



Fundação Oswaldo Cruz/FIOCRUZ
Ministério da Saúde
Instituto Oswaldo Cruz
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Estudo da modulação de corpúsculos lipídicos em células epiteliais

Luciana de Souza Moreira

Tese de Mestrado

Rio de Janeiro

2007

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Manguinhos / CICT / FOCRUZ - RJ

M838 Moreira, Luciana de Souza

Estudo da modulação de corpúsculos lipídicos em células epiteliais /
Luciana de Souza Moreira. – Rio de Janeiro, 2007.
xiv, 80 f. : il. ; 30 cm.

Bibliografia: f. 58-80
Dissertação (mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Biologia Celular e
Molecular, 2007.

1. Corpúsculos lipídicos. 2. Ácido araquidônico. 3. célula epitelial.
4. Inflamação. 5. Neoplasias. I. Título.

CDD: 571.978

Fundação Oswaldo Cruz/FIOCRUZ
Ministério da Saúde
Instituto Oswaldo Cruz
Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

**Título da Tese de Mestrado: Estudo da modulação de corpúsculos lipídicos
em células epiteliais**

Autora: Luciana de Souza Moreira

Orientadores: Dr. Bruno Lourenço Diaz

Dra. Christianne Bandeira de Melo

Data: 08 de Fevereiro de 2007

Componentes da Banca examinadora:

Dra. Patrícia Torres Bozza

Dr. José Andrés Morgado Díaz

Dr. Cláudio Azevedo Canetti

1º Suplente e revisora: Dra. Clarissa Maya Monteiro

2º Suplente: Dra. Adriana Ribeiro Silva

Trabalho apresentado por Luciana de Souza Moreira ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Instituto Oswaldo Cruz, visando obtenção de grau de Mestre em Biologia Celular e Molecular.

Este trabalho foi realizado no Grupo de Inflamação e Câncer da Divisão de Biologia Celular da Coordenação de Pesquisa do Instituto Nacional de Câncer, sob a orientação científica do Dr. Bruno Lourenço Diaz e da Dra. Christianne Bandeira de Melo, com apoio financeiro do CNPq e FAPERJ.

A Deus e aos meus pais

Agradecimentos

Ao Deus onipotente que é o meu refúgio e minha fortaleza, socorro bem presente nas tribulações.

Aos meus pais Ana e Donato que apesar das dificuldades sempre me apoiaram e me permitiram seguir os meus ideais, que aturam as minhas manias e reclamações e compreenderam a minha ausência em muitos finais de semana.

Ao Doutor Bruno Lourenço Diaz, que me deu a oportunidade de iniciar minha carreira científica ao seu lado, quem com muita paciência me ensinou os protocolos e tolerou minhas falhas. Obrigado pela excelente orientação e pelos anos de convivência. Pelo profissionalismo e por sua dedicação durante esse tempo.

À Dra. Christianne Bandeira de Melo pela participação fundamental no desenho experimental e discussão dos resultados desse trabalho.

À Ana Paula pelo companheirismo, ao Gustavo pelo exemplo de boas práticas de laboratório, e em especial ao Bruno Piva que incansavelmente me acompanhou na dura contagem dos corpúsculos lipídicos, que com samba e piada tornou esses momentos divertidos. Valeu Piva!!!

A vocês: “Fernandas”, Monique, Célia, Taís e Luciana que junto com Ana, Gu e Piva formaram o Grupo de Inflamação e Câncer e proporcionaram horas de descontração no laboratório, ou melhor, na cozinha...

Ao Leonardo Karam pelas ajudas nos equipamentos e principalmente pelos importantes conselhos para o futuro, além do exemplo de dedicação e disposição para leitura prévia desta tese.

Aos colaboradores Patrícia Bozza, Hugo Caire, João Viola e Marcello Barcinski pelo livre acesso aos equipamentos e reagentes dos laboratórios.

Ao meu amigo Marcelinho, por estar sempre por perto, pela paciência de me ouvir falando horas da minha vida e dos meus projetos e de rir comigo nas minhas inconstâncias.

Às meninas do Vitória em Cristo que oraram, se alegraram e dançaram comigo. E também, Geraldinho, Milene, Rafael Ramos, Roberta, Vanessa, e todos da PIBQ que apesar da distância estão torcendo por mim.

À Lucimar pela amizade sincera, Tito, Tatiana, Juan Pablo, Juan Carlos, Alex, Adriana, John, e Marcel que passaram na minha vida e me ensinaram o espanhol.

Ao apoio financeiro de CNPq, FAPERJ e INCA/MS.

Sumário

Resumo	ix
Abstract	x
Lista de abreviações	xi
Lista de esquemas e figuras	xiii
1 – Introdução	
1.1 – O Trato gastrointestinal	01
1.1.1 – Integridade do epitélio intestinal	03
1.1.2 – Injúria intestinal, Inflamação e câncer	04
1.2 – Mediadores lipídicos da inflamação	06
1.2.1 – Fosfolipases A ₂ e Ácido Araquidônico	06
1.2.2 – Ciclooxygenases e PGE ₂	09
1.2.3 – Corpúsculos lipídicos	11
1. 2.3.1 – Proteínas relacionadas a corpúsculos lipídicos	13
1.2.3.2 – Função dos corpúsculos lipídicos	14
1.3 – Vias de sinalização celular	16
1.3.1 - Proteínas cinases C (PKC).....	16
1.3.2 - Proteínas cinases de fosfatidilinositol-3 (PI3K).....	17
1.3.3 - Proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPK).....	18
2 – Objetivo	20
3 – Materiais e Métodos	21
3.1 – Materiais	21
3.2 – Células	21
3.3 – Tratamento e indução de corpúsculos lipídicos	22
3.4 – Coloração de corpúsculos lipídicos	22
3.5 – Lisado celular	23
3.6 – Western Blotting	23

3.7 – Produção de PGE ₂	24
3.8 – Modelo de Cicatrização	24
3.9 – Liberação de ácido araquidônico	25
3.10 – Análise estatística	25
4 – Resultados	26
4.1 – Biogênese de corpúsculos lipídicos induzida por AA.....	26
4.2 – Vias de sinalização envolvidas na biogênese de corpúsculos lipídicos induzida por AA	26
4.3 – Corpúsculos lipídicos se correlacionam com a liberação de AA ...	27
4.4 – AA induz a expressão de COX-2.....	28
4.5 – Ausência de corpúsculos lipídicos em borda de lesão de monocamada celular	28
4.6 – Ácido araquidônico altera a integridade da monocamada celular	28
4.7– Presença de corpúsculos lipídicos em células não-confluentes	29
4.8 – Biogênese de corpúsculos lipídicos induzida por SFB.....	29
4.9 – Vias de sinalização envolvidas na biogênese de corpúsculos lipídicos induzida por SFB	30
4.10 – Biogênese de corpúsculos lipídicos induzida por SFB é independente de COX	30
5 – Discussão	49
6 – Conclusão	57
7 – Referências Bibliográficas	58

Resumo

Corpúsculos lipídicos (CLs) são inclusões citoplasmáticas compostas principalmente por triglicerídeos e ésteres de colesterol, sendo também depósitos intracelulares de ácido araquidônico (AA) que pode ser metabolizado para a formação de eicosanóides. A PGE₂ é o principal metabólito da via do AA produzido por células epiteliais. É um potente mediador capaz de modular a motilidade, sobrevivência celular, proliferação celular e angiogênese, que são processos importantes na restauração da homeostase do tecido epitelial após injúria. O nosso objetivo central foi investigar a modulação da biogênese de CLs e seu papel na via do AA em células epiteliais. Foram avaliados: i) a indução de CLs por mediadores inflamatórios; ii) as vias de sinalização intracelular envolvidas; iii) e a modulação de CLs durante a proliferação e migração celular. Utilizamos como modelo experimental uma linhagem celular derivada de epitélio intestinal normal de rato (IEC-6) e os CLs foram contados por microscopia de campo claro após coloração com tetróxido de ósmio. Análise da expressão de proteínas foi realizada por Western Blot e a produção de PGE₂ por EIA no sobrenadante das culturas. Células IEC-6 cultivadas em DMEM suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB) apresentaram de 15 a 20 CL/célula em sub-confluência. Entretanto a retirada de SFB ou o estabelecimento de confluência nas culturas elimina os CLs das células. A biogênese de corpúsculos lipídicos foi induzida por SFB em células não-confluentes foi bloqueada por inibidores de ERK1/2 e p38. A estimulação de IEC-6 confluyente com IL-1 β e PAF e PMA foi incapaz de induzir a biogênese de CLs. Enquanto a adição de AA induziu a formação de CLs de maneira dose-dependente, mas independente de seu metabolismo a PGE₂, e focos de proliferação nas células confluentes. A formação de corpúsculos lipídicos induzida por AA depende da sinalização por p38, PKC e PI3K, mas não de ERK 1 e 2 ou JNK. A biogênese de corpúsculos lipídicos em células epiteliais facilitou a mobilização de AA após ativação sem alterar a expressão de Fosfolipase A₂ citosólica- α (cPLA2- α). Nossos resultados sugerem uma forte relação entre a biogênese de corpúsculos lipídicos e proliferação celular, e que essas organelas são induzidas de forma estímulo-específica em células epiteliais facilitando a mobilização de AA.

Abstract

Lipid Bodies (LBs) are cytoplasmic inclusions mainly formed by triglycerides and cholesterol esters, being also intracellular deposits of arachidonic acid (AA), which can be metabolized for generation of eicosanoids. PGE₂ is the major AA metabolite produced by epithelial cells. It is a potent mediator of cell motility, survival, proliferation and angiogenesis, all central processes to restoration of epithelial tissue homeostasis after injury. Our aim was to investigate LBs biogenesis and their role in AA metabolic pathway in epithelial cells. Specifically we evaluated: i) induction of LBs by inflammatory mediators; ii) intracellular signaling pathways involved in such induction; iii) and modulation of LBs during cell proliferation and migration. We used IEC-6 as experimental model, a cell line derived from rat normal intestinal epithelium. LBs were evaluated under light microscopy after staining by osmium tetroxide. Protein expression level was assessed by western blotting, and PGE₂ generation determined by EIA in cell culture supernatants. IEC-6 cells cultured sub-confluently in DMEM supplemented with 5% fetal bovine serum (FBS) presented 15-20 LBs/cell. FBS withdraw or reaching confluency eliminated LBs. FBS-induced LB biogenesis in sub-confluent cells was blocked by ERK1/2 and p38 inhibitors. Stimulation of confluent IEC-6 by IL-1 β , PAF and PMA was unable to induce LBs. In contrast, addition of AA dose-dependently-induced LB formation, independent of its metabolism to PGE₂, and proliferation foci in confluent cells. LBs formation induced by AA was dependent on signaling through p38, PKC and PI3K, but not on ERK 1/2 or JNK. LB biogenesis by epithelial cells facilitates AA release after activation without changes in cytosolic phospholipase A₂- α (cPLA₂- α) expression. Altogether, our results suggest a strong relationship between LB biogenesis and cell proliferation, and indicate that such organelles are induced in a stimulus-specific manner and facilitate AA mobilization in epithelial cells.

Abreviações

5-LO	Lipoxigenase 5
AA	Ácido araquidônico
ADRP	Proteína relacionada a diferenciação de adipócitos
AO	Ácido oleico
ARE	Região rica em elementos de adenina
ARF	Fator de ribosilação de adenonisa difosfato
Cav	Caveolina
CHO	Células de ovário de hamster chinês
CoA	Coenzima A
COX	Ciclooxigenase
cPGES	Sintase de prostaglandina E citosólica
cPLA₂	Fosfolipase A ₂ citosólica
CRC	Câncer colorretal
DAG	Diacilglicerol
DMEM	Meio de Eagle modificado por Dulbecco
EC	Éster de colesterol
EDTA	Ácido etileno diamino tetracético
EGF	Fator de crescimento epitelial
EGFR	Receptor do fator de crescimento epitelial
EIA	Ensaio imunoenzimático
ERK	Proteína cinase regulada por sinal extracelular
FAP	Síndrome da polipose adenomatosa familiar
FGF	Fator de crescimento de fibroblastos
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HEK	Células de rim embrionário humano
HGF	Fator de crescimento de hepatócitos
HNPCC	Câncer colorretal hereditário sem polipose
HUVEC	Células endoteliais de veia umbilical humana
IBD	Doença inflamatória intestinal
IEC	Células de epitélio de intestino delgado de rato
IL	Interleucina
iPLA₂	Fosfolipase A ₂ independente de cálcio
JNK	Cinase da região N-terminal de c-jun
LT	Leucotrieno
MAPK	Proteína cinase ativada por mitógenos

mPGES	Sintase de prostaglandina E microsomal
NF-κB	Fator nuclear κ B
PAF	Fator de ativação plaquetária
PAF-AH	Acetil hidrolase do fator de ativação plaquetária
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
PAT	Perilipina, ADRP e Tip 47
PBS	Tampão fosfato salino
PDK	Proteína cinase dependente de fosfatidilinositol
PG	Prostaglandina
PI	Fosfatidilinositol
PI3K	Fosfatidilinositol 3 cinase
PKA	Proteína cinase A
PKC	Proteína cinase C
PLA₂	Fosfolipase A ₂
PMA	Acetato de miristato de forbol
RE	Retículo endoplasmático
RIE	Células de epitélio intestinal de rato
RNA	Ácido ribonucléico
RNA_m	Ácido ribonucléico mensageiro
SDS	Duodecil sulfato de sódio
SFB	Soro fetal bovino
sPLA₂	Fosfolipase A ₂ secretória
TAG	Triacilglicerol
TBS	Tampão tris salina
TEER	Resistência elétrica transepitelial
TGF	Fator de crescimento transformante
TNF	Fator de necrose tumoral
TPA	Acetato de tetradecanoilforbol
VEGF	Fator de crescimento de endotélio vascular

Lista de Esquemas e Figuras

Esquema 1.1 – Estrutura do intestino delgado e intestino grosso.

Esquema 1.2 – Vias de Metabolização do ácido araquidônico.

Esquema 5.1 – Biogênese de corpúsculos lipídicos em IEC-6.

Figura 4.1 – Células IEC-6 confluentes não apresentam corpúsculos lipídicos.

Figura 4.2 – Efeito de estímulos inflamatórios na indução de corpúsculos lipídicos em IEC-6 confluyente.

Figura 4.3 – A biogênese de corpúsculos lipídicos induzida por AA em IEC-6 confluyente.

Figura 4.4 – A biogênese de corpúsculos lipídicos induzida por AA em IEC-6 confluyente é independente da formação de PGE_2 .

Figura 4.5 – A biogênese de corpúsculos lipídicos induzida por AA em IEC-6 confluyente é dependente da via de PI3K e PKC.

Figura 4.6 – A biogênese de corpúsculos lipídicos por AA em IEC-6 confluyente é independente de ERK1/2 e JNK.

Figura 4.7 – A fosforilação de ERK 1/2 e JNK não é induzida por AA em IEC-6 confluyente.

Figura 4.8 – p38 MAPK participa na formação de corpúsculos lipídicos induzida por AA em IEC-6 confluyente.

Figura 4.9 – AO induz a formação de corpúsculos lipídicos em IEC-6 confluyente

Figura 4.10 – O aumento do número de corpúsculos lipídicos se correlaciona com o aumento da liberação de AA.

Figura 4.11 – Ativação de IEC-6 confluyente com AA induz a expressão de COX-2 mas não altera a expressão de $cPLA_2$.

Figura 4.12 – Corpúsculos lipídicos estão ausentes na borda da lesão.

Figura 4.13 – Ativação prolongada com AA altera a integridade da monocamada de células IEC-6.

Figura 4.14 – Correlação inversa entre o número de corpúsculos lipídicos e estágio de confluência em IEC-6.

Figura 4.15 – Deprivação de SFB reduz o número de corpúsculos lipídicos em IEC-6 não-confluyente.

Figura 4.16 – Meio condicionado de células confluentes não altera o número de corpúsculos lipídicos em células não-confluentes.

Figura 4.17 – A biogênese de corpúsculos lipídicos induzida por SFB em IEC-6 não-confluyente é dependente da via de p38 e ERK1/2.

Figura 4.18 – A biogênese de corpúsculos lipídicos induzida por SFB em IEC-6 não-confluyente é independente da via de COX.

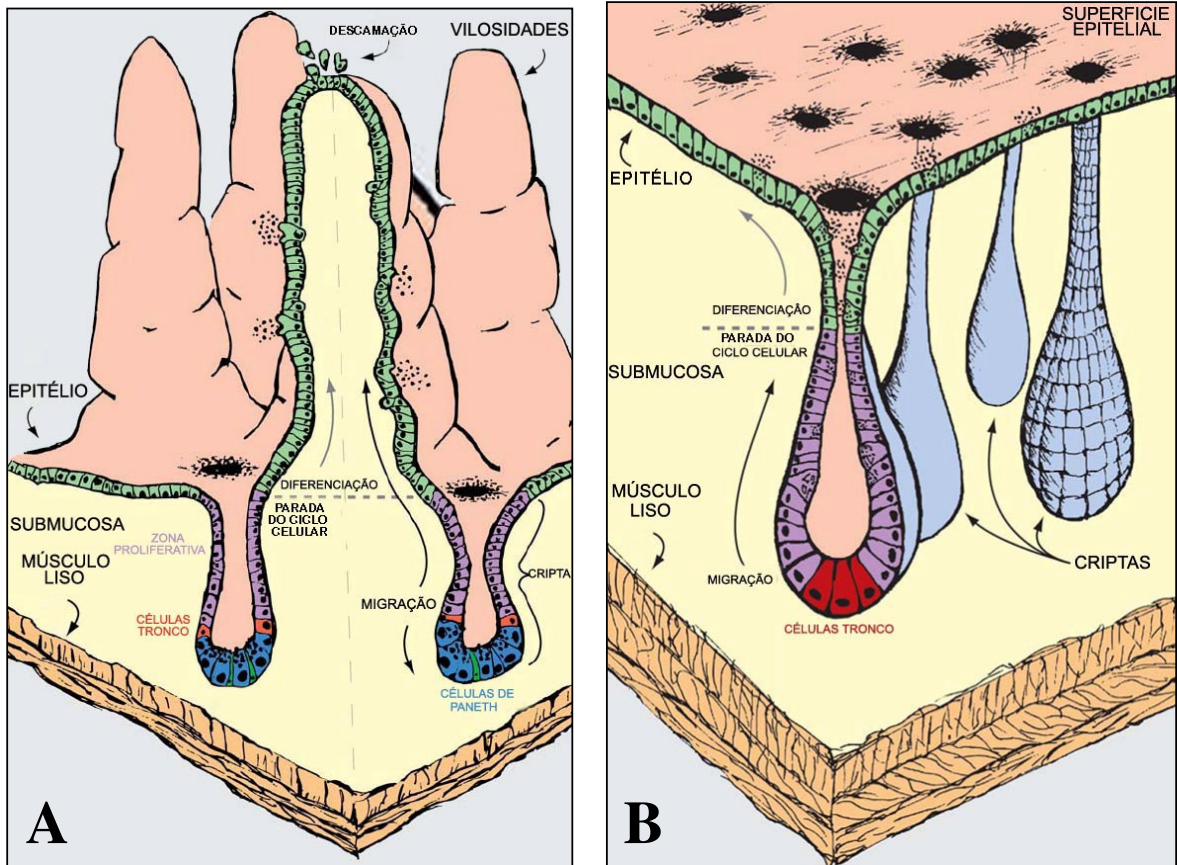
1 – Introdução

1.1 – O trato gastrointestinal

O trato gastrointestinal é um ambiente dinâmico que serve primariamente como órgão de captação de água e nutrientes para o corpo. Cada parte do trato gastrointestinal está adaptada para desempenhar funções específicas, o esôfago para a passagem do alimento, o estômago para armazenamento e mistura do alimento com secreções gástricas iniciando a digestão, e o intestino responsável por concluir a digestão e absorção dos nutrientes.

A parede do trato intestinal é constituída por seis camadas bem definidas. Da superfície do lúmen para o interior do órgão, inclui as seguintes camadas: mucosa, submucosa, camada muscular circular, camada muscular longitudinal e serosa (Guyton e Hall, 2002). O trato intestinal é uma estrutura complexa, apresentando depressões na superfície que são invaginações do epitélio na submucosa, denominadas criptas de Lieberkuhn e por protusões luminais formando as vilosidades, sendo essas encontradas somente no intestino delgado (Sancho et al., 2004) (Esquema 1.1). Além disso, as células epiteliais intestinais são caracterizadas pela presença de microvilosidades na região apical formando a borda em escova. O intenso pregueamento formado pela combinação das vilosidades e microvilosidades proporciona uma ampla superfície de contato com o bolo alimentar, garantindo a alta capacidade de absorção intestinal.

A mucosa do trato intestinal é revestida por uma única camada de células epiteliais, que se originam de células pluripotentes (células tronco intestinais), que se localizam na base da cripta. Essas células podem gerar quatro tipos de células envolvidas em funções homeostáticas, como os enterócitos envolvidos no processo de digestão de nutrientes e absorção; as células caliciformes, principais células produtoras de mucinas; as células enteroendócrinas que secretam hormônios peptídicos; e as células de Paneth que secretam substâncias antimicrobianas e enzimas digestivas, estando ausentes do intestino grosso (Cheng e Leblond, 1974). Dentre esses quatro tipos celulares, o enterócito é o principal tipo celular encontrado no epitélio intestinal, revestindo aproximadamente 80% do órgão. São células epiteliais polarizadas liberando enzimas digestivas e participando ativamente do processo de absorção pelo tecido epitelial, através do transporte transcelular (Snoeck et al., 2005).



Esquema 1.1 – Estrutura do intestino delgado e intestino grosso. O esquema apresenta as camadas mais externas voltadas para o lúmen do intestino delgado e grosso: camada muscular circular formada por músculo liso, submucosa e mucosa (epitelial) e também as células que compõe o revestimento epitelial. Em (A) a estrutura do intestino delgado, as células tronco se localizam logo acima das células de Paneth. As células em proliferação migram para região superior da cripta, parando de proliferar na junção da cripta com a vilosidade, se diferenciam em direção ao topo da vilosidade onde sofrem o processo de descamação. Em (B) a estrutura do intestino grosso, as células tronco se localizam na base da cripta, visto que as células de Paneth estão ausentes no intestino grosso. A parada do ciclo celular e a diferenciação ocorrem na região superior da cripta. Adaptado de Sancho e colaboradores, 2004.

Além das funções de digestão e absorção, uma função crucial do tecido epitelial intestinal é providenciar uma barreira contra substâncias tóxicas e imunogênicas a partir do lúmen do órgão. O epitélio é continuamente exposto a agentes nocivos incluindo fatores endógenos (enzimas pancreáticas e secreção biliar) e fatores externos (como derivados alimentares, patógenos e fármacos) que podem induzir danos na mucosa intestinal (Tabel et al., 2003). A superfície epitelial não é apenas uma barreira passiva para invasores. Esse tecido possui diversos mecanismos para reduzir a infecção por patógenos invasivos e danos por

compostos tóxicos. A integridade do epitélio intestinal depende da produção de mucinas, peptídeos antimicrobianos como as defensinas e liberação de citocinas (IL-1 β , IL-6 e TNF- α), assim como da alta capacidade de regeneração e organização desse epitélio (Oswald, 2006).

O epitélio intestinal é um sistema altamente dinâmico, continuamente renovado por um processo envolvendo proliferação e migração celular a partir dos compartimentos de células tronco, localizados na base das criptas, evoluindo para morte celular programada e descamação das células diferenciadas no topo da vilosidade (intestino delgado) ou na superfície do cólon (criptas coloretais) para o lúmen intestinal (Sancho et al., 2004) (Esquema 1.1). O processo completo, desde a proliferação até a descamação da célula, ocorre no prazo de 3 a 5 dias dependendo da espécie (Martin-Venegas et al., 2006). Essa manutenção é um mecanismo importante na fisiologia gastrointestinal devido à perda contínua das células através do atrito mecânico com o material ingerido, diferenciação e descamação.

1.1.1 – Integridade do epitélio intestinal

A integridade da barreira seletiva e a polarização das células epiteliais são estabelecidas e mantidas devido à interação célula-célula e célula-matriz em diferentes pontos de contato, os quais são coletivamente denominados de junções celulares. Funcionalmente, as junções celulares podem ser classificadas como: (i) junções de ancoramento, (exemplo: junções aderentes, desmossomos e hemidesmossomos); (ii) junções comunicantes (exemplo: junções tipo fenda e as sinapses químicas); e (iii) junções ocludentes (exemplo: junções compactas em vertebrados) (Alberts et al., 2004b).

As junções aderentes envolvem a ligação de feixes de actina entre as células adjacentes mediadas pelas regiões extracelulares dos homodímeros de E-caderinas, formando um cinturão de adesão na região basolateral das células epiteliais. No epitélio intestinal, a expressão de E-caderina é reduzida na fração basal da cripta (Escaffit et al., 2005). Corroborando esta correlação negativa entre E-caderina e proliferação celular, células superexpressando E-caderina têm uma redução significativa na proliferação e migração, com aumento de apoptose (Hermiston et al., 1996).

Os desmossomos são pontos de contato presentes na região basolateral que fixam uma célula à outra, através de filamentos intermediários sendo formados

principalmente por filamentos de queratina (Garrod et al., 1996). Na região basal de uma célula polarizada há os hemidesmossomos, um tipo de junção de ancoramento que integra elementos da matriz extracelular com o citoesqueleto da célula epitelial, constituído principalmente de filamentos intermediários (Green e Jones, 1996).

As junções comunicantes permitem a passagem de pequenas moléculas e íons entre as membranas de células adjacentes, através dos canais formados por proteínas denominadas conexinas. As junções compactas, ou zona ocludente selam as células adjacentes constituindo uma barreira semipermeável que permite a passagem de íons, solutos e água. Além disso, impede a difusão de proteínas entre os domínios apicais e basolaterais, favorecendo o transporte transcelular de macromoléculas (Madara et al., 1980; Mitic e Anderson, 1998). As claudinas são as principais proteínas formadoras de junções compactas, e não estão envolvidas apenas no estabelecimento e controle da polaridade e permeabilidade celular, mas também na transdução de sinal e tumorigênese (Oliveira e Morgado-Diaz, 2007).

A integridade da zona ocludente pode ser facilmente rompida pela remoção de cálcio extracelular, induzindo a perda da polaridade das células epiteliais afetando a permeabilidade paracelular (Cereijido et al., 2000). Essa permeabilidade paracelular pode ser um indicador do grau de organização das junções celulares e da integridade epitelial, e tem sido analisada através da medida da resistência elétrica trans-epitelial (TEER) (Grasset et al., 1984). Essa técnica tem sido amplamente utilizada para avaliar o efeito de diferentes fatores, como citocinas, substâncias derivadas de alimentos, fármacos e mediadores lipídicos da inflamação, na integridade do complexo juncional basolateral.

1.1.2 – Injúria intestinal, Inflamação e câncer

O epitélio intestinal está constantemente exposto a agentes infecciosos ou irritantes derivados da dieta ou da ingestão de medicamentos presentes no lúmen do órgão, além do trauma mecânico provocando injúrias teciduais. A injúria intestinal está associada a diversas características estruturais e funcionais caracterizada pela ruptura do revestimento epitelial, com perda da barreira e diminuição da TEER, danos no endotélio microvascular e até mesmo na musculatura da mucosa, como pode ser observado em úlceras gastrointestinais (Tarnawski, 2005). Estas lesões são rapidamente cicatrizadas devido a mecanismos celulares e moleculares que iniciam e mantêm a resposta para a reepitelização da área danificada.

O processo de cicatrização de úlceras gástricas é o mais bem estudado e envolve migração e proliferação das células epiteliais, angiogênese e deposição de matriz mediada por fibroblastos, sendo um processo altamente regulado por fatores de crescimento (EGF, VEGF, TGF- α e FGF) (Jones et al., 1999; Bouma e Strober, 2003; Tarnawski, 2005). Relatos prévios têm sugerido que migração celular é uma parte essencial do processo inicial de reparo da mucosa gastrointestinal, e esse processo de reparo tem sido denominado de restituição (McCormack et al., 1992; Terano et al., 2001). Durante o processo de restituição, células viáveis migram a partir da área adjacente para a superfície danificada para cobrir a área desnuda. Isto ocorre dentro de poucas horas, e não requer proliferação celular (Terano et al., 2001). Em contraste, em feridas mais extensas ou úlceras, a restituição pode levar dias ou semanas e requer migração e proliferação celular para restabelecer a superfície epitelial.

O processo inflamatório é essencial na restauração da homeostase tecidual, envolvendo recrutamento celular e liberação de mediadores inflamatórios, como citocinas e eicosanóides que atuam na proliferação e migração celular (Wallace e Ma, 2001). Diversos estudos têm apresentado que usos de drogas antiinflamatórias não-esteroidais, como aspirina, reduzem o processo de cicatrização do epitélio gastrointestinal (Halter et al., 2001; Wallace e Devchand, 2005). Inflamação associada com cicatrização tecidual normalmente é um processo “autocontrolado”, entretanto o desequilíbrio entre mediadores antiinflamatórios e pró-inflamatórios promove um risco de neoplasias, visto que o desenvolvimento tumoral é amplamente controlado por mediadores inflamatórios (Coussens e Werb, 2002).

Na inflamação crônica há insuficiência ou perda dos mecanismos requeridos para resolução do processo inflamatório, e conseqüentemente persistência dos fatores inflamatórios (Coussens et al., 2002). Citocinas e mediadores lipídicos induzem proliferação celular, recrutamento de células inflamatórias, aumento da liberação de espécies reativas de oxigênio levando a danos oxidativos no DNA concomitante com redução no reparo do DNA (Coussens et al., 2002). Independente do agente, infeccioso ou não, inflamação crônica providencia um ambiente ideal para o desenvolvimento de um câncer. No caso de doença inflamatória intestinal (IBD) crônica, a presença de mediadores inflamatórios provoca uma hiperplasia epitelial acentuada, com alterações na diferenciação e proliferação celular determinando inicialmente a formação de tumores benignos (O'Byrne e Dalglish, 2001).

Pacientes com IBD, como colite ulcerativa e doença de Crohn, possuem um risco elevado de desenvolvimento de câncer colorretal (CRC) (Itzkowitz e Yio, 2004). IBD está entre as três principais condições de alto risco para CRC, junto com Síndrome da Polipose Adenomatosa Familiar (FAP) e Câncer Colorretal Hereditário sem Polipose (HNPCC) (Instituto Nacional de Câncer et al., 2003; Itzkowitz et al., 2004). O CRC é o câncer mais comum do trato gastrointestinal e a lesão precursora dos adenomas ou pólipos não hereditários são frequentemente de natureza inflamatória (Higaki et al., 1999).

Estudos epidemiológicos documentaram a redução de 40-50% no risco de CRC em pessoas que usam regularmente aspirina (Thun et al., 1991; Thun et al., 1993). O efeito antitumoral dessas drogas é atribuído à capacidade de inibição das ciclooxigenases (COX) (Vane e Botting, 1998). A COX-2 é uma enzima cuja expressão é induzida durante a inflamação. A participação mais aceita para atuação da COX-2 na tumorigênese é a produção de PGE₂, um potente mediador lipídico capaz de modular motilidade e sobrevivência celular (Sheng et al., 2001), proliferação celular (Tsuji e DuBois, 1995), angiogênese (Tsuji et al., 1998) e ruptura do complexo juncional (Martin-Venegas et al., 2006).

1.2 – Mediadores lipídicos da inflamação

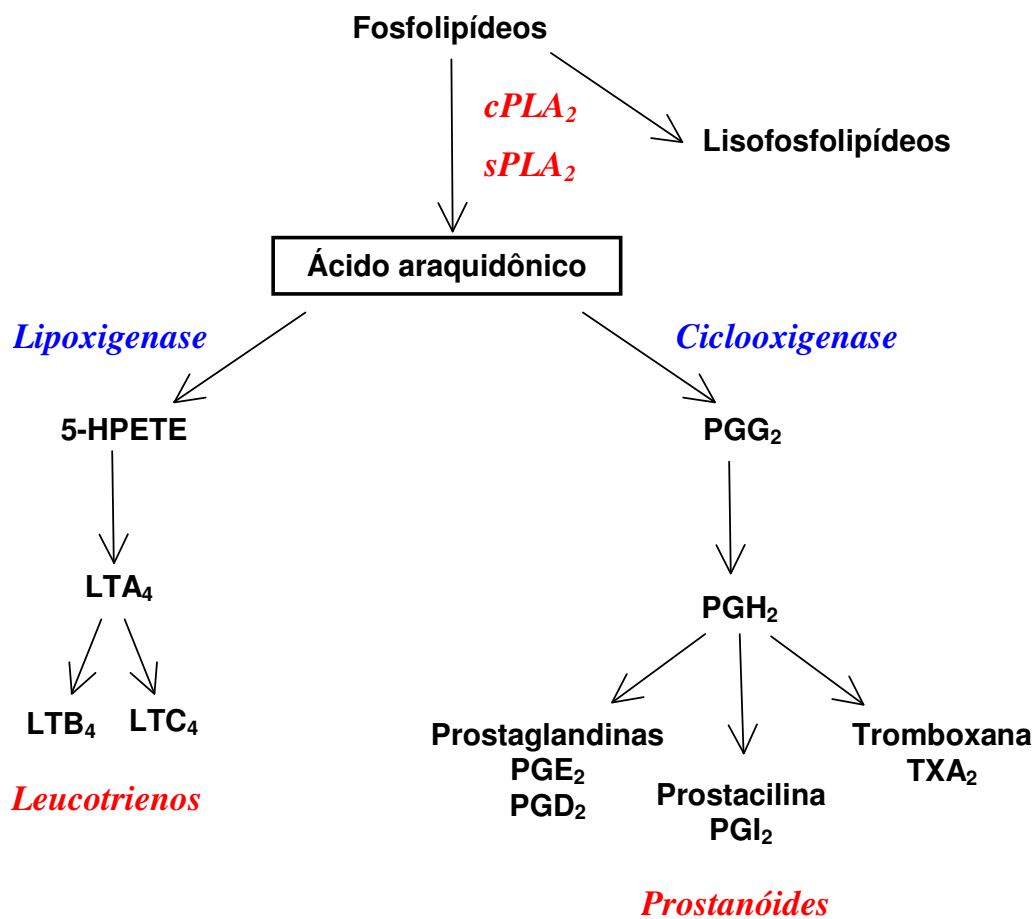
1.2.1 – Fosfolipase A₂ e Ácido Araquidônico

Fosfolipases A₂ (PLA₂) são enzimas envolvidas em metabolismo de lipídeos, tendo importante papel em vários processos celulares. A família de enzimas PLA₂ participa no primeiro passo de biossíntese de mediadores lipídicos da inflamação. As PLA₂ hidrolizam fosfolipídeos na posição *sn*-2 liberando lisofosfolipídeos e ácidos graxos. Um importante ácido graxo liberado no processo inflamatório é o ácido araquidônico (AA), o substrato da COX ou LO (Lipoxigenase) para formação dos eicosanóides (Diaz e Arm, 2003) (Esquema 1.2).

Os lisofosfolipídeos gerados a partir da ação das fosfolipases também podem ativar respostas celulares. Além disso, fosfolipídeos contendo uma ligação éter na posição *sn*-1 e um resíduo de colina ligado ao fosfato, ao serem hidrolisados por PLA₂ formam Liso-PAF. Esse metabólito pode ser acetilado na posição *sn*-2 formando PAF (fator de agregação plaquetária), um potente mediador lipídico,

envolvido em diversos processos celulares, principalmente inflamação (Prescott et al., 2000).

As enzimas PLA₂ têm sido caracterizadas e subdivididas em quatro grandes grupos, o das PLA₂ citosólicas (cPLA₂), o das secretórias (sPLA₂), as independentes de cálcio (iPLA₂) e as PAF acetil-hidrolases (PAF-AH). As isoformas de iPLA₂ ou Grupo VI são enzimas expressas de forma constitutiva, atuando principalmente no remodelamento da membrana, controlando o conteúdo de AA disponível para liberação por outras PLA₂ (Winstead et al., 2000). As enzimas dos grupos VII e VIII, que compreendem as PAF-AH degradam PAF, podendo atenuar e prevenir processos inflamatórios e estresse oxidativo (Tjoelker e Stafforini, 2000).



Esquema 1.2 – Vias de metabolização do ácido araquidônico – O ácido araquidônico liberado da posição sn-2 de um fosfolípido por fosfolipase A₂, pode ser metabolizado por 2 vias para formação dos mediadores lipídicos inflamatórios, os eicosanóides. A via das ciclooxygenases dá origem a endoperóxidos de prostaglandinas instáveis (PGG₂ e PGH₂), que são intermediários na biossíntese dos prostanóides que incluem as prostaglandinas, prostacilina e tromboxana. A via da lipoxigenase forma inicialmente um composto intermediário, o ácido hidroperóxi-eicosatetraenóico (5-HPETE), que é o precursor dos leucotrienos.

As PLA₂ hidrolizam fosfolipídeos podendo liberar substrato para formação de mediadores lipídicos, sendo amplamente aceito que diferentes isoformas de PLA₂, e principalmente cPLA₂ e sPLA₂, apresentam um papel no processo inflamatório (Yedgar et al., 2006). A participação de diferentes PLA₂ no fornecimento de AA para a síntese de eicosanóides é estímulo- e célula-dependente.

Vários estudos têm indicado que sPLA₂ e cPLA₂ agem de modo coordenado na geração de eicosanóides em macrófagos (Balsinde et al., 1998; Satake et al., 2004), neutrófilos (Kim et al., 2002), osteoblastos (Murakami et al., 1997) e fibroblastos (Kuwata et al., 1998). Deve se ressaltar que a cPLA₂- α é expressa de forma constitutiva na maioria dos tecidos (Dessen, 2000), enquanto que as sPLA₂ apresentam expressão diferenciada em diversos órgãos e tecidos (Andreani et al., 2000), tornando-se um potencial alvo terapêutico com maior seletividade e menos efeitos colaterais. A cPLA₂ são enzimas com peso molecular entre 61-114 KD, possuem um resíduo de serina em seu sítio catalítico, e são dependentes de concentração de cálcio na faixa de submicromolar (Six e Dennis, 2000).

As cPLA₂- α são enzimas de aproximadamente 85 KD, sendo a mais bem estudadas, devido a sua seletividade em liberar AA. Essas enzimas são ativadas após fosforilação seguida por uma translocação para sítios onde hidrolizam especificamente fosfolipídeos contendo AA. A disrupção do gene para cPLA₂- α demonstrou o requerimento dessa enzima para geração de eicosanóides por macrófagos (Uozumi et al., 1997; Bonventre et al., 1997) e mastócitos derivados de medula óssea (Fujishima et al., 1999). A deficiência desta enzima leva à redução do número de pólipos intestinais em camundongos susceptíveis (Takaku et al., 2000; Bandeira-Melo e Weller, 2003), indicando um potencial papel para a cPLA₂- α em câncer de cólon. Entretanto, esses resultados não excluem a participação de sPLA₂ na geração de eicosanóides.

As PLA₂ secretórias formam uma família composta por um número extenso de membros (IB, IIA, IIB, IIC, IID, IIE, IIF, III, V, X e XII), que possuem baixo peso molecular (entre 14 a 19 KDa) e necessitam de concentrações de cálcio na faixa de milimolar para ativação. As sPLA₂ diferem umas das outras por alguns aspectos como carga, distribuição tecidual e capacidade de interação com a membrana plasmática, devido à afinidade por proteoglicanos ou fosfatidilcolina (Diaz e Arm, 2003).

Vários indícios apontam para a participação de sPLA₂ em câncer. Estudos clínicos indicaram elevados níveis de sPLA₂-IIA em soro e na mucosa do cólon de

pacientes com colite ulcerativa e doença de Crohn, que são pacientes de alto risco para câncer de cólon (Haapamaki et al., 1999). A expressão de sPLA₂-X é detectada em tumores de cólon humanos, o que se correlaciona com a expressão de COX-2 nestes tecidos (Morioka et al., 2000). Em linhagens celulares de câncer de cólon, essa enzima potencia a liberação de AA e formação de PGE₂ dependente de COX-2 (Morioka et al., 2000). Além de fornecer AA livre para geração de PGE₂, algumas sPLA₂ também modulam a indução de COX-2. Em macrófagos e mastócitos, a sPLA₂-V participa na expressão de COX-2 (Balsinde et al., 1999; Diaz et al., 2006).

O AA liberado pelas PLA₂ não atua somente como substrato para síntese de eicosanóides, mas ao ser liberado, exerce efeitos diretos nas funções celulares. Estes efeitos incluem degranulação de neutrófilos (Bates et al., 1995), secreção de insulina por células de Langerhans isoladas (Band et al., 1992), diferenciação de células de leucemia promielocítica, HL60 (Finstad et al., 1994), inibição da permeabilidade entre células aderentes (Hii et al., 1995), aumento da aderência de neutrófilos e da expressão do receptor de integrina (Bates et al., 1993), aderência de células de câncer de mama em colágeno tipo IV (Paine et al., 2000), indução da migração de células epiteliais (Ruthig e Meckling-Gill, 1999) e modulação da proliferação de diversos tipos celulares, incluindo células tumorais (Monjazebe et al., 2006; Rasha et al., 2007).

Diversos mecanismos moleculares têm sido descritos para as ações de AA, como ativação de proteína cinase C (PKC) (Murakami e Routtenberg, 1985), fosfatidilinositol 3-cinase (PI3K) (Hii et al., 2001), e modulação da atividade de MAPK (Hii et al., 1998).

1.2.2 – Ciclooxygenases e PGE₂.

As ciclooxygenases são enzimas responsáveis pela conversão de AA em PGH₂, sendo este o precursor dos prostanóides, como prostaglandinas (PGE₂, PGD₂ e PGF₂α), prostaciclina e tromboxano. Estes são importantes reguladores de processos homeostáticos bem como de inflamação. A isoforma COX-1 é uma enzima constitutiva que sintetiza prostaglandina para manutenção do organismo, como no caso da proteção da mucosa gástrica e funções plaquetárias (Smith et al., 1998). A COX-2 é uma isoforma induzida por estímulos como citocinas e fatores de crescimento, e tem sido amplamente associada com doenças inflamatórias e câncer (Prescott e Fitzpatrick, 2000).

O AA após ser metabolizado pelas ciclooxigenases a PGH_2 , composto extremamente instável, e pode ser convertido rapidamente a prostaglandina, prostaciclina, ou a tromboxano pelas enzimas sintases terminais. A atividade de ciclooxigenase tem presença disseminada nos tecidos, sendo a presença dos produtos da cascata do AA dependente da distribuição e predomínio das enzimas sintases terminais.

Em câncer de cólon, a COX-2 possui um papel central no desenvolvimento do tumor, e a superexpressão dessa enzima é capaz de modular a proliferação (Leahy et al., 2002), metástase (Tsuji et al., 1997), e alterações do processo apoptótico (Tsuji et al., 1995). Abordagens genéticas como a disrupção do gene da COX-2 (*Ptgs2*) levam à redução significativa do risco de aparecimento de tumores intestinais em camundongos susceptíveis ao desenvolvimento desse tipo de tumor (Oshima et al., 1996). O modo mais aceito para a atuação da COX-2 na tumorigênese é a produção aumentada de PGE_2 .

Duas isoenzimas de sintase de prostaglandina E (PGES) têm sido identificadas e caracterizadas: a PGES citosólica (cPGES) e duas isoformas de PGES associadas a membrana (mPGES-1 e 2). Estudos de co-transfecção de COX e PGES sugerem que COX-2 trabalha mais eficientemente com mPGES-1, enquanto COX-1 é preferencialmente acoplada a cPGES. A disrupção do gene da mPGES-1 impossibilita a produção de PGE_2 em macrófagos estimulados com LPS (Uematsu et al., 2002), sugerindo um importante papel para essa isoforma em inflamação.

A expressão de COX-2 e mPGES-1 é simultaneamente aumentada em pólipos intestinais em modelo animal de FAP, enquanto a expressão de COX-1 e cPGES permanecem inalteradas quando comparadas com o tecido intestinal normal (Takeda et al., 2003). Corroborando o papel de mPGES-1 na tumorigênese, a co-transfecção de COX-2 e mPGES-1 em células HEK-293 induz formação de tumor quando essas células são injetadas em camundongos imunodeficientes (Kamei et al., 2003).

A PGE_2 é um potente mediador lipídico, capaz de modular a motilidade e sobrevivência celular (Sheng et al., 2001), aumentar a proliferação celular e induzir angiogênese (Tsuji et al., 1998). Estudos usando inibidores seletivos para COX-2 mostraram redução da proliferação de câncer de cólon (Sheng et al., 1997), e indução de apoptose de células endoteliais (Leahy et al., 2002), fortalecendo o papel de PGE_2 na tumorigênese.

1.2.3 – Corpúsculos lipídicos

Corpúsculos lipídicos são inclusões citoplasmáticas ricas em lipídeos, sendo a segunda maior reunião de lipídeos associada ao sistema biológico. A primeira é a bicamada lipídica que forma a matriz de todas as membranas celulares. Corpúsculos lipídicos têm sido encontrados em diversos tipos celulares de diversos organismos, incluindo leveduras, plantas, animais, bem como alguns procariontos (Murphy e Vance, 1999), e podem permitir a rápida mobilização de lipídeos para vários processos biológicos.

Em contraste com outras organelas citoplasmáticas, corpúsculos lipídicos são envoltos por uma única camada de fosfolipídeos (Tsuchi-Sato et al., 2002), apresentando um centro rico em lipídeos neutros, como triacilglicerol (TAG), diacilglicerol (DAG) e éster de colesterol (EC) (Murphy, 2001). Corpúsculos lipídicos podem ser relativamente heterogêneos em respeito a tamanho e composição (Murphy, 2001). Várias células estocam TAG e EC em corpúsculos lipídicos relativamente pequenos (<1 μm de diâmetro), por sua vez, adipócitos podem formar corpúsculos lipídicos que podem exceder 100 μm de diâmetro (Londos et al., 1999).

A biogênese de corpúsculos lipídicos vem sendo muito estudada, porém ainda é pouco compreendida. A hipótese mais aceita é que são formados a partir do retículo endoplasmático (RE). Com a síntese de triacilglicerol e ésteres de colesterol pelas enzimas acil CoA-diacilglicerol aciltransferase e acil CoA-colesterol aciltransferase no RE, há um acúmulo destes lipídeos entre as camadas citosólicas fosfolipídicas da membrana, gerando um brotamento para formar uma organela independente, limitada por uma monocamada de fosfolipídeos e proteínas (Martin e Parton, 2006). Uma das propostas da biogênese de corpúsculos lipídicos envolve invaginações da monocamada luminal do RE, onde ela ficaria disposta no interior dos corpúsculos lipídicos, explicando assim porque alguns corpúsculos lipídicos possuem várias monocamadas de fosfolipídeos no seu interior (Robenek et al., 2004).

A biogênese de corpúsculos lipídicos não é um simples reflexo do acúmulo de gordura, é um fenômeno altamente regulado sendo estímulo- e célula- específico (Bozza e Bandeira-Melo, 2005). Em leucócitos, diversos estímulos inflamatórios não-lipídicos são capazes de induzir a formação de corpúsculos lipídicos, como produtos derivados de bactérias e citocinas (Bozza et al., 2007), e esta indução requer ativação de diferentes vias de sinalização e síntese protéica, processos que também

são dependentes do estímulo e do tipo celular (Bozza et al., 1997a; Bozza et al., 1997b).

Corpúsculos lipídicos são associados com vários elementos de citoesqueleto, e podem estar cercados por uma cápsula fibrilar após sua formação (Almahbobi e Hall, 1990; Almahbobi et al., 1992; Almahbobi, 1995). Esta cápsula inclui filamentos intermediários de vimentina que são aderidas aos corpúsculos lipídicos por proteínas adaptadoras, como a proteína associada a filamentos intermediários P200 (Wang et al., 1997; Fong e Wang, 1997). A ruptura de filamentos de vimentina durante a diferenciação de adipócitos 3T3-L1 inibe o acúmulo de corpúsculos lipídicos (Lieber e Evans, 1996). Entretanto, a ausência de vimentina, em camundongos deficientes nesse gene, não prejudica a formação e maturação de corpúsculos lipídicos (Colucci-Guyon et al., 1994). O fenótipo de camundongos deficientes em vimentina sugere um papel importante para a P200, que poderia se acoplar a outras proteínas de citoesqueleto de maneira a compensar a perda de vimentina e impedir uma deficiência na formação de corpúsculo lipídicos (Murphy, 2001).

Apesar da cápsula fibrilar que circunda os corpúsculos lipídicos, essas organelas são estruturas altamente dinâmicas, capazes de se movimentar no espaço intracelular provavelmente para rápida relocação e disponibilização de lipídeos após ativação celular. Em eosinófilos ativados, ocorre polarização da célula e formação de uropódios, com subsequente translocação de corpúsculos lipídicos para essas regiões (Bandeira-Melo et al., 2001). Em células de carcinoma de cólon Caco-2, partículas de HDL(3) são rapidamente internalizadas e localizadas em corpúsculos lipídicos em um processo dependente de tubulina (Rogler et al., 2000). Em embriões de *Drosophila*, corpúsculos lipídicos são capazes de se movimentar bidirecionalmente por associação com dineína, uma proteína motora capaz de se mover através de microtúbulos (Welte et al., 1998). A mobilidade de corpúsculos lipídicos também tem sido observada em processo de fagocitose, essas estruturas têm sido encontradas próximo a fagossomos em macrófagos, sugerindo interação entre essas organelas (D'Avila et al., 2006).

Corpúsculos lipídicos também apresentam interações com outras organelas intracelulares. A principal e mais bem estudada interação é com o RE, visto que a hipótese mais aceita para biogênese de corpúsculos lipídicos é a partir dessa organela. Membranas do RE tem sido constantemente vistas circundando corpúsculos lipídicos (Ozeki et al., 2005; Robenek et al., 2006; Bozza et al., 2007). Associação de corpúsculos lipídicos com ribossomos e mitocôndrias tem sido

apresentada em mastócitos (Engelbrecht et al., 2005), e também com peroxissomos em células COS-7 (Schrader, 2001). Essas possíveis interações fortalecem o recente conceito de que corpúsculos lipídicos são organelas complexas e multifuncionais, e não apenas um estoque inerte de lipídeos.

1.2.3.1 – Proteínas relacionadas a corpúsculos lipídicos

O estudo de corpúsculos lipídicos com modernas técnicas proteômicas tem contribuído significativamente para a descrição das proteínas associadas aos corpúsculos lipídicos. Dentre essas proteínas, várias estão intimamente ligadas a transporte vesicular, fusão de membranas e motilidade de citoesqueleto, incluindo proteínas da família PAT, Rab e ADP-ribosylation factor (ARF) que são pequenas GTPases, caveolinas e fosfolipase D (PLD) (Liu et al., 2004; Cermelli et al., 2006).

Numerosas proteínas da família Rab, que são pequenas GTPases, têm sido detectadas em corpúsculos lipídicos, entretanto a Rab 18 tem recebido especial atenção, pois em contraste com outras Rab, somente essa isoforma é quase que exclusivamente encontrada em corpúsculos lipídicos (Ozeki et al., 2005). Além disso, Rab 18 apresenta localização específica após estímulo na superfície de corpúsculos lipídicos, sendo recrutada após a estimulação de lipólise em adipócitos com agonistas β -adrenérgicos (Martin et al., 2005). Rab 18 é localizada em corpúsculos lipídicos que são tipicamente ativos e a expressão dessa proteína é elevada em regiões de contato com o RE. A elevada associação com o RE é provavelmente para facilitar a transferência de ácidos graxos e lipídeos neutros entre a monocamada dos corpúsculos lipídicos e a bicamada do RE (Ozeki et al., 2005).

As caveolinas (Cav1, Cav2 e Cav3) são proteínas integrais de membrana, presentes nas invaginações características da membrana plasmática, os calvéolos, sendo importantes mediadoras no transportes de colesterol intracelular (Martin e Parton, 2005). Caveolina está presente na superfície de corpúsculos lipídicos (Robenek et al., 2004) e alterações no gene dessa proteína alteram o metabolismo dessas organelas. Mutante Cav3^{DGV}, o qual codifica uma proteína truncada da isoforma caveolina 3, promove um acúmulo de lipídeos neutros nos corpúsculos lipídicos, por reduzir a hidrólise e catabolismo desses lipídeos (Pol et al., 2004). Além disso, a expressão de caveolina mutante previne a associação de Rab 18 com a superfície dos corpúsculos lipídicos (Martin et al., 2005).

Recentemente, um estudo com camundongo mutante para isoforma de caveolina 1 (*cav1^{-/-}*) demonstrou que esses animais apresentavam regeneração prejudicada do fígado após hepatectomia parcial, com reduzida acumulação de corpúsculos lipídicos e as células eram incapazes de progredir no ciclo celular (Fernandez et al., 2006). Durante a regeneração do fígado, corpúsculos lipídicos parecem atuar principalmente no suprimento energético das células hepáticas, visto que o tratamento com glicose reverte o efeito prejudicial causado pela deficiência de caveolina.

As proteínas mais estudadas em corpúsculos lipídicos são as da família PAT, que inclui: perilipina, *adipose-differentiation related protein* (ADRP), TIP47 e S3-12. Em adipócitos, a principal proteína encontrada associada ao corpúsculo lipídico é a perilipina, enquanto em pré-adipócitos e em outras células, a proteína mais encontrada é ADRP (Blanchette-Mackie et al., 1995; Brasaemle et al., 1997a). A isoforma A de perilipina é a proteína mais abundante em corpúsculos lipídicos de adipócitos e células esteroideogênicas. A fosforilação da perilipina A em adipócitos através da ativação de proteína cinase A (PKA), é um evento chave no catabolismo de lipídeos nessas estruturas, pois é essencial para translocação da lipase sensível a hormônios (Brasaemle et al., 1997b). Brasaemle e colaboradores (1997) demonstraram que a expressão de perilipina A em pré-adipócitos, que normalmente não expressam essa proteína, acarreta na hidrólise retardada de triacilglicerol (Brasaemle et al., 1997a).

O RNAm para ADRP é encontrado em uma ampla variedade de tecidos murinos, como coração, cérebro, baço, pulmão, fígado e também em linhagens celulares, como 3T3-L1 (adipócitos), CHO (fibroblastos) e HepG2 (hepatoma) (Bergers e Benjamin, 2003). A superexpressão de ADRP em linhagens celulares resultou em aumentada incorporação de ácidos graxos e acúmulo de corpúsculos lipídicos (Gao e Serrero, 1999; Imamura et al., 2002). Recentemente, ADRP foi relacionada com disfunção renal em camundongos diabéticos (Mishra et al., 2004) e indicada como potencial marcador de diagnóstico e prognóstico para carcinoma renal (Yao et al., 2005).

1.2.3.2 – Função dos corpúsculos lipídicos

Diversos estudos têm levado a um novo conceito que os corpúsculos lipídicos não são somente um estoque de lipídeos neutros do tecido adiposo, mas uma

organela multifuncional. Diversas funções têm sido descritas para essas organelas, como participação na sinalização celular, tráfego de membrana e o mais óbvio a homeostase de lipídeos (Murphy, 2001). Essas estruturas também apresentam um importante papel em doenças, incluindo aterosclerose, diabetes, obesidade e câncer (Yao et al., 2005). Estudos em embrião de *D. melanogaster* também têm chamado a atenção para os corpúsculos lipídicos como uma organela crucial durante o desenvolvimento (Welte et al., 1998).

Acúmulo de corpúsculos lipídicos é um processo altamente indutível que pode ser disparado por uma variedade de estímulos de desenvolvimento, injúrias ambientais e pode apresentar um papel chave na resposta inflamatória. A síntese de eicosanóides depende da co-localização das enzimas responsáveis pela metabolização do AA. Dois sítios intracelulares são importantes para a formação de eicosanóides: a membrana nuclear e os corpúsculos lipídicos. Corpúsculos lipídicos estão aumentados em número e tamanho durante a inflamação e aumentam a capacidade celular de produção de eicosanóides sendo importantes sítios de produção desses mediadores em diversos tipos celulares envolvidos em processos inflamatórios (Weller et al., 1991b; Bandeira-Melo et al., 2002; Melo et al., 2006; Bozza et al., 2007).

Corpúsculos lipídicos servem de depósitos intracelulares de AA e representam fontes citoplasmáticas deste ácido graxo para a geração de mediadores lipídicos (Weller et al., 1991a; Bandeira-Melo et al., 2001). A participação de corpúsculos lipídicos na geração de mediadores lipídicos foi sugerida inicialmente pela localização de PLA₂ citosólica, MAPK, ciclooxigenases e lipoxigenases em uma variedade de leucócitos (Bozza et al., 1997b; Yu et al., 1998; Yu et al., 2000). A formação de corpúsculos lipídicos é induzida por ácidos graxos insaturados, como AA e ácido oléico em neutrófilos (Weller et al., 1991b) e em eosinófilos (Bozza et al., 1997b), e congregam as diferentes enzimas participantes na cascata de produção de eicosanóides (Weller e Dvorak, 1994). A detecção de prostaglandina E₂ (PGE₂) e Leucotrieno C₄ (LTC₄) neo-formados em corpúsculos lipídicos reforça o envolvimento dessas estruturas na formação de eicosanóides (Bandeira-Melo et al., 2001; D'Avila et al., 2006).

1.3 – Vias de sinalização celular

A síntese de prostanóides como a PGE_2 é regulada por quatro passos sucessivos: formação de corpúsculos lipídicos, liberação de AA pelas PLA_2 , metabolização deste ácido graxo pela COX e em seguida pela enzima terminal, PGES. Diversos estudos têm relacionado a biossíntese de eicosanóides com ativação das três principais vias de sinalização intracelular: a via das cinases de fosfatidilinositol-3 (PI3K), via das proteínas cinases C (PKC) e a via das proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPKs). Essas mesmas vias de transdução de sinal também são importantes na regulação de proliferação, migração, diferenciação e apoptose.

1.3.1 - Proteínas cinases C (PKC)

Proteínas cinases C formam uma família de 12 enzimas serina/treonina cinases que podem ser divididas em três classes: as isoformas clássicas ou convencionais (PKC- α , - β I, - β II e - γ); as novas PKC- δ , - ϵ , - η e θ) e as isoformas atípicas (PKC - ζ e λ) e recentemente descritas PKC- μ e PKC- ν . As enzimas PKC apresentam um papel chave na via de transdução de sinal. PKC é regulada por dois mecanismos seqüenciais: 1) fosforilação por uma cinase dependente de fosfatidilinositol-3 (PDK1) e 2) ligação de um segundo mensageiro lipídico, o diacilglicerol (Dempsey et al., 2000).

A ativação de PKC é dependente de cálcio, apesar da adição de pequenas quantidades de diacilglicerol reduzir significativamente essa dependência (Murakami et al., 1986). Os efeitos do diacilglicerol podem ser imitados pela adição de ésteres de forbol, como PMA e TPA, que se ligam e ativam domínios da enzima PKC (Castagna et al., 1982). Enzimas PKC apresentam um importante papel na regulação de proliferação e diferenciação, e também estão envolvidas na regulação de sobrevivência celular. Expressão de dominante-negativo da isoforma de PKC- α induz apoptose em células COS-1 e em células de glândula salivar, sugerindo que PKC- α pode ser um fator de sobrevivência (Dempsey et al., 2000). A isoforma PKC- λ protege contra apoptose a linhagem celular de leucemia K562 (Murray e Fields, 1997).

O papel de PKC também se estende a câncer de cólon. O desenvolvimento desses tumores é acompanhado por mudanças na expressão de isoformas de PKC,

principalmente, um aumento significativo de PKC- β II (Gokmen-Polar et al., 2001). Animais transgênicos para PKC- β II exibem uma hiperproliferação do epitélio colônico e aumentada susceptibilidade para carcinogênese induzida por azoximetano (Murray et al., 1999). Reforçando seu papel promotor do desenvolvimento tumoral. Recentemente, foi proposto que a participação de PKC- β II em câncer de cólon está relacionada, pelo menos em parte, com a indução e estabilização de RNAm de COX-2 (Yu et al., 2003). Estudos recentes demonstraram a modulação recíproca destas enzimas e a metabolização de AA. PKC- α regula a fosforilação e atividade de cPLA₂ em monócitos humanos, podendo ser co-precipitadas, indicando a formação de um complexo (Li et al., 2007). PKC participa ainda da indução de COX-2 por IL-1 β em células do epitélio pulmonar (Chen et al., 2006) e AA induz a translocação dessa cinase para a membrana plasmática em células de carcinoma de mama MCF-7 e em HEK293 (Lopez-Nicolas et al., 2006).

Enzimas da família PKC também participam da biogênese de corpúsculos. PMA é capaz de induzir a formação de corpúsculos lipídicos em neutrófilos (Weller et al., 1991b). O envolvimento de PKC na formação de corpúsculos lipídicos também foi demonstrado com o uso de inibidores dessa enzima, que reduz significativamente a formação de corpúsculos lipídicos induzidos por PAF em eosinófilos e neutrófilos (Bozza et al., 1997a; Bozza et al., 1997b).

1.3.2 - Proteínas cinases de fosfatidilinositol-3 (PI3K)

PI3K é uma família de cinases de lipídeos que fosforilam o carbono 3 do anel de inositol dos fosfolipídeos de membrana, resultando na formação de fosfatidilinositol, como o PI(3,4,5)P₃. Este composto serve como sítio de ancoragem para proteínas sinalizadoras, como PDK1 e proteína cinase B (também chamada de Akt). A ligação de Akt aos fosfolipídeos de inositol na membrana permite que essa proteína seja fosforilada e ativada por PDK1. Quando ativada, Akt retorna para o citoplasma e fosforila várias proteínas-alvo (Alberts et al., 2004a).

A via de PI3K/Akt é ativada principalmente a partir de receptores de fatores de crescimento apresentando um papel crítico na regulação, proliferação e diferenciação de células do epitélio intestinal. EGF e TGF- α estimulam a ativação de PI3K, a qual é requerida para expressão de ciclina D1, e progressão no ciclo celular em células RIE, uma linhagem de epitélio intestinal de rato (Sheng et al., 2003). Corroborando esses resultados, a inibição da atividade de PI3K resulta na

diferenciação e redução da proliferação em células de cólon de origem tumoral, HT-29 e Caco-2 (Wang et al., 2001). A participação de PI3K na transformação celular do epitélio também é sugerida por regular junções aderentes e ativação de p38 MAPK (Laprise et al., 2002).

Recentemente, foi relatado que o AA apresenta um importante papel na estimulação da via de PI3K em neutrófilos, HL60 e HUVECs (Hii et al., 2001). Em câncer de próstata AA induz vários genes (ex: COX-2, IL-1 β , IL-6, TNF- α) que são regulados por NF- κ B, e essa ativação é via PI3K, indicando um papel de destaque para essa cinase em processos inflamatórios (Hughes-Fulford et al., 2006). A participação de PI3K na modulação de mediadores lipídicos inflamatórios foi demonstrada pela dependência dessa enzima na biogênese de corpúsculos lipídicos e produção de LTC₄ induzidos por eotaxina em eosinófilos (Bandeira-Melo et al., 2001). Yu e colaboradores (2000) detectaram a presença de PI3K em corpúsculos lipídicos, sugerindo que a sinalização mediada por PI3K pode estar ativa dentro dessas estruturas, e reforçando a relação entre essa via de sinalização e corpúsculos lipídicos (Yu et al., 2000).

1.3.3 - Proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPK)

A via das MAPK fosforila sítios específicos de serina/treonina na proteína alvo regulando uma ampla gama de respostas celulares. A família das MAP cinases compreende três subgrupos de enzimas: as cinases reguladas por sinal extracelular (ERK1/2); proteínas cinases da região N-terminal de c-jun (JNK) e p38 MAPK. ERK1/2 são predominantemente ativadas por fatores de crescimento, sendo o seu principal papel no crescimento e diferenciação celular. Em contraste, JNK e p38 MAPK são ativadas por diversos tipos de estresses, como choque térmico, luz ultravioleta e citocinas inflamatórias (Johnson e Lapadat, 2002).

O grupo da p38 MAPK é formado por quatro isoformas (α , β , γ , e δ). p38 α e p38 β são expressas em todos os tecidos, enquanto p38 γ é predominante expressa no músculo esquelético e p38 δ é encontrada em pulmão, testículos, pâncreas e intestino delgado (Kaminska, 2005). As duas isoformas p38 α e p38 β MAPK apresentam um importante papel na inflamação. Inibidores específicos dessas enzimas bloqueiam a produção de várias citocinas inflamatórias, (TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-8) e outras proteínas envolvidas em processos inflamatórios, como a COX-2 (Saklatvala, 2004).

A cascata de MAPK é uma das mais importantes vias de sinalização envolvida na expressão do gene da COX-2 e biossíntese de prostaglandinas. Inibidores específicos de p38 bloqueiam o acúmulo de RNAm de COX-2 em uma variedade de células tratadas com mediadores pró-inflamatórios (Lasa et al., 2000). A principal função da via de p38 é descrita como na estabilização de RNAm por interagir com a região rica em elementos AU (ARE) dessas moléculas (Ridley et al., 1998; Saklatvala, 2004). Esses elementos, os quais estão presentes na região 3'-UTR não traduzida do RNAm de vários proto-oncogenes e citocinas incluindo COX-2, confere um controle pós-transcricional da expressão dessas proteínas por atuarem na instabilidade do RNAm (Dixon et al., 2000).

Inibidores específicos de ERK inibem a indução de COX-2 por EGF em células epiteliais e atividade de ERK parece ser requerida para indução de COX-2 via Ras (Sheng et al., 1998). Mutações oncogênicas em Ras e a superexpressão de COX-2 são encontradas em uma variedade de tumores humanos, incluindo câncer colorretal e câncer de mama. Recentemente, foi demonstrado que p38 e ERK1/2 coordenam a dinâmica do processo de cicatrização, estando envolvidas em migração e proliferação de células epiteliais (Sharma et al., 2003; Frey et al., 2004).

Diversos trabalhos têm mostrado que AA pode ativar membros da família das MAPK, fortalecendo o envolvimento dessas enzimas na produção de eicosanóides (Paine et al., 2000; Alexander et al., 2001). A enzima p38 MAPK está envolvida na fosforilação de cPLA₂ em plaquetas (Lin et al., 1993; Kramer et al., 1996), entretanto em neutrófilos essa ativação é via ERK 2 (Syrbu et al., 1999). Em macrófagos ativados com zymosan, ERK e p38 têm importante papel na ativação de cPLA₂ (Hiller e Sundler, 1999). A fosforilação de p38 induzida por AA em neutrófilos é atenuada por inibidores de receptores tirosina cinases e PKC, mas não por inibidores de PI3K (Chang e Wang, 2000), sugerindo uma interação entre as vias de sinalização celular.

A biogênese de corpúsculos lipídicos tem sido alvo de muitos estudos. Diversos deles apontam para a participação das MAPK na formação dessas estruturas. Em eosinófilos estimulados com eotaxina é detectada uma redução significativa da formação de corpúsculos lipídicos após o tratamento com inibidores da via de ERK 1/2 e p38 e concomitante redução de LTC₄ (Yu et al., 1998; Bandeira-Melo et al., 2001). A co-compartimentalização de MAPK, como ERK 1/2 e p38, e cPLA₂ em corpúsculos lipídicos sugere que essas estruturas podem ser sítios intracelulares ativos de liberação de ácido araquidônico e formação de eicosanóides (Yu et al., 1998)

2 – Objetivo

Corpúsculos lipídicos estão aumentados em número e tamanho durante a inflamação e aumentam a capacidade de produção de eicosanóides, sendo importantes sítios de produção desses mediadores em diversos tipos celulares envolvidos em processos inflamatórios. Tendo em vista a importância dos corpúsculos lipídicos na inflamação, bem como o papel desse processo na resposta a injúrias teciduais, o nosso objetivo central é:

Investigar a modulação de corpúsculos lipídicos em células epiteliais intestinais.

Objetivos específicos:

- Analisar o efeito de mediadores inflamatórios na formação de corpúsculos lipídicos em células confluentes;
- Identificar as vias de sinalização envolvidas na biogênese de corpúsculos em células epiteliais confluentes e não-confluentes
- Estudar o envolvimento de corpúsculos lipídicos na cascata do AA;
- Investigar a relação de corpúsculos lipídicos e o estado proliferativo das células epiteliais

3 – Materiais e Métodos:

3.1 - Materiais – Os inibidores PD98059, SP600125, SB202190, U0126, LY294002 e Calphostin C foram obtidos da Biomol. Os reagentes: fator de ativação plaquetária (PAF), NS398, Salicilato de Valerila, ácido araquidônico (AA), ácido oléico (AO) e prostaglandina (PG) E₂ foram obtidos da Cayman Chemical. A interleucina (IL) 1β foi obtida da R&D system. Acetato de miristato de forbol (PMA), ionóforo de Cálcio A23187, e o inibidor Genistein foram obtidos da Sigma-Aldrich. O [5, 6, 8, 9, 11, 12, 14, 15 - ³H]AA ([³H]AA) foi obtido da Amersham Biosciences. Os anticorpos monoclonais IgG de camundongo contra phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182, clone 28B10) e contra phospho-p44/42 MAPK (ERK1/2) (Thr202/Tyr204, clone E10) foram obtidos da Cell Signaling, o anticorpo contra COX-2 (clone 33) obtido da BD Transduction e o anticorpo contra cPLA₂ (4-4B-3C) e o contra GAPDH (clone 6C5) obtido da Santa Cruz. O anticorpo policlonal purificado de coelho contra phospho-JNK (pTpY 183/185) foi obtido da Biomol. Os anticorpos secundários conjugados a peroxidase produzidos em cabra anti IgG de camundongo foi obtido da Santa cruz e contra IgG de coelho obtido da Jackson.

3.2 - Células – A linhagem de célula epitelial de intestino delgado de rato (IEC-6) foi adquirida no Banco de Células do Rio de Janeiro, cultivadas em DMEM suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB), 100 U/ml de Penicilina e 100 µg/ml de Estreptomicina (todos da Gibco). As células foram mantidas em garrafas de cultura (TPP, Techno Plastic products) a 37°C em 5% de CO₂. Entre 5-7 dias, quando atingiam a confluência, as células foram lavadas com tampão salino fosfato (PBS) (KCl 2,67 mM, NaCl 137,93 mM, KH₂PO₄ 1,47 mM e Na₂HPO₄ 8,10 mM) por duas vezes, e tratadas com 0,25% de tripsina com 0,38 g/L de EDTA por aproximadamente 5 minutos a 37°C para soltarem da garrafa de cultura. DMEM suplementado com SFB foi utilizado para inativar a tripsina. As células foram recolhidas para centrifugação, a 300 x g por 5 minutos em temperatura ambiente. Após centrifugação, foram ressuspensas em meio fresco e foram repicadas na proporção de 1:8. Para execução dos experimentos utilizamos somente células mantidas até a décima passagem.

3.3 - Tratamento e indução de corpúsculos lipídicos –. Para análise de corpúsculos lipídicos, as células foram plaqueadas para aderirem em lamínulas de vidro em placa de 24 poços em diferentes estágios de confluência. As células foram analisadas 3 dias após o plaqueamento de 1×10^5 células por poço para análise em estágio confluyente e 1×10^4 células por poço para as células não-confluente. Somente para análise da cinética de confluência, as células plaqueadas na concentração de 1×10^4 células por poço foram cultivadas por até 7 dias. As células não-confluente foram mantidas por 24 horas na ausência de soro antes da ativação com 5% SFB por 24 horas. As células confluentes foram ativadas com IL-1 β (10 ng/ml), PMA (30 nM), PAF (1 μ M), AA (1 a 30 μ M) e AO (1 a 30 μ M) ou PGE₂ (1 e 10 μ M) por 4 horas no terceiro dia de cultura. As células confluentes também foram analisadas nos tempos de 0, 10, e 30 minutos e 1,2,4,8 e 24 horas após a ativação com 10 μ M de AA. As células foram pré-tratadas com inibidores de COX-1 (Salicilato de Valerila, 10 μ M) ou de COX-2 (NS398, 1 μ M), da via de ERK1/2 (U0126, 20 μ M ou PD98059, 50 μ M), de JNK1/2/3 (SP600125, 20 μ M), de p38 (SB202190, 15 μ M), PI3K (LY294002, 10 μ M), PKC (Calphostin C, 1 μ M) e tirosina cinases (Genistein 10 μ M) por 30 minutos. Em seguida, as células foram ativadas com AA 10 μ M por 4 horas em células confluentes e 5% SFB em células não-confluente por 24 horas. As células permaneceram na presença dos inibidores durante todo o tempo de ativação com AA ou SFB. Os estoques dos reagentes estavam diluídos em PBS/BSA 0,1% (PAF, IL-1 β), etanol (AA, AO, PMA, PGE₂) ou DMSO (SP600125, SB202190, U0126, NS398, Salicilato de Valerila, LY294002, Calphostin C e Genistein) onde todas as células receberam concentrações iguais do veículo e esta não excedeu 0,1%. Todos os experimentos com IEC-6 confluyente foram realizados na presença de 5% SFB. A viabilidade celular foi determinada pela morfologia celular.

3.4 - Coloração de corpúsculos lipídicos – Após ativação, os poços foram lavados com PBS, e as células fixadas à temperatura ambiente com formaldeído 3,7% (MERCK) em PBS por no mínimo 1 hora. Posteriormente, as lamínulas foram lavadas com água MilliQ e incubadas com ácido cacodílico à 0.1 M (Sigma) e tetróxido de ósmio (OsO₄) 1,5% (Sigma) (proporção 1:1) por 30 minutos. Em seguida, as lamínulas foram lavadas com água, e as lamínulas incubadas com tiocarboidrazida 0,1% por 3 minutos. As lamínulas foram lavadas com água e incubadas novamente com OsO₄ 1,5% e ácido cacodílico à 0.1 M (proporção 1:1)

por 5 minutos. Após essa incubação, as lamínulas foram lavadas com água para retirar todo excesso de ósmio e montadas em lâminas. A morfologia e a contagem de corpúsculos lipídicos foi realizada por microscopia óptica de campo claro (Zeiss Axiophot) com objetiva com aumento de 100X, e 50 células foram analisadas consecutivamente. A captura das imagens representativas foi realizada em câmera digital CollSNAP-Pro CF em microscópio Olympus BX-FLA.

3.5 - Lisado celular – As células foram plaqueadas em placa de 6 poços na concentração de 2×10^4 ou 2×10^5 células por poço para células não-confluentes e confluentes respectivamente, e mantidas por 3 dias. O lisado total dessas células foi obtido em diferentes intervalos de tempo após ativação com um tampão de extração (Triton 1%, desoxicolato de sódio 0,5%, SDS 0,2%, NaCl 150 mM, Hepes 10 mM, EDTA 2 mM, Ortovanadato de sódio 2 mM, NaF 20 mM, Pepstatina 5 µg/ml, Leupeptina 10 µg/ml, Aprotinina 1 µg/ml e PMSF 1 mM). Foi adicionado 120 µl desse tampão em cada poço e com um auxílio de um raspador (COSTAR), as células foram lisadas e transferidas para um tubo de 0,6 ml. Para a análise das células não-confluentes, 10 poços foram tratados com tripsina conforme descrito no item 3.2 e reunidos em um único tubo e lavados com PBS por centrifugação. Em seguida, ressuspendidas em 120 µl de tampão de extração. O controle de células confluentes sofreu o mesmo processo. Foi adicionado 40 µl de tampão de carregamento 4X com 20% de β-mercaptoetanol (solução estoque 5X: 4,2 g de Tris, 10 ml de glicerol, 10 ml de 0,1 % azul de bromofenol, 15 g de SDS em volume final de 75 ml, pH 6,8). As amostras foram então incubadas a 100 °C por 5 minutos e armazenadas a -20 °C.

3.6 - Western Blotting – O lisado total foi submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 10% (acrilamida/bis 29:1) a 28 mA/gel em condição desnaturante (Tris Base 30,3 g, SDS 10,0 g e Glicina 144,0 g para 1 L de água destilada) por aproximadamente 1 hora. As proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (porosidade de 0,45µM, BioAgency), a 250mA, por 1,5 hora a 4°C em tampão de transferência (Metanol 500 mL, água destilada 2 L, Tris Base 7,57 g e Glicina 36,05 g). Após a transferência, as membranas foram incubadas com tampão de bloqueio contendo 5% de leite desnatado (Nestlé) em TBST (Tris Base 1,2 g, NaCl 9,0 g, Tween-20 1 ml para 1L, pH 7,4) por 2 horas. As membranas foram lavadas seis vezes com TBST, por aproximadamente 1 minuto sob agitação e temperatura ambiente. A seguir, incubadas com anticorpo primário

por 16 horas sob agitação a 4°C. Os anticorpos primários utilizados foram: phospho-p38 (1:2000), phospho-p42/44 (ERK1/2) (1:2000), phospho-JNK (0,25 µg/ml), cPLA₂ (1 µg/ml) e COX-2 (1 µg/ml). Anticorpo contra GAPDH (3 ng/ml) foi utilizado para normalização da quantidade de proteína aplicada no gel. Todos os anticorpos foram diluídos em TBST. As membranas foram lavadas seis vezes com TBST, por aproximadamente 1 minuto sob agitação e temperatura ambiente. Em seguida, foram incubadas com anticorpo secundário conjugado a peroxidase apropriado (1:4000) por 1 hora sob agitação em temperatura ambiente. As membranas foram lavadas seis vezes com TBST, por aproximadamente 1 minuto sob agitação e temperatura ambiente. Após a lavagem, as membranas foram incubadas com substrato quimioluminescente ECL™ Western Blotting Analysis System conforme especificações do fabricante (Amersham Biosciences). Para visualização da expressão das proteínas de interesse, filme de raio-x (Kodak BioMax Light Film) foram expostas às membrana. Após incubação o filme foi revelado por autoradiografia em uma máquina reveladora (KodaK X-OMAT 2000 Processor).

3.7 - Produção de PGE₂ – As células foram plaqueadas em placa de 6 poços na concentração de 2x10⁵ célula/poço para células confluentes e mantidas por 3 dias, em um volume de 2 ml de meio. As células foram estimuladas com AA 10 µM por 2 horas, e então lavadas com PBS por duas vezes e incubadas com meio hipertônico (adição de NaCl 0,1M por 8 h). Após a incubação, 1 ml do sobrenadante foi recolhido após homogeneização, centrifugado a 200 x g por 5 minutos, transferido para outro tubo e estocados a -80°C. A liberação de PGE₂ no sobrenadante da cultura foi analisada por ensaio imunoenzimático (EIA) com STAT-Prostaglandin E₂ EIA, segundo as especificações do fabricante (Cayman Chemical). As reações de EIA foram analisadas em espectrômetro a 450nm (Spectra Max 190, Molecular Devices). Após recolher o sobrenadante as células foram lisadas conforme descrito no item 3.5 para análise de proteína por *Western Blotting*.

3.8 - Modelo de Cicatrização – As células foram plaqueadas na concentração de 1x10⁵ células/poço em placa de 24 poços contendo lamínulas e mantida por 3 dias para atingir a confluência. A integridade da monocamada foi rompida por uma ponteira de micropipeta de 1 ml estéril de um lado ao outro do poço. Em seguida, o meio contendo as células deslocadas foi trocado por meio fresco e as células na borda da lesão foram acompanhadas em intervalos de 2, 4, 8 e 24 horas. Após cada

tempo de incubação, as lamínulas foram fixadas com formaldeído 3,7% e coradas com OsO₄ para enumeração de corpúsculos lipídicos.

3.9 - Liberação de ácido araquidônico – As células foram plaqueadas na concentração de 2×10^5 células/poço em placa de 6 poços e mantidas por 2 dias, e então foram cultivadas na presença de 1 $\mu\text{Ci/ml}$ de [³H]-AA por 16 horas. A concentração de [³H]-AA utilizada não induz a formação de corpúsculos lipídicos. Após a remoção do sobrenadante contendo [³H]-AA não incorporado, as células foram lavadas duas vezes com PBS e incubadas com meio fresco na presença ou não de 10 e 30 μM de ácido oléico por 4 horas. Em seguida, o sobrenadante contendo ácido oléico foi removido e as células foram incubadas por 1 hora com 2 ml de meio fresco contendo ionóforo de cálcio (A23187, 5 μM). Todo o sobrenadante foi recolhido e centrifugado por 10 minutos a 200 x g a 4°C. As células foram lavadas com PBS, em seguida, lisadas com 2 ml de Triton-X 0,1% diluído em água destilada. O sobrenadante e o lisado total foram armazenados a -20°C para análise da liberação [³H]-AA por cintilação líquida (LS 6000 LL, Beckman Instruments). Utilizamos 0,2 ml de amostra em 1,6 ml de líquido de cintilação Ultima Gold (PerkinElmer Life & Analytical Science). A porcentagem de liberação de ácido araquidônico foi calculada pela divisão entre a quantidade radioatividade liberada no sobrenadante e a quantidade de radioatividade do total (lisado e sobrenadante) multiplicado por 100.

3.10 – Análise Estatística – A análise estatística dos resultados foi realizada no programa GraphPad Prism 4, através de teste *t* de *Students* ou ANOVA seguida pelo teste de *Tukey*, considerando significativos os valores de $p < 0,05$.

4 – Resultados

4.1 – Biogênese de corpúsculos lipídicos induzida por AA

No presente estudo, utilizamos uma linhagem celular derivada de epitélio intestinal normal de rato (IEC-6). Essas células quando confluentes não apresentam corpúsculos lipídicos (Figura 4.1), sendo um modelo ideal para estudo da indução da biogênese de corpúsculos lipídicos por mediadores inflamatórios em uma camada epitelial íntegra. Para realização desse estudo, o número de corpúsculos lipídicos foi analisado por microscopia óptica de campo claro após tratamento com diferentes estímulos inflamatórios. A linhagem IEC-6 após atingir a confluência, foi estimulada com diferentes estímulo, como IL-1 β , PAF, PMA que não induziram a formação de corpúsculos lipídicos nessas células (Figura 4.2), enquanto AA induziu de forma significativa a formação de corpúsculos lipídicos. Essa indução ocorreu de maneira dose-dependente (Figura 4.3A) e a cinética de formação de corpúsculos lipídicos induzido por 10 μ M de AA atinge o ponto máximo em 4 horas (Figura 4.3B). Em seguida, começa reduzir, enquanto na cinética de 30 μ M de AA o número de corpúsculos lipídicos é mantido elevado (Figura 4.3C). Para analisar se a indução de corpúsculos lipídicos por AA exógeno seria através de sua metabolização a eicosanóides, as células foram estimuladas com diferentes doses de PGE₂, o principal eicosanóide produzido por células epiteliais. A adição de PGE₂ (1 a 10 μ M) exógena não altera o número de corpúsculos lipídicos em IEC-6 confluyente (Figura 4.4A), indicando que a indução de corpúsculos lipídicos por AA é independente da formação de PGE₂. Corroborando estes resultados, o uso de inibidores de enzimas envolvidas na via de metabolização do AA em PGE₂, Salicilato de Valerila (10 μ M) que inibe COX-1 e o NS-398 (1 μ M) que inibe COX-2, também não interferem significativamente na biogênese de corpúsculos lipídicos por AA (Figura 4.4 B e C)

4.2 – Vias de sinalização envolvidas na biogênese de corpúsculos lipídicos induzida por AA

A biogênese de corpúsculo lipídico é um processo regulado que é estímulo- e células-específico. Essa definição nos levou a investigar as vias de sinalização envolvidas na indução de corpúsculos lipídicos por AA no nosso modelo de estudo. Portanto, utilizamos inibidores seletivos de diversas vias de sinalização. O inibidor

de tirosinas cinases, Genistein (10 μM) (Figura 4.5C), não teve efeito inibitório significativo na indução de corpúsculos lipídicos por AA, enquanto os inibidores da via de PKC (Calphostin C 1 μM) e de PI3K (LY294002 10 μM) reduziram significativamente o número de corpúsculos lipídicos (Figura 4.5A e B), demonstrando um importante papel para a via de PKC e PI3K na biogênese de corpúsculos lipídicos nas células ativadas com AA. As vias de sinalização intracelular envolvendo enzimas da família das MAPK também foram analisadas. Os inibidores U0126 (10 μM), de MEK1/2 que participam da via de ERK 1/2, e SP600125 (20 μM) inibidor de JNK não alteram de modo significativo o número de corpúsculos lipídicos nas células estimuladas com AA (Figura 4.6). Corroborando esse resultado, a ativação de células IEC-6 com AA não é capaz de induzir a fosforilação de ERK1/2 e JNK 9 (Figura 4.7), indicando que essas enzimas não participam da biogênese de corpúsculos lipídicos induzida por AA. Dentre os inibidores de MAPK, o inibidor de p38, SB202190 (15 μM) teve um efeito parcial na redução do número de corpúsculos lipídicos induzidos por AA (Figura 4.8A). O papel para a p38 na via sinalização da biogênese de corpúsculos lipídicos por AA, é reforçado pela fosforilação dessa enzima em IEC-6 estimulada por AA analisada por SDS-PAGE (Figura 4.8B).

4.3 – Corpúsculos lipídicos se correlacionam com a liberação de AA

Para compreender a função dos corpúsculos lipídicos neo-formados em células epiteliais estimuladas com AA, analisamos a liberação de AA por IEC-6 após a indução dessas estruturas. As células foram incubadas com AA marcado radioativamente por aproximadamente 16 horas para que pudesse ser incorporado a fosfolípidos de membranas. A concentração de [^3H]-AA (2,3 fM) utilizada não induz a formação de corpúsculos lipídicos. As células foram então lavadas e cultivadas na presença ou não de 10 e 30 μM de ácido oléico por 4 horas. Em experimento paralelo, ácido oléico estimula a formação de corpúsculos lipídicos semelhante à induzida por AA (Figura 4.9). Após ativação com ionóforo de cálcio, podemos observar que células nas quais foi induzida a formação de corpúsculos lipídicos liberam mais AA (Figura 4.10). Esta diferença não pode ser atribuída a diferenças na expressão de cPLA₂, pois esta não apresenta alterações após a estimulação por AA (Figura 4.11A) ou por AO (dado não mostrado).

4.4 – AA induz a expressão de COX-2

Para investigar o envolvimento de corpúsculos lipídicos na produção de eicosanóides, as células foram ativadas com AA 30 μ M e com meio hipertônico (adição de 0,1M de NaCl) por 2 h. Meio hipertônico foi utilizado como controle positivo na indução da expressão de COX-2, entretanto este não é capaz de induzir formação de corpúsculos lipídicos (dados não mostrado). Apesar de AA induzir a formação de corpúsculos lipídicos e expressão de COX-2 (Figura 4.11B), não encontramos níveis detectáveis de PGE₂. As células também foram estimuladas com AA, o substrato para PGE₂, em combinação com meio hipertônico, por diferentes intervalos de tempo, ainda assim não detectamos liberação de PGE₂ através do método utilizado (EIA).

4.5 – Ausência de corpúsculos lipídicos em borda de lesão de monocamada celular

O tecido epitelial intestinal está freqüentemente exposto a agentes que provocam injúrias na mucosa. Durante a injúria tecidual, ocorre liberação de mediadores inflamatórios que induzem migração e proliferação, potencializando a restauração da integridade da mucosa. Diversos estudos têm demonstrado que o processo de reparo após lesão tecidual envolve mediadores lipídicos da inflamação. Para compreender melhor a relação de corpúsculos lipídicos em resposta a ruptura da integridade da monocamada, utilizamos como modelo o ensaio de cicatrização. O rompimento da monocamada foi realizado com uma ponteira de 1 ml, o meio foi trocado e as células da borda da lesão foram acompanhadas por 2, 8 e 24 horas na presença de SFB, até que a área desnuda fosse fechada. Após coloração com OsO₄, podemos observar que células que provavelmente estariam migrando na borda da “cicatriz” não apresentavam corpúsculos lipídicos (Figura 4.12), indicando que corpúsculos lipídicos não participam desse processo de reparo.

4.6 – Ácido araquidônico altera a integridade da monocamada celular

Para compreender o envolvimento de corpúsculos lipídicos induzidos por AA na interrupção da homeostase tecidual, as células IEC-6 confluentes foram tratadas com 30 μ M de AA por 24 horas. O tratamento prolongado com altas doses de AA

induz a formação de focos de proliferação celular (Figura 4.13), além de induzir a formação exacerbada de corpúsculos lipídicos (Figura 4.3C). Estes resultados indicam uma possível relação da presença de corpúsculos lipídicos e homeostasia.

4.7 – Presença de corpúsculos lipídicos em células não-confluentes

Tendo em vista que células IEC-6, após tratamento com mediador lipídico inflamatório, possuem o número de corpúsculos lipídicos elevados, e sofreram uma alteração da integridade da monocamada, observamos se células em estágio proliferativo teriam alteração no número de corpúsculos lipídicos. Células IEC-6, quando analisadas em um estágio de sub-confluência, possuem um número elevado dessas estruturas, comparado com as células reproduzindo a camada epitelial íntegra (Figura 4.14). Células plaqueadas em um estágio não-confluyente quando acompanhadas por 7 dias, ou seja, até atingirem a confluência, diminuem progressivamente o número de corpúsculos lipídicos (Figura 4.14B). Esses resultados corroboram a relação da presença de corpúsculos lipídicos e a ausência da integridade tecidual.

4.8 – Biogênese de corpúsculos lipídicos induzida por SFB

Os maiores estímulos para reparo tecidual são os fatores de crescimento, tal como EGF, HGF e FGF. Em modelos *in vitro*, o meio de cultura é enriquecido desses fatores devido à suplementação de SFB. A análise de corpúsculos lipídicos foi realizada na presença ou ausência de SFB por 24 horas. A ausência de SFB provoca uma redução drástica no número de corpúsculos lipídicos em células não-confluentes (Figura 4.15A). Com a adição de SFB, após 24 horas na ausência deste, o número de corpúsculos lipídicos em células não-confluyente é completamente restaurado em 24 horas (Figura 4.15B). Células confluentes permanecem refratárias à presença de SFB, mesmo um período de retirada e reposição (Figura 4.15C). Estes resultados indicam uma forte relação entre corpúsculos lipídicos e a resposta do tecido epitelial no reparo tecidual. Sabendo que células intestinais possuem crescimento inibido por contato, alterando assim o metabolismo e a morfologia celular em um processo de diferenciação, investigamos a possibilidade de que células confluentes poderiam modular o número de corpúsculos lipídicos através da liberação de fatores solúveis após atingirem a confluência. O meio condicionado

obtido de células confluentes cultivadas na ausência de SFB por 48 horas foi recolhido e centrifugado a 200 g por 5 minutos. Em seguida, transferido para células não-confluentes que estavam sendo cultivadas em 5% SFB. As células foram mantidas por 24 h com meio condicionando na ausência ou presença de 5% de SFB. Após o tempo de incubação as células foram fixadas e coradas com OsO₄. A redução de corpúsculos lipídicos só foi observada no meio condicionado sem SFB, e essa alteração é atribuída à ausência de SFB (Figura 4.16B). Em células não-confluentes mantidas com meio condicionado contendo 5% SFB, o número de corpúsculos lipídicos se manteve inalterado (Figura 4.16C). Esses resultados indicam que a redução do número de corpúsculos lipídicos em células IEC-6 não é devido a um fator solúvel liberado pelas células quando atingem esse estágio de confluência.

4.9 – Vias de sinalização envolvidas na biogênese de corpúsculos lipídicos induzida por SFB

Para uma melhor compreensão da biogênese de corpúsculos lipídicos induzidos por SFB em células IEC-6 não-confluentes, analisamos as vias de sinalização envolvidas na indução dessas estruturas. As células mantidas por 24 horas na ausência de SFB para redução completa de corpúsculos lipídicos, foram pré-tratadas por 30 minutos com inibidores das três principais vias de MAPK: p38, ERK1/2 e JNK, em seguida as células foram estimuladas com 5% de SFB por 24 horas. O inibidor SP600125 (20 µM), que inibe a via de JNK não afetou significativamente o número de corpúsculos lipídicos induzidos por SFB (Figura 4.17C), enquanto que o inibidor da via de p38, SB202190 (15 µM) e o inibidor de ERK 1/2, PD98059 (50 µM) inibiram drasticamente a formação de corpúsculos lipídicos induzida por SFB (Figura 4.17A e B), indicando um importante papel de p38 e ERK1/2 na indução de corpúsculos lipídicos induzidos por SFB em IEC-6 não-confluente.

4.10 – Biogênese de corpúsculos lipídicos induzida por SFB é independente de COX

Corpúsculos lipídicos estão relacionados com o aumento da produção de eicosanóides em células hematopoiéticas envolvidas na inflamação. A COX-2, uma

enzima participante na produção de eicosanóides, é expressa em diversos tecidos frente a um processo inflamatório. Em células IEC-6, a presença de corpúsculos lipídicos se correlaciona com a expressão de COX-2, visto que quando cultivadas somente com 5% SFB, células não-confluentes expressam COX-2 enquanto nas células confluentes essa enzima não foi detectada (Figura 4.18C). Entretanto, o uso de Salicilato de Valerila (10 μ M) e NS398 (1 μ M), que são inibidores seletivos COX-1 e COX-2 respectivamente, não afetaram a indução de corpúsculos lipídicos induzida por SFB (Figura 4.18A e B), demonstrando que a indução da formação de corpúsculos lipídicos por SFB é independente de COX.

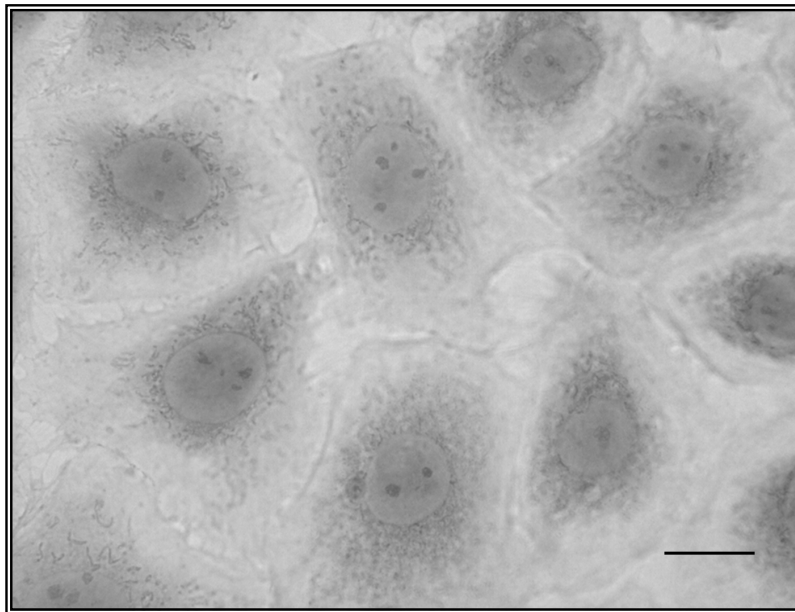


Figura 4.1 – **Células IEC-6 confluentes não apresentam corpúsculos lipídicos** – As imagens são representativas de células IEC-6 plaqueadas na concentração de 1×10^5 cel/poço e cultivadas por 3 dias com 5% SFB. Para observação de corpúsculos lipídicos foi utilizado microscopia óptica de campo claro após coloração com OsO_4 . Barra = 10 μm .

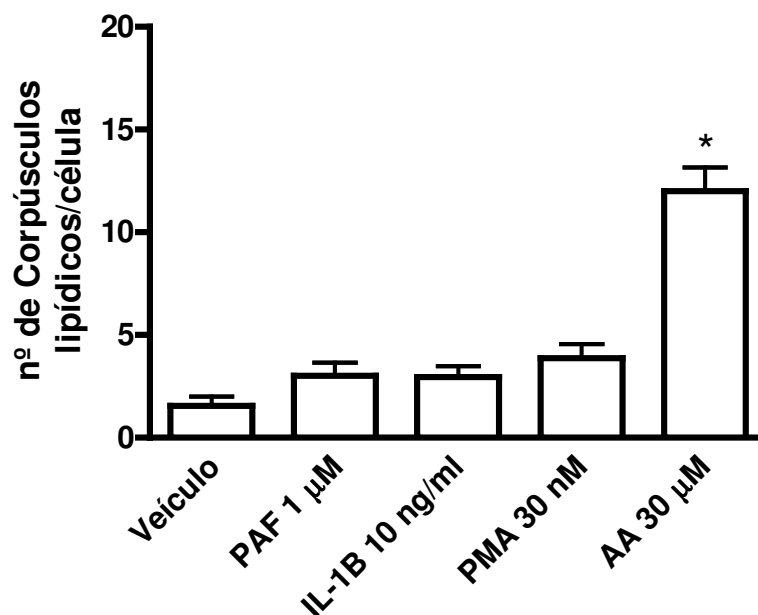


Figura 4.2 – **Efeito de estímulos inflamatórios na indução de corpúsculos lipídicos em IEC-6 confluentes.** As células foram plaqueadas na concentração de 1×10^5 cel/poço e após 3 dias de cultura, sempre na presença de 5% de SFB as células foram ativadas por 4 horas com diferentes estímulos: PAF 1 μ M; IL-1 β 10 ng/ml; PMA 30 nM e AA 30 μ M. Para contagem de corpúsculos lipídicos utilizamos microscopia óptica de campo claro após coloração com OsO₄. Os valores são representativos de três experimentos independentes em que 50 células foram contadas consecutivamente. *, $p < 0.05$ em relação ao grupo veículo.

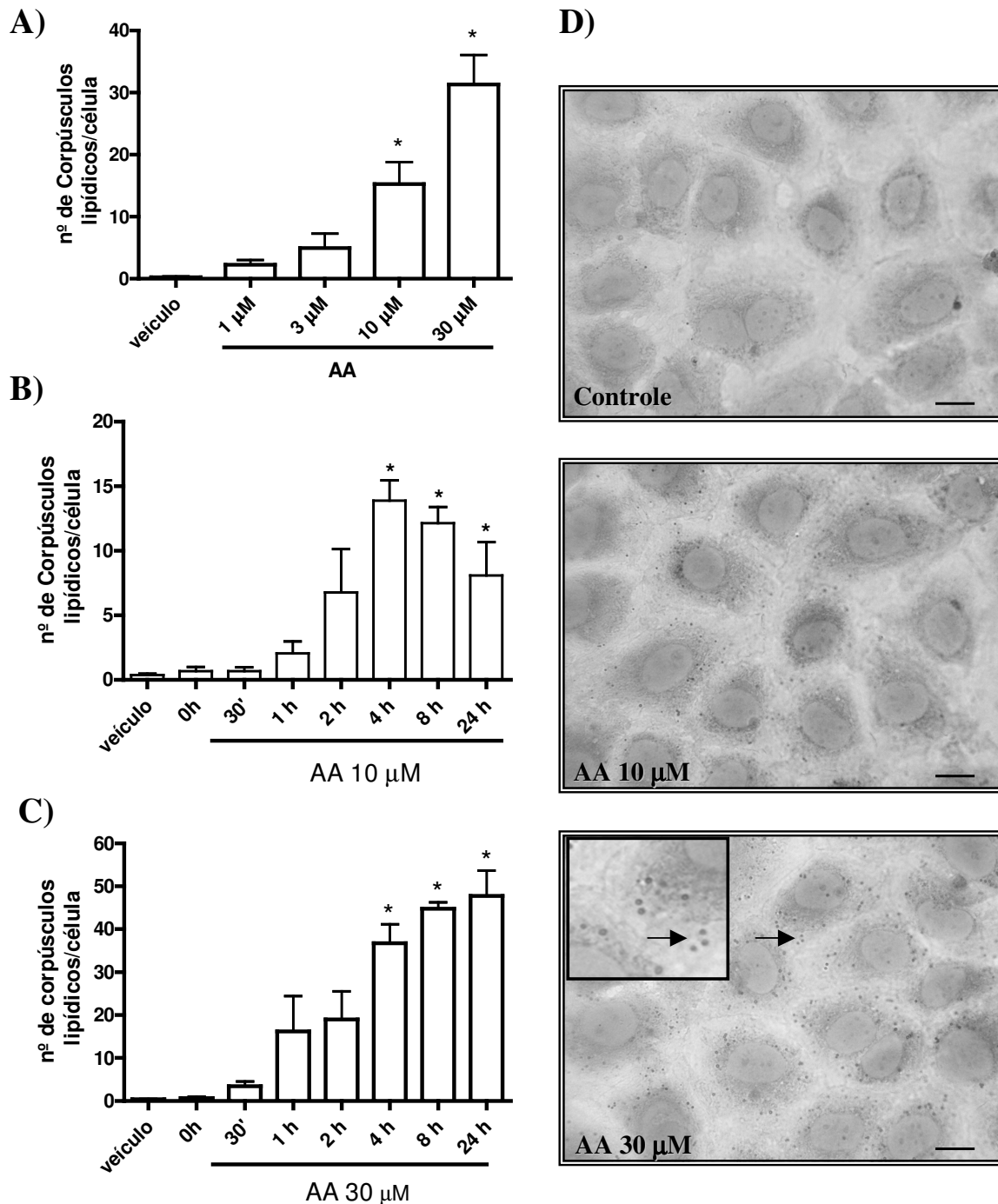


Figura 4.3 – **A biogênese de corpúsculos lipídicos induzida por AA em IEC-6 confluente.** As células foram plaqueadas na concentração de 1×10^5 cel/poço e após 3 dias as células foram estimuladas (A) por 4 horas com diferentes concentrações de AA 1 a 30 μM. As células foram estimuladas por diferentes intervalos de tempo com 10 μM (B) ou 30 μM (C) de AA. D) Imagens representativas de IEC-6 não estimulada (controle) e estimuladas com 10 e 30 μM de AA por 4 horas. Para contagem de corpúsculos lipídicos, utilizamos microscopia óptica de campo claro após coloração com OsO_4 . Os valores representam a média de três experimentos independentes em que 50 células foram contadas consecutivamente. *, $p < 0.05$ em relação ao grupo veículo. Barras = 10 μm.

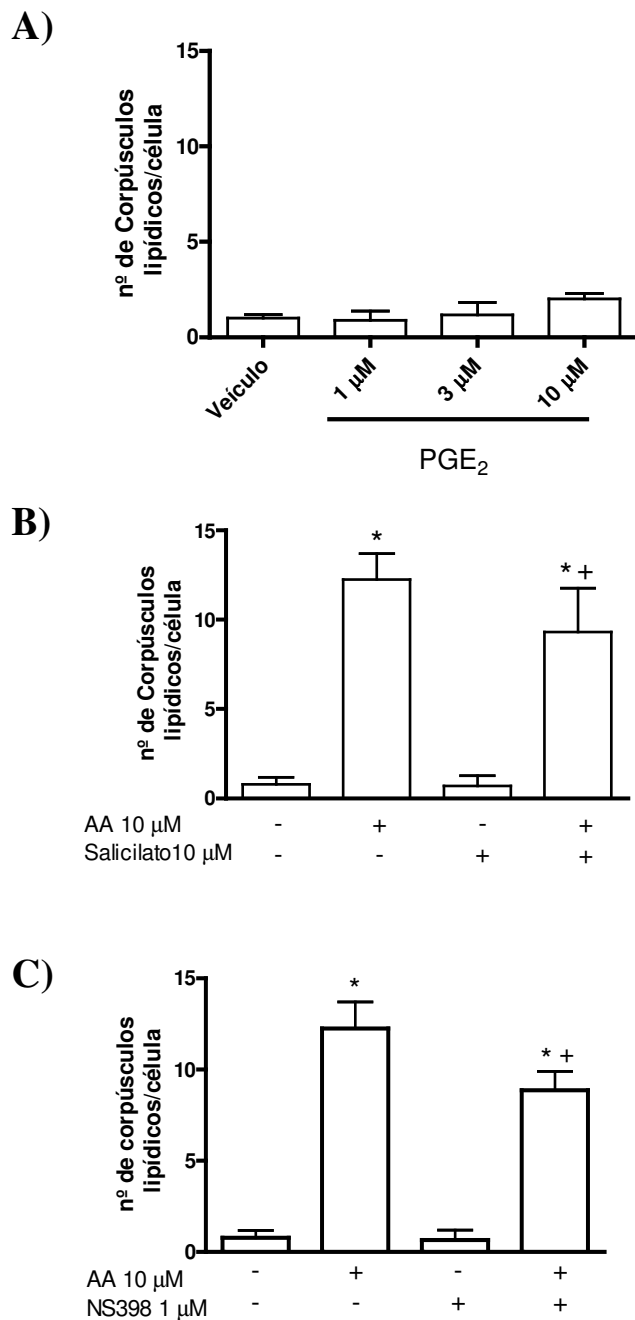


Figura 4.4 – A biogênese de corpúsculos lipídicos induzida por AA em IEC-6 confluenta é independente da formação de PGE₂. (A) As células foram plaqueadas na concentração de 1×10^5 cel/poço e após 3 dias as células foram estimuladas com diferentes concentrações de PGE₂ (1 a 10 µM). As células confluentes foram pré-tratadas com inibidores de COX-1, Salicilato de Valeril 10 µM (B) ou de COX-2, NS3981 µM (C) por 30 minutos, em seguida estimuladas com 10 µM de AA por 4 horas. As células permaneceram na presença dos inibidores durante todo o tempo de ativação. Para contagem de corpúsculos lipídicos, utilizamos microscopia óptica de campo claro após coloração com OsO₄. Os valores representam a média de três experimentos independentes em que 50 células foram contadas consecutivamente. *, $p < 0.05$ em relação ao grupo veículo; +, $p < 0,05$ em relação ao grupo tratado somente com o inibidor de COX.

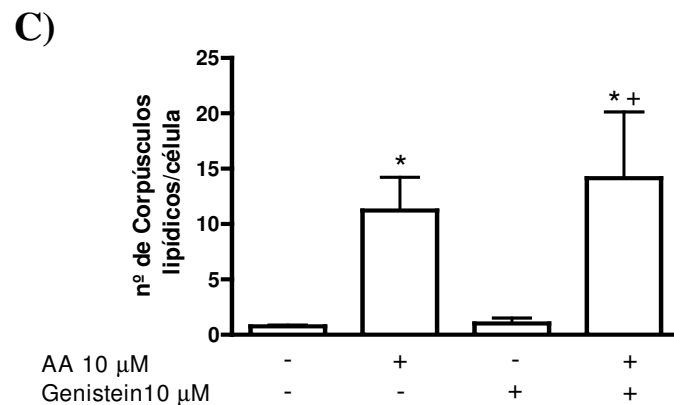
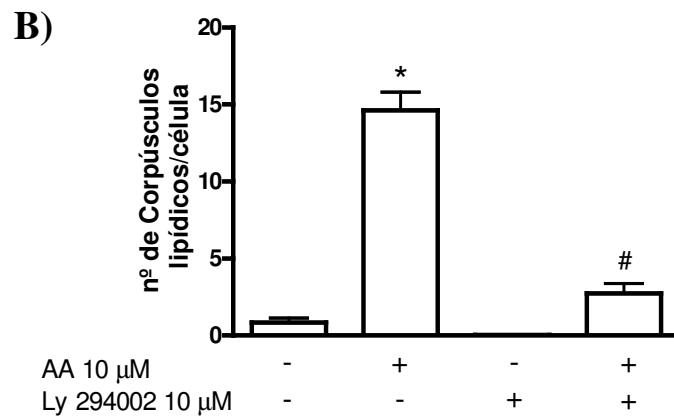
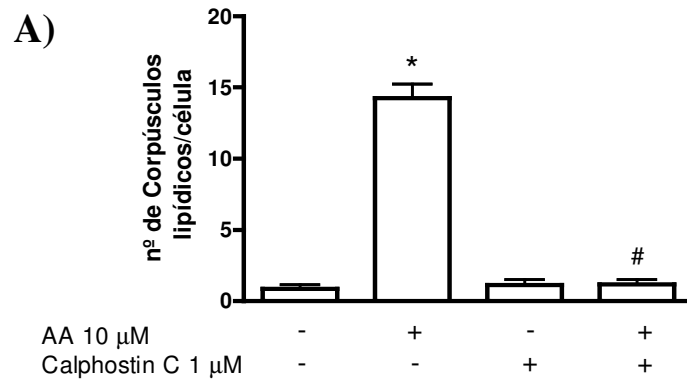


Figura 4.5 – **A biogênese de corpúsculos lipídicos induzida por AA em IEC-6 confluyente é dependente da via de PI3K e PKC.** As células foram plaqueadas na concentração de 1×10^5 cel/poço e após 3 dias foram pré-tratadas com inibidores da via de (A) PKC, Calphostin 1 μ M, (B) PI3K, LY294002 10 μ M e (C) tirosina cinase, Genistein 10 μ M por 30 minutos. Em seguida, as células foram estimuladas com 10 μ M de AA por 4 horas. As células permaneceram na presença dos inibidores durante todo o tempo de ativação. Para contagem de corpúsculos lipídicos, utilizamos microscopia óptica de campo claro após coloração com OsO₄. Os valores são representativos de dois experimentos independentes em que 50 células foram contadas consecutivamente. *, $p < 0,05$ em relação ao grupo veículo; +, $p < 0,05$ em relação ao grupo tratado somente com o inibidor; #, $p < 0,05$ em relação ao grupo estimulado com AA.

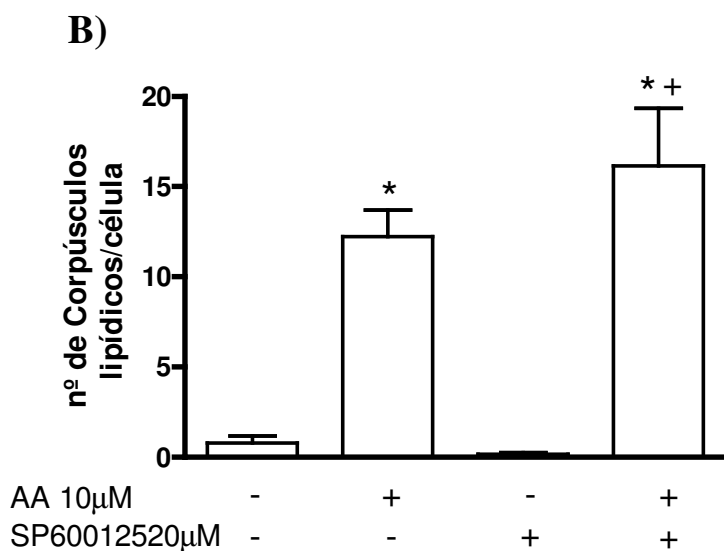
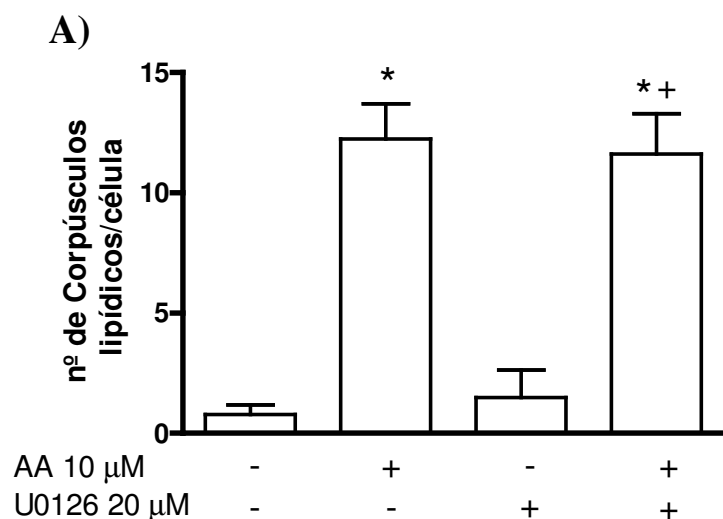


Figura 4.6 – **A biogênese de corpúsculos lipídicos por AA em IEC-6 confluyente é independente de ERK1/2 e JNK.** As células foram plaqueadas na concentração de 1×10^5 cel/poço e após 3 dias foram pré-tratadas com inibidores da via de (A) ERK 1 /2, U0126 20 μ M e (B) JNK, SP600125 20 μ M por 30 minutos. Em seguida, as células foram estimuladas com AA 10 μ M por 4 horas. As células permaneceram na presença dos inibidores durante todo o tempo de ativação. Para contagem de corpúsculos lipídicos, utilizamos microscopia óptica de campo claro após coloração com OsO₄. Os valores representam a média de três experimentos independentes em que 50 células foram contadas consecutivamente. *, p<0.05 em relação ao grupo veículo; +, p<0,05 em relação ao grupo tratado somente com o inibidor.

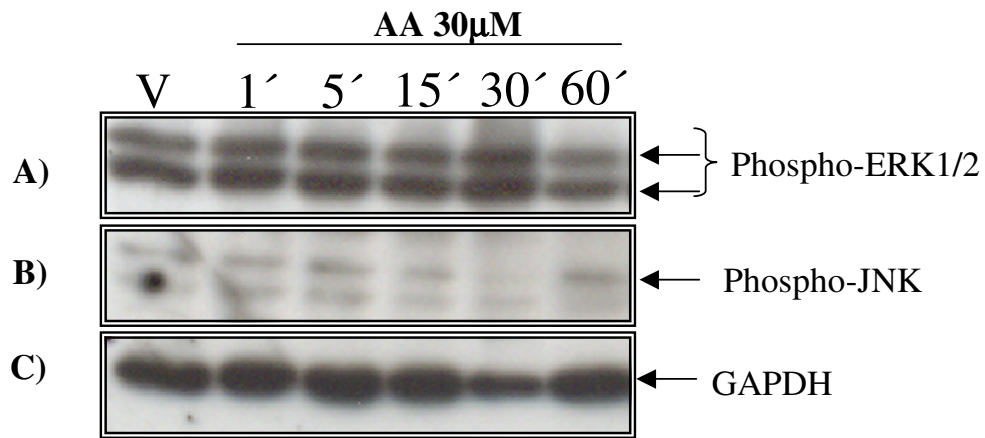
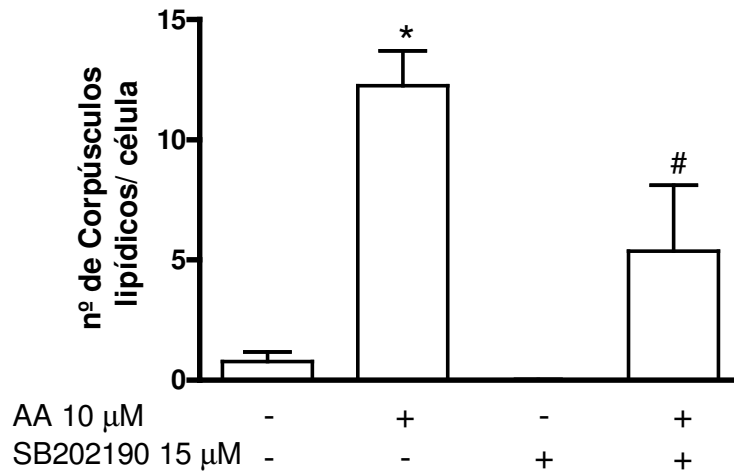


Figura 4.7 – **A fosforilação de ERK 1/2 e JNK não é induzida por AA em IEC-6 confluente.** As células foram plaqueadas na concentração de 2×10^5 cel/poço em placa de 6 poços e após 3 dias estimuladas com 30 μ M de AA por diferentes intervalos de tempo (1 a 60 minutos). As proteínas do lisado total foram separadas por SDS-PAGE. A ativação de (A) ERK1/2 e (B) JNK foi analisada por *immunoblotting* com anticorpos para forma fosforilada dessa enzimas. Anticorpo contra GAPDH (C) foi utilizado para normalização da quantidade de proteína aplicada no gel. As imagens são representativas de pelo menos três experimentos. V = veículo

A)



B)

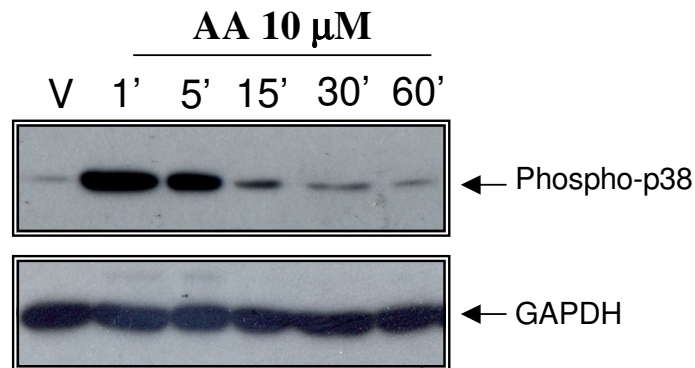


Figura 4.8 – **p38 MAPK participa na formação de corpúsculos lipídicos induzida por AA em IEC-6 confluenta.** (A) As células foram plaqueadas na concentração de 1×10^5 cel/poço e após 3 dias foram pré-tratadas com inibidores da via de p38, SB202190 15 µM por 30 minutos. Em seguida, as células foram estimuladas com 10 µM de AA por 4 horas. As células permaneceram na presença do inibidor durante todo o tempo de ativação. Para contagem de corpúsculos lipídicos, utilizamos microscopia óptica de campo claro após coloração com OsO₄. Os valores representam a média de três experimentos independentes em que 50 células foram contadas consecutivamente. (B) As células foram plaqueadas na concentração de 2×10^5 cel/poço em placa de 6 poços e após 3 dias estimuladas com 10 µM de AA por diferentes intervalos de tempo (1 a 60 minutos). As proteínas do lisado total foram separadas por SDS-PAGE. A ativação de p38 foi analisada por *immunoblotting* com anticorpos para forma fosforilada dessa enzima. Anticorpo contra GAPDH foi utilizado para normalização da quantidade de proteína aplicada no gel. A imagem é representativa de pelo menos três experimentos. *, $p < 0,05$ em relação ao grupo veículo; #, $p < 0,05$ em relação ao grupo estimulado com AA. V= veículo

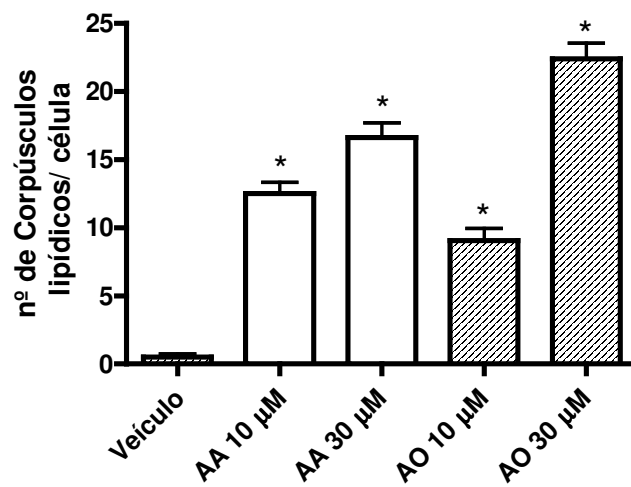


Figura 4.9 – **AO induz a formação de corpúsculos lipídicos em IEC-6 conflente.** As células foram plaqueadas na concentração de 1×10^5 cel/poço e após 3 dias estimuladas com 10 e 30 μM de AA ou AO por 4 horas. Para contagem de corpúsculos lipídicos, utilizamos microscopia óptica de campo claro após coloração com OsO_4 . Os valores são representativos de dois experimentos independentes em que 50 células foram contadas consecutivamente para cada ponto. *, $p < 0.05$ em relação ao grupo veículo;

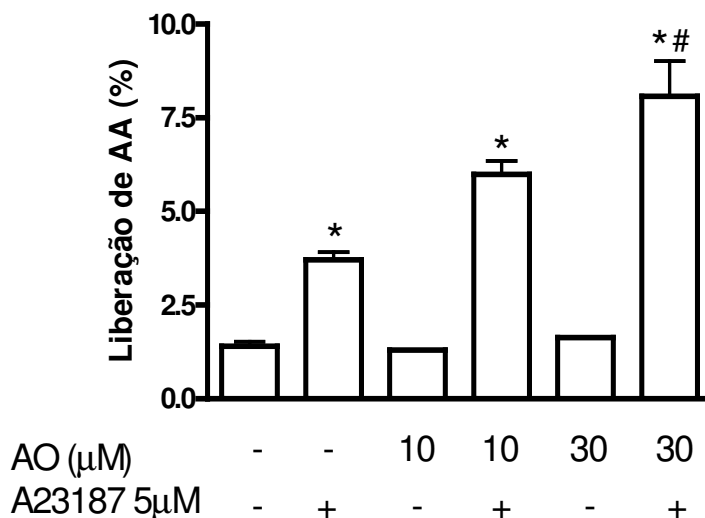


Figura 4.10 – **O aumento do número de corpúsculos lipídicos se correlaciona com o aumento da liberação de AA.** As células foram plaqueadas na concentração de 2×10^5 células/poço em placa de 6 poços e mantidas por 2 dias. Então as células foram cultivadas na presença de 1 $\mu\text{Ci/ml}$ de $[^3\text{H}]\text{-AA}$ por 16 horas. Após a remoção do sobrenadante, as células foram lavadas com PBS e estimuladas com 10 e 30 μM de AO por 4 horas. O sobrenadante contendo AO foi removido e as células ativadas por 1 hora com 5 μM A2187. O sobrenadante foi recolhido para análise da radioatividade por cintilação líquida. Os valores são representativos de dois experimentos independentes. *, $p < 0.05$ em relação ao grupo veículo; #, $p < 0,05$ em relação ao grupo ativado somente com A2187.

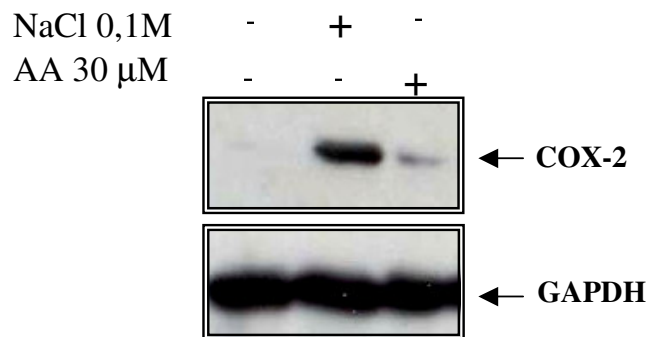
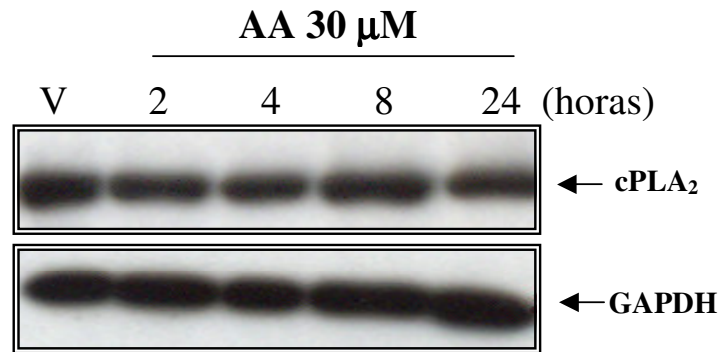


Figura 4.11 – **Ativação de IEC-6 confluyente com AA induz a expressão de COX-2 mas não altera a expressão de cPLA₂.** As células foram plaqueadas na concentração de 2×10^5 cel/poço em placa de 6 poços e após 3 dias estimuladas com 30 μ M de AA. (A) Para análise de cPLA₂, as células foram estimuladas por diferentes intervalos de tempo (2 a 24 horas). (B) Para análise de COX-2, as células foram estimulas por 2 horas. Células estimuladas com meio hipertônico (adição de 0,1 M de NaCl) foram utilizadas como controle na indução de COX-2. As proteínas do lisado total foram separadas por SDS-PAGE. A ativação de cPLA₂ e COX-2 foi analisada por *imunoblotting* e anticorpo contra GAPDH foi utilizado para normalização da quantidade de proteína aplicada no gel. As imagens são representativas de pelo menos três experimentos. V = veículo

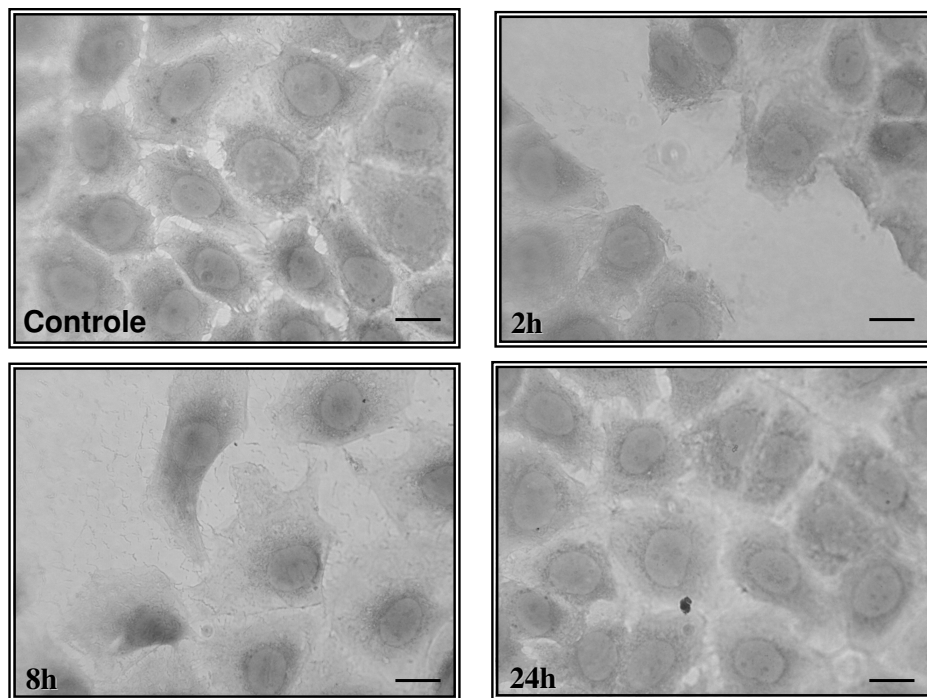
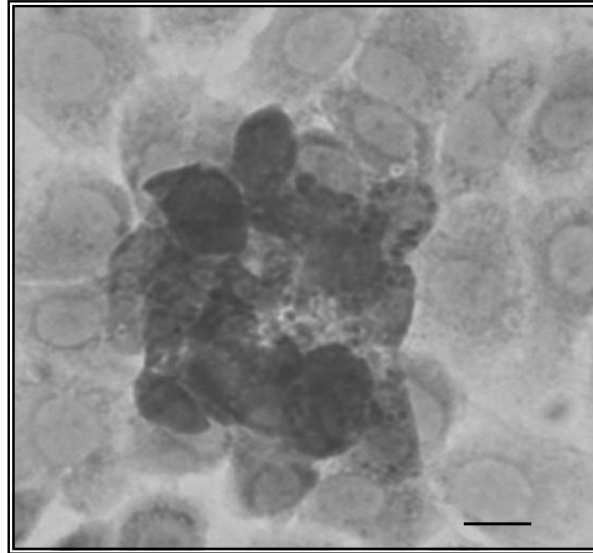


Figura 4.12 – **Corpúsculos lipídicos estão ausentes na borda da lesão.** As células foram plaqueadas na concentração de 1×10^5 células por poço e após 3 dias uma lesão mecânica foi feita com ponteira de micropipeta de 1ml. As células na lesão foram acompanhadas em 2, 8 e 24h e analisadas após coloração com OsO_4 em microscópio óptico. As imagens são representativas de dois experimentos independentes. Barras = 10 μm .

A)



B)

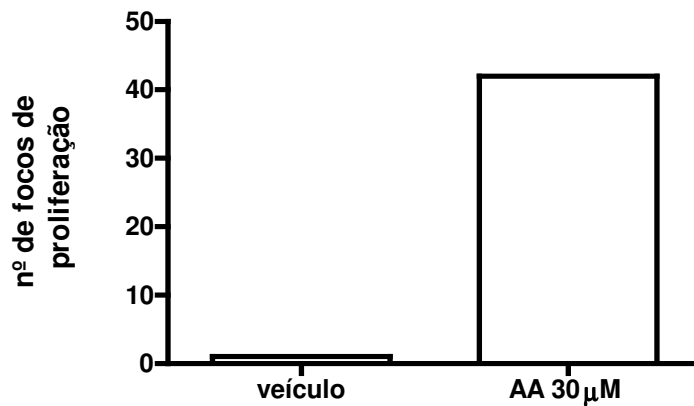
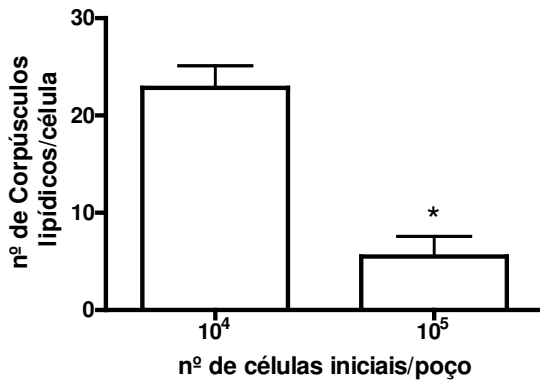
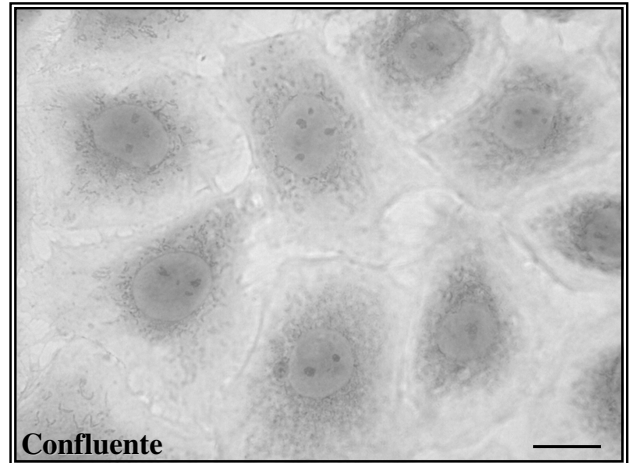


Figura 4.13 – **Ativação prolongada com AA altera a integridade da monocamada de células IEC-6.** As células foram plaqueadas na concentração de 2×10^5 cel/poço em placa de 6 poços e após 3 dias estimuladas com 30 μ M de AA. (A) A imagem de microscopia óptica representa uma região alterada da monocamada celular após a coloração com OsO_4 . (B) Os focos de proliferação induzidos pela estimulação prolongada com AA foram enumerados utilizando microscopia óptica de campo claro. *, $p < 0,05$. A imagem e gráfico são representativos de dois experimentos independentes. Barra = 10 μ m

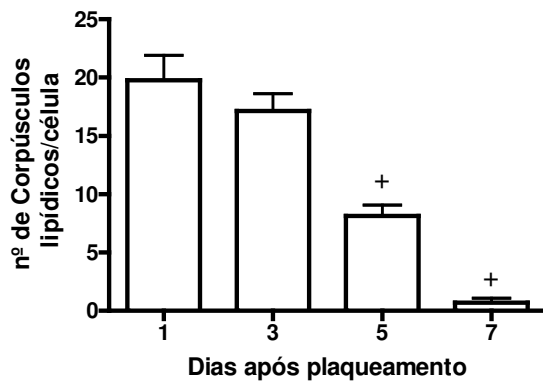
A)



C)



B)



D)

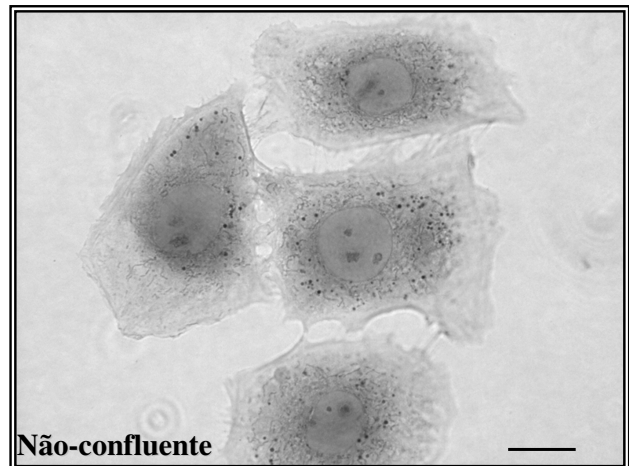


Figura 4.14 – **Correlação inversa entre o número de corpúsculos lipídicos e estágio de confluência em IEC-6.** (A) Células IEC-6 foram plaqueadas em diferentes estágios de confluência e analisadas 3 dias após plaqueamento (B) As células foram plaqueadas na concentração de 10^4 cel/poço e acompanhadas por diferentes intervalos de tempo (1 a 7 dias). Para contagem de corpúsculos lipídicos, utilizamos microscopia óptica de campo claro após coloração com OsO_4 . Os valores são representativos de três experimentos independentes em que 50 células foram contadas consecutivamente. As imagens são representativas de células coradas com OsO_4 plaqueadas na concentração de (C) 1×10^5 cel/poço e (D) 1×10^4 cel/poço, analisadas após 3 dias de em microscopia óptica. *, $p < 0,05$; +, $p < 0,05$ em relação ao primeiro dia. Barras = $10 \mu\text{m}$

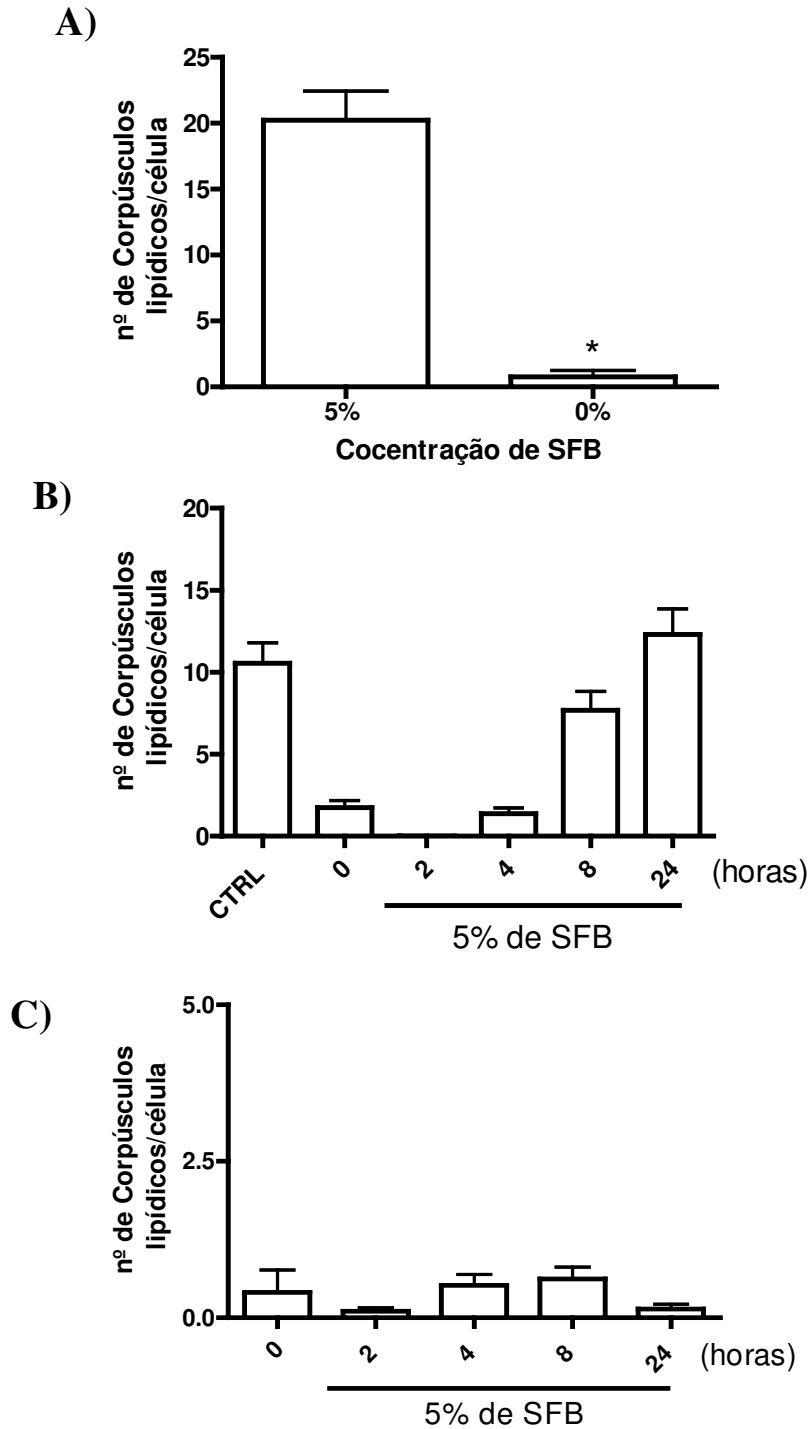


Figura 4.15 – **Deprivação de SFB reduz o número de corpúsculos lipídicos em IEC-6 não-confluentes.** (A) As células foram plaqueadas na concentração de 1×10^4 cel/poço e após 48 horas, cultivadas por 24 horas em meio fresco contendo 5% ou não de SFB. As células foram plaqueadas na concentração de (B) 1×10^4 cel/poço e (C) 1×10^5 cel/poço e após 24 horas as células foram privadas de SFB. Após 24h na ausência de SFB, meio fresco contendo 5% de SFB foi adicionado e as células analisadas em diferentes intervalos de tempo (2 a 24 horas). Para contagem de corpúsculos lipídicos, utilizamos microscopia óptica de campo claro após coloração com OsO_4 . Os gráficos são representativos de pelo menos dois experimentos independentes em que 50 células foram contadas consecutivamente. *, $p < 0.05$.

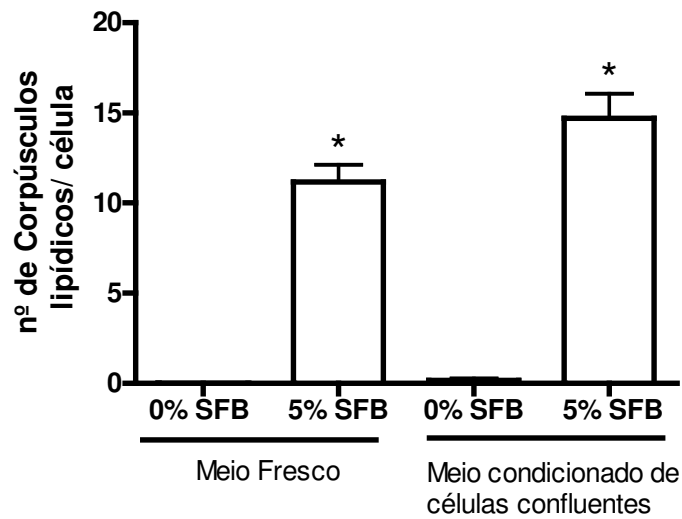


Figura 4.16 – **Meio condicionado de células confluentes não altera o número de corpúsculos lipídicos em células não-confluentes.** As células IEC-6 foram estimuladas por 24 horas com meio condicionado de células confluentes. O meio condicionado obtido de células confluentes cultivadas na ausência de SFB por 48 horas foi transferido para cultura de células não-confluentes e mantidos por 24 horas na ausência ou presença de 5% de SFB. Utilizamos microscopia óptica de campo claro para contagem de corpúsculos lipídicos após coloração com OsO_4 . Os valores são representativos de dois experimentos independentes em que 50 células foram contadas consecutivamente. *, $p < 0.05$ em relação a 0% SFB.

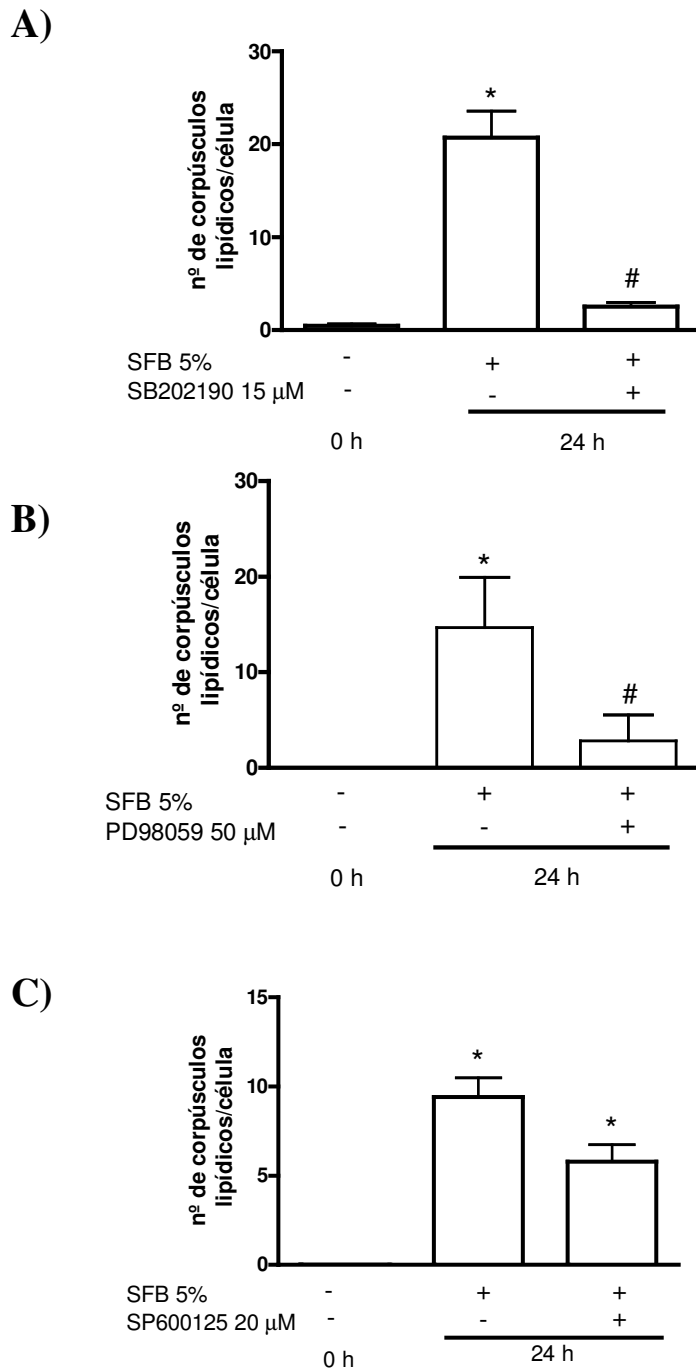


Figura 4.17 – **A biogênese de corpúsculos lipídicos induzida por SFB em IEC-6 não-confluentes é dependente da via de p38 e ERK1/2.** As células foram plaqueadas na concentração de 1×10^4 cel/poço e após 24 horas as células foram deprivadas de SFB. Em seguida, as células foram pré-tratadas com inibidores da via de (A) p38, SB202190 10 μ M, (B) ERK 1 /2, PD98059 50 μ M e (C) JNK, SP600125 20 μ M por 30 minutos. Então, as células foram estimuladas com 5% SFB por 24 horas. As células permaneceram na presença dos inibidores durante todo o tempo de ativação. Os valores são representativos de três experimentos independentes em que 50 células foram contadas consecutivamente. *, $p < 0.05$ em relação ao grupo contendo 0% de SFB (0h); #, $p < 0,05$ em relação ao grupo contendo 5% SFB (24h)

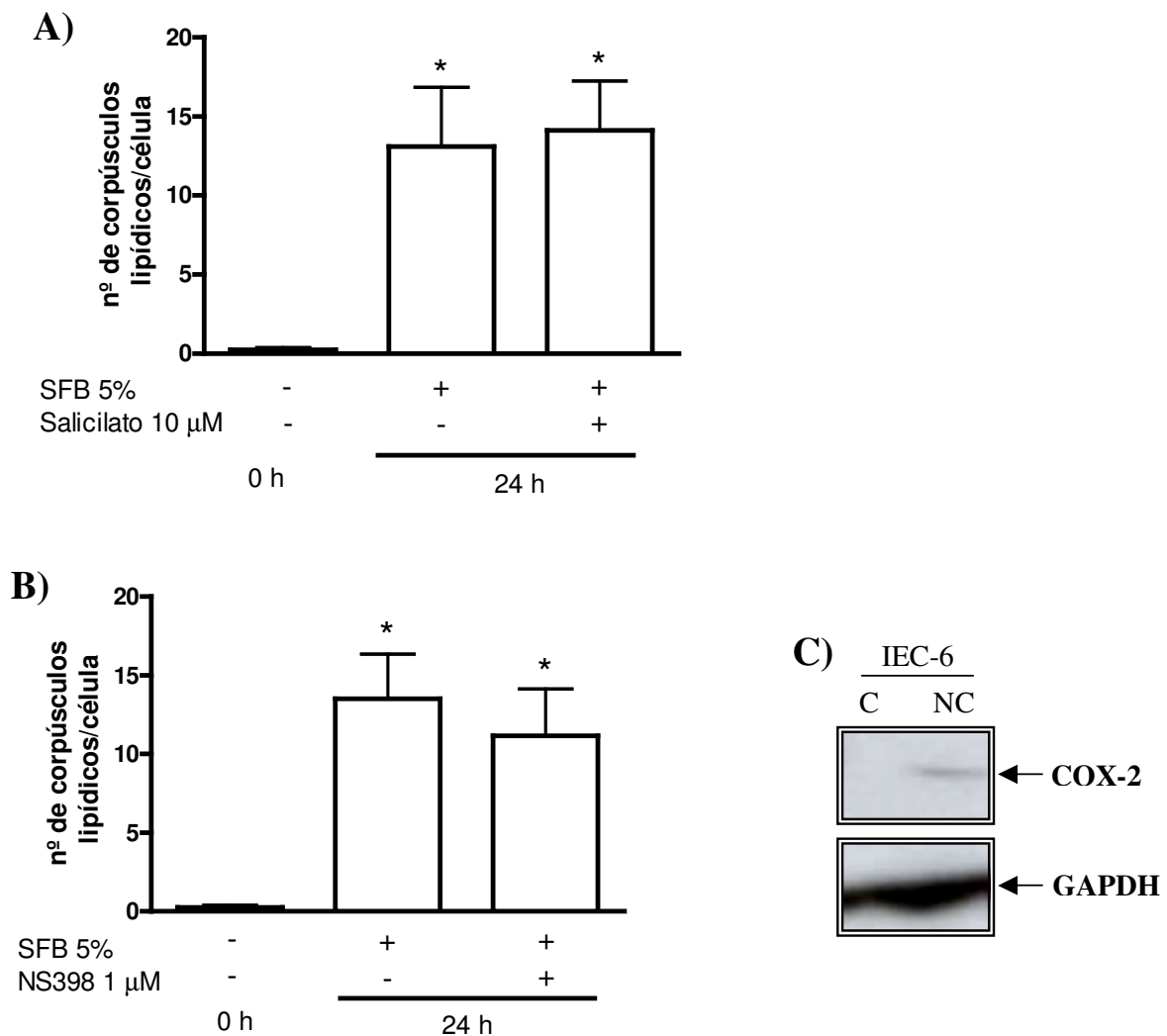


Figura 4.18 – **A biogênese de corpúsculos lipídicos induzida por SFB em IEC-6 não-confluentes é independente da via de COX.** Após 24 horas de plaqueamento as células foram deprivadas de SFB por 24 horas. Em seguida, pré-tratadas com inibidores da via de (A) COX-1, Salicilato de Valeril 10 μ M e (B) COX-2, NS398 1 μ M por 30 minutos, então estimuladas com 5% SFB por 24 horas. As células permaneceram na presença dos inibidores durante todo o tempo de ativação. Os valores representam a média de três experimentos independentes em que 50 células foram contadas consecutivamente. *, $p < 0.05$ em relação ao grupo contendo 0% de SFB (0h). (C) As células foram plaqueadas na concentração de 1×10^4 cel/poço e 10 poços foram tratados com tripsina e reunidos em um único tubo para obtenção do lisado total. O controle de células confluentes sofreu esse mesmo processo. As proteínas do lisado total foram separadas por SDS-PAGE. A expressão de COX-2 foi analisada por *immunoblotting* e anticorpo contra GAPDH foi utilizado para normalização da quantidade de proteína aplicada no gel. As imagens representam a média de três experimentos independentes. C, confluentes e NC, não-confluentes.

5 – Discussão

Corpúsculos lipídicos por muitos anos foram considerados estruturas que apenas estocavam gordura no tecido adiposo. Porém, é crescente a descrição dessas estruturas como organelas dinâmicas e multifuncionais em diversos tipos celulares e vários organismos. Corpúsculos lipídicos têm sido relacionados com o aumento da produção de mediadores lipídicos da inflamação em células hematopoiéticas. Células epiteliais estão freqüentemente expostas à injúria tecidual que promove processos inflamatórios. Entretanto, a participação de corpúsculos lipídicos na fisiologia do tecido epitelial intestinal não tem sido investigada.

Nesse trabalho, estudamos a modulação dos corpúsculos lipídicos no tecido epitelial intestinal, utilizando como modelo de estudo uma linhagem de célula epitelial de intestino delgado de rato, IEC-6. Essas células são amplamente estudadas para melhor compreensão da fisiologia intestinal por possuírem características de células de epitélio normal, determinadas por critérios morfológicos e imunológicos (Quaroni et al., 1979). Em nosso trabalho, essas células foram utilizadas para análise da formação de corpúsculos lipídicos em diferentes condições de cultura, visto que IEC-6 confluyente simulando um epitélio íntegro, não apresenta corpúsculos lipídicos, sendo um modelo ideal para estudo.

Células IEC-6 confluentes foram tratadas com diversos mediadores inflamatórios. Ativação com IL-1 β , PAF, PGE₂ e PMA não foram capazes de induzir a formação de corpúsculos lipídicos nessas células. PAF e PMA, que são capazes de induzir a formação de corpúsculos lipídicos em neutrófilos e eosinófilos, não induziram em IEC-6, corroborando a definição de Bozza & Bandeira-Melo (2005) que a modulação de corpúsculos lipídicos é estímulo- e célula- específicos (Bozza et al., 2005).

Ácidos graxos, como AA e AO, induzem de maneira semelhante a formação corpúsculos lipídicos na linhagem IEC-6. Entretanto, a indução de corpúsculos lipídicos por ácidos graxos não é apenas um acúmulo de lipídeos, visto que PAF e PGE₂, que também são mediadores lipídicos, não induzem a formação dessas estruturas. A indução de corpúsculos com ácidos graxos tem sido descrita por ser dependente da estrutura e estereoisomeria. Em neutrófilos, a formação de corpúsculos lipídicos é muito mais potente com ácidos graxos cis-insaturados, enquanto ácidos graxos saturados e/ou trans-insaturados não alteram o número

dessas estruturas de maneira significativa (Weller et al., 1991b). Em células epiteliais, essa diferença na modulação de corpúsculos lipídicos por diferentes ácidos graxos permanece por ser esclarecida.

A indução de corpúsculos lipídicos tem sido descrita como um processo altamente regulado, que é devido a ativação de vias de sinalização distintas e pode depender de síntese protéica (Bozza et al., 1997b). Nós podemos observar que a regulação da biogênese de corpúsculos lipídicos induzida por AA em células IEC-6 também envolve a participação de diferentes vias de sinalização. O envolvimento de PKC na indução de corpúsculos lipídicos em IEC-6 foi avaliado com o tratamento com Calphostin C, um inibidor que atua no domínio regulatório dessa enzima. Esse tratamento reduziu drasticamente a formação de corpúsculos lipídicos induzidos por AA. Essa participação de PKC é reforçada por estudos demonstrando que AA é capaz de ativar essa enzima (Murakami et al., 1985). Além disso, a participação de PKC na modulação de corpúsculos lipídicos tem sido indicada em estudos com neutrófilos e eosinófilos. Nesses tipos celulares, essa enzima está envolvida na formação dessas estruturas após estímulos como PAF e PMA (Weller et al., 1991b; Bozza et al., 1997a; Bozza et al., 1997b). Entretanto, o tratamento de células IEC-6 com PMA, um reconhecido ativador de PKC, não foi capaz de induzir a formação de corpúsculos lipídicos. Esses resultados indicam que a participação de PKC na indução de corpúsculos lipídicos em células IEC-6 é estímulo-específico.

A família PKC possui 12 isoformas que possuem expressão e ativação diferenciada nos tecidos. Lopez-Nicolas e colaboradores (2006) recentemente demonstraram através de mutações sítios-específicas que AA interage com domínio C1 e C2 que apresentam papéis diferentes e específicos na localização e ativação de PKC- α (Lopez-Nicolas et al., 2006). A interação de AA com domínio C2 modula a ativação e a localização da enzima na membrana plasmática através de maneira dependente de cálcio e a interação com subdomínio C1A estabiliza a interação de PKC- α com a membrana plasmática (Lopez-Nicolas et al., 2006). O mecanismo molecular para ativação de PKC- α por AA difere de PMA pela diferença na afinidade dos subdomínios da enzima. O subdomínio C1B apresenta maior afinidade por ésteres de forbol (Slater et al., 1996). A mutação nessa região não altera a ativação de PKC- α por AA (Lopez-Nicolas et al., 2006), sugerindo uma ativação diferenciada das isoformas de PKC por PMA, assim como por AA. Além da PKC- α , AA foi capaz de translocar as isoformas β I e β II em neutrófilos (Hii et al., 1998).

A biogênese de corpúsculos lipídicos induzida por AA também requer a participação de PI3K em células IEC-6. A recente detecção de PI3K em corpúsculos lipídicos reforça a relação entre essa via de sinalização e corpúsculos lipídicos, além de sugerir que a sinalização mediada por PI3K pode ocorrer dentro dessas estruturas (Yu et al., 2000). Em eosinófilos, a biogênese de corpúsculos lipídicos e a produção de LTC₄ induzidos por eotaxina são inibidas com o tratamento com inibidores de PI3K (Bandeira-Melo et al., 2001). A via de PI3K é ativada em células de câncer de próstata estimuladas com AA participando na indução de genes envolvidos em inflamação, como COX-2, IL-1 β e NF- κ B (Hughes-Fulford et al., 2006). A redução completa do número de corpúsculos lipídicos induzido por AA após o tratamento com inibidor de PI3K indica uma participação importante dessa via na biogênese de corpúsculos lipídicos em IEC-6. Entretanto, permanece por ser mais bem elucidada a relação e possível interação dessa via de sinalização e a via de PKC, visto que ambos inibidores tiveram uma redução drástica dessas estruturas.

A participação da via de MAPK no metabolismo de lipídeos também foi observada na formação de corpúsculos lipídicos em resposta a estímulos inflamatórios em células hematopoiéticas. A formação de corpúsculos lipídicos em eosinófilos estimulados com eotaxina é reduzida com a inibição de membros dessa família, como ERK e p38 (Bandeira-Melo et al., 2001). A ativação das MAPK tem sido também descrita por participar da liberação de eicosanóides, como PGE₂ e LTC₄ (Bandeira-Melo et al., 2001). Na biogênese de corpúsculos lipídicos em IEC-6 induzidos por AA, os inibidores de ERK1/2 e JNK não tiveram efeito, enquanto o inibidor da via de p38 teve uma redução parcial. Essa participação de p38 é reforçada com a observação de que AA é capaz de induzir a fosforilação dessa enzima, mas não de ERK e JNK.

Diversos trabalhos têm apresentado uma correlação da atividade de PKC e fosforilação de p38 em diversos tipos celulares (Hii et al., 1998; Chang et al., 2000). Recentemente, foi apresentado que PMA estimula seletivamente a atividade de p38 α e β , sem afetar atividade das isoformas γ e δ (Kumar et al., 1997), indicando que diferentes isoformas de PKC podem ativar diferentes isoformas de p38. No modelo utilizado neste trabalho, utilizamos o inibidor de p38, SB202190, que inibe seletivamente as isoformas α e β . A inibição parcial da formação de corpúsculos lipídicos por esse inibidor na linhagem IEC-6 indica uma participação de uma outra via paralela a da p38 MAPK e ou diferentes isoformas de p38 atuando na biogênese de corpúsculos lipídicos induzida por AA em células IEC-6. A utilização de

camundongos deficientes em isoformas específicas de p38 pode contribuir significativamente para a compreensão dessa relação de PKC e p38 no metabolismo de lipídeos.

Doença inflamatória crônica intestinal é considerada um fator de risco para câncer. A proliferação excessiva e presença de mediadores inflamatórios expõem as células a um ambiente favorável para o desenvolvimento de alterações genéticas que são precursores de tumores. A presença de corpúsculos lipídicos em células proliferando e alterações ocasionadas pela adição de AA concomitante com a elevação exacerbada do número de corpúsculos lipídicos, estão de acordo com a observação de dados anteriores de Accioly e colaboradores (Accioly et al., 2005), demonstrando que células de câncer de cólon possuem um número elevado de corpúsculos lipídicos quando comparados com o tecido normal adjacente. A adição de ácidos graxos como araquidônico e linoléico potencializam o crescimento induzido por EGF em células epiteliais de glândulas mamárias (Bandyopadhyay et al., 1993), corroborando o possível papel de corpúsculos lipídicos e proliferação.

A participação da via metabólica de AA é bem reconhecida em câncer de cólon. Nesse tipo de câncer, a expressão aumentada de COX-2 é encontrada em 85% dos casos (Eberhart et al., 1994). A via mais aceita para atuação da COX-2 na tumorigênese é a produção de PGE₂, um potente mediador lipídico capaz de modular a motilidade e sobrevivência celular (Sheng et al., 2001), a proliferação celular (Tsuji et al., 1995) e angiogênese (Tsuji et al., 1998). Neste trabalho demonstramos que a expressão de COX-2 é observada em células IEC-6 em estágio subconfluente e essa expressão é perdida quando as células atingem a confluência. Porém, a adição de AA em células confluentes é capaz de induzir a expressão de COX-2, sugerindo um papel para COX-2 durante a proliferação.

Para testar a participação das enzimas envolvidas no metabolismo do AA em tecido epitelial, células IEC-6 foram tratadas com inibidores de COX 1 e 2, Salicilato de Valerila e NS398 que não foram capazes de inibir a indução de corpúsculos lipídicos em células estimuladas com SFB ou com AA. Além disso, altas doses de PGE₂ exógena não foram capazes de modular a biogênese de corpúsculos lipídicos em células confluentes, indicando que a indução de corpúsculos lipídicos por AA é independente da produção de eicosanóides. Apesar de COX e PGE₂ não participarem na biogênese de corpúsculos lipídicos em IEC-6 e neutrófilos (Bozza et al., 2002), a formação dessas estruturas pode ser um mecanismo que pode contribuir para síntese aumentada de eicosanóides independente do estímulo. A

relação do número de corpúsculos lipídicos e liberação de eicosanóides foi observada em leucócitos estimulados com ácido oléico (Bozza et al., 1996), que não é um precursor de eicosanóides, e outros estímulos para formação de corpúsculos lipídicos como RANTES, eotaxina e PAF (Bozza et al., 1996; Bozza et al., 1997b; Bandeira-Melo et al., 2002).

A participação de corpúsculos lipídicos na geração de eicosanóides por células hematopoiéticas é reforçada pela localização de proteínas envolvidas na cascata metabólica do AA e co-localização de produtos finais desta via, como LTC₄ e PGE₂ (Bandeira-Melo et al., 2001; D'Avila et al., 2006). Nesse trabalho, demonstramos que a biogênese de corpúsculos lipídicos favorece a liberação de AA, corroborando a hipótese de que a formação de corpúsculos lipídicos participa na produção de eicosanóides em células epiteliais. A detecção de níveis mais elevados de liberação de AA em células contendo corpúsculos lipídicos indica uma possível facilitação para atividade da cPLA₂, a principal enzima participante na liberação de AA, visto que o tratamento de AA não induz alterações na expressão dessa enzima.

A hipótese de uma maior atividade de cPLA₂ após indução de corpúsculos lipídicos é reforçada pela participação de PKC e MAPK na biogênese dessas estruturas. A fosforilação de cPLA₂ regula a atividade dessa enzima e esse mecanismo de ativação tem sido relacionado por ser dependente de enzimas PKC e MAPK. A inibição de PKC- α mas não PKC- β reduz drasticamente a atividade de cPLA₂ em monócitos humanos. Em cérebro bovino, a fosforilação e a atividade de cPLA₂ é regulada por PKC e ERK2 (Nemenoff et al., 1993). A dependência de PKC na fosforilação de cPLA₂ também foi relatada na linhagem celular MDCK (Xing e Insel, 1996)

Apesar da maior liberação de AA e indução da expressão de COX-2, enzima responsável pela metabolização de AA a PGE₂, não foram encontrados níveis detectáveis desse prostanóide através da técnica de EIA. Métodos mais sensíveis como imunolocalização após fixação com carbodiimida (D'Avila et al., 2006) contribuirá com um melhor entendimento na modulação de corpúsculos lipídicos em células epiteliais. Sendo importante também investigar a presença das enzimas PGES neste tipo celular, visto que a presença dos produtos da cascata do AA dependente da distribuição e predomínio das enzimas sintases terminais.

Durante um processo de injúria tecidual, é bem reconhecido que as células epiteliais proliferam e migram durante o processo de reparo mediado por fatores de crescimento e mediadores inflamatórios. A participação do metabolismo de lipídeos

em reparo tecidual foi recentemente relatada em modelo de hepatectomia parcial, utilizando camundongos com deficiência na formação de corpúsculos lipídicos devido à mutação do gene de Cav1. Camundongos *cav1*^{-/-} possuem regeneração prejudicada do fígado, baixa sobrevivência após lesão, acúmulo reduzido de corpúsculos lipídicos e parada do ciclo celular (Fernandez et al., 2006).

A participação de corpúsculos em resposta a injúria ao tecido epitelial foi analisada em um modelo de cicatrização utilizando IEC-6 confluentes. A lesão mecânica realizada com uma ponteira de 1ml permitia somente a observação de células migrando, e não foi observada alteração no número de corpúsculos lipídicos nessas células. Um modelo de cicatrização, simulando lesões epiteliais mais extensas como observadas em doenças inflamatórias crônicas intestinais, permitirá a observação de células migrando e proliferando e talvez uma possível modulação de corpúsculos lipídicos em resposta a essa lesão, o que não foi possível observar no modelo utilizado.

A modulação de corpúsculos lipídicos por SFB somente é observada em células IEC-6 não-confluentes, pois a retirada e posterior adição de SFB em células confluentes não foi capaz de alterar o número de corpúsculos lipídicos. Em comparação, IEC-6 não-confluente cultivada na ausência de SFB reduz drasticamente o número de corpúsculos lipídicos, sendo esse restaurado completamente 24h após a adição do mesmo. A relação entre redução de corpúsculos lipídicos e crescimento inibido por contato não é devido a um fator solúvel liberado pelas células quando atingem o estágio de confluência. Durante o processo de diferenciação, as células sofrem alterações no metabolismo e na morfologia. A redução de corpúsculos lipídicos é provavelmente devido a uma regulação intracelular do estado proliferativo e/ou da responsividade a estimulação.

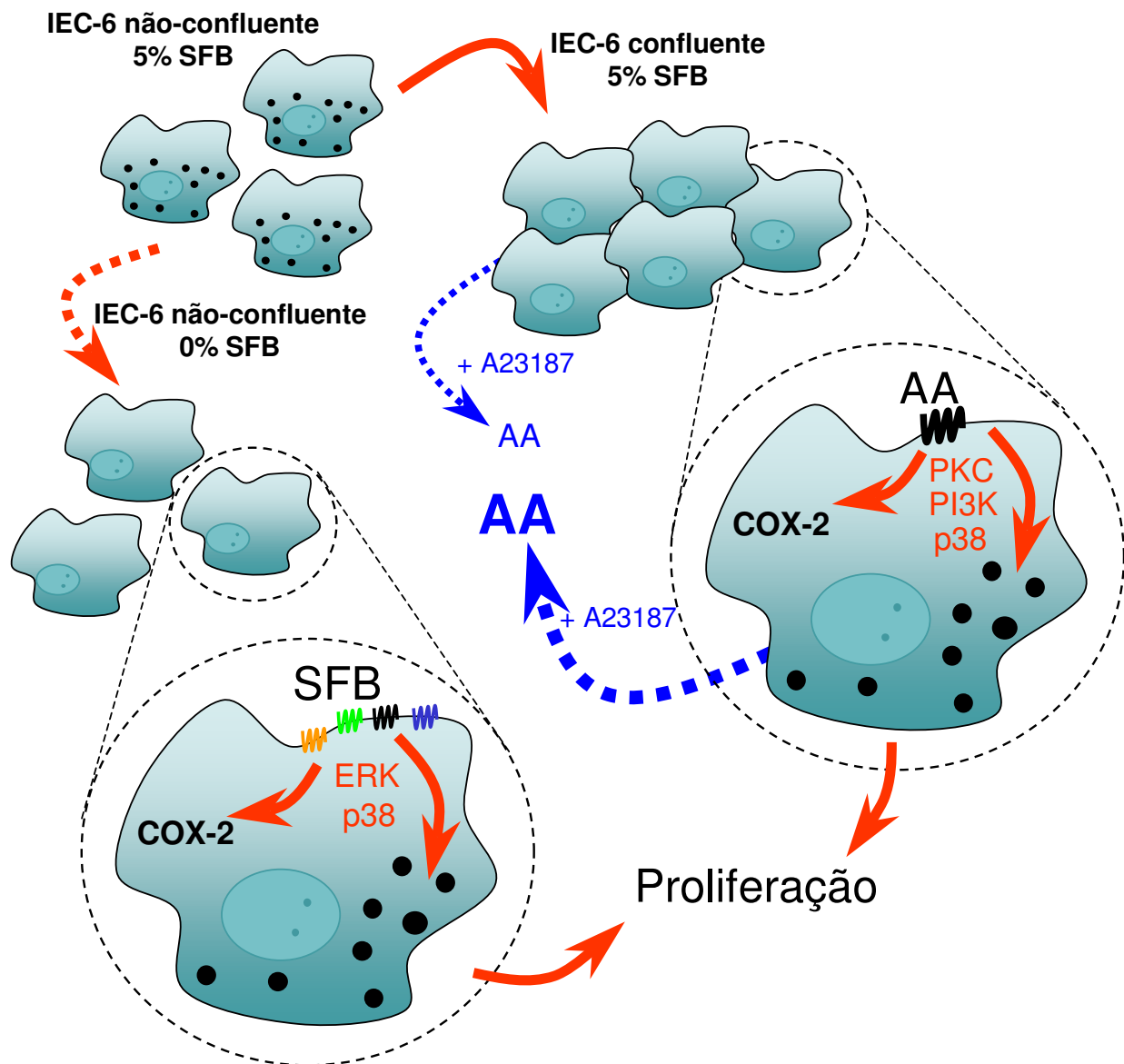
Diversos fatores de crescimento que participam de processos celulares como proliferação, migração e diferenciação estão presentes no SFB. A indução de corpúsculos lipídicos em células não-confluentes por SFB suporta a participação de mediadores lipídicos nesses processos. A presença de corpúsculos lipídicos em células em condições proliferativa e a alteração da homeostase da monocamada pela adição prolongada de AA, indicam uma participação de corpúsculos lipídicos na proliferação e/ou diferenciação de células epiteliais. Além disso, sugerem o envolvimento dessas estruturas em resposta a injúria tecidual e nas alterações iniciais que podem levar ao câncer.

Diferentes MAPK participam na regulação de cada etapa do processo de adipogênese, indicando um importante papel para essa família de enzimas no metabolismo de lipídeos (Bost et al., 2005). Durante a diferenciação, pré-adipócitos enriquecem os corpúsculos lipídicos se diferenciando em adipócitos maduros. Apesar da participação de p38 permanecer controversa nesse processo, pois p38 tem diferentes efeitos dependendo do estágio de diferenciação, outras MAPK têm sido descritas por estarem envolvidas no metabolismo de lipídeos. Tang e colaboradores (2003) demonstraram que U0126, um potente inibidor de MEK, bloqueia a atividade de ERK e a diferenciação de adipócitos. Um inibidor menos eficiente dessa via, o PD98059, não altera o processo de diferenciação (Tang et al., 2003). A mutação no gene de JNK-1, mas não de JNK-2 induz a uma resistência a obesidade induzida por dieta rica em gordura, sugerindo um papel para essa enzima na estocagem de gordura (Hirosumi et al., 2002).

Em nosso estudo, demonstramos que ERK1/2 e JNK não participam da formação de corpúsculos lipídicos induzidos por AA. Entretanto, a formação de corpúsculos induzida por SFB em células não-confluentes requer a participação de ERK1/2, mesmo sendo analisada com um inibidor descrito como menos potente daquele utilizado na indução por AA. Além disso, a indução por SFB parece ser mais dependente das isoformas p38 α e β do que aquela observada na indução por AA, visto que o tratamento com esse inibidor teve uma redução drástica no número de corpúsculos lipídicos induzidos por SFB em células não confluentes. Esses resultados indicando uma participação fundamental das enzimas MAPK na formação de corpúsculos lipídicos em células que não atingiram a confluência, fortalecendo o envolvimento de ERK e p38 no metabolismo de lipídeos em IEC-6. As vias de sinalização de PI3K, PKC e tirosina cinase na formação de corpúsculos lipídicos em células não-confluentes não foram investigadas até o momento.

Nossos resultados sugerem que a presença de corpúsculos lipídicos facilita a mobilização de AA, e a liberação de AA é um passo limitante na formação de PGE₂. No tecido epitelial intestinal, a PGE₂ possui um importante papel na modulação da proliferação celular e no desenvolvimento de tumores coloretais. Entretanto, fica por ser esclarecido o real papel de corpúsculos lipídicos na formação de prostaglandinas em células epiteliais. Em conjunto, nossos dados indicam uma importante relação entre presença de corpúsculos lipídicos e proliferação, e tendo em vista que a proliferação é o processo fundamental no desenvolvimento e na

progressão tumoral, nossos resultados apontam um importante alvo de estudos para melhor compreensão, diagnóstico e controle do câncer coloretal.



Esquema 5.1 – Biogênese de corpúsculos lipídicos em IEC-6. Células IEC-6 cultivadas em DMEM suplementado com 5% SFB apresentaram de 15 a 20 corpúsculos lipídicos por célula em sub-confluência. Entretanto a retirada de SFB ou o estabelecimento de confluência nas culturas elimina os corpúsculos lipídicos das células. Em células não-confluentes, a reposição de SFB induz a biogênese de corpúsculos lipídicos, e requer a participação da via de ERK 1/2 e p38. A estimulação de IEC-6 confluyente com AA e AO induziu a formação de corpúsculos lipídicos. A biogênese de corpúsculos lipídicos induzida por AA depende de distintas vias de sinalização, como PI3K, PKC e p38 MAPK. A formação de corpúsculos lipídicos facilitou a mobilização de AA após ativação, e estimulação prolongada com esse AA induziu alterações na monocamada celular.

6 – Conclusão

- Ácido araquidônico, mas não outros estímulos inflamatórios como IL-1 β , PAF e PMA, induz a formação de corpúsculos lipídicos em IEC-6 confluyente de maneira dependente da concentração;
- A biogênese de corpúsculos lipídicos induzido por AA em células confluentes não depende da conversão desse ácido graxo a prostanóides;
- A indução de corpúsculos lipídicos por AA não envolve ativação de MEK 1/2 ou JNK, mas é parcialmente dependente da ativação de p38;
- A indução de corpúsculos lipídicos por AA não requer o envolvimento de enzimas tirosina cinases, mas é dependente das vias de PKC e PI3K;
- A biogênese de corpúsculos lipídicos em células epiteliais facilita a mobilização de AA após ativação, mas não altera a expressão de cPLA₂.
- Atingir a confluência ou a retirada de SFB reduzem o número de corpúsculos lipídicos em IEC-6, indicando uma correlação positiva entre a proliferação celular e o número de corpúsculos lipídicos;
- IEC-6 não-confluyente apresenta a expressão de COX-2 quando cultivada com 5% SFB, mas essa enzima não participa na biogênese de corpúsculos lipídicos induzida por SFB.
- Em células não-confluentes, as vias de ERK 1/2 e p38 possuem um papel fundamental na biogênese de corpúsculos lipídicos induzida por SFB.

7 – Referências bibliográficas

ACCIOLY, M. T.; KAUFMANN, C.; PACHECO, P.; OLIVEIRA, S. S.; MORGADO-DIAZ, J.; BOZZA, P. T.; VIOLA, J. P. B. Lipid bodies are reservoir of cyclooxygenase-2 and sites of newly formed prostaglandin-E2 in colon cancer cells. **Applied Cancer Research**, v. 2, p. 57-58, 2005.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. Comunicação Celular. In: ARTMÉDICAS. **Biologia molecular da célula**. Porto Alegre:2004a. Cap. 15 , p. 831-906.

_____. Junções Celulares, adesão celular e matriz extracelular. In: ARTMÉDICAS. **Biologia molecular da célula**. Porto Alegre:2004b. Cap. 19 , p. 1065-1125.

ALEXANDER, L. D.; CUI, X. L.; FALCK, J. R.; DOUGLAS, J. G. Arachidonic acid directly activates members of the mitogen-activated protein kinase superfamily in rabbit proximal tubule cells. **Kidney international**, v. 59, n. 6, p. 2039-2053, 2001.

ALMAHBOBI, G. Adhesion of intermediate filaments and lipid droplets in adrenal cells studied by field emission scanning electron microscopy. **Cell and tissue research**, v. 281, n. 2, p. 387-390, 1995.

ALMAHBOBI, G. ; HALL, P. F. The role of intermediate filaments in adrenal steroidogenesis. **Journal of cell science**, v. 97, n. 4, p. 679-687, 1990.

ALMAHBOBI, G.; WILLIAMS, L. J.; HALL, P. F. Attachment of steroidogenic lipid droplets to intermediate filaments in adrenal cells. **Journal of cell science**, v. 101, n. 2, p. 383-393, 1992.

ANDREANI, M.; OLIVIER, J. L.; BERENBAUM, F.; RAYMONDJEAN, M.; BEREZIAT, G. Transcriptional regulation of inflammatory secreted phospholipases A₂. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1488, n. 1-2, p. 149-158, 2000.

BALSINDE, J.; BALBOA, M. A.; DENNIS, E. A. Functional coupling between secretory phospholipase A2 and cyclooxygenase-2 and its regulation by cytosolic group IV phospholipase A2. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 14, p. 7951-7956, 1998.

BALSINDE, J.; SHINOHARA, H.; LEFKOWITZ, L. J.; JOHNSON, C. A.; BALBOA, M. A.; DENNIS, E. A. Group V phospholipase A(2)-dependent induction of cyclooxygenase-2 in macrophages. **Journal of biological chemistry**, v. 274, n. 37, p. 25967-25970, 1999.

BAND, A. M.; JONES, P. M.; HOWELL, S. L. Arachidonic acid-induced insulin secretion from rat islets of Langerhans. **Journal of molecular endocrinology**, v. 8, n. 2, p. 95-101, 1992.

BANDEIRA-MELO, C.; BOZZA, P. T.; WELLER, P. F. The cellular biology of eosinophil eicosanoid formation and function. **The Journal of allergy and clinical immunology**, v. 109, n. 3, p. 393-400, 2002.

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

BANDEIRA-MELO, C. ; WELLER, P. F. Eosinophils and cysteinyl leukotrienes. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 69, n. 2-3, p. 135-143, 2003.

BANDYOPADHYAY, G. K.; HWANG, S.; IMAGAWA, W.; NANDI, S. Role of polyunsaturated fatty acids as signal transducers: amplification of signals from growth factor receptors by fatty acids in mammary epithelial cells. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 48, n. 1, p. 71-78, 1993.

BATES, E. J.; FERRANTE, A.; HARVEY, D. P.; POULOS, A. Polyunsaturated fatty acids increase neutrophil adherence and integrin receptor expression. **Journal of leukocyte biology**, v. 53, n. 4, p. 420-426, 1993.

BATES, E. J.; FERRANTE, A.; SMITHERS, L.; POULOS, A.; ROBINSON, B. S. Effect of fatty acid structure on neutrophil adhesion, degranulation and damage to endothelial cells. **Atherosclerosis**, v. 116, n. 2, p. 247-259, 1995.

BERGERS, G. ; BENJAMIN, L. E. Tumorigenesis and the angiogenic switch. **Nature Reviews Cancer**, v. 3, n. 6, p. 401-410, 2003.

BLANCHETTE-MACKIE, E. J.; DWYER, N. K.; BARBER, T.; COXEY, R. A.; TAKEDA, T.; RONDINONE, C. M.; THEODORAKIS, J. L.; GREENBERG, A. S.; LONDOS, C. Perilipin is located on the surface layer of intracellular lipid droplets in adipocytes. **Journal of Lipid Research**, v. 36, n. 6, p. 1211-1226, 1995.

BONVENTRE, J. V.; HUANG, Z.; TAHERI, M. R.; O'LEARY, E.; LI, E.; MOSKOWITZ, M. A.; SAPIRSTEIN, A. Reduced fertility and postischaemic brain injury in mice deficient in cytosolic phospholipase A2. **Nature**, v. 390, n. 6660, p. 622-625, 1997.

BOST, F.; AOUADI, M.; CARON, L.; BINETRUY, B. The role of MAPKs in adipocyte differentiation and obesity. **Biochimie**, v. 87, n. 1, p. 51-56, 2005.

BOUMA, G. ; STROBER, W. The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease. **Nature Reviews Immunology**, v. 3, n. 7, p. 521-533, 2003.

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

BOZZA, P. T.; PACHECO, P.; YU, W.; WELLER, P. F. NS-398: cyclooxygenase-2 independent inhibition of leukocyte priming for lipid body formation and enhanced leukotriene generation. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 67, n. 4, p. 237-244, 2002.

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

BOZZA, P. T.; MELO, R. C. N.; BANDEIRA-MELO, C. Leukocyte lipid bodies regulation and function: Contribution to allergy and host defense. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 113, n. 1, p. 30-49, 2007.

BOZZA, P. T.; PAYNE, J. L.; MORHAM, S. G.; LANGENBACH, R.; SMITHIES, O.; WELLER, P. F. Leukocyte lipid body formation and eicosanoid generation: Cyclooxygenase-independent inhibition by aspirin. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 93, n. 20, p. 11091-11096, 1996.

BOZZA, P. T.; YU, W.; PENROSE, J. F.; MORGAN, E. S.; DVORAK, A. M.; WELLER, P. F. Eosinophil lipid bodies: specific, inducible intracellular sites for enhanced eicosanoid formation. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 186, n. 6, p. 909-920, 1997b.

BRASAEMLE, D. L.; BARBER, T.; WOLINS, N. E.; SERRERO, G.; BLANCHETTE-MACKIE, E. J.; LONDOS, C. Adipose differentiation-related protein is an ubiquitously expressed lipid storage droplet-associated protein. **Journal of Lipid Research**, v. 38, n. 11, p. 2249-2263, 1997a.

BRASAEMLE, D. L.; BARBER, T.; KIMMEL, A. R.; LONDOS, C. Post-translational Regulation of Perilipin Expression. Stabilization by stored intracellular neutral lipids. **Journal of biological chemistry**, v. 272, n. 14, p. 9378-9387, 1997b.

CASTAGNA, M.; TAKAI, Y.; KAIBUCHI, K.; SANO, K.; KIKKAWA, U.; NISHIZUKA, Y. Direct activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase by tumor-promoting phorbol esters. **Journal of biological chemistry**, v. 257, n. 13, p. 7847-7851, 1982.

CEREJIDO, M.; SHOSHANI, L.; CONTRERAS, R. G. Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions. I. Biogenesis of tight junctions and epithelial polarity. **American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology**, v. 279, n. 3, p. G477-G482, 2000.

CERMELLI, S.; GUO, Y.; GROSS, S. P.; WELTE, M. A. The lipid-droplet proteome reveals that droplets are a protein-storage depot. **Current Biology**, v. 16, n. 18, p. 1783-1795, 2006.

CHANG, L. C. ; WANG, J. P. The upstream regulation of p38 mitogen-activated protein kinase phosphorylation by arachidonic acid in rat neutrophils. **The Journal of pharmacy and pharmacology**, v. 52, n. 5, p. 539-546, 2000.

CHEN, P.; CAI, Y.; YANG, Z. G.; ZHOU, R.; ZHANG, G. S.; DOMANN, F.; FANG, X. Involvement of PKC, p38 MAPK and AP-2 in IL-1beta-induced expression of cyclooxygenase-2 in human pulmonary epithelial cells. **Respirology**, v. 11, n. 1, p. 18-23, 2006.

CHENG, H. ; LEBLOND, C. P. Origin, differentiation and renewal of the four main epithelial cell types in the mouse small intestine. I. Columnar cell. **The American journal of anatomy**, v. 141, n. 4, p. 461-479, 1974.

COLUCCI-GUYON, E.; PORTIER, M. M.; DUNIA, I.; PAULIN, D.; POURNIN, S.; BABINET, C. Mice lacking vimentin develop and reproduce without an obvious phenotype. **Cell**, v. 79, n. 4, p. 679-694, 1994.

COUSSENS, L. M. ; WERB, Z. Inflammation and cancer. **Nature**, v. 420, n. 6917, p. 860-867, 2002.

D'AVILA, H.; MELO, R. C. N.; PARREIRA, G. G.; WERNECK-BARROSO, E.; CASTRO-FARIA-NETO, H. C.; BOZZA, P. T. Mycobacterium bovis bacillus calmette-guerin induces TLR2-Mediated formation of lipid bodies: intracellular domains for eicosanoid synthesis in vivo. **The Journal of Immunology**, v. 176, n. 5, p. 3087-3097, 2006.

DEMPSEY, E. C.; NEWTON, A. C.; MOCHLY-ROSEN, D.; FIELDS, A. P.; REYLAND, M. E.; INSEL, P. A.; MESSING, R. O. Protein kinase C isozymes and the regulation of diverse cell responses. **American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology**, v. 279, n. 3, p. L429-L438, 2000.

DESSEN, A. Structure and mechanism of human cytosolic phospholipase A(2). **Biochimica et biophysica acta**, v. 1488, n. 1-2, p. 40-47, 2000.

DIAZ, B. L. ; ARM, J. P. Phospholipase A(2). **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 69, n. 2-3, p. 87-97, 2003.

DIAZ, B. L.; SATAKE, Y.; KIKAWADA, E.; BALESTRIERI, B.; ARM, J. P. Group V secretory phospholipase A2 amplifies the induction of cyclooxygenase 2 and delayed prostaglandin D2 generation in mouse bone marrow culture-derived mast cells in a strain-dependent manner. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1761, n. 12, p. 1489-1497, 2006.

DIXON, D. A.; KAPLAN, C. D.; MCINTYRE, T. M.; ZIMMERMAN, G. A.; PRESCOTT, S. M. Post-transcriptional control of cyclooxygenase-2 gene expression. The role of the 3'-untranslated region. **Journal of biological chemistry**, v. 275, n. 16, p. 11750-11757, 2000.

EBERHART, C.; COFFEY, R.; RADHIKA, A.; GIARDIELLO, F.; FERRENBACH, S.; DUBOIS, R. Up-regulation of cyclooxygenase 2 gene expression in human colorectal adenomas and adenocarcinomas. **Gastroenterology**, v. 107, n. 4, p. 1183-1188, 1994.

ENGELBRECHT, A. M.; ENGELBRECHT, P.; GENADE, S.; NIESLER, C.; PAGE, C.; SMUTS, M.; LOCHNER, A. Long-chain polyunsaturated fatty acids protect the heart against ischemia/reperfusion-induced injury via a MAPK dependent pathway. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 39, n. 6, p. 940-954, 2005.

ESCAFFIT, F.; PERREAULT, N.; JEAN, D.; FRANCOEUR, C.; HERRING, E.; RANCOURT, C.; RIVARD, N.; VACHON, P. H.; PARE, F.; BOUCHER, M. P. Repressed E-cadherin expression in the lower crypt of human small intestine: a cell marker of functional relevance. **Experimental Cell Research**, v. 302, n. 2, p. 206-220, 2005.

FERNANDEZ, M. A.; ALBOR, C.; INGELMO-TORRES, M.; NIXON, S. J.; FERGUSON, C.; KURZCHALIA, T.; TEBAR, F.; ENRICH, C.; PARTON, R. G.; POL, A. Caveolin-1 is essential for liver regeneration. **Science**, v. 313, n. 5793, p. 1628-1632, 2006.

FINSTAD, H. S.; KOLSET, S. O.; HOLME, J. A.; WIGER, R.; FARRANTS, A. K.; BLOMHOFF, R.; DREVON, C. A. Effect of n-3 and n-6 fatty acids on proliferation and differentiation of promyelocytic leukemic HL-60 cells. **Blood**, v. 84, n. 11, p. 3799-3809, 1994.

FONG, T. H. ; WANG, S. M. Dissection of the signaling mechanism for capsule detachment of lipid droplets in rat adrenocortical cells. **Journal of cellular biochemistry**, v. 65, n. 1, p. 67-74, 1997.

FREY, M. R.; GOLOVIN, A.; POLK, D. B. Epidermal growth factor-stimulated intestinal epithelial cell migration requires Src family kinase-dependent p38 MAPK signaling. **Journal of biological chemistry**, v. 279, n. 43, p. 44513-44521, 2004.

FUJISHIMA, H.; SANCHEZ MEJIA, R. O.; BINGHAM, C. O., III; LAM, B. K.; SAPIRSTEIN, A.; BONVENTRE, J. V.; AUSTEN, K. F.; ARM, J. P. Cytosolic phospholipase A2 is essential for both the immediate and the delayed phases of eicosanoid generation in mouse bone marrow-derived mast cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 96, n. 9, p. 4803-4807, 1999.

GAO, J. ; SERRERO, G. Adipose differentiation related protein (ADRP) expressed in transfected COS-7 cells selectively stimulates long chain fatty acid uptake. **Journal of biological chemistry**, v. 274, n. 24, p. 16825-16830, 1999.

GARROD, D.; CHIDGEY, M.; NORTH, A. Desmosomes: differentiation, development, dynamics and disease. **Current opinion in cell biology**, v. 8, n. 5, p. 670-678, 1996.

GOKMEN-POLAR, Y.; MURRAY, N. R.; VELASCO, M. A.; GATALICA, Z.; FIELDS, A. P. Elevated Protein Kinase C {beta}II Is an Early Promotive Event in Colon Carcinogenesis. **Cancer research**, v. 61, n. 4, p. 1375-1381, 2001.

GRASSET, E.; PINTO, M.; DUSSAULX, E.; ZWEIBAUM, A.; DESJEUX, J. F. Epithelial properties of human colonic carcinoma cell line Caco-2: electrical parameters. **American journal of physiology.Cell physiology**, v. 247, n. 3, p. C260-C267, 1984.

GREEN, K. J. ; JONES, J. C. Desmosomes and hemidesmosomes: structure and function of molecular components. **The FASEB Journal**, v. 10, n. 8, p. 871-881, 1996.

GUYTON, A. C. ; HALL, J. E. Princípios gerais de função gastrointestinal. In: GUANABARA KOOGAN. **Tratado de Fisiologia Médica**. Rio de Janeiro:2002. Cap. 62 , p. 668-676.

HAAPAMAKI, M. M.; GRONROOS, J. M.; NURMI, H.; IRJALA, K.; ALANEN, K. A.; NEVALAINEN, T. J. Phospholipase A2 in serum and colonic mucosa in ulcerative colitis. **Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation**, v. 59, n. 4, p. 279-287, 1999.

HALTER, F.; TARNAWSKI, A. S.; SCHMASSMANN, A.; PESKAR, B. M. Cyclooxygenase 2 implications on maintenance of gastric mucosal integrity and ulcer healing: controversial issues and perspectives. **Gut**, v. 49, n. 3, p. 443-453, 2001.

HERMISTON, M. L.; WONG, M. H.; GORDON, J. I. Forced expression of E-cadherin in the mouse intestinal epithelium slows cell migration and provides evidence for nonautonomous regulation of cell fate in a self-renewing system. **Genes & development**, v. 10, n. 8, p. 985-996, 1996.

HIGAKI, S.; AKAZAWA, A.; NAKAMURA, H.; YANAI, H.; YOSHIDA, T.; OKITA, K. Metaplastic polyp of the colon develops in response to inflammation. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 14, n. 7, p. 709-714, 1999.

HIL, C. S. T.; FERRANTE, A.; SCHMIDT, S.; RATHJEN, D. A.; ROBINSON, B. S.; POULOS, A.; MURRAY, A. W. Inhibition of gap junctional communication by polyunsaturated fatty acids in WB cells: evidence that connexin 43 is not hyperphosphorylated. **Carcinogenesis**, v. 16, n. 7, p. 1505-1511, 1995.

HIL, C. S. T.; HUANG, Z. H.; BILNEY, A.; COSTABILE, M.; MURRAY, A. W.; RATHJEN, D. A.; DER, C. J.; FERRANTE, A. Stimulation of p38 phosphorylation and activity by arachidonic acid in HeLa cells, HL60 promyelocytic leukemic cells, and human neutrophils. Evidence for cell type-specific activation of mitogen-activated protein kinases. **Journal of biological chemistry**, v. 273, n. 30, p. 19277-19282, 1998.

HIL, C. S. T.; MOGHADAMMI, N.; DUNBAR, A.; FERRANTE, A. Activation of the phosphatidylinositol 3-kinase-Akt/protein kinase B signaling pathway in arachidonic acid-stimulated human myeloid and endothelial cells. Involvement of the ErbB receptor family. **Journal of biological chemistry**, v. 276, n. 29, p. 27246-27255, 2001.

HILLER, G. ; SUNDLER, R. Activation of arachidonate release and cytosolic phospholipase A2 via extracellular signal-regulated kinase and p38 mitogen-activated protein kinase in macrophages stimulated by bacteria or zymosan. **Cell signal**, v. 11, n. 12, p. 863-869, 1999.

HIROSUMI, J.; TUNCMAN, G.; CHANG, L.; GORGUN, C. Z.; UYSAL, K. T.; MAEDA, K.; KARIN, M.; HOTAMISLIGIL, G. S. A central role for JNK in obesity and insulin resistance. **Nature**, v. 420, n. 6913, p. 333-336, 2002.

HUGHES-FULFORD, M.; LI, C. F.; BOONYARATANAKORNKIT, J.; SAYYAH, S. Arachidonic acid activates phosphatidylinositol 3-kinase signaling and induces gene expression in prostate cancer. **Cancer research**, v. 66, n. 3, p. 1427-1433, 2006.

IMAMURA, M.; INOBUCHI, T.; IKUYAMA, S.; TANIGUCHI, S.; KOBAYASHI, K.; NAKASHIMA, N.; NAWATA, H. ADRP stimulates lipid accumulation and lipid droplet formation in murine fibroblasts. **American journal of physiology. Endocrinology and metabolism**, v. 283, n. 4, p. E775-E783, 2002.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER; SOCIEDADE BRASILEIRA DE COLOPROCTOLOGIA; COLÉGIO BRASILEIRO DE CIRURGIÕES et al. **Falando sobre câncer de intestino**. Instituto Nacional de Câncer. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde, 2003. 36 p. ISBN 85-7318-088-9.

ITZKOWITZ, S. H. ; YIO, X. Inflammation and Cancer IV. Colorectal cancer in inflammatory bowel disease: the role of inflammation. **American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology**, v. 287, n. 1, p. G7-17, 2004.

JOHNSON, G. L. ; LAPADAT, R. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. **Science**, v. 298, n. 5600, p. 1911-1912, 2002.

JONES, M. K.; TOMIKAWA, M.; MOHAJER, B.; TARNAWSKI, A. S. Gastrointestinal mucosal regeneration: role of growth factors. **Frontiers in bioscience**, v. 4:D303-9., p. D303-D309, 1999.

KAMEI, D.; MURAKAMI, M.; NAKATANI, Y.; ISHIKAWA, Y.; ISHII, T.; KUDO, I. Potential role of microsomal prostaglandin synthase-1 in tumorigenesis. **Journal of biological chemistry**, v. 278, n. 21, p. 19396-19405, 2003.

KAMINSKA, B. MAPK signalling pathways as molecular targets for anti-inflammatory therapy--from molecular mechanisms to therapeutic benefits. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1754, n. 1-2, p. 253-262, 2005.

KIM, Y. J.; KIM, K. P.; HAN, S. K.; MUNOZ, N. M.; ZHU, X.; SANO, H.; LEFF, A. R.; CHO, W. Group V phospholipase A2 induces leukotriene biosynthesis in human neutrophils through the activation of group IVA phospholipase A2. **Journal of biological chemistry**, v. 277, n. 39, p. 36479-36488, 2002.

KRAMER, R. M.; ROBERTS, E. F.; UM, S. L.; BORSCH-HAUBOLD, A. G.; WATSON, S. P.; FISHER, M. J.; JAKUBOWSKI, J. A. p38 mitogen-activated protein kinase phosphorylates cytosolic phospholipase A2 (cPLA2) in thrombin-stimulated platelets. Evidence that proline-directed phosphorylation is not required for mobilization of arachidonic acid by cPLA2. **Journal of biological chemistry**, v. 271, n. 44, p. 27723-27729, 1996.

KUMAR, S.; MCDONNELL, P. C.; GUM, R. J.; HAND, A. T.; LEE, J. C.; YOUNG, P. R. Novel homologues of CSBP/p38 MAP kinase: activation, substrate specificity and sensitivity to inhibition by pyridinyl imidazoles. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 235, n. 3, p. 533-538, 1997.

KUWATA, H.; NAKATANI, Y.; MURAKAMI, M.; KUDO, I. Cytosolic phospholipase A2 is required for cytokine-induced expression of type IIA secretory phospholipase A2 that mediates optimal cyclooxygenase-2-dependent delayed prostaglandin E2 generation in rat 3Y1 fibroblasts. **Journal of biological chemistry**, v. 273, n. 3, p. 1733-1740, 1998.

LAPRISE, P.; CHAILLER, P.; HOUDE, M.; BEAULIEU, J. F.; BOUCHER, M. J.; RIVARD, N. Phosphatidylinositol 3-kinase controls human intestinal epithelial cell differentiation by promoting adherens junction assembly and p38 MAPK activation. **Journal of biological chemistry**, v. 277, n. 10, p. 8226-8234, 2002.

LASA, M.; MAHTANI, K. R.; FINCH, A.; BREWER, G.; SAKLATVALA, J.; CLARK, A. R. Regulation of cyclooxygenase 2 mRNA stability by the mitogen-activated protein kinase p38 signaling cascade. **Molecular and Cellular Biology**, v. 20, n. 12, p. 4265-4274, 2000.

LEAHY, K. M.; ORNBERG, R. L.; WANG, Y.; ZWEIFEL, B. S.; KOKI, A. T.; MASFERRER, J. L. Cyclooxygenase-2 inhibition by celecoxib reduces proliferation and induces apoptosis in angiogenic endothelial cells in vivo. **Cancer research**, v. 62, n. 3, p. 625-631, 2002.

LI, Q.; SUBBULAKSHMI, V.; OLDFIELD, C. M.; AAMIR, R.; WEYMAN, C. M.; WOLFMAN, A.; CATHCART, M. K. PKC{alpha} regulates phosphorylation and enzymatic activity of cPLA2 in vitro and in activated human monocytes. **Cellular Signalling**, v. 19, n. 2, p. 359-366, 2007.

LIEBER, J. G. ; EVANS, R. M. Disruption of the vimentin intermediate filament system during adipose conversion of 3T3-L1 cells inhibits lipid droplet accumulation. **Journal of cell science**, v. 109, n. 13, p. 3047-3058, 1996.

LIN, L. L.; WARTMANN, M.; LIN, A. Y.; KNOPF, J. L.; SETH, A.; DAVIS, R. J. cPLA2 is phosphorylated and activated by MAP kinase. **Cell**, v. 72, n. 2, p. 269-278, 1993.

LIU, P.; YING, Y.; ZHAO, Y.; MUNDY, D. I.; ZHU, M.; ANDERSON, R. G. W. Chinese hamster ovary K2 cell lipid droplets appear to be metabolic organelles involved in membrane traffic. **Journal of biological chemistry**, v. 279, n. 5, p. 3787-3792, 2004.

LONDOS, C.; BRASAEMLE, D. L.; SCHULTZ, C. J.; SEGREST, J. P.; KIMMEL, A. R. Perilipins, ADRP, and other proteins that associate with intracellular neutral lipid droplets in animal cells. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 10, n. 1, p. 51-58, 1999.

LOPEZ-NICOLAS, R.; LOPEZ-ANDREO, M. J.; MARIN-VICENTE, C.; GOMEZ-FERNANDEZ, J. C.; CORBALAN-GARCIA, S. Molecular mechanisms of PKC{alpha} localization and activation by arachidonic acid. The C2 domain also plays a role. **Journal of Molecular Biology**, v. 357, n. 4, p. 1105-1120, 2006.

MADARA, J. L.; TRIER, J. S.; NEUTRA, M. R. Structural changes in the plasma membrane accompanying differentiation of epithelial cells in human and monkey small intestine. **Gastroenterology**, v. 78, n. 5 Pt 1, p. 963-975, 1980.

MARTIN, S.; DRIESSEN, K.; NIXON, S. J.; ZERIAL, M.; PARTON, R. G. Regulated Localization of Rab18 to Lipid Droplets: Effects of lipolytic stimulation and inhibition of lipid droplet catabolism. **Journal of biological chemistry**, v. 280, n. 51, p. 42325-42335, 2005.

MARTIN, S. ; PARTON, R. G. Caveolin, cholesterol, and lipid bodies. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 16, n. 2, p. 163-174, 2005.

MARTIN, S. ; PARTON, R. G. Lipid droplets: a unified view of a dynamic organelle. **Nature reviews.Molecular cell biology**, v. 7, n. 5, p. 373-378, 2006.

MARTIN-VENEGAS, R.; ROIG-PEREZ, S.; FERRER, R.; MORENO, J. J. Arachidonic acid cascade and epithelial barrier function during Caco-2 cell differentiation. **Journal of Lipid Research**, v. 47, n. 7, p. 1416-1423, 2006.

MCCORMACK, S. A.; VIAR, M. J.; JOHNSON, L. R. Migration of IEC-6 cells: a model for mucosal healing. **American journal of physiology.Gastrointestinal and liver physiology**, v. 263, n. 3, p. G426-G435, 1992.

MELO, R.; FABRINO, D.; DIAS, F.; PARREIRA, G. Lipid bodies: Structural markers of inflammatory macrophages in innate immunity. **Inflammation Research**, v. 55, n. 8, p. 342-348, 2006.

MISHRA, R.; EMANCIPATOR, S. N.; MILLER, C.; KERN, T.; SIMONSON, M. S. Adipose differentiation-related protein and regulators of lipid homeostasis identified by gene expression profiling in the murine db/db diabetic kidney. **American journal of physiology.Renal physiology**, v. 286, n. 5, p. F913-F921, 2004.

MITIC, L. L. ; ANDERSON, J. M. Molecular architecture of tight junctions. **Annual review of physiology**, v. 60, n. 1, p. 121-142, 1998.

MONJAZEB, A. M.; HIGH, K. P.; CONNOY, A.; HART, L. S.; KOUMENIS, C.; CHILTON, F. H. Arachidonic acid-induced gene expression in colon cancer cells. **Carcinogenesis**, v. 27, n. 10, p. 1950-1960, 2006.

MORIOKA, Y.; IKEDA, M.; SAIGA, A.; FUJII, N.; ISHIMOTO, Y.; ARITA, H.; HANASAKI, K. Potential role of group X secretory phospholipase A(2) in cyclooxygenase-2-dependent PGE(2) formation during colon tumorigenesis. **FEBS Letters**, v. 487, n. 2, p. 262-266, 2000.

MURAKAMI, K.; CHAN, S. Y.; ROUTTENBERG, A. Protein kinase C activation by cis-fatty acid in the absence of Ca²⁺ and phospholipids. **Journal of biological chemistry**, v. 261, n. 33, p. 15424-15429, 1986.

MURAKAMI, K. ; ROUTTENBERG, A. Direct activation of purified protein kinase C by unsaturated fatty acids (oleate and arachidonate) in the absence of phospholipids and Ca²⁺. **FEBS Letters**, v. 192, n. 2, p. 189-193, 1985.

MURAKAMI, M.; KUWATA, H.; AMAKASU, Y.; SHIMBARA, S.; NAKATANI, Y.; ATSUMI, G.; KUDO, I. Prostaglandin E2 amplifies cytosolic phospholipase A2- and cyclooxygenase-2-dependent delayed prostaglandin E2 generation in mouse osteoblastic cells. Enhancement by secretory phospholipase A2. **Journal of biological chemistry**, v. 272, n. 32, p. 19891-19897, 1997.

MURPHY, D. J. The biogenesis and functions of lipid bodies in animals, plants and microorganisms. **Progress in Lipid Research**, v. 40, n. 5, p. 325-438, 2001.

MURPHY, D. J. ; VANCE, J. Mechanisms of lipid-body formation. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 24, n. 3, p. 109-115, 1999.

MURRAY, N. R.; DAVIDSON, L. A.; CHAPKIN, R. S.; CLAY GUSTAFSON, W.; SCHATTEBERG, D. G.; FIELDS, A. P. Overexpression of protein kinase C {beta}II induces colonic hyperproliferation and increased sensitivity to colon carcinogenesis. **The Journal of Cell Biology**, v. 145, n. 4, p. 699-711, 1999.

MURRAY, N. R. ; FIELDS, A. P. Atypical protein kinase C {iota} protects human leukemia cells against drug-induced apoptosis. **Journal of biological chemistry**, v. 272, n. 44, p. 27521-27524, 1997.

NEMENOFF, R. A.; WINITZ, S.; QIAN, N. X.; VAN PUTTEN, V.; JOHNSON, G. L.; HEASLEY, L. E. Phosphorylation and activation of a high molecular weight form of phospholipase A2 by p42 microtubule-associated protein 2 kinase and protein kinase C. **Journal of biological chemistry**, v. 268, n. 3, p. 1960-1964, 1993.

O'BYRNE, K. J. ; DALGLEISH, A. G. Chronic immune activation and inflammation as the cause of malignancy. **British journal of cancer**, v. 85, n. 4, p. 473-483, 2001.

OLIVEIRA, S. S. ; MORGADO-DIAZ, J. Claudins: multifunctional players in epithelial tight junctions and their role in cancer. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 64, p. 17-28, 2007.

OSHIMA, M.; DINCHUK, J. E.; KARGMAN, S. L.; OSHIMA, H.; HANCOCK, B.; KWONG, E.; TRZASKOS, J. M.; EVANS, J. F.; TAKETO, M. M. Suppression of intestinal polyposis in Apc delta716 knockout mice by inhibition of cyclooxygenase 2 (COX-2). **Cell**, v. 87, n. 5, p. 803-809, 1996.

OSWALD, I. P. Role of intestinal epithelial cells in the innate immune defence of the pig intestine. **Veterinary Research**, v. 37, n. 3, p. 359-368, 2006.

OZEKI, S.; CHENG, J.; TAUCHI-SATO, K.; HATANO, N.; TANIGUCHI, H.; FUJIMOTO, T. Rab18 localizes to lipid droplets and induces their close apposition to the endoplasmic reticulum-derived membrane. **Journal of cell science**, v. 118, n. 12, p. 2601-2611, 2005.

PAINE, E.; PALMANTIER, R.; AKIYAMA, S. K.; OLDEN, K.; ROBERTS, J. D. Arachidonic acid activates mitogen-activated protein (MAP) kinase-activated protein kinase 2 and mediates adhesion of a human breast carcinoma cell line to collagen type IV through a p38 MAP kinase-dependent pathway. **Journal of biological chemistry**, v. 275, n. 15, p. 11284-11290, 2000.

POL, A.; MARTIN, S.; FERNANDEZ, M. A.; FERGUSON, C.; CAROZZI, A.; LUETTERFORST, R.; ENRICH, C.; PARTON, R. G. Dynamic and regulated association of caveolin with lipid bodies: modulation of lipid body motility and function by a dominant negative mutant. **Molecular Biology of the Cell**, v. 15, n. 1, p. 99-110, 2004.

PRESCOTT, S. M. ; FITZPATRICK, F. A. Cyclooxygenase-2 and carcinogenesis. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1470, n. 2, p. M69-M78, 2000.

PRESCOTT, S. M.; ZIMMERMAN, G. A.; STAFFORINI, D. M.; MCINTYRE, T. M. Platelet-activating factor and related lipid mediators. **Annual review of biochemistry**, v. 69, n. 1, p. 419-445, 2000.

QUARONI, A.; WANDS, J.; TRELSTAD, R. L.; ISSELBACHER, K. J. Epithelioid cell cultures from rat small intestine. Characterization by morphologic and immunologic criteria. **The Journal of Cell Biology**, v. 80, n. 2, p. 248-265, 1979.

RASHA, H.; NABARUN, C.; STACY-ANN, M.; EDWARD, W.; MOHSEN, B.; RINA, D.; SHEILA, A. P.; AGNES, A. D.; MARTI, J. Differential effects of omega-3 and omega-6 fatty acids on gene expression in breast cancer cells. **Breast cancer research and treatment**, v. 101, p. 7-16, 2007.

RIDLEY, S. H.; DEAN, J. L. E.; SARFIELD, S. J.; BROOK, M.; CLARK, A. R.; SAKLATVALA, J. A p38 MAP kinase inhibitor regulates stability of interleukin-1-induced cyclooxygenase-2 mRNA. **FEBS Letters**, v. 439, n. 1-2, p. 75-80, 1998.

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

ROBENEK, M. J.; SEVERS, N. J.; SCHLATTMANN, K.; PLENZ, G.; ZIMMER, K. P.; TROYER, D.; ROBENEK, H. Lipids partition caveolin-1 from ER membranes into lipid droplets: updating the model of lipid droplet biogenesis. **The FASEB Journal**, v. 18, n. 7, p. 866-868, 2004.

ROGLER, G.; ASCHENBRENNER, E.; GROSS, V.; STANGE, E. F.; SCHOLMERICH, J. Intracellular transport of high-density lipoprotein 3 in intestinal epithelial cells (Caco-2) is tubulin associated. **Digestion**, v. 61, n. 1, p. 47-58, 2000.

RUTHIG, D. J. ; MECKLING-GILL, K. A. Both (n-3) and (n-6) fatty acids stimulate wound healing in the rat intestinal epithelial cell line, IEC-6. **Journal of Nutrition**, v. 129, n. 10, p. 1791-1798, 1999.

SAKLATVALA, J. The p38 MAP kinase pathway as a therapeutic target in inflammatory disease. **Current opinion in pharmacology**, v. 4, n. 4, p. 372-377, 2004.

SANCHO, E.; BATLLE, E.; CLEVERS, H. Signaling pathways in intestinal development and cancer. **Annual review of cell and developmental biology**, v. 20, n. 1, p. 695-723, 2004.

SATAKE, Y.; DIAZ, B. L.; BALESTRIERI, B.; LAM, B. K.; KANAOKA, Y.; GRUSBY, M. J.; ARM, J. P. Role of group V phospholipase A2 in zymosan-induced eicosanoid generation and vascular permeability revealed by targeted gene disruption. **Journal of biological chemistry**, v. 279, n. 16, p. 16488-16494, 2004.

SCHRADER, M. Tubulo-reticular clusters of peroxisomes in living COS-7 cells: dynamic behavior and association with lipid droplets. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 49, n. 11, p. 1421-1430, 2001.

SHARMA, G. D.; HE, J.; BAZAN, H. E. p38 and ERK1/2 coordinate cellular migration and proliferation in epithelial wound healing: evidence of cross-talk activation between MAP kinase cascades. **Journal of biological chemistry**, v. 278, n. 24, p. 21989-21997, 2003.

SHENG, H.; SHAO, J.; KIRKLAND, S. C.; ISAKSON, P.; COFFEY, R. J.; MORROW, J.; BEAUCHAMP, R. D.; DUBOIS, R. N. Inhibition of human colon cancer cell growth by selective inhibition of cyclooxygenase-2. **The Journal of clinical investigation**, v. 99, n. 9, p. 2254-2259, 1997.

SHENG, H.; SHAO, J.; TOWNSEND, C. M.; EVERS, B. M. Phosphatidylinositol 3-kinase mediates proliferative signals in intestinal epithelial cells. **Gut**, v. 52, n. 10, p. 1472-1478, 2003.

SHENG, H.; SHAO, J.; WASHINGTON, M. K.; DUBOIS, R. N. Prostaglandin E2 increases growth and motility of colorectal carcinoma cells. **Journal of biological chemistry**, v. 276, n. 21, p. 18075-18081, 2001.

SHENG, H.; WILLIAMS, C. S.; SHAO, J.; LIANG, P.; DUBOIS, R. N.; BEAUCHAMP, R. D. Induction of cyclooxygenase-2 by activated Ha-ras oncogene in Rat-1 fibroblasts and the role of mitogen-activated protein kinase pathway. **Journal of biological chemistry**, v. 273, n. 34, p. 22120-22127, 1998.

SIX, D. A. ; DENNIS, E. A. The expanding superfamily of phospholipase A(2) enzymes: classification and characterization. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1488, n. 1-2, p. 1-19, 2000.

SLATER, S. J.; HO, C.; KELLY, M. B.; LARKIN, J. D.; TADDEO, F. J.; YEAGER, M. D.; STUBBS, C. D. Protein kinase C {alpha} contains two activator binding sites that bind phorbol esters and diacylglycerols with opposite affinities. **Journal of biological chemistry**, v. 271, n. 9, p. 4627-4631, 1996.

SMITH, C. J.; ZHANG, Y.; KOBOLDT, C. M.; MUHAMMAD, J.; ZWEIFEL, B. S.; SHAFFER, A.; TALLEY, J. J.; MASFERRER, J. L.; SEIBERT, K.; ISAKSON, P. C. Pharmacological analysis of cyclooxygenase-1 in inflammation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 22, p. 13313-13318, 1998.

SNOECK, V.; GODDEERIS, B.; COX, E. The role of enterocytes in the intestinal barrier function and antigen uptake. **Microbes and Infection**, v. 7, n. 7-8, p. 997-1004, 2005.

SYRBU, S. I.; WATERMAN, W. H.; MOLSKI, T. F.; NAGARKATTI, D.; HAJJAR, J. J.; SHA'AFI, R. I. Phosphorylation of cytosolic phospholipase A2 and the release of arachidonic acid in human neutrophils. **The Journal of Immunology**, v. 162, n. 4, p. 2334-2340, 1999.

TABEL, G.; HOA, N. T.; TARNAWSKI, A.; CHEN, J.; DOMEK, M.; MA, T. Y. Helicobacter pylori infection inhibits healing of the wounded duodenal epithelium in vitro. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 142, n. 6, p. 421-430, 2003.

TAKAKU, K.; SONOSHITA, M.; SASAKI, N.; UOZUMI, N.; DOI, Y.; SHIMIZU, T.; TAKETO, M. M. Suppression of intestinal polyposis in Apc(delta 716) knockout mice by an additional mutation in the cytosolic phospholipase A(2) gene. **Journal of biological chemistry**, v. 275, n. 44, p. 34013-34016, 2000.

TAKEDA, H.; SONOSHITA, M.; OSHIMA, H.; SUGIHARA, K. i.; CHULADA, P. C.; LANGENBACH, R.; OSHIMA, M.; TAKETO, M. M. Cooperation of cyclooxygenase 1 and cyclooxygenase 2 in intestinal polyposis. **Cancer research**, v. 63, n. 16, p. 4872-4877, 2003.

TANG, Q. Q.; OTTO, T. C.; LANE, M. D. Mitotic clonal expansion: A synchronous process required for adipogenesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 1, p. 44-49, 2003.

TARNAWSKI, A. Cellular and molecular mechanisms of gastrointestinal ulcer healing. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 50, n. 0, p. S24-S33, 2005.

TAUCHI-SATO, K.; OZEKI, S.; HOUJOU, T.; TAGUCHI, R.; FUJIMOTO, T. The surface of lipid droplets is a phospholipid monolayer with a unique fatty acid composition. **Journal of biological chemistry**, v. 277, n. 46, p. 44507-44512, 2002.

TERANO, A.; SAKATA-HORIE, K.; SHIMADA, T.; HIRAISHI, H.; YOSHIURA, K.; YONEDA, M.; TAKAHASHI, M.; FUJIMORI, T. The role of cellular migration in the repair process of gastric epithelial cells. **Life Sciences**, v. 69, n. 25-26, p. 3083-3089, 2001.

THUN, M. J.; NAMBOODIRI, M. M.; CALLE, E. E.; FLANDERS, W. D.; HEATH, C. W., Jr. Aspirin use and risk of fatal cancer. **Cancer research**, v. 53, n. 6, p. 1322-1327, 1993.

THUN, M. J.; NAMBOODIRI, M. M.; HEATH, C. W. Aspirin use and reduced risk of fatal colon cancer. **The New England Journal of Medicine**, v. 325, n. 23, p. 1593-1596, 1991.

TJOELKER, L. W. ; STAFFORINI, D. M. Platelet-activating factor acetylhydrolases in health and disease. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1488, n. 1-2, p. 102-123, 2000.

TSUJII, M. ; DUBOIS, R. N. Alterations in cellular adhesion and apoptosis in epithelial cells overexpressing prostaglandin endoperoxide synthase 2. **Cell**, v. 83, n. 3, p. 493-501, 1995.

TSUJII, M.; KAWANO, S.; DUBOIS, R. N. Cyclooxygenase-2 expression in human colon cancer cells increases metastatic potential. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 94, n. 7, p. 3336-3340, 1997.

TSUJII, M.; KAWANO, S.; TSUJI, S.; SAWAOKA, H.; HORI, M.; DUBOIS, R. N. Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells. **Cell**, v. 93, n. 5, p. 705-716, 1998.

UEMATSU, S.; MATSUMOTO, M.; TAKEDA, K.; AKIRA, S. Lipopolysaccharide-dependent prostaglandin E2 production is regulated by the glutathione-dependent prostaglandin E2 synthase gene Induced by the Toll-Like Receptor 4/MyD88/NF-IL6 pathway. **The Journal of Immunology**, v. 168, n. 11, p. 5811-5816, 2002.

UOZUMI, N.; KUME, K.; NAGASE, T.; NAKATANI, N.; ISHII, S.; TASHIRO, F.; KOMAGATA, Y.; MAKI, K.; IKUTA, K.; OUCHI, Y.; MIYAZAKI, J.; SHIMIZU, T. Role of cytosolic phospholipase A2 in allergic response and parturition. **Nature**, v. 390, n. 6660, p. 618-622, 1997.

VANE, J. R. ; BOTTING, R. M. Mechanism of action of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. **The American journal of medicine**, v. 104, n. 3A, p. 2S-8S, 1998.

WALLACE, J. L. ; DEVCHAND, P. R. Emerging roles for cyclooxygenase-2 in gastrointestinal mucosal defense. **British journal of pharmacology**, v. 145, n. 3, p. 275-282, 2005.

WALLACE, J. L. ; MA, L. Inflammatory mediators in gastrointestinal defense and injury. **Experimental Biology and Medicine**, v. 226, n. 11, p. 1003-1015, 2001.

WANG, Q.; WANG, X.; HERNANDEZ, A.; KIM, S.; EVERS, B. M. Inhibition of the phosphatidylinositol 3-kinase pathway contributes to HT29 and Caco-2 intestinal cell differentiation. **Gastroenterology**, v. 120, p. 1381-1392, 2001.

WANG, S. M.; FONG, T. H.; HSU, S. Y.; CHIEN, C. L.; WU, J. C. Reorganization of a novel vimentin-associated protein in 3T3-L1 cells during adipose conversion. **Journal of cellular biochemistry**, v. 67, n. 1, p. 84-91, 1997.

WELLER, P. F. ; DVORAK, A. M. Lipid bodies: intracellular sites for eicosanoid formation. **The Journal of allergy and clinical immunology**, v. 94, n. 6 Pt 2, p. 1151-1156, 1994.

WELLER, P. F.; MONAHAN-EARLEY, R. A.; DVORAK, H. F.; DVORAK, A. M. Cytoplasmic lipid bodies of human eosinophils. Subcellular isolation and analysis of arachidonate incorporation. **The American journal of pathology**, v. 138, n. 1, p. 141-148, 1991a.

WELLER, P. F.; RYEOM, S. W.; PICARD, S. T.; ACKERMAN, S. J.; DVORAK, A. M. Cytoplasmic lipid bodies of neutrophils: formation induced by cis- unsaturated fatty acids and mediated by protein kinase C. **The Journal of Cell Biology**, v. 113, n. 1, p. 137-146, 1991b.

WELTE, M. A.; GROSS, S. P.; POSTNER, M.; BLOCK, S. M.; WIESCHAUS, E. F. Developmental regulation of vesicle transport in drosophila embryos: forces and kinetics. **Cell**, v. 92, n. 4, p. 547-557, 1998.

WINSTEAD, M. V.; BALSINDE, J.; DENNIS, E. A. Calcium-independent phospholipase A(2): structure and function. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1488, n. 1-2, p. 28-39, 2000.

XING, M. ; INSEL, P. A. Protein kinase C-dependent activation of cytosolic phospholipase A2 and mitogen-activated protein kinase by alpha1-adrenergic receptors in madin-darby canine kidney cells. **The Journal of clinical investigation**, v. 97, n. 5, p. 1302-1310, 1996.

YAO, M.; TABUCHI, H.; NAGASHIMA, Y.; BABA, M.; NAKAIGAWA, N.; ISHIGURO, H.; HAMADA, K.; INAYAMA, Y.; KISHIDA, T.; HATTORI, K.; YAMADA-OKABE, H.; KUBOTA, Y. Gene expression analysis of renal carcinoma: adipose differentiation-related protein as a potential diagnostic and prognostic biomarker for clear-cell renal carcinoma. **The Journal of pathology**, v. 205, n. 3, p. 377-387, 2005.

YEDGAR, S.; COHEN, Y.; SHOSEYOV, D. Control of phospholipase A2 activities for the treatment of inflammatory conditions. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1761, n. 11, p. 1373-1382, 2006.

YU, W.; BOZZA, P. T.; TZIZIK, D. M.; GRAY, J. P.; CASSARA, J.; DVORAK, A. M.; WELLER, P. F. Co-compartmentalization of MAP kinases and cytosolic phospholipase A2 at cytoplasmic arachidonate-rich lipid bodies. **The American journal of pathology**, v. 152, n. 3, p. 759-769, 1998.

YU, W.; MURRAY, N. R.; WEEMS, C.; CHEN, L.; GUO, H.; ETHRIDGE, R.; CECI, J. D.; EVERS, B. M.; THOMPSON, E. A.; FIELDS, A. P. Role of cyclooxygenase 2 in protein kinase C {beta}II-mediated colon carcinogenesis. **Journal of biological chemistry**, v. 278, n. 13, p. 11167-11174, 2003.

YU, W.; CASSARA, J.; WELLER, P. F. Phosphatidylinositide 3-kinase localizes to cytoplasmic lipid bodies in human polymorphonuclear leukocytes and other myeloid-derived cells. **Blood**, v. 95, n. 3, p. 1078-1085, 2000.