PADRONIZAÇÃO DA MEDIDA DE pH INTRACELULAR EM CÉLULAS 3T3L1 PELA SONDA FLUORESCENTE BCECF

Polyana Taynara Boza Dias (PIC/CNPq/FA/Uem), André Henrique Oler de Novaes (Co-Autor), Maria Ida Bonini Ravanelli Spezial (Coorientadora), Kellen Brunaldi (Orientadora), e-mail: kbrunaldi@gmail.com

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências Biológicas e da Saúde/Maringá, PR.

Área e subárea do conhecimento conforme tabela do CNPq/CAPES: Ciências Biológicas/ Biofísica e Fisiologia Animal

Palavras-chave: BCECF, pH intracelular, membrana plasmática.

Resumo

A avaliação do pH intracelular pode ser uma ferramenta útil no estudo do transporte transmembrana e captação celular de fármacos e moléculas endógenas, como por exemplo ácidos graxos. Portanto, o objetivo deste trabalho foi padronizar a medida de pH intracelular utilizando a sonda fluorescente BCECF-AM em células 3T3L1. Para tal, as células cultivadas em DMEM foram incubadas com 2 μM de BCECF-AM (no escuro, 20 min, 37ºC), tripsinizadas, centrifugadas e ressuspensas em tampão Krebs-MOPS (10^6 células/ml). BCECF foi excitado a 439 nm e 505 nm e a emissão coletada em 535 nm. A razão entre as intensidades de fluorescência (R = I505/I439) foi medida antes e após a adição de ácido oléico, esteviol e NH_4Cl. Uma curva de calibração de pH foi obtida após a permeabilização das células a prótons com nigericina. Ácido oléico e esteviol (aglucona dos glicosídeos da estévia) promoveram uma redução imediata da fluorescência do BCECF ($t_{1/2}$< 1s) indicativo de acidificação intracelular causada pela ligação e difusão transmembrana dessas moléculas. NH_4Cl causou uma alcalinização intracelular (aumento da fluorescência). Portanto, concluímos que a sonda BCECF estava corretamente carregada no meio intracelular e respondendo a mudanças de pH na direção prevista.

Introdução

A avaliação do pH intracelular pode ser uma ferramenta experimental de grande valia no estudo do transporte transmembrana de moléculas com grupamentos ácidos ou básicos.
Entre os vários métodos de medida de pH intracelular destaca-se a utilização de sondas fluorescentes. As medidas são em tempo real sem a necessidade de procedimentos de separação e a molécula a ser estudada não precisa ser modificada (por exemplo, ligação a um fluoróforo).

Portanto, o objetivo desse trabalho foi realizar a padronização da medida de pH intracelular em células 3T3L1 utilizando a sonda fluorescente sensível a pH BCECF-AM. Este trabalho faz parte de um projeto maior que tem como foco o estudo da ligação e translocação transmembrana do esteviol, a aglucona dos glicosídeos da estévia.

Materiais e métodos

Células 3T3-L1 foram cultivadas em meio Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) com 10% de soro bovino, glicose 25 mM, glutamina 2 mM, penicilina (100 U/mL) e estreptomicina (100 µg/mL). As células foram mantidas à 37ºC e 5% CO_2.
Para as medidas de pH, as células foram incubadas com 2 µM de BCECF-AM por 20 min (37ºC e no escuro) em tampão Krebs-MOPS (118 mM NaCl, 5 mM KCl, 1.1 mM KH_2PO_4, 20 mM MOPS, 2.5 mM $CaCl_2$, and 5.1 mM glucose, pH 7.4). Em seguida, as células foram tripsinizadas, lavadas com PBS e centrifugadas por duas vezes (5 min, 2.000 rpm). Por fim, foram ressuspensas em tampão Krebs-MOPS (3 a 6 × 10^5 células/mL).
As medidas de fluorescência foram realizadas com um fluorímetro Varian Cary Eclipse no modo Ratio, a 37 ºC e com agitação constante. BCECF foi excitado a 439 nm e 505 nm e a emissão coletada em 535 nm. A razão das intensidades de fluorescência (R = I505/I439) foi monitorada antes, durante e após a adição de esteviol, ácido oléico e NH_4Cl. Os dados foram expressos como a razão entre a R após e antes da adição das moléculas estudadas, R/R_0. A linha de base (R_0) foi obtida pela média do registro nos primeiros 120 segundos após estabilização do sinal.
A relação entre o pH intracelular e a fluorescência foi obtida após a permeabilização das células a prótons com 10 µM de nigericina. O pH externo foi modificado com NaOH ou HCl e medido com um pHmetro conectado a um eletrodo para microvolumes.

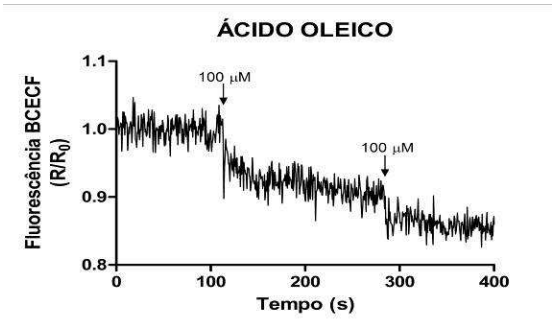
Resultados e Discussão

A sonda fluorescente BCECF é sensível a pH: a protonação dos seus grupamentos carboxila reduz a sua fluorescência. Por outro lado, o BCECF-AM é a forma penetrante (lipossolúvel) não fluorescente que, uma vez no meio intracelular, tem o seus grupamentos acetoximetil (AM) clivados por esterases, gerando BCECF (hidrossolúvel) (NOVAES, 2017).
As Figuras 1 e 2 apresentam experimentos representativos com ácido oléico e esteviol, respectivamente. Ambas as moléculas promoveram uma redução em segundos da fluorescência do BCECF ($t_{1/2}$ < 2 segundos). Esses resultados reportam a acificação do meio intracelular gerada pela ionização dos grupamentos carboxila do ácido oléico (BRUNALDI; HUANG; HAMILTON, 2010) e do esteviol que se ligaram e se difundiram através da membrana plasmática.

Para avaliar a integridade da membrana plasmática, na sequência do registro da Figura 2, NH_4Cl foi adicionado as células e como esperado, a fluorescência (pH) aumentou. No tampão externo, NH_4+ se dissocia em NH_3, o qual permeia a membrana plasmática (membrana é impermeável ao NH_4+). Uma vez, no meio intracelular, o NH_3 se associa a um próton, gerando NH_4+.

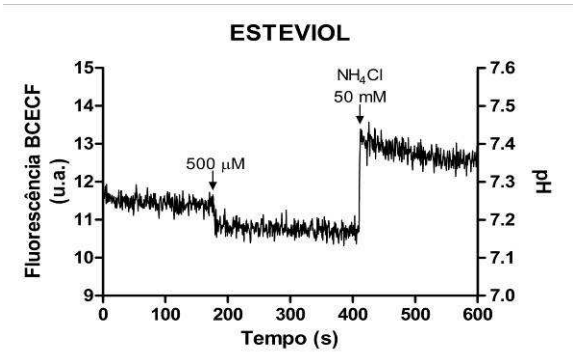
Para a realização da curva de calibração de pH (Figura 3), as células foram permeabilizadas a prótons com nigericina, um ionóforo que transporta íons K^+ e H^+ e equilibra o pH extracelular com o pH intracelular (ZAVOICO; CRAGOE; FEINSTEIN, 1986). Em seguida, o pH do tampão foi modificado e a fluorescência registrada. Como esperado, foi observado uma menor fluorescência com a redução do pH do meio externo e consequentemente do meio intracelular.

Figura 1:



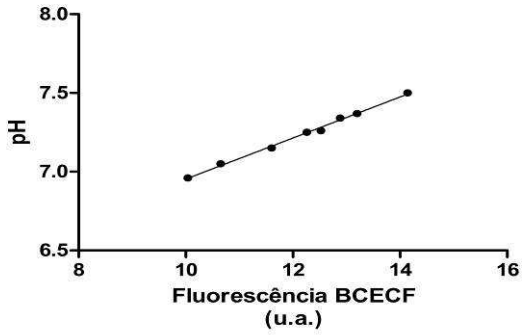
Transporte de ácido oléico através da membrana plasmática de células 3T3-L1 medido pela sonda de pH BCECF. A concentração de ácido oléico foi de 100 µM por adição (20 µL de uma solução estoque a 10 mM em DMSO). A concentração de células foi de 4×10^5 células/mL. BCECF foi excitado a 439 e a 505 nm e a emissão coletada em 535 nm. As fendas de excitação e emissão foram de 5 nm.

Figura 2:



Transporte do esteviol através da membrana plasmática de células 3T3-L1 medido pela sonda de pH BCECF. A concentração de esteviol foi de 500 µM (2,5 µL de uma solução estoque a 400 mM em DMSO) e de NH_4Cl foi de 50 mM. A concentração de células foi de 4×10^5 células/mL. BCECF foi excitado a 439 e a 505 nm e a emissão coletada em 535 nm. As fendas de excitação e emissão foram de 5 nm.

Figura 3:



Calibração do pH intracelular com nigericina. A concentração de nigericina foi de 10 μM. A concentração de células foi de 4 × 10^5 células/mL. BCECF foi excitado a 439 e a 505 nm e a emissão coletada em 535 nm. As fendas de excitação e emissão foram de 5 nm.

Conclusões

Concluímos que a sonda fluorescente sensível a pH BCECF foi corretamente carregada no citoplasma de células 3T3-L1, respondendo tanto à acidificação quanto alcalinização intracelular.

Agradecimentos

Agradecemos ao CNPq e FA pelo apoio e ao PPG/PIC-UEM.

Referências

BRUNALDI, K; HUANG, N; HAMILTON, J.A., Fatty acids are rapidly delivered to and extracted from membranes by methyl-beta-cyclodextrin, J Lipid Res, v. 51, n. 1, p. 120- 31, 2010.

NOVAES, A. H.O; Transporte do Esteviol, Isoesteviol e esteviolbiosídeo através da membrana plasmática de células 3T3-L1. Dissertação (Mestrado) Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2017.

ZAVOICO, G. B.; CRAGOE, E. J.; FEINSTEIN, M. B. Regulation of intracellular pH in human platelets. J Biol Chem, v. 261, n. 28, p. 13160-7, 1986.