscópio de contraste de fase como descrito em Material e Métodos. Os dados representam a média $\pm$ E.P.M de 3-5 animais. * $p < 0,05$ em relação ao DMEM (controle negativo) (ANOVA).

5.21 Efeito dos compostos Wortmanina e LY294002 na formação de CLs induzida pela MT-III e BthTx-II em CMLVs

Estudos recentes demonstraram que a captação de lipídios em CMLVs também ocorre por um processo denominado macropinocitose, que é dependente da PI3K (CHELLAN et al., 2016; RIVERA et al., 2013). Nesse sentido, os inibidores de PI3K (wortmanina e LY294002) são considerados inibidores clássicos do processo de macropinocitose. Para verificar a participação do processo de macropinocitose na formação de CMLVs espumosas induzida pelas sFLA₂s MT-III e BthTx-II, as CMLVs foram pré-tratadas com os compostos wortmanina (2 μ M), ou o composto LY294002 (100 μ M), ou seu veículo (controle), durante 1 h. A seguir, as células foram incubadas com a MT-III (0,4 μ M), ou BthTx-II (0,8 μ M), ou DMEM, por 12 h. Nas condições experimentais deste estudo, esses compostos e seus veículos não acarretaram alterações significativas da viabilidade celular (> 90% de células viáveis, ensaio do MTT) (dados não demonstrados). A Figura 27 mostra que as CMLVs controles, incubadas com o veículo, apresentaram em média $0,40 \pm 0,03$ CLs/célula. A incubação das células com a MT-III, na concentração de 0,4 μ M, por 12 h, na presença do veículo (controle positivo), causou a formação de $30,5 \pm 1,1$ CLs/célula, que foi significativamente maior que o observado no controle basal. Quando as células foram incubadas com a BthTx-II (0,8 μ M) por 12 h na presença do veículo, também houve um aumento do número de CLs (32,3 CL/célula). Quando as CMLVs foram pré-tratadas com os compostos não houve alteração do número basal de CLs ($0,24 \pm 0,2$ CLs/célula). Entretanto, as CMLVs pré-tratadas com a wortmanina e incubadas com as MT-III ou BthTx-II, apresentaram redução expressiva da formação de CLs (70 e 60,8%, respectivamente), que foi significativa em relação as células controle positivas. De forma semelhante, o o pré-tratamento das células com o composto LY294002 confirmou esses dados e causou redução significativa da formação de CLs, em CMLVs incubadas tanto com a MT-III (42%), quanto com a BthTx-II (32,6%).

Figura 27 - Efeito dos compostos wortmanina e LY294002 na formação de CLs induzida pela MT-III e BthTx-II em CMLVs. CMLVs isoladas de artérias aorta de ratos e aderidas a lamínulas de vidro, foram incubadas com os compostos wortmanina (2 μ M) e LY294002 (100 μ M) por 1 h e estimuladas com DMEM (controle), ou MT-III (0,4 μ M), ou BthTx-II (0,8 μ M), ou seu veículo (<1% de DMSO), por 12 h, a 37 °C e 5% CO₂. A seguir, os CLs foram corados com tetróxido de ósmio e quantificados sob o microscópio de contraste de fase como descrito em Material e Métodos. Os dados representam a média $\pm$ E.P.M de 3-5 animais. * p <0,05 em relação ao DMEM (controle negativo) (ANOVA).

5.22 Efeito da MT-III e da BthTx-II na expressão protéica das proteínas de efluxo ABCA1 e ABCG1 em CMLVs

A expressão protéica das proteínas de efluxo ABCA1 e ABCG1 foi analisada por Western blotting, em CMLVs incubadas com a MT-III (0,4 μ M), ou com a BthTx-II (0,8 μ M), ou com DMEM (controle), durante 1, 3, 6 ou 12 h. A Figura 28A representa as bandas imunorreativas para a ABCA1, em que observa-se aumento da intensidade das bandas imunorreativas, obtidas de células incubadas com a MT-III, pelos períodos de 3 e 12 h. Entretanto, quando as células foram incubadas com a BthTx-II, não houve alteração da intensidade das bandas para ABCA1 em nenhum dos períodos de tempo analisados se comparadas as bandas obtidas das CMLVs controles (Figura 28B). A análise densitométrica destas bandas, representada na Figura 28C, confirma que as intensidades das mesmas, em CMLVs incubadas com a MT-III, foram significativamente maiores que os controles após 3 e 12 h de incubação. Em CMLVs incubadas com a BthTx-II não houve diferença significativa em relação aos controles, em nenhum dos períodos de tempo estudados (Figura 28D).

Como demonstrado na Figura 28E, observa-se que a incubação das células com a MT-III induziu um aumento das bandas imunoreativas para a ABCG1, após 3 h de incubação, em comparação às células controles. Por outro lado, a incubação das células com a Bthtx-II induziu o aumento do teor protéico para a ABCG1 após 1 h de incubação (Figura 28F). A análise densitométrica das bandas confirmou esses dados, demonstrando um aumento significativo da expressão tanto de ABCG1 em células incubadas tanto com a MT-III, quanto com a BthTx-II (Figuras 28G e H).

Figura 28 - Efeito das MT-III e da BthTx-II na expressão protéica das proteínas de efluxo ABCA1 e ABCG1 em CMLVs. As CMLVs, isoladas de artérias aorta de ratos eaderidas a placas de cultura de 12 poços, foram incubadas com a MT-III (0,4 μ M), ou BthTx-II (0,8 μ M), ou com DMEM (controle), nos períodos de tempo indicados acima. (A, B, E e F): Bandas imunorreativas representativas do *W. blotting* com anticorpo policlonal anti-ABCA1 ou anti-ABCG1 e anti- β -actina, (C, D, G e H): Quantificação, por densitometria, das bandas de ABCA1 ou ABCG1, normalizadas a partir das bandas de β -actina. Os dados representam a média $\pm$ E.P.M. de 3-4 animais. * $p < 0,05$ em relação ao DMEM (controle) (ANOVA).

5.23 Efeito da MT-III na produção de citocinas por CMLVs

Para investigar a ação estimulatória das fosfolipases A₂ MT-III e BthTx-II em CMLVs, relacionadas à liberação de mediadores inflamatórios, avaliou-se a liberação das citocinas IL-1, IL-6, TNF- α , MCP-1 e fractalcina, por ensaio imunoenzimático. Para tanto, as CMLVs (1×10^6 células), aderidas a microplacas de 6 poços, foram pré-incubadas com a MT-III (0,4 μ M) ou com meio de cultura apenas (DMEM), por 1 a 12 h. A Figura 29A mostra que as CMLVs controles apresentaram uma liberação basal média de 29.1 ± 51 pg/mL de fractalcina, ao longo de 12 h. A adição da MT-III causou aumento significativo da liberação desta quimiocina após 3 e 12 h de incubação, em comparação aos respectivos controles. Ainda, a incubação das CMLVs com a MT-III induziu a liberação de MCP-1, na 3^a e 6^a de incubação, de forma significativa em relação as células controle (índices não detectáveis) (Fig. 29C). Da mesma forma, a incubação das células com a MT-III induziu um aumento significativo de IL-6 na 12^a h de incubação, que foi significativo em relação às células controle ($786,4 \pm 109$ pg/mL) (Fig. 29E). A liberação de IL-1 β e TNF- α , tanto em células controles, quanto tratadas com a MT-III não foi suficiente para ser detectada. Por sua vez, a incubação das CMLVs com a sFLA₂ BthTx-II induziu o aumento da liberação de fractalcina na 1^a e 6^a h de incubação, que foi significativo em relação as células controles ($12,9 \pm 2$ pg/mL e $7,2 \pm 0,7$ pg/mL, respectivamente) (Figura 29B). Ainda, esta FLA₂ induziu a liberação de MCP-1, nos períodos de 6 e 12 h após a incubação com a FLA₂, que foi significativo em relação as células controles (Figura 29D). De forma similar, a BthTx-II induziu a liberação de IL-6, na 6^a e 12^a h de incubação se comparado às células controles (Figura 29F). A liberação de TNF- α e IL-1 β não foi detectada em células incubadas com a BthTx-II.

Figura 29 - Decurso temporal do efeito da MT-III e da BthTx-II na liberação de IL-1 β , IL-6, TNF- α , MCP-1 e fractalcina por CMLVs. As CMLVs aderidas a placas de 12 poços, foram incubadas com a MT-III (0.4 μ M), ou BthTx-II (0.8 μ M), ou DMEM (controle) e após os intervalos de tempo indicados acima, os sobrenadantes foram coletados para quantificação das concentrações das citocinas por ensaio Multiplex, como descrito em Material e Métodos. Os dados representam a média $\pm$ EPM de 4 amostras. * $p < 0,05$ em relação ao controle (ANOVA).

5.24 Efeito da MT-III e da BthTx-II na expressão protéica da COX-1 e da COX-2 em CMLVs

A expressão protéica das COX-1 e -2 foi analisada por Western blotting, em CMLVs incubadas com a MT-III (0,4 μ M), ou com a BthTx-II (0,8 μ M), ou com DMEM (controle), durante 1, 3, 6 ou 12 h. A Figura 30 (A e B) representa as bandas imunorreativas para a COX-1, em que observa-se que não houve alteração das mesmas, em CMLVs estimuladas tanto com a MT-III, quanto com a BthTx-II, entre 1 e 12 h, se comparadas aos respectivos controles. A análise densitométrica destas bandas, representada nas Figuras 30 (C e D), confirma que as intensidades das mesmas, não foram significativamente diferentes daquelas dos respectivos controles, em todos os períodos de tempo estudados.

A seguir, foi realizado o estudo do teor protéico da COX-2, em CMLVs tratadas com a MT-III, ou com a BthTx-II, nas mesmas concentrações, ou DMEM (controle). Como demonstrado nas Figuras 30 (E e F) observa-se que, a incubação das células, tanto com a MT-III, quanto com a BthTx-II, induziu um aumento das bandas imunoreativas para a COX-2, nas 3^a e 6^a hs de incubação, em comparação aos respectivos controles. A análise densitométrica destas bandas (Figura 30 G e H) confirmou esses dados, demonstrando um aumento significativo da expressão de COX-2, em células incubadas com a MT-III, ou BthTx-II, nos períodos de 3 e 6 h, em comparação às células controles. Nos períodos de 1 h e 12 h de incubação com as sFLA₂s, não houve diferença significativa na expressão de COX-2 em relação aos respectivos controles.

Figura 30 - Efeito da MT-III e da BthTx-II na expressão protéica das COX-1 e COX-2 em CMLVs. As CMLVs, isoladas de artérias aorta de ratos e aderidas a placas de cultura de 12 poços, foram incubadas com a MT-III (0,4 μ M), ou BthTx-II (0,8 μ M), ou DMEM (controle), nos períodos de tempo indicados acima. (A, B, E e F): Bandas imunorreativas representativas do *W. blotting* com anticorpo policlonal anti-COX-1 ou COX-2 e anti- β -actina, (C, D, G e H): Quantificação, por densitometria, das bandas da PLIN2, normalizadas a partir das bandas de β -actina. Os dados representam a média $\pm$ E.P.M. de 3-4 animais. * $p < 0,05$ em relação ao DMEM (controle) (ANOVA).

5.25 Distribuição da COX-1 e da COX-2 em CMLVs estimuladas pela MT-III e BthTx-II

Para investigar a possível relação entre os CLs e mediadores lipídicos, avaliou-se a distribuição das COX-1 e COX-2 e sua colocalização com CLs, na vigência de ação da MT-III ou da BthTx-II em CMLVs. Este estudo foi realizado por ensaio de imunofluorescência. Para tanto, as CMLVs, aderidas a lamínulas de vidro, foram incubadas com a MT-III (0,4 μ M), ou BthTx-II (0,8 μ M), ou DMEM (controle), por 6 h. As figuras 31 e 32 ilustram a marcação dos lipídios neutros em vermelho e da COX-1 e COX-2 em verde. Em (A) estão as células controles. Nestas, observa-se uma marcação difusa para os lipídios neutros e para a COX-1 e ausência de marcação para COX-2 no citoplasma. Quando as células foram incubadas com a MT-III (B), ou com a BthTx-II (C), por 6 h, observou-se uma marcação acentuada e pontual de *pools* citoplasmáticos de COX-1 e de COX-2, que co-localizaram com lipídios neutros, no período de tempo estudado.

Figura 31 - Efeito da MT-III e da BthTx-II na distribuição e localização do sistema ciclooxygenase-1 em CMLVs. CMLVs isoladas de artérias aorta de ratos e aderidas a laminulas de vidro, foram estimuladas com DMEM (controle), ou MT-III (0,4 μ M), ou BthTx-II (0,8 μ M), por 6 h. A seguir, as CMLVs foram incubadas com anticorpo anti-COX-1 e com anticorpo secundário conjugado ao AlexaFluor488 (verde), por 1 h, a 37 °C e após, com o NileRed (vermelho), por 1 h. As lâminas foram analisadas sob o microscópio confocal (aumento de 63 x, com zoom de 2 x).

Figura 32 - Efeito da MT-III e da BthTx-II na distribuição e localização de enzimas do sistema ciclooxigenase-2 em CMLVs. CMLVs, isoladas de artérias aorta de ratos e aderidas a lâminulas de vidro foram estimuladas com DMEM (controle), ou MT-III (0,4 μ M), ou BthTx-II (0,8 μ M), por 6 h. A seguir, as CMLVs foram incubadas com anticorpo anti-COX-2 e com anticorpo secundário conjugado ao AlexaFluor488 (verde), por 1 h, a 37 °C e após, com o Nile red (vermelho), por 1 h. As lâminas foram analisadas sob o microscópio confocal (aumento de 63 x, com zoom de 2 x).

5.26 Efeito da MT-III e da BthTx-II na produção da PGE₂ , PGI₂ e TXA₂ por CMLVs

A liberação dos mediadores lipídicos PGE₂ , PGI₂ e TXA₂ por CMLVs, na vigência da ação da MT-III e da BthTx-II foi avaliada nos sobrenadantes das culturas, por ensaio imunoenzimático. Para tanto, as CMLVs (1×10^6 células), aderidas a microplacas de 6 poços, foram incubadas com a MT-III (0,4 μ M), ou BthTx-II (0,8 μ M), ou com meio de cultura apenas (DMEM), por 1 a 12 h. A Figura 33 mostra que as CMLVs controles apresentaram uma liberação basal média de 180 ± 51 pg/mL de PGE₂, ao longo de 12 h. A adição da MT-III causou aumento significativo da liberação deste prostanóide, após 1 e 12 h de incubação, em comparação aos controles. Da mesma forma, quando as células foram incubadas com a BthTx-II, houve um aumento da liberação de PGE₂ entre a 3^a e 12^a h. A análise estatística demonstrou que não houve diferença significativa entre as duas sFLA₂s, quanto à liberação de PGE₂ nos períodos de 3 e 12 h, entretanto, a liberação de PGE₂ induzida pela BthTx-II, em 6 h, foi significativamente maior que a induzida pela MT-III neste período de tempo. Da mesma forma, tanto a MT-III, quanto a BthTx-II foram capazes de induzir a liberação de PGI₂. A MT-III induziu aumento da produção deste prostanóide na 1, 3 e 12^a h de incubação, de forma significativa em relação as células controles. A BthTx-II, por sua vez, induziu aumento significativo de PGI₂ na 1 e 3^a h de incubação, em comparação aos controles. Em adição, ambas induziram aumento da produção de TXA₂ na 6^a h de incubação, em comparação aos respectivos controles.

Figura 33 - Liberação de PGE₂, PGI₂ e TXA₂ induzida pela MT-III e pela BthTx-II em CMLVs. As CMLVs de artéria aorta de ratos (1x10⁶ células) foram incubadas com a MT-III (0,4 µM), ou com a BthTx-II (0,8 Mm), ou meio de cultura apenas (Controle), por 1, 3, 6 e 12 h, a 37 °C e 5% de CO₂. As concentrações de PGE₂, PGI₂ e TXA₂ nos sobrenadantes das culturas foram avaliadas por EIA, como descrito em Material e Métodos. Os dados representam a média E.P.M. de 4-5 animais. *p< 0,05 em relação aos controles. (ANOVA).

5.27 Distribuição da prostaglandina E₂ em CMLVs estimuladas pela MT-III e BthTx-II

Considerando que os CLs são importantes sítios relacionados à síntese de mediadores lipídicos, avaliou-se a co-localização da PGE₂ com os CLs, na vigência da ação da MT-III e BthTx-II em CMLVs, a partir de ensaios de imunofluorescência. Para tanto, CMLVs, aderidas a lamínulas de vidro, foram incubadas com DMEM (controle), ou MT-III (0,4 µM), ou BthTx-II (0,8 µM), por 3 h. A figura 34 ilustra a marcação dos lipídios neutros em vermelho e da PGE₂ em verde. A figura 34 ilustra em (A) as CMLVs controles. Nestas, observa-se ausência de marcação para os lipídios neutros e para a PGE₂, no citoplasma. Quando as células foram incubadas com a MT-III (B), ou com a BthTx-II (C), por 3 h, observou-se uma marcação acentuada e pontual de *pools* citoplasmáticos de PGE₂, que co-localizaram com lipídios neutros, no período de tempo estudado.

Figura 34 - Efeito da MT-III e da BthTx-II na distribuição e localização da PGE_2 em CMLVs. CMLVs, isoladas de artérias aorta de ratos e aderidas a lâminulas de vidro, foram estimuladas com DMEM (controle), ou MT-III (0,4 μ M), ou BthTx-II (0,8 μ M), por 3 h. A seguir, as CMLVs foram incubadas com anticorpo anti- PGE_2 e com anticorpo secundário conjugado ao FITC (verde), por 1 h, a 37 °C e após, com o NileRed (vermelho), por 1 h. As lâminas foram analisadas sob o microscópio confocal (aumento de 40 x).

5.28 Efeito dos compostos valeril salicilato e NS-398 na formação de CLs induzida pela MT-III e BthTx-II em CMLVs

Para verificar a participação dos mediadores provenientes das COX-1 e -2, na formação de CLs induzida pela MT-III e BthTx-II, as CMLVs foram pré-tratadas com os compostos valeril salicilato (30 μ M), inibidor da COX-1, ou NS-398 (10 μ M), inibidor da COX-2, ou veículo (controle), durante 1 h. A seguir, as células foram incubadas com a MT-III (0,4 μ M), ou BthTx-II (0,8 μ M), ou DMEM, por 12 h. Nas condições experimentais deste estudo, esses compostos e seus veículos não acarretaram alterações significativas da viabilidade celular (> 90% de células viáveis, ensaio do MTT) (dados não demonstrados). A Figura 35 mostra que as CMLVs controles, incubadas apenas com o veículo, apresentaram, em média, $1,7 \pm 0,8$ CLs/célula (controle basal). A incubação das células com a MT-III, na concentração de 0,4 μ M, por 12 h, na presença do veículo (controle positivo), causou a formação de $25,3 \pm 9,4$ CLs/célula, que foi significativamente maior que o observado no controle basal. Quando as células foram incubadas com a BthTx-II (0,8 μ M), por 12 h, na presença do veículo (controle positivo), também houve um aumento significativo do número de CLs ($39,3 \pm 7,3$ CL/célula), em relação ao controle basal. Quando as CMLVs foram incubadas apenas com os compostos valeril salicilato ou NS-398 (controle negativo), por 1 h, não houve alteração do número basal de CLs ($1,5 \pm 0,9$ CLs/célula). O pré-tratamento das células com os inibidores não alterou a formação de corpúsculos lipídicos, induzida pela MT-III, ou pela BthTx-II, em relação às células incubadas com as mesmas e pré-tratadas com o veículo (controle positivo).

Figura 35 - Efeito dos compostos valeril salicilato e NS-398 na formação de CLs induzida pela MT-III e BthTx-II em CMLVs. CMLVs, foram isoladas de artérias aorta de ratos, aderidas a lâminulas de vidro e incubadas com o valeril salicilato (30 μ M), ou NS-398 (10 μ M), ou seu veículo (< 1% de DMSO), durante 1 h. A seguir, as células foram estimuladas com DMEM (controle), ou MT-III (0,4 μ M), ou BthTx-II (0,8 μ M), por 12 h, a 37 °C e 5% CO₂. Os CLs foram corados com tetróxido de ósmio e quantificados sob o microscópio de contraste de fase, como descrito em Material e Métodos. Os dados representam a média $\pm$ E.P.M de 3-5 animais. * p <0,05 em relação ao DMEM (controle negativo) (ANOVA).

5.29 Efeito da MT-III na atividade fagocítica de CMLVs

Para investigar se a MT-III seria capaz de induzir as CMLVs a adquirirem aspectos funcionais de macrófagos, foi avaliada a capacidade desta sFLA₂ induzir atividade fagocítica em CMLVs. Para tanto, as CMLVs foram incubadas com a MT-III, nas concentrações de 0,4 e 0,8 μM por 12, 24 e 48 h. A seguir, foram adicionadas *beads* fluorescentes, de 0,5 μm , por um período de 6 h. A figura 36 mostra que as CMLVs controles apresentam baixa atividade fagocítica (1 *beads*/célula). Entretanto, quando estas células foram incubadas com a MT-III (0,4 and 0,8 μM), por 48 h, houve um aumento significativo do número de *beads* nas células (489 and 613%, respectivamente) se comparado aos controles. Nos períodos de 12 e 24 h de incubação com a MT-III, não foi observada alteração da atividade fagocítica por CMLVs, em relação aos respectivos controles.

Figura 36 - Atividade fagocítica de CMLVs estimuladas pela MT-III. CMLVs foram tratadas com a MT-III (0,4 e 0,8 μM) ou DMEM (controle), por 12, 24 e 48 h. A seguir, foi realizada incubação com *beads* fluorescentes (vermelhas) de 0,5 μm , por 6 h. As células foram processadas como descrito em Material e Métodos e incubadas com marcador nuclear Hoechst 33342 (azul). As análises foram realizadas em microscópio automatizado Axiovert 200m para a quantificação do número de *beads*/ célula, como descrito em Material e Métodos. A. Fotomicrografia representativa do efeito da MT-III na função fagocítica de CMLVs na 48ª h. B. Número de beads, após a incubação das CMLVs com MT-III (0,4 e 0,8 μM) ou meio de cultura (controle), pelos intervalos indicados acima. Cada valor representa a média $\pm$ E.P.M de 3-5 animais. * $p < 0,05$ em relação ao DMEM (controle negativo) (ANOVA).

5.30 Efeito da MT-III na expressão de genes relacionados a CMLVs e macrófagos

A expressão de genes marcadores de macrófagos (CD68, MAC2 e CD163) e de CMLVs (alfa actina, SM22 α e MYH11), em células incubadas com a MT-III, foi avaliada 48 h após a incubação das CMLVs com a MT-III (0,4 ou 0,8 μ M). A figura 37 mostra que a incubação das CMLVs com a MT-III induziu aumento da expressão dos genes CD68 e MAC2 (223% e 274%, respectivamente), de forma significativa, em relação às células controles, mas não alterou a expressão de CD163. Na concentração de 0,8 μ M, a MT-III também induziu aumento da expressão dos genes CD68 e MAC2 (92% e 273%, respectivamente), que foi significativo em relação às células controles. A expressão de CD163 não foi alterada, em comparação ao controle. Com relação aos genes de CMLVs, não foi observada alteração na expressão de genes para alfa actina, SM22 α e miosina de cadeia pesada, em células incubadas com a MT-III (0,4 e 0,8 μ M), em nenhum dos períodos de tempo analisados.

Figura 37 - Efeito da MT-III na expressão de genes relacionados a macrófagos e a CMLVs, em CMLVs. As CMLVs foram incubadas com a MT-III (0,4 ou 0,8 μ M), ou meio de cultura (controle), por 48 h e os mRNAs, relacionados aos genes acima citados, foram quantificados por PCR em tempo real, como descrito em Material e Métodos. Os valores representam a média $\pm$ SEM de 5 animais (ANOVA).

6 DISCUSSÃO

Neste estudo, foi investigada a capacidade da fosfolipase A₂ MT-III, cataliticamente ativa, isolada do veneno da serpente *Bothrops asper*, induzir a formação de CLs, em células de músculo liso em cultura e a participação de alguns fatores envolvidos na síntese e metabolismo de lipídeos nesse evento. Em adição, para avaliar a importância da atividade catalítica de FLA₂, foi utilizada a FLA₂ BthTx-II, uma sFLA₂ Asp49 isolada do veneno de *Bothrops jararacussu*, destituída de atividade enzimática. Essa enzima, assim como a MT-III, possui efeito inflamatório marcante, atividade hemolítica e agregante de plaquetas (BONFIM et al., 2009; FULY et al., 2004; GUTIERREZ et al., 1991; HOMSI-BRANDEBURGO et al., 1988). Considerando a alta similaridade estrutural da BthTx-II com a MT-III, esta FLA₂ constitui uma ferramenta científica útil para o estudo da importância da atividade catalítica de FLA₂ para a formação de CLs.

No presente estudo, os resultados mostraram que tanto a MT-III, quanto a BthTx-II induziram, de modo marcante, a formação de CLs em CMLVs. A análise do perfil temporal, da formação dessas inclusões, evidenciou um efeito de instalação rápida, que perdurou até a 12^a h de estimulação. Apesar da formação precoce de CLs em CMLVs incubadas com a BthTx-II, esta FLA₂ induziu a formação destas inclusões apenas a partir da concentração de 0,8 µM, ou seja, o dobro da concentração utilizada para a MT-III. A diferença de concentração entre as fosfolipases A₂, necessária para causar a formação de CLs provavelmente se deve ao fato da BthTx-II não possuir atividade catalítica. Estes dados, estão de acordo com Leiguez et al. (2011) e Furtado et al. (2014), que demonstraram, respectivamente, que a MT-III, isolada do veneno de *Bothrops asper* e FLA₂s ácidas e básicas, isoladas do veneno de *Bothrops atrox*, induziram a formação de CLs em macrófagos. Além disso, de modo similar ao observado com a BthTx-II, demonstramos recentemente, que a MT-II, uma fosfolipase A₂ Lys49, destituída de atividade catalítica, induziu a formação de CLs, em macrófagos peritoneais murinos, apenas a partir da concentração de 0,8 µM (GIANNOTTI, et al., 2013).

As análises por microscopia eletrônica de transmissão confirmaram a formação de CLs em CMLVs e evidenciaram CLs fracamente eletrondensos, em CMLVs estimuladas pela MT-III e pela BthTx-II. Ainda, foi observada uma íntima associação entre os CLs e o retículo endoplasmático, bem como dilatações das

cisternas desta organela em células incubadas com as sFLA₂s estudadas. Recentemente, o retículo endoplasmático, foi considerado o sítio de biogênese dos CLs (OST et al., 2005, TAN et al., 2014). Neste sentido, a associação entre o retículo endoplasmático e as inclusões lipídicas, bem como o aumento de regiões específicas desta organela, observados no presente estudo, sugerem que a formação de CLs, induzida pelas sFLA₂s, ocorra a partir desta organela. De forma semelhante, em macrófagos incubados com a MT-III, também foi verificada uma expansão do RE (LEIGUEZ et al., 2011). Esse dado sugere que os CLs tenham o mesmo sítio de biogênese, tanto em macrófagos, quanto em CMLVs. Por outro lado, os CLs induzidos pela MT-III, em CMLVs, são diferentes daqueles observados em macrófagos, uma vez que nestas células, a MT-III induziu a formação de CLs fortemente eletrondensos e com depósito de material granular na periferia destas organelas (LEIGUEZ et al., 2011). A diferença de eletrondensidade do CL observada entre CMLV e macrófagos, pode estar relacionada ao tipo de lipídio liberado, na vigência da ação da FLA₂, uma vez que, em macrófagos, a MT-III induziu a liberação dos ácidos graxos palmítico, palmitoleico e esteárico e, em CMLVs, esta sFLA₂, assim como a BthTx-II, induziu a liberação de ácido oléico e linoléico apenas. Vale ressaltar que esta é a primeira demonstração da capacidade de sFLA₂s induzirem a formação de CMLVs espumosas. Ainda, os dados aqui obtidos reforçam as ações pró-aterogências desempenhadas por esta classe de enzimas.

A importância das CMLVs em fenótipo sintético, para o desenvolvimento da placa aterosclerótica está bem estabelecida na literatura, como mencionado na Introdução. Por este motivo, todos os estudos desta pesquisa foram realizados com células neste fenótipo. Contudo, consideramos relevante avaliar se, na presente condição experimental, as CMLVs em fenótipo contrátil também seriam capazes de acumular lipídios sob a forma de CLs. Os resultados demonstraram que a nem MT-III e nem a BthTx-II induziram a formação de CLs, em CMLVs em fenótipo contrátil, nas mesmas concentrações em que causaram o aumento do número dessas organelas, em células no fenótipo sintético. De modo similar, a literatura demonstra que as CMLVs, no fenótipo contrátil, incubadas com soro hiperlipidêmico a 10%, por 4 dias, não foram capazes de acumular lipídios (CAMPBELL et al., 1983, CAMPBELL, CAMPBELL et al., 1985, 2012). Por outro lado, estudos realizados *in vivo* demonstraram que as CMLVs, em fenótipo sintético, isoladas da artéria carótida de coelhos, acumularam lipídios, em animais submetidos a uma dieta contendo 1%

de colesterol (CAMPBELL et al., 1986). Desta forma, os dados do presente estudo corroboram a hipótese corrente na literatura, de que o acúmulo de lipídios, em CMLVs, ocorre apenas em processos fisiopatológicos, quando estas células já se apresentam em fenótipo sintético.

A formação de CLs, em diferentes tipos celulares, está relacionada à ação de proteínas da família das perilipinas. A PLIN2 é considerada um arcabouço dessas inclusões (LARIGAUDERIE et al., 2004), por apresentar a capacidade de ligação a ácidos graxos de cadeia longa e favorecer a sua captação (GAO et al., 2000). Como mencionado na Introdução, em condições fisiológicas, a PLIN2, constitutiva, encontra-se em membranas plasmáticas. Porém, em condições em que há um aumento dos ácidos graxos livres, ocorre a mobilização desta proteína, para o citoplasma, que acredita-se ser dependente de proteínas motoras do citoesqueleto, dentre as quais a dineína (ANDERSSON et al., 2006; BOSTROM et al., 2005). Neste contexto, os resultados do presente estudo demonstraram a formação de *pool/s* da proteína PLIN2 no citoplasma das CMLVs, após estímulo pela MT-III e pela BthTx-II, indicando a capacidade de ambas recrutarem e mobilizarem esta proteína. Os mecanismos envolvidos neste efeito, contudo, não foram investigados. Ainda, considerando que os *pool/s* de PLIN2, co-localizaram com os CLs, a mobilização desta proteína para o citoplasma, deve representar um mecanismo importante para a formação de CLs induzida por essas fosfolipases A_2 . Para melhor detalhar os efeitos das duas sFLA₂s ofídicas, avaliou-se o teor protéico da PLIN2. Os resultados obtidos mostraram que a BthTx-II induziu aumento do teor protéico da PLIN2, nas 6^a e 12^a hs de incubação. Entretanto, a MT-III não causou o mesmo efeito. Considerando que a PLIN2 é uma proteína constitutiva e que o seu recrutamento para locais específicos do citoplasma acarreta a formação de novos CLs, a mobilização da proteína constitutiva, pelas duas sFLA₂s estudadas, deve ser suficiente para causar a formação dessas inclusões, nos períodos de incubação estudados. Por outro lado, uma vez que a BthTx-II induziu um maior número de CLs, se comparado à MT-III, o aumento do teor protéico da PLIN2, nos períodos de 6 e 12 h, deve constituir um mecanismo adicional para o efeito deste homólogo de FLA₂. A ausência de maior teor protéico, observado em células incubadas com a MT-III, difere dos dados da literatura, que demonstraram o aumento no teor protéico da PLIN2, em macrófagos estimulados com esta FLA₂ Asp49 (LEIGUEZ et al., 2011). Ainda, em contraste aos nossos dados, Liorente-Corte's et al., (2007)

demonstraram a colocalização da PLIN2 e aumento do mRNA para esta proteína, em CMLVs estimuladas por agregados de LDL.

A PLIN3 é uma proteína amplamente expressa em diversos tipos celulares e importante para a formação de CLs, em células submetidas a grandes quantidades de lipídeos livres (SKINNER et al., 2009; WOLINS et al., 2001). Portanto, o próximo passo deste estudo foi avaliar o possível aumento do teor protéico e o recrutamento da PLIN3, em CMLVs estimuladas com a MT-III ou a BthTx-II. As análises por imunofluorescência demonstraram que estas proteínas induziram o recrutamento da PLIN3 para o citoplasma e co-localização com os CLs. Entretanto, não houve alteração do perfil de expressão protéica desta perilipina nos períodos de tempo estudados. Estes dados apontam que o recrutamento da PLIN3, também contribui para a formação de CLs, induzida pelas duas fosfolipases A_2 . Estes dados estão de acordo com a literatura, que demonstra o recrutamento da PLIN3 em situações de acúmulo lipídico intracelular e a sua contribuição para a formação de CLs, embora exerça um papel secundário para a formação dessas organelas e atue, principalmente, como um mecanismo compensatório, na ausência de PLIN2 (SZTALRYD et al., 2006).

Assim como os macrófagos, as CMLVs expressam uma ampla gama de receptores *scavengers* (MIETUS-SNYDER et al., 1997, MIETUS-SNYDER et al., 2000, YAN et al., 2011). Dentre estes receptores, destacam-se os receptores *scavengers* da classe A (SR-A) e da classe B, como o CD36 (SR-B2) e o receptor clássico para LDL oxidado, LOX-1. Estes receptores são importantes para a captação de lipoproteínas modificadas (oxidadas ou acetiladas) e para a formação de células espumosas. Neste sentido, os resultados do presente estudo, demonstraram que a incubação das CMLVs com a MT-III e com a BthTx-II induziu um aumento da expressão dos receptores SR-A1 e LOX-1, em CMLVs. A BthTx-II induziu, adicionalmente, o aumento do teor protéico de CD36 nessas células. Apesar disso, nenhum destes receptores contribuiu para a formação de CLs decorrente da ação das duas sFLA₂, uma vez que os inibidores específicos dos receptores CD36, SR-A1 e LOX-1, não modificaram os efeitos da MT-III e nem da BthTx-II. Neste contexto, a literatura associa o aumento da expressão de receptores *scavengers* com a liberação de citocinas, como o TNF- α , IFN- γ , e IL-1 (INABA et al., 1992; LI; LIBBY, 1995). Outros estudos relacionaram o aumento do teor desses receptores aos processos de migração e proliferação de CMLVs. Dessa forma, na vigência de

ação das sFLA₂s estudadas, estes receptores devem estar relacionados à produção de agentes inflamatórios e/ou à indução da migração e proliferação de CMLVs, contribuindo desta maneira para a formação da placa aterosclerótica.

Diante dos resultados discutidos acima, investigou-se a participação de duas vias importantes de captação de lipídios, efetuada por endocitose, sendo elas a endocitose mediada por receptor e a macropinocitose. Os dados aqui obtidos indicaram que o processo de endocitose, mediado por receptor, não participa da formação de CMLVs espumosas induzida pelas sFLA₂s ofídicas, uma vez que o inibidor deste tipo de endocitose, o composto dinasore, não afetou a formação de CLs. De outra parte, a inibição da proteína quinase PI3K, essencial para o processo de macropinocitose, reduziu, de modo marcante, a formação de CLs em CMLVs estimuladas tanto pela MT-III, quanto pela BthTx-II. Estes dados indicam que a macropinocitose é um mecanismo de captação de lipídios relevante para a formação de CLs induzida pela MT-III e BthTx-II, em CMLVs. A macropinocitose é um processo pelo qual grandes volumes de macromoléculas solúveis e/ou fluido extracelular são transportados para o meio intracelular, a partir da formação de vesículas, denominadas macropinosomas (MARECHAL et al., 2001). Estas vesículas são formadas por prolongamentos da membrana celular que formam uma cápsula que se funde após englobar o material extracelular. Este processo é regulado, principalmente, pela molécula de PIP3 (fosfoinositol fosfoinositideo 3,4,5 trifosfato), que é resultante da fosforilação do PIP2 (fosfatidilinositol 4,5 bifosfato), pela proteína PI3K. O papel do PIP3 neste processo não está bem esclarecido, mas acredita-se que a sua produção promove o fechamento adequado dos macropinosomas e o seu tráfego intracelular. (HOELLER et al., 2013; VELTMAN et al., 2014). Sabe-se que as membranas macropinocíticas são enriquecidas de PIP3 e que os inibidores de PI3K são bloqueadores potentes do processo de macropinocitose e amplamente utilizados para este fim (HOELLER et al., 2013). Vale ressaltar que o processo de macropinocitose foi vinculado, inicialmente, à captação de LDL por macrófagos (KRUTH et al., 2005) e, recentemente, foi descrito como essencial para a formação de CMLVs espumosas (CHELLAN et al., 2016; RIVERA et al., 2013). Neste sentido, estas informações apoiam os resultados aqui obtidos. No entanto, o mecanismo pelo qual as FLA₂s ativam a PI3K e, consequentemente, o processo de macropinocitose, não foi investigado e merece estudos a respeito.

Os receptores e fatores de transcrição PPARs participam de várias funções celulares, dentre as quais a diferenciação de adipócitos (PATEL et al., 2003), homeostasia da glicose (TAKANO et al., 2004) e a regulação de proteínas envolvidas na formação de corpúsculos lipídicos (OKADA et al., 2002). O PPAR- γ , em particular, regula a transcrição de vários genes envolvidos no metabolismo lipídico e na regulação da homeostasia da glicose e de processos inflamatórios (CHAWLA et al., 2001, LOICHOT et al., 2006). O PPAR- β/δ , por sua vez, é o fator mais amplamente distribuído nos tecidos e seu papel em processos patológicos e fisiológicos não está bem esclarecido. Entretanto, sabe-se que este fator exerce papel crucial no metabolismo de ácidos graxos (BURKART et al., 2007; CHAWLA et al., 2001; PLANAVILA et al., 2005). Ativadores destes receptores incluem eicosanóides, como a prostagladina J_2 e ácidos graxos mono e poliinsaturados, como os ácidos oléico e linoléico (YE et al., 2002). Os PPARs podem induzir a captação de lipídios, por macrófagos e CMLVs, a partir da indução da expressão de receptores *scavengers* e pela modulação de proteínas que captam lipídios, como as proteínas da família das PLINs, relacionadas à captação de ácidos graxos e a formação de células espumosas (ALMEIDA et al., 2009; TONTONNOZ et al., 2008; VOSPER et al., 2001). Desse modo, avaliamos a capacidade da MT-III e da BthTx-II ativarem os fatores de transcrição PPAR- γ e PPAR- β/δ , em CMLVs. Os resultados demonstraram que ambos os fatores foram ativados em CMLVs estimuladas pela MT-III ou pela BthTx-II. Até o presente, não há relatos na literatura que demonstrem a capacidade de uma sFLA₂, do grupo IIA, induzir *per se* a ativação destes fatores. Em apoio a estes dados, foi demonstrado que macrófagos estimulados por LDL, modificado por uma FLA₂ do veneno da serpente *Naja Mossambica*, induziu a ativação dos PPAR- γ e - β/δ (NAMGALADZE et al., 2010). Ainda, como mecanismo adicional, para a formação de CLs, induzida pelas FLA₂s em estudo, os resultados obtidos mostraram que os níveis protéicos PPAR- γ e PPAR- β/δ foram aumentados em CMLVs estimuladas com a MT-III e com a BthTx-II. Estes dados corroboram a literatura, que demonstrou o aumento da expressão de receptores PPAR em macrófagos e CMLVs espumosos, em modelos experimentais de lesões ateroscleróticas (LIM et al., 2006; TONTONNOZ et al., 1998). Ainda, a participação desses fatores, na formação de CMLVs espumosas, foi confirmada por intervenção farmacológica com antagonistas destes receptores. Este conjunto de dados indicam que os fatores PPAR- γ e PPAR- β/δ , desempenham um papel fundamental na

formação de CLs, em CMLVs induzidas pelas sFLA₂s estudadas. Neste contexto, deve-se observar que a liberação dos ácidos graxos oléico e linoléico, induzida por ambas, detectada neste estudo, sugere fortemente que estes ácidos graxos sejam os segundos mensageiros da ação das FLA₂s estudadas, por serem os ativadores clássicos dos PPARs (RAVNSKJAE et al., 2010).

As enzimas DGAT e ACAT são enzimas presentes no retículo endoplasmático e são responsáveis pela síntese de triacilglicerol e colesterol, respectivamente, que são os principais constituintes dos corpúsculos lipídicos (BARTZ et al., 2007; MARTIN, PARTON, 2006; WELLER et al., 1999). Os resultados do presente estudo mostraram que os inibidores das enzimas DGAT e da enzima ACAT, aboliram a formação de corpúsculos lipídicos induzida pela MT-III e pela BthTx-II, demonstrando a importância destas enzimas para a formação de corpúsculos lipídicos. Esta participação provavelmente se dá pelo fornecimento dos substratos triacilglicerol e colesterol para a formação dessas inclusões. Estes dados corroboram a literatura, que aponta a importância da enzima ACAT para a formação de CLs e CMLVs e macrófagos espumosos (RONG et al., 2005; SAKASHITA et al., 2003). O papel da enzima DGAT, em CMLVs, ainda é pouco explorado. Entretanto, Koliwad et al. (2010) demonstraram que agonistas do receptor PPAR- γ induziram a expressão da enzima DGAT e o aumento dos estoques de triacilglicerol (KOLIWAD et al., 2010). Deste modo, é possível sugerir que a ativação da DGAT, verificada no presente estudo, esteja relacionada à ativação do receptor PPAR- γ , constituindo uma via de sinalização para a formação de corpúsculos lipídicos, sob a ação da MT-III e da BthTx-II.

Sabe-se que as FLA₂s secretadas interagem com as FLA₂s intracelulares (cFLA₂ e iFLA₂), para a formação de eicosanóides e dos CLs (BALSINDE et al., 1998; CHAKRABORTI, 2003; GUBERN et al., 2008; GUBERN et al., 2009; HAN et al., 2003;). Diante disso, avaliou-se a participação destas enzimas na formação de CLs induzida pela MT-III e pela BthTx-II. Os resultados demonstraram que o pré-tratamento das células com o composto Pyr-2 α , inibidor da fosfolipase A₂ citosólica, não alterou a formação de CLs induzida pelas duas FLA₂s estudadas. Por outro lado, o pré-tratamento com o composto Bel, inibidor da iFLA₂, reduziu a formação de CLs induzida pela BthTx-II, mas não pela MT-III, apontando a participação desta FLA₂ intracelular na ação da BthTx-II. De forma semelhante, verificamos, anteriormente, a participação da iFLA₂ na formação de CLs em macrófagos

peritoneais, induzida por outra proteína homóloga de fosfolipase A₂ (GIANNOTTI et al., 2013). Sendo a BthTx-II uma proteína homóloga e destituída de atividade catalítica, esta associação poderia explicar também a produção de prostanoídes induzida por esta sFLA₂. Os dados obtidos estão, ainda, de acordo com a literatura, que relaciona a iFLA₂ na formação de CLs, sugerindo que os ácidos graxos provenientes da ação desta FLA₂ sejam os responsáveis pela indução da biogênese de CLs (GUBERN et al., 2008; GUBERN et al., 2009). Contudo, estes autores não especificaram o tipo de ácidos graxos provenientes das iFLA₂s, nos modelos experimentais empregados nestes estudos. A favor de nossos resultados em CMLVs, foi demonstrado que as iFLA₂ estão funcionalmente relacionadas à proliferação e migração de CMLVs (XIE et al., 2007; MOON et al., 2008; XIE et al., 2010; YELLATURU, RAO, 2003;), regulação transcricional (XIE et al., 2007; XIE et al., 2011), hipercontratibilidade vascular associada a diabetes e resposta à injúria vascular (XIE et al., 2010), contribuindo, de modo relevante, para o início e progressão da inflamação vascular e formação da neoíntima. Ainda, como mencionado na Introdução, a interação das sFLA₂s do grupo IIA com outras sFLA₂s se dá pela indução de sua própria expressão e daquelas do grupo IB, acompanhada de sua secreção (JAULMES et al., 2006; KISHINO et al., 1994; KITSIOULI et al., 2009). O estudo da participação das sFLA₂s do grupo IIA, endógenas, no efeito da MT-III e da BthTx-II, em CMLVs, mostrou que as sFLA₂s endógenas não contribuem para a formação de CLs induzida pelas sFLA₂s ofídicas, uma vez que o inibidor de sFLA₂s do GIIA não alterou a formação das inclusões lipídicas por elas induzida.

O efluxo de colesterol representa um mecanismo chave para manutenção dos níveis intracelulares de colesterol e para a prevenção da formação de células espumosas, em condições de excesso de lipídios (SEED et al., 2012; WANG et al., 2007; WANG et al., 2012). Os resultados ora obtidos demonstraram que tanto a MT-III, quanto a BthTx-II, induziram o aumento do teor protéico de ABCA1 e ABCG1, sugerindo que este seja um mecanismo pelo qual as CMLVs respondem ao acúmulo de lipídios induzida pelas FLA₂s ofídicas, para o retorno da homeostasia lipídica. De forma similar, WANG et al. (2014), descreveram que o estradiol induz o efluxo de colesterol, a partir de CMLVs, por um mecanismo dependente de ABCA1 e ABCG1. Ainda, o aumento da expressão de ABCA1 e ABCG1, vista neste estudo, deve estar relacionado à ativação dos fatores de transcrição PPAR, pelas duas sFLA₂s, já que foi demonstrado um papel importante destes receptores na regressão da placa

aterosclerótica. Estudos demonstraram que os PPARs induziram a expressão de ABCA1 e ABCG1 e, conseqüentemente, acarretaram a remoção de colesterol tanto de macrófagos, quanto de CMLVs (AKIYAMA et al., 2002; CHAWLA et al., 2001).

Fatores aterogênicos e citocinas, como o IFN- γ (LI et al. 1995; WAGSATER et al. 2004), a IL-6 e o TNF- α (LI et al., 1995), são capazes de induzir o aumento da expressão de receptores *scavengers* e de promover a formação de CMLVs espumosas. Ainda, quimiocinas como MCP-1 e fractalcina, também produzidas por CMLVs, atuam como agentes quimiotáticos e induzem o recrutamento de leucócitos para o local da lesão aterosclerótica. Desta forma, as citocinas desempenham papel crucial na inflamação vascular crônica, associada à aterosclerose (BUTOI et al., 2011). No presente estudo, verificou-se que a MT-III e a BthTx-II induziram a liberação da citocina IL-6 e das quimiocinas MCP-1 e fractalcina a partir das CMLVs. No que se diz respeito à MCP-1 e à fractalcina, ambas estimulam o recrutamento de monócitos e células T para o foco da lesão (BRAUNERSREUTHER et al., 2007; SCHOBER et al., 2004). A MCP-1, em artérias inflamadas, é expressa em níveis aumentados e é considerada uma das quimiocinas mais potentes para a atração de monócitos (CAMBIEN et al., 2001; SCHOBER et al., 2004). Esta molécula atua através da indução da expressão de moléculas de adesão e de citocinas inflamatórias contribuindo dessa forma para a progressão da aterosclerose (YAMAMOTO et al., 2001). A fractalcina, por sua vez, é expressa por células endoteliais e CMLVs, atuando como molécula quimioatratora, quando na forma solúvel e como molécula de adesão, quando presente na membrana das células. Ainda, sabe-se que, na presença de lipídios oxidados, os monócitos humanos apresentam aumento na expressão de CX3CR1, o receptor para a fractalcina, o que permite que estes leucócitos se liguem às CMLVs e se acumulem na parede dos vasos, em condições hiperlipidêmicas (WONG et al., 2002). Diante destas informações, sugere-se que a produção de IL-6, MCP-1 e fractalcina possam contribuir para o influxo de monócitos e para os processos de migração e proliferação de CMLVs, levando ao aumento da reposta inflamatória vascular, na vigência da ação da MT-III e da BthTx-II.

Uma série de estudos demonstrou a importância das enzimas da via biosintética de eicosanóides na aterosclerose. Dentre estas enzimas, estão aquelas dos sistemas das ciclooxigenases -1 e -2, que representam a etapa limitante desta via. A participação dos produtos da COX-2, na aterosclerose, está relacionada a

uma série de eventos inflamatórios, tais como a ativação da quimiotaxia, produção de citocinas inflamatórias, modificação da permeabilidade vascular e estimulação da migração de CMLVs (FAZIO, LINTON 2004). Neste contexto, os resultados do presente estudo mostraram que tanto a MT-III, quanto a BthTx-II induziram um aumento do teor proteico da COX-2, mas não da COX-1. Estes dados estão de acordo com a literatura, que demonstra que a expressão da COX-2 pode ser rapidamente induzida em CMLVs, por uma série de estímulos inflamatórios, dentre eles a IL-1 (SHIOKOSHI et al., 2002), o EGF (RIMARACHIN et al., 1994) além de altas concentrações de glicose (COSENTINO et al., 2003).

Dentre os produtos derivados das ciclooxigenases, presentes no processo aterosclerótico, a PGE₂, a PGI₂ e a TXA₂ são os principais prostanóides que regulam as funções fisiológicas do sistema cardiovascular, sendo considerados mediadores chave para o desenvolvimento do processo inflamatório em doenças como a aterosclerose. A liberação de PGE₂ e PGI₂, em consequência da expressão de COX-2, já foi verificada em outros estudos que demonstraram o papel regulador dessas prostaglandinas na formação de células espumosas e na amplificação de eventos relacionados à aterosclerose, como a adesão de leucócitos e acúmulo de colesterol em CMLVs (HAJJAR et al., 1982; SAQIB; KARIGAR, 2008; TAKAYAMA et al., 2002). A TXA₂ tem atividade pró-coagulante e vasoconstrictora em CMLVs e favorece o desenvolvimento do processo inflamatório, sendo liberada por células espumosas durante o processo hipercolesterolêmico e aterosclerótico (COLEMAN et al., 1980). Os dados obtidos no presente estudo mostraram que tanto a MT-III, quanto a BthTx-II induziram a liberação de PGE₂, PGI₂ e de TXA₂ pelas CMLVs. Estes resultados sugerem que a liberação da PGI₂ e da PGE₂ esteja relacionada a uma tentativa de retorno à homeostasia, frente à ação das FLA₂s em estudo. Por outro lado, a TXA₂ deve modular positivamente a progressão do processo inflamatório, induzido pelas FLA₂s deste estudo. Sendo a BthTx-II destituída de atividade catalítica, a liberação de PGE₂, PGI₂ e TXA₂ não era esperada. Contudo, tendo sido demonstrado que esta FLA₂ induz a liberação de ácido linoléico e sabendo-se que alguns tipos celulares tem capacidade de converter este lipídio em ácido araquidônico (GAO et al., 2010) é possível sugerir que a produção dos eicosanóides observados seja produto dessa conversão, além da contribuição da iFLA₂ já mencionada.

Os CLs são considerados plataformas da síntese de eicosanóides, pois contêm, em seu interior, os sistemas ciclooxygenase (COX) e 5-lipooxygenase (5-LO). Uma vez que foi observado o aumento do teor protéico de COX-2, induzido por ambas as toxinas, avaliou-se a compartimentalização desta isoforma e da COX-1, sob estímulo pela MT-III ou BthTx-II. Os resultados obtidos, que evidenciaram o aumento dos *pools* intracelulares de COX-1 e COX-2, co-localizados com os CLs, sugerem, fortemente, que estas organelas sejam sítios para síntese de mediadores lipídicos, na vigência da ação das FLA₂s estudadas. Em apoio a esta hipótese, estão os dados deste estudo, demonstrando que a PGE₂ é encontrada no interior dos CLs, quando as CMLVs são estimuladas pelas sFLA₂s ofídicas. Este conjunto de dados aponta, portanto, os CLs como sítios de síntese de prostanóides, sob estímulo das duas proteínas estudadas. Em concordância com estes dados, demonstramos, anteriormente, que a proteína homóloga de FLA₂, MT-II, induziu, em macrófagos, a formação de CLs que também continham PGE₂ (GIANNOTTI et al., 2013).

Diante da liberação expressiva de mediadores lipídicos, em CMLVs, foi investigada a importância dos mediadores provenientes da via das COX-1 e -2, na formação de CLs, a partir de intervenções farmacológicas. O fato dos compostos valeryl salicilato e NS-398 não terem alterado a formação de CLs induzida por ambas as FLA₂s, indicou que os mediadores lipídicos, provenientes da via das ciclooxygenases, não contribuem para a formação de CLs. Estes dados estão de acordo com estudos anteriores de BOZZA et al., (1996, 1996) e do nosso grupo (LEIGUEZ et al., 2011), que não observaram a participação desta via biosintética na formação de CLs. Até onde pode ser verificado, esta é a primeira demonstração da capacidade de sFLA₂s do GIA induzirem a biossíntese de PGE₂ em CMLVs e a sua compartimentalização em CLs. O real significado da produção de PGE₂ e a sua compartimentalização em CLs, para as ações da MT-III e da BthTx-II, em CMLVs, permanece a ser esclarecido. É possível sugerir que, na presente condição experimental, os mediadores lipídicos, contribuam para outros eventos importantes, do processo inflamatório desencadeado pelas sFLA₂s, em CMLVs.

Estudos recentes demonstram que cerca de 50% das células espumosas, presentes em lesões ateroscleróticas, são constituídas por CMLVs, comprovada pela expressão de alfa actina e SM22 α , dentre outros marcadores (ALLAHVERDIAN et al. 2014). Além disso, a literatura demonstrou que as CMLVs espumosas, de lesões ateroscleróticas, também expressam marcadores de macrófagos, tais como

CD68, MAC2 e CD163 (ALLAHVERDIAN et al. 2014; MIETUS-SNYDER et al. 2000). Nesse sentido, os estudos atuais mostram que as CMLVs, quando carregadas de lipídios, adquirem o fenótipo de macrófago, com capacidade fagocítica e de expressão de marcadores típicos deste tipo celular (ALLAHVERDIAN et al. 2014; FEIL et al. 2014; GOMEZ et al. 2013; KOLB et al., 2007; SANDISON et al., 2016). A partir destas informações, avaliou-se a capacidade da MT-III induzir a diferenciação das CMLVs para um fenótipo de macrófago. Os dados obtidos no presente estudo demonstraram que a MT-III induziu o aumento da capacidade fagocítica em CMLVs após 48 horas de incubação. Este fato indica que além de induzir a formação de CMLVs espumosas, a MT-III induz, nestas células, a aquisição de características funcionais e fenotípicas de macrófagos. Estes dados estão de acordo com as informações acima, de que CMLVs espumosas adquirem características funcionais de macrófagos (RONG et al., 2003; SHANKMAN et al., 2015; VENGRENYUK et al., 2015; WEINERT et al., 2013). Ainda, do ponto de vista de modificações na expressão de genes, sabe-se que há uma redução dos marcadores típicos de CMLVs (alfa actina, miosina de cadeia pesada e SM22 α) e um aumento da expressão de genes marcadores de macrófagos (CD68 e MAC2). Os resultados do presente estudo mostrando o aumento significativo dos genes marcadores de macrófagos CD68 e MAC2, em CMLVs estimuladas pela MT-III sugerem, fortemente, que a MT-III modula o fenótipo destas células, favorecendo a transformação destas para um fenótipo de macrófago, com capacidade fagocítica. Curiosamente, não foi verificada alteração dos genes marcadores para CMLVs. Este fato pode estar relacionado à concentração de sFLA₂ utilizada, que pode não ter sido suficiente para induzir redução destes marcadores, e/ou ao período de tempo avaliado, que pode ter sido precoce para verificar tais alterações.

Tomados em conjunto, os dados aqui obtidos nos permitem concluir que as sFLA₂s MT-III e BthTx-II induzem a formação de CMLVs espumosas. Esta é a primeira demonstração da capacidade de fosfolipases A₂ secretadas do grupo IIA induzir a formação de CLs em CMLVs. Ainda, estas enzimas induziram o recrutamento e ativação de diferentes fatores envolvidos na síntese e acúmulo de lipídios. Finalmente, a MT-III, uma sFLA₂ Asp49 clássica, induziu a diferenciação das CMLVs para um fenótipo de macrófago. Os principais efeitos da MT-III e da BthTx-II em CMLVs e os mecanismos envolvidos na formação de CLs, estão representados de forma esquemática na Figura 38. Considerando a homologia das FLA₂ ofídicas

com as sFLA₂ de mamíferos, os resultados deste estudo contribuem para o conhecimento das ações desencadeadas por essa classe de enzimas no que tange ao acúmulo de lipídios em CMLVs. Por fim, este estudo poderá contribuir para o melhor conhecimento da reação inflamatória local, induzida pelos venenos de serpentes botrópicas, os quais, contém níveis elevados de sFLA₂s.

Figura 38 - Esquema representativo dos efeitos da MT-III e da BthTx-II, em células de músculo liso vascular, para a formação de corpúsculos lipídicos e mecanismos envolvidos. A MT-III e a BthTx-II interagem com as CMLVs através da membrana e/ou aceptores específicos e induzem, em CMLVs de fenótipo sintético, o recrutamento das proteínas do retículo endoplasmático ACAT e DGAT, que através da produção de colesterol e triacilglicerol induzem a formação de CLs. Ainda a formação de CLs induzida por essas sFLA₂ se mostrou dependente da proteína PI3K, essencial para o processo de macropinocitose em CMLVs. Da mesma forma, a iFLA₂ participa da formação dessas inclusões em CMLVs incubadas com a BthTx-II, mas não com a MT-III. As cFLA₂ e as sFLA₂ do GIIA de células de músculo liso não participam desse fenômeno. Ainda, as proteínas da família das perilipinas PLIN2 e PLIN3 são recrutadas para os CLs formados na vigência das sFLA₂ ofídicas e devem contribuir para a formação dessas inclusões. Em adição, ambas as toxinas induzem a produção de ácido oléico e linoléico por CMLVs, ácidos graxos esses considerados como ativadores clássicos dos fatores de transcrição nuclear PPAR, que se encontraram ativados e com aumento do teor proteico em CMLVs incubadas com a MT-III e com a BthTx-II. Estes receptores e as enzimas de síntese de lipídios ACAT (acil-CoA:colesterol aciltransferase) e DGAT (diacil-glicerol aciltransferase) se mostraram essenciais para a formação de CLs induzida pelas FLA₂s. Ainda, as FLA₂s MT-III e BthTx-II induzem aumento da expressão de receptores scavengers como o CD36, SR-A1 e LOX-1 e de proteínas de efluxo de lipídios ABCA1 e ABCG1, fatores estes que podem ser regulados pela atividade dos fatores de transcrição PPAR. Em adição, a BthTx-II e a MT-III induziram aumento do teor protéico da COX-2, mas não da COX-1. Estes sistemas enzimáticos colocalizaram com os CLs. Entretanto, os produtos destas vias não participam da formação de CLs induzida pelas FLA₂s. Adicionalmente, a MT-III e a BthTx-II induziram a liberação das citocinas IL-6, MCP-1 e fractalina e dos eicosanóides PGE₂, PGI₂ e TXA₂ e a colocalização da PGE₂ com os CLs, sugerindo que estas inclusões possam ser sítios para a produção de prostaglandinas em CMLVs. Finalmente, as CMLVs incubadas com a MT-III exibiram aumento da expressão gênica de marcadores de macrófagos (CD68 e MAC2) e da atividade fagocítica, o que sugere que a MT-III induz a diferenciação de CMLVs para um fenótipo de macrófago.

7 CONCLUSÕES

1 - A MT-III e a BthTx-II, em concentrações não citotóxicas, induziram, em células de músculo liso vascular:

- ✓ aumento da formação de corpúsculos lipídicos, de modo concentração e tempo-dependente.
- ✓ dilatações das cisternas do retículo endoplasmático;
- ✓ recrutamento das proteínas PLIN2 e PLIN3 para os corpúsculos lipídicos;
- ✓ aumento do teor protéico dos receptores *scavenger* LOX-1 e SR-A1;
- ✓ aumento do teor protéico e ativação dos fatores de transcrição nuclear PPAR- γ e β/δ ;
- ✓ liberação de ácido oléico e linoléico a partir das CMLVs;
- ✓ aumento do teor protéico de COX-2, mas não de COX-1;
- ✓ liberação de PGE₂, PGI₂ e TXA₂;
- ✓ liberação de IL-6, MCP-1 e fractalcina;
- ✓ formação de *pools* intracelulares de PGE₂ contida em corpúsculos lipídicos.

2 - A BthTx-II, mas não a MT-III, induziu o aumento do teor protéico do receptor *scavenger* CD36, em células de músculo liso vascular.

3- Os receptores *scavenger* CD36, SR-A1 e LOX-1 não contribuem para a formação de CLs induzida pelas sFLA₂s.

4- A proteína quinase PI3K, os fatores de transcrição nuclear PPAR- γ e β/δ e as enzimas de síntese de lipídios DGAT e ACAT participam da formação de CLs induzida pela MT-III e pela BthTx-II.

5- A iFLA₂, mas não a cFLA₂, participa da formação de CLs em CMLVs incubadas com a BthTx-II, mas não com a MT-III.

6- As sFLA₂ do GIIA de mamíferos não participam da formação de CLs induzida pelas FLA₂s MT-III e BthTx-II;

7- A MT-III induz a diferenciação das CMLVs para um fenótipo de macrófago e a aquisição da capacidade fagocítica por CMLVs.

8- A atividade catalítica de fosfolipase A₂ não é importante para a formação de CLs.

REFERÊNCIAS*

ADAM, P. J.; CLESHAM, G. J.; FLYNN, P. D.; WEISSBERG, P. L. Identification and characterisation of transforming growth factor beta-regulated vascular smooth muscle cell genes. **Cytokine**, v. 12, n. 4, p. 348-354, 2000.

AKIBA, S.; YONEDA, Y.; OHNO, S.; NEMOTO, M.; SATO, T. Oxidized LDL activates phospholipase A2 to supply fatty acids required for cholesterol esterification. **J. Lipid Res.**, v.123, n.10, p.:845-853, 2003.

ALLAHVERDIAN, S.; CHEHROUDI, A. C.; MCMANUS, B. M.; ABRAHAM, T.; FRANCIS, G. A. Contribution of intimal smooth muscle cells to cholesterol accumulation and macrophage-like cells in human atherosclerosis. **Circulation**, v. 129, n.15, p.1551–1559, 2014.

ALLAHVERDIAN, S.; CHEHROUDI, A.C.; MCMANUS, B.M.; ABRAHAM, T.; FRANCIS, G.A. Contribution of intimal smooth muscle cells to cholesterol accumulation and macrophage-like cells in human atherosclerosis. **Circulation.**, v. 129, n. 15, p. 1551-1559, 2014.

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, n.2, p. 1337-1345, 2009.

ANDERSSON, L.; BOSTRÖM, P.; ERICSON, J.; RUTBERG, M.; MAGNUSSON, B.; MARCHESAN, D; RUIZ, M.; ASP, L.; HUANG, P.; FROHMAN, M. A.; BORÉN, J.; OLOFSSON, S. O. PLD1 and ERK2 regulate cytosolic lipid droplet formation. **J Cell Sci.**,v. 119, n. 11, p.2246-2257, 2006.

ANTHONSEN, M. W.; SOLHAUG, A.; JOHANSEN, B. Functional coupling between secretory and cytosolic phospholipase A₂ modulates tumor necrosis factor-alpha- and interleukin-1beta-induced NF-kappa B activation. **J. Biol. Chem.**, v. 276, n. 32, p.30527-30536, 2001.

ARAKI, N.; JOHNSON, M. T.; SWANSON, J. A. A role for phosphoinositide 3-kinase in the completion of macropinocytosis and phagocytosis by macrophages. **J. Cell Biol.**, v. 135, n. 5, p. 1249-1260, 1996.

ARRESE, E. L.; SAUDALE, F. Z.; SOULAGES, J. L. Lipid Droplets as Signaling Platforms Linking Metabolic and Cellular Functions. **Lipid Insights.**, v.7, p.7-16, 2014.

*De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR6023: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BABU, A. S.; GOWDA, T. V. Dissociation of enzymatic activity from toxic properties of the most basic phospholipase A2 from *Vipera russelli* snake venom by guanidination of lysine residues. **Toxicon**, v. 32, n. 6, p. 749-752, 1994.

BALSINDE, J.; BALBOA, M.A.; DENNIS, E.A. Functional coupling between secretory phospholipase A2 and cyclooxygenase-2 and its regulation by cytosolic group IV phospholipase A2. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 95, n.14, p. 7951-7956, 1998.

BANDEIRA-MELO, C.; PHOOFULO, M.; WELLER, P. F.; Extranuclear lipid bodies, elicited by CCR3-mediated signaling pathways, are the sites of chemokine-enhanced leukotriene C4 production in eosinophils and basophils. **J. Biol. Chem.**, v. 276, n. 25, p. 22779-22787, 2001.

BARTZ, R.; LI, W. H.; VENABLES, B; ZEHMER, J. K.; ROTH, M. R.; WELTI, R.; ANDERSON, R. G.; LIU, P.; CHAPMAN, K. D. J. Lipidomics reveals that adiposomes store ether lipids and mediate phospholipid traffic. **Lipid Res.**, v. 48, n. 4, p. 837-847, 2007.

BAULANDE, S.; LASNIER, F.; LUCAS, M.; PAIRAULT, J. Adiponutrin, a transmembrane protein corresponding to a novel dietary- and obesity-linked mRNA specifically expressed in the adipose lineage. **J. Biol. Chem.**, v. 276, p. 33336-33344, 2001.

BENSINGER, S. J.; TONTONNOZ, P. Integration of metabolism and inflammation by lipid-activated nuclear receptors. **Nature**, v. 454, n. 7203, p. 470-477, 2008.

BONFIM, V. L.; DE CARVALHO, D. D.; PONCE-SOTO, L. A.; KASSAB, B. H.; MARANGONI, S. Toxicity of phospholipases A2 D49 (6-1 and 6-2) and K49 (Bj-VII) from *Bothrops jararacussu* venom. **Cell. Biol. Toxicol.**, v. 5, n. 6, p. 523-532, 2009.

BOSTRÖM, P.; RUTBERG, M.; ERICSSON, J.; HOLMDAHL, P.; ANDERSSON, L.; FROHMAN, M. A.; BORÉN, J.; OLOFSSON, S. O. Cytosolic lipid droplets increase in size by microtubule-dependent complex formation. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.**, v. 25, n. 9, 1945-1951, 2005.

BOYANOVSKY, B. B.; VAN DER WESTHUYZEN, D. R.; WEBB, N. R. Group V secretory phospholipase A2-modified low density lipoprotein promotes foam cell formation by a SR-A- and CD36-independent process that involves cellular proteoglycans. **J. Biol. Chem.**, v. 280, n. 38, p. 32746-32752, 2005.

BOZZA, P. T.; BANDEIRA-MELO, C. Mechanisms of leukocyte lipid body formation and function in inflammation. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 1, p. 113-120, 2005.

BOZZA, P. T.; PAYNE, J. L.; GOULET, J. L.; WELLER, P. F. Mechanisms of platelet-activating factor-induced lipid body formation: requisite roles for 5-lipoxygenase and de novo protein synthesis in the compartmentalization of neutrophil lipids. **J. Exp. Med.**, v. 183, n. 4, p. 1515-1525, 1996.

BOZZA, P. T.; YU, W.; WELLER, P. F. Mechanisms of formation and function of eosinophil lipid bodies: inducible intracellular sites involved in arachidonic acid metabolism. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 92, n. 2, p. 135-140, 1997.

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, n.11, 2249-2263, 1997.

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.

BRAUNERSREUTHER, V.; MACH, F.; STEFFENS, S. The specific role of chemokines in atherosclerosis. **Thromb. Haemost.**, v. 97, n. 5, p. 714-721, 2007.

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

BUTOI, E. D.; GAN, A. M.; MANDUTEANU, I.; STAN, D.; CALIN, M.; PIRVULESCU, M.; KOENEN, R. R.; WEBER, C.; SIMIONESCU, M. Cross talk between smooth muscle cells and monocytes/activated monocytes via CX3CL1/CX3CR1 axis augments expression of pro-atherogenic molecules. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1813, n. 12, p. 2026-2035, 2011.

CAMBIEN, B.; POMERANZ, M.; MILLET, M.A.; ROSSI, B.; SCHMID-ALLIANA, A. Signal transduction involved in MCP-1-mediated monocytic transendothelial migration. **Blood**, v. 97, n. 2, p. 359-366, 1997.

CAMPBELL, G. R.; CAMPBELL, J. H. Smooth muscle phenotypic changes in arterial wall homeostasis: implications for the pathogenesis of atherosclerosis. **Exp. Mol. Pathol.**, v. 42, n. 2, p. 139-162, 1985.

CAMPBELL, J. H.; POPADYNEC, L.; NESTEL, P. J.; CAMPBELL, G. R. Lipid accumulation in arterial smooth muscle cells. Influence of phenotype. **Atherosclerosis**, v. 47, n. 3, p. 279-295, 1983.

CAMPBELL, J. H.; CAMPBELL, G. R. Smooth muscle phenotypic modulation--a personal experience. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 32, n. 8, p. 1784-1789, 2012.

CAMPBELL, J. H.; CAMPBELL, G. R. The role of smooth muscle cells in atherosclerosis. **Curr. Opin. Lipidol.**, v. 5, n. 5, p. 323-330, 1994.

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.

CHAABANE, C.; COEN, M.; BOCHATON-PIALLAT, M. L. Smooth muscle cell phenotypic switch: implications for foam cell formation. **Curr. Opin. Lipidol.**, v. 25, n.5, p. 374-379, 2014.

CHABAN, V. V.; KHANDELIA, H. Distribution of neutral lipids in the lipid droplet core. **J. Phys. Chem. B.**, v. 118, n. 38, p. 11145-11151, 2014.

CHAKRABORTI, S. Phospholipase A(2) isoforms: a perspective. **Cell Signal.**, v. 15, n. 7, 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.

CHAWLA, A.; BARAK, Y.; NAGY, L.; LIAO, D.; TONTONOV, P.; EVANS, R. M. PPAR-gamma dependent and independent effects on macrophage-gene expression in lipid metabolism and inflammation. **Nat. Med.**, v. 7, n. 1, p. 48-52, 2001.

CHELLAN, B.; REARDON, C. A.; GETZ, G. S.; HOFMANN BOWMAN, M. A. Enzymatically Modified Low-Density Lipoprotein Promotes Foam Cell Formation in Smooth Muscle Cells via Macropinocytosis and Enhances Receptor-Mediated Uptake of Oxidized Low-Density Lipoprotein. **Arterioscler Thromb. Vasc. Biol.**, v. 36, n. 6, p. 1101-1113, 2016.

CHELLAN, B.; YAN, L.; SONTAG, T. J.; REARDON, C. A.; HOFMANN, BOWMAN, M. A. IL-22 is induced by S100/calgranulin and impairs cholesterol efflux in macrophages by downregulating ABCG1. **J. Lipid Res.**, v. 55, n. 3, p. 443-454, 2014.

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.**, v. 2, p. 309-315, 2005.

CINTRA, A.C.; MARANGONI, S.; OLIVEIRA, B.; GIGLIO, J.R. Bothropstoxin-I: amino acid sequence and function. **J. Protein Chem.**, v. 12, n. 1, p. 57-64.1993.

CIPOLLONE, F. COX-2 and prostaglandins in atherosclerosis. **Lupus**, v. 14, n. 9, p. 756-759, 2005.

COLEMAN, K.; FITZGERALD, D.; EUSTACE, P.; BOUCHIER-HAYES D. Electroretinography, retinal ischaemia and carotid artery disease. **Eur. J. Vasc. Surg.**, v. 4, n. 6, p. 569-573, 1990.

COOK, C. L.; WEISER, M. C.; SCHWARTZ, P. E.; JONES, C. L.; MAJACK, R. A. Developmentally timed expression of an embryonic growth phenotype in vascular smooth muscle cells. **Circ. Res.**, v. 74, p. 189-196, 1994.

COSENTINO, F.; ETO, M.; DE PAOLIS, P.; VAN DER LOO, B.; BACHSCHMID, M.; ULLRICH, V.; KOUROEDOV, A.; DELLI GATTI, C.; JOCH, H.; VOLPE, M.; LÜSCHER, T. F. High glucose causes upregulation of cyclooxygenase-2 and alters prostanoid profile in human endothelial cells: role of protein kinase C and reactive oxygen species. **Circulation**, v. 107, n. 7, p. 1017-1023, 2003.

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.

DENNIS, E. A.; CAO, J.; HSU, Y. H.; MAGRIOTI, V.; KOKOTOS, G. Phospholipase A₂ enzymes: physical structure, biological function, disease implication, chemical inhibition, and therapeutic intervention. **Chem Rev.**, v. 111, n. 10, p. 6130-6185, 2011.

DVORAK, A. M.; HAMMEL, I.; SCHULMAN, E. S.; PETERS, S. P.; MACGLASHAN, D. W. J.; PYRE, K.; HARVEY, V. S.; GALLI, S. J.; LICHTENSTEIN, L. M. Lipid bodies: cytoplasmic organelles important to arachidonate metabolism in macrophages and mast cells. **J. Immunol.**, v. 131, p. 2965–2976, 1983.

FALCONI, M.; DESIDERI, A.; RUFINI, S. Membrane-perturbing activity of Viperidae myotoxins: an electrostatic surface potential approach to a puzzling problem. **J. Mol. Recognit.**, v. 13, n.1, p. 14-19, 2000.

FAZIO, S.; LINTON, M. F. Unique pathway for cholesterol uptake in fat cells. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 24, n. 9, p. 1538-1539, 2004.

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.

FEIL, S.; FEHRENBACHER, B.; LUKOWSKI, R.; ESSMANN, F.; SCHULZE-OSTHOFF K.; SCHALLER, M.; FEIL, R. Transdifferentiation of vascular smooth muscle cells to macrophage-like cells during atherogenesis. **Circ. Res.**, v. 115, n. 7, p. 662-667, 2014.

FRANCIS, B.; GUTIERREZ, J. M.; LOMONTE, B.; KAISER, II. Myotoxin II from *Bothrops asper* (Terciopelo) venom is a lysine-49 phospholipase A₂. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 284, n. 2, p. 352-359, 1991.

FUENTES, L.; HERNÁNDEZ, M.; NIETO, M. L.; SÁNCHEZ CRESPO, M. What positions nucleosomes? A model. **FEBS Lett.**, v. 30, p. 7-11, 2002.

FULY, A. L.; SOARES, A. M.; MARCUSSI, S.; GIGLIO, J. R.; GUIMARÃES, J. A. Signal transduction pathways involved in the platelet aggregation induced by a D-49 phospholipase A₂ isolated from *Bothrops jararacussu* snake venom. **Biochimie**, v. 86, n. 9-10, p.731-739, 2004.

FURTADO, J. L.; OLIVEIRA, G. A.; PONTES, A. S.; SETÚBAL, S. D. S.; XAVIER, C. V.; LACOUTH-SILVA, F.; LIMA, B. F.; ZAQUEO, K. D.; KAYANO, A. M.; CALDERON, L. A.; STÁBELI, R. G.; SOARES, A. M.; ZULIANI, J. P. Activation of J77A.1 macrophages by three phospholipases A2 isolated from Bothrops atrox snake venom. **Biomed. Res. Int.**, v. **683123**, 2014.

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, J.; YE, H.; SERRERO, G. Stimulation of adipose differentiation related protein (ADRP) expression in adipocyte precursors by long-chain fatty acids. **J. Cell. Physiol.**, v. 182, n. 2, p. 297-302, 2000.

GE, Y.; ELGHETANY, M. T. CD36: a multiligand molecule. **Lab. Hematol.**, v. 11, n. 1, p. 31-37, 2005.

GIANNOTTI, K. C.; LEIGUEZ, E.; MOREIRA, V.; NASCIMENTO, N. G.; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J. M.; LOPES DE MELO, R.; TEIXEIRA, C. A Lys49 phospholipase A2, isolated from Bothrops asper snake venom, induces lipid droplet formation in macrophages which depends on distinct signaling pathways and the C-terminal region. **Biomed. Res. Int.**, v. **807982**, 2013.

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

GITTENBERGER-DE; GROOT, A. C.; DERUITER, M. C.; BERGWERFF, M.; POELMANN, R. E. Smooth muscle cell origin and its relation to heterogeneity in development and disease. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 19, p. 1589-1594, 1999.

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.

GUBERN, A.; CASAS, J. BARCELÓ-TORNS, M.; BARNEDA, D.; DE LA ROSA, X.; MASGRAU, R.; PICATOSTE, F.; BALSINDE, J.; BALBOA, M. A.; CLARO, E. Group IVA phospholipase A2 is necessary for the biogenesis of lipid droplets. **J. Biol. Chem.**, v. 283, n. 41, p. 27369-27382, 2008.

GUIJAS, C.; RODRÍGUEZ, J. P.; RUBIO, J. M.; BALBOA, M. A.; BALSINDE, J. Phospholipase A2 regulation of lipid droplet formation. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1841, p. 1661-1671, 2014.

GUIJAS, C.; RODRÍGUEZ, J. P.; RUBIO, J. M.; BALBOA, M. A.; BALSINDE, J. Phospholipase A2 regulation of lipid droplet formation. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1841, n.12, p. 1661-1671, 2014.

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.

HAJJAR, D. P.; WEKSLER, B. B.; FALCONE, D. J.; HEFTON, J. M.; TACK-GOLDMAN, K.; MINICK, C. R. Prostacyclin modulates cholesteryl ester hydrolytic activity by its effect on cyclic adenosine monophosphate in rabbit aortic smooth muscle cells. **J. Clin. Invest.**, v. 70, n. 3, p. 479-488, 1982.

HALL, J. M.; MCDONNELL, D. P. The molecular mechanisms underlying the proinflammatory actions of thiazolidinediones in human macrophages. **Mol. Endocrinol.**, v. 21, p.1756-1768, 2007.

HANASAKI, K.; ARITA, H. Biological and pathological functions of phospholipase A(2) receptor. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 372, n. 2, p. 215-223, 1999.

HAO, H.; GABBIANI, G.; BOCHATON-PIALLAT, M. L. Arterial smooth muscle cell heterogeneity: implications for atherosclerosis and restenosis development. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 23, p. 1510-1520, 2003.

HARRIS, J.B. In: **Snake Toxins**. Pergamon Press, New York, p. 91-129, 1991.

HEINRIKSON, R. L.; KRUEGER, E. T.; KEIM, P. S. Amino acid sequence of phospholipase A2-alpha 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.

HERRING, B. P.; SMITH, A. F. Telokin expression is mediated by a smooth muscle cell-specific promoter. **Am. J. Physiol.**, v. 270, p. 656-665, 1996.

HOELLER, O.; BOLOURANI, P.; CLARK, J.; STEPHENS, L. R.; HAWKINS, P. T.; WEINER, O. D.; WEEKS, G.; KAY, R. R. Two distinct functions for PI3-kinases in macropinocytosis. **J. Cell Sci.**, v. 126, p. 4296-4307, 2013.

HOELLER, O.; BOLOURANI, P.; CLARK, J.; STEPHENS, L. R.; HAWKINS, P. T.; WEINER, O. D.; WEEKS, G.; KAY, R. R. Two distinct functions for PI3-kinases in macropinocytosis. **J. Cell Sci.**, v. 126, p. 4296-4307, 2013.

HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; QUEIROZ, L. S.; SANTO-NETO, H.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; GIGLIO, J. R. Fractionation of Bothrops jararacussu snake venom: partial chemical characterization and biological activity of bothropstoxin. **Toxicon**, v. 26, n. 7, p. 615-627, 1988.

HOOFNAGLE, M. H.; THOMAS, J. A.; WAMHOFF, B. R.; OWENS, G. K. Origin of neointimal smooth muscle: we've come full circle. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 26, p. 2579-2581, 2006.

HURT-CAMEJO, E.; CAMEJO, G. Potential involvement of type II phospholipase A2 in atherosclerosis. **Atherosclerosis**, v. 132, p. 1-8, 1997.

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.

INABA, T.; GOTODA, T.; SHIMANO, H.; SHIMADA, M.; HARADA, K.; KOZAKI, K.; WATANABE, Y.; HOH, E.; MOTOYOSHI, K.; YAZAKI, Y.; YAMADA, N. Platelet-derived growth factor induces c-fms and scavenger receptor genes in vascular smooth muscle cells. **J. Biol. Chem.**, v. 267, n. 18, p. 13107-13112, 1992.

JAULMES, A.; JANVIER, B.; ANDREANI, M.; RAYMONDJEAN, M. Autocrine and paracrine transcriptional regulation of type IIA secretory phospholipase A2 gene in vascular smooth muscle cells. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 25, p. 1161-1167, 2005.

JAULMES, A.; THIERRY, S.; JANVIER, B.; RAYMONDJEAN, M.; MARÉCHAL, V. Activation of sPLA2-IIA and PGE2 production by high mobility group protein B1 in vascular smooth muscle cells sensitized by IL-1 β . **FASEB J.**, v. 20, p. 1727-1729, 2006.

JENKINS, C. M.; YAN, W.; MANCUSO, D. J.; GROSS, R. W. Highly selective hydrolysis of fatty acyl-CoAs by calcium-independent phospholipase A2 β . Enzyme autoacylation and acyl-CoA-mediated reversal of calmodulin inhibition of phospholipase A2 activity. **J. Biol. Chem.**, v. 281, n. 23, p. 15615-15624, 2006.

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. 319-325, 1990.

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, n. 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.

KITSIOULI, E.; NAKOS, G.; LEKKA, M. E. Phospholipase A2 subclasses in acute respiratory distress syndrome. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1792, n. 10, p. 941-953, 2009.

KIYOTA, E.; SATOH, M.; KOMOHARA, Y.; MORGANELLI, P. M.; HORIUCHI, S.; TAKEYA, M. Acyl-coenzyme A:cholesterol acyltransferase 2 (ACAT2) is induced in monocyte-derived macrophages: in vivo and in vitro studies. **Lab. Invest.**, v. 83, n. 11, p. 1569-1581, 2003.

KOBAYASHI, T.; TAHARA, Y.; MATSUMOTO, M.; IGUCHI, M.; SANO, H.; MURAYAMA, T.; ARAI, H.; OIDA, H.; YURUGI-KOBAYASHI, T.; YAMASHITA, J. K.; KATAGIRI, H.; MAJIMA, M.; YOKODE, M.; KITA, T.; NARUMIYA, S. Roles of thromboxane A(2) and prostacyclin in the development of atherosclerosis in apoE-deficient mice. **J. Clin. Invest.**, v. 114, n. 6, p. 784-794, 2004.

KOHR, M. J.; MURPHY, E.; STEENBERGEN, C. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase acts as a mitochondrial trans-S-nitrosylase in the heart. **PLoS One**, v. 9, n. 10 (e111448), 2014.

KOLB, S.; VRANCKX, R.; HUISSE, M. G.; MICHEL, J. B.; MEILHAC, O. The phosphatidylserine receptor mediates phagocytosis by vascular smooth muscle cells. **J. Pathol.**, v. 212, n. 3, p. 249-259, 2007.

KOLIWAD, S. K.; STREEPER, R. S.; MONETTI, M.; CORNELISSEN, I.; CHAN, L.; TERAYAMA, K.; NAYLOR, S.; RAO, M.; HUBBARD, B.; FARESE, R. V. DGAT1-dependent triacylglycerol storage by macrophages protects mice from diet-induced insulin resistance and inflammation. **J. Clin. Invest.**, v. 120, n. 3, p. 756-767, 2010.

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.

LACOLLEY, P.; REGNAULT, V.; NICOLETTI, A.; LI, Z.; MICHEL, J. B. The vascular smooth muscle cell in arterial pathology: a cell that can take on multiple roles. **Cardiovasc. Res.**, v. 95, n. 2, p. 194-204, 2012.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

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.

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.

LEIGUEZ, E.; GIANNOTTI, K. C.; MOREIRA, V.; MATSUBARA, M. H.; GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B.; RODRÍGUEZ, J. P.; BALSINDE, J.; TEIXEIRA, C. Critical role of TLR2 and MyD88 for functional response of macrophages to a group IIA-secreted phospholipase A2 from snake venom. **PLoS One**, v. 9, n. 4, p. 93741, 2014.

LI, H.; FREEMAN, M. W.; LIBBY, P. Regulation of smooth muscle cell scavenger receptor expression in vivo by atherogenic diets and in vitro by cytokines. **J. Clin. Invest.**, v. 95, n. 1, p. 122-133, 1995.

LI, X.; CATALINA, F.; GRUNDY, S. M.; PATEL, S. Method to measure apolipoprotein B-48 and B-100 secretion rates in an individual mouse: evidence for a very rapid turnover of VLDL and preferential removal of B-48- relative to B-100-containing lipoproteins. **J. Lipid Res.**, v. 37, p. 210-220, 1996.

LIBBY, P.; OKAMOTO, Y.; ROCHA, V. Z.; FOLCO, E. Inflammation in atherosclerosis: transition from theory to practice. **Circ. J.**, v. 74, p. 213-220, 2010.

LIM, H. J.; LEE, S.; LEE, K. S.; PARK, J. H.; JANG, Y.; LEE, E. J.; PARK, H. Y. PPAR gamma activation induces CD36 expression and stimulates foam cell like changes in rVSMCs. **Prostaglandins Other Lipid Mediat.**, v. 80, n. 3-4, p. 165-174, 2006.

LIO, Y. C.; DENNIS, E. A. Interfacial activation, lysophospholipase and transacylase activity of group VI Ca²⁺-independent phospholipase A2. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1392, n.2-3, p. 320-332, 1998.

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.; 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, n. 1, p. 45-49, 2005.

MA, S.; YANG, D.; LI, D.; TANG, B.; YANG, Y. Olive oil intake is inversely related to cancer prevalence: a systematic review and a meta-analysis of 13,800 patients and 23,340 controls in 19 observational studies. **Lipids Health Dis.**, v. 12, n. 53, 2011.

MADSEN, C. S.; REGAN, C. P.; HUNGERFORD, J. E.; WHITE, S. L.; MANABE, I.; OWENS, G. K. Smooth muscle-specific expression of the smooth muscle myosin

heavy chain gene in transgenic mice requires 5'-flanking and first intronic DNA sequence. **Circ. Res.**, v. 82, p. 908-917, 1998.

MANABE, I.; OWENS, G.K. The smooth muscle myosin heavy chain gene exhibits smooth muscle subtype-selective modular regulation in vivo. **J. Biol. Chem.**, v. 276, p. 39076-39087, 2001.

MANNING-TOBIN, J. J.; MOORE, K. J.; SEIMON, T. A.; BELL, S. A.; SHARUK, M.; ALVAREZ-LEITE, J. I.; DE WINTHER, M. P.; TABAS, I.; FREEMAN, M. W. Loss of SR-A and CD36 activity reduces atherosclerotic lesion complexity without abrogating foam cell formation in hyperlipidemic mice. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 29, n. 1, p. 19-26, 2009.

MARÉCHAL, V.; PREVOST M. C.; PETIT, C.; PERRET, E.; HEARD, J. M.; SCHWARTZ, O. Human immunodeficiency virus type 1 entry into macrophages mediated by macropinocytosis. **J. Virol.**, v. 75, n. 22, p. 11166-11177, 2001.

MARGARITI, A.; ZENG, L.; XU, Q. Stem cells, vascular smooth muscle cells and atherosclerosis. **Histol. Histopathol.**, v. 21, p. 979-985, 2006.

MARTIN, S.; PARTON, R. G. Lipid droplets: a unified view of a dynamic organelle. **Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.**, v. 7, n. 5, p. 373-378, 2006.

MATSUMOTO, K.; HIRANO, K.; NOZAKI, S.; TAKAMOTO, A.; NISHIDA, M.; NAKAGAWA-TOYAMA, Y.; JANABI, M. Y.; OHYA, T.; YAMASHITA, S.; MATSUZAWA, Y. Expression of macrophage (Mphi) scavenger receptor, CD36, in cultured human aortic smooth muscle cells in association with expression of peroxisome proliferator activated receptor-gamma, which regulates gain of Mphi-like phenotype in vitro, and its implication in atherogenesis. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 20, n. 4, p. 1027-1032, 2000.

MERICSKAY, M.; PARLAKIAN, A.; PORTEU, A.; DANDRÉ, F.; BONNET, J.; PAULIN, D.; LI, Z. An overlapping CArG/octamer element is required for regulation of desmin gene transcription in arterial smooth muscle cells. **Dev. Biol.**, v. 226, n. 2, p. 192-208, 2000.

METZ, R. P.; PATTERSON, J. L.; WILSON, E. Vascular smooth muscle cells: isolation, culture, and characterization. **Methods Mol. Biol.**, v. 843, p. 169-176, 2012.

MIETUS-SNYDER, M.; FRIERA, A.; GLASS, C. K.; PITAS, R. E. Regulation of scavenger receptor expression in smooth muscle cells by protein kinase C: a role for oxidative stress. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 17, n. 5, p. 969-978, 1997.

MIETUS-SNYDER, M.; GOWRI, M. S.; PITAS, R. E. Class A scavenger receptor up-regulation in smooth muscle cells by oxidized low density lipoprotein. Enhancement by calcium flux and concurrent cyclooxygenase-2 up-regulation. **J. Biol. Chem.**, v. 275, n. 23, p. 17661-17670, 2000.

MOON, S. H.; JENKINS, C. M.; MANCUSO, D. J.; TURK, J.; GROSS, R. W. Smooth muscle cell arachidonic acid release, migration, and proliferation are markedly attenuated in mice null for calcium-independent phospholipase A2beta. **J. Biol. Chem.**, v. 283, n. 49, p. 33975-33987, 2008.

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.

MOSSE, P. R.; CAMPBELL, G. R.; CAMPBELL, J. H. Smooth muscle phenotypic expression in human carotid arteries. II. Atherosclerosis-free diffuse intimal thickenings compared with the media. **Arteriosclerosis**, v. 6, n. 6, p. 664-669 1986.

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

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.; NAKATANI, Y.; HARA, N.; KUDO, I.; INOUE, K. **Phospholipase A2 in Clinical Inflammation: Molecular Approaches to Pathophysiology**. New York: CRC Press, 1995, p. 93-124.

MURAKAMI, M.; NARABA, H.; TANIOKA, T.; SEMMYO, N.; NAKATANI, Y.; KOJIMA, F.; IKEDA, T.; FUEKI, M.; UENO, A.; OH, S.; KUDO, I. Regulation of prostaglandin E2 biosynthesis by inducible membrane-associated prostaglandin E2 synthase that acts in concert with cyclooxygenase-2. **J. Biol. Chem.**, v. 275, p. 32783-32792, 2000.

MURAKAMI, M.; KUDO, I. Diversity and regulatory functions of mammalian secretory phospholipase A2s. **Adv Immunol.**, v. 77, p. 163-94, 2001.

MURAKAMI, M.; TAKETOMI, Y.; SATO, H.; YAMAMOTO, K. Secreted phospholipase A2 revisited. **J Biochem.**, v. 150, n. 3, p. 233-255, 2011.

MURPHY, D. J. The biogenesis and functions of lipid bodies in animals, plants and microorganisms. **Proq. Lipid Res.**, v. 40, p. 325-438, 2001.

NAGASE, M.; HIROSE, S.; SAWAMURA, T.; MASAKI, T.; FUJITA, T. Enhanced expression of endothelial oxidized low-density lipoprotein receptor (LOX-1) in hypertensive rats. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 237, n. 3, p. 496-498, 1997.

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.

OKADA, M.; YAN, S. F.; PINSKY, D. J. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPAR-gamma) activation suppresses ischemic induction of Egr-1 and its inflammatory gene targets. **FASEB J.**, v. 16, n. 14, p. 1861-1868, 2002.

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.

OWENS, G. K. Regulation of differentiation of vascular smooth muscle cells. **Physiol Rev.**, v. 75, p. 487-517, 1995.

OWENS, G. K.; KUMAR, M. S.; WAMHOFF, B. R. Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease. **Physiol Rev.**, v. 84, p. 767-801, 2004.

PATEL, H. J.; BELVISI, M. G.; BISHOP-BAILEY, D.; YACOUB, M. H.; MITCHELL, J. A. Activation of peroxisome proliferator-activated receptors in human airway smooth muscle cells has a superior anti-inflammatory profile to corticosteroids: relevance for chronic obstructive pulmonary disease therapy. **J. Immunol.**, v. 170, n. 5, p. 2663-2669, 2003.

PEREIRA, M. F.; NOVELLO, J. C.; CINTRA, A. C.; GIGLIO, J. R.; LANDUCCI, E. T.; OLIVEIRA, B.; MARANGONI, S. The amino acid sequence of bothropstoxin-II, an Asp-49 myotoxin from *Bothrops jararacussu* (Jararacucu) venom with low phospholipase A2 activity. **J. Protein. Chem.**, v. 17, n. 4, p. 381-386, 1998.

PLANAVILA, A.; LAGUNA, J. C.; VÁZQUEZ-CARRERA, M. Nuclear factor-kappaB activation leads to down-regulation of fatty acid oxidation during cardiac hypertrophy. **J. Biol. Chem.**, v. 280, n.17, p. 17464-17471, 2005.

POL, A.; GROSS, S. P.; PARTON, R. G. Review: biogenesis of the multifunctional lipid droplet: lipids, proteins, and sites. **J Cell Biol.**, v. 204, n. 5, p. 635-646, 2014.

PRADELLES, P.; GRASSI, J.; MACLOUF. Enzyme immunoassays of eicosanoids using acetylcholine esterase as label: an alternative to radioimmunoassay. **J. Anal. Chem.**, v. 57, p. 1170-1173, 1995.

PRUZANSKI, W.; KOPILOV, J.; KUKSIS, A. Diverse activity of human secretory phospholipases A2 on the migration of human vascular smooth muscle cells. **Inflamm. Res.**, v. 64, n. 7, p. 497-500, 2015.

RAVNSKJAER, K.; FRIGERIO, F.; BOERGESEN, M.; NIELSEN, T.; MAECHLER, P.; MANDRUP, S. PPARdelta is a fatty acid sensor that enhances mitochondrial oxidation in insulin-secreting cells and protects against fatty acid-induced dysfunction. **J. Lipid Res.**, v. 51, n. 6, p. 1370-1379, 2010.

RIMARACHIN, J. A.; JACOBSON, J. A.; SZABO, P.; MACLOUF, J.; CREMINON, C.; WEKSLER, B. B. Regulation of cyclooxygenase-2 expression in aortic smooth muscle cells. **Arterioscler. Thromb.**, v. 14, n. 7, p. 1021-1031, 1994.

RIVERA, J.; WALDUCK, A. K.; THOMAS, S. R.; GLAROS, E. N.; HOOKER, E. U.; GUIDA, E.; SOBEY, C. G.; DRUMMOND, G. R. Accumulation of serum lipids by vascular smooth muscle cells involves a macropinocytosis-like uptake pathway and is associated with the downregulation of the ATP-binding cassette transporter A1. **Arch. Pharmacol.**, v. 386, n. 12, p. 1081-1093, 2013.

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.

RONG, J. X.; SHAPIRO, M.; TROGAN, E.; FISHER, E. A. Transdifferentiation of mouse aortic smooth muscle cells to a macrophage-like state after cholesterol loading. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 11, p. 13531-1356, 2003.

RONG, J. X.; KUSUNOKI, J.; OELKERS, P.; STURLEY, S. L.; FISHER, E. A. Acyl-coenzymeA (CoA):cholesterol acyltransferase inhibition in rat and human aortic smooth muscle cells is nontoxic and retards foam cell formation. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.**, v. 25, n. 1, p. 122-127, 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.

RUTH, H. S.; JONES, N. L.; HUANG, W.; ZHAO, B.; ISHII, I.; CHANG, J.; COMBS, C. A.; MALIDE, D.; ZHANG, W. Y. Macropinocytosis is the endocytic pathway that mediates macrophage foam cell formation with native low density lipoprotein. **J. Biol. Chem.**, v. 280, n. 3, p. 2352-2360, 2005.

SANDISON, M. E.; DEMPSTER, J.; MCCARRON, J. G. The transition of smooth muscle cells from a contractile to a migratory, phagocytic phenotype: direct demonstration of phenotypic modulation. **J. Physiol.**, v. 594, n. 21, p. 6189-6209, 2016.

SANTOS, J. I.; CINTRA-FRANCISCHINELLI, M.; BORGES, R. J.; FERNANDES, C. A.; PIZZO, P.; CINTRA, A. C.; BRAZ, A. S.; SOARES, A. M.; FONTES, M. R. Structural, functional, and bioinformatics studies reveal a new snake venom homologue phospholipase A₂ class. **Proteins**, v. 79, n. 1, p. 61-78, 2011.

SAQIB, A.; KARIGAR, C. Cyclooxygenase isoforms in health and disease. **The Internet Journal of Pharmacology**, v.7, n. 1, 2008.

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

SCHAUB, F. J.; HAN, D. K.; LILES, W. C.; ADAMS, L. D.; COATS, S. A.; RAMACHANDRAN, R. K.; SEIFERT, R. A.; SCHWARTZ, S. M.; BOWEN-POPE, D. F. Fas/FADD-mediated activation of a specific program of inflammatory gene expression in vascular smooth muscle cells. **Nat. Med.**, v. 6, n. 7, p. 790-796, 2000.

SCHOBBER, A.; ZERNECKE, A.; LIEHN, E. A.; VON HUNDELSHAUSEN, P.; KNARREN, S.; KUZIEL, W. A.; WEBER, C. Crucial role of the CCL2/CCR2 axis in neointimal hyperplasia after arterial injury in hyperlipidemic mice involves early monocyte recruitment and CCL2 presentation on platelets. **Circ. Res.**, v.95, n.11, p.1125-1133, 2004.

SCHRIJVERS, D. M.; DE MEYER, G. R.; KOCKX, M. M.; HERMAN, A. G.; Martinet, W. Phagocytosis of apoptotic cells by macrophages is impaired in atherosclerosis. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 25, p. 1256–1261, 2005.

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

SHANKMAN, L. S.; GOMEZ, D.; CHEREPANOVA, O. A.; SALMON, M.; ALENCAR, G. F.; HASKINS, R.M.; SWIATLOWSKA, P.; NEWMAN, A. A.; GREENE, E. S.; STRAUB, A. C.; ISAKSON, B.; RANDOLPH, G. J.; OWENS, G. K. KLF4-dependent phenotypic modulation of smooth muscle cells has a key role in atherosclerotic plaque pathogenesis. **Nat. Med.**, v. 21, n. 6, p. 628-637, 2015.

SHIOKOSHI, T.; OHSAKI, Y.; KAWABE, J.; FUJINO, T.; KIKUCHI, K. Downregulation of nitric oxide accumulation by cyclooxygenase-2 induction and thromboxane A2 production in interleukin-1 β -stimulated rat aortic smooth muscle cells. **J Hypertens.**, v. 20, n. 3, p. 455-461, 2002.

SILVA, A. R.; PACHECO, P.; VIEIRA-DE-ABREU, A.; MAYA-MONTEIRO, C. M.; D'ALEGRIA, B.; MAGALHÃES, K. G.; DE ASSIS, E. F.; BANDEIRA-MELO, C.; CASTRO-FARIA-NETO, H. C.; BOZZA, P. T. Lipid bodies in oxidized LDL-induced foam cells are leukotriene-synthesizing organelles: a MCP-1/CCL2 regulated phenomenon. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1791, p. 1066-1075, 2009.

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.

SKINNER, J.R.; SHEW, T.M.; SCHWARTZ, D.M.; TZEKOV, A.; LEPUS, C.M.; ABUMRAD, N.A.; WOLINS, N.E. Diacylglycerol enrichment of endoplasmic

reticulum or lipid droplets recruits perilipin 3/TIP47 during lipid storage and mobilization. **J. Biol. Chem.**, v. 284, n. 45, p. 30941-30948, 2009.

STEMME, V.; SWEDENBORG, J.; CLAESSION, H.; HANSSON, G. K. Expression of cyclo-oxygenase-2 in human atherosclerotic carotid arteries. **Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.**, v. 20, n. 2, p. 146-152, 2000.

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.

SUZUKI, H.; KURIHARA, Y.; TAKEYA, M.; KAMADA, N.; KATAOKA, M.; JISHAGE, K.; UEDA, O.; SAKAGUCHI, H.; HIGASHI, T.; SUZUKI, T.; TAKASHIMA, Y.; KAWABE, Y.; CYNCHI, O.; WADA, Y.; HONDA, M.; KURIHARA, H.; ABURATANI, H.; DOI, T.; MATSUMOTO, A.; AZUMA, S.; NODA, T.; TOYODA, Y.; ITAKURA, H.; YAZAKI, Y.; KODAMA, T. et al. A role for macrophage scavenger receptors in atherosclerosis and susceptibility to infection. **Nature**, v. 386, n. 6622, p. 292-296, 1997.

SZTALRYD, C.; BELL, M.; LU, X.; MERTZ, P.; HICKENBOTTOM, S.; CHANG, B. H.; CHAN, L.; KIMMEL, A. R.; LONDOS, C. Functional compensation for adipose differentiation-related protein (ADFP) by Tip47 in an ADFP null embryonic cell line. **J. Biol. Chem.**, v.281, n. 45, p. 34341-34348, 2006.

TAKANO, H.; HASEGAWA, H.; ZOU, Y.; KOMURO, I. Pleiotropic actions of PPAR gamma activators thiazolidinediones in cardiovascular diseases. **Curr. Pharm. Des.**, v. 10, n. 22, p. 2779-2786, 2004.

TAKAYAMA, K.; KUDO, I.; KIM, D. K.; NAGATA, K.; NOZAWA, Y.; INOUE, K. Purification and characterization of human platelet phospholipase A2 which preferentially hydrolyzes an arachidonoyl residue. **Federation of European Biochemical Societies**, v. 282, p. 326-330, 1991.

TAKAYAMA, K.; GARCÍA-CARDENA, G.; SUKHOVA, G. K.; COMANDER, J.; GIMBRONE, M. A. J. R.; LIBBY, P. Prostaglandin E2 suppresses chemokine production in human macrophages through the EP4 receptor. **J. Biol. Chem.**, v. 277, n. 46, p. 44147-44154, 2002.

TAN, J. S.; SEOW, C. J.; GOH, V. J.; SILVER, D. L.; GENET, J. Recent advances in understanding proteins involved in lipid droplet formation, growth and fusion. **Genomics**, v. 41, n. 5, p. 251-259, 2014.

THUM, T.; BORLAK, J. LOX-1 receptor blockade abrogates oxLDL-induced oxidative DNA damage and prevents activation of the transcriptional repressor Oct-1 in human coronary arterial endothelium. **J. Biol. Chem.**, v. 283, n. 28, p. 19456-19464, 2008.

TIAN, L.; CHEN, K.; CAO, J.; HAN, Z.; GAO, L.; WANG, Y.; FAN, Y.; WANG, C. Galectin-3-induced oxidized low-density lipoprotein promotes the phenotypic

transformation of vascular smooth muscle cells. **Mol. Med. Rep.**, v. 12, n.4, p. 4995-5002, 2012.

TODT, J. C.; HU, B.; CURTIS, J. L. The scavenger receptor sr-a i/ii (cd204) signals via the receptor tyrosine kinase merlk during apoptotic cell uptake by murine macrophages. **J. Leukoc. Biol.**, v. 84, n. 2, p. 510-518, 2008.

TONTONOZ, P.; NAGY, L.; ALVAREZ, J. G.; THOMAZY, V. A.; EVANS, R. M. PPARgamma promotes monocyte/macrophage differentiation and uptake of oxidized LDL. **Cell.**, v. 93, n. 2, p. 241-252, 1998.

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. 815-831, 2000.

VELTMAN, D. M.; LEMIEUX, M. G.; KNECHT, D. A.; INSALL, R. H. PIP₃-dependent macropinocytosis is incompatible with chemotaxis. **J. Cell Biol.**, v. 204, p. 497–505, 2014.

VENGRENYUK, Y.; NISHI, H.; LONG, X.; OUIOMET, M.; SAVJI, N.; MARTINEZ, F.O.; CASSELLA, C. P.; MOORE, K. J.; RAMSEY, S. A.; MIANO, J. M.; FISHER, E. A. Cholesterol loading re-programs the miR-143/145-myocardin axis to convert aortic smooth muscle cells to a dysfunctional macrophage-like phenotype. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 35, n. 3, p. 535–546, 2015.

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.

WEINERT, S.; POITZ, D. M.; AUFFERMANN-GRETZINGER, S.; EGER, L.; HEROLD, J.; MEDUNJANIN, S.; SCHMEISSER, A.; STRASSER, R. H.; BRAUN-DULLAEUS, R. C. The lysosomal transfer of LDL/cholesterol from macrophages into vascular smooth muscle cells induces their phenotypic alteration. **Cardiovasc. Res.**, v. 97, n. 3, p. 544-552, 2013.

WELTE, M.A (Ed.). Expanding roles for lipid droplets. **Curr Biol.**, v. 25, n. 11, p. 470-481, 2015.

WOLINS, N. E.; SKINNER, J. R.; SCHOENFISH, M. J.; TZEKOV, A.; BENSCH, K. G.; BICKEL, P. E. Adipocyte protein S3-12 coats nascent lipid droplets. **J. Biol. Chem.**, v. 39, p. 37713-37721, 2003.

WONG, B. W.; WONG, D.; MCMANUS, B. M. Characterization of fractalkine (CX3CL1) and CX3CR1 in human coronary arteries with native atherosclerosis, diabetes mellitus, and transplant vascular disease. **Cardiovasc. Pathol.**, v. 11, n.6, p. 332-338, 2011.

WORTH, N. F.; ROLFE, B. E.; SONG, J.; CAMPBELL, G. R. Vascular smooth muscle cell phenotypic modulation in culture is associated with reorganisation of contractile and cytoskeletal proteins. **Cell Motil. Cytoskeleton.**, v. 49, p. 130-45, 2001.

XIE, Z.; GONG, M.C.; SU, W.; TURK, J.; GUO, Z. Group VIA phospholipase A2 (iPLA2beta) participates in angiotensin II-induced transcriptional up-regulation of regulator of G-protein signaling-2 in vascular smooth muscle cells. **J Biol Chem.**, v. 282, n. 35, p. 25278-25289, 2007.

XIE, Z.; GONG, M. C.; SU, W.; XIE, D.; TURK, J.; GUO, Z. Role of calcium-independent phospholipase A2 beta in high glucose-induced activation of RhoA, Rho kinase, and CPI-17 in cultured vascular smooth muscle cells and vascular smooth muscle hypercontractility in diabetic animals. **J. Biol. Chem.**, v. 285, n. 12, p. 8628-8638, 2010.

XU, S.; OGURA, S.; CHEN, J.; LITTLE, P.J.; MOSS, J.; LIU, P. LOX-1 in atherosclerosis: biological functions and pharmacological modifiers. **Cell Mol. Life Sci.**, v. 70, n. 16, p. 2859-2872, 2013.

YAMAMOTO, T.; ECKES, B.; KRIEG, T. Effect of interleukin-10 on the gene expression of type I collagen, fibronectin, and decorin in human skin fibroblasts: differential regulation by transforming growth factor-beta and monocyte chemoattractant protein-1. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.281, n.1, p. 200-5, 2001.

YAN, P.; XIA, C.; DUAN, C.; LI, S.; MEI, Z. Biological characteristics of foam cell formation in smooth muscle cells derived from bone marrow stem cells. **Int. J. Biol. Sci.**, v. 7, p. 937-46, 2011.

YAN, M.; MEHTA, J. L.; ZHANG, W.; HU, C. LOX-1, oxidative stress and inflammation: a novel mechanism for diabetic cardiovascular complications. **Cardiovasc. Drugs Ther.**, v. 25, n. 5, p. 451-459, 2011.

YE, P.; HU, X.; ZHAO, Y. The increase in plasminogen activator inhibitor type-1 expression by stimulation of activators for peroxisome proliferator-activated receptors in human endothelial cells. **Chin. Med. Sci. J.**, v. 17, n. 2, p. 112-116, 2002.

ZANI, I. A.; STEPHEN, S. L.; MUGHAL, N. A.; RUSSELL, D.; HOMER-VANNIASINKAM, S.; WHEATCROFT, S. B.; PONNAMBALAM, S. Scavenger receptor structure and function in health and disease. **Cells**, v. 4, n. 2, p. 178-201, 2015.

ZULIANI, J. P.; FERNANDES, C. M.; ZAMUNER, S. R.; GUTIERREZ, J. M.; 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, 2005.

ANEXO A -

SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
INSTITUTO BUTANTAN

FORMULÁRIO DE REGISTRO

Nº. DO ANEXO: 0001_001	MÉTODO: IB/MG/CM-0019_001
ÁREA: Seção de Controle Microbiológico	
TÍTULO: TESTE DE ENDOTOXINA BACTERIANA MÉTODO "GEL CLOT" - TESTE LIMITE	

IB/MG/CM-0019_001/0001_001/133 / 14

Data Entrada: 29 / 04 / 14

Nº. Registro (NR): 0254014

Data Teste: 13 / 05 / 14

Procedência: Laboratório de Farmacologia

Lote: 1305/14

Kit LAL

Endotoxina *E. coli*

Marca: Lonza

Marca: Lonza

Lote nº.: 298273

Lote nº.: 293024

Sensibilidade: 0,125 UE/ml

Concentração Utilizada: 25 UE/ml

Data da reconstituição: 12 / 05 / 14

Data da reconstituição: 18 / 04 / 14

Validade: 26 / 02 / 15

Validade: 16 / 10 / 14

Lotes de despirogenização dos materiais utilizados: 18-04914

Identificação da amostra	Diluição	Resultado Obtido
Amostra 2- PBS (seco); Amostra 3- Solina	Puro	LAL + PRODUTO → ⊕ ⊕ ⊕
EA; Amostra 8- Veneno B. insularis (VBil)-5 µg/ml	1:10	LAL + PRODUTO + ENDOTOXINA → ⊕
Amostra 10- HT-III (GUA)-6,3 µg/ml; Amostra 11- Veneno de C. durissus curvima (VC.Dr.) lote AE		LAL + PRODUTO → ⊕ ⊕ ⊕
10 µg/ml; Amostra 12- CBr lote AE-1, 6,5 µg/ml (A)		LAL + PRODUTO + ENDOTOXINA → ⊕
Água apirrogênica lote: 1305CA2		LAL + PRODUTO → ⊕ ⊕ ⊕
		LAL + PRODUTO + ENDOTOXINA → ⊕
		LAL + PRODUTO → ⊕ ⊕ ⊕
		LAL + PRODUTO + ENDOTOXINA → ⊕
		LAL + ÁGUA → ⊕ ⊕ ⊕
		LAL + ÁGUA + ENDOTOXINA → ⊕

Critérios de validação

O teste é considerado válido quando:

A temperatura do banho-maria manter-se constante a 37 °C ± 1 °C durante todo o ensaio;

O controle negativo (LAL + Água apirrogênica), não apresentar formação de gel;

Os controles positivos (LAL + Produto + endotoxina) e (LAL + Água apirrogênica + endotoxina), apresentarem formação de gel.

Critérios de validação do ensaio: ☒ Conforme☐ Não-conforme 1305/14

Observações: * (A) Amostra 14- VCdt- lote H, 5 µg/ml; Amostra 15- BbTx 2- lote KK 6,5 µg/ml

Cálculos:

Resultado: Menor que 0,125 UE/ml

Data: 14 / 05 / 14

Cristiane H. K. P. Moraes
Técnico de APCT
Seção de Controle Microbiológico

Angela Franco Mattos

Diretora de Controle de Qualidade
12/11/2013

Chefe de Seção A. Utescher
Chefe de Seção de Controle Microbiológico
Seção de Controle Microbiológico