Patrícia Pereira Defilippo

**Atividade enzimática dos subtipos de fosfolipase A₂ (PLA₂)
em cultura primária de neurônios**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Fisiopatologia Experimental
Orientador: Wagner Farid Gattaz

São Paulo

2009

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Defilippo, Patrícia Pereira

Atividade enzimática dos subtipos de fosfolipase A₂ (PLA₂) em cultura primária de neurônios / Patrícia Pereira Defilippo -- São Paulo, 2009.

Dissertação (mestrado) -- Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Fisiopatologia Experimental.

Orientador: Wagner Farid Gattaz.

Descritores: 1.Fosfolipases A 2.Neurônios 3.Técnicas de cultura de células
4.Método radioenzimático

USP/FM/SBD-285/09

Dedico este trabalho à minha família, sempre.

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar à Deus e minha família.

Obrigada ao meu orientador Prof. Dr. Wagner Farid Gattaz e co-orientadora Prof^a Dr^a Nádia Rezende Barbosa Raposo pelos ensinamentos e oportunidade única.

À toda equipe do Laboratório de Neurociências LIM-27.

Ao Centro de Bioterismo da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo pelo fornecimento dos animais utilizados nesse estudo.

APOIO FINANCEIRO

A realização deste trabalho foi possível devido ao apoio financeiro da FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), através do projeto temático “Metabolismo dos fosfolípidos nas doenças neuropsiquiátricas” (processo: 02/12633-7) no qual este trabalho está inserido e bolsa de estudos concedida (processo: 07/52790-4).

NORMALIZAÇÃO ADOTADA

Esta dissertação de mestrado está de acordo com

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journal Editors (Vancouver)*

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina - Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de Apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro de Cunha, Maria Julia de A. L.Fredi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 2ª ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

Abreviatura dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

Lista de Símbolos

Lista de Siglas

Lista de Figuras

Resumo

Summary

1 - INTRODUÇÃO	1
1.1 - Fosfolípides	2
1.2 - Fosfolipase A ₂ (PLA ₂)	5
1.3 - Grupos de PLA ₂	10
1.3.1 - PLA ₂ extracelular dependente de Ca ⁺² (sPLA ₂)	10
1.3.2 - PLA ₂ citosólica dependente de Ca ⁺² (cPLA ₂)	15
1.3.3 - PLA ₂ intracelular independente de Ca ⁺² (iPLA ₂)	23
1.3.4 - PLA ₂ PAF-acetil-hidrolase (PLA ₂ PAF-AH)	27
1.3.5 - PLA ₂ lisossomal (LPLA ₂)	29
1.3.6 - PLA ₂ tecido adiposo-específica (AdPLA ₂)	30
1.4 - Inibidores da PLA ₂	31
1.4.1 - Bromoenol-lactona (BEL)	31
1.4.2 - Metil-araquidonil-fluorofosfonato (MAFP)	33
1.4.3 - Araquidonil-trifluorometil-cetona (AACOCF ₃)	34
1.5 - Fosfolipase A ₂ (PLA ₂) e doenças neuropsiquiátricas	36
1.5.1 - Esquizofrenia	36
1.5.2 - Depressão	38
1.5.3 - Transtorno Afetivo Bipolar	40
1.5.4 - Epilepsia	41
1.5.5 - Doença de Alzheimer	42
1.6 - Cultura primária de neurônios: estudos e aplicações	44
1.7 - Modelos de estudo na determinação enzimática da PLA ₂	47
2 - OBJETIVOS	50
2.1 - Principal	50
2.2 - Secundários	50
3 - MATERIAL E MÉTODOS	51

3.1 - Cultura primária de neurônios.....	51
3.1.1 - Preparo dos recipientes de cultura.....	51
3.1.2 - Obtenção do tecido cortical.....	51
3.1.3 - Contagem das células.....	53
3.1.4 - Semeadura.....	54
3.2. - Preparação da amostra e determinação do conteúdo protéico	55
3.3 - Determinação da atividade de PLA ₂ – método radioenzimático	56
3.3.1 - Otimização do método radioenzimático	58
3.4 - Tratamento da cultura de neurônios corticais	60
3.5 - Determinação da viabilidade celular segundo o método MTT	60
3.6 - Análise estatística	62
4 - RESULTADOS	63
4.1 - Cultura de neurônios	63
4.2 - Otimização do método radioenzimático	63
4.2.1 - Curva de proteína e tempo de incubação	63
4.2.2 - Curva de substrato radioativo	66
4.2.3 - Curva de íons cálcio.....	67
4.2.4 - Curva de pH	68
4.2.5 - Curva do inibidor BEL	69
4.2.6 - Subtipos de PLA ₂ em cultura de neurônios	70
4.3 - Modulação da atividade dos subtipos da PLA ₂ na cultura de neurônios.....	70
4.3.1 - Inibição da atividade de iPLA ₂ com BEL	70
4.3.2 - Inibição da atividade de PLA ₂ com MAFP	71
4.3.3 - Inibição da atividade de PLA ₂ com olanzapina	73
4.4 - Avaliação da viabilidade celular segundo MTT	75
5 - DISCUSSÃO	76
6 - CONCLUSÕES	84
7 - REFERÊNCIAS	85

LISTA DE SÍMBOLOS

C18:1 ^{Δ9}	oleoil
C16:0	palmitoil
C18:2 ^{Δ9,12}	linoleoil
kDa	quilo Dalton
mg	miligramas
ml	mililitros
mM	milimolar
μM	micromolar
nm	nanômetro
pMol	picomol
v/v	volume/volume
α	alfa
β	beta
γ	gama
ζ	zeta
Δ	delta
ε	épsilon
η	eta

LISTA DE SIGLAS

AA	ácido araquidônico
AACOCF ₃	araquidonil trifluorometil cetona
A β	beta amilóide
Ad-PLA ₂	fosfolipase A ₂ tecido adiposo específica
AGE	ácidos graxos essenciais
AMPA	α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid
APP	proteína precursora do amilóide
Asp	aspartato
ATP	adenosina trifosfato
BEL	bromoenol-lactona
BSA	albumina bovina sérica
CaLB	domínio de ligação ao cálcio
Cappesq	Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP
CBR	regiões de ligação ao íon cálcio
Cl ₅₀	concentração inibitória mínima para 50% dos casos
COCF ₃	radical trifluorometilcetona
COOH	radical carboxila
COX	cicloxygenase
cDNA	ácido desoxiribonucléico complementar
cPLA ₂	fosfolipase A ₂ citosólica dependente de cálcio
DA	doença de Alzheimer
DGKA	diacilglicerolquinase
DHA	ácido docohexanóico
DIC	dia em cultura
DNA	ácido desoxiribonucléico
D2	receptor dopaminérgico
ECT	eletroconvulsoterapia
EPA	etil-eicosapentaenoato
FMA	forbol-12-miristato-13-acetato

GFP	proteína verde fluorescente
GTPase	guanosina trifosfatase
GluR2	subunidade do receptor de glutamato
[³ HA]	trício (terceiro isótopo do hidrogênio)
His	histidina
iPLA ₂	fosfolipase A ₂ intracelular independente de cálcio
Lp-PLA ₂	fosfolipase A ₂ associada à lipoproteína
LDL	lipoproteína de baixa densidade
LOX-5	lipoxigenase-5
LPS	lipolissacarídeo
LTM	memória de longa duração
LTP	potenciação de longa duração
LTD	depressão de longa duração
MAFP	metil-araquidonil-fluorofosfonato
MAPK	proteína quinase ativada por mitógeno
MEM	meio mínimo essencial
mRNA	ácido ribonucleico mensageiro
MTT	3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio brometo
M1	receptor muscarínico
NMDA	N-metil-D-aspartato
NMR	ressonância magnética nuclear
NTF	fator de síntese de neurotrofina
PACOCF ₃	palmitoil-trifluorometil-cetona
PAF	fator de ativação de plaquetas
PAF AH	PAF acetil-hidrolase
PBS	solução salina tamponada
PC	fosfatidilcolina
PC-liso	lisofosfatidilcolina
PC12	feocromocitoma
PC	fosfatidilcolina
PE	fosfatidil-etanolamina
PGD ₂	prostaglandina D ₂

PGE2	prostaglandina E2
PGF	fator de crescimento derivados de plaquetas
PI	fosfatidil-inositol
PIP ₂	fosfatidil-inositol-4,5-bifosfato
PKA	proteínaquinase A
PKC	proteínaquinase C
PKC- α	proteínaquinase C- α
PLA	fosfolipase A
PLC	fosfolipase C
PLD	fosfolipase D
PlsEtn-PLA ₂	fosfolipase A ₂ plasmalogênio-seletiva
³¹ P-MRS	espectroscopia de ressonância magnética do fósforo
PS	fosfatidilserina
PtdOH	ácido fosdatídico
PUFA	ácidos graxos poliinsaturados
ROS	espécies reativas de oxigênio
SDS	dodecil-sulfato de sódio
Ser	serina
SNC	sistema nervoso central
sPLA ₂	fosfolipase secretória extracelular
STM	memória de curta duração
5HT2	receptor serotoninérgico

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Representação da membrana plasmática.....	2
Figura 2	Estrutura dos fosfolípides.....	3
Figura 3	Sítio de clivagem da PLA ₂	6
Figura 4	Ataque da fosfolipase A ₂ à membrana celular.....	9
Figura 5	Mecanismo catalítico da sPLA ₂	12
Figura 6	Translocação da cPLA ₂ GIVA (cPLA ₂ α) do citosol para a região perinuclear e envelope nuclear.....	19
Figura 7	Mecanismo de regulação da atividade catalítica da PLA ₂ GVIA via calmodulina e depleção dos estoques de cálcio.....	24
Figura 8	Estrutura química do Bromoenol-lactona.....	32
Figura 9	Estrutura química do Metil-araquidonil-fluorofosfonato.....	33
Figura 10	Estrutura química do Metil-araquidonil-trifluorometil-cetona.....	34
Figura 11	Extração por laparotomia (A) e saco uterino contendo os embriões (B).....	52
Figura 12	Embriões (A) e cérebros de embriões (B) com idade gestacional de 18 dias (<i>Wistar</i>).....	52
Figura 13	Clivagem do substrato PC ¹⁴ C pela PLA ₂	57
Figura 14	Cultura primária de neurônios corticais de rato.....	63
Figura 15	Influência do tempo e da concentração de proteína sobre a atividade da iPLA ₂	64
Figura 16	Influência do tempo e da concentração de proteína sobre a atividade da cPLA ₂	65
Figura 17	Influência do tempo e da concentração de proteína sobre a atividade da sPLA ₂	65
Figura 18	Influência da radioatividade (substrato radioativo) sobre a atividade de PLA ₂	66
Figura 19	Influência da concentração de cálcio sobre a atividade de PLA ₂	67
Figura 20	Influência do pH sobre a atividade de PLA ₂	68

Figura 21	Influência da concentração de BEL sobre a atividade da iPLA ₂	69
Figura 22	Atividade dos subtipos de PLA ₂ em cultura primária de neurônios corticais.....	70
Figura 23	Atividade de iPLA ₂ em cultura primária de neurônios corticais de rato tratadas com concentrações crescentes de BEL por 30 minutos.....	71
Figura 24	Atividade de iPLA ₂ em cultura primária de neurônios corticais de rato tratadas com concentrações crescentes de MAFP por 30 minutos.....	72
Figura 25	Atividade de cPLA ₂ em cultura primária de neurônios corticais de rato tratadas com concentrações crescentes de MAFP por 30 minutos.....	72
Figura 26	Atividade de iPLA ₂ em cultura primária de neurônios corticais de rato tratadas com concentrações crescentes de olanzapina por 30 minutos.....	73
Figura 27	Atividade de cPLA ₂ em cultura primária de neurônios corticais de rato tratadas com concentrações crescentes de olanzapina por 30 minutos.....	74
Figura 28	Atividade de sPLA ₂ em cultura primária de neurônios corticais de rato tratadas com concentrações crescentes de olanzapina por 30 minutos.....	74

RESUMO

Defilippo, P.P. ***Atividade enzimática dos subtipos de fosfolipase A₂ (PLA₂) em cultura primária de neurônios*** [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2009.109 p.

A fosfolipase A₂ (PLA₂) é considerada uma enzima chave no metabolismo de fosfolípidos, principais constituintes das membranas celulares. Alterações da atividade da PLA₂ têm sido descritas no cérebro e sangue (soro, plasma e plaquetas) de pacientes com diversas doenças neuropsiquiátricas e também em matrizes biológicas como tecido cerebral de ratos e cultura de células neuronais. A inibição da atividade da PLA₂ em cultura primárias de neurônios corticais de rato resultou em neurotoxicidade, o que demonstra o papel da PLA₂ em processos de sobrevivência e desenvolvimento neuronal. Neste estudo foi padronizado um ensaio radioenzimático para caracterização dos três principais subtipos da PLA₂ em cultura primária de neurônios: PLA₂ secretória dependente de cálcio (sPLA₂), PLA₂ citosólica dependente de cálcio (cPLA₂) e PLA₂ intracelular independente de cálcio (iPLA₂). Para isso foram testadas variáveis críticas para a reação enzimática e com os resultados obtidos houve um aprimoramento do método empregado. Foi encontrada ainda, uma predominância do subtipo iPLA₂ (71%) nas culturas de neurônios. Dessa forma, apresentamos um modelo *in vitro* para determinação da atividade dos subtipos de PLA₂ que pode ser considerado uma ferramenta para compreensão dos mecanismos envolvidos nas doenças neuropsiquiátricas, nas quais a PLA₂ encontra-se alterada. Além disso, a partir de modelos laboratoriais baseados em estudos com culturas de células, poderão ser evidenciados os efeitos de diversas substâncias químicas novas ou de uso tradicional, como drogas de interesse psiquiátrico, sobre os neurônios.

Descritores: 1. Fosfolipases A 2. Neurônios 3. Técnica de cultura de células 4. Método radioenzimático

SUMMARY

Defilippo, P.P. ***Activity of phospholipase A₂ (PLA₂) subtypes in primary cultures of rat cortical neurons*** [dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2009.109 p.

The phospholipase (PLA₂) is considered a key enzyme in the metabolism of phospholipids, which are the main constituents of cellular membranes. Alterations in PLA₂ activity have been reported in the brain and blood cells of psychiatric patients and also in biological matrixes like rat brain tissues and cultures of neuron cells. Inhibition of PLA₂ activity in primary cultures of rat neurons resulted in neurotoxicity, which demonstrates the role of PLA₂ in survival processes and neuronal development. In this study, a radio-enzymatic assay was standardized to detect the activity of the three main groups of PLA₂, which are the calcium dependent secretory PLA₂ (sPLA₂), the cytosolic calcium dependent PLA₂ (cPLA₂) and the intracellular calcium independent PLA₂ (iPLA₂), in the culture of neurons. Critical variables for the enzymatic assay were tested and from the results the method used was modified. Our findings demonstrate that there is a predominance of iPLA₂ subtype (71%) in cultures of rat neurons. So therefore we present an *in vitro* model which aims to determine the main activity of PLA₂ subtypes and can be considered an investigative tool for comprehending the mechanisms involved in neuropsychiatric disorders that show alterations in PLA₂ activity. Furthermore, the effects of new chemical and traditional substances, such as the drugs used in psychiatric treatments, can be evidenced in the neurons by the use of laboratorial models based on studies of neuron cultures.

Descriptors: 1. Phospholipases A 2. Cell culture techniques 3. Neurons
4. Radioenzymatic assay

1 - INTRODUÇÃO

A importância do ácido araquidônico (AA) no sistema nervoso central (SNC) foi reconhecida quando Bazan (1970) observou um aumento rápido e transitório desse ácido graxo no cérebro devido a convulsões e isquemia cerebral. O *efeito Bazan* vem sendo estudado por mais de 30 anos, com a finalidade de se esclarecer o mecanismo que regula esse aumento de AA proveniente da membrana de fosfolípides no SNC.

Membranas celulares são amplamente constituídas de fosfolípides (Horrobin et al., 1994). O padrão de organização de fosfolípides na bicamada lipídica é determinado pelo tamanho e orientação das cabeças polares e cadeias acil/alquil.

Fosfolípides constituem não somente a base estrutural das membranas, como também lhes confere características de fluidez, permeabilidade para íons e ainda, permitem a criação de um delicado microambiente no interior celular. Na bicamada fosfolipídica de membranas celulares estão inseridos receptores, enzimas e canais iônicos que estão localizados predominantemente nas superfícies intra e extracelular ou que se projetam da membrana (Figura 1). Essas membranas são altamente interativas e dinâmicas. A interação de um agonista com um receptor leva ao aumento do metabolismo fosfolipídico que, conseqüentemente, regulará a atividade dessas enzimas, receptores e canais iônicos ligadas à membrana (Farooqui et al., 2004).

Fosfolípides de membranas neuronais são particularmente importantes na sinalização celular, na formação e remodelamento de dendritos e

sinapses (Horrobin 1998a, 1998b; Horrobin et al., 1994). Todos os neurotransmissores são transportados em vesículas fosfolipídicas. O aumento e a reposição de alguns desses neurotransmissores e íons dependem do realinhamento das moléculas fosfolipídicas. A natureza do fosfolípide é um fator determinante na maneira pela qual os transmissores e os íons serão liberados ou recapturados (Horrobin e Bennet, 1999).

Figura 1 - Representação da membrana celular.
 FONTE: www.3dblogspot.com.br

1.1 - Fosfolípides

Membranas neuronais contêm as três maiores categorias de lípides: colesterol, esfingolípides e fosfolípides. Um fosfolípide típico é constituído de três regiões: uma cabeça polar hidrofílica, glicerol e uma longa cadeia de hidrocarbonetos hidrofóbica (Figura 2).

Figura 2 - Estrutura do fosfolípide. FONTE: www.uic.edu

O glicerol é constituído por três carbonos, nomeados de acordo com suas respectivas posições em *sn-1*, *sn-2*, *sn-3*. Ligado ao carbono *sn-3* existe um átomo de fósforo que, por sua vez, está ligado a um dos integrantes do chamado grupo polar.

O grupo polar pode ser representado por uma colina, etanolamina, inositol ou serina (Ser), formando respectivamente, fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilserina (PS) e fosfatidilinositol (PI). A PC, em sua grande maioria, age como componente estrutural na porção exterior da membrana. Uma pequena parte, originada da metilação da PE, é responsável por fornecer ácidos graxos envolvidos na transdução de sinais. As PEs são ricas em ácidos graxos insaturados, que fornecem maior fluidez e flexibilidade à membrana. PS é normalmente encontrada na porção interna da membrana. No entanto, caso ocorra um dano celular, em particular apoptose, ocorre uma inversão da posição de PS que auxilia na remoção

das células apoptóticas. PI é um componente particularmente importante na transdução de sinais (Horrobin e Bennet, 2003; Piomelli, 2005).

O comportamento funcional das membranas neuronais depende da maneira pela qual os fosfolípides individuais estão alinhados, intercalados com colesterol e associado às proteínas. Cada classe de fosfolípide existe, na verdade, como uma mistura heterogênea de espécies moleculares. A síntese de diferentes *pools* dentro de uma subclasse de fosfolípide parece ser compartimentalizada de acordo com a composição do ácido graxo e grupo polar, através de reações de modificação e interconversão (Farooqui et al., 2002). As propriedades de cada molécula de fosfolípide são dependentes tanto da natureza do grupo polar quanto das moléculas ligadas à posição *sn*-1 e *sn*-2 do fosfolípide. Essas moléculas são geralmente ácidos graxos, conhecidas também como grupos acil.

Os ácidos graxos saturados, constituídos de uma cadeia carbônica com ligações simples entre os átomos de carbono, são estruturas rígidas e possuem cadeias de hidrocarbonetos com diferentes comprimentos. Por sua vez, ácidos graxos insaturados possuem uma ou mais ligações duplas entre os átomos de carbono. As ligações duplas possuem uma determinada angulação e flexibilidade, conferindo mobilidade à cadeia carbônica. Quanto maior o número de ligações duplas, mais fluida, flexível e aparentemente, desordenada será a molécula de fosfolípide (Horrobin e Bennet, 2003).

Os ácidos graxos insaturados são distribuídos em duas séries: ômega-3 e ômega-6, sendo que os números citados indicam a posição da primeira dupla ligação da cadeia carbônica. Esses ácidos graxos são considerados

ácidos graxos essenciais (AGE), pois não podem ser sintetizados e devem ser adquiridos através da dieta alimentar. Os principais AGE são o ácido linoléico e o ácido α -linolênico e, a partir destes, podem ser derivados todos os demais AGE. Aproximadamente 20% do peso do cérebro consistem de AGE, sendo o AA (ω -6) e o ácido docohexanóico (DHA) (ω -3) os maiores constituintes (Fenton et al., 2000; Horrobin e Bennet, 2003).

Os fosfolípides do cérebro são ricos em ácidos graxos insaturados com três a seis duplas ligações, nomeados ácidos graxos poliinsaturados (PUFA). Esses ácidos graxos são importantes para permitir rápidas mudanças no formato da membrana e sua fusão durante a formação e rompimento das conexões sinápticas, juntamente com o aumento de neurotransmissores (British Nutrition Foundation, 1992; Horrobin e Manku, 1990; Horrobin, 1992a).

1.2 - Fosfolipase A₂ (PLA₂)

Membranas neuronais são degradadas por hidrólise via receptores com o envolvimento de fosfolipases, lisofosfolipases e lipases (Farooqui et al., 2000a, 2000b). O metabolismo de PUFA presentes na membrana do SNC (Sung e Horrocks, 1970) é predominantemente controlado pela fosfolipase A₂ (PLA₂) e aciltransferases em um ciclo conhecido como deacilação-reacilação (Farooqui et al., 2000b; Lands e Crawford., 1979; Sung e MacQuarrie, 1989). A PLA₂ atua removendo especificamente AGE da posição *sn*-2 dos fosfolípides, liberando resíduos sem o grupo acil ligado à

posição *sn*-2, denominados lisofosfolípides (Figura 3). Esse processo proporciona uma oportunidade para a célula alocar na posição *sn*-2 vaga um ácido graxo mais apropriado para uma determinada função (Bazan et al., 1993). Ambos, AGE e lisofosfolípides, são moléculas altamente ativas na sinalização celular.

Figura 3 - Sítio de clivagem da PLA₂. FONTE: www.ava.org.ve

Várias classes de receptores neuronais acoplados à proteínas G desencadeiam cascatas de sinalização intracelular por meio da ativação da PLA₂. Os receptores envolvidos pertencem às famílias de receptores dopaminérgicos D2 (Vial e Piomelli, 1995), serotoninérgicos 5HT₂ (Berg, 1996), muscarínicos M1 (Jones et al., 1996) e glutamatérgicos (Farooqui e Horrocks, 1994). Em condições normais, as enzimas da família PLA₂ são envolvidas na manutenção da função celular normal, pelo fornecimento de AA que pode ser convertido em uma série de moléculas sinalizadoras, conhecidas por eicosanóides. Isso inclui prostaglandinas, leucotrienos e

hidroxiácidos, entre outras. Esses metabólitos atuam como segundos mensageiros.

O metabolismo do AA é intensamente investigado nos aspectos farmacológico, fisiológico e bioquímico. A direta clivagem do AA da posição *sn*-2 via PLA₂ é a etapa chave na deacilação em células. Contudo, é importante citar que o AA pode ser gerado por outras vias. A atuação da fosfolipase do tipo C (PLC) sobre a molécula de fosfolípide, forma diacilglicerol que, quando clivado, gera AA via mono ou diacilglicerol-lipase. Já a fosfolipase D (PLD) gera ácido fosfatídico (PtdOH), que será então metabolizado pela ácido-fosfatídico hidrolase em diacilglicerol e AA (Balsinde, 1999). O AA modula canais iônicos e regula a atividade de inúmeras enzimas como proteínaquinase A (PKA), proteínaquinase C (PKC), diacilglicerolquinase (DGKA) e proteína ativadora de guanosina trifosfatase (GTPase). Esse ácido também afeta receptores para fatores de crescimento derivados de plaquetas (PGF) e N-metil-D-aspartato (NMDA), além de inibir a recaptação de glutamato mediada pelo transporte excitatório de aminoácidos (Farooqui et al., 1996).

A ação enzimática da PLA₂ também gera um precursor do fator de ativação de plaquetas (PAF). Isso ocorre quando os produtos dos lisofosfolípidos contêm um radical colina e um grupo acil ligado à posição *sn*-1. Eicosanóides e PAF são mediadores chave na inflamação (Smith et al., 2000).

PAF e AA foram inicialmente estudados em relação às suas funções na resposta inflamatória clássica, tais como o aumento da permeabilidade

vascular e a infiltração por células inflamatórias. Entretanto evidências crescentes mostram que estes lípides bioativos também possuem papéis neurobiológicos significativos sobre canais iônicos, receptores, na liberação dos neurotransmissores, plasticidade sináptica e expressão de genes neuronais (Giulian, 1992). Além disso, os lípides bioativos podem ser considerados mensageiros duplos: modulam funções da célula como mensageiros e tornam-se parte da resposta do tecido nervoso lesado na resposta inflamatória. Esta resposta é observada nos danos decorrentes da reperfusão pós-isquêmica, nas várias formas de neurotrauma, nas doenças infecciosas e nas doenças neurodegenerativas do SNC tais como doença de Alzheimer (DA).

A inflamação no sistema nervoso central difere da inflamação observada em outros tecidos. Se a barreira hematoencefálica for quebrada, células inflamatórias invadem o espaço intercelular e as células gliais são ativadas, particularmente a microglia. Estas células desempenham um papel relevante na resposta inflamatória e podem conduzir à morte neuronal (Giulian, 1992). Além disso, isquemia, convulsões e outras formas de injúrias desencadeiam o processo inflamatório e sensibilizam as respostas neuronais, principalmente por meio dos receptores NMDA de glutamato. Conseqüentemente, ocorre ativação da PLA₂ e liberação do AA, acarretando aumento da síntese de eicosanóides e PAF e recrutamento da ciclooxigenase-2 (COX-2) nos neurônios. As prostaglandinas, derivadas do AA pela ação da enzima COX estão envolvidas na regulação da condução nervosa e na liberação de neurotransmissores (Piomelli, 1993). Os

eicosanóides diferem de outros mensageiros intracelulares de modo importante, pois eles podem cruzar a membrana neuronal e deixar a célula em que foram gerados para atuar em células vizinhas, como resultado de sua natureza anfifílica. Uma vez que prostaglandinas, leucotrienos e PAF podem todos ser derivados da ação da PLA₂, a inibição dessa enzima interfere simultaneamente na sinalização por essas três vias.

A atividade catalítica da PLA₂ sobre a membrana celular (Figura 4) é estimulada, de maneira geral, quando ocorre fosforilação no resíduo Ser⁵⁰⁵ (serina 505) pela proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK). Esta enzima é regulada por mecanismos de transcrição, modulação pós-transcricional da atividade enzimática e translocação na membrana. A PLA₂ está relacionada a diversas respostas celulares, como transdução de sinais, mecanismo de defesa, coagulação sanguínea, digestão e remodelamento de membrana (Murakami et al., 1998).

Figura 4 - Ataque da fosfolipase A₂ à membrana celular.
FONTE: www.rugnj.pg

1.3 - Grupos de PLA₂

1.3.1 - PLA₂ extracelular dependente de Ca⁺² (sPLA₂)

A atividade das formas secretórias da PLA₂ foi primeiramente estudada no suco pancreático e veneno de cobra no início do século passado. Subseqüentemente, sPLA₂ foram bem caracterizadas, mecanicamente elucidadas e estruturalmente definidas (Dennis, 1994). O genoma humano contém nove genes de sPLA₂ (Lambeau e Gelb, 2008). Sua nomenclatura é baseada no padrão da ligação dissulfídica e na ordem de descoberta (Schaloske e Dennis, 2006). Estas enzimas possuem um peptídeo sinalizador N-terminal (Lambeau e Gelb, 2008) e baixo peso molecular (~16kDa). sPLA₂ requer íons cálcio na ordem de milimolar para sua catálise, não demonstram preferência pelo AA frente a outros ácidos graxos na posição *sn*-2 dos fosfolípidos (Dennis, 1994). Além disso, sPLA₂ são estocadas em grânulos citoplasmáticos para serem então secretadas para o meio extracelular, mediante estimulação (Akiba e Sato, 2004).

Estudos de cristalografia (Dennis, 1983; Waite, 1987) demonstraram que a sPLA₂ possui subunidades α e β -hélice e uma região anti-paralela em formato de alça (chamada *beta-wing*) em seu domínio catalítico.

Evolutivamente, sPLA₂ são as mais elementares das PLA₂. Contudo, seu mecanismo de ação é bem definido. Este subtipo enzimático não representa uma enzima acil clássica (serina protease), pois utiliza resíduos catalíticos de histidina (His) e aspartado (Asp) juntamente com o íon cálcio. Este íon se liga ao sítio denominado *loop* pancreático para polarizar uma

ligação com a molécula de água e então atacar um radical carbonila presente nos fosfolípidos. Agem de maneira ótima quando o substrato fosfolipídico é parte de uma interface como uma micela ou membrana. Primeiramente, Verger e colaboradores (1973) propuseram um modelo para a ligação enzima-substrato, em que ocorre uma ligação da enzima com sua própria interface e não à molécula de fosfolípidos. Isso levaria à ativação da enzima que só então, se ligaria ao substrato fosfolipídico. Posteriormente, baseado na “cinética de diluição de superfície”, foi proposto um segundo modelo de ligação enzima-substrato, no qual a enzima solúvel em água se liga a um primeiro substrato fosfolipídico, formando uma interface, para em seguida, se ligar a um segundo substrato agora em seu local catalítico (Dennis, 1994). Por fim, em estudos recentes de cinética e cristalografia, Jain e Berg (2006) propuseram que o mecanismo catalítico da sPLA₂ envolve duas moléculas de água, sendo que uma delas se liga ao íon cálcio (Figura 5). A característica comum a todos esses mecanismos é a presença de um resíduo de His associado ao íon cálcio para estabilizar a ligação.

Figura 5 - Mecanismo catalítico da sPLA (proposto por Jain e Berg, 2006).

A membrana plasmática é um dos principais locais de ação da sPLA₂. No entanto, essa enzima parece apresentar uma diminuição em sua atividade frente às membranas celulares intactas. Assim, é necessária uma perturbação física ou rearranjo da membrana para que ocorra a atividade enzimática (Kudo et al., 1993; Murakami et al., 1995)

As formas secretórias de PLA₂ são subdivididas nos grupos GI, GII, GIII, GV, GIX, GX, GXI, GXII, GXIII, GXIV (Schaloske e Dennis, 2006).

O grupo GIA da sPLA₂ é constituído de isoenzimas isoladas da espécie de cobras *Naja mossambica mossambica* que estimulam a secreção de células β do pâncreas (Juhl et al., 2003). sPLA₂GIB também está presente na constituição do suco pancreático, sendo essencial para a digestão no trato gastrointestinal de fosfolípidos provenientes na dieta. Enzimas deste grupo participam também da regulação de respostas celulares em tecidos via receptores do tipo M (Ishizaki et al., 1994).

As enzimas do Grupo II foram originalmente isoladas do líquido sinovial de pacientes com artrite reumatóide (Seilhamer et al., 1989) e estão amplamente distribuídas em humanos e ratos. Sua expressão está aumentada diante de processos inflamatórios (Kuwata et al., 1998; Pfeilschifter et al., 1993).

sPLA₂GV é uma isoenzima presente em tecidos de camundongos e coração de ratos e humanos (Chen et al., 1994). Sua atividade enzimática é estimulada por processos inflamatórios (Balboa et al., 1996; Reddy et al., 1997; Sawada et al., 1999). Evidências recentes sobre sPLA₂GV em camundongos *knockout* sugerem que esta isoenzima atue no mecanismo de defesa inicial contra invasão por fungos (Satake et al., 2004).

sPLA₂ GV e GX podem estar envolvidas na imunidade inata em infecções por adenovírus. Isso sugere que essas duas isoenzimas atuem na proteção de células contra infecção através do aumento de níveis de lisofosfatidilcolina (PC-liso) (Ohto et al., 2005). Análises de imunofluorescência confocal indicam a presença da sPLA₂GV no nucléolo de astrocitomas do tipo PC12 (linhagem celular derivada de feocromocitomas da medula supra-renal de rato) mantidos em cultura de células corticais neuronais e da glia de cérebro de ratos (Baker e Chang, 1982; Nardichi et al., 2007), o que indica um possível papel da sPLA₂ nas células neuronais.

Tanto a sPLA₂GIIA quanto a GV são capazes de amplificar o estímulo inicial e prolongar as fases de metabolismo do AA por mecanismos autócrinos, parácrinos e justácrinos (Balboa et al., 1996; Chen et al., 1994; Kuwata et al., 1998; Murakami et al., 1998; Pfeilschifter et al., 1993; Reddy et

al., 1997; Sawada et al., 1999; 1999; Tada et al., 1998). Suas funções parecem depender da ligação à proteoglicanas de superfície (Murakami et al., 1993, 1998, 1999; Polgar et al., 1997; Suga et al., 1993; Tada et al., 1998). Em contraste, sPLA₂GIIC que exibe mínima capacidade de ligação à proteoglicanas na superfície celular, não é capaz de aumentar o metabolismo de AA significativamente (Tischfield, 1997).

Os grupos IIA, IIC, IID e V estão intimamente relacionados, devido à distribuição de seus genes no mesmo *locus* cromossomal (Ishizaki et al., 1999; Tischfield, 1997). sPLA₂ GIIA, GIID e GV promovem a degranulação de mastócitos (Murakami et al., 1999) e ainda interferem em processos de coagulação através da ligação ao fator Xa da coagulação ou mesmo através da hidrólise do fosfolípide, já que a formação do coágulo é dependente da membrana fosfolipídica intacta (Kini, 2005; Mounier et al., 2001).

Certas sPLA₂ exercem ação bactericida contra Gram-positivos, o que sugere sua participação em mecanismos de defesa, particularmente GIIA, GV, GX e GXII humanas e GIIA, GIID e GV de células murinas (Beers et al., 2002; Koduri et al., 2002).

Kolko e colaboradores (2006) demonstraram a presença dos grupos GIIIE, GV e GX em culturas primárias de neurônios corticais. Isso prediz a distribuição destas isoenzimas, principalmente nas regiões corticais e hipocampus cerebrais. A expressão elevada de alguns subtipos de PLA₂ secretórias em várias doenças inflamatórias sugere que esta enzima esteja envolvida nos mecanismos de defesa do hospedeiro (Dennis, 1994). As sPLA₂ têm atraído considerável atenção dos pesquisadores, não somente

pelo fato de estarem envolvidas na transdução de sinais, mas também pelo fato de suas atividades estarem alteradas em algumas doenças neurodegenerativas fortemente associadas com inflamação e estresse oxidativo, injúria no tecido neural e em alguns tumores cerebrais (Yang et al., 1999a). Além disso, sPLA₂ estão presentes em todas as regiões cerebrais e apresentam maior atividade na medula oblongata, hipocampo, córtex e menor atividade no tálamo e hipotálamo (Farooqui et al., 2004).

1.3.2 - PLA₂ citosólica dependente de Ca⁺² (cPLA₂)

O Grupo IV (cPLA₂) foi identificado em uma variedade de células, como plaquetas, células do rim e macrófagos. Seu isolamento, determinação da seqüência e clonagem foram realizados a partir da linhagem de células U973 (Clark et al., 1990; 1991; Kramer et al., 1991; Sharp et al., 1991). Essa enzimas intracelulares citosólicas possuem alto peso molecular (85 kDa), requerimento de íons cálcio na ordem submicromolar e apresentam especificidade pelo AA.

cPLA₂ possui o domínio CaLB na seqüência N-terminal de sua cadeia carbônica, similar ao domínio C2 de ligação ao cálcio. O cálcio se liga ao domínio C2 e induz à translocação da cPLA₂ do citosol para o complexo de Golgi, retículo endoplasmático e envelope nuclear (Evans et al., 2001; Nalefsky et al., 1994). A presença do domínio de ligação ao cálcio e o requerimento de deste íon em concentrações submicromolares reforçam a teoria de que a translocação da enzima ocorra em resposta aos sinais de

cálcio. Contudo, em contraste à sPLA₂, o cálcio não exerce um papel catalítico para cPLA₂ e sim auxilia na associação da enzima citosólica à membrana fosfolipídica. Além disso, é relatada uma atividade lisofosfolipídica (LPL) para a enzima cPLA₂ com envolvimento de íons cálcio e o domínio CaLB (Dennis, 1994).

A fosforilação da cPLA₂ leva ao aumento da liberação do AA e conseqüente aumento da atividade enzimática *in vitro* (Lin et al., 1993; Nemenof et al., 1993). A fosforilação e ativação enzimática ocorrem nos resíduos de aminoácidos serina e aspartato, com destaque para a fosforilação na Ser⁵⁰⁵ pela MAPK. Além disso, a fosforilação da cPLA₂ na Ser⁷⁰⁷ pela proteína quinase MNK1 e Ser⁵¹⁵ pela proteína quinase dependente do complexo cálcio-calmodulina também exercem um papel fundamental na sua ativação (Börsch-Haubold et al., 1998; Hefner et al., 2000; Muthalif et al., 2001).

Foram descobertas duas isoformas do Grupo IV que possuem homologia de aproximadamente 30% à cPLA₂ agora conhecida como cPLA₂GIVA (cPLA₂α). As formas parálogas à cPLA₂GIVA são: cPLA₂GIVB (cPLA₂β) com 114 kDa, dependente de cálcio (Pickard et al., 1999; Song et al., 1999) e a cPLA₂GIVC (cPLA₂γ) com 61 kDa, independente de cálcio (Hirabayash e Shimizu, 2000).

cPLA₂GIVA é grupo mais estudado das PLA₂ citosólicas. O cDNA foi clonado a partir da biblioteca de linhagens celulares de macrófagos humanos e murinos (Clark et al., 1991; Sharp et al., 1991). Esta isoenzima é amplamente expressa em tecidos humanos e níveis de mRNA estão

presentes no cérebro, rins, pâncreas, placenta e pulmão (Pickard et al., 1999; Sharp e White, 1993). Diferentes tipos celulares contêm cPLA₂GIVA além de macrófagos, como neutrófilos, plaquetas, células endoteliais, musculares, células epiteliais alveolares, células mesangiais renais e queratinócitos (Kramer et al., 1997).

A máxima ativação da cPLA₂GIVA necessita de uma substancial fosforilação na Ser⁵⁰⁵ por um membro da família MAPK (Kramer et al., 1995; Lin et al., 1993; Qiu e Leslie, 1994). Análises de cPLA₂GIVA mutante, a qual não possui locais de fosforilação para MAPK (cPLA₂GIVA-S505A) demonstraram uma diminuição na sua capacidade de aumentar níveis de AA em resposta a agonistas (Lin et al., 1993).

Experimentos que utilizaram membranas sintéticas demonstraram que a cPLA₂GIVA possui seletividade para fosfolípidos que contenham AA na posição *sn*-2 da cadeia fosfolipídica (Clak et al., 1990; Gronich et al., 1990; Kramer et al., 1996; Leslie et al., 1988; Takayama et al., 1999; Wijkander e Sunder., 1991). cPLA₂GIVA recombinante adicionada à membranas naturais, hidrolisa preferencialmente fosfolípidos araquidonil vinte vezes mais que oleoil (C18:1^{Δ9}), palmitoil (C16:0) ou linleoil (C18:2^{Δ9,12}), quando uma relativa abundância de cada ácido é considerada (Clark et al., 1991; Diez et al., 1994).

A localização da cPLA₂ é amplamente estudada, a fim de se identificar a membrana subcelular à qual essa enzima se liga (Peters-Golden e McNish, 1993). Proteínas marcadas com *green fluorescent protein* (GFP) permitem a monitorização da localização de proteínas em tempo real em

células vivas. Um aumento na concentração de íons cálcio induz à rápida translocação da cPLA₂GIVA–GTP para um restrito espaço na região perinuclear, incluindo o envelope nuclear com concomitante aumento de AA. A ativação da cPLA₂GIVA ocorre posteriormente à sua translocação para a região perinuclear.

No fragmento amino-terminal da cPLA₂GIVA está presente o domínio de ligação ao cálcio (Clark et al., 1991; Nalefski et al., 1994). A estrutura desse domínio foi determinada usando o exame de cristalografia e técnicas de ressonância magnética nuclear (NMR) (Perisic et al., 1998; Xu et al., 1998). O domínio consiste de uma estrutura sanduíche de duas folhas β anti-paralelas compostas de quatro camadas que se liga à dois íons cálcio em regiões conhecidas como regiões de ligação ao íon cálcio (CBRs) (Dessen et al., 1999; Perisic et al., 1998).

Em contraste, o fragmento carboxi-terminal não possui esse domínio e não se liga à membrana, contudo possui atividade catalítica para substratos fosfolipídicos monoméricos (Nalefski et al., 1994). Essas informações indicam que o domínio de ligação ao íon cálcio da cPLA₂GIVA é, na verdade, um domínio funcional responsável pela ligação da enzima à membrana de fosfolípidos de uma maneira dependente de cálcio (Hirabayash e Shimizu, 2000).

O aumento na concentração de cálcio durante a sua translocação ocorre pela mobilização de estoques internos e/ou influxo de cálcio do espaço extracelular via canais operados por voltagem, receptores e estoque. Íons cálcio na concentração de 0,3-1 μ M promovem a ligação da cPLA₂GIVA

à membrana (Channon e Leslie, 1990; Clark et al., 1991). Contudo, existem evidências de que fosfolípides aniônicos, particularmente, fosfatidil-inositol 4,5-bifosfato (PIP_2), promovem a ligação da cPLA_2GIVA às vesículas lipídicas e aumentam sua atividade *in vitro* de uma maneira independente de cálcio (Buckland e Wilson, 1997; Leslie e Channon, 1990; Mosior e Dennis, 1998). A habilidade potencial de fosfolípides específicos de se ligar à cPLA_2GIVA , na ausência de cálcio, pode ser a base molecular para ativação do mecanismo catalítico da cPLA_2GIVA com baixas concentrações de cálcio.

Através da translocação do citosol para a membrana, PLA_2GIVA pode ter acesso ao substrato fosfolipídico. Esse padrão de localização torna possível a participação da cPLA_2GIVA no suprimento de AA para enzimas que participam da biossíntese de eicosanóides (Hirabayash e Shimizu, 2000) (Figura 6). Em conclusão, a translocação da cPLA_2GIVA e o aumento do AA dependem de padrões de sinalização de íons cálcio (Gijón e Leslie, 1999).

Figura 6 - Translocação cPLA_2GIVA ($\text{cPLA}_2\alpha$) do citosol para região perinuclear e envelope nuclear. FONTE: Hirabayashi e Shimizu, 2000.

Com relação à atuação enzimática, estudos comprovam o envolvimento da cPLA₂GIVA em mecanismos de estresse oxidativo e distúrbio sináptico envolvidos na patogênese de doenças neuropsiquiátricas, particularmente DA (Shelat et al., 2008). Em neurônios corticais em cultura, o peptídeo β -amilóide ($A\beta$) induz à formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) via ativação de receptores NMDA. ROS levam à ativação de cPLA₂GIVA e conseqüente aumento de AA e lisofosfolípidos. O AA pode funcionar como mensageiro retrógrado e atuar na modulação da plasticidade sináptica. Lisofosfolípidos, por sua vez, podem causar perturbação na membrana plasmática. O uso de antagonistas de receptores NMDA, como por exemplo a memantina, bloqueiam o aumento do AA provavelmente por essa via, um possível mecanismo do efeito neuroprotetor verificado.

Em culturas de neurônios de Purkinje, a estimulação de receptores α -amino-3-hidroxi-5-metiloxazole-4-propionato (AMPA) levou à translocação da cPLA₂GIVA para os compartimentos de Golgi somáticos e dendríticos e o uso de inibidores da cPLA₂GIVA reduziu o número de subunidades GluR2 de receptores de glutamato. Esses resultados demonstram o envolvimento da cPLA₂ no decréscimo da expressão de receptores AMPA e formação da potenciação de longa duração (LTP) cerebelar, uma forma de plasticidade sináptica (Masato et al., 2008).

Estudos de caracterização do segundo grupo (GIVB) da cPLA₂, demonstraram que esta isoenzima possui cDNA com proteínas de 1002 aminoácidos (Hirabayash e Shimizu, 2000) e análises *northern* mostram que seu RNA mensageiro (ácido ribonucléico mensageiro) é fortemente expresso

no pâncreas, cérebro, coração e fígado. cPLA₂GIVB possui ainda, domínios adicionais próximos ao domínio de ligação ao cálcio e apresenta menor seletividade para clivagem na posição *sn*-2 que *sn*-1 de fosfolípidos quando lisados de células são testados (Song et al., 1999).

Fosfolipase A₂ citosólica do grupo GIVC, o terceiro identificado, possui cDNA com proteínas de 541 aminoácidos (Hirabayash e Shimizu, 2000), sendo expressa no músculo esquelético e coração, com baixos níveis no cérebro, baço, placenta e pâncreas (Underwood et al., 1998; Song et al., 1999; Pickari et al., 1999). Estudos com células em cultura e ensaios com proteínas quinase *in vitro* indicam que a cPLA₂GIVC representa um substrato para MAPK. cPLA₂GIVC contém dois motivos *consensus* para modificação lipídica, um motivo de isoprenilação (-CCLA) na região carboxi-terminal e um potencial local de miristoilação (-MGSSEV) na sequência amino-terminal. cPLA₂GIVC não possui o domínio de ligação a cálcio e, conseqüentemente não requer íons cálcio para sua ativação. Isso indica que a regulação desta isoenzima se diferencia da cPLA₂GIVA e cPLA₂GIVB. cPLA₂IVC demonstra ainda, tanto atividade PLA₁ quanto PLA₂ e tem preferência pelo AA na posição *sn*-2 cerca de duas ou três vezes mais que outros ácidos graxos *in vitro* (Underwood et al., 1998).

Três novos membros da família da PLA₂ foram descobertos e enquadrados no grupo IV: PLA₂GIVD (cPLA₂δ), cPLA₂GIVE (cPLA₂ζ) e cPLA₂GIVF (cPLA₂η).

PLA₂GIVD foi clonada a partir de cDNA de queratinócitos humanos e possui localização no citosol. cPLA₂GIVE foi identificada a partir de células do cérebro e coração, enquanto cPLA₂GIVF do baço e tireóide

Com relação à especificidade pelo substrato, estudos demonstraram que PLA₂GIVD exibe uma atividade hidrolítica seis vezes maior sobre o ácido linoléico (LA) da posição *sn*-2 de fosfolípidos se comparado ao AA. Já cPLA₂GIVF demonstra maior afinidade por PE, enquanto cPLA₂GIVE parece não exibir especificidade sobre nenhum ácido graxo.

Todas as três isoenzimas demonstram requerimento de cálcio, o que está em acordo com a presença do domínio C2 em sua proteína. Íons cálcio livres parecem ser essenciais para ativação da cPLA₂ GIVD. Células estimuladas com cálcio ionóforo revelaram sua translocação para o complexo de Golgi e retículo endoplasmático, no entanto de forma mais lenta se comparada à cPLA₂GIVA (Chiba et al., 2004; Ohto et al., 2005).

1.3.3 - PLA₂ intracelular independente de Ca⁺² (iPLA₂)

A primeira PLA₂ independente de cálcio (iPLA₂) a ser clonada e caracterizada foi classificada como GVIPLA₂, que foi isolada e caracterizada de macrófagos P388D1 (Ackermann et al., 1994). O grupo GVIPLA₂ é subdividido em GVIA, GVIB, GVIC, GVID, GVIE e GVIF e está envolvido com remodelamento de fosfolípides, através de um ciclo de acetilação/reacilação da membrana de fosfolípides chamado ciclo *Lands*. Assim, um fosfolípide pré-existente é clivado pela iPLA₂ para gerar 2-lisofosfolípide, o qual é reacilado com diferentes ácidos graxos para então, gerar novos fosfolípides (Balsinde e Dennis, 1996).

Macrófagos possuem grande capacidade de incorporar AA dos fosfolípides de membrana (Balsinde et al., 1994). Durante o remodelamento da membrana, a incorporação de AA nos fosfolípides, em condições normais, é extremamente dependente da PLA₂. Esse processo ocorre de modo cálcio-independente, o que confirma o envolvimento de GVIPLA₂. A taxa de incorporação de AA também determina a quantidade de ácidos graxos disponíveis. Isso é relevante, uma vez que a disponibilidade de AA livre é um fator limitante para a biossíntese de eicosanóides.

A atividade catalítica da iPLA₂ é regulada por quantidade de cálcio em estoques intracelulares ou pela proteína calmodulina dependente de cálcio, apesar da atividade de iPLA₂ não depender do cálcio. Wolf e colaboradores (1997) relataram que, em células do músculo liso cardíaco, agentes que causam a depleção de estoques intracelulares de cálcio, como *thapsigargin*,

Com relação à ativação da iPLA₂, Akiba e Sato (2004) relataram o envolvimento da PKC α no aumento de AA mediado por iPLA₂. Nestes estudos, o aumento do AA e geração de prostaglandinas D₂ (PGD₂) foram diminuídos pelo BEL ou por oligonucleotídeos *antisense* do Grupo VIAPLA₂. Forbol 12-miristato 13-acetato (FMA) estimulou o aumento de AA e da atividade de iPLA₂, enquanto a *dowregulation* de PKC α diminuiu essa resposta.

O grupo mais estudado da iPLA₂ é o GVIA (Ackerman et al., 1994; Tang et al., 1997), o qual possui inúmeras variações de *splicing*. O padrão estrutural deste grupo inclui diversas repetições de anquirinas que podem ser responsável pela interação proteína-proteína. Alguns destes *splicing* não possuem a região catalítica C, podendo funcionar como proteínas inibitórias para GVIAPLA₂ (Larsson et al., 1998). Moléculas de ATP (adenosina trifosfato) estabilizam a enzima (Lio e Dennis, 1998).

As funções da GVIA incluem remodelamento de fosfolípides (Balsinde et al., 1995), aumento de AA (Atsumi et al., 1998; Martinez e Moreno, 2001; Perez et al., 2004; Rickard et al., 2005; Yellaturu e Rao, 2003), regulação de proteínas (Moran et al., 2005), relaxamento da vasculatura endotelial mediada por acetilcolina (Seegers et al., 2002), secreção (Song et al., 2006; Balboa et al., 2003; Ma et al., 2001) e apoptose (Atsumi et al., 1998, 2000; Perez et al., 2006). Esta enzima pode estar envolvida ainda, na proliferação de linfócitos (Roshak et al., 2000). Além disso, foi demonstrado que a atividade da iPLA₂ varia no decorrer do ciclo celular (Manguikian e Barbour, 2004).

Estudos *in vivo* (Rao et al., 2007; DeMar et al., 2004) relacionam o metabolismo de PUFA com a atividade de iPLA₂. Nesses estudos, a meia vida de [4,5-³H]22:6n-3 foi determinada quando administrado via intracerebroventricular a dois grupos de ratos: um que consumiu uma dieta adequada de PUFA e outro grupo com privação desses ácidos graxos. Os resultados demonstraram que a meia-vida de [4,5-³H]22:6n-3 em ratos com a dieta adequada foi menor quando comparada com os ratos privados de PUFA. Isso sugere que enzimas envolvidas no catabolismo de [4,5-³H]22:6n-3 possam ser inibidas em cérebros de ratos sem PUFA. Em estudos posteriores ficou demonstrado que entre essas enzimas, somente a iPLA₂GVIA está inibida.

Fosfolipase independente de cálcio do grupo GVIB parece estar envolvida no aumento de AA e formação de eicosanóides (Mancuso et al., 2000; Murakami et al., 2005). PLA₂GVIA e GVIB mostram diferentes sensibilidades em relação aos enantiômeros do bromoenol lactona (BEL) (Jenkins et al., 2002). O enantiômero S parece ser mais específico para PLA₂GVIA e o enantiômero R para a enzima GVIB (Jenkins et al., 2002).

PLA₂GVIC, PLA₂GVID, PLA₂GVIE e PLA₂GVIF foram identificadas e nomeadas em trabalhos do fim da década de noventa (Song et al., 1999; Pickard et al., 1999). PLA₂GVIC foi caracterizada a partir do estudo de uma proteína de membrana, *neuropathy target esterase* (NTE) com 146 kDa, expressa em neurônios humanos e de camundongos. NTE possui atividade estearase (Glynn, 1999, 2005) e sua inibição resulta em degeneração axonal. Foi descoberto que uma forma recombinante (NEST) possui

atividades fosfolipase e lisofosfolipase (Pickard et al., 1999). Os autores sugeriram que a forma NEST lentamente hidrolisa ácidos graxos na posição *sn*-2 de fosfolípidos e, subsequente, em uma reação rápida, aumenta ácidos graxos da posição *sn*-1. Essa enzima possivelmente atua na homeostase da membrana.

As enzimas GVID, GVIE e GVIF demonstram atividade hidrolítica tanto em ácido linoléico quanto AA na posição *sn*-2 na ausência de íons cálcio livres. Todas essas três enzimas são inibidas pelo BEL em níveis submicromolares. Além disso, possuem atividade triacilglicerol lipase e acilglicerol transacilase (Song et al., 1999).

1.3.4 - PLA₂ PAF-acetil-hidrolase (PLA₂ PAF-AH)

Dois grupos de serina-PLA₂ (GVII e GVIII) hidrolisam grupos acetil da posição *sn*-2 de PAF e foram nomeadas PAF-acetil-hidrolases (PAF-AH). A partir de estudos posteriores, o grupo foi subdividido em GIIA, GIIB, GVIIIA e GVIIIB (Schaloske e Denis, 2006)

GVIIA é também conhecida PLA₂ associada à lipoproteína (Lp-PLA₂). Esta isoenzima exibe uma tríade catalítica Ser/His/Asp e mostra grande especificidade pelo substrato. Além de sua atividade PAF-hidrolase, também hidrolisa pequenas e médias cadeias de ácidos graxos de diacilgliceróis e triacilgliceróis, possui atividade fosfolipase A₁ (PLA₁) e hidrolisa fosfolípidos oxidados de partículas de lipoproteína de baixa densidade (LDL). A atividade de hidrólise de fosfolípidos oxidados é objeto de interesse por potenciais

efeitos benéficos na inibição da progressão da aterogênese (Karasama et al., 2003; Chen, 2004). No entanto, essa informação é ainda controversa. Caslaske e Packard (2003) relataram que a PLA₂GVIIA é um possível fator de risco para doenças coronarianas e que a quantificação de níveis desta proteína no plasma poderia ser útil como marcador para esse tipo de doença.

PLA₂GVIIIB demonstra 43% de identidade com relação à seqüência de amino-ácidos da PLA₂GVIIA. Foi demonstrado ainda em linhagens celulares de rim bovino que PLA₂GVIIIB se transloca do citosol para a membrana na presença de oxidantes e da membrana para citosol na presença de antioxidantes. A superexpressão da PLA₂GVIIIB em células de ovário de hamster protege as células de apoptose mediante a exposição à estresse oxidativo (Matsuzama et al., 1997).

GVIII, também conhecida como PAF-AH Ib, consiste de duas subunidades catalíticas e uma subunidade regulatória. As subunidades $\alpha 1$ e $\alpha 2$ formam homo e heterodímeros ativamente catalíticos. O substrato específico da PLA₂GVIII parece depender da composição dessas subunidades. O homodímero GVIIIB/GVIIIB catalisa preferencialmente a hidrólise de PAF (1-*O*-alquil-2-acetil-*sn*-glicero-3-fosfocolina e 1-*O*-alquil-2-acetil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina). Já o homodímero GVIIIA/GVIIIA e o heterodímero GVIIIA/GVIIIB exibem intensa atividade para 1-*O*-alquil-2-acetil-*sn*-glicero-3-ácido fosfatídico.

A composição dos dímeros da subunidade catalítica de GVIIIA se modifica durante o desenvolvimento cerebral. A presença das subunidades

GVIIIA foi somente observada em cérebros de rato no período embrionário e pós-natal. Durante o posterior desenvolvimento cerebral, as subunidades GVIIIA mostram-se ausentes (Manyà et al., 1998). Essas informações sugerem que o desenvolvimento cerebral pode ser regulado pela intercalação entre as diferentes subunidades catalíticas e a regulatória

Estudos demonstram que a PLA₂GVIII possa estar envolvida no desenvolvimento cerebral. O gene que codifica a subunidade β é o gene responsável pela lisencefalia *Miller-Dieker* (Hattori et al., 1995) caracterizada por severos defeitos no desenvolvimento cerebral. Em trabalhos posteriores, foi sugerido um mecanismo, no qual a migração neuronal seja prejudicada por defeitos nesse gene (Morris, 2000).

1.3.5 - PLA₂ lisossomal (LPLA₂)

A PLA₂ GXV lisossomal foi purificada por Abe e Shayman (1998) a partir de cérebro bovino. Possui ação de esterificação de um grupo acil com um grupo hidroxil na posição C-1 de ceramidas, na qual os fosfolípidos atuam como grupo doador de radicais acil.

A comparação da sequência de aminoácidos de enzimas humanas, bovinas e de células murinas mostrou um motivo lipase com uma Ser conservada e essencial para sua atividade catalítica (Hiraoka et al., 2002). Essa enzima também possui resíduos de His e Asp conservados, o que sugere a presença da tríade catalítica Ser/His/Asp. A PLA₂ lisossomal possui uma sequência N-terminal com diversos locais de glicosilação. Sua atividade

enzimática ótima ocorre no pH 4,5. Foi observado um acúmulo de PC e PE em ratos *knockout* para PLA₂ GXV em macrófagos alveolares e peritoneais. Isso está em acordo com a seletividade da PLA₂ lisossomal em hidrolisar PC e PE (Abe e Shayman, 1998).

Por estar localizada juntamente com beta-hexosaminidase, enzima presente em lisossomos, foi denominada PLA₂ lisossomal e de acordo com a nomenclatura da superfamília de enzimas da PLA₂ está enquadrada no grupo GXV PLA₂ (Hiraoka et al., 2002).

1.3.6 - PLA₂ tecido adiposo-específica (AdPLA₂)

No intuito de identificar uma nova proteína com atividade significativa no metabolismo adipogênico, Duncan e colaboradores (2008) encontraram um transcrito que codifica uma proteína de 18kDa ativamente expressa em tecido adiposo. Esta enzima catalisa com eficiência o aumento de ácidos graxos livres e lisofosfolípidos a partir da fosfatidilcolina, com preferência para hidrólise na posição *sn*-2 de fosfolípidos. Essas características classificam Ad-PLA₂ como membro da superfamília das PLA₂, podendo ser o primeiro membro do mais novo grupo da PLA₂ independente de cálcio, Grupo XVI.

1.4 - Inibidores da PLA₂

A ativação das isoformas de PLA₂, aumento do AA e geração de PAF são importantes eventos na inflamação e estresse oxidativo associados a trauma neural agudo e desordens neurológicas crônicas (Farooqui e Horrocks, 1994; Phillis e O'Regan, 2004). O uso de inibidores potentes e seletivos sobre a atividade da PLA₂, atuando como agentes terapêuticos, representa uma alternativa no tratamento destas desordens. Além disso, o uso dos inibidores auxilia na determinação da atividade enzimática dos diferentes subtipos de PLA₂, pois estes atuam em conjunto, o que dificulta a análise de cada um isoladamente. Entretanto, apesar de existir um grande número de compostos que apresentem capacidade de inibir a atividade enzimática, poucos conseguem fazê-lo de maneira seletiva.

Os inibidores podem agir por diferentes mecanismos: 1) na incorporação à membrana, o que leva a alterações de suas propriedades físico-químicas, 2) na interação direta com o sítio ativo da enzima, 3) na atuação sobre um outro sítio (alostérico) da enzima, o que leva a mudanças na sua atividade 4) na atuação como detergente e indução a mudanças não-específicas nas propriedades da membranas (Farooqui et al., 1999).

1.4.1 - Bromoenol-lactona (BEL)

O BEL (Figura 8) é um potente inibidor de iPLA₂ de cérebro bovino e PLA₂ plasmalogênio-seletiva, com valores de concentração inibitória mínima

(CI_{50}) de 60 e 40 nM, respectivamente. Este inibidor possui uma estrutura semelhante ao plasmalogênio, substrato natural para $iPLA_2$ de miocárdio e inibe fracamente $cPLA_2$ que possui como substrato fosfatidilcolina. $iPLA_2BEL[^3HA]$ resultou na marcação de uma única banda protéica com massa molecular de 80kDa, o que indica que o BEL é inibidor irreversível covalente de $iPLA_2$ P388D₁ (Farooqui et al., 1999).

Figura 8 - Estrutura química do bromoenol lactona.
FONTE: Farooqui et al, 2006.

Estudos sustentam a hipótese de que o mecanismo bloqueador do BEL mediado por receptores AMPA está envolvido com LTP e depressão de longa duração (LTD) na regulação da plasticidade sináptica. A injeção de BEL (10 μ M) em neurônios piramidais pós-sinápticos na região CA1 hipocampal produziu um significativo aumento na amplitude de correntes excitatórias pós-sinápticas por meio de receptores AMPA (St-Gelais et al., 2004). Isso sugere que a $iPLA_2$ cerebral pode estar envolvida no aprendizado e memória (Fujita et al., 2000; Wolf et al., 1995). Além disso, a injeção intracereboventricular de 3 nmol de BEL prejudicou, de forma

significativa, a *performance* espacial de camundongos (Fujita et al., 2000), o que indica que iPLA₂ está envolvida também em cascatas celulares de formação da memória espacial.

1.4.2 - Metil-araquidonil-fluorofosfonato (MAFP)

Fosfonato análogo do AA, a atividade inibitória do MAFP (Figura 9) ocorre pela reação com a Ser no sítio ativo da enzima, resíduo catalítico comum à cPLA₂ e iPLA₂ (Farooqui et al., 1999).

Figura 9 – Estrutura química do metil-araquidonil-fluorofosfonato.
FONTE: Farooqui et al., 2006.

MAFP é um inibidor irreversível de cPLA₂ de cérebro bovino com CI₅₀ de 0,5 µM e não possui efeito sobre a sPLA₂. MAFP também inibe iPLA₂ de cérebro bovino de uma maneira dose-dependente com valor CI₅₀ = 0,75 µM. Com 50 µM, MAFP inibe completamente a atividade de iPLA₂ em cérebro bovino (Farooqui et al., 2006).

Estudos investigam a modulação de MAFP sobre a atividade da PLA₂. MAFP inibe a atividade de cPLA₂ estimulada por Aβ em cultura de neurônios corticais (Krien et al., 2005). Além disso, injeções intratecais de MAFP em

ratos, produziram efeitos antinociceptivos (Ates et al., 2003), o que sugere que os subtipos de PLA₂ possam estar envolvidos no mecanismo de dor.

Em estudo realizado por Schaeffer e Gattaz, 2005, foram investigados os efeitos de injeções intra-hipocâmpais de MAFP, PACOCF₃ (inibidor reversível de PLA₂) e BEL no processamento da memória de curta duração (STM) e de longa duração (LTM) na tarefa de esquiva inibitória de descida da plataforma. Esse estudo mostrou que a inibição da PLA₂ no hipocampo do rato causou prejuízo na memória.

1.4.3 - Araquidonil-trifluorometil-cetona (AACOCF₃)

Esse inibidor possui estrutura análoga ao AA, em que o grupo carboxila (COOH) é substituído por um grupo trifluorometilcetona (COCF₃). AACOCF₃ (Figura 10) inibe cPLA₂ e iPLA₂ de cérebro bovino de maneira dose-dependente com valores de CI₅₀ de 1,5 e 6,0 µM, respectivamente.

Figura 10 - Estrutura química Araquidonil-trifluorometil-cetona.
FONTE: Farooqui et al., 2006.

Em contraste à lenta dissociação do complexo de Ca⁺²/cPLA₂/AACOCF₃ (Street et al., 1993), o complexo iPLA₂/AACOCF₃ dissocia-se rapidamente sob diluição e aproximadamente toda a atividade de PLA₂ pode ser recuperada, sugerindo uma maior afinidade para cPLA₂

(Ackerman et al., 1995). Sua maior seletividade para PLA₂ intracelulares (dependentes e independentes de cálcio) em relação à PLA₂ extracelulares é justificada por suas propriedades físico-químicas que permitem sua rápida penetração para a célula. AACOCF₃ exerce uma inibição 500 vezes mais potente para cPLA₂ que para sPLA₂ (Trimbel et al., 1993). Contudo, essa inibição também bloqueia a atividade cicloxigenase (Riendeau et al., 1994).

Em relação ao mecanismo de bloqueio enzimático, estudos de ressonância magnética nuclear mostraram que a cadeia carbônica de AACOCF₃ liga-se a uma região hidrofóbica da enzima, onde o grupo carbonil de AACOCF₃ forma uma ligação covalente com o aminoácido Ser²²⁸ no local ativo da enzima. Isso gera um axoânion carregado que interage com um grupo da enzima carregado positivamente (Street et al., 1993; Trimble et al., 1993).

A atuação de AACOCF₃ sobre a atividade de PLA₂ é investigada em inúmeros tipos celulares. Concentrações de 5 a 20µM bloqueiam a liberação de AA, produto da PLA₂, em plaquetas, células monocíticas humanas e células mesangiais (Gronich et al., 1994). O tratamento de células NG 108-15 com AACOCF₃ diminui a formação inicial de neuritos de maneira dose-dependente (Smalheiser et al., 1996). Em culturas neuronais primárias, esse inibidor previne a ativação de caspatases-3 e neurodegeneração induzida pelo peptídeo β-amilóide (Aβ) e peptídeo prion humano (Bate et al., 2004), o que infere o papel nos subtipos de PLA₂ em processos neurodegenerativos (Farooqui e Horrocks, 1994; Farooqui et al., 1997). Em astrócitos, a geração de radicais livres é fortemente inibida pelo AACOCF₃. AACOCF₃ também

inibiu a ativação de cPLA₂ e, conseqüente aumento de AA, mediada por metilmercúrio (MeHg⁺²) (Shanker e Aschner, 2003).

No entanto, apesar de ser descrito como um inibidor específico de cPLA₂, estudos recentes em células não-neuronais indicam que AACOCF₃ pode inibir também COX e 5-lipoxigenase (5-LOX) (Cummings et al., 2000; Fuentes et al., 2003).

Outro componente de forma estrutural semelhante ao AACOCF₃ é o palmitoil trifluometil cuetona (PACOF₃) que demonstra ser quatro vezes mais potente que AACOCF₃ (Cl₅₀ = 3,8 µM) para a hidrólise de dipalmitoil glicerofosfocolina pela iPLA₂ (Ackerman e Dennis, 1995).

1.5 - Fosfolipase A₂ (PLA₂) e doenças neuropsiquiátricas

1.5.1 - Esquizofrenia

Um aumento da atividade da PLA₂ foi relatado no soro, plasma, plaquetas e tecido cerebral de pacientes com esquizofrenia (Gattaz et al., 1987, 1990, 1995a; Glen et al., 1994; Horrobin, 1998a; Hudson et al, 1996; Smesny et al., 2005; Tavares et al., 2003), sugerindo um acelerado metabolismo de fosfolípides da membrana celular nesta patologia.

As alterações no metabolismo de fosfolípides foram encontradas também em tecido cerebral *post mortem* de pacientes com esquizofrenia (Horrobin et al., 1991). Além disso, estudos de Espectroscopia de Ressonância Magnética do Fósforo (³¹P-MRS) no lobo frontal de pacientes

com esquizofrenia encontram uma diminuição de fosfomoésteres e aumento de fosfodiésteres, respectivamente, precursores e metabólitos dos fosfolípides no cérebro (Deicken et al., 1993, 1995a; Fugimoto et al., 1994; Fukuzako et al., 1994; Keshavan et al., 1993; Pettegrew et al., 1993; Williamson et al., 1991). As alterações encontradas no lobo frontal dos pacientes com esquizofrenia sustentam a teoria da hipofrontalidade, a qual é embasada na inibição da atividade dopaminérgica (Gattaz e Bruner, 1996).

Esses achados no cérebro (Yakubian et al., 2002) confirmam resultados de estudos anteriores, os quais encontraram uma diminuição na concentração de fosfolípides dos eritrócitos (Rotrosen e Wolkin, 1987) e um aumento da concentração do metabólito lisofosfatidilcolina na membrana de plaquetas de pacientes com esquizofrenia (Pargerl et al., 1991). Além disso, a concentração de AA em eritrócitos estava reduzida em um subgrupo de pacientes com a mesma patologia (Peet et al., 1998, Glen et al., 1994).

A aceleração do metabolismo de fosfolípides, citada anteriormente, tem sido atribuída principalmente ao aumento da atividade da cPLA₂, a qual seletivamente cliva AA de vesículas de membranas naturais (Clark et al., 1991). Isso está de acordo com achados de que níveis do AA e DHA estão significativamente diminuídos em pacientes com esquizofrenia (Peet et al., 1998) e ainda com relatos clínicos de uma significativa redução nos sintomas positivos depois da suplementação com ácidos graxos essenciais (Peet et al., 1999b).

Além disso, é de interesse notar que um aumento da PLA₂ já foi discutido em outras doenças neuropsiquiátricas nas quais possam ocorrer

sintomas psicóticos, como na epilepsia do lobo temporal e na esclerose múltipla (Simonato, 1993; Visioli et al., 1994).

1.5.2 - Depressão

A depressão maior é um transtorno do humor que atinge milhões de pessoas em todo o mundo (Costello et al., 2003; Hasin et al., 2005; Waslik et al., 2002). Enquanto um grande número de medicações está disponível para manter sob controle os sintomas da doença, o mecanismo de ação dos atuais antidepressivos ainda não está bem esclarecido (Ciraulo et al., 2004). No entanto, já se sabe que de uma forma geral esse tipo de medicação aumenta os níveis de monoaminas sinápticas como norepinefrina, serotonina e dopamina em determinadas regiões cerebrais (Feighner, 1999; Frazer, 2000). As monoaminas ativam seus receptores cognatos pós-sinápticos e modulam a atividade de cascatas de sinalização *down-stream* para produzir o efeito antidepressivo (Coyle e Duman, 2003; Gould e Manji, 2002; Taylor et al., 2005). Receptores de monoaminas estão envolvidos em diversas cascatas de sinalização, incluindo aquelas mediadas por adenil-ciclase, fosfolipase e MAPK (De Vivo e Mayani, 1986, 1990; Dumuis et al., 1988; Undie et al., 1994).

Nakamura (1994) relata que a PLA₂ está envolvida no mecanismo de regeneração axônios noradrenérgicos cerebrais induzida por antidepressivos e que inibidores da PLA₂ podem prejudicar a regeneração induzida por antidepressivos em axônios noradrenérgicos.

Além dos fármacos, uma estratégia utilizada no tratamento de depressão é a eletroconvulsoterapia (ECT), um procedimento que induz à convulsões generalizadas pela passagem de uma corrente elétrica pelo cérebro. Algumas teorias são propostas para explicar os benefícios terapêuticos da ECT (Sackiem, 1994). Uma das hipóteses é que a ECT interfira no metabolismo dos fosfolípides de membrana, via modulação da PLA₂ (Bazan et al., 2002). De fato, pesquisas recentes realizadas por nosso grupo (dados ainda não publicados) demonstram uma alteração na atividade de PLA₂ em regiões cerebrais (córtex, hipocampo, cerebelo, estriado) de animais submetidos ao eletrochoque quando comparados a controles. Além disso, alguns genes de PLA₂ foram identificados como potenciais responsáveis pela modulação da expressão gênica, ocasionada pelo eletrochoque na área cerebral envolvida (hipocampo).

Alterações de PUFA em pacientes com desordens do humor também são relatadas. Uma deficiência em ω -3 e um aumento compensatório nos ácidos graxos monoinsaturados em pacientes com depressão indicam que o metabolismo anormal de ω -3 possa estar associado com a patogênese da depressão (Maes et al., 1999). Outros achados têm relatado alterações na concentração destes ácidos graxos, em particular de eicosanóides e ácido docohexanóide (Edwards et al., 1998; Hibbeln e Salem, 1995).

Estudos recentes (Song et al., 2009) demonstram que um aumento da atividade da PLA₂ e resposta inflamatória associadas à uma deficiência de fatores de síntese de neurotrofinas (NTF's) podem contribuir para etiologia da depressão. Além disso, a suplementação com o ácido graxo

poliinsaturado etil-eicosapentaenoato (EPA), série ω -3, pode reverter o processo inflamatório.

1.5.3 - Transtorno Afetivo Bipolar

A relação entre a anormalidade do metabolismo de fosfolípides e o transtorno afetivo bipolar (TAB) foi postulada por Hibbeln (1999). Estudos relacionam essa anormalidade ao crescimento (Geddis et al., 2004) e sinalização neuronal (Sung et al., 2004) sugeridos como possível fator etiológico nesta doença.

Estudos de ^{31}P -MRS demonstraram níveis alterados de fosfomoésteres e fosfodiésteres envolvidos na síntese e catabolismo de fosfolípides em cérebros de pacientes com TAB e sugerem o aumento da atividade de PLA_2 como mecanismo candidato para o aumento de fosfodiésteres no transtorno afetivo bipolar (Deicken et al., 1995b).

O uso de cloreto de lítio, um estabilizador do humor, reduziu níveis de mobilização de AA e síntese de eicosanóides em cérebros de roedores em 80% (Boseti et al., 2003; Chang et al., 1998, 2001; Rapaport e Bosseti, 2002; Rintala et al., 1999). Isso sugere que anormalidades primárias no TAB podem estar relacionadas à ativação da PLA_2 , levando ao aumento de ácidos graxos como AA e, conseqüente superativação da sinalização celular. De fato, em concentrações terapêuticas, o lítio funciona como um poderoso inibidor da PLA_2 (Chang e Jones, 1998; Chang et al., 2001; Rapoport e Bosseti, 2002; Rintala et al., 1999). Estudos comprovam que o lítio promove

redução da atividade da PLA₂, bem como mRNA e níveis protéicos de cPLA₂ (Craddock e Jones, 1999; Krieger et al., 1965; Rapoport e Bosetti, 2002). Concordante com estes achados, Horrobin e Bennet (1999) também propuseram a superativação da PLA₂ como uma possível explicação para a natureza cíclica da patogênese do transtorno afetivo bipolar e que o lítio possa prevenir tanto o aumento excessivo quanto a depleção de ácidos graxos pela inibição da PLA₂.

1.5.4 - Epilepsia

Os mecanismos da epileptogênese iniciam-se com a excitação da membrana neuronal (Avanzini e Franceschetti, 2003). Alterações no metabolismo dos fosfolípides que compõem a membrana podem alterar o estado de excitação celular. Alguns estudos descrevem que as crises epiléticas promovem uma superativação da PLA₂, a qual resulta no acúmulo de lípides bioativos nas sinapses (Bazan, 1998). Uma estimulação prolongada da PLA₂ pode danificar a integridade da membrana não somente pelo aumento excessivo de cálcio intracelular (que levaria à lipólise, proteólise excessiva e a fragmentação de DNA), mas também pela perda de fosfolípides essenciais para a formação da dupla camada lipídica. Isso ocorre devido à característica detergente de PAF, produto da hidrólise do AA (Bazan et al., 2002; Farooqui et al., 1996; Feuerstein, 1996;). De fato, crises epiléticas são conhecidas por estimular a atividade e expressão da cPLA₂ com acúmulo de AA (Kajiwara et al., 1996; Visioolo et al., 1994).

O uso de modelo de epilepsia induzida por pentilenetetrazol em cérebro de ratos indica significativas elevações na atividade de sPLA₂ nas regiões corticais, hipocampais e cerebelares comparadas com grupo controle. O aumento da atividade da enzima foi mais pronunciado nas regiões hipocampal e cortical (Yegin et al., 2002). Estudos de Dorandeu e colaboradores (1998) corroboram esses achados e sugerem que um tipo tóxico de sPLA₂ administrada por injeções intracerebrais seja um importante desencadeador das crises convulsivas da epilepsia.

1.5.5 - Doença de Alzheimer

A diminuição da transformação da fosfatidilcolina em AA e lisofosfatidilcolina, em neurônios colinérgicos, compromete a formação da colina, substrato de síntese da acetilcolina e, conseqüentemente, contribui para um déficit colinérgico (Blusztajn et al., 1987; Schaeffer et al., 2008). Esse déficit, primariamente resultante de uma degeneração de neurônios colinérgicos, é discutido como aspecto central do distúrbio cognitivo em DA. Além disso, supõe-se que um distúrbio do metabolismo da proteína precursora do amilóide (APP) com a conseqüente deposição do peptídeo A β nos tecidos cerebrais, seja um processo fundamental para a patogênese da DA (Emmerling et al., 1993). Uma série de mecanismos enzimáticos pode resultar nesta desregulação do metabolismo da APP. Assim, a investigação de proteínas relacionadas com o metabolismo de APP tem contribuído para a elucidação de rotas alternativas na patogênese de DA. A ativação da PLA₂

parece ser responsável por um aumento na liberação da APP solúvel no meio extracelular, enquanto a redução da atividade da PLA₂ diminui a secreção da APP solúvel. Isso pode explicar, segundo Zainaghi (2006), a correlação existente entre a redução da atividade da PLA₂ e a formação de placas neuríticas no cérebro de paciente com a DA. Nesse contexto, uma redução da atividade da PLA₂ pode contribuir para a amiloidogênese, conseqüente degeneração neuronal e déficit colinérgico (Forlenza et al., 2006; Gattaz et al., 1995b; Schaefer et al., 2008).

De fato, níveis reduzidos de PLA₂ já foram encontrados em amostras de tecido cerebral e plaquetas de pacientes com DA, afetando de forma negativa o metabolismo fosfolipídico da membrana celular (Gattaz et al., 1995b; Gattaz et al., 1996; Zainaghi, 2006). Farooqui e Horrocks (2006) relataram que modificações nos fosfolípidos de membrana ocorreram antes mesmo das primeiras manifestações clínicas da DA, e que metabólitos do AA são encontrados próximos aos neurofilamentos.

Em cultura de células, a PLA₂ parece estar envolvida na regulação do processamento da APP, uma vez que a inibição da PLA₂ diminuiu a secreção da APP, enquanto a ativação da PLA₂ potencialmente aumentou a secreção da APP (Emmerling et al., 1993). Como as vias secretórias e amiloidogênicas do metabolismo da APP são mutuamente exclusivas, um estímulo da secreção da APP, reduz a formação do peptídeo beta-amilóide em tecidos cerebrais (Caporaso et al., 1992). Com isso, pode-se assumir que a diminuição da atividade da PLA₂ pode estar associada a uma redução do metabolismo de secreção da APP, o que contribui para a amiloidogênese.

Além disso, admite-se que a PLA₂ também participe do processo de polimerização da TAU, na formação dos emaranhados neurofibrilares (Lukiw e Bazan, 2000). Este envolvimento da PLA₂ nas principais vias patogênicas da DA é ratificado pelo achado de uma correlação entre a diminuição da atividade da PLA₂ e o número de placas senis no cérebro de pacientes com DA (Gattaz et al., 1995b, 1996).

1.6 - Cultura primária de neurônios: estudos e aplicações

Enquanto a importância da PLA₂ no metabolismo de eicosanóides e transdução de sinais está bem estabelecida, muito ainda se tem a investigar sobre sua função e regulação no cérebro. Metabólitos da PLA₂ participam de uma grande variedade de funções homeostáticas. A relação entre a modificação de ácidos graxos de membrana e neuroplasticidade tem sido avaliada em diversos modelos (Ikemoto et al., 1997). Estudos demonstram a importância da participação da PLA₂ em funções fisiopatológicas no SNC. No entanto, alguns deles são dificultados pela presença de diferentes tipos celulares (neurônais e não-neurônais), presença de interferentes, padrões de sinalização complexos e a expressão de subtipos de PLA₂ em distintas regiões cerebrais (Sung et al., 2004).

Nesse contexto, a técnica de cultura de células nervosas representa um instrumento poderoso na investigação de processos neurobiológicos. A razão para isso inclui a habilidade de isolar os efeitos de uma variável

específica sobre as células e ainda, responder a questões de um tipo celular específico isolado de outras células (Juurlink e Walz, 1985).

Entre os mamíferos, ratos e camundongos são as espécies mais utilizadas para a obtenção de tecidos visando o estabelecimento de culturas primárias de neurônios. Tais espécies compartilham com os mamíferos superiores uma razoável consistência genética, possibilitando assim a elaboração de modelos voltados para a investigação da fisiologia e da fisiopatologia humana (Banker e Goslin, 1991).

Estudos demonstram que o crescimento de neuritos e diferenciação de células neuroblastomas envolvem a participação do AA em neurônios em cultura (Williams et al., 1994). Já em culturas de neurônios cerebelares, foi demonstrado o envolvimento do AA no crescimento axonal, em um processo dependente da ativação de canais de cálcio (Williams et al., 1994). Além disso, inibidores da PLA₂ prejudicaram o crescimento de neuritos em laminina e, em contrapartida, o AA exógeno estimulou a neuritogênese (Smalheiser et al., 1996).

Em cérebros de embriões de rato, a partir dos quais são estabelecidas as culturas primárias de neurônios corticais, a atividade de PLA₂ apresenta um pico no 18^o dia de gestação (Forlenza et al., 2002). Em culturas primárias de neurônios, a atividade de PLA₂ apresenta um pico no 4^o dia *in vitro*, declinando após 6 dias de incubação, à medida em que ocorre a maturação neuronal. A ativação da PLA₂ nos primeiros estágios da cultura de células sugere seu envolvimento na sobrevivência e desenvolvimento neuronal (Forlenza et al., 2002).

Em culturas primárias de neurônios corticais e hipocâmpais, o uso de inibidores da PLA₂ (MAFP e BEL) prejudicou o desenvolvimento de neuritos e resultou em perda da viabilidade neuronal. Isso demonstra o envolvimento da PLA₂ em processos relacionados à homeostase da membrana neuronal (Mendes et al., 2005).

Em estudos recentes com culturas cerebelares de neurônios granulares (Tedesco et al., 2009), foi demonstrado que neurotoxinas pré-sinápticas que possuem atividade PLA₂ causam degeneração nas junções neuro-musculares. O mecanismo proposto está relacionado à depleção de vesículas sinápticas e aumento da permeabilidade da membrana neuronal aos íons cálcio.

Estudos de Kim e colaboradores (2002) analisaram o efeito de prostaglandinas E₂ (PGE₂), produto da cicloxigenação do AA, em culturas de neurônios. Os resultados demonstraram um efeito neuroprotetor contra morte neuronal induzida por lipopolissacarídeo (LPS).

Redes de culturas neuronais também podem ser utilizadas como modelos para estudo de propriedades celulares isoladas e em conjunto, na reprodução de mecanismos de aprendizagem e processamento de memória (Martinola et al., 1993; Morin et al., 2005; Potter, 2001; Ruaro et al., 2005; Shahaf e Maron, 2001).

A cultura de neurônios e células da glia, utilizadas em ensaios de multi-eletrodos, representa um excelente modelo de estudo para plasticidade neuronal estrutural e funcional. Essas vantagens são observadas, porque é

possível trabalhar sempre com o mesmo grupo de células neuronais por vários meses (Potter e DeMarse, 2001; Van Pelt et al., 2004).

1.7 - Modelos de estudo na determinação enzimática da PLA₂

Os primeiros estudos experimentais sobre a cinética e estrutura desta superfamília de enzimas, tornaram a PLA₂ um importante modelo de atividade enzimática lipídica. Com a descoberta de diferentes membros, sua caracterização extrutural, bem como a descoberta de suas funções celulares, a família da PLA₂ se tornou um dos maiores alvos terapêuticos para o estudo de diferentes patologias (Dennis e Burkie, 2009).

Diante da complexidade da família PLA₂, a metodologia de determinação de sua atividade enzimática tem sido aplicada a inúmeras matrizes biológicas, com a finalidade de se investigar sua atuação desde modelos centrais *in vivo* (tecidos cerebrais humano e animal), passando por modelos *in vitro* (cultura de células) até modelos periféricos (sangue, plasma, plaquetas).

Em trabalhos realizados por nosso grupo, foi encontrada uma atividade alterada da PLA₂ em algumas doenças neuropsiquiátricas, quando investigada em diversas matrizes biológicas e modelos experimentais. Inicialmente, a atividade da PLA₂ se mostrou aumentada em soro, plasma, plaquetas e tecido cerebral de pacientes com esquizofrenia (Gattaz et al., 1987, 1990, 1995a; Tavares, 2003). Na doença de Alzheimer, a atividade da PLA₂ também foi investigada, na qual Gattaz e colaboradores (1995b, 1996)

encontraram em tecido cerebral *post mortem* e plaquetas uma diminuição da atividade da PLA₂. Através de estudos com modelo animal, foi demonstrado que a inibição da PLA₂ prejudica a formação da memória de curta e longa duração (Schaeffer e Gattaz, 2005) e ainda reduz a fluidez da membrana em hipocampo de ratos (Schaeffer et al., 2005). Além disso, o uso de inibidores da PLA₂ em culturas primárias de neurônios corticais e hipocampais (modelo *in vitro*) prejudicou o desenvolvimento de neuritos e resultou em perda da viabilidade neuronal (Forlenza et al., 2007; Mendes et al., 2005).

No entanto, com as condições analíticas utilizadas até então, o método radioenzimático empregado permitia determinar a atividade enzimática da PLA₂ total, não sendo possível identificar a atividade de cada subtipo da PLA₂.

Diante de avanços na biologia celular e molecular, mais de 20 isoformas da PLA₂ já foram descritas (Farooqui e Horrocks, 2006). Logo, a otimização do método radioenzimático através do estabelecimento de novos parâmetros analíticos (quantidade de proteína, tempo de incubação, quantidade de substrato radioativo, quantidade de íons cálcio, pH, quantidade de inibidor da enzima) que permitissem identificar os grupos da PLA₂, se fez necessária. Recentemente, esses novos parâmetros foram estabelecidos para a identificação dos grupos da PLA₂ em plaquetas (Talib et al., 2008).

Assim, uma vez que o método radioenzimático já foi otimizado para outras matrizes biológicas e que já foi observada uma modulação da PLA₂ total em cultura primária de neurônios, uma estratégia para determinar a

atividade de cada subtipo da PLA₂ nessa matriz biológica se tornou essencial para dar prosseguimento a novas investigações.

2 - OBJETIVOS

2.1 - Principal

Otimizar as condições analíticas para a determinação da atividade enzimática dos subtipos de PLA₂ (cPLA₂, sPLA₂ e iPLA₂) em culturas primárias de neurônios corticais empregando o método radioenzimático.

2.2 - Secundários

Identificar o subtipo de PLA₂ predominante nesta matriz;

Avaliar a atividade dos subtipos de PLA₂ em culturas de neurônios submetidas ao tratamento com inibidores da PLA₂ e possíveis moduladores da atividade da PLA₂ de interesse na área psiquiátrica.

3 - MATERIAL E MÉTODOS

3.1 - Cultura primária de neurônios

3.1.1 - Preparo dos recipientes de cultura

Para os ensaios de cultura de células foram utilizadas placas de *Petri* e bandejas com múltiplos poços de poliestireno, tratadas e estéreis. Os recipientes foram sensibilizados com solução de poli-D-lisina (5 µg/ml) em água ultrapura estéril, em volume suficiente para cobrir a superfície de cultura. A solução de poli-D-lisina é constituída de aminoácidos básicos, capazes de diminuir a natureza hidrofóbica do poliestireno. Depois de pelo menos 2 horas em temperatura ambiente, a solução de poli-D-lisina foi removida para aplicação da suspensão celular.

3.1.2 - Obtenção do tecido cortical

Ratas prenhas (*Wistar*) foram fornecidas pelo Centro de Bioterismo da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Os animais foram sacrificados por meio de concussão cefálica seguida de deslocamento cervical. Após a assepsia abdominal com etanol 70% (v/v), extraiu-se por laparotomia o saco uterino contendo os embriões (Figuras 11A e B); obtendo-se assim os embriões com a idade gestacional desejada (E18) (Figura 12A). Após a remoção das membranas gestacionais, os fetos obtidos

foram submetidos à cranotomia occipitofrontal, sendo os respectivos cérebros removidos e acondicionados em placa de *Petri* estéril contendo solução salina balanceada de *Hanks* aquecida a 37°C (Figura 12B). Todos os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq - da Diretoria Clínica da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo com protocolo de nº 894/06.

Figura 11 - Extração por laparotomia (A) e saco uterino contendo os embriões (B). FONTE: Defilippo, PP., 2008.

Figura 12 – Embriões (A) e cérebros de embriões (B) com idade gestacional de 18 dias (Wistar). FONTE: Defilippo, PP., 2008.

Os tecidos corticais foram obtidos por microdissecção em ambiente asséptico. Os hemisférios cerebrais foram separados e as membranas meníngeas removidas, sendo os tecidos obtidos imersos em meio mínimo essencial (*MEM*, Invitrogen, USA).

Concluída a dissecação propriamente dita do córtex, os tecidos obtidos foram reduzidos a fragmentos menores, transferidos para tubo de ensaio e incubados durante 20 minutos em solução proteolítica contendo tripsina (5 mg/ml, Sigma Aldrich), em banho de água à temperatura de 37°C. Após a incubação, os fragmentos foram lavados (3x) com solução salina balanceada de *Hanks* contendo aditivos (MgCl_2 8mM + soro eqüino inativado 10% v/v + tampão *HEPES* 10mM + *DNaseI* 10µg/ml, Invitrogen, USA)).

3.1.3 - Contagem das células

A estimativa numérica de células viáveis foi feita com a coloração pelo azul de *Trypan* e contagem em câmara de *Neubauer*. Foram retirados 10µl da suspensão celular, diluída 20 vezes em solução contendo 90µl de *Hanks* e 100µl de corante azul de *Trypan* 0,4%. Uma alíquota dessa nova solução foi transferida para a câmara de *Neubauer*.

As células não-coradas foram contadas nos quatro campos da câmara, sendo obtida a média da contagem de células por campo. O número de células viáveis por mililitro de suspensão celular foi inferido multiplicando-se o número médio de células por campo pelo fator de diluição (20×10^4).

3.1.4 - Semeadura

As células foram transferidas para meio de cultura *Neurobasal* (Invitrogen, USA) contendo suplemento B-27 (1:50, v/v, Invitrogen, USA), antibióticos (50 UI/ml penicilina e 50µg/ml estreptomicina, Invitrogen, USA) e L-glutamina 0,1mM (Invitrogen, USA). Para os ensaios de viabilidade neuronal, foram utilizadas culturas em baixa densidade, sendo semeadas na densidade de $1,0 \times 10^5$ células em cada poço em placas de 96 poços. Para os ensaios de otimização do método (curvas de atividade da PLA₂) e tratamento das culturas foram utilizadas culturas em alta densidade, semeando-se cerca de $1,0 \times 10^7$ células por placa de *Petri* (100 x 20 mm).

As culturas foram mantidas a 37°C em incubadora perfundida com mistura úmida de ar e CO₂ (5%v/v). Nas culturas, foi adicionado soro fetal bovino (Invitrogen, USA) apenas nas primeiras 24 horas. Após esse período, o meio contendo soro foi trocado totalmente por meio de cultura sem soro. Os neurônios foram mantidos em cultura por quatro dias.

Para utilização das placas de cultura, a integridade dos neurônios foi previamente verificada ao microcópio de luz invertida (Nikon TE300, USA). Em seguida, o meio de cultura foi descartado e os neurônios removidos da superfície da placa com solução salina tamponada (PBS) (pH 7,4, 5°C). A suspensão celular foi então submetida à centrifugação (830 x g/10 min). Logo após, o sobrenadante foi removido, o *pellet* ressuspensionado em tampão Tris-HCl 5mM (pH 7,4) e estocado à temperatura de -70°C.

Para a construção de cada curva de atividade dos subtipos da PLA₂ foram utilizadas cerca de 20 placas de *Petri* (100 x 20 mm) com densidade

celular de 1×10^7 . Esse número de placas corresponde a aproximadamente 20 embriões com 18 dias de gestação, ou seja, em média, duas ratas prenhas (Forlenza, 2000).

3.2 - Preparação da amostra e determinação do conteúdo protéico

As amostras de cultura previamente armazenadas em freezer -70°C foram descongeladas e mantidas sob gelo. Em seguida, foram submetidas a uma leve centrifugação ($840 \times g$ /3 minutos) com posterior separação do sobrenadante da amostra. Uma pequena alíquota de $10 \mu\text{L}$ deste material foi retirada para a determinação do conteúdo de proteínas totais, empregando o Kit Bio-Rad DC (*detergent compatible*) *Protein Assay* (Bio-Rad, Hercules, CA) com base no ensaio de *Lowry* modificado (Lowry et al., 1951). Para a determinação das proteínas totais, foi utilizada uma curva padrão de proteínas de albumina sérica bovina (BSA, Sigma-Aldrich), nas seguintes concentrações: 0,250 mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,75 mg/ml, 1,0 mg/ml e 1,5 mg/ml. As microplacas contendo os calibradores e as amostras de cultura de células (em solução) foram lidas em espectrofotômetro para microplacas (Anthos Zenyth 200St, Brasil) empregando comprimento de onda fixo de 680 nm. Todas as determinações dos níveis de proteínas foram realizadas em triplicata.

3.3 - Determinação da atividade de PLA₂ – método radioenzimático

A atividade enzimática presente em uma solução ou material biológico pode ser dosada quantitativamente com base no efeito catalítico que produz. Para esse propósito é necessário saber a equação da reação catalisada, o método analítico para determinar a diminuição do substrato ou aumento dos produtos analíticos, se a enzima requer cofatores (íons), o pH ótimo de atuação e região de temperatura na qual a enzima é estável. O número de transformação de uma enzima é o número de moléculas de substrato transformadas por unidade de tempo por uma única molécula de enzima (Lehninger, 2002).

A atividade da PLA₂ é uma medida estimada da quantidade de AA marcado liberado através de uma reação na qual a PLA₂ atua cataliticamente sobre o substrato L- α -1-palmitoil-2-araquidonil-fosfatidilcolina, marcado com ¹⁴C (PC¹⁴C) na cauda araquidonil na posição *sn*-2 (Figura 13). A quantidade de AA é determinada através do ensaio radioenzimático (Flesh et al., 1985; Gattaz et al., 1995b), com leitura da radiação beta emitida pelo ¹⁴C, em um contador de cintilação líquida.

Figura 13 - Clivagem do substrato PC¹⁴C pela PLA₂

O ensaio radioenzimático foi realizado com a adição de um substrato exógeno marcado à amostra de cultura de células. Para isso, foi utilizado um tampão de lise (Tris-HCl 5,0 mM pH 7,4) durante a homogeneização da amostra para romper as membranas e, assim, permitir a incorporação do substrato marcado aos fragmentos de membrana. Em seguida, foi adicionado um tampão de lipossomos (Tris-HCl 50 mM) para simular o ambiente celular, unindo os fragmentos de membranas contendo o substrato marcado. Foi adicionado também CaCl₂, íon fundamental para a reação catalítica enzimática. Por fim, foi acrescentado o inibidor específico da atividade de iPLA₂ para que fosse possível a determinação da atividade dos subtipos cPLA₂ e sPLA₂. A reação referente à ação catalítica da PLA₂ sobre o substrato ocorre durante um período de incubação com o substrato radioativo ocorrida à 37°C durante 30 minutos. Após este período, a reação foi interrompida com solução de ácido clorídrico e isopropanol (1:12, v/v) e então, realizada a extração do AA liberado na reação enzimática com solventes orgânicos.

3.3.1 - Otimização do método radioenzimático

Para avançarmos na determinação da atividade dos subtipos de PLA₂, novos protocolos foram desenvolvidos e algumas condições analíticas modificadas para que fosse possível favorecer a atividade de cada subtipo da enzima. Para tal, todos os ensaios seguiram o procedimento descrito a seguir, com exceção das variáveis sob investigação.

Em um preparo prévio, foi pipetado um volume de cada amostra necessário para obter uma concentração de proteína de 1,5mg/mL (exceto para curva de proteína). O volume necessário, foi completado com Tris-HCl 5,0mM/pH 7,4 e Tris-HCl 100mM, de forma que a proporção fosse 2:1, v/v, respectivamente. O branco foi constituído de um volume de Tris-HCl 1M + Tris-HCl 100mM na proporção de 1:1, v/v.

Posteriormente, no ensaio propriamente dito, foram pipetados em cada tubo: 50µL de tampão Tris-HCl 1M pH 7,5 para iPLA₂ e 8,5 para cPLA₂ e sPLA₂ (exceto pra curva de pH), CaCl₂ na ordem de mM pra sPLA₂ e µM pra iPLA₂ e cPLA₂ (exceto pra curca de cálcio), 50µL de BEL 1 mM (exceto para curva do inibidor) para determinar sPLA₂ e cPLA₂, 200 µl de amostra diluída (ou de branco) e 150µl (0,075 µCi) do substrato radioativo (PerkinElmer) (exceto para curva de substrato radioativo) ressuspendido em uma solução de albumina humana (BSA) na concentração de 0,33mg/mL. Posteriormente, foi homogeneizada a mistura reacional e incubada por 15 minutos (exceto para curva de tempo de incubação) à 37°C. Após a incubação, as amostras foram colocadas imediatamente em banho de gelo e foram adicionados 700

μL de solução de parada (ácido clorídrico/(isopropanol, na proporção de 1:12, v/v) para interromper a reação. As amostras foram mantidas à temperatura ambiente por 10 min. Foram adicionados 700 μL de *n*-heptano, homogeneizando-se a mistura, a qual foi centrifugada a 1700 x g por 10 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, foram transferidos 500 μL da fase orgânica para tubos contendo 60mg de sílica-gel e 300 μL de *n*-heptano para nova centrifugação (1700 x g por 10 minutos) à temperatura ambiente. Finalmente, foram transferidos 500 μL do sobrenadante para tubos contendo 6,0 mL de líquido de cintilação, os quais foram homogeneizados, para posterior leitura no contador de cintilação líquida (Tri-Carb 2100 TR). Os resultados foram fornecidos em CPM (contagens por minuto) e convertidos para pMol/mg proteína/min, através da equação:

$$\text{Atividade de PLA}_2 = \text{CPM} \times \text{F} / \text{A} \times \text{E} \times 2,22 \times \text{B}$$

sendo:

CPM = contagem por minuto; **F** = fator de ajuste para a concentração de proteína; **A** = atividade específica do substrato radioativo em mCi/mmol;

B = tempo de incubação em minutos; **E** = eficiência do equipamento.

Em conclusão, foram realizados ensaios para a construção das curvas de atividade de subtipos de PLA₂ em função de: concentração de proteína (0,25; 0,5; 0,75; 1,0 mg/mL), tempo de incubação (15, 30, 45 min); substrato radioativo PC¹⁴C (0,075; 0,087; 0,1; 0,112 μCi); concentração de íons Ca⁺²

(100, 300, 500nM; 1,0, 10, 100 μ M; 1,0 e 50mM), pH (6,5; 7,0; 7,5; 8,0 e 8,5), concentração do inibidor BEL (1,0, 5,0, 10, 50mM).

3.4 - Tratamento da cultura de neurônios corticais

Com a finalidade de aplicar a metodologia otimizada, a atividade da PLA₂ em culturas neuronais corticais foi determinada frente aos tratamentos com:

(1) Inibidores da atividade da PLA₂: BEL (1, 10 e 50 μ M) e MAFP (10, 250 e 500 μ M);

(2) Olanzapina (antipsicótico de segunda geração): 50, 150 e 300 μ g/mL;

As substâncias analisadas foram diluídas em meio *Neurobasal*. Os tratamentos foram realizados no tempo de 30 minutos no 4^o DIC, momento em que se observa o pico da atividade da PLA₂ *in vitro*.

Para análise de cada concentração das substâncias testadas nos tratamentos, foi realizado um agrupamento de 5 placas de *Petri*, com densidade celular de 1×10^7 (100x x20mm).

3.5 - Determinação da viabilidade celular segundo o método MTT

O método de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio brometo (MTT) é amplamente utilizado como medida de viabilidade celular, a qual apresenta

uma relação direta ao total de atividade do complexo mitocondrial celular. Assim, aplicamos o referido método para verificar a viabilidade celular frente às substâncias utilizadas nos tratamentos das culturas de neurônios.

O 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio brometo (MTT) é um sal tetrazólico solúvel em água que produz uma coloração amarelada quando preparado em soluções salinas na ausência de fenol vermelho. O MTT é convertido em um precipitado insolúvel da cor violeta, por meio da clivagem dos anéis tetrazólicos pelas desidrogenases mitocondriais. Essas enzimas, ativas em células vivas, convertem a solução amarelada em um precipitado insolúvel violeta; células mortas ou inviáveis, porém, não fazem essa conversão. O precipitado, insolúvel em água, pode ser solubilizado em isopropanol ou dodecil-sulfato de sódio (SDS), medindo-se então a absorvância da nova solução por meio de espectrofotometria.

Baseado no método descrito por Mosmann (1983), temos resumidamente: 20µL de solução estoque de MTT (5mg/mL em PBS) foram adicionados a cada poço de cultura da placa de 96 poços (contendo 1×10^5 células) e incubados por três horas a 37°C e CO₂ 5%. Em seguida, 150µL de solução de SDS 10% em 0,1N de HCl foram adicionados. Após 18 horas de incubação, a absorvância foi medida, usando-se filtro de 570 nm por meio de espectrofotometria (Anthos Zenyth 200St, Brasil). A leitura da absorvância de cada condição foi feita em triplicata. Os resultados foram replicados pelo menos três vezes, em iguais condições experimentais e os valores das leituras foram calculados em relação à condição controle (100%).

3.6 - Análise estatística

Cada condição testada no ensaio radioenzimático foi realizada em triplicata, sendo que foram realizados pelo menos três ensaios radioenzimáticos independentes para cada condição (n=9).

Para avaliar as diferenças entre as médias dos resultados das atividades dos subtipos de PLA₂ em cada condição, foi aplicada a análise de variância (ANOVA) seguida de teste *post hoc* Tukey. Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão, com valor de significância de 5%. Foi empregado o programa *Statistical Package for Social Sciences (SPSS) for Windows* versão 13.0.

4 - RESULTADOS

4.1 - Cultura de neurônios

A Figura 14 representa uma cultura de neurônios corticais de rato no 4^o dia em cultura (DIC) quando observada à microscopia de luz invertida.

Figura 14 - Cultura primária de neurônios corticais de rato. 4^o dia em cultura (DIC). Microscopia de luz invertida (Nikon TE300) 40x. Barra representa 100px.

4.2 - Otimização do método radioenzimático

4.2.1 - Curva de proteína e tempo de incubação

Os primeiros ensaios realizados foram destinados ao estabelecimento da concentração ideal de proteína e do tempo de incubação necessários para a determinação da atividade de PLA₂. Foram testadas as

concentrações de 0,25; 0,5; 0,75 e 1mg/mL nos tempos de 15, 30 e 45 minutos.

Os resultados são apresentados nas Figuras 15 a 17 e demonstram que as condições ótimas, em relação a estes parâmetros, são: concentração de proteína de 0,25 mg/mL para todos os subtipos avaliados e tempo de incubação de 15 minutos para iPLA₂ (GVIA) (Figura 15) e sPLA₂ (Figura 16), e de 45 minutos para cPLA₂ (Figura 17).

Figura 15 - Influência do tempo e da concentração de proteína sobre a atividade da iPLA₂ em neurônios corticais mantidos em cultura. Os resultados estão expressos em média $\pm$ erro padrão e foram analisados através de ANOVA, seguida de Tukey. **p < 0,01.

Figura 16 - Influência do tempo e da concentração de proteína sobre a atividade da cPLA₂ em neurônios corticais mantidos em cultura. Os resultados estão expressos em média $\pm$ erro padrão e foram analisados através de ANOVA, seguida de Tukey. **p < 0,01.

Figura 17 - Influência do tempo e da concentração de proteína sobre a atividade da sPLA₂ em neurônios corticais mantidos em cultura. Os resultados estão expressos em média $\pm$ erro padrão e foram analisados através de ANOVA, seguida de Tukey. **p < 0,01.

4.2.2 - Curva de substrato radioativo

Para determinar a radioatividade ótima do substrato radioativo, foram utilizados quatro diferentes pontos: 0,075, 0,087, 0,1 e 0,112 μ Ci de radioatividade. Os resultados obtidos encontram-se na Figura 18.

Figura 18 - Influência da radioatividade (substrato radioativo) sobre a atividade das PLA₂ em neurônios corticais mantidos em cultura. Os resultados estão expressos em média $\pm$ erro padrão e foram analisados através de ANOVA, seguida de Tukey. **p < 0,01.

Estes resultados demonstram que a radioatividade ótima foi de 0,1 μ Ci para o subtipo iPLA₂ e cPLA₂. No entanto, um maior requerimento (0,112 Ci) foi necessário para a determinação da atividade do subtipo sPLA₂. Tendo em vista o bom resultado obtido e o elevado custo deste reagente, volumes superiores a 22,5 μ L não foram avaliados para este subtipo.

4.2.3 - Curva de íons cálcio

Os resultados apresentados na Figura 19 demonstram que as concentrações ótimas de cálcio exógeno são: 100 μM para iPLA₂ e cPLA₂, 5mM para sPLA₂.

Figura 19 - Influência da concentração do cálcio sobre a atividade das PLA₂ em neurônios corticais mantidos em cultura. Os resultados estão expressos em média $\pm$ erro padrão e foram analisados através de ANOVA, seguida de Tukey. * $p < 0,05$.

4.2.4 - Curva de pH

O pH ideal para a atividade catalítica das enzimas iPLA₂ e sPLA₂ foi 8,5 e cPLA₂, pH 8,0 (Figura 20).

Figura 20 - Influência do pH sobre a atividade das PLA₂ em neurônios corticais mantidos em cultura. Os resultados estão expressos em média $\pm$ erro padrão e foram analisados através de ANOVA, seguida de Tukey. ** $p < 0,01$.

4.2.5 - Curva do inibidor BEL

Os resultados da Figura 21 demonstram que todas as concentrações de BEL testadas, inibiram de forma significativa a atividade enzimática da iPLA₂.

Figura 21 - Influência da concentração de BEL sobre a atividade da iPLA₂ em neurônios corticais mantidos em cultura. Os resultados estão expressos em média $\pm$ erro padrão e foram analisados através de ANOVA, seguida de Tukey. *** $p < 0,001$.

4.2.6 - Subtipos de PLA₂ em cultura de neurônios

Dados da Figura 22 demonstram que a partir dos resultados gerados neste estudo, foi possível a constatação da predominância do subtipo iPLA₂ (71%) na matriz analisada, seguida de 26% de cPLA₂ e 3% de sPLA₂.

Figura 22 – Atividade dos subtipos de PLA₂ em cultura primária de neurônios corticais.

4.3 - Modulação da atividade dos subtipos da PLA₂ na cultura de neurônios

4.3.1 - Inibição da atividade de iPLA₂ com BEL

Os resultados da Figura 23 mostram a curva de inibição da atividade de iPLA₂ em cultura de neurônios corticais tratadas com BEL durante 30 minutos, nas concentrações de 1μM, 10μM e 50μM. Observou-se uma redução dose-dependente da atividade de PLA₂ que se mostrou significativa a partir de BEL 1μM e mais pronunciada (97%) na concentração de 50μM de BEL.

Figura 23 – Atividade de iPLA₂ em cultura primária de neurônios corticais e rato no 4ºDIC tratadas com doses crescentes de BEL por 30 min. Os resultados estão expressos em média $\pm$ erro padrão e foram analisados através de ANOVA, seguida de Tukey.
* $p < 0,05$.

4.3.2 - Inibição da atividade de PLA₂ com MAFP

As Figuras 24 e 25 representam a curva de inibição da atividade de iPLA₂ e cPLA₂ em cultura de neurônios corticais tratadas com MAFP durante 30 minutos, nas concentrações de 100 μ M, 250 μ M e 500 μ M. Observou-se uma redução dose-dependente da atividade de PLA₂ que se mostrou significativa a partir de MAFP 100 μ M, sendo que a inibição foi total com 500 μ M tanto para o subtipo iPLA₂ quanto cPLA₂.

Figura 24 – Atividade de iPLA₂ em cultura primária de neurônios corticais e rato no 4^ºDIC tratadas com doses crescentes de MAFP por 30 min. Os resultados estão expressos em média $\pm$ erro padrão e foram analisados através de ANOVA, seguida de Tukey. ***p < 0,001.

Figura 25 – Atividade de cPLA₂ em cultura primária de neurônios corticais de rato no 4^ºDIC tratadas com doses crescentes de MAFP por 30 min. Os resultados estão expressos como média $\pm$ erro padrão e foram analisados através de ANOVA, seguida de Tukey. *p < 0,05.

4.3.3 - Inibição da atividade de PLA₂ com olanzapina

Os resultados da atividade de PLA₂ em culturas neuronais tratadas com olanzapina (50, 150 e 300µg/mL) por 30 minutos estão demonstrados nas Figuras 26 a 28. Foi observada uma diminuição significativa (26%) da atividade de iPLA₂ com 300µg/mL de olanzapina. Em relação aos subtipos cPLA₂ e sPLA₂, não houve modulação da atividade enzimática no tratamento com olanzapina

Figura 26 – Atividade de iPLA₂ em cultura primária de neurônios corticais de rato no 4^oDIC tratadas com doses crescentes de olanzapina por 30 min. Os resultados estão expressos em média ± erro padrão e foram analisados através de ANOVA, seguida de Tukey. **p< 0,01.

Figura 27 – Atividade de cPLA₂ em cultura primária de neurônios corticais de rato no 4^oDIC tratadas com doses crescentes de olanzapina por 30 min. Os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão e analisados através de ANOVA, seguida de Tukey.
* $p < 0,05$.

Figura 28 – Atividade de sPLA₂ em cultura primária de neurônios corticais de rato no 4^oDIC tratadas com doses crescentes de olanzapina por 30 min. Os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão e analisados através de ANOVA, seguida de Tukey.
* $p < 0,05$.

4.4 - Avaliação da viabilidade celular segundo MTT

Nenhuma perda de viabilidade celular representativa (indicada em % e comparada com o controle 0% de perda) foi detectada pelo método MTT depois de 30 minutos de tratamento com:

- inibidores da PLA₂: BEL 1μM (5%), 10μM (8%), 50μM (2%); MAFP 100μM (7%), 250μM (14.6%) e 500μM (19.9%);
- olanzapina: 50μM (2%), 150μM (3%), 300μM (2%).

5 - DISCUSSÃO

O objetivo deste estudo foi otimizar o método radioenzimático para a quantificação da atividade dos subtipos de PLA₂, pois as metodologias propostas até o momento e utilizadas na maioria dos trabalhos publicados não possibilitavam a diferenciação entre os subtipos enzimáticos.

É relevante esclarecer que não foi realizada a validação da metodologia. O conceito de validação é mais apropriado às técnicas analíticas que fazem uso de métodos de cromatografia gasosa ou cromatografia líquida de alta eficiência, métodos não-cromatográficos (por ex. titulometria, espectrofotometria ultra-violeta visível) e testes imunológicos ou microbiológicos. O objetivo de uma validação é demonstrar que o método é apropriado para a determinação qualitativa, semi-quantitativa e/ou quantitativa de fármacos e outras substâncias em produtos farmacêuticos. Para isso, deve apresentar especificidade, linearidade, intervalo, precisão, sensibilidade, limite de quantificação, exatidão, adequados à análise. Além disso, os laboratórios de análise devem realizar a validação de métodos para atender ao governo ou a órgãos regulamentadores, sendo que os dados obtidos farão parte do conjunto de informações que serão apresentadas a agências como o *Food and Drug Administration* ou à Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (RE nº 889, ANVISA).

Para a otimização do método aplicado a esse estudo, foram realizadas curvas das condições analíticas (quantidade de proteína, tempo de incubação, quantidade de substrato radioativo, quantidade de íons cálcio,

pH, quantidade de inibidor da enzima) consideradas variáveis críticas em uma reação enzimática, a qual representa o fundamento do método radioenzimático. Ao serem testadas concentrações variadas de proteína a partir de culturas de células, obteve-se um melhor aproveitamento do substrato radioativo com 0,25 mg/mL de proteína para todos os subtipos da PLA₂. Essa quantidade de proteína é menor se comparada a trabalhos anteriores com cultura de neurônios (Forlenza et al., 2002; Mendes et al., 2005) e tecido cerebral de rato (ambas 1,5mg/mL) (Barbosa et al., 2008; Schaeffer e Gattaz, 2005;). Esse resultado demonstra um aprimoramento do método e a vantagem de se utilizar uma menor quantidade de material biológico para as análises. Esses achados se aproximam ainda, da quantidade de proteína ideal (0,2mg/mL) quando plaquetas são utilizadas como matriz biológica (Talib et al., 2008).

O tempo de incubação ótimo para a reação enzimática foi de 15 minutos para os subtipos iPLA₂ e sPLA₂ e 45 minutos para cPLA₂. O tempo de incubação de 15 minutos é utilizado também para determinação da atividade de subtipos de PLA₂ em tecido cerebral de rato em trabalhos realizados pelo nosso grupo (Barbosa et al., 2008). Apesar da possibilidade de se utilizar o menor tempo de incubação (15 minutos) para os três subtipos e assim diminuir o tempo total destinado ao ensaio, optou-se por manter os 45 minutos para cPLA₂, já que o intuito do trabalho é avaliar seletivamente a atividade de cada subtipo da PLA₂.

Para determinação da atividade enzimática dos subtipos cPLA₂ e sPLA₂, é necessário realizar a inibição da atividade de iPLA₂. Nossos

resultados demonstram uma inibição significativa da atividade da iPLA₂ com todas as concentrações, inclusive a menor concentração testada (1mM de BEL). De fato, BEL é um potente e irreversível inibidor da iPLA₂, sendo que sua atuação é 1000 vezes maior e mais seletiva sobre a iPLA₂ que sobre os outros grupos de PLA₂ (Hazen et al., 1991; Song et al., 2006). O Bel é considerado um inibidor suicida para iPLA₂ pela sua semelhança com plasmalógenos que são substratos para esse grupo da enzima (Farooqui et al., 1999).

Nossos resultados demonstram que a radioatividade ótima para o ensaio foi de 0,100μCi para as enzimas cPLA₂ e iPLA₂. No entanto, um maior requerimento (0,112μCi) foi necessário para a determinação da atividade da enzima sPLA₂. De fato, este último subtipo enzimático não demonstra preferência em hidrolisar o AA ligado à fosfatidilcolina frente a outros ácidos graxos (Dennis, 1994), o que acarreta em uma menor afinidade pelo substrato radioativo.

Com relação às concentrações de íons cálcio, as condições ótimas foram: 100μM para iPLA₂ e cPLA₂, 5mM para sPLA₂. Esses achados estão de acordo com estudos de caracterização dos diferentes grupos de PLA₂, nos quais os subtipos intracelulares requerem cálcio na ordem micromolar e subtipos extracelulares na ordem de milimolar (Kudo e Murakami, 2002; Taketo e Sonoshila, 2002).

O pH ideal para ação catalítica do subtipo iPLA₂ (subtipo predominante na cultura de neurônios) foi de 8,5. Esses achados estão em acordo com trabalhos anteriores com a mesma matriz celular, na qual Mendes e

colaboradores (2005) também utilizaram pH de 8,5 para determinar a atividade da PLA₂ total. PLA₂ secretória demonstrou pH ótimo de 8,5 e cPLA₂ tanto 7,5 quanto de 8,0. De fato, estudos de Yoshihara e Watanabe (1990) demonstraram que a cPLA₂ demonstra atividade ótima tanto em pH neutro quanto alcalino. Além disso, com exceção da PLA₂ lisossomal, todas as outras formas caracterizadas atuam em pH neutro a alcalino (Bonventre, 1992).

Nos tratamentos das culturas de neurônios com inibidores da atividade da PLA₂ (BEL e MAFP), foi possível demonstrar a partir dos novos parâmetros estabelecidos, que o uso de BEL inibiu especificamente a atividade do subtipo iPLA₂ de maneira dose-dependente, sendo que a dose de 50 µM apresentou uma inibição mais pronunciada (91%) deste subtipo enzimático. O tratamento com MAFP na dose de 500 µM inibiu por completo e especificamente a atividade de iPLA₂ e do subtipo cPLA₂ a inibição foi de 80%.

Em um segundo momento, as culturas de neurônios foram tratadas com olanzapina, um antipsicótico de segunda geração (Tandon et al., 2008) e exibiram uma significativa inibição da atividade do subtipo iPLA₂ (26%). De fato, um aumento da atividade da PLA₂ é relatado no sangue e tecido cerebral de pacientes com esquizofrenia (Gattaz et al., 1987, 1990, 1995b; Glen et al., 1994, Horrobin, 1998a; Hudson, 1996; Smesny et al., 2005, Tavares et al., 2003), acarretando um metabolismo acelerado dos fosfolípidos de membrana nesta patologia. Em acordo com esses achados, estudos (Gattaz et al., 1987; Ross et al., 1997) demonstraram atividade da

PLA₂ aumentada em pacientes com esquizofrenia que não faziam uso de medicação e, ainda, que a atividade da enzima foi reduzida depois do tratamento desses pacientes com medicamentos antipsicóticos. Além disso, já foi demonstrado que haloperidol (Gattaz et al., 1987) e outros antipsicóticos de primeira geração (Trzeciak et al., 1995) reduziram a atividade da PLA₂. Acredita-se que o mecanismo de redução da atividade da PLA₂, pela ação de fármacos antipsicóticos, ocorra através da ligação da droga na interface enzima-substrato ou a partir de mecanismos de inibição da via de sinalização da PLA₂ ligada à proteína G (Myers et al., 2001).

A partir da observação de nossos resultados, foi possível verificar que as melhores leituras (resposta do equipamento) de atividade de PLA₂ foram obtidas para o subtipo iPLA₂. Esse subtipo representou 71% do total da atividade da PLA₂ na cultura de neurônios quando comparado com os subtipos sPLA₂ e cPLA₂, presentes em menor quantidade, 26% e 3%, respectivamente. Uma possível explicação para a menor atividade de sPLA₂ e cPLA₂ no modelo apresentado, é pelo fato de que estes subtipos estão envolvidos na geração de moduladores da inflamação e, conseqüentemente, no mecanismo de defesa do hospedeiro e estresse oxidativo (Balboa et al., 1996; Beers et al., 2002; Dennis, 1994; Koduri et al., 2002; Kuwata et al., 1998; Murakami et al., 1999; Ohto et al., 2005; Pfeilschifter et al., 1993; Reddy et al., 1997, Satake et al., 2004; Sawada et al., 1999; Yang et al., 1999b; Shelat et al., 2008). Estudos sugerem que a PLA₂ exerça um papel crítico nos mecanismos de morte celular e estresse oxidativo em astrócitos (Clemens et al., 1996; Kramer et al., 1996), especificamente cPLA₂ (Xu et

al., 2002) e sPLA₂ (Lin et al., 2004). A atividade de cPLA₂ em astrócitos funciona como elemento-chave no processo inflamatório (Kramer et al., 1996). cPLA₂GIVA é considerada a enzima principal na geração de eicosanóides e conseqüentemente, em processos inflamatórios (Dennis e Burke, 2009). No entanto, a cultura de neurônios utilizada neste estudo foi mantida sob condições estritamente controladas como, temperatura, pH, umidade, oxigenação e aporte de nutrientes. Dessa forma, esse modelo de cultura reproduz padrões semelhantes a condições fisiológicas dos organismos vivos, onde as funções dos subtipos de sPLA₂ e cPLA₂ seriam menos requisitadas. No entanto, é importante ressaltar que apesar da baixa atividade encontrada para os subtipos sPLA₂ e cPLA₂ na cultura de neurônios, os parâmetros analíticos ótimos para suas respectivas determinações no método radioenzimático, encontram-se estabelecidos.

Já o subtipo iPLA₂, apresenta um papel importante no metabolismo do AA, em particular para o remodelamento de ácidos graxos dos fosfolípides. Essa enzima, encontrada no citosol, possui função na manutenção da membrana celular (Balsinde e Balboa, 2005), especificamente dos fosfolípides (Farooqui et al., 1999; Farooqui e Horrocks, 2006; Muralikrishna Adibhatla e Hatcher, 2006). iPLA participa da via principal com que células incorporam o AA e outros ácidos graxos nos fosfolípides da membrana (Balsinde, 1994; Balsinde e Dennis, 1997). Além disso, estudos com cultura de astrócitos demonstram o envolvimento da iPLA₂ no aumento de ácido docohexanóico que auxilia na manutenção da fluidez da membrana (Salem et al., 2001). iPLA₂ exerce, dessa forma, um papel fundamental na

manutenção de fosfolípidos de células neurais em condições fisiológicas. (Peterson et al., 2006).

É de grande importância a detecção do predomínio do subtipo iPLA₂ na cultura de neurônios, visto que em estudos com tecido cerebral de ratos e humanos, a iPLA₂ também foi o grupo predominante, respondendo por 85% da atividade enzimática (Jardim, 2005; Schaeffer e Gattaz, 2005). Em acordo com esses resultados, trabalhos de Yang e colaboradores (1999a,b) demonstraram que a iPLA₂ compreende 70% da atividade de PLA₂ em homogenatos de cérebro de ratos.

Diante da constatação de que tanto a matriz *in vivo* (tecido cerebral humano e de rato) quanto *in vitro* (cultura de neurônios) apresentam predomínio do subtipo enzimático iPLA₂, torna-se evidente a similaridade entre os respectivos modelos.

No entanto, é importante citar que existem algumas limitações inerentes ao modelo *in vitro*. Nesse trabalho, podemos destacar a quantidade limitada de material biológico fornecida pela cultura de células. Dessa forma, foi necessário que se reunisse um número grande de cultivo de células neuronais para que fosse possível realizar uma única curva de otimização no método radioenzimático.

Contudo, a partir do método otimizado, foi possível verificar a modulação da atividade dos subtipos da PLA₂ de forma seletiva. Além disso, a similaridade entre os modelos *in vitro* e *in vivo*, representada pelo predomínio do subtipo iPLA₂, demonstra que a cultura primária de neurônios

representa um excelente modelo de estudo na compreensão dos mecanismos celulares envolvidos nas doenças neuropsiquiátricas. A partir de estudos com culturas de células, poderá ser investigado o potencial modulador de substâncias químicas inovadoras ou de uso tradicional sobre a atividade da PLA₂.

6 - CONCLUSÕES

As condições analíticas ótimas para determinar a atividade dos três principais subtipos de PLA₂ (iPLA₂, cPLA₂ e sPLA₂) em cultura primária de neurônios foram estabelecidas e o método radioenzimático otimizado.

Os resultados obtidos sugerem diferentes requisições analíticas dos subtipos enzimáticos em relação aos parâmetros testados e diferenças entre as matrizes analíticas (tecido cerebral, plaquetas e cultura primária de neurônios), o que reforça a necessidade de otimização da metodologia para que seja possível analisar seletivamente cada subtipo enzimático.

A observação dos dados propiciou a identificação da iPLA₂ como subtipo enzimático predominante (71%), seguida da cPLA₂ (26%) e sPLA₂ (3%) na cultura de neurônios corticais.

O tratamento da cultura de neurônios com inibidores da PLA₂ e olanzapina modulou especificamente os subtipos da PLA₂.

A cultura de neurônios corticais apresenta-se como excelente ferramenta de estudo, devido à similaridade com o tecido cerebral em relação à predominância do subtipo iPLA₂.

7 - REFERÊNCIAS

Abe A, Shayman JA, Purification and characterization of 1-Oacylceramide synthase, a novel phospholipase A₂ with transacylase activity. *J. Biol. Chem.* 1998; 273: 8467 - 8474.

Ackerman EJ, Kempner ES, Dennis EA Ca²⁺-independent cytosolic phospholipase A₂ from macrophage-like P388D₁ Cells. Isolation and characterization. *J Biol Chem.* 1994; 269 (12): 9227 - 33.

Ackermann EJ and Dennis EA. Mammalian calcium-independent phospholipase A₂. *Biochim Biophys Acta.* 1995; 1259: 125 - 136.

Akiba S, Sato, T. Cellular function of Calcium-Independent Phospholipase A₂. *Biol Pharm.Bull.* 2004; 27 (8): 1174 - 1178.

Ates M, Hamza M, Seidel K, Kotalla CE, Ledent C, and Guhring H Intrathecally applied flurbiprofen produces an endocannabinoid-dependent antinociception in the rat formalin test. *Eur J Neurosci.* 2003; 17: 597 - 604.

Atsumi G, Tajima M, Hadano A, Nakatani Y, Murakami M, Kudo I. Fas-induced arachidonic acid release is mediated by Ca²⁺-independent phospholipase A₂ but not cytosolic phospholipase A₂, which undergoes proteolytic inactivation. *J. Biol. Chem.* 1998; 273: 13870 - 13877

Atsumi G, Murakami M, Kojima K, Hadano A, Tajima M, Kudo I. Distinct roles of two intracellular phospholipase A₂s in fatty acid release in the cell death pathway. Proteolytic fragment of type IVA cytosolic phospholipase A₂ alpha inhibits stimulus-induced arachidonate release, whereas that of type VI Ca²⁺-independent phospholipase A₂ augments spontaneous fatty acid release. *J Biol Chem.* 2000; 275: 18248 - 18258.

Avanzini G, Franceschetti S. Cellular biology of epileptogenesis. *Lancet Neurol.* 2003 Jan;2(1):33-42.

Baker RR, Chang H. Cholinephosphotransferase activities in microsomes and neuronal nuclei isolated from immature rabbit cerebral cortex: the use of endogenously generated diacylglycerols as substrate. *Can. J.Biochem.* 1982; 60:724 - 733.

Balboa, MA., Winstead MV, Balsinde, JA. Tischfield, and Dennis EA. Novel group V phospholipase A₂ involved in arachidonic acid mobilization in murine P388D1 macrophages. *J Biol Chem.* 1996; 271:32381 - 32384.

Balboa MA, Saez Y, Balsinde J. Calcium-independent phospholipase A₂ is required for lysozyme secretion in U937 promonocytes. *J. Immunol.* 2003; 170: 5276 - 5280.

Balsinde J, Bobour SE, Bianco ID, Dennis EA, Arachidonic acid mobilization in P388D1 macrophages is controlled by two distinct Ca^{+2} -dependent phospholipase A₂ enzymes. *Proc Natl Acad Sci*. 1994; (23): 11060 - 4.

Balsinde J, Bianco ID, Ackermann EJ, Conde-Frieboes K, Dennis EA. Inhibition of calcium-independent phospholipase A₂ prevents arachidonic acid incorporation and phospholipid remodeling in P388D1 macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1995; 92: 8527 - 8531.

Balsinde J and Dennis EA. Distinct roles in signal transduction for each of the phospholipase A₂ enzymes present in P388D1 macrophages. *J Biol Chem*. 1996; 271: 6758 - 6765.

Balsinde J, Dennis EA. Bromoenol lactone inhibits magnesium-dependent phosphatidate phosphohydrolase and blocks triacylglycerol biosynthesis in mouse P388D1 macrophages. *J Biol Chem*. 1997; 272 (46): 29317 - 21.

Balsinde S, Balboa MA, Insel PA. Regulation and Inhibition of phospholipase A₂. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 1999; 39:175 - 89. Review.

Balsinde J, Balboa MA. Cellular regulation and proposed biological functions of group VIA calcium-independent phospholipase A₂ in activated cells. *Cell Signal*. 2005; 17(9):1052 - 62.

Banker G, Goslin K. *Culturing Nerve Cells*, Cambridge, Massachusetts, MIT Press 1991; Cap. 2 Types of nerve cell cultures, their advantages and limitations: 11 - 40; Cap. 3 Primary dissociated cell cultures of neural tissue: 41 - 74.

Barbosa NR, Pittella F, Gattaz WF. Centella asiatica water extract inhibits iPLA₂ and cPLA₂ activities in rat cerebellum *Phytomedicine*. 2008 (10) : 896-900.

Bate C, Reid S, Williams A. Phospholipase A₂ inhibitors or platelet-activating factor antagonists prevent prion replication. *J Biol Chem*. 2004; 279: 36405 - 36411.

Bazan NG. Effects of ischemia and electroconvulsive shock on free fatty acid pool in the brain. *Biochim Biophys Acta*. 1970; 218: 1 - 10.

Bazan NG, Zorumski CF, Clark GD. The activation of phospholipase A₂ and release of arachidonic acid and other lipid mediators at the synapse: the role of platelet-activating factor. *J Lipid Mediat*. 1993; 6 (1-3): 421 - 7.

Bazan NG. The neuromessenger platelet-activating factor in plasticity and neurodegeneration. *Prog Brain Res*. 1998; 118 : 281-91.

Bazan NG, Tu B, Rodriguez de Turko EB. What synaptic lipid signaling tells us about seizure-induced damage and epileptogenesis. *Prog Brain Res*; 2002; 135:175 - 185.

Beers SA, Buckland AG, Koduri RS, W. Cho W, Gelb MH, Wilton DC, The antibacterial properties of secreted phospholipases A₂. A major physiological role for the group IIA enzyme that depends on the very high pI of the enzyme to allow penetration of the bacterial cell wall. *J Bio Chem*. 2002; 277 1788 - 1793.

Berg L. Impediments to research progress in development of behavioral approaches to treatment and care of persons with Alzheimer's disease. *Int Psychogeriatr*. 1996; 1: 113 - 4.

Blusztajn JK, Liscovitch M, Richardson UI. Synthesis of acetylcholine from choline derived from phosphatidylcholine in a human neuronal cell line. *Proc Natl Acad Sci*. 1987; 84(15): 5474 - 5477.

Bonventre JV. Phospholipase A₂ and Signal Transduction. *J AM Soc Nephrol*. 1992; 3:128-150.

Börsch-Haubold AG, Bartoli F, Asselin J., Dudler T., Kramer R. M, Apitz-Castro R, Watson SP, and Gelb MH. Identification of the phosphorylation sites of cytosolic phospholipase A₂ in agonist-stimulated human platelets and HeLa cells. *J Biol Chem*.1998; 273: 4449 - 4458.

Bosetti F, Weerasinghe GR, Rosenberger TA, Rapaport SI. Valproic acid down-regulates the conversion of arachidonic acid to eicosanoids via cyclooxygenase-1 and -2 in rat brain. *J Neurochem*. 2003; 85: 690 - 696.

British Nutrition Foundation. Unsaturated fatty acids nutritional and physiological significance. London: Chapman and Hall, 1992.

Buckland AG, Wilton DC. The effect of phosphatidylinositols on cytosolic phospholipase A₂ activity using a continuous fluorescent displacement assay. *Biochem Soc Trans*. 1997; 25: S599.

Caporaso GL, Gandy SE, Buxbaum JD, Greengard P. Chloroquine inhibits intracellular degradation but not secretion of Alzheimer beta/A4 amyloid precursor protein. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1992; 89(6): 2252 - 2256.

Caslake MJ, Packard CJ, Lipoprotein-associated phospholipase A₂ (platelet-activating factor acetylhydrolase) and cardiovascular disease, *Curr Opin Lipidol*. 2003, 14 347 - 352.

Chang MC, Jones CR. Chronic lithium treatment decreases brain phospholipase A₂ activity. *Neurochem Res*. 1998; 23:887 - 892.

Chang MC, Contreras MA, Rosenberger TA, Rintala JJ, Bell JM, Rapoport SI. Chronic valproate treatment decreases the in vivo turnover of arachidonic acid in brain phospholipids: a possible common effect of mood stabilizers. *J Neurochem.* 2001; 77: 796 - 803.

Channon JY, Leslie CC. A calcium-dependent mechanism for associating a soluble arachidonoyl-hydrolyzing phospholipase A₂ with membrane in the macrophage cell line RAW 264.7. *J Biol Chem.* 1990; 265 (10): 5409 - 5413.

Chen CH, Platelet-activating factor acetylhydrolase: is it good or bad for you? *Curr Opin Lipidol.* 2004; 15: 337 - 341.

Chen J, Engle SJ, Seilhamer JJ, Tischfield JA. Cloning and recombinant expression of a novel human low molecular weight Ca⁽²⁺⁾ dependent phospholipase A₂. *J Biol Chem.* 1994; 269(4): 2365 - 8.

Chiba H, Michibata H, Wakimoto K, Seishima M, Kawasaki S, Okubo K, Mitsui H, Torii H, Imai Y. Cloning of a gene for a novel epithelium-specific cytosolic phospholipase A₂, cPLA₂ delta, induced in psoriatic skin. *J Biol Chem.* 2004; 279: 12890 - 12897.

Ciraulo DA, Tsirolnik-Barts L, Shader RI, Greenblatt DJ: Clinical pharmacology and therapeutic of antidepressants. In: *Pharmacotherapy of depression*. Edited by: Ciraulo DA and Shader RI. Totowa NJ, Humana Press; 2004: 33 - 119.

Clark JD, Milona N, Knopf JL. Purification of a 110-kilodalton cytosolic phospholipase A₂ from the human monocytic cell line U937. *Proc Natl Acad Sci.* 1990; 87(19): 7708 - 12.

Clark JD, Lin LL, Kriz RW. A novel arachidonic acid-selective cytosolic PLA₂ contains a Ca²⁺-dependent translocation domain with homology to PKC and GAP *Cell* .1991; 65: 1043 - 1051.

Clemens JA, Stephenson DT, Smalstig EB, Roberts EF, Johnstone EM, Sharp JD, et al. Reactive glia express cytosolic phospholipase A₂ after transient global forebrain ischemia in the rat. *Stroke.* 1996; 27(3): 527 - 35.

Costello EJ, Mustillo S, Erkanli A, Keeler G, Angold A: Prevalence and development of psychiatric disorders in childhood and adolescence. *Arch Gen Psychiatry* 2003; 60: 837 - 844.

Coyle JT, Duman RS: Finding the intracellular signaling pathways affected by mood disorder treatments. *Neuron.* 2003; 38: 157 - 160.

Craddock N, Jones I. Genetics of bipolar disorder. *J Med Genet* 1999; 36: 585 - 594.

Cummings BS, McHowat J, Schnellmann RG. Phospholipase A₂s in cell injury and death. *J Pharmacol Exp Ther*. 2000; 294: 793 - 799.

De Vivo M, Maayani S. Characterization of the 5-hydroxytryptamine_{1A} receptor-mediated inhibition of forskolin-stimulated adenylate cyclase activity in guinea pig and rat hippocampal membranes. *J Pharmacol Exp Ther*. 1986; 238: 248 - 253.

De Vivo M, Maayani S. Stimulation and inhibition of adenylyl cyclase by distinct 5-hydroxytryptamine receptors. *Biochem Pharmacol*. 1990; 40:1551 - 1558.

Deicken RF, Calabrese G, Merrin EL, Meyerhoff DJ, Dillon W, Weiner MW & Fein G.³¹ Phosphorous Magnetic Resonance Spectroscopy of the frontal and parietal lobes in chronic schizophrenia. *Biol Psychiatry*. 1993; 36: 503 - 510.

Deicken RF, Fein G, Weiner MW. Abnormal frontal lobe phosphorous metabolism in bipolar disorder. *Am J Psychiatry*. 1995a; 152: 915 - 918.

Deicken RF, Weiner MW, Fein G. Decreased temporal lobe phosphomonoesters in bipolar disorder. *J Affect Disord*. 1995b; 33: 195 - 199.

DeMar JC Jr, Ma K, Bell JM, Rapoport SI. Half lives of docosahexaenoic acid in rat brain phospholipids are prolonged by 15 weeks of nutritional deprivation of n-3 polyunsaturated fatty acids. *J Neurochem*. 2004; 91: 1125 - 1137.

Dennis, E. A. *The Enzymes* (Boyer, P. D., ed). 3rd Ed, v. 16, pp. 307-353, New York: Academic Press, 1983.

Dennis EA. Diversity of group types, regulation, and function of phospholipase A₂. *J Biol Chem*. 1994; 269 (18): 13057 - 13060.

Dennis EA, Burke JE (2009) Phospholipase A₂ structure/function, mechanism, and signaling. *J Lipid Res*. Suppl:S 237-42.

Dessen A, Tang J, Schmidt H, Stahl M, Clark JD, Seehra J, Somers WS. Crystal structure of human cytosolic phospholipase A₂ reveals a novel topology and catalytic mechanism. *Cell*. 1999; 97 (3) :349-60.

Diez E, Chilton FH, Stroup G, Mayer RJ, Winkler JD, Fonteh AN. Fatty acid and phospholipid selectivity of different phospholipase A₂ enzymes studied by using a mammalian membrane as substrate. *Biochem J*. 1994; 301 (Pt 3): 721 - 6.

Dorandeanu F, Marino-Pernot I, Veyret J, Cristophe Perricho, Lallement G. Secreted Phospholipase A₂-Induced Neurotoxicity and Epileptic Seizures After Intracerebral Administration: An Unexplained Heterogeneity as Emphasized with Paradoxin and Crotoxin. *J Neurosci Res*. 1998; 54: 848 - 862.

Dumuis A, Sebben M, Bockaert J: Pharmacology of 5-hydroxytryptamine-1A receptors which inhibit cAMP production in hippocampal and cortical neurons in primary culture. *Mol Pharmacol*. 1988; 33: 178 - 186.

Duncan RE, Nagy-Sarkadi E, Jaworski K, Ahmadian M, Sul HS. Identification and Functional Characterization of Adipose-specific Phospholipase A₂ (AdPLA₂). *J Biol Chem*. 2008; 283 (37): 25428 - 36.

Edwards R, Peet M, Shay J, Horrobin D. Omega-3 polyunsaturated fatty acid levels in the diet and in red blood cell membranes of depressed patients. *J Affect Disord*. 1998; 48: 149 - 155.

Emmerling MR, Moore CJ, Doyle PD, Carroll RT, Davis RE: Phospholipase A₂ activation influences the processing and secretion of the amyloid precursor protein. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; 197(1): 292 - 297.

Evans JH, Spencer DM, Zweifach A, Leslie CC. Intracellular calcium signals regulating cytosolic phospholipase A₂ translocation to internal membranes. *J Biol Chem*. 2001; 276 (32): 30150 - 60.

Farooqui AA, Horrocks LA. Involvement of glutamate receptors, lipases, and phospholipases in long-term potentiation and neurodegeneration. *J Neurosci Res*. 1994; 36: 267 - 323.

Farooqui AA, Yang HC, Rosenberger TA, Horrocks LA. Phospholipase A₂ and its role in brain tissue. *J Neurochem*. 1996; 69(3): 889 - 901.

Farooqui AA, Yang H-C, and Horrocks LA Involvement of phospholipase A₂ in neurodegeneration. *Neurochem Int*. 1997; 30: 517 - 522.

Farooqui AA, Litsky ML, Farooqui T, Horrocks LA. Inhibitors of intracellular phospholipase A₂ activity: their neurochemical effects and therapeutical importance for neurological disorders. *Brain Res Bull*. 1999; 49: 139 - 53.

Farooqui AA, Horrocks L A, Farooqui T. Glycerophospholipids in brain: Their metabolism, incorporation into membranes, functions, and involvement in neurological disorders. *Chem Phys Lipids*. 2000a; 106: 1 - 29.

Farooqui AA, Horrocks LA, Farooqui T. Deacylation and reacylation of neuronal membrane glycerophospholipids: A matter of life and death. *J Mol Neurosci*. 2000b; 14: 123 - 135.

Farooqui AA, Farooqui T, Horrocks, LA. 2002. Molecular species of phospholipids during brain development. Their occurrence, separation and roles. Pages 147 – 158, in Skinner, E. R. (ed.). *Brain lipids and disorders in biological psychiatry*. Amsterdam: Elsevier Science B.V.

Farooqui AA, Ong W, Horrocks LA. Biochemical Aspects of Neurodegenerations in Human Brain: Involvement of Neural Membrane Phospholipids and Phospholipases A₂. *Neurochemical Research*. 2004; 29: 1961 - 77.

Farooqui AA, Horrocks LA. Phospholipase A₂-generated lipid mediators in the brain: the good, the bad, and the ugly. *Neuroscientist*. 2006;12(3): 245 - 60.

Farooqui AA, Ong W, Horrocks LA. Inhibitors of Brain Phospholipase A₂ Activity: Their Neuropharmacological Effects and Therapeutic Importance for the Treatment of Neurologic Disorders. *Pharmacol Rev*. 2006; 58: 591 - 620.

Feighner JP: Mechanism of action of antidepressant medications. *J Clin Psychiatry*. 1999; 60: 4 - 11.

Fenton, WS Hibbeln J & Knable M. Essential Fatty Acids, Lipid Membrane Abnormalities and Diagnosis and Treatment of Schizophrenia. *Biological Psychiatry*. 2000: 47: 8 - 21.

Feuerstein GZ. Platelet-activating factor: a case for its role in CNS function and brain injury. *J Lipid Mediat Cell Signal*. 1996;14 (1-3) : 109 - 14.

Flesch I, Schmidt B, Ferber E. Acyl chain specificity and kinetic properties of phospholipase A₁ and A₂ of bone marrow-derived macrophages. *Z Naturforsch [C]*. 1985; 40: 356–363. *Brain Res Bull*. 1999; 49(3): 139 - 53.

Forlenza OV. Influência de Mecanismos Colinérgicos nos Processos Neurodegenerativos Relacionados à Formação de Amiloide e Fosforilação da Proteína Tau. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, 2000.

Forlenza OV, Schaeffer EL, Gattaz WF. Phospholipase A₂ activity in rat embryonic brain and in primary cultures of cortical neurons. *J Neural Transm*. 2002; 109: 623 - 631.

Forlenza OV, Schaeffer EL, Gattaz WF. The role of phospholipase A₂ in neuronal homeostasis and memory formation: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *J Neural Transm*. 2006; 114 (2): 231 – 8.

Frazer A. Norepinephrine involvement in antidepressant action. *J Clin Psychiatry*. 2000; 61: 25 - 30.

Fuentes L, Pérez R, Nieto ML, Balsinde J, and Balboa MA. Bromoenol lactone promotes cell death by a mechanism involving phosphatidate phosphohydrolase-1 rather than calcium-independent phospholipase A₂. *J Biol Chem* 2003; 278: 44683 - 44690.

Fujimoto T, Molinoff P, Winokur A. A Neuroleptic Pharmac In Biological Bases of Brain and Disease. *Raven Press Ed.*, New York. 1994; 446 - 456.

Fujita S, Ikegaya Y, Nishiyama N, Matsuki N. Ca⁺²-independent phospholipase A₂ inhibitor impairs spatial memory of mice. *Jpn J Pharmacol* 2000; 83: 277 - 278.

Fukuzato H, Takeuchi K, Ueyama K, Fukuzaco T, Hokazono Y, Hirakawa K, Yamada K, Hashiguchi T, Takigawa M, Fujimoto T. ³¹P magnetic resonance spectroscopy of the medial temporal lobe of schizophrenic patients with neuroleptic-resistant marked positive symptoms. *Eur Psychiatry Clin Neurosc.* 1994; 244: 236 - 247.

Gattaz WF, Kollisch M, Nevalainen TJ, Thuren T, Kinnunen PKJ Increased plasma phospholipase-A₂ activity in schizophrenia: reduction after neuroleptic therapy. *Biol Psychiatry*.1987; 22: 421 - 426.

Gattaz WF, Hubner CK, Nevalainen TJ, Thuren T, Kinnunen PKJ Increased serum phospholipase-A₂ activity in schizophrenia: a replication study. *Biol Psychiatry*. 1990; 28: 495 - 501.

Gattaz WF, Schmitt A, Maras AM Increased platelet phospholipase A₂ activity in schizophrenia. *Schizophr Res.* 1995a; 16: 1 - 6.

Gattaz WF, Maras A, Cairns NJ, Levy R, Förstl H: Decreased phospholipase A₂ activity in Alzheimer brains. *Biol Psychiatry*. 1995b; 37: 13 - 17.

Gattaz WF, Brunner J. Phospholipase A₂ and the hypofrontality hypothesis of schizophrenia. *Prostaglandins Leuko Essent fatty Acids.* 1996; 55 (1-2): 109 - 113.

Geddis MS, Tornieri K, Giesecke A, Rehder V. PLA₂ and secondary metabolites of arachidonic acid control filopodial behaviour in neuronal growth cones. *Cell Motil Cytoskeleton.* 2004; 57: 53 - 67.

Gijón MA, Leslie CC. Regulation of arachidonic acid release and cytosolic phospholipase A₂ activation. *J Leukoc Biol.* 1999; 65 (3) : 330-6.

Giulian D. Microglia and diseases of the nervous system *Curr Neurol.* 1992; 12: 23 - 27.

Glen AI, Glen EM, Horrobin DF, Vaddadi KS, Spellman M, Morse-Fisher N, Ellis K, Skinner FS. A red cell membrane abnormality in a subgroup of

schizophrenic patients: evidence for two diseases. *Schizophr Res.* 1994; 12: 53 - 61.

Glynn P. Neuropathy target esterase. *Bioche J.* 1999; (Pt 3) 344: 625 - 631.

Glynn P. Neuropathy target esterase and phospholipid deacylation. *Biochim et Biophys Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids.* 2005; 1736: 87 - 93.

Gould TD, Manji HK: Signaling networks in the pathophysiology and treatment of mood disorders. *J Psychosom Res.* 2002; 53: 687 - 697.

Gronich JH, Bonventre JV, Nemenoff RA. Purification of a high-molecular-mass form of phospholipase A₂ from rat kidney activated at physiological calcium concentrations. *Biochem J.* 1990; 271: 37 - 43.

Gronich J, Konieczkowski M, Gelb MH, Nemenoff RA, Sedor JR Interleukin-1 causes rapid activation of cytosolic phospholipase A₂ by phosphorylation in rat mesangial cells. *J Clin Invest.* 1994; 93: 1224 - 1233.

Hasin DS, Goodwin RD, Stinson FS, Grant BF: Epidemiology of major depressive disorder: results from the National Epidemiologic Survey on Alcoholism and Related Conditions. *Arch Gen Psychiatry.* 2005; 62: 1097 - 1106.

Hattori M, Adachi H, Aoki J, Tsujimoto M, Arai H, Inoue K. Cloning and expression of a cDNA encoding the beta-subunit (30-kDa subunit) of bovine rain platelet-activating factor acetylhydrolase. *J Biol Chem.* 1995; 270: 31345 - 31352.

Hazen LS, Zupan LR, Weiss RH, Getman DP, Gross RW. Suicide Inhibition of Canine Myocardial Cytosolic Calcium-independent Phospholipase A₂. *J Biological Chemistry.* 1991; 266: 7227 - 32

Hefner Y, Borsch-Haubold AG, Murakami M, Wilde JI, Pasquet S, Schieltz D, Ghomashchi F, Yates JR III, Armstrong CG, Paterson A., Cohen P, Fukunaga R, Hunter T, Kudo I, Watson SP, Gelb MH. Serine 727 phosphorylation and activation of cytosolic phospholipase A₂ by MNK1-related protein kinases. *J. Biol. Chem.* 2000; 275(48): 37542 - 5.

Hibbeln JR, Salem N Jr: Dietary polyunsaturated fatty acids and depression: When cholesterol does not satisfy. *Am J Clin Nutr.* 1995; 62: 1 - 9.

Hibbeln JR, Palmer JW, Davis JM. Are disturbances in lipid-protein interactions by phospholipase A₂ a predisposing factor in affective illness. *Biol Psychiatry* 1999; 25: 945 - 961.

Hirabayashi T, Shimizu K. Localization and regulation of cytosolic phospholipase A₂. *Biochimica et Biophysica Acta.* 2000; 1488: 124 - 138.

Hiraoka M, Abe A, Shayman JA. Cloning and characterization of a lysosomal phospholipase A₂, 1-O-acylceramide synthase. *J Biol Chem*. 2002; 277: 10009 - 9.

Horrobin DF, Manku MS. Clinical biochemistry of essential fatty acids. In: Horrobin DF, ed. Omega-6 essential fatty acids, pathophysiology and roles in clinical medicine. New York: Wiley-Liss, 1990: 21 - 53.

Horrobin DF, Mankus MS, Hilman H, Lain A, Glen M. Fatty acid levels in the brain of schizophrenics and normal controls. *Biol Psychiatry*. 1991; 30: 795 - 830.

Horrobin DF. Nutritional and medical importance of gamma-linolenic acid. *Prog Lipid Res*. 1992a; 31:163 - 194.

Horrobin DF, Glen AIM, Vaddadi K. The membrane hypothesis of schizophrenia. *Schizophr Res*. 1994; 13: 195 - 207.

Horrobin DF. The membrane phospholipid hypothesis as a biochemical basis for the neurodevelopmental concept of schizophrenia. *Schizophr Res*. 1998a; 30(3): 193 - 208.

Horrobin DF. Schizophrenia: the illness that made us human. *Med Hypotheses*. 1998b; 50: 269 - 288.

Horrobin DF. Lipid metabolism, human evolution and schizophrenia. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 1999; 60 (5-6) :431-7.

Horrobin DF, Bennett CN. New gene targets related to schizophrenia and other psychiatric disorders: enzymes, binding proteins and transport proteins involved in phospholipid and fatty acid metabolism. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 1999; 60 (3) : 141-67.

Horrobin DF, Bennett CN. Phospholipid Metabolism and the Pathophysiology of Psychiatry and Neurological Disorders in Peet M, Glen I, Horrobin DF *Phospholipid Spectrum Disorders in Psychiatry and Neurology*. 2^a ed. Lancashire UK: Marius Press; 2003.

Hudson CJ, Kennedy JL, Gotowiec A, Lin A, King N, Gojtan K, Maciardi F, Skorecki K, Meltzer HY, Warsh JJ, Horrobin DF. Genetic variant near cytosolic phospholipase A₂ associated with schizophrenia. *Schizophr Res*. 1996; 21(2): 111 - 116.

Ikemoto A, Kobayashi T, Watanabe S, Okuyama H. Membrane fatty acid modifications of PC12 cells by arachidonate or docosahexaenoate affect neurite outgrowth but not norepinephrine release. *Neurochem Res.* 1997; 22(6): 671 - 678.

Ishizaki J, Hanasaki K, Higashino K, Kishino J, Kikuchi N, Ohara O, Arita H. Molecular cloning of pancreatic group I phospholipase A₂ receptor. *J. Biol. Chem.* 1994; 269: 5897 - 5904.

Ishizaki J, Suzuki N, Higashino K, Yokota Y, Ono T, Kawamoto K., Fujii N, Arita H, Hanasaki K. Cloning and characterization of novel mouse and human secretory phospholipase A₂s. *J Biol Chem.* 1999; 274: 24973 - 24979.

Jardim LSA. Efeitos da atividade da fosfolipase A₂ nos receptores dopaminérgicos: implicações para a esquizofrenia. [tese de doutorado]. São Paulo, SP: Universidade de São Paulo. 2005.

Jain MK, Berg OG. Coupling of the i-face and the active site of phospholipase A₂ for interfacial activation *Curr Opin Chem Biol.* 2006; 10: 473 – 79.

Jenkins CM, Han X, Mancuso DJ, Gross RW, Identification of calcium-independent phospholipase A₂ (iPLA₂) beta, and not iPLA₂ gamma, as the mediator of arginine vasopressin-induced arachidonic acid release in A-10 smooth muscle cells. Enantioselective mechanism-based discrimination of mammalian iPLA₂s. *J. Biol. Chem.* 2002; 27: 32807 - 32814.

Jones CR, Arai T, Bell JM, Rapoport SI. Preferential in vivo incorporation of [3H] arachidonic acid from blood in rat brain synaptosomal fractions before and after cholinergic stimulation. *J Neurochem.* 1996; 67(2): 822 - 9.

Juhl K, Efanov AM, Olsen HL, Gromada J. Secretory phospholipase A₂ is released from pancreatic beta-cells and stimulates insulin secretion via inhibition of ATP-dependent K⁺ channels. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003; 310: 274 - 279.

Juurlink B H J. Wolfgang Walz. Neuromethods, vol.33: Cell Neurobiology Techniques .Eds: A. A. Boulton, G. B. Baker, and A. N. Bateson. *Human Press Inc.* 1985.

Kajiwarra K, Nagawawa H, Shimizu-Nishikawa S, Ookuri T, Kimura M, Sugaya E. Molecular characterization of seizure-related genes isolated by differential screening. *Biochem Biophys Res Commun.* 1996; 219 (3) : 795 - 9.

Karasawa K, Harada A, Satoh N, Inoue K, Setaka M. Plasma platelet activating factor-acetylhydrolase (PAF-AH). *Prog Lipid Res.* 2003; 42: 93 - 114.

Keshavan MS, Sanders RD, Pettergrew JW, Dombrowsky SM & Panchalingam KS. Frontal lobe metabolism and cerebral morphology in schizophrenia. ³¹ P MRS and MRI studies. *Schizophr Research.* 1993; 10: 241 - 246.

Kim EJ, Kwon KJ, Park JY, Lee SH, Moon CH, Baik EJ. Neuroprotective effects of prostaglandin E₂ or cAMP against microglial and neuronal free radical mediated toxicity associated with inflammation. *J Neuros Res.* 2002; 70: 97 - 107.

Kini RM. Structure–function relationships and mechanism of anticoagulant phospholipase A₂ enzymes from snake venoms. *Toxicon.* 2005; 45: 1147 - 1161.

Koduri RS, Gronroos JO, Laine VJ, Le Calvez C, Lambeau G, Nevalainen TJ, Gelb MH. Bactericidal properties of human and murine groups I, II, V, X, and XII secreted phospholipases A₂. *J Biol Chem.* 2002; 277: 5849 – 5857.

Kolko M, Chistofferrsten NR, Barreiro SB, Miller ML, Pizza AJ, Bazan NG. Characterization and Localization of secretory Phospholipase A₂ Groups IIE, V and X in the Rat Brain. *J Neur Res.* 2006; (83): 874 - 882.

Kramer RM, Roberts EF, Manetta J, Putnam JE. The Ca²⁺-sensitive cytosolic phospholipase A₂ is a 100-kDa protein in human monoblast U937 cells. *J Biol Chem.* 1991; 266(8): 5268 - 72.

Kramer RM, Roberts EF, Strieler BA, Johnstone EM. Thrombin induces activation of p38 MAP kinase in human platelets. *J Biol Chem.* 1995; 270(46): 27395 - 8.

Kramer RM, Stephenson DT, Roberts EF, Clemens JA. Cytosolic phospholipase A₂ (cPLA₂) and lipid mediator release in the brain. *J Lipid Mediat Cell Signal.* 1996; 14(1–3): 3 – 7.

Kramer RM, Sharp JD, Lett FEBS. Structure, function and regulation of Ca²⁺-sensitive cytosolic phospholipase A₂ (cPLA₂). *FEBS Lett.* 1997; 410(1): 49 - 53. Review.

Kriem B, Sponne I, Fifre A, Malaplate-Armand C, Lozac'h-Pillot K, Koziel V, Yen-Potin FT, Bihain B, Oster T, Olivier JL. Cytosolic phospholipase A₂ mediates neuronal apoptosis induced by soluble oligomers of the amyloid-peptide. *FASEB J.* 2005; 19: 85 - 87.

Krieger H, Morton NE, Mi MP, Azevedo E, Freire-Maia A, Yasuda N. Racial admixture in North-Eastern Brazil. *Ann Hum Genet* 1965; 29: 113 - 125.

Kudo I, Murakami M, Hara S & Inoue K. Mammalian non-pancreatic phospholipases A₂. *Biochim Biophys Acta*. 1993; 170: 217 - 231.

Kudo I, Murakami M. Phospholipase A₂ enzymes. *Prostaglandins & others Lipid Mediators*. 2002; 68-69: 3 - 58.

Kuwata H., Nakatani Y., Murakami M., and Kudo I. Cytosolic phospholipase A₂ is required for cytokine-induced expression of type IIA secretory phospholipase A₂ that mediates optimal cyclooxygenase-2-dependent delayed prostaglandin E₂ generation in rat 3Y1 fibroblasts. *J Biol Chem*. 1998; 273 (3): 1733 - 40.

Lambeau GA, Gelb MH. Biochemistry and Physiology of Mammalian Secreted Phospholipase A₂. *Annu Rev.Biochem*. 2008; 77: 495 - 520.

Lands WE. and Crawford CG. 1979. Enzymes of membrane phospholipids metabolism in animals. *In The Enzymes of Biological Membranes*. A. Martonosi, editor, Vol 2. Plenum Press, New York, NY.3 - 85.

Larsson PK, Claesson HE, Kennedy BP. Multiple splice variants of the human calcium-independent phospholipase A₂ and their effect on enzyme activity. *J Biol Che*. 1998; 273 (1): 207 - 214.

Lehninger AL, Nelson DL, Cox MC (2002) *in Lehninger Principles of Biochemistry*.3 ed.p: 189-207.WH Freedman and Company, New York.

Leslie CC, Voelker DR, Channon JY, Wall MM, Zelarney PT. Properties and purification of an arachidonoyl-hydrolyzing phospholipase A₂ from a macrophage cell line, RAW 264.7. *Biochim Biophys Acta*. 1988; 963 (3): 476 - 92.

Leslie CC, Channon JY. Anionic phospholipids stimulate an arachidonoyl-hydrolyzing phospholipase A₂ from macrophages and reduce the calcium requirement for activity. *Biochim Biophys Acta*. 1990; 1045: 261 - 270.

Lin L-L, Wartmann M, Lin AY, Knopf JL, Seth A, Davis RJ. cPLA₂ is phosphorylated and activated by MAP kinase. *Cell*. 1993; 72 (2): 269 - 78.

Lin TN, Wang Q, Simonyi A, Chen JJ, Cheung WM, He YY, et al. Induction of secretory phospholipase A₂ in reactive astrocytes in response to transient focal cerebral ischemia in the rat brain. *J Neurochem*. 2004; 90 (3): 637 - 45.

Lio YC, Dennis EA. Interfacial activation, lysophospholipase and transacylase activity of group VI Ca²⁺-independent phospholipase A₂. *Biochim Biophys Acta*. 1998; 1393: 320 - 332.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951; 193: 265 - 275.

Lukiw WJ, Bazan NG. Neuroinflammatory signaling upregulation in Alzheimer's disease. *Neurochem Res*. 2000; 25 (9-10) : 1173 - 84.

Ma Z, Ramanadham S, Wohltmann M, Bohrer A, Hsu FF, J. Turk J. Studies of insulin secretory responses and of arachidonic acid incorporation into phospholipids of stably transfected insulinoma cells that overexpress Group VIA phospholipase A₂ (iPLA₂ beta) indicate a signaling rather than a housekeeping role for iPLA₂ beta. *J Biol Chem*. 2001; 276: 13198 - 13208.

Maes M, Christophe A, Delanghe J, Altamura C, Neels H, Meltzer HY: Lowered omega3 polyunsaturated fatty acids in serum phospholipids and cholesteryl esters of depressed patients. *Psychiatry Res* 1999; 85: 275 - 291.

Mancuso DJ, Jenkins CM, Gross RW. The genomic organization complete mRNA sequence, cloning, and expression of a novel human intracellular membrane-associated calcium independent phospholipase A₂. *J Biol Chem*. 2000; 275 (14): 9937 - 45.

Manguikian DA, Barbour SE, Cell cycle dependence of group VIA calcium-independent phospholipase A₂ activity. *J Biol Chem*. 2004; 279: 52881 - 52892.

Manya H, Aoki J, Watanabe M, Adachi T, Asou H, Inoue Y, Arai H, Inoue K, Switching of platelet-activating factor acetylhydrolase catalytic subunits in developing rat brain. *J Biol Chem*. 1998; 273: 18567 – 18572.

Martinez J, Moreno JJ. Role of Ca²⁺-independent phospholipase A₂ on arachidonic acid release induced by reactive oxygen species. *Arch Biochem Biophys*. 2001; 392: 257 - 262.

Masato Mashimo M, Tetsuya Hirabayashi T, Toshihiko Murayama T, and Takao Shimizu T. Cytosolic PLA₂ activation in Purkinje neurons and its role in AMPA-receptor trafficking. *J Cell Sci*. 2008; 121, 10 - 1242.

Matsuzawa A, Hattori K, Aoki J, Arai H, Inoue K. Protection against oxidative stress-induced cell death by intracellular platelet activating factor-cetylhydrolase II. *J. Biol. Chem*. 1997; 272: 32315 - 32320.

Mendes CT. Modulação da atividade da fosfolipase A₂ em neurônios primários em cultura. [dissertação de mestrado]. São Paulo, SP. Universidade de São Paulo. 2004.

Mendes CT, Gattaz WF, Schaeffer EL, Forlenza, OV. Modulation of phospholipase A₂ activity in primary cultures of rat cortical neurons. *Journal of Neural Transmission*. 2005; 112: 197 - 1308.

Moran JM, Buller RML, McHowat J, Turk J, Wohltmann M, Gross RW, Corbett JA. Genetic and pharmacologic evidence that calcium independent phospholipase A₂ beta regulates virus-induced inducible nitric-oxide synthase expression by macrophages. *J Biol Chem*. 2005; 280: 28162 – 28168.

Morin FO, Takamura Y, Tamiya E: Investigating neuronal activity with planar microelectrode arrays: achievements and new perspectives. *J Biosci Bioeng*. 2005; 100: 131 - 143.

Morris NR, Nuclear migration. From fungi to the mammalian brain. *J Cell Biol*. 2000; 148: 1097 - 1101.

Mosior M, Six DA, Dennis EA. Group IV cytosolic phospholipase A₂ binds with high affinity and specificity to phosphatidylinositol 4,5 biphosphate resulting in dramatic increases in activity. *J Biol Chem*. 1998; 273: 2184 - 2191.

Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983; 65 (1–2) : 55 – 63.

Martinoia S, Bove M, Carlini G, Ciccarelli C, Grattarola M, Storment C, Kovacs G. A general-purpose system for long-term recording from a microelectrode array coupled to excitable cells. *J Neurosci Methods*. 1993; 48: 115 - 121.

Mounier CM, Bon C, Kini RM. Anticoagulant venom and mammalian secreted phospholipases A₂: protein- versus phospholipid-dependent mechanism of action. *Haemostasis*. 2001; 31: 279 - 287.

Murakami M, Kudo I, Inoue K. Molecular nature of phospholipases A₂ involved in prostaglandin I₂ synthesis in human umbilical vein endothelial cells. Possible participation of cytosolic and extracellular type II phospholipases A₂. *J Biol Chem*. 1993; 268 (2): 839 - 44.

Murakami M, Kudo I, Inoue K. Secretory Phospholipase A₂. *J Lipid Mediators* 1995; 12: 119 - 130.

Murakami M, Shimbara S, Kambe T, Kuwata H, Winstead MV, Tischfield JA, Kudo I. The Functions of Five Distinct Mammalian Phospholipase A₂s in Regulating Arachidonic Acid Release. 1998; 23: 14411 - 14423.

Murakami M, Kambe T, Shimbara S, Kudo, I. Functional coupling between various phospholipase A₂s and cyclooxygenases in immediate and delayed prostanoid biosynthetic pathways. *J Biol Chem*. 1999; 274: 3103 - 3115.

Murakami M, Masuda S, Ueda-Semmyo K, Yoda E, Kuwata H, Takanezawa Y, Aoki J, Arai H, Sumimoto H, Ishikawa Y, Ishii T, Nakatani Y, Kudo I. Group VIB Ca^{2+} -independent phospholipase A_2 gamma promotes cellular membrane hydrolysis and prostaglandin production in a manner distinct from other intracellular phospholipases A_2 . *J Biol Chem*. 2005; 280: 14028 - 14041.

Muralikrishna Adibhatla R, Hatcher JF. Phospholipase A_2 , reactive oxygen species, and lipid peroxidation in cerebral ischemia. *Free Radic Biol Med*. 2006; 40(3): 376 - 87.

Muthalif MM, Hefner Y, Canaan S, Harper J, Zhou H, Parmentier J.-H, Aebersold R, Gelb MH, and Malik KU. Functional interaction of calcium-/calmodulin-dependent protein kinase II and cytosolic phospholipase A_2 . *J Biol Chem*. 2001; 276, 39653 - 39660.

Myers CS, Contreras MA, Chang CCJ, Rapoport SI, Appel NM. Haloperidol downregulates phospholipase A_2 signaling in rat basal ganglia circuits. *Brain Res*. 2001; 896: 96 - 101.

Nakamura S. Effects of phospholipase A_2 inhibitors on the antidepressant-induced axonal regeneration of noradrenergic locus coeruleus neurons. *Microsc Res Tech*. 1994; 29 (3): 204-10.

Nalefski EA, Sultzman LA, Martin DM, Kriz RW, Towler PS, Knopf JL, Clark JD. Delineation of two functionally distinct domains of cytosolic phospholipase A_2 , a regulatory Ca^{2+} -dependent lipid-binding domain and a Ca^{2+} -independent catalytic domain. *J Biol Chem*. 1994; 269 (27) : 18239-49.

Nardicchi V, Macchioni L, Ferrini M, Goracci G. The presence of a secretory phospholipase A_2 in the nuclei of neuronal and glial cells of rat brain cortex. *Bioch et Biophys Acta*. 2007; 1345 - 1352.

Nemenoff RA, Winitz S, Qian N-X, Van Putten V, Johnson GL, Heasley LE. Phosphorylation and activation of a high molecular weight form of phospholipase A_2 by p42 microtubule-associated protein 2 kinase and protein kinase C. *Biol Chem*. 1993; 268 (3): 1960 - 4.

Ohto T, Uozumi N, Hirabayashi T, Shimizu T. Identification of novel cytosolic phospholipase A_2 s, murine cPLA $_2$ delta, epsilon, and zeta, which form a gene cluster with cPLA $_2$ beta. *J Biol Chem*. 2005; 280: 24576 - 24583.

Pangerl AM, Stleude A, Jaroni HW, Rüfer R, Gattaz WF. Increased platelet membrane lysophosphocoline in schizophrenia. *Biol Psychiatry*. 1991; 30: 837 - 840.

Peet M, Murphy B, Shay J, Horrobin DF. Depletion of omega-3 fatty acid levels in red blood cell membranes of depressive patients. *Biol Psychiatry*. 1998; 43: 315 - 319.

Peet M (1999). New strategies for the treatment of schizophrenia: omega-3 polyunsaturated fatty acids. In: Peet M, Glen I, Horrobin DF (eds) *Phospholipid spectrum disorder in psychiatry*. Marius Press, Carnforth, UK, pp 189 – 194.

Perez R, Melero R, Balboa MA, Balsinde J. Role of Group VIA calcium-independent phospholipase A₂ in arachidonic acid release, phospholipid fatty acid incorporation, and apoptosis in U937 cells responding to hydrogen peroxide. *J Biol Chem*. 2004; 279: 40385 - 40391.

Perez R, Matabosch X, Llebaria A, Balboa MA, Balsinde J. Blockade of arachidonic acid incorporation into phospholipids induces apoptosis in U937 promonocytic cells. *J Lipid Res*. 2006; 47: 484 - 491.

Perisic O, Fong S, Lynch DE, Bycroft M, Williams RL. Crystal structure of a calcium-phospholipid binding domain from cytosolic phospholipase A₂. *J Biol Chem*. 1998; 273(3): 1596 - 604.

Petegrew JW, Keshavan MS, Minshew NJ. ³¹P nuclear magnetic resonance spectroscopy: Neurodevelopment and schizophrenia. *Schizophr Bull*. 1993; 19: 35 - 53.

Peters-Golden M, McNish RW. Redistribution of 5-lipoxygenase and cytosolic phospholipase A₂ to the nuclear fraction upon macrophage activation. *Biochem. Biophys Res Commun*. 1993; 196 (1): 147 - 53.

Peterson B, Knotts T, Cummings BS. Involvement of Ca⁺²-independent phospholipase isoforms in oxidant-induced neuronal cell death. *NeuroToxicology*. 2006; 28: 150 – 160.

Phillis JW and O'Regan MH. A potentially critical role of phospholipases in central nervous system ischemic, traumatic, and neurodegenerative disorders. *Brain Res Rev*. 2004; 44: 13 - 47.

Pfeilschifter J, Schalkwijk C, Briner VA, and van den Bosch H. Cytokine-stimulated secretion of group II phospholipase A₂ by rat mesangial cells. Its contribution to arachidonic acid release and prostaglandin synthesis by cultured rat glomerular cells. *J Clin Invest*. 1993; 92 (5): 2516 - 23.

Piomelli D. Arachidonic acid in cell signaling. *Curr Opin Cell Biol*. 1993; 5 (2) : 274-80.

Piomelli D. The challenge of brain lipidomics. *Prostaglandins & other Lipid Mediators*. 2005; 77: 23 - 24.

Pickard RT, Striffler BA, Kramer RM, Sharp JD. Molecular cloning of two new human paralogs of 85-kDa cytosolic phospholipase A_2 . *J Biol Chem*. 1999; 274: 8823 - 8831.

Polgar J, Kramer RM, Um SL, Jakubowski JA., and Clemetson KJ. Human group II 14 kDa phospholipase A_2 activates human platelets. *Biochem J*. 1997; 327, 259 - 265.

Potter SM. Distributed processing in cultured neuronal networks. *Progress in Brain Research*. 2001; 130: 49 - 62.

Potter SM, DeMarse TB: A new approach to neural cell culture for long-term studies. *J Neurosci Methods*. 2001; 110(I-2): 17 - 24.

Qiu Z-H, Leslie CC. Protein kinase C-dependent and -independent pathways of mitogen-activated protein kinase activation in macrophages by stimuli that activate phospholipase A_2 . *J Biol Chem*. 1994; 269 (30): 19480 - 7.

Radogna F, Sestili P, Martinelli C, Paolillo M, Paternoster L, Albertini MC, Accorsi A, Gualandi G, Ghibelli L. Lipoxygenase-mediated pro-radical effect of melatonin via stimulation of arachidonic acid metabolism. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2009; 238 (2): 170 – 177.

Rao JS, Ertley RN, DeMar JC, Jr., Rapoport SI, Bazinet RP, Lee HJ. Dietary n-3 PUFA deprivation alters expression of enzymes of the arachidonic and docosahexaenoic acid cascades in rat frontal cortex. *Mol Psychiatry*. 2007; 12: 151 - 157.

Rapoport SI, Bosetti F. Do lithium and anticonvulsants target the brain arachidonic acid cascade in bipolar disorder? *Arch Gen Psychiatry*. 2002; 59: 592 - 596.

Reddy ST, Winstead MV, Tischfield JA, Herschman HR. Analysis of the secretory phospholipase A_2 that mediates prostaglandin production in mast cells. *J Bio. Chem*. 1997; 272: 13591 – 13596.

Resolução – RE nº 899 de 29 de maio de 2003. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Determina a publicação do guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Diário Oficial da União, 2003. 2 jun. Disponível em <http://e-legis.bvs.br/leisref/public/home.php>

Rickard A, Portel C, Kell PJ, Vinson SM, McHowat J. Protease-activated receptor stimulation activates a Ca^{2+} -independent phospholipase A_2 in bladder microvascular endothelial cells. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2005; 288: F714 - F721.

Riendeau D, Guay J, Weech PK, Laliberte' F, Yergey J, Li C, Desmarais S, Perrier H, Liu S, Nicoll-Griffith D, et al. Arachidonyl trifluoromethyl ketone, a potent inhibitor of 85-kDa phospholipase A₂, blocks production of arachidonate and 12-hydroxyeicosatetraenoic acid by calcium ionophore-challenged platelets. *J Biochem*. 1994; 269: 15619 - 15624.

Rintala J, Seemann R, Chandrasekaran K, Rosenberger TA, Chang L, Contreras MA, Contreras MA, Rapoport SI, Chang MC. 85 kDa cytosolic phospholipase A₂ is a target for chronic lithium in rat brain. *Neuroreport*. 1999; 10 (18): 3887-90.

Roshak AK, Capper EA, Stevenson C, Eichman C, Marshall LA. Human calcium-independent phospholipase A₂ mediates lymphocyte proliferation. *J Biol Chem*. 2000; 275: 35692 - 35698.

Ross BM, Hudson C, Erlich J, Warsh JJ, Kish SJ. Increased phospholipid breakdown in schizophrenia. Evidence for the involvement of a calcium-independent phospholipase A₂. *Arch Gen Psychiatry*. 1997; 54 (5) :487-94.

Rotrosen J, Wolkin A. Phospholipid and prostaglandin hypotheses of schizophrenia. In: Meltzer HY(ed). *Psychopharmacology: the third generation of Progress*. Raven Press. 1987; New York, pp 759 - 764.

Ruaro ME, Bonifazi P, Torre V. Toward the neurocomputer: Image processing and pattern recognition with neuronal cultures. *IEEE Trans Biomed Eng*. 2005; 52(3): 371 - 383

Sackeim HA. Central issues regarding the mechanism of action of electroconvulsive therapy: directions for future research. *Psychopharm Bull*. 1994; 30: 281 - 308.

Salem NJr, Litman B, Kim HY, Gawrisch K. Mechanisms of action of docosahexaenoic acid in the nervous system. *Lipids*. 2001; 36: 945 - 959.

Satake Y, Diaz BL, Balestrieri B, Lam BK, Kanaoka Y, Grusby MJ, Arm JP. Role of Group V phospholipase A₂ in zymosan-induced eicosanoid generation and vascular permeability revealed by targeted gene disruption. *J Biol Chem*. 2004; 279: 16488 - 16494.

Sawada H, Murakami M, Enomoto A, Shimbara S, Kudo, I. Regulation of type V phospholipase A₂ expression and function by proinflammatory stimuli. *Eur J Biochem*. 1999; 263(3): 826 - 35.

Schaeffer EL. A inibição da atividade da fosfolipase A₂ no hipocampo de ratos prejudica a formação da memória de curta e de longa duração: implicações para a doença de Alzheimer. [tese de doutorado] - Universidade de São Paulo. São Paulo, 2004.

Schaeffer EL, Gattaz WF. Inhibition of calcium-independent phospholipase A₂ activity in rat hippocampus impairs acquisition of short- and long-term memory. *Psychopharm.* 2005; 181 (2): 392 - 400.

Schaeffer EL, Bassi F Jr, Gattaz WF. Inhibition of phospholipase A₂ activity reduces membrane fluidity in rat hippocampus. *J Neural Transm.* 2005 May;112(5): 641-7.

Schaeffer EL, Forlenza OV, Gattaz WF. Cholinergic and glutamatergic alterations beginning at the early stages of Alzheimer disease: participation of the phospholipase A₂ enzyme. *Psychopharm.* 2008; (1): 1 - 27.

Schaloske RH, Dennis EA. The phospholipase A₂ superfamily and its group numbering system. *Biochim Biophys. Acta.* 2006; 1761: 1246 - 59.

Seegers HC, Gross RW, Boyle WA. Calcium-independent phospholipase 2-derived arachidonic acid is essential for endothelium-dependent relaxation by acetylcholine. *J Pharmacol Exp Ther.* 2002; 302: 918 - 923.

Seilhamer JJ, Plant S, Pruzanski W, Schilling J, Stefanski E, Vadas P, Johnson LK. Multiple forms of phospholipase A₂ in arthritic synovial fluid J *Biochem.* 1989;106(1): 38-42.

Shahaf G, Marom S. Learning in networks of cortical neurons. *J Neurosci.* 2001; 21(22): 8782 - 8788.

Shanker G and Aschner M. Methylmercury-induced reactive oxygen species formation in neonatal cerebral astrocytic cultures is attenuated by antioxidants. *Mol Brain Res.* 2003; 110: 85 - 91.

Sharp JD, White DL, Chiou XG., Goodson T., Gamboa GC, McClure D., Burgett S, Hoskins J, Skatrud PL, Sportsman JR, Becker GW, Kang, LH, Roberts EF, and Kramer RM. Molecular cloning and expression of human Ca⁽²⁺⁾-sensitive cytosolic phospholipase A₂. *J Biol Chem.* 1991; 266 (23): 14850 - 3.

Sharp JD, White DL. Cytosolic PLA₂: mRNA levels and potential for transcriptional regulation. *J Lipid Mediat.* 1993; 8(3): 183 - 9.

Shelat PB, Chalimoniuk M, Wang JH, Strosnajer, Lee JC, Sun AY, Simonyi A, Sun GY. Amyloid beta peptide and NMDA induce ROS from NAPH oxidase and AA release from cytosolic phospholipase A₂ in cortical neurons. *J Neurochim.* 2008; 106: 45 - 55.

Simonato M. A pathogenetic hypothesis of temporal lobe epilepsy. *Pharmacol Res.* 1993; 27 (3): 217-25.

Smalheiser NR, Dissanayake S, Kapil A. Rapid regulation of neurite outgrowth and retraction by phospholipase A₂-derived arachidonic acid and its metabolites. *Brain Res.* 1996; 721 (1-2): 39-48.

Smesny S, Kinder D, Willhardt I, Rosburg T, Lasch J, Berger G, Sauer H. Increased calcium-independent phospholipase A₂ activity in first but not multiepisode chronic schizophrenia. *Biol Psychiatry.* 2005; 57: 399 - 405.

Smith T, McCracken J, Shin YK, DeWitt D. Arachidonic acid and nonsteroidal anti-inflammatory drugs induce conformational changes in the human prostaglandin endoperoxide H₂ synthase-2 (cyclooxygenase-2). *J Biol Chem.* 2000; 275 (51): 40407 - 15.

Song C, Chang XJ, Bean KM, Proia MS, Knopf JL, Kriz RW. Molecular characterization of cytosolic phospholipase A₂-beta. *J Biol Chem.* 1999; 274: 17063 - 17067.

Song C, Zhang XY, Manku M. Increased phospholipase A₂ activity and inflammatory response but decreased nerve growth factor expression in the olfactory bulbectomized rat model of depression: effects of chronic ethyl-eicosapentaenoate treatment. *J Neurosci.* 2009; 29(1):14 - 22.

Song H, Ramanadham S, Bao S, Hsu F, Turk J. A bromoenol-lactone suicide substrate inactive group VIA phospholipase A₂ by generating a diffusible bromomethyl keto acid that alkylates cysteine thiols. *Biochemistry.* 2006; 45: 1061 - 73.

St-Gelais F, Menard C, Congar P, Trudeau LE, Massicotte G. Postsynaptic injection of calcium-independent phospholipase A₂ inhibitors selectively increases AMPA receptor-mediated synaptic transmission. *Hippocampus.* 2004; 14: 319 - 325.

Street IP, Lin HK, Laliberte F, Ghomashchi F, Wang Z, Perrier H, Tremblay NM, Huang Z, Weech PK, Gelb MH. Slow and tight-binding inhibitors of the 85-kDa human phospholipase A₂. *Biochemistry.* 1993; 32: 5935 - 5940.

Suga H, Murakami M, Kudo I, Inoue K. Participation in cellular prostaglandin synthesis of type II phospholipase A₂ secreted and anchored on cell-surface heparin sulfate proteoglycan. *Eur J Biochem.* 1993; 218, 807 - 813.

Sung GY and MacQuarrie RA. Deacylation-reacylation of arachidonoyl groups in cerebral phospholipids. *Annu. N.Y. Acad. Sci USA.* 1989; 559: 37 - 55.

Sung GY and Horrocks LA. The acyl and alk-1-enyl groups of the major phosphoglycerides from brain myelin and mouse brain microsomal, mitochondrial and myelin fractions. *Lipids.* 1970; 5: 1006 - 1012.

Sung GY, Xu J, Jensen MD, Simonyi A. Phospholipase A₂ in the central nervous system: implications for neurodegenerative diseases. *J Lipid Res.* 2004; 45: 205 - 213.

Tada K, Murakami M, Kambe T, and Kudo I. Induction of cyclooxygenase-2 by secretory phospholipases A₂ in nerve growth factor-stimulated rat serosal mast cells is facilitated by interaction with fibroblasts and mediated by a mechanism independent of their enzymatic functions. *J Immunol.* 1998; 161: 5008 - 5015.

Tandon R, Belmaker RH, Gattaz WF, Lopez-Ibor JJ Jr, Okasha A, Singh B, Stein DJ, Olie JP, Fleischhacker WW, Moeller HJ; Section of Pharmacopsychiatry, World Psychiatric Association. World Psychiatric Association Pharmacopsychiatry Section statement on comparative effectiveness of antipsychotics in the treatment of schizophrenia. *Schizophr Res.* 2008; 100 (1-3) : 20-38.

Takayama K, Kudo I, Kim DK, Nagata K, Nozawa Y, Inoue K. Purification and characterization of human platelet phospholipase A₂ which preferentially hydrolyzes an arachidonoyl residue. *FEBS Lett.* 1999; 282 (2): 326 - 30.

Taketo MM, Sonoshita M. Phospholipase A₂ and apoptosis. *Biochimica et Biophysica Acta.* 2002; 1585: 72 - 76.

Talib LL, Yassuda MS, Diniz BS, Forlenza OV, Gattaz WF Cognitive training increases platelet PLA₂ activity in healthy elderly subjects *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2008; 78 (4-5): 265-9.

Tang J, Kriz RW, Wolfman N, Shaffer M, Seehra J, Jones SS. A novel cytosolic calcium-independent phospholipase A₂ contains eight ankyrin motifs. *J Biol. Chem.* 1997; 272: 8567 - 8575.

Tavares H, Yacubian J, Talib LL, Barbosa NR, Gattaz WF. Increased phospholipase A₂ activity in schizophrenia with absent response to niacin. *Schizophr Res* 2003; 61: 1 - 6.

Taylor C, Fricker AD, Devi LA, Gomes I. Mechanisms of action of antidepressants: from neurotransmitter systems to signaling pathways. *Cell Signal.* 2005; 17: 549 - 557.

Tedesco E, Rigoni M, Caccin P, Grishin E, Rossetto O, Montecucco C. Calcium overload in nerve terminals of cultured neurons intoxicated by alpha-latrotoxin and snake PLA₂ neurotoxins. *Toxicon.* 2009; 54(2): 138 - 44.

Tischfield JA. A reassessment of the low molecular weight phospholipase A₂ gene family in mammals. *J Biol Chem.* 1997; 272 (28): 17247 - 50.

Trimble LA, Street IP, Perrier H, Tremblay NM, Weech PK, and Bernstein MA. NMR structural studies of the tight complex between a trifluoromethyl ketone inhibitor and the 85-kDa human phospholipase A₂. *Biochemistry*. 1993; 32: 12560 - 12565.

Trzeciak HI, Kalancinski W, Mlecki A, Kokot D. Effect of neuroleptics on phospholipase A₂ activity in the brain of rats. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*. 1995; 245 (3): 179 – 182.

Underwood KW, Song C, Kriz RW, Chang XJ, Knopf JL, Lin L.-L. A novel calcium-independent phospholipase A₂, cPLA₂-g that is prenylated and contains homology to cPLA₂. *J Biol Chem*. 1998; 273: 21926 - 21932.

Undie AS, Weinstock J, Sarau HM, Friedman E. Evidence for a distinct D1-like dopamine receptor that couples to activation of phosphoinositide metabolism in brain. *J Neurochem*. 1994, 62: 2045 - 2048.

Van Pelt J, Corner MA, Wolters PS, Rutten WLC, Ramakers GJA. Long-term stability and developmental changes in spontaneous network burst firing patterns in dissociated rat cerebral cortex cell cultures on multielectrode arrays. *Neurosci Lett*. 2004; 361(I-3): 86 - 89.

Verger R, Mieras, MCE, de Haas, GH. Action of phospholipase A at interfaces. *J Biol Chem*. 1973; 248 (11): 4023 - 34.

Vial D, Piomelli D. Dopamine D2 receptors potentiate arachidonate release via activation of cytosolic, arachidonate-specific phospholipase A₂. *J Neurochem*. 1995; 64(6): 2765 - 72.

Visioli F, Rodriguez de Turco EB, Kreisman NR, Bazan NG. Membrane lipid degradation is related to interictal cortical activity in a series of seizures. *Metab Brain Dis*. 1994; 9: 161 - 170.

Xu GY, McDonagh T, Yu HA, Nalefski EA, Clark JD, Cumming DA, Solution structure and membrane interactions of the C2 domain of cytosolic phospholipase A₂. *J Mol Biol*. 1998; 280: 485 - 500.

Xu J, Weng YI, Simonyi A, Krugh BW, Liao Z, Weisman GA, et al. Role of PKC and MAPK in cytosolic PLA₂ phosphorylation and arachadonic acid release in primary murine astrocytes. *J Neurochem*. 2002; 83 (2): 259 - 70.

Zainaghi IA. Fosfolipase A₂, fluidez de membrana e proteína precursora do amilóide em plaquetas na Doença de Alzheimer e Comprometimento Cognitivo Leve. [tese de doutorado]. São Paulo, SP: Universidade de São Paulo. 2006.

Zalewski A, Macphee C. Role of lipoprotein-associated phospholipase A₂ in atherosclerosis: biology, epidemiology, and possible therapeutic target, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005; 25: 923 - 931.

Waite A M (1987) *The Phospholipases*, Plenum Press, New York. 1-332

Waslick BD, Kandel R, Kakouros A: Depression in children and adolescents: an overview. In *The many faces of depression in children and adolescents* Edited by: Shaffer D and Waslick BD. Washington DC, American Psychiatric Publishing, Inc.; 2002: 1 - 29.

Williams EJ, Walsh FS, Doherty P. The production of arachidonic acid can account for calcium channel activation in the second messenger pathway underlying neurite outgrowth stimulated by NCAM, N-cadherin, and L1. *J Neurochem*. 1994; 62(3): 1231 – 1234.

Williamson P, Drost D, Stanley J, Carr T, Morrison S, Merskey H. Localized phosphorus 31 magnetic resonance spectroscopy in chronic schizophrenic patients and normal controls. *Arch Gen Psychiatry*. 1991; 48: 578.

Wijkander J, Sundler R. Macrophage arachidonic-mobilizing phospholipase A₂: role of Ca⁺² for membrane binding not for catalytic activity. *Eur J Biochem*. 1991; 202: 873 - 880.

Wolf MJ, Izumi Y, Zorumski CF, Gross RW. Long-term potentiation requires activation of calcium-independent phospholipase A₂. *FEBS Lett*. 1995; 377: 358 - 362.

Wolf MJ, Wang J, Turk J, Gross RW. Depletion of intracellular calcium stores activates smooth muscle cell calcium-independent phospholipase A₂. A novel mechanism underlying arachidonic acid mobilization. *J Biol Chem*. 1997; 272(3): 1522 - 6.

Yakubian J, de Casto CC, Ometto M, Barbosa E, de Camargo CP, Tavares H, Cerri GG, Gattaz WF. 31P-spectroscopy of frontal lobe in schizophrenia: alterations in phospholipid and high-energy phosphate metabolism. *Schizophr Res*. 2002; 58 (2-3): 117 - 22.

Yang TTC, Ung PMU, Rincón M, and Chow C. Role of the CCAAT/Enhancer-binding Protein NFATc2 Transcription Factor Cascade in the Induction of Secretory Phospholipase A₂. *J Biol Chem*. 1999a; 281: 11541 - 11552.

Yang HC, Mosior M, Johnson CA, Chen Y, Dennis EA. Group-specific assays that distinguish between the four major types of mammalian phospholipase A₂. *Anal Biochem* 1999b; 269 (2): 278 - 88.

Yegin A, Akbas SH, Ozben T, Korgun DK. Secretory phospholipase A₂ and phospholipids in neural membranes in an experimental epilepsy model. *Acta Neurol Scand*. 2002; 106 (5) : 258-62.

Yellaturu CR, Rao GN. A requirement for calcium-independent phospholipase A₂ in thrombin-induced arachidonic acid release and growth in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem*. 2003; 278: 43831 – 43837.

Yoshihara Y, Watanabe Y. Translocation of phospholipase A₂ from cytosol to membranes in rat brain induced by calcium ions. *Biochem Biophys Res Commun*. 1990; 170(2): 484 – 490.