

RESULTADOS

1. A linhagem celular CI possui maior expressão da enzima PLD2 em relação às linhagens celulares CA, CI, VET e RBL-2H3

Para testar a especificidade dos anticorpos anti a seqüência interna da PLD2 e anti a porção N-terminal da PLD2 foram preparados lisados das células da linhagem de mastócitos RBL-2H3 selvagem e transfectados: (i) para super expressão de PLD2 na forma catalítica ativa (CA); (ii) para a super expressão de PLD2 na forma catalítica inativa (CI) e (iii) somente com o vetor (VET). As células não foram estimuladas antes do preparo dos lisados. Os lisados celulares foram os mesmos para os dois anticorpos testados.

Os resultados do *western blotting* mostraram que o anticorpo anti a seqüência interna da PLD2 reconhece uma única banda de cerca de 105 kDa que corresponde a PLD2 (Figura 7). O anticorpo anti a porção N-terminal da PLD2 não reconhece a proteína PLD2, mas reconhece outras proteínas e/ou peptídeos. Esses resultados foram importantes para determinar o anticorpo a ser utilizado nesse trabalho. A Figura 8 mostra a quantificação das bandas observadas na Figura 7, onde as células RBL-2H3 foram consideradas como 100%. As células CA possuem 21% mais PLD2 do que as células RBL-2H3. As células CI possuem 415% mais PLD2 em relação às células RBL-2H3. A alta expressão de PLD2 pode ser interpretada como uma forma de compensação da célula, uma vez que a enzima produzida é inativa. As células VET apresentaram 131% mais PLD2 encontrada em células RBL-2H3. Ao contrário de nossos achados os resultados prévios com as mesmas linhagens celulares mostraram um aumento de aproximadamente 20 vezes de super expressão de PLD2 nas células CA e CI em relação as células controle (células transfectadas com o vetor vazio). (Hitomi *et al.*, 2004). Provavelmente a alíquota de células VET utilizada nesta etapa do trabalho estava contaminada com células CA ou CI, assim sendo, novas alíquotas das células

VET foram descongeladas.

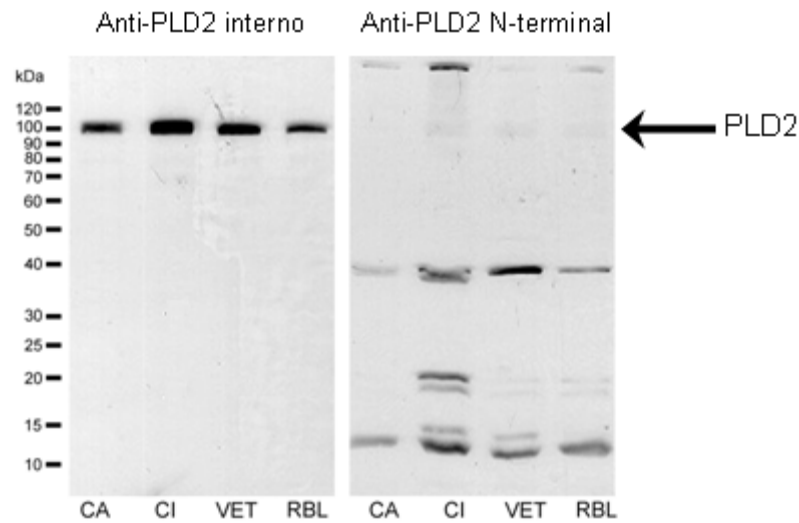


Figura 7. O anticorpo anti a seqüência interna da PLD2 reconhece uma única banda de cerca de 105 kDa que corresponde a PLD2. O anticorpo anti a seqüência interna da PLD2 reconhece uma banda de aproximadamente 105 kDa correspondente ao peso molecular da proteína PLD2. Enquanto bandas protéicas inespecíficas foram detectadas com o anticorpo anti a porção N-terminal da PLD2.

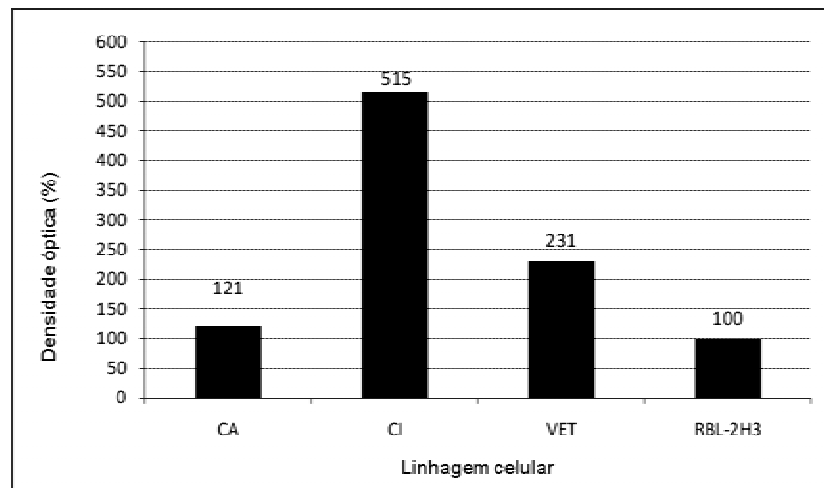


Figura 8. A linhagem PLD2 CI possui maior quantidade da enzima PLD2. As células CA e CI possuem uma maior expressão da enzima PLD2 quando comparadas às células RBL-2H3.

Para confirmar os resultados obtidos com a quantificação da expressão da PLD2 nos lisados celulares, as células não estimuladas foram imunomarcadas com o anticorpo anti a

seqüência interna da PLD2 e analisadas por citometria de fluxo. A expressão de PLD2 nas células selvagens RBL-2H3 foi considerada como 100% (Figura 9). As células CA possuem 37% enquanto, as células CI possuem 79% a mais PLD2 que as células RBL-2H3. Para a quantificação de PLD2 por citometria de fluxo foi utilizada uma alíquota de células VET diferente daquela usada para *western blotting*. Na nova alíquota de células VET a expressão da enzima foi 1% maior do que nas células RBL-2H3. Este resultado está de acordo com o obtido por *western blotting*, por Hitomi e colaboradores (2004).

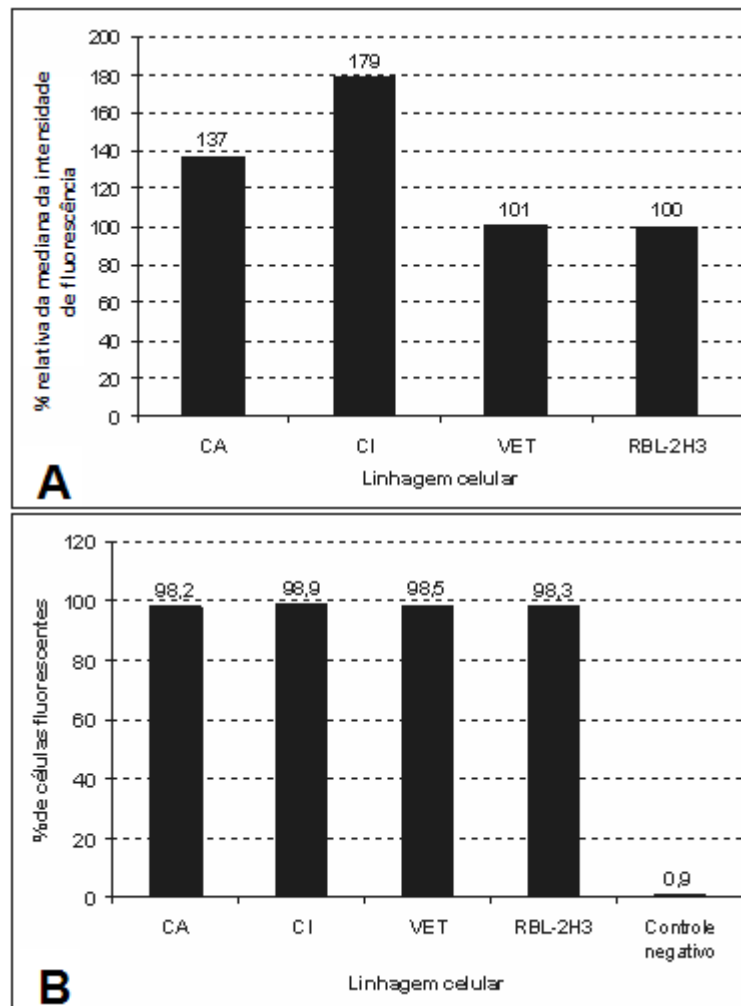
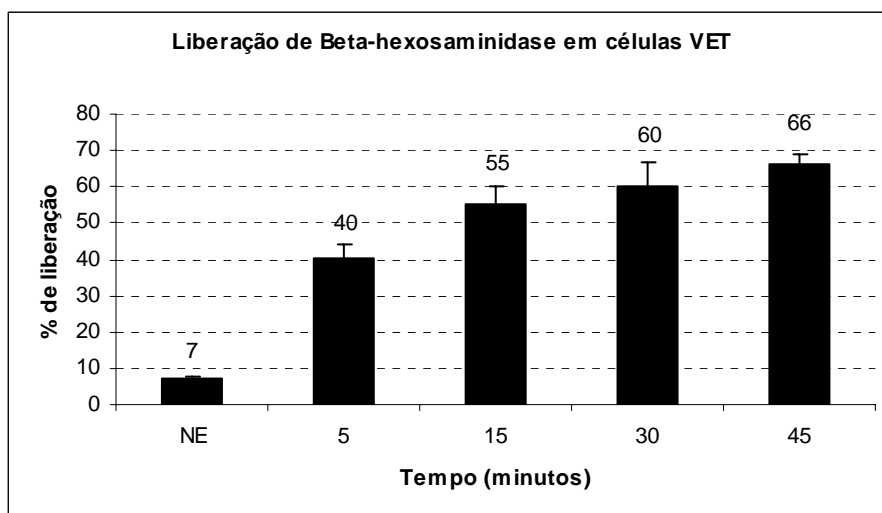
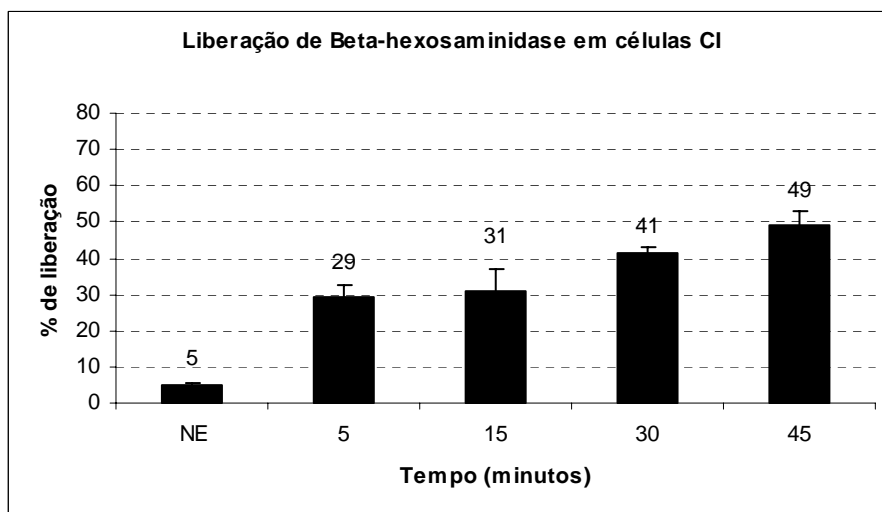
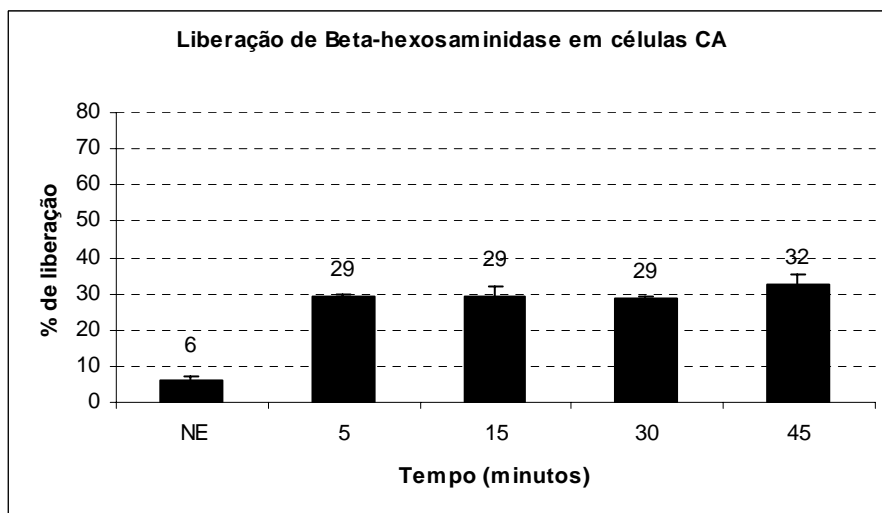


Figura 9. Quantificação da expressão de PLD2 entre as linhagens transfectadas CA, CI, VET e células RBL-2H3. (A) Histogramas representam 10.000 eventos (n=2). O gráfico (B) demonstra que praticamente 100% de células foram imunomarcadas durante a quantificação da enzima PLD2 por citometria de fluxo.

2. A liberação de β -hexosaminidase é menor em células CA e CI em relação às células RBL-2H3 e às células transfectadas somente com o vetor, mas a quantidade desta enzima nos grânulos de células CA e CI é maior

O papel da PLD2 na liberação de mediadores químicos foi analisado através da medida da atividade de β -hexosaminidase liberada. Esta enzima está presente nos grânulos de mastócitos e é liberada juntamente com a histamina como consequência da ativação destas células (Schwartz and Austen, 1980). As células RBL-2H3 liberam 40% após 5 minutos de estímulo e com 45 minutos a liberação aumenta para 69%. Na linhagem VET a atividade de β -hexosaminidase liberada é semelhante à das células RBL-2H3. No entanto, as células CA liberam somente 29% de β -hexosaminidase, após 5 minutos de estímulo e atingem um platô. As células CI, após 5 minutos de estímulo também liberam aproximadamente 29%, mas com 45 minutos ocorre um aumento na liberação de β -hexosaminidase atingindo 49%. Nas células não estimuladas (NE) a β -hexosaminidase liberada foi analisada 45 minutos após o início do experimento (Figura 10).

Com o objetivo de investigar se as diferenças na liberação da atividade de β -hexosaminidase estão relacionadas com a quantidade desta enzima nas células, o conteúdo total desta enzima foi avaliado (Figura 11). O conteúdo total de β -hexosaminidase das células CA e células CI é significativamente maior em relação as células RBL-2H3 ($p=0,00026$ e $p=0,0017$, respectivamente). As células CA e CI armazenam uma maior quantidade de β -hexosaminidase em relação a linhagem celular RBL-2H3, porém não estão liberando a β -hexosaminidase após o estímulo (Figura 10). Estes resultados sugerem que a PLD2 possa estar envolvida na liberação de grânulos secretores.



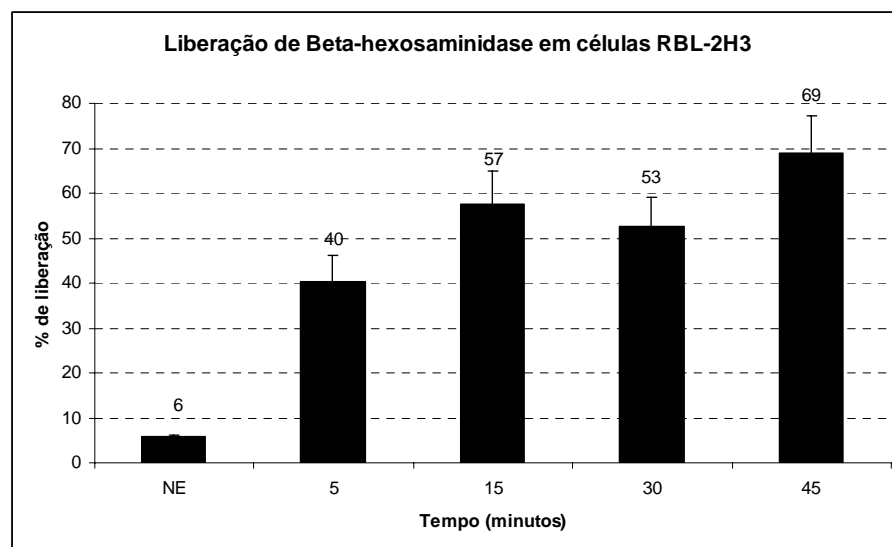


Figura 10. As células CA e CI possuem uma menor liberação de β -hexosaminidase em relação as células RBL-2H3. Em todos os tempos de estímulo, as linhagens transfectadas CA e CI apresentaram redução na porcentagem de liberação de β -hexosaminidase quando comparadas com as células RBL-2H3 e VET. As células foram sensibilizadas com IgE anti TNP e estimuladas pela adição de 50 ng/ mL de DNP-HSA. Os valores obtidos para as células CA foram 6% \pm 1,0 quando NE, 29% \pm 0,5 aos 5 minutos, 29% \pm 3,1 aos 15 minutos, 29 \pm 0,9 aos 30 minutos e 32% \pm 3,2 aos 45 minutos. Nas células CI os valores obtidos foram 5% \pm 0,6, quando NE, 29% \pm 3,8, aos 5 minutos, 31% \pm 6,1 aos 15 minutos, 41% \pm 1,8 aos 30 minutos e 49% \pm 4,1 aos 45 minutos. Os valores obtidos para as células VET foram 7% \pm 0,3 quando NE, 40% \pm 4,0 aos 5 minutos, 55% \pm 5,1 aos 15 minutos, 60% \pm 6,5 aos 30 minutos e 66% \pm 2,8 aos 45 minutos. Os valores obtidos para as células RBL-2H3 foram 6% \pm 0,4 quando NE, 40% \pm 6,0 aos 5 minutos, 57% \pm 7,6 aos 15 minutos, 53% \pm 6,5 aos 30 minutos e 69% \pm 8,4 aos 45 minutos. NE, células não estimuladas (n=3).

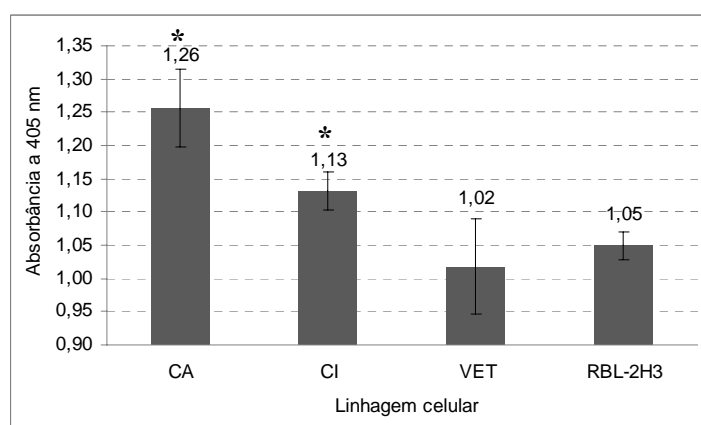


Figura 11. A quantidade da atividade de β -hexosaminidase total das células CA e CI é maior em relação às células RBL-2H3 e transfectadas com o vetor. Os valores obtidos foram 1.26 \pm 0.06, 1.13 \pm 0.03, 1.02 \pm 0.07 e 1.05 \pm 0.02 para as células CA, CI, VET e RBL-2H3, respectivamente). Valores significativamente (*) maiores em relação a linhagem selvagem sendo que p=0,00026 e p=0,0017 respectivamente (n=4).

3. A enzima PLD2 está localizada principalmente em uma região justanuclear das células CA, CI, VET e RBL-2H3

A distribuição da PLD2 nas células CA, CI, VET e RBL-2H3 foi investigada através da imunomarcagem com anticorpo anti a região interna da PLD2 (Figura 12). As células CA, VET e RBL-2H3 possuem uma morfologia fusiforme, enquanto as células CI são estreladas. Nas células CA a maior parte da PLD2 está concentrada na região justanuclear, sugerindo que possa estar associada com o aparelho de Golgi. A PLD2 também apresenta uma distribuição pontuada no citoplasma, o que indica que esta enzima possa estar associada com vesículas. Nas células CI, porém, a PLD2 está mais concentrada no corpo celular, estando quase ausente nos prolongamentos citoplasmáticos. Nas células VET e RBL-2H3, a PLD2 parece mais concentrada no corpo celular em relação aos prolongamentos.

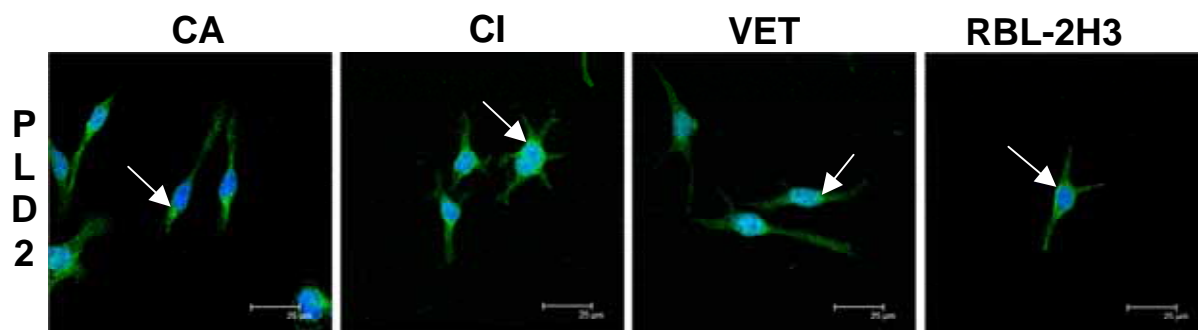


Figura 12. A PLD2 se localiza na região justanuclear das células CA, CI, VET e RBL-2H3. As células foram imunomarcadas com o anticorpo anti a região interna da PLD2 e coradas com DAPI. As setas indicam locais de maior concentração da enzima PLD2. As imagens foram obtidas pelo microscópio confocal Leica modelo SP2.

4. A enzima PLD2 não está associada com os gangliosídeos derivados de GD_{1b} nas linhagens celulares estudadas

Os gangliosídeos derivados do GD_{1b} estão distribuídos uniformemente por toda a superfície de células RBL-2H3 e são reconhecidos pelo anticorpo específico mAb AA4 (Guo *et al.*, 1989). Com imunomarcção das células CA, CI, VET e RBL-2H3 com o mAb AA4 e com o anticorpo anti PLD2 não foi observada uma co-localização entre a enzima PLD2 e os gangliosídeos derivados do GD_{1b} (Figura 13 e 14).

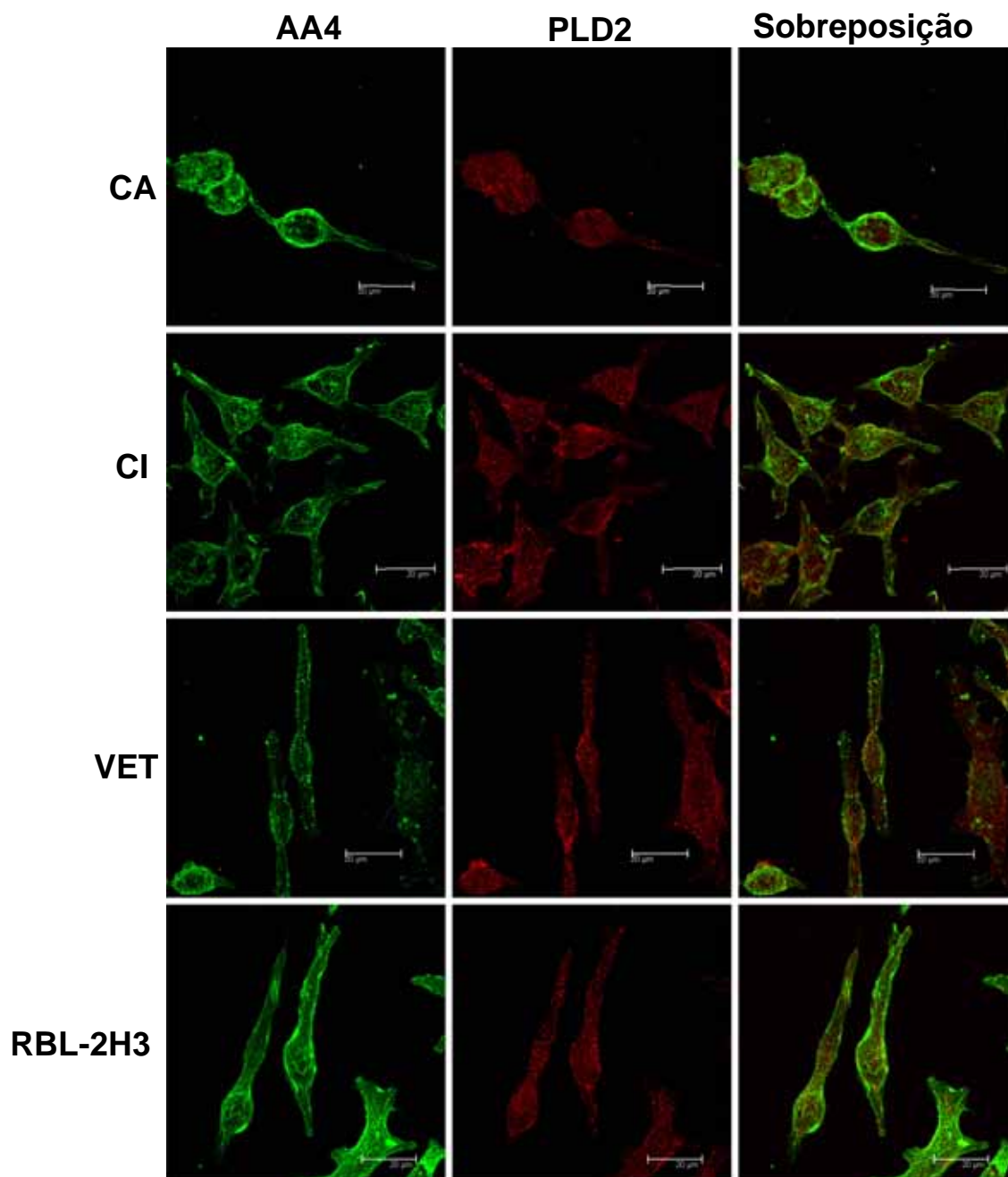


Figura 13. A PLD2 não se co-localiza com os gangliosídeos derivados de GD_{1b} na superfície das células CA, CI, VET e RBL-2H3. Os gangliosídeos estão localizados na superfície celular enquanto a PLD2, esta distribuída no citoplasma e concentrada em regiões justanucleares. Imagens obtidas em microscópio confocal Leica modelo SP5.

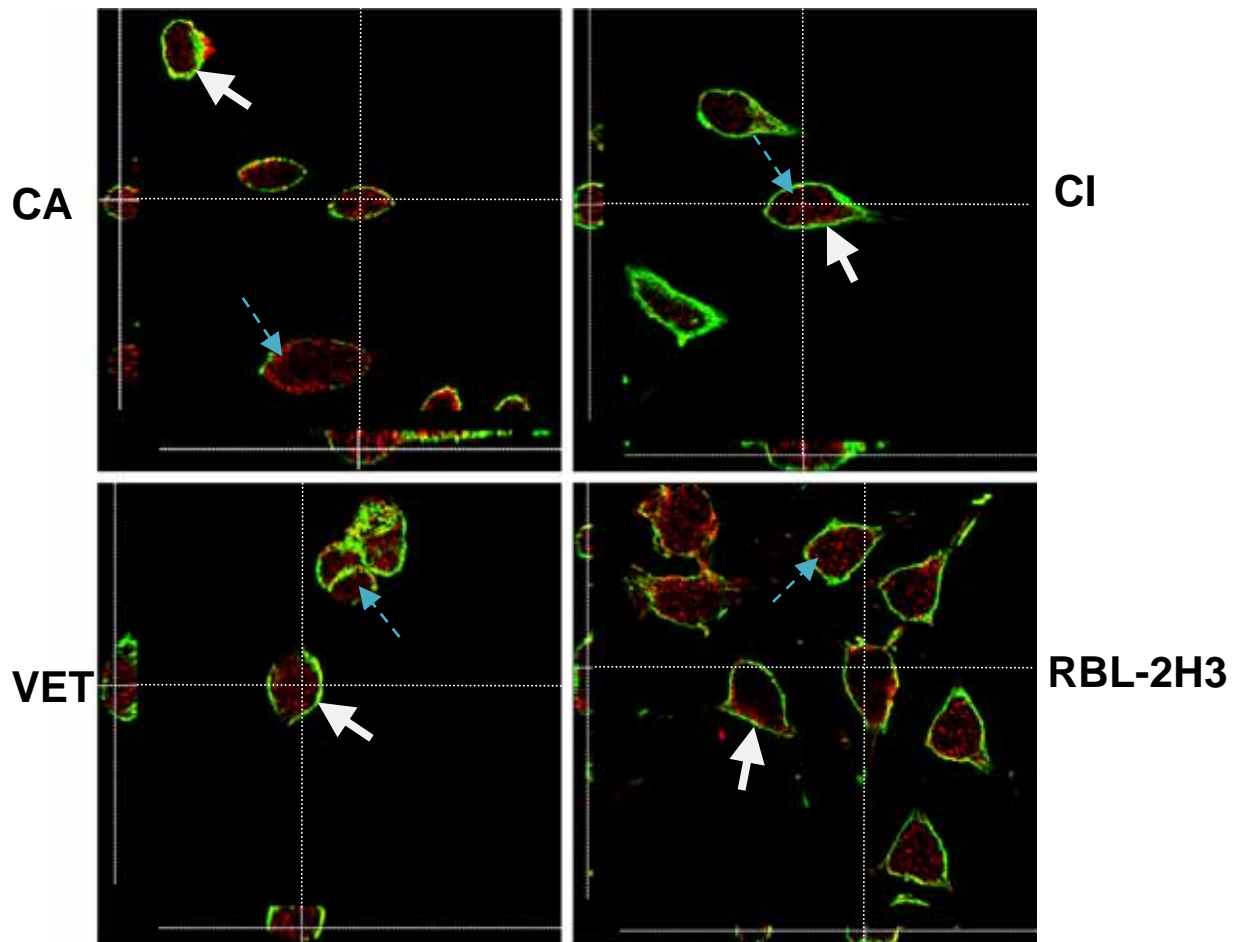


Figura 14. A distribuição dos gangliosídeos derivados de GD_{1b} é diferente da localização da enzima PLD2. Os cortes longitudinais das imagens da Figura 13 confirmam que os gangliosídeos não estão associados com a enzima PLD2 nas células CA, CI, VET e RB-2H3. As setas brancas indicam os gangliosídeos derivados do GD_{1b} localizados na membrana plasmática. As setas azuis indicam a PLD2 localizada no interior da célula. Imagens obtidas em microscópio confocal Leica modelo SP5.

5. A enzima PLD2 é essencial para a manutenção da estrutura do aparelho de Golgi

Os resultados mostraram uma concentração da PLD2 na região justanuclear (conforme mostrado na Figura 12). Para confirmar estes achados realizamos a imunomarcação com anti-GM130 e com o anticorpo anti-PLD2. Os resultados mostraram uma associação da PLD2 com o Golgi. Nas células CI, CA, VET e RBL-2H3 o aparelho de Golgi possui uma localização justanuclear. A co-localização entre a PLD2 e o aparelho de Golgi é melhor observada nas células CI. Entretanto, a observação mais importante foi com relação à estrutura do aparelho de Golgi. Nas células CA o aparelho de Golgi é maior quando comparado com as demais

linhagens. Já nas células CI o aparelho de Golgi é mais disperso em relação às outras linhagens. As células VET e RBL-2H3 apresentam um aparelho de Golgi mais condensado em relação às células CA (Figura 15).

As diferenças morfológicas no aparelho de Golgi observadas entre as quatro linhagens foram avaliadas por microscopia confocal. Nas células CA o aparelho de Golgi é alongado e bem desenvolvido. Já nas células CI o aparelho de Golgi está mais distendido. Nas células VET o aparelho de Golgi é mais alongado, enquanto que nas células RBL-2H3 o aparelho de Golgi é bem compacto (Figura 16).

O nível de expressão da proteína GM130 foi investigado por *Western blotting* para cada linhagem celular (Figura 17). Para a quantificação das bandas os lisados foram preparados com o mesmo número de células. A expressão de GM130 é parecida nas células CA, VET em comparação com as células RBL-2H3. Já nas células CI a expressão de GM130 é 46% menor em relação às células RBL-2H3 (Figura 17). Estes resultados sugerem que a falta de PA pode estar afetando algum mecanismo para o transporte de GM130 para o aparelho de Golgi.

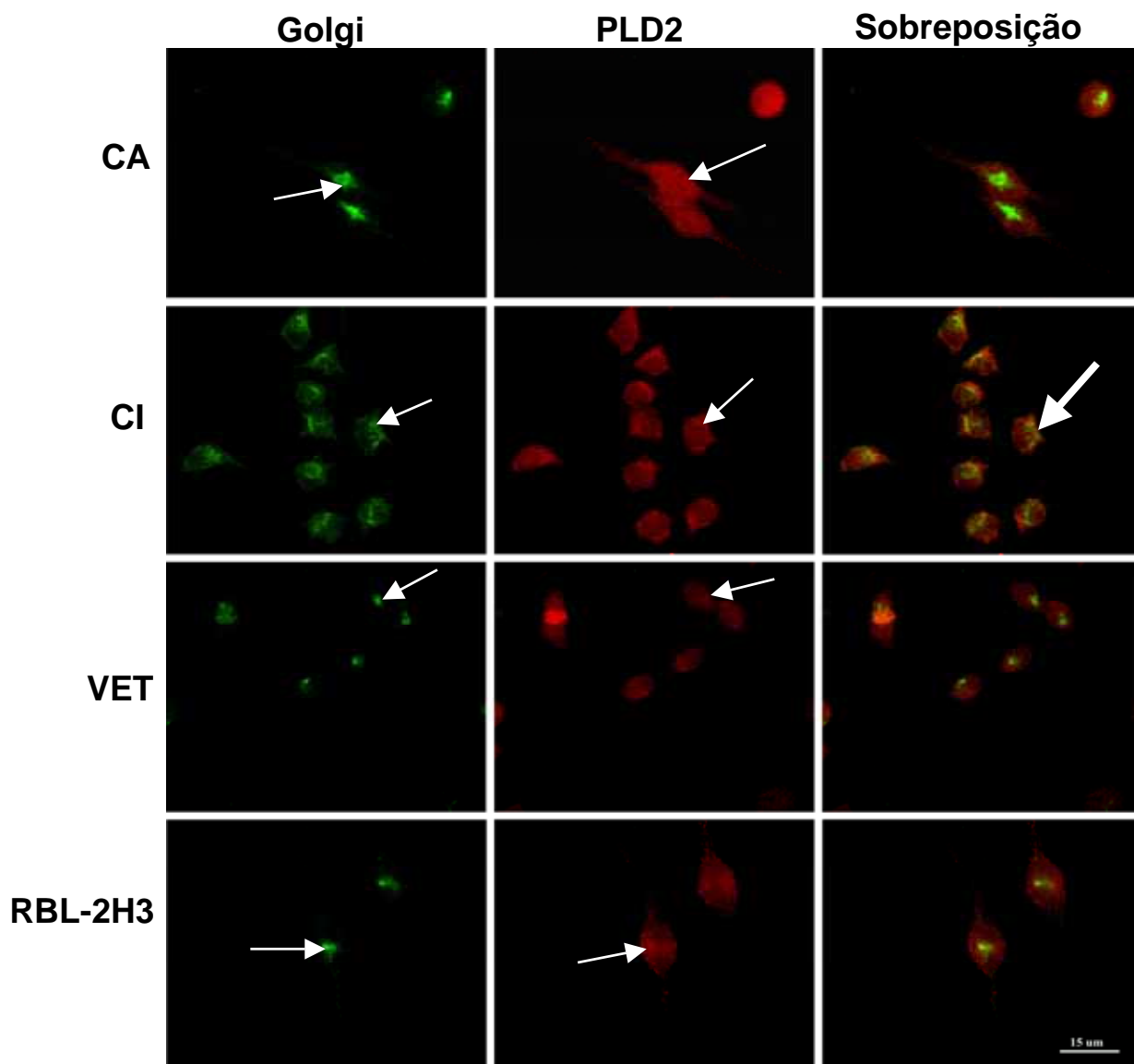


Figura 15. Nas células CI a PLD2 se co-localiza com a proteína GM130. Nas células CA, CI, VET e RBL-2H3 o aparelho de Golgi, imunomarcado pelo anti-GM130, está próximo à região nuclear. Aparelho de Golgi e locais de maior concentração da enzima PLD2 (setas brancas). As áreas de maior concentração da PLD2 parecem se co-localizar com o aparelho de Golgi, especialmente nas células CI. As imagens foram obtidas por microscópio Olympus B50 com o uso do programa de deconvolução Image Pro-Plus.

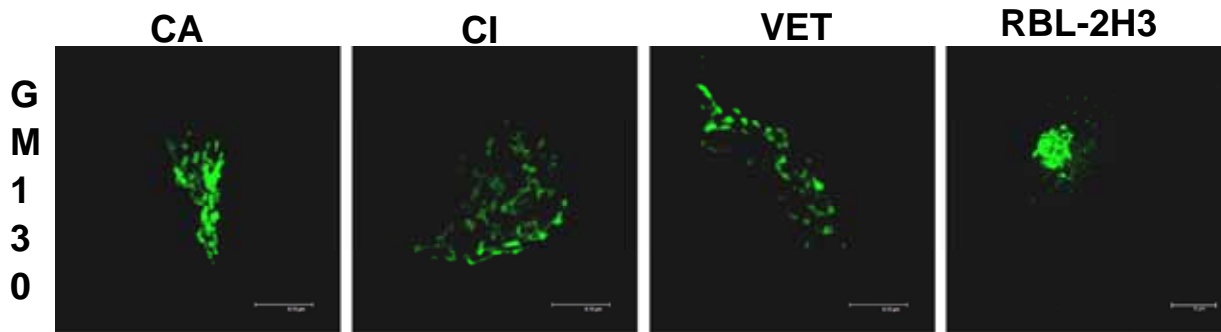


Figura 16. O aparelho de Golgi das células CI é mais distendido em relação às células CA, CI, VET e RBL-2H3. Nas células CA o aparelho de Golgi é mais alongado e nas células CI é mais distendido. Nas células VET o aparelho de Golgi é mais estreito e nas RBL-2H3 é mais compacto. Imagens obtidas pelo microscópio confocal Leica modelo SP2.

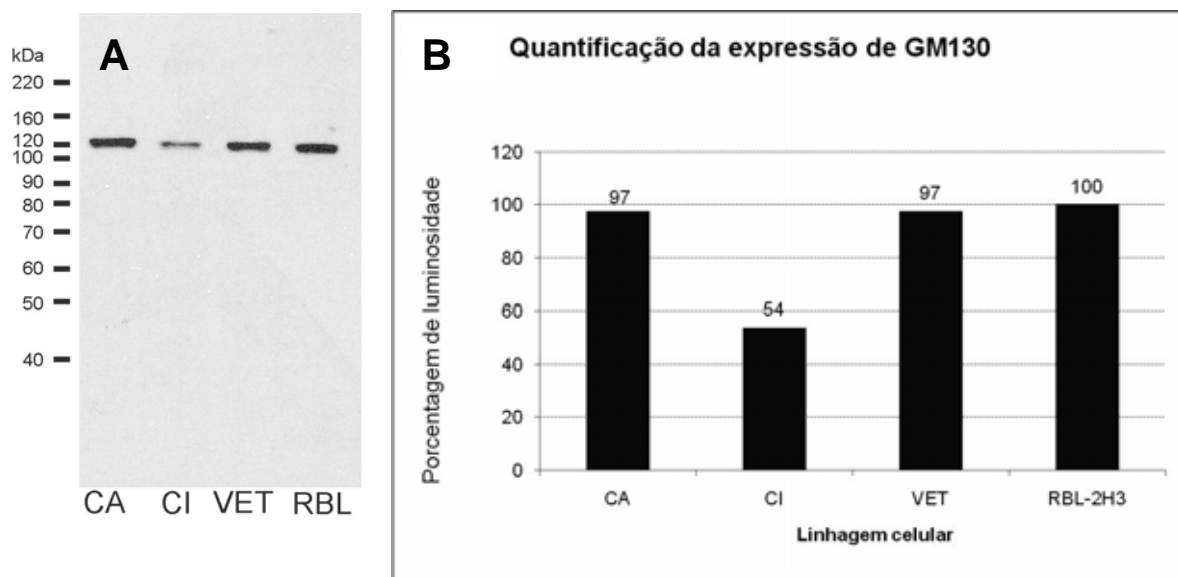


Figura 17. As células CI expressam menos GM130 em relação às outras linhagens celulares. A. *Western Blot* foi imunomarcado com anti-GM130. B. As células CA, CI e VET expressam 97%, 54% e 97%, respectivamente de GM130 em comparação com as células RBL-2H3 (100%).

6. 1-Butanol a 1% não interfere com a viabilidade das células RBL-2H3

A enzima PLD hidrolisa PC produzindo PA e colina (Figura 2). O álcool primário 1-Butanol substitui eficientemente a água nesta reação levando a produção de colina e

fosfatidilbutanol (O'Luanaigh *et al.*, 2002). Desse modo, 1-Butanol é um importante inibidor da formação de PA sintetizado pela PLD. O 1-Butanol foi utilizado com o objetivo de reproduzir as alterações estruturais observadas nas células CI já que estas células não produzem PA. A viabilidade celular após o tratamento com 1-Butanol foi avaliada com azul de Tripán. Os resultados demonstram que 1-Butanol a 1% não altera a viabilidade celular durante os tempos investigados (Figura 18). Ainda, quando as células foram tratadas com 1-Butanol a 2% por até 20 minutos, não ocorre alterações na viabilidade celular. Porém, com tempos mais longos, 2% de 1-Butanol causa uma diminuição da viabilidade celular. O uso de 3%, 4% ou 5% de 1-Butanol por até 10 minutos não afeta a viabilidade celular, o que não ocorre com tempos mais longos. Estes resultados foram confirmados com o uso de iodeto de propídeo (Figura 19). Baseado nestes resultados os experimentos para avaliar o comportamento morfológico e funcional das linhagens celulares foram realizados com 1% ou 2% de 1-Butanol por 10 ou 20 minutos.

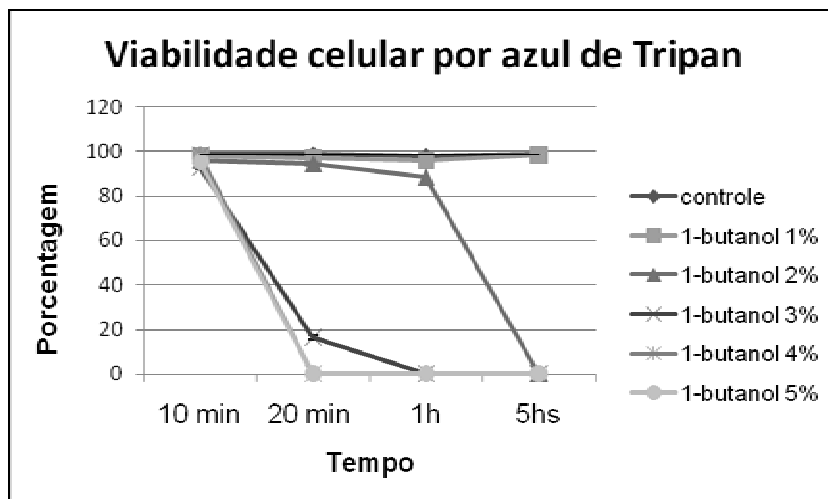


Figura 18. 1% de 1-Butanol não afeta a viabilidade das células RBL-2H3. Observar que células RBL-2H3 incubadas em concentrações maiores que 2% de 1-Butanol por mais que 20 minutos não sobreviveram (n=2).

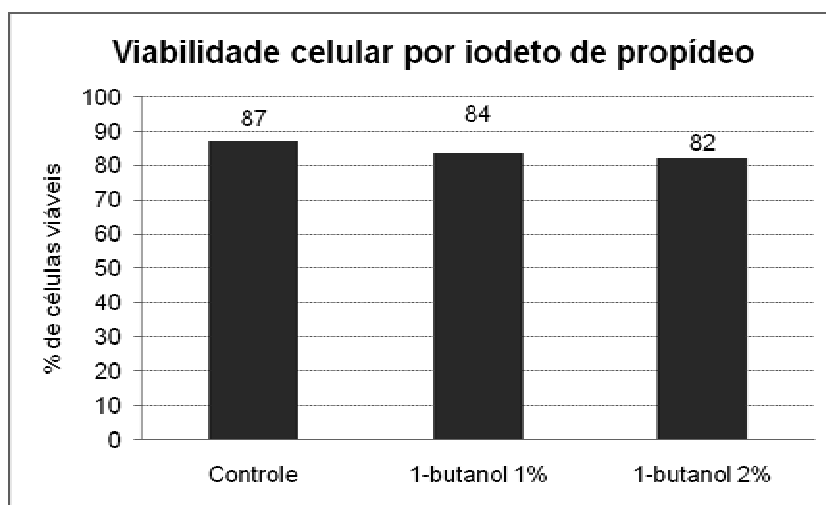


Figura 19. A viabilidade celular não é afetada após incubação com 1-Butanol. Citometria de fluxo com iodeto de propídeo mostra que a incubação com 1% ou 2% de 1-Butanol por 10 minutos não afeta a viabilidade celular (n=2).

7. A incubação com 1-Butanol resultou na desorganização da face cis do aparelho de Golgi

As células CA, CI, VET e RBL foram incubadas com 1-Butanol a 1% por 20 minutos, fixadas e imunomarcadas com anti-GM130. As células CA, CI, VET e RBL-2H3 apresentaram uma desorganização aparente da estrutura do aparelho de Golgi. Estes resultados mostram que o PA pode ser importante na manutenção da organização das cisternas do aparelho de Golgi em células RBL-2H3 (Figura 20).

Para investigar se as alterações na estrutura do aparelho de Golgi eram relacionadas com o uso do 1-Butanol, as células CA foram incubadas em diferentes concentrações deste álcool (0,1%, 1% e 1,5%) e imunomarcadas com anti-GM130. As células CA foram usadas com o objetivo de se verificar se o fenótipo das células CI poderia ser reproduzido. Observou-se uma desorganização progressiva do aparelho de Golgi com o aumento da concentração de 1-Butanol, em relação ao controle (Figura 21).

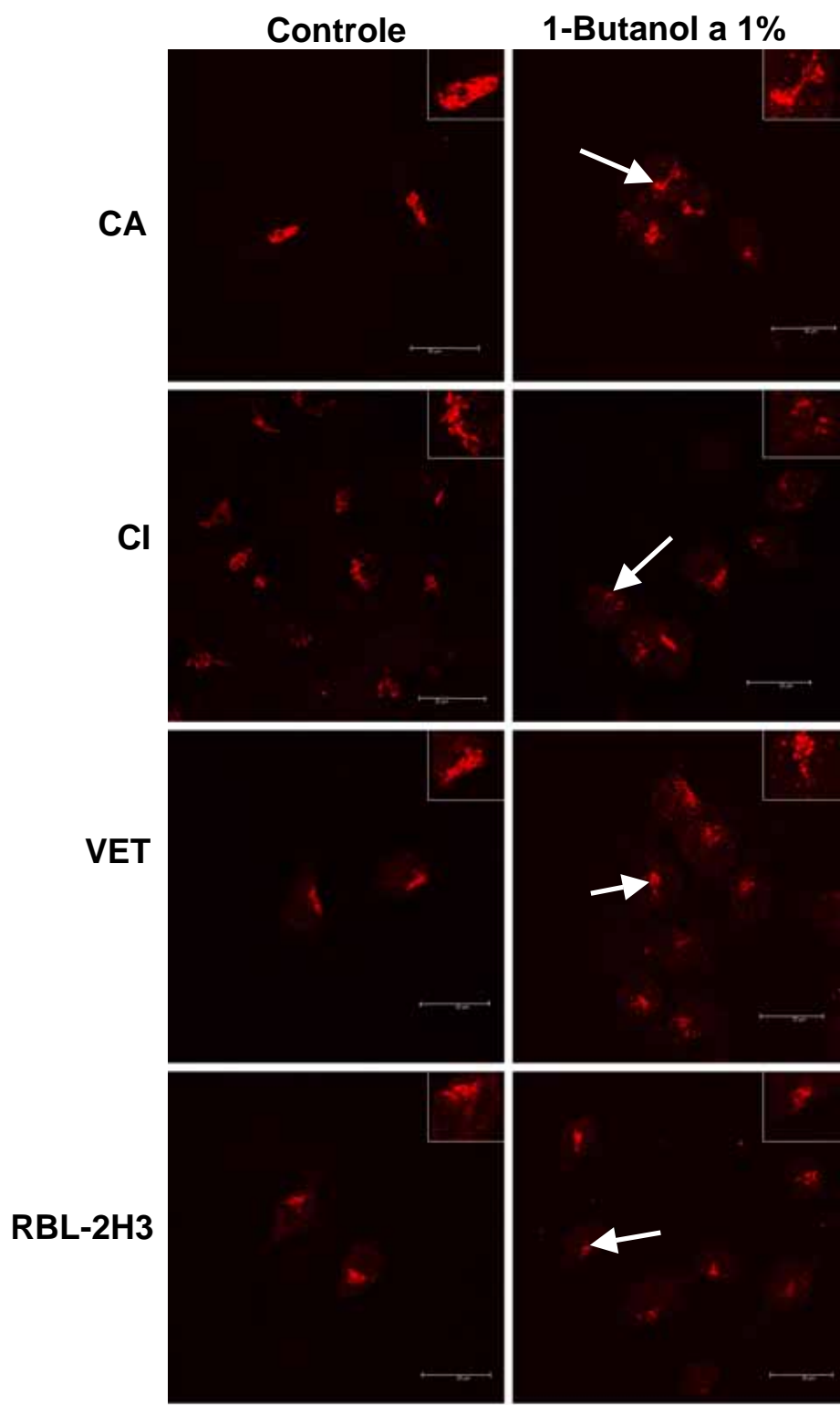


Figura 20. O tratamento com 1-Butanol altera a distribuição da rede cis Golgi nas linhagens celulares. As células foram incubadas com 1-Butanol a 1% por 20 minutos, fixadas e imunomarcadas com o anticorpo anti-GM130. Nas linhagens celulares incubadas com 1-Butanol observou-se uma desorganização do aparelho de Golgi (setas), em relação ao controle. O detalhe mostra um aumento do aparelho de Golgi. Imagens obtidas pelo microscópio confocal Leica modelo SP2.

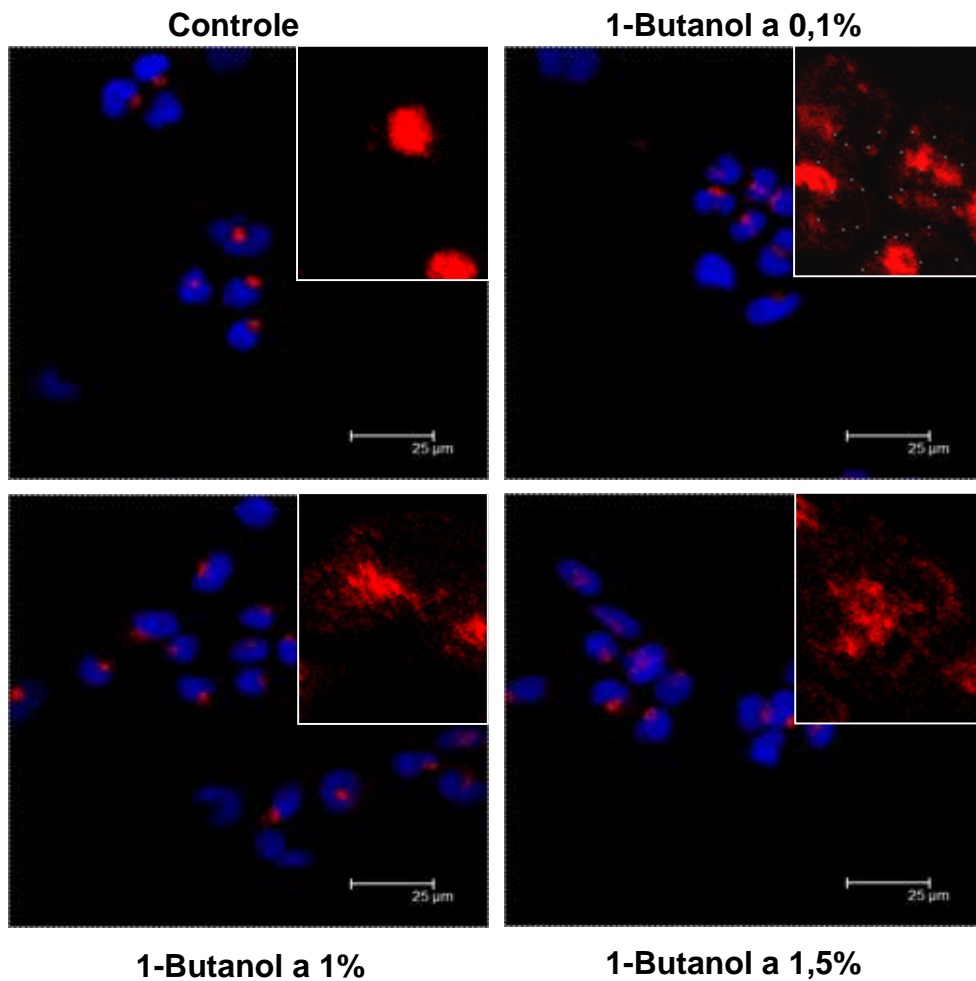


Figura 21. A desestruturação do aparelho de Golgi é dependente da concentração do **1-Butanol**. Observa-se uma maior desorganização do aparelho de Golgi relacionada com o aumento da concentração de 1-Butanol. O controle foi incubado com PBS. A face cis do aparelho de Golgi foi imunomarcada com o anticorpo anti-GM130 e o núcleo foi corado com DAPI. Detalhe mostrando o aparelho de Golgi. Imagens obtidas pelo microscópio confocal Leica modelo SP2.

As diferenças observadas no aparelho de Golgi entre as linhagens por microscopia confocal também foram verificadas em detalhes através da microscopia eletrônica de transmissão (Figura 22). O aparelho de Golgi nas células CA é bem organizado apresentando numerosas cisternas paralelas associadas à pequenas vesículas. Entretanto, nas células CI, o aparelho de Golgi possui um número reduzido de cisternas desorganizadas e dilatadas. Ainda,

apresentam vesículas espalhadas por toda a região do aparelho de Golgi. As células VET possuem um aparelho de Golgi reduzido em comparação com as células RBL-2H3 que possuem um aparelho de Golgi compacto e bem-organizado. Estas observações confirmam a nossa hipótese de que a PLD2 possui um papel na manutenção estrutural do aparelho de Golgi. Quando as linhagens estudadas foram incubadas com 1-Butanol e observadas por microscopia eletrônica de transmissão, todas estas linhagens apresentaram as mesmas alterações no complexo de Golgi. O aparelho de Golgi estava desorganizado com cisternas dilatadas e vesículas dilatadas. Estas modificações do complexo de Golgi foram mais evidentes nas células CI em comparação com as demais linhagens (Figura 22). Estas observações mostram que tanto a falta da atividade catalítica da PLD2 (no caso das células CI), quanto à inibição da produção de PA (pelo 1-Butanol), interferem com a manutenção estrutural do aparelho de Golgi. Provavelmente a estrutura do aparelho de Golgi é sustentada pela produção de PA produzido pela PLD2.