

# **Metodologia para o isolamento de células Intersticiais a partir do intestino delgado de ratazana: caraterização imunocitoquímica e funcional**

Ana Isabel Alves Laço

Mestrado em Biologia Celular e Molecular  
Departamento de Biologia  
2014

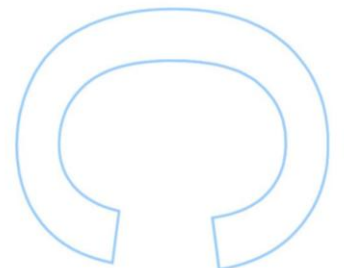
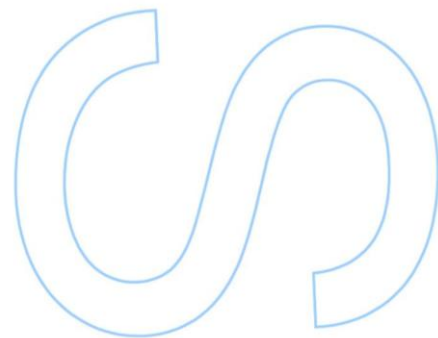
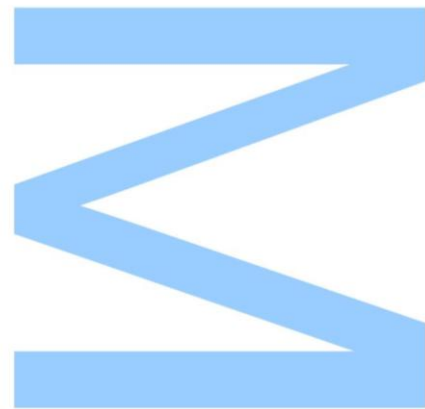
Orientador

Doutora Margarida Duarte Araújo, Professora auxiliar, UMIB  
e MedInUP, ICBAS/UP

Co-orientador

Doutora Maria Adelina Costa, Professora auxiliar, UMIB e  
MedInUP, ICBAS/UP

Doutor Paulo Correia-de-Sá, Professor catedrático, UMIB e  
MedInUP, ICBAS/UP



Todas as correções determinadas pelo júri, e só essas, foram efetuadas.

O Presidente do Júri,

Porto, \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

**N**

**S**

**O**

**Este trabalho permitiu a elaboração e apresentação da seguinte comunicação científica:**

*Título:* “Immunocytochemical and functional characterization of interstitial cells of Cajal in the rat ileum”

*Autores:* A. Alves-Laço, M. Duarte-Araújo, S. Gonçalves-Monteiro, F. Ferreirinha, M.A. Costa, P. Correia-de-Sá.

*Congresso:* Encontro Investigação Jovem Da Universidade Do Porto (IJUP), 2014 – Porto, Portugal

*Participação:* Apresentação de *poster*

**Colaboração com outros trabalhos:**

*Título:* “The topology and enzymatic activity of distinct E-NTPDases as fine-tuning regulators of purinergic signaling in the rat ileum”

*Autores:* M. Duarte-Araújo, S. Gonçalves-Monteiro, C. Tavares, M. T. Magalhães-Cardoso, A. Alves-Laço, F. Ferreirinha, J. Sévigny, P. Correia-de-Sá.

*Congresso:* Purines 2014 – International Conference on Signaling, Drugs and Targets, Bona, Alemanha

*Participação:* Apresentação de *poster*

## Agradecimentos

No decorrer da realização deste trabalho, inúmeras pessoas intervieram, através da colaboração, disponibilidade, apoio e ensinamentos. Desta forma, não posso deixar de revelar o meu profundo agradecimento:

Ao Professor Doutor Paulo Correia-de-Sá pela oportunidade de trabalhar neste laboratório, por todo o rigor, disponibilidade e por todos os conhecimentos transmitidos.

À Professora Doutora Margarida Araújo pela orientação, por todos os ensinamentos transmitidos, pelo voto de confiança e por toda a simpatia, carinho, compreensão, disponibilidade e preocupação demonstrada.

À Professora Doutora Maria Adelina, que mais do que uma co-orientadora vai ser sempre a “fofinha” preferida. Obrigada pela dedicação, apoio, carinho, compreensão e por todos os conselhos dados, que foram de enorme valia para este trabalho. Pessoas das “células” ficam sempre no coração.

À Doutora Fátima Ferreirinha pela simpatia, disponibilidade e ajuda prestada, que contribuíram muito para a realização deste trabalho.

Ao Bernardo Matos por todos os conselhos, preocupação e disponibilidade demonstrada.

À Salomé Monteiro por toda a disponibilidade, apoio e entreatajuda.

À Mariana Certal, a minha Marianolas, pela boa disposição, apoio, entreatajuda, por tornar cada ida “às células” mais animada, por ser uma das grandes “fofinhas” e pela enorme amizade que criamos. Obrigada por todas as nossas conversas e por todos os momentos que partilhamos.

À Adriana Vinhas por pertencer às “fofinhas”, por todo o apoio, carinho e pela amizade que criamos.

À Tânia Rodrigues, por me compreender melhor que ninguém, por todo o apoio e amizade.

Aos restantes elementos do laboratório que sempre se demonstraram disponíveis para me ajudar, dando apoio e ânimo.

Às minhas meninas do mestrado, Eunice, Raquel e Maria por todos os momentos que partilhamos ao longo destes dois anos. Pela amizade que ficou, por me aturarem e por toda a força, entreaajuda e apoio demonstrado.

Às minhas grandes amigas de Vila Real, em especial à Ana Martins, Diana Lourenço e Ângela Soares, porque embora longe estão sempre perto. Obrigada por todos os telefonemas, por todo o carinho, por todas as palavras de incentivo e pela amizade única.

Ao Eduardo Araújo, por ser a pessoa que me faz tão feliz, pela enorme paciência, dedicação, cumplicidade, encorajamento, amor e carinho. Por todas as palavras de conforto e por acreditar sempre em mim.

Ao meu irmão por todas as brincadeiras, zangas amigáveis e cumplicidade.

Aos meus pais por todas as conversas, paciência, apoio incondicional, pela dedicação e esforço para que nada falte e pelo ambiente familiar extraordinário que sempre me proporcionaram. Graças a eles foi possível ter concluído mais uma etapa da minha vida, por isso um grande e sincero “obrigada”.

Esta tese foi realizada no âmbito dos trabalhos de investigação da Unidade Multidisciplinar de Investigação Biomédica (UMIB) e do Center for Drug Discovery and Innovative Medicines (MedInUP). Este trabalho só foi possível devido ao apoio financeiro da Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT) através do Projeto Estratégico PEst-OE/SAU/UI215/2011-14.

## Resumo

A motilidade gastrointestinal depende essencialmente de neurotransmissores como a acetilcolina (ACh), cuja libertação a partir de neurónios motores entéricos se encontra controlada pela ação de neuromoduladores como o ATP e a adenosina. Classicamente, a ACh libertada ativa recetores muscarínicos localizados no músculo liso intestinal, promovendo a sua contração. Contudo, nos últimos anos este conceito modificou-se, tendo surgido novos intervenientes, as células intersticiais (IC), que estabelecem relações muito próximas tanto com os terminais nervosos como com as células musculares lisas (SMC). Estas células de origem mesenquimatosa podem ser classificadas como células intersticiais de Cajal (ICC, c-kit positivas) ou células do tipo-fibroblasto (FLC, PDGFR $\alpha$  positivas) e exibem uma distribuição e características morfológicas distintas de acordo com a sua localização anatómica. Apesar da justaposição entre os neurónios entéricos, ICC e SMC, pouco se sabe acerca do papel neuromodulador das IC na transmissão neuromuscular.

Este estudo teve como principal objetivo conseguir realizar culturas celulares de IC de intestino delgado de ratazana, para poder estudar o seu contributo na neurotransmissão mioentérica. O protocolo original utilizado permitiu obter culturas celulares enriquecidas em IC, em que predominam células Ano1, SK3 e PDGFR $\alpha$  positivas, que se poderão definir como FLC. Ocasionalmente poderão existir ICC (tipicamente c-Kit positivas e PDGFR $\alpha$  negativas) e SMC (positivas para a actina  $\alpha$ ). Este estudo permitiu, pela primeira vez, obter imagens que revelam a imunorreatividade do Ano1 em culturas celulares. Funcionalmente, a maioria das células resultantes da cultura primária reagem através do aumento dos níveis intracelulares de cálcio ( $[Ca^{2+}]_i$ ) em resposta à incubação com ATP (10 e 100  $\mu$ M). Apenas a célula que não respondeu ao ATP respondeu à ACh (10  $\mu$ M), gerando um aumento de grande amplitude nos níveis  $[Ca^{2+}]_i$ . Estes resultados sugerem que, com a metodologia descrita, é possível obter culturas celulares mistas, com predomínio de células PDGFR $\alpha$ + que respondem ao ATP. As restantes células, menos abundantes, poderão ser ICC ou SMC, reativas à ACh.

Palavras-chave: células Intersticiais (IC), células intersticiais de Cajal (ICC), células tipo-fibroblasto (FLC), células musculares lisas (SMC), culturas celulares, plexo mioentérico, íleo, imunofluorescência indireta, oscilações intracelulares de  $Ca^{2+}$ .

## Abstract

Gastrointestinal motility depends on the release of different neurotransmitters and neuromodulators. Acetylcholine is the most efficient intestinal excitatory neurotransmitter and its release can be modulated by purines (e.g ATP and adenosine). Until recent years it was accepted that ACh activation of muscarinic receptors located in smooth muscle cells would result in intestinal contraction, but that concept has changed. Nowadays it was demonstrated that interstitial cells (IC) of mesenchymal origin are in close proximity to enteric nerve bundles and smooth muscle cells (SMC), forming an electrical syncytium. These IC, consisting of both interstitial cells of Cajal (ICC, c-kit positive cells) and fibroblast like cells (FLC, PDGFR $\alpha$  positive cells), are organized in different subpopulations based on their morphological features and anatomical location in the muscle wall. But despite the proximity between enteric neurons, ICC and SMC, little is known about the role of ICC in neuromuscular transmission.

We decided to create enriched IC primary cell cultures from the rat small intestine. After establishing a novel protocol to obtain these primary cell cultures we were able, by immunofluorescence, to identify the majority of these cells as Ano1, SK3 and PDGFR $\alpha$  positive cells, compatible with FLC phenotype. Occasionally there may also be found some ICC (c-Kit positive but PDGFR $\alpha$  negative cells) and SMC ( $\alpha$ -actin positive cells). To our knowledge this is the first time that Ano1 positive cells are shown in culture. In primary cell cultures, the majority of cells responded to ATP (10 and 100  $\mu$ M) by increasing intracellular calcium levels. The cell that did not respond to ATP was the only one that increased its  $[Ca^{2+}]_i$  levels after ACh (10  $\mu$ M) incubation. Taking together, these results support the idea that these are heterogeneous cell cultures, with a predominance of PDGFR $\alpha$ <sup>+</sup> cells that respond to ATP. The remaining minority cells, responsive to ACh, may be either ICC or SMC.

Key words: Interstitial cells (IC), interstitial cells of Cajal (ICC), fibroblast like cells (FLC), smooth muscle cells (SMC), cell cultures, myenteric plexus, ileum, indirect immunofluorescence, intracellular  $Ca^{2+}$  oscillation.

# Índice

|       |                                                 |    |
|-------|-------------------------------------------------|----|
| I.    | INTRODUÇÃO.....                                 | 1  |
| 1.    | Sistema Nervoso Entérico .....                  | 1  |
| 1.1   | Plexo mioentérico.....                          | 1  |
| 1.2   | Neurotransmissão Entérica .....                 | 2  |
| 1.3   | Células intersticiais de Cajal.....             | 3  |
| 1.3.1 | Origem e desenvolvimento .....                  | 3  |
| 1.3.2 | Subtipos de ICC .....                           | 5  |
| 1.3.3 | Células do tipo-fibroblasto .....               | 6  |
| 1.3.4 | Caraterísticas morfológicas .....               | 8  |
| 1.3.5 | Marcadores moleculares e a sua importância..... | 8  |
| 1.3.6 | Relevância clínica .....                        | 10 |
| 1.4   | Culturas celulares .....                        | 10 |
| 1.4.1 | Tipos de culturas celulares.....                | 11 |
| 1.4.2 | Método de obtenção de culturas primárias .....  | 12 |
| 1.4.3 | Condições e avaliação das culturas .....        | 12 |
| 1.4.4 | Contaminação nas culturas celulares .....       | 14 |
| 1.4.5 | Comportamento das ICC em cultura celular .....  | 14 |
| II.   | OBJETIVOS .....                                 | 16 |
| III.  | MATERIAL E MÉTODOS .....                        | 17 |
| 3.    | Culturas celulares.....                         | 17 |

|          |                                                                                                                                     |    |
|----------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.1      | Preparação da amostra biológica - Isolamento do intestino delgado de ratasanas jovens.....                                          | 17 |
| 3.1.1    | Cultura de células - técnica do explante .....                                                                                      | 18 |
| 3.1.2    | Cultura de células - técnica de dissociação enzimática .....                                                                        | 18 |
| 3.2      | Manutenção das culturas .....                                                                                                       | 20 |
| 3.3      | Tripsinização das células .....                                                                                                     | 21 |
| 3.4      | Identificação fenotípica das culturas celulares .....                                                                               | 22 |
| 3.4.1    | Imunocitoquímica .....                                                                                                              | 22 |
| 3.5      | Imunohistoquímica de íleo de ratazana.....                                                                                          | 25 |
| 3.5.1    | Preparação da amostra biológica – Íleo e preparações de plexo mioentérico – músculo longitudinal (MP-LM) de ratasanas adultas ..... | 25 |
| 3.5.2    | Imunohistoquímica de cortes transversais de íleo de ratazana.....                                                                   | 25 |
| 3.6      | Imunohistoquímica de preparações de MP-LM de íleo ratazana.....                                                                     | 26 |
| 3.7      | Avaliação das oscilações de $Ca^{2+}$ intracelular ( $[Ca^{2+}]_i$ ) em células vivas por microscopia confocal .....                | 27 |
| IV.      | RESULTADOS .....                                                                                                                    | 29 |
| 4.       | Localização das IC no íleo de ratazana.....                                                                                         | 29 |
| 4.1      | Cultura de células Intersticiais isoladas a partir do intestino delgado de ratazana .....                                           | 34 |
| 4.1.1    | Técnica do explante vrs técnica de dissociação enzimática .....                                                                     | 34 |
| 4.1.2    | Técnica de dissociação enzimática .....                                                                                             | 37 |
| 4.1.2.a) | Composição e efeito do tempo de incubação do tecido com a solução de digestão .....                                                 | 37 |
| 4.1.2.b) | Duração da cultura primária.....                                                                                                    | 38 |

|       |                                                                                                                                          |    |
|-------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 4.2   | Caraterização fenotípica de culturas celulares de íleo de ratazana.....                                                                  | 39 |
| 4.3   | Caraterização funcional das células em cultura isoladas do íleo de ratazana:<br>Análise das oscilações intracelulares do $Ca^{2+}$ ..... | 44 |
| V.    | DISCUSSÃO .....                                                                                                                          | 48 |
| VI.   | Conclusões.....                                                                                                                          | 57 |
| VII.  | Perspetivas Futuras.....                                                                                                                 | 59 |
| VIII. | Referências Bibliográficas .....                                                                                                         | 60 |

## Lista de abreviaturas

|                                      |                                                                           |
|--------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------|
| <b>ACh</b>                           | Acetilcolina                                                              |
| <b>ADO</b>                           | Adenosina                                                                 |
| <b>Ano1</b>                          | Anoctamina 1 (canal de cloro ativado pelo cálcio)                         |
| <b>ATP</b>                           | Adenosina 5'-Trifosfato                                                   |
| <b>AU</b>                            | Unidades Arbitrárias                                                      |
| <b>BSA</b>                           | Albumina Sérica Bovina                                                    |
| <b>c-Kit</b>                         | Recetor de células estaminais (SCF) ou CD117                              |
| <b>Ca<sup>2+</sup></b>               | Catião Cálcio                                                             |
| <b>[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub></b> | Concentração de Cálcio intracelular                                       |
| <b>Cl<sup>-</sup></b>                | Anião Cloro                                                               |
| <b>CO<sub>2</sub></b>                | Dióxido de Carbono                                                        |
| <b>FBS</b>                           | Soro Fetal Bovino                                                         |
| <b>FLC</b>                           | Células do Tipo-Fibroblasto                                               |
| <b>GFAP</b>                          | Proteína Glial Fibrilar Ácida                                             |
| <b>GI</b>                            | Gastrointestinal                                                          |
| <b>ICBAS/UP</b>                      | Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar da Universidade do Porto |
| <b>IC</b>                            | Células Intersticiais                                                     |
| <b>ICC</b>                           | Células Intersticiais de Cajal                                            |
| <b>ICC-CM</b>                        | Células Intersticiais de Cajal do Músculo Circular                        |
| <b>ICC-DMP</b>                       | Células Intersticiais de Cajal do Plexo Muscular Profundo                 |
| <b>ICC-LM</b>                        | Células Intersticiais de Cajal do Músculo Longitudinal                    |
| <b>ICC-MY/MP</b>                     | Células Intersticiais de Cajal Mioentéricas                               |
| <b>ICC-SM</b>                        | Células Intersticiais de Cajal da Submucosa                               |
| <b>ICC-SMP</b>                       | Células Intersticiais de Cajal do Plexo Submucoso                         |
| <b>ICC-SS</b>                        | Células Intersticiais de Cajal da Subserosa                               |
| <b>MFB</b>                           | Miofibroblastos                                                           |
| <b>mL</b>                            | Mililitros                                                                |
| <b>MP-LM</b>                         | Plexo Mioentérico – Músculo Longitudinal                                  |
| <b>N</b>                             | Número de experiências realizadas                                         |
| <b>Nm</b>                            | Nanómetros                                                                |
| <b>PBS</b>                           | Tampão Salino-Fosfato                                                     |
| <b>PDGFR<math>\alpha</math></b>      | Recetor $\alpha$ do Fator de crescimento Derivado das Plaquetas           |

|            |                                                                                                    |
|------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>PFA</b> | Paraformaldeído                                                                                    |
| <b>SCF</b> | Fator de Crescimento das Células Estaminais                                                        |
| <b>SK3</b> | Canal de K <sup>+</sup> ativado pelo Ca <sup>2+</sup> de pequena condutância (K <sub>Ca</sub> 2.3) |
| <b>SMA</b> | Actina do Músculo Liso                                                                             |
| <b>SMC</b> | Células Musculares Lisas                                                                           |
| <b>μM</b>  | Micrómetro                                                                                         |
| <b>Vim</b> | Vimentina                                                                                          |

## Lista de figuras

|                                                                                                                                              |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1 - Representação esquemática e imagem de imunohistoquímica dos diferentes componentes do plexo mioentérico do íleo de ratazana. .... | 2  |
| Figura 2 – Desenvolvimento e plasticidade das ICC .....                                                                                      | 4  |
| Figura 3 - Localização e designação das ICC nas diferentes porções e camadas do trato GI .....                                               | 6  |
| Figura 4 - Representação do sincício SIP .....                                                                                               | 7  |
| Figura 5 - Procedimento experimental usado na técnica de dissociação enzimática... ..                                                        | 20 |
| Figura 6 - Determinação da densidade celular.....                                                                                            | 21 |
| Figura 7 - Representação esquemática do processo de imunofluorescência indireta .                                                            | 22 |
| Figura 8 – Marcação dupla das IC presentes no íleo de ratazana com Ano1 e c-Kit... ..                                                        | 30 |
| Figura 9 – Marcação dupla dos subtipos de IC no íleo de ratazana com c-Kit e PDGFR $\alpha$ .....                                            | 31 |
| Figura 10 – Marcação dupla das IC presentes no MP-LM com Ano1 e c-Kit.....                                                                   | 32 |
| Figura 11 – Marcação dupla das IC presentes no MP-LM com c-Kit e PDGFR $\alpha$ .....                                                        | 34 |
| Figura 12 - Culturas celulares obtidas pela técnica do explante.....                                                                         | 35 |
| Figura 13 - Culturas celulares obtidas por digestão enzimática. ....                                                                         | 36 |
| Figura 14 - Aspeto morfológico da mesma cultura primária aos 3 (a), 7 (b) e 11 (c) dias .....                                                | 39 |
| Figura 15 – Marcação das IC resultantes de cultura primária com vimentina e actina $\alpha$ . .....                                          | 40 |
| Figura 16 – Marcação das IC resultante da subcultura com conexina 43, GFAP e c-Kit .....                                                     | 40 |
| Figura 17 – Marcação dupla das IC resultantes de cultura primária com Ano1 e c-Kit.. ..                                                      | 41 |

|                                                                                                                                     |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 18 – Marcação dupla das IC resultantes da cultura primária com Ano1 e vimentina. ....                                        | 42 |
| Figura 19 – Marcação dupla das IC resultantes da cultura primária com Ano1 e actina $\alpha$ .....                                  | 43 |
| Figura 20 – Marcação dupla das IC com vimentina e PDGFR $\alpha$ e marcação dupla SK3 e actina $\alpha$ . ....                      | 43 |
| Figura 21 – Oscilação dos níveis intracelulares de Ca <sup>2+</sup> numa subcultura de células de íleo de ratazana com 6 dias ..... | 45 |
| Figura 22 - Oscilação dos níveis intracelulares de Ca <sup>2+</sup> numa cultura primária de íleo de ratazana com 2 dias.....       | 46 |
| Figura 23 - Representação esquemática das características fenotípicas das culturas celulares primárias realizadas.....              | 54 |

## Lista de tabelas

|                                                                                                                                                                                                            |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 1 - Anticorpos primários utilizados na marcação por imunofluorescência indireta de células e nas preparações de plexo mioentérico- músculo longitudinal (MP-LM) e cortes transversais de íleo. .... | 23 |
| Tabela 2 - Anticorpos secundários usados nas marcações por imunofluorescência indireta.....                                                                                                                | 24 |
| Tabela 3 - Lasers usados na observação por imunofluorescência indireta. ....                                                                                                                               | 25 |
| Tabela 4 - Comparação da técnica do explante com a técnica de dissociação enzimática para obtenção de culturas de IC de íleo de ratazana. ....                                                             | 36 |



# I. INTRODUÇÃO

## 1. Sistema Nervoso Entérico

O Sistema Nervoso Entérico (SNE) é uma parte do sistema nervoso autónomo, formado por uma rede neuronal complexa que controla as funções motoras, o fluxo sanguíneo local, as secreções gastrointestinais e as funções de carácter imunológico e endócrino ao longo de todo o aparelho gastrointestinal (GI) [1].

Este sistema está organizado em dois grandes plexos: o plexo mioentérico (ou de Auerbach), que se localiza entre os músculos longitudinal e circular e o plexo submucoso (ou de Meissner), presente entre o músculo circular e a submucosa [2]. Para além de neurónios o SNE é constituído por células não neuronais tais como células da glia, células intersticiais de Cajal (ICC) e células do tipo-fibroblasto (FLC) [2].

### 1.1 Plexo mioentérico

O plexo mioentérico é responsável pelo peristaltismo GI, sendo constituído por uma vasta rede de nervos e gânglios localizados entre as camadas longitudinal e circular da túnica muscular externa [2]. Os gânglios do plexo mioentérico apresentam orientação, tamanhos e morfologias diferentes consoante as espécies e consoante a parte do intestino em que se situam. Sob o ponto de vista morfológico, o plexo mioentérico está organizado em três redes, com fibras de diferentes espessuras (Fig. 1). A rede primária é constituída pelos gânglios que contêm os corpos celulares dos neurónios mioentéricos e pelas fibras interganglionares; a rede secundária é formada por longos filamentos nervosos paralelos ao sentido das fibras musculares circulares e por último a rede terciária, correspondente às inúmeras ramificações das duas redes anteriores, representada por filamentos nervosos mais finos, que formam uma malha que ocupa o espaço existente entre as fibras mais espessas das restantes redes [2-4]. A maioria dos neurónios entéricos têm os corpos celulares no interior do plexo mioentérico e as varicosidades estão incorporadas na túnica muscular, onde os neurotransmissores excitatórios e inibitórios são libertados [5].

Estudos funcionais revelaram essencialmente a existência de neurónios sensitivos, interneurónios (orientados longitudinalmente no sentido oral e aboral), e neurónios motores inibitórios e excitatórios [1].

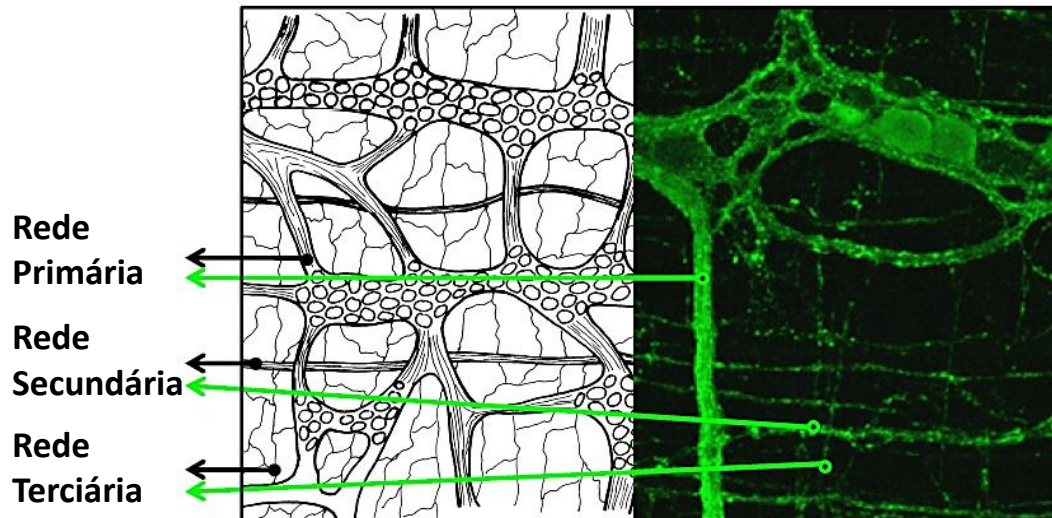


Figura 1 - Representação esquemática e imagem de imunohistoquímica dos diferentes componentes do plexo mioentérico do íleo de ratazana. Identificação da rede primária, secundária e terciária dos componentes do plexo mioentérico (Adaptada de [6]).

## 1.2 Neurotransmissão Entérica

A motilidade gastrointestinal depende da libertação de neurotransmissores dos neurónios motores entéricos. Tanto a acetilcolina (ACh) como a substância P são considerados neurotransmissores excitatórios, enquanto o monóxido de azoto (NO) e o péptido intestinal vasoativo (VIP) são neurotransmissores inibitórios [7]. De entre estes a ACh é o neurotransmissor mais eficaz, podendo a sua libertação ser modulada por diversas substâncias endógenas, como as purinas (ATP e adenosina). A ACh promove a contração do músculo liso intestinal via ativação de recetores muscarínicos, principalmente dos subtipos  $M_2$  e  $M_3$ .

Contudo, nos últimos anos este conceito sofreu algumas alterações, tendo surgido novos intervenientes que estabelecem relações muito próximas tanto com os terminais nervosos como com as células musculares lisas (SMC), formando um sincício. Neste sincício as células encontram-se associadas eletricamente através de junções estreitadas, mantendo um contacto tão próximo que pode ser inferior a 20 nm como já se demonstrou em estudos ultra-estruturais [8-10]. Neste cenário de sinapse tripartida,

são as células intersticiais que assumem o papel de geradoras de ritmicidade elétrica, às quais se atribui a capacidade de coordenar a propagação e a integração de diversos estímulos [11].

### 1.3 Células intersticiais de Cajal

As células intersticiais de Cajal (ICC) devem o seu nome ao neuroanatomista espanhol Santiago Ramón y Cajal [12], que as descreveu pela primeira vez como células nervosas, localizadas no final dos neurónios motores em órgãos inervados por nervos periféricos. Com base nas colorações disponíveis na época (1890) - como a coloração de Golgi (impregnação de prata) e a coloração com azul-de-metileno de Ehrlich, Cajal classificou estas células como neurónios primitivos [13, 14]. Após as primeiras descrições de Cajal, estas células foram identificadas usando diferentes nomenclaturas, até que Dogiel lhes deu o nome de "*Cajal'sche zellen*" - ou seja ICC, nome que prevalece mais de cem anos após a sua descoberta [14].

Quanto à função, o papel mais importante das ICC reside na regulação da motilidade, pois são consideradas como as "células marca-passo" do aparelho GI. São estas as células responsáveis pela (a) geração da atividade das ondas lentas nos músculos GI; (b) coordenação da propagação das ondas lentas; (c) mediação da neurotransmissão proveniente do SNE; (d) deteção da ocorrência de eventos mecânicos (como o estiramento) coordenando as respetivas respostas [14-18].

#### 1.3.1 Origem e desenvolvimento

Embora Cajal acreditasse que as ICC eram um tipo de neurónios primitivos, Taxi através da microscopia ótica e eletrónica, distinguiu estas células de neurónios, macrófagos e células de Schwann [13]. Apesar destas células serem distinguíveis de outros tipos celulares presentes na túnica muscular, o debate acerca da sua origem permanece atual.

Uma das hipóteses mais plausíveis quando se iniciaram os estudos era a sua proveniência da crista neural ou do mesenquima, uma vez que as ICC têm características comuns com células derivadas destes dois "tecidos" [19]. Hoje em dia, estudos de desenvolvimento demonstraram que as ICC têm origem mesodérmica [20]. Alguns investigadores indicam que as ICC são células musculares lisas primitivas ou especializadas [21], ao invés de outros que defendem que estas possuem

características ultra-estruturais de fibroblastos [22]. Este debate poderá nunca ser resolvido através da localização anatômica ou da análise ultra-estrutural, uma vez que as características morfológicas das ICC são partilhadas com uma grande variedade de células presentes na túnica muscular e a falta de reagentes específicos para marcar estas células nos tecidos GI torna esta tarefa ainda mais difícil.

Contudo, todos os autores concordam que a sinalização do recetor tirosina cinase Kit é crítica durante o último período gestacional e após o nascimento para o desenvolvimento e manutenção das populações de ICC. Células precursoras positivas para o c-Kit e que retenham a sua expressão levam ao desenvolvimento de ICC funcionais, enquanto células precursoras positivas para o c-Kit que não são sinalizadas por esta via, tornam-se SMC (Fig.2) [8, 14, 23].

Um facto interessante é que as ICC revelam um elevado grau de plasticidade, o que significa que a perda destas células em certos distúrbios não implica necessariamente a sua morte celular [24]. A transdiferenciação e a apoptose têm sido propostas como os mecanismos prováveis para o desaparecimento destas células. Alguns estudos revelam que as ICC se podem transdiferenciar em fibroblastos ou células musculares, que não expressam o Kit e estas células, por sua vez, podem novamente transdiferenciar-se em ICC que expressam o proto-oncogene Kit [14].

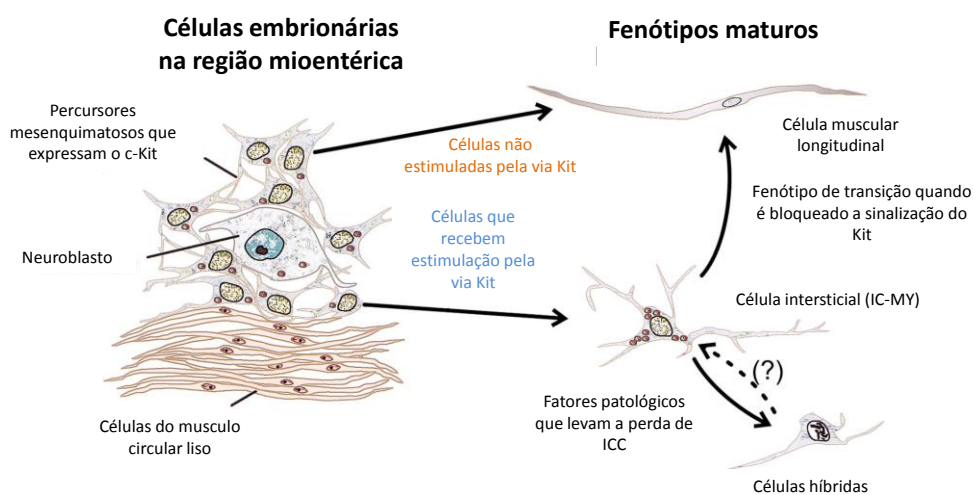


Figura 2 - Imagem representativa do desenvolvimento e plasticidade das ICC. Do lado esquerdo estão representadas as células mesenquimatosas que expressam o c-Kit a partir do 12º dia de gestação; os neuroblastos encontram-se muito próximos das células positivas para o Kit e expressam o SCF (o ligando do Kit), podendo fornecer uma sinalização precoce. As células do músculo circular liso que expressam o Kit, também são positivas para o SCF. Este processo ocorre em poucos dias em animais recém-nascidos, requerendo semanas em animais adultos (Adaptada de [13]).

### 1.3.2 Subtipos de ICC

Foram descritos vários tipos morfológicos de ICC baseado na sua localização anatômica (Fig. 3) [14]. No trato GI o primeiro grupo de ICC organizado está localizado na camada subserosa (ICC-SS), sendo composto por células estreladas mais ou menos dispersas [25]. Contudo a maioria das ICC encontra-se à volta do plexo mioentérico, sendo designadas de ICC-MY; ICC-MP ou ICC-AP (para o plexo de Auerbach's) [14, 26]. Estas células de aspeto estrelado têm prolongamentos múltiplos que se interligam formando uma rede à volta do plexo, no espaço entre as camadas de músculo circular e longitudinal [14, 27]. As células intersticiais de Cajal presentes no músculo circular (ICC-CM) são principalmente bipolares ou fusiformes, orientadas de acordo com o eixo maior das células musculares circundantes. Estas células não formam uma rede como as anteriores. No músculo longitudinal encontramos células intersticiais de Cajal do músculo longitudinal (ICC-LM). Estas são semelhantes às ICC-CM, mas são normalmente menos numerosas. Um termo coletivo para as ICC-LM e ICC-CM é células intersticiais de Cajal intramusculares (ICC-IM) [14, 25]. A última localização organizada de ICC depende do local do aparelho GI em causa: no estômago formam um agrupamento na submucosa que lhe valeu a designação de Células intersticiais de Cajal da submucosa (ICC-SM). No intestino delgado as células intersticiais de Cajal formam um plexo muscular profundo (ICC-DMP), constituído por células fusiformes que se dispõem numa camada fina que acompanha o músculo circular. Já no cólon as células multipolares formam associações muito próximas entre si e com os feixes nervosos do DMP, constituindo as células intersticiais de Cajal do plexo submucoso (ICC-SMP). Estas células encontram-se na submucosa e no plexo submucoso, na interface entre o tecido conjuntivo submucoso e a camada mais interna do músculo circular [14, 25].

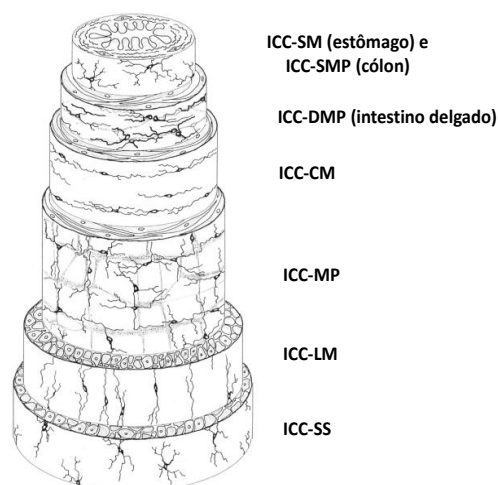


Figura 3 - Representação esquemática da localização e designação das ICC nas diferentes porções e camadas do trato GI. (Adaptada de [25]).

### 1.3.3 Células do tipo-fibroblasto

Como dito anteriormente, as ICC atuam como intermediárias dos estímulos excitatórios e inibitórios provenientes dos neurónios entéricos para as SMC, via junções estreitadas (*gap junctions*). [28]. Recentemente, têm surgido mais estudos acerca das células do tipo-fibroblasto (FLC) mesenquimatosas. Estas localizam-se paralelamente às ICC e apresentam várias características morfológicas semelhantes a fibroblastos do tecido conjuntivo. Tal como nas ICC, as FLC estão localizadas à volta dos neurónios entéricos e estão ligadas às SMC por junções estreitadas [22, 29]. Adicionalmente, sabe-se que toda a sinalização é provavelmente integrada pelas ICC e por estas células antes de serem transmitidas às fibras musculares lisas [28, 29].

As FLC têm características ultra-estruturais distintas das ICC, nomeadamente, o citoplasma tem moderada a elevada densidade eletrónica e o retículo endoplasmático rugoso é bem desenvolvido [30]. As FLC têm imunoreatividade para o recetor do fator de crescimento  $\alpha$  derivado das plaquetas (PDGFR $\alpha$ ) e para o canal de potássio de pequena condutância ativado pelo cálcio (SK $_3$ ), mas não apresentam imunoreatividade para o c-Kit [29, 31]. O PDGFR $\alpha$  é considerado o marcador específico das FLC. Este é um recetor tirosina quinase do tipo III, estruturalmente similar ao c-Kit que é expresso em diversos órgãos, bem como no trato GI [31, 32]. Durante o desenvolvimento dos mamíferos os sinais PDGFR $\alpha$  positivos são cruciais para a organogénese. Na morfogénese das vilosidades do intestino delgado de rato,

as células mesenquimatosas subjacentes às células epiteliais expressam este marcador e recebem o ligando PDGF-A das células epiteliais. Na musculatura GI, as células mesenquimatosas, precursoras das ICC e das SMC, também expressam o PDGFR $\alpha$  [33]. Até 2014, grande parte da discussão das células intersticiais (IC) girava em torno das ICC, contudo hoje em dia reconheceu-se a existência de uma segunda população de IC que partilham o mesmo espaço anatómico que as ICC. Esta segunda classe de células, formalmente referidas na literatura como FLC, são positivas para o PDGFR $\alpha$  e para o SK3 [29, 34-36].

“Células intersticiais” é então uma designação morfológica que representa um conjunto de células que ocupam espaços dentro de um interstício, mas que têm origens e fenótipos diferentes. Nos tecidos musculares lisos, por exemplo, para além das ICC e das células positivas para o PDGFR $\alpha$ , os fibroblastos, mastócitos e macrófagos também podem ter esta designação [11]. Neste contexto surgiu recentemente o conceito de sincício SIP (Fig.4), constituído pelas IC e pelas SMC que se encontram acopladas eletricamente às IC [11, 37]. Embora a atividade deste sincício seja altamente integrada nos órgãos GI, o acoplamento elétrico entre as células SIP faz com que seja muito difícil deduzir as funções específicas de cada um dos componentes. Estudos em animais *knockout* podem ajudar a estudar elementos específicos do sincício SIP, mas continua a ser difícil determinar as funções específicas de cada um dos componentes celulares [37].

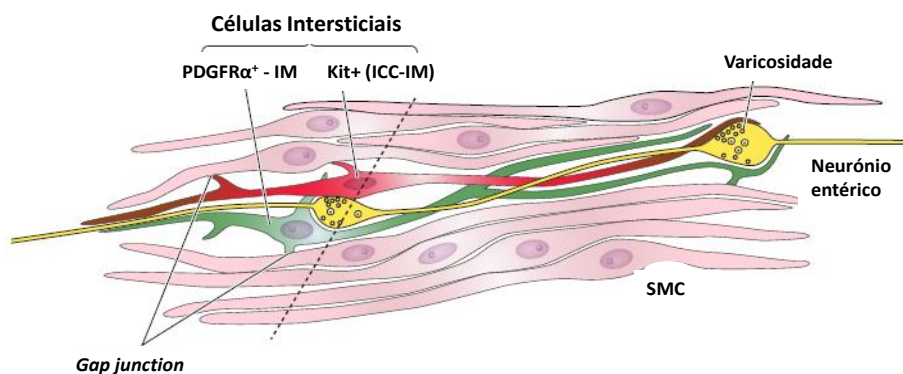


Figura 4 - Representação do sincício SIP. As SMC, ICC e células positivas para o PDGFR $\alpha$  encontram-se organizadas em torno dos prolongamentos dos neurónios entéricos motores excitatórios e inibitórios (Adaptada de [11]).

Nos últimos anos os anatomistas têm especulado sobre o papel das FLC nas SMC, mas pouco se sabe sobre o seu envolvimento na fisiologia ou patologia GI, uma vez que ainda não foi encontrado nenhum método eficiente para as isolar e estudar [30].

### 1.3.4 Características morfológicas

De uma forma geral, as ICC têm uma forma triangular ou estrelada e apresentam um núcleo de grandes dimensões, pouco citoplasma e normalmente, dois a três prolongamentos originários do corpo celular. Apresentam uma elevada quantidade de mitocôndrias e caveolinas. Uma característica morfológica particular das ICC é a ocorrência de grandes bifurcações triangulares “nos pontos de junção”. Estas células são frequentemente encontradas próximas das SMC, com os prolongamentos a terminarem sobre elas [17, 38].

As células intersticiais de Cajal do plexo muscular profundo são alongadas e com a mesma orientação que as células do músculo circular. Têm um núcleo oval e o seu citoplasma é menos denso do que o das SMC. O aparelho de Golgi e o retículo endoplasmático liso estão principalmente localizados na região perinuclear. Uma característica importante é a abundância/riqueza em mitocôndrias. Estas são observadas no citoplasma perinuclear e nos prolongamentos celulares. Nestes prolongamentos também existe a presença de microtúbulos e filamentos intermédios. As FLC-DMP não apresentam lâmina basal nem caveolinas e formam poucas junções estreitadas com as SMC, contrariamente ao que se passa com as ICC-DMP.

As células intersticiais de Cajal do plexo mioentérico são caracterizadas por um citoplasma menos denso e elevada quantidade de mitocôndrias, mas ao contrário das ICC-DMP, não possuem lâmina basal nem caveolinas. As FLC presentes nesta região também não possuem lâmina basal ou caveolinas, mas possuem um retículo endoplasmático e um complexo de Golgi bem desenvolvido. Estas formam pequenas junções estreitadas entre elas e com as células do músculo liso circular e longitudinal [39].

### 1.3.5 Marcadores moleculares e a sua importância

Provavelmente a descoberta mais importante na identificação das ICC surgiu quando foi reconhecido que são células que expressam o c-Kit, um proto-oncogene que codifica o recetor tirosina cinase, Kit [8, 13, 16]. O Kit é uma proteína transmembranar com um recetor extracelular e um domínio tirosina cinase intracelular. O seu ligando, o fator de crescimento das células estaminais (SCF) é produzido pelas SMC e pelos neurónios e leva à ativação da tirosina cinase [40]. O SCF pode ser expresso de duas

formas: ligado à membrana ou na forma solúvel, sendo que o primeiro é fundamental em culturas de ICC, pois na sua ausência as ICC-MY não se desenvolvem corretamente [8, 41].

A descoberta do c-Kit foi ainda mais importante na determinação, por imunohistoquímica, do estado das ICC numa variedade de distúrbios da motilidade GI. Outra descoberta marcante foi a constatação de que a sinalização via recetores Kit na célula é essencial para o desenvolvimento, proliferação, diferenciação e função das ICC, bem como para a manutenção do seu fenótipo durante o período fetal e neonatal [16, 23, 40]. Se se bloquear a função do Kit em ratazanas e em ratos impede-se o desenvolvimento correto das ICC e da sua atividade marca-passo; muitos estudos demonstraram que animais portadores de mutações não letais no c-Kit ou no SCF apresentam defeitos nas redes de ICC [13, 26, 40]. Os efeitos da sinalização do Kit em ICC maduras continuam desconhecidos, embora estas células continuem a expressar o gene c-Kit e o seu produto [40].

Recentemente, um novo avanço permitiu uma identificação mais específica das IC. Farrugia e colaboradores demonstraram que as ICC entéricas expressam o produto do gene *Tmem16a*, a anoctamina 1 (*Ano1*), um canal de  $Cl^-$  ativado pelo  $Ca^{2+}$  que está envolvido na atividade marca-passo destas células [42]. Contrariamente ao Kit, este marcador não é expresso por outros tipos de células, nomeadamente mastócitos, fornecendo, assim, uma marcação mais específica [20, 43].

Para além destes dois marcadores principais, as ICC (todas ou alguns subtipos) expressam conexina 43 [44], actina  $\alpha$  [40, 45], motilina [17], vimentina [45-47], CD34 [48], o canal de potássio, SK3 [49], recetores muscarínicos  $M_2$  e  $M_3$  [15, 50, 51], recetores para as neuroquininas  $NK_1$  e  $NK_3$  [52, 53], recetores inibitórios VIP-1 e VIP-2 [15], recetores purinérgicos  $P2Y_1$ ,  $P2Y_4$ ,  $P2X_2$  e  $P2X_5$  [54, 55] e recetores da serotonina 5-HT, 5-HT<sub>3</sub> e 5-HT<sub>4</sub> [56].

De entre os recetores expressos nas células intersticiais suscita-nos particular curiosidade os recetores muscarínicos  $M_3$ , pois trabalhos realizados no Laboratório de Farmacologia e Neurobiologia do ICBAS demonstraram que a ACh libertada pelos neurónios mioentéricos excitatórios é capaz de modular positivamente a sua própria libertação através da ativação de recetores muscarínicos do subtipo  $M_3$ , que levam à acumulação extracelular de adenosina e, subsequentemente, à ativação pré-sináptica de recetores  $A_{2A}$  facilitatórios [57]. Estudos funcionais sugerem que as IC podem estar

envolvidas neste mecanismo regulador da neurotransmissão mioentérica. Surgiu assim a necessidade de investigar o papel das IC na transmissão sináptica mioentérica, criando para tal uma cultura de células intersticiais de ratazana que permita responder a algumas das questões que se colocam.

### 1.3.6 Relevância clínica

Desde o reconhecimento que as ICC desempenham um papel crítico na motilidade gastrointestinal, muitas associações patológicas entre estas células e a dismotilidade têm sido reportadas em todas as regiões do intestino [58]. Interpretar o significado funcional destes distúrbios não é fácil, visto que outros tipos celulares, como neurónios entéricos, também são afetados em muitas destas condições. Constata-se contudo uma elevada associação entre a perda de ICC e a perda de neurónios entéricos em distúrbios de motilidade [27].

Há uma grande variedade de distúrbios de motilidade que envolvem as ICC, tais como gastroparesia diabética, colite ulcerosa, doença de Crohn, apendicite, obstipação, atresia intestinal e enteropatia [59]. Os importantes papéis fisiológicos das ICC, também sugerem a possibilidade de um papel causal para a perda de ICC em alguns distúrbios motores. Relativamente ao modelo da diabetes, a perda de mais de 50% das ICC não parece afetar nenhum parâmetro da atividade das ondas lentas, sugerindo que a rede de células marca-passo pode resistir a uma redução acentuada da sua densidade. Para além disso, estas células formam uma rede intrínseca com células PDGFR $\alpha$  positivas, e esta rede está por sua vez ligada às SMC. Assim, uma disfunção das ICC pode estar relacionada com a perda de ligação entre estes três tipos celulares, ou a uma lesão dos mesmos [24].

Em suma, o trabalho para a compreensão do papel das ICC nos processos fisiológicos básicos providenciou novos conhecimentos que aumentam as hipóteses de se perceber a fisiopatologia GI, e eventualmente, contribuir para a sua resolução [26].

## 1.4 Culturas celulares

As culturas celulares iniciaram-se no princípio do século XX com Harrison, em 1907, e Carrel, em 1912. Por definição, culturas celulares são células animais ou vegetais, isoladas de tecidos vivos, que podem continuar a crescer *in vitro* se os nutrientes e

todos os outros fatores necessários à sua sobrevivência, crescimento e proliferação forem corretamente fornecidos. As células em cultura são um modelo de função biológica muito contraditório, devido à perda de características que ocorre durante o seu desenvolvimento. Contudo esta técnica apresenta inúmeras vantagens ao permitir o controlo das condições ambientais; a possibilidade de estudar fenómenos inacessíveis em tecidos intatos; conhecimento do comportamento e função de uma população isolada de células; análise independente de diferentes parâmetros; o elevado número de ensaios num reduzido intervalo de tempo e a diminuição do número de animais nos ensaios experimentais, tornando-se assim uma alternativa menos dispendiosa e em conformidade com as atuais regras de bem-estar aplicáveis a animais de laboratório [60].

#### 1.4.1 Tipos de culturas celulares

As culturas celulares podem ser divididas em dois tipos: primárias e contínuas. As culturas primárias e subculturas iniciais, são constituídas por células isoladas a partir de animais ou vegetais. Estas são culturas celulares heterogêneas, podendo encontrar-se mais do que um tipo de células em estádios de diferenciação distintos. A cultura primária permite um pequeno número de divisões (ou passagens) celulares, após as quais entram em estado de senescência e morrem. As culturas primárias requerem meios de cultura complexos, sendo um processo trabalhoso até se conseguir padronizar. No entanto, neste tipo de cultura há menor probabilidade de ocorrerem alterações fenotípicas, bem como alterações do envelhecimento celular, sendo estas células mais representativas do tecido de origem [60].

Culturas contínuas ou permanentes são constituídas por um único tipo de células que se propagam em série, num número limitado de divisões celulares (aproximadamente trinta). Por outro lado, existe um grupo das células que se propaga indefinidamente e possui esta capacidade devido ao facto de terem sido transformadas em células tumorais (linhas imortalizadas). Esta transformação pode ser induzida pela introdução de oncogenes virais ou tratamentos químicos. Estas células por serem mais homogêneas e mais estáveis são mais reprodutíveis que as populações de células primárias [60].

### 1.4.2 Método de obtenção de culturas primárias

A obtenção de culturas primárias de células é essencialmente realizada por duas técnicas distintas, a técnica do explante e a técnica da dissociação enzimática.

Relativamente à técnica do explante, as culturas primárias são obtidas pela recolha cirúrgica de tecido, posteriormente dissociado em pequenos fragmentos que são colocados numa caixa de cultura (plástico ou vidro), imerso em meio de cultura adequado. Alguns dias após, as células começam a migrar dos pedaços de tecido até atingirem a confluência [61].

A dissociação enzimática é, atualmente, a técnica mais utilizada. Este processo difere da técnica anterior pelo recurso a enzimas digestivas proteolíticas, como a tripsina e a colagenase, que clivam a ligação entre as células, obtendo-se assim uma suspensão celular. A colagenase é uma enzima que degrada a molécula da matriz mais abundante nas células, o colagénio, diferindo assim da tripsina que é uma proteína que age inespecificamente em proteínas, clivando-as [62]. O uso de proteases é a grande desvantagem desta técnica, pois estas podem apresentar efeitos de toxicidade nas células, removendo proteínas da superfície celular, comprometendo a viabilidade das células. A principal vantagem é o elevado número de células que se consegue obter, num curto período de tempo [61].

Quando as células das culturas primárias atingem a confluência, podem sofrer novamente uma dissociação enzimática, com recurso a enzimas que promovem uma dissociação suave das células entre si e o substrato. A enzima proteolítica inespecífica mais utilizada é a tripsina, que hidrolisa cadeias polipeptídicas nos radicais lisil-arginil formando terminações de clivagem éster e amida. Esta, por ser inespecífica, não deve ficar muito tempo em contato com as células para não ocorrer lise celular. As células são, posteriormente, colocadas em subcultura [61, 62].

### 1.4.3 Condições e avaliação das culturas

Os meios nutritivos (meios de cultura) utilizados para as culturas de células fornecem as substâncias essenciais para o crescimento, controlo e manutenção das culturas, tornando-se assim o fator complexo mais importante. O meio de cultura é uma solução constituída essencialmente por sais minerais, hidratos de carbono, aminoácidos,

vitaminas, proteínas, péptidos, lípidos e ácidos gordos. As condições a que a cultura está sujeita devem ser fisiológica e bioquimicamente semelhantes às que as células ostentam *in vivo*, para a obtenção de um maior número de células *in vitro*. A temperatura, humidade, pH também devem ser semelhantes ao encontrado no tecido de origem. Para tal mantem-se as culturas em incubadoras, à temperatura de 37 °C, humidade entre 90 a 98% e CO<sub>2</sub> entre 2 a 10% [60, 63].

As células *in vitro* necessitam de uma base de suporte que é fornecido pelo plástico ou vidro das caixas de cultura. No entanto, estes suportes muitas vezes não são suficientes e é necessário adicionar fatores de adesão, como o colagénio, gelatina, fibronectina, laminina e poli-D-lisina, que permitem uma melhor adesão das células e um melhor crescimento e proliferação das mesmas. Nas culturas de ICC utilizou-se o colagénio como revestimento das caixas de cultura [63].

Para o crescimento e proliferação celulares é necessário que as células produzam energia e proteínas, essenciais para o seu metabolismo. Para tal é importante suplementar a cultura com fatores de crescimento e hormonas. Também o soro animal é muitas vezes adicionado diretamente ao meio de cultura para o compensar nutricionalmente [64].

A avaliação do desempenho de uma cultura celular é geralmente baseada em quatro características celulares importantes: morfologia, crescimento celular, expressão de funções especiais e eficácia da cultura [61]. A morfologia é um dos parâmetros mais fáceis de determinar. O primeiro sinal de que algo não está bem na cultura celular ocorre quando, ao serem examinadas ao microscópio ótico, as células apresentam padrões de adesão fracos e uma reduzida taxa de crescimento.

Para estimar a taxa de crescimento recorre-se a um contador de partículas eletrónico ou à câmara de *Neubauer* em que, com o auxílio de um corante vital (as células mortas incorporam o corante) se faz uma avaliação da viabilidade celular.

A expressão funcional das células é difícil de observar, pelo que testes bioquímicos e imunológicos podem ser utilizados para a sua determinação.

A eficácia da cultura é calculada pelo número de colónias de células presentes nas caixas de cultura. A percentagem da colónia indica a sobrevivência celular, enquanto o tamanho das colónias referem-se à taxa de crescimento [61, 63].

#### 1.4.4 Contaminação nas culturas celulares

A manutenção da assepsia em cultura é uma questão central para a viabilidade da mesma. Contudo, a contaminação pode surgir devido quer a fatores químicos quer a biológicos. Bactérias, fungos e leveduras são os principais contaminantes biológicos das culturas celulares, que causam danos irreversíveis nas células, sendo por isso mais fáceis de detetar. Contudo, a contaminação biológica por micoplasmas ou vírus, bem como os contaminantes químicos que não são visualmente detetáveis, requerem métodos de deteção específicos [61].

O primeiro passo para detetar contaminação bacteriana ou fúngica consiste na observação macroscópica e microscópica. Uma vez detetada a contaminação todos os reagentes e soros utilizados na cultura de células, bem como a própria cultura têm que ser destruídos com hipoclorito de sódio e, posteriormente, descartados [61].

Algumas práticas devem ser seguidas para evitar as contaminações, devendo o investigador possuir prática em culturas celulares e todo o equipamento, material e reagentes deve ser mantido em condições assépticas. A utilização prolongada de antibióticos e antimicóticos podem mascarar a presença de microrganismos, levando ao desenvolvimento de estirpes mais resistentes. Por este motivo é importante avaliar periodicamente a presença de contaminação com o auxílio do microscópio ótico [65].

#### 1.4.5 Comportamento das ICC em cultura celular

Uma análise minuciosa da literatura revelou que, a maioria dos estudos em ICC são realizados em tecido e não utilizam as culturas celulares como modelo de estudo. Assim, pouco se sabe sobre o comportamento destas células em cultura, uma vez que estas alteram rapidamente o seu fenótipo e perdem a automaticidade, tornando-se SMC [15, 42]. À medida que a cultura avança aumenta, simultaneamente, a expressão de genes presentes nas células musculares [26]. Estudos que contribuam para caracterizar as diferenças das ICC são escassos, provavelmente devido à dificuldade em identificar estas células quer em cultura quer dispersas dos músculos GI [15]. Contudo, tem havido alguma preferência pelas culturas de ICC, uma vez que na dissociação fresca estas tornam-se muito difíceis de identificar devido ao predomínio das células musculares [66]. Para tentar resolver alguns destes problemas foi criado recentemente um novo modelo animal de ratos *knockin* que expressam a proteína

verde fluorescente (GFP) nas ICC, (GFP-Kit) [67], tornando a identificação das ICC mais simples [42].

O procedimento para a obtenção de culturas de ICC está descrito maioritariamente para rato (*Mus musculus*), contudo noutras espécies, como coelho, porquinho da índia e humano consegue encontrar-se alguma bibliografia com a descrição da metodologia utilizada [15, 17, 18, 23, 68]. A grande lacuna surge, assim, quando a espécie-alvo é a ratazana (*Ratus norvegicus*) onde à exceção de um procedimento para a obtenção destas células na bexiga [69], não existe mais nenhuma metodologia disponível. Os procedimentos usados para a obtenção de culturas primárias de ICC não variam muito entre si, sendo a técnica de dissociação enzimática a mais frequentemente utilizada. A composição da solução de digestão também é semelhante nas várias metodologias. Relativamente à idade dos animais, parece haver um consenso entre todos os autores para a utilização de animais recém-nascidos ou jovens com 4 a 15 dias de vida [18, 66, 69, 70].

## II. OBJETIVOS

Apesar da justaposição entre os neurónios entéricos, as ICC e as SMC, pouco se sabe acerca do papel neuromodulador das ICC na transmissão neuromuscular. Assim, o presente estudo teve como principal objetivo conseguir um protocolo original de culturas de Células Intersticiais (CI) de intestino delgado de ratazana, para poder mais tarde avaliar a sua fisiologia e o seu papel na sinapse tripartida. Assim, o primeiro objetivo deste trabalho foi encontrar a melhor forma de isolar, cultivar e fazer crescer ICCs obtidas a partir do intestino delgado de ratazanas. Esperava-se que esta metodologia permitisse obter um protocolo eficaz para conseguir culturas celulares com uma população enriquecida em IC.

De seguida realizou-se uma tentativa para caracterizar fenotipicamente as culturas celulares obtidas, recorrendo-se a técnicas de imunocitoquímica. Alguns dos anticorpos usados são pouco específicos (como a vimentina ou a actina  $\alpha$ ), mas outros permitiram distinguir IC (c-Kit e Ano1) e os seus subtipos (PDGFR $\alpha$ , SK3). Como muitos destes anticorpos não foram devidamente testados em ratazana e não se sabia se seriam capazes de marcar as populações celulares pretendidas, foram realizadas experiências de imunofluorescência indireta em cortes transversais de íleo de ratazana (onde se avaliou a localização anatómica da população em estudo) e em preparações de plexo mioentérico – músculo longitudinal (PM-ML) para conhecer melhor a morfologia celular e as interações entre células marcadas.

Tendo-se obtido um protocolo que permitiu a obtenção de culturas celulares enriquecidas em IC, foi necessário caracterizar estas populações celulares presentes na cultura do ponto de vista funcional. Recorreu-se, assim, à realização de ensaios que permitiram avaliar a resposta das células à ACh e ao ATP, observando a dinâmica do  $[Ca^{2+}]_i$  em células vivas marcadas com sonda fluorescente (Fluo4-NW) por microscopia confocal.

## III. MATERIAL E MÉTODOS

### 3. Culturas celulares

#### 3.1 Preparação da amostra biológica - Isolamento do intestino delgado de ratazanas jovens

Para o procedimento experimental utilizaram-se preparações de intestino delgado (íleo e jejuno) de ratazanas da estirpe Wistar (Biotério do ICBAS-UP, Porto, Portugal), de ambos os sexos, com idade entre os 8 e 15 dias. Estes animais foram mantidos no intervalo térmico ótimo para a espécie (20-24 °C), com humidade entre os 40 e os 60% e com períodos alternados luminosidade/obscuridade de 12 horas. Tiveram acesso a comida e água *ad libitum*. As ratazanas foram sacrificadas por decapitação com guilhotina (Sistema Stolting 51330). A manipulação animal e os procedimentos experimentais decorreram de acordo com as orientações definidas pela entidade responsável em Portugal, a DGAV (Direção Geral de Agricultura e Veterinária), segundo o disposto no decreto-lei nº 113 de 7 de agosto de 2013, referente à proteção dos animais para fins experimentais.

Após realizar a assepsia da região abdominal com álcool a 70° com material esterilizado, foi realizada uma incisão de aproximadamente 2 cm de comprimento ao longo da linha média. O cego do animal foi identificado e o intestino delgado da região peri-cecal exteriorizado. Foi excisada uma seção proximal ao cego com aproximadamente 10 cm de comprimento; o último centímetro foi excluído da preparação de trabalho para evitar a região da válvula ileo-cecal. De seguida, procedeu-se ao esvaziamento do conteúdo intestinal com o auxílio de uma seringa contendo solução de Tyrode (mM: NaCl 137; KCl 2,7; CaCl<sub>2</sub> 1,8; MgCl<sub>2</sub> 1; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,4; NaHCO<sub>3</sub> 11,9 e glucose 11,2) esterilizada e refrigerada [38]. O tecido foi então submetido a um processo de descontaminação, que consistia na instilação através do lúmen intestinal de meio de cultura (M119) refrigerado com uma elevada concentração de fármacos com atividade antifúngica e antibiótica (AB10x), nomeadamente 25 µg/mL de anfotericina B (250µg//mL, Sigma), 1000 IU/mL de penicilina e 1000 µg/mL de estreptomina (Solução penicilina – estreptomina a 10000 IU/MI – 10000 µg/mL, Sigma) e 50 µg/mL de gentamicina (Sigma). O tecido era de seguida imerso numa solução AB10x, durante 30 minutos.

### 3.1.1 Cultura de células - técnica do explante

Após a descontaminação, o tecido foi manipulado na câmara de fluxo laminar. O intestino foi colocado numa placa de *Petri* revestida com *Sylgard*® para facilitar a sua seção ao longo do seu eixo maior para expor a mucosa. Com o auxílio de zaragatoas estéreis, a mucosa era destacada da muscular externa, sendo de seguida essa preparação novamente colocada na solução AB10x durante aproximadamente 15 minutos. Após esse período, o tecido era cortado em pequenos fragmentos (~2-3 mm<sup>2</sup>) que foram uniformemente distribuídos em caixas de cultura de 35 mm (Costar®). As caixas de cultura foram previamente revestidas com colagénio (Sigma), um fator de adesão celular, que provou ser melhor do que o revestimento com gelatina a 2% em H<sub>2</sub>O (Sigma) preconizado por alguns autores. As placas revestidas com colagénio foram preparadas no dia anterior ao da cultura, ficando a secar dentro da incubadora a 37 °C.

Às caixas de cultura com os fragmentos de tecido foi adicionado meio de cultura M199 (Sigma), suplementado com o fator de crescimento das células estaminais (SCF, 5ng/mL Sigma), soro fetal bovino (FBS a 10%, Sigma), D-valina (1%, Sigma), 3,75 µg/mL de anfotericina B (250 µg/mL, Sigma), 150 IU/mL de penicilina, 150 µg/mL de estreptomicina (Solução penicilina - estreptomicina a 10000 IU/mL – 10000 µg/mL, Sigma) e 50 µg/mL de gentamicina (Sigma). As culturas foram incubadas a 37 °C, numa atmosfera húmida contendo 5% de CO<sub>2</sub>.

A migração celular a partir dos fragmentos de tecido foi observada 6 a 8 dias após o início das culturas primárias, sendo os fragmentos de tecido removidos nesta fase. As células foram mantidas nas condições acima mencionadas.

### 3.1.2 Cultura de células - técnica de dissociação enzimática

Neste tipo de cultura foram realizados dois protocolos diferentes: **protocolo A** e **protocolo B**.

**Protocolo A** (adaptado de [23]): O tecido foi preparado como descrito para a técnica do explante mas, antes de retirar a mucosa sujeitava-se o tecido a uma série de três imersões em solução AB10x, cada uma com a duração de 30 minutos (Fig. 5). Após

retirar-se a mucosa (Fig. 5), o tecido foi sujeito a dissociação mecânica com auxílio de uma tesoura, resultando em fragmentos muito pequenos. Posteriormente, os fragmentos foram colocados a 37 °C, durante 40 a 60 minutos, numa solução de digestão composta por: 1,3 mg/mL colagenase do tipo II (Sigma); 2,0 mg/ml albumina sérica bovina (BSA) (Sigma); 2,0 mg/ml inibidor da tripsina (Sigma) e 0,27 mg/ml ATP (Sigma) em M199. De seguida, a mistura foi agitada três vezes, de 3 em 3 minutos, para se obter uma suspensão mais ou menos homogénea. A mistura que daí resultava era centrifugada 5 minutos a 1000 rpm e depois de desperdiçar o sobrenadante o *pellet* era ressuspendido em M199 (Sigma) suplementado com SCF (5ng/mL Sigma), 10% FBS (Sigma), 1% D-valina (Sigma), 3,75 µg/mL de anfotericina B (250 µg/mL, Sigma), 150 IU/mL de penicilina, 150 µg/mL de estreptomicina (Solução penicilina - estreptomicina a 10000 IU/mL – 10000 µg/mL, Sigma) e 50 µg/mL de gentamicina (Sigma). A suspensão obtida era filtrada através de um crivo com o auxílio de uma seringa e distribuída em placas de 35mm (Costar®) ou em placas *chamber-slide* (Nunc®), previamente revestidas com colagénio.

**Protocolo B** (adaptado de [71] e [66]): O tecido foi preparado como descrito para a técnica do explante e, já sem a mucosa, foi cortado em pequenos fragmentos sendo de seguida equilibrado numa solução refrigerada de Hank's sem  $\text{Ca}^{2+}$  contendo (mM): KCl 5,36; NaOH 0,34; NaCl 125;  $\text{NaHCO}_3$  0,44; glucose 10; sucrose 2,9 e Hepes 11 a pH 7,2 durante 15 minutos [66]. Os fragmentos foram depois transferidos para a solução de digestão durante 25 minutos a 37°C, sem agitação (Fig. 5). A solução de digestão era constituída por solução de Hanks sem  $\text{Ca}^{2+}$  à qual se adicionou 2 mg/mL de inibidor da tripsina (Sigma), 2 mg/mL de BSA (Sigma), 0,27 mg/mL de ATP (Sigma) e colagenase do tipo II. Foram testadas colagenases do tipo II de várias origens (Sigma e Worthington) com diferentes concentrações (0,65 mg/mL e 1,3 mg/mL), tendo no final do período de otimização do protocolo sido selecionada a enzima da Worthington, a 0,65 mg/mL. Após três a quatro lavagens com solução de Hank's sem  $\text{Ca}^{2+}$  para remover eventuais restos da solução de digestão, os fragmentos foram sujeitos a dissociação mecânica com auxílio de uma micropipeta com pontas de diâmetro cada vez menor (Fig. 5). A suspensão celular obtida foi distribuída por placas de cultura adequadas à técnica a que se destinavam (caixas de 35 mm (Costar®), *chamber slide* (Nunc®) ou Fluoro Dish™), previamente revestidas com colagénio. O meio de cultura utilizado neste tipo de culturas foi o M199 (Sigma), suplementado com SCF (5ng/mL, Sigma), 10% FBS (Sigma), 1% D-valina (Sigma), 3,75µg/mL de anfotericina B (250 µg/mL, Sigma), 150 IU/mL de penicilina, 150 µg/mL de

estreptomicina (Solução penicilina - estreptomicina a 10000 IU/mL – 10000 µg/mL, Sigma) e 50 µg/mL de gentamicina (Sigma). As culturas foram incubadas a 37 °C, numa atmosfera húmida contendo 5% de CO<sub>2</sub>.

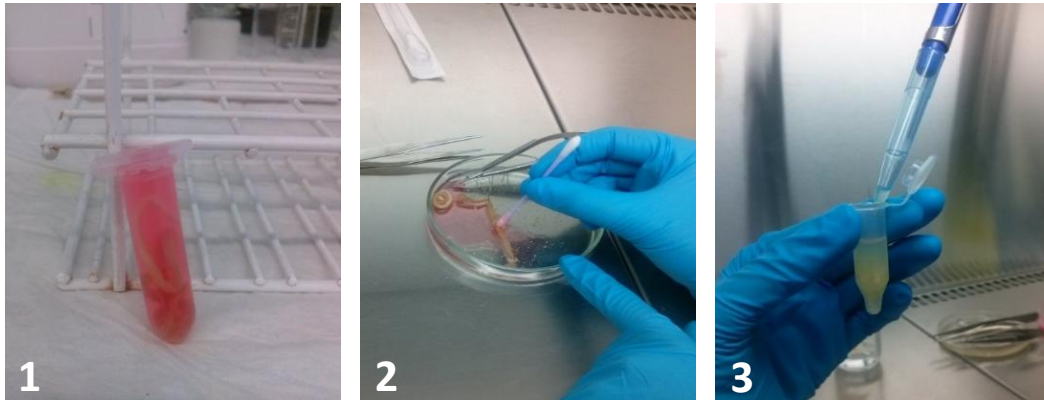


Figura 5 - Procedimento experimental usado na técnica de dissociação enzimática. 1 – Após se retirar o intestino delgado, este passa por um processo de descontaminação em AB10x; 2 – Processo de retirar a mucosa com o auxílio de uma zaragatoa. 3 – O tecido fragmentado é colocado na solução de digestão durante 30 minutos, sendo depois sujeito a dissociação mecânica com a ajuda de uma micropipeta.

### 3.2 Manutenção das culturas

Após colocação do tecido/suspensão celular nas placas de cultura foi adicionado meio M199 suplementado com SCF, BSA e os antifúngicos/antibióticos anteriormente referidos. As culturas eram mantidas na incubadora (37 °C a 5% de CO<sub>2</sub>) até os momentos de mudança de meio (M199 suplementado). As culturas foram monitorizadas recorrendo a um microscópio invertido de contraste de fase (Olympus CK2).

Relativamente às culturas celulares obtidas pela técnica do explante, a primeira mudança de meio era realizada 6 a 7 dias após o início da cultura primária. As posteriores mudanças de meio ocorreram em intervalos de 2 a 3 dias. No que diz respeito a culturas obtidas pela técnica da dissociação enzimática, 24h após a realização da cultura metade do meio era mudado. Subsequentemente, o meio de cultura foi mudado em intervalos de 2 a 3 dias.

### 3.3 Tripsinização das células

Quando as culturas celulares atingiam a confluência, procedia-se à sua tripsinização. O meio de cultura era removido das caixas e as culturas lavadas com tampão salino-fosfato (PBS) estéril, previamente aquecido a 37 °C; este procedimento era repetido duas vezes para garantir a eliminação do meio de cultura ainda presente nas caixas. As células aderentes eram isoladas enzimaticamente [recorrendo a uma solução de tripsina a 0,04 % (Sigma), pH 7,4 e colagenase a 0,025 % (Sigma) em PBS], durante 10 a 15 minutos; a reação de tripsinização era interrompida pela adição de meio de cultura fresco. A densidade celular de cada suspensão foi determinada numa câmara de *Neubauer* (Fig. 6: 1, 2 e 3), recorrendo a um corante vital, o azul de tripano (Sigma), que permite a distinção entre células viáveis (que não incorporam o corante) e células não viáveis (que incorporam o corante, tornando-se azuis), através da observação em microscópio ótico (Fig. 6).

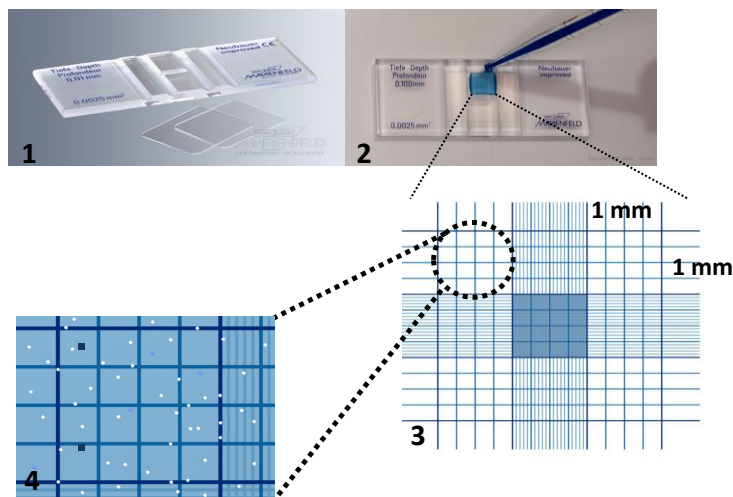


Figura 6 - Representação esquemática da determinação da densidade celular. 1 - câmara de *Neubauer* e lamelas; 2 - adição da suspensão celular já com o azul de tripano; 3 - visualização da grelha no microscópio ótico; 4 - as células viáveis não incorporam o corante (mais claras) e as células não viáveis ficam azuis,

$$\text{N}^\circ \text{ de células/mL} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de células contadas}}{4 \text{ (n}^\circ \text{ de quadrantes de contagem)}} \times 10^4 \text{ mL} \times 2 \text{ (Fator de diluição)}$$

$$\text{N}^\circ \text{ de células/mL} \times \text{Vol. a usar} = 2,0 \times 10^4 \text{ mL} \times \text{Vol. Pretendido}$$

Após a contagem as células foram diluídas no respetivo meio de cultura e subcultivadas com uma densidade de  $2,0 \times 10^4$  células/mL.

### 3.4 Identificação fenotípica das culturas celulares

#### 3.4.1 Imunocitoquímica

Para realizar experiências de imunofluorescência as subculturas (semeadas a uma densidade de  $2,0 \times 10^4$  células/mL) e as culturas primárias (duração aproximada 3-5 dias) foram cultivadas em lâminas de vidro com oito poços (*chamber slide* – Nunc®), previamente revestidas com colagénio. As células resultantes foram sujeitas a imunofluorescência indireta, para caracterização imunofenotípica.

Previamente ao processo de marcação, as células foram fixadas para preservar adequadamente os componentes celulares (como os antígenos e as enzimas) e facilitar as marcações convencionais e imunológicas, evitando que as células e os seus constituintes se apresentem distorcidos e retraídos [72]. As células foram sujeitas a três tipos de fixação diferentes, de acordo com as preferências identificadas para cada anticorpo: paraformaldeído (PFA) a 4% em PBS, acetona a 100% e acetona a 50% (em 2% PFA).

As células foram fixadas durante 10 a 15 minutos e posteriormente lavadas três vezes com PBS (10 minutos cada) e subsequentemente incubadas com tampão de bloqueio I (10% de FBS, 1% de BSA, 0,1% de Triton X-100 e 0,05% de  $\text{NaN}_3$ ) durante 1 hora, à temperatura ambiente. Este passo permitiu bloquear ligações não específicas do antisoro primário, diminuindo a possibilidade de ocorrência de *background* (imagens não específicas de fundo).

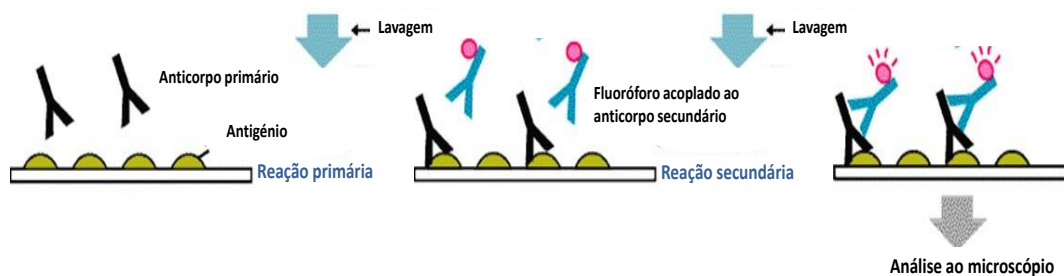


Figura 7 - Representação esquemática do processo de imunofluorescência indireta (adaptado de <http://slideplayer.com.br/slide/1625277/>).

Procedeu-se, então, à marcação por imunofluorescência indireta utilizando-se um anticorpo primário específico contra um antígeno alvo e um anticorpo secundário (com um fluoróforo acoplado), que reconhece o anticorpo primário (Fig. 7).

Tabela 1 - Anticorpos primários utilizados na marcação por imunofluorescência indireta de células e nas preparações de plexo mioentérico- músculo longitudinal (MP-LM) e cortes transversais de íleo.

| Anticorpo Primário                | Hospedeiro  | Diluição | Fonte         |
|-----------------------------------|-------------|----------|---------------|
| <b>actina <math>\alpha</math></b> | Rato (ms)   | 1:250    | Sigma-Aldrich |
| <b>Ano 1</b>                      | Coelho (rb) | 1:100    | Abcam         |
| <b>c-Kit</b>                      | Cabra (gt)  | 1:50     | Santa Cruz    |
| <b>Cx43</b>                       | Coelho (rb) | 1:600    | Abcam         |
| <b>GFAP</b>                       | Coelho (rb) | 1:900    | Dako          |
| <b>PDGFR<math>\alpha</math></b>   | Coelho (rb) | 1:500    | Abcam         |
| <b>SK<sub>3</sub></b>             | Coelho (rb) | 1:300    | Abcam         |
| <b>Vimentina (Vim)</b>            | Rato (ms)   | 1:150    | Dako          |

- 1) **actina  $\alpha$**  (SMA-FITC) - Actina do músculo liso - permite identificar a actina  $\alpha$  do músculo liso intestinal [73], podendo contudo também estar presente em IC [40, 47].
- 2) **Ano1** - anoctamina 1 - identifica o canal de cloro ativado pelo cálcio do tipo 1, presente em IC (c-Kit ou PDGFR $\alpha$  positivas) [42, 43, 74];
- 3) **c-Kit** - proto-oncogene c-Kit - marca o recetor do fator das células estaminais, presente nas ICC [7, 8, 13, 15, 16, 75];
- 4) **cx 43** - conexina 43 - constituinte das junções estreitadas (*gap junctions*) existentes entre diversas células da sinapse mioentérica, como células musculares lisas [76] [77]
- 5) **GFAP** - proteína fibrilar acídica glial – identifica células da glia [78];
- 6) **SK<sub>3</sub>** - K<sub>Ca</sub>2.3 - que marca o canal de potássio ativado pelo cálcio (K<sub>Ca</sub>2.3.) presente nas IC [29, 31, 34, 35, 49]
- 7) **PDGFR $\alpha$**  - recetor  $\alpha$  do fator de crescimento derivado das plaquetas [29, 30, 37], presente nas FLC;
- 8) **Vim** – vimentina - filamento intermediário característico de células mesenquimatosas [45, 47, 79, 80], tal como os fibroblastos e as IC;

Os anticorpos primários utilizados na marcação das células foram diluídos em tampão de bloqueio II (5% de FBS, 1% de BSA, 0,1% de Triton X-100 e 0,05% de  $\text{NaN}_3$  em PBS) e incubados a 4 °C, *overnight* (~16 horas) (Tabela 1).

Após a incubação, as células foram lavadas três vezes com PBS (10 minutos cada). Seguidamente fez-se a incubação com os anticorpos secundários fluorescentes, previamente diluídos em tampão de bloqueio II (Tabela 2) durante 2 horas, com agitação à temperatura ambiente. A partir deste momento, as células foram mantidas no escuro de forma a evitar a fotoexcitação dos fluoróforos. No final do período de incubação, as células foram novamente lavadas três vezes com PBS (10 minutos cada). De seguida colocou-se nas lâminas de vidro meio de montagem Vectashield® (que tem incluído o fluorocromo DAPI, para marcar os núcleos) e sobre este as lamelas. As lâminas foram armazenadas no escuro, a 4°C.

Todas as experiências de imunofluorescência indireta realizadas foram sujeitas a controlos de especificidade (controlos negativos), por omissão dos anticorpos primários da solução de reação.

A preparação foi observada em microscópio confocal (Olympus FV1000, Japão) utilizando os lasers que irradiam num comprimento de onda de gama adequada ao fluoróforo usado. Após a visualização das células e recolha das imagens necessárias, estas foram processadas informaticamente com o *software* FluoView (FV10-ASW2.0). A microscopia confocal é uma técnica que permite otimizar e melhorar a resolução de imagens obtidas por um microscópio convencional, focando o sinal em seções finas da amostra que se pretende analisar. Este tipo de microscopia funciona recorrendo à iluminação da amostra ponto por ponto através de um laser de excitação com um comprimento de onda adequado, rejeitando toda a luz emitida que esteja fora de foco (Tabela 3).

Tabela 2 - Anticorpos secundários usados nas marcações por imunofluorescência indireta.

| Anticorpo secundário   | Hospedeiro | IgG anti-x | Diluição | Fonte            |
|------------------------|------------|------------|----------|------------------|
| <b>Alexa Fluor 488</b> | Burro      | Anti-rb    | 1:1000   | Molecular Probes |
| <b>Alexa Fluor 488</b> | Burro      | Anti-ms    | 1:1500   | Molecular Probes |
| <b>Alexa Fluor 568</b> | Burro      | Anti-rb    | 1:1000   | Molecular Probes |
| <b>Alexa Fluor 568</b> | Burro      | Anti-gt    | 1:1000   | Molecular Probes |

Tabela 3 - Lasers usados na observação por imunofluorescência indireta.

| <b>Fluoróforo excitado</b> | <b>Comprimento de onda</b> | <b>Laser</b> |
|----------------------------|----------------------------|--------------|
| <b>Alexa Fluor 488</b>     | 488 nm                     | Argon        |
| <b>Alexa Fluor 568</b>     | 568 nm                     | HeNe1        |

### 3.5 Imunohistoquímica de íleo de ratazana

#### 3.5.1 Preparação da amostra biológica – Íleo e preparações de Plexo Mioentérico – Músculo Longitudinal de ratazanas adultas

Para a imunohistoquímica foram utilizados cortes transversais de íleo e preparações de Plexo Mioentérico – Músculo Longitudinal (MP-LM) de ratazana adulta. O íleo foi obtido como descrito anteriormente e reservado para a realização de cortes transversais da totalidade do órgão ou para dar origem a preparações de MP-LM. Relativamente à preparação de MP-LM, esta foi preparada segundo o método descrito inicialmente por Ambache nos anos cinquenta e posteriormente melhorado e adotado para utilizar em íleo de ratazana [81]. Esta técnica consiste na colocação do lúmen da porção distal do íleo numa pipeta de vidro efetuando-se de seguida, com o auxílio de um bisturi, um corte ao longo do seu eixo maior. A incisão realizada deve garantir apenas o corte das camadas superficiais do íleo (serosa, músculo longitudinal e plexo mioentérico), evitando cortar em profundidade para excluir o músculo circular. Em seguida o músculo longitudinal com o plexo mioentérico aderente foi separado das camadas profundas com o auxílio de uma gaze embebida em solução Tyrode, esfregando-a suavemente ao longo de toda a incisão e em torno de toda a circunferência do íleo. Esta técnica permite obter uma preparação que deve conter o músculo longitudinal e o plexo mioentérico subjacente, embora por vezes não se consigam excluir as fibras mais externas do músculo circular.

#### 3.5.2 Imunohistoquímica de cortes transversais de íleo de ratazana

As secções de íleo (~1 cm de comprimento) foram fixadas de acordo com as preferências de cada anticorpo em: PFA 4% em PBS; acetona a 100%; acetona a 50%

em 2% PBS ou em PLP (paraformaldeído 2%, lisina 0.075 M, fosfato de sódio 0.037 M, periodato de sódio 0.01 M). Este último fixador é capaz de preservar tanto a ultraestrutura do tecido como a sua antigenicidade [72]. A fixação em PFA ou acetona foi realizada durante 30 minutos a 4°C. No que diz respeito ao PLP, a fixação foi realizada durante a noite (16 horas) a 4°C. As preparações foram posteriormente lavadas com uma solução de tampão fosfato 0,1 M em 3 ciclos de 10 minutos e criopreservadas em solução crioprotectora (glicerol anidro 20%, tampão fosfato 0,1 M), durante 16 horas a 4°C. Para o seccionamento, o tecido foi colocado num criostato (Leica CM1850) a -25 °C durante 30 minutos para estabilização da temperatura. Depois foram cortadas seções transversais com cerca de 16 µm de espessura, que foram colocadas em lâminas com PBS.

As lâminas contendo os cortes transversais do íleo foram lavadas três vezes com PBS (10 minutos cada) e subsequentemente incubadas com tampão de bloqueio I (10% de FBS, 1% de BSA, 0,3% de Triton X-100 e 0,05% de NaN<sub>3</sub>) durante 2 horas com agitação, à temperatura ambiente. Depois de bloqueadas e permeabilizadas, as amostras foram incubadas com os anticorpos primários (Tabela 1) diluídos em tampão de bloqueio II (5% de FBS, 1% de BSA, 0,3% de Triton X-100 e 0,05 de NaN<sub>3</sub>) a 4°C, durante a noite (16 horas), com agitação constante. Após a incubação com os anticorpos primários, o tecido foi lavado três vezes com PBS (10 minutos cada). Seguidamente fez-se a incubação com os anticorpos secundários fluorescentes, previamente diluídos em tampão de bloqueio II (Tabela 2) durante 2 horas, com agitação, à temperatura ambiente, sempre garantindo que estes se encontravam no escuro. Seguidamente, as preparações foram lavadas três vezes com PBS (10 minutos cada). Após conclusão desta etapa as amostras foram montadas em lâminas de vidro com meio de montagem Vectashield<sup>®</sup>, cobertas com lamelas e armazenadas a 4°C até posterior visualização.

### 3.6 Imunohistoquímica de preparações de MP-LM de íleo ratazana

As preparações de MP-LM foram estiradas (com a ajuda de alfinetes) em placas de Petri revestidas com Sylgard<sup>®</sup> e sujeitas a três tipos de fixação diferentes, de acordo com as preferências identificadas para cada anticorpo, PFA 4% em PBS, acetona a

100% ou acetona a 50% em 2% PFA, durante 30 minutos a 4°C. Os tecidos foram lavados em PBS, incubados com tampão de bloqueio I e depois com os anticorpos primários (Tabela 1) diluídos em tampão de bloqueio II a 4°C, durante a noite (16 horas). Após a incubação com os anticorpos primários, o tecido foi lavado 3x com PBS e fez-se a incubação com os anticorpos secundários fluorescentes, previamente diluídos em tampão de bloqueio II (Tabela 2), durante 2 horas, com agitação, à temperatura ambiente, sempre garantindo que estes se encontravam no escuro. Seguidamente, as preparações foram lavadas três vezes com PBS. Após conclusão desta etapa as amostras foram montadas em lâminas de vidro em meio de montagem Vectashield<sup>®</sup>, cobertas com lamelas e armazenadas a 4°C até posterior visualização.

### 3.7 Avaliação das oscilações de $Ca^{2+}$ intracelular ( $[Ca^{2+}]_i$ ) em células vivas por microscopia confocal

Através da metodologia descrita anteriormente, obtiveram-se culturas celulares heterogéneas a partir do íleo de ratazana. As culturas eram constituídas por células musculares lisas e por células mesenquimatosas (ICC e fibroblastos). Para a caracterização funcional das células, estas foram semeadas em caixas de cultura com poço central de 10 mm (FluoroDish<sup>®</sup>) e fundo de quartzo. As células permaneceram em crescimento entre 3 a 5 dias.

Previamente à realização dos ensaios funcionais, o meio de cultura foi removido e as células foram lavadas com a solução de Tyrode e incubadas durante 30 minutos, a 37 °C, com a sonda fluorescente sensível ao  $Ca^{2+}$ , Fluo-4NW (2,5  $\mu$ M), em PBS numa solução contendo 2,5 % de ácido plurónico em DMSO (100  $\mu$ M). Após a remoção da solução com o fluoróforo, as células foram novamente lavadas com a solução de Tyrode. As caixas foram subsequentemente montadas na câmara de perfusão termostaticada do microscópio confocal invertido (Olympus FV1000, Japan), equipado com uma objetiva de 20x (LUCPLFL 20 X PH; N.A. 0.45). A partir desse momento, as células foram perfundidas continuamente (1mL/min) com uma solução Tyrode arejada com uma mistura de  $O_2$  (95%) e  $CO_2$  (5%), a 32 °C. Os fármacos testados foram perfundidos através de um sistema multicanal de perfusão (ValveLink 8.2, Digitimer, San Francisco, CA). As culturas foram então perfundidas com a solução de Tyrode (controlo) ou com os fármacos a testar durante 2-6 minutos. Os fármacos usados foram os seguintes: ATP (Sigma) e ACh (Sigma).

Com recurso a um laser (Multi-line Ar laser), o fluoróforo foi excitado a 488 nm emitindo fluorescência no intervalo de 510-560 nm (detetada pelo scanner do microscópio confocal). As alterações na fluorescência do Fluo-4NW foram detetadas pelo *software* FluoView Advanced Software (Olympus, Tokyo, Japan). As imagens de fluorescência foram recolhidas em intervalos de 20 segundos. As regiões de interesse foram definidas como áreas brilhantes, com o mínimo de ruído de fundo possível.

Os sinais de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular foram calibrados para uma resposta máxima de cálcio produzido pelo ionóforo, ionomicina (5  $\mu\text{M}$ , 100% de resposta) [82].

## IV. RESULTADOS

### 4. Localização das IC no íleo de ratazana

Com o objetivo de identificar e localizar os diferentes tipos de IC existentes no íleo de ratazanas adultas (alvo dos estudos funcionais que precederam o presente trabalho), foram realizadas experiências de imunofluorescência indireta em cortes transversais e em preparações de MP-LM de íleo. Para alcançar esse objetivo foram utilizados anticorpos específicos para as células Intersticiais (IC) - o anticorpo Ano1 (rb, 1:100) e para as subpopulações conhecidas: células intersticiais de Cajal (ICC) – o anticorpo c-Kit (gt, 1:50) e células do tipo-fibroblasto (FLC) – o anticorpo anti-PDGFR $\alpha$  (rb, 1:500). Foram realizadas marcações simples e duplas (com anticorpos que não partilhavam o mesmo hospedeiro), tendo as imagens apresentadas sido obtidas por microscopia confocal.

Após a observação microscópica das imagens obtidas por imunofluorescência indireta (Fig. 8) verificamos que em cortes transversais de íleo de ratazana existem várias células que apresentam imunorreatividade positiva contra anticorpos específicos para as IC: c-Kit (vermelho) e Ano1 (verde). Foi possível identificar células imunopositivas para o c-Kit no plexo mioentérico (PM) (D2, seta branca) e no plexo muscular profundo (DMP, D2, seta amarela). Estes ensaios de imunolocalização tornaram evidente que o anticorpo Ano1 (verde) apresenta uma imunorreatividade mais intensa (C1 e C2) que a obtida com o c-Kit (D1 e D2). Para além da intensidade da resposta é ainda evidente que há uma população maior de células positivas para o Ano1, células essas dispostas de forma ordenada na subserosa (SS) (A2 e B2 setas laranjas), PM (A2, B2 e C2 setas brancas) e no DMP (A2, B2, C2 setas amarelas).

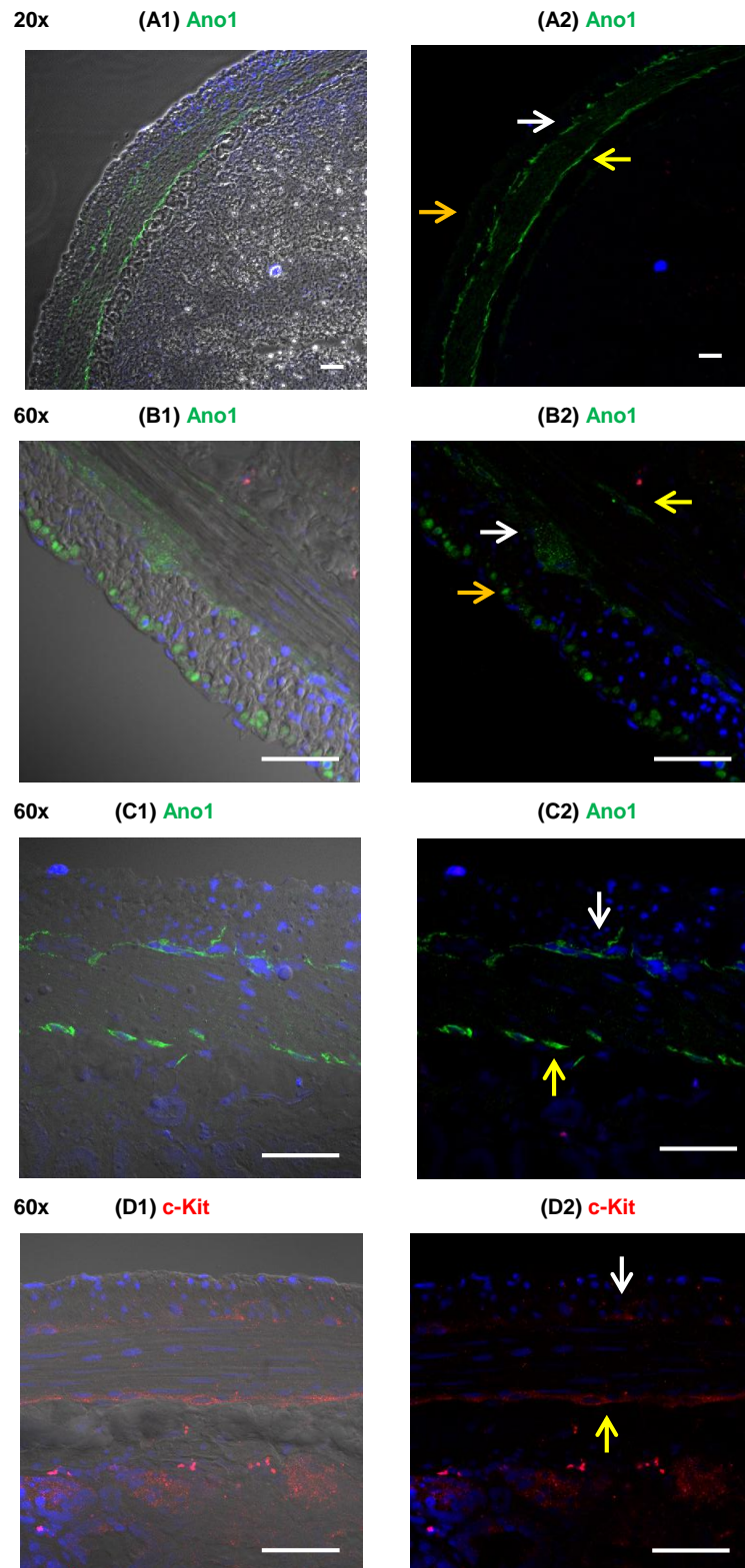


Figura 8 - Localização imunohistoquímica das IC presentes no íleo de ratazana. O tecido foi fixado em acetona a 100% e as imagens obtidas por microscopia confocal com as objetivas de 20x e 60x (escala: 50  $\mu$ M). Os núcleos das células encontram-se marcados a azul (DAPI). As células com imunorreatividade positiva para o Ano1 estão marcadas a verde

(A-C) e para o c-Kit encontram-se marcadas a vermelho (D1 e D2). Existem células positivas para o Ano1 na subserosa (A2, e B2 setas laranjas) e células positivas para o c-Kit (D2) e para o Ano1 (B2, C2 e D2) no Plexo Mioentérico (PM, setas brancas) e no Plexo Muscular Profundo (DMP, setas amarelas).

Para identificar a localização e o subtipo das IC presentes no íleo foi realizada uma marcação dupla com os anticorpos Kit (vermelho) e PDGRF $\alpha$  (verde), pois segundo a nova nomenclatura [11, 37] as células c-Kit positivas são classificadas como ICC, sendo as células c-Kit $^{-}$ /PDGRF $\alpha$  $^{+}$  identificadas como FLC [29].

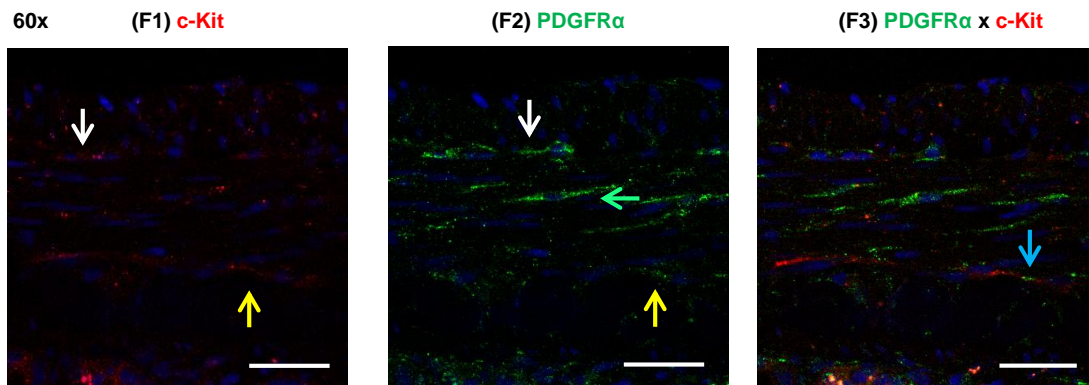


Figura 9 - Localização imunohistoquímica dos subtipos de IC presentes no íleo de ratazana. O tecido foi fixado em acetona a 50% e as imagens obtidas por microscopia confocal com a objetiva de 60x (escala: 50  $\mu$ M). Os núcleos das células encontram-se marcados a azul (DAPI). Observam-se células com imunorreatividade positiva para o c-Kit (F1, vermelho) no PM (seta branca) e no DMP (seta amarela) e células positivas para o PDGRF $\alpha$  (F2, verde) no PM (seta branca), isoladas no músculo circular (seta verde) e no DMP (seta amarela). Na imagem com marcação dupla (F3, PDGRF $\alpha$  x c-Kit) torna-se evidente que não existe co-localização entre os 2 anticorpos testados, encontrando-se as células c-Kit positivas justapostas às células PDGRF $\alpha$  positivas (seta azul).

Pela observação da Figura 9 vemos que algumas células apresentam imunorreatividade positiva para o c-Kit (vermelho, F1), enquanto outras são positivas para o PDGRF $\alpha$  (F2, verde). Como se pode observar na imagem F3 estas células parecem de facto pertencer a subtipos diferentes de IC, ficando as ICC (c-Kit $^{+}$  mas PDGRF $\alpha$  $^{-}$ ) justapostas às FLC (PDGRF $\alpha$  $^{+}$  mas c-Kit $^{-}$ ) quer no PM (seta branca) quer no DMP (seta amarela). Esta marcação lado-a-lado está de acordo com a literatura, que refere que apesar da proximidade destas células [29] estas apresentam imunorreatividade diferente para estes dois anticorpos.

Assim, no que diz respeito às experiências de imunofluorescência indireta realizadas em seções transversais de íleo (permitindo uma melhor visualização anatômica das camadas que o constituem), observaram-se células positivas para o c-Kit e Ano1 tanto no PM como no DMP (Fig. 8, C2 e D2), que poderão ser classificadas como ICC. Existem ainda células na subserosa que são imunorreativas apenas para o Ano1 (Fig. 8, A2). Observamos outras células, que se encontram aparentemente dispersas no

músculo liso circular e apresentam marcação para o anticorpo PDGFR $\alpha$  que marca FLC no PM e DMP (Fig. 9, F2).

Conhecendo a distribuição das IC no íleo de ratazana tentámos estudar com mais pormenor as características morfológicas destas células e avaliar a proximidade mantida entre si.

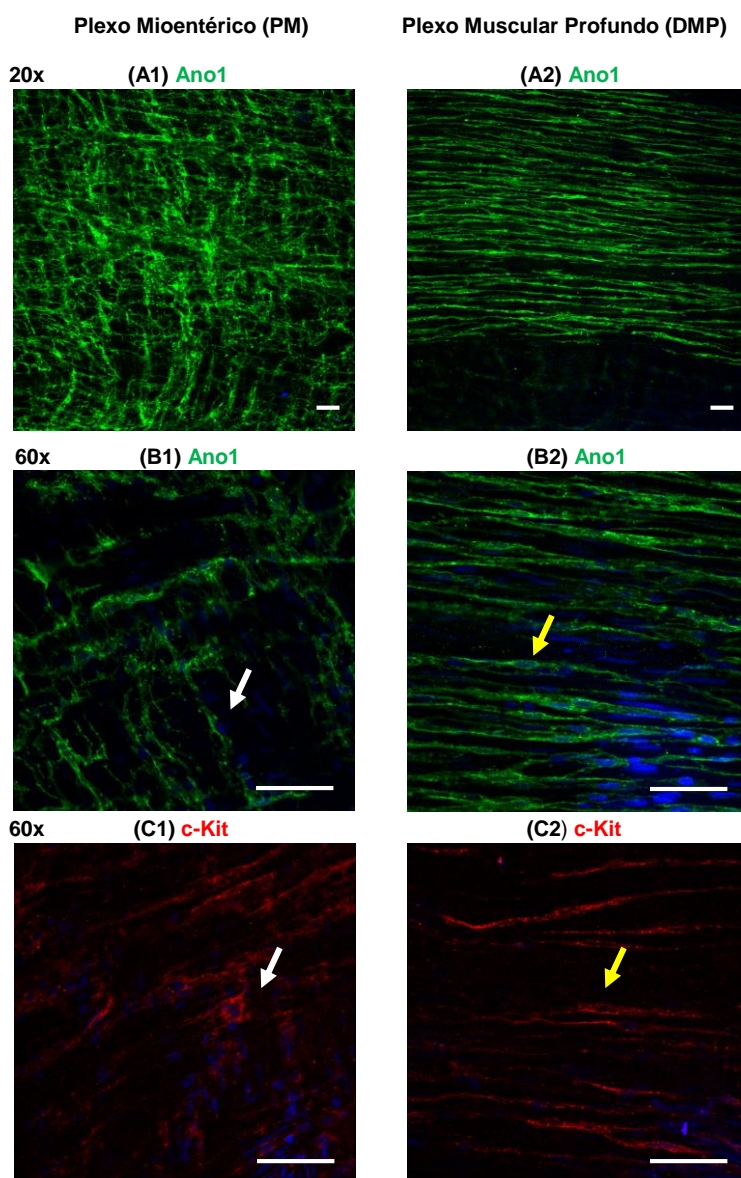
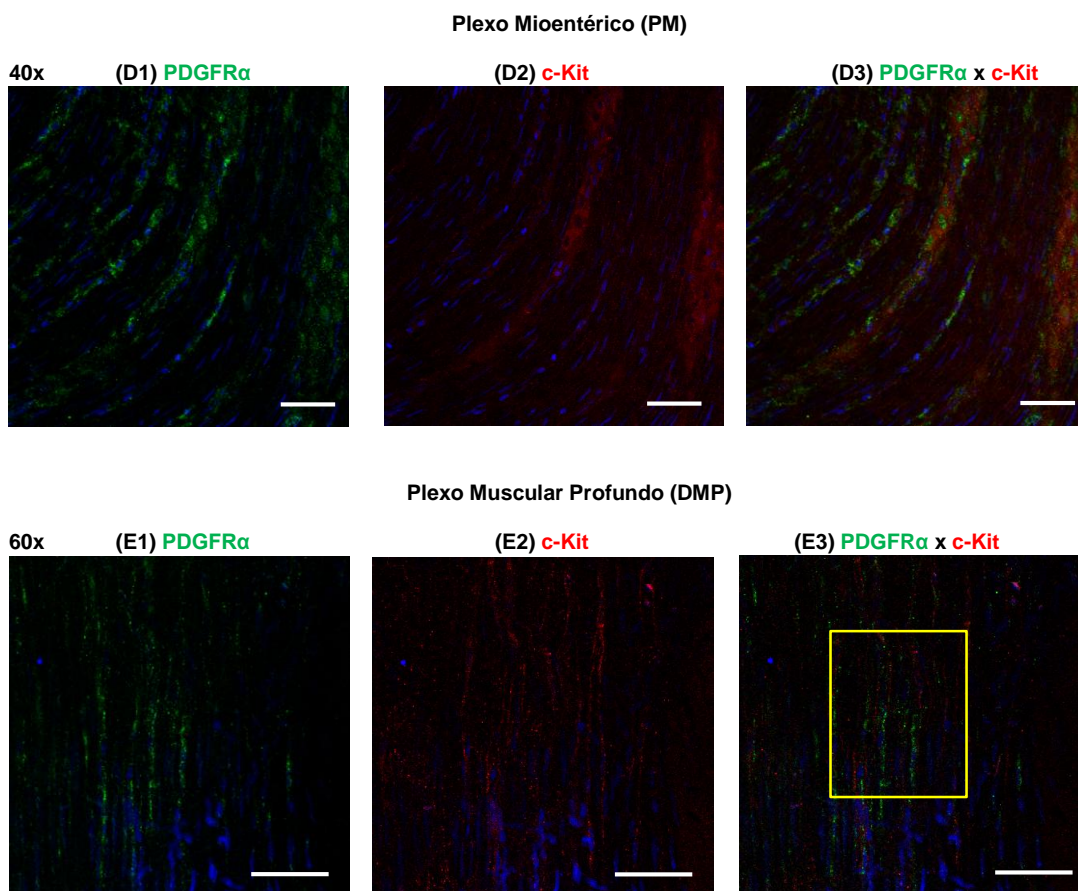


Figura 10 - Identificação imunohistoquímica de IC presentes no MP-LM de íleo de ratazana. Imagens de microscopia confocal obtidas com objetivas de 20x e 60x. Escala:50 $\mu$ M. Os núcleos das células encontram-se marcados a azul (DAPI). Ambas as preparações foram fixadas em 100% acetona. A verde temos representada a imunorreatividade positiva das células contra o anticorpo Anó1 (A1, A2, B1 e B2). A vermelho observam-se células imunorreativas para o c-Kit (C1 e C2). A imunofluorescência observada na presença de qualquer um dos anticorpos permitiu identificar IC no PM (B1, C1, setas brancas) e IC no DMP (B2, C2 setas amarelas).

Pela análise da Figura 10 podemos observar que os anticorpos utilizados evidenciam de forma clara a existência de dois grupos distintos de IC nas preparações de MP-LM existindo uma população maior de células positivas para Ano1 (B1 e B2) que para o c-Kit (C1 e C2). Observa-se ainda que a marcação Ano1 é mais intensa que a marcação c-Kit. O primeiro grupo de IC localiza-se no PM, sendo constituído por células com uma morfologia estrelada e vários prolongamentos que se entrelaçam entre si (A1, B1 e C1). O segundo grupo de IC é composto por células de aspeto fusiforme, alinhadas de forma paralela ao músculo circular, localizadas no DMP - em concordância com o que está descrito para esta porção do intestino.

Contudo, para definir o subtipo das IC observadas foi necessário realizar uma marcação dupla com os anticorpos c-Kit (vermelho) e PDGFR $\alpha$  (verde), como descrito anteriormente em cortes transversais de íleo.



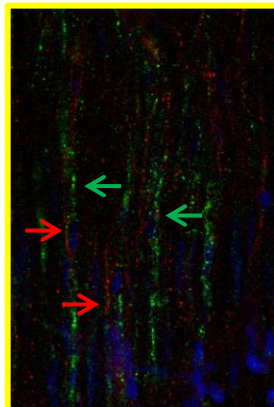


Figura 11 - Identificação imunohistoquímica dos subtipos de IC presentes no MP-LM de íleo de ratazana. Imagens de microscopia confocal obtidas com objetiva de 60x, numa preparação fixada em 50% de acetona. Escala:50 $\mu$ M. Os núcleos das células encontram-se marcados a azul (DAPI). Pode observar-se células imunorreativas contra o anticorpo PDGFR $\alpha$  (verde) no PM e no DMP. Também se verifica a presença do anticorpo c-Kit (vermelho) no PM e no DMP. A marcação dupla sugere que as células PDGFR $\alpha$  positivas (setas verdes) são diferentes das células c-Kit positivas (setas vermelhas).

A observação da Figura 11 permitiu perceber que nas preparações de MP-LM de íleo a marcação dupla com os anticorpos c-Kit e PDGFR $\alpha$  poderá servir o propósito de distinguir as duas populações de IC presentes, como havia já sido possível nas experiências de imunofluorescência realizadas com cortes transversais de Íleo. Assim, podemos considerar que tanto no PM (D3) como no DMP (E3), as células c-Kit<sup>+</sup>/PDGFR $\alpha$ <sup>-</sup> serão ICC que se encontram lado a lado com células c-Kit<sup>-</sup>/PDGFR $\alpha$ <sup>+</sup>, classificadas como FLC.

## 4.1 Cultura de células Intersticiais isoladas a partir do intestino delgado de ratazana

### 4.1.1 Técnica do explante vrs técnica de dissociação enzimática

A fim de determinar qual das técnicas melhor se adequaria ao isolamento e proliferação das IC, foram realizadas diversas culturas celulares com recurso à técnica do explante e de dissociação enzimática.

Das experiências realizadas foi possível concluir que as culturas obtidas pela técnica do explante necessitavam mais tempo, atingindo as células alguma confluência 8 a 10 dias após o início da cultura. Muitas dessas células apresentavam citoplasma

abundante, núcleo relativamente pequeno, e vários prolongamentos, compatível com a morfologia exibida pelos fibroblastos (Fig. 12) [83, 84]. Nestas culturas foi ainda possível observar um outro tipo celular, em menor número que o anteriormente descrito. Estas células eram de maiores dimensões, apresentam um padrão estriado com vários prolongamentos característicos das fibras musculares, morfologia compatível com a descrita para células musculares lisas [85].

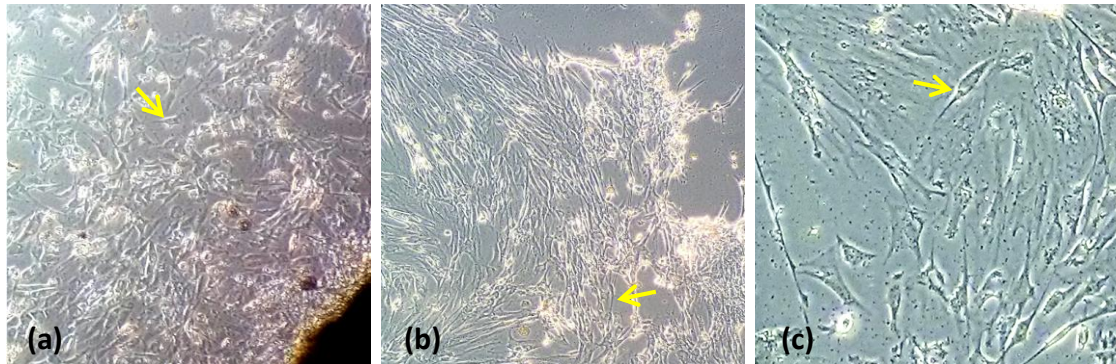


Figura 12 - Culturas celulares obtidas pela técnica do explante, observadas por microscopia ótica. A maioria das células encontram-se em torno do explante (a) e (b). As células que predominavam tinham um citoplasma abundante, núcleo relativamente pequeno e vários prolongamentos, apresentando uma morfologia compatível com a de fibroblastos (c), (setas amarelas). Imagem (a) e (b) com ampliação 20x ; imagem (c) ampliação 20x e zoom.

Quanto à técnica de digestão enzimática, observou-se que apesar de ser mais morosa permitia obter uma maior quantidade de células num intervalo de tempo mais curto, de 3 a 4 dias. Essas células apresentavam uma morfologia coincidente com a das IC descrita na bibliografia: pequenas dimensões; corpo fusiforme ou triangular, com prolongamentos em cada um dos vértices; com um núcleo grande e citoplasma denso e pequeno [38]. Como podemos observar nas imagens obtidas por microscopia ótica (ver Fig. 13, por exemplo) nas culturas celulares obtidas por digestão enzimática foi possível distinguir células com morfologia triangular e estrelada (seta vermelha) sugerindo a existência de uma cultura mista de células com morfologia compatível com IC (mais abundantes) e SMC (seta azul, menos abundantes).

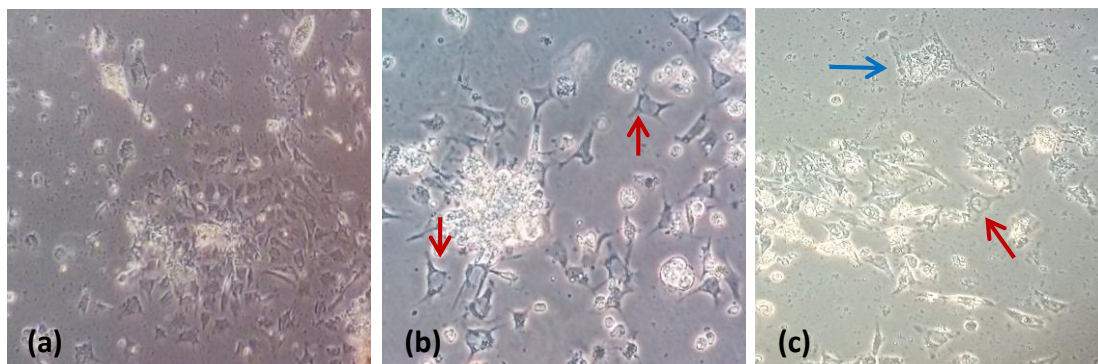


Figura 13 - Culturas celulares obtidas por digestão enzimática, observadas por microscopia ótica. Na imagem (a) vemos o aspeto da cultura com a objetiva de 20x; (b) e (c) foram captadas com a objetiva a 40x. Pode-se observar que as culturas apresentam uma população celular mista, com predomínio de células com uma morfologia compatível com a das IC (setas vermelhas), surgindo de forma menos frequente células com uma morfologia compatível com SMC (seta azul).

Na tabela 4 é feita uma descrição mais detalhada das características observadas nas culturas com o recurso a ambas as técnicas. Uma vez que com a técnica de dissociação enzimática foi possível obter culturas com os fenótipos desejados num curto espaço de tempo, esta foi a técnica eleita para realizar as culturas de IC a partir de intestino delgado de ratazana.

Tabela 4 - Comparação da técnica do explante com a técnica de dissociação enzimática para obtenção de culturas de IC de íleo de ratazana.

| <b>Técnica do explante</b>                                                                                       | <b>Técnica de dissociação enzimática</b>                                                               |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Células localizadas preferencialmente em torno do explante                                                       | Distribuição uniforme das células pelas caixas de cultura                                              |
| Baixa densidade celular                                                                                          | Elevada densidade celular                                                                              |
| Migração celular lenta. Obtenção de células a partir do 6/7 dias                                                 | Obtenção de células ao fim de 3 dias                                                                   |
| As células mais próximas do explante apresentavam sinais de envelhecimento mais rapidamente que as da periferia  | Células na mesma fase de envelhecimento                                                                |
| Obtenção de uma cultura celular heterogénea (IC, SMC e fibroblastos), com tendência para predominar fibroblastos | Obtenção de uma cultura celular heterogénea (IC, SMC e fibroblastos), com tendência para predominar IC |
| Culturas celulares sem vestígios de restos de tecidos e/ou células mortas                                        | Culturas celulares com vestígios de restos de tecidos e/ou células mortas                              |

## 4.1.2 Técnica de dissociação enzimática

### 4.1.2.a) Composição e efeito do tempo de incubação do tecido com a solução de digestão

Uma vez definida a técnica que ia ser usada, foram realizados vários testes a fim de verificar quais as melhores condições de cultura para a obtenção de IC.

Começou-se por analisar quais as condições enzimáticas mais adequadas aquando da digestão do tecido. A utilização de proteases para dissociar células a partir de um tecido mais ou menos complexo é um método utilizado frequentemente, apesar de poder ser considerado bastante agressivo para as células [61]. Assim, foram testadas duas concentrações da colagenase do tipo II - a 1,3mg/mL e a 0,65mg/mL, mas não se observou qualquer alteração na quantidade nem na viabilidade celular. Contudo, a marca (e eventualmente o lote) da colagenase do tipo II utilizada mostrou-se determinante para o resultado obtido com as culturas celulares. Constatou-se que utilizando a colagenase tipo II comercializada pela Sigma se obtiveram poucas células, com a viabilidade comprometida. Já a colagenase tipo II da Worthington não se mostrou tão agressiva para as células, que foram obtidas em maior número e com melhor viabilidade.

A fim de verificar qual o tempo de incubação mais apropriado foram realizados dois protocolos, sendo as principais diferenças: o tempo de incubação do tecido na solução de digestão, 40-60 minutos no protocolo A e de 25 minutos no B; no protocolo A existe ainda uma etapa que consiste na filtração da suspensão celular, estando esta ausente no protocolo B; por sua vez no protocolo B é usada a solução de Hank's sem  $Ca^{2+}$  para equilibrar o tecido durante 15 minutos, sendo esta solução também utilizada para perfazer a solução de digestão; no protocolo A utiliza-se M199 para perfazer a solução de digestão.

No que diz respeito ao protocolo A, só ao fim de 6 a 7 dias é que conseguíamos obter células. Estas apresentavam morfologia predominantemente fibroblástica e muscular. Quando atingida a confluência (aproximadamente 15 dias), as células eram tripsinizadas e colocadas em subcultura. As células resultantes da subcultura tinham as mesmas características que as da cultura primária. As células demonstraram não ser

tolerantes a tempos de digestão longos, pois a densidade celular era reduzida. Com este procedimento não se observou um enriquecimento de células com morfologia de IC e a cultura apresentava poucos vestígios de restos celulares.

Relativamente ao protocolo B, este era bastante mais rápido que o A, obtendo-se células logo a partir do segundo dia e estas, ao fim de 4 dias estavam prontas a ser usadas noutras experiências. O tempo de digestão foi metade do tempo usado no protocolo anterior, o que favorecia a viabilidade das células, uma vez que estas não se mostraram tolerantes a tempos de exposição prolongados. Neste protocolo observou-se uma predominância de células com morfologia de IC. Contudo, contrariamente ao protocolo A, não é realizada a etapa da filtração da suspensão celular observando-se, assim, uma elevada quantidade de restos celulares nas culturas.

#### 4.1.2.b) Duração da cultura primária

Uma vez que se observou alguma predominância de fibroblastos nas culturas iniciais, recorreu-se ao uso da D-valina, um inibidor seletivo da proliferação celular, que inibe as células que não possuem a enzima oxidase D-amino. Esta é frequentemente utilizada em culturas celulares para inibir o crescimento de fibroblastos ao mesmo tempo que permite o crescimento seletivo das células epiteliais [86]. Apesar de na literatura não estar descrito o uso deste inibidor em culturas de IC, realizámos culturas celulares que demonstraram que a D-valina para além de não comprometer a viabilidade e o crescimento das células, era particularmente eficaz nos primeiros dias de cultura. Nestas condições, o crescimento dos fibroblastos só foi observado após 6 dias em cultura.

Quanto ao tempo indicado para utilizar as células obtidas na cultura primária de IC, grande parte das referências consultadas refere 3 a 4 dias [18, 38, 70, 87]. Após 6/7 dias, estas células tendem a entrar em apoptose ou a transdiferenciarem-se em SMC ou fibroblastos (Fig. 14).

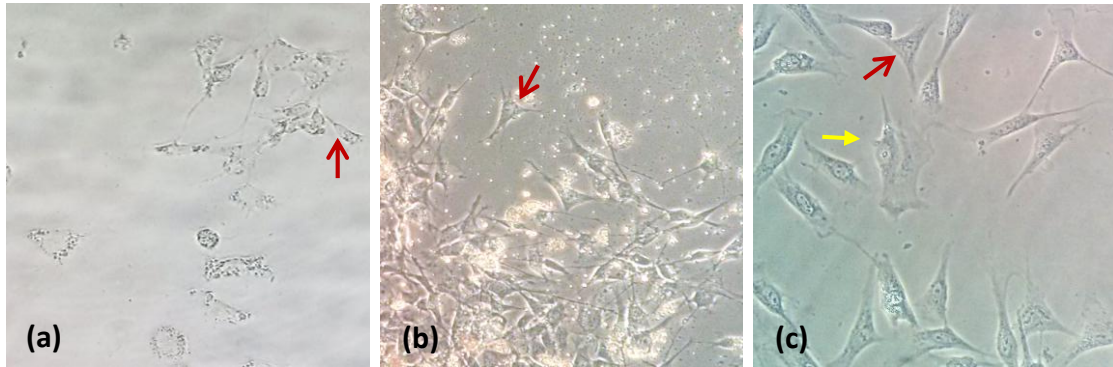


Figura 14 - Observação por microscopia ótica do aspeto morfológico da mesma cultura primária aos 3 (a), 7 (b) e 11 (c) dias. Estas imagens foram obtidas por microscopia ótica com a objetiva de 20x (b) e 40x (a) e (c). Células com uma morfologia compatível com a das IC (setas vermelhas) e células transdiferenciadas, com morfologia compatível com SMC (seta amarela)

## 4.2 Caraterização fenotípica de culturas celulares de íleo de ratazana

Com o objetivo de tentar caracterizar o enriquecimento em IC nas culturas celulares isoladas do íleo de ratazana recorreu-se à imunofluorescência indireta. A escolha dos anticorpos utilizados teve por base os tipos celulares que mais frequentemente se podem encontrar numa cultura celular obtida a partir das camadas musculares externas do íleo de ratazana.

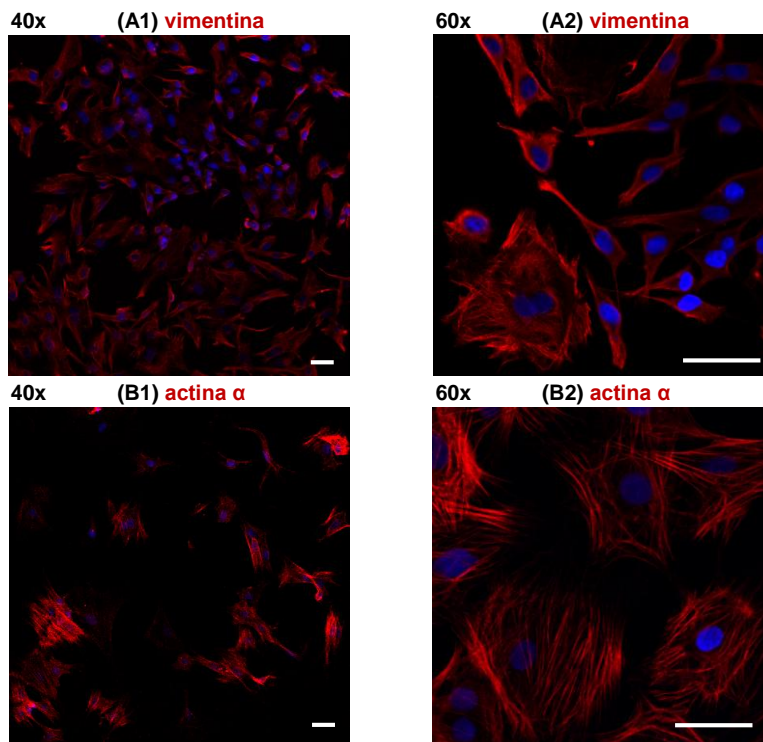


Figura 15 - Identificação imunocitoquímica de células de íleo de ratazana. Imagens de microscopia confocal obtidas com objetiva de 40x e 60x. Escala:50µM. A marcação contra a vimentina corresponde a uma culturas primária com 7dias, enquanto a marcação contra a actina  $\alpha$  é de uma cultura primária com 11 dias. Os núcleos das células encontram-se marcados a azul (DAPI). É possível observar imunorreatividade positiva contra a vimentina (vermelho, A1 e A2) e a actina  $\alpha$  (vermelho, B1 e B2).

Pela análise da Figura 15 é possível perceber que nas culturas primárias apresentadas a maioria das células apresenta imunorreatividade positiva para a vimentina (A1 e A2) e para a actina  $\alpha$  (B1 e B2).

Numa fase inicial foi testado o anticorpo GFAP, a fim de verificar a possível existência de células da glia nas nossas culturas (Fig. 16, C). Também se testou a marcação contra a conexina 43, uma proteína que faz parte das junções comunicantes entre as SMC e as IC (Fig. 16, D), assim como o anticorpo c-Kit, que é característico das ICC (Fig. 16, E).

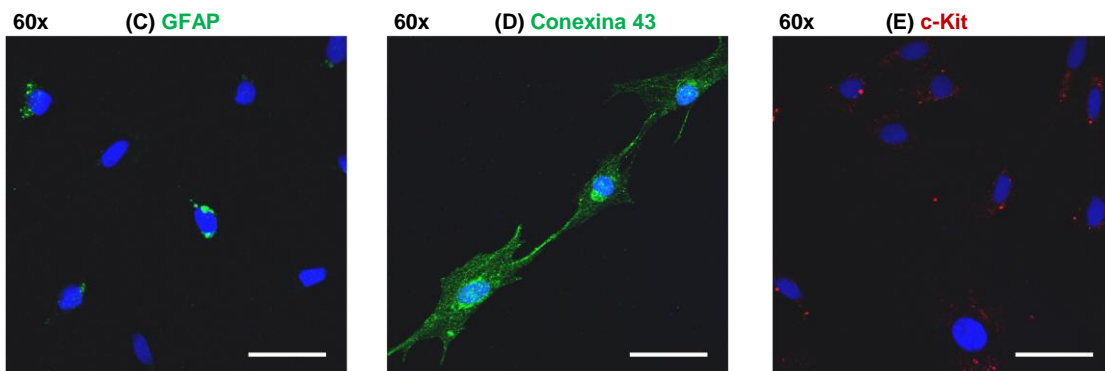


Figura 16 - Identificação imunocitoquímica de células de íleo de ratazana. Imagens de microscopia confocal obtidas com objetiva de 60x. Escala:50µM. Subculturas com 11 dias. Os núcleos das células encontram-se marcados a azul (DAPI), sendo possível observar imunorreatividade positiva contra a conexina 43 (D, verde). Não parece haver imunorreatividade para o GFAP (C, verde) nem para o c-Kit (E, vermelho).

Os resultados expressos na Fig. 16 permitem-nos observar que não parecem existir células da glia (GFAP-negativas, C), nem células positivas para o c-Kit (E). Alguns grupos de células apresentavam imunorreatividade contra a conexina 43. É interessante verificar que a densidade maior de marcação conexina 43 se verifica nos prolongamentos de contacto entre células vizinhas.

Para tentar esclarecer a existência de IC nas culturas primárias foram realizados alguns ensaios de co-localização entre os anticorpos c-Kit e Ano1, já que recentemente foi demonstrado que algumas IC podem ser positivas para o Ano1 mas negativas para o c-Kit [75] (Fig. 17).

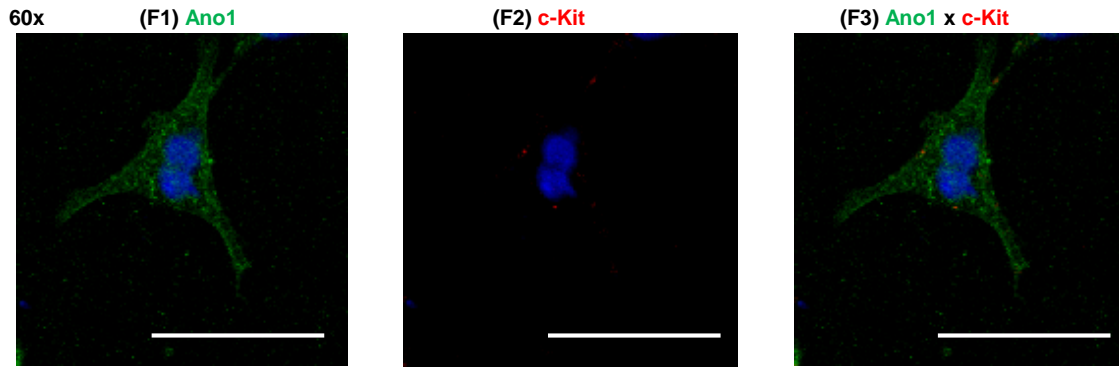
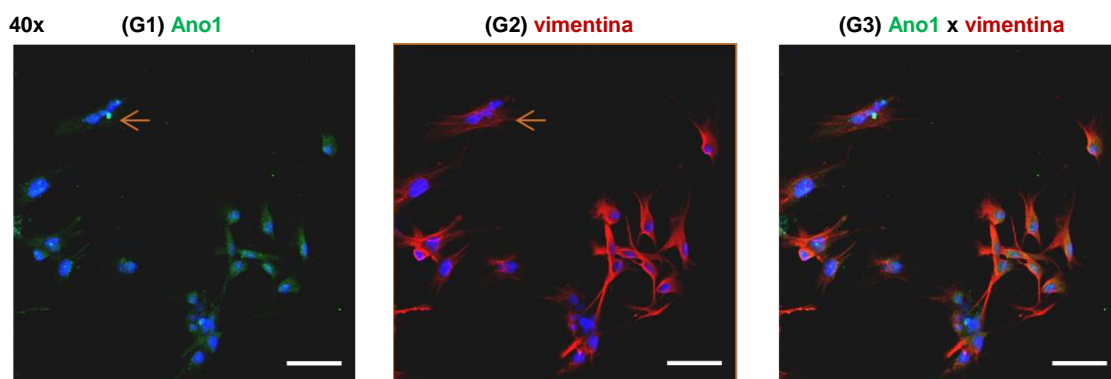


Figura 17 - Identificação imunocitoquímica de células de íleo de ratazana. Imagens de microscopia confocal obtidas com objetiva de 60x, ampliada. Escala:50µM. Cultura primária com 3 dias. Os núcleos das células encontram-se marcados a azul (DAPI). Marcação dupla Ano1 e c-Kit, sendo possível observar que as duas células apenas exibem imunoreatividade positiva para o Ano1(F1, verde), sendo negativas para o anticorpo c-Kit (F2, vermelho)

Estes ensaios preliminares permitiram concluir que nas culturas primárias existe uma grande parte da população celular positiva para o Ano1, marcador de IC. Contudo, a maioria das células parecem ser c-Kit negativas (Fig. 17, F2) caracterizando essas células como  $Ano1^+/c-Kit^-$ .

Pela análise da Figura 18, observamos a existência de co-localização entre a marcação para o Ano1 (G1, H1) e para a vimentina (G2, H2) em quase todas as células da cultura. A co-localização (G3, H3) destas duas marcações sugere que estas células têm características fenotípicas de IC  $Ano1^+/vimentina^+$ . Ocasionalmente, observam-se células  $Ano1^-/vimentina^+$ , compatíveis com outros tipos celulares do tipo fibroblástico.



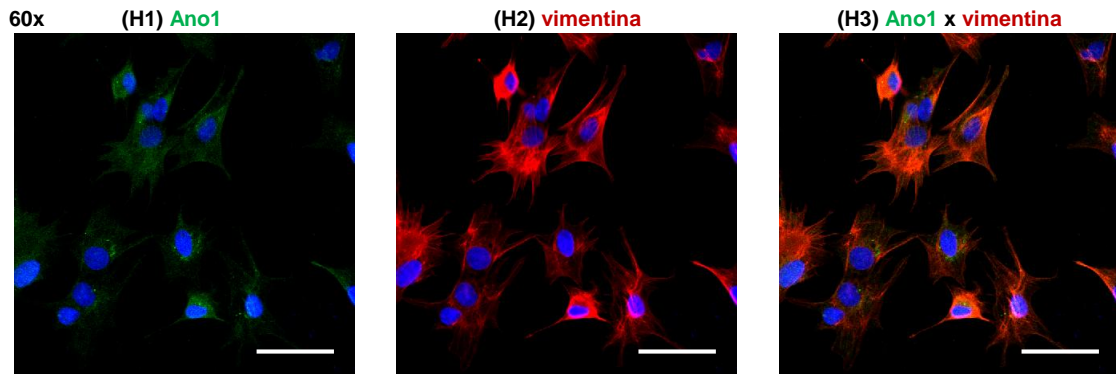
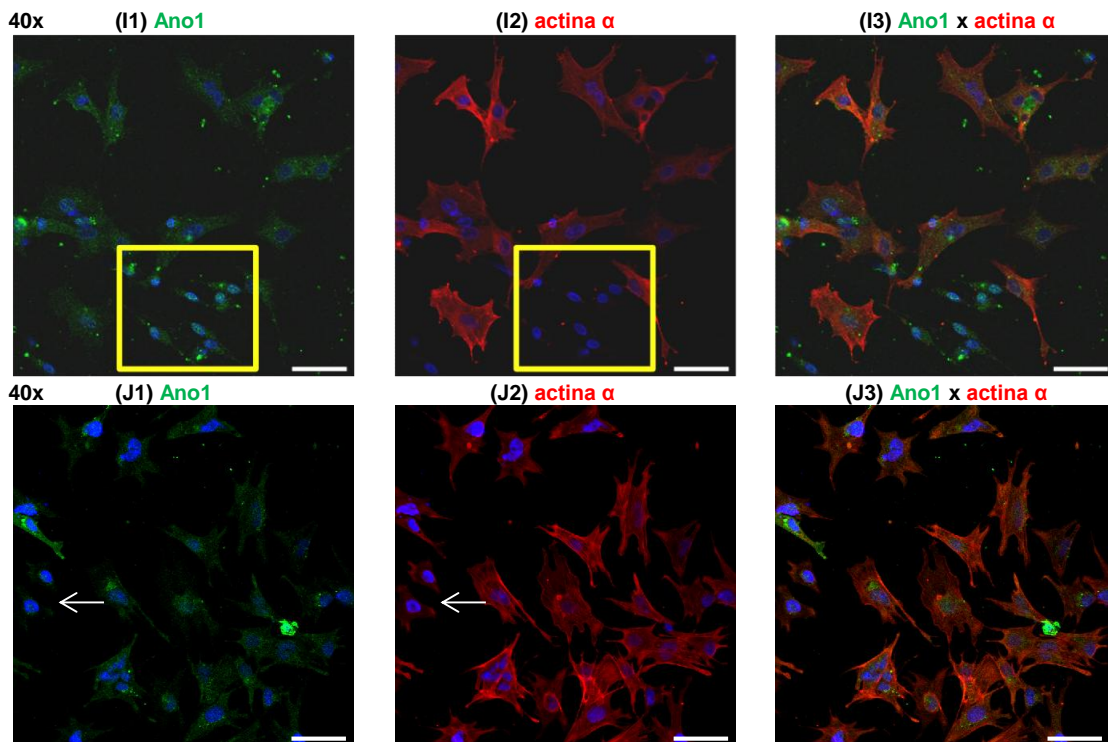


Figura 18 - Identificação imunocitoquímica de células de íleo de ratazana. Imagens de microscopia confocal obtidas com objetiva de 40x e 60x. Escala:50 $\mu$ M. Os núcleos das células encontram-se marcados a azul (DAPI). Marcação dupla Anó1 e vimentina (G-H) em células de cultura primária com 3 dias. Predominam as células Anó1<sup>+</sup>/Vim<sup>+</sup>, observam-se ocasionalmente algumas células Anó1<sup>-</sup>/Vim<sup>+</sup> (seta laranja, G1, G2).

Relativamente à marcação dupla Anó1 e actina  $\alpha$ , pode-se observar na Figura 19 que existem células positivas e células negativas para os dois anticorpos, predominando as células positivas para ambos, Anó1<sup>+</sup>/actina  $\alpha$ <sup>+</sup>. Contudo, encontram-se populações Anó1<sup>+</sup>/actina  $\alpha$ <sup>-</sup> (Fig. 19, I1-I3), sendo mais frequente encontrar de forma dispersa células Anó1<sup>-</sup>/actina  $\alpha$ <sup>+</sup>, apresentando uma morfologia compatível com células musculares lisas (Fig. 19, J1, J2, K1 e K2, setas brancas).



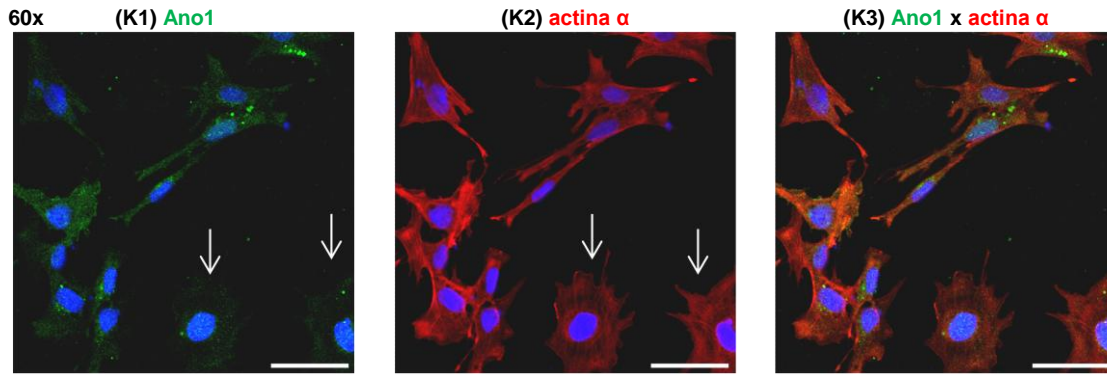


Figura 19 - Identificação imunocitoquímica de células de íleo de ratazana. Imagens de microscopia confocal obtidas com objetiva de 40x e 60x. Escala:50µM. Os núcleos das células encontram-se marcados a azul (DAPI). Marcação dupla Ano1 e actina  $\alpha$  (I-K) em células de cultura primária com 4 dias. Predominam as células Ano1<sup>+</sup>/actina  $\alpha$ <sup>+</sup>, apesar de se ter encontrado uma população Ano1<sup>+</sup>/actina  $\alpha$ <sup>-</sup> (I1-I2, quadrado amarelo). De forma dispersa encontram-se células Ano1<sup>-</sup>/actina  $\alpha$ <sup>+</sup> (K1-K2, setas branca).

Do mesmo modo, realizaram-se experiências para avaliar a expressão de marcadores de FLC, o SK3 e o PDGFR $\alpha$ , nas culturas celulares isoladas do íleo de ratazana.

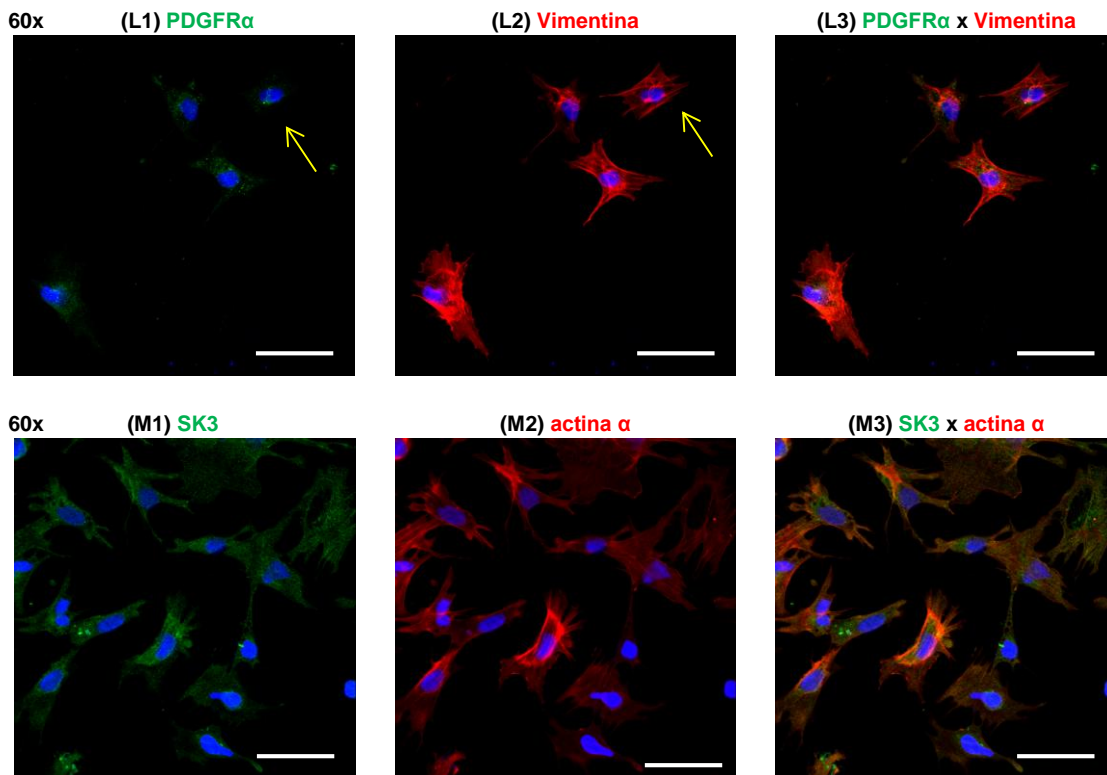


Figura 20 - Identificação imunocitoquímica de células de íleo de ratazana. Imagens de microscopia confocal obtidas com objetiva de 60x. Escala:50µM. Os núcleos das células encontram-se marcados a azul (DAPI). Células de cultura primária com 4 dias. A primeira série de imagens (L) correspondem à marcação dupla com PDGFR $\alpha$  e vimentina, verificando-se que a maioria das células são positivas para ambos os marcadores (PDGFR $\alpha$ <sup>+</sup>/vimentina<sup>+</sup>), surgindo ocasionalmente células PDGFR $\alpha$ <sup>-</sup>/vimentina<sup>+</sup> (L1, L2, setas amarelas). A série de imagens (K) corresponde à marcação dupla SK3 e actina  $\alpha$ , verificando-se igualmente que todas as células são positivas para ambos os marcadores (SK3<sup>+</sup>/actina  $\alpha$ <sup>+</sup>).

Assim, pela análise da última figura (Fig. 20), podemos concluir que nas culturas primárias a população de células predominante apresenta imunorreatividade dupla contra a vimentina e o PDGFR $\alpha$  (PDGFR $\alpha^+$ /vimentina $^+$ ). Ocasionalmente encontram-se células PDGFR $\alpha^+$ /vimentina $^+$  (L1, L2, setas amarelas). A marcação dupla que associou os anticorpos contra SK3 e actina  $\alpha$  revelou uma elevada co-localização entre estes marcadores, caracterizando estas células como SK3 $^+$ /actina  $\alpha^+$ .

Em suma, pela análise destes resultados, observamos que nas culturas primárias realizadas existe uma população heterogénea de células, tendencialmente Ano1 $^+$ /vimentina $^+$  e Ano1 $^+$ /actina  $\alpha^+$ , compatíveis com IC, surgindo ocasionalmente células Ano1 $^-$  compatíveis com a morfologia encontrada nas SMC. Dentro dos subtipos de IC descritas, as células isoladas a partir do íleo de ratazana são PDGFR $\alpha^+$  e SK3 $^+$ , podendo ser caracterizadas fenotipicamente como FLC.

### 4.3 Caracterização funcional das células em cultura isoladas do íleo de ratazana: Análise das oscilações intracelulares do Ca $^{2+}$

Para avaliar a funcionalidade das células em cultura isoladas do íleo de ratazana, realizaram-se experiências para medir as oscilações intracelulares de Ca $^{2+}$  ([Ca $^{2+}$ ] $_i$ ) por microscopia confocal em células previamente marcadas com a sonda fluorescente Fluo-4NW. Nestas experiências usaram-se culturas primárias com 2 dias e subculturas com seis dias. As células foram estimuladas com ATP (10, 50 e 100  $\mu$ M) e/ou ACh (1, 3 e 10  $\mu$ M).

Todas as células da subcultura com 6 dias ( $n=10$ ) responderam à ACh (1 e 3  $\mu$ M) e ao ATP (50  $\mu$ M), através de aumentos rápidos dos níveis [Ca $^{2+}$ ] $_i$  (Fig. 21). Nestas condições experimentais, a resposta ao ATP (50  $\mu$ M) foi de maior amplitude da verificada para a ACh (1  $\mu$ M), tendo em consideração que não se obteve uma maior resposta à ACh quando se aumentou concentração para 3  $\mu$ M.

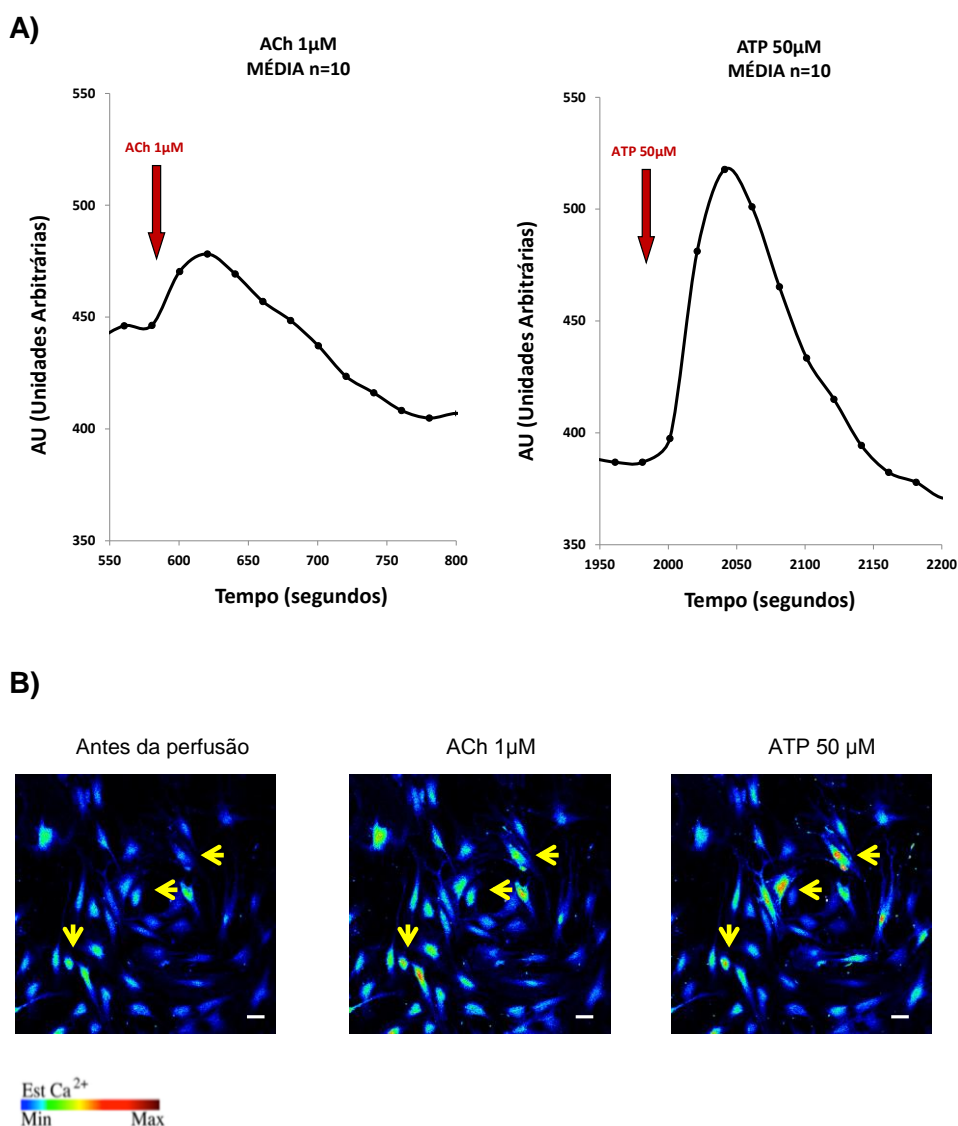
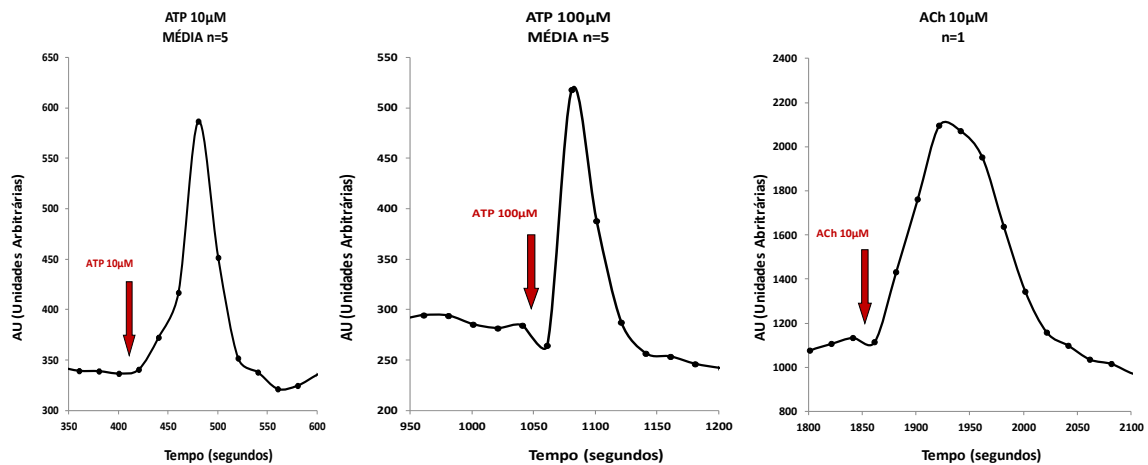


Figura 21 - Subcultura de células de íleo de ratazana com 6 dias. As células foram incubadas com a sonda sensível ao cálcio, Fluo-4NW (2.5  $\mu$ M, em PBS contendo 2,5% de ácido plurónico), durante 30 min a 37 °C. Os sinais de Ca<sup>2+</sup> foram monitorizados no microscópio confocal (Olympus FV1000, Japão). As células foram perfundidas (1ml/min) com uma solução de Tyrode; a ACh (1 e 3  $\mu$ M) e o ATP (50  $\mu$ M),  $n=10$ , foram aplicados durante 4 minutos. (A) Oscilações dos níveis de Ca<sup>2+</sup> intracelular induzido pela ACh 1 $\mu$ M e pelo ATP 50 $\mu$ M. (B) Imagens de microscopia confocal das células marcadas com a sonda fluorescente Fluo-4NW antes e após aplicação dos fármacos (ACh 1 $\mu$ M e ATP 50  $\mu$ M). As setas amarelas representam as células que respondem a ambos os fármacos. Escala: 50  $\mu$ M.

Na cultura primária com dois dias de evolução, a incubação com ATP (10 e 100  $\mu$ M,  $n=6$ ) causou um aumento dos níveis intracelulares de cálcio em 5 das 6 células avaliadas. Na célula que não respondeu ao ATP, observou-se uma resposta de grande amplitude e mais sustentada à ACh.

A)



B)

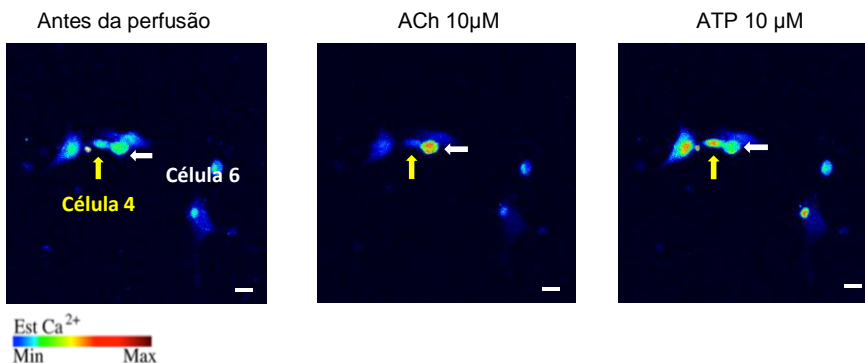


Figura 22 - Cultura primária de células de íleo de ratazana com 2 dias. As células foram incubadas com a sonda sensível ao cálcio, Fluo-4NW (2.5  $\mu$ M, em PBS contendo 2,5% de ácido plurônico), durante 30 min a 37 °C. Os sinais de Ca<sup>2+</sup> foram monitorizados no microscópio confocal (Olympus FV1000, Japão). As células foram perfundidas (1ml/min) com uma solução de Tyrode; a ACh (10  $\mu$ M) e o ATP (10 e 100  $\mu$ M) foram aplicados durante 4 minutos ( $n=6$ ). (A) Oscilações dos níveis de Ca<sup>2+</sup> intracelular induzido pelo ATP 10 e 100 $\mu$ M e ACh 10 $\mu$ M. (B) Imagens de microscopia confocal das células marcadas com a sonda fluorescente Fluo-4NW antes e após aplicação dos fármacos (ACh 10 $\mu$ M e ATP 10  $\mu$ M). A seta amarela corresponde à célula 4, sensível ao ATP mas insensível à ACh. A seta branca representa a célula 6, sensível à ACh mas que não responde ao ATP. Escala: 50  $\mu$ M.

Os resultados apresentados indicam que as duas culturas celulares testadas responderam de forma distinta aos estímulos aplicados. No primeiro caso (subcultura com 6 dias,  $n=10$ ) todas as células responderam de forma similar, primeiro à ACh (resposta de baixa amplitude) e depois ao ATP; a resposta ao ATP teve aproximadamente o dobro da amplitude da resposta obtida para a ACh. Na cultura primária com 2 dias, 5 das 6 células responderam ao ATP (resposta de baixa amplitude), verificando-se que a célula que não respondeu ao ATP respondeu à ACh

através de uma resposta sustentada e de grande amplitude (cinco vezes maior) comparativamente com a resposta obtida para o ATP (Fig. 22).

## V. DISCUSSÃO

As culturas celulares de intestino têm sido alvo em muitos estudos relacionados com os processos que estão envolvidos na motilidade GI. Considerando que o intestino consiste numa mistura heterogénea de células, o isolamento dos vários componentes celulares pode oferecer a possibilidade de definir as características moleculares e funcionais de cada tipo celular.

Pela análise minuciosa da bibliografia constatámos que na maioria dos casos as culturas de IC resultavam de outras porções do aparelho digestivo (maioritariamente cólon) provenientes de espécies como o rato e humano. Não foi encontrada nenhuma referência a um protocolo que resultasse na obtenção de IC do intestino delgado de ratazana, porção e espécie alvo da investigação conduzida no Laboratório de Farmacologia e Neurobiologia do ICBAS. Assim, espera-se que a metodologia original utilizada neste trabalho contribua para a padronização do protocolo a seguir quando se pretende isolar IC a partir do intestino delgado de ratazana.

Para iniciar uma nova metodologia é necessário alguma coragem, sorte e principalmente muito trabalho. Neste caso a tónica deve ser colocada no trabalho exaustivo, que se materializou em muitas culturas sem sucesso, às quais se seguiram novas alterações de protocolo e técnica. Iniciar um novo protocolo de culturas celulares é sempre uma aposta arriscada, mas em tecido normalmente colonizado por diversos microrganismos (como acontece no intestino) o problema agudiza-se. Considerámos que enumerar os problemas que surgiram seria demasiado exaustivo para a redação desta tese, mas uma lista sumária pode ajudar a traduzir as dificuldades que foram sendo ultrapassadas.

Desde logo, a primeira questão que surgiu foi relativa ao método de obtenção de células – pelo método do explante [73] ou por dissociação enzimática [66, 71]. Estas técnicas diferem fundamentalmente no processo inicial de isolamento das células em que, no segundo caso, se recorre a enzimas proteolíticas para auxiliar a digestão do tecido. De acordo com os resultados obtidos, a técnica de dissociação enzimática revelou ser a mais adequada para conseguir um protocolo de rotina de culturas de IC de intestino delgado de ratazana. Comparativamente ao método do explante, o método de dissociação enzimática permitiu obter células rapidamente (em 2 a 3 dias),

com uma elevada densidade celular ( $100 \times 10^4$  células) e com uma morfologia característica de IC (Fig. 13). Esta morfologia era caracterizada por células de pequenas dimensões, corpo celular fusiforme, estrelado ou mais frequentemente triangular, com prolongamentos em cada um dos vértices, núcleo grande e citoplasma pouco abundante e denso [38, 44].

Escolhido o método de cultura, muitos fatores do protocolo foram testados e otimizados para se obter uma cultura de IC de intestino delgado de ratazana. Foi necessário ponderar o melhor método de preparação do tecido, as melhores combinações enzimáticas, a duração do processo de digestão, a escolha do material onde as culturas se vão desenvolver e o seu revestimento, duração das culturas, entre outros.

Quanto à preparação do tecido, como se trata de um órgão naturalmente colonizado por microrganismos saprófitas, maioritariamente constituídos por bactérias (para além de fungos e protozoários), o uso sistemático de técnicas cuidadas e material estéril durante o processo de isolamento do tecido teve que ser complementado com várias lavagens com meios estéreis e utilizar antibióticos para reduzir a proliferação desses microrganismos. Foi identificado como um dos momentos mais críticos a remoção da mucosa com zaragatoa, pelo que após esse passo o tecido resultante era imerso numa solução com uma elevada concentração de antibióticos, durante 30 minutos.

No que diz respeito às soluções enzimáticas utilizadas na obtenção de culturas celulares, sabe-se que a tripsina e a colagenase têm condições ótimas de ação diferentes. A tripsina necessita condições livres de cálcio e pH neutro, contrariamente à colagenase que necessita cálcio e pH ácido. Inicialmente usava-se a solução M199, mas visto que esta tem na sua constituição iões cálcio poderia levar a uma digestão pouco eficiente do tecido. Assim, para obter uma boa digestão do tecido este foi sujeito a condições livres de cálcio (solução de Hank's livre de cálcio) mesmo antes de iniciar a digestão enzimática. A albumina sérica bovina também foi adicionado à solução de digestão, uma vez que ajuda a estabilizar as células dissociadas sem afetar a atividade da colagenase [38].

Relativamente à digestão enzimática é essencial usar uma concentração não muito elevada de enzimas proteolíticas, cumprindo o objetivo de dissociar as células sem as lesar. Outro fator a ter em consideração neste contexto é o tempo de duração da digestão, sendo o equilíbrio destes dois fatores mais difícil de se conseguir quando se

trata de culturas de ICC, descritas como muito sensíveis a tempos de digestão longos [38]. Assim, após experimentar algumas marcas/lotos diferentes de colagenase tipo II que inviabilizaram as culturas, foram testadas duas concentrações de colagenase do tipo II (Worthington a 1,3 e a 0,65 mg/mL), com vários tempos de digestão. Observou-se que, com uma concentração enzimática inferior a viabilidade celular era superior à custa de uma digestão incompleta do tecido após 25 minutos de contato, que foi parcialmente compensada pela obtenção de culturas mais densas e com maior viabilidade celular, comparativamente com tempos de digestão mais prolongados (40 a 60 minutos).

Quanto à escolha do material onde as culturas se iriam desenvolver, observou-se que as culturas de IC preferem as caixas de plástico às de vidro, pois mesmo que ambas estivessem revestidas com colagénio (que se mostrou mais favorável que a gelatina) as células aderiam melhor, obtendo-se uma maior densidade celular e células com uma morfologia mais próxima da esperada. Contudo, esta escolha foi verdadeiramente condicionada pelas condições experimentais exigidas pelas técnicas utilizadas. Tanto nas experiências de imunofluorescência como nas de análise das oscilações do  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular recorreu-se à microscopia confocal, que possui algumas características que inviabilizam o uso de caixas de plástico, desde logo por causa da destruição do plástico pela irradiação laser do microscópio invertido. Assim, todas as imagens de imunofluorescência e de avaliação do  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular das culturas de IC foram conseguidas em caixas de vidro revestidas com colagénio.

A avaliação da duração ideal da cultura foi o último passo determinante para conseguir um bom equilíbrio entre a densidade e a viabilidade celular. Observou-se que, com o último protocolo testado, algumas das IC começavam a entrar em apoptose após 5 a 6 dias em cultura, não conseguindo as viáveis garantir a concentração celular desejada num espaço de tempo curto. Assim, sabendo da elevada sensibilidade que as IC apresentam em cultura, optou-se por utilizar as células após 2 a 5 dias em cultura, seguindo a generalidade dos protocolos existentes na bibliografia [18, 38, 70, 87].

No processo de obter uma cultura enriquecida em IC foi imprescindível reduzir o crescimento de contaminantes, como a invasão habitual destas culturas por fibroblastos. Para tal, impediu-se a proliferação destas células com D-valina. Por outro lado, tornou-se imperioso avaliar fenotipicamente os tipos celulares existentes nas culturas através da sua imunorreatividade a anticorpos específicos. Contudo, tratando-

se de intestino delgado de uma espécie diferente do rato e do Homem, foi necessário (1) encontrar anticorpos suficientemente reativos para os marcadores celulares expressos na ratazana e (2) testar a eficácia dos anticorpos no tecido e avaliar a sua reatividade / localização, no tecido, bem como as particularidades metodológicas dos mesmos por não se encontrarem descritas na literatura. Por esse motivo foram realizadas, em paralelo, experiências de imunofluorescência indireta em cortes transversais de íleo de ratazana e em preparações de MP-LM.

No que diz respeito aos cortes transversais de íleo de ratazana (que permitem localizar anatomicamente a marcação observada), foram realizados ensaios para testar a imunorreatividade do c-kit, do Ano1 e do PDGFR $\alpha$ . Observámos que, apesar da marcação Ano1 ser muito mais expressiva do que a marcação obtida com o c-Kit, existiam células organizadas ao longo do MP e do DMP que eram positivas para ambos os anticorpos (Fig. 8). Estas marcações permitiram-nos concluir que no íleo de ratazana existem ICC-MY e ICC-DMP. Estes resultados estão de acordo com os descritos na literatura [29, 31, 74] para outras espécies. Além das localizações descritas, foi encontrada na subserosa uma população de células que apresentava uma morfologia estrelada com imunorreatividade específica para Ano1 (Fig. 8, B1 e B2). Trata-se de um resultado duplamente inovador porque não só demonstra que no íleo de ratazana as ICC-SS estão presentes (relatos anteriores referiam a sua existência apenas no rato e no porquinho da índia) [37], como também revela ICC-SS em que o Ano1 não colocaliza com o c-Kit, ao contrário do descrito na literatura [75].

Relativamente ao PDGFR $\alpha$ , observámos que marca de forma mais difusa células existentes no MP, no DMP e outras dispersas no músculo circular (Fig. 9). Através da marcação dupla com c-Kit, verificámos que embora ambos os marcadores evidenciem células localizadas nos mesmos plexos (MP e DM), não existe co-localização entre o c-Kit e o PDGFR $\alpha$ , mostrando que a marcação se origina de células distintas habitando o mesmo nicho anatómico. Esta observação está em concordância com o facto de coexistirem no PM e DMP ICC c-Kit<sup>+</sup>/PDGFR $\alpha$ <sup>-</sup> e FLC c-Kit<sup>+</sup>/PDGFR $\alpha$ <sup>+</sup> [29, 31]. As experiências de imunofluorescência realizadas em preparações de MP-LM permitiram confirmar parte dos resultados descritos nos ensaios realizados em cortes transversais de íleo (Fig. 8 e 9). Para além disso, tornaram ainda possível compreender melhor a morfologia das células envolvidas e a natureza da relação anatómica entre elas. Verificou-se, assim, que o c-Kit e o PDGFR $\alpha$  marcavam IC diferentes, embora coabitando no mesmo local e partilhando algumas características morfológicas básicas (e.g. aspeto estrelado no MP *versus* o aspeto fusiforme no

DMP). Assim as ICC ( $Ano1^+/c\text{-Kit}^+/PDGFR\alpha^-$ ) são células que se apresentam justapostas às FLC ( $Ano1^+/c\text{-Kit}^+/PDGFR\alpha^+$ ) tanto no MP como no DMP. Estas semelhanças fizeram com que fosse proposta uma terminologia similar à adotada para as ICC para designar as diferentes populações de células PDGFR $\alpha$  positivas: PDGFR $\alpha$ -MY e PDGFR $\alpha$ -DMP [11]. De notar também que existe cada vez mais relutância em utilizar o termo FLC para designar as células PDGFR $\alpha$  positivas, mas poderá ainda ser prematuro afirmar se será uma ou outra designação a prevalecer [11, 37].

Tendo compreendido algumas particularidades da utilização de anticorpos específicos para as populações celulares alvo deste tecido, a mesma técnica de imunofluorescência indireta foi aplicada para caracterizar fenotipicamente as células em cultura. Contudo, dado tratar-se de uma cultura heterogénea foi necessário recorrer a alguns outros anticorpos que permitissem identificar grandes grupos celulares, como a vimentina e a actina  $\alpha$ . Quanto à vimentina, um filamento intermediário característico das células de origem mesenquimatosa [80], verificámos nas culturas primárias realizadas praticamente todas as células apresentam imunorreatividade positiva para a vimentina. Este resultado poderá ser concordante com vários outros estudos que identificaram diversas células (localizadas no DMP, na subserosa e outras localizações) positivas quer para o c-Kit quer para a vimentina [47, 88]. Relativamente à proteína contrátil *actina  $\alpha$*  verificámos que a maioria das células, mas não todas, eram positivas para a actina  $\alpha$ . Algumas das células marcadas exibiam uma morfologia característica de células musculares - células de grandes dimensões com um padrão estriado e com inúmeros prolongamentos característicos das fibras musculares (Fig. 15). Questiona-se a especificidade desta marcação, já que a maior parte destas células também poderiam ser IC porque segundo a literatura estas células podem apresentar este filamento como constituinte do citoesqueleto [40, 45].

Quanto aos marcadores específicos para ICC, o c-Kit seria a opção mais óbvia, pois é o mais referenciado na literatura [7, 8, 15, 16, 75, 88]. Contudo a utilização deste anticorpo em ratazana [89, 90] é tecnicamente mais complicado que em outras espécies, sendo esse um dos motivos que fez com que este estudo só pudesse ser desenvolvido nesta ocasião. Alternativamente surgiu como marcador de ICC o Ano1. A expressão deste marcador foi inicialmente identificada em células de tumores GI que também são KIT $^+$  e nas ICC, onde se demonstrou que era um dos genes mais expressos [91, 92]. Assim, desde a descoberta deste marcador assumiu-se que todas

as células positivas para c-Kit eram também positivas para o Ano1 em todos os mamíferos, incluindo humanos [11, 74, 93]. No entanto, um estudo recente demonstrou de forma conclusiva que em cólon de rato existem células positivas para o Ano1 que são negativas para o c-Kit. Esta marcação mantém-se surpreendentemente em ratos *knockout* para ICC onde que a marcação c-Kit diminuiu cerca de 50% e a marcação Ano1 manteve-se similar ao rato controlo [75]. Existem, portanto, células Ano1<sup>+</sup>/c-Kit<sup>-</sup> (que não são ICC) que vão de encontro ao fenótipo que parece predominar nas culturas celulares primárias obtidas nas nossas condições experimentais (Fig. 17). De fato, a co-localização entre Ano1 e c-Kit nem sempre foi evidente nas nossas condições experimentais, já que apesar da marcação Ano1 ter sido evidente em praticamente todas as células, a marcação para o c-Kit foi apenas esporádica. As dúvidas foram-se entretanto dissipando com a realização de outras marcações duplas, mais bem-sucedidas que revelaram a existência de uma população maioritariamente constituída por células Ano1<sup>+</sup>/vimentina<sup>+</sup> e Ano1<sup>+</sup>/actina  $\alpha^+$  (Fig. 18 e 19). Nestas culturas surgiam ocasionalmente células Ano1<sup>-</sup>/vimentina<sup>+</sup> (provavelmente fibroblastos ou miofibroblastos) (Fig.18, G1) e Ano1<sup>-</sup>/actina  $\alpha^+$ , de morfologia compatível com a encontrada em células musculares (Fig.19, J1 e K1).

Até 2014, a discussão das células intersticiais (IC) estava centrada nas ICC, células Ano1<sup>+</sup>/c-Kit<sup>+</sup>, mas hoje em dia reconhece-se a existência de uma segunda população de IC que partilham o mesmo nicho anatómico das ICC, justapondo-se a estas [11]. Este segundo tipo de células, formalmente referidas na literatura como FLC, são positivas para o PDGFR $\alpha$  e para o SK3 [29, 34-36], distinguindo-se assim das ICC. Recentemente, um outro estudo observou que nas FLC a rápida despolarização da membrana induzida pelo zinco é totalmente suprimida na presença de um antagonista do Ano1, revelando que este canal de cloro ativado pelo cálcio está de facto presente nestas células [94]. Adicionalmente, outros autores mostraram que a expressão de c-Kit e PDGFR $\alpha$  é diferente em culturas celulares e em tecido: c-Kit é bastante expresso no tecido, tendo uma expressão quase nula em células; contrariamente, o PDGFR $\alpha$  é mais expresso em células do que no tecido intacto [94]. Esta observação parece corroborar os resultados de imunofluorescência que obtivemos em tecido (marcação PDGFR $\alpha$  subtil) e nas culturas celulares (marcação c-Kit subtil). Este argumento não deve, contudo, invalidar o facto das células em cultura poderem ser de fato c-Kit negativas se a maioria da população for constituída por FLC (células PDGFR $\alpha$  positivas).

Todos estes argumentos bibliográficos se correlacionam com o fenótipo que caracteriza as culturas primárias obtidas através da metodologia descrita neste trabalho: predomínio de células Ano1, SK3 e PDGFR $\alpha$  positivas que se poderão definir como FLC. Ocasionalmente poderão existir ICC (tipicamente c-Kit positivas e PDGFR $\alpha$  negativas) e células musculares (positivas apenas para a actina  $\alpha$ ). Esta distribuição pode aproximar-se do modelo recentemente descrito como Sincício SIP. Este sincício é constituído por células musculares que se encontram acopladas eletricamente às ICC e às células PDGFR $\alpha$  positivas (ou FLC), sustentando o conceito que são as IC que geram a atividade *pacemaker* através no trato GI, coordenando os sinais provenientes dos nervos entéricos e dos estímulos mecanossensitivos para as células musculares adjacentes [11, 37].

Acreditamos, pois, que a cultura celular obtida através da metodologia descrita é constituída por uma população heterogénea onde predominam as FLC (células PDGFR $\alpha$  e Ano1 positivas), sendo a primeira vez que são publicadas imagens revelando a imunorreatividade destas células ao Ano1.

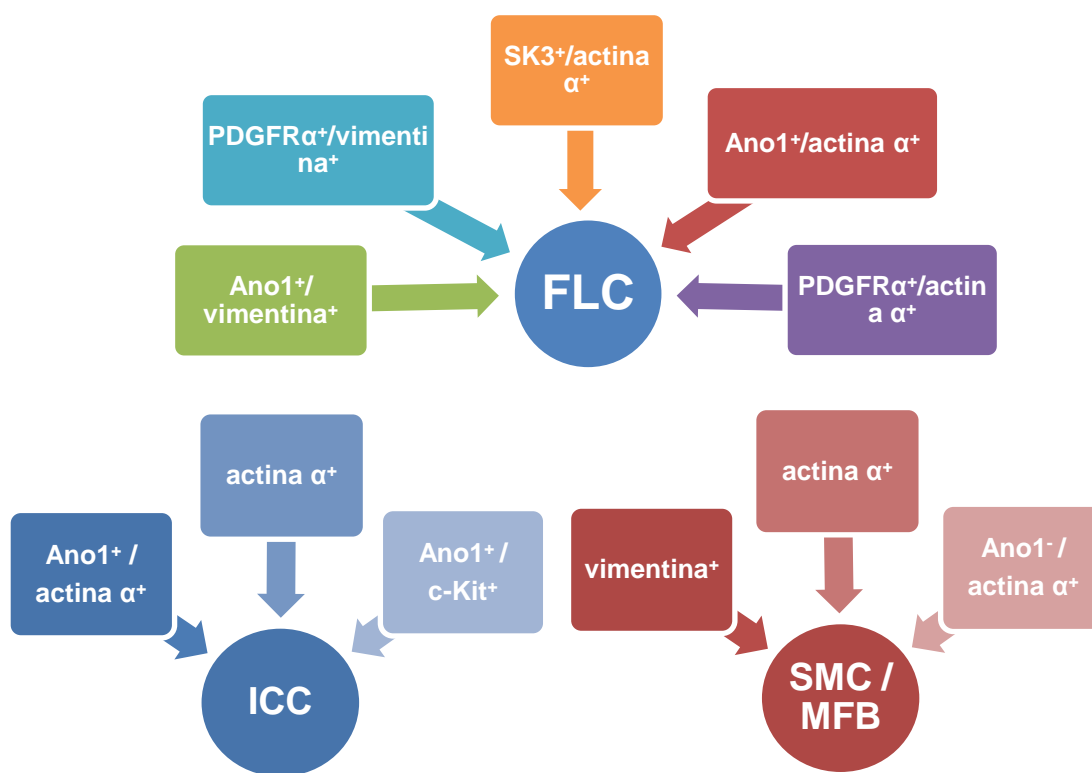


Figura 23 - Representação esquemática das características fenotípicas das culturas celulares primárias realizadas. FLC: célula tipo-fibroblasto; ICC: célula Intersticial de Cajal; SMC: célula muscular lisa e MFB: miofibroblasto.

Tendo conseguido a caracterização imunofenotípica das culturas celulares, optou-se por tentar caracterizar funcionalmente os subtipos celulares presentes na cultura. Para tal, recorreu-se a um método baseado na resposta diferencial das células marcadas com uma sonda fluorescente sensível ao  $\text{Ca}^{2+}$ , Fluo-4NW, por microscopia confocal funcional.

Estudos anteriores de imunofluorescência deste mesmo grupo demonstraram, através da microscopia confocal, que os recetores muscarínicos  $M_3$  estão localizados predominantemente nas ICC intramusculares. Ensaio neuroquímico sugerem que a ativação dos recetores  $M_3$  nas ICC desempenha um papel relevante na regulação da libertação de ACh, através do aumento dos níveis extracelulares de adenosina e consequente ativação de recetores excitatórios do subtipo  $A_{2A}$  [57]. Outros estudos indicam a presença do recetor  $M_3$  e  $M_2$  em ICC [50, 51, 57, 95], mas apenas um deles se refere à presença destes marcadores em culturas celulares [15]. No entanto, estes recetores muscarínicos também estão presentes no músculo liso do trato GI [95-97], bem como em culturas de SMC [15].

Quanto aos nucleótidos de adenina, em 2009 ficou demonstrada a existência de um efeito bifásico do ATP no MP-LM de íleo de ratazana. O efeito facilitatório sobre a libertação basal de ACh deve-se à ativação direta de recetores ionotrópicos P2X, provavelmente do subtipo P2X2, localizados nos terminais mioentéricos. Já o efeito inibitório resulta da formação de ADP e ADO a partir do catabolismo do ATP, com subsequente ativação de recetores  $P2Y_1$  e  $A_1$  presentes nos neurónios mioentéricos, que diminuem a libertação de ACh induzida pela estimulação elétrica [98]. Até à data deste estudo, não foi encontrada bibliografia referente à presença de recetores purinérgicos em culturas de IC. Contudo, um estudo revela por imunohistoquímica a presença dos recetores P2X2 e P2X5 nas ICC, mas sem evidências funcionais [54].

Assim, perante os resultados funcionais já obtidos por este grupo de trabalho em íleo de ratazana, usou-se a ACh e o ATP, para avaliar a resposta das células em cultura a estes estímulos.

Na subcultura verificou-se que a maioria das células respondiam à ACh (1  $\mu\text{M}$ ) e ao ATP (50  $\mu\text{M}$ ) através de aumentos transitórios dos níveis de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . Este resultado sugere que a subcultura apresenta uma população celular aparentemente homogénea. Já nas células resultantes da cultura primária, observou-se que 5 das 6 células examinadas responderam ao ATP (10 e 100  $\mu\text{M}$ ), através de aumentos rápidos dos

níveis de  $[Ca^{2+}]_i$ , sendo que a célula que não respondeu ao ATP foi a única que produziu uma resposta à ACh (10  $\mu$ M). Neste caso, a cultura primária parece ser do tipo misto com um predomínio maior de células reativas ao ATP do que à ACh.

No que diz respeito à neurotransmissão purinérgica, estudos recentes [30, 35] indicam que as células PDGFR $\alpha^+$  respondem com uma corrente de grande amplitude quando expostas ao ATP e ADP. Já as SMC respondem com uma corrente de baixa amplitude ou nem sequer manifestaram qualquer tipo de resposta quando estimuladas pelas purinas, sucedendo o mesmo com as ICC. Estes dados sugerem fortemente que as células PDGFR $\alpha^+$  são os principais alvos da neurotransmissão purinérgica nos músculos GI. Quanto às IC da subserosa, um estudo realizado em colon de porquinho-da-índia revelou que a maioria dessas células seriam presumivelmente FLC – células que respondem ao ATP por ativação P2Y $_1$ , mas não respondem à ACh. As células que respondem ao ATP são c-Kit negativas e vimentina positivas [88]. Confrontando estas observações com os resultados obtidos neste estudo, os dados sugerem que as células da cultura primária que responderam ao ATP serão provavelmente células PDGFR $\alpha$  positivas logo, FLC [30, 88]. De acordo com o descrito, a célula que apenas respondeu à ACh poderá ser uma ICC ou uma SMC. Diversos trabalhos referem que nas SMC se verifica um aumento do  $[Ca^{2+}]_i$  após incubação com ACh (10  $\mu$ M) [88], enquanto outros autores referem que o carbacol, um agonista da ACh, é capaz de modular a atividade *pacemaker* das ICC por intermédio de recetores M $_3$  [99].

Pela análise da bibliografia consultada em conjunto com os resultados experimentais obtidos, julgamos poder afirmar que as culturas celulares primárias resultantes da metodologia descrita são constituídas por diferentes tipos celulares, com um marcado predomínio de células PDGFR $\alpha^+$ , que respondem ao ATP. As restantes células, menos abundantes, poderão ser ICC e/ou SMC, reativas à ACh. Esta caracterização é essencial para, num futuro próximo, ser possível compreender o papel de cada tipo celular constituinte do Sincício SIP como mediador da neurotransmissão purinérgica em intestino delgado de ratazana através de critérios funcionais, *i.e.* sem sacrificar a viabilidade celular. É de salientar que não existe até à data deste estudo nenhum trabalho que demonstre a presença de recetores purinérgicos em culturas celulares de IC de intestino delgado.

## VI. Conclusões

Ao longo deste estudo foi possível estabelecer um protocolo relativamente simples e inovador que permitiu obter uma cultura enriquecida em IC do intestino delgado de ratazana. A técnica utilizada recorre à dissociação enzimática e mecânica, permitindo obter um elevado rendimento celular com células morfológicamente compatíveis com IC em 2-5 dias.

Recorrendo à técnica de imunofluorescência indireta foi possível avaliar em cortes transversais de íleo e preparações de MP-LM a marcação com determinados anticorpos, cuja eficácia e distribuição não havia ainda sido testada nesta espécie. Foi possível observar células c-Kit e Ano1 positivas (marcação específica para IC) organizadas ao longo do MP e do DMP. Verificamos ainda a presença de células positivas para o PDGFR $\alpha$ , marcador expresso pelas FLC, no MP, DMP e ao longo do músculo circular. Mostramos pela primeira vez, em intestino delgado de ratazana, ICC-SS imunopositivas para o Ano1 e negativas para o c-Kit, o que sugere a presença de outras células diferentes de ICC. As marcações duplas com c-Kit e PDGFR $\alpha$  permitiram a identificação de células justapostas, que ocupam os mesmos nichos anatómicos (MP e DMP) mas que são distintas entre si, umas Ano1<sup>+</sup>/c-Kit<sup>+</sup>/PDGFR $\alpha$ <sup>-</sup> (ICC) e outras Ano1<sup>+</sup>/c-Kit<sup>+</sup>/PDGFR $\alpha$ <sup>+</sup> (FLC).

Quanto à caracterização fenotípica das células presentes nas culturas celulares obtidas a partir do intestino delgado de ratazana, foi possível concluir que se trata de uma cultura celular enriquecida em IC, onde predominam células vimentina, actina  $\alpha$  e Ano1 positivas, mas c-kit negativas. Adicionalmente, estas células são imunopositivas para o SK3 e o PDGFR $\alpha$ , marcadores de FLC. Ocasionalmente surgem células isoladas vimentina e/ou actina  $\alpha$  positivas mas Ano1 negativas, compatíveis com fibroblastos e/ou SMC, respetivamente. Este trabalho mostrou pela primeira vez a expressão do marcador Ano1 em culturas celulares.

Tendo conseguido a caracterização imunofenotípica das culturas celulares, o passo seguinte consistiu em caracterizar funcionalmente os subtipos celulares presentes. Para tal, avaliou-se a dinâmica do Ca<sup>2+</sup> intracelular em célula única, por microscopia confocal com sonda fluorescente, em resposta a agonistas específicos. As células da subcultura responderam todas da mesma forma à aplicação de ACh e de ATP, sugerindo tratar-se de uma cultura homogénea. Já as células da cultura primária

responderam de forma diferencial; a maior parte respondeu através de aumentos dos níveis de  $[Ca^{2+}]_i$  à aplicação de ATP (10 e 100  $\mu$ M). Uma das células não respondeu ao ATP e foi a única a responder à aplicação de ACh (10 $\mu$ M), com um aumento elevado dos níveis  $[Ca^{2+}]_i$ . Estes resultados permitem concluir que as culturas primárias realizadas eram enriquecidas provavelmente em FLC (respondem ao ATP), surgindo ocasionalmente células que respondem apenas à ACh, como seria de esperar tratando-se de células musculares.

Julgamos por isso ter cumprido grande parte dos objetivos a que nos propúnhamos, criando um protocolo que permite a caracterização imunofenotípica e funcional de células intersticiais em cultura de intestino delgado de ratazana. Ficam ainda criadas as condições que permitirão num futuro próximo esclarecer quais os recetores colinérgicos e purinérgicos, transportadores de nucleósidos, canais de cálcio (entre outros) expressos nestas células, e de que forma colaboram na neurotransmissão mioentérica.

## VII. Perspetivas Futuras

A implementação de culturas celulares primárias enriquecidas em IC de intestino delgado de ratazana no Laboratório de Farmacologia e Neurobiologia do ICBAS/UP permitirá estudar de forma pormenorizada os vários componentes que integram a neurotransmissão mioentérica.

No sentido de otimizar a técnica agora apresentada, perspectiva-se a curto prazo a avaliação da resposta funcional das células em cultura (alteração dos níveis  $[Ca^{2+}]_i$ ) a vários estímulos (ACh e ATP), seguido da identificação imunofenotípica dessas mesmas células, correlacionado de forma clara função e o fenótipo.

A curto-médio prazo pretende identificar-se determinados alvos moleculares nos vários tipos celulares presentes nas culturas, dando continuidade a estudos funcionais já realizados no laboratório. Esses estudos sugerem que a ativação de recetores muscarínicos  $M_3$  (possivelmente localizados nas IC) poderão dar origem a uma elevação dos níveis extracelulares de ATP (quantificado por bioluminescência) e/ou adenosina (quantificada por HPLC), responsável pela ativação subsequente de recetores excitatório  $A_{2A}$  nos neurónios mioentéricos.

Paralelamente surgem outras questões de igual interesse, como o esclarecimento dos mecanismos envolvidos na libertação e metabolização do ATP e da adenosina a partir das células intersticiais e/ou células musculares e seus mecanismos de regulação.

## VIII. Referências Bibliográficas

1. Costa, M., S.J. Brookes, and G.W. Hennig, *Anatomy and physiology of the enteric nervous system*. Gut, 2000. **47 Suppl 4**: p. iv15-9; discussion iv26.
2. Furness, J.B., *The organisation of the autonomic nervous system: peripheral connections*. Auton Neurosci, 2006. **130**(1-2): p. 1-5.
3. Wilson, A.J., et al., *The source of the nerve fibres forming the deep muscular and circular muscle plexuses in the small intestine of the guinea-pig*. Cell Tissue Res, 1987. **247**(3): p. 497-504.
4. Lomax, A.E. and J.B. Furness, *Neurochemical classification of enteric neurons in the guinea-pig distal colon*. Cell Tissue Res, 2000. **302**(1): p. 59-72.
5. Furness, J.B., *Types of neurons in the enteric nervous system*. J Auton Nerv Syst, 2000. **81**(1-3): p. 87-96.
6. Duarte-Araújo, M., *Endogenous purines as potential pharmacological targets to control myenteric neurotransmission.*, in *Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar*. 2011, Universidade do Porto. p. 162.
7. Ward, S.M., et al., *Pacemaking in interstitial cells of Cajal depends upon calcium handling by endoplasmic reticulum and mitochondria*. J Physiol, 2000. **525 Pt 2**: p. 355-61.
8. Ward, S.M., et al., *Development of interstitial cells of Cajal and pacemaking in mice lacking enteric nerves*. Gastroenterology, 1999. **117**(3): p. 584-94.
9. Horiguchi, K., K.M. Sanders, and S.M. Ward, *Enteric motor neurons form synaptic-like junctions with interstitial cells of Cajal in the canine gastric antrum*. Cell Tissue Res, 2003. **311**(3): p. 299-313.
10. Yamamoto, M., *Electron microscopic studies on the innervation of the smooth muscle and the interstitial cell of Cajal in the small intestine of the mouse and bat*. Arch Histol Jpn, 1977. **40**(3): p. 171-201.
11. Sanders, K.M., S.M. Ward, and S.D. Koh, *Interstitial cells: regulators of smooth muscle function*. Physiol Rev, 2014. **94**(3): p. 859-907.
12. Ramón y Cajal, S., *Histologie du système nerveux de l'homme & des vertébrés*. Vol. v. 1. 1909, Paris :: Maloine.
13. Ward, S.M. and K.M. Sanders, *Physiology and Pathophysiology of the Interstitial Cell of Cajal: From Bench to Bedside I. Functional development and plasticity of interstitial cells of Cajal networks*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2001. **281**: p. G602–G611.

14. Al-Shboul, O.A., *The importance of interstitial cells of cajal in the gastrointestinal tract*. Saudi J Gastroenterol, 2013. **19**(1): p. 3-15.
15. Epperson, A., et al., *Molecular markers expressed in cultured and freshly isolated interstitial cells of Cajal*. Am J Physiol Cell Physiol, 2000. **279**(2): p. C529-39.
16. Huizinga, J.D., et al., *W/kit gene required for interstitial cells of Cajal and for intestinal pacemaker activity*. Nature, 1995. **373**(6512): p. 347-9.
17. Xu, W.D., et al., *Long-term culture and cryopreservation of interstitial cells of Cajal*. Scand J Gastroenterol, 2012. **47**(1): p. 89-98.
18. Wang, Z.Y., et al., *Actin microfilament involved in regulation of pacemaking activity in cultured interstitial cells of Cajal from murine intestine*. J Membr Biol, 2010. **234**(3): p. 217-25.
19. Young, H.M., *Embryological origin of interstitial cells of Cajal*. Microsc Res Tech, 1999. **47**(5): p. 303-8.
20. Mawe, G.M., *Interstitial cells of Cajal in the gut: what makes them tick?* J Physiol, 2009. **587**(Pt 20): p. 4765.
21. Fausone Pellegrini, M.S., C. Cortesini, and P. Romagnoli, *[Ultrastructure of the tunica muscularis of the cardiac portion of the human esophagus and stomach, with special reference to the so-called Cajal's interstitial cells]*. Arch Ital Anat Embriol, 1977. **82**(2): p. 157-77.
22. Komuro, T., *Three-dimensional observation of the fibroblast-like cells associated with the rat myenteric plexus, with special reference to the interstitial cells of Cajal*. Cell Tissue Res, 1989. **255**(2): p. 343-51.
23. Li, C.X., et al., *Dissociation, culture and morphologic changes of interstitial cells of Cajal in vitro*. World J Gastroenterol, 2005. **11**(18): p. 2838-40.
24. Huizinga, J.D., N. Zarate, and G. Farrugia, *Physiology, injury, and recovery of interstitial cells of Cajal: basic and clinical science*. Gastroenterology, 2009. **137**(5): p. 1548-56.
25. Hanani, M., G. Farrugia, and T. Komuro, *Intercellular coupling of interstitial cells of cajal in the digestive tract*. Int Rev Cytol, 2005. **242**: p. 249-82.
26. Sanders, K.M., S.D. Koh, and S.M. Ward, *Interstitial cells of cajal as pacemakers in the gastrointestinal tract*. Annu Rev Physiol, 2006. **68**: p. 307-43.
27. Lees-Green, R., et al., *Biophysically based modeling of the interstitial cells of cajal: current status and future perspectives*. Front Physiol, 2011. **2**: p. 29.
28. Sanders, K.M., S.J. Hwang, and S.M. Ward, *Neuroeffector apparatus in gastrointestinal smooth muscle organs*. J Physiol, 2010. **588**(Pt 23): p. 4621-39.
29. Iino, S. and Y. Nojyo, *Immunohistochemical demonstration of c-Kit-negative fibroblast-like cells in murine gastrointestinal musculature*. Arch Histol Cytol, 2009. **72**(2): p. 107-15.

30. Kurahashi, M., et al., *A functional role for the 'fibroblast-like cells' in gastrointestinal smooth muscles*. J Physiol, 2011. **589**(Pt 3): p. 697-710.
31. Iino, S., et al., *c-Kit-negative fibroblast-like cells express platelet-derived growth factor receptor alpha in the murine gastrointestinal musculature*. Histochem Cell Biol, 2009. **131**(6): p. 691-702.
32. Andrae, J., R. Gallini, and C. Betsholtz, *Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine*. Genes Dev, 2008. **22**(10): p. 1276-312.
33. Kurahashi, M., et al., *Platelet-derived growth factor signals play critical roles in differentiation of longitudinal smooth muscle cells in mouse embryonic gut*. Neurogastroenterol Motil, 2008. **20**(5): p. 521-31.
34. Vanderwinden, J.M., et al., *Kit-negative fibroblast-like cells expressing SK3, a Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel, in the gut musculature in health and disease*. Cell Tissue Res, 2002. **310**(3): p. 349-58.
35. Kurahashi, M., et al., *Platelet-derived growth factor receptor alpha-positive cells in the tunica muscularis of human colon*. J Cell Mol Med, 2012. **16**(7): p. 1397-404.
36. Grover, M., et al., *Platelet-derived growth factor receptor alpha (PDGFRalpha)-expressing "fibroblast-like cells" in diabetic and idiopathic gastroparesis of humans*. Neurogastroenterol Motil, 2012. **24**(9): p. 844-52.
37. Blair, P.J., et al., *The significance of interstitial cells in neurogastroenterology*. J Neurogastroenterol Motil, 2014. **20**(3): p. 294-317.
38. Lee, J.C., et al., *Generation of slow waves in membrane potential is an intrinsic property of interstitial cells of Cajal*. Am J Physiol, 1999. **277**(2 Pt 1): p. G409-23.
39. Komuro, T., *Comparative morphology of interstitial cells of Cajal: ultrastructural characterization*. Microsc Res Tech, 1999. **47**(4): p. 267-85.
40. Mei, F., et al., *Plasticity of interstitial cells of cajal: a study in the small intestine of adult Guinea pigs*. Anat Rec (Hoboken), 2009. **292**(7): p. 985-93.
41. Lennartsson, J. and L. Ronnstrand, *Stem cell factor receptor/c-Kit: from basic science to clinical implications*. Physiol Rev, 2012. **92**(4): p. 1619-49.
42. Zhu, M.H., et al., *A Ca(2+)-activated Cl(-) conductance in interstitial cells of Cajal linked to slow wave currents and pacemaker activity*. J Physiol, 2009. **587**(Pt 20): p. 4905-18.
43. Sanders, K.M., et al., *Anoctamins and gastrointestinal smooth muscle excitability*. Exp Physiol, 2012. **97**(2): p. 200-6.
44. Komuro, T., *Structure and organization of interstitial cells of Cajal in the gastrointestinal tract*. J Physiol, 2006. **576**(Pt 3): p. 653-8.

45. Formey, A., et al., *Identification and functional response of interstitial Cajal-like cells from rat mesenteric artery*. Cell Tissue Res, 2011. **343**(3): p. 509-19.
46. Deng, J., et al., *Identification of T-type calcium channels in the interstitial cells of Cajal in rat bladder*. Urology, 2012. **80**(6): p. 1389.e1-7.
47. Wang, X.Y., et al., *PKC-epsilon translocation in enteric neurons and interstitial cells of Cajal in response to muscarinic stimulation*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2003. **285**(3): p. G593-601.
48. Robinson, T.L., et al., *Gastrointestinal stromal tumors may originate from a subset of CD34-positive interstitial cells of Cajal*. Am J Pathol, 2000. **156**(4): p. 1157-63.
49. Fujita, A., et al., *Expression of Ca(2+)-activated K(+) channels, SK3, in the interstitial cells of Cajal in the gastrointestinal tract*. Am J Physiol Cell Physiol, 2001. **281**(5): p. C1727-33.
50. Zhu, M.H., et al., *Muscarinic activation of Ca<sup>2+</sup>-activated Cl<sup>-</sup> current in interstitial cells of Cajal*. J Physiol, 2011. **589**(Pt 18): p. 4565-82.
51. Iino, S. and Y. Nojyo, *Muscarinic M(2) acetylcholine receptor distribution in the guinea-pig gastrointestinal tract*. Neuroscience, 2006. **138**(2): p. 549-59.
52. Faussone-Pellegrini, M.S., et al., *Alterations of neurokinin receptors and interstitial cells of Cajal during and after jejunal inflammation induced by Nippostrongylus brasiliensis in the rat*. Neurogastroenterol Motil, 2002. **14**(1): p. 83-95.
53. Lavin, S.T., et al., *Activation of neurokinin 1 receptors on interstitial cells of Cajal of the guinea-pig small intestine by substance P*. Histochem Cell Biol, 1998. **110**(3): p. 263-71.
54. Burnstock, G. and S. Lavin, *Interstitial cells of Cajal and purinergic signalling*. Auton Neurosci, 2002. **97**(1): p. 68-72.
55. Van Nassauw, L., et al., *Region-specific distribution of the P2Y4 receptor in enteric glial cells and interstitial cells of Cajal within the guinea-pig gastrointestinal tract*. Auton Neurosci, 2006. **126-127**: p. 299-306.
56. Poole, D.P., et al., *Identification of neurons that express 5-hydroxytryptamine4 receptors in intestine*. Cell Tissue Res, 2006. **325**(3): p. 413-22.
57. Vieira, C., et al., *Muscarinic M(3) facilitation of acetylcholine release from rat myenteric neurons depends on adenosine outflow leading to activation of excitatory A(2A) receptors*. Neurogastroenterol Motil, 2009. **21**(10): p. 1118-e95.
58. Farrugia, G., *Interstitial cells of Cajal in health and disease*. Neurogastroenterol Motil, 2008. **20 Suppl 1**: p. 54-63.
59. Huizinga, J.D. and J.H. Chen, *Interstitial cells of Cajal: update on basic and clinical science*. Curr Gastroenterol Rep, 2014. **16**(1): p. 363.
60. Hartung, T., et al., *Good Cell Culture Practice. ECVAM Good Cell Culture Practice Task Force Report 1*. Altern Lab Anim, 2002. **30**(4): p. 407-14.

61. Ryan, J.A., *Introduction to Animal Cell Culture* C. Incorporated, Editor. 2008.
62. Scientific, C., *Handbook of Primary Cell Culture*, C. Scientific, Editor. 2007.
63. Freshney, R.I., *Basic Principles of Cell Culture*, in *Culture of Cells for Tissue Engineering*, I. John Wiley & Sons, Editor. 2006. p. 3-22.
64. Sula, K., P. Draber, and K. Nouza, *Addition of serum to the medium used for preparation of cell suspensions as a possible source of artifacts in cell-mediated reactions studied by means of the popliteal lymph node test*. *J Immunogenet*, 1980. **7**(6): p. 483-9.
65. Stacey, G.N., *Cell culture contamination*. *Methods Mol Biol*, 2011. **731**: p. 79-91.
66. Koh, S.D., K.M. Sanders, and S.M. Ward, *Spontaneous electrical rhythmicity in cultured interstitial cells of cajal from the murine small intestine*. *J Physiol*, 1998. **513 ( Pt 1)**: p. 203-13.
67. Ro, S., et al., *A model to study the phenotypic changes of interstitial cells of Cajal in gastrointestinal diseases*. *Gastroenterology*, 2010. **138**(3): p. 1068-78.e1-2.
68. Popescu, L.M., et al., *Novel type of interstitial cell (Cajal-like) in human fallopian tube*. *J Cell Mol Med*, 2005. **9**(2): p. 479-523.
69. Kim, S.O., et al., *Spontaneous electrical activity of cultured interstitial cells of cajal from mouse urinary bladder*. *Korean J Physiol Pharmacol*, 2013. **17**(6): p. 531-6.
70. Wright, G.W., S.P. Parsons, and J.D. Huizinga, *Ca<sup>2+</sup> sensitivity of the maxi chloride channel in interstitial cells of Cajal*. *Neurogastroenterol Motil*, 2012. **24**(5): p. e221-34.
71. Kim, B.J., et al., *Effects of histamine on cultured interstitial cells of cajal in murine small intestine*. *Korean J Physiol Pharmacol*, 2013. **17**(2): p. 149-56.
72. Ramos-Vara, J.A., et al., *Suggested guidelines for immunohistochemical techniques in veterinary diagnostic laboratories*. *J Vet Diagn Invest*, 2008. **20**(4): p. 393-413.
73. Chung, H., et al., *Isolation and characterization of smooth muscle cells from rat corpus cavernosum tissue for the study of erectile dysfunction*. *Korean J Urol*, 2012. **53**(8): p. 556-63.
74. Gomez-Pinilla, P.J., et al., *Ano1 is a selective marker of interstitial cells of Cajal in the human and mouse gastrointestinal tract*. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2009. **296**(6): p. G1370-81.
75. Wang, X.Y., et al., *Discrepancies between c-Kit positive and Ano1 positive ICC-SMP in the W/W(v) and wild-type mouse colon; relationships with motor patterns and calcium transients*. *Neurogastroenterol Motil*, 2014. **26**(9): p. 1298-310.
76. Eckardt, D., et al., *Functional role of connexin43 gap junction channels in adult mouse heart assessed by inducible gene deletion*. *J Mol Cell Cardiol*, 2004. **36**(1): p. 101-10.

77. Nemeth, L., S. Maddur, and P. Puri, *Immunolocalization of the gap junction protein Connexin43 in the interstitial cells of Cajal in the normal and Hirschsprung's disease bowel*. *J Pediatr Surg*, 2000. **35**(6): p. 823-8.
78. Gershon, M.D., *The enteric nervous system: a second brain*. *Hosp Pract (1995)*, 1999. **34**(7): p. 31-2, 35-8, 41-2 passim.
79. Hu, L., et al., *Association of Vimentin overexpression and hepatocellular carcinoma metastasis*. *Oncogene*, 2004. **23**(1): p. 298-302.
80. Utsunomiya, T., et al., *Intracellular distribution of intermediate filaments in vimentin-positive gastric carcinomas: confocal laser scanning microscopy using formalin-fixed paraffin-embedded specimens*. *Pathol Res Pract*, 2002. **198**(2): p. 69-76.
81. Duarte-Araujo, M., et al., *Dual effects of adenosine on acetylcholine release from myenteric motoneurons are mediated by junctional facilitatory A(2A) and extrajunctional inhibitory A(1) receptors*. *Br J Pharmacol*, 2004. **141**(6): p. 925-34.
82. Noronha-Matos, J.B., et al., *Role of ecto-NTPDases on UDP-sensitive P2Y(6) receptor activation during osteogenic differentiation of primary bone marrow stromal cells from postmenopausal women*. *J Cell Physiol*, 2012. **227**(6): p. 2694-709.
83. Novotny, G.E. and C. Gnoth, *Variability of fibroblast morphology in vivo: a silver impregnation study on human digital dermis and subcutis*. *J Anat*, 1991. **177**: p. 195-207.
84. Alberts, B., et al., *Molecular Biology of the Cell, 4th edition*. 4th ed. 2002, New York: Garland Science.
85. Kao, C.Y. and M.E. Carsten, *Cellular Aspects of Smooth Muscle Function*. 1997, Cambridge University Press.
86. Gilbert, S.F. and B.R. Migeon, *D-valine as a selective agent for normal human and rodent epithelial cells in culture*. *Cell*, 1975. **5**(1): p. 11-7.
87. Huizinga, J.D., et al., *High-conductance chloride channels generate pacemaker currents in interstitial cells of Cajal*. *Gastroenterology*, 2002. **123**(5): p. 1627-36.
88. Tamada, H. and H. Hashitani, *Calcium responses in subserosal interstitial cells of the guinea-pig proximal colon*. *Neurogastroenterol Motil*, 2014. **26**(1): p. 115-23.
89. Vahabi, B., et al., *The role of c-kit-positive interstitial cells in mediating phasic contractions of bladder strips from streptozotocin-induced diabetic rats*. *BJU Int*, 2011. **107**(9): p. 1480-7.
90. Horiguchi, K. and T. Komuro, *Ultrastructural characterization of interstitial cells of Cajal in the rat small intestine using control and Ws/Ws mutant rats*. *Cell Tissue Res*, 1998. **293**(2): p. 277-84.
91. Chen, H., et al., *Differential gene expression in functional classes of interstitial cells of Cajal in murine small intestine*. *Physiol Genomics*, 2007. **31**(3): p. 492-509.

92. West, R.B., et al., *The novel marker, DOG1, is expressed ubiquitously in gastrointestinal stromal tumors irrespective of KIT or PDGFRA mutation status*. *Am J Pathol*, 2004. **165**(1): p. 107-13.
93. Hwang, S.J., et al., *Expression of anoctamin 1/TMEM16A by interstitial cells of Cajal is fundamental for slow wave activity in gastrointestinal muscles*. *J Physiol*, 2009. **587**(Pt 20): p. 4887-904.
94. Zeng, F., et al., *GPR39 is coupled to TMEM16A in intestinal fibroblast-like cells*. *PLoS One*, 2012. **7**(10): p. e47686.
95. Unno, T., et al., *M(2) and M(3) muscarinic receptor-mediated contractions in longitudinal smooth muscle of the ileum studied with receptor knockout mice*. *Br J Pharmacol*, 2005. **146**(1): p. 98-108.
96. Eglen, R.M., *Muscarinic receptors and gastrointestinal tract smooth muscle function*. *Life Sci*, 2001. **68**(22-23): p. 2573-8.
97. Hirshman, C.A., B. Lande, and T.L. Croxton, *Role of M2 muscarinic receptors in airway smooth muscle contraction*. *Life Sci*, 1999. **64**(6-7): p. 443-8.
98. Duarte-Araujo, M., et al., *Relative contribution of ecto-ATPase and ecto-ATPDase pathways to the biphasic effect of ATP on acetylcholine release from myenteric motoneurons*. *Br J Pharmacol*, 2009. **156**(3): p. 519-33.
99. So, K.Y., et al., *Carbachol regulates pacemaker activities in cultured interstitial cells of Cajal from the mouse small intestine*. *Mol Cells*, 2009. **27**(5): p. 525-31.