

CENTRO UNIVERSITÁRIO SÃO CAMILO
Curso de Biomedicina

Priscila Signor Motta

**MECANISMOS MOLECULARES ENVOLVIDOS NA SÍNTESE DE
PROSTAGLANDINA E₂, INDUZIDA POR UMA FOSFOLIPASE A₂
OFÍDICA, EM PRÉ-ADIPÓCITOS MURINOS**

São Paulo

2017

Priscila Signor Motta

**MECANISMOS MOLECULARES ENVOLVIDOS NA SÍNTESE DE
PROSTAGLANDINA E₂, INDUZIDA POR UMA FOSFOLIPASE A₂
OFÍDICA, EM PRÉ-ADIPÓCITOS MURINOS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Biomedicina do Centro Universitário São Camilo, orientado pelo Prof. Dr. Ronni Rômulo Novaes e Brito e co-orientado pelo Dr. Elbio Leiguez Junior, como requisito para obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

São Paulo

2017

Priscila Signor Motta

**MECANISMOS MOLECULARES ENVOLVIDOS NA SÍNTESE DE
PROSTAGLANDINA E₂, INDUZIDA POR UMA FOSFOLIPASE A₂
OFÍDICA, EM PRÉ-ADIPÓCITOS MURINOS**

São Paulo, 24 de maio de 2017

Prof. Dr. Ronni Rômulo Novaes e Brito

Prof. MSc. Valter Luiz da Costa Junior

Agradecimentos

Agradeço aos meus amados pais e minha irmã por terem me concedido a oportunidade de me tornar uma profissional da saúde e por todo amor e incentivo, que foram essenciais para a minha formação, não só profissional, mas também pessoal. Obrigada por serem tão maravilhosos. Amo vocês.

Agradeço ao meu amor Ricardo, por estar comigo nessa jornada, por ter sido tão compreensivo nos momentos difíceis e nas longas horas de estudo. Obrigada por me incentivar a seguir meu coração. Você é muito especial para mim. Te amo.

Agradeço as minhas amigas, Daniele Belo e Fabíola Leite, colegas de aula e companheiras de vida. Obrigada por todos os momentos inesquecíveis nesses anos de faculdade. Adoro vocês.

Agradeço aos meus orientadores do Instituto Butantan, Dr. Elbio Leiguez Junior e Dra. Catarina Teixeira, pela oportunidade e pelos ensinamentos durante minha Iniciação Científica e agradeço principalmente por terem feito eu me apaixonar pela pesquisa.

Agradeço ao Professor Ronni, por aceitar orientar meu Trabalho de Conclusão de Curso, pelos ensinamentos e conselhos sobre pesquisa. Muito obrigada! Agradeço também a todos os professores do Centro Universitário São Camilo por compartilharem seus conhecimentos para que nós, alunos, desenvolvêssemos pensamento crítico e ético.

O presente estudo foi desenvolvido no laboratório de Farmacologia, Unidade de Inflamação, do Instituto Butantan sob a orientação do Dr. Elbio Leiguez Junior e da Dra. Catarina Teixeira, com apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, processo 2015/124701-3 e 2011/23236-4.

Em tempo, com este estudo, fui agraciada com o prêmio Jovem Cientista do ano de 2016, na categoria Iniciação Científica, do Instituto Butantan.

“O futuro pertence àqueles que acreditam na beleza de seus sonhos”.

Eleanor Roosevelt

MOTTA, Priscila Signor. **Mecanismos moleculares envolvidos na síntese de prostaglandina E₂, induzida por uma fosfolipase A₂ ofídica, em pré-adipócitos murinos**. 2017. 45f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Biomedicina) – Centro Universitário São Camilo, São Paulo, 2017.

As peçonhas de serpentes da família Viperidae contêm teores elevados de enzimas lipolíticas, da família das fosfolipases A₂ (FLA₂s). A partir do veneno da serpente *Bothrops asper*, foi isolada a FLA₂ MT-III, com potente atividade inflamatória e capacidade de ativar diferentes funções de células imunocompetentes. Esta enzima apresenta homologia estrutural e funcional com as FLA₂s secretadas de mamíferos, do grupo IIA, encontradas em níveis elevados em pacientes com doenças de natureza inflamatória. Desse modo, a MT-III constitui uma ferramenta científica útil para o esclarecimento de processos fisiopatológicos associados à inflamação. A obesidade é uma doença metabólica, de natureza inflamatória, cuja incidência aumentou drasticamente nas últimas décadas, representando um fator de risco para a perda da saúde na sociedade contemporânea. Foi demonstrado que as FLA₂s, do grupo IIA, encontram-se em níveis elevados no soro de pacientes obesos e no tecido adiposo inflamado, sugerindo um papel para este grupo de enzimas no desencadeamento e/ou desenvolvimento da obesidade. No entanto, até o presente, as ações destas enzimas, em pré-adipócitos, não estão esclarecidas. É conhecido que a PGE₂ exerce efeitos antilipolíticos em adipócitos e acarreta acúmulo de lipídios nestas células, contribuindo para a diferenciação de pré-adipócitos em adipócitos maduros. Desse modo, este estudo investigou a capacidade da MT-III induzir a biossíntese de PGE₂ e os mecanismos envolvidos neste efeito, com foco: *i*) na participação da ciclooxigenase-1 (COX-1) e -2 (COX-2) e dos receptores de PGE₂ (EP1-EP4), *ii*) na expressão proteica da COX-1 e COX-2, *iii*) do receptor EP4 e *iv*) da prostaglandina E sintase -1 microssomal (PGESm-1). A MT-III induziu um aumento significativo da liberação de PGE₂ desde a 1^a até a 12^a hora de incubação. O tratamento prévio dos pré-adipócitos com os inibidores da COX-1 ou COX-2 ou com o antagonista do receptor EP4 reduziu, significativamente, a liberação de PGE₂ induzida pela MT-III. Além disso, a MT-III induziu um aumento significativo da expressão proteica de COX-2 na 6^a e 12^a hora de incubação e da mPGES-1 já na 1^a hora de incubação. Assim, este estudo demonstrou que a MT-III é capaz de ativar diretamente os pré-adipócitos para a produção de PGE₂ dependente da COX-1, COX-2 e do receptor EP4. Ainda, o aumento dos níveis proteicos da COX-2 e da PGESm-1 deve contribuir para a síntese de PGE₂, induzida pela MT-III. Neste sentido, os pré-adipócitos são células alvo para as FLA₂ secretadas, do grupo IIA, responsáveis pela biossíntese da PGE₂, um importante mediador implicado no desencadeamento e desenvolvimento da obesidade.

Palavras-Chave: Fosfolipase A₂. 3T3-L1. Eicosanoides. Inflamação.

MOTTA, Priscila Signor. **Molecular mechanisms involved in synthesis of prostaglandin E₂ induced by an ophidian phospholipase A₂ in murine preadipocytes**. 2017. 45p. Course conclusion work. (Degree in Biomedicine) - Centro Universitário São Camilo, São Paulo, 2017.

Viperidae snake venoms contain high levels of lipolytic enzymes from the phospholipase A₂ (PLA₂) family. MT-III, a group IIA secreted PLA₂ (sPLA₂), isolated from *Bothrops asper* snake venom, shows potent inflammatory activity and ability to activate different functions of immunocompetent cells. This enzyme shows structural and functional homology with group IIA secreted PLA₂ from mammals, found in high levels in patients with inflammatory diseases. Thus, MT-III is an useful scientific tool for elucidating pathophysiological processes associated with inflammation. Obesity is a metabolic disease of inflammatory nature, whose incidence has increased dramatically in the last decades, representing a risk factor for the loss of health in the contemporary society. Group IIA PLA₂s have been shown to be elevated in the serum of obese patients and in inflamed adipose tissue, suggesting a role for this group of enzymes in triggering and/or developing of obesity. However, the actions of sPLA₂ on preadipocytes are still unknown. PGE₂ exerts anti-lipolytic effects on adipocytes leading to accumulation of lipids in these cells contributing to differentiation of preadipocytes in mature adipocytes. This study investigated the ability of MT-III to induce PGE₂ biosynthesis and the mechanisms involved in this effect, focusing on the participation of cyclooxygenase-1 (COX-1) and -2 (COX-2) and PGE₂ receptors (EP1-EP4) and protein expression of COX-1 and COX-2, EP4 receptor and microsomal prostaglandin E synthase -1 (mPGES-1) were also evaluated. MT-III induced a significant increase of PGE₂ release at 1 up to 12 hours. Pretreatment of preadipocytes with COX-1 or COX-2 inhibitors or EP4 antagonist significantly reduced the release of PGE₂ induced by MT-III. Moreover, MT-III induced a significant increase of COX-2 protein expression at 6 up to 12 hours and protein expression of mPGES-1 at the first hour. Together, this study showed that MT-III is able to directly activate preadipocytes to produce PGE₂ dependent on COX-1, COX-2 and EP4 receptor. Furthermore, preadipocytes are target cells for group IIA secreted PLA₂, responsible for PGE₂ biosynthesis, an important mediator implicated in the triggering and development of obesity.

Keywords: Phospholipase A₂. 3T3-L1. Eicosanoids. Inflammation.

Lista de Figuras

Figura 1 - Efeito da MT-III na atividade metabólica de pré-adipócitos 3T3-L1, em cultura.....	24
Figura 2 - Efeito da MT-III na liberação de PGE ₂ , em pré-adipócitos 3T3-L1, em cultura.....	25
Figura 3 - Efeito de inibidores da COX-1 e da COX-2 na liberação de PGE ₂ induzida pela MT-III em pré-adipócitos 3T3-L1, em cultura.....	27
Figura 4 - Efeito da MT-III na expressão protéica de COX-1 ou COX-2 por pré-adipócitos 3T3-L1, em cultura.....	29
Figura 5 - Efeito da MT-III na expressão proteica de PGESm-1 por pré-adipócitos 3T3-L1, em cultura.....	31
Figura 6 - Efeito dos antagonistas dos receptores E1, EP2, EP3 ou EP4 na liberação de PGE ₂ , induzida pela MT-III em pré-adipócitos 3T3-L1, em cultura.....	33
Figura 7 - Efeito da MT-III na expressão proteica do receptor EP4 por pré-adipócitos 3T3-L1, em cultura.....	35
Figura 8 - Representação esquemática dos mecanismos envolvidos na biossíntese de PGE ₂ , induzido pela MT-III, em pré-adipócitos da linhagem 3T3-L1.....	39

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Crescimento de pré-adipócitos após 24 horas de adição a microplacas de 12 poços.....	23
Tabela 2 - Crescimento de pré-adipócitos após 48 horas de adição a microplacas de 12 poços.....	23
Tabela 3 - Crescimento de pré-adipócitos após 72 horas de adição a microplacas de 12 poços.....	23
Tabela 4 - Crescimento de pré-adipócitos após 96 horas de adição a microplacas de 12 poços.....	23

Lista de Abreviaturas

COX-1	Ciclooxigenase 1
COX-2	Ciclooxigenase 2
FLA ₂	Fosfolipase A ₂
sFLA ₂	Fosfolipase A ₂ secretada
MT-III	Miotoxina III
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
PGES	Prostaglandina E sintase
PGESm-1	Prostaglandina E sintase microssomal 1

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
1.1 Fosfolipases A ₂	12
1.2 Tecido Adiposo e os mediadores lipídicos	15
1.3 Biossíntese de Prostaglandina E ₂	16
2 OBJETIVO.....	18
2.1 Objetivos Gerais	18
2.2 Objetivos Específicos	18
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	19
3.1 Fosfolipase A ₂	19
3.2 Cultivo da linhagem de pré-adipócitos 3T3-L1	19
3.3 Ensaio para determinação da atividade metabólica: redução do brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil) 2,5-difenil-2H-tetrazolium (MTT)	19
3.4 Determinação das concentrações de prostaglandina E ₂ (PGE ₂) no sobrenadante dos pré-adipócitos 3T3-L1.....	20
3.5 Análise quantitativa da COX-1 e -2, da PGESm-1 e do receptor EP4 por Western blotting.....	20
3.6 Intervenções Farmacológicas	21
3.6 Análise estatística	21
4 RESULTADOS	22
4.1 Cultura da linhagem de pré-adipócitos 3T3-L1	22
4.2 Efeito da Miotoxina-III (MT-III) na viabilidade dos pré-adipócitos 3T3-L1	24
4.3 Efeito da MT-III sobre a liberação de PGE ₂ por pré-adipócitos 3T3-L1	25
4.4 Participação das ciclooxigenases (COX-1 e COX-2) na liberação de PGE ₂ , induzida pela MT-III em pré-adipócitos 3T3-L1.....	26
4.5 Efeito da MT-III na expressão proteica da COX-1 e COX-2 em pré-adipócitos 3T3-L1.....	28
4.6 Efeito da MT-III na expressão proteica da prostaglandina sintase microssomal-1 (PGESm-1) em pré-adipócitos 3T3-L1.....	30
4.7 Participação dos receptores de prostaglandina (EP1-EP4) na liberação de PGE ₂ , induzida pela MT-III, em pré-adipócitos 3T3-L1.....	32
4.8 Efeito da MT-III na expressão proteica receptor EP4, em pré-adipócitos 3T3-L1	34

5 DISCUSSÃO	36
6 CONCLUSÃO.....	39
REFERÊNCIAS.....	40

1 INTRODUÇÃO

As toxinas animais desempenham um papel singular nas ciências biomédicas. Durante o processo evolutivo, essas toxinas sofreram um refinamento de suas estruturas químicas, para atuarem em alvos específicos de suas presas. Desse modo, as toxinas animais purificadas têm sido utilizadas como ferramentas científicas úteis para estudos de processos e mecanismos fisiológicos e fisiopatológicos, dentre outras finalidades. Neste contexto, encontram-se as fosfolipases A₂.

1.1 Fosfolipases A₂

As fosfolipases A₂ (FLA₂s) constituem uma ampla família de enzimas, com inúmeras funções biológicas, que abrangem desde a síntese e o reparo de membranas até à geração de segundos mensageiros, envolvidos em processos biológicos e transdução de sinais (VALENTIN; LAMBEAU, 2000; BROWN; CHAMBERS; DOODY, 2003). Estas enzimas são abundantes na natureza e estão presentes em altas concentrações em venenos de serpentes, abelhas e vespas e no suco pancreático de mamíferos (HARRIS, 1991). As FLA₂s hidrolisam a ligação acil-éster, na posição sn-2 de fosfolipídios, gerando ácidos graxos livres, tais como o ácido araquidônico (AA), o ácido oleico (AO) e lisofosfolipídios, como o liso-PAF (VALENTIN; LAMBEAU, 2000). A reação de hidrólise é dependente de íons cálcio e a unidade catalítica da enzima é constituída pelos aminoácidos His 48, Asp 99 e uma molécula de água (RIZZO et al., 2000).

A superfamília das FLA₂s foi dividida em FLA₂s secretadas (sFLA₂) e FLA₂ intracelulares, sendo estas últimas representadas pelas enzima citosólicas (cFLA₂), independentes de Ca⁺² (iFLA₂), acetil-hidrolases do fator ativador de plaquetas (PAF-AH), as fosfolipases lisossomais e a FLA₂ específica do tecido adiposo (AdFLA₂) (SCHALOSKE; DENNIS, 2006; DULCAN et al., 2008). Até o momento, as FLA₂s estão divididas em 15 grupos, com diversos subgrupos, de acordo com critérios físico-químicos (BROWN et al., 2003; DAVIDSON; DENNIS, 1990; HEINRIKSON et al., 1977; RIZZO et al., 2000; SIX; DENNIS, 2000; SCHALOSKE; DENNIS, 2006, MURAKAMI et al., 2011).

As fosfolipases A_2 secretadas (sFLA₂s), de mamíferos, consistem em 13 grupos (IB, IIA, IIC, IID, IIE, IIF, III, V, X, XI IA, XIIB e otoconin-95) e estão subdivididos em sFLA₂s estruturalmente típicas (I, II, V e X) e dois outros grupos de atípicas (III e XII) (LAMBEAU; GELB, 2008). Parte de seus efeitos, na função celular, é dependente da liberação de derivados do ácido araquidônico e de lisofosfolipídeos (RIZZO et al., 2000). Outros efeitos estão associados à ligação da enzima a receptores específicos de membranas, descritos como do tipo M (muscular) e N (neuronal) (LAMBEAU; LAZDUNSKI, 1999; SILLIMAN et al., 2002; GRANATA et al., 2005). O grupo IIA, de interesse neste estudo, compreende as sFLA₂s presentes em fluidos inflamatórios de mamíferos e aquelas presentes em venenos de serpentes da família Viperidae (HARRIS et al., 1991). Este grupo de enzimas de mamíferos tem implicações em doenças de origem inflamatória, tal como a síndrome do desconforto respiratório no adulto, o choque séptico, a pancreatite aguda (KIM et al., 1995; SCHRODER et al., 1980; VADAS, 1984; VADAS; PRUZANSKI, 1986), as doenças autoimunes (artrite reumatóide, doença de Crohn e colite ulcerativa) (HAAPAMAKI et al., 1998, 1999; LIN et al., 1996), além da asma brônquica e rinite alérgica (CHILTON et al., 1996; STADEL et al., 1994; MURAKAMI et al., 2011). Ainda, estudos recentes relacionaram as sFLA₂s a doenças metabólicas inflamatórias, como a aterosclerose e a obesidade (GARCES et al., 2010; DUTOUR et al., 2010; HUI et al., 2012). Na obesidade, foram implicadas as fosfolipases A_2 secretadas do grupo IB, IIA, V, X e XVI. As sFLA₂s do grupo IB e X atuam como "sFLA₂s digestivas" e participam, indiretamente, do acúmulo de gordura corporal, por controlarem a digestão de fosfolipídios e a absorção dos mesmos no trato gastrointestinal (HUGGINS et al., 2002; SATO et al., 2011). Em contrapartida, as sFLA₂s do grupo V, importantes no controle do metabolismo energético, estão relacionadas à proteção contra desordens metabólicas. Na obesidade, o grupo V controla as populações de macrófagos do tipo M1, no tecido adiposo e na inflamação (MURAKAMI et al., 2014). As FLA₂s do grupo XVI, são enzimas presentes somente no tecido adiposo e estão relacionadas à indução da obesidade, por regularem negativamente a lipólise neste tecido (JAWORSKI et al., 2009). Já as sFLA₂s do grupo IIA, conhecidas como FLA₂s inflamatórias, apresentam os níveis aumentados no plasma de indivíduos obesos (GARCES et al., 2010), porém os mecanismos de ação desencadeados por essa classe de enzimas, nesta doença, não é conhecido,

justificando estudos a este respeito.

A partir do veneno da serpente *Bothrops asper*, da América Central, foram isoladas quatro miotoxinas com estrutura de fosfolipase A_2 , denominadas MT-I a IV, todas com ação miotóxica. A MT-III, objeto deste estudo, além da ação miotóxica, induz efeito inflamatório marcante, caracterizado por edema, infiltrado leucocitário (CHAVES et al., 1998; GUTIERREZ et al., 1986; LOMONTE; GUTIERREZ, 1989; LOMONTE et al., 1993; I et al., 2005a), liberação de eicosanoides (leucotrieno B_4 , tromboxano A_2 , prostaglandina E_2 e D_2) com aumento da expressão proteica da ciclooxigenase-2 e liberação de citocinas (fator de necrose tumoral alfa, interleucina-1 e interleucina-6) no foco inflamatório em diferentes modelos experimentais in vivo (ZULIANI et al., 2005; MOREIRA et al., 2008). Em modelos experimentais in vitro, a MT-III ativa funções dos macrófagos, tais como a produção de agentes microbicidas e a fagocitose (ZULIANI et al., 2005b). Além disso, demonstramos que a MT-III induz o aumento na formação de corpúsculos lipídicos em macrófagos peritoneais murinos isolados, dependente da ativação de proteínas sinalizadoras (e.g. PKC, PI3K e p38MAPK), com aumento do teor proteico da perilipina 2 (PLIN2), importante proteína envolvida na captação, acúmulo lipídico e diferenciação de macrófagos em células espumosas (PAUL et al., 2008; LEIGUEZ et al., 2011). Ainda, nosso grupo demonstrou que esta FLA_2 causou ativação e aumentou o teor proteico dos receptores e fatores de transcrição PPAR- γ e PPAR- β/δ e do CD36, os quais contribuem, de modo relevante, para a formação de corpúsculos lipídicos e consequente aumento dos níveis de triacilglicerol (TAG) e colesterol (LEIGUEZ JUNIOR et al., 2015). Além do ambiente rico em ácidos graxos, promovido pela ação da MT-III, a partir de membranas celulares de macrófagos murinos e monócitos humanos, demonstramos que os receptores do tipo Toll like 2 e a molécula adaptadora MyD88 são essenciais para a desencadeamento da resposta inflamatória e formação de corpúsculos lipídicos (LEIGUEZ et al., 2014). Dessa forma, considerando a capacidade de s FLA_2 s induzirem acúmulo de lipídeos em células não especializadas nesta função, tal como os monócitos e macrófagos (GUIJAS et al., 2014; LEIGUEZ et al., 2011; LEIGUEZ et al., 2014; LEIGUEZ JUNIOR et al., 2015), é plausível supor que esta classe de enzimas tenha um papel na ativação de células que compõem o tecido adiposo, como os adipócitos. Neste sentido, foi demonstrado que a inibição farmacológica de s FLA_2 s de mamíferos, do

grupo IIA, causou proteção contra a obesidade e a disfunção metabólica, em ratos (IYER et al., 2010). No entanto, os mecanismos envolvidos no desencadeamento da obesidade induzido pelas sFLA₂s, do grupo IIA, relacionados à indução do processo inflamatório, não foram investigados e justificam estudos a esse respeito.

1.2 Tecido Adiposo e os mediadores lipídicos

O tecido adiposo é o principal reservatório energético do organismo. Este tecido é constituído pelos adipócitos, que são células especializadas no armazenamento de lipídios sob a forma de triacilglicerol, sem prejuízo a sua integridade funcional. Estas células possuem sistemas especializados para a síntese de ácidos graxos (lipogênese) e seu estoque em TAG, em períodos de oferta energética abundante, e para sua mobilização, pela lipólise, em condições de déficit calórico (AHIMA; FLIER, 2000). Em mamíferos, há dois tipos de tecido adiposo: o tecido adiposo branco (TAB) e o tecido adiposo marrom (TAM). O TAB pode ocupar até 85% da massa total do tecido adiposo, sendo o restante representado por água e proteínas (PAND, 2001). O TAM está relacionado à produção de calor (termogênese) e, portanto, participa ativamente na regulação da temperatura corporal.

O TAB é constituído, principalmente, por adipócitos. Além disso, apresenta uma matriz de tecido conjuntivo (fibras colágenas e reticulares), tecido nervoso, células do estroma vascular, nódulos linfáticos, células do sistema imune, fibroblastos, células indiferenciadas pluripotentes de origem mesodérmica, conhecidas como células tronco mesenquimais (CTMs) do tecido adiposo e pré-adipócitos (AHIMA; FLIER, 2000; ONG; SUGII, 2013). O TAB, além de ser um reservatório de gordura, contribui para a homeostasia do organismo (ZHANG ; FRITSCHÉ, 1994).

A literatura têm demonstrado que os ácidos graxos são importantes indutores na diferenciação de pré-adipócitos em adipócitos maduros, contribuindo para o desencadeamento da obesidade (AMRI et al., 1991; XIE et al., 2006). Neste sentido, foi demonstrado que o excesso de ácidos graxos, provenientes de células inflamatórias, pode ser metabolizado por adipócitos, causando uma sobrecarga lipídica, alterando a secreção de metabólitos e o metabolismo lipídico nestas células

(IYER et al., 2010). O metabolismo dos ácidos graxos pelos sistemas ciclooxigenase-1 e -2 acarreta a síntese de prostanoídes (prostaglandinas e tromboxano A_2). Estes mediadores exercem ações autócrinas e parácrinas, pela ativação de receptores de membrana, acoplados à proteína G e receptores nucleares, conhecidos como receptores ativados por proliferadores de peroxissomas (PPARs), que apresentam as isoformas PPAR- α , PPAR- δ/β e PPAR- γ (SUGIMOTO et al., 2007). Prostanóides em níveis elevados estão relacionados a anormalidades lipídicas, que ocorrem no tecido adiposo e contribuem para a complexidade da patogênese da obesidade e para sinais e sintomas da síndrome metabólica (ENOMOTO et al., 2000; Perez et al., 2006; GARCÍA-ALONSO et al., 2016). Estes mediadores modulam a diferenciação e maturação de adipócitos (SHILLABEER et al., 1998). Neste sentido, estudos que investiguem a capacidade das fosfolipases A_2 secretadas induzirem a síntese de prostanoídes, tal como de PGE_2 e os mecanismos envolvidos deste efeito, revestem-se de importância.

1.3 Biossíntese de Prostaglandina E_2

A prostaglandina E_2 (PGE_2) origina-se do metabolismo do ácido araquidônico, pelas enzimas COX-1 e -2 e pela conversão do metabólito gerado, a PGH_2 , por sintases PGE terminais (PGES), em PGE_2 (CHANDRASEKHARAN, et al., 2002; WESTMAN et al., 2004). A COX-1 é a isoforma expressa constitutivamente na maioria das células e é responsável pela formação de prostanoídes em condições fisiológicas. A COX-2, por sua vez, pode ser expressa constitutivamente ou ser induzida sob diversas condições fisiopatológicas, de natureza inflamatória (KATORI e MAJIMA, 2000).

Em relação às sintases terminais, foram descritas três isoformas: prostaglandina E sintase microssomal 1 (PGESm-1), prostaglandina E sintase microssomal 2 (PGESm-2) e prostaglandina E sintase citosólica (PGESc). A PGESm-1 é induzida por diversos agentes pró-inflamatórios, sendo sua expressão encontrada em pacientes acometidos por artrite reumatóide (JAKOBSSON et al., 1999; MURAKAMI et al., 2014; WESTMAN et al., 2004). Já a PGESm-2 é a isoforma expressa constitutivamente em diversos tipos celulares (MURAKAMI et al., 2011). A terceira isoforma identificada, a PGES citosólica (PGESc), é expressa

constitutivamente em vários tipos celulares, exceto nas células cerebrais, onde foi observado um pequeno aumento da expressão de PGESs após estímulo inflamatório com LPS (TANIOKA et al., 2000).

Em processos inflamatórios a PGE_2 é um dos mediadores centrais da inflamação e dor, inclusive as inflamações articulares (BOMBARDIERI et al., 1981; HARDY et al., 2002). De modo geral, este prostanoide promove vasodilatação e potencializa o aumento da permeabilidade vascular causado pela histamina e bradicinina (MILLS et al., 1993; GERRITSEN, 1996); Além de sensibilizar nociceptores e acarretar a redução do limiar de dor frente a agentes algésicos (OMOTE et al., 2002). Em um contexto metabólico, a PGE_2 é responsável pelo aumento da síntese de leptina, causando resistência no organismo e comprometendo diretamente o controle da saciedade (FAIN; BAHOUTH, 2000). Ainda, a PGE_2 , está relacionada ao aumento dos níveis de TAG em adipócitos, contribuindo para o acúmulo de lipídico nestas células (ENOMOTO et al., 2000; PEREZ et al., 2006). Este mediador desencadeia seus efeitos através da ativação de quatro tipos diferentes de receptores, denominados EP1, EP2, EP3 e EP4. Estes receptores são expressos em diferentes tecidos e tipos celulares, incluindo os pré-adipócitos (TSUBOI et al., 2003). Estes receptores são acoplados a proteína G e medeiam os diversos efeitos da PGE_2 , de acordo com sua localização no tecido e associação a vias de transdução de sinal intracelular. Assim, o receptor EP1 aumenta a concentração de cálcio intracelular, enquanto o EP3 diminui ou aumenta o AMP cíclico (cAMP), por ativar a proteína G inibitória (G_{ai}) ou estimulatória (G_{as}). Ainda, a PGE_2 , por meio do receptor EP3, diminui a taxa de lipólise em adipócitos maduros, por reduzir os níveis de cAMP, contribuindo para a hipertrofia destas células (JAWORSKI et al., 2009). Os receptores EP2 e EP4, por sua vez, aumentam os níveis de cAMP, por ativarem a adenilato ciclase, via proteína G_{as} , mas diferem na resposta induzida por certos ligantes (BREYER et al., 2001; COLEMAN et al., 1994). Já a ativação do receptor EP4 contribui para o desenvolvimento da dor e inflamação (LIN et al., 1996; MCCOY et al., 2002).

Dessa maneira, dada a relevância da PGE_2 para o metabolismo de adipócitos, os estudos relacionados à elucidação dos mecanismos envolvidos na síntese deste mediador, induzido por uma fosfolipase A_2 secretada, do grupo IIA, tornam-se relevantes.

2 OBJETIVO

2.1 Objetivos Gerais

Investigar a capacidade da MT-III, uma FLA₂ secretada, do grupo IIA, induzir a síntese de PGE₂ e os mecanismos moleculares envolvidos neste efeito, em pré-adipócitos murinos da linhagem 3T3-L1.

2.2 Objetivos Específicos

Foram avaliados os efeitos da sFLA₂ MT-III em pré-adipócitos 3T3-L1, quanto:

- à biossíntese de PGE₂;
- à participação das ciclooxigenases -1 e -2 na síntese de PGE₂;
- à expressão proteica das ciclooxigenases -1 e -2 e da PGESm1;
- à participação dos receptores de PGE₂ (EP1-EP4) na síntese de PGE₂;
- à expressão proteica do receptor de PGE₂ (EP4).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Fosfolipase A₂

A fosfolipase A₂ secretada MT-III, isolada do veneno da serpente *Bothrops asper*, foi fornecida pelo Dr. José Maria Gutiérrez, do Instituto Clodomiro Picado, da Universidade da Costa Rica, Costa Rica. A toxina MT-III foi purificada de acordo com a metodologia proposta por KAISER et al (1990) e liofilizada. A homogeneidade foi comprovada por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), sob condições redutoras (LAEMMLI, 1970). A concentração inicial da MT-III, utilizada nesse estudo, foi de 0,4 µM, com base nos estudos anteriores (MOREIRA et al., 2008; LEIGUEZ et al., 2011; LEIGUEZ et al., 2014) e na viabilidade celular realizada no presente estudo.

3.2 Cultivo da linhagem de pré-adipócitos 3T3-L1

A linhagem de pré-adipócitos 3T3-L1, obtida do banco de células da empresa *American Type Culture Collection* (ATCC), foi cultivada até atingir a confluência de 80% em meio de cultura DMEM, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (v/v).

3.3 Ensaio para determinação da atividade metabólica: redução do brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil) 2,5-difenil-2H-tetrazolium (MTT)

A atividade metabólica dos pré-adipócitos 3T3-L1 foi avaliada pelo método da redução do sal de tetrazolium e formação do produto solúvel formazan (MOSMANN, 1983). Após cada período de incubação, as microplacas foram centrifugadas a 200 x g, por 10 minutos e o sobrenadante de cada amostra foi retirado. A seguir, foram acrescentados, a cada poço, 90 µL de meio de cultura DMEM e 10 µL de MTT (5 mg/mL). Então, os pré-adipócitos foram incubados a 37 °C, em estufa a 5% de CO₂, por 3 horas. Para dissolver os cristais de formazan, provenientes da redução do sal de tetrazolium pelas células viáveis, foi adicionado 100 µL de dimetil sulfóxido (DMSO) em cada poço. Após 30 minutos de agitação das microplacas, efetuou-se a

determinação da D.O., a 540 nm, em espectrofotômetro (Labsystem Multiscan®). A redução da atividade metabólica foi definida como a porcentagem de diminuição da D.O, observada na monocamada submetida à ação do DMEM (livre de soro fetal bovino) e das diferentes concentrações da MT-III (3,25; 6,5 ou 13 µg/mL).

3.4 Determinação das concentrações de prostaglandina E₂ (PGE₂) no sobrenadante dos pré-adipócitos 3T3-L1

A concentração de PGE₂ foi avaliada nos sobrenadantes das culturas dos pré-adipócitos, incubados com MT-III (0,4 µM) ou DMEM (livre de soro fetal bovino - controle), por ensaio imunoenzimático (EIA). Para tanto, as amostras foram centrifugadas a 200 x g por 5 min e então submetidas ao kit comercial (Cayman Chemical, MI) para quantificação do referido mediador, por ensaio imunoenzimático específico (EIA). As concentrações de PGE₂ foram estimadas a partir de curva padrão específica e representadas em pg/mL.

3.5 Análise quantitativa da COX-1 e -2, da PGESm-1 e do receptor EP4 por *Western blotting*

As células 3T3-L1, plaqueadas na concentração 2x10³ células, em placas de 12 poços, após atingir confluência de 80%, foram incubadas com a MT-III (0,4 µM) ou meio de cultura apenas, por 1-48 horas. Após, as células foram lisadas com 100 µL de tampão de amostra (LAEMMLI, 1970) (SDS 20 %; glicerina; β-mercaptoetanol 1 M; tampão Tris 1 M pH 6,8; Azul de bromofenol a 0,1 %).

As proteínas, contidas em alíquotas de 25 µL de amostra, foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida a 10% (SDS-PAGE). Para tanto, foi aplicada uma voltagem constante de 150 Volts (V). Posteriormente, as bandas proteicas foram transferidas, em sistema tamponado, para uma membrana de nitrocelulose (GE Healthcare), sob voltagem de 100 V, durante 90 minutos, a 4 °C. Os sítios inespecíficos, da membrana de nitrocelulose foram bloqueados por uma solução contendo albumina 5% (em tampão de lavagem) durante 1 hora. A seguir, as membranas foram incubadas com anticorpo primário anti-COX-1, anti-COX-2,

anti-PGESm-1 ou anti-EP4 (Cayman), na diluição 1:500 (v/v), durante 18 horas. Após 3 lavagens de 5 minutos, foi adicionado o anticorpo secundário, conjugado à peroxidase, na diluição de 1:2000 (v/v) (GE Healthcare), durante 1 hora.

A quimioluminescência das bandas imunoreativas para a COX-1 e -2, PGESm-1 e para os receptor EP4 foram detectadas pelo software do Image Quant (GE Healthcare) e normalizadas a partir das densidades das bandas da proteína padrão β -actina.

3.6 Intervenções Farmacológicas

Para avaliar a participação da ciclooxigenase-1, ciclooxigenase-2 e dos diferentes subtipos de receptores da PGE₂, na biossíntese deste mediador, induzida pela MT-III, as células foram previamente tratadas com inibidores ou antagonistas específicos. As concentrações dos inibidores e dos antagonistas que foram empregados, neste estudo, foram baseados na literatura, após a análise de seus efeitos na viabilidade celular.

NS398 (10 μ M) – inibidor da ciclooxigenase-1, por 1 h (NISHIMURA et al., 2006);
Valeril Salicilato (10 μ M) – inibidor da ciclooxigenase-2, por 1h (KIM et al., 1995);
SC19220 (10 μ M) - antagonista do receptor EP1 da PGE₂, por 1 h (JONES et al., 2009);

AH6809 (10 μ M) - antagonista do receptor EP2 da PGE₂, por 1 h (LIN et al., 2009);
L79816 (1 μ M) - antagonista do receptor EP3 da PGE₂, por 1 h (JONES et al., 2009);

AH23848 (10 μ M) - antagonista do receptor EP4 da PGE₂, por 1 h (JONES et al., 2009);

3.6 Análise estatística

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

4 RESULTADOS

4.1 Cultura da linhagem de pré-adipócitos 3T3-L1

Para início dos estudos dos efeitos da MT-III sobre os pré-adipócitos da linhagem 3T3-L1, a cultura celular foi padronizada. Para tanto, as células foram semeadas em microplacas de cultura celular de 12 poços, em diferentes concentrações (2×10^3 , 2×10^4 ou 2×10^5 célula/poço). A tabela 1 mostra o crescimento celular dos pré-adipócitos 3T3-L1 24 horas após a adição das células nas diferentes concentrações. Os poços com 2×10^3 células apresentaram células espreiadas não confluentes; na concentração de 2×10^4 células observamos células espreiadas com 80% de confluência, enquanto os poços que receberam 2×10^5 células apresentaram formação de monocamada. A tabela 2 mostra o crescimento celular, 48 horas após adição das células. Neste período de tempo, verificou-se que os poços que receberam células na concentração 2×10^3 , apresentaram-se espreiadas e não confluentes; poços contendo 2×10^4 e 2×10^5 células já apresentaram células em monocamada. Na tabela 3 está demonstrado o crescimento dos pré-adipócitos após 72 horas. Pode-se observar que a concentração de 2×10^3 apresentou células não confluentes; na concentração de 2×10^4 observou-se células em monocamada e na concentração de 2×10^5 a área foi insuficiente para o crescimento celular que ocorreu neste período. A tabela 4 mostra o crescimento dos pré-adipócitos 96 horas após a adição das células. Após esse período, os poços com 2×10^3 apresentaram 80% de confluência. Contudo, tanto nas concentrações de 2×10^4 , quanto na de 2×10^5 , a área da placa de 12 poços foi insuficiente para o crescimento de celular ocorrido neste período. A partir destes dados, a concentração inicial de 2×10^3 /poço foi selecionada para os experimentos subsequentes, por reunir o número de células adequado em um tempo mínimo (96 horas) após a tripsinização.

Tabela 1 - Crescimento de pré-adipócitos após 24 horas de adição a microplacas de 12 poços.

Cel/ poço	12 poços
2×10^3	+
2×10^4	+++
2×10^5	++++

Tabela 2 - Crescimento de pré-adipócitos após 48 horas de adição a microplacas de 12 poços.

Cel/ poço	12 poços
2×10^3	++
2×10^4	++++
2×10^5	+++++

Tabela 3 - Crescimento de pré-adipócitos após 72 horas de adição a microplacas de 12 poços.

Cel/ poço	12 poços
2×10^3	++
2×10^4	+++++
2×10^5	AI

Tabela 4 - Crescimento de pré-adipócitos após 96 horas de adição a microplacas de 12 poços.

Cel/ poço	12 poços
2×10^3	+++
2×10^4	AI
2×10^5	AI

(+) células não confluentes

(++) células espreiadas não confluentes

(+++) células espreiadas com 80% de confluência

(++++) formação da monocamada

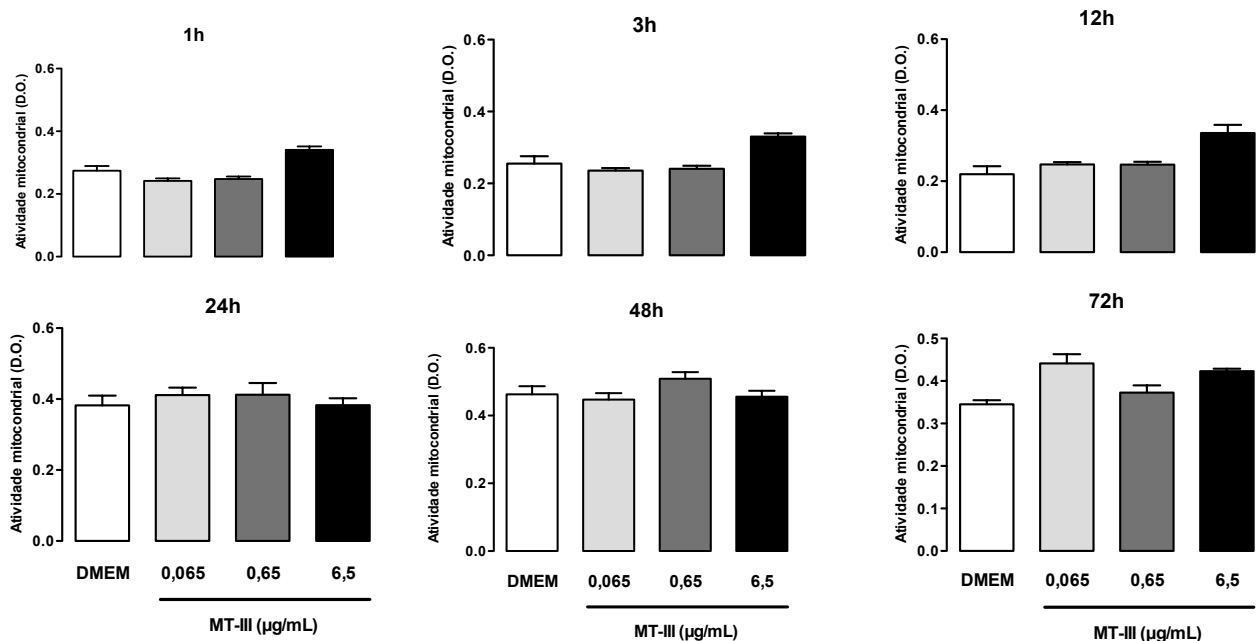
(+++++) células em monocamada

(AI) área insuficiente para o número de células crescidas

4.2 Efeito da Miotoxina-III (MT-III) na viabilidade dos pré-adipócitos 3T3-L1

Para este estudo, as células 3T3-L1, na concentração inicial de 2×10^3 foram incubadas com concentrações crescentes (3,25, 6,5 e 13 $\mu\text{g/mL}$) de MT-III ou DMEM (controle), por 1, 3, 12, 24, 48 ou 72 horas e a viabilidade celular foi avaliada pela determinação da atividade oxidativa mitocondrial, pelo ensaio de redução do MTT. A figura 1 mostra que os pré-adipócitos 3T3-L1, incubados apenas com DEMEM, apresentaram-se metabolicamente ativos até a 72h de incubação. A MT-III não afetou a atividade oxidativa mitocondrial dessas células, em nenhuma das concentrações e tempo estudados, em comparação aos respectivos controles. A partir destes resultados e com base naqueles já descritos na literatura (MOREIRA et al., 2008; LEIGUEZ et al., 2011; LEIGUEZ et al., 2014) foi definida a concentração intermediária de 6,5 $\mu\text{g/mL}$ (0,4 μM) para os ensaios seguintes.

Figura 1 - Efeito da MT-III na atividade metabólica dos pré-adipócitos 3T3-L1, em cultura.



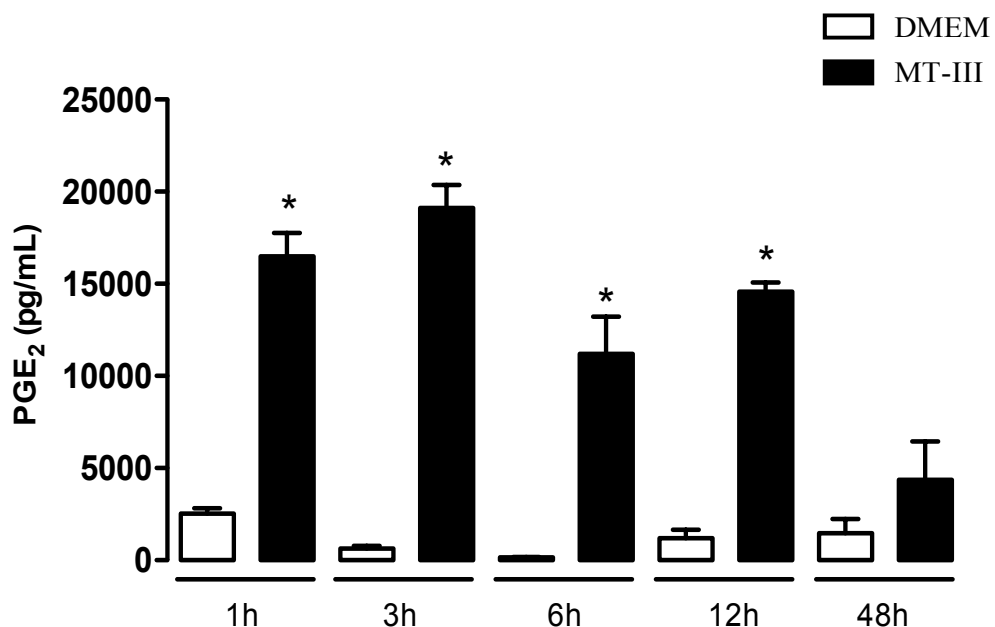
Nota: Os pré-adipócitos foram incubados com a MT-III (0,065; 0,65; 6,5 μM) ou DMEM (controle). Após 1, 3, 12, 24, 48 e 72 horas, a atividade metabólica foi determinada pelo ensaio de redução do MTT, como descrito em Material e Métodos. Cada valor representa a média \pm EPM de 4 amostras (ANOVA).

4.3 Efeito da MT-III sobre a liberação de PGE₂ por pré-adipócitos 3T3-L1

A quantificação da PGE₂ contida nos sobrenadantes das culturas de pré-adipócitos 3T3-L1, incubados com MT-III (0,4 μM) ou DMEM sem soro fetal bovino (controle), foi determinada após 1 a 48 horas.

A figura 2 mostra que os pré-adipócitos controles, incubados apenas com meio de cultura, apresentaram uma liberação basal de PGE₂ de 2531 ± 300 pg/mL, na 1^a hora, 635.3 ± 136 pg/mL na 3^a hora, 160.9 ± 248 pg/mL na 6^a hora, 1200 ± 453 pg/mL na 12^a hora e de 1475 ± 756 pg/mL na 48^a hora . A incubação das células com a MT-III causou um aumento significativo de PGE₂ desde a 1^a hora até a 12^a hora, quando comparados aos respectivos controles dos diferentes períodos de tempo avaliados.

Figura 2 - Efeito da MT-III na liberação de PGE₂, em pré-adipócitos 3T3-L1, em cultura.

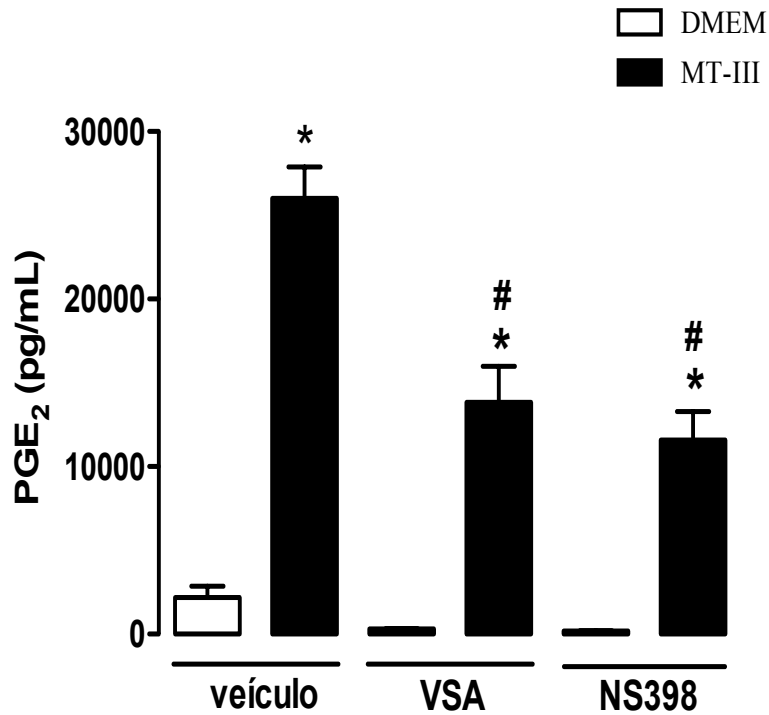


Nota: Os pré-adipócitos foram incubados com a MT-III (0,4 μM) ou DMEM (controle) e após os intervalos de tempo indicados acima, os sobrenadantes foram coletados para quantificação das concentrações de PGE₂ por ensaio imunoenzimático, como descrito em Material e Métodos. Os dados representam a média ± EPM de 4 amostras (ANOVA).

4.4 Participação das ciclooxigenases (COX-1 e COX-2) na liberação de PGE₂, induzida pela MT-III em pré-adipócitos 3T3-L1

Para verificar a participação das COXs na liberação de PGE₂, induzida pela MT-III, os pré-adipócitos foram pré-tratados com o composto valeril salicilato (10 µM), um inibidor seletivo da COX-1, ou NS398 (10 µM) um inibidor seletivo da COX-2, ou veículo (DMSO < 1%) (controle), por 1 h e então incubados com a MT-III (0,4 µM) ou DMEM (controle) por 6 h. As concentrações de PGE₂ foram avaliadas nos sobrenadantes, dos diferentes grupos, por EIA. Como mostra a figura 3, nos sobrenadantes das células controles, incubadas com DMEM acrescido do veículo (DMSO) ou valeril salicilato ou o composto NS398, foi observado liberação média de 900 pg/mL de PGE₂, após 6 horas de incubação. Quando as células foram incubadas com a MT-III, na presença do veículo, houve um aumento significativo da liberação de PGE₂ (26017 ± 1864 pg/mL), em relação ao respectivo controle (2195 ± 674 pg/mL), após 6 horas. Em pré-adipócitos pré-tratados com o valeril salicilato houve redução em torno de 40% da liberação da PGE₂, induzida pela MT-III, que foi significativa em relação ao controle positivo, células pré-tratadas com DMSO e incubadas com essa FLA₂. Em pré-adipócitos tratados com o composto NS398, houve redução de 50% da liberação de PGE₂ induzida pela MT-III, estatisticamente significativa quando comparada ao controle positivo.

Figura 3 - Efeito de inibidores da COX-1 e da COX-2 na liberação de PGE₂, induzida pela MT-III em pré-adipócitos 3T3-L1, em cultura.

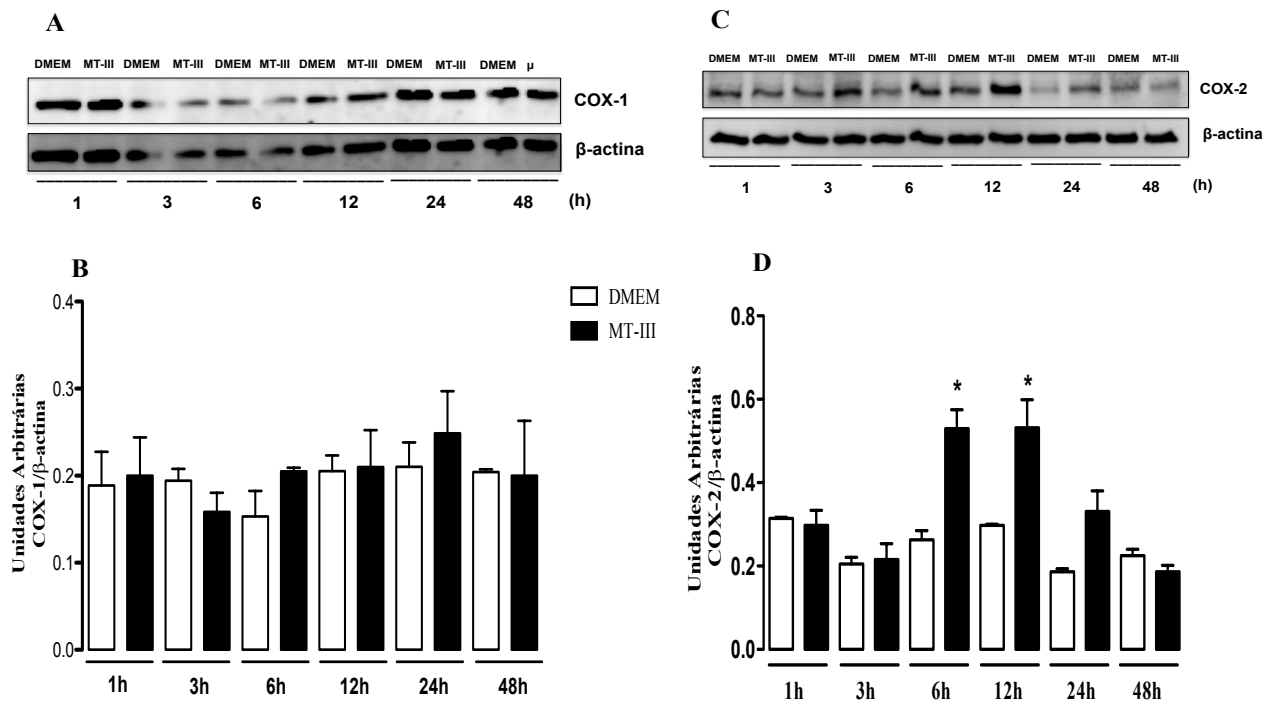


Nota: Os pré-adipócitos em cultura foram pré-tratados com valeril salicilato (10 μ M) ou NS398 (10 μ M) ou DMEM acrescido do veículo (DMSO), por 1 hora e então incubados com a MT-III (0,4 μ M), por 6 horas. Os sobrenadantes foram coletados para quantificação das concentrações de PGE₂ por ensaio imunoenzimático, como descrito em Material e Métodos. Os dados representam a média \pm EPM de 3-4 amostras. * p <0.05 em relação ao controle; # p <0.05 em relação à MT-III (ANOVA).

4.5 Efeito da MT-III na expressão proteica da COX-1 e COX-2 em pré-adipócitos 3T3-L1.

No presente estudo, a expressão proteica das COX-1 e -2 foi analisada por *Western blotting*, em pré-adipócitos incubados com a MT-III (0,4 μ M) ou com DMEM (controle), durante 1, 3, 6, 12, 24 e 48 horas. A figura 4A representa as bandas imunorreativas para a COX-1, que mostram que não houve alteração das mesmas, em pré-adipócitos estimulados com a MT-III entre 1 e 48 horas, se comparadas aos respectivos controles. A análise densitométrica destas bandas, representada na figura 4B, confirma que as intensidades das mesmas em células incubadas com a MT-III não foram significativamente diferentes daquelas dos respectivos controles, em todos os períodos de tempo estudados. Com relação ao teor proteico da COX-2, em pré-adipócitos estimulados com a MT-III ou DMEM, a figura 4C mostra que a incubação das células com a MT-III induziu aumento das bandas imunoreativas para a COX-2, na 6^a e 12^a horas de incubação, se comparadas aos respectivos controles. A análise densitométrica destas bandas (Figura 4D) confirmou esses dados, demonstrando aumento significativo na expressão de COX-2 em células incubadas com a MT-III no período de 6 e 12 horas, em comparação às células controle. Nos demais períodos de incubação com a MT-III, não houve diferença significativa na expressão de COX-2 em relação aos respectivos controles.

Figura 4 - Efeito da MT-III na expressão proteica da COX-1 ou COX-2 em pré-adipócitos 3T3-L1, em cultura.

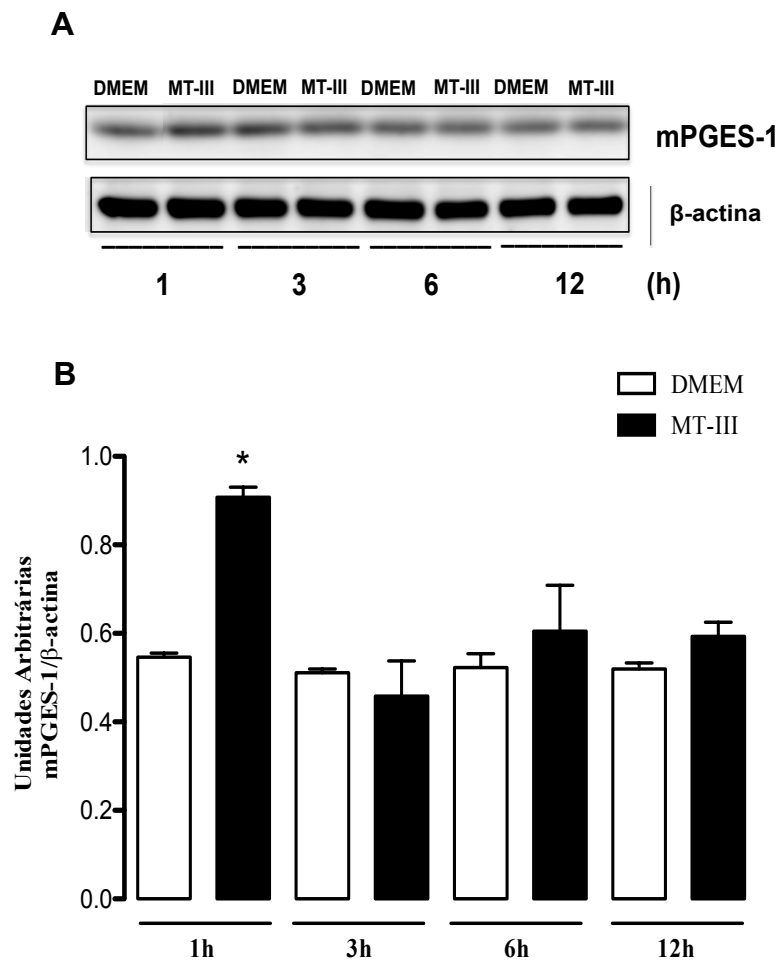


Nota: Os pré-adipócitos em cultura foram incubados com a MT-III (0,4 μ M) ou com DMEM (controle), pelos períodos de tempo indicados acima. (A, C): *Western blotting* com anticorpo policlonal anti-COX-1 ou anti-COX-2 ou anticorpo monoclonal anti- β -actina, representativo de amostras de homogenatos de pré-adipócitos (n=4); (B, D): Quantificação, por densitometria, das bandas de COX-1 ou COX-2, normalizadas a partir das bandas de β -actina. * $p < 0.05$ em relação ao controle (ANOVA).

4.6 Efeito da MT-III na expressão proteica da prostaglandina sintase microssomal-1 (PGESm-1) em pré-adipócitos 3T3-L1

O efeito da MT-III na expressão proteica da PGESm-1 foi avaliada por *Western blotting*, em células incubadas com a MT-III (0,4 μ M) ou DMEM (controle) por 1, 3, 6 ou 12 horas. A figura 5A mostra as bandas representativas da expressão proteica de PGESm-1 ou de β -actina, após a incubação das células com a MT-III (0,4 μ M) ou DMEM (controle). Como pode ser observado, a intensidade das bandas imunorreativas para a PGESm-1 na 3, 6 e 12 horas após incubação com a MT-III, não foram diferentes daquelas incubadas com DMEM. No entanto, a análise densitométrica das bandas obtidas (Figura 5B) mostra que a MT-III causou aumento significativo da expressão proteica de PGESm-1, em relação ao controle, na 1^a hora de incubação.

Figura 5 - Efeito da MT-III na expressão proteica de PGESm-1 em pré-adipócitos 3T3-L1, em cultura.

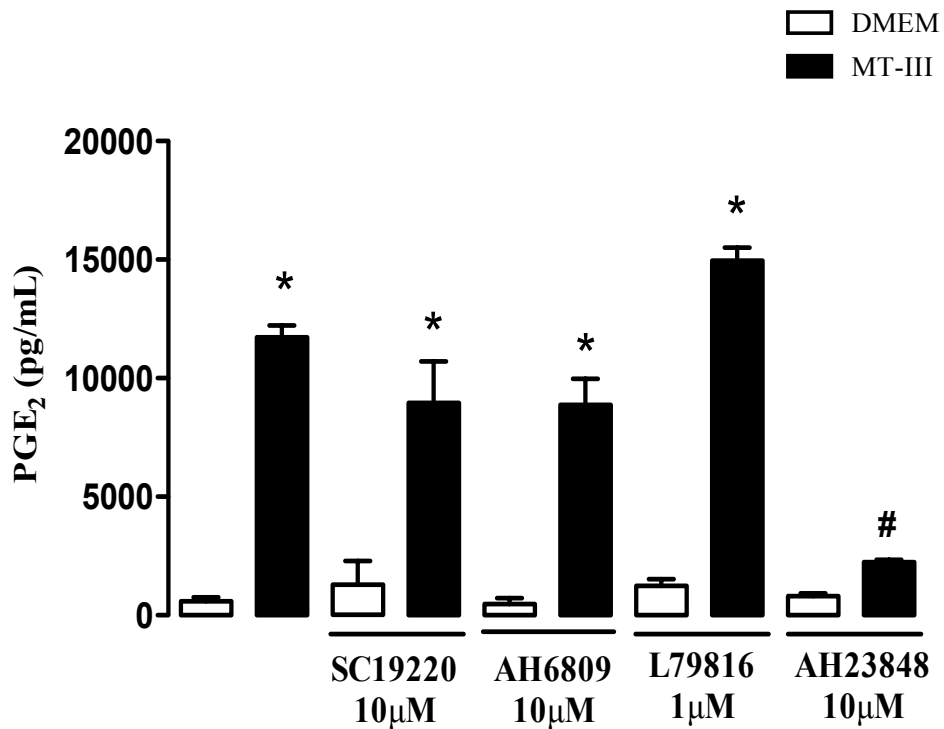


Nota: Os pré-adipócitos em cultura foram incubados com a MT-III (0,4 μ M) ou com DMEM (controle), pelos períodos de tempo indicados acima. (A): *Western blotting* com anticorpo policlonal anti-PGESm-1 ou anticorpo monoclonal anti- β -actina, representativo (n=4) de amostras de homogenatos de pré-adipócitos; (B): Quantificação, por densitometria, das bandas de PGESm-1, normalizadas a partir das bandas de β -actina. * p <0.05 em relação ao controle (ANOVA).

4.7 Participação dos receptores de prostaglandina (EP1-EP4) na liberação de PGE₂, induzida pela MT-III, em pré-adipócitos 3T3-L1

Para este estudo, os pré-adipócitos foram incubados com o composto SC19220, ou AH6809, ou L79816, ou AH23848, antagonistas dos receptores EP1, EP2, EP3 ou EP4, respectivamente, ou seus veículos (DMSO < 1%), por 1 hora e então incubados com a MT-III (0,4 µM) ou DMEM (controle), por 6 horas. As concentrações de PGE₂ foram avaliadas nos sobrenadantes das culturas, por EIA. Como mostra a figura 6, os sobrenadantes das células controles, incubadas com DMEM acrescido do veículo (DMSO) ou com os antagonistas, foi observado uma liberação média de 950 pg/mL de PGE₂, após 6 horas de incubação. Quando as células foram pré-tratadas com o DMEM acrescido do veículo e então incubadas com a MT-III, pelo mesmo período de tempo, houve aumento significativo da liberação de PGE₂ (11724 ± 503 pg/mL), em relação ao controle basal (3843 ± 79 pg/mL). Em pré-adipócitos pré-tratados com os compostos SC19220, ou AH6809, ou L79816 não houve alteração dos níveis de PGE₂ induzidos pela MT-III, em relação ao controle pré-tratado com o veículo e estimulado com a MT-III. Por outro lado, o pré-tratamento das células com o antagonista do receptor EP4 (composto AH23848) e incubadas com a MT-III, aboliu a liberação de PGE₂, em comparação ao controle positivo (pré-tratado com o veículo e estimulado com a MT-III).

Figura 6 - Efeito dos antagonistas dos receptores E1, EP2, EP3 ou EP4 na liberação de PGE₂, induzida pela MT-III em pré-adipócitos 3T3-L1, em cultura.

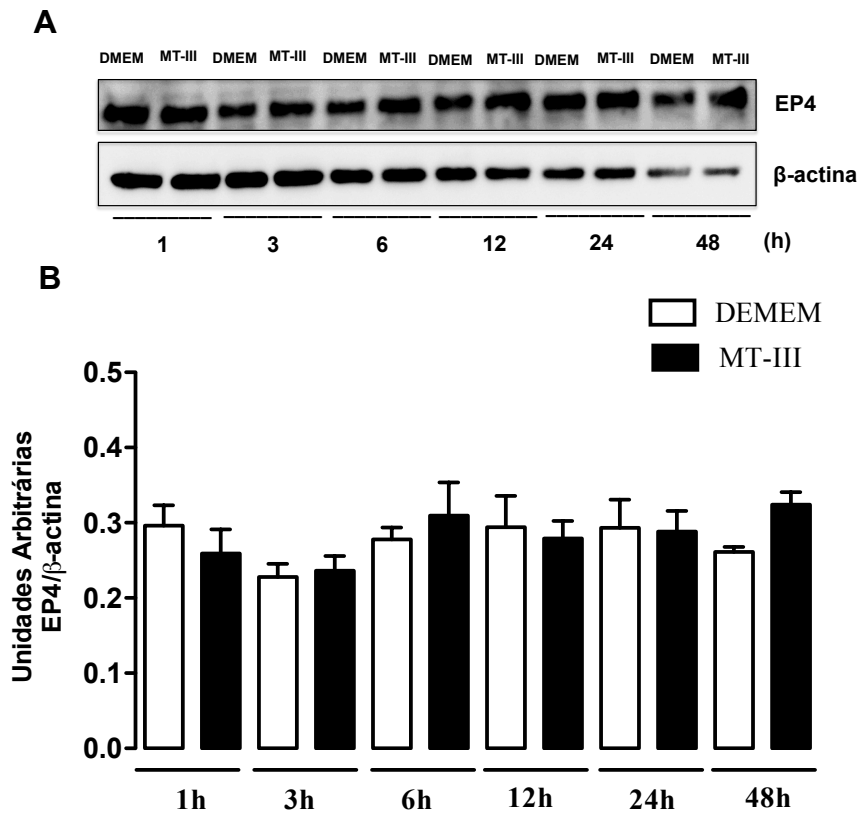


Nota: Os pré-adipócitos em cultura foram pré-tratados com os compostos SC19220 ou AH6809 ou L79816 ou AH23848, antagonistas dos receptores EP1-EP4, respectivamente, ou DMEM acrescido do veículo (DMSO), por 1 hora e então incubados com a MT-III (0,4 µM) ou DMEM (controle) por 6 horas. Os sobrenadantes foram coletados para quantificação das concentrações de PGE₂ por ensaio imunoenzimático, como descrito em Material e Métodos. Os dados representam a média ± EPM de 3-4 amostras. * $p < 0.05$ em relação ao controle; # $p < 0.05$ em relação à MT-III (ANOVA).

4.8 Efeito da MT-III na expressão proteica receptor EP4, em pré-adipócitos 3T3-L1

O efeito da MT-III, na expressão proteica do receptor EP4 foi avaliado por *Western blotting*. Para tanto, os pré-adipócitos foram incubados com a MT-III (0,4 μ M) ou DMEM (controle) por 1, 3, 6, 12, 24 ou 48 horas. A figura 7A mostra as bandas representativas da expressão proteica desse receptor em pré-adipócitos, após incubação com a MT-III ou DMEM (Controle). Como pode ser verificado, as bandas representativas das amostras incubadas com a MT-III mostram intensidades similares àquelas detectadas em células controles, em todos os períodos de tempo avaliados. A análise densitométrica das bandas obtidas (Figura 7B) confirma que MT-III não causou modificação dos níveis proteicos do receptor EP4, em relação aos controles, em nenhum dos períodos de tempo estudados.

Figura 7 - Efeito da MT-III na expressão proteica do receptor EP4 em pré-adipócitos 3T3-L1, em cultura.



Nota: Os pré-adipócitos foram incubados com a MT-III (0,4 μ M) ou com DMEM (controle), pelos períodos de tempo indicados acima. (A): *Western blotting* com anticorpo policlonal anti-EP4 e anticorpo monoclonal anti- β -actina, representativo (n=4) de amostras de homogenatos de pré-adipócitos; (B): Quantificação, por densitometria, das bandas do EP4, normalizadas a partir das bandas de β -actina. * p <0.05 em relação ao controle (ANOVA).

5 DISCUSSÃO

Os níveis de fosfolipase A_2 secretadas (sFLA $_2$ s) estão elevados no soro de paciente obesos, assim como no tecido adiposo inflamado. No entanto, os efeitos da ação direta e os mecanismos desencadeados, por essa classe de enzima, sobre células do tecido adiposo, não são conhecidos. Neste estudo, foram determinadas as condições ideais para a realização da cultura de pré-adipócitos da linhagem 3T3-L1. Os resultados mostraram que estas células apresentaram um crescimento rápido formando monocamadas em 24 horas a partir da concentração de 2×10^5 células/poço e em 48 horas a partir da concentração de 2×10^4 células/poço. Devido a estes resultados, a concentração inicial de células, considerada adequada para os experimentos foi de 2×10^3 células/poço, uma vez que a confluência total das células 3T3-L1 pode desencadear o processo de diferenciação dos pré-adipócitos em adipócitos maduros. Desta forma, foi padronizado utilizar a concentração de 2×10^3 célula/poço, pois atinge confluência de 80% após 96 horas de semeadura e de contato com a tripsina, esta por sua vez, a curto prazo, poderia causar ativação deste tipo celular e prejudicar a avaliação dos parâmetros inflamatórios a serem avaliados.

A seguir, avaliamos os efeitos da MT-III, sobre a linhagem de pré-adipócitos 3T3-L1, quanto à viabilidade celular e à síntese da PGE $_2$. Os resultados, do presente estudo, demonstraram que a MT-III não alterou a viabilidade dos pré-adipócitos em nenhuma das concentrações e períodos de tempo estudados. De modo similar, foi demonstrado que a MT-III não alterou a viabilidade de macrófagos peritoneais de camundongos, indicando o baixo efeito tóxico desta fosfolipase A_2 sobre células em cultura (ZULIANI et al., 2005). A PGE $_2$, é um prostanóide originado da metabolização do ácido araquidônico pelo sistema enzimático das ciclooxigenases (COX-1 e COX-2). É conhecido que a prostaglandina E $_2$, por meio do receptor EP3, diminui a taxa de lipólise, por reduzir os níveis de AMP cíclico, contribuindo para a hipertrofia dos adipócitos (JAWORSKI et al., 2009). Este mediador é responsável também pelo aumento da síntese de leptina, causando resistência a este hormônio, comprometendo diretamente o controle da saciedade (FAIN et al., 2000; POWELL et al., 2007). Ainda, a prostaglandina E $_2$, assim como a prostaglandina J $_2$, estão relacionadas ao aumento dos níveis de TAG em adipócitos, contribuindo para o

acúmulo lipídico nestas células (ENOMOTO et al., 2000; PEREZ et al., 2006). Neste estudo, a fosfolipase A₂ secretada MT-III induziu uma liberação significativa de prostaglandina E₂, dependente da ativação da COX-1 e da COX-2, em pré-adipócitos 3T3-L1, uma vez que tanto a inibição da COX-1, quanto da COX-2, por intervenções farmacológicas específicas, reduziu, de modo marcante, a produção desse mediador. Além disso, como mecanismo adicional, foi verificado que a MT-III induziu aumento dos níveis proteicos de COX-2. No entanto, não houve aumento significativo dos níveis proteicos de COX-1. Este estudo, até onde foi possível verificar, demonstrou pela primeira vez que uma fosfolipase A₂ secretada, do grupo IIA, ativa a síntese de PGE₂ a partir de uma ação direta sobre uma célula precursora de adipócitos maduros, os pré-adipócitos, indicando que estas células constituem um alvo celular importante para a ação dessas enzimas. A produção da PGE₂ pelo pré-adipócito, sob estímulo de uma sFLA₂ pode contribuir para o desencadeamento de eventos relevantes ligados à obesidade.

A etapa final da produção de PGE₂ é realizada pelas prostaglaninas E sintases, prostaglandina E sintase microssomal 1 (PGESm-1), prostaglandina E sintase microssomal 2 (PGESm-2) e/ou prostaglandina E sintase citosólica (PGESc), que convertem a PGH₂, em PGE₂ (YU et al., 2016). A isoforma PGESm-1 é induzida por diversos agentes inflamatórios e a expressão desta enzima está aumentada no tecido adiposo em processo adipogênico (MICHAUD et al., 2014). Os resultados deste estudo mostraram que a MT-III induziu aumento da PGESm-1 em pré-adipócitos. Dessa forma, é possível sugerir que a expressão de PGESm-1 esteja relacionada ao aumento dos níveis prostaglandina E₂, induzida pela MT-III.

Os efeitos biológicos da PGE₂ são mediados por 4 tipos de receptores, acoplados à proteína G, denominados de EP1, EP2, EP3 e EP4. Achados da literatura mostram que a ativação do receptor EP4, pela PGE₂, pode levar ao aumento da expressão de enzimas-chave da produção desta prostaglandina, como a COX-2 e a PGESm-1 (LIN et al., 2006; MCCOY et al., 2002). Os resultados obtidos demonstraram que o tratamento das células com o antagonista do receptor EP4 inibiu a liberação de PGE₂, induzida pela MT-III. No entanto, os níveis proteicos deste receptor não foi alterado em pré-adipócitos estimulados pela MT-III. Estes resultados mostram a relevância do receptor EP4 para produção de PGE₂, induzida pela MT-III, em pré-adipócitos.

Em conjunto, os resultados deste estudo demonstram o baixo efeito citotóxico da MT-III sobre pré-adipócitos da linhagem 3T3-L1. Além disso, a MT-III induziu a síntese da PGE₂, por meio da ativação do sistema COX-1 e COX-2 e do receptor EP4. Como mecanismo adicional para a síntese de PGE₂, induzida pela MT-III, foi evidenciado o aumento dos níveis proteicos de COX-2 e da PGESm-1. Esses dados sugerem um possível papel das fosfolipases A₂ secretadas, do grupo IIA, na indução da adipogênese e diferenciação de pré-adipócitos em adipócitos maduros.

6 CONCLUSÃO

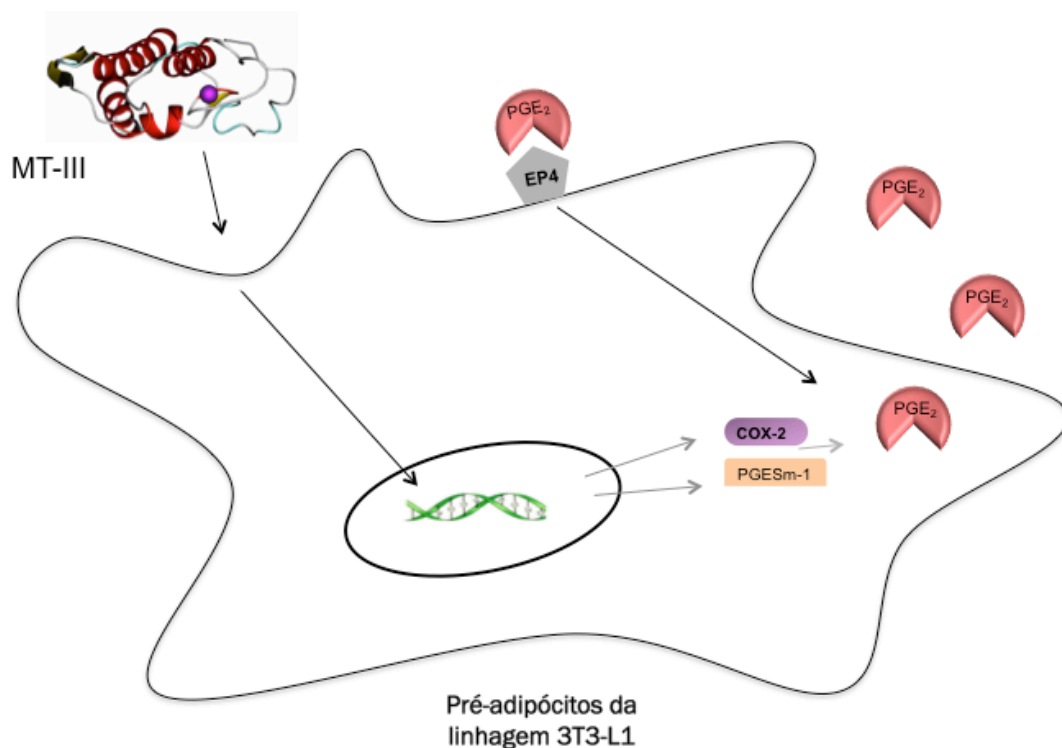
A MT-III, em concentração não tóxica, induziu em pré-adipócitos 3T3-L1:

- a biossíntese de PGE_2 ;
- o aumento dos níveis proteicos de COX-2 e da PGESm-1;

A biossíntese de PGE_2 , induzida pela MT-III, em pré-adipócitos 3T3-L1, é dependente:

- da ativação das COX-1 e COX-2, bem como do receptor EP4.

Figura 8 - Representação esquemática dos mecanismos envolvidos na biossíntese de PGE_2 , induzido pela MT-III, em pré-adipócitos da linhagem 3T3-L1.



Nota: A MT-III, uma fosfolipase A_2 secretada, interage com a membrana dos pré-adipócitos e induz a ativação de fatores de transcrição, ainda não determinados, que ocasionam o aumento dos níveis proteicos da COX-2 e da PGESm-1. Além disso, a MT-III induz a ativação da COX-1, COX-2 e do receptor EP4 para a biossíntese da PGE_2 .

REFERÊNCIAS

AHIMA, Rexford S.; FLIER, Jeffery S. Adipose tissue as an endocrine organ. **Trends Endocrinol Metab.**, v. 11, n.8, p. 327- 32, Oct. 2000.

AMRI, Ez-Zoubir; BERTRAND, Bénédicte; AILHAUD, Gérard; GRIMALDI, Paul. Regulation of adipose cell differentiation. I. Fatty acids are inducers of the aP2 gene expression. **J Lipid Res.**, v. 32, p. 1449-56, 1991.

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

CHAVES, Fernando; LEON, Giorgina; ALVARADO, Victor Hugo; GUTIÉRREZ, José Maria. Pharmacological modulation of edema induced by Lys-49 and Asp-49 myotoxic phospholipases A2 isolated from the venom of the snake *Bothrops asper* (terciopelo). **Toxicol.**, v. 36, p. 1861-1869, 1998.

CHILTON, Floyd. H.; AVERILL, Francis. J.; HUBBARD, Walter. C.; FONTEH, Alfred. N.; TRIGGIANI, Massimo; LIU, Mark. C. Antigen-induced generation of lyso-phospholipids in human airways. **J. Exp. Med.**, v. 183, p. 2235-2245, 1996.

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

ENOMOTO, Nobuyuki. et al. Kupffer cell-derived prostaglandin E2 is involved in alcohol-induced fat accumulation in rat liver. **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.**, v. 279, p. 100–106, 2000.

FAIN, John. N.; BAHOUTH, Sulleiman W. Regulation of leptin release by mammalian adipose tissue. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 274, p. 571–575, 2000.

GARCES, Fátima et al. High plasma phospholipase A2 activity, inflammation markers, and LDL alterations in obesity with or without type 2 diabetes. **Obesity (Silver Spring)**, v. 18, n. 10, p. 2023-2029, 2010.

GARCÍA-ALONSO, Verónica et al. Prostaglandin E2 Exerts Multiple Regulatory Actions on Human Obese Adipose Tissue Remodeling, Inflammation, Adaptive Thermogenesis and Lipolysis. **Plos One**, v. 11, n. 4, p.1-17, abr. 2016.

GUIJAS, Carlos et al. Phospholipase A2 regulation of lipid droplet formation. **Biochimica Et Biophysica Acta (bba) - Molecular And Cell Biology Of Lipids.**, v. 1841, n. 12, p.1661-1671, dez. 2014.

GUTIERREZ, José Maria et al. Inflammatory infiltrate in skeletal muscle injected with Bothrops asper venom. **Rev. Biol. Trop.**, v. 34, p. 209-219, 1986.

HAAPAMAKI, Markku. et al. Elevated group II phospholipase A2 mass concentration in serum and colonic mucosa in Crohn's disease. **J. Clin. Chem. Lab. Med.**, v. 36, p. 751-755, 1998.

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

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

HUGGINS, Kevin .W.; BOILEAU, Amy .C.; HUI, David Y. Protection against diet-induced obesity and obesity-related insulin resistance in group 1B PLA2-deficient mice, **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, v. 283, p. 994 -1001, 2002.

HUI, David Y. Phospholipase A2 enzymes in metabolic and cardiovascular diseases. **Curr. Opin. Lipidol.**, v. 23, n.3, p. 235-40, 2012.

IYER, Abishek; FAIRLIE, David P.; PRINS, Joannes B.; HAMMOCK, Bruce .D.; BROWN, Lindsay. Inflammatory lipid mediators in adipocyte function and obesity. **Nat. Rev. Endocrinol.**, v. 6, n. 2, p. 71-82, 2010.

JAWORSKI, Kathy. et al. AdPLA ablation increases lipolysis and prevents obesity induced by high-fat feeding or leptin deficiency. **Nat. Med.**, v. 15, p. 159-168, 2009.

KIM, D. et al. Bronchoalveolar lavage fluid phospholipase A2 activities are increased in human adult respiratory distress syndrome. **Am. J. Physiol.**, v. 269, p. 109-118, 1995.

LAMBEAU, Gérard.; GELB, Michael H. Biochemistry and physiology of mammalian secreted phospholipases A2. **Annu. Rev. Biochem.**, v.77, p. 495-520, 2008.

LEIGUEZ JUNIOR, Elbio. **Estudo dos fatores envolvidos na formação de corpúsculos lipídicos, induzido por uma fosfolipase A2, isolada do veneno de serpente: síntese e metabolismo de lipídeos.** 2015. 132 f. Tese (Doutorado em Imunologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

LEIGUEZ, Elbio et al. Critical role of TLR2 and MyD88 for functional response of macrophages to a group IIA-secreted phospholipase A2 from snake venom. **PLoS One**, v. 9, n.4, p. e93741, 2014.

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

LI, Hiromi; HATAKEYAMA, Shinji; TSUTSUMI, Kae; SATO, Takashi; AKIBA, Satoshi. Group IVa phospholipase A2 is associated with the storage of lipids in adipose tissue and liver. **Prostaglandins Other Lipid Mediat.**, v. 86, p. 12-17, 2008.

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

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

LOMONTE, Bruno et al. Host response to *Bothrops asper* snake venom. Analysis of edema formation, inflammatory cells, and cytokine release in a mouse model. **Inflammation.**, v. 17, p. 93-105, 1993.

MADSEN, Lise et al. Adipocyte differentiation of 3T3-L1 preadipocytes is dependent on lipoxygenase activity during the initial stages of the differentiation process. **Biochem. J.**, v. 375, p. 539-549, 2003.

MATSUDA, Tadashi.; HIRANO, Toshio. IL-6. In Oppenheim JJ & Feldmann M (eds.) Cytokine Reference, New York, London; 2000, p. 537–563.

MCCOY, Jennifer M.; WICKS, Joan R.; AUDOLY, Laurent P.. The role of prostaglandin E2 receptors in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. **Journal Of Clinical Investigation**, v. 110, n. 5, p. 651-658, set. 2002.

MICHAUD, Andréanne et al. Prostaglandin (PG) F2 Alpha Synthesis in Human Subcutaneous and Omental Adipose Tissue: Modulation by Inflammatory Cytokines and Role of the Human Aldose Reductase AKR1B1. **Plos One**, v. 9, n. 3, mar. 2014.

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

MURAKAMI, Makoto.; TAKETOMI, Yoshitaka.; MIKI, Yoshimi.; SATO, Hiroyasu.; HIRABAYASHI, T.; YAMAMOTO, Kei. Recent progress in phospholipase A₂ research: from cells to animals to humans. **Prog. Lipid Res.**, v.50, p. 152-192, 2011.

MURAKAMI, Makoto.; TAKETOMI, Yoshitaka.; MIKI, Yoshimi.; SATO, Hiroyasu.; YAMAMOTO, Kei.; LAMBEAU, Gérard. Emerging roles of secreted phospholipase A2 enzymes: The 3rd edition. **Biochimie.**, 2014.

PAUL, Antoni; CHANG, Benny H.; LI, Lan; YECHOOR, Vijay K.; CHAN, Lawrence. Deficiency of adipose differentiation-related protein impairs foam cell formation and protects against atherosclerosis. **Circ. Res.**, v.102, p. 1492–1501, 2008.

PEREZ, Silvia; ASPICHUETA, Patricia; OCHOA, Begoña; CHICO, Yolanda. The 2-series prostaglandins suppress vLDL secretion in an inflammatory conditiondependent manner in primary rat hepatocytes. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1761, p. 160–171, 2006.

RIZZO, Maria T.; NGUYEN, Elisabeth; ALDO-BENSON, Marlene; LAMBEAU, Gérard. Secreted phospholipase A(2) induces vascular endothelial cell migration. **Blood**, v. 96, p. 3809-15, 2000.

SATO, Hiroyasu. et al. Physiological roles of group X-secreted phospholipase A2 in reproduction, gastrointestinal phospholipid digestion, and neuronal function. **J. Biol. Chem.**, v. 286, p. 11632-11648, 2011.

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

SHILLABEER, G.; KUMAR, V.; TIBBO, E.; LAU, D. C. Arachidonic acid metabolites of the lipoxygenase as well as the cyclooxygenase pathway may be involved in regulating preadipocyte differentiation. **Metabolism**, v. 47, p. 461–466, 1998.

SILLIMAN, Christopher et al. Presence of the M-type sPLA(2) receptor on neutrophils and its role in elastase release and adhesion. **Am. J. Physiol. Cell. Physiol.**, v. 283, p. 1102-1113, 2002.

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

STADEL, J.M.; HOYLE, K.; NACLERIO, R.M.; ROSHAK, A.; CHILTON, F.H. Characterization of phospholipase A2 from human nasal lavage. **Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.**, v. 11, p. 108-113, 1994.

SUGIMOTO, Yukihiro; NARUMIYA, Shuh. Prostaglandin E receptors. **J. Biol. Chem.**, v. 282, p. 11613-11617, 2007.

VADAS, P. Elevated plasma phospholipase A2 levels: correlation with the hemodynamic and pulmonary changes in gram-negative septic shock. **J. Lab. Clin. Med.**, v. 104, p. 873-877, 1984.

VADAS, P.; PRUZANSKI, W. Role of secretory phospholipases A2 in the pathobiology of disease. **Lab. Invest.**, v. 55, p. 391-404, 1986.

VALENTIN, Emmanuel.; LAMBEAU, Gérard. What can venom phospholipases A(2) tell us about the functional diversity of mammalian secreted phospholipases A(2)? **Biochimie**, v. 82, p. 815-831, 2000.

XIE, W.; HAMILTON, J. A.; KIRKLAND, J. L.; CORKEY, B. E.; GUO, W. Oleate-induced formation of fat cells with impaired insulin sensitivity. **Lipids**, v. 41, p. 267-271, 2006.

YU, Jing et al. mPGES-1-derived PGE₂ contributes to adriamycin-induced podocyte injury. **American Journal Of Physiology - Renal Physiology**, v. 310, n. 6, p. 492-498, jan. 2016.

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

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

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