

CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DO FATOR INDUTOR DE CORPOS
LIPÍDICOS EM MACRÓFAGOS MURINOS PRESENTE NO SORO DE
CAMUNDONGO

THIAGO TORRES DE AGUIAR

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE – UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RIO DE JANEIRO

JUNHO DE 2014

CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DO FATOR INDUTOR DE CORPOS LIPÍDICOS EM
MACRÓFAGOS MURINOS PRESENTE NO SORO DE CAMUNDONGO

THIAGO TORRES DE AGUIAR

“Dissertação apresentada ao Centro de
Biotecnologia e Biotecnologia da Universidade
Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro,
como requisito parcial das exigências para a
obtenção do título de Mestre em Biologia
Celular”

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE - UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RIO DE JANEIRO

JUNHO DE 2014

CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DO FATOR INDUTOR DE CORPOS LIPÍDICOS EM
MACRÓFAGOS MURINOS PRESENTE NO SORO DE CAMUNDONGO

THIAGO TORRES DE AGUIAR

“Dissertação apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como requisito parcial das exigências para a obtenção do título de Mestre em Biologia Celular”

Aprovada em 02 de junho de 2014.

Comissão Examinadora:

Prof^a. Georgia Correa Atella (Dr^a. em Química Biológica)

Prof^a. Olga Lima Tavares Machado (Dr^a. em Bioquímica)

Prof^a. Maria Raquel Garcia Vega (Dr^a. em Química)

Prof. Renato Augusto DaMatta (Dr. em Ciência) – UENF
(Orientador)

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Biologia Celular e Tecidual, no Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro sob a orientação do Professor Doutor Renato Augusto DaMatta.

Apoio financeiro:

- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq);
- Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ);
- Fundação de Coordenação de Pessoal de Nível Superior (CAPES);
- Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF).

Agradecimentos

Gostaria de agradecer ao meu orientador Renato Augusto DaMatta, pela orientação, paciência e por possibilitar a minha continuação no projeto que vem sendo desenvolvido desde a minha graduação. Também agradeço à Laura Azeredo Miranda Mota, que continuou sendo minha co-orientadora, assim como foi na minha graduação.

Agradeço aos colegas de laboratório (Fernanda Silva, Gabriel Rabello, Júlia Resende, João Cláudio, Juliana Azevedo, Juliana Padrão, Luciana Rangel, Natália Almeida) pelo companheirismo.

Agradeço aos técnicos do LBCT, Adriana Alves, Darli Grativol, Rosemary Cardoso, Giovana Alves, Beatriz Ferreira e Arthur Rodrigues por possibilitarem a realização deste trabalho.

Agradeço à Prof^a. Olga Machado e ao Prof. Elias Alves, da UENF, pelos conselhos dados na defesa de projeto deste trabalho.

Agradeço à Prof^a. Georgia Atella, da UFRJ, que nos ajudou a aprender os protocolos de deslipidação e cromatografia de camada fina.

Agradeço à Prof^a. Patrícia Bozza, da Fiocruz, que gentilmente nos cedeu o C75 utilizado neste trabalho.

Agradeço à Prof^a. Raquel Garcia, da UENF, que nos ajudou a realizar os experimentos de cromatografia de camada fina na UENF e deu conselhos valiosos para a realização deste trabalho.

Agradeço aos meus pais, Alencar e Fátima, por me darem suporte para realização do meu Mestrado.

Agradeço a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para este trabalho e que não foram citados.

Muito obrigado a todos!

SUMÁRIO

Resumo	VIII
Abstract	IX
Lista de abreviaturas e siglas	X
Lista de figuras	XI
1 - INTRODUÇÃO	1
2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	2
2.1 - Macrófagos	2
2.2 - Corpos lipídicos	3
2.2.1 - Características	3
2.2.2 - Funções e biogênese	5
2.2.3 - Doenças e patogêneses envolvendo corpos lipídicos	7
2.2.4 - Indução de corpos lipídicos	9
3 - OBJETIVOS	12
4 - MATERIAIS E MÉTODOS	13
4.1 - Macrófagos	13
4.2 - Obtenção de soro de camundongo	13
4.3 - Ultracentrifugação	13
4.4 - Aquecimento do soro	14
4.5 - Deslipidação do soro	14
4.6 - Teste de viabilidade celular com deidrogenase láctica	14
4.7 - Extração total de lipídios	15
4.8 - Cromatografia em camada delgada	15
4.9 - Eluição dos lipídios da placa de CCD	15
4.10 - Marcação de corpos lipídicos - microscopia de fluorescência	16
4.11 - Marcação de corpos lipídicos - microscopia óptica de campo claro	17
4.12 - Quantificação de corpos lipídicos	17
4.13 - Apresentação dos resultados e análise estatística	17
5 - RESULTADOS	18
5.1 - Tratamento do soro de camundongo	18
5.2 - Cromatografia em camada delgada	26
6 - DISCUSSÃO	32
7 - CONCLUSÃO	36
8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37

Resumo

Corpos lipídicos (CL) são organelas arredondadas, altamente dinâmicas e envolvidas por uma monocamada de fosfolipídios. Desempenham funções em diferentes processos celulares. Uma de suas características marcantes é o fato de serem organelas de biogênese induzível. Leucócitos em repouso, diferentemente de adipócitos, possuem poucos CL. Macrófagos peritoneais de camundongo quando cultivados com soro de camundongo (SC) por 24 h apresentam grandes quantidades de CL. Neste trabalho foram avaliados procedimentos para tentar desvendar a natureza química do fator indutor de CL. Os procedimentos foram os seguintes: SC foi ultracentrifugado, aquecido, submetido a ciclos de congelamento e descongelamento, deslipidado e submetido a cromatografia em camada delgada (CCD). A ultracentrifugação do soro foi ineficiente; todas as 3 frações obtidas geraram CL de forma similar ao SC não centrifugado. SC aquecido a altas temperaturas perde capacidade de induzir CL progressivamente. O congelamento e descongelamento do soro não alterou a capacidade de geração de CL. A deslipidação do SC revelou que a porção lipídica do soro induziu CL, enquanto a porção proteica não induziu. O cultivo de macrófagos murinos com SC juntamente com C75, inibidor da enzima ácido graxo sintase, resultou em menor quantidade de CL gerado, indicando que o metabolismo de lipídios é importante na geração de CL induzida por SC. CCD foi realizada com soro fetal bovino (SFB), que não induz a geração de CL, e SC. SC possui maior variedade de classes lipídicas e maiores quantidades de lipídios. Os lipídios separados na CCD dos dois soros foram recuperados e testados no cultivo de macrófagos peritoneais murinos. Apesar de ter havido diferença nas contagens dos macrófagos cultivados com os lipídios obtidos do CCD de ambos os soros e SFB, a indução de CL foi insignificante. Os resultados obtidos sugerem que o fator indutor de CL presente no SC possui natureza lipídica.

Palavras-chave: corpos lipídicos, soro de camundongo, macrófagos.

Abstract

Lipid droplets (LD) are round and highly dynamic organelles that are surrounded by a monolayer of phospholipids. They play roles in different cellular processes. One of LD key characteristics is that they are organelles that have inducible biogenesis. Resting leukocytes, unlike adipocytes, have few quantities of LD. Mice peritoneal macrophages, when cultured with mice serum (MS) for 24 hours, exhibit plenty of LD. Here we evaluated procedures to unravel the chemical nature of the molecule that induces LD formation. Procedures were: MS was ultracentrifuged, heated, submitted to freeze-thaw cycles, delipidated and submitted to thin layer chromatography (TLC). Ultracentrifugation was inefficient; all 3 fractions obtained induced LD similarly to non-centrifuged MS. MS heated at high temperatures progressively lost LD induction capacity. MS submitted to freeze-thaw cycles did not alter LD induction capacity. MS delipidation revealed that the lipids portion induced LD, and the proteins portion did not. The culture of murine macrophages with MS and C75, inhibitor of fatty acid synthase, resulted in less LD generated, which indicated that lipids metabolism is important in LD biogenesis induced by MS. TLC was performed with fetal bovine serum (FBS), which does not induce LD biogenesis, and MS. MS has bigger variety of lipids classes and bigger quantities of lipids. Lipids separated by TLC from both serums were recovered and tested in the culture of murine peritoneal macrophages. Despite the fact that there were differences between macrophages cultured with lipids separated through TLC and those cultured with FBS, induction of LD was insignificant. Results obtained suggest that the molecule, present in MS, that induces LD biogenesis in murine macrophages, is a lipid.

Keywords: lipid droplets, mice serum, macrophages.

Lista de abreviatura e siglas

Ác: ácido;

CCD: cromatografia em camada delgada (*thin layer chromatography*);

CEUA: Comissão de Ética de Uso Animal;

CHO: colesterol;

CHOe: colesterol esterificado;

CL: corpo(s) lipídico(s);

cPLA₂: fosfolipase A2 citosólica;

DAG: diacilglicerol;

DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (Meio Eagle modificado por Dulbecco);

EDTA: *ethylenediamine tetraacetic acid* (ácido etilenodiamino tetra-acético);

LPS: lipopolissacarídeo;

MG: monoacilglicerol;

ND: lipídio não-determinado;

PBS: *phosphate buffered saline* (tampão fosfato-salino);

PGD₂: prostaglandina D₂;

PGE₂: prostaglandina E₂;

PL: fosfolipídio;

RE: retículo endoplasmático;

SC: soro de camundongo;

SFB: soro fetal bovino;

TG: triacilglicerol;

TIP47: *tail-interacting protein of 47 kDa*;

Lista de figuras e tabelas

- Figura 1.** Os macrófagos, que são encontrados nos tecidos, se originam a partir de células-tronco na medula óssea de animais vertebrados.....(3)
- Figura 2.** Macrófagos peritoneais murinos cultivados por 24 h em DMEM suplementado com soro de camundongo.....(4)
- Figura 3.** Tubo após ultracentrifugação do soro de camundongo.....(19)
- Figura 4.** Avaliação de corpos lipídicos por categoria de macrófagos após cultivo com soro de camundongo (SC) ou com as frações obtidas do SC após ultracentrifugação (Frações 1, 2 e 3).....(19)
- Figura 5.** Macrófagos peritoneais murinos cultivados com soro de camundongo submetido a aquecimento.....(20)
- Figura 6.** Avaliação de corpos lipídicos por categoria de macrófagos após cultivo com soro de camundongo (SC) aquecido em banho-maria a 70, 80, 90 ou 100°C.....(21)
- Figura 7.** Avaliação de corpos lipídicos por categoria de macrófagos após cultivo com soro de camundongo (SC) congelado e descongelado repetidamente por 2, 4, 6 ou 8 vezes.....(22)
- Figura 8.** Deslipidação do soro fetal bovino (esquerda) e soro de camundongo (direita).....(23)
- Figura 9.** Avaliação de corpos lipídicos por categoria de macrófagos após cultivo com soro fetal bovino (SFB), soro de camundongo (SC) ou porções proteica (Ptn) ou lipídica (Lip) do SC separadas por deslipidação.....(23)
- Figura 10.** Macrófagos peritoneais murinos cultivados com soro de camundongo (SC) 2% puro ou com a adição de 0,5 µL/mL, 1 µL/mL ou 5 µL/mL de C75, inibidor de ácido graxo sintase.....(24)
- Figura 11.** Avaliação de corpos lipídicos por categoria de macrófagos após cultivo com soro de camundongo (SC) 2% puro ou com 0,5 µg/mL, 1 µg/mL ou 5 µg/mL de C75, inibidor de ácido graxo sintase.....(25)
- Figura 12.** Teste de viabilidade dos macrófagos peritoneais murinos cultivados com soro de camundongo (SC) 2% puro ou com C75 (0,5 µg/mL, 1 µg/mL ou 5 µg/mL).....(26)
- Figura 13.** Placas de cromatografia em camada delgada feitas em momentos distintos.....(27)

- Figura 14.** Densitometria da placa de cromatografia em camada delgada dos soros fetal bovino e de camundongo.....(28)
- Figura 15.** Cromatografia em camada delgada do soro fetal bovino (SFB) e soro de camundongo (SC).....(29)
- Figura 16.** Avaliação de corpos lipídicos por categoria de macrófagos após cultivo com soro fetal bovino (SFB), soro de camundongo (SC) ou lipídios de SFB separados por cromatografia em camada delgada.....(30)
- Figura 17.** Avaliação de corpos lipídicos por categoria de macrófagos após cultivo com soro fetal bovino (SFB), soro de camundongo (SC) ou lipídios de SC separados por cromatografia em camada delgada.....(31)
- Tabela 1.** Exemplos de estímulos (coluna da esquerda) desencadeados por moléculas e compostos que induzem a formação de corpos lipídicos em diferentes tipos de leucócitos (coluna da direita).....(10)

1 - INTRODUÇÃO

Corpos lipídicos (CL) são organelas ubíquas envolvidas por uma monocamada de fosfolipídios (Bozza *et al.*, 2009), que geralmente se apresentam em formato arredondado (Tauchi-Sato *et al.*, 2002; Suzuki *et al.*, 2011). CL possuem cerca de 25 nm quando recém formados (Ohsaki *et al.*, 2014), e podem atingir 100 µm de diâmetro em adipócitos (Suzuki *et al.*, 2011). São organelas altamente dinâmicas que desempenham papéis em diferentes funções. CL são locais de armazenamento, síntese e disponibilização de lipídios (Pol *et al.*, 2014), participam do metabolismo de proteínas (Farese *et al.*, 2009), são locais de síntese de eicosanóides, e possuem outras diversas funções (Bozza *et al.*, 2009).

Uma das características marcantes de CL é o fato de serem organelas de biogênese induzível. A adição de diferentes compostos ao meio de cultura de leucócitos levam à formação de novos CL, já que leucócitos em estado de repouso possuem poucos CL no citoplasma. Dentre estes compostos estão triacilgliceróis (Zweytick *et al.*, 2000; Farese *et al.*, 2009; Walther e Farese Jr., 2009; Beller *et al.*, 2010), lipopolissacarídeo (LPS) (Pacheco *et al.*, 2002), ácido oleico (Suzuki *et al.*, 2011), dentre outras moléculas. Em algumas espécies de alga, a indução de CL com o uso de brefeldina A é interessante para a produção de biodiesel (Kim *et al.*, 2013). Nosso grupo observou, adicionalmente, que macrófagos peritoneais de camundongo quando cultivados com soro de camundongo (SC) por 24 h apresentam grandes quantidades de CL (Lobato *et al.*, 2003; Monteiro, 2005; Mota, 2009; Aguiar, 2012; Mota *et al.*, 2014). A partir deste princípio o presente trabalho foi realizado.

SC foi submetido a diferentes tratamentos para tentar desvendar a natureza química do fator indutor de CL. SC foi ultracentrifugado, aquecido, submetido a ciclos de congelamento e descongelamento, deslipidado e submetido a cromatografia em camada delgada (CCD) para análise lipídica. Posteriormente, SC submetido aos diferentes procedimentos foi utilizado no cultivo de macrófagos peritoneais murinos. Adicionalmente, foi testado o cultivo de macrófagos com SC e C75, inibidor da enzima ácido graxo sintase (Kim *et al.*, 2004).

2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 - Macrófagos

Macrófagos são células diferenciadas encontradas em tecidos que se originam de monócitos circulantes na corrente sanguínea, que por sua vez, são derivados de monoblastos e promonócitos na medula óssea (Figura 1). Macrófagos são responsáveis pela ingestão de células danificadas, em morte programada, e materiais inorgânicos, defesa contra microrganismos e síntese de compostos biológicos, como prostaglandinas e proteínas do sistema complemento (Cline, 1978), sendo responsáveis por combater infecções e manter a homeostase tecidual (Davies *et al.*, 2013). Macrófagos estão presentes na maioria dos tecidos (Davies *et al.*, 2013).

O acúmulo de lipídios em macrófagos e células musculares leva ao surgimento de células espumosas (*foam cells*). Em pacientes portadores de lepra, causada por *Mycobacterium leprae*, estas células espumosas se agregam, formando estruturas similares a tumores que desfiguram o portador deste patógeno (Elamin *et al.*, 2012). As células espumosas também são responsáveis pela formação de placas ateroscleróticas na parede de artérias (Martin e Parton, 2005), o que prejudica o fluxo sanguíneo. Este processo se inicia a partir do acúmulo de lipoproteínas nas artérias. Uma resposta inflamatória é iniciada, e macrófagos fagocitam estas moléculas, tornando-se células espumosas. Estas células perdem sua capacidade de migração, secretam moléculas pro-inflamatórias e proteases que degradam a matriz extracelular adjacente continuamente no local, e eventualmente sofrem necrose. Estes fatores contribuem para a persistência da placa aterosclerótica e possível infarto do tecido (Moore *et al.*, 2013).

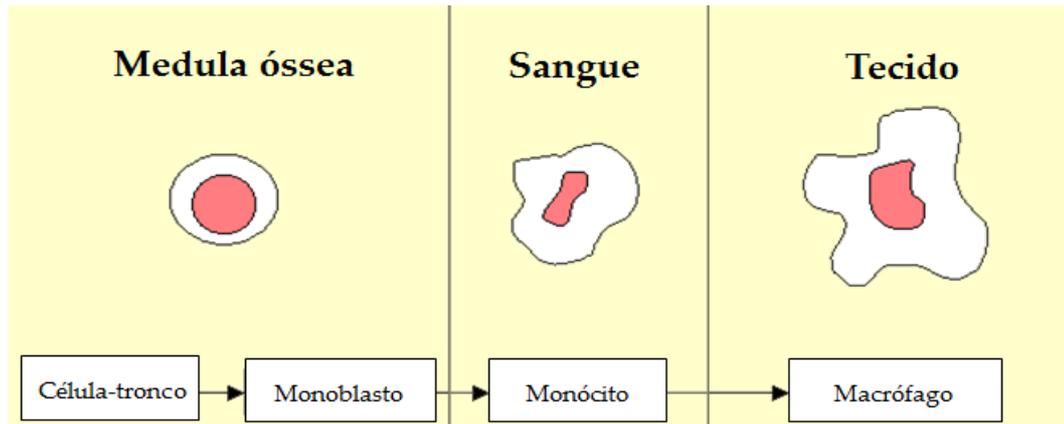


Figura 1. Os macrófagos, que são encontrados nos tecidos, se originam a partir de células-tronco na medula óssea de animais vertebrados. Ao migrarem para o sangue, os monoblastos se diferenciam em monócitos, que se diferenciam em macrófagos ao realizarem diapedese. Adaptado de <<http://web.mit.edu>>.

2.2 - Corpos lipídicos

2.2.1 - Características

CL são organelas ricas em lipídios (Bozza *et al.*, 2009), que geralmente se apresentam em formato arredondado (Tauchi-Sato *et al.*, 2002; Suzuki *et al.*, 2011) (Figura 2). CL estão presentes em diversos tipos celulares, como células de animais, vegetais, bactérias e leveduras (Murphy, 2001; Waltermann *et al.*, 2005; Bozza *et al.*, 2007). Células do epitélio da glândula mamária (durante o período de gravidez e lactação), adipócitos e células hepáticas produzem mais CL do que outros tipos celulares (Arisqueta *et al.*, 2013). Diferentemente de outras organelas, CL são envolvidos por uma monocamada de fosfolipídios (Bozza *et al.*, 2009). Esta monocamada possui sua porção hidrofílica virada para o citoplasma e uma cadeia hidrofóbica interagindo com o interior do CL (Murphy e Vance, 1999; Brown, 2001). Em adipócitos, o repertório de proteínas de membrana também varia de acordo com a posição do CL no citosol (Ducharme e Bickel, 2008). O interior dos CL apresenta algumas membranas e porções amorfas (Robenek *et al.*, 2005; Wan *et al.*, 2007; Bozza *et al.*, 2009; Singh *et al.*, 2009). As primeiras observações sobre CL surgiram no final do século XIX, quando foram primeiramente descritas como “gotículas de lipídios” (Altman, 1890; Wilson, 1896; revisto em Farese *et al.*, 2009). Dentre os lipídios presentes no interior de CL, destacam-se triacilgliceróis (Walther e Farese

Jr., 2009; Beller *et al.*, 2010; Ohsaki *et al.*, 2014; Wilfling *et al.*, 2014), ésteres de colesterol (Zweytick *et al.*, 2000; Farese *et al.*, 2009), colesterol livre (Tauchi-Sato *et al.*, 2002) e, em alguns tipos celulares, diacilgliceróis (Walther e Farese Jr., 2009), que são precursores da síntese de triacilgliceróis e um dos produtos de sua quebra (Ohsaki *et al.*, 2014).

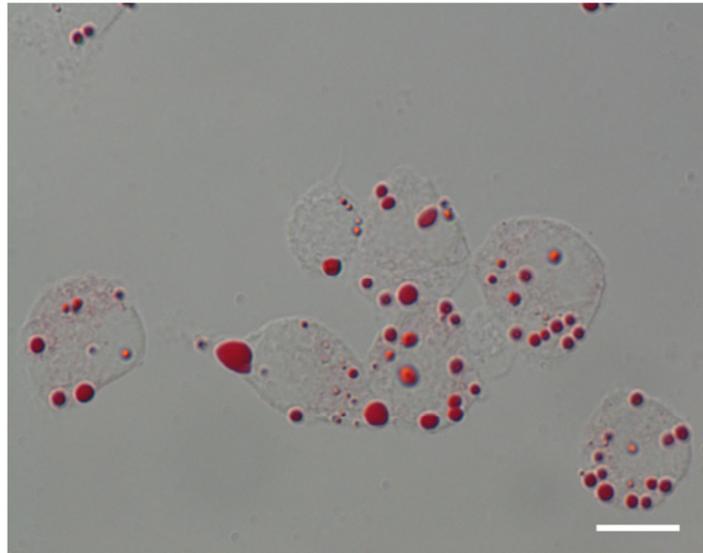


Figura 2. Macrófagos peritoneais murinos cultivados por 24 h em DMEM suplementado com soro de camundongo. Os corpos lipídicos estão marcados de vermelho com Oil Red. Micrografia feita pelo próprio autor. Barra = 10 μm .

Em células adiposas, CL podem exceder 100 μm de diâmetro e, portanto, ocupam grande parte do volume celular. Em outros tipos celulares, CL raramente excedem 10 μm de diâmetro (Suzuki *et al.*, 2011). CL recém formados possuem diâmetro menor, por volta de 25 nm (Ohsaki *et al.*, 2014), crescendo através da fusão de vários CL ou síntese e incorporação de triacilgliceróis na membrana da organela (Wilfling *et al.*, 2014). Em adipócitos, CL se localizam logo abaixo da superfície da membrana plasmática (Suzuki *et al.*, 2011), enquanto em macrófagos envolvidos em respostas inflamatórias, CL se localizam próximos aos fagossomos (D'Avila *et al.*, 2006; Peyron *et al.*, 2008). Em algas, CL estão presentes tanto no citoplasma como no interior de cloroplastos (Liu *et al.*, 2013). CL em adipócitos possuem pouca motilidade, pois se associam aos filamentos intermediários. Em células não adiposas CL possuem maior motilidade, o que reflete sua associação com microtúbulos (Suzuki *et al.*, 2011).

A membrana dos CL possui variado repertório de proteínas de membrana, que variam de acordo com o tamanho dos CL e podem variar dentro de uma mesma célula (Wilfling *et al.*, 2014). As principais proteínas encontradas na superfície de CL são as da família PAT (perilipina, adipofilina e TIP47), que foram recentemente renomeadas família das perilipinas (Saka e Valdivia, 2012), e caveolina-1 (Robenek *et al.*, 2004). Estas proteínas também estão presentes no interior dos CL, que é essencialmente rico em lipídios neutros, apesar de adipofilina e TIP47 serem proteínas altamente polares. As proteínas da família perilipina e caveolina-1 desempenham função na montagem dos CL (Bozza *et al.*, 2009). Robenek *et al.* (2005) observaram conglomerados de proteínas da família perilipina em porções da face interna da membrana plasmática celular. Quando as células foram induzidas a acumular CL, estas organelas se organizavam nestes locais. Em CL de algas, as proteínas da família perilipina estão ausentes (Liu *et al.*, 2013).

2.2.2 - Funções e biogênese

CL são locais de armazenamento, síntese e disponibilização de lipídios (Pol *et al.*, 2014), mas também são organelas altamente ativas e dinâmicas com diversas funções. Quando a taxa de energia consumida pelo organismo é maior do que a energia utilizada, a sobra é estocada em CL sob a forma de triacilgliceróis (Ducharme e Bickel, 2008). Em situações opostas, quando a necessidade de energia é alta, CL são rapidamente consumidos (Saka e Valdivia, 2012). Em adipócitos, lipídios são estocados como triacilgliceróis e disponibilizados como ácidos graxos e gliceróis para o organismo ao serem lançados na corrente sanguínea (Ducharme e Bickel, 2008). Em outros tipos celulares, CL estocam energia para a própria célula (Suzuki *et al.*, 2011). CL podem se mover em direção a mitocôndrias e se associar a elas física e funcionalmente (Pu *et al.*, 2011). Além do mais, CL se associam a peroxissomos, o que facilita a quebra dos lipídios para disponibilização para a célula (Liu *et al.*, 2013).

CL são locais de síntese de eicosanóides (prostaglandinas), que são lipídios envolvidos em sinalização celular, particularmente em condições inflamatórias. Isso demonstra que CL são importantes durante condições patológicas (Bozza *et al.*, 2009). O conteúdo diversificado, a grande dinâmica e a associação de CL com outras organelas evidenciam que estas organelas possuem funções em sinalização

e ativação celular, regulação do metabolismo de lipídios, tráfego de membranas e controle da síntese e secreção de mediadores inflamatórios (Bozza *et al.*, 2009). CL também provêm proteção contra efeitos tóxicos decorrentes da internalização exacerbada de lipídios realizada por macrófagos (Farese *et al.*, 2009; Suzuki *et al.*, 2011), o que é evidenciado pelo crescimento dos CL já existentes em situações onde há o excesso de lipídios (Saka e Valdivia, 2012). CL também atuam no armazenamento de fosfolipídios e esteróis necessários para a síntese de membranas biológicas, hormônios e sais biliares (Pol *et al.*, 2014) e metabolismo de proteínas (Farese *et al.*, 2009). Foi descrito que CL também atuam no processo de degradação de proteínas (Wilfling *et al.*, 2014). O triacilglicerol de CL de plantas e microrganismos podem ser utilizados como fonte de biocombustível. A produção de triacilglicerol em algas verdes pode ser 100 vezes maior do que a planta que mais acumula lipídios, a soja (Liu *et al.*, 2013).

Não existe um consenso unânime sobre o modelo definitivo de formação de CL. Entretanto, em todos os modelos existe a transferência de proteínas e lipídios do retículo endoplasmático (RE), em locais onde acontece a síntese de lipídios neutros (Wilfling *et al.*, 2014), para o CL nascente. Bozza *et al.* (2009) revisaram 2 modelos e propuseram um terceiro. No primeiro modelo, ocorre o acúmulo de lipídios entre os dois folhetos do RE; em determinado momento o CL nascente é liberado e fica envolvido por uma monomembrana derivada do RE. No segundo modelo a formação de CL ocorre ao longo do RE em porções onde existe o acúmulo de adipofilinas. Entretanto, Wilfling *et al.* (2014) afirmam que não existe certeza de que o processo de formação dos CL é mediado por proteínas. O terceiro modelo propõe que o CL nascente incorpora porções membranares derivadas do RE, o que é reafirmado pela presença de proteínas integrais de membrana funcionais no interior dessas organelas. Guo *et al.* (2009) também revisaram 3 modelos. Em todos os modelos o CL se forma no RE, em locais onde ocorre o acúmulo de lipídios. O CL nascente brota e incorpora uma porção da membrana do RE. A diferença entre os modelos é a origem da monocamada derivada do RE, que pode ser da porção citosólica da membrana que envolve o RE ou da porção oposta, que está virada para o interior do RE. Pol *et al.* (2014) e Wilfling *et al.* (2014) descreveram um modelo similar aos anteriores, no qual ocorre acúmulo de lipídios entre a bicamada que circunda o RE. O acúmulo de lipídios cria uma protuberância na monocada que está virada para o citosol da célula. Esta protuberância pode permanecer ligada ao RE ou se soltar,

dando origem a um novo CL. Em procariotos, CL são derivados da membrana plasmática (Walther e Farese Jr., 2009). Entretanto, em bactérias os CL se formam no citoplasma, e a origem da monocamada lipídica que envolve essa organela é desconhecida (Stehr *et al.*, 2012). Em leveduras, a fissão de CL existentes também foi descrito como mecanismo de formação de novos CL (Pol *et al.*, 2014).

Quando CL incorporam mais lipídios, seu tamanho aumenta e, por consequência, o tamanho de sua membrana também aumenta. A síntese de novos fosfolipídios de membrana ocorre a partir de enzimas derivadas do RE, que estão presentes na superfície dos CL, mas também necessita de processos que ocorrem em mitocôndrias e em peroxissomos (Pol *et al.*, 2014).

2.2.3 - Doenças e patogêneses envolvendo corpos lipídicos

A recente pandemia de obesidade é um dos fatores que motivou a intensificação de estudos sobre CL (Ohsaki *et al.*, 2014). O adenovírus humano 36, que pode estar relacionado a casos de obesidade, diminui a oxidação de ácidos graxos e induz a expressão de proteínas que levam a lipogênese e acúmulo de CL em culturas de células musculares humanas (Saka e Valdivia, 2012). Recentemente tem sido investigado a possibilidade da utilização de compostos naturais obtidos de plantas como forma de evitar o acúmulo de CL devido ao desbalanço energético do organismo, pois o excesso de energia consumido pelo organismo é estocado sob a forma de triacilgliceróis em CL de adipócitos (Wong e Kaneda, 2014).

Algumas bactérias podem usar lipídios provenientes de CL como fonte de energia para sua proliferação e desenvolvimento (Elamin *et al.*, 2012), e alguns vírus usam lipídios provenientes de CL para montar novas partículas virais (Suzuki *et al.*, 2011). Alguns rotavírus se associam a CL para sua replicação. A inibição da formação de CL afeta negativamente este processo (Saka e Valdivia, 2012). *Chlamydia pneumoniae*, uma bactéria patógena do sistema respiratório, infecta macrófagos e está ligada a formação de células espumosas. Tanto a bactéria viva como morta com luz ultravioleta induzem a formação de CL nos macrófagos (Saka e Valdivia, 2012). Alguns patógenos são capazes de induzir a formação de CL na célula infectada para utilizar os lipídios como fonte de energia. Neste caso, os CL surgem simultaneamente na célula hospedeira e no patógeno intracelular (Stehr *et al.*, 2012). A bactéria *Mycobacterium tuberculosis*, causadora de tuberculose, se

aloja no interior de macrófagos alveolares. Ela permanece no interior de fagossomos. A bactéria é capaz de induzir a agregação de CL ao redor do fagossomo, o que a torna mais resistente ao sistema imune do hospedeiro. Ademais, estes CL são internalizados para o interior do fagossomo e utilizados como fonte de energia por *M. tuberculosis* (Stehr *et al.*, 2012). *Chlamydia trachomatis*, que infecta células epiteliais, é capaz de translocar CL da célula hospedeira para dentro do patógeno, num processo similar a endocitose (Saka e Valdivia, 2012).

Eicosanóides são moléculas sinalizadoras que se originam de ácidos graxos poliinsaturados de 20 carbonos. Têm meia-vida curta (segundos a poucos minutos) mas podem induzir drásticas mudanças patológicas e fisiológicas. Um dos precursores dos eicosanóides é o ácido araquidônico, que está presente em grande volume em CL de leucócitos e células epiteliais. cPLA₂, presente na monomembrana de CL, é uma enzima que medeia a liberação de ácido araquidônico (Saka e Valdivia, 2012). A indução da biogênese de CL em macrófagos durante infecções, e como consequência a maior capacidade de produção de prostaglandina E₂ (PGE₂) (Mota, 2009; Mota *et al.*, 2014), podem contribuir para o sucesso do estabelecimento de patógenos. PGE₂ inibe respostas do tipo Th1 e a produção de óxido nítrico, facilitando o sucesso do patógeno (Renz *et al.*, 1988; Betz e Fox, 1991). A produção de óxido nítrico é menor em macrófagos com grandes quantidades de CL, o que diminui a capacidade microbicida destas células contra *Toxoplasma gondii* (Mota, 2009; Mota *et al.*, 2014). *Toxoplasma gondii* também induz e se associa a CL em células musculares, através do vacúolo parasitóforo onde ele se aloja, para utilizá-los como fonte de obtenção de lipídios (Gomes *et al.*, 2014). Infecções e condições inflamatórias acarretam mudanças nos níveis de ácidos graxos e triglicerídeos circulantes e nos níveis de HDL no plasma sanguíneo (Arisqueta *et al.*, 2013), o que pode ser consequência da atuação de CL nestas condições.

A inibição do acúmulo de lipídios em células espumosas pode ser utilizada em terapias contra aterosclerose (Li e Glass, 2002). Ademais, a inibição do acúmulo de CL pode ser interessante em terapias antiinflamatórias, como forma de combate a reações alérgicas do pulmão (Bozza *et al.*, 2009) e pode ser útil como alvo para terapia contra câncer, pois foi observado o aumento na quantidade de CL por célula cancerosa em relação a células normais e estabelecido que esse aumento é benéfico para as células cancerosas (Accioly *et al.*, 2008; Bozza e Viola, 2010).

2.2.4 - Indução de corpos lipídicos

Por serem organelas de biogênese induzível (Bozza *et al.*, 2009), alguns compostos são utilizados para induzir a biogênese de CL em diferentes linhagens celulares (Tabela 1). Entre os compostos utilizados para iniciar este processo estão triacilgliceróis (Zweytick *et al.*, 2000; Farese *et al.*, 2009; Walther e Farese Jr., 2009; Beller *et al.*, 2010), ácidos graxos insaturados (Weller *et al.*, 1991; Bozza *et al.*, 1996; Pu *et al.*, 2011), citocinas (Melo *et al.*, 2013), quimiocinas e hormônios (Bozza *et al.*, 2009), PGD₂ (Mesquita-Santos *et al.*, 2006), LPS (Pacheco *et al.*, 2002), lipoproteína acetilada de baixa densidade, ácido oleico (Suzuki *et al.*, 2011) e ácido oleico conjugado com albumina de soro fetal bovino (SFB) (Brasaemle *et al.*, 2000; Robenek *et al.*, 2004). O cultivo de *Saccharomyces cerevisiae* em meio de cultura suplementado com oleato induz a biogênese de CL e surgimento de novos peroxissomos, pois nesta levedura os peroxissomos são os únicos locais da célula onde ocorre a β -oxidação de ácidos graxos (Grillitsch *et al.*, 2011). Kim *et al.* (2013) demonstraram a indução do acúmulo de CL em algas (*Chlamydomonas reinhardtii* e *Chlorella vulgaris*) com brefeldina A, um composto que bloqueia o transporte de proteínas recém sintetizadas no RE para o aparato de Golgi, causando estresse no RE e consequente acúmulo de CL em algas. O acúmulo de CL em algas é interessante para a produção de biodiesel (Kim *et al.*, 2013). O veneno de *Bothrops asper*, causador de processo inflamatório, também induz a gênese de CL em macrófagos de camundongo (Giannotti *et al.*, 2013). O estresse celular pode levar à formação de CL, o que reflete a participação de CL na degradação de proteínas e processos imunes (Pol *et al.*, 2014). Leucócitos em repouso apresentam baixas quantidades de CL. Estímulos, como a adição de compostos previamente citados em meio de cultura ou *in vivo*, podem desencadear a gênese de novos CL em neutrófilos, eosinófilos, monócitos/macrófagos, células epiteliais e endoteliais e células relacionadas a processos inflamatórios (Bozza *et al.*, 2009).

Tabela 1. Exemplos de estímulos (coluna da esquerda) desencadeados por moléculas e compostos que induzem a formação de corpos lipídicos em diferentes tipos de leucócitos (coluna da direita). Adaptado de Bozza *et al.*, 2009.

Estímulo	Tipo celular
Ácidos graxos	
Ácidos graxos insaturados	Neutrófilos, eosinófilos, monócitos/macrófagos
Lipoproteínas	
Ac-LDL, E-LDL, AGE-LDL, Ox-LDL.	Macrófagos
Moléculas derivadas de patógeno	
LPS/LAM	Macrófagos, neutrófilos
Mediadores Lipídicos	
PAF, não lisoPAF	Neutrófilos, eosinófilos, macrófagos
5-HETE	Neutrófilos
PGD ₂	Eosinófilos
Hormônios	
Leptina, resistina	Macrófagos
Citocinas/fatores de crescimento	
IL-5, GM-CSF, IL-16	Eosinófilos
Quimiocinas	
CCL5, CCL11, CCL24, CCL26	Eosinófilos
CCL2	Macrófagos

Diferentes estímulos induzem a formação de CL com diferentes lipídios internalizados. O cultivo de *S. cerevisiae* em meio de cultura suplementado com glicose resulta em CL com quantidades similares de triacilglicerol e éster de esteroide, enquanto leveduras cultivadas em ácido oleico possuem CL com maiores quantidades de triacilglicerol (Grillitsch *et al.*, 2011).

Na literatura já foram relatados efeitos do cultivo de macrófagos de origem murina com soro proveniente de camundongos. Crocker *et al.* (1988) observaram que soro de camundongo (SC) aumenta a expressão de hemaglutinina em macrófagos murinos *in vitro*. Nosso grupo também relatou que a maior expressão de sialoadesina em macrófagos murinos, após cultivo com SC, facilita a invasão destas células por *Trypanosoma cruzi* (Monteiro *et al.*, 2005). Lobato *et al.* (2003), Monteiro (2005), Mota (2009), Aguiar (2012) e Mota *et al.* (2014) observaram que macrófagos peritoneais de camundongo apresentam elevado número de CL quando cultivados com SC, principalmente comparados com aqueles cultivados com SFB. Entretanto, não foi elucidada a natureza do fator, ou fatores, presente no SC, que induz a biogênese de CL. Também já foi relatado que o cultivo de macrófagos murinos J774-

A1 com soro de coelhos hiperlipidêmicos Watanabe, rico em colesterol, induziu a formação de CL (Mori *et al.*, 2001).

Nosso grupo elaborou duas hipóteses para a geração de CL no cultivo de macrófagos peritoneais murinos com SC. A primeira está relacionada à diferença da constituição lipídica do SC quando comparado ao SFB. A segunda hipótese leva em conta que o transporte de lipídios nos organismos é realizado através de proteínas carreadoras (Mahley *et al.*, 1984), e que o melhor reconhecimento destas proteínas pelos receptores presentes nos macrófagos murinos, devido à homologia de linhagens entre as células e o SC, facilitaria a internalização de lipídios, o que aumentaria a taxa de geração de CL. Crocker *et al.* (1988) propuseram que o efeito de SC em células cultivadas *in vitro* poderia estar relacionado ao aumento de concentração de compostos do soro em relação ao organismo vivo.

O soro, em culturas de células animais, contém fatores de crescimento, fatores de adesão, minerais, lipídios em quantidades menores, como o ácido linoleico e o ácido oleico, que está relacionado à biogênese de CL (Suzuki *et al.*, 2011), geralmente associados a proteínas, hormônios, vitaminas e proteínas, como a albumina (Freshney, 2005). Para tentar desvendar a natureza química do fator indutor de CL presente no SC, primeiramente tentamos determinar se este fator possui natureza proteica ou lipídica. Inicialmente submetemos SC a diferentes tratamentos - ultracentrifugação, aquecimento, deslipidação e CCD - e, em seguida, o testamos no cultivo de macrófagos murinos. Também fizemos o cultivo de macrófagos peritoneais de camundongo com SC e C75, bloqueador da atividade da enzima ácido graxo sintase (Kim *et al.*, 2004), primeiramente sintetizado por Loftus *et al.* (2000). Os resultados obtidos até agora nos indicam uma provável natureza lipídica do fator indutor de CL presente no SC.

3 - OBJETIVOS

Objetivo geral:

Caracterizar a natureza química do fator presente no SC responsável pela indução de CL em macrófagos peritoneais de camundongo.

Objetivos específicos:

- Submeter SC a diferentes tratamentos e, em seguida, testá-lo no cultivo de macrófagos peritoneais de camundongo;
- Testar indução de CL com frações proteica e lipídica do SC;
- Determinar e comparar a composição lipídica do SFB e do SC;
- Testar indução de CL com lipídios do SFB e SC purificados através de CCD.

4 - MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 - Macrófagos

Macrófagos foram obtidos do lavado peritoneal de camundongos Suíços adultos, obtidos do biotério da UENF e mantidos sob ciclos de dia/noite de 12 h e temperatura controlados com acesso a ração e água *ad libitum*, utilizando-se 10 mL de solução de Hank's por animal. O lavado foi depositado em tubo cônico de 50 mL e centrifugado (500 g, 10 min, 4°C). O sobrenadante foi descartado, o sedimento ressuspensão em 4 mL de DMEM (Sigma-Aldrich D1152) e 150 µL foi colocado sobre lamínulas redondas em placa de 24 poços. Após 1 h de adesão, as células foram lavadas com solução de Hank's e cultivadas em DMEM contendo 2 ou 10% de SFB, SC puro, tratado ou com a adição de C75, ou porções lipídica e/ou proteica do SC por 24 h a 37°C em estufa, sob atmosfera de 5% de CO₂. Após este período o número de CL foi quantificado (item 4.12) (Mota, 2009). O uso de camundongos neste trabalho foi aprovado pela CEUA - UENF em junho de 2010, protocolo 87.

4.2 - Obtenção de soro de camundongo

SC foi obtido a partir da coleta de sangue de camundongos Suíços adultos, mantidos com acesso a ração e água *ad libitum*, por punção cardíaca utilizando-se seringa de 3 mL e agulha de 26 G. O sangue foi deixado coagular na seringa por 6 h a 25°C. O soro foi coletado com uma pipeta *Pasteur*, transferido para tubos cônicos, formando um único *pool*, centrifugado (600 g, 10 min, temperatura ambiente), inativado (30 min, 56°C), para neutralização de proteínas do complemento, aliquoteado (200 µL) e estocado em freezer a -20°C.

4.3 - Ultracentrifugação

Um mL de SC foi ultracentrifugado a 100.000 g por 1 h a 4°C. Três frações de soro foram obtidas, coletadas, aliquoteadas e testadas, separadamente ou juntas, na indução de CL através do cultivo de macrófagos peritoneais de camundongo.

4.4 - Aquecimento do soro

Alíquotas de 200 μ L de SC foram submetidas a temperaturas de 70, 80, 90 ou 100°C por 5 min em banho-maria. Os soros tratados com diferentes temperaturas foram testados separadamente no cultivo de macrófagos peritoneais de camundongo.

4.5 - Deslipidação do soro

Para cada 5 mL de SC foram adicionados 10 mL de solução éter diisopropílico:n-butanol (60:40 v/v) (VETEC) e 10 μ L de EDTA (50 mg/mL) em tubo cônico de 15 mL. A solução foi misturada por 30 min em aparelho orbital (Arsec HOM030). Em seguida foi centrifugada (2 min, 800 g, temperatura ambiente). As duas porções resultantes (proteica e lipídica) foram coletadas com pipeta *Pasteur* e alíquotadas em *ependorfs* para secagem de solventes com o uso de arraste de nitrogênio. As porções secas foram ressuspensas em SFB no mesmo volume inicial da amostra de soro e testadas separadamente (porção lipídica ou proteica) ou conjuntamente (porção lipídica e proteica) no cultivo de macrófagos peritoneais de camundongo (Cham e Knowles, 1976).

4.6 - Teste de viabilidade celular com deidrogenase láctica

Foram coletados 50 μ L do meio de cultura utilizado no cultivo de macrófagos de camundongo com SC e C75 e colocados em placa de 96 poços. Para o controle negativo foi adicionado agente detergente, Triton 10%, ao poço com as células durante 3 h após o cultivo. Em seguida a placa de 96 poços foi envolvida com papel alumínio e congelada. Paralelamente, foram preparadas soluções A (alumínio férrico e substrato) e B (NAD e água destilada) com as substâncias contidas no kit de dosagem de deidrogenase láctica da marca Doles, de acordo com instruções do fabricante. Sob o abrigo da luz, foram adicionados 100 μ L de solução A e em seguida a placa foi incubada em estufa a 37°C por 3 min. Posteriormente, 100 μ L de solução B foram adicionados aos poços e a placa foi incubada em estufa a 37°C por 5 min. Em seguida a placa foi lida em 492 nm em leitor de microplacas VersaMax (Molecular Devices). Um gráfico com o resultado das leituras foi feito.

4.7 - Extração total de lipídios

As amostras (400 µL de SFB ou SC) foram colocadas em tubos de vidro de fundo cônico e foram adicionados 0,5 mL de clorofórmio e 1 mL de metanol. A solução foi misturada com o uso de aparelho vórtex de 5 em 5 min durante 1 h. Em seguida a solução foi centrifugada (1000 g, 30 min, 25°C) e o sobrenadante coletado. O sedimento da solução sofreu uma segunda extração, com a mesma solução. O sobrenadante foi coletado e misturado ao sobrenadante da primeira extração. Foram adicionados 0,5 mL de clorofórmio e 0,5 mL de água aos sobrenadantes coletados. A solução foi misturada com o uso de aparelho vórtex e centrifugada (1000 g, 30 min, 25°C). O sedimento resultante (fase orgânica) foi coletado e colocado em novo tubo (Bligh e Dyer, 1959).

4.8 - Cromatografia em camada delgada

Uma placa de sílica para CCD foi marcada para inserção das amostras de SFB, SC e dos padrões. As amostras sofreram extração de lipídios (item 4.7), foram secas por arraste de nitrogênio e ressuspensas em 50 µL de clorofórmio. Os seguintes padrões foram utilizados: monoacilglicerol, diacilglicerol, triacilglicerol, colesterol, colesterol esterificado e fosfolípido.

Após aplicação das amostras e padrões, a placa foi eluída em béquer, parcialmente embebida, em posição vertical, com 60 mL de hexano, 40 mL de éter etílico e 1 mL de ácido acético. A seguir a placa de CCD foi deixada para secar em temperatura ambiente. Após secagem a placa foi borrifada com agente revelador (10% CuSO₄, 8% H₃PO₄ em água destilada), e foi deixada novamente para secar em temperatura ambiente. Em seguida foi colocada sob uma placa aquecedora a cerca de 200°C por 5 min. A análise densitométrica foi realizada com o programa TotalLab, utilizando-se a imagem obtida da placa de sílica após revelação e escaneamento.

4.9 - Eluição dos lipídios da placa de CCD

Em uma placa de sílica para CCD foram inseridas amostras dos lipídios extraídos do SFB ou SC, ressuspensas em clorofórmio. Foram aplicados no início da

placa 10 μL de lipídios extraídos (item 4.7) que foram reveladas com agente revelador. O restante da amostra (390 μL SFB; 240 μL SC) foi aplicada uniformemente em linha reta em outra porção da placa de sílica. Após serem parcialmente eluídas em solução com 60 mL de hexano, 40 mL de éter etílico e 1 mL de ácido acético (v:v:v), parte da placa foi borrifada com agente revelador e aquecida para revelação da posição dos lipídios. A outra porção da placa foi parcialmente raspada com uma espátula, de acordo com a posição dos lipídios revelados (Figura 15). O pó obtido foi colocado em um filtro de papel, posicionado sobre um pote de vidro limpo, e clorofórmio foi aplicado sobre a amostra. A amostra foi deixada secar, e após esse processo pequena quantidade de clorofórmio foi aplicada. Para confirmação da separação dos lipídios, uma nova placa de CCD foi feita, com as amostras sendo aplicadas em diferentes locais da placa. Após confirmação da separação dos lipídios, as amostras foram transferidas para tubos cônicos. O clorofórmio foi eliminado com o uso de arraste de nitrogênio. As amostras foram ressuspensas em SFB com o mesmo volume inicial de soro utilizado para a extração de lipídios. Cada amostra lipídica foi reconstituída separadamente em meio de cultura DMEM. Este meio de cultura foi filtrado em membrana de poro 0,22 μm e utilizado no cultivo de macrófagos peritoneais de camundongo.

4.10 - Marcação de corpos lipídicos - microscopia de fluorescência

Macrófagos cultivados por 24 h em SFB, SC ou suas diferentes porções ou SC tratado foram fixados por 15 min com 4% de formaldeído recém preparado em PBS, lavados em PBS por 2 vezes, incubados por 15 min com o corante Vermelho de Nilo a 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, e lavados novamente em PBS. A seguir, as lamínulas foram montadas com 10 μL de ProLong Gold (Invitrogen P36931) e seladas com esmalte, sendo imediatamente observadas em microscópio de fluorescência Axioplan Zeiss equipado com contraste interferencial de Nomarski, lâmpada HBO 100 e câmera digital AxioCam Mrc5 gerenciada pelo programa Axiovision (Greenspan *et al.*, 1985). Todo o processo de manipulação do marcador fluorescente foi feito ao abrigo de luz.

4.11 - Marcação de corpos lipídicos - microscopia óptica de campo claro

Macrófagos cultivados por 24 h em SFB, SC ou suas diferentes porções ou SC tratado foram fixados por 15 min com 4% de formaldeído recém preparado em PBS. As células foram lavadas com PBS e foi adicionado propilenoglicol 100% nas lamínulas por 7 min. O propilenoglicol foi retirado e foi adicionado Oil Red 5%, preparado com propilenoglicol. Após 15 min o Oil Red foi retirado e foi adicionado propilenoglicol 80% dissolvido em água destilada por 3 min. Posteriormente o propilenoglicol 80% foi removido, e as lamínulas foram lavadas com PBS, retiradas dos poços da placa de cultura e vertidas em lâminas com ProLong Gold.

4.12 - Quantificação de corpos lipídicos

Para a quantificação de CL os macrófagos foram classificados em categorias que variaram de acordo com a quantidade de CL que cada um possuía. Estas categorias compreenderam macrófagos sem CL, com 1 até 3, com 4 até 6, com 7 até 9 ou com 10 ou mais CL. Em cada lamínula 100 células foram contabilizadas e distribuídas nas categorias de acordo com a quantidade de CL observados; pelo menos 3 lamínulas em cada experimento foram quantificadas para obtenção de média e desvio padrão.

4.13 - Apresentação dos resultados e análise estatística

Os resultados foram representados graficamente utilizando-se o GraphPad Prism 5. Os gráficos utilizados foram do tipo ordenada e abscissa. No eixo das abscissas estão as diferentes categorias de macrófagos baseadas no número de CL presentes; no eixo das ordenadas está a quantidade de células referente a cada categoria. Os gráficos foram testados estatisticamente com o uso do programa GraphPad Prism 5 pelo teste de Anova com $P < 0,05$.

5 - RESULTADOS

Para tentar desvendar a natureza química da molécula presente no SC que induz a formação de CL nos macrófagos peritoneais murinos, SC foi submetido a diferentes tratamentos (item 5.1). A ultracentrifugação do soro teve como intuito separá-lo em frações, que foram testadas separadamente no cultivo das células. O aquecimento do soro teve como objetivo desnaturar proteínas. O mesmo foi testado com ciclos de congelamento e descongelamento. SC foi deslipidado para separá-lo em porções proteica e lipídica, que foram testadas separadamente no cultivo dos macrófagos. O cultivo simultâneo dos macrófagos com SC e C75 teve como objetivo testar a importância do metabolismo de lipídios na indução de CL feita pelo SC. Adicionalmente, foram feitos CCD com o intuito de comparar o perfil lipídico do SC e do SFB, que não induz a formação de CL (item 5.2). Posteriormente, novas CCD foram realizadas objetivando-se o cultivo dos macrófagos com os lipídios purificados.

5.1 - Tratamento do soro de camundongo

A ultracentrifugação do SC gerou três frações (Figura 3). A fração F1 aparentou ter grande conteúdo lipídico, e a fração F3 apresentou um precipitado que acreditamos conter proteínas do soro (Figura 3), possivelmente desnaturadas. A fração F2 é uma fração intermediária. Todas as frações induziram de forma equivalente a biogênese de CL (Figura 4). A indução de CL nos macrófagos cultivados com as três frações do soro juntas foi similar ao resultado obtido com SC não centrifugado (Figura 4).

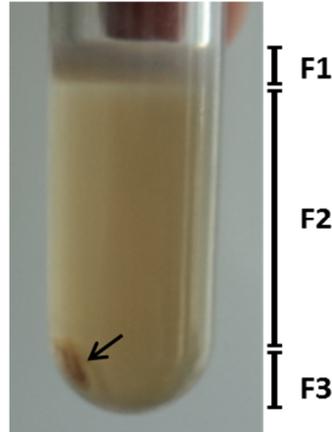


Figura 3. Tubo após ultracentrifugação do soro de camundongo. O soro foi separado em três frações: F1, caracterizada pelo conteúdo lipídico, F2, fração intermediária, e F3, com possível precipitado de proteínas (seta). As frações foram utilizadas no cultivo de macrófagos peritoneais murinos, juntas ou separadas.

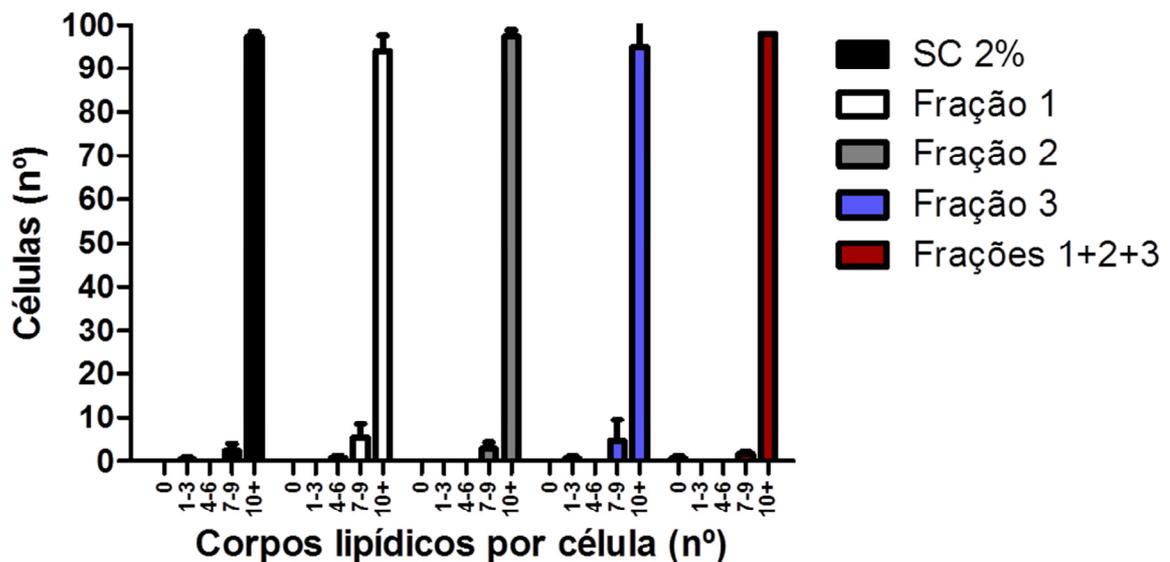


Figura 4. Avaliação de corpos lipídicos por categoria de macrófagos após cultivo com soro de camundongo (SC) ou com as frações obtidas do SC após ultracentrifugação (Frações 1, 2 e 3). Todas as frações geraram corpos lipídicos (CL). Experimento representativo de duas repetições feitas em triplicata.

SC foi aquecido em banho-maria durante 5 min sob diferentes temperaturas. Foi possível perceber gradual diminuição do número de CL com o aumento progressivo da temperatura (Figura 5). Essa redução na capacidade de gerar CL foi confirmada após quantificação (Figura 6). Comparado ao controle (SC 2% não

aquecido) o soro aquecido a partir de 70°C perde capacidade de indução de CL. Em 80 e 90°C ocorre queda na indução de CL comparado ao SC aquecido a 70°C, porém a geração de CL dos macrófagos cultivados com SC aquecido a 80 e 90°C é equivalente, gerando pouco CL. SC aquecido a 100°C não gera CL.

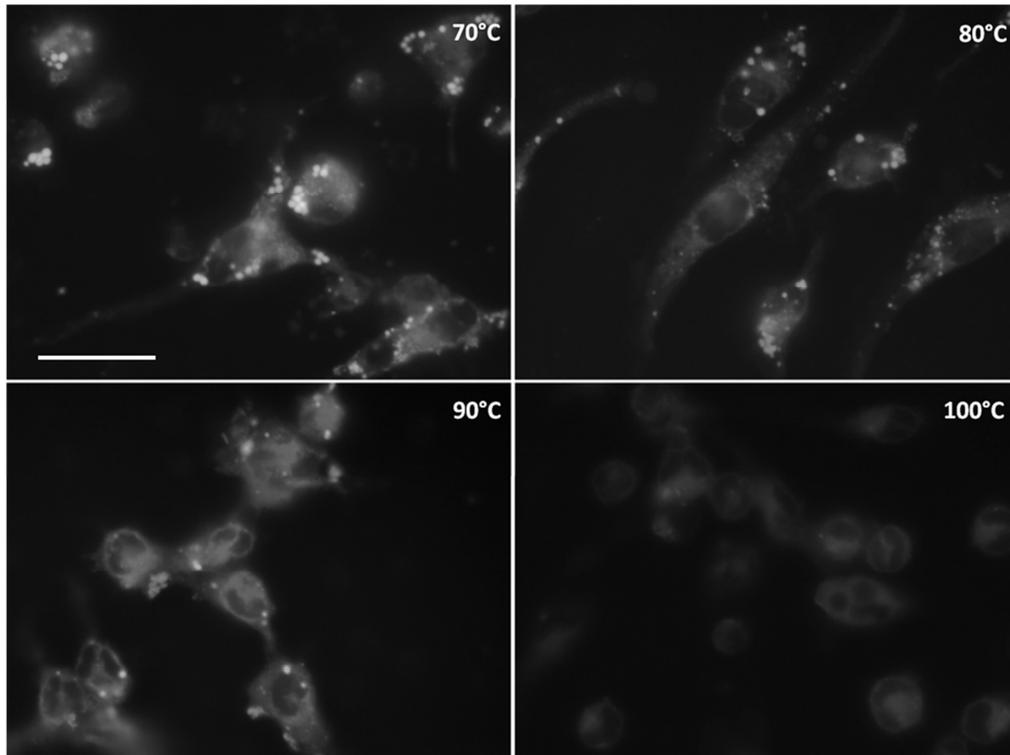


Figura 5. Macrófagos peritoneais murinos cultivados com soro de camundongo submetido a aquecimento. A geração de corpos lipídicos diminuiu com o aumento gradativo da temperatura (referenciadas no canto direito superior). As amostras foram marcadas com vermelho de Nilo, marcador fluorescente de corpos lipídicos. Barra = 10 μ m.

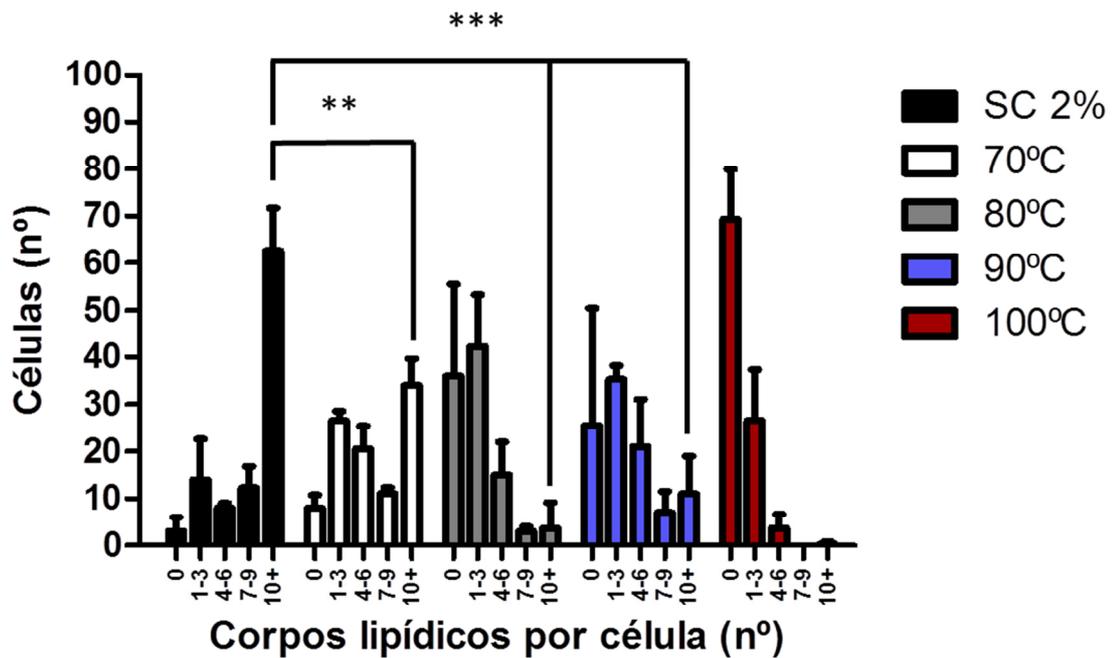


Figura 6. Avaliação de corpos lipídicos por categoria de macrófagos após cultivo com soro de camundongo (SC) aquecido em banho-maria a 70, 80, 90 ou 100°C. O aumento gradual da temperatura diminuiu o poder de indução de corpos lipídicos do soro. Soro aquecido a 100°C não induziu corpos lipídicos (CL) nos macrófagos. Experimento representativo de duas repetições feitas em triplicata. *** Diferença significativa com $P < 0,001$; ** $P < 0,01$.

Ciclos de congelamento e descongelamento do SC foram feitos com o intuito de entender melhor a natureza química do composto indutor de CL presente no soro. Após estes ciclos, o soro foi utilizado em cultura de macrófagos murinos. SC congelado e descongelado manteve a capacidade de geração de CL inalterada (Figura 7).

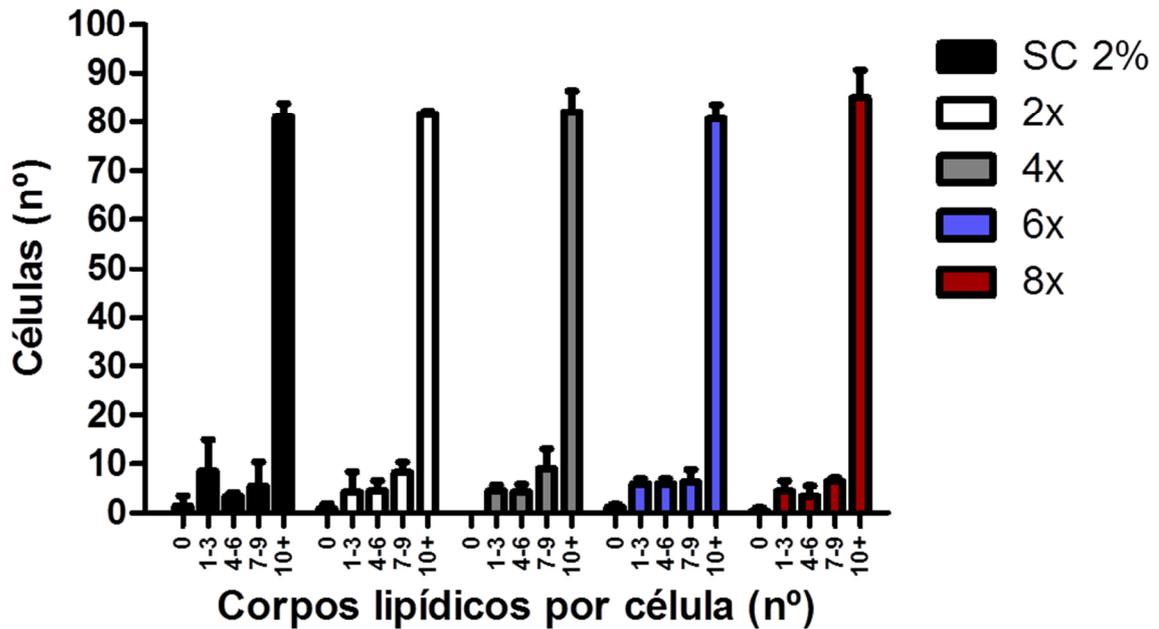


Figura 7. Avaliação de corpos lipídicos por categoria de macrófagos após cultivo com soro de camundongo (SC) congelado e descongelado repetidamente por 2, 4, 6 ou 8 vezes. A capacidade de indução de corpos lipídicos (CL) do soro permaneceu inalterada. Experimento representativo de duas repetições feitas em triplicata.

SFB e SC foram submetidos à deslipidação. Porções lipídicas e proteicas dos dois soros foram obtidas, sendo a porção lipídica do SC maior do que a do SFB (Figura 8). As porções lipídica e proteica do SC foram testadas no cultivo de macrófagos peritoneais de camundongo. A fração lipídica gerou CL, enquanto a fração proteica não induziu CL. Entretanto, a porção lipídica induziu menos CL do que o SC. O agrupamento das porções lipídica e proteica do SC não retornou a capacidade de geração de CL (Figura 9).



Figura 8. Deslipidação do soro fetal bovino (esquerda) e soro de camundongo (direita). A porção lipídica do soro de camundongo (seta vermelha) é substancialmente maior do que a do soro fetal bovino (seta branca).

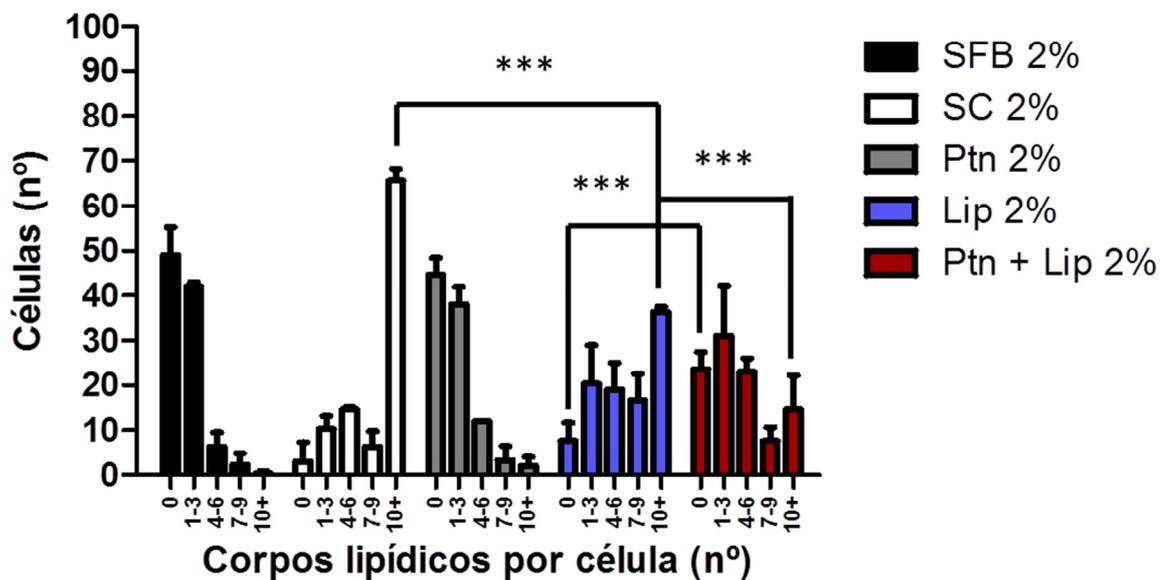


Figura 9. Avaliação de corpos lipídicos por categoria de macrófagos após cultivo com soro fetal bovino (SFB), soro de camundongo (SC) ou porções proteica (Ptn) ou lipídica (Lip) do SC separadas por deslipidação. A porção proteica não induziu geração de corpos lipídicos, enquanto a porção lipídica induziu. Entretanto, a porção lipídica induziu menos corpos lipídicos do que SC. Experimento representativo de duas repetições feitas em triplicata. *** Diferença significativa com $P < 0,001$.

C75, inibidor da enzima ácido graxo sintase, foi adicionado no meio de cultura para verificar se haveria alterações na indução de CL do SC. Foi possível perceber

gradual diminuição do número de CL com o aumento progressivo da concentração de C75 no meio de cultura (Figura 10). A adição de 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de C75 ao meio de cultura não reduziu a capacidade de geração de CL do SC. Porém, com 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ houve decréscimo na quantidade de CL induzidos. Com 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de C75 no meio houve acentuada diminuição na indução de CL (Figura 11).

A viabilidade celular foi avaliada nos macrófagos cultivados com C75 para testar se a diminuição da quantidade de CL estava relacionada a morte dos macrófagos (Figura 12). Foi possível confirmar que a adição do C75 ao meio de cultura não induziu a morte das células, e que, portanto, a diminuição da geração de CL foi devido a inibição da enzima ácido graxo sintase.

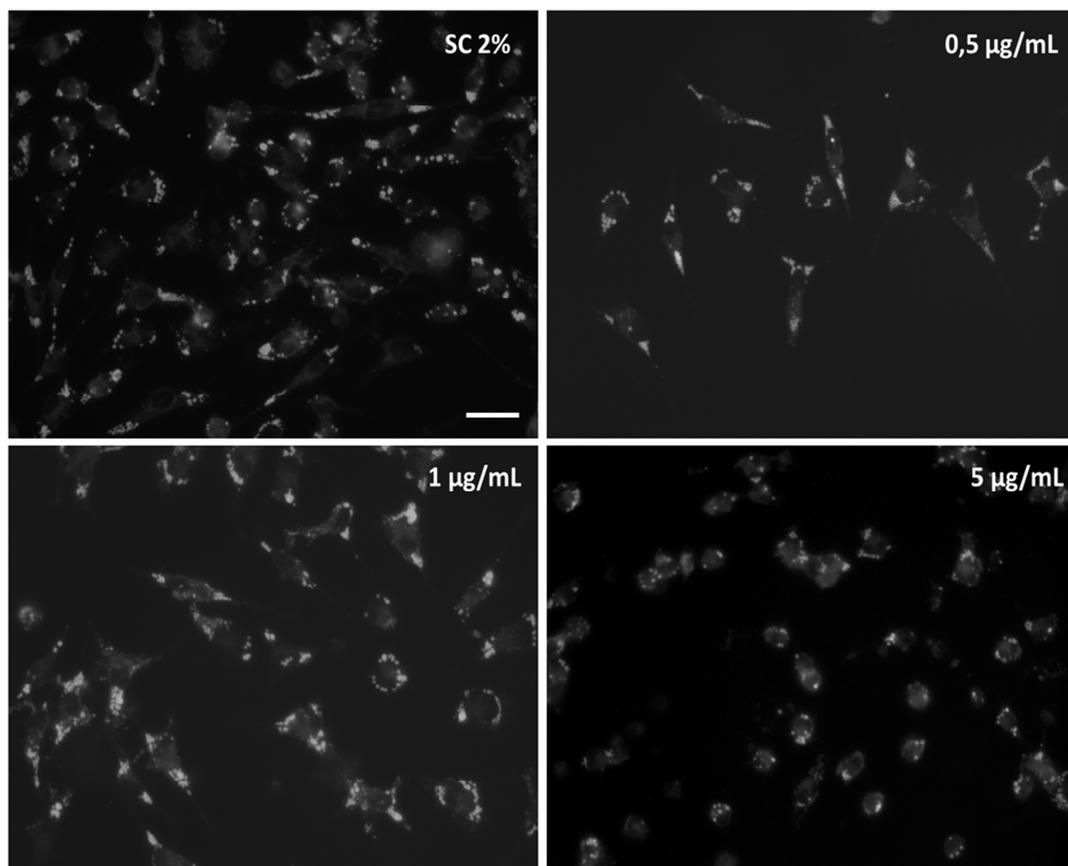


Figura 10. Macrófagos peritoneais murinos cultivados com soro de camundongo (SC) 2% puro ou com a adição de 0,5 $\mu\text{L}/\text{mL}$, 1 $\mu\text{L}/\text{mL}$ ou 5 $\mu\text{L}/\text{mL}$ de C75, inibidor de ácido graxo sintase. As células foram preparadas com Vermelho de Nilo, marcador fluorescente de corpos lipídicos. Barra = 10 μm .

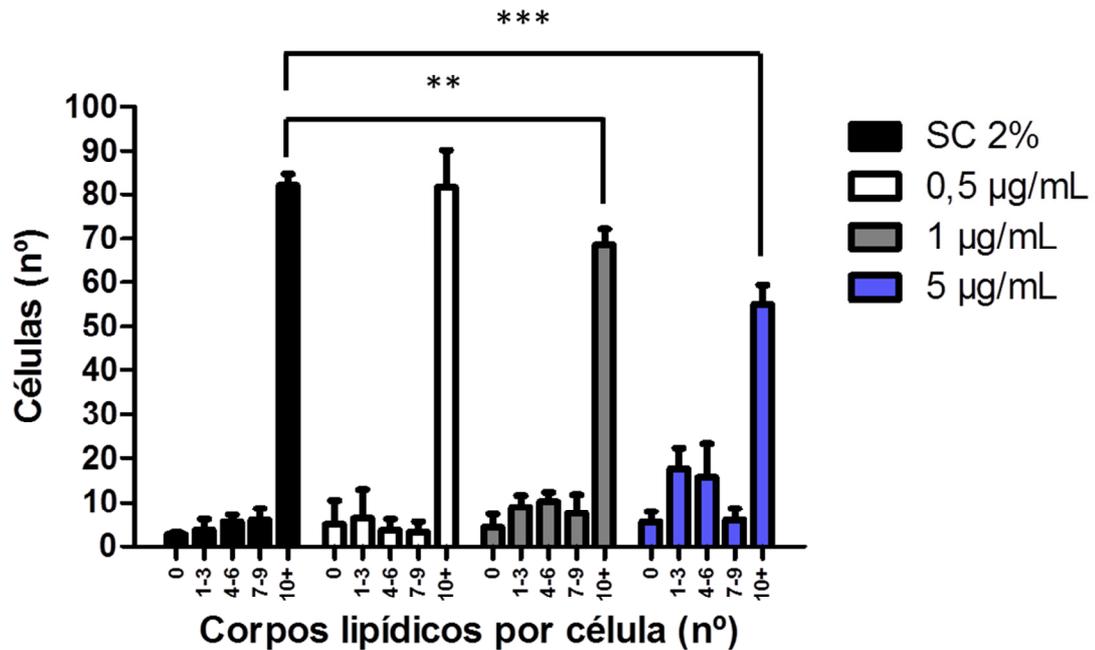


Figura 11. Avaliação de corpos lipídicos por categoria de macrófagos após cultivo com soro de camundongo (SC) 2% puro ou com 0,5 µg/mL, 1 µg/mL ou 5 µg/mL de C75, inibidor de ácido graxo sintase. A adição de 0,5 µg/mL não diminuiu a geração de corpos lipídicos (CL). Com 1 e 5 µg/mL de C75 houve diminuição na geração de CL. Experimento representativo de três repetições realizadas em triplicata. *** Diferença significativa com $P < 0,001$; ** $P < 0,01$.

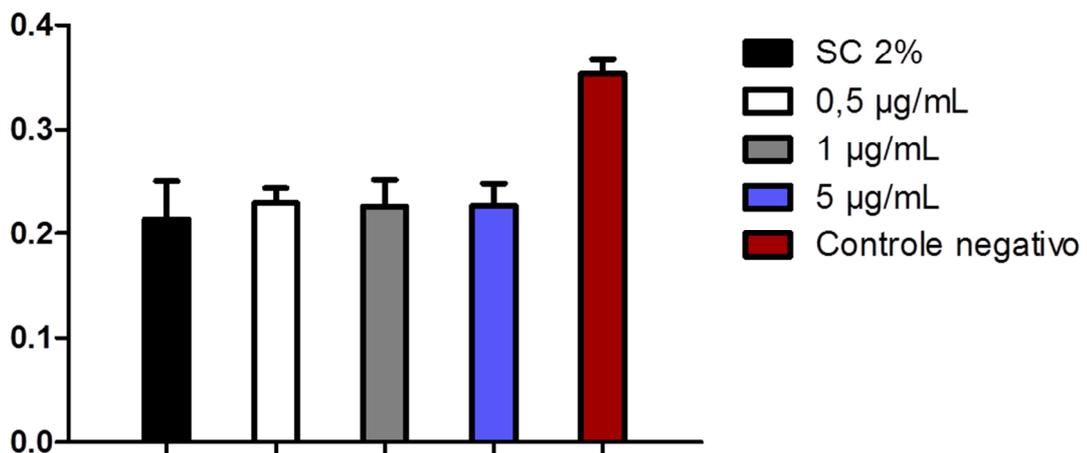


Figura 12. Teste de viabilidade dos macrófagos peritoneais murinos cultivados com soro de camundongo (SC) 2% puro ou com C75 (0,5 µg/mL, 1 µg/mL ou 5 µg/mL). Para o controle negativo as células foram tratadas com agente detergente, Triton 10%.

5.2 - Cromatografia em camada delgada

CCD foi realizada para comparar a composição lipídica do SFB e do SC (Figura 13). Foi observada a existência de maior número de classes lipídicas no SC e em maiores quantidades totais, quando comparado ao SFB. O SC apresentou maiores quantidades percentuais da composição lipídica total de triacilglicerol, ácidos graxos e diacilglicerol. Ademais, estão presentes duas classes de lipídios não determinadas (ND1 e ND2) no SC que estão ausentes do SFB. ND3 e ND4 estão presentes nos dois soros, porém SC possui maior quantidade percentual de ambos. SFB possui maiores quantidades percentuais de colesterol esterificado, colesterol, fosfolípido e monoacilglicerol. Também está presente no SFB monoacilglicerol, que não foi detectado no SC. Porém, estão ausentes os lipídios ND1, ND2 e ácido graxo, que estão presentes no SC (Figura 14). A figura 14 expressa a média da leitura da densitometria dos dois CCD. É importante ressaltar que a análise densitométrica mostrou que todos os lipídios estão presentes em maiores quantidades no SC, com exceção de monoacilglicerol, que só estava presente no SFB.

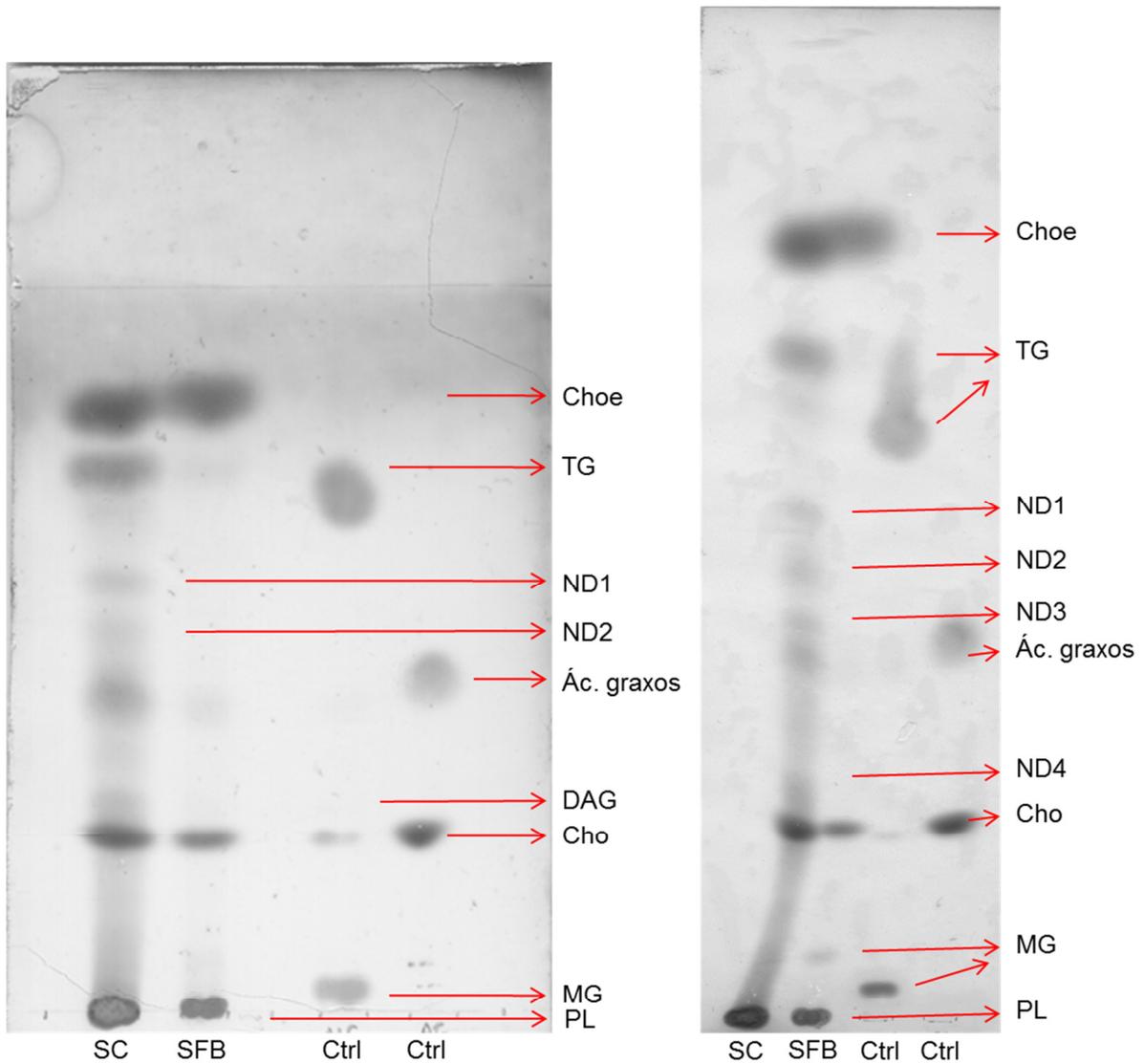


Figura 13. Placas de cromatografia em camada delgada feitas em momentos distintos. SC: soro de camundongo. SFB: soro fetal bovino. CTRL: controle (amostras-padrão). PL: fosfolípido. Cho: colesterol. DAG: diacilglicerol. Ác. graxos: ácidos graxos. TG: triacilglicerol. Choe: colesterol esterificado. MG: monoacilglicerol. ND: lipídio não determinado.

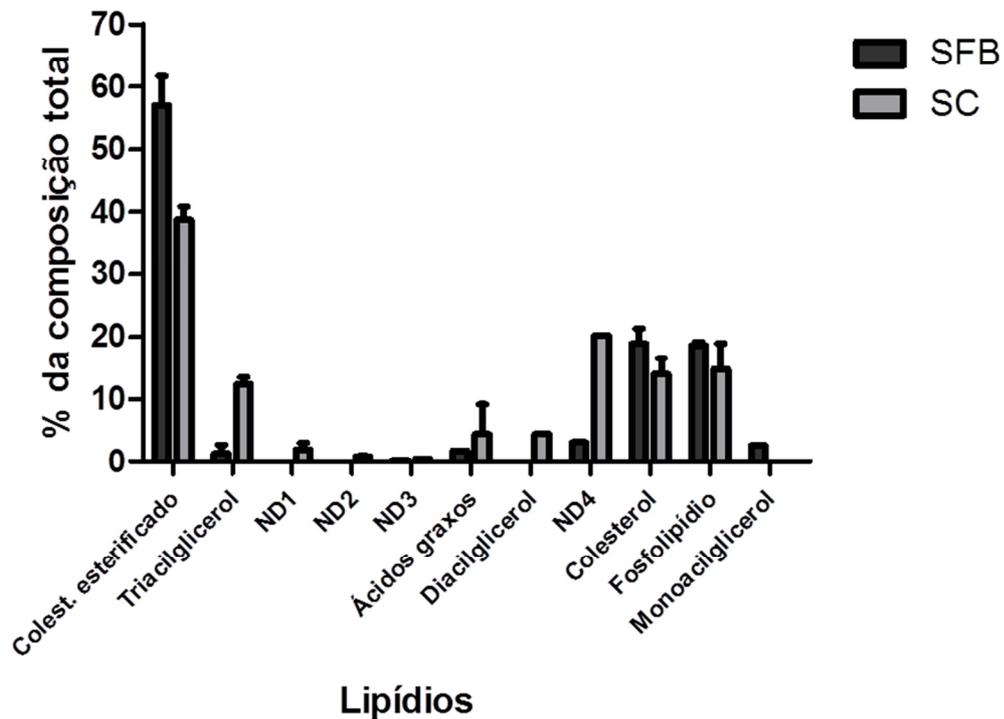


Figura 14. Densitometria da placa de cromatografia em camada delgada dos soros fetal bovino e de camundongo. No eixo das abscissas estão representadas as diferentes classes lipídicas observadas. No eixo das ordenadas está representada a porcentagem da proporção total de cada lipídio no soro fetal bovino (SFB) e no soro de camundongo (SC). ND: lipídio não determinado. Colest.: colesterol.

Objetivando separar lipídios, CCD com SFB e SC foram realizadas (Figura 15). Os resultados obtidos indicam pequena diferença na indução de CL em cada lipídio obtido. Os lipídios 1 e 3 do SFB foram os que mais induziram CL (Figura 16). O lipídio 4 do SC induziu mais CL do que os outros lipídios recuperados da CCD feita com SC (Figura 17). Entretanto, em todos os casos, os lipídios separados pelo CCD induziram bem menos CL do que o controle positivo (SC). No CCD de SFB, os lipídios 1 e 3 induziram mais CL do que SFB puro (Figura 16).

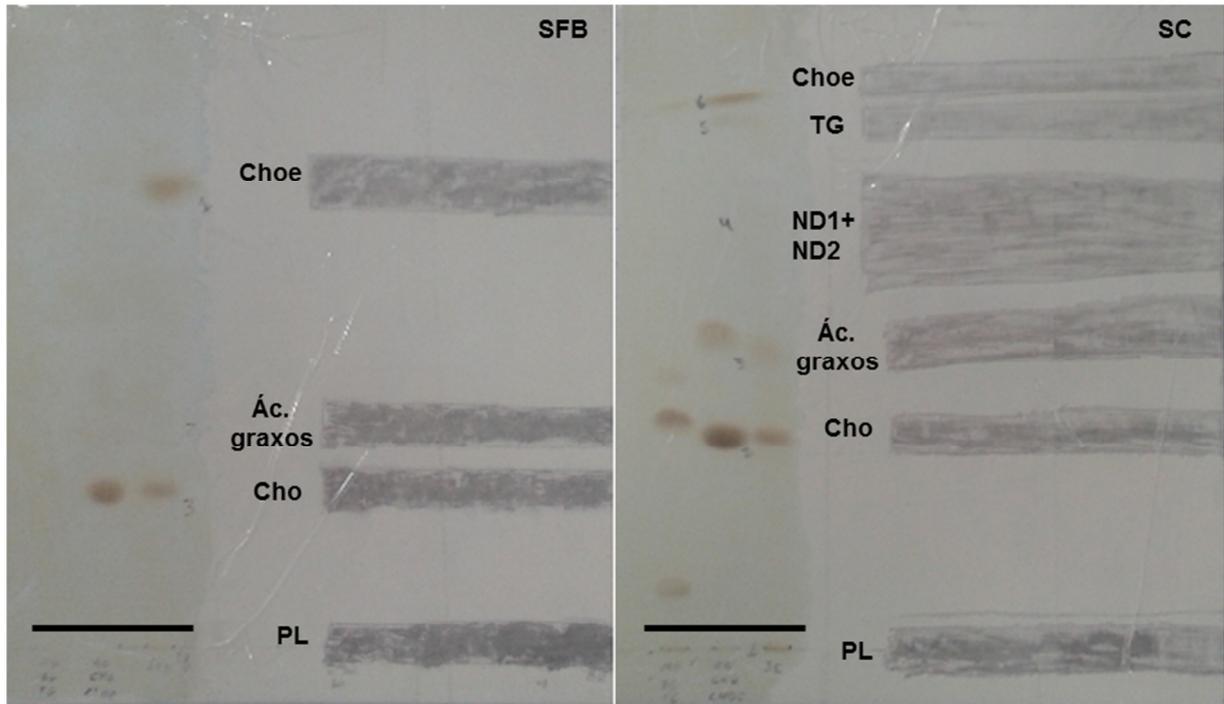


Figura 15. Cromatografia em camada delgada do soro fetal bovino (SFB) e soro de camundongo (SC). Na primeira porção da placa (linha contínua) foram aplicadas pequenas quantidades de amostra que foram reveladas para guiar o processo de raspagem. As bandas de lipídios foram nomeadas e raspadas como indicado na figura. Cho: colesterol. Choe: colesterol esterificado. Ác. graxos: ácidos graxos. PL: fosfolipídio. TG: triacilglicerol. ND: lipídio não determinado.

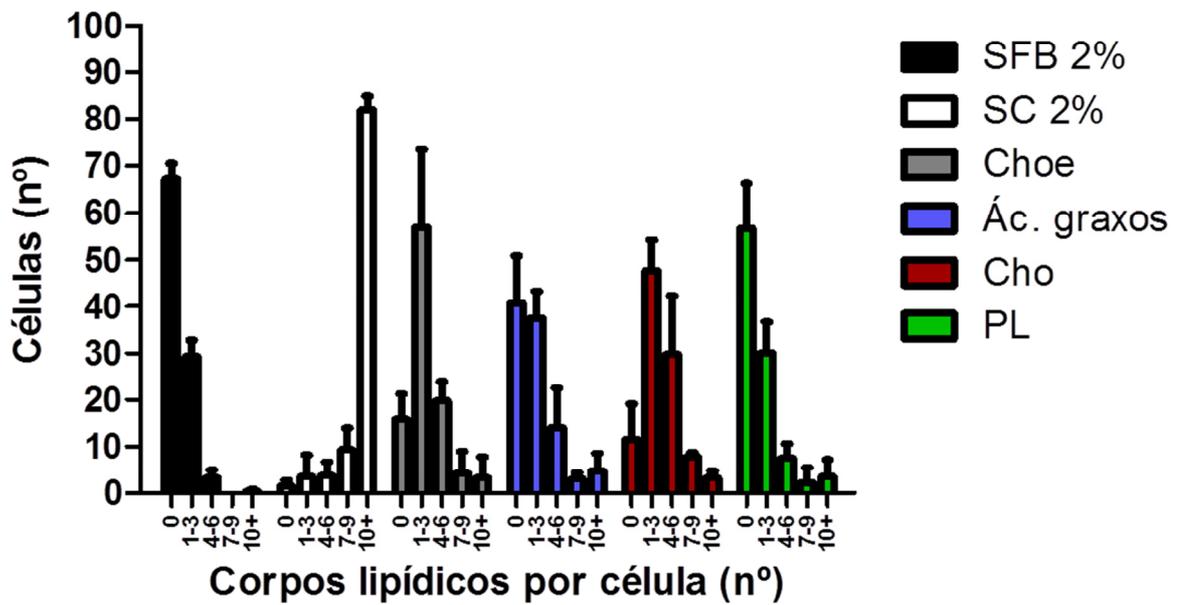


Figura 16. Avaliação de corpos lipídicos por categoria de macrófagos após cultivo com soro fetal bovino (SFB), soro de camundongo (SC) ou lipídios de SFB separados por cromatografia em camada delgada. Colesterol esterificado (Choe) e colesterol (Cho) do SFB foram os que mais induziram corpos lipídicos em comparação aos outros lipídios; porém induziram pouco comparados ao controle positivo (SC), mas induziram mais corpos lipídicos comparado ao SFB puro. Fosfolipídio (PL) foi o que teve menor capacidade de indução de corpos lipídicos. Ác. graxos: ácidos graxos. Experimento representativo de quatro repetições realizadas em triplicata.

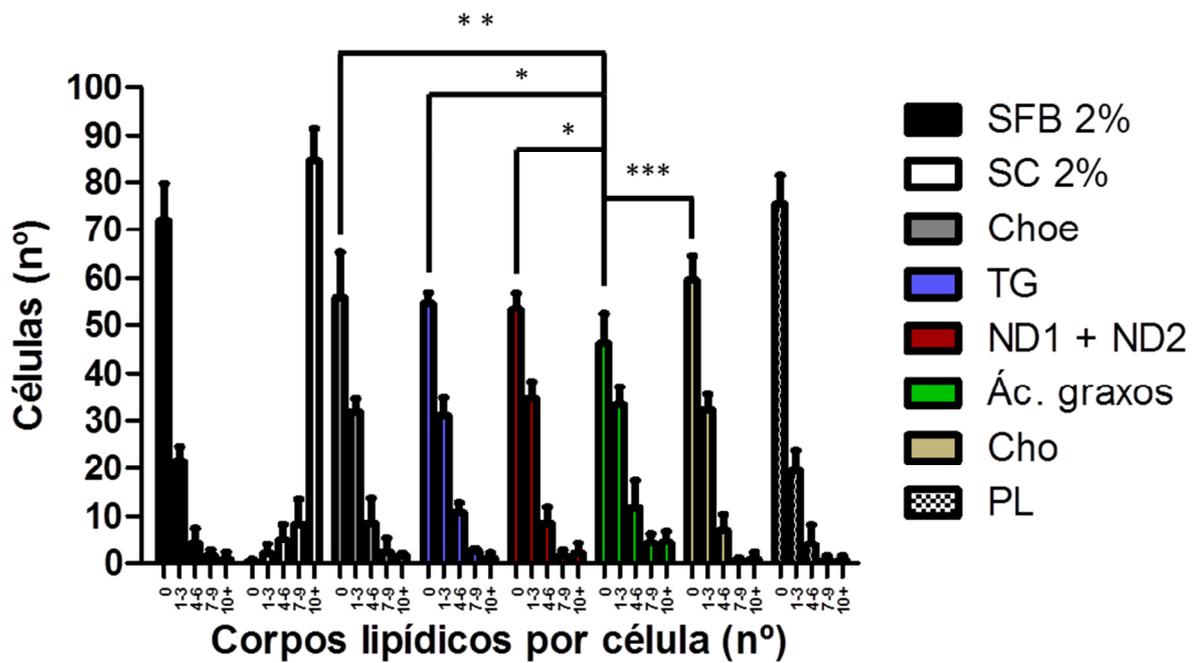


Figura 17. Avaliação de corpos lipídicos por categoria de macrófagos após cultivo com soro fetal bovino (SFB), soro de camundongo (SC) ou lipídios de SC separados por cromatografia em camada delgada. Ácidos graxos (Ác. graxos) do SC foram os que mais induziram corpos lipídicos em comparação aos outros lipídios; porém induziram pouco comparado ao controle positivo (SC). Fosfolipídio (PL) foi o que teve menor capacidade de indução de CL. Choe: colesterol esterificado. TG: triacilglicerol. ND: lipídios não-determinados. Cho: colesterol. Experimento representativo de quatro repetições realizadas em triplicata. *** Diferença significativa com $P < 0,001$; ** $P < 0,01$; * $P < 0,05$.

6 - DISCUSSÃO

CL são organelas presentes em diferentes tipos celulares. A quantidade de CL presentes em cada tipo celular varia grandemente. Em adipócitos, CL são numerosos e podem compor a maior parte do volume citoplasmático da célula. Por outro lado, macrófagos em repouso geralmente não possuem CL. Uma característica marcante dos CL é o fato de que são organelas de biogênese induzível. Diferentes compostos, notadamente lipídios, podem ser utilizados para induzir o surgimento de CL em leucócitos. Em trabalhos anteriores desenvolvidos no nosso grupo (Lobato *et al.*, 2003; Monteiro, 2005; Mota, 2009; Aguiar, 2012; Mota *et al.*, 2014) foi observado, adicionalmente, que SC é capaz de induzir a biogênese de CL em macrófagos de camundongo. Neste trabalho, tentamos entender a natureza química do fator indutor (ou fatores indutores), presente no SC, responsável por deflagrar a biogênese de CL em macrófagos peritoneais murinos.

Primeiramente submetemos o SC a um processo de ultracentrifugação, sendo fracionado em 3 porções. Os resultados indicaram que todas as frações induziram CL de forma similar ao SC não centrifugado, o que sugere que o processo de ultracentrifugação não foi capaz de separar adequadamente o fator indutor de CL. Outra hipótese está relacionada ao processo de coleta das frações realizada com pipeta *Pasteur*. É possível que tenha ocorrido mistura entre as frações. É importante ressaltar que a última fração, F3, foi ressuspensa com parte da fração intermediária F2, o que pode ter acarretado mistura entre as frações e influenciado os resultados dos experimentos. Estes resultados também podem indicar que a geração de CL pode ser devido a um fenômeno multifatorial, já que todas as frações induziram CL nos macrófagos.

Posteriormente submetemos alíquotas de SC a um processo de aquecimento em banho-maria sob altas temperaturas. Foi possível notar um declínio na capacidade de indução de CL do soro aquecido. Esses resultados indicam que o fator indutor de CL do SC é termolábil, e que, portanto, é possível que um fator proteico esteja envolvido no fenômeno de geração de CL. Adicionalmente, foi possível notar que a consistência do soro aquecido, especialmente a 90 e 100 °C, foi alterada; o composto ganhou consistência gelatinosa. Esta condição pode ter ocorrido devido ao cozimento de proteínas do soro e/ou a submissão de lipídios ao aquecimento, o que pode alterar sua viscosidade (Bock e Peralta, 2009).

Entretanto, o congelamento/descongelamento lento do SC não alterou a capacidade de indução de CL do soro. Alíquotas de SC, congeladas e descongeladas, induziram CL nos macrófagos de camundongo de forma similar ao controle (SC sem ciclos de congelamento/descongelamento). Este resultado sugere que a porção lipídica do SC é mais importante do que a porção proteica na indução de CL nos macrófagos murinos, pois ciclos de congelamento/descongelamento geralmente degradam proteínas (Pierce Biotech., 2005). Também é possível que o congelamento e descongelamento contínuo do soro não tenha desnaturado as proteínas do soro como era esperado.

SFB e SC foram submetidos ao processo de deslipidação com o intuito de separar o soro em porções proteica e lipídica e testá-las na indução de CL nos macrófagos. Logo após a deslipidação, foi possível notar grande diferença no volume de conteúdo lipídico entre os dois soros. SC possui maior volume de lipídios em comparação ao SFB, resultado que foi corroborado pela análise de CCD. No cultivo de macrófagos peritoneais, somente a porção lipídica induziu a biogênese de CL em macrófagos. Entretanto, a porção lipídica induziu menos CL do que SC não deslipidado. Quando as porções lipídica e proteica do SC foram testadas conjuntamente a indução de CL foi menor do que quando a porção lipídica foi testada separadamente. Porém, o poder de indução foi maior do que a porção proteica testada separadamente. Estes resultados novamente indicam que o fator indutor de CL presente no SC provavelmente possui natureza lipídica. É importante ressaltar que o método de deslipidação utilizado não causa a desnaturação das proteínas do soro (Clam e Knowles, 1976), e que, portanto, a porção proteica do soro não induz a formação de CL.

O cultivo de macrófagos peritoneais de camundongo com SC e C75 foi testado. C75 é um inibidor da ácido graxo sintase (Kim *et al.*, 2004), que é uma enzima que catalisa a síntese de ácidos graxos de cadeia longa a partir de malonil-CoA (Loftus *et al.*, 2000). A adição gradual da concentração de C75 ao meio de cultura inibiu a indução de CL progressivamente. Isto indica que o processo de biogênese de CL induzido por SC envolve o metabolismo de lipídios, particularmente ácidos graxos, sugerindo que o fator indutor de CL do SC possui natureza lipídica. Esta hipótese é reforçada pela descrição de que, em leveduras, a deleção de enzimas que realizam a síntese de ésteres de lipídios resulta no desaparecimento de CL observáveis através de microscopia de fluorescência, o que indica a

necessidade da síntese de lipídios para o surgimento de CL (Ohsaki *et al.*, 2014). Adicionalmente, para verificar se a adição de C75 ao meio de cultura estava reduzindo a indução de CL por SC por morte dos macrófagos, foi feita uma leitura de desidrogenase láctica do meio. Os resultados indicaram que os macrófagos estavam vivos, e que a queda do número de CL contabilizados ocorreu devido à ação do C75, e não devido a morte das células.

Posteriormente foram feitas CCD com SFB, que não induz a geração de CL, e SC, com o intuito de comparar a composição lipídica de ambos. Foi observado que, como esperado, devido ao resultado observado na deslipidação, SC possui maior quantidade de lipídios em sua composição quando comparado ao SFB. A análise densitométrica das duas CCD indicou que SC possui maior variedade de classes lipídicas do que SFB e em maiores quantidades, além da presença de 2 classes lipídicas não determinadas que estão ausentes do SFB. O maior conteúdo lipídico e maior variedade de lipídios do SC pode contribuir para o fenômeno de geração de CL nos macrófagos murinos.

A utilização de soro de coelhos rico em colesterol foi previamente relatada como forma de induzir a formação de CL em macrófagos murinos (Mori *et al.*, 2001). Na análise densitométrica de CCD do SFB e SC, o volume percentual de colesterol no SFB foi maior do que no SC. Entretanto, o volume total de colesterol no SC é maior, assim como de todos os lipídios encontrados, com exceção de monoacilglicerol, o que pode contribuir para a geração de CL nos macrófagos. Alguns autores utilizaram ácido oleico (ácido graxo) (Suzuki *et al.*, 2011) e triacilgliceróis (Zweytick *et al.*, 2000; Farese *et al.*, 2009; Walther e Farese Jr., 2009; Beller *et al.*, 2010) como forma de induzir CL em leucócitos. Ambos os lipídios estão presentes em maiores quantidades total e percentual no SC. Portanto, isto também pode ser um fator decisivo na geração de CL induzida por SC. A presença de duas classes lipídicas não determinadas no SC (ND1 e ND2), que estão ausentes do SFB, também sustenta nossa tese de que os lipídios do SC são responsáveis pela indução de CL nos macrófagos murinos. É possível que uma das classes de lipídios não determinadas (ND4) presentes no SFB e SC seja diacilglicerol.

Após a análise do CCD de SFB e SC, novas CCD preparativas, de ambos os soros, foram refeitas. Uma porção da placa foi utilizada para revelação dos lipídios e a outra parte foi utilizada para raspagem e ressolubilização dos lipídios em SFB. Foram obtidos 4 classes lipídicas no CCD de SFB e 6 no de SC. Após a raspagem

da placa, ressolubilização dos lipídios e confirmação da separação dos lipídios, o solvente foi eliminado e os lipídios foram ressolubilizados em SFB com o mesmo volume inicial de soro utilizado na extração dos lipídios. Este SFB enriquecido com os lipídios foi testado no cultivo de macrófagos peritoneais de camundongo. Ao contrário do esperado, os lipídios obtidos do SFB induziram mais CL do que os lipídios do SC. Colesterol e colesterol esterificado do SFB foram os que mais induziram CL dentre todos os lipídios obtidos, fato corroborado por Mori *et al.* (2001), que utilizaram soro de coelhos rico em colesterol como indutor de CL. Entretanto, a indução de CL ficou muito aquém da indução feita pelo SC. Dentre os lipídios obtidos do SC, ácidos graxos foram os que mais induziram CL. Colesterol e colesterol esterificado do SFB induziram mais CL do que o SFB puro, o que pode ser explicado pela maior concentração de lipídios neste caso. A falta de indução de CL, notadamente no caso dos lipídios obtidos do SC, pode ter ocorrido devido a pouca quantidade obtida de cada lipídio e possíveis perdas durante o processo de separação. Outra possibilidade está relacionada ao processamento das lipoproteínas durante o CCD. É importante ressaltar que a disponibilidade de SFB é alta, pois este soro é vendido comercialmente. Por outro lado, a obtenção de SC é mais trabalhosa e custosa, já que envolve o sacrifício de grandes quantidades de camundongos. Este fator limita a quantidade de SC que pode ser utilizada em cada experimento.

7 - CONCLUSÃO

Os resultados obtidos no presente trabalho indicam que o fator indutor de CL em macrófagos peritoneais de camundongo, presente no SC, possui natureza lipídica. Isto corrobora uma de nossas hipóteses e é sustentado pela vasta gama de trabalhos que utilizam meio de cultura enriquecido com lipídios para induzir a biogênese de CL em leucócitos. A ultracentrifugação do SC não permitiu deduzir qual foi a fração responsável pela indução de CL, pois todas as frações induziram CL. O aquecimento do SC resultou em menor capacidade de indução de CL, sugerindo que as porções proteica e lipídica do soro são termolábeis. O congelamento e descongelamento repetido do SC não alterou a capacidade de indução de CL, sugerindo que o fator indutor resiste a este tipo de tratamento ou que a indução de CL é feita por lipídios. A deslipidação do SC revelou que a porção lipídica do soro foi capaz de induzir CL, enquanto a porção proteica não induziu, sugerindo que lipídios são importantes para a indução de CL realizada pelo SC. O uso de C75, inibidor da ácido graxo sintase, também atestou a importância dos lipídios do SC na indução de CL, já que o cultivo dos macrófagos murinos com SC e C75 diminuiu a quantidade de CL gerados. A CCD revelou que SC possui maior variedade e volume de classes lipídicas em relação ao SFB. Entretanto, a raspagem e utilização dos lipídios separados por CCD não possibilitou precisar com exatidão qual classe lipídica é responsável por este fenômeno. Outros tipos de abordagem terão que ser utilizados para indicar qual é o lipídio ou a lipoproteína, que está presente no SC, responsável pela indução de CL.

8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Accioly, M.T., Pacheco, P., Maya-Monteiro, C.M., Carrossini, N., Robbs, B.K., Oliveira, S.S., Kaufmann, C., Morgado-Diaz, J.A., Bozza, P.T., Viola, J.P. (2008) Lipid bodies are reservoirs of cyclooxygenase-2 and sites of prostaglandin-E₂ synthesis in colon cancer cells. *Cancer Res.* 68:1732-1740.
- Aguiar, T.T. (2012) *Indução de corpos lipídicos em macrófagos murinos com soro homólogo de camundongo: possível natureza proteica do fator indutor.* Monografia (Bacharelado em Ciências Biológicas) - Campos dos Goytacazes - RJ - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro - UENF, 47p.
- Altmann, R. (1890) *Die Elementarorganismen und ihre Beziehungen zu den Zellen.* Leipzig: Veit.
- Arisqueta, L., Nuñez-Garcia, M., Ogando, J., Garcia-Arcos, I., Ochoa, B., Aspichueta, P., Fresnedo, O., Rueda, Y. (2013) Involvement of lipid droplets in hepatic responses to lipopolysaccharide treatment in mice. *Biochim. Biophys. Acta* 1831:1357-1367.
- Beller, M., Thiel, K., Thul, P.J., Jackle, H. (2010) Lipid droplets: a dynamic organelle moves into focus. *FEBS Letters* 584:2176-2182.
- Betz, M., Fox, B.S. (1991) Prostaglandin E₂ inhibits production of Th1 lymphokines but not of Th2 lymphokines. *J. Immunol.* 146:108-113.
- Bligh, E.G., Dyer, W.J. (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. *J. Biochem. Physiol.* 37:911-913.
- Bock, P.M., Peralta, J.S. (2009) Alterações estruturais e nutricionais em lipídeos submetidos a processamento químico e aquecimento. *La Salle - Revista de Educação, Ciência e Cultura.* 14:77-86.
- Bozza, P.T., Payne, J.L., Morham, S.G., Langenbach, R., Smithies, O., Weller, P.F. (1996) Leukocyte lipid body formation and eicosanoid generation: cyclooxygenase-independent inhibition by aspirin. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:11091-11096.
- Bozza, P.T., Melo, R.C., Bandeira-Melo, C. (2007) Leukocyte lipid bodies regulation and function: contribution to allergy and host defense. *Pharmacol. Ther.* 113:30-49.
- Bozza, P.T., Magalhães, K.G., Weller, P.F. (2009) Leukocyte lipid bodies - Biogenesis and functions in inflammation. *Biochim Biophys Acta.* 1791:540-551.
- Bozza, P.T., Viola, J.P.B. (2010) Lipid droplets in inflammation and cancer. *Prostaglandins, Leukot. and Essent. Fatty Acids* 82:243-250.

- Brasaemle, D.L., Rubin, B., Harten, I.A., Gruia-Gray, J., Kimmel, A.R., Londos, C. (2000) Perilipin A increases triacylglycerol storage by decreasing the rate of triacylglycerol hydrolysis. *J. Biol. Chem.* 275:38486-38493.
- Brown, D.A. (2001) Lipid droplets: proteins floating in a pool of fat. *Curr. Biol.* 11:R446-449.
- Cham, B.E., Knowles, B.R. (1976) A solvent system for delipidation of plasma or serum without protein precipitation. *J. Lipid Res.* 17:176:181.
- Cline, M.J. (1978) Monocytes, macrophages, and their disease in men. *J Invest Dermatol.* 41:56-58.
- Crocker, P.R., Hill, M., Gordon, S. (1988) Regulation of a murine macrophage haemagglutinin (sheep erythrocyte receptor) by a species-restricted serum factor. *Immunol.* 65:515-522.
- D'avila, H., Melo, R.C., Parreira, G.G., Werneck-Barroso, E., Castro-Faria-Neto, H.C., Bozza, P.T. (2006) *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin induces TLR2-mediated formation of lipid bodies: intracellular domains for eicosanoid synthesis in vivo. *J Immunol* 176:3087-3097.
- Davies, L.C., Jenkins, S.J., Allen, J.E., Taylor, P.R. (2013) Tissue-resident macrophages. *Nature Immunology.* 14:986-995.
- Ducharme, N.A., Bickel, P.A. (2008) Minireview: lipid droplets in lipogenesis and lipolysis. *Endocrinology* 149:942-949.
- Elamin, A.A., Stehr, M., Singh, M. (2012) Lipid droplets and *Mycobacterium leprae* infection. *Journal of Pathogens* 2012:1-10.
- Farese, R.V., Farese Jr., R.V., Walther, T.C. (2009) Lipid droplets finally get a little R-E-S-P-E-C-T. *Cell* 139:855-860.
- Freshney, R.I. (2005) Culture of animal cells: a manual of basic techniques. 5^a edição. Editora Wiley-Liss: pp. 123-125/129.
- Giannotti, K.C., Leiguez, E., Moreira, V., Nascimento, N.G., Lomonte, B., Gutiérrez, J.M., Melo, R.L., Teixeira, C. (2013) A Lys49 phospholipase A₂, isolated from *Bothrops asper* snake venom, induces lipid droplet formation in macrophages which depends on distinct signaling pathways and the C-terminal region. *Biomed Research International* 2013:1-14.
- Gomes, A.F., Magalhães, K.G., Rodrigues, R.M., Carvalho, L., Molinaro, R., Bozza, P.T., Barbosa, H.S. (2014) *Toxoplasma gondii*-skeletal muscle cells interaction

- increases lipid droplet biogenesis and positively modulates the production of IL-12, IFN- γ and PGE₂. *Parasit Vectors* 7:1-13
- Greenspan, P.; Mayer, E.P.; Fowler, S.D. (1985) Nile Red: a selective fluorescent stain for intracellular lipid droplets. *J Cell Biol* 100:965-973.
- Grillitsch, K., Connerth, M., Kofeler, H., Arrey, T.N., Rietschel, T.N., Wagner, B., Karas, M., Daum, G. (2011) Lipid particles/droplets of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* revisited: lipidome meets proteome. *Biochim. Biophys. Acta* 1811:1165-1176.
- Guo, Y., Cordes, K.R., Farese, R.V., Farese Jr, R.V., Walther, T.C. (2009) Lipid droplets at a glance. *J Cell Sci* 122:749-752.
- Kim, E., Miller, I., Aja, S., Landree, L.E., Pinn, M., Mcfaden, J., Kuhajda, F.P., Moran, T.H., Ronnett, G.V. (2004) C75, a fatty acid synthase inhibitor, reduces food intake via hypothalamic AMP-activated protein kinase. *JBC* 279:19970-19976.
- Kim, S., Kim, H., Ko, D., Yamaoka, Y., Otsuru, M., Kawai-Yamada, M., Ishikawa, T., Oh, H., Nishida, I., Li-Beisson, Y., Lee, Y. (2013) Rapid induction of lipid droplets in *Chlamidomonas reinhardtii* and *Chlorella vulgaris* by brefeldin A. *PLoS ONE* 8(12): e81978.
- Li, A.C., Glass, C.K. (2002) The macrophage foam cell as a target for anti-therapeutic intervention. *Nat. Med.* 8:1235-1242.
- Liu, Y., Zhang, C., Shen, X., Zhang, X., Cichello, S., Guan, H., Liu, P. (2013) Microorganism lipid droplets and biofuel development. *BMB Rep.* 46:575-581.
- Lobato C.S.S., Monteiro V.G., DaMatta R.A. (2003) Culture of mice peritoneal macrophages with homologous serum caused induction of lipid bodies. *Acta Microsc.* 12:341-342.
- Loftus, T.M., Jaworsky, D.E., Frehywot, G.E., Townsend, C.A., Ronnett, G.V., Lane, M.D., Kuhajda, F.P. (2000) Reduced food intake and body weight in mice treated with fatty acid synthase inhibitors. *Science* 288:2379-2381.
- Mahley, R.W., Innerarity, T.L., Rall, S.C., Jr., Weisgraber, K.H. (1984) Plasma lipoproteins: apolipoprotein structure and function. *J. Lipid Res.* 25:1277-1294.
- Martin, S., Parton, R.G. (2005) Caveolin, cholesterol, and lipid bodies. *Semin. Cell Dev. Biol.* 16:163-174.
- Melo, R.C.N., Paganoti, G.F., Dvorak, A.M., Weller, P.F. (2013) The internal architecture of leukocyte lipid body organelles by three-dimensional electron microscopy tomography. *PLoS ONE* 8(3):E59578.

- Mesquita-Santos, F.P., Vieira-De-Abreu, A., Calheiros, A.S., Figueiredo, I.H., Castro-Faria-Neto, H.C., Weller, P.F., Bozza, P.T., Diaz, B.L., Bandeira-Melo, C. (2006) Cutting edge: prostaglandin d₂ enhances leukotriene c₄ synthesis by eosinophils during allergic inflammation: synergistic in vivo role of endogenous eotaxin. *J. Immunol.* 176:1326-1330.
- Monteiro, V.G. (2005) *Efeito do soro homólogo no cultivo dos macrófagos peritoneais de camundongo: vesículas lipídicas e influência da sialoadesina na interação com Trypanosoma cruzi, Leishmaniaamazonensis e levedura.* Tese (Doutorado em Biociências e Biotecnologia) - Campos dos Goytacazes - RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro - UENF.
- Moore, K.J., Sheedy, F.J., Fisher, E.A. (2013) Macrophages in atherosclerosis: a dynamic balance. *Immunology.* 13:709-721.
- Mori, M., Itabe, H., Higashi, Y., Fujimoto, Y., Shiomi, M., Yoshizumi, M., Ouchi, Y., Takano, T. (2001) Foam cell formation containing lipid droplets enriched with free cholesterol by hiperlipidemic serum. *J Lip Res* 42:1771-1781.
- Mota, L.A.M. (2009) *Macrófagos peritoneais de camundongo cultivados com soro homólogo apresentam grande número de corpos lipídicos e ação microbicida reduzida contra Toxoplasma gondii.* Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia) - Campos dos Goytacazes - RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro - UENF, 71p.
- Mota L.A.M., Roberto-Neto J., Monteiro, V.G., Lobato, C.S.S., Oliveira, M.A., Cunha, M., D'Avila, H., Seabra, S.H., Bozza, P.T., DaMatta, R.A. Culture of mouse peritoneal macrophages with mouse serum induces lipid bodies that associates to the parasitophorous vacuole and lower microbicidal capacity against *Toxoplasma gondii*. Submetido nas Memórias do Instituto Oswaldo Cruz Rio de Janeiro, abril de 2014.
- Murphy, D.J., Vance, J. (1999) Mechanisms of lipid-body formation. *Trends Biochem. Sci.* 24:109-115.
- Murphy, D.J. (2001) The biogenesis and functions of lipid bodies in animals, plants and microorganisms. *Prog. Lipid Res.* 40:325–438.
- Ohsaki, Y., Suzuki, M., Fujimoto, T. (2014) Open questions in lipid droplet biology. *Chem. Biol.* 21:86-96.
- Pacheco, P., Bozza, F.A., Gomes, R.N., Bozza, M., Weller, P.F., Castro-Faria-Neto, H.C., Bozza, P.T. (2002) Lipopolysaccharide-Induced leukocyte lipid body formation

- in vivo*: innate elicited intracellular loci involved in eicosanoid metabolism. *J. Immunol.* 169: 6438-6506.
- Peyron, P., Vaubourgeix, J., Poquet, Y., Levillain, F., Botanch, C., Bardou, F., Daffe, M., Emile, J.F, Marchou, B., Cardona, P.J., De Chastellier, C., Altare, F. (2008) Foamy macrophages from tuberculous patients` granulomas constitute a nutrient-rich reservoir for *M. tuberculosis* persistence. *PLoS Pathog.* 4:e1000204.
- Pierce Biotechnology Inc. (2005) Technical Resource: Protein stability and storage. TR0043.1. Disponível em http://sites.bio.indiana.edu/~chenlab/protocol_files/protein_storage.pdf. Acessado em 09/05/2014.
- Pol, A., Gross, S.P., Parton, R.G. (2014) Biogenesis of the multifunctional lipid droplet: lipids, proteins and sites. *J. Cell Biol.* 204:635-646.
- Pu, J., Ha, C.W., Zhang, S., Jung, J.P., Huh, W.K., Liu, P. (2011) Interactomic study on interaction between lipid droplets and mitochondria. *Protein Cell.* 2(6):487-496.
- Renz, H., Gong, J.H., Schmidt, A., Nain, M., Gemsa, D. (1988) Release of tumor necrosis factor-alpha from macrophages. Enhancement and suppression are dose-dependently regulated by prostaglandin E₂ and cyclic nucleotides. *J. Immunol.* 141:2388-2393.
- Robenek, M.J., Severs, N.J., Schlattmann, K., Plenz, G., Zimmer, K.P., Troyer, D., Robenek, H. (2004) Lipid partition caveolin-1 from ER membranes into lipid droplets: updating the model of lipid droplet biogenesis. *FASEB J.* 18:866-868.
- Robenek, H., Robenek, M.J., Troyer, D. (2005) PAT family proteins pervade lipid droplet cores. *J. Lipid Res.* 46:1331-1338.
- Saka, H.A., Valdivia, R. (2012) Emerging roles for lipid droplets in immunity and host-pathogen interactions. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 28:411-437.
- Singh, R., Kaushik, S., Wang, Y., Xiang, Y., Novak, I., Komatsu, M., Tanaka, K., Cuervo, A.M., Czaja, A.M. (2009) Autophagy regulates lipid metabolism. *Nature* 458:1131-1135.
- Stehr, M., Elamin, A.A., Singh, M. (2012) Cytosolic lipid formations formed during infection by viral and bacterial pathogens. *Microb Infect.* 14:1227-1237.
- Suzuki, M., Shinohara, Y., Ohsaki, Y., Fujimoto, T. (2011) Lipid droplets: size matters. *J. Electron Microsc.* 60 (Suppl. 1):S101-S116.
- Tauchi-Sato, K., Ozeki, S., Houjou, S., Houjou, T., Taguchi, R., Fujimoto, T. (2002) The surface of lipid droplets is a phospholipid monolayer with a unique fatty acids composition. *J. Biol. Chem.* 277:44507-44512.

- Waltermann, M., Hinz, A., Robenek, H., Troyer, D., Reichelt, R., Malkus, U. (2005) Mechanism of lipid-body formation in prokaryotes: how bacteria fatten up. *Mol. Microbiol.* 55:750–763.
- Walther, T.C., Farese Jr., R.V. (2009) The life of lipid droplets. *Biochim. Biophys. Acta.* 1791:459-466.
- Wan, H.C., Melo, R.C., Jin, Z., Dvorak, A.M., Weller, P.F. (2007) Roles and origins of leukocyte lipid bodies : proteomic and ultrastructural studies. *FASEB J.* 21:167-178.
- Weller, P.F., Ryeom, S.W., Picard, S.T., Ackerman, S.J., Dvorak, A.M. (1991) Cytoplasmic lipid bodies of neutrophils: formation induced by cis-unsaturated fatty acids and mediated by protein kinase C. *J. Cell Biol.* 113:137-146.
- Wilfling, F., Haas, J.T., Walther, T.C., Farese Jr, R.V. (2014) Lipid droplet biogenesis. *Curr Opin Cell Biol* 29:39-45.
- Wilson, E. (1896) *The cell in development and inheritance.* New York: Macmillan.
- Wong, C.P., Kaneda, T. (2014) Plant natural products as an anti-lipid droplets accumulation agent. *J Nat Med.* 68:253-266.
- Zweytick, D., Athenstaedt, K., Daum, G. (2000) Intracellular lipid particles of eukaryotic cells. *Biochim. Biophys. Acta.* 1469:101-120.