

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO



**“ESTUDO *IN VITRO* DE INTERAÇÕES DAS CÉLULAS  
EPITELIAIS E ESTROMAIS EM MUCOSA GÁSTRICA  
HUMANA: INFLUÊNCIA DO *Helicobacter pylori*”**

**CARLOS ANTONIO DO NASCIMENTO SANTOS**

**2007**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
MORFOLÓGICAS**

**“ESTUDO *IN VITRO* DE INTERAÇÕES DAS CÉLULAS EPITELIAIS E  
ESTROMAIS EM MUCOSA GÁSTRICA HUMANA: INFLUÊNCIA DO *Helicobacter  
pylori*”**

**CARLOS ANTONIO DO NASCIMENTO SANTOS**

**Tese apresentada ao Programa de Pós  
Graduação em Ciências Morfológicas da  
Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ,  
como parte dos requisitos necessários à  
obtenção do grau de Doutor em Ciências  
Morfológicas.**

**Orientadores: Prof. Dr. Luiz Eurico Nasciutti  
Prof. Dr. Radovan Borojevic**

**Rio de Janeiro**

**2007**

**“ESTUDO *IN VITRO* DE INTERAÇÕES DAS CÉLULAS EPITELIAIS E  
ESTROMAIS EM MUCOSA GÁSTRICA HUMANA: INFLUÊNCIA DO *Helicobacter  
pylori*”**

**CARLOS ANTONIO DO NASCIMENTO SANTOS**

**Orientadores: Prof. Dr. Luiz Eurico Nasciutti**

**Prof. Dr. Radovan Borojevic**

Tese submetida ao corpo docente do Programa de Pós Graduação em Ciências Morfológicas da Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Ciências Morfológicas.

Aprovada pela banca examinadora constituída por:

---

Profa. Dra. – Christina Maeda Takiya - Examinadora

---

Profa. Dra. Celeste Carvalho Siqueira Elia – Examinadora

---

Profa. Dra. Dulciene Maria Magalhães Queiroz - Examinadora

---

Profa. Dra. Regina Maria Cavalcante Pilotto Domingues – Examinadora

---

Profa. Dra. Silvana Allodi - Revisora e Suplente

Rio de Janeiro, 2007

## FICHA CATALOGRÁFICA

Santos, Carlos Antonio do Nascimento

**Estudo *in vitro* de interações das células epiteliais e estromais em mucosa gástrica humana: Influência do *Helicobacter pylori* / Carlos Antonio do Nascimento Santos** - Rio de Janeiro, Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ/Departamento de Histologia e Embriologia, Instituto de Ciências Biomédicas - ICB, 2007.

xiv, 93 f.; il.; 31 cm.

Orientadores: Prof. Dr. Luiz Eurico Nasciutti e Prof. Dr. Radovan Borojevic  
Tese (doutorado) – UFRJ/Instituto de Ciências Biomédicas/Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfológicas, 2007.

Referências Bibliográficas: f. 83 –93.

1. Mucosa Gástrica – citologia. 2. *Helicobacter pylori*. 3. Células estromais. 4. Células epiteliais. 5. Células cultivadas. 6. Matriz Extracelular. 7. Imunohistoquímica. 8. Microscopia eletrônica de transmissão. 9. Comunicação celular. 10. Esferóides celulares. 11. *In vitro*. 12. Humano. 13. Morfologia – Tese. I. Nasciutti, Luiz Eurico. II. Borojevic, Radovan. III. Universidade Federal do Rio de Janeiro, ICB, Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfológicas. IV. Título.

À minha família, em especial, aos meus pais, “*in memoriam*”,

Francisco dos Santos e Lea do Nascimento Santos.

À minha esposa, Regiane Diniz Vieira Santos,

Ao meu filho, Caio Diniz Santos.

## AGRADECIMENTOS

---

À Universidade Federal do Rio de Janeiro, ao Instituto de Ciências Biomédicas e ao Programa de Pós-graduação em Ciências Morfológicas, pela oportunidade proporcionada para a realização do curso de Doutorado em Ciências Morfológicas.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão de bolsa.

Aos meus orientadores, Professores Luiz Eurico Nasciutti e Radovan Borojevic, não só pela excelente orientação, mas pelo espírito profissional na qualidade de mestre, pelos ensinamentos, amizade e, principalmente, pela confiança em minha capacidade em desenvolver este trabalho.

Ao grupo de pesquisa do Laboratório de Interações Celulares nos Sistemas Endócrino e Reprodutor, Leandro, Aparecida, Michel, Daniel, Pedro, Renato, Plínio, Elaine, Natalia, Marcos, Célia, Antonio, Marcos, pelo convívio alegre, saudável e pela contribuição de alguma forma para a realização deste trabalho.

À colega e amiga de laboratório, a Farmacêutica e nossa técnica, Maria Aparecida de Oliveira Domingos, pelos vários anos de convívio e aprendizados mútuos, pelos ensinamentos, colaboração, sugestões e amizade.

Aos pacientes que permitiram a utilização de suas biópsias para pesquisa.

Aos Professores do Departamento de Histologia e Embriologia, se não pela contribuição neste trabalho, pelo convívio e pela amizade.

Ao grupo de pesquisa do Laboratório de Proliferação e Diferenciação Celular, em especial, aos Professores Radovan Borojevic e Márcia Cury, aos alunos Hamilton, Renata, Alessandra, Alex, Rodrigo, Felipe, Leonardo, Luciana e Guilherme pela colaboração, conselhos, sugestões e amizade.

Ao grupo de pesquisa do Laboratório de Neurologia – Histologia e Ultraestrutura, em especial, os Professores Ana Maria Blanco Martinez, Silvana Allodi, Nadia Campos, Marcelo Sampaio, Simone Florim e Clynton Correia pelos conselhos, sugestões, colaboração e amizade.

Ao grupo de pesquisa do Laboratório de Patologia Celular, em especial a Professora Christina Takiya, aos alunos Januário, Priscila, Bernardo e Túlio, a técnica Silvania, pelos conselhos, sugestões, colaboração e amizade.

Ao grupo de pesquisa do Laboratório Multidisciplinar, em especial, a Dra. Celeste Elia, Dr. Eitor Siffert, Dra. Márcia Costa, Dr. Marcelo Neves e Cesônia Martinusso, pelos conselhos, sugestões, colaboração e amizade.

Ao grupo do Laboratório de Pesquisa em Bacteriologia – Faculdade de Medicina – UFMG - BH, em especial, a Dra. Dulciene Queiroz e a Dra. Taciana de Figueiredo Soares pelos conselhos, sugestões, colaboração e amizade.

Ao grupo de pesquisa do Laboratório de Biologia de Anaeróbios do Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes-Departamento de Microbiologia Médica, em especial, aos Professores Regina Domingues, Geraldo Renato de Paula, Eliane Ferreira e ao técnico Joaquim dos Santos Filho, pelos conselhos, sugestões, colaboração e amizade.

Ao grupo de pesquisa do Laboratório de Biomineralização, em especial, aos Professores Marcos Farina e Leonardo Andrade pelos conselhos, sugestões, colaboração e amizade.

Ao grupo de pesquisa do Laboratório de Imunidade Celular, em especial, as Professoras Morgana Castelo-Branco e Maria do Carmo Ciavaglia, pelos conselhos, sugestões, colaboração e amizade.

Ao grupo de pesquisa do Laboratório de Bioquímica da Matriz extracelular, em especial, a Professora Tatiana Sampaio e as alunas Maria Lúcia e Madalena pelos conselhos, sugestões, colaboração e amizade.

Ao grupo de pesquisa do Banco de Células do HU, em especial, os Professores Maria Isabel Rossi, Helio Dutra, ao técnico Antônio, aos alunos Ana Paula, Juliana, Fábio pelas sugestões, colaboração e amizade.

Ao grupo de pesquisa do Laboratório de Biologia Celular e Ultraestrutural do Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes, em especial, aos Professores Thais Souto-Padron, Marcos Deboni e Vinício Feo da Veiga, pelas sugestões, colaboração e amizade.

Ao grupo de pesquisa do Laboratório de Ultraestrutura Celular Hertha Meyer, pela permissão do uso do microscópio eletrônico de varredura e pelas sugestões, colaboração e amizade.

Ao grupo de pesquisa do Laboratório de Morfogênese Celular, em especial, aos Professores Vivaldo Moura Neto e Jane Amaral, pelos conselhos, sugestões, colaboração e amizade.

Aos meus irmãos amigos Regiane Diniz, Maria da Graça, Aparecida, Cesônia, Soninha, Armando, Nadia, Rosa, Cida, Clarice, Leonardo, José Seixas, Cíntia, Célia Palmeron, Francis Dube, Fani, Carminha, Lili, Elaine pelo apoio nos momentos mais difíceis.

Às secretárias do Departamento de Histologia e Embriologia, Maria da Graça, Tânia, Simone, Gorete e Édna não só pelo desempenho burocrático, mas pela ótima convivência harmoniosa e saudável.

Aos Técnicos do Departamento de Histologia e Embriologia, Silvio, Roberto, José Carlos, Felício *in memoriam*, Jorge e Sylvania, pelo empenho, colaboração e amizade.

Aos Técnicos do Departamento de Patologia Geral do HU, Arnaldo, Antônia, Rita e Antônio pelo empenho, colaboração e amizade.

A todos que colaboraram para a conclusão deste trabalho.

Aos meus pais, Francisco dos Santos e Léa do Nascimento Santos.

Aos meus irmãos, cunhados e sobrinhos, pelo apoio, incentivo, torcida e pela confiança.

A minha sogra, Maria Sonia, às minhas cunhadas, Ana Cristina e Cristiane pelo apoio, incentivo, torcida e pela confiança.

À minha esposa, Regiane Diniz Vieira Santos e, ao meu filho, Caio Diniz Santos, pelo amor, carinho, alegria e, principalmente, por compreender a minha ausência nas vezes que tive que ampliar meus conhecimentos junto à pesquisa, obrigado pelo incentivo, apoio, tolerância e confiança.

## RESUMO

---

### “ESTUDO *IN VITRO* DE INTERAÇÕES DAS CÉLULAS EPITELIAIS E ESTROMAIS EM MUCOSA GÁSTRICA HUMANA: INFLUÊNCIA DO *Helicobacter pylori*”

Carlos Antonio do Nascimento Santos

Orientadores: Prof. Dr. Luiz Eurico Nasciutti  
Prof. Dr. Radovan Borojevic

Resumo da Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós Graduação em Ciências Morfológicas da Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Ciências Morfológicas.

*Helicobacter pylori* (*H. pylori*) é um microrganismo capaz de sobreviver e colonizar a mucosa gástrica humana, desencadeando um grande número de lesões do trato gastrointestinal. Embora vários estudos *in vitro* tenham contribuído para a compreensão do processo de agressão, essas abordagens têm sido limitadas pelas dificuldades em se obter populações homogêneas de células epiteliais e estromais viáveis desta mucosa. Assim, o objetivo principal deste estudo foi estabelecer e caracterizar essas populações celulares, a partir de cultura primária de tecido proveniente de biópsia antral gástrica humana, e desenvolver sistemas de co-cultivos em 2 e 3 dimensões (D) destas populações celulares. Em seguida, foram avaliadas nestes sistemas, as interações das células epiteliais e estromais com o *H. pylori*, utilizando imunocitoquímica e microscopia eletrônica de transmissão e de varredura. Os resultados obtidos mostraram populações homogêneas de células epiteliais e estromais com características bastante semelhantes à mucosa *in vivo*, capazes de secretar diferentes componentes de matriz extracelular (colágeno tipo IV, fibronectina, laminina e condroitim sulfato), podendo ser mantidas em cultivo por longos períodos. Nas co-culturas, em especial nas em 3D (nos esferóides), essas células se mostraram muito adequadas aos estudos das interações celulares existentes na mucosa gástrica infectada pelo *H. pylori*. As análises ultraestruturais revelaram células epiteliais apresentando uma certa polarização, com a presença do bacilo na região das microvilosidades da superfície apical e no interior das células, dentro de estruturas semelhantes a fagosomas. De forma relevante, essas características morfológicas foram observadas com apenas 3 horas de incubação dos esferóides com o *H. pylori*. Em conclusão, essas culturas estabelecidas representam modelos de estudos originais que podem ser utilizados como importantes ferramentas na análise do papel das toxinas liberadas pelo *H. pylori*, e na compreensão dos mecanismos de interação, colonização e invasão desta bactéria na mucosa gástrica humana.

## SUMMARY

---

### AN *IN VITRO* STUDY OF THE EPITHELIAL AND STOMAL CELLS INTERACTIONS IN HUMAN GASTRIC MUCOSA: INFLUENCE OF THE *Helicobacter pylori*.

**Carlos Antonio do Nascimento Santos**

Supervisors: Prof. Dr. Luiz Eurico Nasciutti  
Prof. Dr. Radovan Borojevic

Summary of the doctoral thesis submitted to the Pos-graduation program in morphological Sciences of the Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, as part of the requirements to obtain the Doctor degree in Morphological Sciences.

*Helicobacter pylori* is a microorganism capable of surviving and colonizing the human gastric mucosa, causing a great number of injuries in the gastro intestinal tract. Although many studies *in vitro* have contributed with a better understanding of virulent process, these approaches are limited by the difficulties of obtaining a homogeneous population of epithelial and stromal cells of that mucosa. For this reason, the main goal of this study was to establish and characterize these cells populations obtained from primary cultures of human gastric tissue biopsies and to develop co-culture systems of 2 and 3 dimensions (D) of the cell populations. After obtaining the cells, the interactions of the epithelial and stromal cell with *H. pylori* were verified using immunocytochemistry and transmission and scanning electron microscopy. The results demonstrate homogeneous populations of epithelial and stromal cells with characteristics very similar to the mucosa *in vivo* and capable of secreting different components of the extracellular matrix (collagen type IV, fibronectin, laminin and chondroitin sulfate) and to be cultured for long periods. In the co-cultures, especially the 3D (spheroids), those cells have demonstrated to be useful first studies of cell interactions of the gastric mucosa infected by *H. pylori*. The ultrastructure analyses revealed polarized epithelial cells, with bacillus on the apical surface of the microvilli inside the cells, in structures resembling phagosomes. The morphological characteristics were observed only within 3 hours of incubation of the spheroid with *H. pylori*. In conclusion, the cell cultures obtained in our study represent useful and original models that can be used as important tools to understand the role of the toxins delivered by *H. pylori*, and the interaction, colonization and invasion mechanisms of these bacteria in the human gastric mucosa.

## ÍNDICE

---

Folha de rosto .....	i
Folha de aprovação .....	i
Ficha catalográfica .....	iii
Agradecimentos .....	v
Resumo .....	viii
Summary .....	ix
Lista de figuras .....	xi
Lista de tabelas e abreviaturas .....	xii
<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
MUCOSA GÁSTRICA .....	1
MUCOSA GÁSTRICA E MATRIZ EXTRACELULAR .....	8
MUCOSA GÁSTRICA E <i>HELICOBACTER PYLORI</i> .....	12
JUSTIFICATIVA DO TRABALHO .....	17
<b>OBJETIVO GERAL .....</b>	<b>21</b>
OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	21
<b>MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>22</b>
ESTABELECIMENTO DAS POPULAÇÕES CELULARES ESTROMAL E EPITELIAL A PARTIR DE CULTURA PRIMÁRIA OBTIDA DE MUCOSA ANTRAL GÁSTRICA HUMANA .....	23
CÉLULAS ESTROMAIS .....	23
CÉLULAS EPITELIAIS .....	24
CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E IMUNOCITOQUÍMICA DAS POPULAÇÕES CELULARES OBTIDAS .....	25
MÉTODO CITOQUÍMICO DE IDENTIFICAÇÃO DE GLICOCONJUGADOS DAS CÉLULAS EPITELIAIS .....	29
EXPERIMENTOS DE CO-CULTURAS DAS POPULAÇÕES CELULARES OBTIDAS .....	30
ENSAIOS DE PROLIFERAÇÃO CELULAR .....	32
CARACTERIZAÇÃO ULTRAESTRUTURAL DAS CO-CULTURAS EM MONOCAMADA E DOS ESFERÓIDES .....	33
MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO .....	33
MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA .....	34
EXPERIMENTOS DE CO-CULTIVO COM O <i>H. PYLORI</i> .....	35
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>37</b>
ESTABELECIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DAS POPULAÇÕES DE CÉLULAS ESTROMAIS E EPITELIAIS DA MUCOSA GÁSTRICA .....	37
CÉLULAS ESTROMAIS .....	37
CÉLULAS EPITELIAIS .....	39
CARACTERIZAÇÃO DAS CO-CULTURAS CELULARES OBTIDAS .....	42
CO-CULTURA EM MONOCAMADA .....	42
CO-CULTURA EM TRÊS DIMENSÕES .....	42
AVALIAÇÃO INDIRETA DA PROLIFERAÇÃO CELULAR .....	50
ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL DAS CO-CULTURAS .....	52
ANÁLISE DAS CÉLULAS CULTIVADAS NA PRESENÇA DE <i>HELICOBACTER PYLORI</i> .....	60
<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>66</b>
<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>82</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>83</b>

## LISTA DE FIGURAS

---

- Figura 1:** Imagens ilustrativas mostrando as regiões do estômago, um aspecto anatômico da mucosa que reveste a região do antro gástrico humano, visto por endoscopia, e um esquema tridimensional mostrando a parede deste órgão com suas respectivas camadas histológicas.....02
- Figura 2:** Imagens ilustrativas do estomago, detalhes histológicos das criptas e glândulas gástricas e uma amplificação das regiões istmo, colo e base da glândula, destacando principalmente, as regiões da glândula gástrica e a localização de seus principais tipos celulares constituintes..... 04
- Figura 3:** Imagens de microscopia eletrônica de transmissão do *Helicobacter pylori* e de varredura da superfície da mucosa gástrica infectada por uma grande quantidade deste bacilo.....13
- Figura 4:** Esquema que sugere o caminho pelo que percorre o *H. pylori* no processo de infecção da mucosa gástrica humana. ....17
- Figura 5:** Micrografias de contraste de fase e de imunofluorescência de cultura primária obtida da mucosa antral gástrica humana, com 30 dias de cultivo (VI passagem). ....36
- Figura 6:** Micrografias de contraste de fase e de imunofluorescência de cultura primária obtida da mucosa antral gástrica humana, com 60 dias de cultivo (XII passagem).....38
- Figura 7:** Micrografias de contraste de fase das células epiteliais gástricas cultivadas sobre células 3T3 e das células epiteliais isoladas, e imunofluorescência das células epiteliais. ....39
- Figura 8:** Micrografias ópticas da população epitelial isolada corada pelo ácido periódico de Schiff (PAS) e marcada para várias lectinas (Con A, SBA, PNA, LCA, WGA). ....41
- Figura 9:** Micrografias de contraste de fase e de imunofluorescência de co-cultura em monocamada das populações epitelial e estromal. ....42
- Figura 10:** Micrografias de contraste de fase de co-cultura em 3D das populações epitelial e estromal isoladas da mucosa gástrica com 3 e 35 dias em cultivo. ....44
- Figura 11:** Micrografias ópticas de co-cultura em 3D de células epiteliais e estromais gástricas após 21 dias de cultivo, coradas pela hematoxilina e eosina e marcadas para a lectina Con A, citoqueratina 7 e vimentina. ....45
- Figura 12:** Micrografias de co-cultura em 3D das populações epitelial e estromal após 7 e 21 dias de cultivo. Culturas Imunomarcadas para colágeno tipo IV e fibronectina. ....46

- Figura 13:** Micrografias de co-cultura em 3D das populações epitelial e estromal após 7 e 21 dias de cultivo. Culturas Imunomarcadas para laminina e condroitim sulfato. ....47
- Figura 14:** Curva de proliferação das células epiteliais e estromais isoladas da mucosa gástrica humana pelo método indireto de crescimento celular MTT.....49
- Figura 15:** Eletromicrografias de varredura das culturas em monocamada das células epiteliais, estromais e de ambas co-cultivadas, isoladas da mucosa gástrica humana. ....51
- Figura 16:** Micrografias de cortes semifinos corados com azul de toluidina e de MET das culturas da população epitelial e da co-cultura epitelial/estromal isoladas da mucosa gástrica humana.....52
- Figura 17:** Eletromicrografias de varredura da superfície dos esferóides das co-culturas em 3D das populações epitelial e estromal isoladas da mucosa gástrica humana, cultivadas por 3 , 7, 14 e 21 dias. ....54
- Figura 18:** Eletromicrografias de varredura da superfície e do interior dos esferóides das co-culturas em 3D das populações epitelial e estromal isoladas da mucosa gástrica humana, cultivadas por 7, 14 e 21 dias. ....55
- Figura 19:** Micrografias óticas de cortes semifinos corados com azul de toluidina, dos esferóides das co-culturas em 3D das populações epitelial e estromal isoladas da mucosa gástrica humana, cultivadas por 7, 14 e 21 dias.....56
- Figura 20:** Eletromicrografias de transmissão das co-culturas de três dimensões de células isoladas da mucosa antral gástrica humana. ....57
- Figura 21:** Eletromicrografias de varredura das células epiteliais, estromais e da co-cultura em monocamada epitélio/estroma isoladas da mucosa gástrica humana e infectadas com *H. pylori* por 3 h.....59
- Figura 22:** Eletromicrografias de transmissão da co-cultura em monocamada das células epiteliais e estromais isoladas da mucosa gástrica humana e infectadas com *H. pylori* por 3 h.....60
- Figura 23:** Eletromicrografias de varredura da superfície dos esferóides das células epiteliais e estromais em co-cultura em 3D por 21 dias e infectadas com *H. pylori* por 3 h. ....62
- Figura 24:** Eletromicrografias de transmissão dos esferóides das células epiteliais e estromais em co-cultura em 3D por 21 dias e infectadas com *H. pylori* por 3 h.....63

## LISTA DE TABELAS

---

**Tabela 1-** Classificação dos anticorpos utilizados

**Tabela 2-** Classificação das lectinas utilizadas

## LISTA DE ABREVIATURAS

---

<b>2D</b>	Duas dimensões (monocamada)
<b>3D</b>	Três dimensões (esferóide)
<b>AH</b>	Ácido hialurônico
<b>ATCC</b>	<i>American Type Culture Collection</i>
<b>Atm</b>	Pressão atmosférica
<b>BSA</b>	Soro albumina bovina
<b>CagA+</b>	Citotoxina associada ao gene A da cepa positiva de Hp
<b>Cell Tak</b>	Biopolímero, usado no revestimento de placa de cultivo de células
<b>cm</b>	Centímetro
<b>CNPq</b>	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
<b>Con A</b>	Concanavalin A ( $\alpha$ -D-Man, $\alpha$ -D-Glc)
<b>CS</b>	Condroitin sulfato
<b>Cy3</b>	<i>Streptavidina</i>
<b>DAB</b>	Diaminobenzidina
<b>DAPI</b>	Marcador de proteína nuclear celular
<b>DBA</b>	<i>Dolichos biflorus agglutinin</i>
<b>DMEM</b>	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
<b>DMSO</b>	<i>Dimethyl sulfoxide</i>
<b>DPGF</b>	Fator de crescimento derivado de plaquetas
<b>DS</b>	Dermatan sulfato
<b>EDTA</b>	Ethylene-diaminobenzidine
<b>EGF</b>	Fator de crescimento epidérmico
<b>FGF</b>	Fator de crescimento de fibroblasto
<b>FITC</b>	<i>Fluorescein isothiocyanate</i>
<b>Fuc</b>	<i>Fucose</i>
<b>GAGs</b>	Glicosaminoglicanos
<b>GalNac</b>	<i>N-acetyl-galactosamine</i>
<b>GlcNac</b>	<i>N-acetyl-glucosamine</i>
<b>tox176</b>	<i>gnotobiotic mouse</i>
<b>HBSS CMF</b>	<i>calcium- and magnesium-free Hanks' balanced salt solution</i>
<b>HE</b>	Hematoxilina e eosina
<b>Hp</b>	<i>Helicobacter pylori</i>
<b>HS</b>	Heparan sulfato
<b>HUFF(HU)</b>	Hospital Universitário Clementino Fraga Filho
<b>IARC</b>	<i>International Agency for research on cancer</i>

<b>ICB</b>	Instituto de Ciências Biomédicas
<b>INCQS</b>	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde - Fiocruz
<b>HAM - F12</b>	Meio de cultura enriquecido para células epiteliais
<b>Lamp1</b>	marcador de endossoma maduro
<b>Le<sup>b</sup></b>	Oligossacarídeo de manose, fucose e N-acetilglucosamina
<b>MALT</b>	Tecido linfóide associado à mucosa gástrica
<b>Man</b>	Mannose;
<b>Matrigel</b>	Membrana basal artificial
<b>MB</b>	Membrana basal
<b>MEC</b>	Matriz extracelular
<b>MET</b>	Microscopia eletrônica de transmissão
<b>MEV</b>	Microscopia eletrônica de varredura
<b>min</b>	Minuto
<b>NH<sub>4</sub>Cl</b>	Cloreto de amônia
<b>P. M.</b>	peso molecular
<b>PABCAM</b>	Programa Avançado de Biologia Celular Aplicado à Medicina
<b>PAS</b>	Ácido eriódico de schiff
<b>PHA-L</b>	<i>Phaseolus vulgaris</i> Tipo complexo de carboidrato
<b>PNA</b>	Peanut agglutinin
<b>PNA</b>	<i>Arachis hypogaea</i> ( $\beta$ -D-Gal(1-3)GalNAc)
<b>RCCS-4,</b>	<i>The rotary cell culture system</i>
<b>SBA</b>	<i>Soybean agglutinin</i> (D-GalNAc)
<b>SFB</b>	Soro fetal bovino
<b>TGF<math>\beta</math></b>	Fator de crescimento tranformante $\beta$
<b>TGF<math>\alpha</math></b>	Fator de crescimento transformante $\alpha$
<b>TPS</b>	Tampão fosfato de sódio
<b>UEA<sub>1</sub></b>	<i>Ulex europeus agglutinin-1</i>
<b>UFRJ</b>	Universidade Federal do Rio de Janeiro
<b>UreA, UreB</b>	Subunidades da enzima urease
<b>Vac-A</b>	Toxina vacuolizante A
<b>VEGF</b>	Fator de crescimento endotelial vascular
<b>WGA</b>	<i>Triticum vulgare</i> ((Wheat germ) (D-GlcNAc) <sub>2</sub> , NeuNAc)

### Siglas das linhagens celulares humanas

<b>3T3</b>	linhagem celular fibroblástica
<b>A549</b>	células epiteliais isoladas do pulmão
<b>BT-747, T47D, ZR-75-1, MCF-7, SK-BR-3</b>	Carcinomas de mama
<b>HSC-39, Hs-746T, RF-1, RF-48</b>	Carcinomas gástricos
<b>AGS, KATO II, KATO III</b>	Adenocarcinomas gástricos
<b>MDA-MB-231, MDA-MB-453</b>	Adenocarcinomas gástricos
<b>MKN-1, MKN-28, MKN-74,</b>	Adenoescamosa
<b>SNU-5, SNU-</b>	carcinomatóides pleural e peritoneal

## **INTRODUÇÃO**

---

### **Mucosa Gástrica**

O estômago, encontrado na maioria dos vertebrados, é uma expansão muscular do tubo digestivo em forma de bolsa, situado na porção anterior da cavidade peritoneal ou abdominal (ROMER E PARSONS, 1985), onde os alimentos são mantidos o tempo necessário para se realizar a digestão ácida (ZAVALACAMIN, 1996). O estômago é um órgão dividido em quatro grandes regiões anatômicas: região cárdica, regiões do corpo e do fundo e região pilórica (antro pilórico) (Robbins, 2000). O piloro termina em um forte esfíncter muscular que circunda a junção gastroduodenal. Histologicamente, o estômago, assim como todo o tubo digestivo, é formado por quatro camadas principais: mucosa, constituída por epitélio, lâmina própria e muscular da mucosa; submucosa, formada por tecido conjuntivo denso; muscular, apresenta-se constituída por feixes musculares orientados de forma circular, oblíquo e longitudinal; e serosa, uma delgada camada formada de tecido conjuntivo frouxo revestido por epitélio pavimentoso simples (WHEATER, 1994) (Figura 1).

De maneira geral, a mucosa do estômago é formada por um epitélio, que pode ser dividido em superficial, foveolar e mais profundamente, glandular; e uma lâmina própria conjuntiva limitada por uma faixa de músculo liso, denominada muscular da mucosa. Em todo o estômago, o revestimento epitelial superficial é composto por uma camada de células prismáticas secretoras de muco (PAS-positivas), com núcleo esférico e basal, normalmente sem apresentar nucléolo. Na porção apical dessas células existem grânulos de muco que convertem o epitélio em uma lâmina de células granulares, cuja função é proteger o lúmen estomacal da autodigestão. Este epitélio superficial, quando se invagina para a lâmina própria, forma as criptas ou

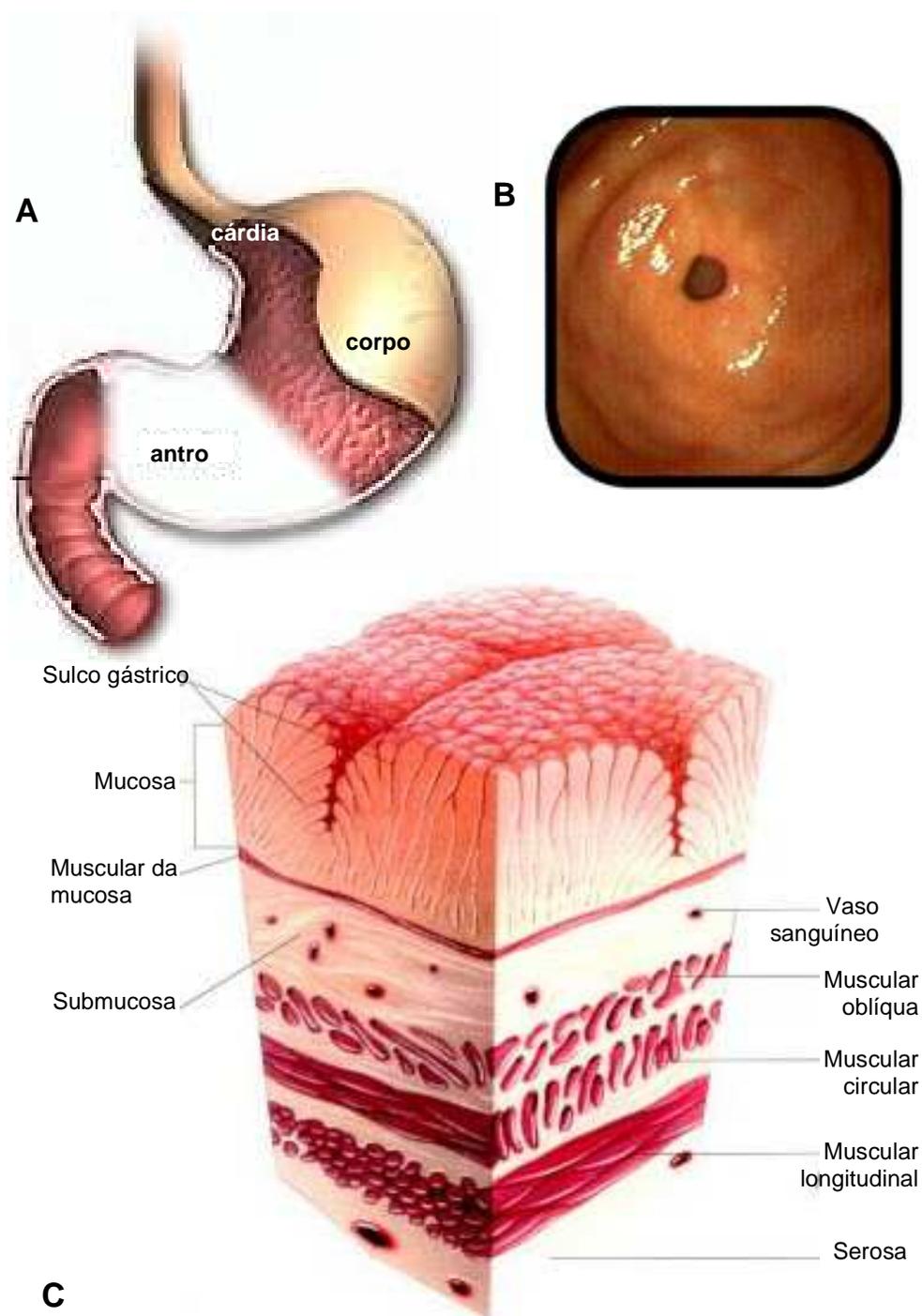


Figura 1– Imagens ilustrativas mostrando as regiões do estômago (A), um aspecto anatômico da mucosa que reveste a região do antro gástrico humano, visto por endoscopia (B) e um esquema tridimensional mostrando a parede deste órgão com suas respectivas camadas histológicas (C): mucosa, muscular da mucosa, submucosa, musculares e serosa.

fovéolas gástricas, contínuas com as glândulas gástricas, que desembocam nestas fovéolas. Estas glândulas apresentam três regiões características, conhecidas como istmo, colo e base. Ao longo dessas regiões são observados basicamente cinco tipos celulares: células-fonte, parietais, mucosas do colo, zimogênicas e enteroendócrinas. As células-fonte localizam-se em pequeno número na junção entre as fovéolas e as glândulas, porção chamada de colo. Estas células se dividem constantemente e aproximadamente metade das células filhas permanece como célula fonte; a outra metade garante a manutenção das células da superfície do estômago ou da parte profunda da glândula (Figura 2) (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004, KIERSZENBAUM, 2004). Tem sido relatado que a maioria, se não todos, os tecidos epiteliais contêm células-tronco e a elas são atribuídas as funções de manutenção do tecido normal e/ou a regeneração do tecido após uma lesão (SLACK, 2000). Também na região do colo, as células parietais são arredondadas ou piramidais, com núcleo esférico e citoplasma intensamente eosinófilo. Estas células têm como função a produção de ácido clorídrico e do fator antianêmico intrínseco (glicoproteína essencial para que a vitamina B<sub>12</sub> seja absorvida pelo intestino), presentes no suco gástrico (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004). As células mucosas do colo, também em pequena quantidade e localizadas na região do colo, secretam muco que histoquimicamente é diferente daquele produzido pelas células mucosas que revestem as fossetas e a superfície do estômago. As células zimogênicas estão localizadas no terço inferior das glândulas fúndicas e do corpo. Elas produzem grânulos de zimogênio, onde permanece estocado a proenzima chamada pepsinogênio, que é convertida à pepsina quando liberada no lúmen gástrico. A pepsina é uma enzima proteolítica capaz de digerir a maior parte das proteínas. A lipase que tem função de digerir gordura no homem, também é

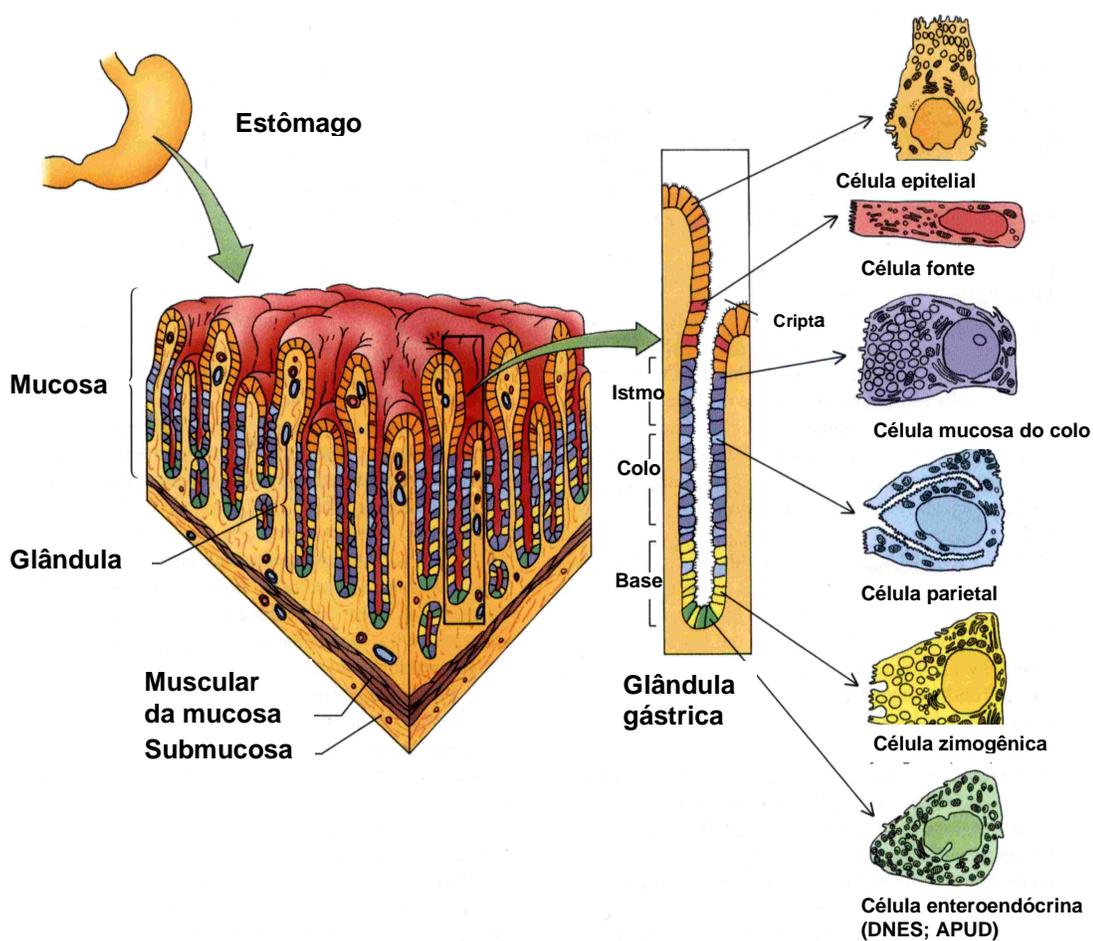


Figura 2 – Imagens ilustrativas do estômago, detalhes histológicos das criptas e glândulas gástricas e uma amplificação das regiões istmo, colo e base da glândula, destacando principalmente, as regiões da glândula gástrica e a localização de seus principais tipos celulares constituintes. Copiado do livro *color textbook of histology*. Gartner and James, 1997.

produzida pelas células parietais. As células enteroendócrinas estão disseminadas por todo o tubo digestivo, porém as encontradas na região pilórica do estômago estão envolvidas principalmente com a produção de um polipeptídeo chamado gastrina, que estimula a secreção das células parietais (WHEATER, 1994; JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004, KIERSZENBAUM, 2004). As glândulas fúndicas, do tipo tubulares retas, são formadas por células mucosas do colo, células parietais e células zimogênicas, além de células-fonte e enteroendócrinas. As glândulas cárdicas, tubulares simples, são constituídas principalmente por células secretoras de muco, apresentando algumas células indiferenciadas no colo e região superior da glândula; células enteroendócrinas espalhadas pela glândula e, por vezes, células parietais. Já as glândulas pilóricas, ao contrário das glândulas tubulares simples do fundo e do corpo, são ramificadas e compostas quase exclusivamente de células secretoras de muco e em menor quantidade, pelas células parietais, enteroendócrinas e células-fonte (ROSS e ROWRELL, 1993; YOUNG e HEATH, 2001). Os diferentes tipos de mucosa gástrica variam de acordo com os tipos celulares e a arquitetura das glândulas. Entre os tipos de mucosa não há uma transição abrupta, mas observa-se uma *zona mucosa de transição*, onde podemos encontrar mistura de tipos glandulares. Esta observação é comum nas regiões cárdica e antral, onde células parietais esparsas são encontradas (WHITEHEAD, 1997).

A grande maioria das células epiteliais da mucosa gástrica é constituída por células mucosas que têm como principal característica a produção de muco, cujo principal componente é a glicoproteína mucina. A mucina tem na sua composição somente cinco distintos monossacarídeos (galactose, N-acetilglicosamina, N-acetilgalactosamina, fucose e ácido siálico), mas a proporção relativa destes

açúcares é variável entre as mucinas, tornando muito difícil a tentativa de se estimar o seu conteúdo total (LAMONT e cols., 1983). Por outro lado, as lectinas facilmente distinguem açúcares muito semelhantes, através de um número de pontes de hidrogênio situadas no domínio de reconhecimento para carboidrato em cada tipo de proteína. Constituem um grupo de proteínas homólogas que se ligam com alta afinidade e seletividade a resíduos de carboidratos, em solução ou na superfície de células. As lectinas têm sido muito utilizadas na caracterização de células epiteliais, assim como, na localização de moléculas que atuam como receptores de alta especificidade, localizados na superfície de todas as células animais. Elas reconhecem epitopos na seqüência de carboidratos e alguns exemplos de lectinas são: *succynalated wheat germ agglutinin* (sWGA), *Dolichos biflorus agglutinin* (DBA), *Ulex europeus agglutinin-1* (UEA<sub>1</sub>) e *peanut agglutinin* (PNA), estas lectinas, mesmo depois dos processos enzimáticos e de centrifugação, reagiram com grande quantidade de mucina intracelular de 10 a 35% das células epiteliais isoladas da mucosa gástricas de cão (BOLAND e cols., 1990). Alguns patógenos como o *Helicobacter pylori*, o vibrião da cólera, o vírus influenza, toxinas da bactéria pertussis têm lectinas que medeiam à adesão às células hospedeiras ou a entrada da toxina nas células. As glândulas duodenais e pilóricas, além da similaridade no perfil de adesão às lectinas, apresentam mucinas com mais diversidades de resíduos carboidratos terminais do que as células caliciformes e células mucosas da superfície (SCHUMACHER e cols., 2004).

A lâmina própria, junto com a membrana basal (MB), constitui uma trama de suporte para o epitélio. Composta por tecido conjuntivo frouxo, bastante vascularizado, exhibe numerosas células do sistema imunológico (plasmócitos, linfócitos, mastócitos, neutrófilos e monócitos), que por diapedese migram do sangue

para a lamina própria, e uma outra população de células fixas do tecido conjuntivo (por exemplo, fibroblastos e miofibroblastos) (ROSS e ROWRELL, 1993). Os principais tipos celulares estromais observados na lâmina própria do estômago embrionário são representados pelos fibroblastos, que se originam de células precursoras no tecido de sustentação primitivo (mesênquima); miofibroblastos e células com funções de defesa no tecido, principalmente mastócitos, macrófagos e linfócitos, estes últimos em forma de agregados não-encapsulados, denominados tecido linfóide associado à mucosa gástrica (MALT) (YOUNG e HEATH, 2001). Fibras reticulares e colágenas, e ocasionais elásticas, são também encontradas, além de capilares e fibras nervosas. A mucosa gástrica possui um rico suprimento sangüíneo que consiste em capilares extensamente ramificados. Este suprimento é necessário para fornecer oxigênio, bicarbonato e nutrientes às células epiteliais e para remover o ácido que sofreu difusão retrógrada. Este fluxo é regulado por mediadores vasoativos locais, particularmente óxido nítrico endógeno (gerado pelas células endoteliais), prostaglandinas e neuropeptídeos; um aumento no fluxo sangüíneo é observado simultaneamente com a estimulação da secreção ácida. Por outro lado, a isquemia da mucosa pode desempenhar um papel-chave no sentido de promover uma lesão da mucosa. O fluxo sangüíneo pode ser afetado negativamente pelo estresse clínico ou cirúrgico grave, por certos agentes exógenos tipo aspirina e álcool e pela penetração dentro da lâmina própria de agentes luminiais, tais como ácido e pepsina (ROBBINS e cols., 2000). Os canais linfáticos ocupam apenas a porção inferior da lâmina própria, próxima à muscular da mucosa em direção a lâmina própria (OWEN, 1996). A análise histológica do corpo, em uma mucosa normal, revela uma lâmina própria totalmente preenchida por glândulas gástricas ou fúndicas. A lâmina própria desta região é mais evidente entre as criptas gástricas,

onde um pequeno número de plasmócitos, linfócitos, eosinófilos e histiócitos é observado. Nesta região são observadas fibras musculares lisas ocasionais, vindas da muscular da mucosa, que se interpõem entre as glândulas. A lâmina própria da região antral, quando comparada com a do corpo, exibe maior quantidade de fibras musculares lisas que saem da muscular da mucosa e pequena quantidade de linfócitos e plasmócitos (WHITEHEAD, 1997).

### **Mucosa Gástrica e Matriz Extracelular**

Ao longo do desenvolvimento normal do estômago, vários estudos sobre os componentes de matriz extracelular (MEC) têm sido realizados, mostrando que a MEC da lâmina própria deste órgão apresenta-se constituída por colágenos, lamininas, nidogênios (entactinas) e proteoglicanos como perlecano, agrino e bamacano (TIMPL e BROWN, 1996; HALFTER cols., 1998; COLOGNATO e YURCHENCO, 2000). Entretanto, dentre as moléculas mais expressas na MEC, a laminina e suas isoformas parecem atuar de forma crucial em todas as etapas da embriogênese. A partir da oitava semana de gestação, vários componentes de matriz, como proteoglicano de heparan sulfato, colágeno tipo IV, cadeias de laminina  $\alpha 1$ ,  $\beta 1$  e  $\gamma 1$ , foram detectados de forma uniforme e sistemática na membrana basal da mucosa gástrica humana em formação (TREMBLAY e MENARD, 1996). A laminina é uma molécula evolutivamente muito antiga e a sua ausência acarreta o não prosseguimento do desenvolvimento embrionário (COLOGNATO e YURCHENCO, 2000). A laminina -1 ( $\alpha 1\beta 1\gamma 1$ ) parece ser a principal laminina expressa bem no início do desenvolvimento embrionário (TIMPL, 1985; SMYTH e cols., 1999). A laminina apresenta vários domínios que se ligam entre si e com

outras macromoléculas da matriz, uma porção que interage com a célula, mediada por integrinas, distroglicano, além de outros receptores, e através destas interações a laminina contribui potencialmente para diferenciação, forma e movimento celular, mantém os fenótipos teciduais, e promove a sobrevivência do tecido (COLOGNATO e YURCHENCO, 2000). A laminina, junto com o colágeno do tipo IV e o nidogênio, forma a integridade estrutural da MB de tecidos normais, porém a expressão destes elementos e suas isoformas têm papel fundamental em vários tipos de tumores, principalmente os de origem epitelial. Em carcinomas, a membrana basal apresenta-se contínua na maioria dos tumores epiteliais malignos, com exceção para os carcinomas gástricos difusos e carcinomas de mama infiltrados (MAATTA e cols., 2001).

No estômago humano adulto, a cadeia  $\alpha_2$  da laminina está presente em membranas basais das glândulas e na porção inferior das fovéolas, enquanto a cadeia  $\alpha_3$  (laminina 5) localiza-se em MBs do epitélio superficial e porção superior das fovéolas. As cadeias  $\alpha_1$ ,  $\beta_1$  e  $\gamma_1$  (laminina-1) são detectadas em toda a MB da mucosa, enquanto  $\beta_2$  predomina em membranas de vasos sangüíneos da mucosa. Estes dados demonstram que no estômago adulto há uma distribuição zonal das cadeias  $\alpha_2$  e  $\alpha_3$  da laminina, enquanto as outras cadeias exibem uma distribuição mais geral (VIRTANEN e cols. 1995). Na organização das MBs, as lamininas têm uma contribuição importante, participando da formação de uma trama peculiar. Esta trama é constituída por moléculas de laminina ligadas entre si, na forma de polímero em rede, ou lamininas ligadas a moléculas de colágeno IV, aos nidogênios, à fibronectina e a outros componentes. Estas ligações intermoleculares são propriedades protoméricas e são produtos de processo muito bem direcionado (RUBEM e YURCHENCO, 1994).

A fibronectina e a tenascina são vistas em co-localização, entre a oitava e a vigésima semana de gestação, ao longo de todo mesênquima; porém, na mucosa adulta, a fibronectina foi detectada em todos os níveis do epitélio superficial e do glandular, sendo que a expressão da tenascina fica restrita às células do epitélio superficial e o das criptas gástricas (TREMBLAY e MENARD, 1996). Por outro lado, num estudo imunohistoquímico sobre a distribuição de elementos de MEC em mucosa de pacientes com úlcera gástrica, foi observado um aumento da expressão de fibronectina e de colágeno tipo I (GILLESSEN e cols., 1996).

Na lâmina própria da mucosa do estômago adulto, os fibroblastos continuam sendo os principais tipos celulares responsáveis pela síntese e secreção dos componentes da MEC, como glicosaminoglicanos, colágenos, elastina e diferentes isoformas da laminina (YOUNG e HEATH, 2001).

Vários estudos *in vitro* têm mostrado um papel fundamental dos elementos da MEC na interação, adesão, proliferação, migração e diferenciação celular (OLIVERO e FURCHT, 1993; RHODES e cols., 1994; COLOGNATO e YURCHENCO, 2000). Ensaio de adesão e migração de células epiteliais do cristalino de coelho sobre colágeno IV, laminina e fibronectina mostraram que a adesão celular é dependente da concentração destes componentes, sendo que, mesmo em baixa concentração, o colágeno promove a máxima adesão e a fibronectina a máxima migração (OLIVERO e FURCHT, 1993). As células mucosas do estômago de porquinhos da Índia, cultivadas por 3 horas sobre diferentes substratos, mostraram 40% de células aderidas ao matrigel, 25% tanto no colágeno IV como na fibronectina, 10% na laminina e 3% sobre o plástico sem tratamento (RHODES e cols., 1994)

Estudos têm relatado a participação dos glicosaminoglicanos (GAGs) livres ou presos a proteoglicanos no crescimento e progressão de tumores. No estudo da

mucosa gástrica humana normal e patológica foi observada a presença de ácido hialurônico (AH), heparan sulfato (HS), condroitin sulfato (CS) e dermatan sulfato (DS); porém, na mucosa patológica, a quantidade de GAGs totais foi o dobro quando comparada com a da mucosa gástrica humana normal (THEOCHARIS e cols., 2003).

Os proteoglicanos formados de condroitim/dermatam sulfato, decorina e biglicano, além de participarem na organização da rede de fibrilas de colágeno e interagirem com outras proteínas não colagenosas, estão direta ou indiretamente envolvidos na sinalização que leva ao crescimento e diferenciação celular, via interação com citocinas (POHLE e cols., 2001). Por outro lado, fatores de crescimento e seus receptores têm importante papel na proliferação, migração, reparo tecidual e cicatrização ulcerosa. As células estromais, por exemplo, são moduladas à proliferação e diferenciação pelos fatores de crescimento, que interagem com seus receptores de superfície celular afetando, portanto, a expressão gênica. Os fibroblastos, por exemplo, quando estimulados à proliferação pelo fator de crescimento derivado de plaquetas (DPGF) e pelo fator de crescimento de fibroblasto (FGF) têm papel importantíssimo no neocrescimento na região do tecido lesado. Além disso, quando ativos, assumem um papel multipotencial e se comportam de maneira semelhante ao mesênquima primitivo do qual eles derivaram, diferenciando-se em vários tipos celulares (STEVENS e LOWE, 1995).

A maioria dos fatores de crescimento é originada de células vizinhas a uma célula afetada e agem como mediadores locais embora alguns desses fatores estejam na circulação. De forma geral, a maioria dos fatores de crescimento possui uma variedade de outras ações, que incluem regulação do crescimento, divisão celular, proliferação, sobrevivência, diferenciação e migração. Por exemplo, o FGF e

múltiplos subtipos estimulam proliferação de muitos tipos celulares, inibem a diferenciação de vários tipos de células-tronco, e agem como sinais indutores no desenvolvimento embrionário (ALBERTS e cols., 1997). Na mucosa gástrica, os fatores de crescimento TGF $\alpha$  e EGF controlam a proliferação celular através de seus receptores comuns, sendo que, o TGF $\alpha$  atua predominantemente sob condições normais e após lesão aguda, já o EGF exerce suas ações principalmente durante a cicatrização de úlcera crônica (JONES e cols. 1999). Outros fatores como, FGF e VEGF, promovem a restauração do tecido conjuntivo e da microvascularização (angiogênese) na lesão da mucosa, enquanto o fator de crescimento insulina-símile, fator de crescimento de queratinócito, fator de crescimento de hepatócito e peptídeos em trevo (*trefoil peptides*) têm sido implicados na regeneração das lesões do trato gastrintestinais (JONES e cols., 1999).

### **Mucosa Gástrica e *Helicobacter pylori***

Há mais de cem anos que têm sido observados organismos na mucosa gástrica humana (BIZZOZERO, 1893 apud TOMSEN e cols., 1990), porém um maior interesse só foi despertado a partir de 1983, quando dois pesquisadores chamados Warren e Marshall isolaram pela primeira vez o *H. pylori*. Para provar que esta bactéria era responsável pelas gastrites e úlceras, Marshall ingeriu uma cultura purificada de *H. pylori*. Os sintomas começaram 7 dias após a ingestão e, ao ser submetido à endoscopia, foi constatada uma gastrite.

O *H. pylori* é um bacilo gram-negativo de formato espiralado (Figura 3). Esta bactéria coloniza 90% dos pacientes com úlcera gástrica e mais de 70% dos pacientes com úlcera duodenal, assim como mais da metade de pacientes sem

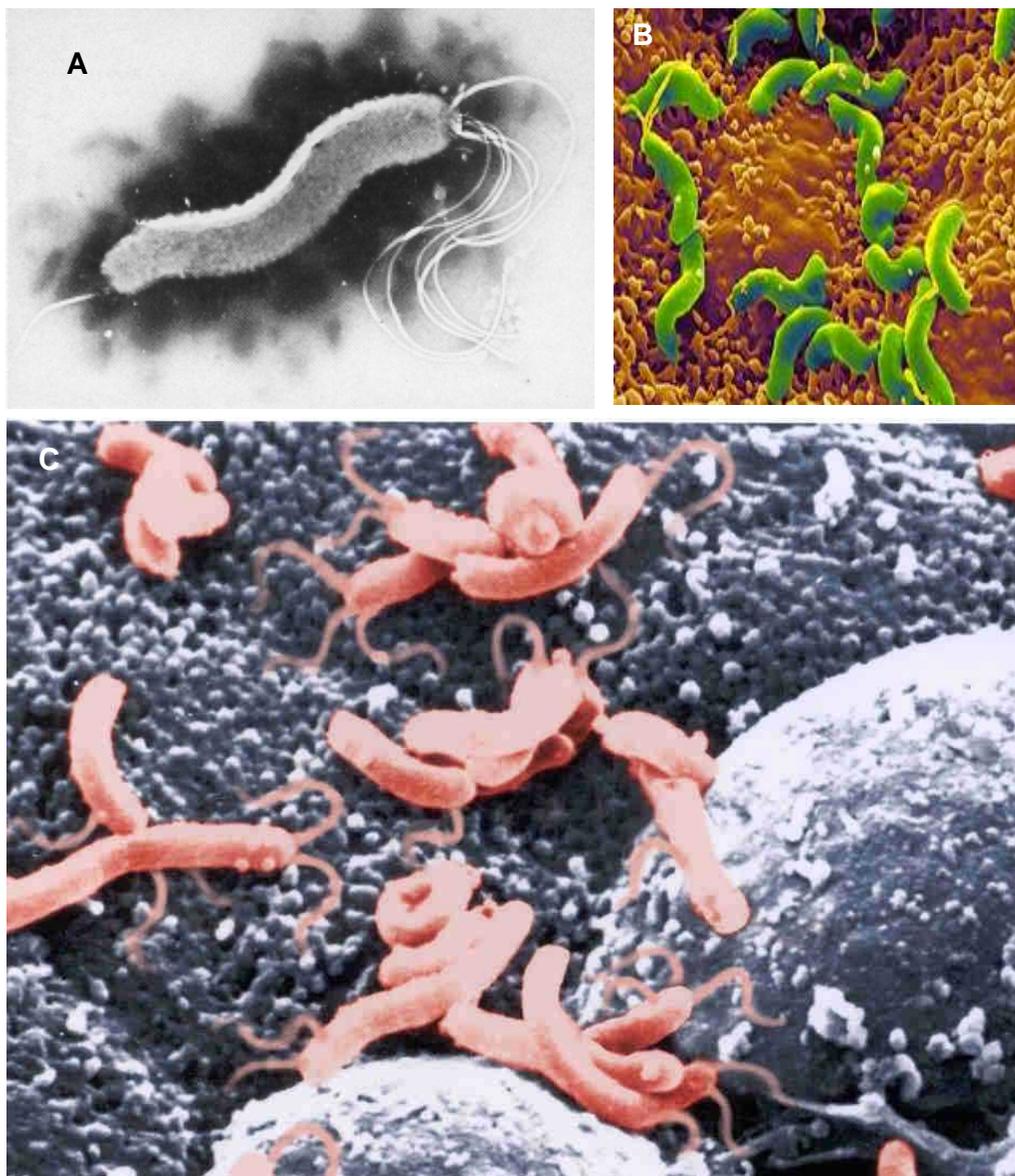


Figura 3 – Imagens de microscopia eletrônica de transmissão do *Helicobacter pylori* (A) e de varredura da superfície da mucosa gástrica infectada por uma grande quantidade deste bacilo (B, C). Yasmin T. e cols., in Abstracts of the General Meeting of the American Society of Microbiology, 102, p.166.

úlceras (RUNE, 1996). Além disto, a maioria das pessoas infectadas é assintomática, apresentando inflamação moderada detectada somente através do resultado histológico (RUNE, 1996; MONTECUCCO e RAPPUOLI, 2001). Classificado pelo IARC (International Agency for Research on Cancer) como agente patogênico classe I, o *H. pylori* não é somente a causa principal de gastrite e úlcera péptica, mas é também considerado um carcinógeno gástrico (KUIPERS e MEUDWISSEN, 1996; QUEIROZ e cols., 1998). Dados mostram que a gastrite associada ao *H. pylori* é a doença infecciosa mais comum no mundo, afetando mais de 50% da população (RUNE, 1996).

Tem sido proposto que o *H. pylori* adere às células epiteliais gástricas através de adesinas que se ligam a receptores específicos presentes na superfície das células hospedeiras (SLOMIANY e cols., 1995). Esses receptores no tecido são moléculas de adesão especializadas com funções cruciais para o estabelecimento de um habitat ótimo, o qual permite a colonização do *H. pylori* no hospedeiro (SMOOT, 1997). A colonização do *H. pylori*, mostrada em vários estudos de adesão, revela modificações na superfície celular epitelial, na forma de pequenas projeções celulares denominadas pedículos de aderência, nos quais a bactéria se fixa com maior firmeza à célula (CHEN e cols., 1983; GOODWIN e cols., 1985; SMOOT, 1993), exercendo seus efeitos patogênicos sobre os sistemas de defesa responsáveis pela homeostasia da mucosa. A ruptura epitelial ocorre através de um lipopolissacarídeo presente na membrana superficial do *H. pylori*, capaz de enfraquecer as interações existentes tanto entre células da mucosa com proteínas de MEC (SLOMIANY e cols., 1994), quanto entre receptores e mucinas específicas presentes nas células epiteliais gástricas (SLOMIANY e cols., 1995). Por outro lado, a camada de muco protetor sofre uma extensa degradação pelas várias enzimas

mucolíticas produzidas pela bactéria (SLOMIANY e SLOMIANY, 1993; SLOMIANY e cols., 1994). Além dessas enzimas, o *H. pylori* também secreta urease em grandes quantidades, que é constituída por duas subunidades, UreA e UreB (MOBLEY e cols., 1995). Esta enzima protege a bactéria do meio ácido, através da produção de amônia, aumentando o pH do micro-ambiente em torno dela. A ultraestrutura da mucosa gástrica humana com gastrite associada ao *H. pylori* mostrou várias alterações, tais como, a diminuição dos grânulos de muco, mudanças degenerativas e a perda dos complexos juncionais que unem as células epiteliais (KAZI e cols., 1990). O *H. pylori* produz uma toxina vacuolizante, a Vac-A, que induz a vacuolização da célula epitelial gástrica (COVER e BLASER, 1993) e possui o gene *cagA*, o primeiro gene cepa-específico identificado no *H. pylori* e que está fortemente associado ao câncer gástrico (PEEK e cols., 1999). Os pacientes infectados por cepas que expressam *cagA*<sup>+</sup> têm probabilidade três vezes maior de desenvolver câncer gástrico do que aqueles infectados por cepas *cagA*<sup>-</sup> (PARSONNET e cols., 1997). O gene *cagA* é considerado marcador da ilha de patogenicidade *cag* (*cag-PAI*), que possui de 35 a 40Kb e que comporta 31 genes (BLASER e BERG, 2001). A *cag-PAI* é um componente do genoma do *H. pylori* que contém genes homólogos aos de outras bactérias que codificam componentes do sistema de secreção do tipo IV. O *H. pylori* utiliza este sistema para introduzir moléculas efetoras para a célula hospedeira e modular vias intracelulares, incluindo a expressão de proto-oncogenes (COVACCI e RAPPUOLI, 2000). A proteína *cagA* do *H. pylori* atua como antígeno altamente imunogênico e qualquer variação em sua estrutura pode levar a diferentes graus de resposta inflamatória do hospedeiro. Na mucosa gástrica de pacientes infectados por cepas *cag-PAI*<sup>+</sup>, foi observado uma relação direta entre o predomínio de neutrófilos e o aumento de secreção de

interleucina-8 (IL-8), entretanto, cepas *cagA*- também induzem aumento desta interleucina (QUEIROZ e cols., 1998), possivelmente por meio do gene *cagE*, que é um dos genes da ilha *cag* e o principal responsável pelo aumento de IL-8 (NAITO e YOSHIKAWA, 2002).

Slomiany e cols. (1991) mostraram que o lipopolissacarídeo do *H. pylori* interfere na interação da laminina com a sua integrina receptora, presente na membrana da célula epitelial gástrica. Outros estudos mostraram que células epiteliais entram rapidamente em apoptose, quando perdem o contato com a MEC subjacente (FRISCH e FRANCIS, 1994; RUOSLATHI e REED, 1994).

A colonização da célula epitelial gástrica pelo *H. pylori* modula a expressão de lamininas e suas integrinas receptoras. Além disso, o processo de metaplasia intestinal, subsequente à infecção, pode levar até mesmo à ausência de expressão de uma isoforma da laminina, a laminina  $\alpha_2$  ou merosina, fundamental na renovação glandular gástrica (SALES e cols., 1998). Estudos imunohistoquímicos e ultraestruturais mostraram uma descontinuidade de marcação para a cadeia  $\alpha_2$  da laminina e sua integrina receptora,  $\alpha_6 \beta_4$ , em MBs glandulares das mucosas colonizadas pelo *H. pylori* (SALES e cols., 2001). Ultraestruturalmente, foi observada uma estreita relação entre fibroblastos e células epiteliais gástricas em mucosas normais, relação esta que desaparece quando ocorre a colonização da célula pelo *H. pylori*, sugerindo que a adesão deste bacilo à superfície de células epiteliais desestabiliza as interações epitélio/estroma e modula a expressão de moléculas da MEC (SALES e cols., 2001). Parece que somente a interação entre o bacilo e o epitélio seja suficiente para interferir na expressão e organização dos componentes que mantêm a integridade da membrana basal epitelial. Por outro lado, tem sido sugerido que o *H. pylori* se liga a vários elementos de matriz extracelular presentes

na lâmina própria, próximos à região de infecção, levando a vários aspectos de agressão a mucosa infectada (DUBREUILLE e cols., 2002) (Figura 4). As lectinas presentes na superfície gástrica desempenham um papel também importante na interação com o *H. pylori*. A bactéria adere à superfície interna do estômago pelas interações entre suas adesinas e oligossacarídeos específicos das glicoproteínas da membrana das células epiteliais gástricas. Entre os sítios de ligação, está o oligossacarídeo Le<sup>b</sup> reconhecido pelo *H. pylori*, quando ele é parte do determinante do grupo sanguíneo O, explicando desta forma, a maior incidência de úlcera gástrica nas pessoas com este grupo sanguíneo. Diferença considerável no padrão de aglutinação de glicoconjugados foi observada na parede de formas cocóide e espiral de *H. pylori*, detectados com a utilização de lectinas específicas para resíduos de açúcares (manose, fucose, N-acetilglicosamina). Esta diferença pode estar relacionada com mudanças estruturais durante os eventos de transformação morfológica, resultando na exposição ou no mascaramento de alguns resíduos de açúcar sobre a superfície celular. A possibilidade de haver resíduos de açúcar na superfície celular pode permitir que a bactéria se ligue a diferentes receptores, constituídos de resíduos de açúcares, sobre o muco gástrico e células epiteliais (KHIN e cols., 2000).

### **Justificativa do trabalho**

Considerando as dificuldades experimentais para se estabelecer cultura primária de células de mucosa gástrica, os estudos *in vitro* sobre as interações do *H. pylori* com essas células têm utilizado principalmente linhagens celulares tumorais, comumente obtidas de carcinomas e adenocarcinomas (YOSHIDA e cols., 1990;

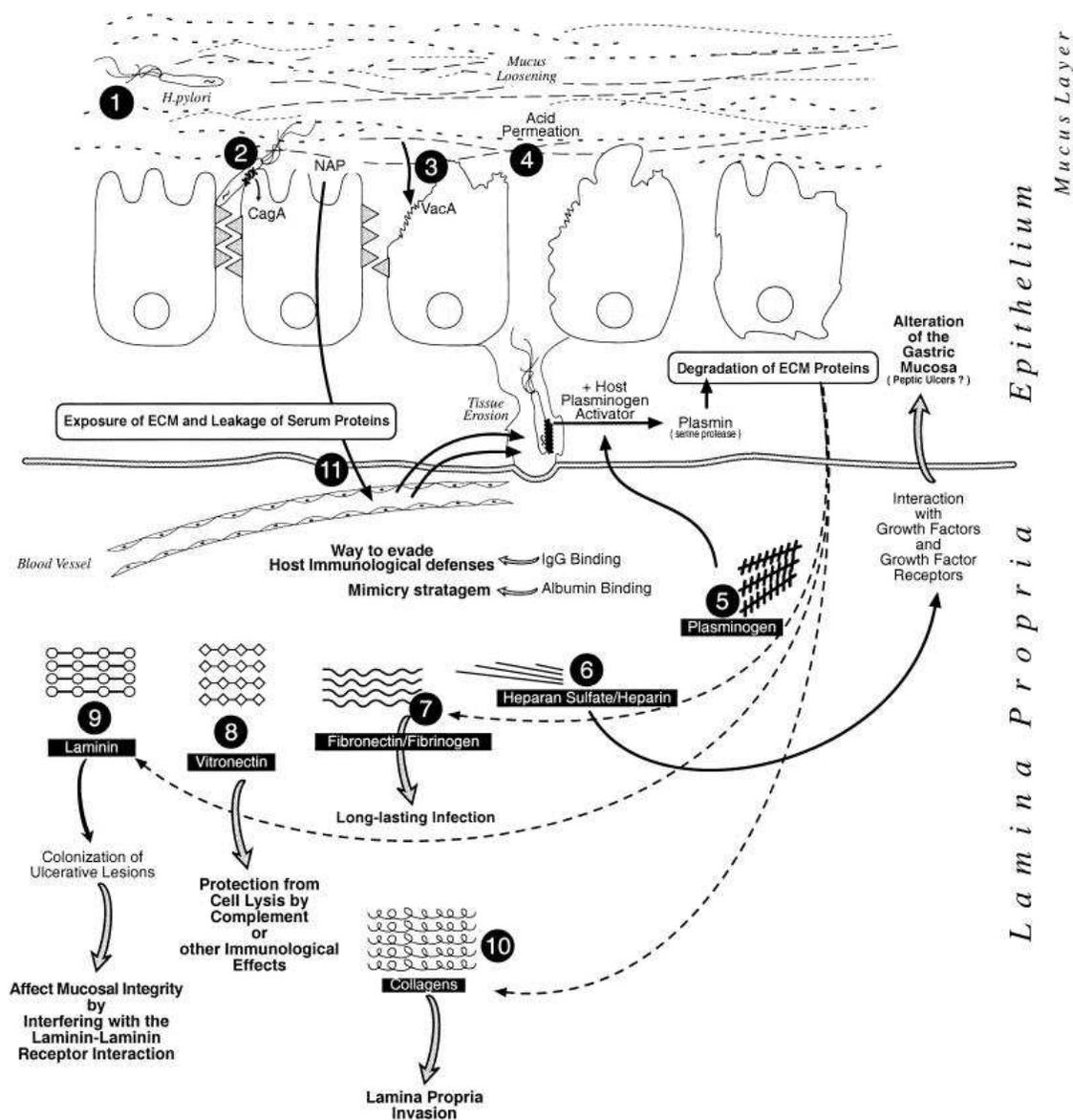


Figura 4 – Esquema que sugere o caminho pelo que percorre o *H. pylori* no processo de infecção da mucosa gástrica humana. O bacilo primeiro atravessa a camada de muco e, em seguida, interage e induz alteração morfológicas nas células epiteliais e, por último, possivelmente interage com os vários componentes de MEC localizados no tecido conjuntivo subjacente, a lâmina própria. Dubreulle cols. Microbiology and Molecular Biology Review. vol.66, No. 4, p.617-629. 2002.

EVANS e cols., 1992; SMOOT e cols., 1993; WADSTROM e cols., 1996; MAYER e cols., 2001; THEOCHARIS e cols., 2003; van AMSTERDAM e van der ENDE, 2004 ). Desta forma, são poucos os estudos *in vitro* que tratam destas interações utilizando populações celulares homogêneas normais, com capacidade de cultivo por longo período. Foi mostrado na literatura que células epiteliais obtidas de biópsias gástricas humanas apresentam viabilidade semelhante à da mucosa *in vivo* por até duas semanas em cultivo (TERANO e cols., 1983). Células epiteliais da mucosa gástrica de outros animais como as do coelho, quando plaqueadas sobre uma membrana basal artificial (matrigel), apresentam viabilidade pelo menos por uma semana (CHEW e cols., 1989), enquanto que as células gástricas de suíno e rato (MEYER-ROSEMBERG e BERGLINDH 1996), gato doméstico (FOX e cols., 1995; SIMPSON e cols., 2001), camundongo (SMYTHIES e cols., 2000) e porquinho da Índia (RHODES e cols., 1994) foram mantidas em cultura por até um mês, sem a proliferação de fibroblastos.

Os modelos de cultivo de células em monocamada têm sido bastante utilizados para estudar as interações entre o *H. pylori* e linhagens celulares epiteliais derivadas de adenocarcinoma gástrico humano (THOMSEN e cols., 1990; SMOOT e cols., 1993). Ensaios de adesão do *H. pylori* com as células epiteliais gástricas mostraram que esta bactéria induz alterações morfológicas no citoesqueleto das células e formação de pedículos de aderência (SMOOT e cols., 1993). Segal e cols. (1996) também mostraram que a aderência do *H. pylori* às células gástricas induz a um rearranjo do citoesqueleto e à fosforilação da tirosina das proteínas da célula hospedeira.

Por outro lado, a utilização de sistemas de co-culturas em monocamada e em três dimensões (3D) tem possibilitado uma melhor compreensão dos fenômenos

de interações celulares, pois proporcionam condições de cultivo *in vitro* que mais se aproximam das situações *in vivo*. Os trabalhos com modelos de cultivo em 3D no campo da engenharia tecidual mostraram que células normais, como os hepatócitos (TONG e cols., 1994) e células ósseas (KELE e cols., 2000), podem estabelecer uma organização histológica *in vitro* típica, mantendo inclusive a funcionalidade específica do órgão de origem. Embora esse tipo de estratégia venha sendo empregado com sucesso em vários modelos de tecidos (KUNZ-SCHUGHART e cols., 2001, 2004; YAMAUCHI e cols. 2003), não há relatos na literatura de estudos com células epiteliais e estromais isoladas a partir de cultura primária de mucosa gástrica humana, e colocadas em co-cultivo em monocamada ou em 3D.

## **OBJETIVO GERAL**

---

Embora seja conhecido que a colonização da mucosa gástrica pelo *H. pylori* ocorra através do epitélio, muitos autores têm relatado neste bacilo a presença de moléculas com alta afinidade por vários componentes da MEC, presentes no estroma conjuntivo adjacente. Assim, o objetivo geral deste trabalho é estabelecer *in vitro* um modelo de co-cultura que possibilite o estudo das interações entre células epiteliais e estromais gástricas humanas na presença do *H. pylori*.

### **Objetivos específicos:**

1. Isolar e estabelecer populações celulares homogêneas estromal e epitelial a partir de cultura primária de biópsia gástrica da mucosa antral humana normal;
2. Caracterizar morfológicamente por contraste de fase, coloração histológica e por imunocitoquímica os tipos celulares e os componentes de MEC presentes nas culturas;
3. Estabelecer modelos de co-cultura em monocamada e em 3D com as células estromais e epiteliais obtidas;
4. Analisar eventuais alterações na distribuição de componentes de MEC, presentes nos modelos de co-cultura;
5. Analisar os aspectos ultraestruturais dos tipos celulares gástricos obtidos e cultivados em monocamada e em 3D, utilizando microscopia eletrônica de transmissão e de varredura;
6. Analisar os aspectos ultraestruturais das interações entre o *H. pylori* e os tipos celulares gástricos presentes nos diferentes modelos de cultura estabelecidos.

## MATERIAIS E MÉTODOS

---

O trabalho experimental foi desenvolvido no Laboratório de Proliferação e Diferenciação Celular – Unidade de Interações Celulares no Sistema Endócrino e Reprodutor do Departamento de Histologia e Embriologia do Instituto de Ciências Biomédicas da UFRJ e no Programa Avançado de Biologia Celular Aplicado à Medicina (PABCAM) do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho (HUCFF).

O material biológico (biópsias) utilizado neste estudo foi obtido de pacientes voluntários que assinaram consentimento livre e esclarecido. Esses pacientes participam do projeto “Estudo da apoptose celular na mucosa gastrointestinal”, coordenado pelo Dr. Heitor Siffert Pereira de Souza, do Laboratório Multidisciplinar - HUCFF, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, CEP n. 150\01, e pela Comissão de Investigação Científica - HUCFF, CIC n. 115\01, submetido em 2001 e aprovado em 2002.

As biópsias foram retiradas da região do antro gástrico, com o auxílio de um equipamento endoscópico conectado a um monitor de vídeo, no Departamento de Gastroenterologia do HUCFF. Este material foi selecionado previamente pelo teste de urease negativa, que indica ausência de *H. pylori*, e, em seguida, analisado por médicos patologistas do HUCFF, para confirmação histológica de patologia e/ou a ausência do bacilo. As biópsias gástricas utilizadas neste estudo foram obtidas de 10 pacientes, que se queixavam de queimação e dores no estômago, mas com diagnóstico negativo para o bacilo *H. pylori*. Toda a manipulação do material biológico foi realizada no PABCAM, que possui todo o equipamento e as condições necessárias para este tipo de processamento.

## **Estabelecimento das Populações Celulares Estromal e Epitelial a partir de Cultura Primária obtida de Mucosa Antral Gástrica Humana**

### **Células Estromais**

O material biopsiado da mucosa antral gástrica dos pacientes submetidos à endoscopia foi coletado em tubos plásticos com solução tamponada estéril, tampão fosfato de sódio 0,01M e pH 7,45 (TPS), contendo dois antibióticos e um antifúngico (penicilina 10.000 ui, estreptomicina 10 mg e anfotericina "B" 25), e em seguida processado em câmara de fluxo laminar segundo o seguinte protocolo:

1. Lavagem das biópsias, 3 vezes com a solução tampão TPS 0,01M pH 7,45;
2. Dissociação mecânica com tesoura de aço e a enzimática com solução de colagenase 1A (1mg/mL) (SIGMA), preparada em meio de cultura DMEM (SIGMA), sem soro e incubada em estufa a 37 °C e atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>, durante 1 hora;
3. Ao final da dissociação, o homogenado celular foi centrifugado, o *pellet* das células foi ressuspensão em 1 ml de meio de cultura e as células foram contadas em câmara de *Neubauer*;
4. Após a contagem, as células foram plaqueadas em garrafas de 25 cm<sup>2</sup> de área, com aproximadamente 10<sup>6</sup> células/garrafa, em 4 ml de meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (GIBCO), e mantidas em estufa a 37 °C e atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>;
5. Após serem cultivadas durante 7 dias, as células foram tripsinizadas (solução de tripsina a 0,3% em meio DMEM), centrifugadas, ressuspensas e contadas em câmara de *Neubauer*;

6. Parte das células foi plaqueada em placas de 24 poços com lamínulas de vidro ( $10^4$  células/lamínula), cultivadas durante sete dias em estufa a  $37^{\circ}\text{C}$  e atmosfera de 5% de  $\text{CO}_2$ , e submetidas aos testes imunocitoquímicos para a caracterização dos tipos celulares e de componentes de MEC;
7. O restante das células foi mantido em garrafas de  $25\text{ cm}^2$  de área nas mesmas condições acima descritas, e os mesmos procedimentos de tripsinização e replaqueamento das células foram periodicamente repetidos. A caracterização dos tipos celulares presentes nas culturas era realizada a cada passagem e, após 60 dias de cultivo ( $10^{\text{a}}$  passagem), uma população homogênea de células estromais foi obtida.

### **Células Epiteliais**

Para a obtenção da população epitelial, os primeiros procedimentos de coleta do material foram os mesmos descritos anteriormente para a obtenção das células estromais, seguidos das seguintes modificações:

1. Após a dissociação mecânica dos fragmentos da mucosa gástrica, a digestão enzimática foi feita em solução de dispase com EDTA 0,02% em HBSS CMF, a  $4^{\circ}\text{C}$  por 16 horas;
2. Agitação em placa magnética por 1 hora à temperatura ambiente;
3. Após a dissociação, centrifugação e contagem das células obtidas, as mesmas foram plaqueadas em garrafas de  $25\text{ cm}^2$  de área, contendo  $10^6$  células/garrafa, em meio de cultura DMEM (Sigma) com 10% de SFB, por 2 a 6 horas, em estufa a  $37^{\circ}\text{C}$  e atmosfera de 5% de  $\text{CO}_2$ ;

4. Em seguida, o meio de cultura, com as células não aderidas (células epiteliais), foi coletado, centrifugado e o *pellet* obtido ressuspensão em meio de cultura HAM-F12 com SFB a 10%;
5. Estas células foram plaqueadas no mesmo meio HAM-F12 sobre um tapete de células estromais (células 3T3, obtidas do banco de células do PABCAM do HU), uma linhagem de células fibroblásticas previamente irradiadas, e cultivadas durante 7 dias nas mesmas condições;
6. Após este tempo, as células epiteliais foram tripsinizadas (tripsina 0,3% em meio Dulbecco), e uma parte cultivada em placa de 24 poços com lamínulas de vidro ( $10^4$  células/poço) durante 7 dias, em estufa a  $37^\circ\text{C}$  e atmosfera de 5% de  $\text{CO}_2$ , para a caracterização imunocitoquímica;
8. Do restante das células, uma parte foi mantida em garrafas de  $25\text{ cm}^2$  de área, nas mesmas condições acima descritas, para outros experimentos, e a outra parte, congelada em nitrogênio líquido.

Nessas condições, o estabelecimento da população homogênea de células epiteliais foi obtido logo após a primeira semana de cultivo.

### **Caracterização Morfológica e Imunocitoquímica das Populações Celulares obtidas**

As populações de células obtidas da mucosa gástrica foram caracterizadas morfológicamente por microscopia de contraste de fase e por imunofluorescência (epifluorescência), para detecção de proteínas do citoesqueleto e de elementos de MEC. Os procedimentos imunocitoquímicos foram efetuados diretamente na placa de cultivo, nas células *in situ*, conforme descrito anteriormente por Tougard e cols. (1977). Para as células estromais, foi utilizado como fixador o paraformaldeído à 4%

(Sigma) + sacarose à 4% (Vetec) em tampão Sorensen 0,1M, pH 7,4, durante 30 min à temperatura ambiente; para as células epiteliais, foram utilizados a acetona e o metanol a 90%, durante 5 min à 4°C. Após a fixação das células, a imunofluorescência foi realizada com a utilização do kit LSAB da DAKO, conforme os passos abaixo:

1. Lavagem das células por três vezes durante 30 min, com TPS para a retirada do fixador;
2. Incubação das células durante 30 min com cloreto de amônia (NH<sub>4</sub>Cl) 50nM em TPS, para neutralização e remoção dos grupamentos aldeídicos livres (REGGIO e cols.,1983);
3. Incubação com saponina 0,05% (Sigma) em TPS durante 30 min para a permeabilização da membrana celular, facilitando a penetração do anticorpo sem danificar a estrutura da célula;
4. Incubação por 30 min com uma solução de saponina 0,05% mais gelatina 0,2% (gelatina tipo B - Sigma) em TPS, para prevenção da adsorção inespecífica de imunoglobulinas;
5. Incubação com o anticorpo primário *overnight*, diluído na solução de saponina/gelatina/TPS; o controle negativo dos anticorpos monoclonal e policlonal foi feito através da incubação das células com TPS ou soro normal de cabra, respectivamente, em lugar do anticorpo primário;
6. Lavagem das células com a solução de saponina/gelatina/TPS, três vezes durante 30 min;
7. Incubação com anticorpo secundário biotilado universal (Ig anti-camundongo e Ig anti-coelho) (Dako), diluído na solução de saponina/gelatina/TPS durante 30 min;

8. Lavagem das células com a solução de saponina/gelatina/TPS, três vezes durante 30 min;
9. Incubação com streptavidina Cy3 (Sigma), diluída na solução de saponina/gelatina/TPS durante 1h 30 min;
10. Lavagem das células com a solução de saponina/gelatina/TPS, três vezes durante 30 min;
11. Lavagem rápida em TPS;
12. Incubação com DAPI durante 5 min, para visualizar núcleos celulares;
13. Lavagem das células com água destilada, três vezes durante 5 min;
14. Montagem das lamínulas em lâminas com N-propilgalato (Sigma);
15. Observação e fotografia das lâminas em microscópio de fluorescência (Zeiss e Axiosbop II).

Para caracterizar as células epiteliais, foi utilizado o protocolo descrito acima com algumas modificações:

1. Lavagem das células com uma solução tampão (TPS - 0,1M, pH 7,4) mais soro albumina bovina (BSA) a 1% (TPS/BSA), três vezes durante 30 min;
3. Incubação das células com o anticorpo primário durante 30 min;
4. Lavagem três vezes com TPS/BSA, durante 30 min;
5. Incubação com anticorpo secundário biotilado universal, durante 10 min; o controle negativo dos anticorpos monoclonal e policlonal foi feito através da incubação das células com TPS ou soro normal de cabra, respectivamente, em lugar do anticorpo primário;
6. Lavagem com TPS, três vezes durante 10 min;
7. Incubação com streptavidina Cy3 (Sigma) durante 30 min;
8. Lavagem com TPS, três vezes durante 10 min;

9. Lavagem com água destilada, três vezes durante 5 min;
10. Incubação com DAPI durante 5 min;
13. Lavagem das células com água destilada, três vezes durante 5 min;
14. Montagem das lamínulas em lâminas com de N-propilgalato (Sigma) e observação e fotografia das lâminas em microscópio de fluorescência (Zeiss e Axiosbop II).

Os anticorpos utilizados nas imunomarcações e suas respectivas diluições estão listados na Tabela 1.

**Tabela 1 – Anticorpos utilizados**

<b>Anticorpo primários</b>	<b>Tipo</b>	<b>Diluição</b>	<b>Fonte</b>
$\alpha$ -Actina de músculo liso	Monoclonal clone 1A 4	1/400	Sigma
Citoqueratina	Policlonal NCL-CKp	1/100	Novocastra
Citoqueratina 7	monoclonal clone ov-tl 12/30	1/100	DAKO
Citoqueratina 8	monoclonal clone 35 $\beta$ H11	1/100	DAKO
Vimentina	Monoclonal clone LN-6	1/100	Sigma
Colágeno tipo IV	Monoclonal clone COL-94	1/100	Sigma
Condroitin sulfato	Monoclonal clone CS-56	1/200	Sigma
Fibronectina	Monoclonal clone FN-15	1/100	Sigma
Laminina	Monoclonal clone LAM-89	1/100	Sigma
<b>Anticorpos secundários</b>		<b>Diluição</b>	<b>Fonte</b>
IgG anti-camundongo e IgG anti-coelho (biotinilado universal) conjugado (TRITC)		1/80	Dako
IgG anti-camundongo conjugado (FITC)		1/100	Dako
IgG anti-coelho conjugado (CY3)		1/100	Sigma
Streptavidina Cy3		1/1000	Sigma

### **Método citoquímico de identificação de glicoconjugados das células epiteliais**

Neste estudo, as lectinas foram selecionadas com base em sua ampla utilização na identificação de açúcares específicos localizados na superfície celular. A identificação de glicoconjugados constitui uma forma geral de análise da substância mucosa presente nas células epiteliais. As lectinas utilizadas nas reações estão listadas na Tabela 2, tendo sido empregadas na diluição de 100µl/ml em TPS (pH 7.4), conforme o protocolo seguinte:

1. Fixação das células com acetona gelada;
2. Lavagem das células com TPS mais BSA a 1%, três vezes durante 30 min;
3. Incubação das células com a lectina biotinilada durante 30 min;
4. Lavagem três vezes com TPS/BSA a 1%, durante 30 min;
5. Incubação com streptavidina Cy3 (Sigma) durante 30 min;
6. Lavagem com TPS, três vezes durante 10 min;
7. Lavagem com água destilada, três vezes durante 5 min;
8. Incubação com DAPI durante 5 min;
9. Lavagem das células com água destilada, três vezes durante 5 min;
10. Montagem das lamínulas com de N-propilgalato e observação e fotografia das lâminas em microscópio de fluorescência (Zeiss - AxiosKop 2 e Nikon – Eclipse E 800).

**Tabela 2 – Lectinas utilizadas**

<b>Lectina</b>	<b>Abreviação</b>	<b>Açúcar específico</b>	<b>Fonte</b>
Concanavalina A	Con A	$\alpha$ -D-Man, $\alpha$ -D-Glc	VETEC
<i>Dolichos biflorus agglutinin</i>	DBA	$\alpha$ -GlcNAc	VETEC
Glycine max	SBA	D-GalNAc	VETEC
<i>Arachis hypogaea</i>	PNA	$\beta$ -D-Gal(1-3)GalNAc	VETEC
<i>Triticum vulgare</i> (Wheat germ)	WGA	(D-GlcNAc) <sub>2</sub> , NeuNAc	VETEC
<i>Phaseolus vulgaris</i>	PHA-L	Tipo complexo de carboidrato	VETEC
<i>Lentil agglutinin</i> (Lens culinaris)	LCA	D-Man, D-Glc	VETEC

Man, manose; GalNAc, N-acetil-galactosamine; GlcNAc, N-acetil-glicosamine.

### **Experimentos de co-cultura das populações celulares obtidas**

As populações homogêneas de células estromais e epiteliais foram utilizadas em experimentos de co-cultura em monocamada e em três dimensões (3D). Na co-cultura em monocamada, as duas populações celulares foram cultivadas na proporção de 1:1 ( $10^4$  células de cada tipo). As células, após terem sido misturadas por 10 min com o auxílio de um agitador magnético, foram plaqueadas em poços contendo lamínulas de vidro (1 cm de diâmetro), em meio Dulbecco suplementado com 10% de SFB. As células foram incubadas em estufa a 37 °C e atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Essas co-culturas foram caracterizadas por imunofluorescência, utilizando

os mesmos protocolos descritos anteriormente para as culturas isoladas, e por microscopia eletrônica, em média, após 5 dias de cultivo.

A co-cultura em 3D também foi estabelecida na mesma proporção de 1:1 (1,5 X 10<sup>4</sup> células de cada tipo). Estas células foram cultivadas em placas contendo poços com fundo em “U”, área de 0,5 cm de diâmetro, previamente recobertos por uma película de gel de agarose à 1%, em meio de cultura KM-F12. As células foram incubadas em estufa a 37 °C e atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. O tempo suficiente para a formação das estruturas tridimensionais (estruturas conhecidas como esferóides) foi de dois a três dias de cultivo. Alguns dos esferóides já formados foram transferidos para um sistema rotatório de cultura celular (RCCS-4). Este sistema foi desenvolvido pela NASA e permite a formação de um ambiente de microgravidade única, funcionando com baixa turbulência e baixo aquecimento, minimizando o dano mecânico e permitindo associação de diferentes tipos celulares em estruturas de 3D com vários milímetros de diâmetro. É uma forma otimizada de cultivar células aderentes e em suspensão, promovendo alta transferência de massa com adequada nutrição e oxigenação. Neste sistema, os esferóides foram cultivados por 3, 7, 14, 21 e 28 dias, períodos em que foram caracterizados morfológicamente e por imunofluorescência, segundo o seguinte protocolo: os esferóides foram incluídos em OCT e congelados diretamente em nitrogênio líquido; em seguida foram seccionados em criostato com espessura de 6 µm, à temperatura de -20 °C e armazenados em freezer até o momento de utilização, sendo então fixados e submetidos ao mesmo protocolo descrito anteriormente para a imunofluorescência.

Estes esferóides também foram caracterizados por microscopia eletrônica de transmissão e de varredura.

## Ensaio de proliferação celular

Para analisar a atividade proliferativa das células obtidas da mucosa gástrica utilizamos o método do MTT, que se baseia na conversão do sal tetrazolium (3-(4,5-dimetihylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxy-methoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium) em formazam, que é solúvel em meio de cultura. As análises do crescimento celular foram feitas com células em cultura primária na VI passagem (CP-VI<sub>p</sub>), células epiteliais estabelecidas e cultura primária com mais de XII passagens de cultivo (estromais estabelecidas). O crescimento destas células foi avaliado em dois grupos, separados pelo tempo de cultivo (CP-VI<sub>p</sub>), e o meio de cultivo utilizado. O primeiro grupo foi formado por: a) cultivos isolados de células da CP-VI<sub>p</sub>, b) de células epiteliais estabelecidas e c) de co-cultivos destas células; e o segundo grupo foi formado por: a) cultivos isolados de células estromais, b) células epiteliais e c) co-cultivos destas células. Ambos os grupos foram cultivados nos meios de cultivo DMEM e HAM-F12. Estas células foram suspensas em placas de 96 poços, na proporção de  $8 \times 10^2$  células/poço, contendo 200  $\mu$ L do meio de cultivo respectivo (DMEM ou HAM-F12), em triplicata. Após 48 horas de cultivo, os ensaios de proliferação celular foram realizados nos pontos 0, 24, 48, 72 e 96 horas, segundo o seguinte protocolo: de cada poço foi retirado e desprezado todo o meio de cultura e adicionados 100  $\mu$ L de MTT (50  $\mu$ g/mL); a placa foi então protegida da luz com papel laminado e incubada por 3 horas em estufa a 37°C; a pós esta etapa, o meio de cultura com o MTT livre foi desprezado e, em seguida, as células nos poços foram incubadas com 100  $\mu$ L de DMSO sob agitação por 10 min; finalmente, a solução de DMSO e as células foram transferidas para o leitor de densidade ótica (570 nm), para avaliação indireta da proliferação celular. Os dados desta avaliação foram

analisados pelo programa de dados computacional Prisma 4. A diferença entre as populações celulares foram comparadas através da análise de variância (ANOVA), sendo considerada variação estatisticamente significativa quando  $p$  foi menor que 0.05 nos grupos analisados.

## **Caracterização ultraestrutural das co-culturas em monocamada e dos esferóides**

### **Microscopia eletrônica de transmissão**

As culturas processadas para microscopia eletrônica de transmissão (MET) foram fixadas *in situ* com glutaraldeído 2,5 %, em tampão fosfato de sódio (TPS) 0,1M, pH 7,4, durante duas horas. Em seguida, foram lavadas em TPS, duas vezes por cinco min, e em tampão cacodilato 0,1 M, pH 7,4, durante cinco min; seguindo para o tetróxido de ósmio 1% + ferrocianeto de potássio 0,8 % + cloreto de cálcio 5 mM, em tampão cacodilato 0,1M, pH 7,4, durante uma hora e trinta min, na ausência de luz. Ao final dessa etapa, as culturas foram novamente lavadas em tampão cacodilato 0,1M, pH 7,4 (três vezes, cinco min cada lavagem) e, por fim, colocadas em solução aquosa de acetato de uranila 1% durante a noite, a 4 °C. A desidratação foi iniciada no dia seguinte pela manhã, onde as culturas foram lavadas em água destilada e em seguida em vários banhos de acetona em diferentes concentrações (30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 100%). Em seguida, as culturas foram infiltradas com resina (EMBed - 812) e acetona (1:1) durante a noite sob agitação. A infiltração com a resina pura foi feita na manhã do terceiro dia, sendo o material orientado e emblocado na parte da tarde. Para a polimerização da resina, os blocos foram colocados em estufa à 60°C por 48 horas. Após esta etapa, os blocos foram

seccionados em ultramicrotomo (RMC-MT 6000 – XL) numa espessura de 200 a 500 nm. Esses cortes semifinos foram colocados em lâminas de vidro, corados com azul de toluidina e analisados ao microscópio óptico. Posteriormente, foram obtidos cortes ultrafinos com 60-80 nm e colhidos em grades de cobre. Essas grades foram contrastadas com acetato de uranila 5% por 30 min. Em seguida, lavadas em água destilada, contrastadas em citrato de chumbo por 5 min, e novamente lavadas em água destilada. Após a contrastação, o material foi observado e fotografado ao microscópio eletrônico de transmissão, operado na voltagem de 80 KV, modelos JEOL 1200 e Morgagni 268, FEI.

### **Microscopia eletrônica de varredura**

O procedimento para a microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi em parte semelhante àquele descrito para microscopia eletrônica de transmissão até a contrastação do material pelo acetato de uranila. Deste ponto em diante, as culturas foram desidratadas com solução alcoólica crescente de 30%, 50% 70% e 100%, seguindo para a etapa de secagem até o ponto crítico, no aparelho Baltec CPD 030 (*critical point dryer*). Para que a amostra apresentasse maior condutividade e gerasse elétrons secundários, o material foi revestido com uma fina camada de ouro, com aproximadamente 20 nm de espessura, com o auxílio de um metalizador, modelo Baltec SCD 050. Em seguida, o material foi analisado e fotografado num microscópio eletrônico de varredura, modelo JEOL 5310.

### **Experimentos de co-cultivo com o *Helicobacter pylori***

A cepa de *H. pylori*, ATCC 43504, lote 1104380, foi obtida do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) da Fundação Oswaldo Cruz. Esta cepa apresenta positividade para citocinas como *vacA+* e *cagA+* e possui um sistema de secreção do tipo IV, um aparato utilizado na introdução de substâncias nocivas para dentro de células hospedeiras.

As bactérias liofilizadas foram primeiro ressuspensas em caldo Brucella por 48 horas a 37 °C, em seguida cultivadas em placa de Petri com agar brucella (Gibco) suplementado com 5% de sangue de carneiro, e incubadas por 24 a 48 horas a 37°C, sob microaerofilia (5% O<sub>2</sub> / 10% CO<sub>2</sub> / 85% N<sub>2</sub>) e em ambiente com 98% de umidade. Após o crescimento, a quantidade de bactérias utilizadas neste estudo foi obtida com o auxílio da escala de *Mcfarland*. Suspensões contendo 10<sup>7</sup> e 10<sup>8</sup> bactérias foram obtidas respectivamente através dos tubos de números 0,5 e 1,0 desta escala. O *H. pylori* foi inicialmente analisado por coloração negativa. Esta coloração foi realizada a partir do cultivo da amostra em meio agar sólido ressuspenso em 1 ml de solução tampão TPS. Uma gota desta solução foi aplicada imediatamente sobre grades previamente cobertas por um filme de *formvar*, permanecendo por 5 min, sendo o excesso da solução retirado com auxílio de papel de filtro. As bactérias foram então fixadas em glutaraldeído 2,5%, por 5 min e, em seguida, coradas com ácido fosfotúngstico (PTA) 2% e 4%, pH 7,2, por um minuto. As grades foram observadas ao microscópio eletrônico de transmissão (JEOL 1200 e Morgagni 268, FEI). Estes experimentos foram realizados para verificar as características gerais do *H. pylori*.

Os procedimentos de co-cultivo das bactérias com as culturas celulares estabelecidas foram realizados no Laboratório de Biologia de Anaeróbios, do Departamento de Microbiologia Médica do Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes. Uma vez estabelecidas as culturas de monocamada, com células epiteliais e estromais cultivadas na proporção de  $10^4$  células/poço com 1 cm de diâmetro, utilizou-se uma quantidade de  $10^7$  *H. pylori*/ml de meio de cultura. Nas culturas em 3D, a mesma quantidade de  $10^7$  *H. pylori* foi utilizada para cada poço da placa de Elisa contendo um esferóide, com um total de  $3 \times 10^4$  células, e 250  $\mu$ L de meio de cultura. Tanto nas culturas em monocamada quanto nas culturas em 3D, o tempo de interação com o *H. pylori* foi de 3 horas em estufa com entrada de 5% de CO<sub>2</sub> e com temperatura de 37 °C. Após este período de tempo, essas co-culturas foram então analisadas por microscopia eletrônica de transmissão e de varredura, segundo protocolos previamente descritos.

## RESULTADOS

---

### **Estabelecimento e caracterização das populações de células estromais e epiteliais da mucosa gástrica**

#### **Células estromais**

À microscopia de contraste de fase, as culturas primárias da mucosa gástrica do antro, logo nas primeiras horas de cultivo, apresentavam várias e pequenas colônias de células com aspectos epiteliais e estromais. Com a expansão destas colônias e do crescimento celular, observou-se que a cultura chegava a sua total confluência entre o 5<sup>o</sup> e 7<sup>o</sup> dias de cultivo. A partir desta cultura confluenta, as células eram tripsinizadas e replaqueadas, e ao longo de várias passagens a principal característica observada era o predomínio de células com forma alongada e citoplasma espreado (tipo fibroblasto), em relação às células com forma arredondada (tipo epitelial). Com aproximadamente 30 dias de cultivo (VI passagem), poucas células do tipo epitelial ainda estavam presentes (Figura 5A). Isto foi se tornando cada vez mais evidente à medida que a cultura primária era submetida à nova passagem. Com aproximadamente 60 dias de cultivo, as células presentes eram exclusivamente do tipo estromal.

Com 30 dias de cultivo, foi realizada a caracterização imunocitoquímica da cultura, que revelou que as células da mucosa gástrica humana mantêm *in vitro* uma alta capacidade de sintetizar vários componentes de citoesqueleto e de MEC característicos de células epiteliais e estromais. Foram observados filamentos de vimentina distribuídos ao redor do núcleo e em todo citoplasma, projetando-se para os prolongamentos celulares da maioria das células (Figura 5B). Os filamentos imunomarcados para  $\alpha$ -actina de músculo liso estavam também presentes na

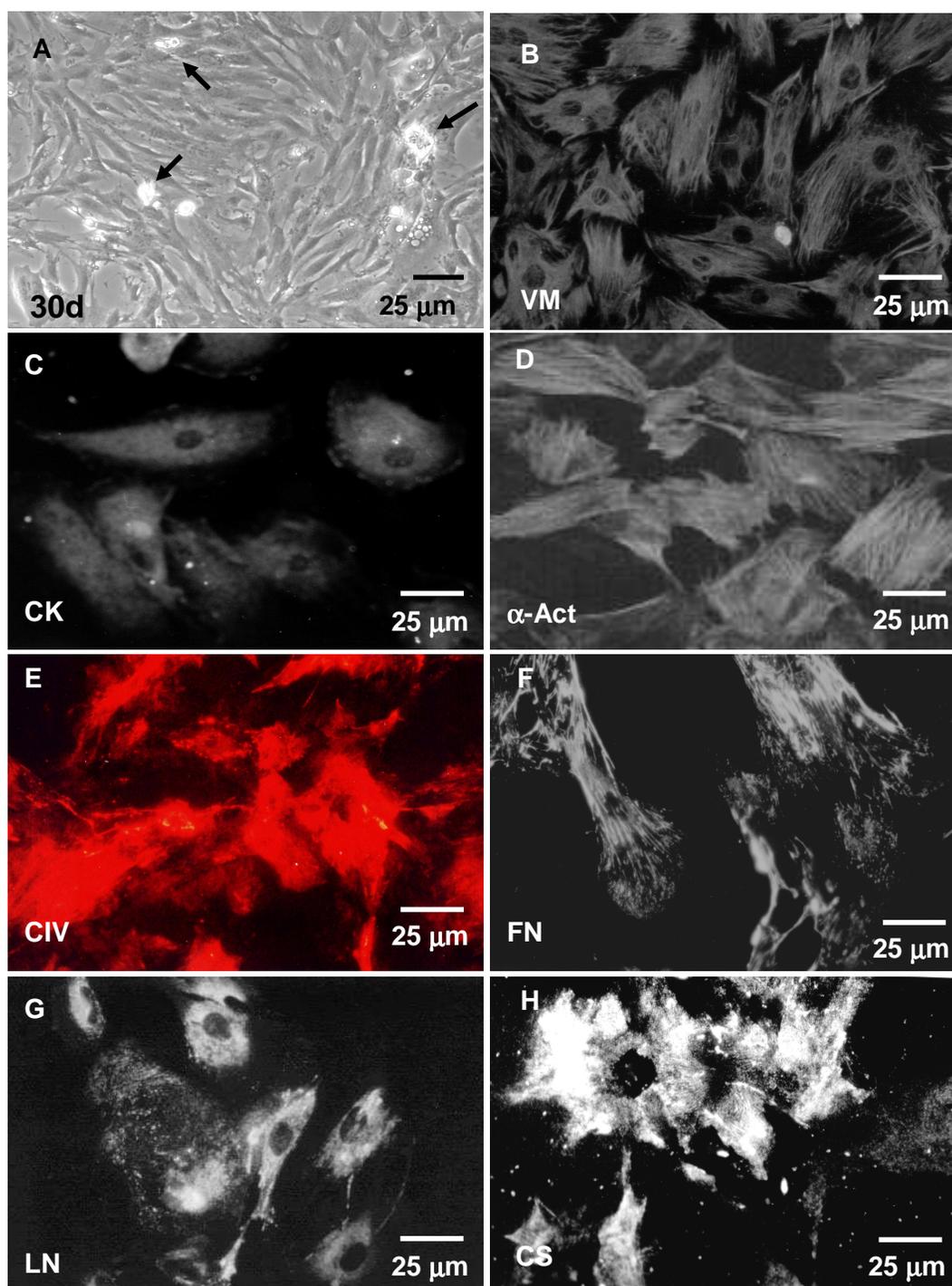


Figura 5 - Micrografias de contraste de fase (A) e de imunofluorescência (B - H) de cultura primária obtida da mucosa antral gástrica humana, com 30 dias de cultivo (VI passagem). Nesta passagem foram observados pequenos grupos de células epiteliais (setas) sobre células fibroblastóides. Esta cultura mostrou reação positiva para VM – vimentina, CK – citoqueratina,  $\alpha$ -act -  $\alpha$ -actina de músculo liso, C IV – colágeno tipo IV, FN - fibronectina, LN – laminina, CS – condroitim sulfato.

maioria das células, preenchendo todo o citoplasma (Figura 5C). No entanto, apenas uma pequena parte das células da cultura primária apresentou imunorreatividade para citoqueratina, distribuída por todo citoplasma (Figura 5D). Em relação aos componentes de MEC, a quase totalidade das células cultivadas apresentou marcação intensa para colágeno do tipo IV, fibronectina, laminina e condroitin sulfato distribuídos no citoplasma e na MEC (Figura 5E, F, G, H). Em determinadas regiões, onde estavam presentes grupos heterogêneos de células, material abundante constituído de componentes de MEC era encontrado nas zonas de contato celular.

Neste estudo, observamos que a obtenção da população homogênea de células estromais gástricas levou em média 60 dias de cultivo, o que representou aproximadamente 10 a 12 passagens. Com as caracterizações imunocitoquímicas, foi possível confirmar que estas células são de origem mesenquimal, constituindo uma população homogênea de células de natureza fibroblastóide (Figura 6).

### **Células Epiteliais**

As células epiteliais cultivadas sobre as células 3T3 irradiadas proliferaram rapidamente e recobriram toda a superfície do substrato (Figura 7A), tendo sido tripsinizadas e replaqueadas. Morfologicamente, estas células apresentaram uma forma arredondada e grande quantidade de citoqueratina concentrada ao redor do núcleo e por todo o citoplasma, confirmando desta forma sua origem epitelial (Figura 7B, C, D). As células epiteliais também apresentaram imunomarcações positivas para colágeno do tipo IV, fibronectina, laminina e condroitin sulfato, distribuídos principalmente nos espaços extracelulares (Figura 7E, F, G, H). Estas células de natureza epitelial da mucosa gástrica apresentaram coloração variada pelo ácido

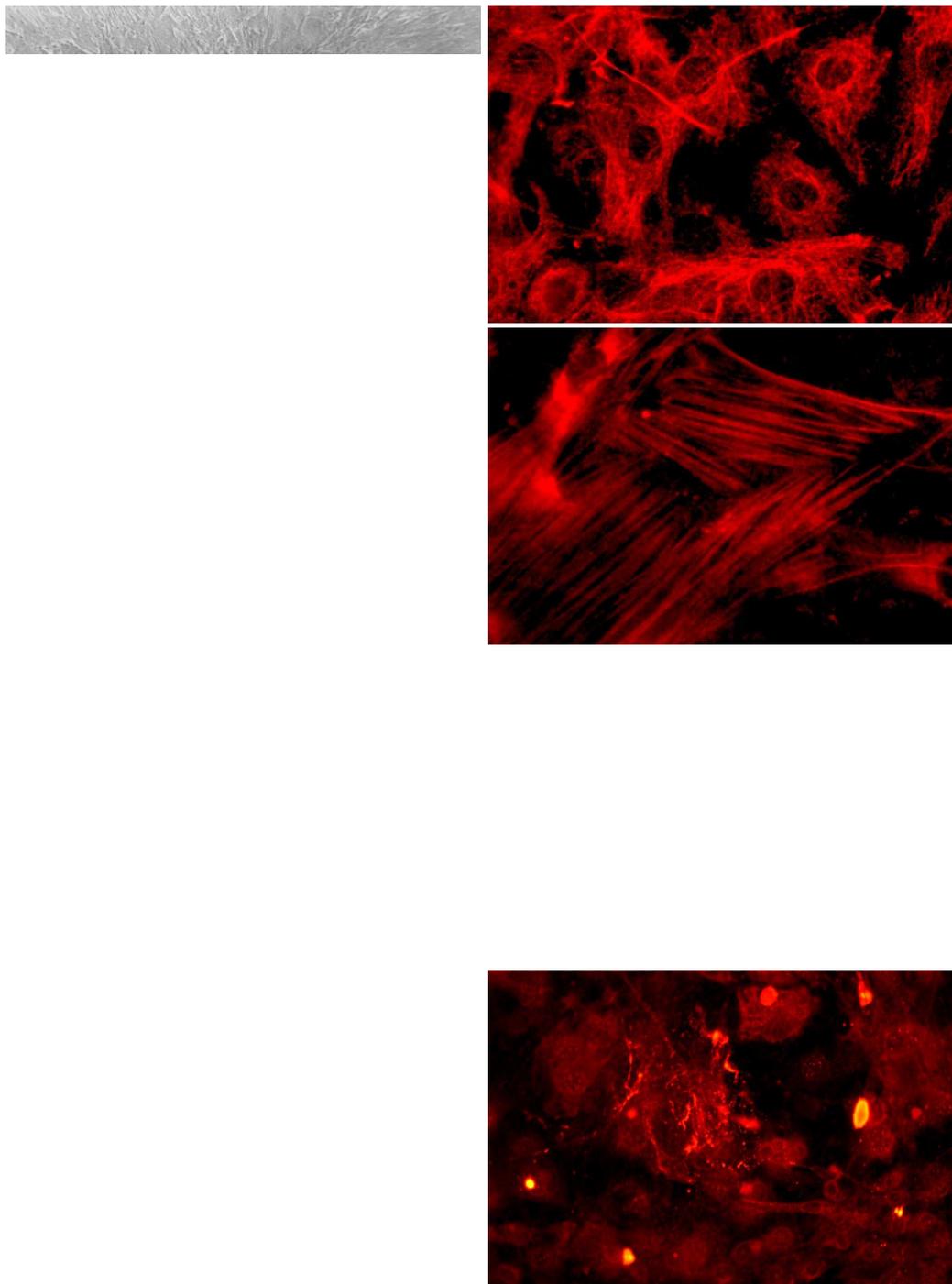


Figura 6 - Micrografias de contraste de fase (A) e de imunofluorescência (B - H) de cultura primária obtida da mucosa antral gástrica humana, com 60 dias (60d) de cultivo (XII passagem). Estas imagens mostram uma população homogênea de células estromais fibroblastóides com capacidade de sintetizar elementos de citoesqueleto e de MEC. Vimentina (VM), citoqueratina (CK),  $\alpha$ -actina de músculo liso ( $\alpha$ -Ac), colágeno tipo IV (C IV), fibronectina (FN), laminina (LN), condroitim sulfato (CS).

ERROR: ioerror  
OFFENDING COMMAND: image  
  
STACK:

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)