

MATERIAL E MÉTODOS

1. Células

A linhagem de mastócitos RBL-2H3 foi utilizada neste trabalho. Estas células foram transfectadas para a super expressão de PLD2-Flag® nas formas catalítica ativa e inativa. As células RBL-2H3 não transfectadas e transfectada somente com o vetor foram usadas como controle. Na construção da PLD2 foi utilizado um gene para expressão de uma seqüência de aminoácidos denominada Flag® (N-Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys-C) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA) que pode servir como marcador da enzima PLD (Figura 6). O Flag® constitui-se de apenas oito aminoácidos e, portanto, tem a propriedade de interferir menos com a atividade funcional da enzima. Estas linhagens foram cedidas pelos nossos colaboradores Dr. T. Hitomi e Dr. Reuben P. Siraganian (National Institute of Dental and Craniofacial Research, NIH, Bethesda, MD, EUA).

As células foram cultivadas em meio mínimo essencial de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado com 15% de soro fetal bovino, 0,434 mg/mL de glutamina, 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina e 0,25 µg/mL de anfotericina B, como previamente descrito (Basciano *et al.*, 1986; Morita & Siraganian, 1981; Pierini *et al.*, 1996) e mantidas em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ a 37°C.

As células foram monitoradas com o auxílio de um microscópio invertido DIAVERT (Leitz). Assim que atingiram a confluência, as células foram removidas dos frascos de cultivo pela incubação com Tripsina-EDTA por 15 minutos a 37°C, em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. Após centrifugação a 106 x g por 5 minutos, o sobrenadante foi descartado e o sedimento foi ressuspenso em meio de cultura para a posterior quantificação e padronização do número de células a ser utilizado nos experimentos. Todos os reagentes utilizados no cultivo celular foram adquiridos da Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA. Para

as células transfectadas com o plasmídeo foi adicionado ao meio geneticina 418 (0,4 mg/mL) (Gibco - Invitrogen Life Technology) com a finalidade de manter a seleção das células transfectadas.

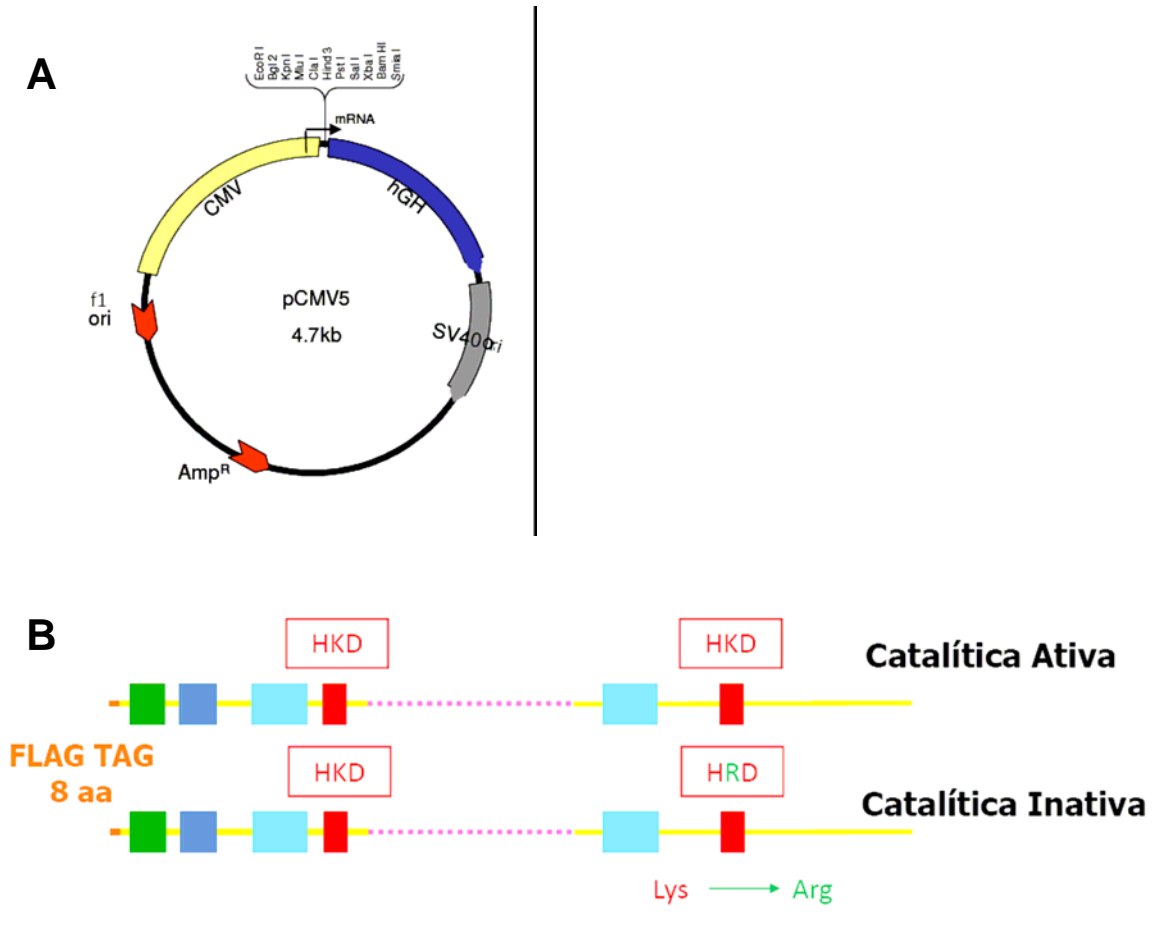


Figura 6. Esquema do vetor pCMV5 e do construto da PLD2-Flag® na forma catalítica ativa e inativa. (A) O vetor pCMV5 da Genetyx-mac foi gentilmente cedido pelo nosso colaborador Dr. Taro Okada (Kobe University Graduate School of Medicine, Kobe, Japão) e utilizado para transfecção das linhagens que foram utilizados nesse estudo. (B) As formas catalítica ativa e inativa diferem na seqüência de aminoácidos do motivo HKD (Histidina, Lisina, Ácido aspártico). Na forma catalítica inativa a Lisina (K) foi substituída pela Arginina (R).

2. Anticorpos e marcadores

Anticorpos primários:

- Anticorpo policlonal anti-PLD2 *Internal* (Biosource International, Camarillo, CA), produzido em coelho, que reconhece os resíduos de aminoácidos 476-489 na região interna da

PLD2 (Colley *et al.*, 1997). Este anticorpo foi utilizado na concentração final de 5 µg/mL;

- Anticorpo policlonal anti-PLD2 *N-terminal* (Biosource International), produzido em coelho, que reconhece os resíduos de aminoácidos 29-39 na região N-terminal da PLD2 (Colley *et al.*, 1997). Este anticorpo foi utilizado na concentração final de 5 µg/mL;

- mAb GM130 (BD Transduction Laboratories, San Jose, CA), produzido em camundongo, reconhece a proteína estrutural GM (*Golgi Matrix Protein*) de 130 kDa presente na face cis do aparelho de Golgi. Este anticorpo foi utilizado na concentração final de 3 µg/mL;

-mAb anti-β-tubulina (Chemicon International, Billerica, MA, EUA), produzido em camundongo e específico para β-tubulina. Este anticorpo foi utilizado na concentração final de 0,75 µg/mL;

- mAb AD1 (Kitani *et al.*, 1991), reconhece a proteína CD63 presente na membrana de lisossomos, grânulos secretores e na membrana plasmática (gentilmente cedido pelo Dr. Reuben P. Siraganian). Este anticorpo foi utilizado na concentração final de 6 µg/mL;

- mAb AA4 é produzido em nosso laboratório através da imunização de camundongos com o hibridoma (gentilmente cedido pelo Dr. Reuben P. Siraganian). Este anticorpo foi purificado do fluido ascítico pela precipitação com sulfato de amônio, seguida por cromatografia de troca iônica (DEAE). O mAb AA4 reconhece os gangliosídeos derivados de GD_{1b} da superfície de mastócitos de rato e de camundongo e foi utilizado na concentração final de 2,5 µg/mL.

Anticorpos secundários:

- fragmento F(ab)₂ de IgG de cabra anti-IgG de camundongo conjugado com Alexa 594 ou 488 (Molecular Probes, Carlsbad, CA, USA) e utilizado na concentração final de 6,6 µg/mL (1:300);

- fragmento F(ab)₂ de IgG de jumento anti-IgG de cabra conjugado com Alexa 594

(Molecular Probes) e utilizado na concentração final de 6,6 µg/mL (1:300);

- fragmento F(ab)₂ de IgG de cabra anti-IgG de coelho conjugado com Alexa 594 ou 488 (Molecular Probes) e utilizado na concentração final de 6,6 µg/mL (1:300);

- fragmento F(ab)₂ de IgG de jumento anti-coelho ou anti-camundongo conjugado com Peroxidase (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, PA) e utilizado na diluição de 1:20000 em TBS/Tween.

Corante fluorescente:

- DAPI (4', 6-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride), marcador nuclear, (Molecular Probes) foi utilizado na concentração final de 0,2 µg/mL.

3. Ativação das células RBL-2H3 via FcεRI

Para alguns experimentos as células foram previamente sensibilizadas com IgE anti-TNP (gentilmente cedida pelo Dr. Reuben Siraganian, do National Institutes of Health, Bethesda, MD, EUA), na concentração de 1:5000 em meio de cultura, por 16 horas. A seguir, as células foram lavadas em PBS contendo BSA 1% e incubadas com DNP₄₈-HSA (50 ng/mL- Sigma Aldrich) durante 45 minutos.

4. Outros Reagentes

O álcool primário 1-Butanol (Acros Organics, New Jersey, USA) foi utilizado para impedir a produção de ácido fosfatídico pela enzima PLD.

O ácido fosfatídico (3-sn-Phosphatidic acid sodium salt from egg yolk lecithin) (Sigma Aldrich) foi utilizado para recuperar o fenótipo das células transfectadas com a enzima PLD2 catalítica inativa. O PA foi preparado de acordo com Sakai e colaboradores 2001.

5. Western-blotting

As células foram quantificadas com uso do contador de partículas Z1 (Beckman Coulter Fullerton, CA, USA) e o mesmo número de células de cada linhagem foi solubilizado. As células foram solubilizadas em 750 µL do tampão de amostra (Tris 125,0 mM, SDS 4%, glicerol 10%, azul de bromofenol 0,006% e β-mercaptoetanol 1,8%), por 5 minutos a 70 °C. A seguir, as amostras foram sonicadas por 10 segundos, resfriadas em gelo e acrescidas de 15 µL do coquetel inibidor de proteases (AEBSF 104 mM, aprotinina 0,08 mM, leupeptina 2,1 mM, bestatina 3,6 mM, pepstatina 1,5 mM e E-64 1,4 mM) (Sigma Aldrich). Posteriormente, as amostras foram centrifugadas por 2 minutos a 106 x g e armazenadas a -80 °C. As amostras foram aplicadas em gel de poliacrilamida 10% e a corrida foi efetuada com corrente de 200 V e 30 mA em tampão de corrida (glicina 190 mM, tris 25 mM e 0,1% de SDS). As proteínas do gel foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose. Após a transferência, as proteínas foram coradas com Ponceau Red por 10 minutos. A membrana foi então, lavada em TBS/Tween (NaCl 100 mM, Tris-HCl 10 mM pH 8,0 e 0,05% de Tween-20, v/v) e incubada por 30 minutos com tampão de bloqueio BSA 1% (Sigma Aldrich) em TBS/Tween. Após o bloqueio, a membrana foi incubada com um anticorpo primário específico: anti-PLD2 (N-terminal), anti-PLD2 (região interna) (Biosource International), GM130 ou γ-tubulina por 1 hora. Após a incubação as membranas foram lavadas em TBS/Tween e, em seguida, incubadas com o anticorpo secundário anti-coelho ou anti-mouse, dependendo do anticorpo primário utilizado, conjugado com HRP na diluição de 1:20000, por 1 hora em TBS/Tween. Após a incubação, as membranas foram lavadas 10 vezes com TBS/Tween e reveladas usando ECL-Kit (Enhanced ChemiLuminescence, Amersham International Ltd., Bucks, UK). Para quantificação das bandas protéicas foi utilizado o programa *Adobe Photoshop 7.0*.

6. Citometria de fluxo

As células em cultura foram lavadas com *Hank's Balanced Salt Solution* e removidas dos frascos de cultivo (Costar-Corning Incorporated, NY, EUA) pela incubação com tripsina-EDTA, por 15 minutos a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. Subseqüentemente, as células foram centrifugadas a 424 x g por 5 minutos à temperatura ambiente. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento celular foi lavado com PBS. A seguir, as células foram fixadas com 2% de paraformaldeído (EM Sciences) em PBS por 20 minutos sob agitação. Após a fixação, as células foram centrifugadas 424 x g por 5 minutos e incubadas com 0,1 M de glicina em PBS por 10 minutos, depois de centrifugadas as células foram permeabilizadas com 0,1% de saponina durante 15 minutos sob agitação. Após a permeabilização as células foram centrifugadas e incubadas com a solução de bloqueio contendo 5 µg/mL de IgG (da mesma espécie do animal em que o anticorpo secundário foi produzido) diluído em PBS contendo BSA 1%, por 30 minutos, sob agitação à temperatura ambiente. A seguir, as células foram centrifugadas, o sobrenadante descartado e o sedimento celular ressuspendido no anticorpo primário anti-PLD2 *Internal* (Biosource International) na concentração de 5 µg/mL diluído em PBS contendo 0,01% de saponina, e incubado por 1 hora sob agitação à temperatura ambiente. Após a incubação as células foram lavadas duas vezes com PBS e centrifugadas a 424 x g por 5 minutos à temperatura ambiente. No controle foi omitido o anticorpo primário. As células foram então, lavadas 2 vezes com PBS e incubadas com o anticorpo secundário IgG de cabra anti-coelho, conjugado com Alexa 488 (Molecular Probes), durante 30 minutos. A seguir, as células foram centrifugadas (424 x g/5 minutos), lavadas 3 vezes em PBS e analisadas em citômetro de fluxo (*Facsort*), com excitação do laser a 488 nm com o uso do programa *CellQuest* (Becton Dickison Labware, San Jose, CA).

7. Análise da viabilidade celular após incubação com 1-Butanol

7.1. Azul de tripan

As células RBL-2H3 foram cultivadas em placa com 24 poços e alimentadas com 400 μ L de meio de cultura DMEM suplementado com 15% de soro fetal bovino. As células foram mantidas a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ por 24 horas. Após esse período foi retirado o sobrenadante e adicionado em cada poço 1-Butanol nas seguintes diluições 1%, 2% 3% 4% e 5% em PBS. As células foram incubadas durante 10 minutos, 20 minutos, 1 e 5 horas, a 37°C em atmosfera úmida. Após cada período de incubação o sobrenadante foi retirado e foi adicionado o corante azul de tripan 0,02% por 30 minutos a 37°C (Ying *et al.*, 2000). O controle foi realizado na ausência de 1-Butanol. Após a incubação com o azul de tripan os poços foram examinados em microscópio de campo claro com aumento de 200x. As células inviáveis apresentaram citoplasma corado em azul. Com auxílio de um contador manual de células foram quantificadas cerca de 300 células por poço (entre vivas e mortas). A porcentagem de células vivas foi calculada através dos valores obtidos nestas contagens.

7.2. Iodeto de propídeo

As culturas de células RBL-2H3 foram lavadas com *Hank's Balanced Salt Solution* e as células foram removidas dos frascos pela incubação com tripsina-EDTA por 15 minutos a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. Subseqüentemente, as células foram centrifugadas a 242 x g por 5 minutos à temperatura ambiente e em seguida, o sobrenadante foi desprezado, o sedimento celular lavado com PBS e as células foram então, quantificadas. Em seguida, as células foram aliquotadas em diversos tubos e incubadas com 1%, 2% e 3% de 1-Butanol em PBS, por 10 e 20 minutos. O controle foi realizado na ausência de 1-Butanol. Após a incubação as células foram lavadas em PBS, centrifugadas em 424 x g por 5 minutos e ressuspensas em 1 mL de PBS contendo 5 μ g/mL de iodeto de propídeo. A seguir, o sedimento celular foi fixado com paraformaldeído a 4% durante 15 minutos e depois,

centrifugadas 54 x g. O sobrenadante foi descartado e o sedimento celular ressuspensionado em PBS e lavado 3 vezes em PBS por centrifugação. A análise foi realizada por citometria de fluxo com excitação do laser a 480 nm.

8. Imunofluorescência

As células ($2,5-5,0 \times 10^4$) foram cultivadas sobre lamínulas de vidro de 12 ou 13 mm de diâmetro (GlassTécnica Import, Brasil) em placas de 24 poços, contendo meio DMEM suplementado com 15% de soro fetal bovino. Para alguns experimentos as células foram sensibilizadas e, após 16 horas de cultivo foram estimuladas conforme descrito no item 3. Após 16 horas as células foram fixadas em paraformaldeído 2% (Electron Microscopy Sciences, Fort Washington, PA) em PBS, por 20 minutos à temperatura ambiente. As células foram permeabilizadas em 0,01% de saponina (Sigma Aldrich) em PBS, por 20 minutos ou em 0,3% de Triton X-100 (Sigma Aldrich) em PBS por 10 minutos à temperatura ambiente. Para a imunomarcação de β -tubulina as células foram fixadas em paraformaldeído a 4% em PBS contendo 50 μ M de Taxol e 50 mM EGTA, durante 20 minutos à 37°C. Subseqüentemente, as células foram lavadas duas vezes com PBS, uma vez com PBS contendo 0,1 M de glicina (Sigma Aldrich) e novamente com PBS. Em seguida, os sítios inespecíficos foram bloqueados através da incubação por 30 minutos com PBS contendo BSA 1% (albumina de soro bovino- Sigma Aldrich) e 5 μ g/mL de IgG da mesma espécie animal onde foi produzido o anticorpo secundário. Posteriormente, as células foram incubadas por 1 hora com os diferentes anticorpos primários diluídos em PBS contendo BSA 1%. Os anticorpos primários utilizados para analisar a rota biossintética-secretora até a formação de vesículas secretoras foram: anti-GM130, mAb AD1 e mAb AA4 diluídos em PBS e incubadas por 1 hora. Para analisar a distribuição da PLD2 as linhagens foram incubadas por 1 hora com o anticorpo anti PLD2 *Internal* diluído em PBS. Para analisar os microtúbulos as células

foram incubadas por 1 hora com o anticorpo β -tubulina diluído em PBS. Após a incubação as células foram lavadas por 30 minutos (5 vezes de 6 minutos) em PBS. A seguir, as células foram incubadas com os anticorpos secundários diluídos em PBS, lavadas 10 vezes de 5 minutos com PBS e, em seguida, lavadas com água purificada em sistema Milli-Q (Millipore Corporation, Bedford, MA, EUA) e montadas sobre lâminas de vidro (Knittel Glase, Braunschweig, Alemanha) com Fluoromount G (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, EUA). No controle foi omitido o anticorpo primário. O material foi analisado em microscópio de fluorescência (Olympus BK 50, USA, Melville, NY) acoplado a uma câmera digital (Nikon DXM 1200, USA, Melville, NY) e as imagens foram processadas com programa de deconvolução Image Pro-Plus 4.5.1 (MediaCybernetics, Silver Spring, MD) ou usando o microscópio confocal *Leica* TCS SP5 e SP2 (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha) com programa de captura e processamento de imagem LAS AF 1.8.2 build 1465 *Leica Microsystems CMS GmbH*.

9. Ensaio de liberação de β -hexosaminidase

As células foram cultivadas na concentração de 3×10^4 células/poço em placas de 96 poços. Para alguns experimentos as células foram sensibilizadas e, após 16 horas de cultivo, foram estimuladas conforme descrito anteriormente no item 3. As células foram lavadas com tampão Tyrode-Gelatina-BSA (TGB) a 37°C (137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 12 mM NaHCO₃; 0,37 mM NaH₂PO₄; 0,1 mM MgCl₂; 1,3 mM CaCl₂; 10 mM HEPES, pH 7,3, suplementado com 0,01% de gelatina de suíno (Sigma Aldrich) e 0,1% de BSA (Sigma Aldrich). Após o estímulo foi realizado um ensaio colorimétrico para a enzima β -hexosaminidase. Foram retirados 25 μ L do sobrenadante de cada poço e cada alíquota foi incubada por 30 minutos com 25 μ L do substrato da enzima, o NAG 8 mM (p-nitrophenil N-acetil- β -D-glucosaminida) diluído em tampão citrato 0,1 M- ácido cítrico 0,1 M (pH 4.5). A reação foi bloqueada pela

adição de 50 μL de NaCl 0,2 M, NaOH 0,2 M e glicina 0,2 M (pH 10,0). A concentração da β -hexosaminidase foi determinada através da medida do produto da reação analisado a 405 nm em leitor de placas ELISA POWER WAVE X (Bio-Tek Instrument, Inc-Winosky, VT). Com o comprimento de onda de 405 nm o total (100%) de β -hexosaminidase de cada poço foi determinado pela soma dos valores para o sobrenadante mais o valor obtido com as células solubilizadas em 1% de Triton X-100. A partir do valor total obtido foi calculado a porcentagem de β -hexosaminidase liberada do sobrenadante.

10. Microscopia eletrônica de transmissão

As células foram cultivadas na concentração de 1×10^7 células/poço conforme descrito no item 1, em placa de 6 poços e cultivadas por 72 horas. As células foram alimentadas com meio de cultura DMEM 24 horas antes de serem fixadas com 2% de paraformaldeído (EM Sciences) e 2% de glutaraldeído (EM Sciences), contendo 0,05% de CaCl_2 em tampão cacodilato 0,1 M, pH 7,4 por 1 hora à temperatura ambiente. As células foram lavadas em tampão cacodilato e então pós-fixadas em OsO_4 (EM Sciences) a 2% por 1 hora à temperatura ambiente. As amostras foram desidratadas em uma série crescente de etanol, até o etanol absoluto. As células foram retiradas da placa com óxido de propileno e incluídas em EMBED 812 (EM Sciences). Os cortes finos foram obtidos com navalha de diamante, colocados em grades de cobre e contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo por 10 minutos cada. As grades foram, posteriormente, observadas em microscópio eletrônico de transmissão PHILIPS EM 208 (Fei Company, Eindhoven, The Netherlands).

11. Estatística

Para comparação de variáveis contínuas foi utilizado o teste T de Student unicaudal, com valor p de 0,05. Valores com a mesma variância foram considerados. Os dados foram

analisados com o programa Excel 2002 versão 10.