

8. A incubação com PA recupera a organização estrutural do aparelho de Golgi das células CI

Após a incubação com 10 mg/mL de PA as células CI passaram a apresentar um aparelho de Golgi compacto e estruturalmente organizado. As demais linhagens não apresentaram alterações significantes no complexo de Golgi após a incubação com PA (Figura 23).

Para comprovar que a recuperação estrutural do aparelho de Golgi esta realmente relacionada com a presença de PA, as células CI foram incubadas com diferentes doses de PA por vários tempos. Ainda a face cis do aparelho de Golgi foi imunomarcada com o anticorpo anti-GM130. As células CI não incubadas com PA apresentam um aparelho de Golgi desorganizado e disperso pelo citoplasma. Com 1 hora de incubação com PA já foi possível observar uma leve condensação do aparelho de Golgi. Com 24 e 48 horas de incubação observa-se uma maior condensação do aparelho de Golgi. Com 72 horas aparelho de Golgi volta a se desorganizar, provavelmente, devido a falta de PA no meio, uma vez que foi metabolizado pelas células. Com 20 mg/mL de PA nos mesmos tempos (1 hora, 24 e 48 horas), também se observou a condensação do aparelho de Golgi, em relação às células CA não tratadas. Os mesmos resultados foram observados com 30 mg/mL de PA por 1 hora e 24 horas de incubação, porém com 24 horas se observou o mesmo resultado encontrado com 10 mg/mL de PA por 48 horas (Figura 24).

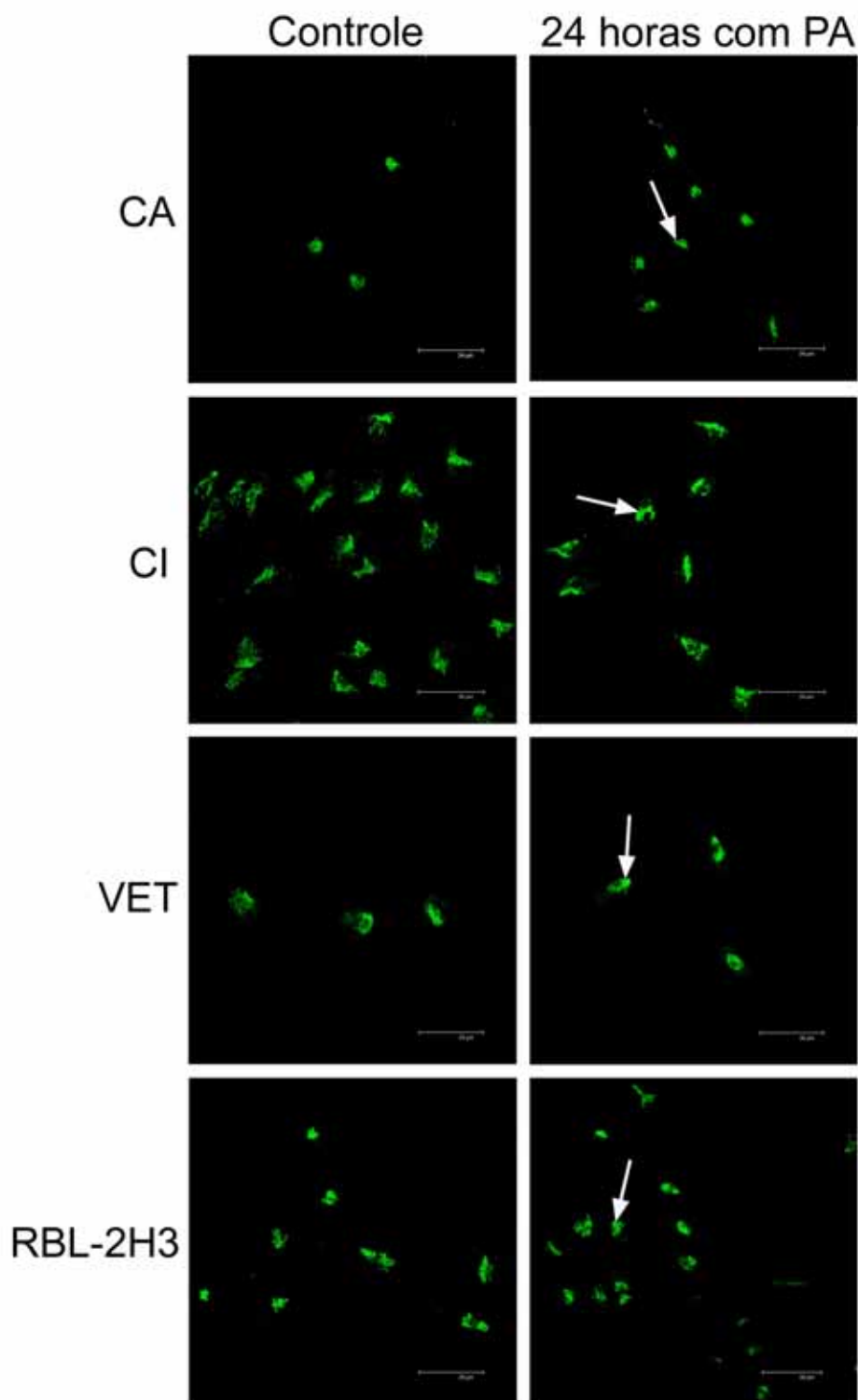
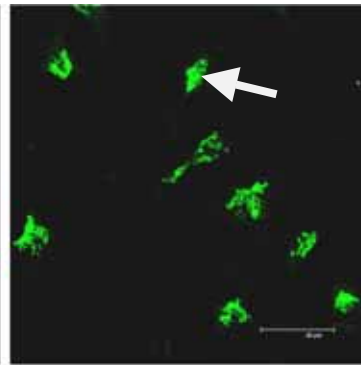
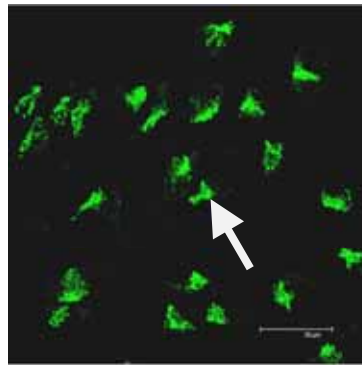


Figura 23. O PA recupera a estrutura do aparelho de Golgi em células CI. As linhagens foram incubadas por 24 horas com 10 mg/mL de PA. As células CA não mostram alterações estruturais do aparelho de Golgi após incubação com PA. Nas células CI o aparelho de Golgi apresenta recuperação estrutural e aparece condensado. As células VET apresentam uma pequena reorganização estrutural do aparelho de Golgi. As células RBL-2H3 não sofrem alterações estruturais no aparelho de Golgi (Aparelho de Golgi imunomarcado com o anti-GM130, setas). Imagens obtidas pelo microscópio confocal Leica modelo SP2.

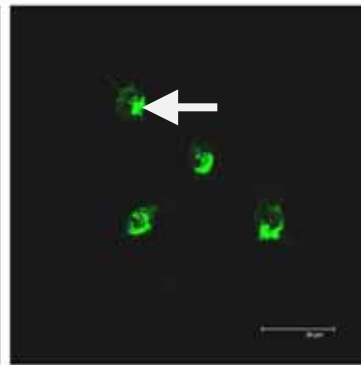
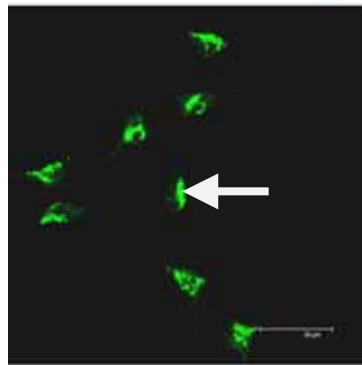
Células CI

Sem Tratamento



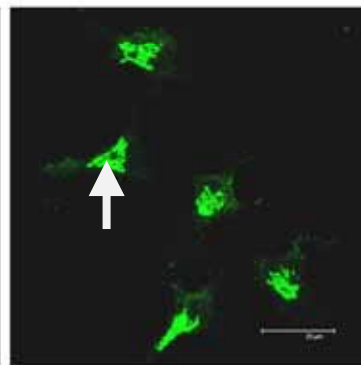
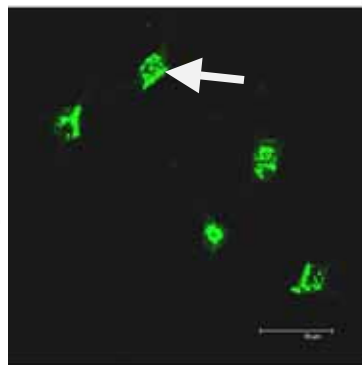
1 hora
10 mg/mL

24 horas
10 mg/mL



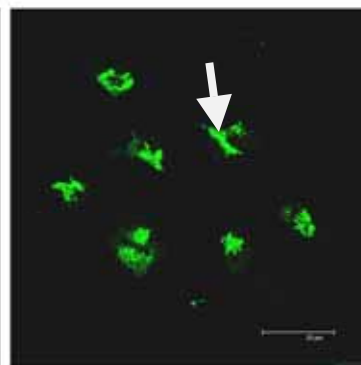
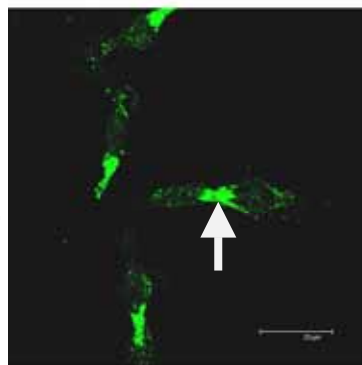
48 horas
10 mg/mL

72 horas
10 mg/mL



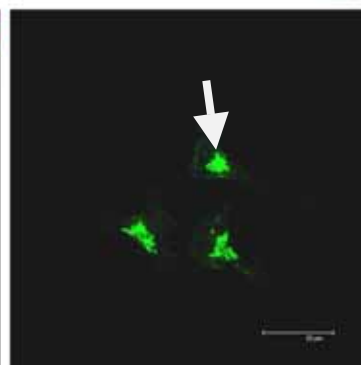
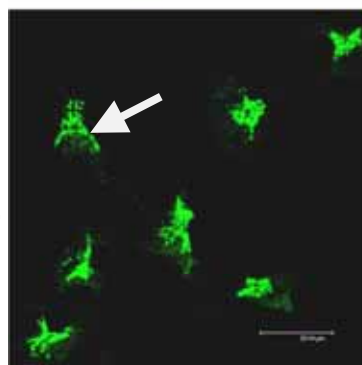
1 hora
20 mg/mL

24 horas
20 mg/mL



48 horas
20 mg/mL

1 horas
30 mg/mL



24 horas
30 mg/mL

Figura 24. A recuperação estrutural do aparelho de Golgi pelo PA nas células CI ocorre de maneira tempo e dose dependentes. As células CI foram incubadas ou não com PA e imunomarcadas com anti GM130 (Aparelho de Golgi, setas). Imagens obtidas pelo microscópio confocal Leica modelo SP2.

9. Os microtúbulos apresentam uma distribuição desordenada em células CI estimuladas via FcεRI

As células foram imunomarcadas com o anticorpo anti-β-tubulina para evidenciar a estrutura dos microtúbulos, e também com o anticorpo anti-PLD2 (Figuras 25 e 26). Nas células CA, VET e RBL-2H3 não estimuladas os microtúbulos formam feixes seguindo o maior eixo destas células, que são fusiformes. Já nas células CI os microtúbulos acompanham a forma estrelada destas células. Nas células CA, CI, VET e RBL-2H3 a enzima PLD2 encontra-se dispersa por todo o citoplasma, onde se observa alguns pontos de acúmulo desta enzima. Nas células CA, após 15 minutos de estímulo, os microtúbulos estão distribuídos de forma radial a partir do centro organizador de microtúbulos localizado próximo ao aparelho de Golgi. Nas células CA, após 15 minutos de estímulo, a distribuição da PLD2 está alinhada com os microtúbulos seguindo o seu maior eixo. Em contrapartida, nas células CI estimuladas, os microtúbulos estão desorganizados, não sendo possível identificar o centro organizador de microtúbulos. Já nas células RBL e nas células VET os microtúbulos se distribuem de modo organizado e radial após o estímulo. Após os 15 minutos de estímulo as células CA, CI, VET e RBL-2H3 se espalham no substrato e a PLD2 se redistribui juntamente com os microtúbulos acompanhando as mudanças morfológicas das células. Nas células CA, CI, VET e RBL-2H3, não estimuladas, os microtúbulos estão distribuídos de acordo com a forma das células que estão espalhadas. Porém a PLD2 está concentrada em algumas regiões da célula. Quando as células CA, VET e RBL-2H3 são estimuladas, a PLD2 está posicionada entre os microtúbulos, porém nas células CI os microtúbulos estão fortemente unidos e a PLD2 não se localiza entre estes microtúbulos (Figura 27).

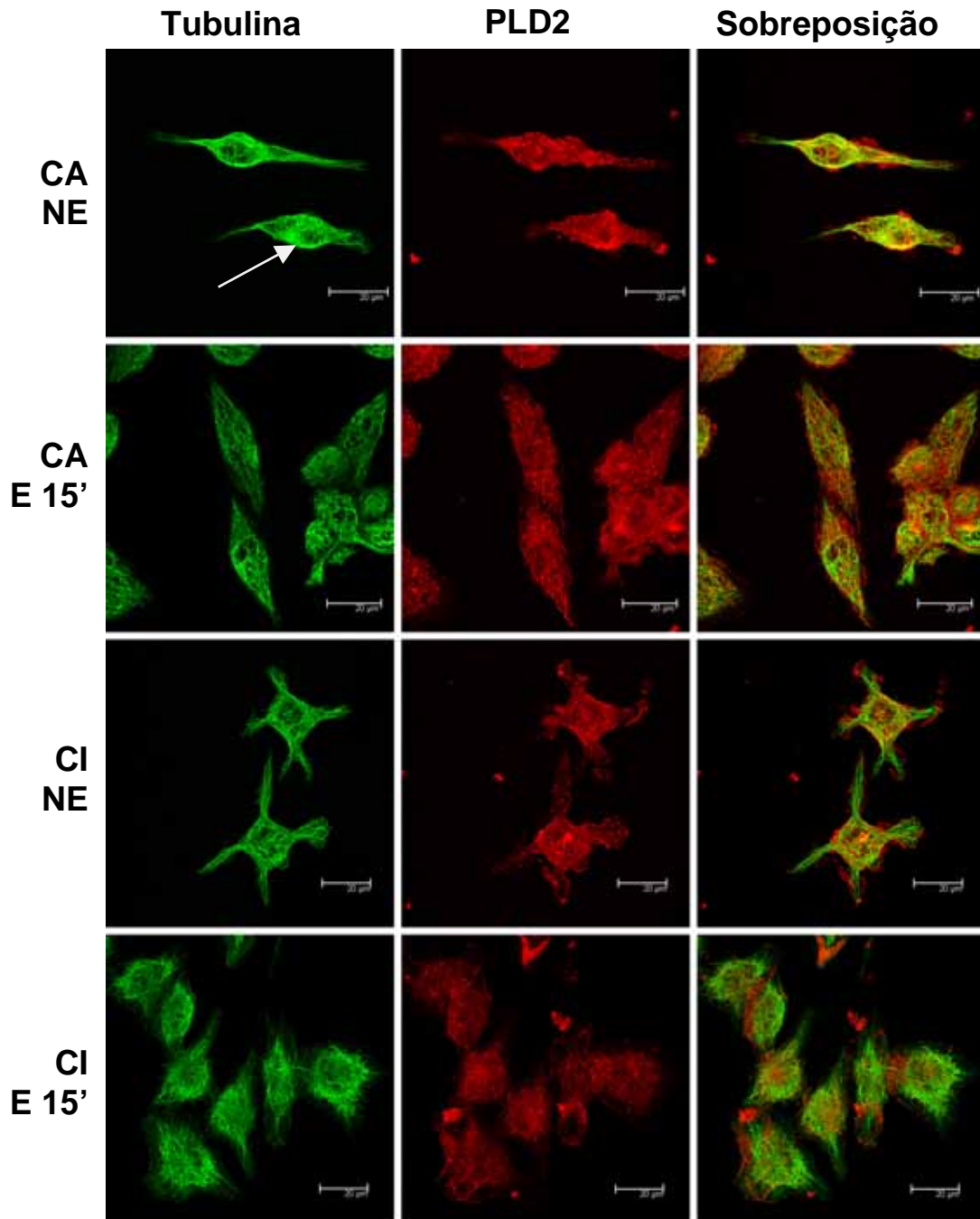


Figura 25. Nas células CI estimuladas os microtúbulos estão desorganizados. Nas células CA e CI não estimuladas os microtúbulos formam feixes distribuídos ao longo do maior eixo das células fusiformes. Nas células CA estimuladas os microtúbulos se distribuem de forma radial a partir do centro organizador de microtúbulos. Nas células CI não ocorre a formação de um centro organizador de microtúbulos. A PLD2 está dispersa por todo o citoplasma das células e a sua distribuição acompanhando as mudanças morfológicas das células estimuladas (Centro organizador dos microtúbulos; setas). Imagens obtidas pelo microscópio confocal Leica modelo SP5.

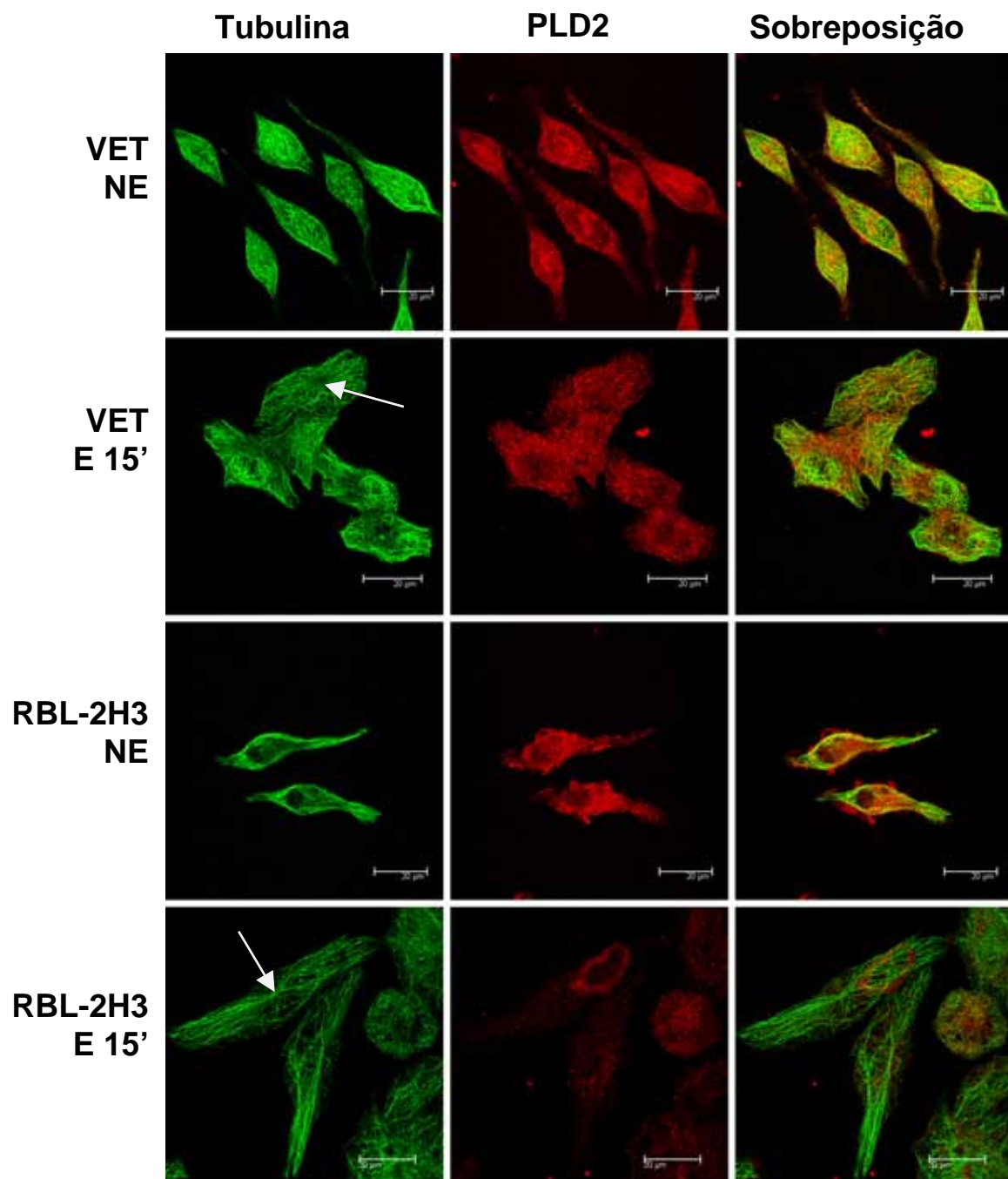


Figura 26. Nas células VET e RBL-2H3 estimuladas observa-se um centro organizador de microtúbulos. Nas células VET e RBL-2H3 não estimuladas a distribuição dos microtúbulos acompanha a forma fusiforme das células. Após 15 minutos de estímulo os microtúbulos possuem uma distribuição radial e se encontram espalhados por toda a célula (Centro organizador dos microtúbulos; setas). Imagens obtidas pelo microscópio confocal Leica modelo SP5.

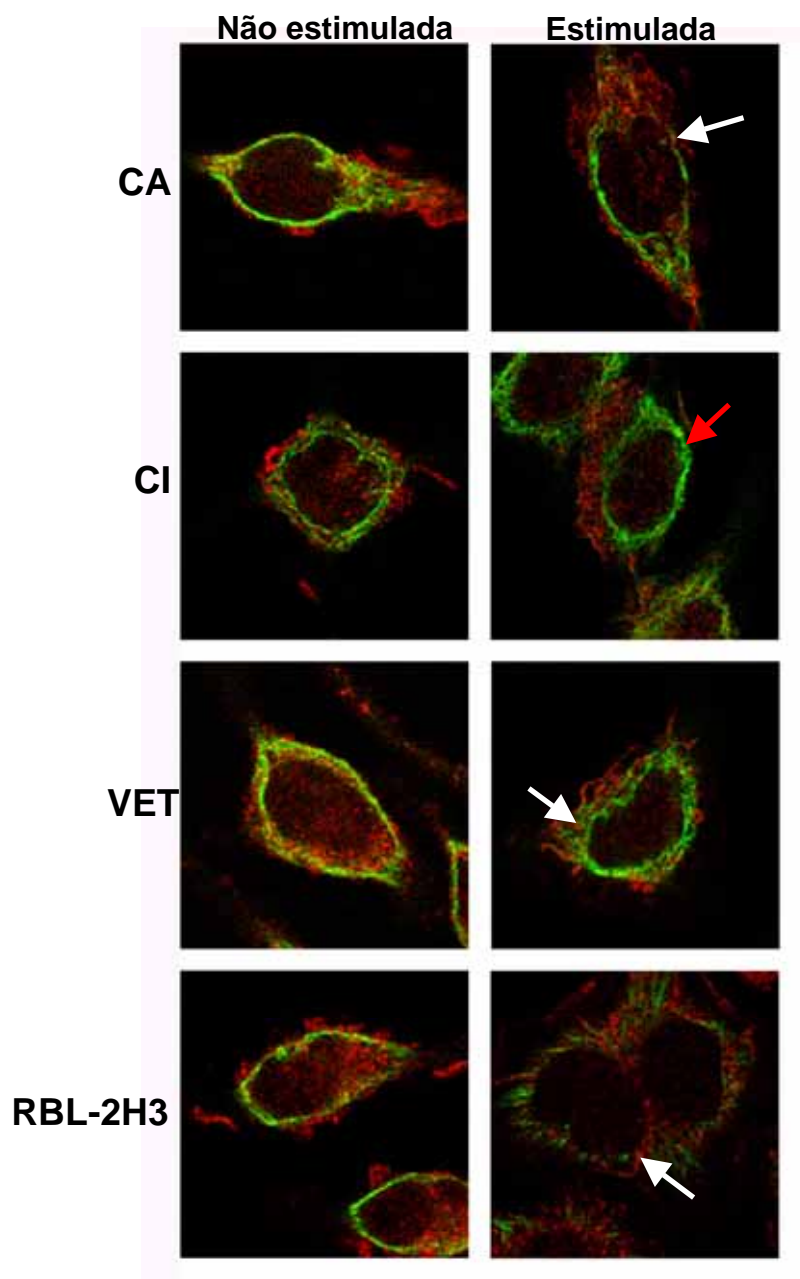
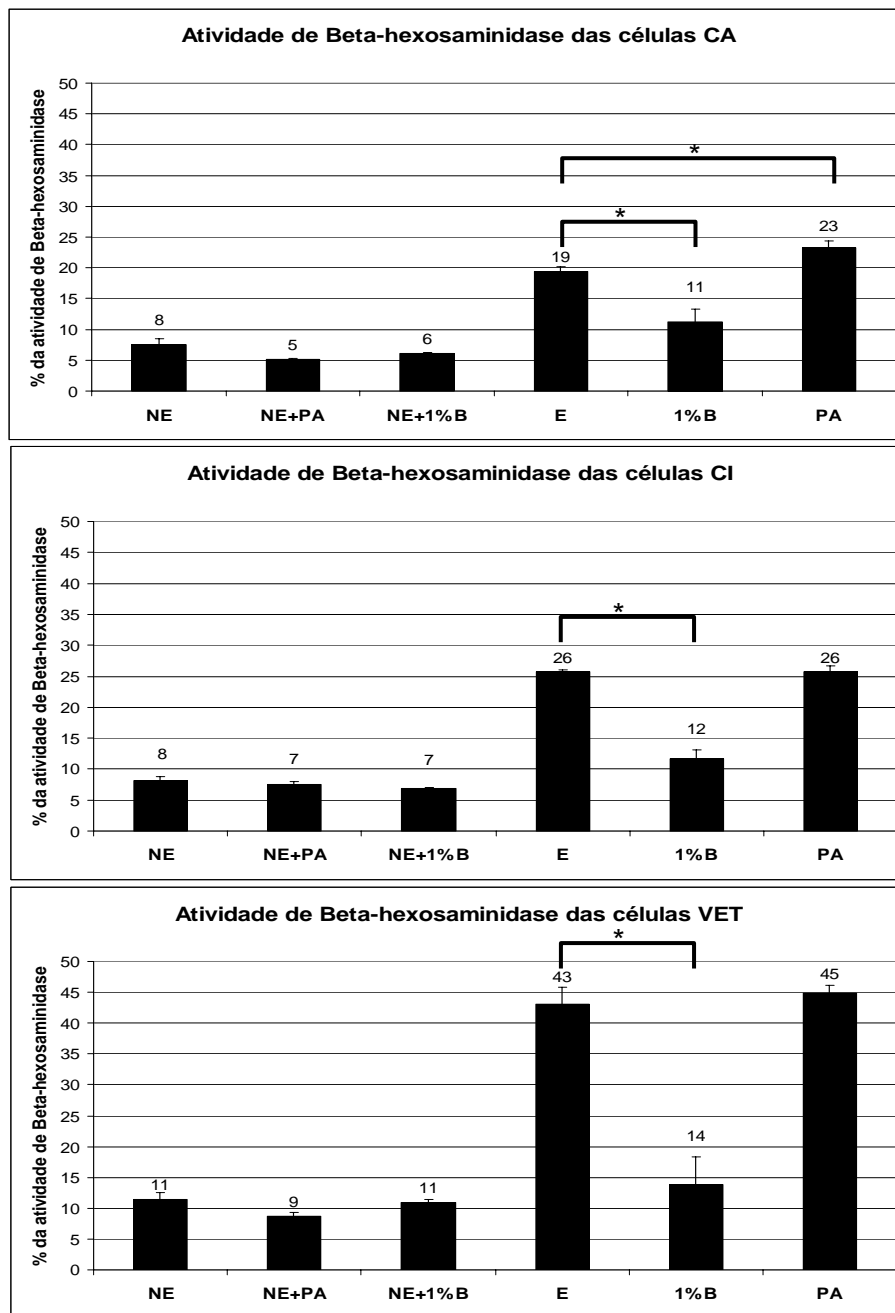


Figura 27. Nas células CI a PLD2 não se localiza entre os microtúbulos. Nas células CA, VET e RBL-2H3 estimuladas a PLD2 está entre os microtúbulos (seta vermelha). Nas células CI os microtúbulos estão unidos e a PLD2 não se localiza entre os microtúbulos (seta vermelha). (Tubulina, setas brancas; Concentrações de PLD2, setas azuis) Os cortes transversais são as sobreposições das Figuras 25 e 26. Imagens obtidas pelo microscópio confocal Leica modelo SP5.

10. As células CA possuem um aumento na atividade de β -hexosaminidase liberada após tratamento com PA

A atividade da β -hexosaminidase liberada foi detectada nas linhagens transfectadas após a incubação com PA a 10 mg/mL ou 1-Butanol a 1%. As linhagens celulares foram sensibilizadas com IgE anti-TNP e estimuladas com DNP-HSA por 15 minutos e apresentaram 19%, 26%, 43% e 44% de atividade de β -hexosaminidase liberada, respectivamente. Quando as células CA, CI, VET e RBL-2H3 foram estimuladas pelo mesmo tempo na presença de PA foram obtidos 23%, 26%, 45% e 43% de atividade liberada, respectivamente. A liberação da atividade de β -hexosaminidase foi significativamente maior nas células CA em comparação com as células CA não incubadas com PA. Quando tratadas com 1-Butanol a 1%, sensibilizadas e estimuladas por 15 minutos as células CA, CI, VET e RBL-2H3 apresentam uma diminuição da atividade de atividade de β -hexosaminidase liberada para 11%, 12%, 14% e 18%, respectivamente. Na ausência de estímulo as células CA, CI, VET e RBL-2H3 possuem uma atividade de β -hexosaminidase liberada de 8%, 8%, 11% e 9%, respectivamente. Como controle foi realizado o tratamento com PA ou 1-Butanol na ausência de estímulo e foram obtidos valores semelhantes aos valores das células não estimuladas. Portanto o tratamento com PA ou com 1-Butanol não interfere na liberação basal da atividade da β -hexosaminidase. Os resultados mostram que o tratamento com PA não estimula a liberação de β -hexosaminidase ocorrendo apenas um pequeno aumento nas células CA e VET de 3,8% e 1,8% respectivamente. Sendo que, o aumento observado entre as células CA apenas estimuladas e estimuladas na presença de PA é significativo. Já com relação à adição de 1-Butanol a 1% observou-se uma diminuição estatisticamente significativa na atividade da β -hexosaminidase liberada em todas as células estimuladas. A diminuição da liberação foi de 8%, 12%, 25% e 44% para as células CA, CI, VET e RBL-2H3 estimuladas

com 1-Butanol, respectivamente, em relação às células apenas estimuladas. Estes dados demonstram a importância da atividade catalítica da PLD no processo de desgranulação dos mastócitos através do FcεRI (Figura 28).



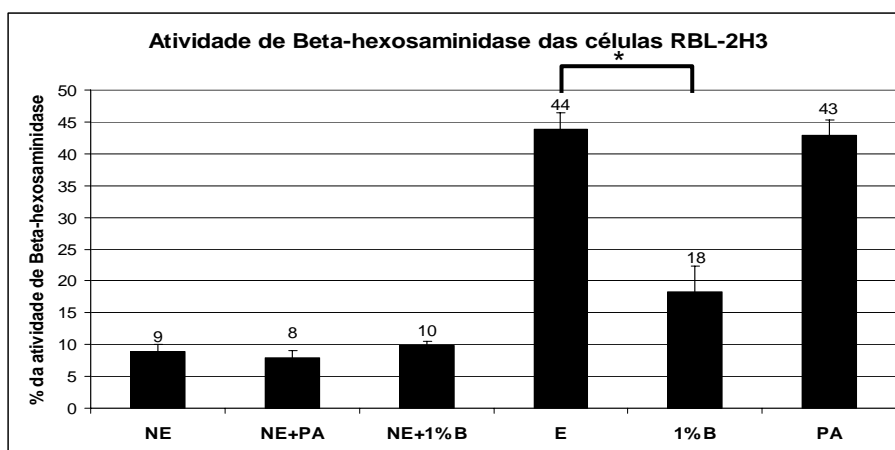


Figura 28. PA regula a atividade de β -hexosaminidase liberada. Células CA estimuladas na presença de PA apresentaram um aumento significativo (*) na atividade de β -hexosaminidase liberada em relação às células CA estimuladas na ausência de PA. Células CI, VET e RBL-2H3 estimuladas na presença de PA apresentam uma liberação de β -hexosaminidase semelhante à das células estimuladas na ausência de PA. Nas células estimuladas na presença de 1% de 1-Butanol ocorre uma redução significativa (*) na atividade de β -hexosaminidase liberada em comparação com células estimuladas sem 1-Butanol. As células foram sensibilizadas com IgE anti-TNP e em alguns experimentos as células foram estimuladas com DNP-HSA, por 15 minutos. Células não estimuladas (NE), células NE incubadas na presença de PA (NE+PA) e células NE incubadas na presença de 1-Butanol a 1% (NE+1%B). Células estimuladas (E), células estimuladas e incubadas com 1-Butanol a 1% (1%B) e células estimuladas e incubadas com ácido fosfatídico (PA). Os valores obtidos com o desvio padrão são inferiores a 5%, (n=3).

11. Após a incubação com PA os grânulos secretores das células CA, CI, VET e RBL-2H3 se concentram na região perinuclear

Para verificar uma possível participação do PA na distribuição dos grânulos secretores nas células transfectadas, principalmente nas células CI, as quais produzem uma menor quantidade de PA em relação às células CA (Hitomi *et al.*, 2004), as células foram incubadas com PA na concentração de 10 mg/mL, por 1 e 24 horas (Figura 29 e 30). As células foram imunomarcadas com o anticorpo mAb AD1 que reconhece o CD 63 na membrana dos grânulos secretores. Nas células CA, os grânulos citoplasmáticos estão pouco agrupados, enquanto que nas células CI os grânulos citoplasmáticos formam extensos agregados (Figura

29). Nas células VET e RBL-2H3, os grânulos estão dispersos por toda a célula (Figura 30). Após 1 hora de incubação com PA os grânulos das células CA, CI, VET e RBL-2H3 se localizam nas proximidades da região perinuclear. Porém, com 24 horas de incubação com PA, os grânulos estão bem concentrados na região perinuclear. Estes dados sugerem que o PA também possui um papel na distribuição dos grânulos secretores destas células.

Quando observadas ao microscópio eletrônico de transmissão as células RBL-2H3 apresentam grânulos elétron-densos (Figura 31). Nas células CA e VET os grânulos também são elétron-densos. Já nas células CI os grânulos são elétron-lúcidos.

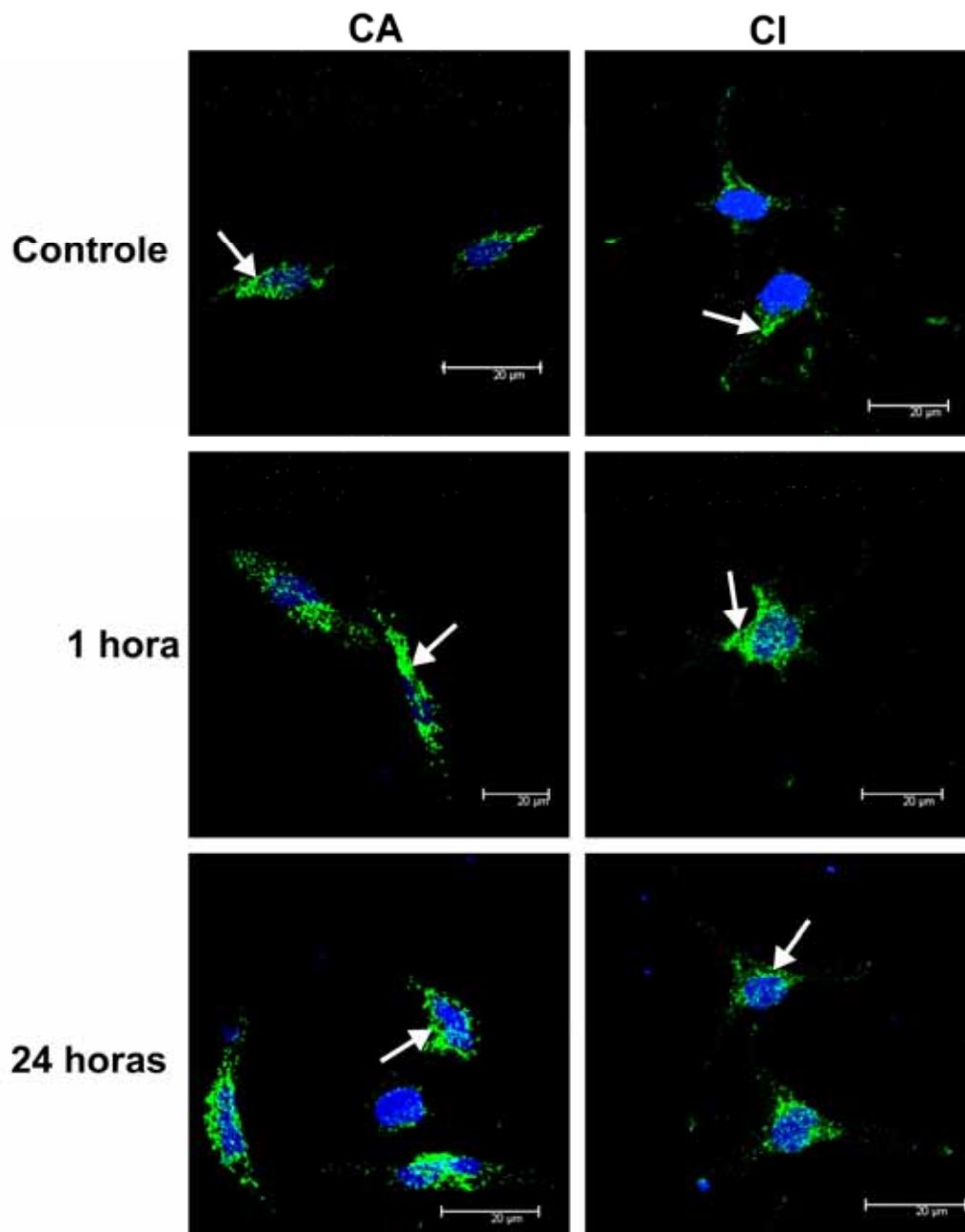
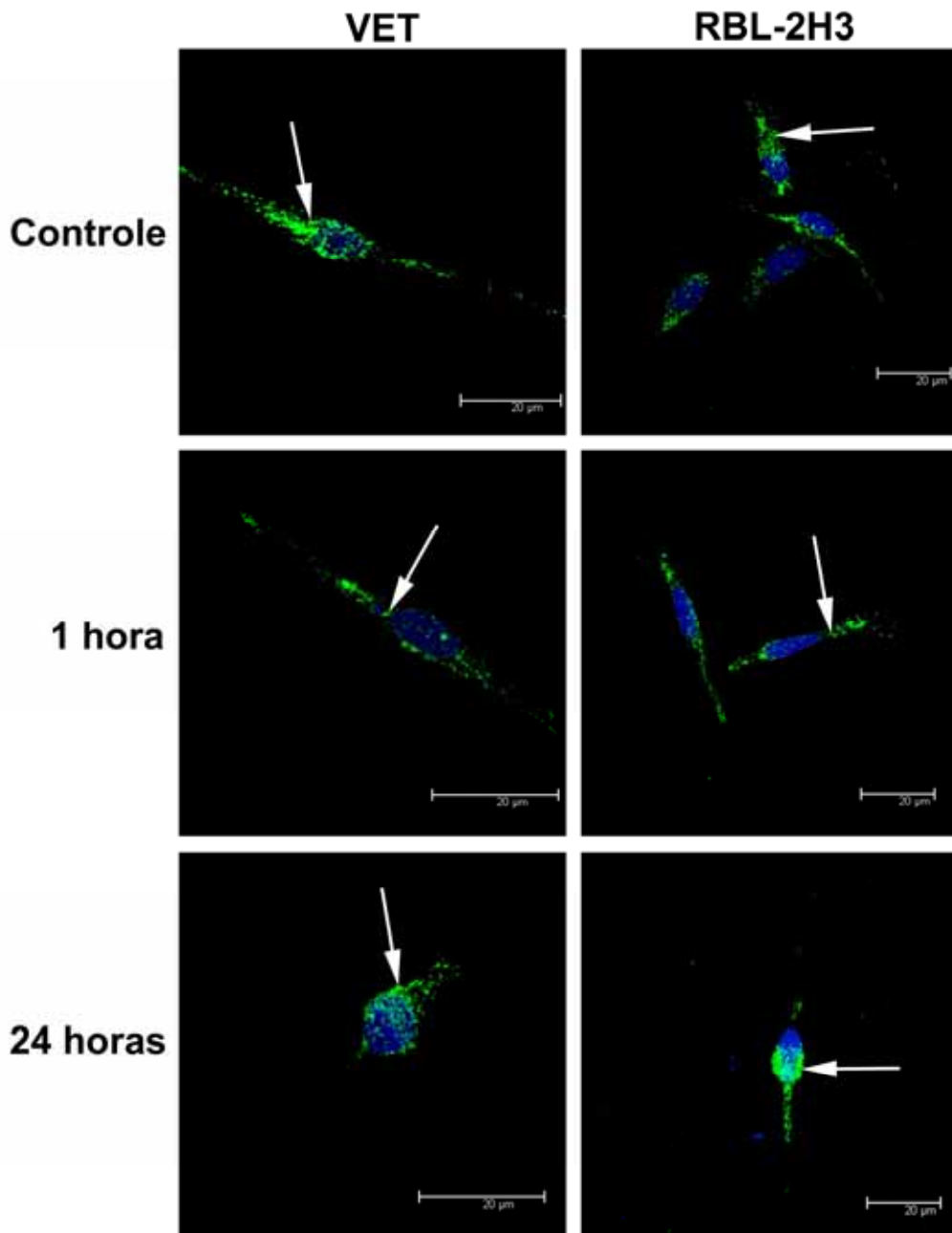


Figura 29. PA afeta a distribuição dos grânulos secretores nas células CA e CI. Nas células CA, os grânulos citoplasmáticos estão pouco agrupados. Nas células CI os grânulos citoplasmáticos formam extensos agregados. Após 1 e 24 horas de incubação com PA os grânulos se concentram na região perinuclear. (Concentrações de grânulos, setas). Os núcleos foram corados com DAPI. Imagens obtidas pelo microscópio confocal Leica modelo SP5.



Fia PA afeta abuição dos grânulos secretores nas células VET e RBL-2H3. Nas células VET e RBL-2H3, os grânulos citoplasmáticos estão dispersos pelo citoplasma, porém nas células RBL-2H3 os grânulos estão um pouco mais concentrados na região perinuclear. Após 1 e 24 horas de incubação com PA os grânulos estão bem concentrados na região perinuclear. (Concentrações de grânulos, setas). Os núcleos foram corados com DAPI. Imagens obtidas pelo microscópio confocal Leica modelo SP5.

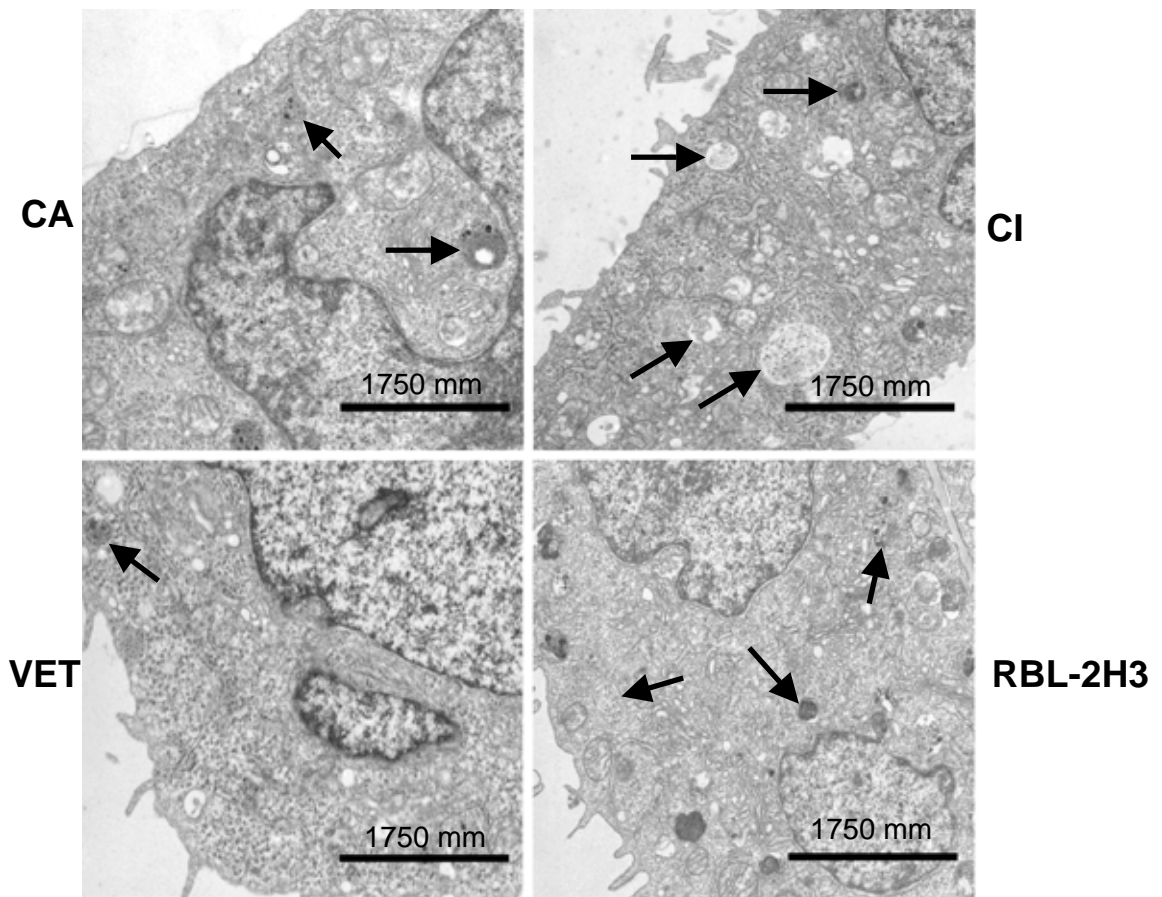


Figura 31. Os grânulos das células CI são mais elétron-lúcidos em relação à linhagem controle. As células CA, CI, VET e RBL-2H3 possuem grânulos espalhados pelo citoplasma. As linhagens celulares CA, VET e RBL-2H3 possuem grânulos mais elétron-densos em relação às células CI. As setas indicam grânulos secretores.