

INTERAÇÃO ENTRE CÉLULAS CONJUNTIVAS HEPÁTICAS E MASTÓCITOS

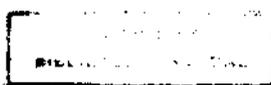
JOSÉ MARQUES DE BRITO NETO

Tese apresentada ao Departamento de Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos necessários à obtenção de grau de Mestre em Farmacologia, sob a orientação do Dr. Radovan Borojevic

Presidente da banca examinadora: Dr. Radovan Borojevic
Banca examinadora: Dr. Ithamar Vugman
Dr. Antonio Condino

B777i
22781/BC

Campinas - 1994



Ficha catalográfica

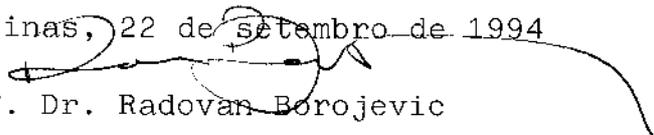
BRITO, José Marques

"Interação entre células conjuntivas hepáticas e mastócitos"

Tese: Mestrado em Ciências (Farmacologia)

Este exemplar corresponde à versão final da tese de Mestrado, apresentada a Faculdade de Ciências Médicas - UNICAMP, para obtenção do título de Mestre em Farmacologia do Biólogo José Marques de Brito Neto.

Campinas, 22 de setembro de 1994


Prof. Dr. Radovan Borojevic

- Orientador -

I. Universidade de Campinas - FCM

II. Título

Aos meus pais e a minha irmã pelo amor e o apoio constante que permitiu-me alcançar e concluir esta importante etapa da minha vida.

A Marcela pelo amor, carinho e paciência na parte final desta tese.

v

Não sei porque penso
Não sei porque sinto
Sei apenas que acredito
naquilo que penso
e naquilo que sinto.

Trabalho realizado no laboratório de Patologia Celular e Molecular, no Departamento de Bioquímica do Instituto de Química na Universidade Federal do Rio de Janeiro-RJ, com o auxílio das seguintes instituições: Coordenação e Aperfeiçoamento do Pessoal do Ensino Superior (CAPES), Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) e Conselho de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

AGRADECIMENTOS

Ao prof. Radovan pela orientação no meu desenvolvimento científico e a oportunidade a mim dada de desenvolver esta tese.

Ao Dr. Cezar Nahoum pelo apoio e conhecimento que ajudaram-me na realização desta tese.

A Hélio pela importante ajuda dada na parte inicial deste trabalho e a Cristina Vicente pelo apoio inicial no laboratório.

Ao amigo Cristiano pelo empurrão inicial.

A prof. Marcia El-Cheikh pela participação técnica e científica essenciais para conclusão deste trabalho. Ao prof. Zé Paulo pela ajuda científica e pela atenção dada.

Ao Dr. Domingos pelas inúmeras biópsias fornecidas.

Ao amigo Rodrigo pela força dada em Campinas.

A galera do laboratório Marcio, Sandrinha, Michelle, Alvaro, Lú, Bel, França, Roberto, Marcelo, Lulu e etc pelo bom ambiente de trabalho e pelas ajudas no dia a dia do laboratório.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	01
1.1. Células derivadas de granuloma hepático de camundongo esquistossomótico.....	01
1.2. Mastócitos (Histórico).....	03
1.3. Origem e Distribuição.....	04
1.4. Heterogeneidade dos mastócitos.....	06
1.4.1. Heterogeneidade de mastócitos de rato e murino.....	06
1.4.2. Heterogeneidade de mastócitos humanos.....	09
1.5. Fatores que atuam na maturação, diferenciação e proliferação de mastócitos.....	11
1.5.1. Interleucina-3 (Il-3).....	12
1.5.2. Interleucina-4 (Il-4).....	13
1.5.3. Interleucina-9 (Il-9).....	14
1.5.4. Interleucina-10 (Il-10).....	15
1.5.5. "Stem Cell Factor" (SCF).....	16
1.6. Função dos mastócitos.....	20
1.6.1 Fonte de citocinas.....	21
2. OBJETIVO.....	23
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	24
3.1. Obtenção de células primárias.....	24
3.1.1. Células de corpóra cavernosa.....	24
3.1.2. Células conjuntivas hepáticas (células GR).....	26
3.1.3. Fibroblastos de pele de camundongo (FPC).....	27

3.1.4. Fibroblastos de pele humano (FPH).....	28
3.1.5. Mastócitos humano de pele (MCH).....	28
3.1.6. Mastócitos de camundongo (MCC).....	29
3.2. Obtenção de célula estabelecida.....	30
3.2.1. Células 3T3.....	30
3.3. Cocultura de mastócitos com estromas celulares.....	30
2.3.1. Cocultura de mastócitos com estroma de célula GR fixada.....	31
3.4. Preparação de filme de colágeno.....	31
3.5. Quantificação de mastócitos.....	32
3.5.1. Contagem de mastócitos purificados.....	32
3.5.2. Contagem de mastócitos em cocultura.....	32
3.5.3. Contagem de mastócitos em citocentrifugado.....	33
3.6. Coloração.....	34
3.6.1. Azul de Alcian e Safranina.....	34
3.6.2. MayGruwald e Giemsa.....	35
3.7. Técnicas para o PCR.....	35
3.7.1. Colocação das células em tampão de lise.....	35
3.7.2. Extração de RNA.....	36
3.7.3. Síntese de cDNA.....	37
3.7.4. "Polymerase chain reaction" (PCR).....	37
3.7.5. Seqüência dos "primers".....	38
3.7.6. Análise em gel de agarose.....	38
4. RESULTADOS.....	39
4.1. Cocultura de MCC com estromas celulares.....	39
4.2. MCC em cocultura com células GR sintetizam heparina.....	41
4.3. Cocultura de MCH com estromas celulares.....	42
4.4. Formação de mensagem para "Stem Cell Factor" em células GR	

de cocultura com MCC.....	44
4.5. Cocultura de MCC com estroma de GR fixado.....	46
4.6.Figuras.....	48
5. DISCUSSÃO.....	56
6. CONCLUSÃO.....	60
7. BIBLIOGRAFIA.....	61

RESUMO

Na esquistossomose, parte dos ovos liberados pelo *S. mansoni* são embolizados no fígado. Inicia-se então um processo inflamatório que evolui em um granuloma periovular. As células inflamatórias, principalmente macrófagos, são as primeiras a formarem o granuloma. Posteriormente há o crescimento de células conjuntivas hepáticas, que passam a ser um dos principais constituintes do granuloma e também há grande deposição de matriz extracelular. Os fatores envolvidos neste processo ainda não estão esclarecidos. Nesta etapa foi descrita a proliferação localizada de células mielóides e monomacrofágicas. As células conjuntivas derivadas do granuloma (GR) periovular mostraram-se capazes de sustentar *in vitro* a proliferação de células mielóides FDC-P1 e AD-3. O objetivo deste trabalho foi identificar qual ou quais fatores estariam sendo secretados pelas células GR. Em nosso estudo usamos mastócitos como modelo para identificar estes fatores. Eles são dependentes de interleucina-3, Interleucina-4 e/ou "Stem Cell Factor". As células GR sustentaram a viabilidade e proliferação de mastócitos peritoneais murinos, os quais mantiveram a síntese de heparina por cinco semanas em cocultura com células GR. Também sustentaram a proliferação de mastócitos humanos (dependentes de "Stem Cell Factor") por nove dias de cocultura. Demonstramos que células GR podem ser induzidas por mastócitos a expressar mensagem para "Stem Cell Factor", além de apresentarem o fator associado a membrana. Pois estromas de células GR fixadas que tiveram contato prévio com mastócitos sustentaram a viabilidade de novos mastócitos plaqueados até terceiro dia de cultura. Acreditamos que o "Stem Cell Factor" seja o fator responsável pela proliferação dos mastócitos, como também participe *in vivo* no processo granulomatoso.

ABSTRACT

In the schistosomal infection, a part of *S.mansoni* eggs are brought into the liver where they embolize. Granulomas are initially composed of inflammatory cells, among which macrophages are predominant. The hepatic connective tissue cells grow and the associated extracellular matrix becomes an important element of granulomas. The factors involved in these events are still unknown. In the later phase of peri-ovular infection myeloid and monomacrophagic cells were able to proliferate. *In vitro*, granuloma-derived connective tissue cells (GR) have been shown to induce proliferation of myeloid cells FDC-P1 and AD-3. Our interest was to identify which factors are produced by GR cells. In this work, we have used mast cells as a model to describe these factors, because mast cells are dependent of Interleukine-3, Interleukine-4 and/or Stem Cell Factor. The GR cells have supported the survival and proliferation of peritoneal murine mast cells, which have maintained their heparin synthesis for five weeks in coculture with GR cells. Human mast cells (Stem Cell Factor-dependent) proliferated in six days in coculture with GR cells. We have shown that mast cells can induce GR cells to express message for Stem Cell Factor and the stroma-associated form of the factor. We believe that the Stem Cell Factor could be responsible for the mast cells proliferation and participate in the granulomatous process *in vivo*.

1- INTRODUÇÃO

1.1. - CÉLULAS CONJUNTIVAS DERIVADAS DE GRANULOMA HEPÁTICO DE CAMUNDONGO ESQUISTOSSOMÓTICO

O fígado é constituído na sua maioria por hepatócitos (células epiteliais) que se agrupam em placas e anastomosam entre si formando unidades morfológicas (lóbulos hepáticos). O espaço entre as placas de hepatócitos formam os capilares sinusóides (*sinusóides hepáticos*). A parede dos sinusóides hepáticos por sua vez são formados por três tipos celulares: células endoteliais, células fagocitárias (*células de Kupffer*) e células armazenadoras de lipídios (*células de Ito*) (Junqueira & Carneiro, 1985).

A reação inflamatória granulomatosa tem início com a embolização de ovos do verme *S. mansoni* nos radículos venosos do sistema porta intra-hepático. O *S. mansoni* fica hospedado nas veias mesentéricas liberando ovos diariamente, dos quais aproximadamente um terço são carreados pela circulação venosa. Nela os ovos são levados até o fígado, e pela veia porta até os espaços intravasculares, nos radículos venosos ou próximos dos sinusóides .

O início da reação granulomatosa é formado por células inflamatórias que encapsulam o ovo com o miracídio, como: eosinófilos, linfócitos e principalmente monócitos, oriundos do sangue. Nesta etapa ainda não há presença de células conjuntivas. Com a constante mobilização das células inflamatórias o granuloma desenvolve-se, obstruindo vasos sanguíneos e desorganizando o tecido adjacente.

Com o decorrer da reação granulomatosa as células da linhagem monomacrofágicas permanecem predominantes. Contudo, células conjuntivas começam a aparecer ao redor dos granulomas, como também a deposição de

matriz extracelular. Posteriormente as células conjuntivas hepáticas passam a ser um dos maiores componentes do granuloma periovular, além sintetizarem grandes quantidades de matriz extracelular. Nesta etapa de desenvolvimento do granuloma foi detectado a presença de precursores mielóides, como também a capacidade do estroma conjuntivo periovular recém formado em sustentar a proliferação de linhagens mielóides (Borojevic *ET AL*, 1981 e Geuskens *ET AL*, 1991).

In vitro as células conjuntivas derivadas do granuloma periovular (GR) também mostraram-se capazes de sustentar em cultura a proliferação de linhagens mielóides estabelecidas AD-3 (IL-3-dependente) e FDCP-1 (IL-3, GM-CSF e SCF-dependentes). As células GR expressam GM-CSF, contudo El-Cheik, em 1992 (resultado não publicado), demonstrou que células GR não apresentaram RNA_m para IL-3 e nem para IL-4.

A origem das células conjuntivas provém da mobilização das células Ito, as quais são ativadas sofrendo uma mudança na sua morfologia. Elas deixam de acumular lipídios, apresentam o RER desenvolvido, e passam a sintetizar colágeno tipo I, II, III e principalmente colágeno tipo IV e laminina. Estas células foram reconhecidas como sendo miofibroblasto (Biouac-Sage *ET AL*, 1985 e Boloukhere *ET AL*, 1993).

Os fatores que participam no desenvolvimento do granuloma periovular e na proliferação das células conjuntivas permanecem desconhecidos. Contudo, Amiri, em 1992, demonstrou que TNF- α era capaz de induzir a formação de granuloma e a síntese de colágeno.

1.2- MASTÓCITOS (Histórico) (Selye, 1965)

Os mastócitos foram primeiramente ilustrados e reconhecidos por Von Recklinghausen em 1863, em mesentério de sapo não corado. Doze anos após, um anatomista alemão Waldeyer observou a presença de células contendo grânulos ao longo do tecido conjuntivo, chamando-as de "plasma cells". Embora, descrevendo certas características destas células, não chegou a identificar o mastócito como uma linhagem celular distinta. No final do século XIX, Karl Weigert começou a utilizar uma nova técnica de coloração histológica, seu sobrinho Paul Ehrlich costumava a admirar as lâminas por ele preparadas. Paul Ehrlich, na época, era um estudante de medicina e descobriu que as células chamadas por seu chefe, Waldeyer, de "plasma cells", quando coradas com corantes básicos azuis, adquiriam cores avermelhadas ou violetas, diferenciando-se de outras "plasma cells", que não sofriam metacromasia. Essas células foram chamadas por ele de "Mastzellen", (Mast, foi oriundo de "Mastung", palavra alemã que significa "mastigação" e "zellen" relativo a "célula"), pois ele acreditava que a causa destas células conterem grandes e numerosos grânulos metacromáticos, fosse decorrente de uma super-alimentação.

Ehrlich, dando continuidade aos seus estudos, descreveu que estas células encontravam-se predominantemente ao redor de vasos sanguíneos, nervos, ductos glandulares e em focos inflamatórios. Seus resultados foram incorporados a sua tese de doutorado em 1878, e apresentados à Sociedade de Fisiologia de Berlim, em 17 de janeiro, de 1879, comunicando ao mundo a existência dos mastócitos. Nascia assim um novo tipo celular, iniciando-se uma importante questão, "Qual era a sua função ?"

1.3 - Origem e Distribuição

Os precursores de mastócitos aparecem primeiramente na embriogênese dentro das membranas embrionárias, em seguida passando a aparecer no fígado fetal. O aparecimento dos precursores em outros tecidos, como a pele, ocorre posteriormente, acreditando-se porém, que sejam originários do fígado fetal. Na fase adulta os precursores passam a ser produzidos na medula óssea, de onde saem para a circulação sanguínea e vias linfáticas. A partir daí migram para os tecidos periféricos, onde sofrem maturação e diferenciação (Kitamura *ET AL*, 1979), ao contrário dos basófilos e outros granulócitos, que sofrem maturação dentro da medula óssea. Até hoje não foram identificados em condições normais mastócitos maduros na circulação sanguínea e na medula óssea. A diferenciação dos mastócitos é controlada pelo micro ambiente, no qual o precursor se instala, podendo adquirir fenótipos de mastócitos de tecido conjuntivo (MCTC) ou de mucosa (MCM), (Nakano *ET AL*, 1985). Kobayashi *ET AL*, em 1986, demonstraram *in vitro* e *in vivo*, que um único mastócito peritoneal maduro murino é capaz de gerar duas subpopulações, a de MCM e MCTC. Evidenciando que os subtipos de mastócitos existentes possam ser descendentes de um mesmo precursor.

Em camundongos White Spotting (W/W^v) que são deficitários em mastócitos e de outras células hematopoiéticas devido a deficiência em seus precursores. Quando mastócitos peritoneais (MCTC) de animais normais foram injetados na pele e na parede do estômago de camundongos W/W^v. Eles mantiveram na pele o fenótipo de MCTC, enquanto na parede estomacal adquiriram o fenótipo de MCM (Sonoda *ET AL*, 1986).

Essa capacidade dos mastócitos de mudarem de fenótipo, foi bem estudada por Kanakura *ET AL*, 1988. A partir de células de medula óssea de

animais normais cultivadas com IL-3, os autores obtiveram uma população pura de MCM, a qual foi injetada na cavidade peritoneal de um camundongo W/W^v. Após 15 semanas, os MCM injetados apresentaram um fenótipo de MCTC. Estes por sua vez foram postos em cultura líquida com IL-3 por 8 semanas, readquirindo o fenótipo de MCM. Em seguida foram novamente reinjetados na cavidade peritoneal de camundongos W/W^v e retirados após 15 semanas, retomando o fenótipo de MCTC.

A maior parte destes estudos foram realizados em ratos e camundongos. Conseqüentemente, quando equiparados ao modelo humano, não foram totalmente equivalentes. Células de medula óssea humana, cordão umbilical e células mononucleares do sangue, quando cultivadas com IL-3 e IL-4, desenvolveram basófilos, falhando na obtenção de mastócitos (Kirshenbaum *ET AL*, 1989). Entretanto, quando células de cordão umbilical humano foram colocadas sobre fibroblasto embrionário murino (3T3), desenvolveram-se em mastócitos após 4 semanas, ao invés de basófilo (Furitsu *ET AL*, 1989). A linhagem 3T3 também foi capaz de sustentar por 18 dias em cultura mastócitos humanos de pulmão (Levi-Schaffer *ET AL*, 1987).

Em 1990, três grupos de pesquisadores diferentes identificaram o fator produzido por fibroblasto 3T3, responsável pela capacidade de desenvolver, diferenciar e sustentar a viabilidade de mastócitos humanos e de roedores, o "Stem Cell Factor" (SCF). Atualmente, acredita-se, que para o desenvolvimento de mastócitos *in vivo* é necessário a interação entre o receptor para o SCF (c-kit) presente em células precursoras e mastócitos maduros, com SCF expresso por fibroblasto e outras células do microambiente (Galli *ET AL*, 1993). Camundongos Steel Dieck SL/SL^d deficientes de SCF possuem menos que 1% de mastócitos que um animal normal.

Os mastócitos, tanto em roedores quanto em humanos, estão distribuídos por todo tecido conjuntivo, ao redor de vasos sanguíneos e linfáticos, próximos ou em contato com terminações nervosas, e sob superfícies epiteliais como as dos sistemas respiratório e gastrointestinal e da pele.

1.4 - Heterogeneidade dos mastócitos.

Os mastócitos podem apresentar heterogeneidade: no tamanho, na ultraestrutura, no conteúdo de mediadores pré-formados e induzidos, na resposta a estímulos por drogas, proteoglicanos e outras características.

Dois termos são freqüentemente usados para se referir à heterogeneidade, "maturação" e "diferenciação": "maturação" se refere ao processo de crescimento do mastócito desde a fase de precursor, e "diferenciação" às características específicas, que são adquiridas.

Portanto um processo de maturação inclui um processo de diferenciação, embora um processo de diferenciação pode ou não incluir um processo de maturação.

1.4.1- Heterogeneidade em mastócitos de rato e murino

O primeiro a descrever heterogeneidade em mastócitos foi Maximow, em 1905, observando uma população de mastócitos na mucosa intestinal de um rato, a qual ele considerou "atípica", pois apresentou características diferentes na coloração (Siraganian, 1988 e Galli, 1990). Hoje se sabe, que a diferença é devido ao conteúdo de glicosaminoglicanos dos grânulos. Todavia, somente a

partir de 1960, Enerback desenvolvendo técnicas de fixação e coloração mais apropriadas, descreveu a diferença entre mastócitos encontrados na mucosa intestinal "atípicos" ou de "mucosa" (MCM), e os observados na pele, "típicos" ou de "tecido conjuntivo" (MCTC) (Enerback, 1987). Os termos foram escolhidos baseado na predominância de cada tipo de mastócito nos respectivos tecidos.

Os MCTC possuem heparina como proteoglicano, enquanto, os MCM possuem sulfato de condroitina nos seus grânulos. Utilizando-se de corantes com afinidade para heparina, como sulfato de berberina e safranina, este último usado junto com um corante com afinidade para glicosaminoglicano sulfatado, o azul de Alcian, mostrou-se que, com a coloração de azul de Alcian-safranina os MCM coram em azul o citoplasma e o núcleo em vermelho (fig.1) e não coram-se com sulfato de berberina. O MCTC cora o núcleo e o citoplasma em vermelho, devido a safranina (fig.2), e em amarelo fluorescente com sulfato de berberina. Quando os MCTC são tratados previamente com heparinase, perdem a capacidade de se corarem tanto com safranina quanto com sulfato de berberina.

Os MCTC estão distribuídos pelos tecidos conjuntivos, pele e cavidade serosas como a pleural e a peritoneal. Já os MCM se encontram preferencialmente na mucosa intestinal e do pulmão. Os MCM tem aproximadamente metade do tamanho dos MCTC, que variam entre 9 a 20 micrometros. O tempo de vida de um MCM é de no máximo 40 dias, enquanto o de MCTC é superior a 6 meses. O conteúdo granular também varia entre os subtipos de mastócitos. Os MCTC possuem de 10 a 30 picogramas de histamina por célula, enquanto MCM de 1 a 2 picogramas.

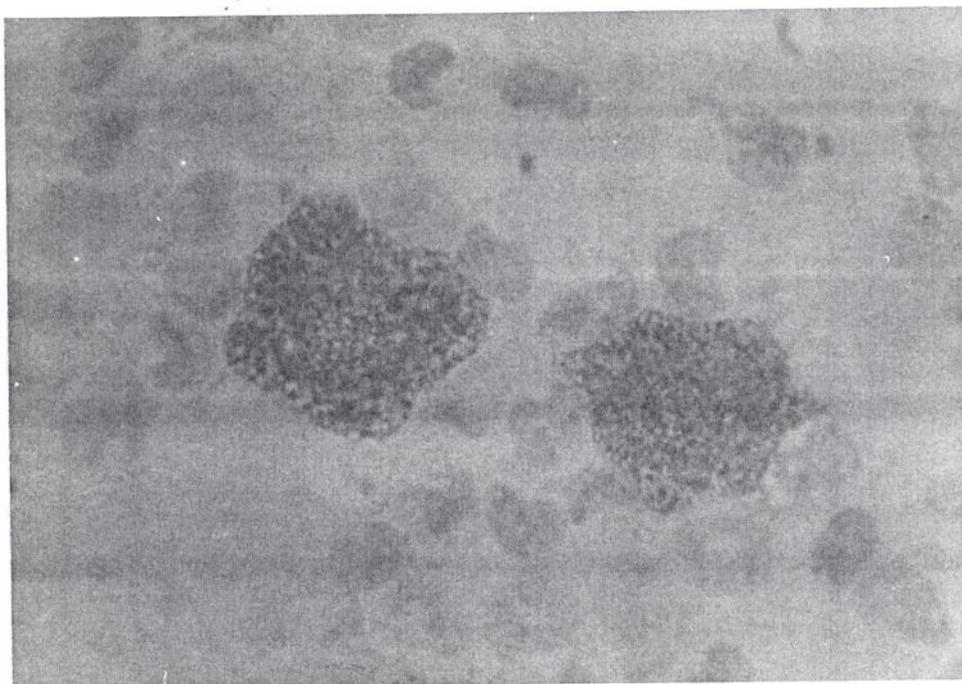


Figura 1. - Mastócitos peritoneais murinos degranulados sem seus conteúdo de heparina corados com azul de Alcian-safranina.

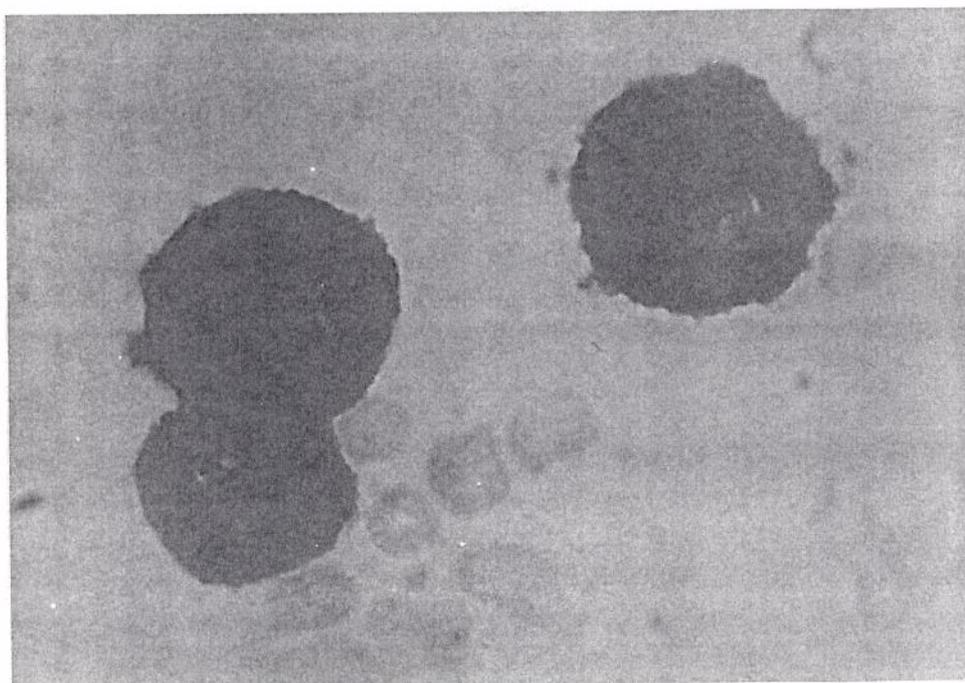


Figura 2. - Mastócitos peritoneais murinos íntegros corados com azul de Alcian-safranina.

Os maiores constituintes dos grânulos porém, são as proteases neutras do tipo serina, chamadas de "rat mast cell protease" (RMCP-I e RMCP-II). As RMCP-I (quimase e carboxipeptidase) estão presentes nos MCTC, e as RMCP-II nos MCM. A resposta aos estímulos também é variada, ambas as populações de mastócitos são sensíveis a estímulos por IgE e por Ionóforo de Cálcio, porém somente os MCTC são sensíveis a estímulos por compostos catiônicos como, composto 48/80 e neuropeptídeos. Os derivados lipídicos sintetizados após o estímulo, são distintos para cada subpopulação mastocitária, os MCM produzem grandes quantidades de leucotrienos LTC₄, enquanto os MCTC produzem essencialmente prostaglandinas PGD₂. As funções igualmente se distinguem, mesmo ainda não esclarecida sua função em alguns eventos biológicos. Sabe-se que ratos infectados com *Nippostrongylus brasiliensis* sofrem hiperplasia no número de MCM, enquanto os MCTC permanecem iguais.

1.4.2 - Heterogeneidade de mastócitos humano

Os mastócitos humanos, assim como os mastócitos de roedores, apresentam diferenças em vários aspectos como características morfológicas, conteúdo de histamina, ultraestrutura citoplasmática dos grânulos, propriedades histoquímicas, respostas a estímulos e principalmente o conteúdo de proteínas citoplasmáticas.

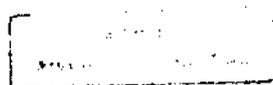
O principal parâmetro de classificação dos mastócitos humanos, são duas proteases neutras do tipo serina: triptase e quimase, (Irani *ET AL*, 1986, 1990).

Como nos roedores, os mastócitos humanos estão divididos em duas subpopulações, uma que possui triptase e quimase (MCtq) e outra que possui apenas triptase (MCq) ou níveis de quimase ainda não detectáveis. Essas subpopulações não podem ser caracterizadas somente pela localização, pois todos os sítios anatômicos povoados por mastócitos apresentam as duas subpopulações, porém em cada sítio anatômico ocorre a predominância de uma determinada subpopulação. Os MCtq estão presentes em maior número na pele, nos tecidos conjuntivos e na submucosa intestinal, enquanto os MCt predominam nas mucosas intestinal e pulmonar.

Além da diferença do conteúdo das proteases neutras, a concentração destas nos grânulos igualmente varia. Os MCtq possuem 35 picogramas/célula de triptase, 4,5 picogramas/células de quimase, um tipo de catepsina G e carboxipeptidase aproximadamente entre 0,5 a 16 picogramas/célula. Contudo, os MCt apresentam apenas 11 picogramas/célula de triptase e menos de 10% de carboxipeptidase, não possuindo as demais proteases (Irani *ET AL*, 1991).

A resposta a estímulos possui alguns paralelos com os mastócitos de roedores. O MCtq é sensível a estímulos por neuropeptídeos e compostos básicos, como substância P e composto 48/80, assemelhando-se aos MCTC dos roedores. Por outro lado, os MCt são insensíveis a estes estímulos, assemelhando-se ao MCM. Pacientes com imunodeficiência congênita ou com síndrome de imunodeficiência adquirida, sofrem redução no número de MCt (Irani *ET AL*, 1987), enquanto os MCtq se mantêm constantes.

Baseado nestas semelhanças, é aceito que os MCtq representam a população mastocitária de tecido conjuntivo (MCTC) encontrado em roedores, enquanto, os MCt representam os mastócitos de mucosa (MCM).



1.5. - Fatores que atuam na maturação, diferenciação e proliferação de mastócitos.

Na última década, obteve-se um grande avanço na identificação de fatores responsáveis pela regulação dos mastócitos em roedores. Existem atualmente vários fatores de crescimento descritos, responsáveis pelo: desenvolvimento a partir de precursores, manutenção em cultura, indução a diferenciação e proliferação. Porém, estes fatores não tiveram atuação em mastócitos humanos, com exceção do Stem Cell Factor.

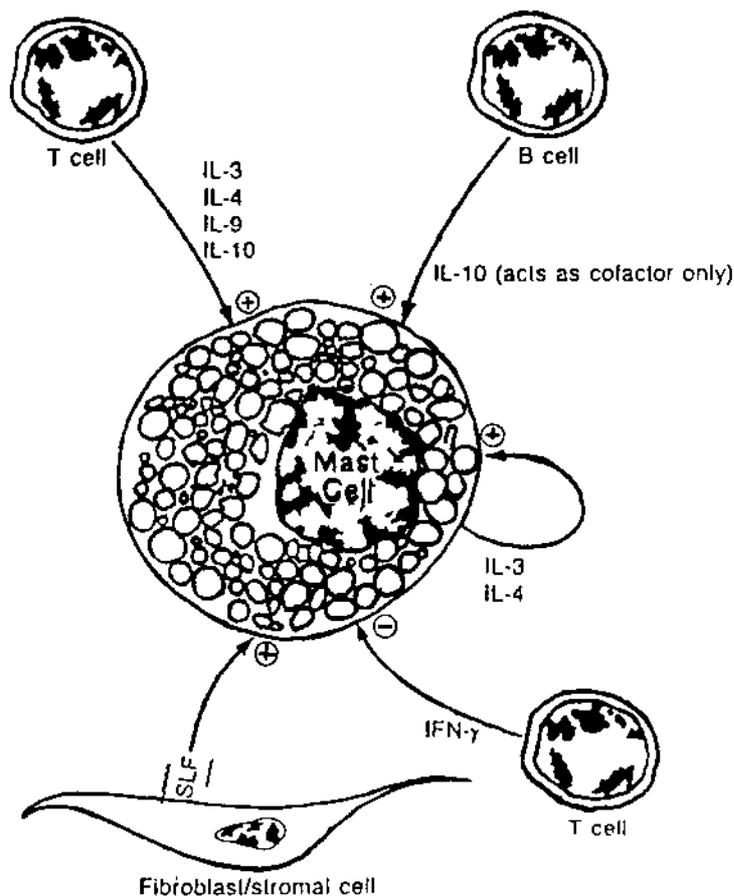


Figura 3. - Fatores do microambiente que promovem o crescimento e a diferenciação de mastócitos (Swieter *ET AL.*, 1992).

1.5.1 - Interleucina-3 (Il-3)

Il-3 é uma glicoproteína de 28 kDa que promove a sobrevivência, a proliferação e a diferenciação de células progenitoras hematopoiéticas de várias linhagens, incluindo eritrócitos, linfócitos, monócitos, granulócitos, megacariócitos e mastócitos. É produzido principalmente por linfócitos T estimulados antígenoicamente ou por agentes mitóticos, e também por mastócitos ativados imunologicamente ou por outros agentes como, composto 48/80 e Ionóforo de Cálcio (Plaut *ET AL*, 1989).

In vitro, a Il-3 possui a capacidade de induzir o desenvolvimento, a maturação e a diferenciação de MCM, a partir de precursores de medula óssea, baço e órgãos linfáticos (Nabel *et al*; Nagao *ET AL*; Razin *ET AL*; Tertian *ET AL*; 1981), originando uma população de MCM com 99% de pureza (Nakahata *ET AL*, 1986). *In vivo*, a Il-3 participa na resposta mastocitária a infecções parasitárias, acarretando numa hiperplasia de mastócitos da mucosa intestinal (Lee *ET AL*, 1986). Ao contrário dos animais normais, camundongos atímicos (*nude*) quando infectados com nematódio *N. brasiliensis*, não sofrem variação no número de mastócitos intestinais (Ruitenber *ET AL*, 1976) Contudo, quando a Il-3 é administrada por via intraperitoneal em camundongos *nude* infectados por parasitas, gera uma mastocitose de mucosa em grau similar ao de animais normais (Abe *ET AL*, 1988). Animais normais tratados com anticorpo anti-Il-3, antes e durante infecção por nematódios, mostram uma redução de 40-50% de mastócitos da mucosa intestinal (Madden *ET AL*, 1991).

Abe *ET AL*, em 1993, demonstraram que camundongos normais tratados com IL-3 durante cinco dias, desenvolvem mastocitose intestinal e adquirem resistência a infecção oral por larvas de *Strongyloides ratti*. Após 21 horas de infecção, os animais tratados apresentaram no intestino menos de 94% de

larvas do que os camundongos controles. Estes resultados demonstram a participação *in vivo* da Il-3, na proliferação de mastócitos e na resistência durante as infestações parasitárias.

Em mastócitos humanos, a Il-3 não foi capaz de gerar os mesmos resultados. Vários autores cultivaram células de medula óssea humana na presença de Il-3, sem sucesso na obtenção de mastócitos. Kirshenbaum e colaboradores em 1989, obtiveram células com características de mastócitos humanos em culturas de agar. Eles cultivaram durante três semanas células de medula óssea tratadas com IL-3, obtendo de 1-5% de células contendo triptase e histamina. Grande parte das células constitui-se de basófilo, aproximadamente de 20-50%. Contudo, este resultado não repetiu-se em cultura líquida e em metilcelulose, onde obteve-se apenas basófilos.

1.5.2 - Interleucina-4 (Il-4)

Il-4 é uma glicoproteína de 20 kDa produzida por células T. Também é produzida por mastócito estimulados por via imune e não imunológica (Plaut *ET AL*, 1989). Estudos *in vitro* mostraram que a Il-4 atua sinergisticamente com a Il-3, induzindo a proliferação tanto de mastócitos derivados de medula óssea quanto mastócitos peritoneais (Schmitt *ET AL*, 1987; Nakahata *ET AL*, 1986 e Tsuji *ET AL*, 1990). Em relação a mastócitos peritoneais *in vitro*, a Il-3 parece agir como principal fator de sobrevivência, enquanto a Il-4 atua como cofator que estimula a proliferação. Quando se administra o anticorpo anti-Il-4 em camundongos infectados por *N. brasiliensis*, há uma diminuição de 50% de mastócitos intestinais. Contudo, quando anticorpos anti-IL-3 e anti-Il-4 são administrados conjuntamente, há uma diminuição de 85-90% na mastocitose

(Madden *ET AL*, 1991). Estes resultados demonstram que a Il-4, é um importante modulador da proliferação de mastócitos tanto *in vitro* quanto *in vivo*.

Kanakura *ET AL*, em 1989, demonstraram que a Il-4, juntamente com a Il-3, induz a proliferação de mastócitos peritoneais. Quando cultivados em metilcelulose, estes mastócitos mantêm seu fenótipo de MCTC. Contudo, quando os MCTC foram transferidos para cultura líquida, passaram a sintetizar sulfato de condroitina, adquirindo o fenótipo de MCM. Culturas de longa duração de medula óssea, na presença de ambas as citocinas, dão origem apenas a MCM, não existindo ainda evidências de que a Il-4, sozinha ou em conjunto com a Il-3, possa induzir progenitores a se diferenciarem em MCTC. Esses dados indicam que somente a Il-3 e a Il-4 não sejam suficientes para induzir a diferenciação de precursores em MCTC.

Em cultura por 4 semanas de medula óssea humana e de cordão umbilical, a Il-4, ou Il-4 concomitante com Il-3, não foi capazes de gerar mastócitos, apenas células com morfologia de basófilos (Saito *ET AL*, 1988).

1.5.3 - Interleucina-9 (Il-9)

Il-9 é uma glicoproteína de 35 kDa, produzida por células "T helper" e células de baço tratadas com agentes mitóticos. Demonstrou-se que a Il-9 atua sinergisticamente com a Il-3, aumentando a proliferação de mastócitos primários derivados da medula óssea. Contudo, a Il-9 isoladamente não possui capacidade proliferativa sobre mastócitos primários, mas apenas prolonga sua sobrevivência, (Hultner *ET AL*, 1989 e 1990).

Miyazawa *ET AL*, em 1992, demonstraram a presença de receptores para Il-9 em mastócitos, porém a via de atuação da Il-9 permanece desconhecida. Alguns dados indicam que seja uma via distinta a da Il-3 e do "Stem Cell Factor", pois ambos induzem a fosforilação de MAP (mitogen-activated protein) quinase e de Raf-1, enquanto a Il-9 não induz, sugerindo que a Il-9 utilize uma via própria de sinalização.

Em humanos a Il-9 foi incapaz de induzir a diferenciação de mastócitos, a partir de culturas em suspensão, de medula óssea e cordão umbilical, mesmo quando concomitante com Il-1, Il-2, Il-3, Il-4, Il-5, Il-6 e GM-CSF, (Ishizaka *ET AL*, 1991).

1.5.4 - Interleucina-10 (Il-10)

A Il-10 é uma proteína de 35-40 kDa. É produzida por subtipos de células "T helper" (fig.3) ativadas imunologicamente, e por células B, monócitos e macrófagos (Howard *ET AL*, 1992).

A Il-10 mostrou-se ineficiente para o crescimento de linhagens de mastócitos Il-3-dependentes (MCM). Contudo, quando utilizado concomitante com Il-3 ou Il-4, potencializa a ação proliferativa de ambos os fatores. Além disso, a Il-10 concomitante com a Il-4 sustenta o crescimento de mastócitos, mesmo na ausência da Il-3. Quando as três citocinas são utilizadas concomitantemente, observa-se o mais potente estímulo de crescimento, tanto para culturas primárias de mastócitos quanto para linhagens de mastócitos Il-3 dependentes. Estas três citocinas são sintetizadas pela mesma população de células T, as quais parecem ser produzidas durante infecções por *N.*

brasiliensis, onde se desenvolve uma mastocitose intestinal, (Thompson-Snipes *ET AL*, 1991).

Apesar da Il-10 atuar sinergisticamente com Il-3 e/ou Il-4 sobre mastócitos de roedores, não se tem evidências do mesmo resultado com mastócitos humanos.

1.5.5 - "Stem Cell Factor" (SCF)

O "Stem Cell Factor" (SCF) foi descrito em 1990, por três grupos distintos de pesquisadores. Cada qual denominou-o a sua maneira como: Steel Factor-SLT chamado também de Mast Cell Growth Factor-MGF (Willinas *ET AL*, 1990; Copeland *ET AL*, 1990 e Anderson *ET AL*, 1990), Stem Cell Factor-SCF (Zsebo *ET AL*, 1990 e Martin *ET AL*, 1990), ou kit-ligante-KL (Huang *ET AL*, 1990). Nesta tese optei por referir-me como Stem Cell Factor (SCF).

O SCF é secretado por vários tipos celulares, dentre eles, fibroblasto (fig.3), células do fígado, de Sertoli, derivadas do estroma medular ósseo, endoteliais e do baço. O SCF é produto do gene do locus *Steel* (SL) do cromossomo 10, e é o ligante do produto do proto-oncogene c-kit, que é um receptor tirosina quinase do tipo III (Copeland *ET AL*, 1990 e Zsebo *ET AL*, 1990). O SCF pode estar associado à membrana celular ou estar na forma solúvel. As formas do SCF são determinadas por "splicing" alternativo de RNA, que dão origem a um RNAm formado por 8 exons ou a outro depletado do exon 6, constituído por 7 exons. O produto de transcrição do exon 6, é o sítio de ação de uma protease ainda não identificada, a qual age sobre o sítio, clivando-o e liberando a porção extramembranar do fator (forma solúvel) (fig.4), Conseqüentemente RNAm contendo o exon 6 geram tanto o fator

aderido a membrana quanto a forma solúvel. Em contrapartida os depletados do exon 6, geram apenas a forma não solúvel (Huang *ET AL*, 1992 e Fleischman, 1993). A expressão entre as duas formas do SCF, é específica em cada tecido, variando quantitativamente entre eles. No cérebro e em fibroblastos, existem 100 vezes mais a forma solúvel do que a associada a membrana, enquanto na medula óssea e no baço as duas formas estão igualmente representadas (Huang *ET AL*, 1992).

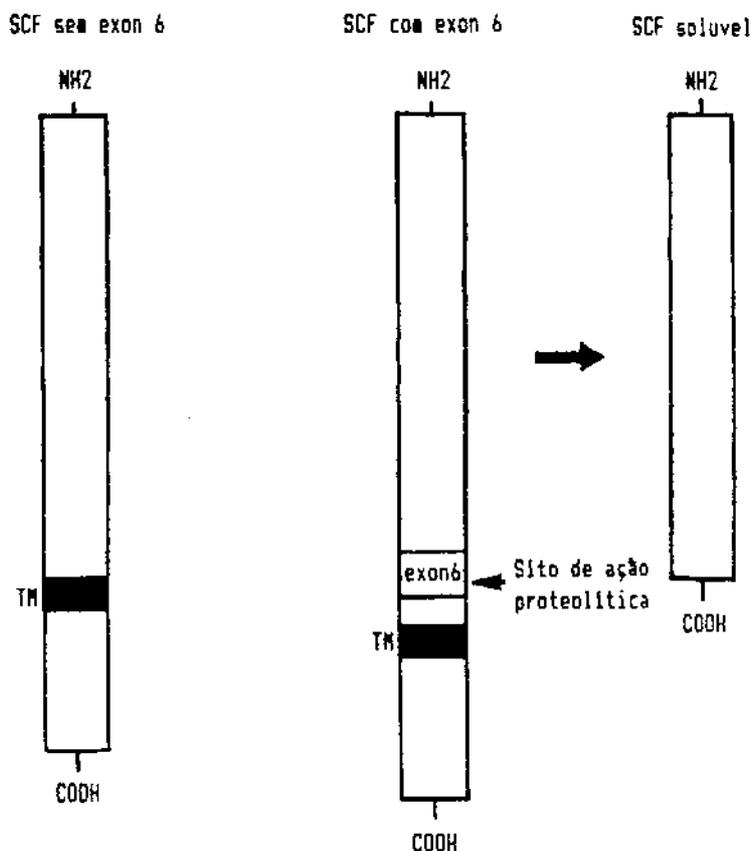


Figura 4.- O fator depletado do transcrito do exon 6 (esquerda) apresenta a forma associada a membrana, enquanto o contendo o produto do exon 6 (direita) é capaz de gerar a duas formas (Fleischman, 1993).

A forma do SCF associada a membrana celular age como fator de crescimento local e/ou como "homing" para células que expressem receptor para SCF, como progenitores hematopoiéticos, células germinativas primordiais e melanócitos (Tsai *ET AL*, 1991 e Dolci *ET AL*, 1991). A forma solúvel do SCF também possui atividade agindo na forma de dímeros, ligados não covalentemente.

Tsai *ET AL*, em 1991, em trabalho utilizando SCF murino recombinante (SCFmr), mostraram ser o fator capaz de induzir *in vitro*, o crescimento e a diferenciação de mastócitos a partir de células de medula óssea murina, cultivadas durante 4 semanas. Os mastócitos diferenciados continham heparina, apresentando fenótipo de MCTC. O SCFmr também foi capaz de estimular a proliferação de mastócitos peritoneais maduros.

Em humanos, usando-se SCF humano recombinante (SCFhr) nas culturas de células de medula óssea e células mononucleares de sangue periférico, obteve-se mastócitos após 4 semanas de cultura. Estes continham triptase como protease (MCt), que em analogia a roedores representariam os MCM. Contudo, o conteúdo de protease quimase, que caracteriza o MCtq, não chegou a ser analisado (Valent *ET AL*, 1992). Eles também demonstraram que, após 6 a 8 semanas de cultura, 40% das células constituíam-se de mastócitos. Ainda neste trabalho utilizaram a IL-3, a IL-4, a IL-9, o M-CSF e o "nerve growth factor" (NGF) concomitante com o SCFhr, e todos os fatores tiveram ação inibitória na diferenciação de MCt.

Camundongos SL/SLd deficientes do SCF associado à membrana e camundongos (W/Wv) cujas células são desprovidas de receptores para SCF, possuem as mesmas anomalias, como esterilidade, anemia, despigmentação devido a ausência de melanócitos e ainda menos que 1% de mastócitos, que um camundongo normal (+/+) (Kitamura *ET AL*, 1978 e Kitamura *ET AL*, 1979).

Transplante de medula óssea de camundongos SL/SLd para camundongos W/Wv, reverte o quadro de anemia e restaura o número de mastócitos. Entretanto o transplante de medula óssea de camundongos +/+ para SL/SLd foi incapaz de reverter o quadro anêmico e de elevar o número de mastócitos (Kitamura *ET AL*, 1978). Kitamura *ET AL*, em 1979, demonstraram que, em fragmentos de pele de camundongos W/Wv enxertados em camundongos SL/SLd, ocorreu o aparecimento de mastócitos no local do enxerto. Contudo, nos fragmentos de pele de SL/SLd introduzidos em camundongos normais, não houve o aparecimento de mastócitos. Estes dados evidenciam a importância da forma do SCF associado a membrana, no crescimento e na diferenciação de mastócitos. Pois, os camundongos SL/SLd secretam a forma solúvel do SCF, mas são incapazes de sustentar *in vivo* a manutenção do crescimento das linhagens SCF-dependentes.

Tsai *ET AL*, em 1991, mostraram que injeções subcutâneas de SCF de rato em camundongos SL/SLd ao longo de três semanas, originaram nos locais de aplicação mastócitos contendo heparina. Este tratamento resultou na diminuição da anemia, ocorrendo um aumento de eritrócitos. Contudo o aparecimento de mastócitos ficou restrito ao local de aplicação, enquanto uma administração sistêmica do SCF promoveu o aparecimento tanto de mastócitos de mucosa quanto de conjuntivo, fora dos locais de aplicação.

Experimentos semelhantes com primatas demonstraram que, aplicações subcutâneas de SCFhr em babuínos (*Papio cynocephalus*), aumentaram a população mastocitária em vários sítios anatômicos, chegando a 100x de aumento em alguns órgãos. A descontinuidade da administração do SCFhr, fez com que a população mastocitária voltasse à níveis basais (Galli *ET AL*, 1993).

Além do SCF ser um fator de crescimento e diferenciação de mastócitos e outras linhagens hematopoiéticas, possui também outras atividades como: a de adesão, fator quimiotático e de liberador de histamina de mastócitos.

Nakajima e colaboradores em 1992, demonstraram que mastócitos peritoneais de rato, quando induzidos com SCF, secretam 20% do conteúdo de histamina, além de potencializar a degranulação de mastócitos estimulados por IgE (Coleman *ET AL*, 1993).

No trabalho realizado por Meininger em 1992, no modelo de câmara de Boyden para quantificar migração celular, verificou que o SCF possui atividade quimiotática tanto para mastócitos de conjuntivo quanto para os de mucosa.

Experimentos de cocultura de mastócitos com fibroblasto embrionários (3T3) demonstraram que os mastócitos plaqueados sobre as culturas de 3T3 de camundongos +/+, estavam totalmente aderidos após três horas, enquanto que os plaqueados sobre as culturas de 3T3 de animais SL/SL apresentavam-se soltos, além de que, a adesão dos mastócitos sobre 3T3 de +/+, foi inibida na presença do anticorpo anti-SCF (Adashi *ET AL*, 1992).

1.6. - Função dos mastócitos

A ação dos mastócitos como células efetoras das reações de hipersensibilidade mediadas por IgE, foram amplamente estudadas, e bem descritas. Contudo os mastócitos participam de vários eventos biológicos, não mediados por IgE, e cujas suas funções permanecem desconhecidas. Recentemente descobriu-se que os mastócitos são uma fonte de produção e liberação de uma gama de citocinas, indicando um novo mecanismo de sua ação.

1.6.1. - Fonte de citocinas

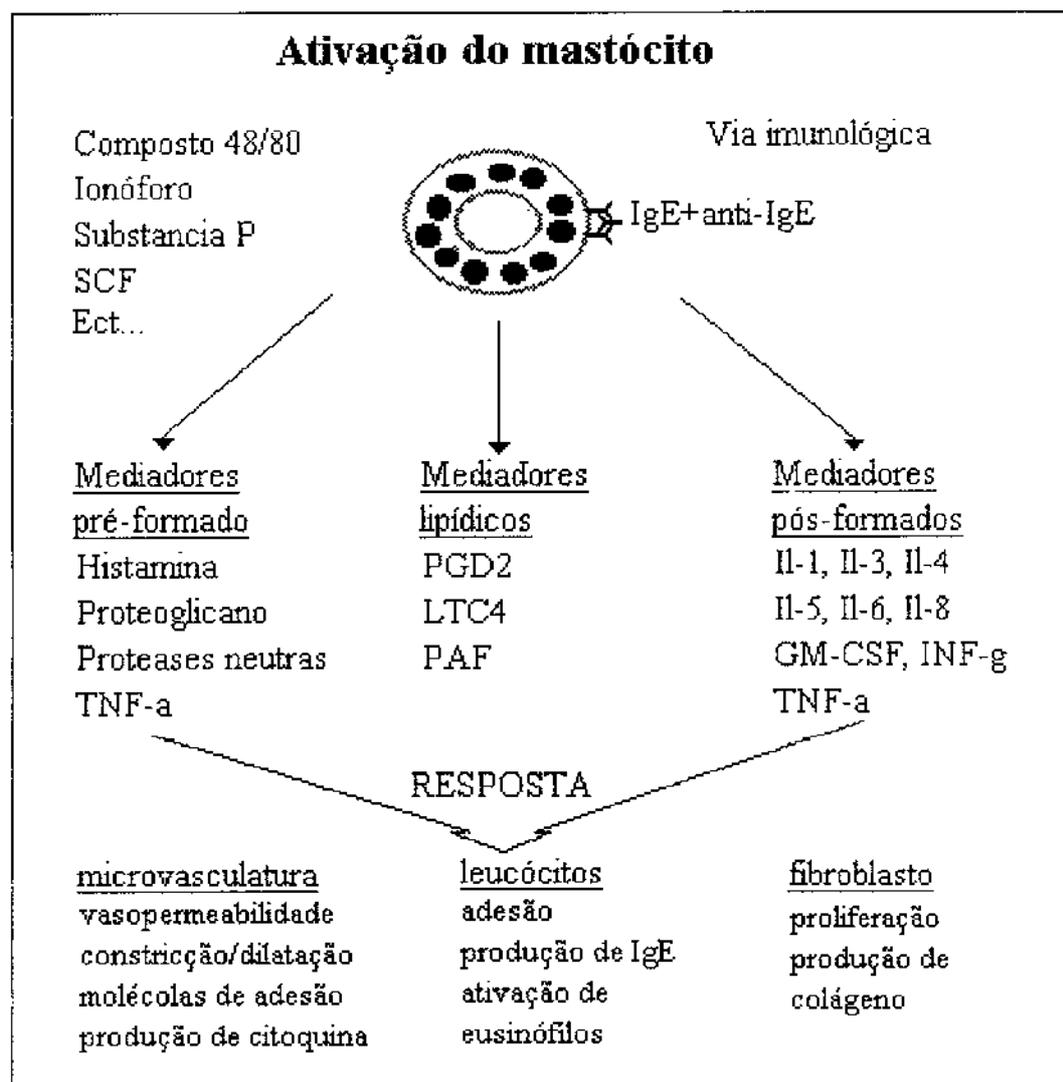


Figura 5. - Função dos mastócitos (Michel *ET AL*, 1992)

Plaut *ET AL*, em 1990, e Galli *ET AL*, em 1991, demonstraram que linhagens de mastócitos Il-3-dependentes, obtidas a partir de cultivo de células de fígado fetal (CFTL 12, CFTL 15 e CFTL 17), quando estimulados por IgE e por Ionóforo de Cálcio, passam a expressar RNAm para, a IL-3, a Il-4, a Il-5 e a Il-6, além de sintetizar e liberar Il-3, Il-4, Il-6 e "Tumor Necrosis Factor- α " (TNF- α) biologicamente ativos uma hora após o estímulo, chegando ao seu máximo em 6 horas.

Burd *ET AL*, em 1989, mostraram que linhagens de mastócitos Il-3-dependentes e não dependentes, ao estímulo por IgE, passam a expressar RNAm para Il-1 alfa, Il-3, Il-5, Il-6, GM-CSF, Interferon-gama (IFN-gama) e quatro moléculas da família das proteínas inflamatórias de macrófago (MIP-1): TCA3, JE, MIP-1 α e MIP-1 β . Mastócitos derivados de medula óssea, quando estimulados por IgE, liberam Il-1, Il-4 e Il-6 com atividade biológica.

Mastócitos peritoneais de camundongos em cocultura com 3T3, passam a expressar RNAm para Il-3, após dezoito horas de cocultura, porém os mastócitos cultivados com o sobrenadante da 3T3 não apresentaram RNAm para Il-3 (Razin *ET AL*, 1991).

Gordon *ET AL*, em 1990, demonstraram que, tanto mastócitos obtidos *in vitro*, quanto isolados da cavidade peritoneal de camundongos contém constitutivamente TNF- α com atividade biológica. O estímulo de mastócito por IgE e por outros compostos, o induz a uma produção de altos níveis de RNAm para TNF- α , como também a uma rápida liberação de TNF- α pré-formado e que mantém-se liberando por até duas horas (Gordon *ET AL*, 1991).

2. OBJETIVO

Este trabalho teve como fim estudar *in vitro* a capacidade de células conjuntivas hepáticas em secretar fatores, responsáveis pela sustentação de células de origem hematopoiética. Utilizamos o mastócito como modelo para tentar identificar o fator ou os fatores secretados pelas células GR, em razão de estarem bem descritos os fatores que regulam seu crescimento e diferenciação..

Nossa meta foi verificar a capacidade das células GR em sustentar a sobrevivência e a proliferação de mastócitos murinos e humanos *in vitro*, e de identificar os fatores envolvidos neste processo.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1- OBTENÇÃO DE CULTURAS CÉLULAS PRIMÁRIAS.

3.1.1.- Células de corpora cavernosa humana (CC);

As células de corpora cavernosa foram obtidas a partir de fragmentos de tecido de corpora cavernosa, oriundos de duas cirurgias de colocação de próteses em pênis de dois pacientes impotentes de aproximadamente sessenta anos. As operações foram realizadas pelos médicos Dr. Pedro Ivo Ravynine, e pelo Dr. Luis Carlos Miranda, que nos cederam gentilmente as biópsias.

As coletas das biópsias realizaram-se nas salas de cirurgia. Cada fragmento de tecidos de corpora cavernosa pesava aproximadamente 200mg, sendo dois fragmentos por paciente. Os tecidos eram transferidos em seguida para tubos estéreis com tampa, que continham o meio de cultura Dulbecco (Sigma Chemical Co. St. Louis) suplementado com 10% de SFB (Soro Fetal Bovino inativado)(Fazenda Pig, lote MA 03), pH 7.4, penicilina, estreptomicina, kanamicina, tilomicina e mantidos no gelo a uma temperatura de aproximadamente 4°C. As biópsias foram manipuladas esterilmente em câmaras de fluxo laminar (Trox e Veco- Brasil), no laboratório de Patologia Celular e Molecular (UFRJ, Ilha do Fundão). Utilizamos dois processos distintos para obtenção das células: por dissociação e por explantes.

Dissociação - Os fragmentos foram lavados 3x com solução salina sem Cálcio e Magnésio (BSS-CMF - Balanced salt solution - Calcium and Magnesium Free), em seguida cortados em pedaços de 1 a 2 mm, lavados novamente 3x com BSS-CMF e transferidos para um frasco com magneto

contendo 10 ml de tripsina 0.05% em BSS-CMF (Gibco Laboratories Life Technologis Inc. Grand Island, New York).

Na etapa seguinte, o frasco com fragmentos foi levado para um agitador magnético e homogenizado por 1 hora a 37°C. Após a dissociação enzimática a solução contendo as células foi aspirada, lavada 2x com salina contendo Cálcio e Magnésio (BSS-Balanced salt solution) e as células resuspendidas em meio Dulbecco com 10% de SFB, pH 7.4 mais pencilina e streptomicina. As células foram plaqueadas em garrafas plásticas de cultura de células de 25 mm², com aproximadamente 7×10^4 células vivas por garrafa e mantidas em estufas de atmosfera úmida com 5% de CO₂. Os meios foram trocados com periodicidade de 1 à 2 dias, e as células trocadas de garrafa toda vez que chegavam a confluência. Parte delas foram congeladas e criopreservadas em nitrogênio líquido.

Explantos - Uma parte dos fragmentos cortados para dissociação enzimática foi utilizada para este procedimento. Fragmentos de 1 mm foram selecionados e transferidos, com uma pipeta Pasteur, para as garrafas de cultura de células, as quais estavam em posição invertida. Os fragmentos foram colocados na parte de baixo das garrafas que se encontravam para o alto. Nove fragmentos foram colocados por garrafa, com espaço intercalando-os de aproximadamente de 1.5 cm. Em seguida o meio de cultura residual foi aspirado ao redor de cada fragmento, e 2 ml de meio Dulbecco com 10% de SFB mais penicilina e estreptomicina adicionados nas garrafas. Elas foram mantidas invertidas por 2 horas, para adesão dos fragmentos e transferidas para estufas de atmosfera úmida com 5% de CO₂. Após as garrafas foram desviradas cuidadosamente evitando o descolamento dos fragmentos.

A primeira troca de meio foi realizada 7 dias após a colocação dos explantes e a primeira passagem das células para outras garrafas no décimo oitavo dia de cultura.

3.1.2.- Células derivadas de granuloma hepático de camundongo esquistossomótico (Células GR)

(Pelegriño e Brener, 1956)

As células GR foram obtidas a partir da dissociação de granulomas periovulares hepáticos de camundongos esquistossomóticos. De 2 a 3 fígados eram retirados e homogenizados em Omni-Mixer (Sorval, Norwalk, CT, EUA), para dispersão do parênquima hepático. Os granulomas foram sedimentados sucessivamente em solução salina tamponada (BSS), até a obtenção de um sobrenadante límpido.

Após, os granulomas foram colocados num recipiente com magneto, contendo colagenase tipo 1A (Sigma) 1 mg/ml de meio Dulbecco, na proporção de 1 grama de granuloma para 10 ml de solução. Eles foram homogenizados por 1 hora a 37°C e em seguida o sobrenadante foi coletado e guardado a 4°C. Esta etapa foi repetida por mais duas vezes até a dissociação dos granulomas. As células coletadas foram lavadas e resuspendidas em meio Dulbecco suplementado com 10% de SFB, penicilina e estreptomicina. Depois, elas foram plaqueadas em garrafas de 25 cm² e cultivadas por 1 hora, tempo no qual parte das células aderiram. Após este período as culturas foram lavadas para retirada de debris e de células não aderidas.

Partes das células aderidas eram constituídas de macrófagos, os quais eram eliminados com a passagem das células GR de uma garrafa para outra. Os macrófagos não são suscetíveis à ação de tripsina, permanecendo assim.

aderidos nas garrafas e se fazendo presentes nas culturas somente até a terceira e a quarta passagem.

3.1.3. - Fibroblasto de pele de camundongo (FPC);

(Benyon *ET AL*, 1987)

Um camundongo C-3H recém-nato foi asfixiado com éter até a sua morte. Em seguida foi colocado numa solução de Lysoform 1/100 por 15 min, lavado com álcool 70% e depois, transferido para um fluxo laminar estéril. Sua pele foi retirada esterilmente, cortada em pedaços de 1 a 2 mm e seus fragmentos colocados num frasco estéril, com um magneto, contendo uma solução de RPMI 1640 com colagenase tipo 1A (Sigma) 1.5 mg/ml, hialuronidase tipo 1 (Sigma) 0.5 mg/ml., na proporção de 1 grama de tecido para 10ml. de solução. Os fragmentos foram homogenizados por 1 hora a 37° C, o sobrenadante com as células já dissociadas foi aspirado e guardado a 4°C. No frasco com os fragmentos restantes colocou-se mais solução com colagenase e hialuronidase repetindo-se a etapa anterior. Ao término da segunda dissociação enzimática, as duas frações coletadas foram juntas, e passadas por uma tela de nylon de 100 micrometros. As células filtradas foram lavadas 2x com BSS, resuspendidas em meio de cultura Dulbecco com 10% SFB, penicillina e estreptomicina, e depois plaqueadas 1.3×10^6 células vivas por garrafa de 25 cm². As células foram mantidas como as demais já descritas acima e uma outra parte sendo criopreservada. Os fibroblastos utilizados nos experimentos não passaram pela fase de criopreservação.

3.1.4. - Fibroblasto de pele humana (FPH)

(Benyon *ET AL*, 1987)

Os fibroblastos de pele humana foram obtidos a partir da dissociação de pele de prepúcio, o qual foi conseguido em cirurgias de postectomia realizadas em crianças na faixa etária de 1 a 5 anos. O procedimento de coleta das biópsias foi o mesmo utilizado para os tecidos de Corpora Caverosa. Contudo, na dissociação enzimática foi utilizado o protocolo empregado para pele de camundongo. As células foram igualmente mantidas em cultura como as demais obtidas por dissociação.

3.1.5. - Mastócitos humanos de pele (MCH)

(Benyon *ET AL*, 1987)

Os mastócitos de pele foram obtidos do produto da dissociação enzimática de prepúcio, dos mesmos utilizados para obtenção dos fibroblastos. A solução de células totais dissociadas foi colocada sobre um gradiente descontínuo de Percoll (Pharmacia, Uppsala, Sweden), o qual foi preparado com uma solução isotônica de Percoll (SIP = 9 partes de Percoll /1 parte de solução salina 10x) e diluído em diferentes volumes de meio RPMI 1640 com 1% SFB. Resultando em concentrações de SIP de 80%, 70%, 60%, 50% e 40%, que são correspondentes as densidades de 1100, 1090, 1076, 1063 e 1051 g/ml respectivamente.

Após, 2 ml. de cada solução de SIP foi transferido para um mesmo tubo de Percoll, colocando da solução mais concentrada de SIP no fundo do tubo para menos concentrada, formando-se um gradiente descontínuo com cinco

frações. Sobre cada gradiente era colocado 1 ml. de solução de células dissociadas resuspendidas em RPMI 1640 contendo de 1 a 10×10^6 células, e centrifugando imediatamente por 20 min, a 22°C e a 500 x g (Centrifuga refrigerada - Spin VI - Incibrás).

Ao término da centrifugação a face de 40% de SIP do gradiente foi descartada e guardadas as interfaces de 40/50%, 50/60% e 60/70%, de onde foram obtidos os fibroblastos. Os MCH foram obtidos na interface e face de 70/80% e 80% respectivamente, com um grau de pureza de 93%, e utilizados nos experimentos imediatamente após a purificação. Este protocolo foi repetido a cada experimento com MCH.

3.1.6- Mastócitos de camundongo (MCC).

(Kobayashi *ET AL*, 1986 e Benyon *ET AL*, 1987)

Mastócitos peritoneais de camundongo foram extraídos das cavidades peritoneais de camundongos C-57Bl/10, utilizando-se de 20 a 60 animais por experimento. Os MCC foram extraídos por lavagem peritoneal, cada cavidade recebeu um volume de 3 a 5 ml de BSS, pH.7.4 ajustado com bicarbonato de Sódio, heparina 5 U/ml e pré-aquecida a 37°C. Após cada lavagem, o lavado com as células era colocado num tubo de centrifuga de 50 ml, onde outros lavados eram colocados e guardados a 4°C.

Ao final das lavagens, os tubos eram centrifugados, as células resuspendidas num volume determinado de RPMI 1640 e quantificadas. A purificação dos MCC foram feitas por gradiente descontínuo de Percoll, empregando-se o mesmo protocolo usado para os mastócitos humanos.

3.2 - Obtenção de linhagem estabelecida

3.2.1- 3T3.

A 3T3 é uma linhagem de célula estabelecida originária da American Type Culture Collection (ATCC), descrita como fibroblasto embrionário de camundongo suíço albino. Esta linhagem é mantida pelo Banco de Células do Rio de Janeiro (UFRJ- Ilha do Fundão), de onde obtive as células 3T3 para realização dos experimentos. Elas foram cultivadas com o mesmo procedimento usado para outras linhagens celulares já descritas.

3.3. - Cocultura de mastócitos com estromas celulares

(Levi-Schaffer *ET AL*, 1985 e Levi-Schaffer *ET AL*, 1987)

Utilizou-se as 5 linhagens descritas para formação dos estromas, sendo elas, CC, FH, FC, GR e 3T3. As células foram plaqueadas separadamente, em placas de 24 poços numa densidade de 1.1×10^4 cél./poço, e cada qual foi coberto previamente com um filme de colágeno. As células foram cultivadas por 5 dias em meio de cultura RPMI 1640 com 10% SFB, penicilina e estreptomicina num volume de 0.5 ml/poço.

No quinto dia de cultura 1.1×10^4 mastócitos/poço (humanos ou murinos) eram plaqueados, de acordo com experimento que estive-se em andamento. As coculturas foram cultivadas sob as mesmas condições em que viam sendo mantidas os estromas, e as primeiras trocas de meio feitas no segundo dia de cocultura. A cada dois dias os meios eram trocados.

3.3.1. - Cocultura de mastócitos com estroma de GR fixada

(Roberts *ET AL*, 1987)

As GR foram plaqueadas em placas de 24 poços, 1.1×10^4 cél./poço, e cultivadas por 5 dias. No quinto dia de cultura as células foram fixadas com glutaraldeído a 2% em BSS, pH 7.4 tamponada com bicarbonato de sódio, por 5 min. As células foram lavadas 3x com BSS e em seguida os mastócitos foram plaqueados sobre as culturas fixadas, na mesma densidade e volume de meio usadas para as coculturas com estromas vivos. A manutenção das culturas também procedeu-se de forma igual. Como controle, coculturas com estromas vivos foram cultivadas paralelamente.

3.4 - Preparação de filme de colágeno

(Elstale e Bard, 1972)

Os filmes de colágeno nas placas e garrafas de cultura, foram preparados à partir de uma solução de colágeno 0.3% de tendão de rabo de rato Wistar. Os rabos eram cortados e seus tendões retirados, colocados em ácido acético 1%, onde colágeno se solubilizava. Depois a solução de colágeno era titulada e ajustada a concentração para uma solução de 0.3%.

3.5 - Quantificação de mastócitos

3.5.1 - Contagem de mastócitos purificados

O grau de pureza e a quantificação dos mastócitos eram feitos por dois tipos de contagem: uma específica para mastócitos e uma total. Depois era feita a relação entre as duas contagens para determinar a porcentagem de mastócitos no total de células.

A solução de células oriundas das interfaces e faces de 70/80% e 80% do gradiente de Percoll eram resuspendidas num volume de meio determinado, do qual retirava-se duas alíquotas de 20 μ l. Uma delas era colocada diretamente numa câmara de Neubauer e contada num microscópio óptico invertido de fase contraste de filtro amarelo (Leitz Labovert). A outra alíquota era acrescentado 20 μ l de azul de toluidina 0.1% (Sigma) em etanol 30%, e deixado corar por 2 min, para então ser colocada numa câmara de New Bauer, e contado as células coradas em lilás. Nesta contagem a fase contraste e o filtro amarelo eram retirados.

Os resultados das contagens com o corante eram divididos por 4, multiplicado por 2 (fator de diluição) e multiplicado pelo volume de meio em que haviam sido resuspendidas as células.

3.5.2 - Contagem de mastócitos em cocultura

As coculturas foram fixadas acrescentando 0.5ml de formol 8% em BSS pH 7.4, em cada poço da placa de 24 poços, onde já continham 0.5ml. de meio de cultura, resultando numa concentração final de formol 4%, e deixadas por

10 min. a temperatura ambiente. Após a fixação as placas eram invertidas para retirada do formol e postas a secar.

As coculturas foram coradas com azul de Toluidina 0.1% em etanol 30%, durante 2 a 4 min, onde cada poço recebeu um volume de corante suficiente para cobrir o fundo. Em seguida os poços eram lavados 2x com etanol 30%, 2x com etanol 90% e uma vez com etanol p.a. 100%.

No momento da contagem acrescentou-se nos poços corados um volume de álcool, suficiente para cobrir os fundos. As placas foram levadas ao microscópio invertido sem contraste de fase e sem filtro, e contadas as células coradas em lilás. O microscópio estava equipado com um par de oculares de 12.5x de aumento, sendo com uma ocular graticulada e a outra normal. A objetiva era de 10x, dando um aumento total de 125x. Contou-se 10 campos diferentes por poço, e apenas as células que estavam dentro da área do graticulo, que era de 1.42 mm².

A quantificação do número total de mastócitos por poço se procedeu, dividindo-se o número totais de mastócitos contados por 10 (n. de campos contados), multiplicando-se por 188 (área do poço 188 mm quadrados) e dividindo-se por 1.42 (área do graticulo 1.42 mm²).

3.5.3 - Contagem de mastócitos em citocentrifugado

O citocentrifugado foi feito inicialmente para se confirmar o grau de pureza dos mastócitos obtidos das frações de Percoll e comparar com as contagens feitas durante as extrações. De cada face e interface do gradiente de Percoll eram retirados alíquotas 100 µl, contendo aproximadamente 5000

células (50000 cél./ml), e colocadas nas caçapas da citocentrífuga, onde foram centrifugadas por 5 min a 800 rpm.

As lâminas foram fixadas com fixador de Carnoy's por 15 mim e coradas com MayGrunwald Giemsa. Contou-se 500 células por lâmina, diferenciando-se apenas em mastócitos e células nucleadas. As contagens foram feitas em microscópio óptico num aumento de 1000x em imersão, dando-se os resultados das contagens em porcentagem.

3.6 - COLORAÇÃO

3.6.1 - Azul de Alcian e safranina

(Worthington e Bailey, 1962)

As coculturas de mastócitos e as lâminas de citocentrifugado já fixadas foram reidratadas com uma seqüência de banhos, com diferentes concentrações de etanol 100%, 90%, 80%, 70%, 30% e passando para água. Após a reidratação, as lâminas e as culturas foram coradas com azul de Alcian 3% em ácido sulfúrico 2N por 1 hora, e lavadas por 5 mim. em água corrente. Em seguida foram coradas com safranina 0.1% em solução aquosa por 4 a 6 mim, e lavadas 2x com etanol 100% para desidratar. As lâminas foram montadas com Etelan e lamínula e as coculturas deixadas secar em temperatura ambiente.

As coculturas foram observadas em microscópio óptico invertido sem a utilização de filtros, acrescentando-se álcool nas garrafas coradas para melhorar a resolução, durante a observação. Os mastócitos coraram em vermelho, com exceção de alguns com o núcleo corado em vermelho e o citoplasma em azul.

3.6.2 - MayGrunwald e Giemsa

(Bird e Forrester, 1980)

As lâminas de citocentrifugado foram fixadas com Carnoy's durante 15 min. Depois foram coradas por 20 min em MayGrunwald, lavadas com água, e coradas com Giemsa por 45 min. As lâminas foram lavadas com ácido acético, postas a secar numa estufa a 56°C, e montadas.

3.7 - Técnicas para o PCR

3.7.1 - Colocação das células em tampão de lise

Células GR em cultivo foram postas em tampão de lise após 8 dias de cultura, sendo que para as células GR de cocultura com mastócitos este período dividiu-se em 4 dias em cultura e mais 4 dias em cocultura. As culturas foram tripsinizadas, as células GR quantificadas e transferidas para tubos de Eppendorf virgens. Cada um recebeu 1×10^6 células GR, num total de dois tubos de Eppendorf. As células foram lavadas 3 x em RPMI 1640 a 4°C, e resuspendidas em 0.5ml/tubo de Eppendorff de tampão de lise contendo, DEPC (Dietilpirocarbonato) um inibidor de RNase, e em seguida guardadas em freezer.

As células GR de cocultura após a tripsinização foram replaqueadas, e cultivadas por 1 hora. Neste período houve a adesão das células GR nas garrafas, porém sem adesão dos mastócitos. As culturas foram lavadas 3x com

CMF, retirando-se os mastócitos contaminantes, e em seguida tripsinizadas. 1.3×10^6 células GR foram transferidas para um tubo de Ependorff e repetindo o protocolo utilizado para as células GR de cultura simples.

3.7.2 - Extração de RNA

(Chomczynski e Sacchi, 1987)

Em tubos de ultracentrifuga 13x51 mm autoclavados e siliconizados foram colocados 1.5 ml de 5.7M de CsCl, sobre o qual adicionou-se cuidadosamente 0.5 ml da solução de lisado de células. Os tubos foram centrifugados a 35000 rpm, num rotor SW-55 Beckman a 18°C por 18 horas. Após a centrifugação o sobrenadante foi aspirado com uma pipeta Pasteur, retirando o DNA celular, e permanecendo o RNA no fundo do tubo. Os tubos foram cuidadosamente invertidos para retirada de líquido residual e postos a secar por 5 a 10 min. O RNA centrifugado foi então resuspenso em 360 µl de solução TES (10 mM de Tris-Cl, pH 7.4; 5 mM EDTA e 1% de dodecil sulfato de sódio) e transferido para um tubo limpo, no qual o RNA foi precipitado, adicionando-se 40 µl. de 3M de Acetato de Sódio e 1 ml de etanol por 30 min no gelo. O RNA precipitado foi resuspenso em 360 µl de água, e novamente precipitado em acetato de sódio e etanol, e guardando a -20°C.

3.7.3- Síntese do cDNA

(Ehlers e Smith, 1991)

Nos tubos com os RNA precipitados, seus sobrenadantes foram retirados e adicionados 7 μ l de água e 4 μ l de oligo-dT (500 μ g/ml), incubando por 10 min a 65°C. Em seguida a 4°C adicionou-se 4 μ l de tampão de transcriptase reversa 5x, 1 μ l de DTT 10x (0.1 mM), 1 μ l de dNTPs (10 mM cada), 1 μ l de RNAsin (35000 U/ml) e 1 μ l de enzima de transcriptase reversa. Após os tubos foram incubados a 37°C por 1 hora, e depois a 95°C por 5 min. Ao termino adicionou-se aos tubos 80 μ l de água, estocando-os a -20°C.

3.7.4 - "Polimerase Chain Reaction" (PCR)

(Ehlers e Smith, 1991)

Em tubos de Eppendorf de 0.5 ml foram colocados 2.5 μ l de mistura de primers (5'/3', 2 μ M de cada), 2.5 μ l de tampão de PCR 10x, 0.5 μ l de dNTP's (10 mM), 14.4 μ l de água, 5 μ l da solução de cDNA e 0.1 μ l de Taq polimerase (5 U/ μ l), sobre a mistura foi adicionado óleo mineral, para evitar evaporação.

Os tubos de Eppendorf foram colocados num aparelho de PCR (Quatro Tc -40), programado para 30 ciclos com três etapas de temperatura sendo: 1 min a 94°C, 2 min a 60°C e 3 min a 72°C, e no último ciclo uma etapa de 7 min a 72°C. Os tubos foram estocados a -20°C.

3.7.5 - Sequência dos primers

β - Actina (Alonso *ET AL*, 1986)

(Sense) 5' GTG GGC CGC TCT AGG CAC CAA 3' e

(anti-sense) 5' CTC TTT GAT GTC ACG CAC GAT TTC 3'.

Stem Cell Factor (Flanagan *ET AL*, 1991)

(sense) 5' CCG GAT CCT GGA GCT CCA GAA CAG CTA A 3' e

(anti-sense) 5' GGC TGC AGT CCA CAA TTA CAC CTC TTG AA 3'.

3.7.6 - Análise em gel de agarose

De cada tubo foram retirados 8 μ l do produto da amplificação por PCR e colocados em tubos novos, onde foram adicionados 2 μ l de azul de bromofenol e homogenizados. Os volumes de 10 μ l de cada tubo foram colocados em poços de um gel de 1.5% de agarose com brometo de etídio. As amostras foram postas para correr por 1 hora e 30 min a 100 Volts numa cubeta de 30 cm, preenchida com TEB 1x o suficiente para cobrir o gel. Após a corrida o gel foi levado para um transiluminador com fonte de U.V., e as bandas fluorescentes de cDNAs visualizadas. Paralelamente a corrida das amostras, aplicou-se um marcador de pares de base.

Os gels foram fotografados imediatamente após serem retirados da cubeta, com uma máquina polaróide com filme preto e branco.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. - Cocultura de MCC com estromas celulares

Os MCC foram plaqueados sobre monocamadas de GR e FPC confluentes. As células eram oriundas das faces e interfaces de 80% e 80/70% respectivamente, do gradiente de Percoll. Aproximadamente 93% das células obtidas apresentaram metacromasia quando coradas com azul de toluidina. Cada poço da placa de 24 poços recebeu 1×10^4 mastócitos em 0.5 ml de meio de cultura. As coculturas tiveram seus meios trocados a cada dois dias e foram fixadas no terceiro, sexto e nono dia de cultura.

No terceiro dia de cocultura de mastócitos com GR (MCC/GR), aproximadamente 70% a 80% dos mastócitos plaqueados mantiveram-se viáveis, um resultado superior ao de 30% de mastócitos viáveis encontrados nas coculturas de MCC/FPC. Para quantificar a taxa de proliferação dos MCC ao longo da cocultura, padronizou-se o número de MCC contado por cocultura no terceiro dia como sendo 100% de mastócitos (valor inicial), e a partir dele comparou-se com as contagens realizadas no sexto e nono dia. A variação dos MCC ao longo da cocultura foi expressa em porcentagem.

O estroma formado por células GR, no sexto dia de cocultura, estimulou um aumento no número de MCC de $47 \pm 7.6\%$ em relação ao terceiro dia ($P < 0.01$, Mann-Whitney U teste - Daniel, 1991) e no nono dia de cocultura de $59 \pm 16.1\%$ ($P < 0.01$, fig.6). Por outro lado, o estroma formado por FPC foi incapaz de sustentar proliferação de MCC entre o terceiro e sexto dia de cocultura, havendo inclusive uma diminuição de $(13 \pm 9\%)$. Contudo, entre o sexto e o nono dia houve um aumento de $(23 \pm 19\%)$ de MCC (fig.6).

Os MCC em cultura com GR apresentaram-se com uma forma esférica, bem granulados e com a capacidade metacromática preservada, quando corados com Azul de Toluidina (fig.7). A adesão dos MCC à monocamada foi parcial, com alguns mostrando-se semi-aderidos e havendo formação de pequenas colónias (fig.8), poucos MCC apresentaram-se espalhados (fig.9).

Estes resultados demonstraram que as células GR além de induzirem a proliferação de mastócitos peritoneais de camundongos, são capazes de fazê-lo independentemente da adição de fatores exógenos na cultura, divergindo dos resultados encontrados por Levi-Schaffer *ET AL* em seus estudos, em 1985, onde foi demonstrado que o estroma formado por fibroblastos embrionários 3T3 era capaz de sustentar por onze semanas os mastócitos peritoneais de ratos, porém sem induzir a proliferação.

O nosso resultado sugeriu-nos que as células GR pudessem estar sintetizando: a Il-3, a Il-4, o SCF ou mesmo um fator ainda não descrito. Contudo, El-Cheikh, em 1992 (resultado não publicado), demonstrou que células GR não apresentam RNAm para Il-3 e nem para a Il-4. Este resultado nos direcionou para a hipótese do SCF estar sendo expresso pelas células GR, e de ser o fator responsável pela proliferação dos mastócitos.

Tsai *ET AL*, em 1991, demonstraram que o SCF sozinho é capaz de induzir a proliferação de mastócitos peritoneais, além de mantê-los com fenótipo de MCTC e de induzir a diferenciação de MCM em MCTC após 4 semanas de cultura. Também Levi-Schaffer et al, em 1986, mostraram que mastócitos Il-3-dependentes com fenótipo de MCM em cocultura por três semanas com células 3T3, as quais secretam SCF, passam a sintetizar heparina e adquirem fenótipo de MCTC. Recentemente mostrou-se que a linhagem celular RBL-2H3, considerada atualmente como mastócito do tipo "mucosa", quando colocada em cocultura com 3T3, passa a ser suscetível a estímulos por

composto 48/80, característica específica de mastócitos conjuntivos em roedores (Swieter *ET AL*, 1993).

Baseados em nossos resultados e nos presentes na literatura, resolvemos verificar a capacidade das células GR de manter a síntese de heparina nos mastócitos e o seu fenótipo de MCTC.

4.2. - MCC em cocultura com células GR sintetizam heparina

Os MCC mantiveram a síntese de heparina após cinco semanas em cocultura com as células GR. Com a coloração de azul de Alcian-safranina os MCC coraram o núcleo e principalmente o citoplasma de vermelho (fig.9), evidenciando a presença da heparina. Este resultado demonstrou que as células GR são capazes de manter o fenótipo dos MCC em MCTC, sugerindo mais uma vez a presença do SCF nas culturas ou, talvez, de algum outro fator não descrito com atividade análoga.

O tempo de 5 semanas de cocultura foi escolhido por nós, com base nos estudos de Levi-Schaffer *ET AL* de 1986, que demonstraram que um mastócito em cocultura é capaz de mudar de fenótipo em três semanas. Também Tsai *ET AL*, com seus experimentos em 1991, mostraram a mudança de fenótipo de mastócitos em 4 semanas de cultura. Como margem de segurança estendemos nossas culturas por 5 semanas. Estes resultados foram um forte indício de que, efetivamente, as células GR estivessem expressando o SCF, pois elas, sem expressar Il-3 e Il-4, foram capazes de induzir a proliferação de MCC e de manter o seu fenótipo. Assim, resolvemos realizar outro experimento onde pudéssemos testar com mais precisão a atividade biológica do SCF. Fizemos, então, uma cocultura de mastócitos humanos de pele com células GR, pois o

SCF é o único fator atualmente descrito capaz de sustentar *in vitro* a maturação, sobrevivência e proliferação de mastócitos humanos.

4.3. - Cocultura de MCH com estromas celulares

As GR se mostraram capazes de sustentar a proliferação de MCH em seis dias de cocultura, e a viabilidade de MCH por 9 dias. Porém, o mesmo não foi observado em cocultura de MCH com células primárias de origem humana, como fibroblasto de pele humana (FPH) e células de corpóra cavernosa (CC), as quais mantiveram apenas a viabilidade dos MCH. Os MCH cultivados em cultura líquida na ausência dos estromas morreram em 48 horas.

Dos MCH plaqueados aproximadamente de 20% a 27% mantiveram-se viáveis no terceiro dia de cocultura com GR. No sexto dia de cocultura, em relação ao terceiro dia de cocultura, no sexto dia houve um aumento no número de MCH de $33.7 \pm 7.6\%$ ($p < 0.05$, Mann-Whitney U teste) (fig.10). Neste período foram encontrados vários MCH em divisões (fig.11- MCH espreado e outro em telófase e fig.12- MCH em telófase, corados com azul de toluidina). Entretanto entre o sexto e o nono dia houve uma diminuição de $20.9 \pm 8.6\%$ ($p < 0.05$) (fig.10).

Os estromas formados por FPH foram usados como controles por secretarem constitutivamente o SCF, sendo assim capazes de sustentar a sobrevivência de MCH *in vitro*, mas sem induzir a sua proliferação. A viabilidade de MCH no terceiro dia de cocultura com FPH foi similar ao obtido em MCP/GR. Em relação ao terceiro dia de cocultura, as coculturas de MCP/FP e MCP/CC tiveram no sexto dia uma diminuição no número de MCH de $11 \pm 10\%$ e $14.5 \pm 10\%$ respectivamente ($p < 0.008$, Mann-Whitney U teste) (fig.10).

Após o sexto dia, o número de MCH nestas culturas manteve-se constante até o nono dia (fig.10) permanecendo assim até o décimo primeiro e décimo oitavo dia de cocultura (resultado não apresentado).

Os MCH em todas as cocultura se apresentaram aderidos e espalhados em menos de 24 horas de plaqueamento. Ao contrário do que foi observado com MCC em cocultura que apresentaram uma forma esférica, os MCH encontravam-se espalhados e alongados com diferentes formas, a não ser quando em divisão (fig.11 e 12). Os MCH em cocultura com GR mantiveram sua capacidade metacromática, quando corados com azul de toluidina (fig.11 e 12).

Os resultados mostraram que estromas formados por células GR também são capazes de sustentar a sobrevivência e a proliferação de mastócitos humanos, evidenciando a presença do SCF nas culturas. Levi-Schaffer *ET AL*, em 1987, demonstraram que as células 3T3 são capazes de sustentar por 18 dias mastócitos humanos de pulmão, embora sem prolifera-los. Além de mastócitos humanos oriundos de medula óssea serem mantidos em cultura na presença de SCF humano recombinante (Valent *ET AL*, 1992). Também os fibroblasto de pele humano que expressam o SCF mantiveram a viabilidade dos mastócitos, igualmente como as 3T3.

Nossos resultados demonstraram que as células GR estavam expressando um fator com atividade biológica semelhante ao SCF. Contudo permanecia a possibilidade de que pudesse ser um novo fator. Assim resolvemos verificar se as células GR apresentavam mensagem para o SCF.

4.4. - Formação de mensagem para Stem Cell Factor em GR de cocultura com MCC

O objetivo deste experimento, foi verificar a expressão de RNAm para Stem Cell Factor (SCF), por células GR.

Analisaram-se 2 lotes de células GR: células GR na sexta passagem (GR#6) e acima da décima passagem (GR>#10). As células GR>#10 foram analisadas em condições normais de cultura, e postas em cocultura com MCC por 4 dias e depois isoladas. Pois as células GR>#10, oriundas de cultura, não apresentaram mensagem para SCF, enquanto que as células GR#6 apresentaram (fig.13). A partir daí resolvemos verificar se as células GR>#10 em cocultura com mastócitos (GR/MCC) passariam a expressar mensagem para SCF.

Para analisar as células GR, seus RNAm foram isolados e feitos uma síntese de cDNA. Na ampliação do cDNA pela técnica do PCR foram utilizados primers para porção transmembranar do SCF e β -actina, este último como controle de uma mensagem expressa constitutivamente. Para certificarmos da não contaminação de DNA genômico nas extrações de RNA, realizamos o procedimento de síntese e amplificação de cDNA por PCR nas soluções de extrato de RNA das células GR#6 e das GR>#10 de MCC/GR, mas na ausência da transcriptase reversa. Denominamos-as de: GR' e GR'/MCC respectivamente (fig.13 e 14).

Os produtos das amplificações do PCR foram analisados em gel de agarose e demonstraram que as células GR#6 apresentaram mensagem para SCF enquanto as células GR>#10 não apresentaram (fig.13). Porém, a GR>#10 de cocultura com MCC (GR/MCC) por 4 dias foi positiva em expressar mensagem para SCF (fig.13). Como controle positivo de mensagem

para SCF utilizamos o fibroblasto de pele de camundongo (FP) e a célula 3T3 e ambas tiveram seus cDNA amplificados com "primer" para SCF (fig. 13).

As soluções das GR' e das GR'/MCC não apresentaram produto de amplificação, excluindo a possibilidade de uma contaminação de DNA genômico e conseqüentemente numa amplificação a partir dele. Para nos certificarmos da integridade dos cDNA, fizemos amplificação por PCR para β -actina das preparações das células GR#6, GR>#10 de MCC/GR, SF e 3T3, obtendo-se amplificação em todas as preparações, com exceção dos extratos de RNA de GR#6 e GR>#10 de MCC/GR, as quais não sofreram amplificação (fig.14).

Estes resultados nos conduziram a três conclusões, das quais uma esperada, que as células GR são capazes de expressar RNAm para SCF. No entanto, o fato das GRs não expressarem constitutivamente o SCF, além de serem suscetíveis a indução por MCC a expressarem mensagem para o SCF, nos surpreendeu.

Baseados neste resultado, resolvemos tentar demonstrar se o mastócitos seriam capazes de induzir as células GR>#10 (que não apresentaram mensagem para SCF) a expressar o SCF, dentro de um modelo biológico. Fizemos então cocultura de mastócitos com monocamadas de células GR>#10 fixadas, das quais uma seria fixada após a cocultura com mastócitos e a outra simplesmente fixada sem contato prévio com MCC. Pois sendo uma das formas SCF associada à membrana celular, com a fixação estaríamos fixando o fator juntamente com a monocamada.

4.5 - Cocultura de MCC com estroma de GR fixada

Neste experimento observou-se a capacidade de estromas de células GR>#10 (fixadas) e estromas de GR>#10 (fixadas) de cocultura com MCC, de manter a viabilidade de MCC em nove dias de cultura.

Coculturas de MCC/GR de quatro dias foram lavadas para retirada dos MCC e fixadas em seguida. Paralelamente culturas de células GR de oito dias foram fixadas, correspondendo ao quarto dia de cocultura de MCC/GR. Como controle utilizamos cocultura de MCC com GR vivas (MCC/GR).

O número de MCC plaqueados foi estabelecido como 100% de MCC ao contrário dos outros experimentos onde 100% eram referentes ao terceiro dia de cocultura. A partir dele comparou-se o número de MCC contados ao longo cultura (fig.15). No terceiro dia de cocultura realizou-se a primeira contagem de MCC, obtendo-se uma viabilidade de 83.5% nos controles, 50% nas coculturas de células GR(fixadas) de MCC/GR e de 4% nas de células GR(fixadas). Ao sexto dia os controles tiveram um aumento 15.5%, equivalendo a 99% de viabilidade, entretanto, as coculturas de células GR(fixadas) de MCC/GR sofreram uma perda de 36%, equivalendo a 12% de viabilidade e nas coculturas de células GR (fixadas), apenas 0.7% dos MCC se mantiveram viáveis. No nono dia de cocultura, porém, somente os controles apresentavam MCC viáveis, aproximadamente 97% de viabilidade (fig.15).

Estes resultados confirmaram a capacidade dos mastócitos de induzirem as célula GR a expressarem o SCF, como também a presença da forma do fator associado a membrana, pois foi suscetível a fixação pelo glutaraldeído. Os estromas de células GR fixada no quarto dia de cocultura com MCC foram capazes de manter 50% dos mastócitos vivos contra 4% dos mastócitos sobre estromas de células GR que não tiveram contato prévio. O período de 4 dias de

cocultura foi escolhido, porque foi neste tempo em que obtivemos os resultados da expressão do RNAm para SCF, além de que, foi entre o terceiro e o sexto dia que ocorreu a maior proliferação de mastócitos.

Adachi *ET AL*, em 1992, demonstraram a participação, tanto da forma do SCF associado a membrana, quanto o seu receptor na adesão dos mastócitos aos estromas celulares. Ele mostrou que a adesão dos mastócitos em cultura ocorre em 3 horas, porém, quando plaqueados sobre fibroblastos embrionários de camundongos SL/SLd, somente 10% dos mastócitos aderiram em relação aos plaqueados sobre fibroblastos de animais normais. Mesmo com a adição de meio condicionado com Il-3 e Il-4, apenas 40% dos mastócitos aderiram, demonstrando que, independentemente dos mastócitos estarem viáveis ou não, a forma do SCF associada a membrana participa de forma efetiva nas suas adesões. Estes dados contribuem para evidenciar que o fator expresso na membrana das células GR seja o SCF, pois as células GR fixadas de cocultura foram capazes de mediar a adesão de 50% dos mastócitos plaqueados. Indicando que o fator tenha permanecido na cultura mesmo após a fixação e a morte das células GR, acrescentando o fato da troca de meios das culturas favorecer a retirada das células não aderidas.

4.6. - Figuras

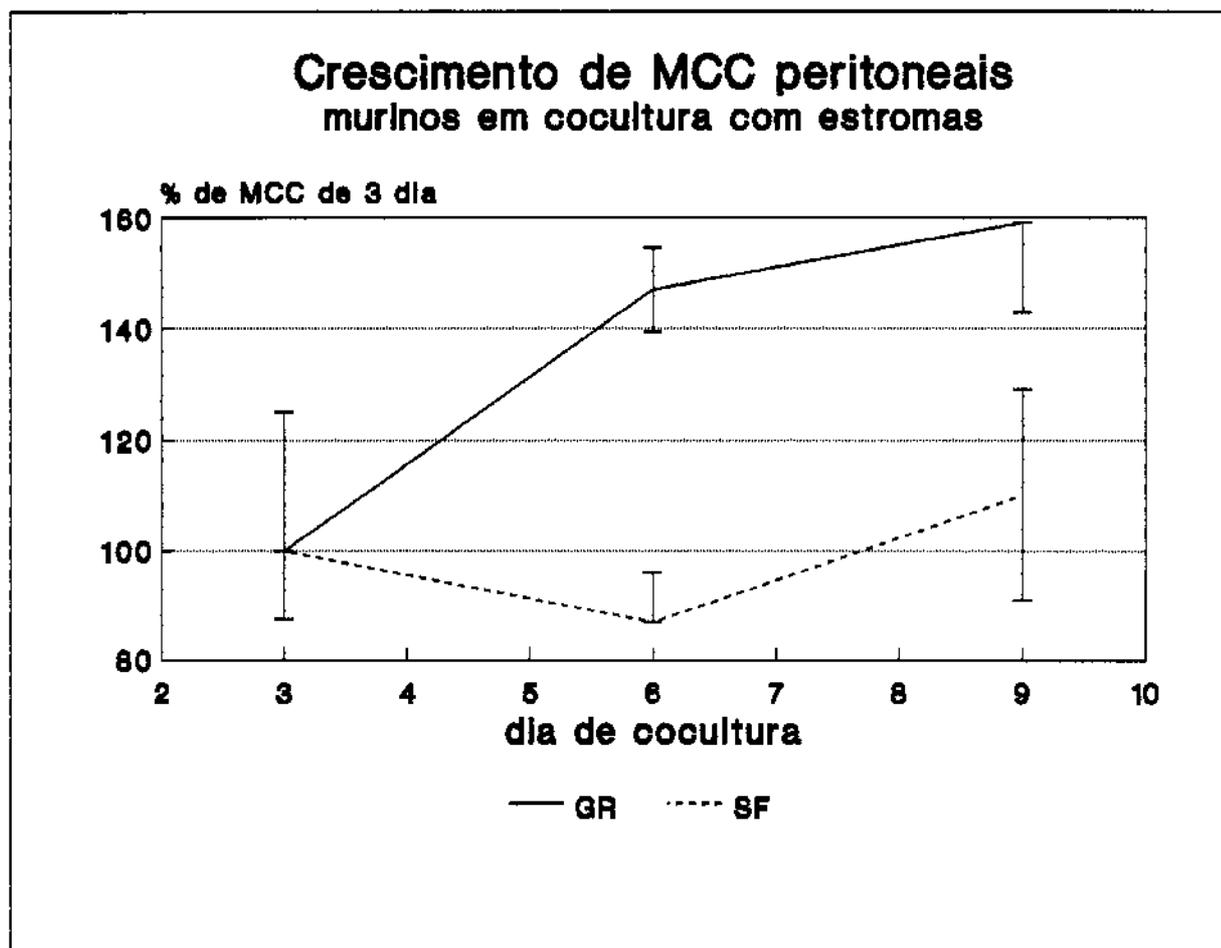


Figura 6 - Cocultura de MCC com células GR. Número de mastócitos murinos metacromáticos representados em porcentagem.

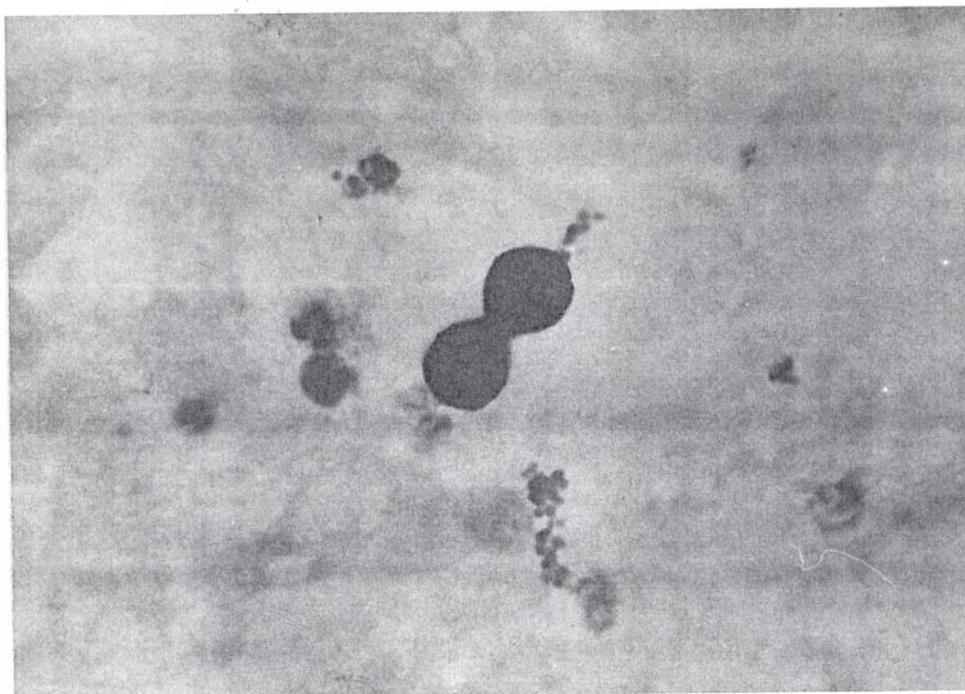


Figura 7. Foto de MCC em cocultura com células GR. Mastócitos peritoneais murinos corados com azul de toluidina no sexto dia de cocultura.

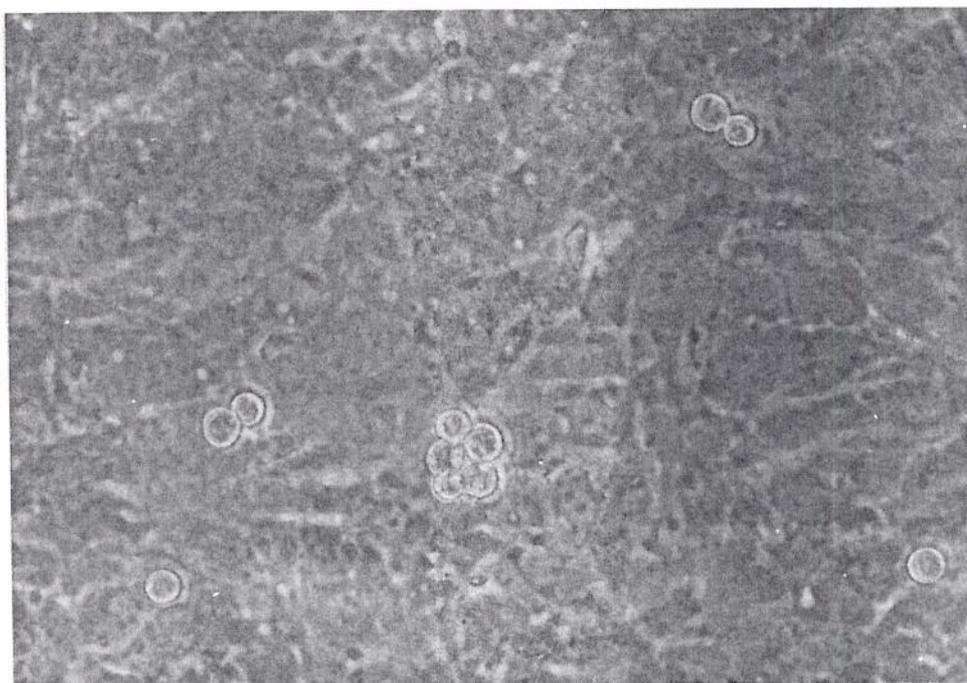


Figura 8. Foto de uma cocultura de MCC/GR de três semanas. Os mastócitos apresentam uma forma esférica, podendo estar isolados ou em pequenas "clusters".

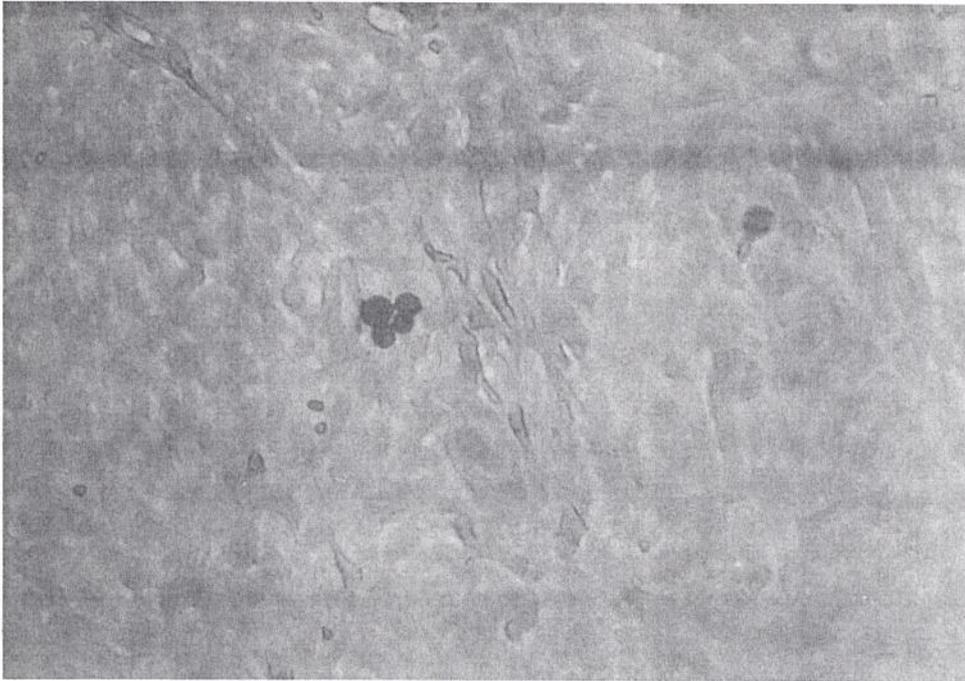


Figura 9. Cocultura de MCC/GR de cinco semanas coradas com azul de Alcian-Safranina. Quatro mastócitos corados em vermelhos e um isolado com o citoplasma corado em azul.

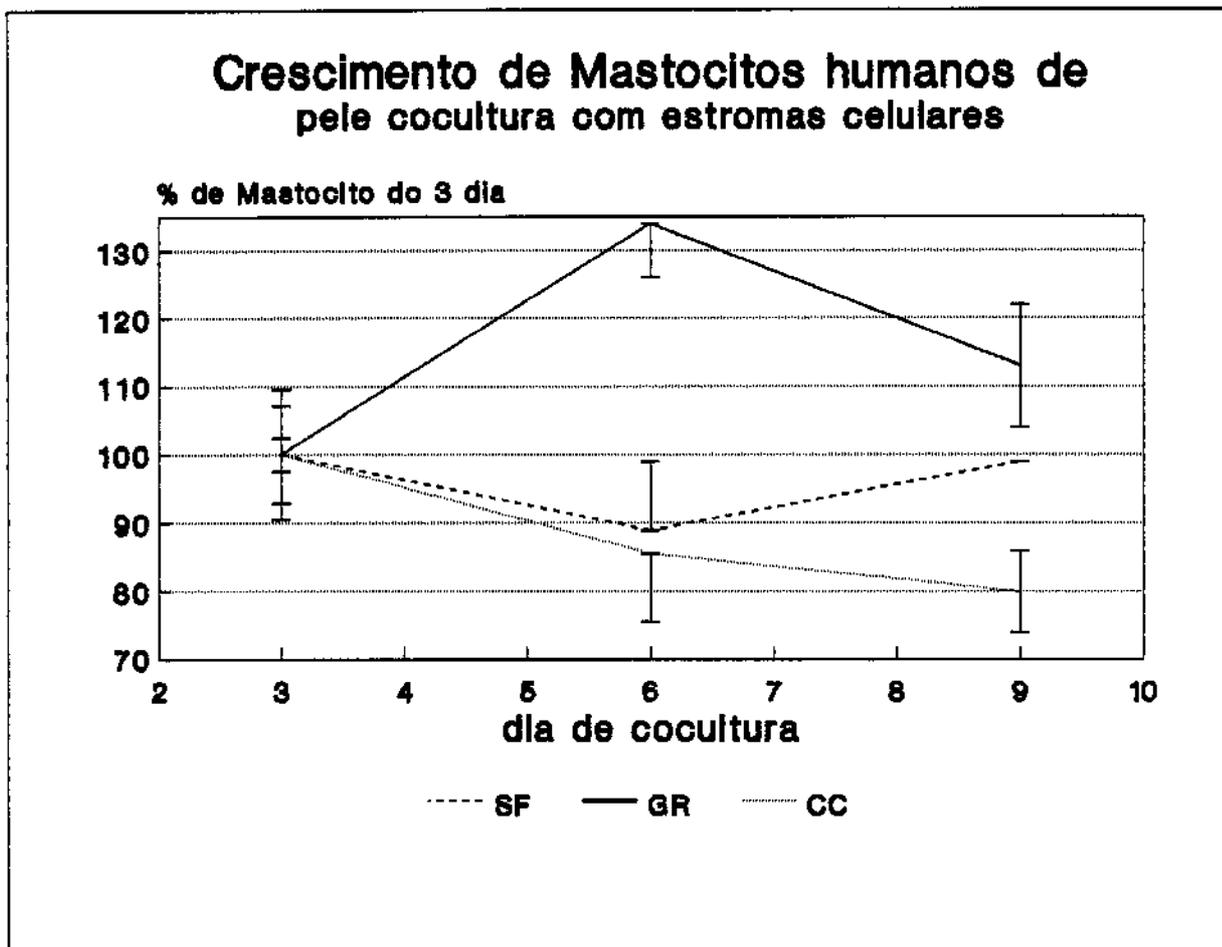


Figura 10. Mastócitos humanos de pele metacromáticos em cocultura com estromas de células primárias GR e humanas. Número de MCH expresso em porcentagem.

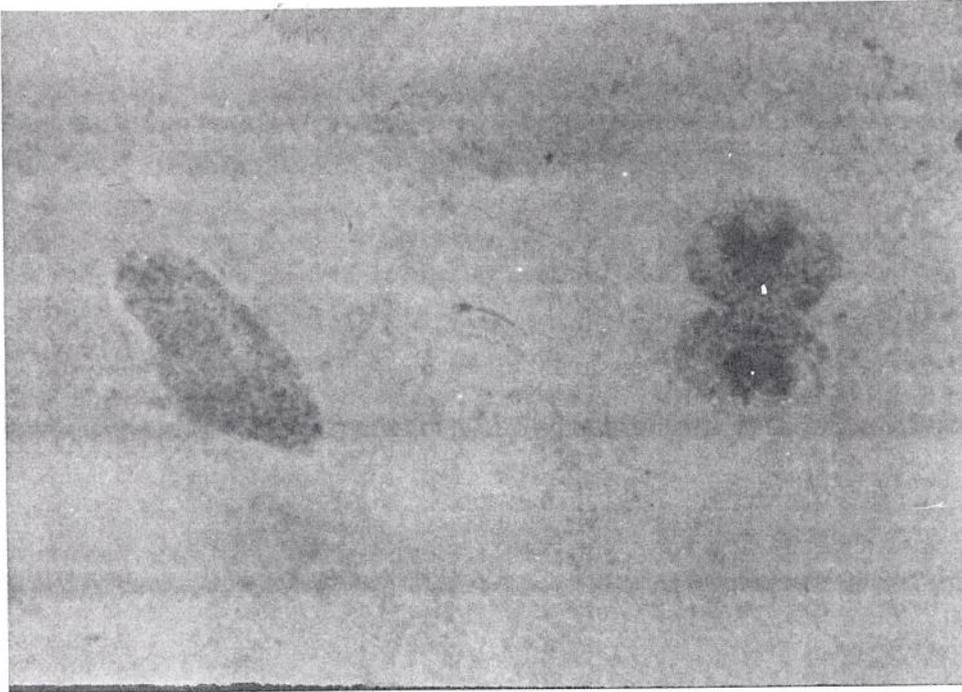


Figura 11. Foto de dois MCH no sexto dia de cocultura com células GR. Um espreado e outro em divisão na fase de Telófase.

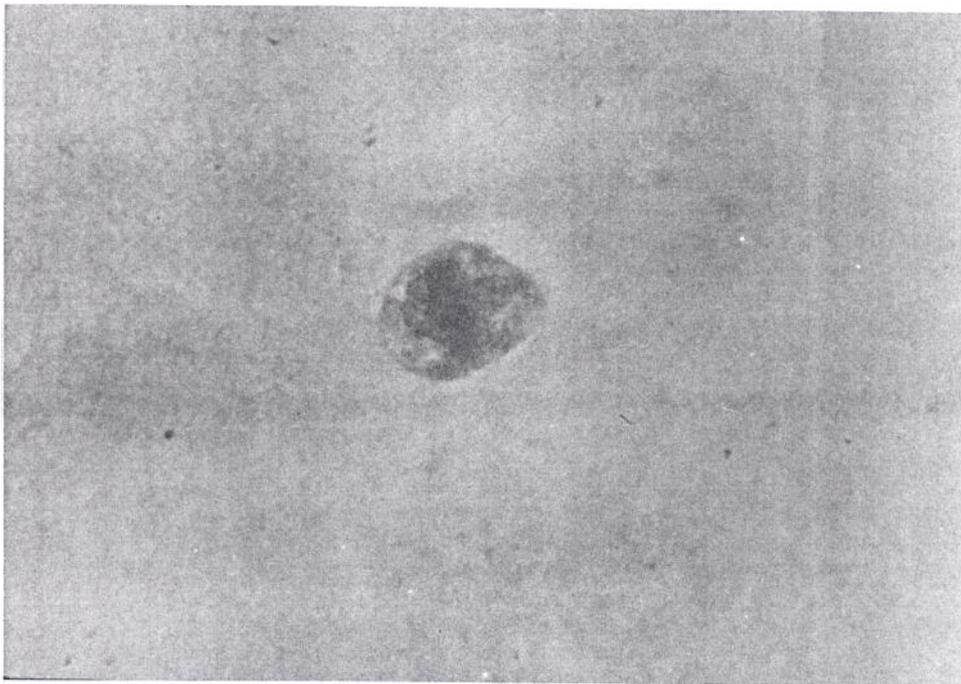


Figura 12. Foto de um MCH em anáfase, corados com azul de toluidina, no sexto dia de cocultura com células GR.

Gel de agarose de PCRs de linhagens celulares para SCF

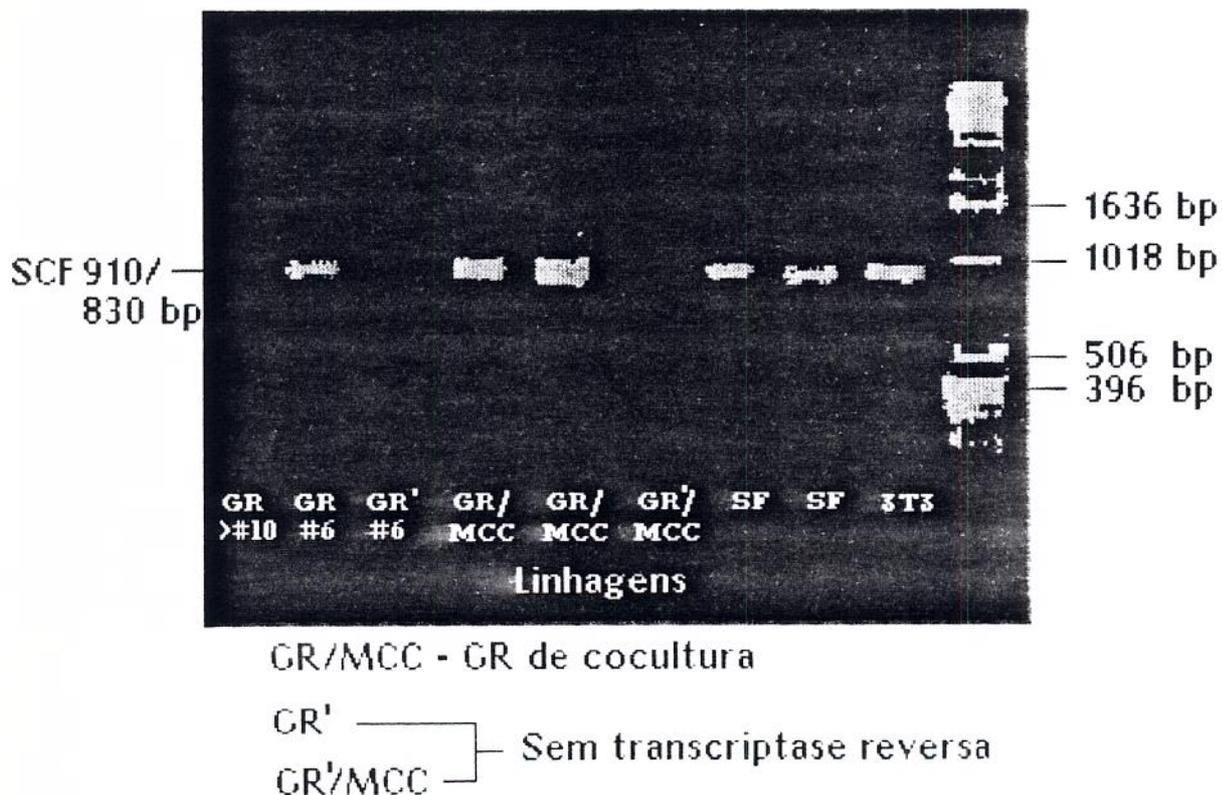


Figura 13. Gel de agarose com produtos de amplificação por PCR para Stem Cell Factor.

Gel de agarose de PCRs de linhagens celulares para beta-actina

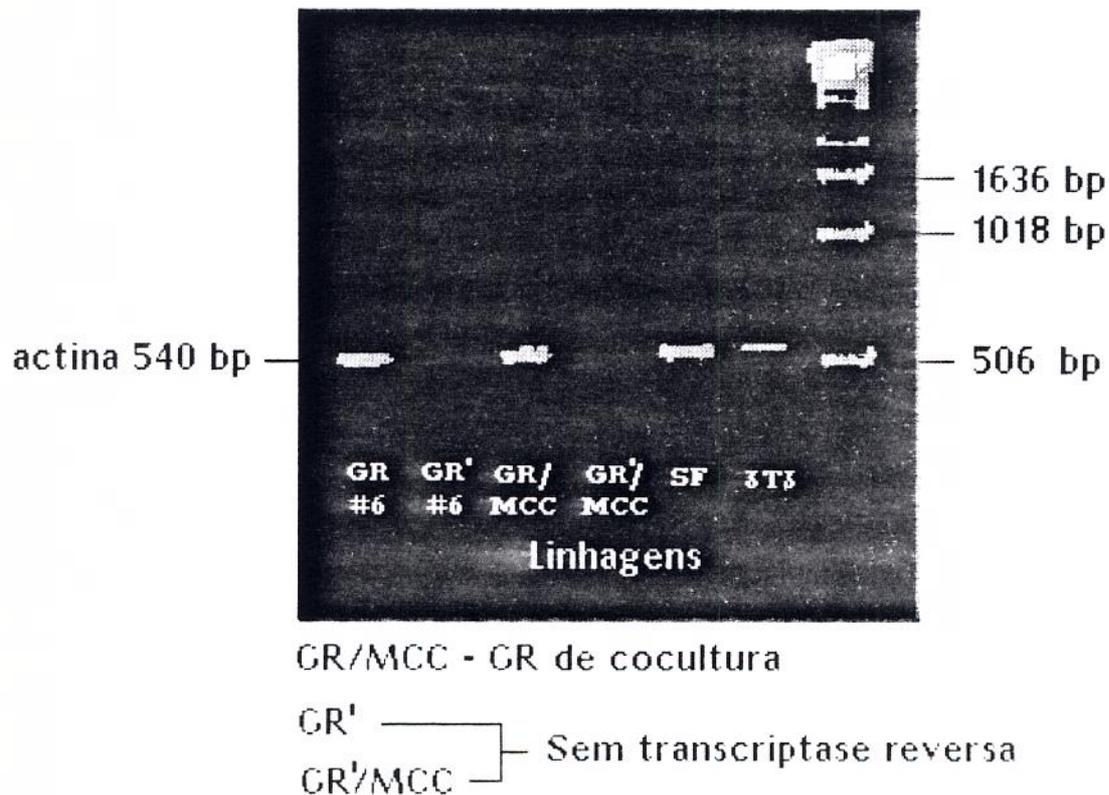


Figura 14. Gel de agarose com produtos de amplificação por PCR para β -actina.

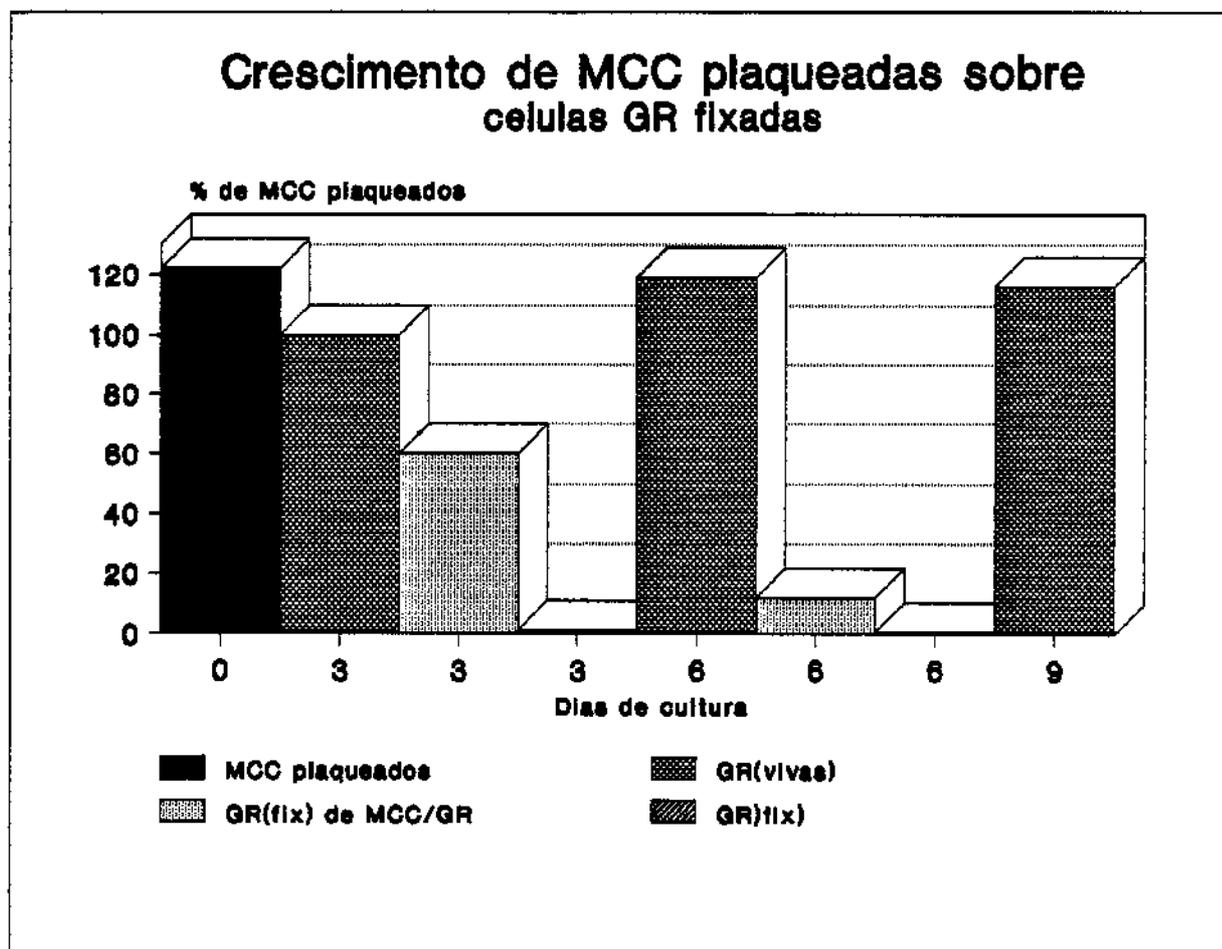


Figura 15. Mastócitos em cultura com estromas de células GR fixadas.

5. DISCUSSÃO GERAL

Nossos resultados demonstraram que as GRs podem ser induzidas a expressar mensagem para o SCF e, possivelmente, de secretar o fator biologicamente ativo. Contudo, expõe uma questão importante: por quê fibroblasto de camundongo induziram apenas um pequeno aumento de mastócitos não comparável ao obtido com células GR, assim como os fibroblasto humanos só sustentaram a sobrevivência, e ambos expressam o SCF?

As GRs poderiam estar expressando quantitativamente mais SCF. Poderiam ocorrer splicing alternativos que depletassem o exon 6, favorecendo assim o aparecimento da forma do fator associado a membrana. Ou um terceiro ou mais fatores estarem envolvidos, possivelmente até de origem autócrina dos mastócitos. Razin *ET AL*, em 1991, demonstraram que mastócitos peritoneais de camundongos quando plaqueados sobre células 3T3 passam a expressar após 18 horas RNAm para a Il-3.

Heinrich *ET AL*, em 1993, levantaram essas mesmas questões entre células de estroma de medula óssea, células endoteliais e fibroblastos humanos, as quais secretam constitutivamente o SCF, embora, só as células de estroma medula óssea sejam capazes de sustentar sobrevivência de precursores hematopoiéticos. Contudo, quando se estimulam células endoteliais e fibroblasto com Il-1 α , estes passam a expressar fatores de crescimento hematopoiéticos e moléculas de adesão, como a Il-1, Il-6, Il-8, GM-CSF, G-CSF, E-selectin, VCAM-1 e ICAN-1, adquirindo a capacidade de sustentar o crescimento e a diferenciação de células progenitoras hematopoiéticas. Assim, o autor, baseado nestes dados, tentou verificar se o estímulo por Il-1 nos fibroblasto e nas células endoteliais, aumentariam a síntese de SCF e uma

maior transcrição do SCF depletado do fragmento respectivo ao exon 6. Ele mostrou que não houve variação na expressão qualitativa e nem quantitativa de SCF.

Equiparando os resultados obtidos por Heinrich com os nossos, podemos sugerir que os mastócitos possam estar liberando fatores que estimulem a expressão da mensagem para SCF nas células GR, tais como: TNF- α ou Il-1. No entanto, TNF- α é sintetizado constitutivamente por mastócitos peritoneais de camundongo, o que não ocorre com Il-1, o qual foi detectado em linhagens de mastócitos Il-3-dependentes induzidos imunologicamente ou por Ionóforo de Cálcio (Gordon e Galli, 1990).

Vários indícios sugerem o TNF- α como o possível efector da indução, além de que, muitas das funções relacionadas aos mastócitos são mimetizadas por TNF- α tais como: expressão de moléculas de adesão para leucócitos, angiogêneses, proliferação de fibroblasto, síntese de colágeno e formação de granulomas (Gordon e Galli, 1990). Klein *ET AL*, em 1989, demonstraram que fragmentos de pele de prepúcio humano quando ativados por agentes degranulantes de mastócitos sofrem aumento da expressão de ELAM-1, a qual é inibida na presença de anticorpo anti-TNF- α . Ele também demonstrou a presença de TNF- α em mastócitos da pele. Dayton *ET AL*, em 1989, mostraram que fibroblastos 3T3 em cocultura com mastócitos, perdem a inibição por contato e proliferam, chegando a um número 5 vezes maior de células. Em paralelo também ocorre um aumento na síntese de colágeno e de proteoglicanos.

A participação do TNF- α na indução da GR poderia explicar o fato da GR de baixa passagem expressar mensagem para o SCF, por que quando se dissociam granulomas para obtenção de células GR, a maior parte das células obtidas é constituída por macrófagos. Estes, por sua vez, são capazes de

secretar TNF- α e ficam presentes nas culturas de GR até terceira e quarta passagem, podendo ser uma fonte de estímulo.

O estímulo inicial sobre as células GR nas coculturas poderia ser dado pelos mastócitos, que morrem nos primeiros três dias de cultura, liberando assim o TNF- α pré-formado (fig.16). A partir daí o próprio SCF expressado, agiria estimulando os mastócitos a liberarem o TNF- α (fig.17). Nakajima demonstrou, em 1992, que mastócitos estimulados por SCF liberam 20% do seu conteúdo de histamina. Acrescentando a este dado, o fato de que mastócitos peritoneais sensibilizados, quando estimulados por anti-IgE, liberam o seu conteúdo de TNF- α em paralelo ao de histamina.

Muitos estudos faltam ser realizados para confirmar: se o RNAm para SCF presente na GR dá origem a uma molécula biologicamente ativa, se TNF- α é capaz de induzir a célula GR a expressar de RNAm para SCF e se SCF é o único fator responsável pela proliferação, ou se há participação de outros fatores e qual a origem.

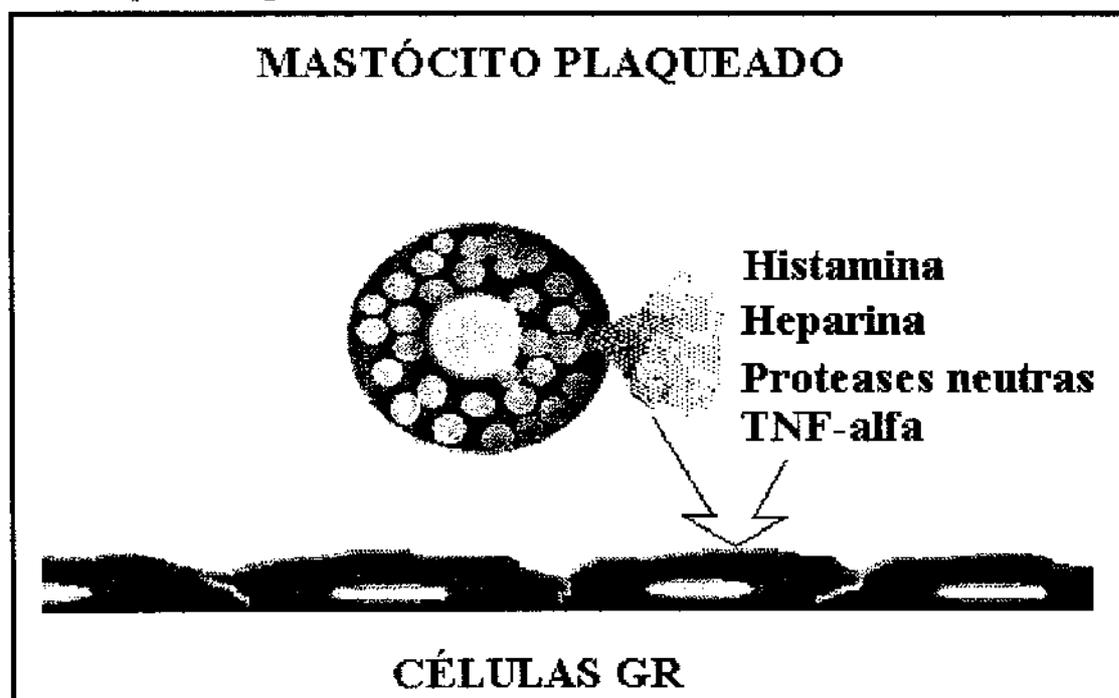


Figura 16. - Esquema de plaqueamento de mastócitos sobre células GR

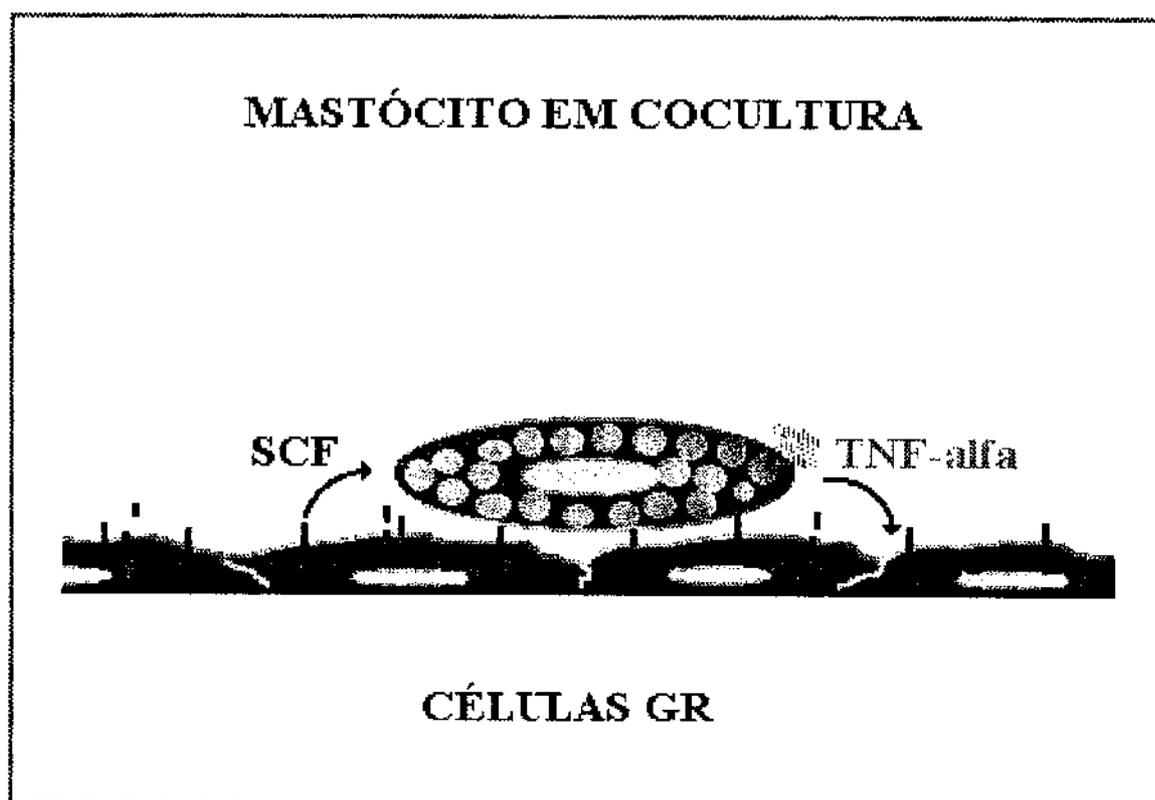


Figura 17. - Esquema de mastócitos em cocultura com células GR.

6. CONCLUSÃO

Os estromas formados por células derivadas de granuloma hepático de camundongo esquistosomótico são capazes de sustentar a sobrevivência e proliferação de mastócitos peritoneais de camundongo, bem como a manutenção de seu fenótipo de conjuntivo, sendo igualmente eficiente na proliferação de mastócitos de pele humana.

As células GR podem ser moduladas a expressar ou não mensagem para SCF, pois a descontinuidade do estímulo sobre as GR inibe a expressão do SCF.

Os mastócitos peritoneais de camundongo são capazes de induzir as células GR a expressar RNAm para SCF.

O fator expressado pelas células GR, induzidas por mastócitos, é capaz de mediar a adesão dos mastócitos, bem como a sua viabilidade até o terceiro dia de cultura.

7. BIBLIOGRAFIA

- Abe, T., Ochiachi, H., Minamishima, Y. & Nawa, Y. (1988): Induction of intestinal mastocytosis in nude mice by repeated injection of interleukin-3. *INT. ARCH. ALLERGY APPL. IMMUNOL.* **86**, 356-358.
- Abe, T., Sugaya, H., Ishida, K., Khan, I., Tasdemir, I. & Yoshimura, K. (1993): Intestinal protection against *Strongyloides ratti* and mastocytosis induced by administration of interleukin-3 in mice. *IMMUNOLOGY* **80**, 116-121.
- Adachi,S; Ebi,Y; Nishikawa,S-I; Hayashi,S-I; Yamazaki,M; Kasugai,T; Yamamura,T; Nomura,S. & Kitamura,Y (1992): Necessity of extracellular domain of W (c-Kit) receptor for attachment of murine culture mast cell to fibroblast. *BLOOD* **79**(3), 650-656.
- Alonso,S; Minty,A; Bourlet,J. & Buckingham (1986): Comparison of the Three actin coding sequences in the mouse; evolutionary relationships between the actin genes of worm-blooded vertebrates. *J.MOL.EVOL.* **23**(1), 11-22.
- Amiri, P., Locksley, R. M., Parslow, T. G., Sandick, M., Rector, E., Ritter, D. & McKerrow, J. H. (1992): Tumor necrosis factor α restores granulomas and induces parasite egg-laying in schistosome-infected SCID mice. *NATURE* **356**, 604-607.
- Anderson,D,M; Lyman,S,D; Baird,A; Wignall,J,M; Eisenman,J; Rauch,C; March,C,J; Boswell,H,S; Gimpel,S,D; Cosman,D; Williams,D,E (1990): Molecular cloning of mast cell growth factor, a hematopoietin that is active in both membrane bound and soluble forms. *CELL* **63**, 235-243.
- Benyon, R, C; Lowman, M, A; Church, M, K (1987): Human skin mast cells: their dispersion, purification, and secretory characterization. *J.IMMUNOL.* **FEV**, 861-867.
- Bioulac-Sage, P. & Balabaud, C (1985): La cellule perisinusoidale (ou la cellule de Ito). *GASTROENTEROL. CLIN. BIOL.* **9**, 312-322.
- Bird, B, R; Forrester, F, T (1980): Basic laboratory techniques in cell culture. 1st ed. U.S. Department of Health and human services,. 58 p.

- Boloukhere, M; Baldo-Correa, E & Borojevic, R (1993): Experimental schistosomiasis mansoni: characterization of connective tissue cells in hepatic periovular granulomas. *J. SUBMICROSC. CYTOL. PATHOL.* **25**, 505-517.
- Burd,P,R; Rogers,H,W; Gordon,J,R (1989): Interleukin 3-dependent and independent mast cells stimulated with IgE and antigen express multiple cytokines. *J.EXP.MED.* **70**, 245-257.
- Chomczynski, P; Sacchi, N (1987): Single step method of isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *ANAL. BIOCHEM.* **162**(1), 156-159.
- Coleman, J. W., Holliday, M. R., Kimber, I., Zsebo, M. & Galli, S.J. (1993): Regulation of mouse peritoneal mast cell secretory by Stem Cell Factor, Il-4 or Il-4. *J. IMMUNOL.* **150**(2), 556-562.
- Copeland,N,G; Gilbert,D,J; Cho,B,C; Donovan,P,J; Jenkins,N,A; Cosman,D; Anderson,D; Lyman,S,D; Williams,D,E (1990): Mast cell growth factor maps near the Steel locus on mouse chromosome 10 and is deleted in a number of steel alleles. *CELL* **63**, 175-183.
- Daniel, W.W. (1991): The Mann-Whitney test. Em: Biostatistics: a foundation for analysis in the health sciences. 5^aed. Vol.1. John Wiley & Sons, Inc. Canada, 592-594.
- Dayton,E,T; Caulfield,J,P; Hein,A; Austen,K,F; Stevens,R,L (1989): Regulation of the growth rate of mouse fibroblasts by Il-3-activated mouse bone marrow derived-mast cells. *J.IMMUNOL.* **142**, 4307-4313.
- Dolci, S; Williams, D, E; Ernst, J, K; Resnick, J, L; Brannan, C, I; Lock, L, F; Lyman, S, D; Boswell, H, S; Donovan, P, J (1991): Requirement for mast cell growth factor for primordial germ cell survival in culture. *Nature* **352**, 809-811.
- Elstale, T. & Bard, J. (1972): Collagen substrate for study on cell behavior. *J. CELL BIOL.* **54**, 626-637.

- Enerback, L. (1987): Mast Cells. Em: Histochemistry in Pathologic Diagnosis. 1sted. Vol. 1. (Eds: Spicer, S. S.) Marcel Dekker, Inc., New York, 695-726.
- Fleischman, R. A. (1993): From white spots to stem cells: the role of the Kit receptor in mammalian. *TRENDS. GENET.* **9(8)**, 285-290.
- Furitsu, T; Saito, H; Dvorak, A, M; Schwartz, L, B; Irani, A, A; Burdick, J, F; Ishizaka, K; Ishizaka, T (1989): Development of human mast cells in vitro. *PROC. NATL. ACAD. SCI. USA* **86**, 10039-10043.
- Galli, S. J. (1990): Biology of Disease. New Insights into "The Riddle of mast cells": Microenviromental regulation of mast cell development and phenotypic heterogeneity. *LAB. INVEST.* **62 (1)**, 5-33.
- Galli, S, J; Lemura, A; Garlick, D, S; Gamba-Vitalo, C; Zsebo, K, M; Andrews, R, G (1993): Reversible expansion of primate mast cell population in vivo by Stem Cell Factor. *J. CLIN. INVEST.* **91**, 148-152.
- Gordon, J, R; Burd, P, R; Galli, S, J (1990): Mast cell as a source of multifunctional cytokines. *IMMUNOLOGY* **11(12)**, 458-464.
- Gordon, J, R; Galli, S, J (1990): Mast cell as a source of both pre-formed and immunologically inducible TNF- α /cachectin. *NATURE* **346**, 274-276.
- Gordon, J, R; Galli, S, J (1991): Release of both preformed and newly synthesized tumor necrosis factor α (TNF- α)/cachectin by mouse mast cells stimulate by the Fc ϵ RI: a mechanism for the sustained action of mast cell-derived TNF- α during IgE-dependent biological responses. *J. EXP. MED.* **174**, 103-107.
- Heinrich, M, C; Dooley, D, C; Freed, A, C; Band, L; Hoatlin, M, E; Keeble, W, W; Peters, S, T; Silvey, K, V; Ey, F, S; Kabat, D; Maziarz, R, T; Bagby, G, C Jr (1993): Constitutive expression of Steel Factor gene by human stromal cells. *BLOOD* **82(3)**, 771-783.
- Howard, M; O'Garra, A (1992): Biological properties of interleukin 10. *IMMUNOLOGY TODAY* **13(6)**, 198-200.
- Huang, E; Nocka, K; Beier, D, R; Chu, T-Y; Buck, J; Lahm, H-W; Wellner, D; Leder, P; Besmer, P (1990): The hematopoietic growth factor KL is encoded

by the SL locus and is the ligand of the c-Kit receptor, the gene product of the W locus. *CELL* **63**, 225-233.

Huang,E,J; Nocka,K,H; Buck,J; Besmer,P (1992): Differential expression and processing of two cell associated forms of the Kit-ligand: KI-1 and KI-2. *Mol. biol. CELL* **3**, 349-362.

Hultner,L; Druez,C; Moiller,J; Uyttenhove,C; Schmitt,E; Rude,E; Dormer,P; Van Snick,J (1990): Mast cells growth-enhancing activity (MEA) is structurally related and functionally identical to the novel mouse T cell growth factor P40/TCGFIII (interleukin 9). *EUR. J. IMMUNOL.* **20**, 1413-1416.

Hultner,L; Moeller,J; Scimitt,E; Jager,G; Reisbach,G; Ring,J; Dormer,P (1989): Tniol-sensitive mast cell lines derived from mouse bone marrow respond to a mast cell grhowth-enhancing activity differrent from both IL-3 e and Il-4. *J.IMMUNOL.* **142**(10), 3440-3446.

Irani,A,A; Craig,S,S; DeBlois,G; Elson,C,O; Schechter,N,M; Achwartz,L,B (1987): Deficiency of the tryptase-positive, chymase-negative masr cell type in gastrointestinal mucosa of patients with defective T lymphocyte function. *J.IMMUNOL.* **138**, 4381.

Irani,A,A; Goldstein,S,M; Wintroub,B,U; Bradford.T; Schwartz,L,b (1991): Human carboxypeptidase. Selectice localization to MCTc cells. *J.IMMUNOL.* **147**, 247-253.

Irani,A,A; Schechter,N,M; Craig,S,S; Deblois,G; Schwartz,L,B (1986): Two human cell subsets with distinct neutral protease composition. *PROC.NATL. ACAD.SCI.USA* **83**, 4464-4468.

Irani,A,A; Schechter,N,M; Craig,S,S; Deblois,G; Schwartz,L,B (1986): Detection of MCT and MCTC types human mast cells by immunohistochemistry using new monoclonals anti-tryptase and anti-chymase antibodies. *J. HISTOCHEM. CYTOCHEM.* **37**, 1509-1515.

Irani,A,A; Schwartz,L,b (1990): Neutral protease as indicator of human mast cell heterogeneity. *MONOGR. ALLERGY* **27**, 146-162.

- Ishizaka,T; Furitsu,T; Inagaki,N (1991): In vitro development and functions of human mast cells. *INT. ARCH. ALLERGY APPL IMMUNOL.* **94**, 116-121.
- Junqueira,L,C; Carneiro,J (1985): Histologia básica. 6ª ed. Vol.1.*GUANABARA KOOGAN*, Rio de Janeiro. 512 pág.
- Kanakura,T; Thompsom,H; Nakano,T; Yamamura,T,I; Asai,H; Kitamura,Y; Metcalfe,D,D; Galli,S,J (1989): Multiple bidirectional alterations of phenotype and changes in proliferative potential during the in vitro and in vivo passage of clonal mast cell populations derived from mouse peritoneal mast cells. *BLOOD* **72**, 877-885.
- Kirshenbaum,A,S; Goff,J,P; Dreskin,S,C; Irani,AM; Schwartz,L,B; Metcalfe,D,D (1989): Il-3 dependent growth of basophil-like cells and mast cells from human bone marrow. *J.IMMUNOL.* **142**(7), 2424-2429.
- Kitamura,T; Go,S; Hatanaka,K (1978): Decrease of mast cells in W/W^v mice and their increase by bone marrow transplantation. *BLOOD* **52**, 447-452.
- Kitamura,Y; Go,S (1979): Decreased production of mast cells in SL/SL^d anemic mice. *BLOOD* **53**, 492-497.
- Klein,L,M; Lavker,R,M; Matis,W,L; Murphy,G,F (1989): Degranulation of human mast cells induces an endothelial antigen central to leukocyte adhesion. *PROC.NATL. ACAD.SCI.USA* **86**, 8972-8976.
- Kobayashi,T., Nakano, T., Nakahata, T., Asai, H., Yagi, Y., Tsuji, K., Komiyama, A., Akabane, T., Kojima, S. & Kitamura, Y. (1986): Formation of mast cells colonies in methylcelulose by mouse peritoneal cells and differentiation of these cloned cells in both the skin and the gastric mucosa of W/W^v mice: Evidence that a common precursor can give rise to both "connective" tissue type and "mucosal" mast cells. *J. IMMUNOL.* **136**, 1378-1384.
- Lee, F., Yokota, T., Otsuka, T., Meyerson, P., Villaret, D., Coffman, R., Mosman, T., Rennick, D., Roehm, N., Smith, C., Zlotnick, A. & Arai, K., I (1986): Isolation and characterization of a mouse interleukin cDNA clone that expresses B cell stimulatory factor 1 activities and T-cell-and mast cell-stimulating activities. *PROC. NATL. ACAD. SCI. USA* **83**, 2061-2065.

- Levi-Schaffer,F; Austen,K,F; Caulfield,J,P; Hein,A; Bloes,W; Stevens,R (1985): Fibroblast maintain the phenotype and viability of the rat heparin containing mast cell in vitro. *J.IMMUNOL.* **135**(5), 3454-3462.
- Levi-Schaffer,F; Austen,K,F; Gravallesse,P,M; Stevens,R,L (1986): Co-culture of interleukin 3-dependent mouse mast cells with fibroblast results in a phenotypic change of mast cells. *PROC.NATL. ACAD.SCI.USA* **83**, 6485-6488.
- Levi-Schaffer,F; Austen,K,F; Caulfield,J,P; Hein,A; Gravallesse,P,M; Stevens,R,L (1987): Co-culture of lung-derived mast cells with mouse 3T3 fibroblast: Morphology and IgE-mediated release of histamine, prostaglandin D₂, and leukotrienes. *J.IMMUNOL.* **139**(2), 494-500.
- Madeen,K,B; Urban,JF,Jr; Zilterner,H,J; Schrader,J,S; Finkelman,F,D; Katona,I,M (1991): Antibodies to Il-3 and Il-4 suppress helminth-induced intestinal mastocytosis. *FASEB J* **5**, A1012.
- Martin,F,H; Suggs,S,V; Langley,K,E; Lu,H,S; Ting,J; Okino,K; Morris,F; McNiece,I,K; Jacobsen,F,W; Mendiaz,E,A; Birkett,N,C; Smith,K,A; Johnson,M,J; Parker,V,P; Flores,J,C; Patel,A,C; Fisher,E,F; Erjavec,H,O; Herrera,C,J; Wypych,J; Sachdev,R,K; Pope,J,A; Leslie,I; Wen,D; Lin,C-H; Cupples,R,L; Zebo,K,M (1990): Primary structure and functional expression of rat and human stem cell factor DNAs. *CELL* **63**(5), 203-211.
- Meininger,C,J; Yano,H; Rottapel,R; Bernstein,A; Zebo,K,M; Zetter,B,R (1992): The c-Kit receptor ligand functions as a mast cell chemoattractant. *BLOOD* **79**(4), 958-963.
- Michel,L; Arock,M; Dubertret,L (1992): Le mastocyte et son exploration. *PATHOLOGIE BIOLOGIE* **40**(2), 147-159.
- Miyazawa,K; Hendrie,P,C; Kim,Y-J; Mantel,C; Yang,Y-C; Kwon,B,S; Broxmeyer,H,E (1992): Recombinant human interleukin-9 induces protein tyrosine phosphorylation and synergizes with Steel Factor to stimulate proliferation of the human factor-dependent cell line M07e. *BLOOD* **80**(7), 1685-1692.

- Nabel,G; Galli,S,J; Dvorak,A,M; Dvorak,H,F; Cantor,H (1981): Inducer T lymphocytes synthesize a factor that stimulates proliferation of cloned mast cells. *NATURE* **291**, 332.
- Nagao,K; Yokoro,K; Aaronson,S,A (1981): continuous lines of basophil/mast cells derived from normal mouse bone marrow. *SCIENCE* **212**, 333-335.
- Nakahata,T; Kobayashi,T; Ishiguro,A; Tsuji,K; Naganuma,K; Ando,O; Yagi,Y; Tadokoro,K; Akabane,T (1986): Extensive proliferation of mature connective-tissue type mast cells in vitro. *NATURE* **324**, 65-67.
- Nakajima,K; Hirai,K; Yamaguchi,M; Takaishi,T; Ohta,K; Morita,Y; Ito,K (1992): Stem cell factor has histamine releasing activity in rat connective tissue-type mast cells. *BIOCHEM. BIOPHYS. RES. COMMUN.* **183**(3), 1076-1083.
- Nakano, T., Sonoda, T., Hayashi, C., Yamatodani, A., Kanayama, Y., Yamamura, T., Asai, H., Yonezawa, T., Kitamura, Y. & Galli, S. J. (1985): Fate of bone marrow-derived cultured mast cells after intracutaneous, intraperitoneal, and intravenous transfer into genetically mast cells-deficient W/W^v mice. Evidence that cultured mast cells can give rise to both connective tissue type and mucosal mast cells. *J. EXP. MED.* **162**, 1025-1043.
- Nocka,K; Buck,J; Levi,E; Besmer,P (1990): Candidate ligand for the c-kit transmembrane kinase receptor: KL, a fibroblast derived growth factor stimulates mast cells and erythroid progenitors. *THE EMBO JOURNAL* **9**(10), 3287-3294.
- Pellegrino, J. & Brener, Z. (1956). Method for isolating schistosome granulomas from mouse livers. *J. PARASITOL.* **42**: 564.
- Plaut, M; Pierce, J, H; Watson, C, J; Hanley-Hyde, J; Nordan, R, P; Paul, W, E (1989): Mast cell lines produce lymphokines in response to cross-linkage of FcεRI to calcium ionophores. *NATURE* **339**(4), 64-67.
- Razin,E; Cordon-Cardo,C; Good,R,A (1981): Growth a pure population of mast cells in vitro with conditioned medium derived from concanavalin A-stimulated splenocytes. *PROC.NATL. ACAD.SCI.USA* **78**, 2559-2561.

- Razin,E; Leslie,K,B; Scharder,J,W (1991): Connective tissue mast cells in contact with fibroblast express Il-3 mRNA. *J.IMMUNOL.* **146**, 981-987.
- Roberts, R.A.; Spoocher, E.; Parkinson, E. K.; Lord, B. I.; Allen, T. D. & Dexter, T. M. (1987): Metabolically inactive 3T3 cells can substitute for marrow stromal cells to promote the proliferation and development of multipotent haemopoietic stem cells. *J. CELL. PHYSIOL.* **132**, 203-214.
- Ruitenber, E. J. & Elgersma, A. (1976): Absence of intestinal mast cell response in congenitally athymic mice during a *Trichinella spiralis* infection. *NATURE* **264**, 258-260.
- Saito,H; Hatake,K; Dvorak,A,M; Leiferman,K,M; Donnenberg,A,D; Arai,N; Ishizaka,T (1988): Selective differentiation and proliferation of hematopoietic cells induced by recombinant human interleukins. *PROC.NATL. ACAD.SCI.USA* **85**, 2288-2292.
- Schmitt. E; Fassbernder, B; Beyreuther, K; Spaeth, E; Schwarzkopf, R; Rude, E. (1987): Charaterization of T cell-derived lymphokine that acts synergistically with Il-3 on the growth of murine mast cells and is identical with Il-4. *IMMUNOBIOLOGY* **174**, 406-419.
- Selye, H (1965): The mast cells. 1^aed. Vol.1. Butter Worths, Washington, pág. 498.
- Siraganian, R. P. (1988): Mast cells and Basophils. Em: Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates. 1^aed. Vol.1. (Eds: Gallin, J. I., Golstein, I. M., & Snyderman, R.) Raven Press, New York, 513-542.
- Sonoda, S., Sonoda, T., Nakano, T., Kanayama, Y., Kanakura, Y., Asai, H., Yonezawa, T. & Kitamura, Y. (1986): Development of mucosal mast cells after injection of a single connective tissue-type mast cell in the stomach mucosa of genetically mast cell-deficient W/W^v mice. *J. IMMUNOL.* **137**, 1319-1322.
- Swieter,M; Mergenhagen,S,E; Siraganian,R,P (1992): Microenviroment factors that influence mast cell phenoyte and function. *PROC. SOC. EXP. BIOL. MED.* **199**(1), 22-33.

- Swieter,M; Midura,R,J; Nishikata,H; Oliver,C; Berenstein,E,H; Mergenhagen,S,E; Hascall,V,P; Siraganian,R,P (1993): Mouse 3T3 fibroblasts induce rat basophilic leukemia (RBL-2H3) cells to acquire responsiveness to compound 48/80. *J. IMMUNOL.* **150**(2), 617-624.
- Tertian,G; Yung,Y,P; Guy-Grand,D; Moore,MAS (1981): Long term in vitro culture of murine mast cells. Description of a growth-factor dependent culture technique. *J. IMMUNOL.* **127**, 788.
- Thompson-Snipes,L; Dhar,V; Bond,M,W; Mosmann,TR; Moore,K,W; Renick,DM (1991): Interleukin 10: A novel stimulatory factor for mast cells and their progenitors. *J. EXP. MED.* **173**, 507-510.
- Tsai,M; Shih,L,S; Newlands,G,F; Takeishi,T; Langley,K,E; Zsebo,K,M; Miller,H,R; Geissler,E,N; Galli,S,J (1991): The rat c-Kit ligand, Stem Cell Factor, induces the development of connective-type and mucosal mast cells in vivo. Analysis by anatomical distribution, histochemistry, and protease phenotype. *J. EXP. MED.* **174**, 125-131.
- Tsai,M; Takeishi,T; Thompson,H; Langley,K,E; Zsebo,K,M; Metcalfe,D,D; Geissler,E,N; Galli,S,J (1991): Induction of mast cell proliferation, maturation, and heparin synthesis by the rat *c-kit* ligand, stem cell factor. *PROC. NATL. ACAD. SCI. USA* **88**, 6382-6386.
- Tsuji,K; Nakahata,T; Takagi,M; Kobayashi,T; Ishiguro,A; Kikuchi,T; Naganuma,K; Koike,K; Miyajima,A; Arai,K,I; Akabane,T (1990): Effects of interleukin-3 and interleukin-4 on the development of "connective tissue-type" mast cells: Interleukin-3 supports their survival and interleukin-4 supports their proliferation synergistically with interleukin-3. *BLOOD* **75**, 421-427.
- Valent,p; Spanblochl,E; Sperr,W,R; Sillaber,C; Zsebo,K,M; Agis,H; Strobl,H; Geissler,K; Bettelheim,P; Lechner,K (1992): Induction of differentiation of human mast from bone marrow and peripheral blood mononuclear cells by recombinant human stem cell factor/kit-ligand in long-term culture. *BLOOD* **80**(9), 2237-2245.

Williams,D,E; Eisenman,J; Baird,A; Rauch,C; Ness,K,V; March,C,J; Park,L,S; Martin,U; Mochizuki,D,Y; Boswell,H,S; Burgess,G,S; Cosman,D; Lyman,S,D (1990): Identification of a ligand for the c-Kit proto-oncogene. *CELL* **63**, 167-174.

Witte,O,N (1990): Steel locus defines new multipotent growth factor. *CELL* **63**, 5-6.

Worthington; Bailey (1970): *Histochine normale et pathologie*. Vol. 2. Gauthier-Villars, Paris. 1699-1700 pages.

Zsebo,K,M; Williams,D,A; Geissler,E,N; Broudy,V,C; Martin,F,H; Atkins,H,L; Hsu,R-Y; Birkett,N,C; Okino,K,H; Murdock,D,C; Jacobsen,F,W; Langley,K,E; Smith,K,A; Takeishi,T; Cattanach,B,M; Galli,S,J; Suggs,S,V (1990): Stem Cell Factor is encoded at the Sl locus of the mouse and is the ligand for the c-Kit tyrosine kinase receptor. *CELL* **63**, 213-224.

Zsebo,K,M; Wypych,J; McNiece,I,A; Lu,H,S; Smith,K,A; Karkare,S,B; Sachdev,R,K; Yuschenkoff,V,N; Birkett,N,C; Williams,L,R; Satyagal,V,N; Tung,W; Bosselman,R,A; Mendiaz,E,A; Langly,K,E (1990): Identification, purification, and biological characterization of hematopoietic Stem Cell Factor from buffalo rat liver conditioned medium. *CELL* **63**, 195-201.