

Leda Leme Talib

Desenvolvimento de métodos para  
determinação da atividade das frações da  
fosfolipase A<sub>2</sub> em plaquetas

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

Área de Concentração: **Psiquiatria**

Orientação: **Prof. Dr. Wagner Farid Gattaz**

São Paulo  
2006

Este trabalho é dedicado à minha Mãe,  
ao meu marido Jerry e aos meus filhos,  
Pedro Augusto e Mariah, com todo o  
meu amor!

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus pela presença constante e por todo amparo concedido

Ao Prof. Dr. Wagner F. Gattaz, meu orientador, por todo seu apoio e incentivo durante todos estes anos de trabalho.

À minha família, pela paciência, compreensão e amor que sempre me dedicaram. Aos meus filhos por cada minuto da minha participação nas suas vidas, cedido à minha pesquisa e estudos. Meus queridos, muito obrigado!!

À Colega de trabalho e amiga Eliza pela disposição com que me ajudou na realização dos experimentos radioenzimáticos.

Aos colegas do Laboratório de Neurociências, principalmente à equipe da Neuroquímica: Evelin, Nadia, Eliza, Karisa, Girlene, Edivani, Sandra e Carolina, à todas muito obrigado!

As minhas queridas amigas Isis e Zelinda, pelo ombro amigo nos momentos difíceis, sempre com uma palavra de apoio e por todos os momentos felizes e descontraídos!

À Evelin, por todas as discussões pertinentes ao estudo e pela ajuda na elaboração do manuscrito ;

À Dr<sup>a</sup> Kete Dualib. Valente, pelo apoio nas coletas de amostras dos pacientes epiléticos, alvo inicial deste estudo.

À FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), pelo financiamento do projeto Temático “Metabolismo dos Fosfolípidos nas Doenças Neuropsiquiátricas”, no qual este trabalho está inserido.

***“Tenho em mim todos os sonhos do mundo”***

Fernando Pessoa

## NORMALIZAÇÃO ADOTADA

Esta dissertação está de acordo com

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals 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. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 2ª ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

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

# SUMÁRIO

|   |    |
|---|----|
| Lista de Figuras  |    |
| Lista de Tabelas  |    |
| Resumo  |    |
| Summary   |    |
| 1. INTRODUÇÃO.....  | 01 |
| 1.1. Fosfolípides.....  | 03 |
| 1.2. Fosfolipase A <sub>2</sub> .....                                 | 07 |
| 1.2.1. Classificação das fosfolipase A <sub>2</sub> .....             | 08 |
| 1.2.2. Inibidores das fosfolipase A <sub>2</sub> .....                | 19 |
| 1.3. Fosfolipase A <sub>2</sub> e desordens psiquiátricas.....        | 24 |
| 1.3.1. Esquizofrenia.....   | 24 |
| 1.3.2. Epilepsia.....   | 26 |
| 1.3.3. Doença de Alzheimer.....                                       | 27 |
| 1.3.4. Depressão e Transtorno Bipolar.....                            | 30 |
| 1.4. O uso de plaquetas como modelo periférico de neurônio.....       | 32 |
| 2. OBJETIVO GERAL.....  | 34 |
| 2.1. Objetivos específicos.....                                       | 34 |
| 3. MÉTODOS.....   | 35 |
| 3.1. Coleta das amostras.....   | 35 |
| 3.2. Separação e lavagem das plaquetas.....                           | 36 |
| 3.3. Determinação de proteínas.....                                   | 37 |
| 3.4. Determinação da atividade da PLA <sub>2</sub> .....              | 39 |
| 3.4.1. Ensaio radioenzimático.....                                    | 40 |
| 3.4.2. Ensaios de otimização da atividade da PLA <sub>2</sub> .....   | 42 |
| 3.4.3. Caracterização das diferentes formas de PLA <sub>2</sub> ..... | 43 |
| 4. RESULTADOS.....  | 44 |

|   |    |
|---|----|
| Otimização do método para determinação da atividade da PLA <sub>2</sub> em plaquetas..... | 44 |
| Determinação da concentração de proteína.....   | 44 |
| Determinação da concentração de substrato.....  | 46 |
| Ensaio para determinação ideal de Cálcio.....   | 47 |
| Estudos de inibição da PLA <sub>2</sub> em plaquetas.....                                 | 50 |
| Ensaio para verificar eficiência e especificidade do MAFP em plaquetas.....               | 50 |
| Eficiência e especificidade do bromoenolactone (BEL) em plaquetas..                       | 54 |
| Otimização do método para determinar atividade da PLA <sub>2</sub> GVI em plaquetas.....  | 57 |
| DISCUSSÃO.....  | 60 |
| CONCLUSÕES.....   | 70 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....   | 71 |



## LISTA DE FIGURAS

|                   |  |    |
|-------------------|--|----|
| <b>Figura 1-</b>  | Representação de membrana biológica.....   | 02 |
| <b>Figura 2-</b>  | Esquema de fosfolípides.....   | 06 |
| <b>Figura 3-</b>  | Fosfolipase A2 humana de líquido sinovial.....   | 10 |
| <b>Figura 4-</b>  | Estrutura da cPLA <sub>2</sub> .....   | 15 |
| <b>Figura 5-</b>  | Representação da estrutura interna de plaquetas.....   | 33 |
| <b>Figura 6-</b>  | Ativação das plaquetas com os prolongamentos de membrana.....  | 33 |
| <b>Figura 7-</b>  | Mecanismo de formação de vesículas lípidicas – Lipossomas.....   | 40 |
| <b>Figura 8-</b>  | Curva da atividade da PLA <sub>2</sub> em função da concentração de proteínas.....                               | 45 |
| <b>Figura 9-</b>  | Curva de atividade da PLA <sub>2</sub> em relação à concentração do substrato.....                               | 47 |
| <b>Figura 10-</b> | Curva da atividade da PLA <sub>2</sub> com relação à concentração de cálcio.....                                 | 49 |
| <b>Figura 11-</b> | Curva da atividade da PLA <sub>2</sub> em relação à concentração de EDTA.....                                    | 50 |
| <b>Figura 12-</b> | Curva de inibição da atividade da PLA <sub>2</sub> com MAFP.....   | 52 |
| <b>Figura 13-</b> | Curva de Cálcio com e sem o inibidor MAFP.....   | 53 |
| <b>Figura-14</b>  | Porcentagem de inibição da atividade da PLA <sub>2</sub> com MAFP  | 53 |
| <b>Figura 15-</b> | Inibição da atividade das PLA <sub>2</sub> dependentes de cálcio frente ao MAFP em solução de metil acetato..... | 54 |

|                   |   |    |
|-------------------|---|----|
| <b>Figura 16-</b> | Atividade da PLA <sub>2</sub> em diferentes concentrações de Cálcio na presença e na ausência de BEL..... | 55 |
| <b>Figura 17-</b> | Curva de inibição com BEL.....  | 56 |
| <b>Figura 18-</b> | Atividade da PLA <sub>2</sub> frente aos dois substratos.....   | 58 |
| <b>Figura 19-</b> | inibição da PLA <sub>2</sub> GVI frente ao MAFP, utilizando o substrato PC-palmitoyl.....                 | 59 |
| <b>Figura 20-</b> | inibição da PLA <sub>2</sub> GVI frente ao BEL, utilizando o substrato PC-palmitoyl.....                  | 59 |
| <b>Figura 21-</b> | Estrutura química do MAFP.....  | 65 |
| <b>Figura 22-</b> | Estrutura química do <i>Bromoenol Lactone</i> (BEL).....  | 67 |

## LISTA DE TABELAS

|   |    |
|---|----|
| <b>Tabela 1:</b> Propriedades enzimáticas da PLA <sub>2</sub> expressas em humanos....                  | 23 |
| <b>Tabela 2:</b> Atividade média da PLA <sub>2</sub> (pMol.mg/min.) em relação à proteína.....          | 45 |
| <b>Tabela 3:</b> Atividade média da PLA <sub>2</sub> (pMol.mg/min) em relação ao substrato.....         | 46 |
| <b>Tabela 4:</b> Atividade média da PLA <sub>2</sub> com diferentes concentrações de cálcio e EDTA..... | 48 |
| <b>Tabela 5:</b> Atividade média da PLA <sub>2</sub> com diferentes concentrações de EDTA.....          | 49 |
| <b>Tabela 6:</b> Inibição da PLA <sub>2</sub> com MAFP.....   | 52 |
| <b>Tabela 7:</b> Média das atividades da PLA <sub>2</sub> na presença e na ausência de BEL.....         | 55 |
| <b>Tabela 8:</b> Dados comparativos da Atividade da PLA <sub>2</sub> frente a dois substratos.....      | 58 |

## RESUMO

Talib, LL. ***Desenvolvimento de métodos para determinação da atividade das frações da fosfolipase A<sub>2</sub> em plaquetas*** [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2006. 81p.

A fosfolipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) é uma enzima chave no metabolismo dos fosfolípidos de membrana e é um dos principais componentes envolvidos na sinalização celular. Alterações da atividade da PLA<sub>2</sub> tem sido descritas no cérebro e no sangue (soro, plasma e plaquetas) de pacientes com diversas doenças neuropsiquiátricas. Neste estudo foi desenvolvido um ensaio radioenzimático para detectar em plaquetas, a atividade dos três principais grupos de PLA<sub>2</sub>, que são PLA<sub>2</sub> secretórias ou PLA<sub>2</sub> extracelular dependente de Ca<sup>2+</sup> (sPLA<sub>2</sub>); PLA<sub>2</sub> citosólicas dependentes de Ca<sup>2+</sup> (cPLA<sub>2</sub>) e as PLA<sub>2</sub> intracelulares independentes de Ca<sup>2+</sup> (iPLA<sub>2</sub>). Para confirmar a presença desses grupos da enzima em plaquetas, algumas variáveis foram testadas, como as diferenças de preferência ao ácido graxo como substrato, o requerimento de cálcio e a inibição seletiva com os inibidores *Bromo enol lactone* (BEL) e o *Methyl Arachidonyl Fluorophosphonate* (MAFP). Os resultados obtidos demonstram a presença dos três principais grupos de PLA<sub>2</sub> (sPLA<sub>2</sub>, cPLA<sub>2</sub>, and iPLA<sub>2</sub>) em plaquetas. Estes achados sugerem o uso de plaquetas, uma amostra biológica de fácil acesso, como possível modelo periférico de neurônios para o estudo do metabolismo de fosfolípidos.

Descritores: 1.FOSFOLIPASE A 2.FOSFOLIPÍDEOS/metabolismo  
3 PLAQUETAS 4. RADIOIMUNOENSAIO/métodos

## SUMMARY

Talib, LL. ***Development of methods to access phospholipase A<sub>2</sub> fraction activity in platelets*** [dissertation], São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2006. 81p

Phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) is a key-enzyme in the metabolism of membrane phospholipids and is one of the major components involved in cell signaling. Alterations of PLA<sub>2</sub> activity have been reported in brains and blood cells in several neuropsychiatric diseases. In this study we developed a radio-enzymatic assay to detect in platelets the activity of the three main groups of PLA<sub>2</sub>, which are secretory PLA<sub>2</sub> or extracellular calcium dependent PLA<sub>2</sub> (sPLA<sub>2</sub>), cytosolic calcium dependent PLA<sub>2</sub> (cPLA<sub>2</sub>) and intracellular calcium independent PLA<sub>2</sub> (iPLA<sub>2</sub>). To confirm the presence of these PLA<sub>2</sub> groups some variables were tested, such as differences in the preferred fatty acid substrate, calcium dependence, and selective inhibition with Bromoenol lactone (BEL) and Methyl Arachidonyl Fluorophosphonate (MAFP). Our findings demonstrate the presence of the three main groups of PLA<sub>2</sub> (sPLA<sub>2</sub>, cPLA<sub>2</sub>, and iPLA<sub>2</sub>) in platelets. In addition, this study is in line with others suggesting that platelets, a typical biological sample, can be used as a peripheral model for neurons.

Keywords: 1.PHOSPHOLIPASE A 2.PHOSPHOLIPIDS/metabolism  
3.BLOOD PLATELETS 4.RADIOIMMUNOASSAY/methods

# 1 INTRODUÇÃO

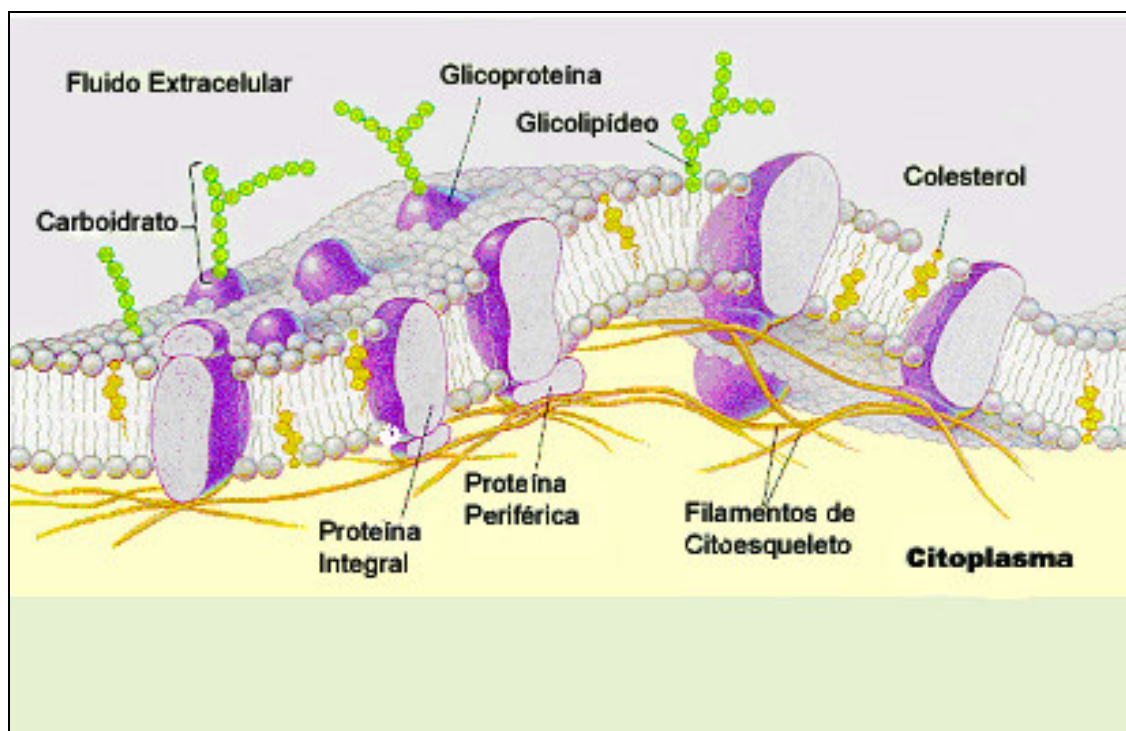
A função e a plasticidade do cérebro são profundamente influenciadas pelas propriedades fisicoquímicas dos fosfolípides. A membrana neuronal, como todas as membranas celulares, é formada por uma dupla camada lipídica (fig 1). Um dos aspectos críticos da participação dos fosfolípides na função neuronal é a sua habilidade em modificar as respostas funcionais dos canais iônicos, funções sinápticas e as cascatas de sinalização celular. Assim, alterações no tipo, natureza e organização dos fosfolípides em membranas celulares específicas podem ocasionar modificações das funções das células em determinadas situações fisiológicas, ou seja, alterações na homeostase lipídica são fatores importantes para o início e progressão de muitas doenças (Gross et al.,2005).

Os fosfolípides de membrana participam de diversas funções fisiológicas, tais como: 1) composição de barreiras para difusão de íons e metabólitos, facilitando as funções eletrofisiológicas através da manutenção de potencial de membrana apropriado; 2) inserção de complexos protéicos, mediadores de transmissão de sinais elétricos e químicos, por exemplo, canais iônicos, sinapses e receptores e 3) funciona como reservatório de segundo mensageiros lipídicos de transdução de sinais (Gross et al.,2005).

A análise das alterações na composição, conteúdo, variação espacial e vias metabólicas dos lípides nas células são importantes áreas de

investigação, as quais tem permitido descobrir novas funções dos lípides em processos degenerativos, e tem-se tornado conhecido como Lipidômica (Gross et al. 2005; Peterson e Cummings, 2006; Piomelli , 2005).

Lipidômica compreende a identificação e quantificação dos lípides constituintes dos compartimentos e/ou subcompartimentos celulares, suas mudanças frente a perturbações celulares e o estudo das interações lípides-lípides e lípides-proteínas que participam dos processos fisiológicos e patofisiológicos. (Gross et al.,2005). Neste contexto, um dos pontos de fundamental importância é o estudo dos grupos de fosfolipases  $A_2$  presente no cérebro, já que estas enzimas são responsáveis por algumas das vias mais importantes no metabolismo dos fosfolípides.



**Figura 1** Representação de membrana biológica - [www.people.virginia.edu](http://www.people.virginia.edu)

## 1.1- Fosfolípidos

Os fosfolípidos e moléculas relacionadas compreendem 60% da porção não aquosa do cérebro e em uma proporção até maior dos dendritos e sinapses; são os maiores constituintes das membranas de células neuronais e glias, das membranas de vesículas sinápticas, do retículo endoplasmático nuclear, das membranas das mitocôndrias e do complexo de Golgi. Os fosfolípidos são essenciais para todas as células vivas e, portanto, mudanças no seu metabolismo podem influenciar um organismo (Horrobin, 2003).

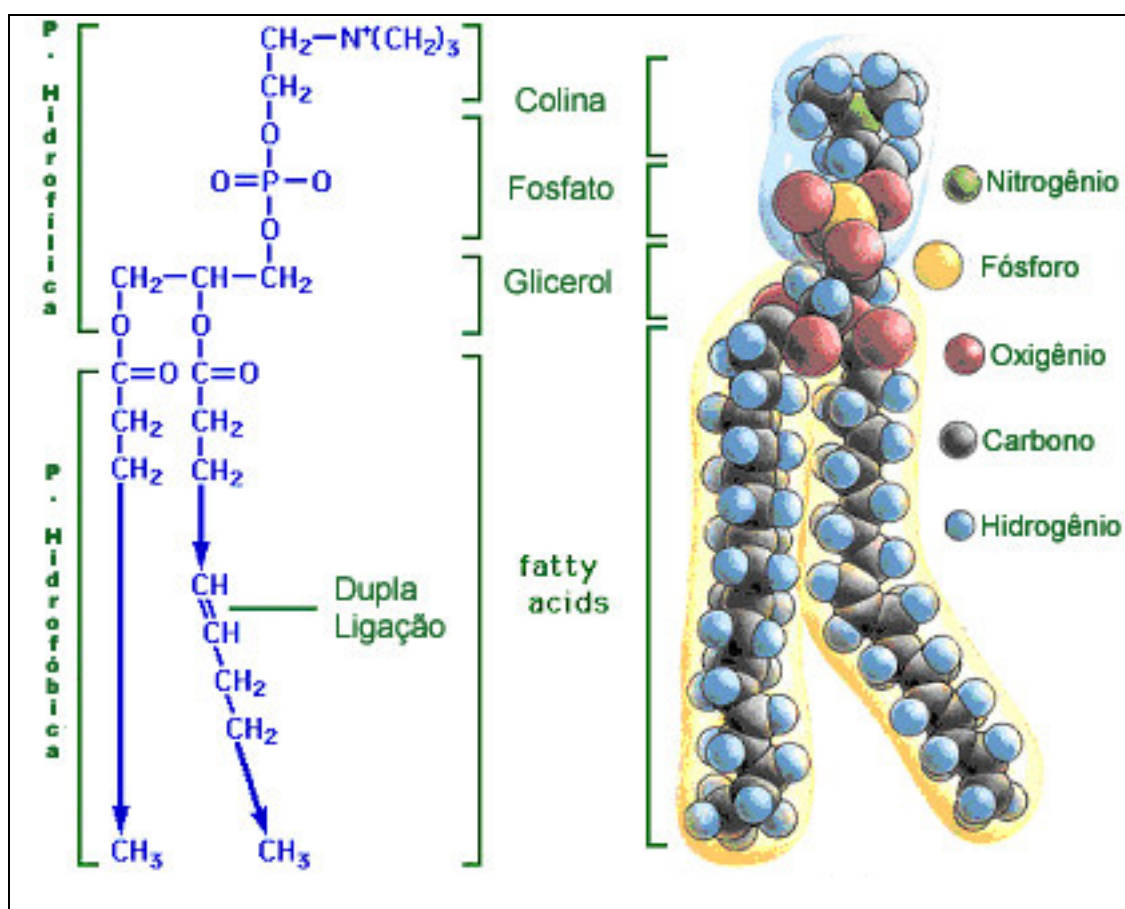
Esses compostos contêm uma molécula de glicerol como componente básico ao qual um grupo fosfato ( $\text{PO}_4$ ) é esterificado no carbono  $\alpha$  (*sn-3*), e dois ácidos graxos são esterificados nos dois átomos de carbono remanescentes (posições *sn-1* e *sn-2*). O glicerol e o  $\text{PO}_4$ , que é ligado a uma base (etanolamina, colina, serina, inositol) ou a um átomo de hidrogênio (ácido fosfatídico), formam a cabeça polar (hidrofílica), e os ácidos graxos esterificados formam a cauda apolar (hidrofóbica) dos glicerofosfolípidos ou fosfolípidos (fig 2). Essa característica anfifílica dos fosfolípidos, é que os induz a permanecerem juntos formando uma bicamada, com a porção hidrofóbica voltada para o interior da membrana e a porção hidrofílica para a camada externa (Fenton et al., 2000; Peterson e Cummings, 2006; Horrobin, 2003).



As principais bases ligadas ao grupo fosfato (PO<sub>4</sub>) são colina, etanolamina, serina, e inositol, formando os fosfolípides denominados fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilserina (PS) e fosfatidilinositol (PI), respectivamente. A fosfatidilcolina, em sua grande maioria, age como componente estrutural na porção exterior da membrana, uma pequena parte, originada da conversão da PE através de metilação, é que fornece os ácidos graxos que estão envolvidos com a transdução de sinal. As PEs são ricas em ácidos graxos insaturados o que lhes permite conferir a membrana maior fluidez e flexibilidade. Fosfatidilserina é normalmente encontrada na porção interna das membranas, somente em caso de dano celular, em particular, apoptose, ela pode inverter essa posição. Fosfatidilinositol é um componente particularmente importante nos mecanismos de transdução de sinal (Horrobin, 2003; Piomelli, 2005).

Os ácidos graxos podem ser de diferentes tipos dependendo do tamanho da cadeia de carbono, do número de duplas ligações, da posição dessas duplas ligações e da configuração dessas duplas ligações (*cis* ou *trans*). De uma maneira geral, ácidos graxos com maior número de duplas ligações (insaturados) conferem aos fosfolípides propriedades de angulação, flexibilidade e mobilidade. Normalmente, o ácido graxo ligado à posição *sn-1* é saturado e à posição *sn-2* insaturado, com uma ou mais duplas ligações. O grau de insaturação dessas moléculas determina o arranjo espacial bem como a fluidez da membrana (Horrobin, 2003).

Os ácidos graxos insaturados são distribuídos em duas séries: ômega-3 (n-3) e ômega-6 (n-6), sendo que o número indica a posição da dupla ligação. Esses ácidos graxos são considerados Ácidos Graxos Essenciais (AGE) pois, não podem ser sintetizado e devem ser adquiridos através da dieta. Os principais AGE são o ácido linolêico e o ácido alfa linolênico, sendo que a partir deles pode-se derivar todos os demais AGE. Porém, essa conversão é muito lenta e não supre as necessidades do organismo. Aproximadamente 20% do peso do cérebro consiste de AGE, sendo o ácido araquidônico (AA) - série Omega-6 - e o ácido docosahexaenóico (DHA) - série Omega-3 - responsáveis pela maior parte, com pequena, porém importante contribuição do ácido adrênico (AdrA), ácido decosapentaenóico (DPA), ácido dihomogamalinolênico (DGLA) e ácido eicopentaenóico (EPA) (Fenton et al., 2000, Horrobin, 2003).



**Figura 2:** Esquema de fosfolípides. Fonte: [telstar.ote.cmu.edu/.../img/structures.jpg](http://telstar.ote.cmu.edu/.../img/structures.jpg)

O conteúdo específico dos ácidos graxos essenciais na membrana pode modificar o funcionamento neuronal e produzir efeitos clínicos através de dois mecanismos: (1) mudanças no conteúdo desses ácidos graxos alteram o micro-ambiente das membranas e, conseqüentemente, a estrutura e função de receptores, canais iônicos e enzimas; (2) os ácidos graxos essenciais contribuem para a regulação celular por atuar como uma fonte de precursores para segundos mensageiros na transdução de sinais intra e inter-celulares, o que aumenta sua relevância para a neurotransmissão (Agranoff et al., 1999; Fenton et al., 2000).

A síntese dos fosfolípidos se dá a partir da ligação dos ácidos graxos às moléculas de carbono do glicerol, pela ação dos sistemas enzimáticos da aciltransferase e da transacilase que, juntamente com as fosfolipases  $A_2$  ( $PLA_2$ ), são responsáveis pela remodelação dos fosfolípidos, processo que ocorre durante todo o tempo de vida da membrana celular e é crucial para a manutenção da homeostase celular (Horrobin et al., 1994).

## 1.2 Fosfolipase $A_2$

A fosfolipase  $A_2$  ( $PLA_2$ ) compreende uma superfamília de enzimas que catalisam a hidrólise da posição *sn-2* dos fosfolípidos de membranas celulares – plasmáticas e subcelulares, levando a produção de um ácido graxo livre e lisofosfolípidos. Esta reação é de particular importância se o ácido graxo esterificado for o ácido araquidônico que é precursor de eicosanóides (Fenton et al. 2000; Kudo e Murakami, 2002). Embora o ácido araquidônico possa ser liberado dos fosfolípidos por processos que não envolvam a  $PLA_2$ , em muitas células a  $PLA_2$  é o primeiro sistema enzimático que regula a sua liberação. Tanto o ácido araquidônico quanto as prostaglandinas que deles resultam, como os lisofosfolípidos liberados pela  $PLA_2$ , são importantes mediadores na transmissão e no processamento de sinais neuronais (Piomelli 1993; Bazan et al., 1993), através da modulação dos canais iônicos, atuando como segundos mensageiros, através da

expressão gênica, e da liberação e captação de neurotransmissores (Lautens et al., 1998).

### **1.2.1 Classificação das fosfolipase A2**

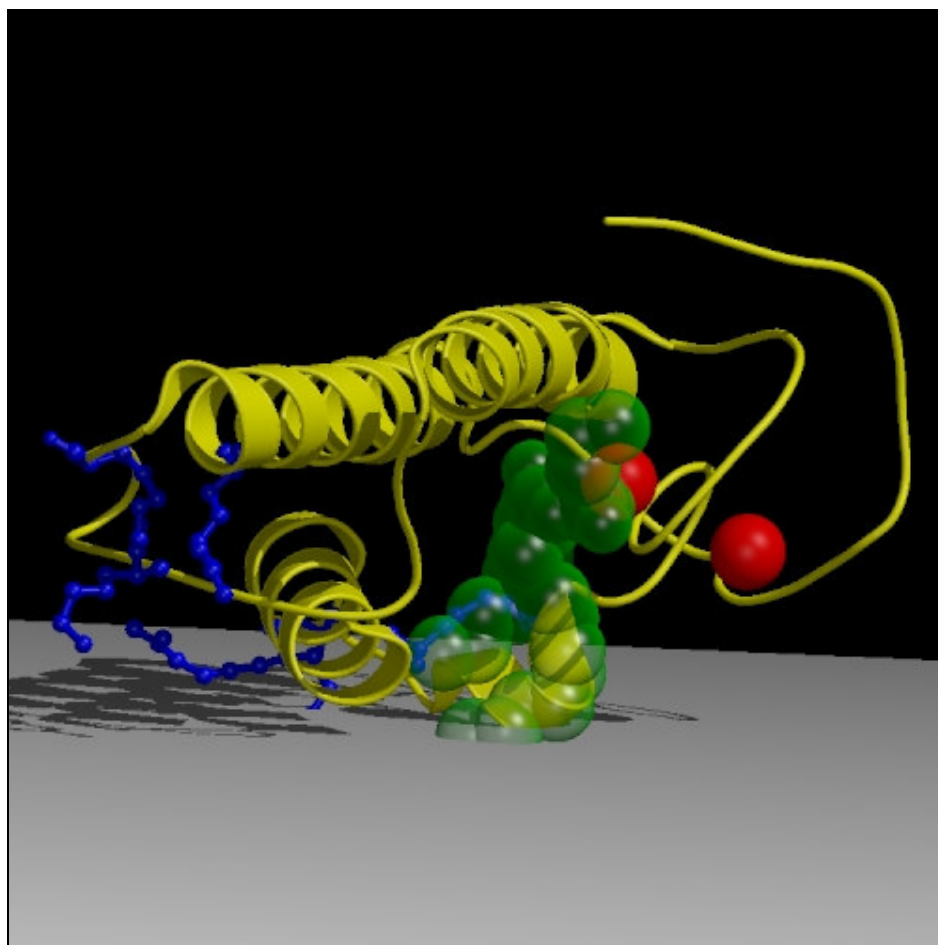
Cerca de vinte distintas PLA<sub>2</sub> de mamíferos foram identificadas e caracterizadas. Elas estão divididas em diversos grupos dependendo da sua estrutura, propriedade enzimática, localização e função celular: (Six e Dennis, 2000; Winstead et al., 2000; Kudo e Murakami, 2002; Chakraborti, 2003; Farooqui et al., 2004). Todavia, baseado nas propriedades biológicas, pode-se utilizar uma classificação simplificada dos três principais grupos: as PLA<sub>2</sub> secretórias ou PLA<sub>2</sub> extracelular dependente de Ca<sup>2+</sup> (sPLA<sub>2</sub>); PLA<sub>2</sub> citosólicas dependentes de Ca<sup>2+</sup> (cPLA<sub>2</sub>) e as PLA<sub>2</sub> intracelulares independentes de Ca<sup>2+</sup> (iPLA<sub>2</sub>). Existem ainda as PAF acetyl hidrolases e as PLA<sub>2</sub> Plasmalógeno seletivas. Todas serão descritas mais detalhadamente a seguir.

#### **a) PLA<sub>2</sub> extracelular dependente de Ca<sup>2+</sup>(sPLA<sub>2</sub>)**

Subdividida em diversos grupos: PLA<sub>2</sub>GIB, PLA<sub>2</sub>GIIA, PLA<sub>2</sub>GIID, PLA<sub>2</sub>GIIE e PLA<sub>2</sub>GIIF, PLA<sub>2</sub>GIII, PLA<sub>2</sub>GV, PLA<sub>2</sub>GX, PLA<sub>2</sub>GXII e PLA<sub>2</sub>GXIII.

As PLA<sub>2</sub> extracelulares ou secretadas são muito semelhantes. Essas enzimas são caracterizadas por baixo peso molecular (12 – 18 KDa), um domínio catalítico e um domínio fortemente ligado ao íon Ca<sup>2+</sup> (*cálcio loop*), requerimento de Ca<sup>2+</sup> em concentrações milimolares e por não apresentar nenhuma seletividade ao ácido graxo da posição *sn*-2. As sPLA<sub>2</sub> possuem ligações dissulfetos e um resíduo de histidina como grupo catalítico (figura 3). A hidrólise do substrato é precedida pela ativação e orientação de uma molécula de água através de uma ponte de hidrogênio com o sítio ativo histidina. Junto à histidina existe um resíduo de aspartato, que juntamente com o sítio de ligação ao cálcio retêm o íon. Membranas ricas em esfingomielina dificultam a penetração da sPLA<sub>2</sub>. A presença de fosfolípidos oxidáveis nas vesículas facilita a reação das sPLA<sub>2</sub>. Oxidação dos fosfolípidos altera o estado fisiológico das membranas o qual por sua vez afeta a suscetibilidade dos resíduos de ácidos graxos oxigenados e não oxigenados para o ataque da sPLA<sub>2</sub>. As sPLA<sub>2</sub> estão envolvidas em vários processos biológicos tais como modificação na geração de eicosanóides, inflamação e defesa do hospedeiro (Kudo e Murakami 2002).

No cérebro, as sPLA<sub>2</sub> estão presentes em todas as regiões, apresentando maior atividade na medula oblongata, hipocampo e córtex e menor atividade no tálamo e hipotálamo (Farooqui et al, 2004).



**Figura 3:** Fosfolipase A<sub>2</sub> humana de líquido sinovial. As esferas representam os íons Ca<sup>+2</sup>, os quais são requeridos para a atividade catalítica e para o aumento da integridade estrutural. A figura representa a orientação do domínio sobre interação com a membrana biológica (representada pelo plano). Representado em verde transparente estão os estados análogos da molécula lipídica sendo hidrolisadas no sítio catalítico. Os resíduos em azul representam mudanças de cargas positivas, as quais são importantes para a interação interfacial da enzima com a membrana biológica. Fonte [brahms.chem.uic.edu/figures/pla2\\_lig.jpg](http://brahms.chem.uic.edu/figures/pla2_lig.jpg)

**b) PLA<sub>2</sub> intracelular citosólica dependente de Ca<sup>2+</sup> (PLA<sub>2</sub> grupo IV, PLA<sub>2</sub>GIV ou cPLA<sub>2</sub>)**

Subdividida em três grupos: PLA<sub>2</sub>GIVA, PLA<sub>2</sub>GIVB e PLA<sub>2</sub>GIVC, com peso molecular de 85, 110 e 60 KDa, respectivamente. A PLA<sub>2</sub>GIVA é a melhor caracterizada até o momento. Essa PLA<sub>2</sub> consiste de dois domínios

funcionalmente distintos: (1) domínio de ligação a lípidos de membrana dependente de  $\text{Ca}^{2+}$  no terminal amino (N-terminal), ou domínio C2 (138 aminoácidos), contendo os resíduos de ligação de  $\text{Ca}^{2+}$  e de ligação a membranas; e (2) domínio catalítico independente de  $\text{Ca}^{2+}$  no terminal carboxil (C-terminal), contendo os resíduos do sítio ativo, representados na figura 4 (Nalefski et al., 1998). É a única  $\text{PLA}_2$  que mostra seletividade significativa para fosfolípidos que possuem ácido araquidônico na posição *sn-2*, sendo o grau de insaturação, a posição da dupla ligação e o tamanho da cadeia do ácido graxo na posição *sn-2* os responsáveis pela especificidade da enzima ao substrato. Concentrações micromolares de  $\text{Ca}^{2+}$  ativam a  $\text{PLA}_2\text{GIVA}$ , onde o íon permite o deslocamento da enzima até a vesícula de fosfolípide para a hidrólise interfacial (Kudo e Murakami, 2002). A  $\text{PLA}_2\text{GIVA}$ , por estar presente no citosol, precisa de algo que lhe dê acesso aos substratos fosfolipídicos, e é devido a isso que há a necessidade de íons  $\text{Ca}^{2+}$ . O aumento na concentração interna desses íons ocorre pela mobilização de  $\text{Ca}^{2+}$  armazenado internamente e ou pelo influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  do espaço extracelular via canais operados por voltagem ou por receptores (Hirabayashi e Shimizu, 2000). O domínio C2 isolado da  $\text{PLA}_2\text{GIVA}$  humana mostrou uma seletividade para a ligação às vesículas de fosfolípidos com cabeça polar com características hidrofóbicas (cabeça polar neutra), como fosfatidilcolina (PC) e fosfatidiletanolamina (PE) (Nalefski e Falke, 1996; Nalefski et al., 1998).

As  $\text{PLA}_2\text{GIVA}$  são expressas na maioria das células e tecidos, incluindo plaquetas. Sem dúvida, a  $\text{PLA}_2\text{GIVA}$  desempenha um papel



essencial na liberação do ácido araquidônico dos fosfolípides suprindo as cascatas das ciclo-oxigenases e das lipoxigenases para a produção de eicosanóides, além de regular a produção de mediadores derivados de lisofosfolípides como o fator ativador de plaquetas (PAF). Algumas linhas de pesquisa têm associado a PLA<sub>2</sub>GIVA com a regulação da apoptose, por mecanismos pouco conhecidos. Presumivelmente certos produtos da PLA<sub>2</sub>GIVA, como eicosanóides ou lisofosfolípides, devem secundariamente afetar a viabilidade celular e a sua proliferação (Kudo e Murakami 2002).

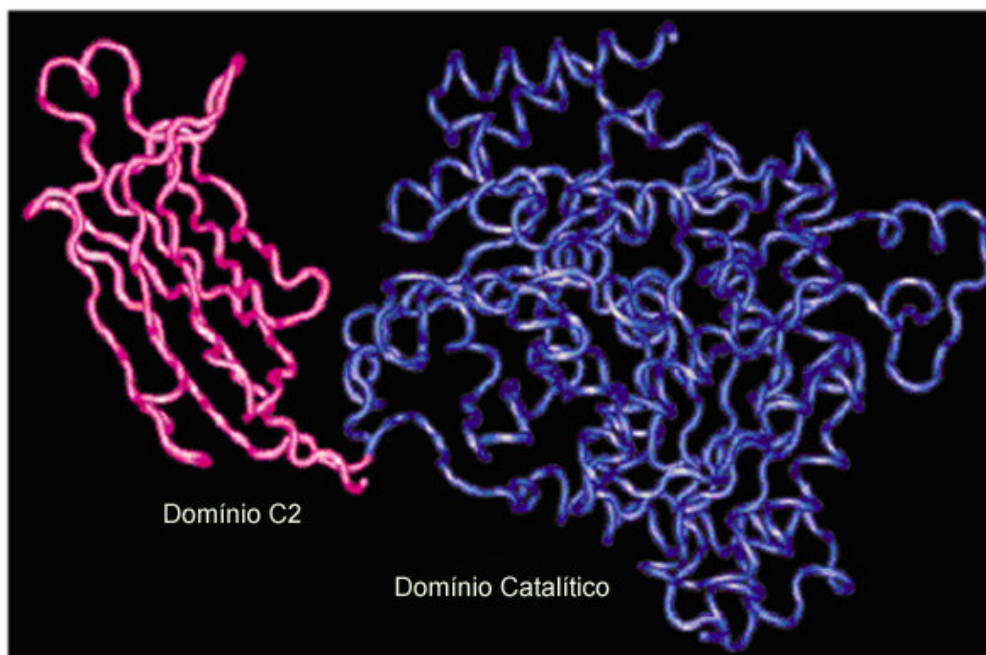
A PLA<sub>2</sub>GIVB também está localizada no citosol, porém, na presença de íons Ca<sup>2+</sup> desloca-se para as membranas. A liberação de ácido araquidônico do substrato *Phosphatidylcholine, L- $\alpha$ -1 palmitoyl-2-arachidonyl-[arachidonyl-1-<sup>14</sup>C]* (PC14C) pela PLA<sub>2</sub>GIVB foi estritamente dependente de Ca<sup>2+</sup>, uma vez que não foi detectada atividade da enzima na presença do quelante de Ca<sup>2+</sup>, etileno glicol-bis-(b-amino-etil éter) (EGTA) (Song et al., 1999). Adicionalmente, foi observada uma diminuição da atividade dessa PLA<sub>2</sub> de 5-10 vezes na presença de outro quelante de Ca<sup>2+</sup>, tetra acetato de etilenodiamina (EDTA), em relação à atividade observada na presença de Ca<sup>2+</sup> 1,0 mM (Pickard et al.,1999). Tomados em conjunto, os achados descritos sugerem que a PLA<sub>2</sub>GIVB pode responder a agonistas que mobilizam Ca<sup>2+</sup> de maneira similar à PLA<sub>2</sub>GIVA. A sensibilidade da PLA<sub>2</sub>GIVB ao Ca<sup>2+</sup> é provavelmente devida a uma região na sua seqüência de aminoácidos que possui uma semelhança ao domínio C2 da PLA<sub>2</sub>GIVA (Song et al.,1999).

A PLA<sub>2</sub>GIVC não contém o domínio C2 (Underwood et al., 1998; Pickard et al., 1999) o qual é importante para a ligação dependente de Ca<sup>2+</sup> da PLA<sub>2</sub>GIVA às membranas (Nalefski et al., 1994), indicando que a ativação da PLA<sub>2</sub>GIVC é regulada por um mecanismo diferente daquele da PLA<sub>2</sub>GIVA, bem como da PLA<sub>2</sub>GIVB. A investigação da presença da PLA<sub>2</sub>GIVC humana no sobrenadante ou no “pellet” de membranas de células de ovário de hamster chinês (CHO) ou de células de insetos Sf9 super expressando a enzima encontrou que a PLA<sub>2</sub>GIVC localiza-se na fração de membranas (Underwood et al., 1998; Stewart et al., 2002). A determinação do requerimento de Ca<sup>2+</sup> para a atividade da PLA<sub>2</sub>GIVC em lisados de células COS super expressando a enzima, incubados com o substrato PC14C, na ausência Ca<sup>2+</sup> ou na presença de Ca<sup>2+</sup> 10 mM, mostrou que a atividade da enzima não é afetada por Ca<sup>2+</sup> (Underwood et al., 1998). Além disso, a atividade da PLA<sub>2</sub>GIVC não foi afetada ao quelar o Ca<sup>2+</sup> por EDTA (Pickard et al., 1999). Esses achados indicam que a PLA<sub>2</sub>GIVC é uma enzima independente de Ca<sup>2+</sup> e é fortemente ligada às membranas. Porém, pertence ao grupo de enzimas dependentes de Ca<sup>2+</sup> devido a sua grande semelhança estrutural com as PLA<sub>2</sub> desse grupo, principalmente seu domínio catalítico, que é bem semelhante ao da PLA<sub>2</sub>GIVA (Underwood et al., 1998).

Em membranas neuronais e em outros sistemas celulares a ativação da PLA<sub>2</sub>GIV e a conseqüente liberação de ácido araquidônico pode ocorrer através de diferentes mecanismos de ligações com receptores dopaminérgicos, serotoninérgicos, glutamatérgicos, citoquinas e de fator de

crescimento. Através dessas ligações às diferentes cascatas de sinalizações a PLA<sub>2</sub>GIV é uma importante PLA<sub>2</sub> para liberação rápida de ácido araquidônico nas células além de modular diversos processos intracelulares (Farooqui et al, 2004; Sun, et al, 2004).

Um novo grupo de PLA<sub>2</sub>GIV foi descrito, a PLA<sub>2</sub>GIVD, porém ela é expressa exclusivamente em epitélio escamoso estratificado (pele) e está marcadamente aumentada em casos de psoríase. Esta enzima apresenta grande similaridade e níveis de atividade próximos às PLA<sub>2</sub>GIVB. Ela não mostra especificidade ao ácido araquidônico na posição *sn*-2 do substrato, mas sim ao ácido linoléico. Assim como as PLA<sub>2</sub>GIVB, as PLA<sub>2</sub>GIVD apresentam atividade dependente de Ca<sup>2+</sup> (Sun et al 2004).



**Figura 4.** Estrutura da cPLA<sub>2</sub>. O domínio dependente de cálcio (C2) está representado em rosa e o domínio catalítico C-terminal em azul. A superfície de ligação à membrana é representada pela parte superior da estrutura. A imagem foi gerada usando o programa Cn3D (NCBI) e é baseada na estrutura de Dessen et al, (1999).

c) **PLA<sub>2</sub> intracelular independente de Ca<sup>2+</sup>** (PLA<sub>2</sub>GVI ou iPLA<sub>2</sub>): São subdivididas em PLA<sub>2</sub>GVIA e PLA<sub>2</sub>GVIIB.

Essas enzimas são caracterizadas por peso molecular em torno de 80 kDa e por hidrolisar os ácidos graxos da posição *sn*-2 dos fosfolípidos com a seguinte ordem de preferência: ácido linolêico > ácido palmítico > ácido olêico > ácido araquidônico. A PLA<sub>2</sub>GVI tem uma única seqüência de amino ácidos contendo uma lípase e sete ou oito repetições *ankyrin* (Kudo e Murakami 2002; Farooqui et al, 2004).

Embora a PLA<sub>2</sub>GVI não tenha muita preferência em clivar fosfolípidos com ácido araquidônico na posição *sn*-2, está diretamente envolvida na regulação das reações de remodelamento de ácidos graxos nos fosfolípidos de membranas celulares, então deve influenciar a distribuição subcelular de ácido araquidônico entre os diferentes compartimentos, bem como a quantidade relativa de ácido graxo presente em cada compartimento celular (Balsinde et al., 1999).

A atividade da PLA<sub>2</sub>GVI foi determinada no sobrenadante ou no “pellet” de membranas de células COS super expressando a enzima. PLA<sub>2</sub>GVI foi incubada com ambos os substratos PC<sup>14</sup>C e fosfatidiletanolamina marcada com <sup>14</sup>C (PE<sup>14</sup>C), mostrando níveis de atividade similares na fração citosólica de células controles e de células super expressando a PLA<sub>2</sub>GVI, enquanto que sua atividade na fração de membranas de células super expressando a enzima foi 5,5 vezes maior do que aquela em células controles. Foi observada uma correlação entre a atividade aumentada da PLA<sub>2</sub>GVI e a presença maior da enzima na fração de membranas, indicando que a PLA<sub>2</sub>GVI é uma proteína ligada a membranas (Larsson et al., 1999). A determinação do requerimento de Ca<sup>2+</sup> para a atividade da PLA<sub>2</sub>GVI humana em lisados de células COS que super expressam a enzima, incubados com ambos os substratos PC<sup>14</sup>C e PE<sup>14</sup>C, na ausência de Ca<sup>2+</sup> ou na presença de Ca<sup>2+</sup> 5,0 mM, mostrou que a atividade da enzima foi significativamente maior na ausência de Ca<sup>2+</sup> (Larsson et al., 1998).

Na determinação da atividade da PLA<sub>2</sub>GVIB no sobrenadante ou no “pellet” de membranas de células Sf9 ou de células COS super expressando a enzima, foram observados, níveis similares tanto na fração citosólica de células controles quanto na de células que super expressam a PLA<sub>2</sub>GVIB. A atividade dessa enzima foi detectada predominantemente na fração de membranas. A determinação do requerimento de Ca<sup>2+</sup> para a atividade da PLA<sub>2</sub>GVIB humana no “pellet” de membranas de células Sf9 super expressando a enzima, incubado com PC sintética como substrato, na ausência ou na presença de Ca<sup>2+</sup> (variando de 0-10 mM), mostrou que a atividade da PLA<sub>2</sub>GVIB foi independente de Ca<sup>2+</sup> (Mancuso et al., 2000; Tanaka et al., 2000).

As PLA<sub>2</sub>s intracelulares parecem contribuir para a patogênese de doenças neuropsiquiátricas como: esquizofrenia, epilepsia, doença de Alzheimer, depressão, esclerose múltipla, entre outras. Nestas doenças já foram descritas alterações de metabolismo de fosfolípidos na membrana neuronal. (vide abaixo em 1.3.).

d) **PAF-acetilhidrolases** (plasmáticas): Subdivididas em PLA<sub>2</sub>GVII (PLA<sub>2</sub>GVIIA e PLA<sub>2</sub>GVIIB) e PLA<sub>2</sub>GVIII (PLA<sub>2</sub>GVIIIA e PLA<sub>2</sub>GVIIB).

Essas enzimas exibem um substrato específico, são as chamadas PAF (fator ativador de plaquetas) acetilhidrolases (PAF-AH) que hidrolisam e inativam o mediador lipídico PAF. A degradação desses fosfolípidos

bioativos pela PAF-AH pode levar a alteração da reação inflamatória e arteriosclerose (Kudo e Murakami,2002; Farooqui et al. 1999).

**e) PLA<sub>2</sub> Plasmalógeno seletiva : PlsEtn-PLA<sub>2</sub>**

Essas enzimas são caracterizadas por peso molecular em torno de 39 kDa. Elas hidrolisam ácido araquidônico e DHA da posição *sn*-2 dos plasmalógenos, um tipo especial de fosfolípides com um vinil éster ligado à posição *sn*-1 do glicerol, liberando um lisoplasmalógeno. DHA é metabolizado pelas ciclo-oxigenases e lipoxigenases liberando docosanóides (resolvins, decosatrienos e neuroprotectinas), os quais possuem propriedades antiinflamatórias e neuroprotetoras (Farooqui e Horrocks,2006). As PLA<sub>2</sub> plasmalógeno seletivas diferem das demais PLA<sub>2</sub> intracelulares não somente no peso molecular, mas também, nas propriedades cinéticas, especificidade ao substrato e resposta aos inibidores. (Farooqui e Horrocks, 2003 e 2006). As PlsEts-PLA<sub>2</sub> localizam se no citosol e apresentam atividade independente de Ca<sup>2+</sup> porém, não são inibidas pelo *Bromoenoil lactone* (BEL), potente inibidor das PLA<sub>2</sub>GVI. Essas enzimas são inibidas por ATP (adenosina trifosfato) em concentrações milimolares, ou seja concentrações intracelulares normais, diferentemente das PLA<sub>2</sub>GVI que são ativadas na presença do nucleotídeo (Farooqui, 2004; 2001).

### 1.2.2 Inibidores das fosfolipase A<sub>2</sub>

A existência de diferentes tipos de PLA<sub>2</sub>, funcionando em conjunto dificulta a análise de cada uma isoladamente. Para isso torna-se necessário o uso de inibidores específicos. Existe um grande número de compostos que apresentam capacidade de inibir a enzima, mas poucos conseguem fazê-lo de maneira seletiva.

Os inibidores podem agir por diferentes mecanismos como: 1) incorporando-se na membrana, levando a alterações das propriedades físicoquímicas, 2) interagindo diretamente com o sítio ativo da enzima, 3) Atuando sobre um outro sítio (sítio alostérico) da enzima, levando a mudanças na atividade, e 4) atuando como detergente, que induz mudanças não específicas nas propriedades da membrana (Farooqui 1999).

A seguir serão descritos os inibidores mais conhecidos:

a) ***Arachidonyl trifluoromethyl ketone (AACOCF<sub>3</sub>)*** – Análogo do ácido araquidônico em que o grupo carboxila (COOH) é trocado por um grupo *trifluoromethylketone* (COCF<sub>3</sub>). Inibidor reversível da PLA<sub>2</sub>, sendo mais seletivo para PLA<sub>2</sub> intracelulares (dependentes e independentes de cálcio) do que para as PLA<sub>2</sub> extracelulares devido as suas propriedades físicoquímicas, que permite sua rápida penetração na célula. Estudos de ressonância nuclear magnética (NMR) sugerem que a cadeia de carbono do



AACOCF3 se liga na porção hidrofóbica e o grupo carbonil forma uma ligação covalente com o sítio ativo, gerando um axoanion carregado que interage com o grupo da enzima carregado positivamente. (Farooqui 1999).

b) **Palmitoyl trifluoromethyl ketone (PACOCF3)** – análogo do ácido palmítico, inibe quatro vezes mais que o AACOCF3 a PLA<sub>2</sub> independente de cálcio (PLA<sub>2</sub>GVI) (IC<sub>50</sub> = 3,8μM e 15μM para o PACOCF3 e AACOCF3 respectivamente), mas igualmente ao AACOCF3, inibe de maneira reversível e não seletiva. (Farooqui 1999).

c) **Bromoenoil Lactone (BEL)** – é um potente inibidor das PLA<sub>2</sub> independentes de cálcio (PLA<sub>2</sub>GVI), sendo mil vezes mais potente em relação as PLA<sub>2</sub>GIV. Isso se deve ao fato que o BEL possui uma estrutura semelhante aos plasmalógenos que são substrato para as iPLA<sub>2</sub> e não o são para as cPLA<sub>2</sub> que hidrolisam preferencialmente a fosfatidilcolina.

O BEL inibe covalente e irreversivelmente (Hazen 1991 e Farooqui 1999). Várias evidências, demonstram o mecanismo de inibição do BEL: ele se liga covalentemente perto ou no sítio de ação da PLA<sub>2</sub> imediatamente depois da hidrólise e antes da difusão da lise catalítica. A inibição da iPLA<sub>2</sub> pelo BEL é tempo dependente a potência de inibição, bem como a ligação covalente, são inibidas competitivamente por fosfolípidos. Em altas concentrações, o BEL demonstra uma fase de dependência em relação ao tempo, inicialmente rápida, seguida de uma segunda fase que demonstra uma pseudocinética de primeira ordem. A existência de duas isoformas da

enzima, distintas cineticamente, que são inativadas com velocidades diferentes e a presença de isômeros ópticos do BEL que se presentes, podem diferir em suas afinidades e velocidades de hidrólise são algumas das explicações para esse comportamento (Hazen et al.,1991).

d) ***Methyl Arachidonyl Fluorophosphonate (MAFP)*** – fosfonato análogo do ácido araquidônico. É um inibidor irreversível das PLA<sub>2</sub> intracelulares dependentes de cálcio, mas não tem efeito sobre as PLA<sub>2</sub> dependentes de cálcio extracelulares. MAFP inibe a atividade enzimática pela reação com o resíduo serina do sítio catalítico, através de uma reação de fosforilação, impedindo assim sua recuperação, o que o torna irreversível. MAFP também inibe a PLA<sub>2</sub>GVI (IC<sub>50</sub> = 0,5µM) (Farooqui 1999).

e) ***Pyrrhophenone*** – potente inibidor da cPLA<sub>2</sub> porém não seletivo, sendo 230 vezes mais potente que o AACOCF<sub>3</sub>. Inibe a interação entre o substrato e o sítio ativo da enzima na interface, sem afetar a qualidade do substrato. *Pyrrhophenone* inibe muito pobremente a iPLA<sub>2</sub> e as PLA<sub>2</sub> extracelulares (Ono et al., 2002). *Pyrrhophenone* ainda não está disponível comercialmente.

f) **LY311727** – inibidor potente e seletivo das PLA<sub>2</sub> extracelulares, desenvolvido pela Lilly Research Laboratories e ainda não disponível comercialmente. LY311727 é um derivado indol cuja estrutura química foi refinada por cristalografia de raios-X , usando como modelo o sítio ativo da

PLA<sub>2</sub>GIIA (sPLA<sub>2</sub>). Este composto inibe seletivamente as sPLA<sub>2</sub> em concentrações nanomolres (Balsinde et al., 1999).

Um resumo das propriedades mais importantes das diversas formas de PLA<sub>2</sub> encontra-se na tabela 1.

Tabela 1: Propriedades enzimáticas da PLA<sub>2</sub> expressas em humanos

| Grupo                    | Expressão                             | Localização       | Peso Molecular (KDa) | Requerimento de Cálcio | Sítio catalítico | Cromossomo | especificidade ao ácido graxo               | inibição                       |
|--------------------------|---------------------------------------|-------------------|----------------------|------------------------|------------------|------------|---|--------------------------------|
| PLA <sub>2</sub> GIB     | pancreas                              | extracelular      | 13 - 15              | mM                     | His/Asp          | 12q23-24   | nenhuma                                     | DTT, LY311727, Indoxam e EDTA  |
| PLA <sub>2</sub> GIIA    | Líquido sinovial e plaquetas          | extracelular      | 13 - 15              | mM                     | His/Asp          | 1p34-36    | -nenhuma                                    | DTT e LY311727, Indoxam e EDTA |
| PLA <sub>2</sub> GIVA    | Plaquetas e células U937              | citossólica       | 85                   | µM                     | Ser/Asp          | 1q25       | Ácido araquidônico                          | MAFP e EDTA                    |
| PLA <sub>2</sub> GIVB    | cérebro                               | citossólica       | 100                  | µM                     | Ser/Asp          | 15         | Ácido araquidônico                          | MAFP e EDTA                    |
| PLA <sub>2</sub> GIVC    | Coração, músculo esquelético          | ligada à membrana | 65                   | Nenhum                 | Ser/Asp          | 19         | Ácido araquidônico                          | MAFP                           |
| PLA <sub>2</sub> GIVD    | pele                                  | citossólica       | 100                  | mM                     | Ser/Asp          | 15q15      | Ácido linoleico                             | ND                             |
| PLA <sub>2</sub> GV      | Coração, pulmão, macrofagos           | extracelular      | 14                   | mM                     | His/Asp          | 1p34-36    | nenhuma                                     | DTT, LY311727, Indoxam e EDTA  |
| PLA <sub>2</sub> GVIA    | Cérebro, macrofago placentar, coração | ligada à membrana | 88                   | Nenhum                 | Ser/His/Asp      | 22q13      | Ácido linoleico, ácido palmítico            | MAFP e BEL                     |
| PLA <sub>2</sub> GVIB    | cérebro                               | citossólica       | 90                   | Nenhum                 | Ser/His/Asp      | 7q31       | Ácido linoleico, ácido palmítico            | MAFP e BEL                     |
| PLA <sub>2</sub> GVIIA   | Plasma (PAF-AH)                       | extracelulares    | 45                   | Nenhum                 | Ser/His/Asp      | 6p12.3     | PAF   | DTT, LY311727, Indoxam e EDTA  |
| PLA <sub>2</sub> GX      | Leucócitos timo baço                  | extracelular      | 14                   | mM                     | His/Asp          | 16p13.2    | ND  | DTT, LY311727, Indoxam e EDTA  |
| PLs-Etn-PLA <sub>2</sub> | Coração e cérebro                     | citossólica       | 39                   | Nenhum                 | ND               | ND         | Ácido araquidônico<br>Ácido decosohexanoico | PACOCF3:e BEL                  |

ND = não determinado

### 1.3. Fosfolipase A<sub>2</sub> e desordens psiquiátricas

#### 1.3.1 Esquizofrenia

A esquizofrenia ocorre com uma prevalência de 1% em homens e mulheres, sendo o início da doença no final da adolescência/início da vida adulta e mais precoce em homens (Frazer et al., 1994).

As mudanças funcionais do cérebro de esquizofrênicos parecem estar relacionadas com distúrbio do metabolismo de fosfolípides. Estudos recentes com <sup>31</sup>P-espectroscopia magnética sugerem uma aceleração do metabolismo de fosfolípides no lobo frontal de esquizofrênicos. Nestes estudos investigaram-se as ressonâncias dos fosfomonoésteres (PME) e dos fosfodiésteres (PDE), respectivamente os precursores e os metabólitos dos fosfolípides no cérebro. Esquizofrênicos mostravam uma diminuição dos PME e um aumento dos PDE no lobo frontal (Williamson et al., 1991; Fujimoto et al., 1992; Keshavan et al., 1993; Pettegrew et al., 1993; Fukuzako et al., 1994; Deicken et al., 1993; 1995; Heinsberger et al., 1997). Uma aceleração do metabolismo de fosfolípides foi também encontrada em um estudo *post mortem* no lobo frontal de esquizofrênicos (Horrobin et al., 1991). Esses achados no cérebro, embora ainda controversos (Yacubian et al., 2002), apoiam resultados de estudos anteriores, que encontraram em esquizofrenia uma diminuição da concentração de fosfolípides nos eritrócitos

(Revisão em Rotrosen e Wolkin, 1987) e um aumento da concentração do metabólito lisofosfatidilcolina na membrana de plaquetas (Pangerl et al., 1991). Também a concentração do ácido araquidônico em eritrócitos foi encontrada reduzida em um subgrupo de pacientes esquizofrênicos (Peet et al., 1994, Glen et al., 1994).

Como a PLA<sub>2</sub> é uma enzima chave no metabolismo dos fosfolípidos, um aumento de sua atividade estaria implicado na esquizofrenia e poderia ser detectada tanto no cérebro como em tecidos periféricos. As alterações do cérebro seriam encontradas principalmente no lobo frontal, levando a uma hipofrontalidade causada por uma inibição da atividade dopaminérgica (Brunner e Gattaz, 1996) que supostamente ocorre na esquizofrenia (Weinberger et al., 1987). De fato, evidências experimentais foram obtidas por diversos grupos, sugerindo uma aceleração do metabolismo de fosfolípidos pela PLA<sub>2</sub> em esquizofrenia (Gattaz et al., 1987, 1990, 1995a; Tavares et al., 2003; Nojonen et al., 1993; Ross et al., 1997, 1999; Yao et al., 2000).

Entretanto, é de interesse notar que um aumento da PLA<sub>2</sub> já foi discutido em outras doenças neuropsiquiátricas nas quais podem ocorrer sintomas psicóticos, como na epilepsia do lobo temporal e na esclerose múltipla (Simonato et al., 1993; Visioli et al., 1994). Isto sugere que nestas doenças o aumento da PLA<sub>2</sub> poderia estar implicado na origem das manifestações psicóticas.

### 1.3.2 Epilepsia

Os mecanismos da epileptogênese iniciam-se com a excitação da membrana neuronal. A dupla camada lipídica é altamente impermeável aos íons, todavia os íons podem ser ativamente transportados através da membrana pelas bombas iônicas e dos canais *gated e no-gated*. As bombas iônicas criam e mantêm o potencial de membrana em descanso (pré-requisito para a excitação), enquanto as correntes iônicas fluem através dos canais *gated* levando à mudanças no estado de excitação (Avanzini et al., 2003).

Alterações no metabolismo dos fosfolípidos que compõe a membrana neuronal podem alterar o estado de excitação celular. Na verdade, alguns estudos descrevem que as crises promovem uma superativação da PLA<sub>2</sub>, resultando no acúmulo de lípidos bioativos nas sinapses (Bazan, 1998). Alguns mediadores inflamatórios, como o óxido nítrico e outros mediadores pró-inflamatórios, como as prostaglandinas nas quais a PLA<sub>2</sub> é a enzima chave para a sua produção, são aumentados pela ativação das células gliais, que ocorre durante a crise (Matoth et. Al. 2000).

A PLA<sub>2</sub>, em condições normais está envolvida com a manutenção das funções celulares através da produção de ácido araquidônico e eicosanóides. Quando o ácido araquidônico é hidrolisado pela PLA<sub>2</sub>, a partir de 1-O-alkil ligado aos fosfolípidos, é formado liso-PAF o qual é acetilado

para a formação do PAF, esse por sua vez, interage com receptores específicos levando a um aumento do  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, condição necessária para a manutenção das funções celulares normais. Uma estimulação prolongada da  $\text{PLA}_2$  pode danificar a integridade da membrana, não somente pelo aumento excessivo de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, que levaria a lipólise e proteólise excessiva e a fragmentação do DNA, mas também pela perda de fosfolípides essenciais para a formação da dupla camada lipídica, devido à característica detergente da estrutura do PAF. Esses processos, juntamente com o acúmulo de peróxidos lipídicos podem estar associados com várias formas de danos cerebrais agudos e crônicos, como a epilepsia e a esquizofrenia (Farooqui et al., 1996; Feuerstein G. 1996; Bazan et al., 2002).

### **1.3.3 Doença de Alzheimer**

Distúrbios do metabolismo de fosfolípidos foram descritos na Doença de Alzheimer (DA) (Barany et al., 1985; Kanfer et al., 1986; Nitsch et al., 1992). Investigações da atividade da  $\text{PLA}_2$  *post-mortem* no cérebro de pacientes com DA comparados com controles não-dementes de mesma idade (Gattaz et al., 1995b), mostraram que pacientes com DA tinham uma



redução significativa da atividade da PLA<sub>2</sub> no córtex parietal e no lobo frontal em comparação com os controles.

Existem correlações sugerindo uma associação entre a redução da atividade da PLA<sub>2</sub> e o grau de severidade da DA: Quanto menor a atividade da PLA<sub>2</sub>, menor a idade do óbito, e menor a idade de início da doença; quanto menor a atividade da PLA<sub>2</sub> maior o número de placas senis e de neurofibrilas. Esses achados no cérebro e em plaquetas indicam uma redução do metabolismo de fosfolípidos da membrana celular na DA. Esta redução foi também encontrada em estudos com espectroscopia magnética com <sup>31</sup>P (Brown et al., 1989; Forlenza et al., 2005).

Blusztajn et al. (1987) sublinharam o significado do metabolismo dos fosfolípidos para a síntese do neurotransmissor acetilcolina. O metabolismo da fosfatidilcolina (PC) da membrana contribui para a síntese da acetilcolina (Blusztajn e Wurtman, 1983). A PC é o substrato natural da PLA<sub>2</sub>. Uma redução da PLA<sub>2</sub> resulta em uma redução do metabolismo da PC, podendo contribuir assim para um déficit colinérgico. Esse déficit, primariamente resultante de uma degeneração de neurônios colinérgicos, é discutido como aspecto central do distúrbio cognitivo na DA. Neste sentido, é de interesse o achado de experimentos, nos quais uma inibição intracerebral da PLA<sub>2</sub> causou um distúrbio da memória em animais de laboratório (Hölscher e Rose, 1994; Schaeffer e Gattaz, 2005).

O cérebro de pacientes com DA apresenta alterações histomorfológicas características, as chamadas placas senis. O principal componente das placas senis é o peptídeo  $\beta$ -amilóide ( $A\beta$ ). O  $A\beta$  parece ser de importância na patogênese da DA, ele é formado a partir da cisão de um grupo de aminoácidos (APP 597-639) da proteína precursora do amilóide (APP). Fisiologicamente, o processamento da APP na membrana celular ocorre através de uma cisão proteolítica no meio da região  $\beta$ -amilóide, evitando assim a formação do  $A\beta$ . Um distúrbio deste processamento pode resultar na formação de placas de amilóide (revisão em Haas e Selkoe, 1993).

A  $PLA_2$  influencia decisivamente o processamento e a secreção da APP. Uma inibição da  $PLA_2$  reduz a secreção da APP da membrana, enquanto que uma ativação da  $PLA_2$  aumenta a liberação da APP no meio extracelular (Emmerling et al., 1993). Como o aumento da secreção da APP diminui a formação do  $A\beta$  (Caporaso et al., 1992; Fukushima et al., 1993), é razoável supor que uma redução na secreção da APP, contribui para um aumento da produção do  $A\beta$ .

### 1.3.4 Depressão e Transtorno Bipolar

A depressão é hipoteticamente causada por distúrbios da síntese, liberação, recaptção e metabolismo dos neurotransmissores serotonina e catecolaminas, além das alterações dos receptores desses neurotransmissores. (Horrobin, 1999b).

Esses fatos sugerem que tanto na depressão unipolar como no transtorno bipolar, ocorrem alterações nos mecanismos de transdução de sinais pós-receptores, que podem ser regulados por proteínas de membranas, as quais exercem diferentes ações nos neurônios e outras células. Entre essas ações está a ativação das fosfolipases, incluindo fosfolipase C (PLC), fosfolipase D (PLD) e PLA<sub>2</sub> (Horrobin, 1999b; Hibbeln, 1989). De fato, Hibbeln e colaboradores (1989) sugeriram que alterações da PLA<sub>2</sub> poderiam influenciar os sistemas de neurotransmissores de maneira a desencadear a depressão. A hipótese de Hibbeln é que o aumento da atividade da PLA<sub>2</sub> na depressão levaria a alterações dos fosfolípides de membrana, que por sua vez levaria a alterações da atividade de proteínas ligadas às membranas associadas com as diversas alterações observadas na depressão.

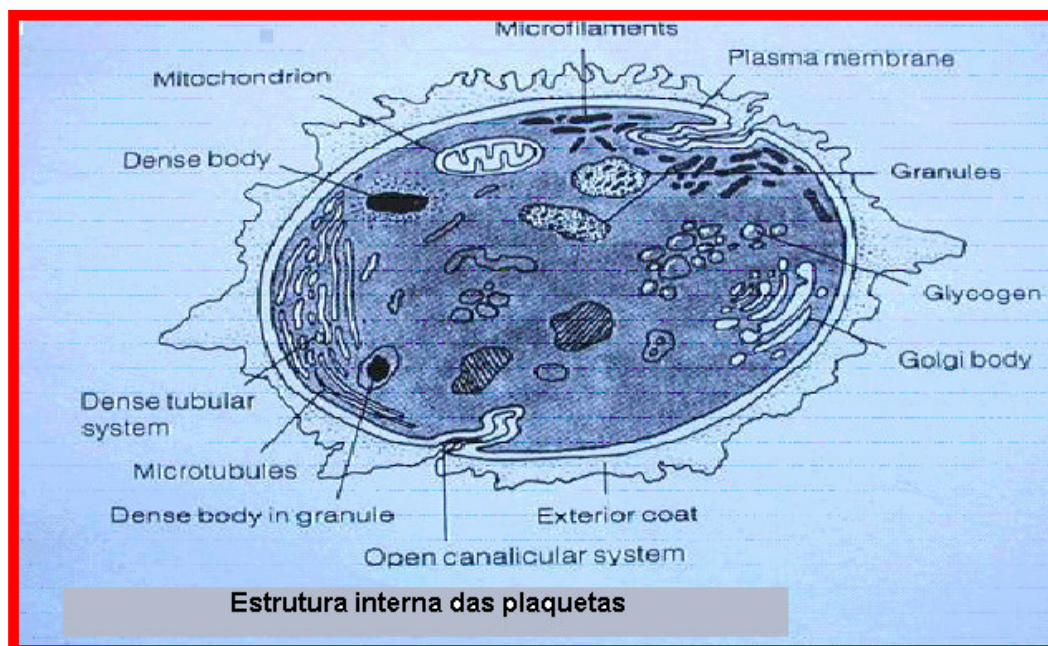
Na depressão existem evidências de anormalidades no metabolismo dos fosfolípides e ácidos graxos. Todavia, na depressão ocorre uma afinidade da PLA<sub>2</sub> pelos ácidos graxos de 20 carbonos da série Omega-3

(DHA), levando a uma diminuição desses ácidos graxos, acompanhados ou não, de um aumento da liberação dos ácidos graxos da série Omega -6 (ácido araquidônico). O DHA é na verdade, considerado como componente estrutural crucial do sistema nervoso, sendo a sua principal função aumentar a fluidez da membrana, permitindo um funcionamento ótimo da membrana neuronal. Uma diminuição de DHA levaria a uma redução da fluidez da membrana.(Edwards, 1999). Diversos estudos correlacionam o aumento da incidência de depressão com a diminuição dos níveis de DHA e sugerem que uma dieta mais rica nesta forma de ácido graxo poderia trazer efeitos benéficos.

#### 1.4 O uso de plaquetas como modelo periférico de neurônios

Numerosos estudos descrevem o uso de parâmetros bioquímicos das plaquetas como marcadores clínicos para desordens neurológicas (Luca et al., 2002). O uso da bioquímica das plaquetas como modelo periférico do metabolismo cerebral baseia-se nas características similares entre plaquetas e neurônios: 1) plaquetas armazenam e liberam neurotransmissores (nos grânulos densos); 2) a liberação dos grânulos alfas e dos grânulos densos é regulada pelas concentrações intracelulares de cálcio; 3) plaquetas expressam várias proteínas relacionadas a neurônios como os receptores N-metil D-aspartato (NMDA); 4) plaquetas têm em suas membranas receptores adrenérgicos, dopaminérgicos e serotoninérgicos (figura 5) (Owens, 1994) e 5) as plaquetas prolongam o processamento da membrana plasmática, lembrando neuritos que são esculpidos pelas proteases extracelulares (figura 6) (Bush, 1998).

De acordo com vários achados em plaquetas, como alteração das PLA<sub>2</sub>, da fluidez da membrana, de níveis de proteína quinase C, hiperreatividade de receptores serotoninérgicos em pacientes deprimidos entre outros, permite considerar as plaquetas como fonte de material biológico humano viável para estudos de mecanismos metabólicos, espelhando no sistema periférico os processos metabólicos que ocorrem no sistema nervoso central (Padovani et al., 2001 e Owens, 1994).



**Figura 5:** Representação da estrutura interna de plaquetas



**Figura 6:** ativação das plaquetas com os prolongamentos de membrana

## 2 OBJETIVO GERAL

Desenvolver uma metodologia para detectar e determinar a atividade dos diferentes grupos de PLA<sub>2</sub> em plaquetas, para que sirva no futuro para estudos da atividade da enzima em doenças neuropsiquiátricas.

### 2.1 Objetivos específicos:

Utilizar a mesma matriz biológica (plaquetas), para validar um método radioenzimático de determinação da atividade dos diferentes grupos de PLA<sub>2</sub>, utilizando propriedades específicas de cada uma delas, como a dependência do Ca<sup>2+</sup>, pH ideal e especificidade ao substrato.

Para isso foram utilizados diferentes substratos (fosfatidilcolina com ácido araquidônico e com ácido palmítico marcado com <sup>14</sup>C na posição *sn* 2) e os inibidores MAFP e o BEL.

### 3 MÉTODOS:

#### 3.1- Coleta das amostras –

Para a separação das plaquetas foram coletados de cada indivíduo saudável 40mL de sangue venoso com anticoagulante citrato de sódio.

#### Soluções de uso:

**1-** ACD-NH-Formol-A: consiste de uma solução de citrato modificado, contendo glicose, ácido cítrico, citrato de sódio em água ultrapura.

**2-** Solução de Lavagem: 30mL de citrato de sódio 0,1M; 3,3 $\mu$ L de cloreto de potássio 0,155M; 1mL de cloreto de magnésio 0,1M; 1,5mL de glicose 0,33M; 2,5mL de apyrase 20 Unidades/mL; 0,25mL de albumina 200mg/mL; 2mL de cloreto de cálcio 0,1M e 59,45mL de cloreto de sódio 0,9%.

**3-** Tris-sacarose pH 7,4

Tris 50mM pH 7,4, sacarose 233mM em água ultrapura.



4- Substrato radioativo estoque (*Phosphatidylcholine, L- $\alpha$ -1 palmitoyl-2-arachidonyl-[arachidonyl-1- $^{14}$ C]* 50 $\mu$ Ci e *L-3 Phosphatidylcholine, 1-palmitoyl-2-[palmitoyl-1- $^{14}$ C]* 50 $\mu$ Ci  $\rightarrow$  Diluir os radioativos em tolueno:etanol:BHT (1:10, v/v). Aliquotar a solução estoque do radioativo em frascos de vidro e armazená-los em freezer  $-20^{\circ}\text{C}$ . Para uso, evaporar em fluxo de nitrogênio 12 $\mu$ L da solução estoque por tubo e reconstituir com 150 $\mu$ L de albumina humana (0,3mg/mL) diluída em água ultrapura. A solução deve ser homogeneizada em sonicador e mantida em gelo até o uso.

5- Solução de parada:

Ácido clorídrico : Isopropanol (1:11,67, v/v)

### **3.2 Separação e lavagem das Plaquetas:**

Foram coletados 40 mL de sangue em quatro tubos com capacidade de 10 mL, contendo anticoagulante citrato de sódio 0,106 mol/L. Em cada tubo adicionou-se 1 mL de ACD-NH. Os tubos foram homogeneizados delicadamente por inversão e centrifugados durante 15 minutos a 1600 rpm a  $20^{\circ}\text{C}$ . A seguir, os sobrenadantes (Plasma Rico em Plaquetas - PRP) foram transferidos para outro tubo com capacidade de 50 mL (tipo falcon) e

o pH ajustado para 6,5 com ACD-NH. O PRP foi, então, transferido para 4 tubos de poliestireno (4 a 5 mL/tubo) e centrifugados durante 10 minutos a 2400 rpm à 20°C. O sobrenadante foi removido cuidadosamente por inversão, e ao pellet adicionou-se 2,5 mL de solução de lavagem.

Após descanso de 10 minutos, as plaquetas foram homogeneizadas cuidadosamente com uma pipeta Pasteur até total diluição e então se adicionou mais 2,5 mL de solução de lavagem. A mistura foi centrifugada por 8 minutos a 2400 rpm, o sobrenadante foi removido cuidadosamente, e o “pellet” foi ressuspendido com 0,5 mL de tris-sacarose, homogeneizando com a pipeta. As plaquetas em tris-sacarose foram armazenadas em 4 criotubos com 0,5 mL e mantidas em freezer -70°C para posterior determinação da concentração de proteínas e atividade da PLA<sub>2</sub>.

### **3.3 Determinação de proteínas**

As proteínas foram quantificadas utilizando o kit *Bio-Rad DC Protein assay* (Bio-Rad Hercules, CA) que é um ensaio colorimétrico para a determinação de proteínas, baseado no método de Lowry (Lowry et al., 1951), modificado para ser compatível com detergentes utilizados no preparo da amostra. O ensaio consiste na reação de proteínas com uma

solução alcalina de tartarato de cobre (Reagente A) e com o reagente de Folin (*1,2-naphthoquinone-4-sulfonate*) (Reagente B). Como no ensaio de Lowry, existem duas etapas que levam ao desenvolvimento da cor: a reação entre proteínas e o cobre em um meio alcalino, e a subsequente ligação do reagente de Folin às proteínas tratadas com cobre (Lowry et al., 1951). Quando o reagente de Folin liga-se a essas proteínas, ele é reduzido pela perda de 1, 2 ou 3 átomos de oxigênio, e muda a cor do amarelo para um azul característico, cuja absorbância é lida entre 405 e 750 nm (Peterson, 1979).

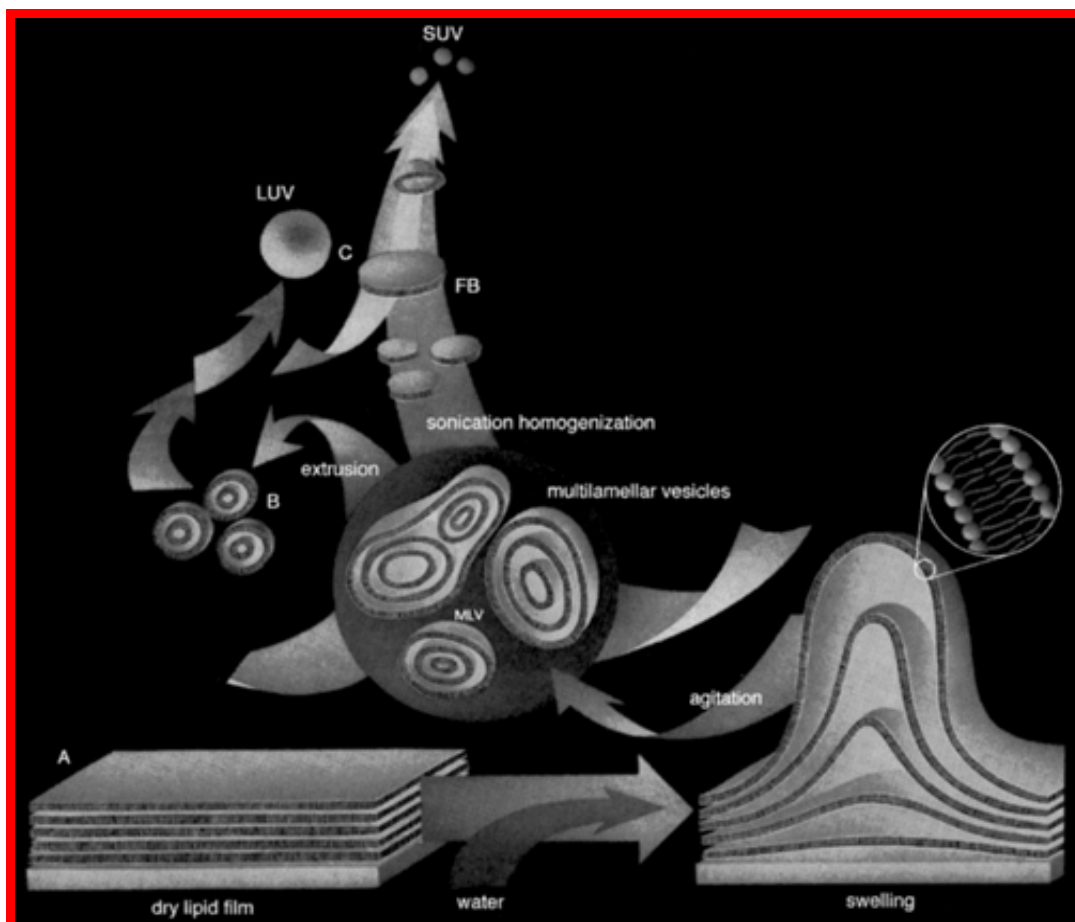
Para a determinação das proteínas totais, foi utilizado uma curva padrão de proteínas utilizando-se albumina de soro bovino (*bovine serum albumin* ou BSA; Sigma-Aldrich), nas seguintes concentrações: 0,1 mg/mL, 0,2 mg/mL, 0,5 mg/mL, 1,0 mg/mL e 1,5 mg/mL.

O ensaio foi realizado em microplacas de 96 poços (em temperatura ambiente), onde foi pipetado 25  $\mu$ L do Reagente A, 5  $\mu$ L do padrão de proteínas de BSA nas seis diferentes concentrações ou 5  $\mu$ L das amostras ou branco (tris-sacarose) e 200  $\mu$ L do Reagente B. Após incubação de 15 min em temperatura ambiente em um Agitador de placas (Wallac-PerkinElmer, Boston, MA), as absorbâncias das amostras foram lidas em um Leitor de microplacas (Spectracount; Packard, Meriden, CT) a 680 nm. Todas as determinações dos níveis de proteínas foram realizadas em triplicatas.

### 3.4 Determinação da Atividade da PLA<sub>2</sub>

O método utilizado para determinar a atividade da PLA<sub>2</sub> foi o rádio-enzimático, descrito previamente (Flesch et al., 1985; Gattaz et al., 1995). Os substratos da enzima utilizados foram o L-α-1-palmitoil-2-araquidonil-fosfatidilcolina marcada com [1-<sup>14</sup>C] na cauda araquidonil na posição *sn*-2 (araquidonil-1-<sup>14</sup>C-PC) (PerkinElmer, Boston, MA) e o *L*-3-*Phosphatidylcholine, 1-palmitoyl-2-[1-<sup>14</sup>C]palmitoyl*. Neste ensaio, o [1-<sup>14</sup>C]-ácido graxo, ligado à posição *sn*-2 da fosfatidilcolina, é clivado pela PLA<sub>2</sub> e extraído. A radioatividade do [1-<sup>14</sup>C]-ácido graxo liberado é medida em um contador de cintilação líquida e utilizada para calcular a atividade da PLA<sub>2</sub>.

Esse método pode ser utilizado para diversas amostras, como homogenato de tecido cerebral, cultura de células ou, como neste estudo, para plaquetas. Para o preparo da amostra é imprescindível utilizar um tampão de lise (tris-sacarose) para romper as membranas e, assim, permitir a incorporação do substrato marcado aos fragmentos de membrana. É necessário também adicionar um tampão para formar lipossomos (Tris-HCl 50 mM) para simular um ambiente celular, unindo os fragmentos de membranas contendo o substrato marcado. Para se formar lipossomos, é importante agitar e sonicar o substrato fosfolipídico em meio aquoso (figura 7).



**Figura 7::** Mecanismo de formação de vesículas lipídicas – Lipossomas: finas camadas lipídicas são hidratadas formando pilhas da bicamada lipídica fluida e inchadas. Durante a agitação, formam-se, então, as grandes vesículas multilamelares (GVM), as quais permitem interação da água com os hidratos de carbono centrais da bicamada. Uma vez formadas, a redução do tamanho dessas partículas requer energia, ou na forma de energia ultrasônica (sonicação) formando as vesículas unilamelares pequenas (VUP), ou energia mecânica (extrusão). Fonte: [www.avantilipids.com/PreparationOfLipossomes.html](http://www.avantilipids.com/PreparationOfLipossomes.html)

### 3.4.1 Ensaio radioenzimático

Esse método foi o procedimento básico comum a todos os ensaios (curvas de proteína, curvas de substratos, curvas de  $\text{Ca}^{2+}$ , EDTA, BEL e MAFP).

As amostras previamente armazenadas em *freezer*  $-70^{\circ}\text{C}$  foram descongeladas e mantidas sob gelo. Após determinação dos níveis de proteínas, foi pipetado um volume de cada amostra, necessário para obter uma concentração de proteína de  $0,2\text{ mg/mL}$ . O volume da amostra foi completado para  $400\ \mu\text{L}$  de Tris-sacarose pH 7,4 (tampão de lise) e adicionou-se  $600\ \mu\text{L}$  de Tris 50 mM pH 8,5. A amostra referente ao branco continha  $400\ \mu\text{L}$  de Tris-Sacarose pH 7,4 e  $600\ \mu\text{L}$  de Tris 50mM. Cada amostra foi realizada em triplicata. Após homogeneização foi pipetado em cada tubo:  $100\ \mu\text{L}$  de tampão/  $\text{CaCl}_2$ / EDTA/ MAFP/ BEL,  $50\ \mu\text{L}$  de Tris-HCl 1,0 M,  $200\ \mu\text{L}$  da amostra diluída (ou do branco) e  $150\ \mu\text{L}$  ( $0,06\ \mu\text{Ci}$ ) do substrato radioativo.

Homogeneizou-se novamente e a mistura foi incubada por 30 min (exceto para curva de tempo de incubação) a  $37\ ^{\circ}\text{C}$  em banho-maria sob agitação. Após a incubação, as amostras foram colocadas imediatamente em banho de gelo e foram adicionados  $700\ \mu\text{L}$  de solução de parada, para interromper a reação. Em seguida as amostras foram levadas à temperatura ambiente e após 10 min de repouso, adicionou-se  $700\ \mu\text{L}$  de *n*-heptano, para extração do ácido graxo marcado através de agitação rigorosa em vórtex por 30 seg. A mistura foi então, centrifugada a 4000 rpm por 10 min a temperatura ambiente. Transferiu-se  $500\ \mu\text{L}$  da fase orgânica para tubos contendo 60mg de sílica gel e  $300\ \mu\text{L}$  de *n*-heptano para reter os fosfolípidos e centrifugou-se novamente a 4000 rpm por 5 min a temperatura ambiente. Transferiu-se  $500\ \mu\text{L}$  do sobrenadante para tubos contendo 6,0 mL de

líquido de cintilação e após homogeneização, colocou-se para contar em um contador de cintilação líquida (Tri-Carb 2100 TR) na seguinte ordem: Branco, 100 % (somente o substrato marcado) e amostras. Os resultados foram fornecidos em CPM, e então, corrigidos para pmol/mg de proteína/min utilizando a seguinte fórmula:

$$\text{Atividade da PLA}_2 \text{ (pMol/mg prot/min)} = \text{CPM} \times 25 / A \times 0,988 \times 2,22 \times B$$

Sendo, CPM = contagens por minuto; 25 = fator de ajuste para 2 mg de proteína (2 mg/0,04 mg concentração final de proteína); A = atividade específica do radioativo em mCi/mMol; B = tempo de incubação em minutos; 0,988 = Eficiência do equipamento.

### **3.4.2 Ensaios de otimização da atividade da PLA<sub>2</sub>**

Todos esses ensaios seguiram o procedimento descrito no item 3.4.1. com exceção das variáveis a serem investigadas. Foram construídas curvas de atividade da PLA<sub>2</sub> em função da concentração de substrato PC<sup>14</sup>C (0,03, 0,045, 0,06 e 0,075 μCi/mL); da concentração de proteína (0,1, 0,2, 0,3, 0,4 e 0,5 mg/mL); concentração de Ca<sup>2+</sup> (100 e 300 nM; 1,0, 3,0 10, 30 e 100 μM; 1,0 e 5,0 mM); da concentração de EDTA (500 μM, 1,0 e 5,0 mM);

da concentração de MAFP (1,0, 3,0, 10, 30, 100 e 300 $\mu$ M, 1,0 e 3,0 mM) e da concentração de BEL (100 e 300,500, 700 nM; 1,0, 3,0, 5,0, 7,0, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 70, 100, 150,200, 300, 400 e 500  $\mu$ M).

### 3.4.3 Caracterização das diferentes formas de PLA<sub>2</sub>

Para a diferenciação dos grupos de PLA<sub>2</sub> presentes nas plaquetas foram realizados ensaios com substratos de preferência para cada uma. Para determinação da atividade das PLA<sub>2</sub> dependentes de cálcio as amostras foram incubadas com L- $\alpha$ -1-palmitoil-2-araquidonil-fosfatidilcolina marcada com [1-<sup>14</sup>C] na cauda araquidonil na posição *sn*-2 (araquidonil-1-<sup>14</sup>C-PC), além das concentrações ideais de Ca<sup>+2</sup> (100 $\mu$ M para as PLA<sub>2</sub> intracelulares e 5mM para as extracelulares). A atividade das PLA<sub>2</sub> independente de cálcio foi determinada utilizando como substrato o *L*-3-*Phosphatidylcholine, 1-palmitoyl-2-[1-<sup>14</sup>C]palmitoyl*, na presença do quelante de cálcio EDTA (2,5mM).



## 4. RESULTADOS

### 4.1- Otimização do método para determinação da atividade da PLA<sub>2</sub> em plaquetas:

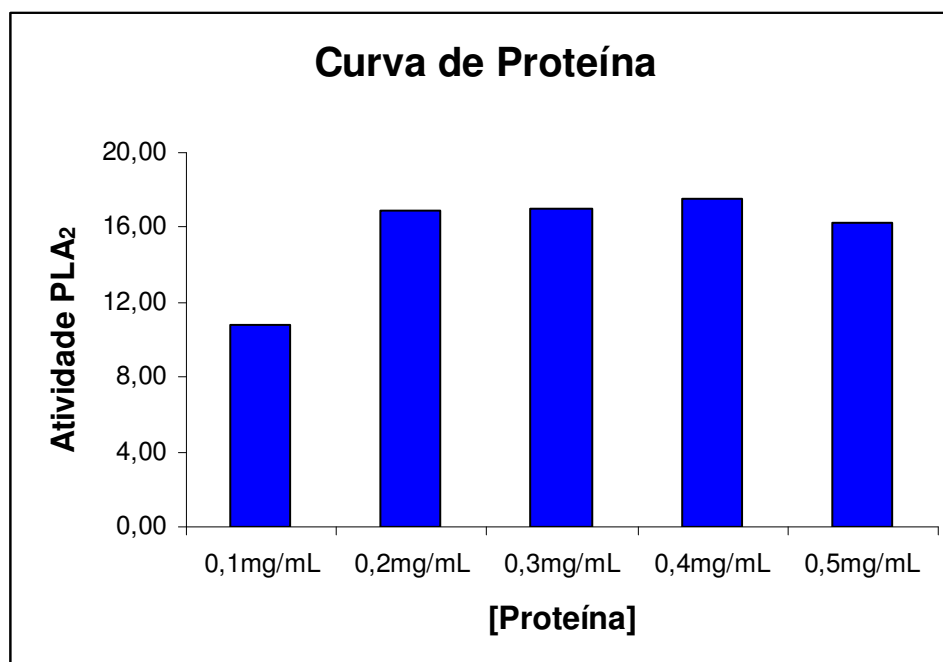
Para a otimização foram utilizadas plaquetas de indivíduos controles saudáveis. As plaquetas foram preparadas conforme descrito no item 3.2.

#### 4.1.1 Determinação da concentração de proteína

Nesse ensaio determinou-se a concentração ideal de proteína para melhor aproveitamento do substrato, levando-se em conta o volume obtido das amostras. Foram realizados ensaios utilizando o substrato *Phosphatidylcholine, L- $\alpha$ -1 palmitoyl-2-arachidonyl-[arachidonyl-1-<sup>14</sup>C]* com concentrações crescentes de proteína em uma faixa de 0,1 a 0,5mg/mL. Conforme ilustra a figura 8 pode se observar que com 0,2mg/mL obteve-se a saturação do substrato.

**Tabela 2: Atividade média da PLA<sub>2</sub> (pMol.mg/min.) em relação à proteína**

| <b>Concentração de Proteína</b> | <b>Atividade média</b> |
|---------------------------------|------------------------|
| 0,1mg/mL                        | 10,85±2,24             |
| 0,2mg/mL                        | 16,91±1,56             |
| 0,3mg/mL                        | 16,98±0,80             |
| 0,4mg/mL                        | 17,59±0,61             |
| 0,5mg/mL                        | 16,26±0,92             |



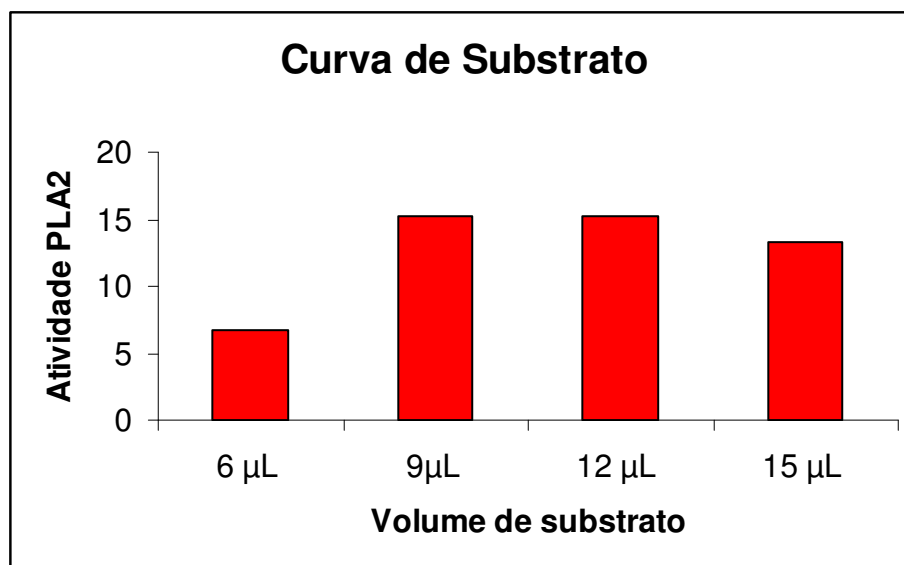
**Figura 8:** Curva da atividade da PLA<sub>2</sub> em função da concentração de proteínas. Dados obtidos a partir de 3 ensaios

#### 4.1.2- Determinação da concentração de substrato

Baseados na concentração de 0,2mg/mL de proteína, foram testados diferentes concentrações do substrato *Phosphatidylcholine, L- $\alpha$ -1 palmitoyl-2-arachidonyl-[arachidonyl-1- $^{14}$ C]*. Obteve-se a atividade máxima com 9 $\mu$ L (0,045  $\mu$ Ci) do substrato (figura 9), mas optamos por utilizar 12 $\mu$ L (0,06 $\mu$ Ci) por esperarmos atividade aumentada no estudo de alguns dos transtornos, nos quais o método será aplicado.

**Tabela 3: Atividade média da PLA<sub>2</sub> (pMol.mg/min) em relação ao substrato**

| <b>Volume substrato</b> | <b>Atividade Média</b> |
|-------------------------|------------------------|
| 6 uL (0,03 $\mu$ Ci)    | 6,70 $\pm$ 0,33        |
| 9uL (0,045 $\mu$ Ci)    | 15,19 $\pm$ 3,68       |
| 12 uL (0,06 $\mu$ Ci)   | 15,15 $\pm$ 3,61       |
| 15 uL (0,075 $\mu$ Ci)  | 13,30 $\pm$ 1,90       |



**Figura 9:** curva de atividade da PLA<sub>2</sub> em relação à concentração do substrato. Dados obtidos em 2 ensaios

#### 4.1.3 Ensaio para determinação ideal de Cálcio

Foram realizadas curvas com diferentes concentrações de Cálcio e EDTA sendo que nas concentrações micromolares, ideal para a atividade da cPLA<sub>2</sub>, obteve-se uma atividade maior com 100 μM de CaCl<sub>2</sub>. A concentração ótima para as PLA<sub>2</sub> extracelulares (sPLA<sub>2</sub>) foi 5 mM de CaCl<sub>2</sub>. Esses ensaios foram realizados conforme descrito no item 3.4.1, utilizando como substrato a *Phosphatidylcholine, L-α-1 palmitoyl-2-arachidonyl-[arachidonyl-1-<sup>14</sup>C]*. Com esse substrato, ao quelar o cálcio com EDTA, não conseguimos medir com precisão a atividade da PLA<sub>2</sub>GVI (iPLA<sub>2</sub>) como mostra a figura 10. As concentrações de cálcio e EDTA foram ajustadas para apresentarem as concentrações finais listadas na tabela 4, para tanto, foram

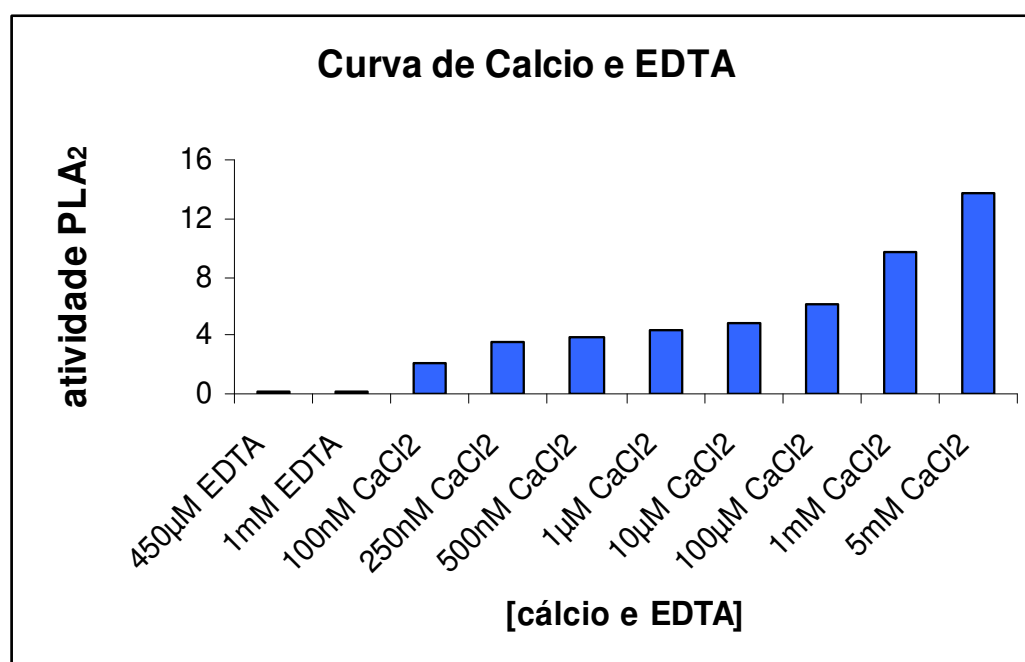
dosadas as quantidades de cálcio endógeno presentes nas plaquetas, as quais apresentaram valores indetectáveis de cálcio total ou iônico. Ainda assim, realizamos uma curva com EDTA,(figura 11), para verificarmos se as concentrações utilizadas eram suficientes para quelar o cálcio endógeno (concentrações muito baixas) e o cálcio presente em alguns tampões (por exemplo, Tris), estes testes confirmaram que o ensaio não é específico para medir a atividade da iPLA<sub>2</sub>.

**Tabela 4: Atividade média da PLA<sub>2</sub> com diferentes concentrações de Cálcio e EDTA**

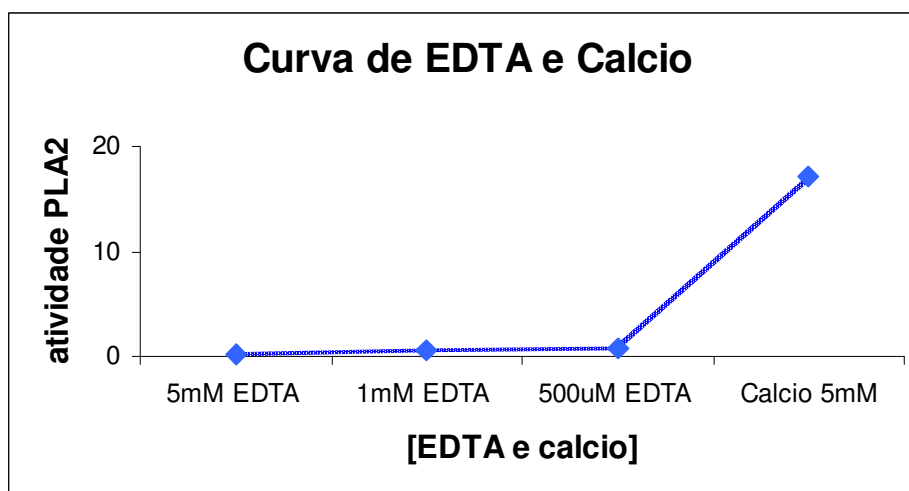
| Concentração de cálcio e EDTA | Atividade média |
|-------------------------------|-----------------|
| 450uM EDTA                    | 0,23±0,09       |
| 1mM EDTA                      | 0,19±0,27       |
| 100nM CaCl <sub>2</sub>       | 2,13±3,00       |
| 250nM CaCl <sub>2</sub>       | 3,57±0,09       |
| 500nM CaCl <sub>2</sub>       | 3,80±0,30       |
| 1uM CaCl <sub>2</sub>         | 4,39±0,67       |
| 10uM CaCl <sub>2</sub>        | 4,86±0,42       |
| 100uM CaCl <sub>2</sub>       | 6,13±0,49       |
| 1mM CaCl <sub>2</sub>         | 9,74±2,00       |
| 5mM CaCl <sub>2</sub>         | 13,68±0,59      |

**Tabela 5: Atividade média da PL<sub>A2</sub> com diferentes concentrações de EDTA**

| Concentração de EDTA | Atividade Média |
|----------------------|-----------------|
| 5mM EDTA             | 0,15±0,21       |
| 1mM EDTA             | 0,49±0,23       |
| 500uM EDTA           | 0,84±0,83       |
| Calcio 5mM           | 17,24±0,18      |



**Figura 10:** Curva da atividade da PL<sub>A2</sub> com relação à concentração de cálcio. Dados de 2 ensaios



**Figura 11:** Curva da atividade da PLA<sub>2</sub> em relação à concentração de EDTA.

## 4.2 Estudos de inibição da PLA<sub>2</sub> em plaquetas

Foram utilizados dois inibidores: O BEL e o MAFP sendo que esse último em duas formas de apresentação, liofilizado e em solução de metil acetato.

### 4.2.1- Ensaio para verificar eficiência e especificidade do MAFP em plaquetas

O MAFP é descrito como inibidor das PLA<sub>2</sub> GIV e GVI (iPLA<sub>2</sub> e cPLA<sub>2</sub>). Como não houve sensibilidade para determinar a atividade da iPLA<sub>2</sub>,

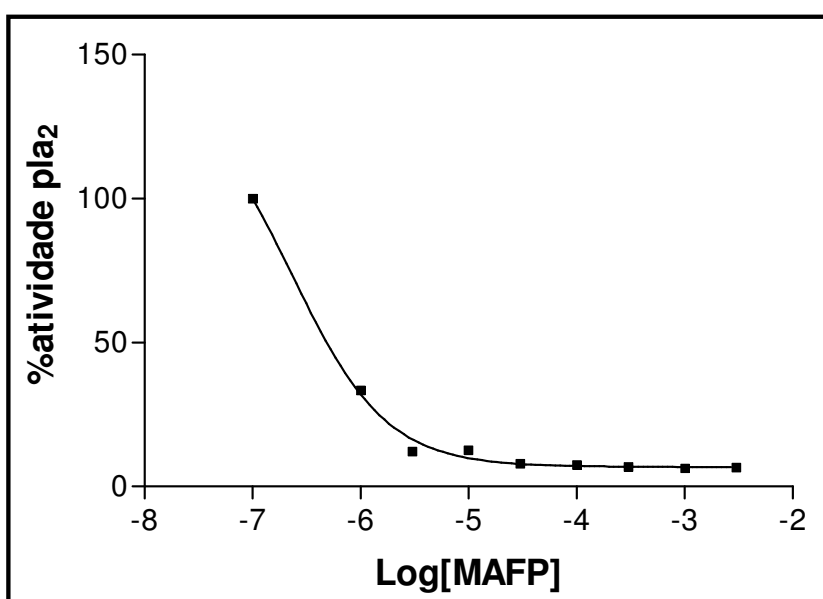
foram construídas curvas para estabelecer a concentração ideal para produzir inibição total das cPLA<sub>2</sub>s. Conforme mostra a figura 12.

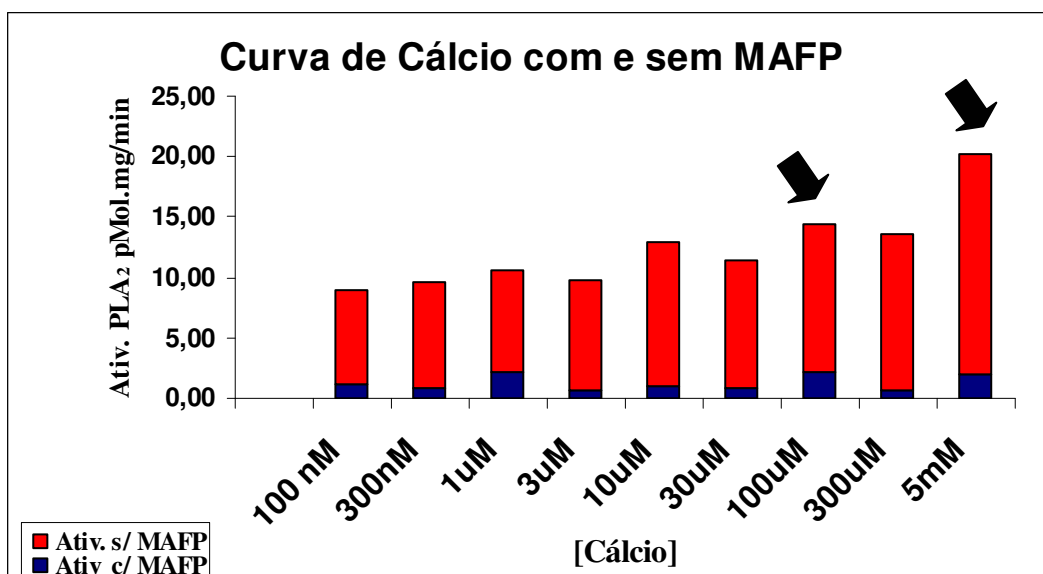
Após determinação da concentração onde houve saturação, foram realizados ensaios onde foi fixada a concentração de MAFP (100 μM), e variou-se a concentração de cálcio para confirmar a especificidade do MAFP, verificando se a inibição ocorreria somente nas concentrações micromolares, ideais para cPLA<sub>2</sub> ou, se em concentrações milimolares, ideais para sPLA<sub>2</sub> também haveria inibição (figura 13). Verificamos que a inibição ocorre nas duas condições (destaque nas figuras 13 e 14), mostrando que em amostras onde existe concomitância de diferentes grupos da PLA<sub>2</sub> o MAFP não é específico. Esses ensaios foram realizados utilizando o MAFP liofilizado, reconstituído com DMSO e salina. Ao utilizar o MAFP em solução de metil acetato verificou-se o mesmo comportamento conforme demonstrado na figura 15.



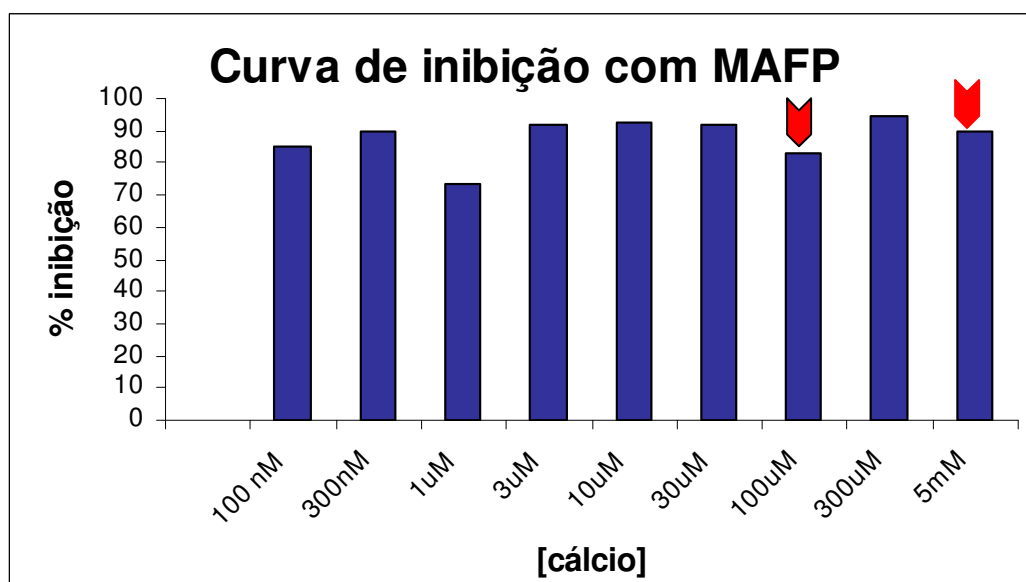
**Tabela 6: Inibição da PLA<sub>2</sub> com MAFP**

| [MAFP]     | [MAFP]   | log[MAFP] | Ativ media PLA <sub>2</sub><br>(pMol/mg prot/min) | %Ativ<br>PLA <sub>2</sub> |
|------------|----------|-----------|---|---------------------------|
| Sem MAFP   | 1,00E-07 | 7,00      | 15,11   | 100                       |
| 1uM MAFP   | 1,00E-06 | 6,00      | 5,08  | 33,6                      |
| 3uM MAFP   | 3,00E-06 | 5,52      | 1,86  | 12,3                      |
| 10uM MAFP  | 1,00E-05 | 5,00      | 1,92  | 12,7                      |
| 30uM MAFP  | 3,00E-05 | 4,52      | 1,21  | 8                         |
| 100uM MAFP | 1,00E-04 | 4,00      | 1,15  | 7,6                       |
| 300uM MAFP | 3,00E-04 | 3,52      | 1,05  | 6,9                       |
| 1mM MAFP   | 1,00E-03 | 3,00      | 0,97  | 6,4                       |
| 3mM MAFP   | 3,00E-03 | 2,52      | 1,02  | 6,7                       |

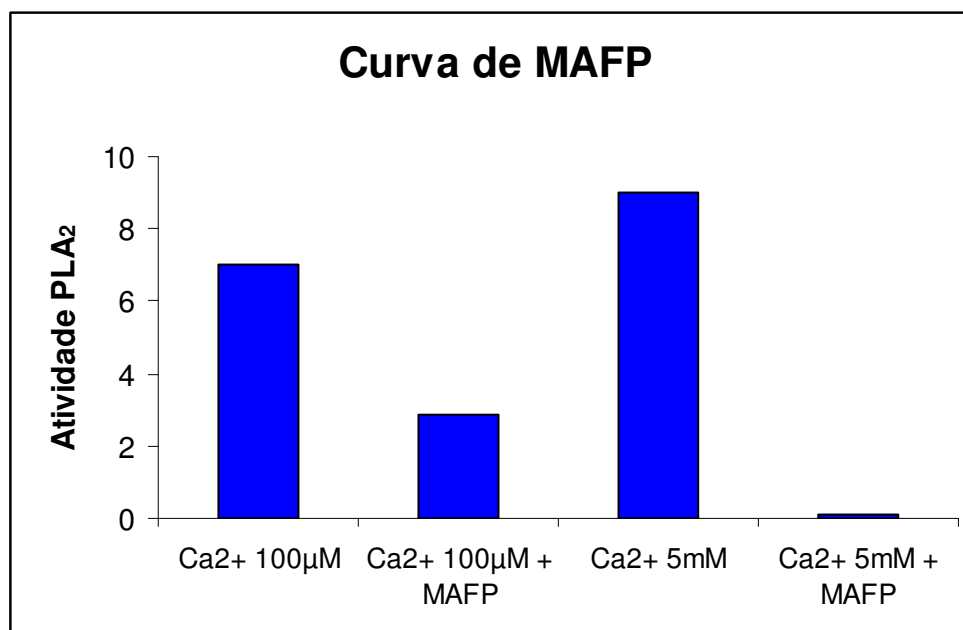
**Figura 12** Curva de inibição da atividade da PLA<sub>2</sub> com MAFP. Ensaio realizado com 3 amostras



**Figura 13: Curva de Cálcio com e sem o inibidor MAFP.** Média da atividade da PLA<sub>2</sub> de 3 ensaios com 7 amostras, utilizando 100 $\mu$ M de MAFP. As setas indicam que houve inibição tanto de cPLA<sub>2</sub> como de sPLA<sub>2</sub>.



**Figura 14: Porcentagem de inibição da atividade da PLA<sub>2</sub> com MAFP,** em relação à concentração de cálcio no ensaio. As setas indicam as condições ideais para as cPLA<sub>2</sub> e sPLA<sub>2</sub> (100 $\mu$ M e 5mM de CaCl<sub>2</sub>, respectivamente).



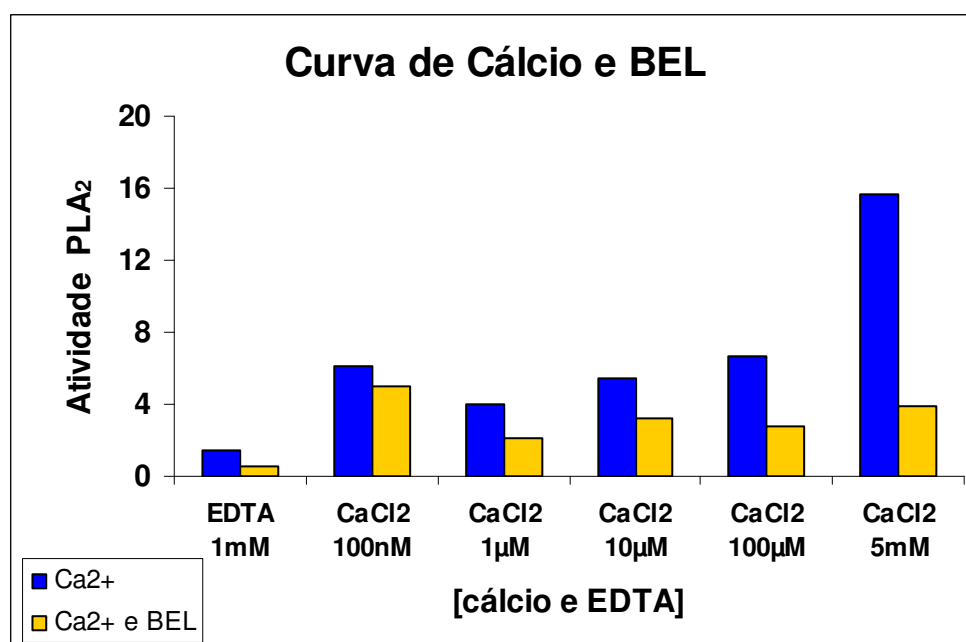
**Figura 15:** inibição da atividade das PLA<sub>2</sub> dependentes de cálcio frente ao MAFP em solução de metil acetato

#### 4.2.2- Eficiência e especificidade do *Bromoenoil Lactone* (BEL) em plaquetas

Foram realizados ensaios utilizando concentração fixa de BEL (300µM) com diferentes concentrações de cálcio (100nM, 1,0, 10 e 100µM e 5mM) e também com EDTA 2,5mM (mesmo o método não sendo ideal para essa condição) com objetivo de verificar a especificidade do BEL em relação aos diferentes grupos da enzima presente nas plaquetas (sPLA<sub>2</sub>, cPLA<sub>2</sub>, e iPLA<sub>2</sub>) (figura 16).

**Tabela 7: Média das atividades da PLA<sub>2</sub> na presença e na ausência de BEL**

| [cálcio] | Atividade média da PLA <sub>2</sub> | Atividade média da PLA <sub>2</sub> C/ BEL |
|----------|-------------------------------------|--|
| EDTA 1mM | 1,47±1,54                           | 0,54±0,76                                  |
| 100nM    | 6,15±3,53                           | 4,96±1,90                                  |
| 1µM      | 4,02±0,33                           | 2,14±1,13                                  |
| 10µM     | 5,48±1,05                           | 3,17±1,41                                  |
| 100µM    | 6,67±0,43                           | 2,80±0,51                                  |
| 5mM      | 15,72±0,57                          | 3,91±0,95                                  |



**Figura 16:** Atividade da PLA<sub>2</sub> em diferentes concentrações de cálcio na presença e na ausência de BEL.

Conforme observado nos resultados apresentados acima, com a adição de BEL ocorreu uma inibição da atividade da PLA<sub>2</sub> em condições



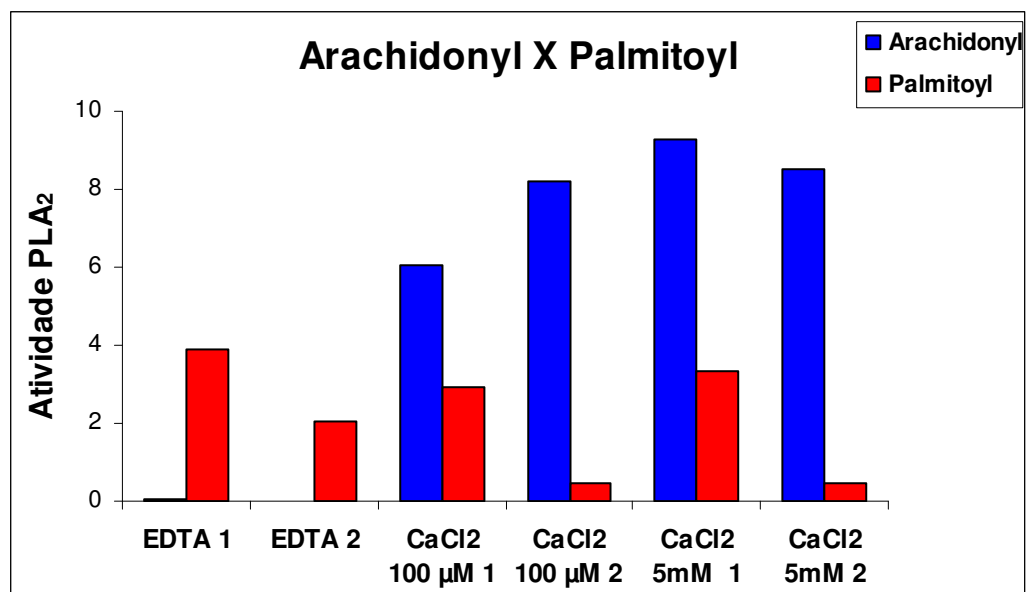
### 4.3 Otimização do método para determinar atividade da PLA<sub>2</sub>GVI em plaquetas

Visto que utilizando *Phosphatidylcholine, L- $\alpha$ -1 palmitoyl-2-arachidonyl-[arachidonyl-1-<sup>14</sup>C]* como substrato, não houve especificidade para medir a atividade da iPLA<sub>2</sub> nas plaquetas, mesmo na ausência de cálcio, ou seja, com a adição de EDTA 2,5mM, optou-se por utilizar um substrato com o ácido palmítico na posição *sn*-2, já que as iPLA<sub>2</sub> têm preferência em clivar esse ácido graxo. O substrato utilizado foi o *L-3-Phosphatidylcholine, 1-palmitoyl-2-[1-<sup>14</sup>C]palmitoyl*. Foram construídas, em paralelo, uma curva utilizando o substrato *Phosphatidylcholine, L- $\alpha$ -1 palmitoyl-2-arachidonyl-[arachidonyl-1-<sup>14</sup>C]* e outra utilizando o novo substrato *L-3-Phosphatidylcholine, 1-palmitoyl-2-[1-<sup>14</sup>C]palmitoyl*, ambas com duas amostras e nas condições ideais para cPLA<sub>2</sub> (100  $\mu$ M de CaCl<sub>2</sub>), sPLA<sub>2</sub> (5mM de CaCl<sub>2</sub>) e iPLA<sub>2</sub> (EDTA - ausência de Ca<sup>+2</sup>). (figura 18). Foram testadas, também, a inibição com MAFP e com BEL, a fim de verificar, se nestas condições a inibição seria mais específica (figura 19 e 20).

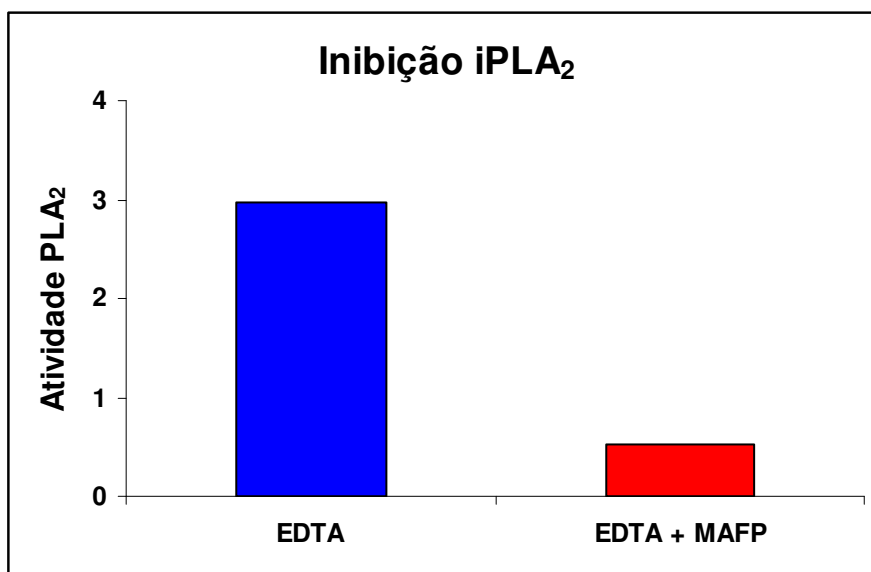
Com relação à iPLA<sub>2</sub>, o novo substrato mostrou-se mais específico e sensível permitindo estabelecer um método ótimo para determinar a sua atividade. Para as PLA<sub>2</sub> dependentes de Cálcio (cPLA<sub>2</sub> e sPLA<sub>2</sub>) não houve especificidade ao substrato mostrando que o ácido araquidônico na posição *sn*-2 é o melhor substrato para essas formas da enzima.

**Tabela 8: Dados comparativos da Atividade da PLA<sub>2</sub> frente a dois substratos**

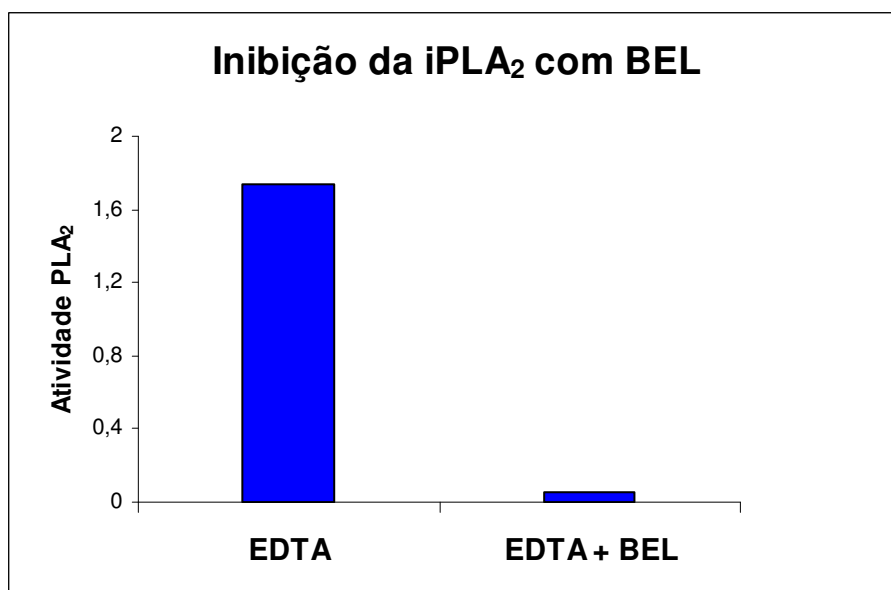
| [Cálcio e EDTA]  | Atividade PC-AA | Atividade PC-palmitoyl |
|------------------|-----------------|------------------------|
| EDTA am1         | 0,06            | 3,88±0,04              |
| EDTA am2         | 0               | 2,08±0,04              |
| Cacl2 100uM am1  | 6,07            | 2,91±0,33              |
| Cacl2 100uM am 2 | 8,22            | 0,45±0,63              |
| Cacl2 5mM am 1   | 9,3             | 3,33±0,09              |
| Cacl2 5mM am 2   | 8,5             | 0,46±0,65              |



**Figura 18:** Atividade da PLA<sub>2</sub> frente aos dois substratos: *Phosphatidylcholine, L- $\alpha$ -1 palmitoyl-2-arachidonyl-[arachidonyl-1-<sup>14</sup>C]* e *L-3-Phosphatidylcholine, 1-palmitoyl-2-[1-<sup>14</sup>C]palmitoyl*



**Figura 19:** inibição da PLA<sub>2</sub>GVI frente ao MAFP, utilizando o substrato PC-palmitoyl. Resultado de 2 ensaios com 2 amostras.



**Figura 20:** inibição da PLA<sub>2</sub>GVI frente ao BEL, utilizando o substrato PC-palmitoyl.



## 5.DISSCUSSÃO

Uma das grandes dificuldades da área de estudo que hoje se denomina Lipidômica, é a separação e identificação dos fosfolípidos. Mesmo com o avanço das diversas tecnologias empregadas para essa finalidade, o fato de moléculas lipídicas idênticas ou muito parecidas possuírem propriedades funcionais diversas, faz com que seja necessário elucidar e quantificar os seus precursores, produtos e as enzimas responsáveis pelo seu metabolismo. O fato de se utilizar amostras biológicas complexas como homogenato de tecido cerebral, cultura de células, ou plaquetas sem dúvida, dificulta ainda mais esses estudos. Todavia, o estudo do metabolismo dos fosfolípidos através da determinação da atividade enzimática da PLA<sub>2</sub>, é de interesse em inúmeras doenças. As plaquetas estão entre as diversas células utilizadas para determinar, *in vitro*, a atividade da PLA<sub>2</sub>. Essas células vêm sendo utilizadas como modelos periféricos de neurônios devido às suas similaridades (Padovani et al., 2001; Owens, 1994; Bush, 1998; Di Luca et al., 2002).

Alguns testes de padronização previamente definidos pelo nosso grupo tanto para tecido cerebral humano e de rato como para plaquetas, foram mantidos. Entre esses, estão o tempo de incubação, onde se manteve o tempo de 30 minutos e o pH de 7,5 (Gattaz et al., 2004; Schaeffer e Gattaz, 2005).

Ao padronizar a quantidade de proteína obteve-se um melhor aproveitamento do substrato utilizando 0,2mg/mL de proteína conforme demonstrado na figura 8. Ao contrário de outras matrizes como tecido cerebral, a quantidade de proteínas necessárias em plaquetas para obter a atividade máxima é menor – 1,5mg/mL para tecido cerebral (Schaeffer e Gattaz, 2005) – indicando uma maior expressão da enzima em plaquetas. Porém deve-se levar em conta que células responsáveis por respostas inflamatórias, como as plaquetas, armazenam em seus grânulos grandes quantidades de sPLA<sub>2</sub> e que ao serem ativadas elas são prontamente liberadas (Kudo e Murakami, 2002). As sPLA<sub>2</sub> estão envolvidas com mecanismos de defesa e, segundo nossos achados, respondem por mais de 50% da atividade total das PLA<sub>2</sub> em plaquetas.

Com relação à concentração de substrato, apesar de haver saturação a partir de 9µL (0,045µCi), a concentração de 12 µL (0,06µCi), anteriormente definida por nosso grupo, foi mantida. Isso porque em pacientes portadores de desordem neuropsiquiátrica, como esquizofrenia e epilepsia, por exemplo, onde a atividade da PLA<sub>2</sub> está aumentada, uma quantidade maior de substrato permite uma melhor diferenciação entre pacientes e indivíduos sadios (Gattaz et al. 1987, 1990, 1995a; Tavares et al., 2003; Nojonen et al., 1993; Ross et al., 1997, 1999; Bazan, 1998; Yao et al., 2000).

Usando como substrato fosfatidilcolina com ácido araquidônico marcado com <sup>14</sup>C, encontramos que as concentrações ótimas de cálcio para obtermos as maiores atividades da PLA<sub>2</sub> foram 100µM (nas concentrações

micromolares) e 5mM (nas concentrações milimolares), mostrando que plaquetas expressam pelo menos uma PLA<sub>2</sub> de cada um dos grupos de PLA<sub>2</sub> dependentes de cálcio, ou seja, cPLA<sub>2</sub> e sPLA<sub>2</sub>, respectivamente. Esse achado está de acordo com estudos de caracterização dos diferentes grupos de PLA<sub>2</sub> com relação ao requerimento de cálcio (Kudo e Murakami, 2002; Taketo, 2002).

Na ausência de íons cálcio, ou seja, na presença do EDTA, ainda empregando como substrato fosfatidilcolina com ácido araquidônico marcado com <sup>14</sup>C, a atividade da PLA<sub>2</sub> encontrada foi muito baixa e o método não mostrou sensibilidade bastante para detectá-la. De fato, alguns trabalhos sugerem que em plaquetas a atividade da PLA<sub>2</sub> independente de cálcio (iPLA<sub>2</sub>) é muito baixa ou inexistente (Kramer, 1993). Uma explicação para essa baixa atividade é que a dependência de íons cálcio para esterificação do ácido araquidônico dos fosfolípidos é variada nas diferentes células. Nos neutrófilos, por exemplo, a esterificação não é afetada pelo Ca<sup>2+</sup>, porém em plaquetas ela é fortemente dependente de cálcio extra e intracelular (Daniele JJ et al., 1999). Nessas condições, a ausência de cálcio torna o ensaio inespecífico para determinar a atividade das iPLA<sub>2</sub>. Portanto, para a determinação da atividade das PLA<sub>2</sub> independentes de cálcio, fez-se necessário o emprego de um substrato mais específico para essa forma da enzima. Ao escolher o melhor substrato para as iPLA<sub>2</sub>, deve-se levar em conta que as mesmas hidrolisam os ácidos graxos da posição *sn*-2 dos fosfolípidos com a seguinte ordem de preferência: ácido linoleico > ácido palmítico > ácido oleico > ácido araquidônico (Farooqui et al., 2004), ou seja,

existe uma preferência maior sobre outros ácidos graxos do que sobre o ácido araquidônico. De fato, alguns autores sugerem o emprego do *L-3-Phosphatidylcholine, 1-palmitoyl-2-[1-<sup>14</sup>C]palmitoyl* como substrato para determinar a atividade das iPLA<sub>2</sub>. Os resultados obtidos com a utilização desse substrato no presente estudo mostraram que a especificidade a esse ácido graxo é maior, tornando o método mais sensível para a determinação da atividade da iPLA<sub>2</sub>.

Vale salientar a importância da detecção desta forma da enzima, visto que em estudos com tecido cerebral de ratos e de humanos, a iPLA<sub>2</sub> foi o grupo predominante, respondendo por 85% da atividade da enzima (Schaeffer e Gattaz, 2005; Jardim, 2005). Na verdade, na maioria das células não circulantes como miócitos cardíacos, ilhotas pancreáticas e células da musculatura vascular, a iPLA<sub>2</sub> é o grupo de enzima predominante. Nessas células ocorre uma inibição da atividade enzimática na presença de íons cálcio, e um aumento da atividade na ausência desses íons. Esse mecanismo de regulação é devido a uma proteína identificada como calmodulina (CaM), a qual é responsável por modular a atividade da PLA<sub>2</sub>GVIA-2 (Wolf e Gross, 1996). Através de uma análise mais detalhada da interação da PLA<sub>2</sub>GVIA-2 com a CaM, foi demonstrada a formação de um complexo ternário cataliticamente inativo, CaM-Ca<sup>2+</sup>-iPLA<sub>2</sub>, que poderia ser reversivelmente dissociado após a quelação de todo Ca<sup>2+</sup> com EGTA, fazendo com que as PLA<sub>2</sub>GVIA-2 voltassem a ter sua atividade catalítica total (Wolf et al., 1997; Jenkins et al., 2001). Com base nesses estudos,

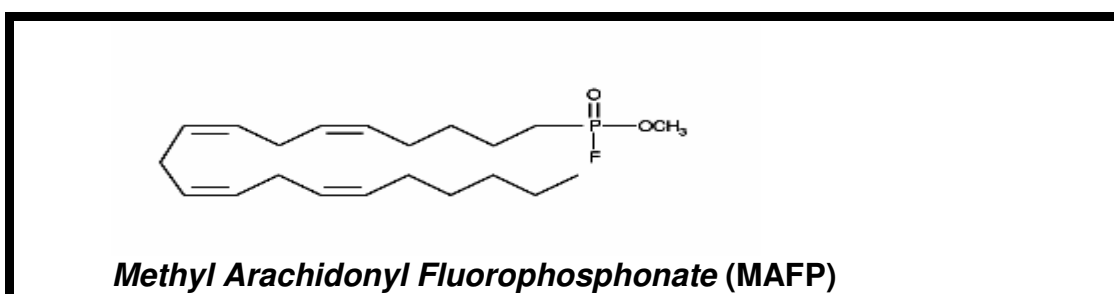
pode-se dizer que em plaquetas não existe esse mecanismo de regulação pela CaM, já que na ausência de cálcio não houve aumento de atividade.

O emprego do *L-3-Phosphatidylcholine, 1-palmitoyl-2-[1-<sup>14</sup>C]palmitoyl* como substrato para determinar a atividade da PLA<sub>2</sub> não apresentou resultados satisfatórios para a atividade das PLA<sub>2</sub> dependentes de cálcio, mesmo quando realizados sob condições ideais para esses grupos, ou seja, 100µM de CaCl<sub>2</sub> para as cPLA<sub>2</sub> e 5 mM de CaCl<sub>2</sub> para as sPLA<sub>2</sub>, demonstrando assim a preferência desses grupos de PLA<sub>2</sub> em hidrolisar o ácido araquidônico na posição *sn-2* dos fosfolípides. De fato, as cPLA<sub>2</sub> apresentam seletividade vinte vezes maior em hidrolisar o ácido araquidônico em relação ao ácido palmítico na posição *sn-2* dos fosfolípides (Kudo e Murakami, 2002; Farooqui, 2004; Taketo, 2002; Leslie, 2004). As sPLA<sub>2</sub>, apesar de não apresentarem preferência por nenhum ácido graxo na posição *sn-2* e de tenderem a agir preferencialmente sobre fosfolípides aniônicos como PG (fosfatidilglicerol), PE e PS ao invés de fosfolípides aniônicos como PC, estão envolvidas na liberação de ácido araquidônico através de diferentes mecanismos (Sun, 2004; Kudo e Murakami, 2002).

A inibição da atividade da PLA<sub>2</sub> é uma área de grande interesse não só pela necessidade de elucidar as funções de determinado grupo da enzima ou sua ocorrência em determinado grupo de células, mas também porque inibidores específicos para cada grupo seriam de potencial importância para o desenvolvimento de novas drogas para o tratamento das inflamações, *stress* oxidativo e talvez de algumas doenças

neuropsiquiátricas, como a esquizofrenia, a epilepsia e a doença de Parkinson.

Os testes de inibição foram realizados utilizando os inibidores *Methyl Arachidonyl Fluorophosphonate* (MAFP) e o *Bromoenoil Lactone* (BEL). O MAFP é um potente e irreversível inibidor da cPLA<sub>2</sub> e da iPLA<sub>2</sub>, isso porque os dois grupos da enzima apresentam mecanismos catalíticos similares e aparentemente usam uma serina central para catálise; o MAFP possui uma cauda araquidonil ligada ao grupamento reativo serina (Balsinde et al., 1999). MAFP não tem efeito sobre as sPLA<sub>2</sub>, já que o centro catalítico desse grupo de enzimas é um grupamento histidina.



**Figura 21:** Estrutura química do MAFP

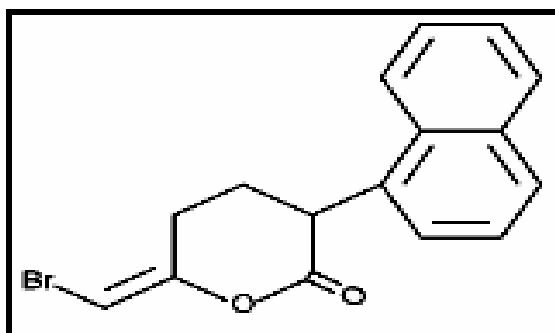
Todavia, os ensaios de inibição com MAFP, além da inibição da cPLA<sub>2</sub> e iPLA<sub>2</sub>, ou seja, nas condições de ensaio ideais para os dois grupos da enzima (100  $\mu$ M de CaCl<sub>2</sub> e fosfatidilcolina com ácido araquidônico marcado com <sup>14</sup>C para cPLA<sub>2</sub>, e ausência de cálcio e fosfatidilcolina com

ácido palmítico marcado com  $^{14}\text{C}$  para  $i\text{PLA}_2$ ), houve inibição também da  $s\text{PLA}_2$  (5mM de  $\text{CaCl}_2$  e fosfatidilcolina com ácido araquidônico marcado com  $^{14}\text{C}$ ) conforme ilustram as figuras 13 e 14. Esses dados sugerem que apesar do mecanismo de ação do MAFP ser a interação direta com o sítio ativo serina, podem ocorrer mudanças que levariam a interação com outros sítios ativos, ou ainda provocando alterações na estrutura do substrato, que também levaria a uma inibição não específica (Farooqui et al., 1999).

Um trabalho recente de Lucas e Dennis (2005), destacou o cuidado que se deve ter com a forma comercial dos inibidores, mostrando que o MAFP comercializado na forma liofilizada apresenta alto grau de oxidação, fazendo com que seu efeito inibitório seja o oposto do esperado, ou seja, essa forma de MAFP inibiria as  $s\text{PLA}_2$ , mas não as  $c\text{PLA}_2$ . O efeito de inibição sobre a  $c\text{PLA}_2$  ocorreria com a forma comercializada em solução de metil acetato. Nossos testes com as duas formas do inibidor não apresentaram diferenças na forma de inibição; ambos inibiram os diferentes grupos de  $\text{PLA}_2$  (figura 15). Mediante esses resultados, não podemos concluir se a forma de apresentação do substrato pode acarretar uma inibição inespecífica. Para confirmar esses achados seria necessário utilizar grupos isolados e purificados da enzima.

O BEL é um potente e irreversível inibidor da  $i\text{PLA}_2$ . A inibição com BEL é 1000 vezes mais potente e seletiva sobre a  $i\text{PLA}_2$  do que sobre os grupos de  $\text{PLA}_2$  dependentes de cálcio ( $c\text{PLA}_2$  e  $s\text{PLA}_2$ ) (Hazen et al., 1991; Song et al., 2006). Isto é devido ao fato de o BEL ser considerado um

substrato suicida para a  $iPLA_2$  devido à sua semelhança com plasmalógenos, que são substratos para esse grupo da enzima, enquanto que as  $cPLA_2$ , por exemplo, têm preferência em hidrolisar fosfatidilcolina (Farooqui, 1999). O BEL foi desenvolvido, a princípio, como um inibidor de proteases serinas, todavia, hoje se sabe que ele afeta mais do que um tipo de enzima (Song et al., 2006). Estudos recentes com espectrometria de massa demonstram que o BEL, ao se ligar a  $iPLA_2$ , promove a formação de um composto enzimático intermediário, a pseudo enzima *bromomethyl keto acid* (BMKA), que por sua vez possui reatividade suficiente para provocar inativação catalítica de outras enzimas que possam estar concomitantemente presentes (Song et al., 2006).



**Figura 22:** Estrutura química do *Bromoenol Lactone* (BEL)

Em nossos estudos de inibição com o BEL em plaquetas, onde confirmadamente estão presentes diferentes grupos de  $PLA_2$ , não houve inibição específica da  $iPLA_2$ , e sim inibição de todos os grupos de  $PLA_2$ , nas



condições consideradas ideais para cada um. O aumento da concentração de BEL realmente pode levar a inibição da cPLA<sub>2</sub> e da sPLA<sub>2</sub>. Porém, ocorreram inibições em concentrações baixas e o IC<sub>50</sub> foi aproximadamente 100µM, sugerindo que a inativação da enzima pode ocorrer por outros mecanismos como a alquilação pela BMKA.

Verificamos que em plaquetas, onde diferentes grupos de PLA<sub>2</sub> ocorrem concomitantemente, não é viável construir curvas com concentrações crescentes de inibidores a fim de se determinar dois ou mais IC<sub>50</sub>, um para cada grupo da enzima. Esses achados confirmam alguns estudos sobre os diferentes mecanismos de ação desses inibidores, os quais levariam à inibição de diferentes formas da enzima, ou ainda, em concentrações altas interfeririam na integridade do substrato levando a uma inibição inespecífica da atividade enzimática (Lucas e Dennis, 2005; Farooqui et al., 1999).

Quando se utilizam condições ideais para determinar a atividade de um grupo da PLA<sub>2</sub>, o uso de inibidores e o conhecimento de seus mecanismos de ação são fundamentais para confirmação da presença de determinado grupo da enzima. Um exemplo claro é a utilização do BEL para confirmar que a atividade encontrada com o novo substrato proposto, ou seja, fosfatidilcolina com ácido palmítico marcado com <sup>14</sup>C, se devia realmente a iPLA<sub>2</sub> e não a cPLA<sub>2</sub>GIVC, que também apresenta atividade independente de cálcio. O subgrupo cPLA<sub>2</sub>GIVC não é inibido pelo BEL

(Lucas e Dennis, 2005), portanto, a inibição de 96% da atividade enzimática, conforme demonstra a figura 20, confirma a presença da iPLA<sub>2</sub>.

## 6. CONCLUSÕES

Estabeleceu-se um método preciso e sensível para determinar a atividade dos diversos grupos de PLA<sub>2</sub> presente em plaquetas.

A utilização das propriedades específicas de cada grupo de PLA<sub>2</sub>, bem como, de seus inibidores e ativadores são primordiais para determinar a atividade de grupos isolados da enzima.

O uso de inibidores, in vitro, com a finalidade de identificar os diferentes grupos de PLA<sub>2</sub>, deve ser feito com cautela, levando-se em conta os mecanismos de ação e as limitações de cada um. Principalmente, quando se trata de amostras biológicas complexas, com mais de um grupo da enzima presente. Porém, o uso desses inibidores para confirmar a presença da enzima é fundamental.

As plaquetas, amostra utilizada nesse estudo, expressam pelo menos uma enzima de cada um dos três principais grupos de PLA<sub>2</sub>: sPLA<sub>2</sub>, cPLA<sub>2</sub> e iPLA<sub>2</sub>. Podendo então, ser utilizadas como células periféricas para estudos de alterações de atividade da PLA<sub>2</sub>.

As alterações da atividade da PLA<sub>2</sub>, medidas com o método proposto, poderão ser utilizadas como um marcador biológico periférico para diversas doenças neuropsiquiátricas.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agranoff BW, Benjamins JA, Hajra AK. Lipids in: Siegel GJ, Agranoff BW, Albers RW, Molinoff PB (eds.). *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular, and Medical Aspects*. 6th ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers; 1999. p.731-41.

Avanzini G & Franceschetti S. Cellular biology of epileptogenesis. *The Lancet Neurology*. 2003; 2: 33-42.

Balsinde J, Balboa MA, Insel PA, Dennis EA. Regulation and inhibition of phospholipase A2. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 1999; 39:175-89.

Balsinde J, Dennis EA. Distinct roles in signal transduction for each of the phospholipase A2 enzymes present in P388D1 macrophages. *J Biol Chem*. 1996; 271:6758-65.

Balsinde J, Winstead MV, Dennis E. Phospholipase A2 regulation of arachidonic acid mobilization. *FEBS Letters*. 2002; 531:2-6.

Barany M, Chang YC, Arus C, Rustan T, Frey WH. Increased glycerol-3-phosphorylcholine in post-mortem Alzheimer's brain. *Lancet*. 1985; 1: 517.

Bazan NG. The neuromessenger platelet-activating factor in plasticity and neurodegeneration. *Progress in Brain Research*. 1998; 118: 281-291.

Bazan NG, Colangelo V & Lukiw WJ. Prostaglandins and other lipid mediator in Alzheimer's disease. *Prostaglandins & others Lipid Mediators* 2002; 68-69: 197-210.

Bazan NG, Zorumski CF & Clarck GD. The activation of phospholipase A<sub>2</sub> and release of arachidonic acid and other lipid mediators at the sinapse: The role of platelet activating factor. *J Lipid Mediators*. 1993; 6: 421-427.

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

Blusztajn JK, Wurtman RJ. Choline and cholinergic neurons. *Science* 1983; 221: 614-620.

Bonventre, JV. Erratum to "Roles of phospholipases A<sub>2</sub> in brain cell and tissue injury associated with ischemia and excitotoxicity. *J. Lipid Mediators Cell Signalling*.1997; 17: 71-79

Brown GG, Levine SR, Gorell JM, Pettegrew JW, Gdowski JW, Bueri JA, Helpern JA, Welch KMA. In vivo <sup>31</sup>P NMR profiles of Alzheimer's disease and multiple subcortical infarct dementia. *Neurology*.1989; 39: 1423-1427.

Bush AI, Tanzi RE. Alzheimer disease-related abnormalities of amyloid  $\beta$  precursor protein isoforms in the platelet. *Arch Neurol* 1998; 55: 1179 – 1180.

Caporaso GL, Gandy SE, Buxbaum JD, Ramabhadran TV, Greengard P Protein phosphorylation regulates secretion of Alzheimer  $\beta$ A4 amyloid precursor protein. *Proc Natl Acad Sci USA*1992; 89: 3055-3059.

Chakraborti S. Phospholipase A<sub>2</sub> isoforms: a perspective. *Cell Signal*. 2003;15:637-65.

Daniele JJ, Fidelio GD, Bianco ID. Calcium dependency of arachidonic acid incorporation into cellular phospholipids of different cell types. *Prostaglandins & other Lipid Mediators* 1999; 57 341-350.

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

Deicken RF, Merrin EL, Floyd TC & Weiner MW. Correlation between left frontal phospholipids and Wisconsin card sort test performance in schizophrenia. *Schizophr Research*. 1995; 14: 177-181.

Di Luca M, Colciaghi F, Pastorino L, Borroni B, Padovani A, Cattabeni F. Platelets as a peripheral district were to study pathogenetic mechanisms of Alzheimer disease: The case of amyloid precursor protein. *European Journal of Pharmacology*. 2000; 405: 277-283.

Edwards RW, Peet M. Essential Fatty Acid Intake in Relation to Depression in Peet M., Glen I, Horrobin DF. *Phospholipid Spectrum Disorders in Psychiatry*. Lancashire UK: Marius Press; 1999.

Emmerling MR, Moore CJ, Doyle PD, Carroll RT, Davis RE. Phospholipase A<sub>2</sub> activation influences the processing and secretion of the amyloid precursor protein. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; 197: 292-297.

Engel JJ. Introduction to temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Research*. 1996; 26: 141-50.

Farooqui AA, Horrocks LA. Brain phospholipases A<sub>2</sub>: a perspective on the history. *Prostaglandins, Leucotrienes and Essential Fatty acids* 2004; 71: 161-169

Farooqui AA, Horrocks LA. Phospholipase A<sub>2</sub>-Generated Lipid mediators in the Brain: The Good, the Bad, and the Ugly. *The Neuroscientist*. 2006; 12: 245-60.

Farooqui AA, Horrocks LA. Plasmalogens: Workhorse Lipids of Membranes in Normal and Injured Neurons and Glia. *The Neuroscientist*. 2001; 7: 232-45.

Farooqui AA, Horrocks LA, Farooqui T. Glycerophospholipids in brain: Their metabolism, incorporation into membranes, functions, and involvement in neurological disorders. *Chemistry and Physics of Lipids*. 2000; 106: 1-29.

Farooqui AA, Litsky ML, Farooqui T, Horrocks LA. Inhibitors of intracellular phospholipase A<sub>2</sub> activity: Their neurochemical effects and Therapeutical importance for neurological disorders. *Brain Research Bulletin*. 1999; 49: 139-153.

Farooqui AA, Yang HC, Horrocks L. Involvement of phospholipase A<sub>2</sub> in neurodegeneration. *Neurochem. Int*. 1996; 30: 517-522.

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

Feuerstein GZ. Platelet-activating factor: a case for its role in CNS function and brain injury. *J. Lipid Mediators Cell signaling*. 1996;14: 109-114.

Flesch I, Schmidt B, Ferber E. Acyl chain specificity and kinetic properties of phospholipase A1 and A2 of bone marrow-derived macrophages. *ZNaturforsch [C]*. 1985; 40(5-6): 356-63.

Forlenza OV, Wacker P, Nunes PV, Yacubian J, Castro CC, Otaduy MC, Gattaz WF. Reduced phospholipid breakdown in Alzheimer's brains: a <sup>31</sup>P spectroscopy study. *Psychopharmacology (Berl)*. 2005;180: 359-65.

Frazer A, Molinoff P, Winokur A. A Neuroleptic Pharmacology in Biological Bases of brain and Disease. *Raven Press Ed.*, New York 1994; 446-456.

Fujimoto T, Nakano T, Takano T, Hokazono Y, Asakura T & Tsuji T. Study of chronic schizophrenics using <sup>31</sup>P magnetic resonance chemical shift imaging. *Acta Psychiatr Scand*. 1992; 86: 455-462.

Fukushima D, Konishi M, Maruyama K, Miyamoto T, Ishiura S, Suzuki K. Activation of the secretory pathway leads to a decrease in the intracellular amyloidogenic fragments generated from the amyloid protein precursor. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; 194: 202-207.

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

Gattaz WF, Brunner J. Phospholipase A<sub>2</sub> and the hypofrontality hypothesis of schizophrenia. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*.1996; 55(1-2):109-13.

Gattaz WF, Forlenza OV, Talib LL, Barbosa NR & Bottino CM. Platelet phospholipase A<sub>2</sub> activity in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *J Neural Transm*. 2004; 111(5):591-601.

Gattaz WF, Hübner CK, Nevalainen TJ, Thuren T, Kinnunen PKJ. Increased serum phospholipase A<sub>2</sub> activity in schizophrenia: a replication study. *Biol Psychiatry*. 1990; 28: 495-501.

Gattaz WF, Köllisch M Thuren T, Virtanen JA & Kinnunen PKJ Increased plasma phospholipase A<sub>2</sub> activity in schizophrenic patients: reduction after neuroleptics therapy. *Biol Psychiatry*. 1987; 22: 421-426.

Gattaz WF, Maras A, Cairns NJ, Levy R, Förstl H. Decreased phospholipase A<sub>2</sub> activity in Alzheimer brains. *Biol Psychiatry*.1995b; 37: 13-17.

Gattaz WF, Steudle A, Maras A. Increased platelet phospholipase A<sub>2</sub> in schizophrenia. *Schizophrenia Research*. 1995; 16: 1 –6.

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 of two diseases. *Schizophrenia Research*. 1994; 12: 53-61

Gross RW, Jenkins XM, Yang J, Mancuso DJ, Han X. Functional lipidomics: the roles of specialized lipids and lipid-protein interaction in modulating neuronal function. *Prostaglandins & other Lipid Mediators*. 2005; 77: 52-64.

Haass C, Selkoe DJ. Cellular processing of  $\beta$ -amyloid precursor protein and the genesis of amyloid  $\beta$ -peptide. *Cell*. 1993; 75: 1039-1042.

Hazen LS, Zupan LR, Weiss RH, Getman DP, Gross RW. Suicide Inhibition of Canine Myocardial Cytosolic Calcium-Independent Phospholipase A<sub>2</sub>. *J. Biological Chemistry*. 1991; 266: 7227-32.

Hibbeln JR, Palmer JW, Davis JM. Are disturbances in lipid-protein interactions by phospholipase A<sub>2</sub> a predisposing factor in affective illness?. *Biol Psychiatry*. 1989; 25: 945-61.

Hinsberger AD, Williamson PC, Carr TJ, Stanley JA, Drost DJ, Desnmore M, Macfabe GC & Montemurro DG. Magnetic resonance imaging volumetric and <sup>31</sup>P phosphorous magnetic resonance spectroscopy measurements in schizophrenia. *J Psychiatry neurosci*. 1997; 22: 111-117.

Hiroaki C, Hideo M, Koji W, Mariko S, Satoshi K, Kousaku O, Hiroshi M, Hideshi T, Yuji I. Cloning of a Gene for a Novel Epithelium-specific Cytosolic Phospholipase A<sub>2</sub>, cPLA<sub>2</sub>δ, Induced in Psoriatic Skin. *J Biological Chemistry*. 2004; 279: 12890 – 97.

Hirabayashi T, Shimizu T. Localization and regulation of cytosolic phospholipase A<sub>2</sub>. *Biochim Biophys Acta*. 2000;1488:124-38.

Hölscher C, Rose SP. Inhibitors of phospholipase A<sub>2</sub> produce amnesia for a passive avoidance task in the chick. *Behav Neural Biol*. 1994; 61: 225-32.

Horrobin DF, Bennett CN . The membrane phospholipid concept of schizophrenia In Gattaz WF, Häfner H. *Search for the Causes of schizophrenia*. 1999. Springer. Heidelberg.

Horrobin DF, Bennett CN. Depression and bipolar disorder: relationships to impaired fatty acid and phospholipids metabolism and to diabetes, cardiovascular disease, immunological abnormalities, cancer, ageing and osteoporosis. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*. 1999b; 60: 217-34.

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<sup>a</sup> ed. Lancashire UK: Marius Press; 2003.

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

Horrobin DF, Manku MS, Hilman H, Iain A & Glen M. Fatty acid levels in the brains of schizophrenics and normal controls. *Biol Psychiatry*. 1991; 30: 795-805.



Jardim LSA, Efeitos da atividade da fosfolipase A<sub>2</sub> nos receptores dopaminérgicos: implicações para a esquizofrenia. *Tese apresentada a Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em ciências*. 2005.

Jenkins CM, Wolf MJ, Mancuso DJ, Groos RW. Identification of the calmodulin binding domain of recombinant calcium-independent phospholipase A<sub>2</sub>. *J Biol Chem*. 2001; 276: 7129-35.

Jones OT. Ca<sup>2+</sup> Channels and epilepsy. *European journal of Pharmacolog*. 2000; 447: 211-225.

Kanfer JN, Hattori H, Orihel D. Reduced phospholipase D activity in brain tissue samples from Alzheimer's disease patients. *Ann Neurol*. 1986; 20: 265-267.

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

Kramer RM, Roberts EF, Manetta JV, Hislop PA, Jakubowski JA. Trombin-induced phosphorylation and activation of Ca<sup>(+2)</sup>-sensitive cytosolic phospholipase A<sub>2</sub> in human platelets. *J Biol Chem*. 1993; 268: 26796-804.

Kudo I, Murakami M . Phospholipase A<sub>2</sub> enzymes. *Prostaglandins & others Lipid Mediators*. 2002; 68-69: 3-58.

Larsson PKA, Kennedy BP, Claesson HE. The human calcium-independent phospholipase A<sub>2</sub> gene: multiple enzymes with distinct properties from a single gene. *Eur J Biochem*. 1999;262:575-85.

Larsson PKA, Claesson HE, Kennedy BP. Multiple splice variants of the human calcium-independent phospholipase A<sub>2</sub> and their effect on enzyme activity. *J Biol Chem*. 1998; 273:207-14.

Lautens LL, Chiou XG, Sharp JD, Young III WS, Sprague DL, Ross LS, Felder CC. Cytosolic phospholipase A<sub>2</sub> (cPLA<sub>2</sub>) distribution in murine brain and functional studies indicate that cPLA<sub>2</sub> does not participate in muscarinic receptor-mediated signaling in neurons. *Brain Research*. 1998; 809: 18-30.

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

Lucas KK, Dennis EA. Distinguishing phospholipase A<sub>2</sub> types in biological samples by employing group-specific assays in presence of inhibitors. *Prostaglandins & other Lipid mediators*. 2005; 77; 235-248.

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 A<sub>2</sub>. *J Biol Chem*. 2000; 275:9937-45.

Marsh L, Rao V. Psychiatric complications in patients with epilepsy: a review. *Epilepsy Research*. 2002; 49: 11-33.

Marsh L, Sullivan EV, Morrell M, Lim KO, Pfefferbaum A. Structural brain abnormalities in patients with schizophrenia, epilepsy with chronic interictal psychosis. *Psychiatry Research Neuroimaging*. 2001; 108: 1-15.

Matoth I, Pinto F, Sicsic C, Brenner T. Inhibitory effect of carbamazepine on inflammatory mediators produced by stimulated glial cells. *Neuroscience Research*. 2000; 38: 209-212.

Nalefski EA, Falke JJ. The C2 domain calcium-binding motif: structural and functional diversity. *Protein Sci*. 1996;5: 2375-90.

Nalefski EA, McDonagh T, Somers W, Seehra J, Falke JJ, Clark JD. Independent folding and ligand specificity of the C2 calcium-dependent lipid binding domain of cytosolic phospholipase A<sub>2</sub>. *J Biol Chem*. 1998; 273: 1365-72.

Nalefski EA, Sultzman LA, Martin DM, Kriz RW, Towler PS, Knopf JL, Clark JD. Delineation of two functionally distinct domains of cytosolic phospholipase A<sub>2</sub>, a regulatory Ca<sup>2+</sup>-dependent lipid-binding domain and a Ca<sup>2+</sup>-independent catalytic domain. *J Biol Chem*. 1994; 269: 18239-49.

Nitsch RM, Blusztajn JK, Pittas AG, Slack BE, Growdon JH, Wurtman RJ. Evidence for a membrane defect in Alzheimer disease brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 1671-1675.

Noponen M, Sanfilippo M, Samanich K, Ryer H, Ko G, Angrist B, Wolkin A, Rotrosen J. Elevated PLA<sub>2</sub> activity in schizophrenics and other Psychiatric patients. *Biol Psychiatry*. 1993;34: 641-649.

Ono T, Yamada K, Chikazawa Y, Ueno M, Nakamoto S, Okuno T, Seno K. Characterization of a novel inhibitor of cytosolic phospholipase A<sub>2</sub>α, pyrrophenone. *Biochem J*. 2002; 363(Pt 3): 727-35.

Owens MJ, Nemeroff CB. Role of serotonin in the pathophysiology of depression: focus on the serotonin transporter. *Clim Chem*.1994; 40: 288-295.

Padovani A, Borroni B, Colciaghi F, Pastorino L, Archetti S, Cottini E, Caimi L, Cattabeni F, Di Luca M. Platelet amyloid precursor protein forms in AD: a peripheral tool and a pharmacological target. *Mechanisms of Ageing and Development*. 2001; 122: 1997 – 2004.

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

Peet M, Laugharne JDE, Horrobin DF, Reynolds GP. Arachidonic acid: A common link in the biology of schizophrenia? *Arch Gen Psychiatry*. 1994; 51: 665-666.

Peterson GL. Review of the Folin phenol protein quantitation method of Lowry, Rosebrough, Farr and Randall. *Anal Biochem*. 1979; 100(2): 201-20.

Peterson LB, Cummings BS. A review of chromatographic methods for the assessment of phospholipids in biological samples. *Biomedical Chromatography*. 2006; 20: 227-243.

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

Pettegrew JW, Klunk WE, Panchalingam K, Kanfer JN, McClure RJ. Clinical and neurochemical effects of acetyl-L-carnitine in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 1995; 16 (1): 1-4.

Pickard RT, Strifler BA, Kramer RM, Sharp JD. Molecular cloning of two new human paralogs of 85-kDa cytosolic phospholipase A2. *J Biol Chem*. 1999; 274: 8823-31.

Piomelli D . Arachidonic acid in cell signaling *Current Opinion in Cell Biology* 1993; 5: 274-280.

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

Ross BM, Hudson C, Erlich J, Warsh JJ, Kish SJ . Increased phospholipid breakdown in schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry*. 1997; 54: 487-94.

Ross MB, Turenne S, Moszczynska A, Warsh JJ, Kish SJ. Differential alteration of phospholipase A<sub>2</sub> activities in brain of patients with schizophrenia. *Brain Res.* 1999; 821: 407-413.

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.

Schaeffer EL, Gattaz WF. Inhibition of calcium-independent phospholipase A<sub>2</sub> activity in rat hippocampus impairs acquisition of short- and long-term memory. *Psychopharmacology (Berl)*. 2005; 181(2): 392-400.

Simonato M . A pathogenetic hypothesis of temporal lobe epilepsy. *Pharmacol Res.* 1993; 27: 217-225.

Six DA, Dennis EA. The expanding superfamily of phospholipase A<sub>2</sub> enzymes: classification and characterization. *Biochim Biophys Acta.* 2000; 1488: 1-19.

Song C, Chang X -J, Bean KM, Proia MS, Knopf JL, Kriz RW. Molecular characterization of cytosolic phospholipase A<sub>2</sub>- b. *J Biol Chem.* 1999; 274: 17063-67.

Song H, Ramanadham s, Bao S, Hsu F, Turk J. A bromoenol lactone suicide substrate inactivates group VIA phospholipase A<sub>2</sub> by generating a Diffusible bromomethyl keto acid that alkylates cysteine thiols. *Biochemistry.* 2006; 45: 1061-73.

Stewart A, Ghosh M, Spencer DM, Leslie CC. Enzymatic properties of human cytosolic phospholipase A<sub>2</sub> . *J Biol Chem.* 2002; 277: 29526-36.

Sun GY, Xu J, Jensen MD, Simonyi A. Phospholipase A<sub>2</sub> in the central nervous system: implications for neurodegenerative diseases. *J. Lipid Research.* 2004; 45: 205-13.

Taketo MM, Sonoshita M. Phospholipase A<sub>2</sub> and apoptosis. *Biochimica et Biophysica Acta.* 2002; 1585: 72-76.

Tanaka H, Takeya R, Sumimoto H. A novel intracellular membrane-bound calcium independent phospholipase A<sub>2</sub>. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000; 272: 320-6.

Tavares H, Yacubian J, Talib LL, Barbosa NR, Gattaz WF. Increased Phospholipase A<sub>2</sub> activity in schizophrenia with absent response to niacin. *Schizophrenia Res.* 2002; 61: 1-6.

Underwood KW, Song C, Kriz RW, Chang XJ, Knopf JL, Lin LL. A novel calcium-independent phospholipase A<sub>2</sub>, cPLA<sub>2</sub> that is prenylated and contains homology to cPLA<sub>2</sub>. *J Biol Chem*. 1998; 273: 21926-32.

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

Weinberger DR. Implications of normal brain development for the pathogenesis of schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry*. 1987; 44: 660-669.

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

Winstead MV, Balsinde J, Dennis EA. Calcium-independent phospholipase A<sub>2</sub>: structure and function. *Biochim Biophys Acta*. 2000; 1499: 28-39.

Wolf MJ, Gross RW. The calcium-dependent association and functional coupling of calmodulin with myocardial PLA<sub>2</sub>. *J Biol Chem*. 1996; 271: 20989-92.

Wolf MJ, Wang J, Turk J, Gross RW. Depletion of intracellular calcium stores activates smooth muscle cell calcium-independent PLA<sub>2</sub>. *J Biol Chem*. 1997; 272: 1522-6.

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

Yao JK, Leonard S, Reddy RD. Membrane phospholipid abnormalities in postmortem brains from schizophrenic patients. *Schizophr Res* 2000; 42: 7-17.