

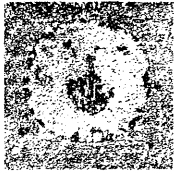
LUCIANA DE FÁTIMA CHAVES DE MELLO

ESTUDO DO MECANISMO DE RECRUTAMENTO DE MASTÓCITOS PARA SÍTIOS PERIFÉRICOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular, do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biologia Celular.

Orientadora: Prof.^ª Dr.^ª Maria Célia Jamur

CURITIBA
2000



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR

Departamento de Biologia Celular
Setor de Ciências Biológicas
Universidade Federal do Paraná

PARECER

A Comissão Examinadora de Dissertação de Mestrado
“ **ESTUDO DO MECANISMO DE RECRUTAMENTO DE MASTÓCITOS PARA
SÍTIOS PERIFÉRICOS**”, de autoria da Pós-Graduanda Luciana de Fátima
Chaves de Mello, e composta pelos Professores: Dra. Maria Célia Jamur;
(como Orientador e Presidente); Dr. Itamar Vugman (~~F~~MRP); Dra. Márcia Helena
Mendonça (UFPR). atribui individualmente as seguintes notas: Dra. Mária Célia
Jamur nota 10 (dez); Dr. Itamar Vugman; nota, 10 (dez); Dra.
árcia Helena Mendonça,. Nota 10 (dez). De acordo com o Regimento
interno do Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular, a candidata
foi: aprovada com a nota 10 dez (com louros), para a devida
publicação o trabalho deve sofrer as modificações sugeridas. Em Curitiba, 18 de
Fevereiro de dois mil.

Dra. Maria Célia Jamur

Dr. Itamar Vugman

Dra. Márcia Helena Mendonça

“Cada um de nós compõe a sua própria história, cada ser, em si, carrega o dom de ser capaz, de ser feliz.”

(Almir Satter & Renato Teixeira)

Aos meus pais, Osmir e Maria de Lourdes, que sempre me estimularam e ajudaram, com toda a dedicação, para que este trabalho se realizasse. Obrigada pelo carinho, paciência e amor devotados ao longo de toda a minha vida e desculpem-me se às vezes não consigo demonstrar todo o amor que sinto.

A Ricardo, meu namorado, que está sempre ao meu lado, dando forças para continuar e que tantas vezes não me deixou desistir depois de tanta luta. Obrigada por me fazer pensar sobre as coisas que realmente importam na vida. Seu amor e carinho são fundamentais para a minha vida.

À Prof^a. Dr^a. Maria Célia Jamur, minha orientadora, pela sua competência, dedicação e conhecimento, sem os quais não seria possível a realização deste trabalho. Obrigada pela oportunidade e pela paciência com que conduziu estes anos de mestrado.

AGRADECIMENTOS

À Dr^a. Constance Oliver, pelo auxílio na parte estatística e confecção de gráficos e pranchas. Suas sugestões foram de fundamental importância para a realização deste trabalho.

À amiga Joice Maria da Cunha, pela amizade cultivada desde os tempos de graduação. “Amigo é aquele que sabe entender o silêncio e manter a presença, mesmo quando ausente” . Obrigada por tudo.

À Ana Cristina Grodzki, pela grande ajuda prestada durante a elaboração desta tese e por ter me recebido em sua casa, junto com a Joice e a Débora, durante o tempo que estive na USP, em Ribeirão Preto.

À Andréa Novaes Moreno, pelo incentivo e pela ajuda oferecida nos momentos aflitos. Obrigada pelos bons momentos proporcionados por sua alegria e por suas palavras, que me reerguiam nos momentos em que tudo parecia errado.

À Mariana da Rocha Piemonte, Carlos Alberto Miquelotto e demais colegas do Curso de Pós-Graduação pela amizade e cumplicidade nos momentos difíceis.

Às meninas do laboratório de Embriologia do Departamento de Biologia Celular da UFPR: Verônica, Sônia, Fabiana, Marisa e Renata. Obrigada pelos momentos divertidos vividos durante estes dois anos.

À Prof^a Carla Wanderer, que muito ajudou nas aulas ministradas em Palotina, cedendo gentilmente seu material. Obrigada pela amizade que nasceu aos poucos e por me orientar nesta nova fase da minha vida.

Aos professores do Departamento de Biologia Celular da UFPR, em especial a Cecília Beatriz Niederheitmann, Marco Antônio Ferreira Randi e Luís Fernando Fávaro pela amizade e pelo apoio prestado durante este tempo em que me dividi entre a preparação de aulas e a confecção desta tese.

À Cláudia Feijó Ortolani-Machado e Roberta Feijó Ortolani pela amizade e apoio.

Aos professores e funcionários do Campus de Palotina da UFPR, Prof. Waldir, Jovanir, Cibele, Vânia, Luciano e Milton, pela amizade e pelo convívio agradável.

Aos alunos de Medicina Veterinária do Campus de Palotina da UFPR, que muito me ensinaram nestes meses de convivência e que me receberam com respeito e carinho.

Às secretárias Gerizalda Guimarães Julião Bernardo e Marlene Bonifácio Camargo, pela atenção, cooperação e presença nos momentos de dificuldade.

Ao Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular, Prof. Dr. Ciro Alberto de Oliveira Ribeiro, pelo apoio financeiro conseguido junto à PRPPG, sem o qual não seria possível minhas várias viagens e permanência em Ribeirão Preto. Obrigada também pela amizade e pelas palavras que tantas vezes me reanimaram quando alguns problemas pareciam não ter solução.

À PRPPG, pelas passagens e auxílio financeiro cedidos.

À minha irmã Deizy, pela presença constante e por ceder sua impressora para fazer tantas cópias de um trabalho que nunca mais parava de ser corrigido.

Aos meus sobrinhos, Carolina e Cássio, em especial Mariana, que deu à nossa família mais um motivo de felicidade, Amanda.

Aos meus sogros, Dona Wilma e Seu Roland, a quem eu considero como segundos pais. Obrigada pela convivência diária, que me faz acreditar que é possível viver de maneira feliz, mesmo diante das dificuldades.

Aos amigos de todo dia: Martina, Claus, Bia, Marlon, Lauren, Tetê, Carol, Guilherme, Eduardo, Mysheil, Andréa, Luís Fernando e tantos outros, que sempre se interessaram e acharam o máximo eu estar fazendo mestrado, enquanto eu nem sempre achava a mesma coisa. Obrigada pela amizade, presença e alegria!

À CAPES, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pela bolsa de mestrado concedida.

Ao Departamento de Morfologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP, pelo uso de seus laboratórios e equipamentos durante o desenvolvimento deste trabalho.

Aos técnicos do Departamento de Morfologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP, Márcia Sirlene Zardin Graeef, Domingos Soares de Souza, Vani M. A. Corrêa e Izilda Rodrigues Violante pelo auxílio prestado.

SUMÁRIO

Lista de Figuras.....	viii
Resumo.....	ix
Summary.....	x
I – Revisão de Literatura.....	1
II – Objetivos.....	12
III – Material e Métodos.....	13
IV – Resultados.....	17
V – Figuras.....	20
VI – Discussão.....	28
VII - Conclusões.....	34
Anexos.....	35
Referências Bibliográficas.....	41

LISTA DE FIGURAS

FIGURAS	PÁGINA
01- Obtenção de células da medula óssea.....	20
02 - Esquema demonstrando o processo de conjugação de anticorpos às esferas magnéticas tosiladas.....	21
03 – Separação Imunomagnética.....	22
04 – Separação da população de células positivas e negativas da medula óssea, utilizando o mAb BGD6 conjugado às esferas magnéticas.....	23
05 – Mesentério de rato.....	24
06 – Mastócitos do mesentério de rato colhido 48 horas após os tratamentos.....	25
07 – Mastócitos do mesentério de rato corados com Azul de Toluidina.....	26
08 – Imunomarcação da população de mastócitos da medula óssea com o mAb BGD6.....	27

RESUMO

Os grânulos citoplasmáticos dos mastócitos contêm inúmeras substâncias que, quando liberadas, participam das respostas alérgicas e inflamatórias. A liberação de tais substâncias está relacionada com o estímulo dos mastócitos, que ocorre quando os receptores de alta afinidade (FC ϵ RI) para imunoglobulina E (IgE) são interligados ou, também, de maneira independente dos FC ϵ RI, através da ação de substâncias como o composto 48/80, que causa a desgranulação dos mastócitos de forma não-citotóxica. A lise dos mastócitos pela água destilada causa a liberação apenas dos mediadores pré-formados contidos nos grânulos dos mastócitos, tais como a histamina, a heparina, o fator quimiotático para eosinófilos na anafilaxia (ECF-A) e proteases. A desgranulação causada pela anti-IgE ou pelo composto 48/80, além destes fatores, também libera os mediadores neo-formados, como os leucotrienos, prostaglandinas e citocinas. Os mecanismos de diferenciação e crescimento dos mastócitos e de seus precursores são determinados pela ação de fatores de crescimento e outras interleucinas, porém, não se conhece exatamente quais os fatores que estão envolvidos no recrutamento dos mastócitos da medula óssea. Para investigar se os mediadores químicos pré-formados e neo-formados liberados pelos mastócitos participam do processo de recrutamento destas células da medula óssea, ratos foram injetados intraperitonealmente com água destilada, que causa lise dos mastócitos, com anti-IgE e com o composto 48/80, que causam a desgranulação dos mastócitos de forma dose-dependente. Os mastócitos da medula óssea foram isolados com esferas magnéticas conjugadas ao mAb BGD6, específico para mastócitos. A população de mastócitos da medula óssea obtida de animais controle varia entre 2,38% e 2,5%. A diminuição da população de mastócitos da medula óssea observada 48 horas após a injeção intraperitoneal de água destilada, anti-IgE e composto 48/80, ocorre de maneira equivalente nos três tratamentos: 0,6%; 0,75% e 0,41%, respectivamente. Animais também foram injetados com o fator estimulador de colônias de granulócito (G-CSF) e o fator estimulador de colônias de granulócito/macrófago (GM-CSF), os quais não provocaram desgranulação dos mastócitos peritoneais e não promoveram redução na população de mastócitos da medula óssea. O G-CSF promoveu um aumento da população de mastócitos da medula óssea (5,48%) e induziu o aparecimento de mastócitos imaturos no mesentério. O GM-CSF não alterou a população de mastócitos da medula óssea, que manteve o mesmo número de células encontrado nos controles. Os resultados sugerem que os compostos pré-formados liberados pelos mastócitos são suficientes para recrutar estas células e seus precursores da medula óssea.

SUMMARY

Mast cell cytoplasmic granules contain numerous substances that when released participate in allergic and inflammatory responses. Mast cell granules may be released when the mast cells are activated by cross-linking of the high affinity IgE receptor (FC ϵ RI), or in an FC ϵ RI independent manner by substances such as Compound 48/80 that cause the non-cytotoxic degranulation of mast cells. The lysis of mast cells by distilled water results in the release of only the preformed mediators such as histamine, heparin, chemotactic factor for eosinophils in anaphylaxis (ECF-A) and proteases. When mast cells are degranulated by anti-IgE or by Compound 48/80, in addition to releasing the pre-formed factors, the cells also release newly formed mediators such as leukotrienes, prostaglandins and cytokines. Although the growth and differentiation of mast cells and their precursors are controlled by the action of growth factors and other interleukines, it is not known exactly which factors are involved in the recruitment of mast cells from the bone marrow to peripheral sites. In order to investigate whether the pre-formed or newly formed mediators released by mast cells play a role in the recruitment of mast cells from the bone marrow, rats were injected intraperitoneally with distilled water which lyses the mast cells or with anti-IgE or with Compound 48/80 both of which degranulate the mast cells in a dose dependent fashion. Mast cells were isolated from the bone marrow by immunomagnetic isolation using magnetic beads conjugated with the mast cell specific antibody mAb BGD6. In control animals, between 2.38% and 2.5% of the cells in the bone marrow were mast cells. Intraperitoneal injection with distilled water, anti-IgE or Compound 48/80, all resulted in a similar diminution (0.6%; 0.75% and 0.41%) of mast cells in the bone marrow. Animals were also injected with two growth factors, granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) and granulocyte/macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF) that do not stimulate mast cell degranulation. No reduction in the number of mast cells in the bone marrow was observed with either factor. However, intraperitoneal exposure to G-CSF causes an increase in the number of mast cells in the bone marrow (5.48%) and increased the number of immature mast cells in the mesentery. After exposure to GM-CSF, the number of mast cells seen in the bone marrow and in the mesentery was the same as that seen in control animals. Our results suggest that the pre-formed mediators released by mast cells are sufficient to recruit mast cells and their precursors from the bone marrow.

I – REVISÃO DE LITERATURA

REVISÃO DE LITERATURA

Mastócitos são células do tecido conjuntivo que participam do sistema imune. Estas células são encontradas, principalmente, nos tecidos subcutâneos e nas mucosas. Os mastócitos desenvolvem um importante papel nos processos alérgicos, inflamatórios, na reparação de tecidos e na defesa do hospedeiro contra parasitas (GALLI, 1990; SCHWARTZ & KEPLEY, 1994; METCALF et al., 1997).

Os mastócitos possuem grânulos citoplasmáticos que se apresentam metacromáticos quando corados com corantes básicos, tais como o azul de toluidina. Através da metacromasia, EHRLICH (1877) pode identificar e classificar os mastócitos como células próprias do tecido conjuntivo. Os grânulos dos mastócitos apresentam metacromasia devido à presença, no seu interior, de uma glicosaminoglicana sulfatada: a heparina. Além da heparina, estão armazenados nos grânulos vários outros mediadores químicos pré-formados, como a histamina, o fator quimiotático para eosinófilos na anafilaxia (ECF-A), as proteases (SCHWARTZ & AUSTEN, 1984; SIRAGANIAN, 1988; NILSSON & METCALF, 1996), a IL-16 (CENTER et al., 1997; RUMSAENG, et al., 1997) e a IL-8 (GRÜTZKAU et al., 1997) que são liberados alguns segundos após a estimulação dos mastócitos. Recentemente, foi demonstrado por DE PAULI e cols. (1999) que o “*Stem Cell Factor*” (SCF) é também armazenado em grânulos secretores de mastócitos e que pode ser liberado sem perder seu efeito biológico sobre mastócitos. Estas células também secretam fatores neo-formados, derivados do metabolismo do ácido araquidônico, como as prostaglandinas e a substância de reação lenta da anafilaxia (SRS-A) ou leucotrienos (LEWIS & AUSTEN, 1981; SCHWARTZ & AUSTEN, 1984). Ainda, algumas horas após o estímulo, os mastócitos produzem e liberam outras interleucinas e outros fatores de crescimento (MURAKAMI et al., 1995), como o fator estimulador de colônias granulócito/macrófago (GM-CSF) (WODNAR-FILIPOWICZ et al., 1989; OKAYAMA et al., 1998) e o fator transformante de crescimento (TGF- β) (GRUBER et al., 1994).

Embora os mastócitos sejam células residentes do tecido conjuntivo, experimentos indiretos realizados *in vivo* e *in vitro* mostram que estas células são derivadas de tecidos hematopoiéticos (KITAMURA, et al., 1979; GALLI, et al., 1984; GALLI, 1990). Os mastócitos

e seus precursores podem migrar livremente, mas dificilmente são encontrados na corrente sanguínea (HUFF et al., 1995; SMITH & WEIS, 1996). Através de experimentos com camundongos *W/W* geneticamente deficientes em mastócitos, foi demonstrado que estas células se originam de células multipotentes hematopoiéticas (KITAMURA et al., 1981; SHRADER et al., 1981; NAKAHATA et al., 1982). Células sanguíneas mononucleares obtidas do sangue de camundongo selvagem foram injetadas diretamente na pele de camundongo congênito *W/W* e mastócitos apareceram nos pontos de injeção. Esta observação sugere que os precursores de mastócitos migram, através da corrente sanguínea, da medula óssea para o tecido conjuntivo, onde proliferam e se diferenciam em mastócitos maduros (HATANAKA et al., 1979; KITAMURA et al., 1979; KITAMURA et al., 1993). Segundo NILSSON & METCALF (1996) e GALLI & LANTZ (1999), os mastócitos se originam do sistema hematopoiético a partir de células multipotentes CD-34 positivas, capazes de originar linfócitos, eritrócitos, megacariócitos, basófilos, neutrófilos, eosinófilos e monócitos. O precursor comprometido a originar mastócitos circula no sangue, expressa CD-34 e o receptor (c-kit) para o "stem cell factor" (SCF), mas ainda não expressa o FCεRI na superfície celular (ROTTEM et al., 1994b).

Em roedores, duas populações fenotipicamente distintas de mastócitos podem ser encontradas: os mastócitos de tecido conjuntivo (CTMC), presentes na pele e cavidade peritoneal e os mastócitos de mucosa (MMC), presentes principalmente na lâmina própria intestinal (ASKENASE, 1980). Estes fenótipos específicos de mastócitos são determinados pelos fatores de diferenciação presentes em cada tecido. Estudos *in vitro* sugerem que os MMC têm sua diferenciação regulada pela interleucina-3 (IL-3), uma citocina produzida, geralmente, por linfócitos T. Já os CTMC requerem, principalmente, o SCF (c-kit ligante) para a sua diferenciação, o qual é produzido por células endoteliais e outras células do estroma, como os fibroblastos (VALENT, 1994).

Os mastócitos possuem receptores de alta afinidade (FCεRI) para a imunoglobulina E (IgE) presentes em sua superfície. As moléculas de IgE se ligam aos receptores através de sua porção Fc (ISHIZAKA & ISHIZAKA, 1984). Quando antígenos específicos se ligam às moléculas de IgE, que estão ligadas à superfície dos mastócitos através da subunidade α do FCεRI, provocam a ligação cruzada dos receptores da superfície celular, levando à desgranulação dos mastócitos e liberação de substâncias pré e neo-formadas. Os

receptores FC ϵ RI possuem três subunidades: α , β e γ , sendo que a subunidade α , exposta na superfície da membrana, contém o sítio de ligação para a IgE (METZGER, 1992). Apesar de conter o sítio de ligação para a IgE, a subunidade α não parece desempenhar um papel importante na transdução do sinal por possuir um curto domínio intracitoplasmático. A subunidade β é que possui uma sequência de aminoácidos tirosina chamada de sequência para ativação de tirosinas, que sofre uma rápida fosforilação pela tirosina-quinase logo após a agregação dos FC ϵ RI (HAMAWY et al., 1995). A seguir, se inicia a fosforilação da proteína G, que estimula a fosforilação da fosfolipase C (PLC), formando fosfatidilinositol 4,5-difosfato (IP3) e diacilglicerol (DAG). A formação destas substâncias leva à ativação de outras proteínas quinase e mobilização intracelular de cálcio, resultando na desgranulação dos mastócitos e consequente liberação do conteúdo dos grânulos citoplasmáticos (ARAI et al., 1995; HAMAWY, et al., 1995). A fosfolipase A₂ (PLA₂) pode ser ativada pela proteína G, pelo DAG ou ainda pelo aumento da concentração de cálcio intracelular. A PLA₂ libera o ácido araquidônico dos fosfolípidos de membrana. O ácido araquidônico possui duas vias de metabolização: a via da cicloxigenase, que origina prostaglandinas (PGs) e tromboxanos, e a via da lipoxigenase, que origina os ácidos hidroxicicosatetraenóicos (HETEs) e leucotrienos (LTs) (HAMAWY et al., 1995; MURAKAMI et al., 1995). O diagrama 1 resume os passos utilizados no mecanismo de desgranulação do mastócito através do FC ϵ RI.

Além da desgranulação desencadeada através da ativação do mastócito pela ligação cruzada dos receptores de IgE, agentes como o composto 48/80 também podem causar a desgranulação dos mastócitos. A desgranulação causada pelo composto 48/80 não é citotóxica, mantendo a integridade da membrana plasmática e liberando histamina de maneira dose-dependente (BLOOM & HAEGERMARK, 1965; JOHNSON & MORAN, 1969; SIRAGANIAN, 1988). Esta desgranulação envolve a ativação direta de proteínas G através da inserção de anéis aromáticos do composto 48/80 na membrana da célula, o que culmina com a produção dos produtos originados do metabolismo do ácido araquidônico e de citocinas (MOUSLI et al., 1990a; MOUSLI et al., 1990b). O mecanismo de ativação do mastócito pelo composto 48/80 está sumarizado no diagrama 2.

A produção de citocinas, como a IL-3, IL-4, IL-5 e IL-6, do fator estimulador de colônias granulócito-macrófago (GM-CSF) e do fator ativador de plaquetas (PAF), depende

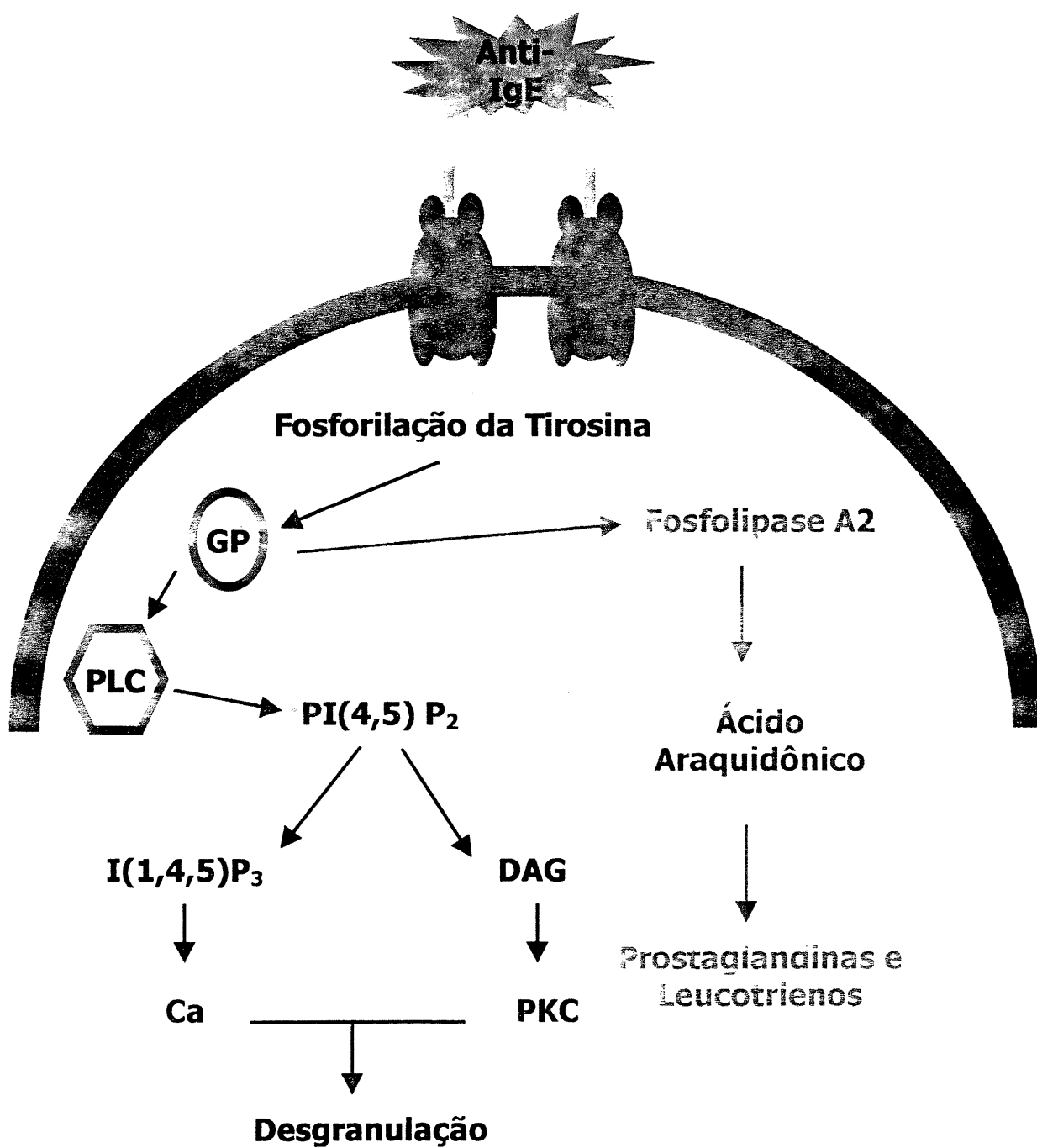


Diagrama 1 - A interligação dos receptores de IgE resulta na desgranulação dos mastócitos e produção de prostaglandinas e leucotrienos.

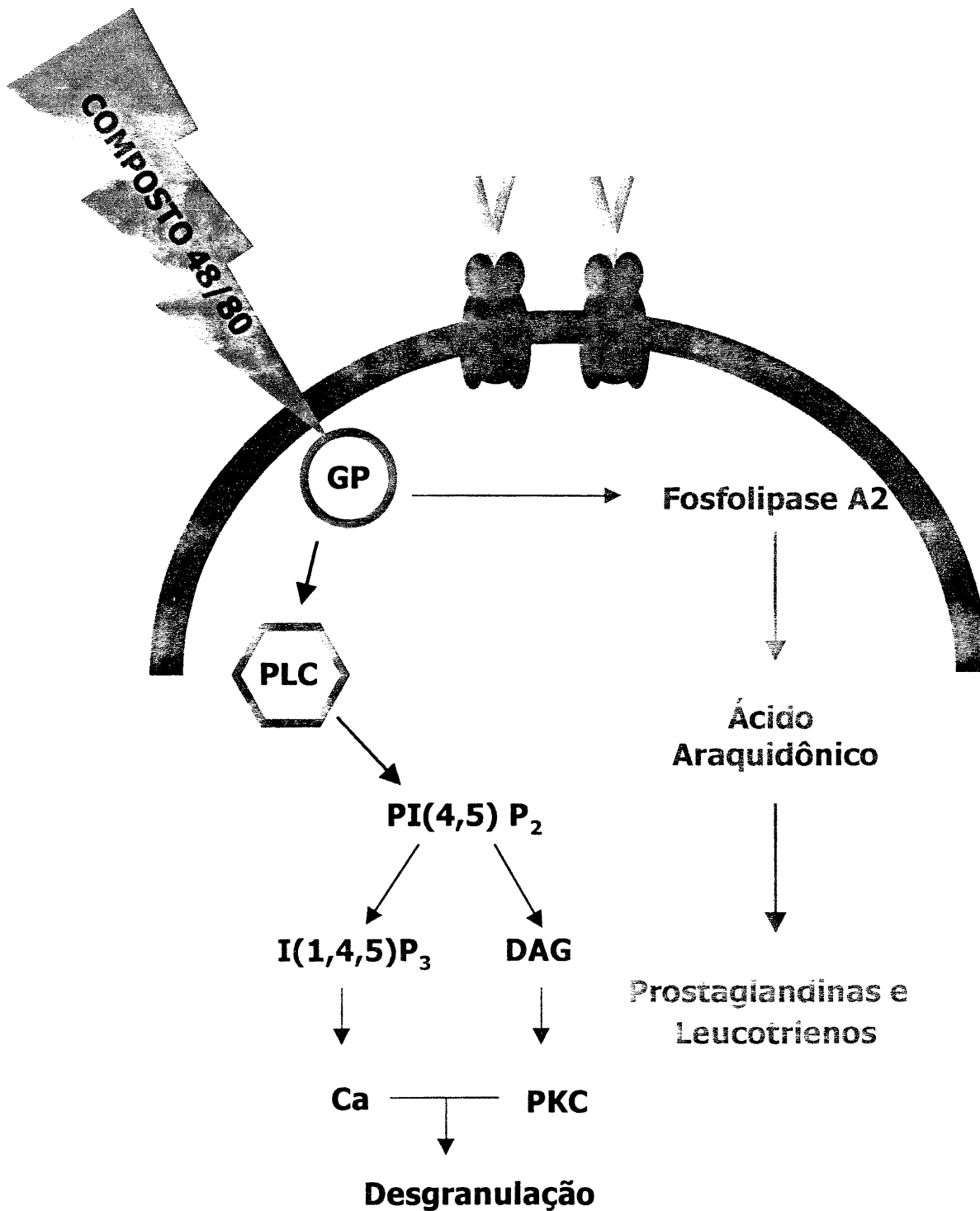


Diagrama 2 - A estimulação dos mastócitos pelo composto 48/80 ocorre pela ativação direta da proteína G, independente do receptor para IgE (FcεRI). Os mediadores pré-formados e neo-formados produzidos e liberados são os mesmos obtidos pelo estímulo através do receptor.

da ativação de duas vias de sinalização: a das proteínas quinase e a dependente de cálcio. A síntese destas substâncias, que são recém-sintetizadas, ocorre de 8 a 12 horas após a desgranulação dos mastócitos. Ainda, algumas citocinas produzidas podem estar envolvidas na indução da formação dos RNAm para enzimas responsáveis pela produção das prostaglandinas e dos leucotrienos (ARAI et al., 1995; MURAKAMI et al., 1995; HAMAWY et al., 1995; NILSSON & METCALF, 1996).

Os mediadores pré-formados, neo-formados e recém-sintetizados, liberados pelos mastócitos, são os responsáveis pela função destas células nas reações inflamatórias e processos imunológicos (SCHWARTZ & KEPLEY, 1994). Um dos principais papéis dos produtos liberados pelos mastócitos nas reações inflamatórias é induzir a vasodilatação, aumentando a permeabilidade vascular e, conseqüentemente, facilitando a difusão de proteínas plasmáticas e a passagem de células de defesa sanguíneas para o tecido conjuntivo. A vasodilatação é provocada pela histamina liberada pelos grânulos citoplasmáticos, que além de desempenhar esta função, também age como fator quimiotático, juntamente com outros mediadores pré-formados, como o ECF-A. Os mediadores neo-formados que possuem função quimiotática são a prostaglandina D₂ (PGD₂), o leucotrieno B₄ (LTB₄), o PAF, o fator quimiotático e de ativação de macrófagos (MCAF) e RANTES, que orientam a migração de neutrófilos, eosinófilos, monócitos e linfócitos para os sítios de inflamação (LEWIS & AUSTEN, 1981; SCHWARTZ & AUSTEN, 1984; NILSSON & METCALF, 1996).

Alguns fatores recém-sintetizados liberados pelos mastócitos podem regular a diferenciação dos próprios mastócitos, como é o caso da IL-3. Porém, a IL-3, apenas, não age na diferenciação dos mastócitos, sendo necessária a presença de outros fatores, como o SCF, para sua diferenciação (TSAI et al., 1991; METCALF et al., 1997).

A IL-3 é uma glicoproteína com peso molecular de 28000 Da e é liberada *in vivo* principalmente por linfócitos T ativados (FUNG et al., 1984). Esta citocina age como um fator de crescimento que, *in vitro*, promove a proliferação e diferenciação de progenitores hematopoiéticos de várias linhagens e age, também, como um potente fator de crescimento de precursores de mastócitos (SIRAGANIAN, 1988; VALENT et al., 1991). A presença de IL-3 em cultura de células da medula óssea de camundongos causa o desenvolvimento e a proliferação de colônias de mastócitos, quatro dias após o início da cultura. Experimentos

realizados por KANAKURA e cols. (1988), utilizando mastócitos peritoneais que continham grânulos metacromáticos em seu citoplasma, classificados fenotipicamente como CTMC, demonstraram que a presença de IL-3 e IL-4 no meio de cultura induz nestas células uma perda gradual das características de CTMC, que passam a expressar características de MMC. A adição das IL-4, IL-9 e IL-10 potencializa a proliferação dos mastócitos que é suportada, primeiramente, pela IL-3. Entretanto, um meio de cultura condicionado por células do baço contendo IL-3, IL-4, IL-9 e IL-10 é muito mais eficiente na proliferação dos mastócitos derivados da medula óssea em relação a um meio contendo somente a IL-3 (IHLE et al., 1983; KITAMURA et al., 1993). Outros autores, como TSAI e cols. (1991), ROTTEM e cols. (1994a) e METCALF e cols. (1997), também descrevem o sinergismo da IL-3 com as IL-4, IL-9 e IL-10 e com o fator de crescimento SCF, na proliferação de mastócitos derivados da medula óssea.

O SCF é um fator de crescimento produzido tanto como uma proteína transmembrana quanto na forma solúvel, e foi identificado como sendo o ligante para o receptor c-kit, o qual pertence à família de receptores tirosina quinase tipo III. O c-kit é encontrado na maioria das células CD-34 positivas da medula óssea, sendo os mastócitos as únicas células da linhagem hematopoiética a expressar o c-kit de maneira significativa quando maduras (GALLI et al., 1993; LANTZ & HUFF, 1995; ASHMAN, 1999). Este fator induz a diferenciação de mastócitos, orienta a migração dos precursores de mastócitos, induz a liberação de mediadores e a adesão destas células ao tecido conjuntivo (NILSSON et al., 1994; VALENT, 1994). Experimentos desenvolvidos por LANTZ & HUFF (1995), demonstraram que apenas o SCF não é capaz de suportar o crescimento de colônias de mastócitos. Para isso, células da medula óssea agranuladas, negativas para marcadores de linfócitos, monócitos e granulócitos, mas positivas para o c-kit, foram cultivadas na presença do SCF apenas ou em associação com IL-3, IL-4 e IL-9. Um número significativo de colônias de mastócitos desenvolveu-se na presença de SCF e IL-3 e células metacromaticamente coradas apareceram de forma surpreendente, em culturas contendo SCF e IL-9. A associação da IL-4 com o SCF não resultou no aparecimento de colônias de mastócitos. Entretanto, KARIMI e cols. (1999), também demonstrando a impossibilidade de se obter mastócitos a partir de células cultivadas somente na presença do SCF, obtiveram resultados nos quais a adição de IL-4 ao meio contendo SCF estimulou a expressão do c-

kit e do FC ϵ RI de maneira dose-dependente, o que veio a tornar possível o crescimento e o desenvolvimento dos mastócitos.

Com o objetivo de recrutar um número suficiente de células fonte CD-34 positivas da medula óssea para a corrente sanguínea, vários fatores de crescimento vêm sendo utilizados clinicamente no tratamento de pacientes que sofrem distúrbios hematopoiéticos, como o G-CSF e o GM-CSF. Nestes tratamentos, os fatores de crescimento são administrados por 4 a 5 dias em doadores saudáveis, facilitando a obtenção de células CD-34 positivas que serão utilizadas no transplante de medula óssea. Os melhores resultados nos transplantes foram obtidos com a administração de G-CSF em associação com SCF, indicando a capacidade proliferativa destes fatores sobre as células fonte hematopoiéticas. Entretanto, pacientes tratados com G-CSF ou GM-CSF apresentam reações de hipersensibilidade mediada por IgE, sendo essencial que se elimine estas reações para que o tratamento tenha continuidade (COSTA, 1998).

O G-CSF e o GM-CSF são produzidos por células do tecido conjuntivo ou por células do sistema imune ativadas, inclusive células T e mastócitos, estes, estimulados através do FC ϵ RI (WODNAR-FILIPOWICZ, et al., 1989; VALENT et al., 1991; OKAYAMA, et al., 1998). Estes fatores mielopoiéticos, em concentrações menores do que aquelas requeridas para a proliferação, são capazes de estimular aspectos funcionais de granulócitos, eosinófilos e macrófagos maduros, tais como sobrevivência, mobilidade celular, atividade fagocítica, síntese de moléculas biologicamente ativas e a expressão de marcadores de membrana (METCALF, 1986).

O G-CSF é uma glicoproteína produzida por vários tipos celulares e, segundo COSTA (1998), estimula a proliferação e diferenciação de neutrófilos a partir de seus progenitores e também potencializa a função destas células quando maduras. Porém, METCALF & NICOLA (1983), relatam que o G-CSF também está envolvido na proliferação de progenitores multipotentes e eritróides. De acordo com OGAWA (1993), o G-CSF estimula a proliferação e maturação de precursores de neutrófilos, ao mesmo tempo que pode, também, iniciar a proliferação de células precursoras dormentes. Além disso, juntamente com o SCF e a IL-3, o G-CSF também pode garantir a sobrevivência de células fonte hematopoiéticas *in vitro* (BODINE et al., 1991; ITOH et al., 1992). Experimentos realizados por TAKAUE e cols. (1990), demonstraram que o G-CSF influi na diferenciação

de progenitores hematopoiéticos imaturos, tornando-os responsivos à IL-3, e em consequência, orientado-os para determinadas linhagens, onde poderão continuar respondendo ao G-CSF ou então, passar a responder ao GM-CSF. Ainda, METCALF em 1986, demonstrou que o G-CSF pode iniciar a proliferação de precursores da linhagem granulócito-macrófago (GM), mas não é capaz de suportar o desenvolvimento destas células após 2 ou 4 semanas. Trabalhos realizados por YANG e cols. (1998), demonstraram que o G-CSF promove o desenvolvimento de precursores hematopoiéticos *in vivo*, porém sem induzir sua diferenciação para a linhagem mielóide.

O GM-CSF induz a proliferação de progenitores hematopoiéticos em seus primeiros estágios, estimula a diferenciação de várias linhagens mielóides, regula as funções de células maduras e estimula a proliferação de progenitores CD-34 positivos (SONODA, et al., 1994; WESSELY, et al., 1998). O GM-CSF pode, ainda, suportar o crescimento de megacariócitos e mastócitos (NISHIJIMA, et al., 1997). Experimentos realizados com mastócitos humanos da linhagem H1 demonstraram que o GM-CSF produzido por estas células parece ter grande participação na indução e manutenção das respostas alérgicas e inflamatórias, já que os mastócitos aumentam a produção deste fator quando estimulados pela IgE (WODNAR-FILIPOWICZ et al., 1989; OKAYAMA et al., 1998). Observações semelhantes foram feitas por PLUZNICK e cols. (1984), em experimentos com mastócitos de camundongos da linhagem PT18, nos quais o GM-CSF estimulou a proliferação de mastócitos. O GM-CSF apenas, ou em associação com a IL-3 e SCF, aumenta a produção de precursores da linhagem granulocítica (OGAWA, 1993), inclusive mastócitos, como é citado por NISHIJIMA e cols. (1995). Estes autores demonstram a capacidade do hGM-CSF (GM-CSF humano) de formar colônias de mastócitos de maneira muito semelhante à IL-3. Entretanto, em experimentos nos quais o rmGM-CSF (GM-CSF recombinante de camundongo) foi adicionado a células de medula óssea cultivadas em meio contendo rmIL-3 ou rmSCF (SCF recombinante de camundongo), o desenvolvimento de mastócitos foi bloqueado, sugerindo que esta citocina pode desviar os potenciais precursores de mastócitos para outras linhagens (BRESSLER et al., 1989; ROTTEM et al., 1994a; DU et al., 1997). Experimentos realizados por DU e cols. (1997), com células precursoras do fígado fetal, sugerem que o rhGM-CSF (GM-CSF recombinante humano) age muito mais sobre os precursores de mastócitos do que sobre os mastócitos imaturos. Estes mesmos

pesquisadores, em 1997, também demonstraram que o rhGM-CSF não interfere na expressão do c-kit pelos mastócitos, apesar de atenuar o desenvolvimento destas células se adicionado à cultura de células precursoras antes da adição do rhSCF.

A maioria dos estudos relacionados com o processo de diferenciação e proliferação de precursores de mastócitos tem sido realizada *in vitro* a partir do cultivo das células da medula óssea. Porém, a caracterização de precursores e de mastócitos em diferentes estágios de maturação sempre foi dificultada pela falta de marcadores específicos (ODARJUK et al, 1989). Para a caracterização e identificação segura dos mastócitos imaturos, apenas a coloração pelo azul de toluidina não é suficiente, já que estas células apresentam poucos ou nenhum grânulo metacromático. Dados morfológicos associados à citoquímica do conteúdo granular não são suficientes para caracterizar precursores de mastócitos ainda indiferenciados e, portanto, desprovidos de grânulos citoplasmáticos. Recentemente, alguns marcadores para mastócitos foram utilizados, mas estes se ligaram também à superfície de outras células, como monócitos e macrófagos, não sendo, portanto, específicos (HAMANN et al, 1995; KINZER et al, 1995). A identificação e caracterização de populações de mastócitos imaturos e células indiferenciadas foi possível utilizando-se os anticorpos monoclonais mAb AA4 e mAb BGD6, específicos contra antígenos presentes na superfície de mastócitos (JAMUR et al., 1996).

Com a utilização do anticorpo monoclonal mAb AA4, que reconhece gangliosídeos do tipo GD1b específicos da superfície dos mastócitos (OLIVER et al., 1992), foi possível identificar mastócitos da medula óssea em diferentes estágios de maturação e classificá-los como bem imaturos, quase desprovidos de grânulos citoplasmáticos, imaturos, com poucos grânulos, e maduros (JAMUR et al., 1998). O isolamento das células da medula óssea, realizado com a utilização de esferas magnéticas "tosyl ativadas" conjugadas ao mAb AA4 possibilitou quantificar as células pertencentes à linhagem de mastócitos presentes na medula óssea, que corresponde a 2,42% (JAMUR et al., 1997).

Utilizando o modelo experimental no qual a injeção intraperitoneal de água destilada causa a lise e desaparecimento dos mastócitos peritoneais (FAWCETT, 1955; MENDONÇA et al., 1986), associados a métodos imunoquímicos, que utilizam anticorpos específicos para mastócitos, foi possível estudar o processo de repovoamento e maturação dos mastócitos da cavidade peritoneal 2, 6 e 10 dias após a injeção intraperitoneal de água

destilada (MORENO et al., 1997). Ainda, estes mesmos autores demonstraram que ocorre uma diminuição na população de mastócitos da medula óssea durante o repovoamento da cavidade peritoneal, após a depleção pela água destilada. Mastócitos bem imaturos foram identificados na corrente sanguínea 48 horas após a depleção da cavidade peritoneal pela injeção intraperitoneal de água destilada (JAMUR et al., 1998). Estes dados, quando analisados em conjunto, sugerem que ocorre um recrutamento de precursores de mastócitos da medula óssea para repovoar a cavidade peritoneal, após a lise e desaparecimento da população de mastócitos peritoneais causados pela injeção intraperitoneal de água destilada.

A técnica de separação imunomagnética associada ao uso de anticorpos específicos para mastócitos, como o mAb BGD6, pode ser aplicada na quantificação precisa da população de mastócitos da medula óssea. Esta metodologia poderá ser utilizada para demonstrar as variações sofridas pela população de mastócitos da medula óssea durante o recrutamento de mastócitos para sítios periféricos.

No presente estudo procuramos investigar se compostos liberados pelos mastócitos, sejam eles pré- ou neo-formados, possam estar envolvidos no recrutamento de mastócitos. Para tal, utilizamos três modelos experimentais, os quais promovem a liberação de substâncias produzidas pelos mastócitos, como mostra o quadro abaixo.

SUBSTÂNCIAS	MECANISMOS DE AÇÃO
Água destilada	Lise
Composto 48/80	Desgranulação não-mediada por receptor
Anti-IgE	Desgranulação mediada por receptor

Com o objetivo de investigar a participação de fatores de crescimento no processo de recrutamento de mastócitos, alguns animais foram injetados intraperitonealmente com rG-CSF e rGM-CSF.

II – OBJETIVOS

OBJETIVOS

Investigar se fatores liberados pela desgranulação dos próprios mastócitos, participam do recrutamento de mastócitos da medula óssea para a cavidade peritoneal, durante o seu repovoamento.

Investigar se fatores hematopoiéticos de crescimento, tais como GM-CSF e G-CSF atuam no processo de migração de mastócitos da medula óssea para a cavidade peritoneal, durante o seu processo de repovoamento.

III – MATERIAL E MÉTODOS

MATERIAL E MÉTODOS

A. ANIMAIS:

Foram utilizados 74 ratos Wistar machos, pesando em média, 250g, fornecidos pelo biotério da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP. Os animais foram submetidos aos tratamentos descritos a seguir:

B. TRATAMENTOS:

Os animais receberam a injeção intraperitoneal das seguintes substâncias:

- 1. Água destilada** - 6 ratos foram injetados com 20ml de água destilada.
- 2. Composto 48/80 (*p*-metoxy-*N*-metilfenetilamina)** - um total de 15 ratos foram injetados com as seguintes concentrações do composto 48/80 (Sigma, St. Louis, MO): 4 animais com 10µg/animal, 6 com 25µg/animal e 5 com 50µg/animal. O composto 48/80 foi diluído em solução de Tyrode-Tris 0,02M, pH 7,2 (JAMUR & VUGMAN, 1988).
- 3. Anti-IgE** - 23 ratos foram injetados com anti-IgE (Biosource International, Camarillo, CA), assim distribuídos: 5 ratos injetados com 1µg/animal, 6 ratos com 2,5µg/animal, 6 ratos com 5µg/animal, 3 ratos com 10µg/animal e 3 ratos com 15µg/animal, diluídos em salina tamponada com fosfato (PBS).
- 4. rG-CSF e rGM-CSF** - ambos os fatores foram injetados na concentração de 0,2µg/animal, em PBS. Oito ratos foram injetados com G-CSF (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN) e 9 ratos receberam a injeção de GM-CSF (Biosource International, Camarillo, CA).
- 5. Controle** - como controle foram utilizados 3 ratos que não receberam nenhum tratamento, 4 ratos injetados com 20ml de solução salina a 0,9% e 6 ratos injetados com IgG normal de rato (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) diluída em PBS, na concentração de 10µg/animal.

C. OBTENÇÃO DO MATERIAL

A medula óssea e o mesentério foram colhidos dos animais 48 horas após terem recebido os tratamentos acima citados. A medula óssea foi obtida através da injeção de

PBS, contendo 1000U/ml de DNase (Sigma) e 1000U/ml de heparina (Produtos Roche Químicas e Farmacêuticos SA, Rio de Janeiro, Brasil), no canal medular do fêmur. As células foram dissociadas com pipeta Pasteur através de sucessivas aspirações e a seguir filtradas em Nytex de 25µm (Fig. 1). Em seguida, as células foram lavadas por centrifugação em PBS contendo 2% de soro albumina bovina (BSA) por 2 vezes, durante 5 minutos, a 1000 rpm. A seguir, o sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em PBS+BSA a 2%.

D. ANTICORPO

Foi utilizado o anticorpo mAb BGD6, que reconhece proteínas específicas da superfície dos mastócitos. Este anticorpo é produzido em camundongos contra a superfícies de células da leucemia basofílica de rato, da linhagem RBL-2H3 (HAMAWY et al., 1992).

E. CONJUGAÇÃO DE ANTICORPOS A ESFERAS MAGNÉTICAS

O anticorpo mAb BGD6 foi conjugado a esferas magnéticas tosyl ativadas de acordo com JAMUR e cols. (1997). As esferas magnéticas (Dynabeads M-450 Tosylactivated, Dynal, Lake Success, NY) foram misturadas até formar uma suspensão uniforme. A seguir, as esferas magnéticas foram ressuspensas em Tampão Borato 0,1M pH 9,5 e o anticorpo mAb BGD6 na concentração de 200 µg/ml, foi adicionado à solução. As esferas magnéticas foram incubadas por 10 minutos a 37°C. Após a incubação, foi adicionado 0,5% de BSA para auxiliar na orientação dos anticorpos durante o acoplamento, realizado por 24 horas a 37°C. A seguir, a suspensão de esferas conjugadas ao anticorpo mAb BGD6 foi lavada com o auxílio do concentrador de partículas magnéticas (CPM), em PBS+BSA a 0,1% por 5 minutos a 4°C. Os radicais tosil livres foram bloqueados pela incubação em tampão Tris 0,2M + 0,1% de BSA, pH 8,5, durante 4 horas a 37°C. As esferas magnéticas conjugadas ao mAb BGD6 foram novamente lavadas em PBS+BSA a 0,1% a 4°C, ressuspensas em PBS com 0,1% de BSA e estocadas a 4°C, a uma concentração final de 4×10^8 esferas por ml (30 mg/ml) (Fig. 2).

F. SEPARAÇÃO DOS MASTÓCITOS UTILIZANDO o mAb BGD6 CONJUGADO A ESFERAS MAGNÉTICAS:

As células da medula óssea após serem lavadas duas vezes em PBS + BSA a 2%, foram incubadas por 10 a 15 minutos em solução de PBS + BSA a 2% contendo as esferas magnéticas conjugadas com o anticorpo mAb BGD6, na proporção de 3 esferas para 1 célula-alvo. As células foram lavadas 1 vez em PBS + BSA a 2% e 5 vezes em PBS. As lavagens foram feitas com auxílio do CPM (Figs. 3 e 4).

G. MESENTÉRIO:

O mesentério foi distendido em placa de Petri parafinada, lavado em PBS, fixado em formol a 10% em PBS por 20 minutos e lavado com água destilada. Posteriormente, foram recortados fragmentos do mesentério, que foram distendidos em lâmina histológica e secos em placa aquecedora a 45°C. Os fragmentos de mesentério foram, então, corados com Azul de Toluidina 0,1% contendo 1% de ácido acético, pH 2,8, por 15 minutos. Alguns fragmentos também foram corados com Giemsa (Sigma). As lâminas foram desidratadas em série crescente de etanol, diafanizadas em xilol e montadas com Permount. O material foi observado e fotografado em microscópio OLYMPUS BX-50.

H. QUANTIFICAÇÃO:

A porcentagem de mastócitos presentes na medula óssea foi determinada por contagem em Câmara de Neubauer das células positivas associadas às esferas magnéticas, e negativas, ou seja, não ligadas às esferas magnéticas (Fig. 4).

Os mastócitos observados no mesentério dos animais controle e dos animais tratados com rG-CSF também foram quantificados. Foi contado um total de 720 campos. Destes, 360 foram contados em lâminas de mesentério provenientes de 3 animais controle e 360 contados em lâminas provenientes de 3 animais tratados com G-CSF. Foram contadas 6 lâminas, sendo 1 lâmina proveniente de cada animal.

I. IMUNOFLUORESCÊNCIA

As células da medula óssea foram colocadas em lamínulas revestidas com Cell Tak (Becton Dickinson Labware, Collaborative Biomedical Products, Bedford, MA), fixadas em

paraformaldeído a 2% (Ladd Research Industries, Burlington, VT) em metanol por 5 minutos a -20°C . Após a fixação, as células foram lavadas com PBS e a seguir imunomarcadas com o anticorpo mAb BGD6 biotinilado ($10\mu\text{g/ml}$) por 1 hora a temperatura ambiente. As células foram então, lavadas em PBS+BSA a 1% e em PBS por 30 minutos. A seguir, as células foram incubadas por 30 minutos com $5\mu\text{g/ml}$ de estreptavidina conjugada ao Texas Red (Jackson ImmunoResearch), lavadas 5 vezes em PBS, lavadas rapidamente em água bidestilada e montadas em lâminas com Fluoromount (EM Sciences, Fort Washington, PA). O material foi observado e fotografado em microscópio de fluorescência Axiophot-Zeiss.

IV – RESULTADOS

RESULTADOS

1. EFEITOS DA INJEÇÃO INTRAPERITONEAL DE ÁGUA DESTILADA SOBRE A POPULAÇÃO DE MASTÓCITOS DA MEDULA ÓSSEA:

A população de mastócitos isolada da medula óssea de animais controle através de esferas magnéticas conjugadas ao mAb BGD6 corresponde a 2,5% do total de células da medula óssea. Esta população de mastócitos decai de 2,5% para 0,60% quando os animais são injetados intraperitonealmente com água destilada. Os mastócitos da medula óssea foram quantificados 48 horas após o tratamento (GRÁFICO 1).

Para confirmar que a injeção intraperitoneal de água destilada causou a lise e o desaparecimento dos mastócitos peritoneais, fragmentos de mesentério foram analisados. O mesentério do animal controle estava repleto de mastócito (Fig. 5A), em contraste com o mesentério dos animais colhido 48 horas após a injeção intraperitoneal de água destilada, que estava desprovido de mastócitos (Fig. 5B).

2. EFEITOS DA INJEÇÃO INTRAPERITONEAL DO COMPOSTO 48/80 SOBRE A POPULAÇÃO DE MASTÓCITOS DA MEDULA ÓSSEA:

Com o isolamento imunomagnético utilizando o mAb BGD6 foi possível observar que a população de mastócitos da medula óssea diminui de 2,38% (controle) para 0,41%, dois dias após a injeção intraperitoneal do composto 48/80 na concentração de 50µg/rato. Após a injeção intraperitoneal de composto 48/80 na concentração de 25µg/rato a porcentagem apresentada pela população de mastócitos da medula óssea foi 1,21% e após a injeção intraperitoneal de 10µg/rato, a população de mastócitos da medula óssea foi 2,09%. Este último valor é próximo àquele apresentado pela população de mastócitos da medula óssea dos animais controle (2,38%). Estes dados demonstram, também, que o efeito do composto 48/80 sobre a população de mastócitos da medula óssea é dose-dependente (GRÁFICO 2).

O tratamento com o composto 48/80 foi confirmado através da análise de fragmentos de mesentério obtidos 2 dias após a injeção intraperitoneal de 50µg/animal desta substância, nos quais a maioria dos mastócitos estava desgranulada (Fig. 6A).

3. EFEITOS DA INJEÇÃO INTRAPERITONEAL DE ANTI-IgE SOBRE A POPULAÇÃO DE MASTÓCITOS DA MEDULA ÓSSEA:

As células da medula óssea dos animais que receberam a injeção intraperitoneal de anti-IgE em diferentes concentrações, também foram quantificadas após o isolamento imunomagnético utilizando o mAb BGD6 conjugado a esferas magnéticas. A quantificação das células da medula óssea demonstrou que a diminuição da população de mastócitos, 2 dias após o tratamento, está relacionada com a intensidade da desgranulação sofrida pelos mastócitos peritoneais. Nos animais que receberam anti-IgE nas concentrações de 15µg/animal, 10µg/animal e 5µg/animal a porcentagem de mastócitos da medula óssea foi similar, ou seja, de aproximadamente 0,75%, valor menor ao encontrado nos animais controle (2,25%). Portanto, utilizando uma faixa de concentração entre 5 e 15µg/animal, não ocorre mudanças no número de mastócitos da medula óssea. Utilizando anti-IgE nas concentrações de 2,5µg/animal e 1µg/animal a população de mastócitos da medula óssea foi, respectivamente, de 2,5% e 2,31%, demonstrando que as menores concentrações de anti-IgE não têm efeito sobre a população de mastócitos da medula óssea (GRÁFICO 3). Os animais controle foram injetados intraperitonealmente com 10µg/animal de IgG normal de rato e a população de mastócitos da medula óssea destes animais é de 2,25%. Este valor também é próximo ao da população de mastócitos da medula óssea encontrada em animais não tratados (GRÁFICO 3).

A análise de fragmentos de mesentério demonstrou que os mastócitos dos animais que receberam intraperitonealmente 5µg/animal de anti-IgE, sofreram desgranulação (Fig. 6B), enquanto que os animais que receberam apenas 1µg/animal, apresentaram raros mastócitos desgranulados (Fig. 6C). Estas observações confirmam a eficiência do tratamento.

4. AVALIAÇÃO DA POPULAÇÃO DE MASTÓCITOS APÓS A INJEÇÃO INTRAPERITONEAL DE FATORES DE CRESCIMENTO:

rG-CSF

Houve aumento da população de mastócitos da medula óssea 48 horas após a injeção intraperitoneal do G-CSF de 2,38%, valor encontrado em animais controle, para 5,48% (GRÁFICO 4).

Os fragmentos de mesentério dos animais tratados com o rG-CSF não apresentaram mastócitos desgranulados (Fig. 7A). No entanto, foi observada uma grande quantidade de mastócitos imaturos no mesentério destes animais, localizados próximos aos vasos sanguíneos (FIG. 7B). Com o objetivo de confirmar estas observações, foram quantificados os mastócitos do mesentério de alguns dos animais tratados com rG-CSF e comparados com o mesentério de animais controle (TABELA 1).

rGM-CSF

A injeção intraperitoneal de GM-CSF não alterou o número de células da população de mastócitos da medula óssea, que foi de 2,35%, semelhante a 2,38%, valor encontrado nos animais controle (GRÁFICO 4).

O tratamento com o rGM-CSF também não estimulou a desgranulação dos mastócitos, os quais se apresentaram intactos nos fragmentos de mesentério. Também não foi observado aumento no número de mastócitos imaturos do mesentério destes animais. O mesentério dos ratos tratados com o GM-CSF (Fig. 7C) se assemelhou ao dos animais controle (FIG. 5A).

5. IMUNOMARCAÇÃO DE CÉLULAS DA MEDULA ÓSSEA:

Quando células da medula óssea foram imunomarcadas com o mAb BGD6, somente a população de mastócitos apresentou imunofluorescência positiva. O número de mastócitos imunomarcados, observados nos campos microscópicos, é compatível com os resultados obtidos através da quantificação das populações de mastócitos isoladas da medula óssea de animais que receberam diferentes tratamentos. Poucos mastócitos, foram observados na medula óssea de ratos que foram injetados intraperitonealmente com 5 µg/animal de anti-IgE (Fig. 8A), quando comparados com os mastócitos observados na medula óssea de animais controle que foram injetados com IgG de rato e apresentaram muitas células imunomarcadas com o mAb BGD6 (Fig. 8B). A medula óssea de animais que receberam a injeção intraperitoneal de G-CSF apresentou, em relação aos animais controle, uma grande quantidade de mastócitos imunomarcados com o mAb BGD6, demonstrando o aumento na população de mastócitos causado por este fator (FIG. 8C).

V – FIGURAS

Isolamento de Mastócitos

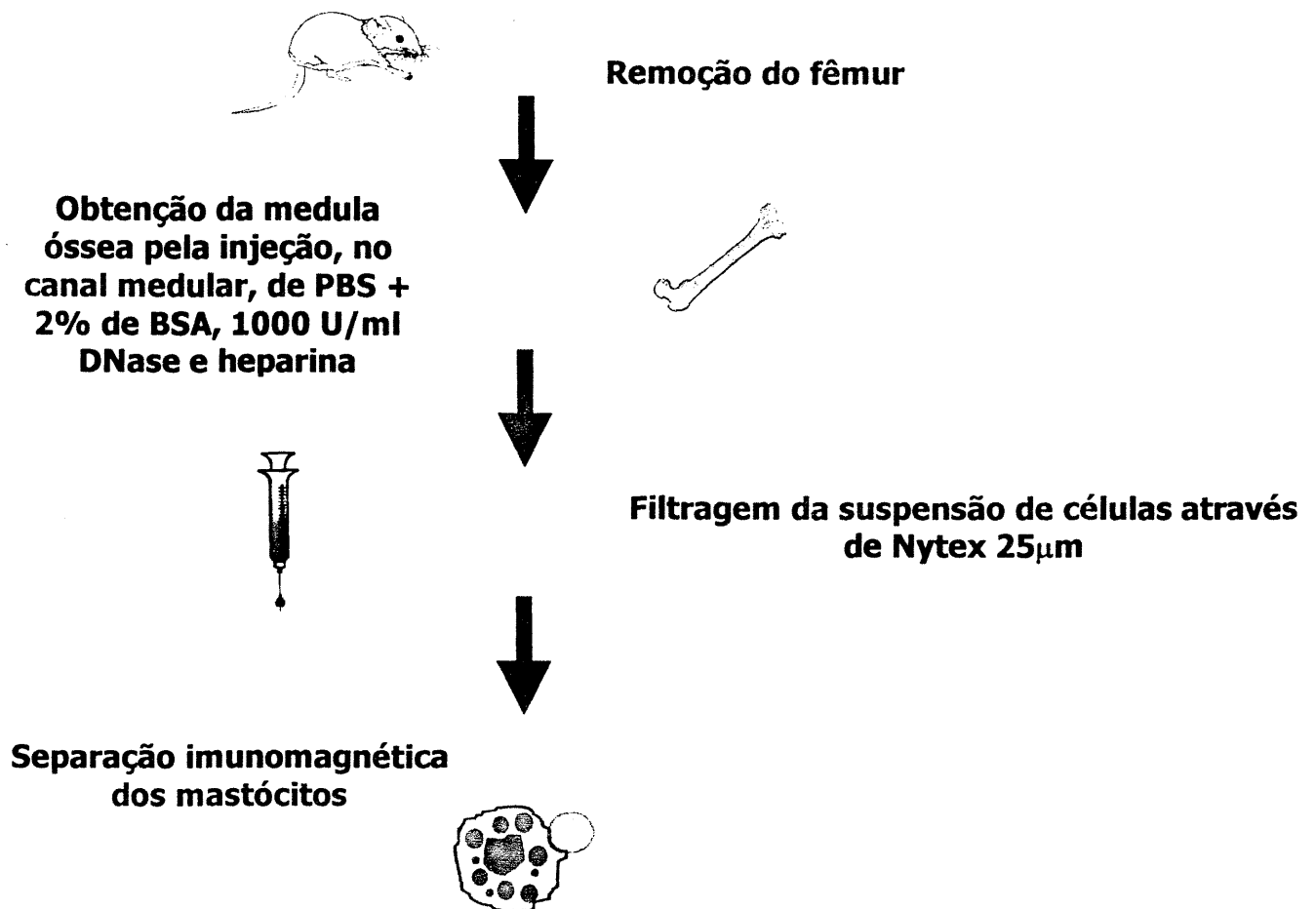


Fig. 1 – Obtenção das células da medula óssea.

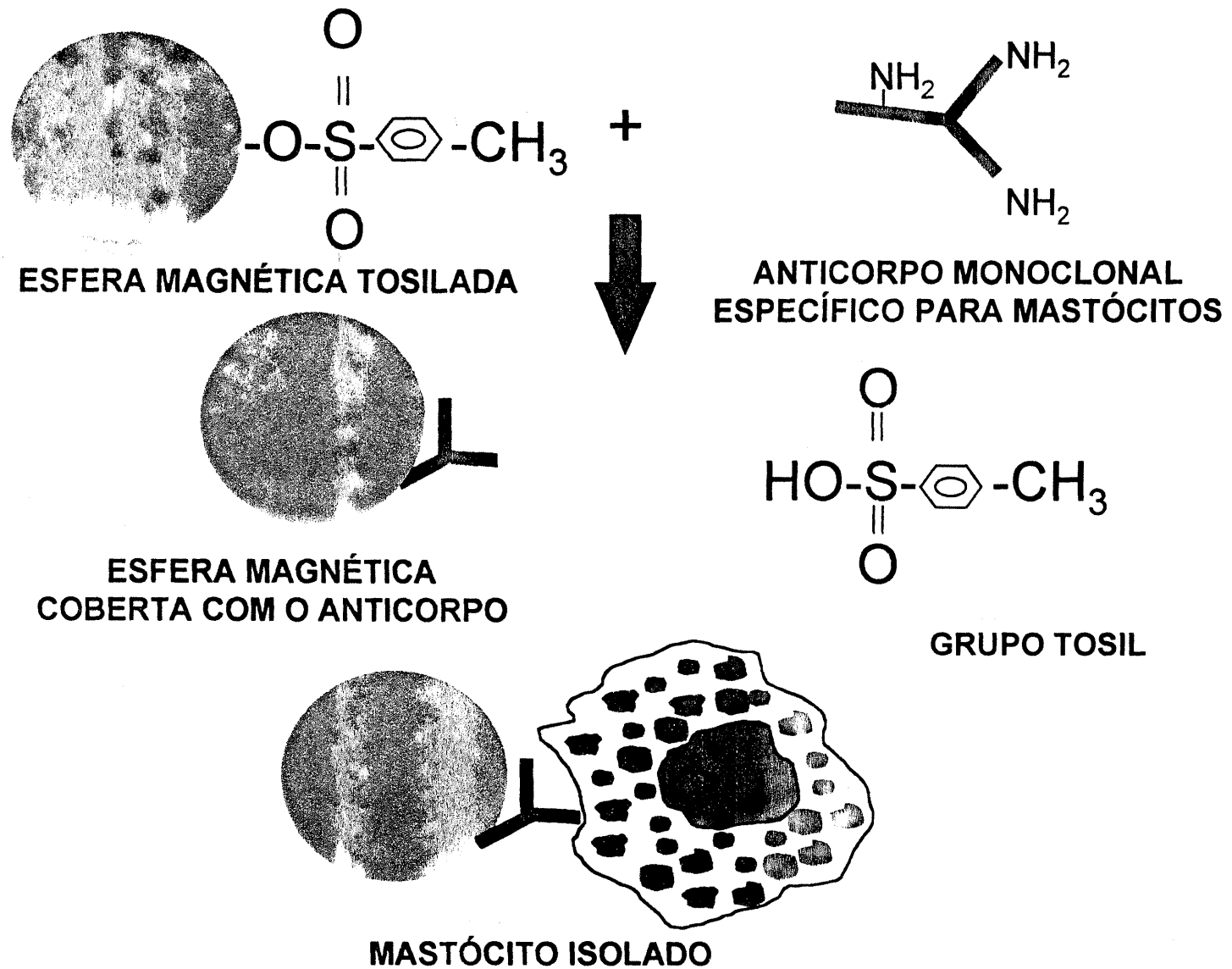


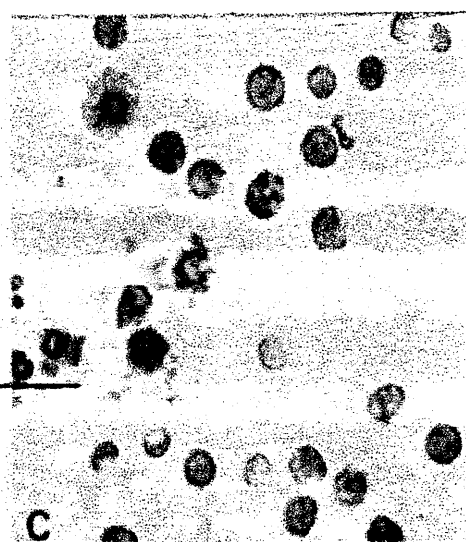
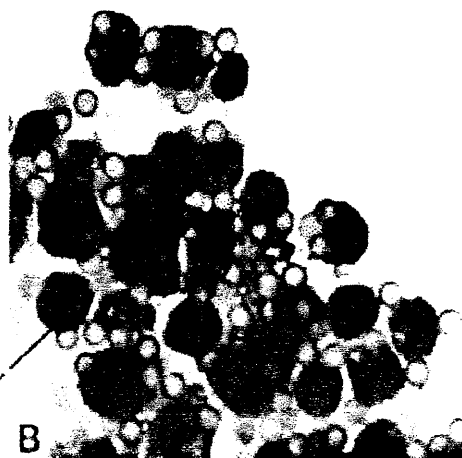
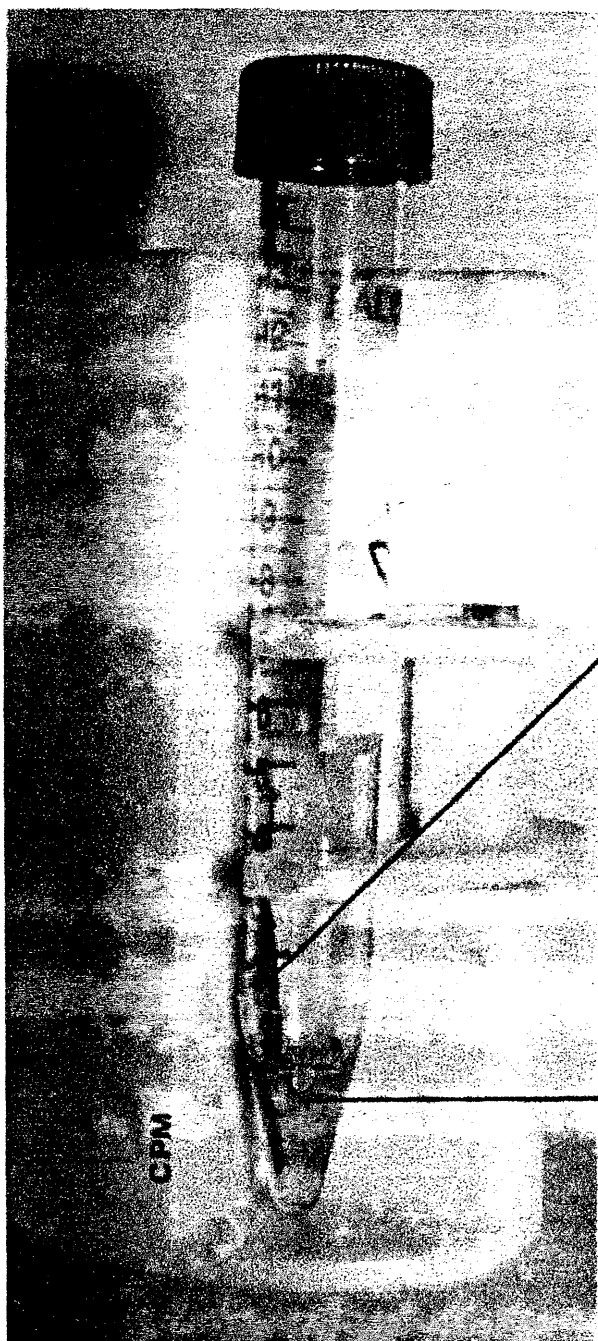
Fig. 2 - Esquema demonstrando o processo de conjugação de anticorpos específicos às esferas magnéticas tosiladas.

Fig. 3 – Separação Imunomagnética.

A – Tubo de ensaio contendo a população total de células. Os mastócitos ligados às esferas magnéticas conjugadas ao mAb BGD6 estão isolados e se encontram na parede do tubo, em contato com o CPM. As demais células estão em suspensão.

B – População positiva: mastócitos isolados pelas esferas magnéticas conjugadas ao mAb BGD6.

C – População negativa: células que não se ligaram às esferas magnéticas cobertas com o mAb BGD6.



Isolamento Imunomagnético de Mastócitos

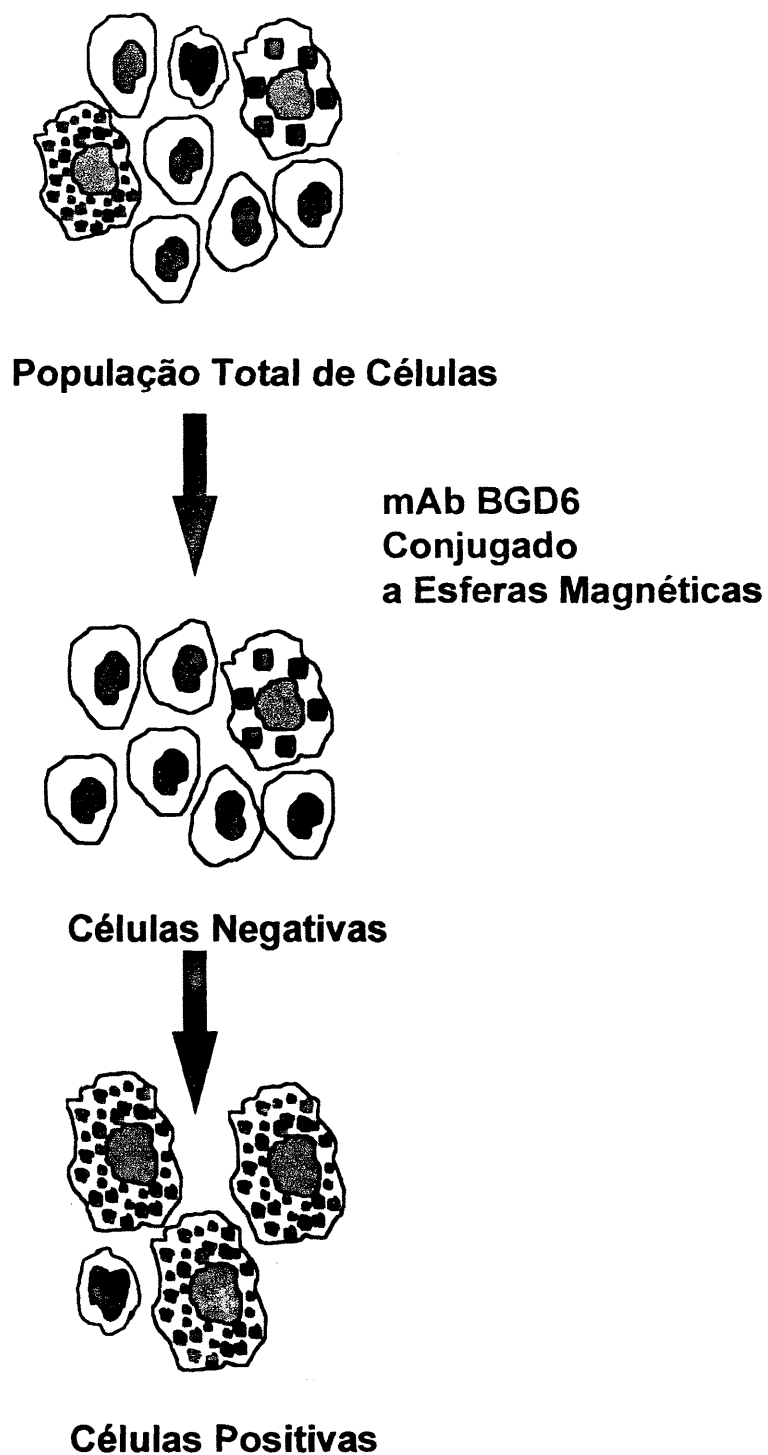


Fig. 4 - Separação da população de células positivas e negativas da medula óssea, utilizando o mAb BGD6 conjugado às esferas magnéticas.

Fig. 5 – Mesentério de rato. Aumento: 528X.

A – Animal controle. Observar os mastócitos intactos com o citoplasma repleto de grânulos (setas). Coloração: azul de toluidina.

B – Mesentério de animal colhido 48 horas após a injeção intraperitoneal de água destilada. Notar a ausência de mastócitos. Coloração: Giemsa.

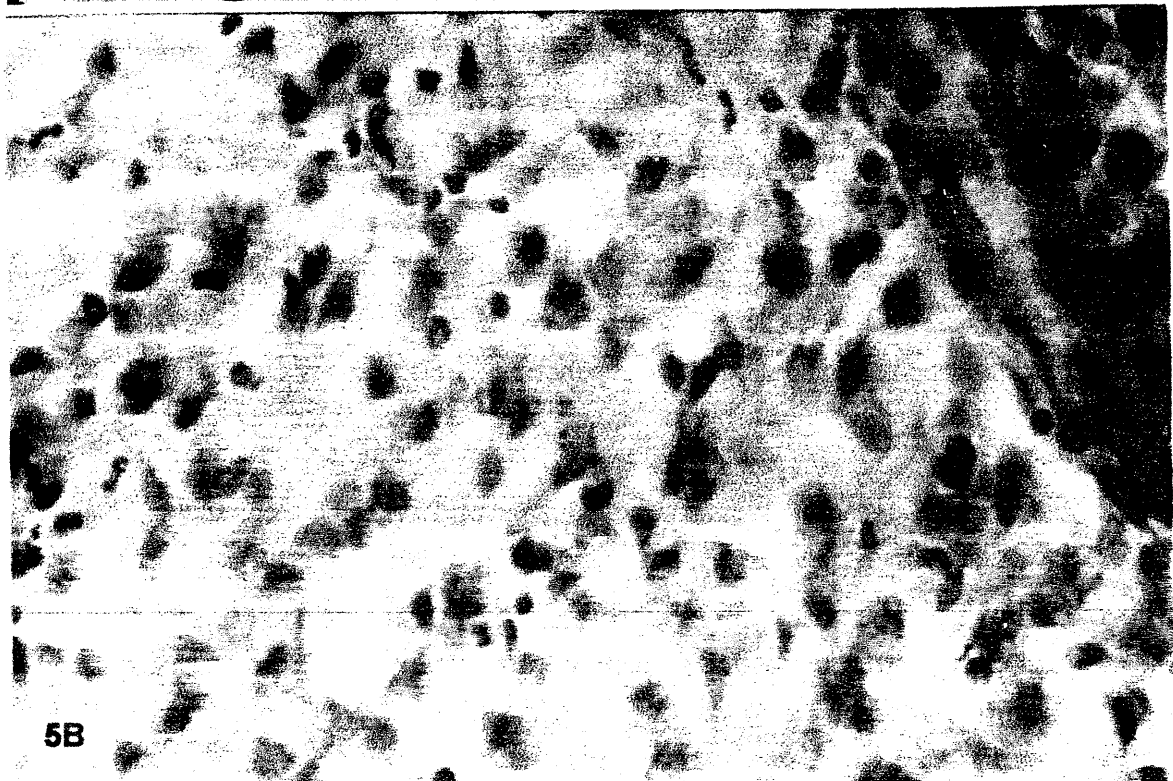
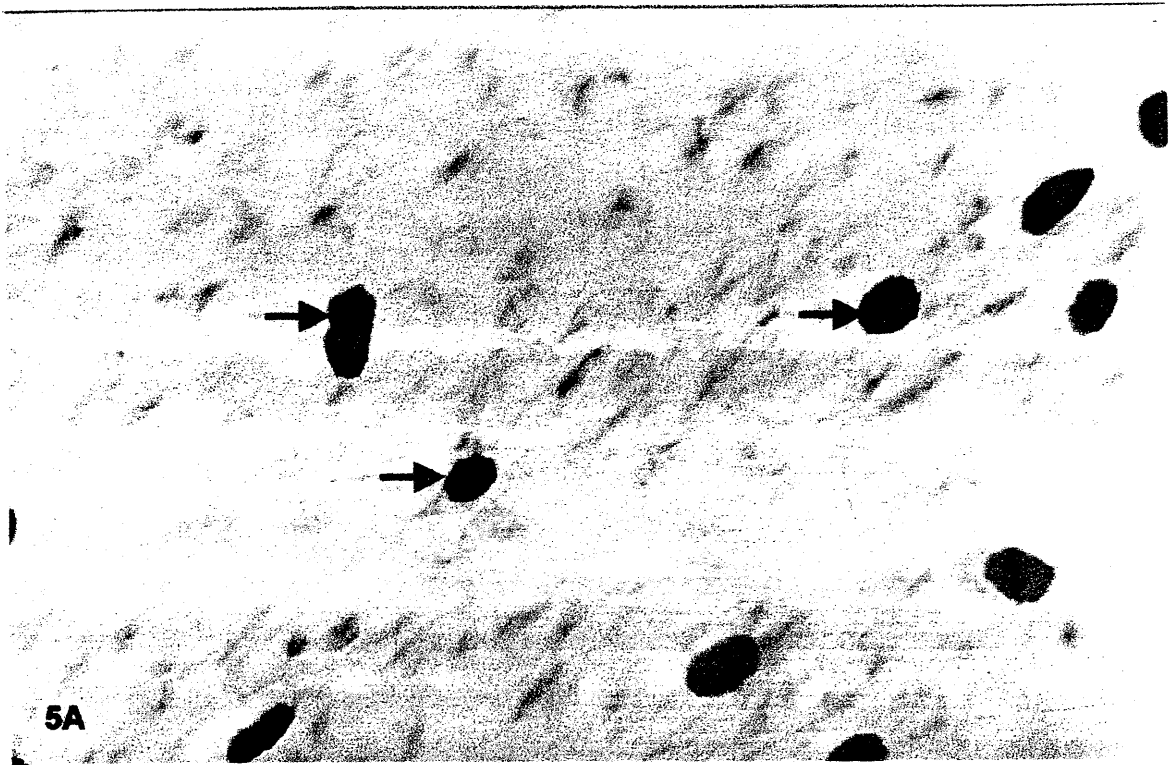


FIG. 6 – Mastócitos do mesentério de rato colhido 48 horas após os tratamentos.

Coloração: Azul de Toluidina. Aumento: 528X.

A – Mesentério de um animal que recebeu a injeção intraperitoneal do composto 48/80 ($50\mu\text{g}/\text{rato}$). Observar os mastócitos desgranulados (setas).

B – Observar os mastócitos desgranulados (setas) no mesentério de um animal que recebeu a injeção intraperitoneal de $5\mu\text{g}$ de anti-IgE.

C – Nos animais que receberam a injeção intraperitoneal de anti-IgE a $1\mu\text{g}/\text{rato}$, a maioria dos mastócitos estão intactos (setas) e alguns estão levemente desgranulados (cabeças de seta).

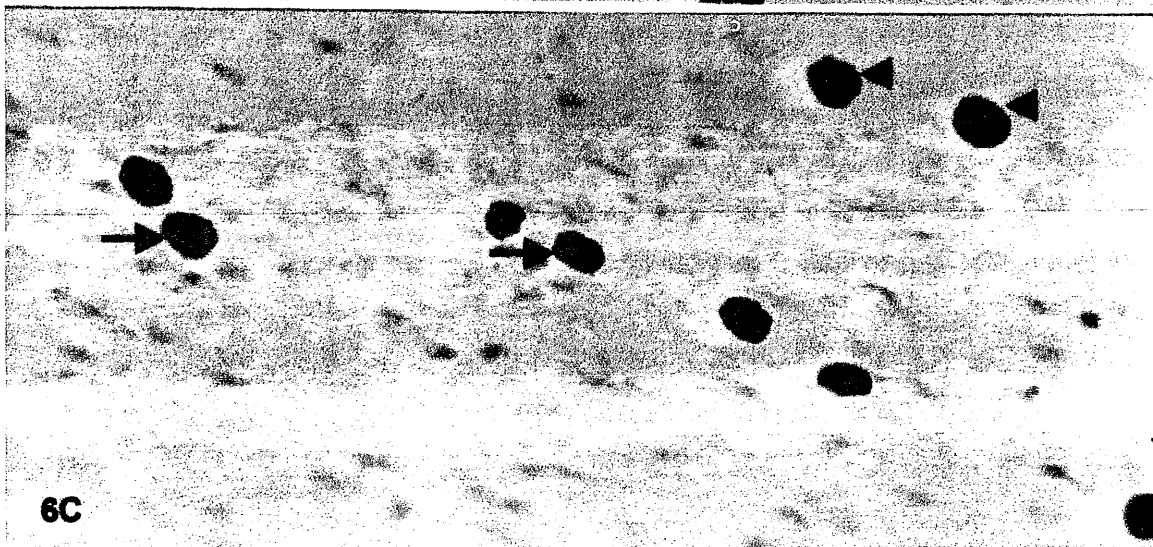
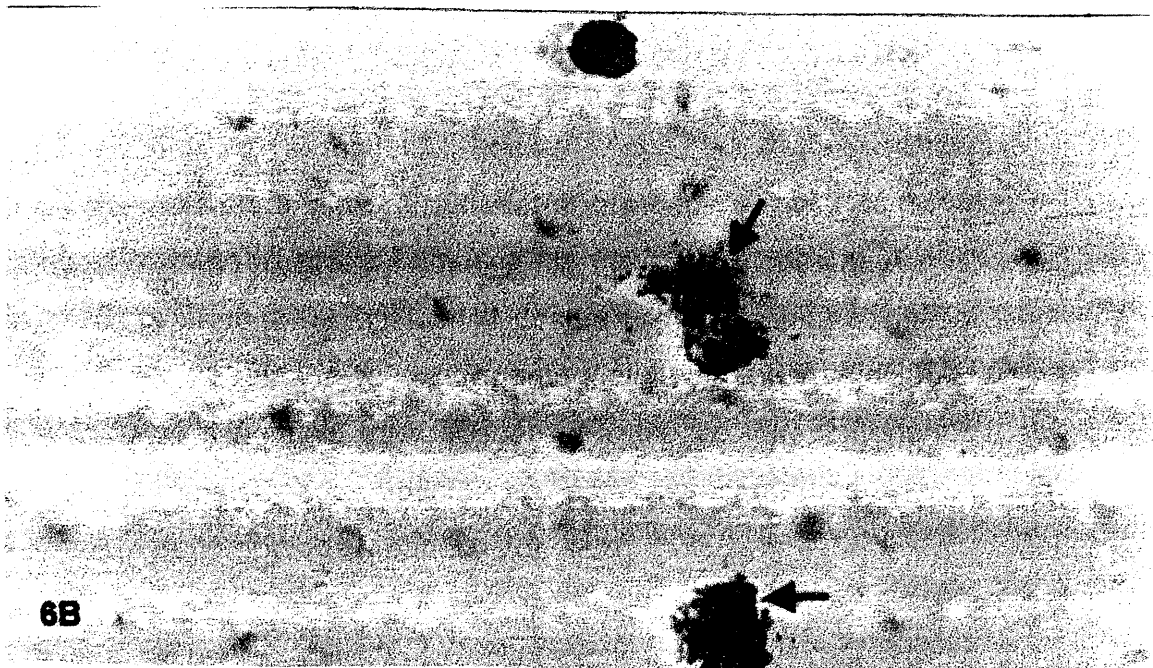
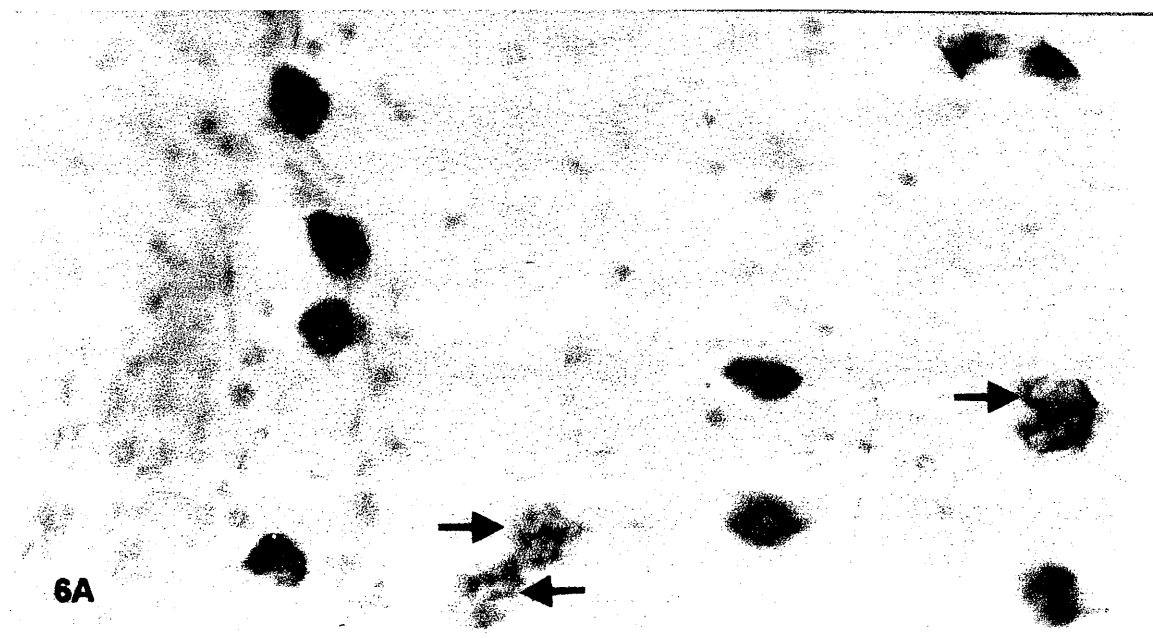


FIG. 7 - Mastócitos do mesentério de rato corados com Azul de Toluidina.
Aumento: 528X.

A – Mesentério de animal que recebeu a injeção intraperitoneal de G-CSF. Observar a grande quantidade de mastócitos em diferentes fases de maturação apresentando poucos grânulos metacromáticos (setas). Mastócito maduro (cabeça de seta).

B – Mesentério de animal tratado com G-CSF. Observar a grande quantidade de mastócitos imaturos (setas) com poucos grânulos metacromáticos, próximos a um vaso sanguíneo (*). Mastócitos maduros (cabeças de seta).

C – Mesentério de animal tratado com GM-CSF. Observar inúmeros mastócitos maduros (setas) próximos a um vaso sanguíneo (*). Notar raros mastócitos imaturos (cabeças de seta).

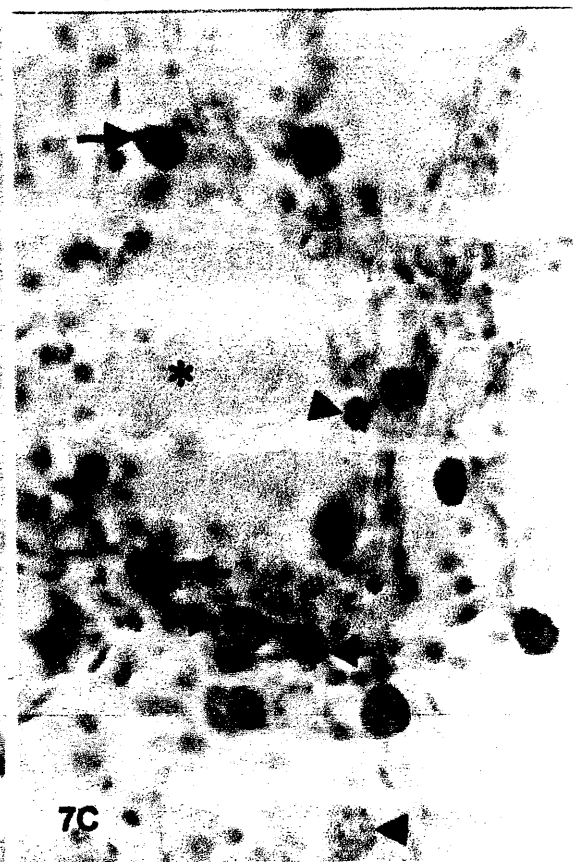
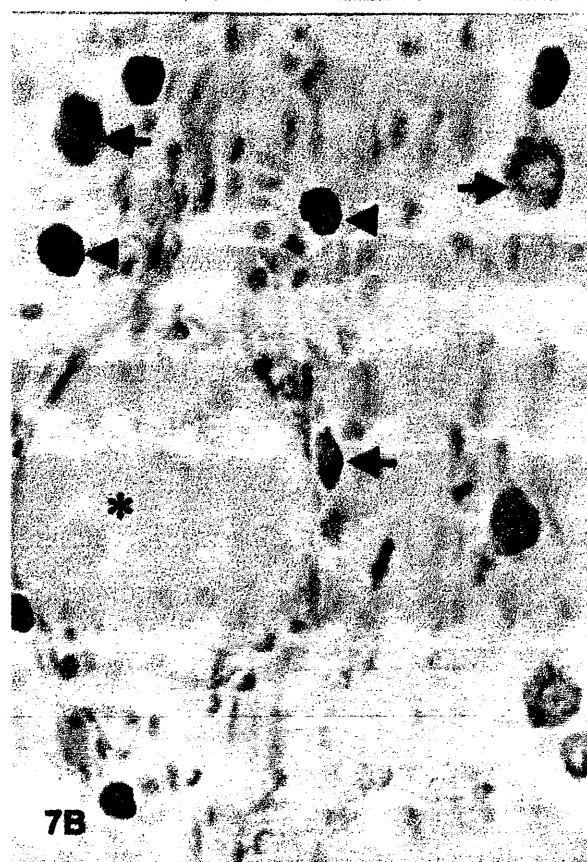
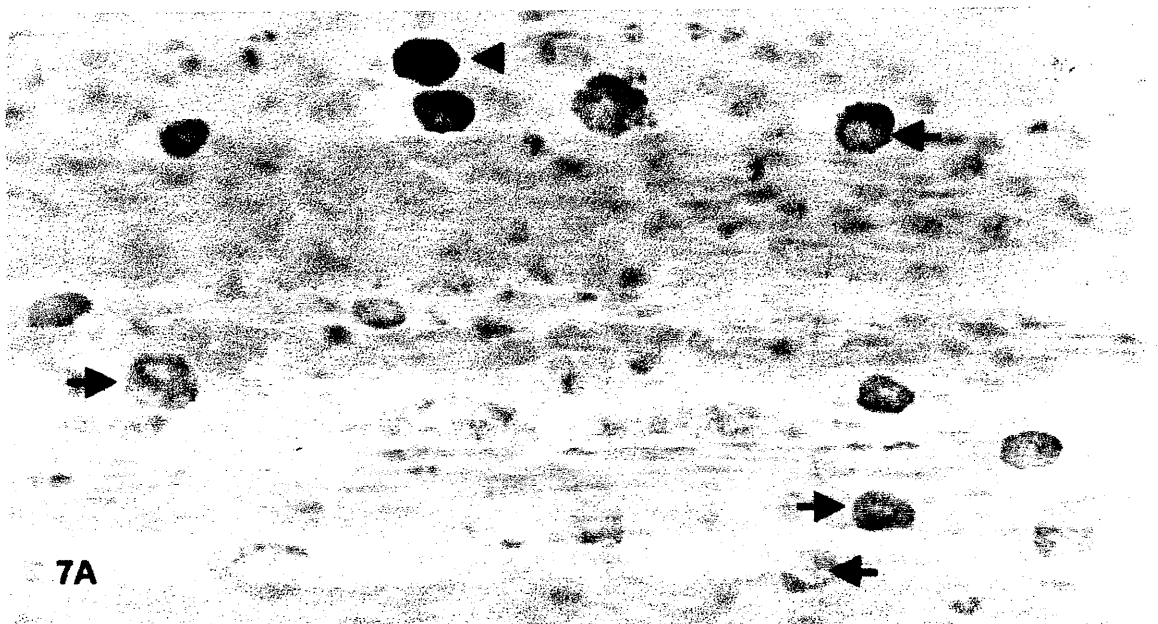
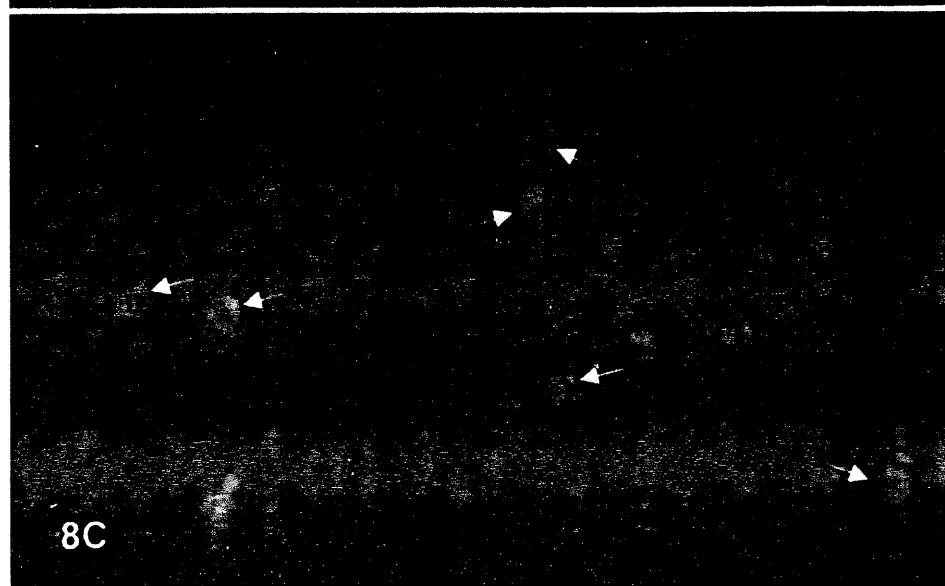
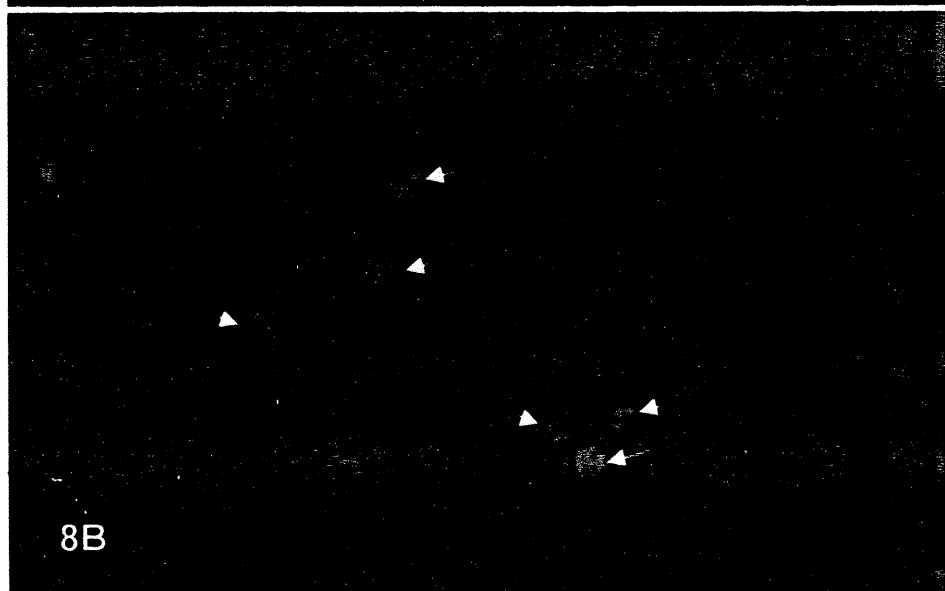


FIG. 8 – Imunomarcacão da população de mastócitos da medula óssea com o mAb BGD6. Aumento: 430X.

A – Observar raros mastócitos imunofluorescentes (setas), obtidos dois dias após a injeção intraperitoneal de 5 μ g/animal anti-IgE.

B - Medula óssea obtida dois dias após a injeção intraperitoneal de IgG normal de rato. Observar os mastócitos com fluorescência positiva (setas).

C – Observar inúmeros mastócitos imunofluorescentes (setas), obtidos dois dias após a injeção intraperitoneal do G-CSF.



VI – DISCUSSÃO

DISCUSSÃO

Nossos resultados demonstram que as substâncias liberadas pelos mastócitos podem recrutar precursores destas células da medula óssea para a cavidade peritoneal. O isolamento de populações puras de mastócitos da medula óssea, através do uso de esferas magnéticas conjugadas a anticorpos monoclonais específicos, permitiu demonstrar que 48 horas após a lise dos mastócitos peritoneais pela água destilada, ocorre uma diminuição da população de mastócitos da medula óssea. Durante a lise, os grânulos citoplasmáticos liberam compostos pré-formados, como a histamina, o fator quimiotático para eosinófilos na anafilaxia (ECF-A), as proteases (SIRAGANIAN, 1988; NILSSON & METCALF, 1996), o fator de necrose tumoral- α (TNF- α) (GORDON & GALLI, 1991; DVORAK, 1997), a interleucina-8 (IL-8) (GRÜTZKAU et al., 1997) e o SCF (DE PAULIS et al., 1999). A lise pela água destilada leva à morte dos mastócitos e como consequência, não ocorre a produção dos fatores neo-formados como prostaglandinas, leucotrienos e outras citocinas, os quais dependem do metabolismo celular (MURAKAMI et al., 1995). Por outro lado, a injeção de anti-IgE causa a desgranulação dos mastócitos através do FC ϵ RI, resultando na ativação celular e liberação de compostos pré-formados e também dos neo-formados (CREWS et al., 1981). O composto 48/80 também estimula os mastócitos a desgranular. Entretanto, esta substância age estimulando diretamente a proteína G (MOUSLI et al., 1990a; MOUSLI et al., 1990b), desgranulando os mastócitos de maneira não-citotóxica e independente do FC ϵ RI (BLOOM & HAEGERMARCK, 1965; JOHNSON & MORAN, 1969), levando à liberação de fatores pré e neo-formados. Apesar de o composto 48/80 e a anti-IgE estimularem a liberação de compostos pré e neo-formados, os resultados obtidos através da quantificação da população de mastócitos da medula óssea são semelhantes aos encontrados após a lise dos mastócitos pela água destilada, que libera somente compostos pré-formados. Estas observações sugerem que os fatores pré-formados liberados pelos próprios mastócitos são suficientes para recrutar estas células da medula óssea para a cavidade peritoneal.

Compostos pré-formados, como a histamina, o ECF-A, as proteases (SIRAGANIAN, 1988; NILSSON & METCALF, 1996), a IL-16 (CENTER et al., 1997; RUMSAENG, et al., 1997), o TNF- α (GORDON & GALLI, 1991; DVORAK, 1997) e a IL-8 (GRÜTZKAU et al.,

1997), são conhecidos como quimioatraentes de eosinófilos, neutrófilos, linfócitos e monócitos, direcionando estas células para o sítio de inflamação (ERB, et al., 1996; NILSSON & METCALF, 1996; CENTER et al., 1997; ROSEMBERG & GALLIN, 1999). No entanto, muitos destes mediadores pré-formados não são considerados quimioatraentes para os próprios mastócitos, apesar de ser observado um grande acúmulo destas células em situações de asma, alergias, rinite, rejeição de transplantes, artrite reumatóide, infestação parasitária e fibrose hepática, pulmonar ou endomiocárdica (KASUGAI et al., 1995; ARMETTI et al., 1999; NILSSON et al., 1998). O acúmulo de mastócitos nestas situações se deve, provavelmente, ao processo de recrutamento destas células ou de seus precursores (ARMETTI et al., 1999). Em quadros de fibrose e esclerodermite é observado um aumento no número de mastócitos no local de inflamação que é seguido de um acúmulo de eosinófilos (ARMETTI et al., 1999). Isto sugere que as substâncias liberadas pela desgranulação dos mastócitos e que participam do recrutamento dos eosinófilos também podem estar envolvidas no recrutamento dos próprios mastócitos. Entretanto, pouco se conhece sobre os fatores que podem estar, especificamente, envolvidos na quimiotaxia dos mastócitos para sítios periféricos (GRUBER et al., 1994; NILSSON et al., 1996; HARTMANN et al., 1997). NILSSON e cols. (1994), estudando mastócitos humanos da linhagem 1 (HMC-1), observaram que estas células apresentam quimiotaxia para SCF, em experimentos realizados em câmaras de migração. Ainda, NILSSON e cols. (1994) e NILSSON e cols. (1998) confirmaram a ação quimiotática do SCF para os mastócitos, mostrando que anticorpos específicos para SCF inibem a quimiotaxia dos mastócitos quando adicionados a câmaras de migração. Estes autores demonstraram ainda, a atividade quimiotática do SCF sobre os mastócitos no fluido nasal de pacientes com rinite alérgica obtido no final da primavera e após a estimulação dos mastócitos através de antígenos alergênicos. Segundo DE PAULI e cols. (1999), o SCF é armazenado nos grânulos dos mastócitos, o que reforça nossos achados relacionados com o recrutamento de mastócitos da medula óssea por fatores pré-formados. Os mastócitos também expressam o receptor para a IL-8, que é um fator pré-formado (GRÜTZKAU et al., 1997), o qual parece ter um importante papel no recrutamento destas células durante a resposta inflamatória (NILSSON et al., 1999). Os nossos resultados mostram que os mediadores pré-formados, os quais também são quimiotáticos para granulócitos (NILSSON & METCALF, 1996; ROSEMBERG

& GALLIN, 1999) são suficientes para recrutar mastócitos. Estes achados sugerem que mecanismos envolvidos no recrutamento de mastócitos possam ser semelhantes aos utilizados por granulócitos. Um elo comum entre estes dois tipos celulares é a origem, pois mastócitos e granulócitos derivam de células precursoras hematopoiéticas CD-34 positivas (NILSSON & METCALF, 1996; GALLI & LANTZ, 1999).

Apesar dos fatores pré-formados se mostrarem suficientes para recrutar os mastócitos, é conhecido o papel de algumas substâncias neo-formadas na quimiotaxia destas células (NILSSON & METCALF, 1996; DE BOER et al., 1999). Entre estas estão a PGD_2 (SCHWARTZ & AUSTEN, 1984), o fator transformante de crescimento- $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$), conhecido por controlar a proliferação, diferenciação e quimiotaxia de monócitos, fibroblastos e neutrófilos (GRUBER et al., 1994; KIM & LEE, 1999), e a quimocina "*Regulated upon Activation, Normal T cell Expressed and Secreted*" (RANTES), conhecida por recrutar linfócitos e eosinófilos da corrente sanguínea para sítios de inflamação (NILSSON et al., 1994; KRENSKY, 1999), todas produzidas e liberadas pelos mastócitos. MATTOLI e cols. (1995) demonstraram que a ação quimiotática do RANTES sobre os mastócitos é mais potente que a do SCF. Entretanto, os estudos de NILSSON e cols. (1994), mostraram que o SCF é mais eficiente na quimiotaxia de mastócitos do que o RANTES. A ação quimiotática da IL-3 sobre os mastócitos também foi investigada por NILSSON e cols. (1994). Esta citocina é produzida principalmente por linfócitos T (FUNG et al., 1984), mas também é produzida e liberada pelos mastócitos como um mediador neo-formado. Apesar da IL-3 estimular a proliferação e diferenciação dos próprios mastócitos, quando em sinergia com as IL-4, IL-9 e IL-10 (ROTTEM et al., 1994a; METCALF et al., 1997), esta citocina não demonstrou quimiotaxia para os mastócitos da linhagem HMC-1, quando colocada na presença destas células em câmaras de migração (NILSSON et al., 1994). Entretanto, MEININGER e cols. (1992) mostram que a IL-3 potencializa o efeito quimiotático do SCF para os mastócitos. A IL-4 também é um fator neo-formado liberado pelos mastócitos, que age como fator de diferenciação sobre estas células (ROTTEM et al., 1994; METCALF, 1997). No entanto, não se conhece a ação quimiotática desta citocina sobre a população de mastócitos (NILSSON et al., 1994). A IL-5, que é produzida por células T, basófilos, mastócitos e eosinófilos (ARAI et al., 1995; MURAKAMI et al., 1995; SALVI et al., 1999), age na proliferação e diferenciação de mastócitos e de eosinófilos, mas

apenas se conhece a sua ação quimiotática para os eosinófilos (SALVI et al., 1999). Para elucidar a participação de fatores neo-formados produzidos pelos mastócitos no recrutamento destas células, estes devem ser isolados e injetados separadamente nos animais.

Os fatores de crescimento G-CSF e GM-CSF vêm sendo usados clinicamente para aumentar o número de “*stem cells*” CD-34 positivas na circulação sanguínea de doadores de medula óssea para transplantes. No entanto, 75% destes pacientes desenvolvem reações de hipersensibilidade mediada por IgE, o que compromete a eficácia do tratamento (COSTA, 1998). Por este motivo, resolvemos testar estes fatores em ratos para investigar a sua possível participação no processo de recrutamento de mastócitos. Observamos que a injeção intraperitoneal do G-CSF não causa desgranulação dos mastócitos do mesentério, porém, aumentou de forma drástica, de 2,38% para 5,48%, a população de mastócitos da medula óssea. A injeção intraperitoneal do G-CSF resultou num aumento de mastócitos no mesentério dos animais tratados e muitos mastócitos imaturos, com poucos grânulos metacromáticos, foram observados na proximidade dos vasos sanguíneos. Estes resultados sugerem que o G-CSF pode promover a proliferação ou diferenciação das células da linhagem de mastócitos. YANG e cols. (1998), utilizando ratos transgênicos, os quais receberam o gene humano do receptor de G-CSF (hG-CSFR), demonstraram que este fator pode suportar o crescimento e diferenciação de colônias de megacariócitos e de mastócitos e, também, estimular a proliferação destas colônias. OGAWA (1993), mostrou que o G-CSF tem a capacidade de iniciar a proliferação de células precursoras dormentes. Achados semelhantes foram observados *in vitro* por METCALF (1986) e VALTIERI e cols. (1987), que mostraram que o G-CSF é capaz de iniciar a proliferação e estimular a diferenciação de precursores hematopoiéticos para a linhagem mielóide. Nossos resultados demonstram que o G-CSF causou um aumento na população de mastócitos na medula óssea e no mesentério. Talvez este resultado se deva à capacidade do G-CSF de tornar os precursores hematopoiéticos mais responsivos à IL-3 (TAKAUE et al. 1990), pois esta, em sinergia com outros fatores, é responsável pela diferenciação e desenvolvimento de mastócitos (SIRAGANIAN, 1988; VALENT, 1994; METCALF et al., 1997). Este mecanismo de ação pode explicar a presença de muitos mastócitos imaturos que observamos no mesentério, pois precursores de mastócitos ali

presentes poderiam estar sendo estimulados a proliferar ou se diferenciar. A proliferação da população de mastócitos da medula óssea, causada pelo G-CSF, não nos permite concluir se houve ou não recrutamento destas células para a cavidade peritoneal, como após os tratamentos com água destilada, anti-IgE e composto 48/80, pois a população de mastócitos da medula óssea não diminuiu. No entanto, o grande número de mastócitos imaturos observado no mesentério pode ter sido, também, resultado de proliferação e diferenciação local (TAKAUE et al., 1990; OGAWA, 1993; YANG, et al., 1998) de precursores de mastócitos que já se encontravam no tecido ou uma diferenciação de precursores recém-migrados da medula óssea. Nossos achados podem facilitar a interpretação de alguns resultados obtidos após o uso clínico do G-CSF, como reações de hipersensibilidade mediadas por IgE, apresentadas por 75% dos pacientes que recebem este fator durante o tratamento de distúrbios mielopoiéticos (COSTA, 1998).

A injeção intraperitoneal do GM-CSF não causou a desgranulação dos mastócitos peritoneais. Além de não causar desgranulação, não foi observado aumento de mastócitos imaturos no mesentério com o uso *in vivo* do GM-CSF, nem alterações no número de mastócitos da medula óssea, o que sugere que o GM-CSF não age sobre o recrutamento e proliferação deste tipo celular. No entanto, alguns autores atribuem ao GM-CSF liberado por mastócitos ativados (WODNAR-FILIPOWSKI et al., 1989; OKAYAMA et al., 1998) a capacidade de atrair e manter eosinófilos e fibroblastos no sítio de inflamação (LEVI-SCHAFFER et al., 1998; ARMETTI et al., 1999), da mesma maneira que os componentes pré-formados liberados pelos mastócitos, já discutidos anteriormente. PLUZNICK e cols. (1984), em experimentos realizados com mastócitos de camundongo da linhagem PT18, demonstraram que o GM-CSF estimula a proliferação de mastócitos. Ainda, experimentos realizados *in vitro* por OGAWA (1993) e NISHIJIMA (1997), demonstram que o GM-CSF suporta a formação e o crescimento de colônias de mastócitos. Este fator, porém, não demonstrou efeito sobre os mastócitos no modelo experimental que utilizamos. Estudos *in vitro* realizados por BRESSLER e cols. (1989), ROTTEM e cols. (1994a) e DU e cols. (1997), também não demonstram um efeito biológico significativo do GM-CSF sobre a população de mastócitos, nem mesmo quando associado ao SCF ou IL-3. Para ocorrer sinalização intracelular, além do GM-CSF se ligar à subunidades α de seu receptor, esta subunidade deverá estar acoplada à subunidade $\beta 1$ (NICOLA e METCALF, 1991). No

entanto, a mesma subunidade $\beta 1$ também é compartilhada com as subunidades α , que liga outros mediadores como IL-3, IL-4 e IL-5 (NICOLA & METCALF, 1991; WATANABE et al., 1995; SCOTT & BEGLEY, 1999). Desta forma, o uso destes mediadores em associação, pode ter a um efeito inibitório e não sinérgico, na resposta celular (NICOLA & METCALF, 1991; ROTTEM et al., 1994a). Isto poderia explicar a falta de efeito biológico do GM-CSF sobre mastócitos.

Distúrbios imunológicos que apresentam um grande acúmulo de mastócitos, como asma, rinite, rejeição de transplantes e as várias formas de fibrose (NILSSON et al., 1994; ARMETTI et al., 1999) poderão ser melhor compreendidas e solucionadas se os mediadores envolvidos no processo de recrutamento de mastócitos da medula óssea forem conhecidos. Estudos futuros, que possam utilizar o fracionamento dos componentes dos grânulos dos mastócitos, permitirão que o papel de cada um destes componentes seja testado no processo de recrutamento de mastócitos da medula óssea para sítios periféricos. A utilização do método do isolamento imunomagnético associado aos modelos experimentais aqui descritos, facilitará a obtenção de resultados mais precisos com relação à participação de mediadores químicos específicos no processo de recrutamento dos mastócitos da medula óssea para sítios periféricos.

CONCLUSÕES

CONCLUSÕES

1. A água destilada causa lise dos mastócitos peritoneais e consequente liberação dos componentes pré-formados dos grânulos.
2. Quarenta e oito horas após a lise, ocorre uma diminuição da população de mastócitos da medula óssea.
3. A injeção do composto 48/80 e de anti-IgE também resultam na diminuição da população de mastócitos da medula óssea, observada 48 horas após o tratamento.
4. O número de mastócitos isolados da medula óssea é equivalente, 48 horas após a injeção de água destilada, do composto 48/80 ou da anti-IgE.
5. Os fatores pré-formados são essenciais para o recrutamento de mastócitos da medula óssea para a cavidade peritoneal.
6. O G-CSF não causa desgranulação de mastócitos peritoneais, porém é observado um aumento na população de mastócitos da medula óssea.
7. O G-CSF promove um aumento do número de mastócitos imaturos no mesentério.
8. O GM-CSF não causa desgranulação dos mastócitos peritoneais e também não são observadas alterações na população de mastócitos da medula óssea.

ANEXOS

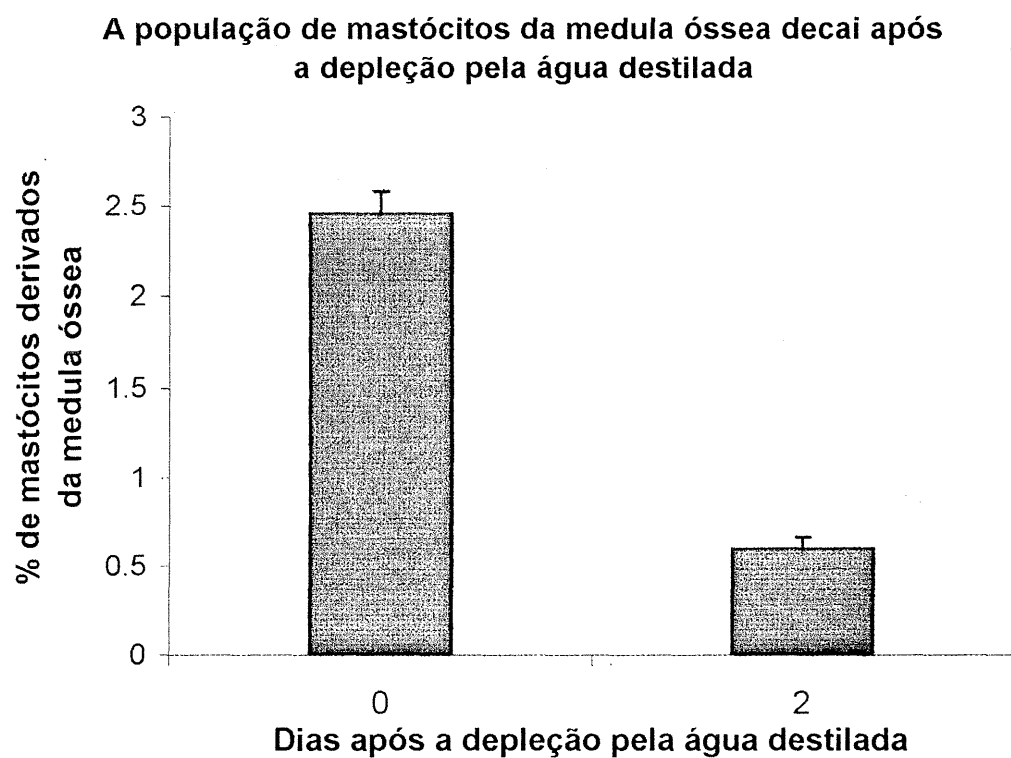


GRÁFICO 1 – Redução da população de mastócitos da medula óssea, dois dias após a injeção intraperitoneal de água destilada. Os mastócitos são isolados com o mAb BGD6 conjugado a esferas magnéticas.

A injeção intraperitoneal de composto 48/80 resulta em redução dos mastócitos na medula óssea

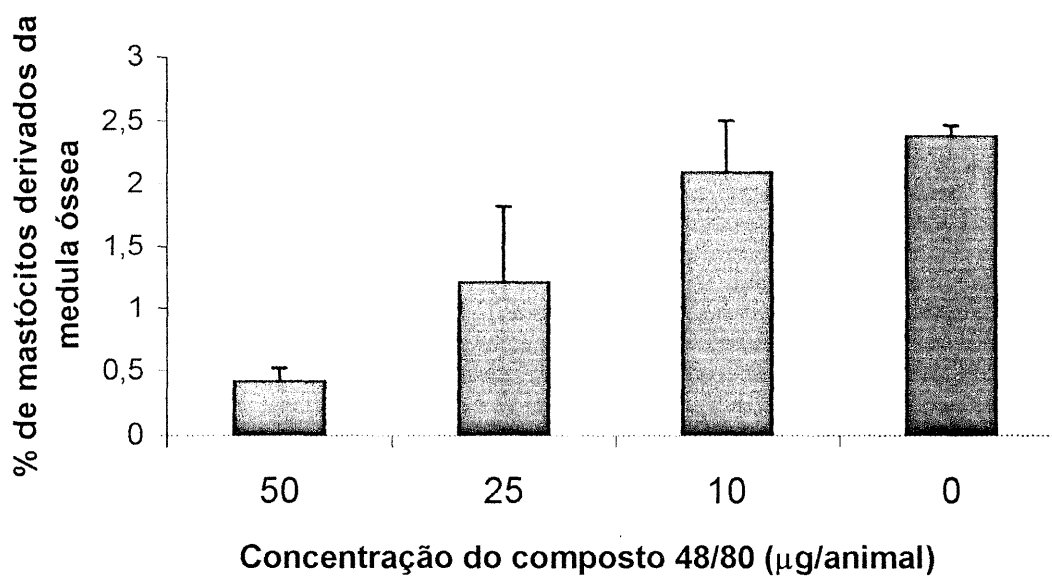


GRÁFICO 2 - Demonstração da redução da população de mastócitos da medula óssea. Os mastócitos foram isolados com o mAb BGD6 conjugado às esferas magnéticas, dois dias após a injeção intraperitoneal de composto 48/80.

A injeção intraperitoneal de anti-IgE reduz o número de mastócitos na medula óssea

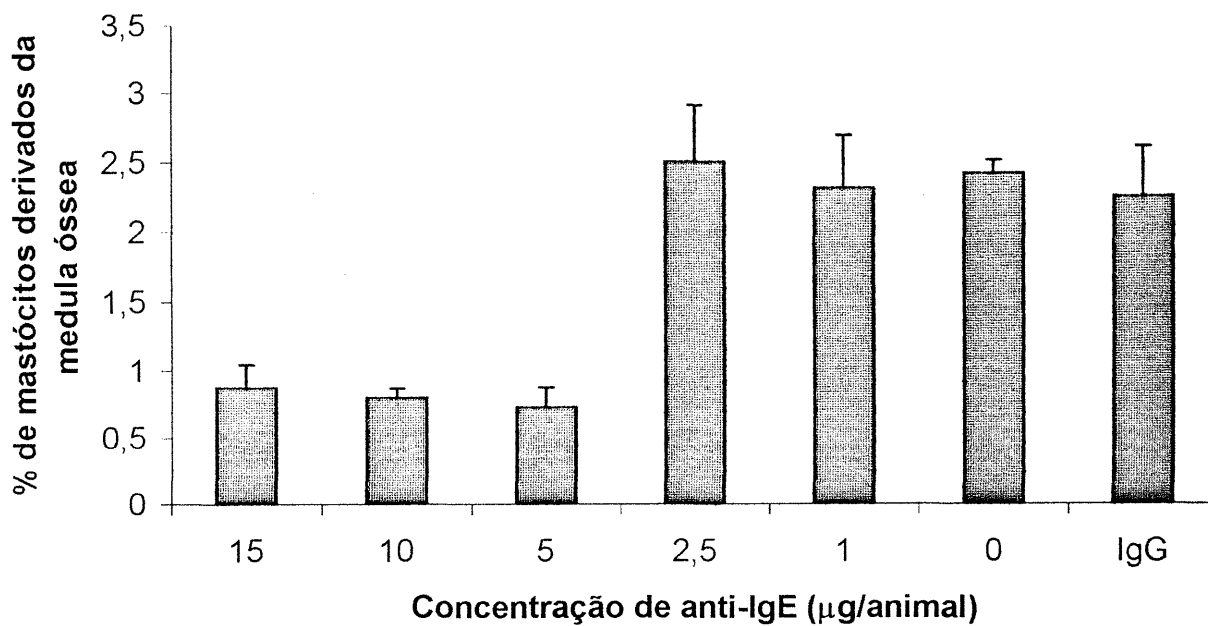


GRÁFICO 3 - Demonstração da redução da população de mastócitos da medula óssea, observada no segundo dia após a injeção intraperitoneal de anti-IgE. Os mastócitos foram isolados pelo mAb BGD6 conjugado às esferas magnéticas.

Dois dias após a injeção intraperitoneal de G-CSF observa-se um aumento significativo de mastócitos na medula óssea

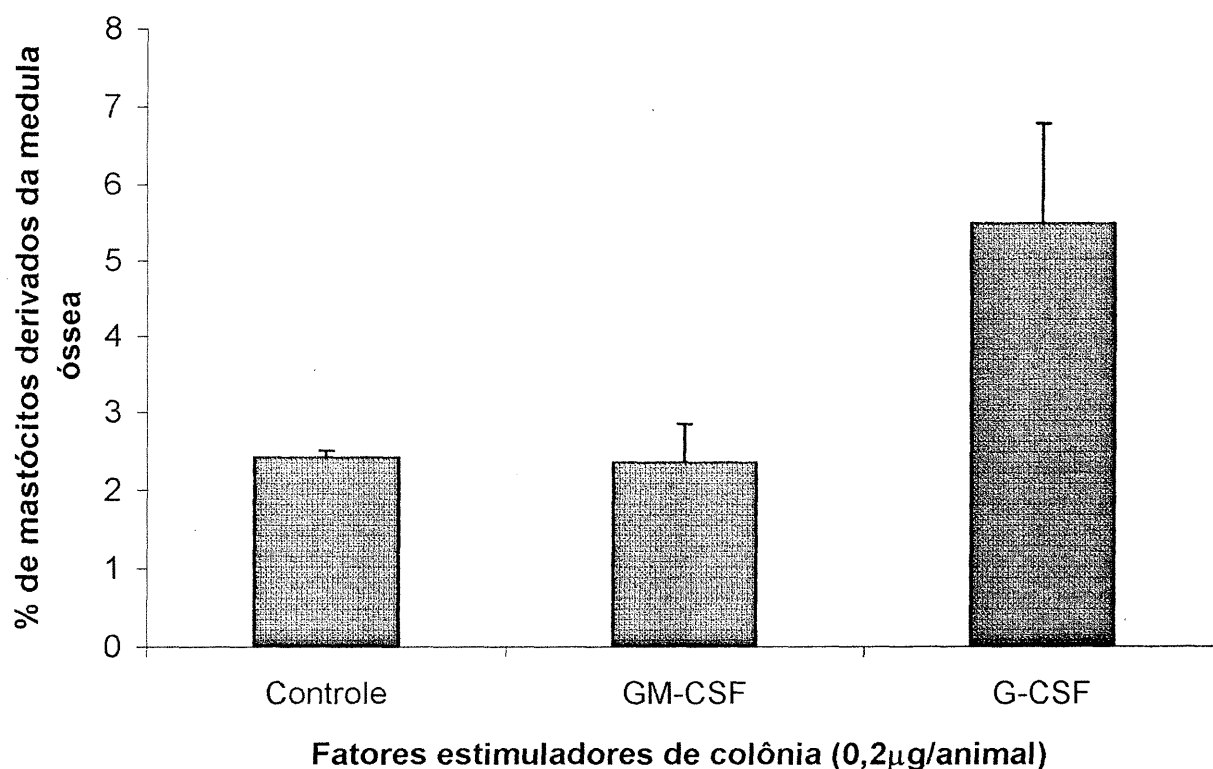


GRÁFICO 4 – Efeito dos fatores de crescimento sobre os mastócitos derivados da medula óssea. Os animais que receberam GM-CSF intraperitonealmente, não apresentaram alterações na população de mastócitos da medula óssea.

Tabela 1 – População de mastócitos do mesentério de animais tratados com G-CSF e controle. Coloração: azul de toluidina.

Animais	Mastócitos maduros		Mastócitos imaturos *	
	janelas	Próx. a vasos	janelas	Próx. a vasos
Controle	349	2105	Não detectado	Não detectado
Injetado com G-CSF	325	3193	23	43

O número de mastócitos representa a média do número de células contadas em 360 campos, obtidos de 6 lâminas de mesentério provenientes de 3 animais tratados com rG-CSF e de 3 animais controle.

*Mastócitos imaturos: células com poucos grânulos citoplasmáticos metacromáticos.

VIII – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- ARAI, N.; NAITO, Y.; MASUDA, E. S.; LEE, H.; TSURUTA, R.; ENDO, H.; YOKOTA, T.; ARAI, K. Expression of TH1 and TH2 cytokines that control mast cell growth. *In: Biological and molecular aspects of mast cell and basophil differentiation and function*, edited by Kitamura, Y.; Yamamoto, S.; Galli, S. J.; Greaves, M. W. **Raven Press, Ltd.**, New York, p. 39, 1995.
- ARMETTI, L.; ADMON, D.; SOLOMON, A.; LEVI-SCHAFFER, F. Mast cells and eosinophils – their role in tissue remodeling. **ACI International**, v. 11, p. 22, 1999.
- ASHMAN, L. K. The biology of stem cell factor and its receptor. **Intl. J. Biochem. Cell Biol.** V. 31, p. 1037-1051, 1999.
- ASKENASE, P. W. Immunopathology of parasitic diseases: involvement of basophils and mast cells. **Springer Semin. Immunopathology**, v. 2, p. 417-442, 1980.
- BLOOM, G. D.; HAEGERMARK, O. A study on morphological changes and histamine release induced by 48/80 in rat peritoneal mast cell. **Exp. Ell Res.**, v. 40, p. 637-654, 1965.
- BODINE, D. M.; CROSIER, P. S.; CLARK, S. C. Effects of hematopoietic growth factors on the survival of primitive stem cells in liquid suspense culture. **Blood**. V.78, p. 914, 1991.
- BRESSLER, R. B.; THOMPSON, H. L.; KEFFER, J. M.; METCALFE, D. D. Inhibition of the growth of IL-3-dependent mast cells from murine bone marrow by recombinant granulocyte macrophage-colony-stimulating factor. **J. Immunol.** V. 143, p. 135, 1989.

- CENTER, D. M.; KORNFELD, H.; CRUIKSHANK, W. W. Interleukin-16. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, v. 29, p. 1231-1234, 1997.
- COSTA, J. J. Updates on cells and cytokines: The therapeutic use of hematopoietic growth factors. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 101, p.1-6, 1998.
- CREWS, F. T.; MORITA, Y.; GIVNEY, A. N.; HIRATA, F.; SIRAGANIAN, R. P.; AXELROD, J. IgE-mediated histamine release in rat basophilic leukemia cells: receptor activation, phospholipid methylation, Ca^{2+} flux, and release of arachidonic acid. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 212, p. 561-571, 1981.
- DE BOER, W. I.; VAN SCHADEWIJK, A.; SONT, J. K.; SHARMA, H. S.; STOLK, J.; HIEMSTRA, P. S.; VAN KRIEKEN, J. H. Transforming growth factor beta 1 and recruitment of macrophages and mast cells in airways in chronic obstructive pulmonary disease. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, v. 158, p. 1951-1957, 1998.
- DE PAULI, A.; MINOPOLI, G.; ARBUSTINI, E.; DE CRESCENZO, G.; DAL PIAZ, F.; PUCCI, P.; RUSSO, T.; MARONE, G. Stem cell factor is localized in, release from, and cleaved by human mast cells. **J. Immunol.**, v. 163, p. 2799-2808, 1999.
- DU, Z.; LI, Y.; XIA, H.; IRANI, A.; SCHWARTZ, L. B. Recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (CSF), but not recombinant human granulocyte CSF, down-regulates the recombinant human stem cell factor-dependent differentiation of human fetal liver-derived mast cells. **J. Immunol.** V. 159, p. 838-845, 1997.
- DVORAK, A. M. New aspects of mast cell biology. **Int. Arch. Allergy Immunol.** v. 114, p. 1-9, 1997.
- ERB, K. J.; HOLLOWAY, J. W.; LE GROS, G. Innate Immunity: mast cells in the front line. **Current Biology**, v. 6, p. 941, 1996.

- ERLICH, P. Beitrage zur Kennthis der Anilinfarben und ihrer Verwendung in der mikroskopischen technik. Arch. Mikr. Anat., **13**:263-277, 1877.
- FAWCETT, D. W. An experimental study of mast degranulation and regeneration. **Anat. Rec.**, v. 121, p.29-43, 1955.
- FUNG, M. C.; HAPEL, J. P.; YMER, S.; COHEN, D. R.; JOHNSON, R. M.; CAMPBELL, H. D.; YOUNG, I. G. Molecular cloning of cDNA for murine interleukin 3. **Nature**, v. 307, p. 233, 1984.
- GALLI, S. J.; DVORAK, A. M.; DVORAK, H. F. Basophils and mast cells: morphologic insights into their biology, secretory patterns and function. **Prog. Allergy**, v. 34 p. 1, 1984.
- GALLI, S. J. New insights into "The riddle of the mast cell": microenvironmental regulation of mast cell development and phenotypic heterogeneity. **Lab. Inv.** V. 62, p. 5-33, 1990.
- GALLI, S. J.; TSAI, M.; WERSHIL, B. K. The c-kit receptor, stem cell factor and mast cells. What each is teaching us about the others. **Am. J. Pathol.**, v. 142, p. 965-974, 1993.
- GALLI, S. J.; LANTZ, C. S. Allergy. In: *Fundamental Immunology*. Edited by William E. Paul. **Lippincott-Raven Publishers**, Philadelphia, PA, 4th edition, p.1127, 1999.
- GORDON, J. R.; GALLI, S. J. Release of both preformed and newly synthesized tumor necrosis factor alpha (TNF- α)/cachectin by mouse mast cells stimulated via de Fc epsilon RI: a mechanism for the sustained action of mast cell-derived TNF- α during IgE-dependent biological responses. **J. Exp. Med.**, v. 174, p. 103, 1991.
- GRUBER, B. L.; MARCHESE, M. J.; KEW, R. R. Transforming growth factor- β 1 mediates mast cell chemotaxis. **J. Immunol.**, v. 152, p. 5860, 1994.

- GRÜTZKAU, A.; KRÜGER-KRASAGAKES, S.; KÖGEL, H.; MÖLLER, A.; LIPPERT, U.; HENZ, B. M. Detection of intracellular interleukin-8 in human mast cells: flow cytometry as a guide for immunoelectron microscopy. **J. Histochem. Cytochem.** V. 45, p. 935-945, 1997.
- HAMANN, K.; HAAS, N.; GRABBE, J.; WELKER, P.; CZARNETZKI, B.M.; Two novel mast cell phenotypic markers, monoclonal antibodies Ki-MC1 e Ki-M1P, identify distinct mast cell subtypes. **J. Dermatol.**, v. 133, p. 547-552, 1995.
- HAMAWY, M. M.; OLIVER, C. D.; SIRAGANIAN, R. P. Inhibition of IgE binding to RBL-2H3 cells by a monoclonal antibody (BD6) to a surface protein other than the affinity receptor. **J. Immunol.**, v. 148, p. 524, 1992.
- HAMAWY, M. M.; MERGENHAGEM, S. E.; SIRAGANIAN, R. P. Protein tyrosine phosphorylation as a mechanism of signalling in mast cells and basophils. **Cellular Signalling**, v. 7, n. 6, p. 535-544, 1995.
- HARTMANN, K.; HENZ, B. M.; KRUGER-KRASAGAKES, S.; KOHL, J.; BURGER, R.; GUHL, S.; HAASE, I.; LIPPERT, U.; ZUBERBIER, T. C3a and C5a stimulate chemotaxis of human mast cells. **Blood**, v.89, p. 2863-2870, 1997.
- HATANAKA, K.; KITAMURA, Y.; NISHIMURE, Y. Local development of bone marrow derived precursors in the skin of mice. **Blood**, v. 53, p. 142, 1979.
- HUFF, T. F.; LANTZ, C. S.; RYAN, J. J.; LEFTWICH, J. A. Mast cell-committed progenitors. In *Biological and molecular aspects of mast cell and basophil differentiation and function*. Y. Kitamura, Y. Yamamoto, S. J. Galli and M. W. Greaves, ed. Raven Press, Ltd., NY, p.105. 1995.

- IHLE, J.N.; KELLER, J.; OROSZLAN, S.; HENDERSON, L.E.; COPELAND, T.D.; FITCH, F.; PRYSTOWSKY, M.B.; GOLDWASSER, E.; SCHRADER, J.W.; PARASZYNSKI E.; DY, M.; LEBEL, B. Biologic properties of homogenous interleukin 3. I. Demonstration of WEHI-3 growth-factor activity, colony-stimulating factor activity, P cell-stimulating factor activity and histamine-producing cell-stimulating factor activity. **J. Immunol.**, 131:282-287, 1983.
- ISHIZAKA, T.; ISHIZAKA, K. Activation of mast cells mediator release through IgE receptors. **Prog. Allergy**. V. 34, p. 188-235, 1984.
- ITOH, Y.; IKEBUCHI, K.; HIRASHIMA, K. Interleukine-3 and granulocyte-colony stimulating factor as survival factors in murine hematopoietic stem cells *in vitro*. **Int. J. Hematol.**, v. 55, p. 139, 1992.
- JAMUR, M. C.; VUGMAN, I. Rat peritoneal mast cell regranulation and acid phosphatase and trimetaphosphatase activity induced after stimulation by 48/80. A fluorescence, ultrastructural, and cytochemical study. **Cell. Mol. Biol.** V. 34, p. 231-237, 1988.
- JAMUR, M. C.; GRODZKI, A. C. G.; OLIVER, C. Identification of a putative mast cell precursor using mast cell specific antibody BGD6. **Mol. Biol. Cell**, v.7, p. 151a, 1996.
- JAMUR, M. C.; GRODZKI, A. C. G.; MORENO, A. N.; SWAIM, W. D.; SIRAGANIAN, R. P.; OLIVER, C. Immunomagnetic isolation of rat bone marrow-derived and peritoneal mast cells. **J. Histochem. Cytochem.** V. 45, p. 1715-1722, 1997.
- JAMUR, M. C.; GRODZKI, A. C. G.; MELLO, L. F. C.; MORENO, A. N.; SIRAGANIAN, R. P.; OLIVER, C. Depletion of mast cells from the peritoneal cavity results in an increase in undifferentiated mast cells in the bone marrow and the appearance of mast cells in the circulation. **Mol. Biol. Cell**, v. 9, p. 378a, 1998.

- JOHNSON, A. R.; MORAN, N. C. Selective release of histamine from rat mast cell by compound 48/80 and antigen. **J. Physiol.**, p. 453-459, 1969.
- KANAKURA, Y.; THOMPSON, H.; NAKANO, T.; YAMAMURA, T-I.; ASAI, H.; KITAMURA, Y.; METCALF, D. D.; GALLI, S. J. Multiple bidirectional alterations of phenotype and changes in proliferative potential during the *in vitro* and *in vivo* passage of clonal mast cell populations derived from mouse peritoneal mast cells. **Blood**, v. 72, p. 877-885, 1988.
- KARIMI, K.; REDEGELD, F. A.; HEIJDRRA, B.; NIJKAMP, F. P. Stem cell factor and interleukin-4 induce murine bone marrow cells to develop into mast cells with connective tissue type characteristics *in vitro*. **Exp. Hematol.**, v. 27, p. 654-662, 1999.
- KASUGAI, T.; TEI, H.; OKADA, M.; HIROTA, S.; MORIMOTO, M.; YAMADA, M.; NAKAMA, A.; ARIZONO, N.; KITAMURA, Y. Infection with *Nippostrongylus brasiliensis* induces invasion of mast cells precursor from peripheral blood to small intestine. **Blood**, v. 85, p. 1334-1340, 1995.
- KIM, H. M.; LEE, Y. M. Role of TGF-beta 1 on the IgE-depedent anaphylaxis reaction. **J. Immunol.**, v. 162, p. 4960-4965, 1999.
- KINZER, C. A.; KEEGAN, A. D.; PAUL, W. E. Identification of FcεRI^{neg} mast cells in mouse bone marrow cell cultures. Use of a monoclonal anti-p161 antibody. **J. Exp., Med.**, v. 182, p. 575-579, 1995.
- KITAMURA, Y.; MATSUDA, H.; HATANAKA, K. Clonal mature of mast cells clusters formed in W/W mice after bone marrow transplantation. **Nature**, v. 281, p. 154-155, 1979.
- KITAMURA, Y.; YOKOYAMA, M.; MATSUDA, H.; OHNO, T. Spleen colony forming cell as common precursor for tissue mast cell and granulocytes. **Nature**, v. 291, p. 159-162, 1981.

- KITAMURA, Y.; KASUGAI, T.; AKIZONO, N.; MATSUDA, H. Development of mast cells and basophils: processes and regulation mechanisms. **Am. J. Med. Sci.**, v. 306, p. 185-191, 1993.
- KRENSKY, A. M. Biology and therapeutic implications of the chemokine RANTES. **ACI International**, v. 11, p. 16, 1999.
- LANTZ, C. S.; HUFF, T. F. Differential responsiveness of purified mouse c-kit⁺ mast cells and their progenitors to IL-3 and stem cell factor. **J. Immunol**, v. 155, p. 4024-4029, 1995.
- LEVI-SCHAFFER, F.; TEMKIN, V.; MALAMUD, V.; FELD, S.; ZILBERMAN, Y. Mast cells enhance eosinophil survival in vitro: role of TNF- α and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. **J. Immunol.**, v. 160, p. 5554-5562, 1998.
- LEWIS, R. A.; AUSTEN, K. F. Mediation of local homeostasis and inflammation by leukotrienes and other mast cell-dependent compounds. **Nature**, v. 293, p.103-108, 1981.
- MATOLLI, S.; ACKERMAN, V.; VITTORI, E.; MARINI, M. Mast cell chemotactic activity of RANTES. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 209, p. 316-321, 1995.
- MEININGER, C. J.; YANO, H.; ROTTAPEL, R.; BERNSTEIN, A.; ZSEBO, K. M.; ZETTER, B. R. The c-kit receptor ligand functions as a mast cell chemoattractant. **Blood**, v. 79, p. 958-963, 1992.
- MENDONÇA, V. O.; VUGMAN, I.; JAMUR, M. C. Maturation of adult rat peritoneal and mesentery mast cells: a morphological and histofluorescence study. **Cell Tissue Res.** V. 243, p. 635, 1986.

- METCALF, D.; NICOLA, N. A. Proliferative effects of purified granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) on normal mouse hemopoietic cells. **J. Cell Physiol.**, v. 116, p. 198, 1983.
- METCALF, D. The molecular biology and functions of the Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factors. **Blood**. V. 67, p. 257-267, 1986.
- METCALF, D. D.; BARAM, D.; MEKORI, Y. A. Mast cells. **Physiol. Rev.**, v. 77, p. 1033-1079, 1997.
- METZGER, H. The receptor with high affinity for IgE. **Immunol. Rev.**, v. 125, p. 37-48, 1992.
- MORENO, A. N.; ORTOLANI-MACHADO, C. F.; MELLO, L. F. C.; OLIVER, C.; JAMUR, M. C. Depletion of peritoneal mast cells correlates with a reduction in bone marrow mast cells. **Mol. Biol. Cell**, v. 8, p. 456a, 1997.
- MOUSLI, M. C.; BRONNER, J.; BOCKAERT, J.; ROUOT, B.; LANDRY, Y. Interaction of substance P, compound 48/80 and mastoparan with α -subunit C-terminal of G-protein. **Immunol. Lett.**, v. 25, p. 355-358, 1990.
- MOUSLI, M. C.; BRONNER, C.; LANDRY, Y.; BOCKAERT, J.; ROUOT, B. Direct activation of GTP-binding regulatory proteins (G-proteins) by substance P and compound 48/80. **FEBS Lett.**, v. 259, p. 260-262, 1990.
- MURAKAMI, M.; AUSTEN, K. F.; ARM, J. P. Cytokine regulation of arachidonic acid metabolism in mast cells, In: *Biological and molecular aspects of mast cell and basophil differentiation and function*, edited by Kitamura, Y.; Yamamoto, S.; Galli, S. J.; Greaves, M. W. **Raven Press, Ltd.**, New York, p. 25, 1995.

- NAKAHATA, T.; SPICER, S. S.; CANTER, J. R.; OGAWA, M. Clonal assay of mouse mast cell colonies in methylcellulose culture. **Blood**. V. 60, p. 352p., 1982.
- NICOLA, N. A.; METCALF, D. D. Subunit promiscuity among hemopoietic growth factor receptors. **Cell**, v. 67, p. 1, 1991.
- NILSSON, G.; BUTTERFIELD, J. H.; NILSSON, K.; SIEGBAHN, A. Stem Cell factor is a chemotactic factor for human mast cells. **J. Immunol.**, v. 153, p. 3717-3723, 1994.
- NILSSON, G.; JOHNELL, M.; HAMMER, C. H.; TIFFANY, H. L.; NILSSON, K.; METCALF, D. D.; SIEGBAHN, A.; MURPHY, P. M. C3a and C5a are chemotaxins for human mast cells and act through distinct receptors via a pertussis toxin-sensitive signal transduction pathway. **J. Immunol.**, v. 157, p. 1693-1698, 1996.
- NILSSON, G.; METCALF, D. D. Contemporary issues in mast cell biology. **Allergy and Asthma Proc.**, v.17, p. 59-63, 1996.
- NILSSON, G.; HJERTSON, M.; ANDERSSON, M.; GREIFF, L.; SVENSSON, C.; NILSSON, K.; SIEGBAHN, A. Demonstration of mast cell-chemotactic activity in nasal lavage fluid: characterization of one chemotaxin as a c-kit ligand, stem cell factor. **Allergy**, v. 53, p. 874-879, 1998.
- NILSSON, G.; MIKOVITS, J. A.; METCALF, D. D.; TAUB, D. D. Mast cell migratory response to interleukin-8 is mediated through interaction with chemokine receptor CXCR2/Interleukin-8RB. **Blood**, v. 93, p/2791-2797, 1999.
- NISHIJIMA, I.; NAKAHATA, T.; HIRABAYASHI, J. A human GM-CSF receptor expressed in transgenic mice stimulates proliferation and differentiation of hemopoietic progenitors to all lineages in response to human GM-CSF. **Mol. Biol. Cell**. v. 6, p. 497-508, 1995.

- NISHIJIMA, I.; WATANABE, S.; NAKAHATA, T.; ARAI, K. Human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (hGM-CSF)-dependent *in vitro* proliferation and differentiation of all hematopoietic progenitor cells in hGM-CSF receptor transgenic mice. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 100, n. 6, p. S79-S86, 1997.
- ODARJUK, J.; ROSSOW, N.; KARAWAJEW, L. Investigation of mast cell differentiation *in vivo* by use of monoclonal antibodies. **Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.**, v. 90, p. 261-266, 1989.
- OGAWA, M. Differentiation and proliferation of hematopoietic stem cells. **Blood**. V. 81, n. 11, p. 2844-2853, 1993.
- OKAYAMA, Y.; KOBAYASHI, H.; ASHMAN, L. K.; DOBASHI, K.; NAKAZAWA, T.; HOLGATE, S. T.; CHURCH, M. K.; MOTI, M. Human lung mast cells are enriched in the capacity to produce granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in response to IgE-dependent stimulation. **Eur. J. Immunol.** v. 28, p. 708-715, 1998.
- OLIVER, C.; SAHARA, N.; KITANI, S.; ROBBINS, A. N.; MERTZ, L. M.; SIRAGANIAN, R. P. Binding of monoclonal antibody AA4 to gangliosides on rat basophilic leukemia cells produces changes similar to those seen with FC ϵ receptor activation. **J. Cell. Biol.** v. 116, p. 635, 1992.
- PLUZNIK, D. H.; CUNNINGHAM, R. E.; NOGUCHI, P. D. Colony-stimulating factor (CSF) controls proliferation of CSF-dependent cells by acting during the G1 phase of the cell cycle. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. V. 81, p. 7451, 1984.
- ROSEMBERG, H.F.; GALLIN, J.I. Inflammation. In: *Fundamental Immunology*. Edited by William E. Paul. **Lippincott-Raven Publishers**, Philadelphia, PA, 4th edition, p.1051, 1999.

- ROTTEM, M.; HULL, G.; METCALF, D. D. Demonstration of differential effects of cytokines on mast cells derived from murine bone marrow and peripheral blood mononuclear cells. **Exp. Hematol.** v. 2, p. 1147, 1994a.
- ROTTEM, M.; OKADA, T.; GOFF, J. P.; METCALF, D. D. Mast cells cultured from the peripheral blood of normal donors and patients with mastocytosis originate from a CD34⁺/FC ϵ RI⁻ cell population. **Blood**, v. 84, p. 2489-2496, 1994b.
- RUMSAENG, V.; CRUIKSHANK, W. W.; FOSTER, B.; PRUSSIN, C.; KIRSHENBAUM, A. S.; DAVIS, T. A.; KORNFELD, H.; CENTER, D. M.; METCALF, D. D. Human mast cell produce the CD4⁺ T lymphocyte chemoattractant factor, IL-16. **J. Immunol.**, v. 159, p. 2904-2910, 1997.
- SALVI, S.; SEMPER, A.; BLOMBERG, A.; HOLLOWAY, J.; JAFFAR, Z.; PAPI, A.; TERAN, L.; POLOSA, R.; KELLY, F.; SANDSTROM, T.; HOLGATE, S.; FREW, A. Interleukin-5 production by human airway epithelial cells. **Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.**, v. 20, p. 984-991, 1999.
- SCHWARTZ, L. B.; AUSTEN, K. F. Structure and function of the chemical mediators of mast cells. **Prog. Allergy**. V. 34, p. 271. 1984.
- SCHWARTZ, L. B.; KEPLEY, C. Development of markers for human basophils and mast cells. **J. Allergy Clin. Immunol.** n. 6, 1231-1240, 1994.
- SCOTT, C. L.; BEGLEY, C. G. The beta common chain (beta c) of the granulocyte macrophage-colony stimulating factor, interleukina-3 and interleukina-5 receptors. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, v. 31, p. 1011-1015, 1999.
- SHRADER, J. W.; LEWIA, Y.; LEWIS-CLARK, C. The peristing (P) cell: histamine content, regulation by a T-cell derived factor, origin from a bone marrow precursor and relationship to mast cells. **Proc. Natl. Acad. Sci., USA**. V. v. 78, p. 323, 1981.

- SIRAGANIAN, R. P. Mast cells and basophils. In: *Inflammation: basic principles and clinical correlates*, edited by Galli, S. J.; Goldstein, I. M.; Snyderman, N. **New York, Raven Press**, p. 513-542, 1988.
- SMITH, T. J.; WEIS, J. H. Mucosal T cells and mast cells share common adhesion receptors. **Immunol. Today**, v. 17, p. 60, 1996.
- SONODA, Y.; SAKABE, H.; OHMISONO, Y.; TANIMUKAI, S.; YOKOTA, S.; NAKAGAWA, S.; CLARK, S. C.; ABE, T. Synergistic actions of stem cell factor and other burst-promoting activities on proliferation of CD34+ highly purified blood progenitors expressing HLA-DR or different levels of c-kit protein. **Blood**, v. 84, p. 4099-4106, 1994.
- TAKAUE, Y.; KAWANO, Y.; READING, C. L.; WATANABE, T.; ABE, T.; NINOMIYA, T.; SHIMIZU, E.; OGURA, T.; KURODA, Y.; YOKOBAYASHI, A.; NAKAHATA, T.; ASANO, S.; VENTURA, G. Effects of recombinant human G-CSF, GM-CSF, IL-3 and IL-1 α on the growth and purified human peripheral blood progenitors. **Blood**, v. 76, p. 330-335, 1990.
- TSAI, M.; TAKASHI, T.; THOMPSON, H.; LANGLEY, K.; ZSEBO, K. M.; METCALF, D. D.; GEISLER, E. N.; GALLI, S. J. Induction of mast cell proliferation, maturation and heparin synthesis by the rat c-kit ligand, stem cell factor. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 88, p. 6382-6386, 1991.
- VALENT, P.; SILLABER, C.; BETTELHEIM P. The growth and differentiation of mast cells. **Prog. Growth Factor Res.**, v. 3, p. 27-41, 1991.
- VALENT, P. The riddle of mast cell: kit(CD117)-ligand as the missing link? **Immunol. Today**. V. 15, n. 3, p.111, 1994.

- VALTIERI, M.; TWEARDY, D. J.; CARACCIOLO, D.; JOHNSON, K.; MAVILIO, F.; ALTMANN, S.; SANTOLI, D.; ROVERA, G. Cytokine-dependent granulocytic differentiation. Regulation of proliferative and differentiative responses in a murine progenitor cell line. **J. Immunol.**, v. 138, n. 11, p.3829-3835, 1987.
- WATANABE, S.; MUTO, A.; ITOH, T.; YOKOTA, T.; MIYAJIMA, A.; ARAI, K. Activation of early response genes and cell proliferation by shared cytokine receptor system of GM-CSF and IL-4. In: *Biological and molecular aspects of mast cell and basophil differentiation and function*, edited by: Kitamura, Y.; Yamamoto, S.; Galli, S. J.; Greaves, M. W. **Raven Press, Ltd.**, New York, p. 79, 1995.
- WESSELY, O.; DEINER, E-M.; LIM, K. C.; MELLITZER, G.; STEINLEIN, P.; BEUG, H. Mammalian granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor expressed in primary avian hematopoietic progenitors: lineage-specific regulation of proliferation and differentiation. **J. Cell Biol.**, v. 141, n. 4, p. 1041-1051, 1998.
- WODNAR-FILIPOWICZ, A.; HEUSSER, C. H.; MORONI, C. Production of the hemopoietic growth factors GM-CSF and interleukin-3 by mast cells in response to IgE receptor-mediated activation. **Nature**. v. 339, p. 150-152, 1989.
- YANG, F.; WATABE, S.; TSUJI, K.; XU, M.; KANEKO, A.; EBIHARA, Y.; NAKAHATA, T. Human Granulocyte Colony-Stimulating Factor (G-CSF) stimulates the *in vitro* and *in vivo* development but not commitment of primitive multipotential progenitors from transgenic mice expressing the human G-CSF receptor. **Blood**. V. 92, n. 12, p. 4632-4640, 1998.