

LUCIANA DE FÁTIMA CHAVES DE MELLO

***ESTUDO DAS ALTERAÇÕES DE POPULAÇÕES DE PRECURSORES DE
MASTÓCITOS NA MEDULA ÓSSEA DE RATO, APÓS DEPLEÇÃO DA
CAVIDADE PERITONEAL***

Monografia apresentada à Coordenação do Curso de Ciências Biológicas, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, para a obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas. Orientadora: Prof^a Dr^a Maria Célia Jamur do Dept^o de Biologia Celular.

CURITIBA

1997

***ESTUDO DAS ALTERAÇÕES DE POPULAÇÕES DE PRECURSORES DE
MASTÓCITOS NA MEDULA ÓSSEA DE RATO, APÓS DEPLEÇÃO DA
CAVIDADE PERITONEAL***

Monografia apresentada à Coordenação do Curso de Ciências Biológicas, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, para a obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas. Orientadora: Prof^a Dr^a Maria Célia Jamur do Dept^o de Biologia Celular.

CURITIBA

1997

À minha mãe, Maria de Lourdes, que sempre me estimulou e ajudou, com toda a sua dedicação, para que este trabalho se realizasse. Sua força e presença constantes foram fundamentais para que eu chegasse até aqui. Mãe, obrigada pelo carinho, paciência e amor devotados ao longo de toda a minha vida e, em especial, nestes quatro anos de graduação.

Minha orientadora, Maria Célia Jamur, pela competência e dedicação, que fizeram do Laboratório de Biologia dos Mastócitos um dos mais produtivos laboratórios do Departamento de Biologia Celular. Sem os seus amplos conhecimentos, que não se limitam apenas à Biologia dos Mastócitos, este trabalho não poderia ter se realizado. Obrigada pelo seu estímulo nos momentos de dúvida e pela sua amizade e compreensão nos momentos difíceis.

...

iii

...

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Constance Oliver, do Naval Office of Research, Virginia, USA, pelo auxílio na parte estatística e pela sua paciência e carinho constantes.

Agradeço à amiga Ana Cristina Grodzki, pela amizade e eterna paciência nos momentos de aflição.

Agradeço à amiga Andréa Novaes Moreno, que é o maior exemplo de que as coisas podem dar certo, mesmo quando parecem impossíveis e que sempre me reergue com uma palavra de conforto.

Agradeço às amigas Roberta Feijó Ortolani e Cláudia Feijó Ortolani-Machado, pela amizade e pela ajuda sempre presentes.

Agradeço a Ricardo Zischler, pelo carinho e compreensão dedicados e pela força que me faz acreditar que tudo pode dar certo.

Agradeço à Gabriela de Almeida Ferreira e Fernanda dos Santos Hirooka pelo companheirismo e alegria que contagiam o laboratório.

Agradeço à Eliana Campagnolo, e demais pós-graduandos do Curso de Pós-Graduação em Morfologia-Biologia Celular pelo apoio e amizade.

Agradeço ao amigo Luiz Fernando Fávaro pela alegria sempre contagiante.

Agradeço aos professores Marco Antônio Randi e Célia Regina Franco pelos conhecimentos de Biologia Celular transmitidos durante a graduação.

Agradeço ao professor Manoel Carlos Toth Quintilham pelos ensinamentos sobre Histologia Básica e, principalmente, pela experiência de vida que me ajudou a crescer e lutar com mais vontade pelos meus sonhos.

Agradeço a Joice Maria da Cunha, amiga e irmã, que sempre esteve comigo durante a graduação, nas horas alegres e desesperadoras. Sua amizade é muito importante para mim.

Agradeço às amigas Adriane Martins de Freitas, Carolina Aymoré Bonin, Mariana Pirih Cordeiro, Kelly Cristiane Gutseit e demais colegas de graduação pelo companheirismo demonstrado durante toda a nossa formação.

SUMÁRIO

Lista de Figuras	vii
Resumo	viii
I - Introdução	1
II - Objetivos	5
III - Material e Métodos	6
IV - Resultados	10
V - Figuras	14
VI - Discussão	22
VII - Conclusão	25
Anexos	26
Referências Bibliográficas	28

LISTA DE FIGURAS

- 1 - Mastócitos imaturos da medula óssea, observados em microscopia confocal, apresentando imunofluorescência positiva para o mAb BGD6.....14
- 2 - A-D Mastócitos da população de células da medula óssea incubadas com mAb BGD6 conjugado às esferas magnéticas e coradas com azul de toluidina.....15
- 3 - A-C Isolamento sequencial de mastócitos da medula óssea, utilizando o mAb AA4 conjugado às esferas magnéticas, seguido de isolamento com o mAb BGD6, também ligado às esferas magnéticas.....16
- 4 - Esquema demonstrando o isolamento sequencial de mastócitos através de imunoafinidade.....17
- 5 - Ultraestrutura de um precursor de mastócito indiferenciado isolado pelo mAb BGD6 conjugado às esferas magnéticas.....18
- 6 - Demonstração da variação da população de mastócitos da medula óssea, isolada pelo mAb AA4 conjugado às esferas magnéticas, após depleção dos mastócitos da cavidade peritoneal por injeção intraperitoneal de água destilada.....19
- 7 - Demonstração da variação de precursores de mastócitos indiferenciados da medula óssea, isolados pelo mAb BGD6 conjugado às esferas magnéticas, após a depleção a cavidade peritoneal.....20
- 8 - Comparação da variação sofrida pelas populações diferenciada e indiferenciada de mastócitos derivados da medula óssea.....21

RESUMO

Mastócitos são células do tecido conjuntivo responsáveis pelas reações alérgicas e processos inflamatórios. Os precursores destas células são originados da medula óssea e migram para os tecidos. No entanto, na medula óssea é possível encontrar mastócitos em todos os estágios de maturação. Os anticorpos monoclonais AA4 (mAb AA4), específico para um gangliosídeo da superfície de mastócitos, e mAb BGD6, específico para uma proteína desta célula, foram conjugados a esferas magnéticas. O mAb AA4 conjugado às esferas magnéticas permitiu isolar a população de mastócitos da medula óssea, que apresentou células em diferentes estágios de maturação. O mAb BGD6 conjugado às esferas magnéticas, além de isolar a mesma população de mastócitos identificada pelo mAb AA4, isolou células precursoras indiferenciadas, pertencentes a linhagem de mastócitos. O isolamento sequencial, utilizando o mAb BGD6 conjugado às esferas logo após a separação imunomagnética com o mAb AA4, permitiu que se isolasse somente a população de células indiferenciadas, não isoladas anteriormente pelo mAb AA4. Estas células ainda foram imunomarcadas com um anticorpo policlonal anti o receptor para o c-kit ligante, presente em mastócitos mas não em basófilos. Após isoladas, tanto pelo mAb AA4 quanto pelo mAb BGD6 conjugados às esferas magnéticas, as células foram coradas com azul de toluidina a 0,1%, pH 2,8 e contadas em câmara de Neubauer. Através desta contagem foi possível estimar e determinar as variações sofridas pelas populações de células diferenciadas e indiferenciadas da medula óssea após depleção dos mastócitos da cavidade peritoneal de ratos pela injeção intraperitoneal de água destilada. A população de células isoladas pelo mAb AA4 conjugado às esferas magnéticas foi estimada em 2,4%. Dois dias após a depleção da cavidade peritoneal esta população diminuiu para 0,3%, após 6 dias aumentou para 0,49% e no 10^o. dia atingiu 0,66%. Através do isolamento sequencial com o mAb BGD6 conjugado às esferas magnéticas pode-se estimar que a população de células indiferenciadas da medula óssea, pertencentes à linhagem de mastócitos, corresponde a 0,02%. No 2^o. dia após a depleção da cavidade peritoneal, esta população cresce para 0,33%, decai para 0,26% no 6^o. dia e atinge 0,4% no 10^o. dia após a depleção. Estes resultados sugerem que além de precursores, mastócitos em maturação podem deixar a medula óssea para povoar os tecidos.

I - INTRODUÇÃO

Os mastócitos são células encontradas como constituintes da maioria dos tecidos conjuntivos. São células facilmente identificadas pelos proeminentes grânulos basofílicos encontrados em seu citoplasma. A metacromasia apresentada por estes grânulos foi o que levou ERLICH (1887) a identificar os mastócitos como células do tecido conjuntivo. Estes grânulos possuem muitas substâncias farmacologicamente ativas, como a histamina e a heparina. Ainda, os mastócitos estimulados liberam prostaglandinas e leucotrienos (SCHWARTZ & AUTEN, 1984). Além destas substâncias, também possuem proteases neutras, fatores quimiotáticos e mediadores químicos que participam das reações inflamatórias e dos processos imunológicos (GALLI et al., 1984; SIRAGANIAN, 1988).

A participação dos mastócitos nos processos alérgicos e inflamatórios é determinada pelos receptores para a imunoglobulina E (IgE), presentes na superfície destas células (ISHIZAKA & ISHIZAKA, 1984). Os receptores para IgE possuem três subunidades: α , β e δ . A subunidade α corresponde ao sítio de ligação para a IgE e está exposta na superfície da membrana (BASCIANO et al., 1986).

Os mastócitos, por serem amplamente distribuídos pelo corpo, são abundantemente encontrados nas superfícies mucosas, incluindo a lâmina própria, submucosa e muscular, podendo ainda ser encontrados livres na cavidade peritoneal de alguns roedores. Os mastócitos localizados na mucosa

constituem, no mínimo, duas populações com características funcionais distintas, que variam de acordo com o estado patológico, com a localização anatômica e com a espécie (MaCDONALD et al., 1980; MILLER, 1980; JARRET & MILLER, 1982). Nos roedores, duas populações fenotipicamente distintas foram descritas: os mastócitos de tecidos conjuntivos (CTMC) e os mastócitos de mucosa (MMC). Em ratos, os CTMC estão presentes na pele, musculatura lisa e estriada, membrana serosa e fluido peritoneal, enquanto que os MMC são encontrados na lâmina própria e no epitélio da mucosa gastrointestinal (ASKENASE, 1980; ERB et al., 1996). Estes achados conferem aos mastócitos outras atividades funcionais, tais como: participação efetiva nas respostas inflamatórias, na citotoxicidade celular direta e indireta e na imunorregulação da reparação de tecidos (BEFUS et al., 1986).

Embora os mastócitos sejam considerados células próprias do tecido conjuntivo, estudos realizados *in vivo* e *in vitro*, mostram através de experimentos indiretos que eles são derivados dos tecidos hematopoiéticos (KITAMURA et al., 1983; GALLI et al., 1984; GALLI, 1990). Apesar dos mastócitos e seus precursores migrarem livremente (SMITH et al., 1996; HUFF et al., 1995), eles são raramente vistos no sangue periférico. Baixos números de mastócitos granulados têm sido encontrados circulando no sangue periférico de ratos (CSABA et al., 1969). Adicionalmente, precursores de mastócitos têm sido reconhecidos no sangue de ratos (ZUCHER-FRANKLIN et al., 1981) e humanos (DENBURG et al., 1983) seguindo culturas em “ágar soft”. Outras células originadas da medula óssea migram já diferenciadas pela corrente sanguínea, tais como, neutrófilos e eosinófilos.

A relação dos mastócitos com a célula fonte hematopoiética multipotente ("stem cell") foi investigada por KITAMURA et al. (1981), SHRADER et al. (1981) e NAKAHATA et al. (1982). Estes pesquisadores sugerem que os mastócitos são uma progênie da célula fonte do tecido hematopoiético. Os mastócitos não são detectados no sangue, no entanto, quando células mononucleares do sangue de camundongo +/+ são diretamente injetadas na pele de camundongo congênito W/W, grupos de mastócitos aparecem nos pontos injetados. Estas evidências indicam que os seus precursores migram através da corrente sanguínea e quando chegam ao tecido conjuntivo, se diferenciam em mastócitos (HATANAKA et al., 1979; KITAMURA et al., 1979). METCALF et al. (1991) sugerem, ainda, que os progenitores de mastócitos não têm papel fisiológico determinado, porém migram para os locais específicos dos tecidos onde amadurecem, passando a exibir fenótipos específicos daquele tecido.

Através de estudos anteriores, realizados em nosso laboratório, utilizando diferentes modelos experimentais, foi possível determinar *in vivo* o tempo de repovoamento e os estágios de maturação dos mastócitos da cavidade peritoneal de rato (MENDONÇA et al., 1986; JAMUR & VUGMAN, 1986; GRECA et al., 1989; NIEDERHEITMANN, 1993). A caracterização destas células foi realizada através de estudos morfológicos utilizando histofluorescência, histoquímica e citoquímica ultraestrutural (JAMUR et al., 1986). No entanto, dados morfológicos, mesmo associados à citoquímica do conteúdo granular não seriam suficientes para caracterizar precursores de mastócitos ainda indiferenciados e, portanto, desprovidos de grânulos.

Utilizando um anticorpo monoclonal anti-gangliosídeo específico de mastócito mAb AA4 (OLIVER et al., 1992), conseguimos marcar mastócitos na medula óssea nos seus diferentes estádios de maturação. Para tal, foi necessário utilizar a fixação por microondas associada a baixas concentrações de glutaraldeído para preservar a antigenicidade (JAMUR et al., 1995a). Assim sendo, foi possível classificar as células imunomarcadas em: bem imaturas, imaturas e maduras (JAMUR et al., 1995; GRODZKI et al., 1996).

Com a utilização do anticorpo mAb AA4 conjugado a esferas magnéticas “tosyl-ativadas”, foi possível isolar a população de mastócitos da medula óssea (JAMUR et al., 1995b). Utilizando a separação sequencial com o mAb AA4 e, a seguir, com o mAb BGD6 conjugado a esferas magnéticas, foi possível isolar uma população de células indiferenciadas. Estas células foram positivas quando imunomarcadas com o anticorpo anti-CD34, confirmando que pertencem à linhagem de mastócitos (VALENT et al., 1994).

Durante o desenvolvimento deste trabalho, utilizamos esferas magnéticas “tosyl-ativadas” (JAMUR, et al., 1995), as quais foram conjugadas aos anticorpos específicos AA4 e BGD6, com o objetivo de separar as células positivas para estes anticorpos da população total de células da medula óssea de rato. As células isoladas pelo mAb AA4 e mAb BGD6 foram imunomarcadas por anticorpos diferentes daqueles utilizados para a separação, tais como anti c-kit e BC4, para melhor caracterizar estas células como mastócitos. Também foram investigadas as alterações na população de células AA4 positivas e BGD6 positivas da medula óssea, durante o repovoamento da cavidade peritoneal dos ratos.

II - OBJETIVOS

Separar da medula óssea de rato a população de mastócitos, através de imunoafinidade, utilizando o anticorpo AA4 e BGD6 e contar as populações de células isoladas com a finalidade de estimar o número de células ainda indiferenciadas presentes na medula óssea.

Identificar a presença de mais de um antígeno na mesma célula, através de imunomarcacão com anticorpos diferentes daqueles utilizados no isolamento das populações.

Analisar o envolvimento das células da linhagem de mastócitos presentes na medula óssea durante o repovoamento da cavidade peritoneal de ratos que tiveram a cavidade peritoneal depletada de mastócitos. Para este estudo, serão isoladas as populações de mastócitos da medula óssea de ratos que sofreram a injeção intraperitoneal de água destilada, as quais serão quantificadas e imunomarcadas.

III - MATERIAL E MÉTODOS

A. Obtenção do material

Foram utilizados ratos Wistar, pesando 150g, os quais foram injetados intraperitonealmente com água destilada. No 2º, 6º e 10º dias após a injeção, foi colhida a medula óssea dos animais, através da injeção de salina tamponada com fosfato (PBS), contendo heparina (1000 unidades/ml), no canal medular do fêmur. As células foram dissociadas com pipeta Pasteur por sucessivas aspirações.

B. Anticorpos

Foram utilizados anticorpos monoclonais AA4 contra um gangliosídeo da superfície de mastócitos (GUO et al., 1989) e mAb BGD6 contra uma proteína (HAMAWY et al., 1992), produzidos em camundongo contra a superfície de células RBL-2H3. Também foi utilizado um anticorpo policlonal anti c-kit (SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY).

C. Conjugação

1. Foi feita uma suspensão uniforme de esferas magnéticas (Dynabeads M-450 Tosylactivated, Dynal), a qual foi agitada brevemente.

2. O anticorpo (mAb AA4 ou mAb BGD6) foi dissolvido em solução de borato 0,05M; pH 9,5; cuja concentração era de 150 µg/proteína/ml.

3. Foi adicionado à solução de mAb AA4 ou mAb BGD6 um volume igual de solução de esferas magnéticas (anticorpo/esfera magnética = 75µg/15µg; LEA et al., 1986).

4. A solução foi incubada por 24h, a 22°C, em um rotor com velocidade lenta.

5. As esferas foram colhidas com auxílio do CPM (Concentrador de Partículas Magnéticas - Dynal).

6. Então, as esferas magnéticas foram lavadas 3 vezes por 10 minutos, 1 vez por 30 minutos e 1 vez "overnight" a 4°C. Todas as lavagens foram feitas em 5ml de PBS 0,01M (tampão fosfato) contendo 0,1% de BSA (soro albumina bovina).

7. As esferas foram colhidas com o CPM e o sobrenadante foi desprezado. As esferas magnéticas foram ressuspendidas em tampão PBS a uma concentração de 4×10^8 esferas (30mg/ml).

8. As esferas magnéticas conjugadas com o anticorpo (mAb AA4 ou mAb BGD6) foram estocadas a 4°C em PBS + BSA 1%.

D. Separação Celular

As células da medula óssea foram colhidas em PBS + BSA 2%, contendo 1000 unidades/ml de DNase (Sigma). A seguir, foram lavadas duas vezes em PBS + BSA 2% e incubadas por 5 a 10 minutos em solução de PBS + BSA 2% contendo as esferas magnéticas conjugadas com o anticorpo específico, na proporção de 3 esferas para 1 célula-alvo. As células foram

lavadas 1 vez em PBS + BSA 2% e 5 vezes em PBS. As lavagens foram feitas por separação magnética, utilizando o CPM.

A população de células isoladas, primeiramente pelo mAb AA4 conjugado a esferas magnéticas, foi utilizada nas contagens afim de investigar o processo de repovoamento da cavidade peritoneal por células precursoras de mastócitos. A população negativa obtida por este isolamento foi incubada com mAb BGD6 com a finalidade de isolar e quantificar as células ainda indiferenciadas que participam do repovoamento da cavidade peritoneal.

E. Microscopia óptica

Contagem: 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. Estas células foram coradas com azul de toluidina 0,1% + ácido acético 0,1%, pH 3,5.

F. Imunofluorescência

As células ligadas às esferas magnéticas foram colocadas em lamínulas revestidas com Cel-Tak, fixadas em paraformaldeído a 2% em metanol a -20°C, lavadas em PBS e a seguir imunomarcadas com os anticorpos BGD6 e anti c-kit. O anticorpo secundário foi uma IgG de jumento anti camundongo e outra anti coelho conjugada ao FITC (fluoresceína). Para fazer a dupla marcação, foi utilizada uma IgG de cabra anti camundongo conjugada ao Texas Red.

G. Microscopia eletrônica

Fixação - as células ligadas às esferas magnéticas conjugadas com o anticorpo mAb BGD6 foram fixadas através de microondas em solução de glutaraldeído a 0,05% mais paraformaldeído a 2%, (JAMUR et al., 1995).

Pós-fixação - As células foram embebidas em ágar a 2% com o auxílio do CPM e, então, pós-fixadas em OsO₄ 2% (EM Science) por 1 hora, a temperatura ambiente e lavadas em água destilada. A seguir, foram desidratadas em séries crescentes de etanol, lavadas em acetona e incluídas em Embed 812 (EM Science). Os cortes ultrafinos foram obtidos com navalha de diamante e contrastados por 10 minutos em citrato de chumbo (REYNOLD, 1963) e acetato de uranila.

IV - RESULTADOS

IDENTIFICAÇÃO DE PRECURSORES DE MASTÓCITOS E DE MASTÓCITOS EM MATURAÇÃO

Com as colorações de rotina para mastócitos, como o azul de toluidina, não é possível identificar mastócitos bem imaturos ou seus precursores. No entanto, estas células podem ser identificadas através da utilização de anticorpos específicos contra antígenos presentes na superfície de mastócitos.

Utilizando os anticorpos monoclonais (mAb) AA4, contra gangliosídeos do tipo GD1b específicos da superfície de mastócito, e BGD6, contra uma proteína de membrana, também específica para esta célula, foi possível identificar mastócitos imaturos, com nenhum ou poucos grânulos. Com a utilização do mAb BGD6, foi possível observar também, células completamente indiferenciadas, as quais são desprovidas de grânulos citoplasmáticos e com raras organelas e que possuem o núcleo arredondado, volumoso e central. Esta população de células pode, inicialmente, ser identificada através de imunofluorescência, apresentando imunofluorescência positiva na sua superfície, quando imunomarcada com o mAb BGD6 (FIG. 1).

Com a utilização dos anticorpos monoclonais AA4 e BGD6 conjugados às esferas magnéticas, foi possível, inicialmente, identificar a linhagem de mastócitos dentro da população total de células da medula óssea, uma vez que estas células ligam-se às esferas magnéticas e podem ser coradas com azul de toluidina. Com o mAb BGD6 conjugado às esferas magnéticas foi

possível, inicialmente, identificar e, a seguir, isolar células indiferenciadas (FIG. 2A), reconhecidas como precursoras de mastócitos, por apresentarem o antígeno para BGD6, bem como mastócitos em maturação, os quais apresentam poucos grânulos metacromáticos, que aumentam durante a maturação (FIG.2B e 2C). Quando maduros, os mastócitos apresentam citoplasma repleto de grânulos (FIG. 2D).

ISOLAMENTO DOS PRECURSORES DE MASTÓCITOS DA MEDULA ÓSSEA E SUA CARACTERIZAÇÃO

O isolamento imunomagnético com o mAb AA4 permite a observação de células em diferentes estágios de maturação. Estas células, após isoladas com o mAb AA4, foram imunomarcadas com o mAb BGD6 e com um anticorpo policlonal anti-c-kit. O c-kit é um receptor para o “c-kit ligante” ou seja, para o Fator de Crescimento de “Stem Cell” (SCF). Quando as células bem imaturas são submetidas à dupla marcação (simultânea) com o mAb BGD6, identificado pelo anticorpo secundário conjugado ao Texas Red, e com o anti-c-kit, revelado pelo anticorpo secundário conjugado a fluoresceína (FITC), existe uma predominância da fluorescência avermelhada sobre a alaranjada após a sobreposição, indicando que o antígeno para BGD6 pode ser expresso anteriormente ao c-kit ou, ainda, ser predominante nestas células. Na maioria das células, observa-se a fluorescência de cor alaranjada, indicando a presença de ambos os antígenos nas células de tamanho intermediário, que ainda estão em maturação (FIG. 3A). Com o objetivo de isolar somente as células indiferenciadas, utilizou-se o isolamento sequencial, no qual

primeiramente se isolou as células com a utilização do mAb AA4 conjugado às esferas magnéticas, seguido do isolamento da população negativa (células que não se ligaram às esferas magnéticas + mAb AA4) pelo mAb BGD6 (FIG. 4).

Para confirmar a identidade destas células, elas foram imunomarcadas com mAb BGD6 e reveladas com o anticorpo secundário marcado com FITC. Todas as células ligadas às esferas magnéticas conjugadas ao mAb BGD6 também apresentaram fluorescência positiva após a imunomarcagem com o mAb BGD6 (FIG. 3B).

BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS / UFPR

A caracterização final destas células indiferenciadas como precursoras de mastócitos, foi a imunomarcagem positiva para o c-kit (FIG. 3C). Este antígeno está presente em mastócitos e ausente em basófilos.

Os precursores de mastócitos isolados foram analisados a nível de microscopia eletrônica, confirmando as características de uma célula indiferenciada. Estas células apresentaram citoplasma desprovido de grânulos e com raras organelas, quase totalmente ocupado pelo núcleo volumoso, arredondado e central (FIG. 5).

ANÁLISE DO PROCESSO DE MIGRAÇÃO DA POPULAÇÃO DE MASTÓCITOS DA MEDULA ÓSSEA APÓS A DEPLEÇÃO DOS MASTÓCITOS DA CAVIDADE PERITONEAL

Além de possibilitar a identificação das populações de mastócitos, o isolamento sequencial realizado com a utilização das esferas magnéticas conjugadas ao mAb AA4 e ao mAb BGD6 também possibilitou a quantificação dos mastócitos que compõem a população da medula óssea. Ainda, se pode

avaliar o processo de migração que ocorre após a depleção de mastócitos da cavidade peritoneal, causada pela injeção intraperitoneal de água destilada.

Após a contagem das células isoladas pelo mAb AA4, em câmara de Neubauer, a partir de animais controle, pode-se observar que a população de mastócitos da medula óssea corresponde a 2,4%. No 2º. dia após a depleção da população de mastócitos da cavidade peritoneal por água destilada, a população de mastócitos da medula óssea decresce para 0,3%. Seis dias após a depleção, esta população de células aumentou para 0,49% e atingiu 0,66% (TABELA I) no 10º. dia após a cavidade peritoneal ter sido depletada (FIG. 6).

O isolamento sequencial pelo mAb BGD6 permitiu quantificar a população de células indiferenciadas pertencentes à linhagem de mastócitos, que corresponde a 0,02%. Dois dias após a depleção da cavidade peritoneal, a população de células indiferenciadas aumentou para 0,3%. No 6º. dia, a população decresceu para 0,26%, aumentando para 0,4% (TABELA II) no 10º. dia após a depleção. (FIG. 7 - 8).

V - FIGURAS

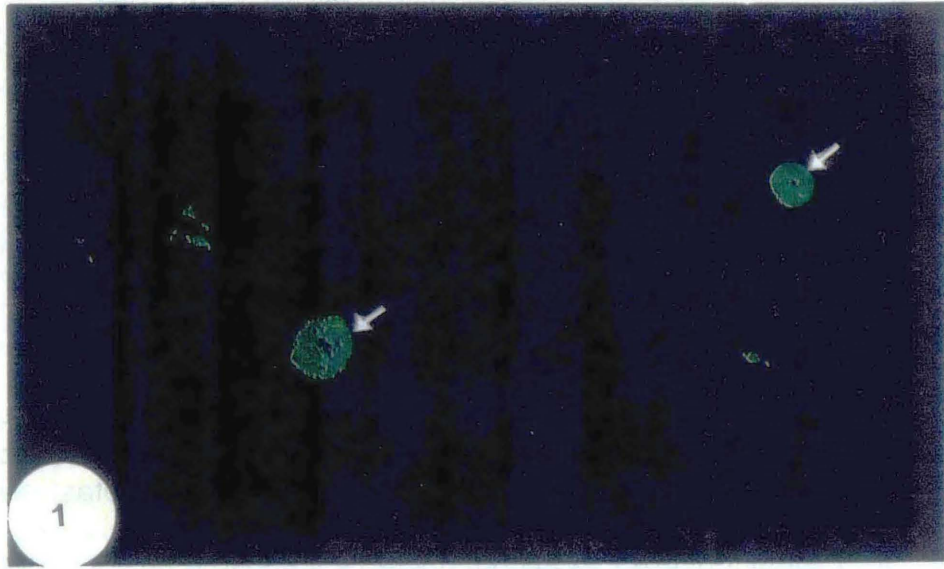
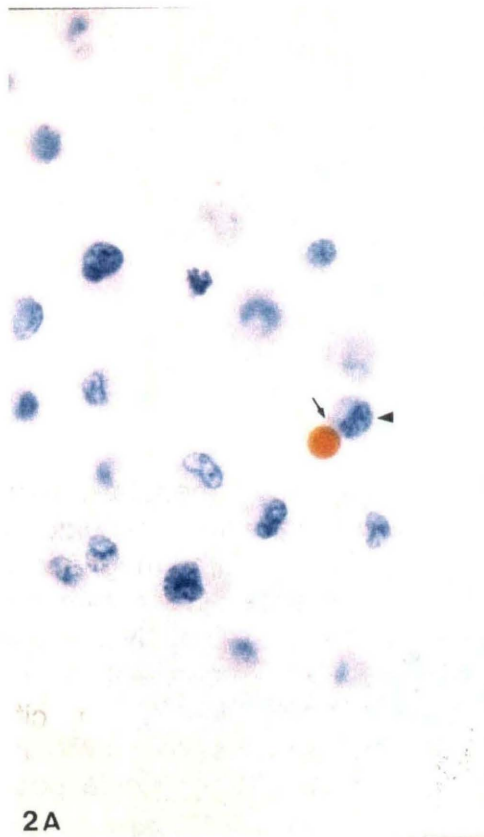
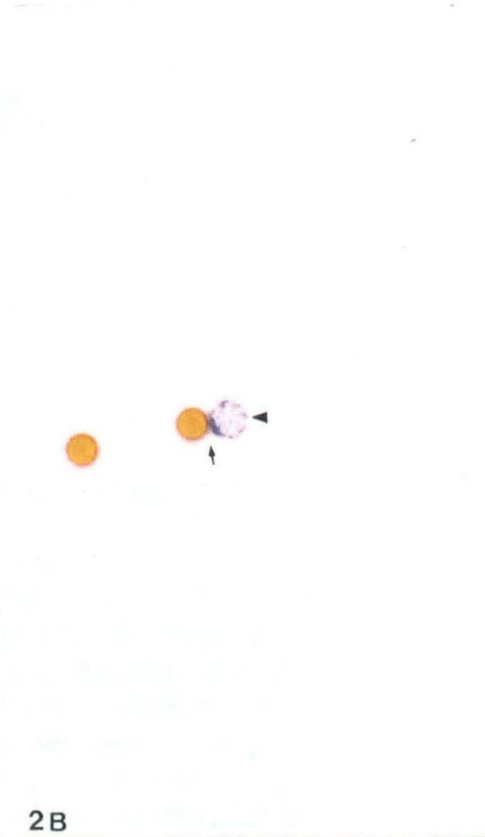


Fig. 1 - Mastócitos imaturos da medula óssea, observados em microscopia confocal, apresentando imunofluorescência positiva para o mAb BGD6 (setas).

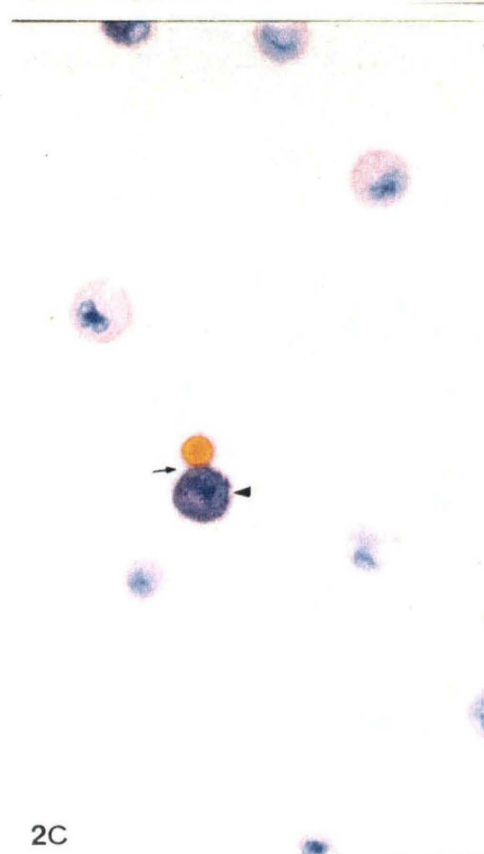
- Fig. 2 A-D - Mastócitos da população de células da medula óssea incubadas com mAb BGD6 conjugado às esferas magnéticas (setas) e coradas com azul de toluidina.
- A - Célula indiferenciada com núcleo volumoso e arredondado, citoplasma desprovido de grânulos (cabeça de seta).
 - B - Mastócito bem imaturo com poucos grânulos citoplasmáticos metacromáticos (cabeça de seta).
 - C - Mastócito imaturo apresentando grânulos metacromáticos no citoplasma (cabeça de seta).
 - D - Mastócito maduro com o citoplasma repleto de grânulos metacromáticos que encobrem o núcleo (cabeça de seta).



2A



2B



2C



2D

- Fig. 3 A- C - Isolamento sequencial de mastócitos da medula óssea, utilizando o mAb AA4 conjugado às esferas magnéticas, seguido de isolamento com o mAb BGD6, também ligado às esferas magnéticas (setas).
- A - Os precursores de mastócitos isolados apresentam reação positiva para mAb BGD6 e anti c-kit (cabeças de seta). Nas células menores, observar a fluorescência avermelhada correspondente ao predomínio do antígeno para o mAb BGD6 em relação ao c-kit (*).
 - B - Os precursores de mastócitos isolados com esferas magnéticas conjugadas ao mAb BGD6 apresentam fluorescência positiva para o mAb BGD6 (cabeça de seta).
 - C - Os precursores de mastócitos isolados pelo mAb BGD6 conjugado às esferas magnéticas apresentam imunofluorescência positiva para o c-kit (cabeça de seta).

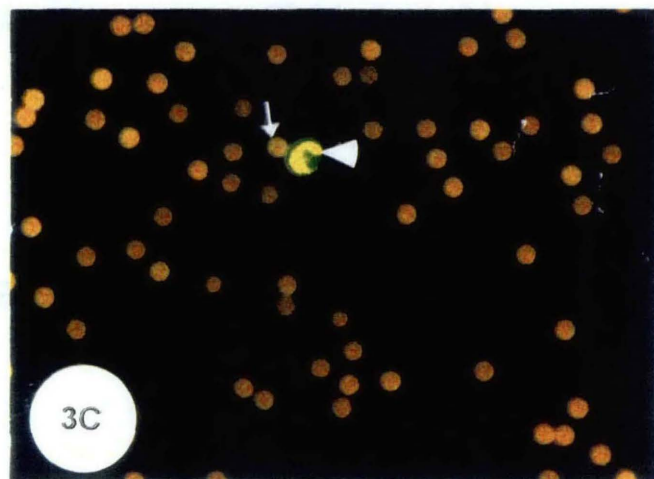
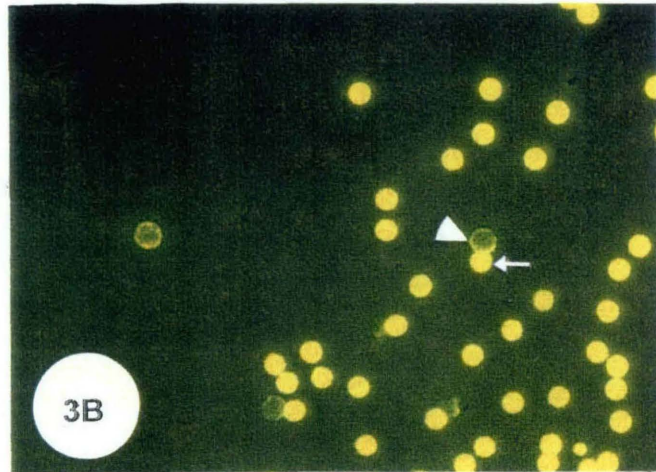
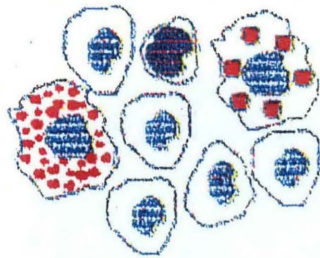


Fig. 4 - Esquema demonstrando o isolamento sequencial de mastócitos através de imunoafinidade.

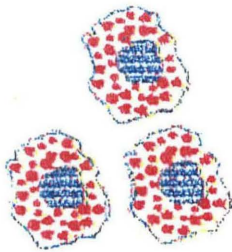
Isolamento Imunomagnético de Mastócitos Indiferenciados



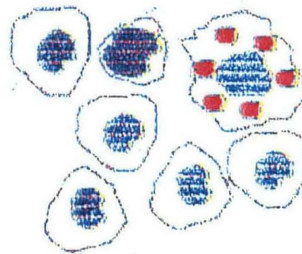
Medula Óssea Total



Esferas Magnéticas acopladas ao mAb AA4



Células Positivas



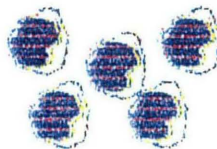
Células Negativas



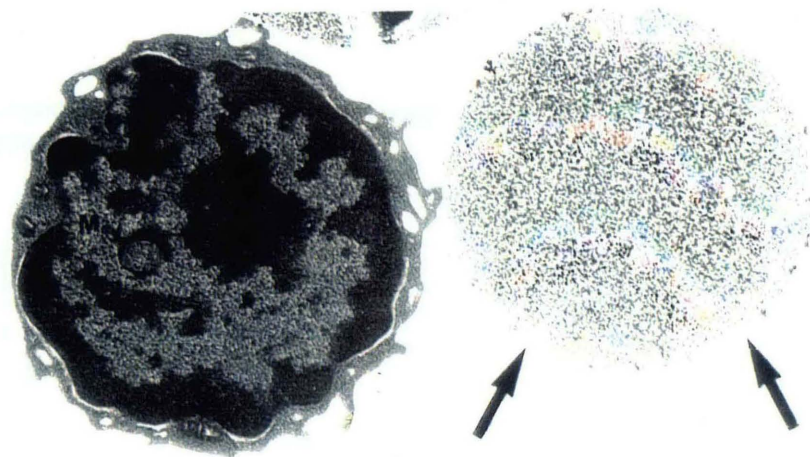
Descartadas



Esferas Magnéticas acopladas ao mAb BGD6



Mastócitos Indiferenciados



5

Fig. 5 - Ultraestrutura de um precursor de mastócito indiferenciado (M) isolado pelo mAb BGD6 conjugado às esferas magnéticas (setas).

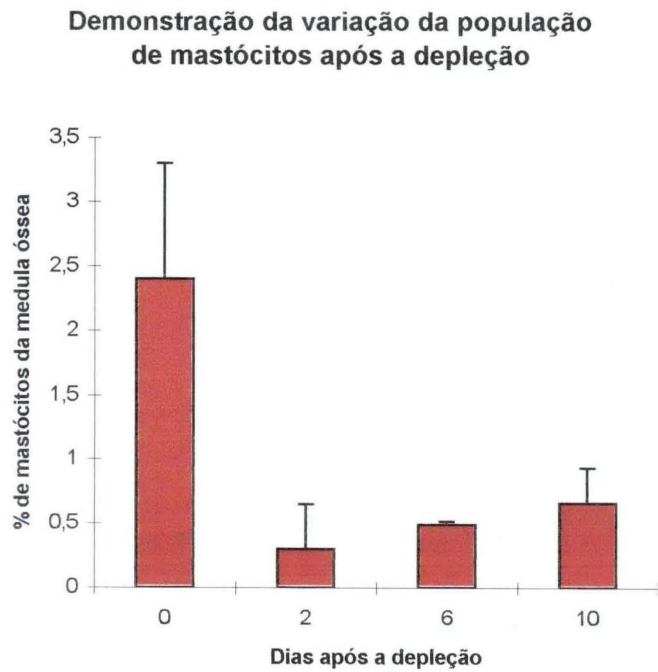


Fig. 6 - Demonstração da variação da população de mastócitos da medula óssea, isolada pelo mAb AA4 conjugado às esferas magnéticas, após depleção dos mastócitos da cavidade peritoneal por injeção intraperitoneal de água destilada.

Varição da população de precursores de mastócitos indiferenciados da medula óssea após a depleção da cavidade peritoneal.

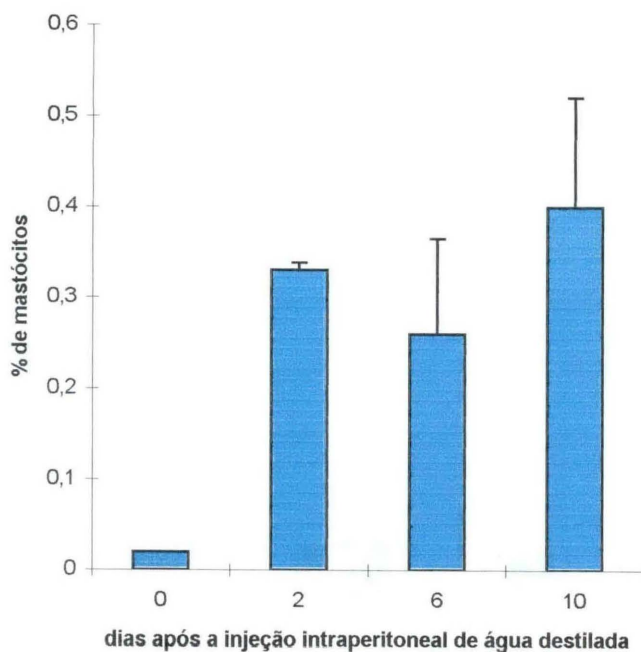
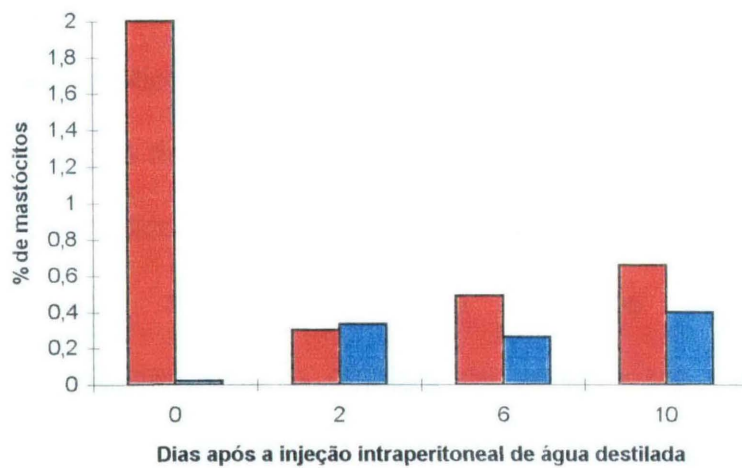


Fig. 7 - Demonstração da variação de precursores de mastócitos indiferenciados da medula óssea, isolados pelo mAb BGD6 conjugado às esferas magnéticas, após a depleção da cavidade peritoneal.

Comparação entre a variação das populações diferenciadas e indiferenciadas de mastócitos derivados da medula óssea



- células isoladas pelo mAb AA4 conjugado às esferas magnéticas.
- células isoladas pelo mAb BGD6 conjugado às esferas magnéticas.

Fig. 8 - Comparação da variação sofrida pelas populações diferenciada e indiferenciada de mastócitos derivados da medula óssea.

VI - DISCUSSÃO

A caracterização de precursores de mastócitos e de mastócitos em diferentes estágios de maturação, segundo ODARJUK (1989), sempre foi dificultada pela falta de marcadores específicos. Para a caracterização e identificação segura dos mastócitos imaturos, apenas a coloração por azul de toluidina não é suficiente, já que estas células apresentam poucos grânulos metacromáticos. Estudos anteriores foram baseados apenas na análise morfológica dessas células (DVORAK, 1991) ou no conteúdo de seus grânulos citoplasmáticos (JAMUR et al., 1986; JAMUR & VUGMAN, 1988). Os anticorpos monoclonais foram utilizados anteriormente por alguns pesquisadores com o objetivo de caracterizar mastócitos imaturos. Para identificar e caracterizar populações de mastócitos imaturos e células indiferenciadas é necessária a utilização de anticorpos monoclonais específicos contra antígenos presentes na superfície de mastócitos (JAMUR et al., 1996).

Com a utilização de esferas magnéticas conjugadas a anticorpos monoclonais específicos, foi possível isolar e quantificar as células em diferentes estágios de maturação. O anticorpo monoclonal AA4 conjugado às esferas magnéticas permitiu o isolamento, a partir da medula óssea, de populações de mastócitos maduros, imaturos e bem imaturos (JAMUR, 1997). No presente estudo foi possível observar, após o isolamento dos mastócitos pelo mAb AA4 conjugado às esferas magnéticas, seguido de dupla marcação

com o mAb BGD6 e o anti c-kit, células de tamanho intermediário com fluorescência alaranjada e células bem pequenas com fluorescência avermelhada, o que indica que o antígeno para o mAb BGD6 predomina sobre o c-kit em células bem indiferenciadas.

No presente trabalho, através do isolamento com o mAb BGD6 conjugado às esferas magnéticas, pode-se observar células pequenas, indiferenciadas, desprovidas de grânulos e que não foram isoladas pelo mAb AA4 conjugado às esferas magnéticas. Após o isolamento, estas células ainda foram imunomarcadas com o mAb BGD6 conjugado ao anticorpo secundário FITC, apresentando fluorescência positiva. Estas células indiferenciadas apresentaram fluorescência positiva após imunomarcção com o anti c-kit conjugado ao anticorpo secundário FITC, comprovando que são precursoras de mastócitos, visto que este antígeno não está presente em basófilos (VALENT, 1994).

Através da imunoseparação magnética foi possível determinar, em animais controle, que a população de mastócitos da medula óssea corresponde a 2,4% das células da medula óssea. Utilizando o método da injeção intraperitoneal de água a população de mastócitos peritoneais foi depletada. Dois dias após a depleção, através do isolamento das células da medula óssea pelo mAb AA4 conjugado às esferas magnéticas, pode-se observar que a população de mastócitos da medula óssea decresce para 0,3%. No 6º. dia após a injeção intraperitoneal de água destilada, a população aumentou para 0,49% e no 10º. dia atingiu 0,66%. Entretanto, no 10º. dia após a depleção, observa-se que a população de mastócitos isolada pelo mAb

AA4 ainda não se recuperou, atingindo apenas 27,5% do valor total de mastócitos da medula óssea, que é 2,4%. Estes números indicam que a população de mastócitos da medula óssea serve como reservatório de mastócitos para suprir o povoamento dos tecidos. Estes números sugerem que os mastócitos que migram da medula óssea para repovoar a cavidade peritoneal podem estar em diferentes estágios de maturação. Estes resultados são contrários à literatura, que menciona que apenas precursores deixam a medula óssea (GALLI et al., 1992; KITAMURA et al., 1993).

Em animais controle, os mastócitos da medula óssea isolados com mAb BGD6 conjugado às esferas magnéticas após o isolamento pelo mAb AA4, corresponde a 0,02%. Assim como a população de células da linhagem de mastócitos sofreu alterações durante o repovoamento da cavidade peritoneal, a população de células indiferenciadas, isoladas pelo mAb BGD6, também é alterada. Dois dias após a depleção da cavidade peritoneal por água destilada, observou-se que a população de células indiferenciadas aumenta de 0,02% para 0,33%. Após 6 dias de depleção, esta população diminuiu para 0,26% e voltou a subir, para 0,4% no 10^o. dia, correspondendo a vinte vezes o valor inicial desta população. Observados nos controles, estes valores sugerem que estas células indiferenciadas proliferam na medula óssea para atender o recrutamento durante o repovoamento da cavidade peritoneal. Estes resultados também mostram que a população de mastócitos da medula óssea é mantida e restabelecida pela população de células indiferenciadas, isoladas da medula óssea pelo mAb BGD6.

VII - CONCLUSÃO

- 1 - A utilização de anticorpos é eficiente para a caracterização e identificação de mastócitos em diferentes estágios de maturação e de células indiferenciadas pertencentes à linhagem de mastócitos.
- 2 - Células ainda indiferenciadas apresentam imunofluorescência positiva para o mAb BGD6, que reconhece antígeno específico para mastócito.
- 3 - A separação imunomagnética com o mAb AA4 é eficiente para o isolamento de mastócitos da medula óssea em diferentes estágios de maturação.
- 4 - A população de mastócitos, AA4 positiva, corresponde a 2,4% da população total de células da medula óssea. Esta população decresce com a depleção dos mastócitos peritoneais.
- 5 - O isolamento imunomagnético com o mAb BGD6 separa uma população de células indiferenciadas precursoras de mastócitos, que é c-kit positiva, confirmando sua identificação como mastócito e não basófilo.
- 6 - A população de células indiferenciadas precursoras de mastócitos, BGD6 positiva, corresponde a 0,02% da população total de células da medula óssea.
- 7 - A população de células indiferenciadas pertencentes à linhagem de mastócitos, isoladas pelo mAb BGD6, aumenta vinte vezes após a depleção dos mastócitos da cavidade peritoneal.
- 8 - Os resultados mostram que, além de precursores, mastócitos em maturação podem deixar a medula óssea para povoar os tecidos.

TABELA I. Mastócitos isolados através do mAb AA4 conjugado às esferas magnéticas de animais controles e de animais tratados por 2, 6 e 10 dias.

Medula Óssea	Número de Animais	Total de células ± DP	Total de Mastócitos Isolados ± DP	% de Mastócitos	% de Mastócitos em relação ao controle
Controle	30	$2 \pm 0.9 \times 10^7$	$4.6 \pm 0.4 \times 10^5$	2,4%	—
2 dias	2	$16.45 \pm 8.4 \times 10^7$	$0.053 \pm 0.032 \times 10^7$	0,3%	12,5%
6 dias	2	$29,7 \pm 14.9 \times 10^7$	$0.124 \pm 0,01 \times 10^7$	0,49%	20,4%
10 dias	2	$23.9 \pm 11.5 \times 10^7$	$0,144 \pm 0,014 \times 10^7$	0,66%	27,5%

DP = Desvio Padrão

TABELA II. Mastócitos isolados através do mAb BGD6 conjugado às esferas magnéticas após 2, 6 e 10 dias após a depleção da cavidade peritoneal por água destilada.

Medula Óssea	Número de Animais	Total de células ± DP	Total de Mastócitos Isolados ± DP	% de Mastócitos
2 dias	2	11.4±3,95x10 ⁷	0.038±0.008x10 ⁷	0,33%
6 dias	2	61,4±31,3x10 ⁷	0.162±0,105x10 ⁷	0,26%
10 dias	2	61,7±21.77x10 ⁷	0,103±0,117x10 ⁷	0,4%

DP = Desvio Padrão

VIII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASKENASE, P. W. Imunopathology of parasitic diseases: involvement of basophils and mast cells. Springer Semin. Immunopathology, 2:417-442, 1980.

BASCIANO, L.K.; BERENSTEIN, E.H.; KMAK, L.; SIRAGANIAN, R.P. Monoclonal antibodies that inhibit IgE binding. J. Biol. Chem. 261:11823, 1986.

BEFUS, A. D.; BIENESTOCK, J.; DENBURG, J.A. Mast cell differentiation and heterogeneity. New York, Raven Press, 426p., 1986.

CHEN, X.J.; ENERBACK, L. Application of an immunocolloid gold technique for the ultrastructural demonstration of IgE-receptor complexes on rat mast cell. Apmis 102 : 729 -735, 1994.

CSABA, G.; HODINKA, L.; SURJAN, L., Jr. transport of mast cells by the blood circulation. Experientia, 25 : 735, 1969.

DENBURG, J. A.; RICHARDSON, M.; TELIZYN, S.; BIENENSTOCK, J. Basophil/mast cell precursors in human peripheral blood. Blood, 61 : 775, 1983.

DVORAK, A. M.; GALLI, S. Y.; SCHULMAN, E. S.; LICHESTENSTEIN, L. M.; DVORAK, H. F. Basophil and mast cell degranulation: ultrastructural analysis of mechanisms of mediator release. Fed. Proc. 42:2510, 1983.

DVORAK, A. M. Blood Cell Biochemistry. Basophil and mast cell degranulation and recovery. Plenum Press, NY., v. 4, 1991.

ENERBACK, L. Mast cell heterogeneity: the evolution of the concept of a specific mucosal mast cell. In: BEFUS, A. D.; BIENESTOCK, J.; DENBURG, J.A. Mast cell differentiation and heterogeneity. New York, Raven Press, 1-26p. 1986.

ERB, J. K., HOLLOWAY, J. W., GROS, G. L. Innate immunity: mast cells in the front line. Current Biology, v.6, 8 : 941. 1996.

ERLICH, P. Beitrage zur Kennthis der Anilinfarben und ihrer Verwendung in der mikroskopischen technik. Arch. Mikr. Anat., 13:263-277, 1877.

FARACO, C. D.; VUGMAN, I.; JAMUR, M. C. Caracterização do processo de maturação de mastócitos peritoneais de rato, através de imunofluorescência. VIII Cong. Bras. Biol. Celular. Anais p.47, 1993.

GALLI, S. J.; DVORACK, A. M.; DVORACK, H. F. Basophils and mast cells: morphologic insights into their biology, secretory patterns and function. Prog. Allergy, 34:1p, 1984.

GALLI, S. J. New insights into "The riddle of the mast cells": microenviromental regulation of mast cell development and phenotypic heterogeneity. Lab. Inv. 62:5-33, 1990.

GALLI, S.J.; TSAI, M.; GORDON, J.R.; GEISLLER, E.N.; WERSHIL, B. K. Analyzing mast cell development and function using mice carrying mutation at W/c-kit or S1/MGF (SCF) loci. Ann N.Y. Acad. Sci. 664:69, 1992.

GRECA, A. C.; MORENO, A. N.; JAMUR, M. C.; SUZUKI, L.; VUGMAN, I. A injeção de água destilada estimula o repovoamento da cavidade peritoneal e do mesentério por mastócitos. VII Reunião Anual da FESBE. Anais p.287, 1992.

GETETTI, et al., J. Immunological Methods, 16: 129-133, 1993. JAMUR, M. C.; FARACO, D. C.; LUNARDI, L. O.; SIRAGANIAN, R. P.; OLIVER, C. Microwave fixation improves antigenicity of glutaraldehyde sensitive antigens while preserving ultrastructural detail. J. Histochem. Cytochem., 43:307-331, 1995.

GRODZKI, A. C. G.; MELLO, L. F. C.; LEITE, A. R.; OLIVER, C.; JAMUR, M. C. Immunomagnetic isolation of rat bone marrow derived mast cells in all stages of maturation. Braz. J. morphol. Sci., v. 13, p. 116, 1996.

GUERREIRO, M. H. C. M.; JAMUR, M. C.; PERES, F.F.; CARDOSO, J. R. Estudo do processo de diferenciação de mastócitos peritoneais de rato, *in vitro*. VIII Cong. Bras. Biol. Celular. Anais, p. 48, 1993.

GUO, N.; HER, G. R.; REINHOLD, V. N.; BRENNAN, M. J.; SIRAGANIAN, R. P.; GISBURG, V. Monoclonal antibody AA4, which inhibits binding of IgE to high affinity receptors on rat basophilic leukemia cells, binding to novel α -galactosyl derivatives of ganglioside G_{d1b}. J. Biol. Chem. 264: 13272, 1989.

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. 148:524, 1992.

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, Ltda, NY, p. 105. 1995.

ISHIZAKA, T.; ISHIZAKA, K. Activation of mast cells mediator release through IgE receptors. Prog. Allergy, 34:188-235, 1984.

JARRET, E. E. E.; MILLER, H. R. P. Production and activities of IgE in helminth infection. Prog. Allergy. 31:178p., 1982.

JAMUR, M. C.; VUGMAM, I.; HAND, A. R. Ultrastructural and cytochemical studies of acid phosphatase and trimetaphosphatase in rat peritoneal mast cell developing, *in vivo*. Cell Tissue Res. 244:557, 1986.

JAMUR, M. C.; VUGMAN, I. Acid phosphatase activity during maturation of rat mesentery mast cell. Cell Mol. Biol. 33:69, 1987.

JAMUR, M. C.; VUGMAN, I. Cytochemical demonstration of basic proteins in rat peritoneal mast cell maturation. Cell. Mol. Biol., 34:27-31, 1988.

JAMUR, M. C.; MORENO, A. N.; GRODZKI, A. C. G.; LUNARDI, L. O.; OLIVER, C. Detection of immature mast cells using a monoclonal antibody (mAb AA4) to mast cell specific gangliosides. Mol. Biol. Cell, 5:486p., 1994.

JAMUR, M.C., FARACO, C.D., LUNARDI, L.O., OLIVER, C. Microwave fixation improves antigenicity of a glutaraldehyde sensitive antigen while preserving morphology. Mol. Biol. Cell 4 : 111a, 1993.

JAMUR, M.C.; GRODZKI, A.C.G.; MORENO, A.N.; FARACO, C.D.; LUNARDI, L.O.; OLIVER, C. Identificação de gangliosídeo específico de mastócitos, em células da medula óssea de rato. Reunião sobre Criométodos e Imunomarcção ultraestrutural. 1:12, 1994.

JAMUR, M. C.; FARACO, C. D.; LUNARDI, L. O.; SIRAGANIAN, R. P.; OLIVER, C. Microwave fixation improves antigenicity of glutaraldehyde sensitive antigens while preserving ultrastructural detail. J. Histochem. Cytochem. Vol. 43, No.3, pp. 307-311, 1995.

JAMUR, M. C.; MORENO, A. N.; GRODZKI, A. C. G.; SIRAGANIAN, R. P.; OLIVER, C. Immunomagnetic separation of rat peritoneal and bone marrow derived mast cell. Mol. Biol. Cell, 6:447a., 1995.

JAMUR, M. C.; OLIVER, C. Binding of antibody to the gamma subunit of FC ϵ RI in rat basophilic leukemia cells results in morphological changes without inducing histamine release. Cell Tissue Res. 284:153-159, 1996.

JAMUR, M. C., GRODZKI, A. C. G., MORENO, A. N., SWAIN, W. D., SIRAGANIAN, R. P. and OLIVER, C. Immunomagnetic isolation of rat bone marrow-derived and peritoneal mast cells. J. Histochem. Cytochem., v. 45(1): 1-8., 1997.

KATANAKA, K.; KITAMURA, Y.; NISHIMURE, Y. Local development of bone marrow derived precursors in the skin of mice. Blood, 53:142p., 1979.

KITAMURA, Y., et al. Decrease of mast cells in W/W mice and their increase by bone marrow transplantation. Blood, 52(2):145-148, 1978.

KITAMURA, Y.; MATSUDA, H.; HATANAKA, K. Clonal mature of mast cells clusters formed in W/W mice after bone marrow transplantation. Nature, 281:154-155, 1979.

KITAMURA, Y.; YOKOYAMA, M.; MATSUDA, H.; OHNO, T. Spleen colony forming cell as common precursor for tissue mast cell and granulocytes. Nature, 291:159-162, 1981.

KITAMURA, Y.; KASUGAI, T.; AKIZONO, N.; MATSUDA, H. Development of mast cells and basophils: process and mechanisms. Am. J. Med. Sci. 306(3) : 185 - 191, 1993.

KITANI, S.; BERESTEIN, E.; MERGENHAGEN, S.; TEMPST, P.; SIRAGANIAN, R.P. A cell surface glycoprotein of rat basophilic leukemia cells close to the high affinity IgE receptor (FcRI). J. Biol. Chem. 266 : 1903, 1991.

LEA, T.; SMELAND, E.; FUNDERUD, S.; VARTDAL, F.; DAVIES, C.; BEISKE, K.; UGELSTAD, J. Characterization of human mononuclear cells after positive selection with immunomagnetic particles. Scand J. Immunol., 23 : 509 - 519, 1986.

LICHTENSTEIN, L. M. Allergy and the immune System. Scientific American, p.85-93, 1993.

MaCDONALD, T. T.; MURRAY, M.; FERGUSON, A. *Nippostrongylus brasiliensis*: mast cell kinetics at small intestinal sites in infected rats. Exp. Parasitol., 49:9p., 1980.

MARSHAL, G. D. Jr. Cytokines: clinical potentials for the allergic patient. Prog. Allergy, 13:311, 1992.

MENDONÇA, V. O.; VUGMAN, I.; JAMUR, M. C. Maturation of adult rat peritonealand mesentery mast cells: a morphological and histofluorescence study. Cell Tissue Res. 243:635, 1986.

MILLER, H. R. P. The structure, origin and function of mucosal mast cells. A brief review. Biology Cell, 39:229p., 1980.

MORENO, A. N.; JAMUR, M. C. Aspectos ultraestruturais de mastócitos de rato durante o repovoamento. XIV Col. SBME. Anais, p.165. 1993.

NAKAHATA, T.; SPICER, S. S.; CANTER, J. R.; OGAWA, M. Clonal assay of mouse mast cell colonies in methylcellulose culture. Blood, 60: 352p., 1982.

NIEDERHEITMANN, C. B. H.; JAMUR, M. C. Identificação histoquímica de mastócitos de mesentério de rato, durante o processo de maturação. VII Cong. Bras. Biol. Celular. Anais, p.46, 1993.

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.

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. 116 : 635, 1992.

REYNOLDS, E.S. The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. J. Cell Biol. 17 : 208, 1963.

RODEWALD, H.R.; DESSING, M.; DVORAK, A.M.; GALLI, S.J. Identification of a committed precursor for the mast cell lineage. Science 271 : 729 - 876, 1996.

SHARADER, J. W.; LEWIA, I.; LEWIS-CLARK; CULVENOR. 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. 78:323, 1981.

SCHWARTZ, L. B.; AUSTEN, K. F.; Structure and function of the chemical mediators of mast cells. Prog. Allergy. 34:271, 1984.

SIRAGANIAN, R. P. Mast cells and basophils. In: GALLI, J. I.; GOLDSTEIN, I. M.; SNYDERMAN, R. Inflammation: basic principles and clinical correlates. New York, Raven Press, 513-542, 1988.

SMITH, T. J.; WEIS, J. H. Mucosal T cells and mast cells share common adhesion receptors. Immun. Today, 17:60, 1996.

TRICKETT, A. E.; FORD, P. R. L.; TANG, L. P.; VOWELS, M. R. Comparison of magnetic particles for immunomagnetic bone marrow purging using an acute lymphoblastic leukemia model. Transplantation Proc., 22:2177-2178, 1990.

VALENT, P.; SILLABER, C.; BETTELHEIN, P. The growth and differentiation of mast cells. Prog. Growth Factor. Res. 3 : 27. 1991.

VALENT, P. The riddle of the mast cell: kit(CD117)-ligand as the missing link? Immunol. Today. vol.15, 3:111. 1994.

ZUCHER-FRANKLIN, D.; GRUSKY, D.; HIRAYAMA, N.; SCHNIPPER, E. The presence of mast cell precursors in rat peripheral blood. Blood, 58 : 544, 1981.