

ANDRÉA NOVAIS MORENO



**SEPARAÇÃO IMUNOMAGNÉTICA E CARACTERIZAÇÃO
DE MASTÓCITOS DE RATO DURANTE O
REPOVOAMENTO DA CAVIDADE PERITONEAL E A SUA
RELAÇÃO COM A POPULAÇÃO DE MASTÓCITOS DA
MEDULA ÓSSEA**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Morfologia, Área de Concentração em Biologia Celular do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

CURITIBA

1997

ANDRÉA NOVAIS MORENO

**SEPARAÇÃO IMUNOMAGNÉTICA E CARACTERIZAÇÃO
DE MASTÓCITOS DE RATO DURANTE O
REPOVOAMENTO DA CAVIDADE PERITONEAL E A SUA
RELAÇÃO COM A POPULAÇÃO DE MASTÓCITOS DA
MEDULA ÓSSEA**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Morfologia, Área de Concentração em Biologia Celular do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

CURITIBA

1997

À

Minha mãe , Neide

Exemplo de luta e dedicação. Lutou contra a morte por amor e dedicou sua vida de luz para o nosso bem estar. Somos hoje , o reflexo deste amor, que nunca deixou de iluminar nossos caminhos.

A

DEUS

“Elevo os meus olhos para os montes; de onde me virá o socorro? O meu socorro vem do Senhor, que fez o céu e a terra. Não deixará vacilar o teu pé ; aquele que te guarda não tosquenejará. Eis que não tosquenejará nem dormirá o guarda de Israel. O Senhor é quem te guarda; o Senhor é a tua sombra à tua direita. O sol não te molestará de dia nem a lua de noite. O Senhor te guardará de todo o mal ; ele guardará a tua alma. O Senhor guardará a tua entrada e a tua saída, desde agora e para sempre.”

(SALMO 121)

À

Prof.^a. Dr.^a. Maria Célia Jamur , orientadora e amiga, a quem devo não só minha iniciação a pesquisa, como também, um conhecimento amplo, científico e humano. “A ciência será sempre uma busca, jamais um descobrimento total. É uma viagem, nunca uma chegada.”

AGRADECIMENTOS

À Prof^ª. do Depto de Biologia Celular da UFPr, Claudia Feijó Ortolani Machado, pela amizade, apoio e incentivo constantes, pela sua paciência na correção ortográfica e pelas sugestões dadas a este trabalho. Muitas vezes, durante este percurso, eu chorei e sempre encontrei em você uma amiga fiel. À você o meu profundo respeito e carinho.

Ao Office Naval Research (ONR) e ao National Institutes of Health (NIH) pelo auxílio financeiro para a obtenção do material utilizado neste trabalho.

À Dr^ª. Constance Oliver (ONR-NIH, EUA), pelas suas valiosas sugestões.

A meu pai Admar e às minhas irmãs, figuras tão importantes em minha vida.

À fiel amiga Ana Cristina Gonçalves Grodzki por toda compreensão, incentivo e apoio, não só na confecção deste trabalho, mas em todos os momentos de minha vida. Em momentos difíceis, sua eterna paciência; em momentos felizes, sua alegria. À você amiga, minha gratidão eterna.

Às amigas Roberta Feijó Ortolani e Luciana de Fátima Mello, pela ajuda, força e alegria constante. “O laço que une a sua família verdadeira, não é de sangue, mas de respeito e alegria pela vida um do outro.”

Aos amigos Eliana Campagnolo, Luís Fernando Fávaro, Ana Meyer, Sandra Freiburger e Gabriela de Almeida Ferreira por todo o apoio, paciência e torcida positiva pela conquista de mais uma batalha, das muitas que ainda terei em minha vida. Espero estar sempre rodeada de pessoas maravilhosas como vocês.

Aos colegas do Departamento de Biologia Celular e da Pós-Graduação pelo convívio amigo e pelo apoio.

À amiga e secretária do Curso de Pós-Graduação em Morfologia - Biologia Celular, Marlene Bonifácio de Camargo, pela ajuda, compreensão e eterna paciência.

À Prof^ª. Dr^ª. Edith Susana Elisabeth Fanta pela franquia ao uso do Fotomicroscópio OLYMPUS PM 10AD.

Ao Centro de Microscopia Eletrônica (CME) da UFPr, na pessoas de sua diretora, Prof^ª. Dr^ª. Dorly de Freitas Buchi, pelo acesso aos equipamentos utilizados na realização de parte do material desta tese.

À técnica Vera Regina F. Piontek (CME - UFPr), pela amizade, dedicação e pela ajuda nas ampliações e reproduções fotográficas utilizadas na documentação científica desta dissertação.

Ao Laboratório de Microscopia Eletrônica de Ribeirão Preto pelo uso dos aparelhos e em especial aos funcionários, Maria Tereza P. Maglia e José Augusto Maulin, pelo auxílio técnico prestado.

Ao CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pelos seis meses de bolsa concedida.

Às amigas Ana Maria Brauza Cunha e Ângela Maria Satler, atual secretária do Departamento de Biologia Celular, pela amizade e carinho.

A todos aqueles que direta e indiretamente colaboraram na realização deste trabalho e que vivenciaram comigo mais uma etapa de minha vida.

SUMÁRIO

Lista de Figuras -----	vii
Resumo -----	ix
Summary -----	x
I - Introdução -----	1
II - Revisão de Literatura -----	3
III - Material e Métodos -----	15
IV - Resultados -----	21
V - Figuras -----	30
VI - Discussão -----	43
VII - Conclusões -----	51
Anexos -----	53
Referências Bibliográficas -----	57

LISTA DE FIGURAS

FIGURA	PÁGINA
01 - Modelo da conjugação dos anticorpos às esferas magnéticas -----	30
02 - Separação imunomagnética dos mastócitos -----	31
03 - Mastócitos peritoneais corados com azul de toluidina pH 3,5 -----	32
04 - Lavado peritoneal colhido dez dias após a injeção intraperitoneal ----- de água destilada.	33
05 - Quantificação dos mastócitos durante o repovoamento da cavidade ---- peritoneal de rato, após a injeção intraperitoneal de água destilada.	34
06 - Quantificação dos mastócitos da medula óssea observados após ----- depleção da cavidade peritoneal.	35
07 - Comparação das alterações ocorridas na população de mastócitos ----- peritoneais e da medula óssea, durante o repovoamento da cavidade peritoneal após a injeção de água destilada.	36
08 - Identificação imunocitoquímica dos mastócitos -----	37
09 - Mastócitos imaturos -----	38
10 - Mastócitos peritoneais isolados através da separação ----- imunomagnética.	39

- 11 - Mastócitos peritoneais isolados com esferas magnéticas conjugadas --- 40
com o anticorpo monoclonal AA4 (mAb AA4) e imunomarcadas
com o mAb BC4.
- 12 - Mastócitos peritoneais isolados com esferas magnéticas conjugadas --- 41
com mAb AA4 e imunomarcadas com mAb anti IgE.
- 13 - Maturação dos mastócitos ----- 42

RESUMO

A injeção intraperitoneal de água destilada em ratos é um procedimento que leva a lise e desaparecimento dos mastócitos da cavidade peritoneal, proporcionando um modelo adequado para o estudo do repovoamento e maturação dos mastócitos. No presente trabalho, o efeito da depleção dos mastócitos peritoneais em outro possível reservatório de mastócitos, a medula óssea, foram investigados. Os mastócitos peritoneais e da medula óssea foram isolados com esferas magnéticas conjugadas ao anticorpo monoclonal AA4 (mAb AA4) específico para mastócitos. As células isoladas também foram imunomarcadas com mAb anti IgE e com mAb BC4, pois a maioria das células isoladas dois dias após a depleção da cavidade peritoneal eram imaturas, o que dificultava sua identificação como mastócitos. Todas as células ligadas às esferas magnéticas foram reconhecidas por estes anticorpos, o que confirmou sua identificação como mastócitos. Após o isolamento as células ligadas às esferas magnéticas foram coradas com azul de toluidina pH 3,5 e contadas em câmara de Neubauer. Nos animais controle, os mastócitos corresponderam a 25% do total de células da cavidade peritoneal, enquanto que a população de mastócitos da medula óssea foi de 2,4% do total de células. Dois dias após a injeção de água destilada, somente 2,5% de células da cavidade peritoneal eram mastócitos. Seis e dez dias após a injeção, o número de mastócitos na cavidade peritoneal aumentou para 11,5% e 23,75%, respectivamente. O número de mastócitos na medula óssea sofre alteração paralela a do número observado na cavidade peritoneal. Dois dias após a injeção de água destilada o número de mastócitos da medula óssea diminuiu para 0,3%. Em seis dias, este número aumentou para 0,49% e em dez dias para 0,66%. Estes resultados indicam que há um dinâmico processo de migração de células da linhagem de mastócitos da medula óssea durante o repovoamento da cavidade peritoneal.

SUMMARY

Injection of distilled water into rat peritoneal cavity is a well characterized model frequently used to investigate repopulation and maturation of mast cells. Exposure of mast cells in the peritoneal cavity to distilled water results in their lysis and disappearance. In the present study, the effect of the depletion of peritoneal mast cells on another possible reservoir of mast cells, the bone marrow, was investigated. Two, six and ten days after injection of distilled water or saline into the peritoneal cavity of Wistar rats, mast cells from the peritoneal cavity and bone marrow were isolated with a mast cell specific antibody, mAb AA4, conjugated to tosylactivated magnetic beads. Since many of the cells bound to the magnetic beads were immature, and not readily identifiable as mast cells, the isolated cells were also immunostained with mAb anti IgE and mAb BC4. All cells bound to the magnetic beads were also positive for IgE and BC4, thus confirming that these cells were indeed mast cells. After isolation the cells attached to the beads were stained with Toluidine blue pH 3.5 and counted in a Neubauer camera. In control animals, mast cells comprised 25% of the total cells from peritoneal cavity, while in the bone marrow the mast cell population was 2.4% of total cells. Two days after injection of distilled water, only 2.5% of the cells in the peritoneal cavity were mast cells. Six and ten days after injection the number of mast cells in the peritoneal cavity had increased to 11.5% and 23.75% respectively. The number of mast cells in bone marrow paralleled the change in mast cell numbers seen in the peritoneal cavity. Two days after injection of distilled water the number of mast cells in the bone marrow had decreased to 0.3%. At six days the cells had increased in number to 0.49% and by 10 days had reached 0.66%. These results indicate that there is a dynamic process of mast cell migration from the bone marrow during repopulation of the peritoneal cavity.

I - INTRODUÇÃO

I -INTRODUÇÃO

Os mastócitos produzem e armazenam em seus grânulos citoplasmáticos uma gama de mediadores químicos potentes, como a histamina. Além disso, os mastócitos expressam em sua superfície celular receptores de alta afinidade ($FC\epsilon RI$) para Imunoglobulina E (IgE). O complexo IgE-receptor possui um importante papel nos processos de liberação destes mediadores químicos, que ao serem liberados causam reações alérgicas. Os mastócitos participam de reações de hipersensibilidade lenta e imediata, porém a liberação de mediadores químicos ainda está associada a vários fenômenos, tais como: reação inflamatória, toxicidade celular, ativação e diferenciação celular, imunorregulação e também potenciam a citotoxicidade de eosinófilos e macrófagos.

Devido a sua extensa participação em vários fenômenos que ocorrem nos organismos, os mastócitos vêm sendo amplamente estudados. Um dos aspectos explorados pelos pesquisadores envolve sua origem e os processos de diferenciação e maturação. Estudos *in vivo* e *in vitro* mostram claramente que estas células são derivadas dos tecidos hematopoiéticos (KITAMURA et al., 1979; GALLI et al., 1984; GALLI, 1990). O desenvolvimento de técnicas de cultivo e a reconstituição da população de mastócitos em camundongos deficientes em mastócitos (KITAMURA et al., 1978), facilitaram a análise dos diversos fatores do microambiente que propiciam o crescimento e a diferenciação destas células (VALENT et al., 1991).

Alguns pesquisadores estudaram o processo de maturação dos mastócitos durante o repovoamento da cavidade peritoneal, após a injeção intraperitoneal de água destilada que causa a lise e o desaparecimento dos mastócitos (FAWCETT, 1955; MENDONÇA et al., 1986; GRECA, 1991). A identificação das células imaturas durante

este processo está vinculada a presença e quantidade de grânulos citoplasmáticos. No entanto, pesquisas realizadas *in vitro* sugerem que os mastócitos imaturos apresentam o receptor de alta afinidade para a IgE antes mesmo de formarem grânulos citoplasmáticos (GALLI et al., 1982). Desta forma, células bem imaturas, desprovidas de grânulos, só poderiam ser identificadas com a utilização de marcadores específicos para outras estruturas celulares. Atualmente, anticorpos monoclonais específicos foram produzidos contra componentes da membrana celular de mastócitos, os quais podem ser utilizados na sua identificação (FARACO et al., 1997). Com a caracterização de células precursoras e de células que constituem a linhagem de mastócitos, muitas questões relacionadas com a biologia destas células poderão ser respondidas. Aspectos envolvendo a migração e proliferação dos mastócitos *in vivo*, bem como a sua relação com o ambiente extracelular continuam obscuros, dificultando o entendimento da sua participação em processos fisiológicos e patológicos.

No presente trabalho procuraremos identificar e isolar os mastócitos bem imaturos e em maturação obtidos durante o processo de repovoamento da cavidade peritoneal de ratos, após a injeção intraperitoneal de água destilada, utilizando anticorpos específicos contra diferentes componentes da superfície de mastócitos. Também procuraremos avaliar a dinâmica de recrutamento das células da medula óssea durante o repovoamento da cavidade peritoneal.

II - REVISÃO DE LITERATURA

II - REVISÃO DE LITERATURA

Os mastócitos são células do tecido conjuntivo que se caracterizam por apresentarem proeminentes grânulos metacromáticos (ERLICH, 1877). A metacromasia dos grânulos de mastócitos é consequência da grande concentração de heparina, uma proteoglicana altamente sulfatada (JORPES et al., 1937; HOLMGREN & WILANDER, 1937). Além da heparina, os grânulos de mastócitos contêm aminas, proteases neutras e fatores quimiotáticos (SCHWARTZ & KEPLEY, 1994). Estas células possuem receptores específicos na sua superfície, com alta afinidade ($FC_{\epsilon}RI$) para IgE (ISHIZAKA & ISHIZAKA, 1984). A interação entre antígenos multivalentes com os receptores de superfície para a imunoglobulina E desencadeia eventos bioquímicos que levam a liberação da histamina, metabólitos do ácido aracdônico e citocinas (GORDON et al., 1990). Estas moléculas efetoras são responsáveis pelas reações de hipersensibilidade lenta (HENDERSON et al., 1979) e imediata (BENHAMOU et al., 1992). Quando as IgEs são interligadas por antígenos ou outras moléculas que promovem o inter cruzamento dos receptores, ocorre a desgranulação dos mastócitos e consequente liberação do conteúdo granular. Os mediadores químicos liberados por estas células participam de fenômenos associados à reação inflamatória, à toxicidade celular, a ativação e diferenciação celular, à imunorregulação e à potencialização da citotoxicidade de eosinófilos e de macrófagos. Esses receptores de alta afinidade estão distribuídos em toda a superfície celular (SULLIVAN et al., 1971), não sendo observado um número significativo de receptores no citoplasma das células (ISERSKY et al., 1975; ROSSI et al., 1977). O mastócito tem uma participação importante nas reações inflamatórias defensivas mas sua ampla desgranulação pode produzir reações anafiláticas graves nos organismos. O complexo IgE-receptor formado na superfície de

mastócitos e a consequente liberação de mediadores químicos, estabelecem uma íntima relação entre o ambiente extracelular e as atividades fisiológicas ou patológicas destas células (GALLI et al., 1992).

Os receptores foram purificados e testados por diferentes grupos de pesquisadores (FROESE, 1984; METZGER et al., 1986). Com os receptores purificados foi possível analisar a capacidade dos mesmos de se ligarem com alta afinidade a IgE e a anticorpos monoclonais específicos (BASCIANO et al., 1986). Anticorpos específicos podem se ligar ao receptor de IgE e ativar as células na ausência de IgE (BASCIANO et al., 1986; ISERSKY et al., 1978; ISHIZAKA & ISHIZAKA, 1978). Atualmente, a estrutura destes receptores é bem conhecida, graças a estudos realizados por vários grupos de pesquisa. METZGER (1992) descreveu um modelo para o FC ϵ RI que se compõe de 3 subunidades: uma cadeia α , com uma porção exposta ao meio externo, uma intramembranosa e outra exposta ao citoplasma; uma cadeia β , com duas porções citoplasmáticas, sendo a maior parte intramembranosa; duas cadeias γ , cada uma com uma porção intramembranosa e uma cauda citoplasmática. A subunidade α é a que contém o sítio de ligação para IgE (BASCIANO et al., 1986).

A IgE ligada ao receptor foi demonstrada imunocitoquimicamente por CHEN e ENERBACK (1994). Utilizando o anticorpo anti IgE conjugado ao ouro coloidal, foi observado que em mastócitos pré-fixados as partículas de ouro estavam homogeneamente distribuídas na superfície celular. As partículas de ouro imunomarcadas com anti IgE foram observadas na superfície de mastócitos de ratos normais, porém este número foi bem mais significativo em mastócitos de rato infectados por *Nippostrongylus brasiliensis*.

A participação dos mastócitos em processos imunológicos levaram os pesquisadores a se aprofundarem nas investigações relacionadas com a biologia destas células. Um dos aspectos que tem atraído o interesse de vários grupos de pesquisadores está relacionado com a origem, diferenciação, maturação e com o processo de repovoamento dos mastócitos nos tecidos. Durante a embriogênese, inicialmente os precursores de mastócitos aparecem no saco vitelino. O número destas células diminui rapidamente neste local e são, logo a seguir, observadas no fígado fetal (SONODA et al., 1983).

Embora os mastócitos sejam considerados células próprias do tecido conjuntivo, estudos *in vivo* e *in vitro* mostram claramente que são derivados dos tecidos hematopoiéticos (KITAMURA et al., 1981; YUEN et al., 1988; GALLI et al., 1990). No animal adulto, a medula óssea é a principal fonte de precursores de mastócitos (SONODA et al., 1986; GINSBURG et al., 1982). KITAMURA et al. (1978) demonstraram que ratos deficientes em mastócitos, quando transplantados com a medula óssea de ratos normais, apresentaram um aumento significativo de mastócitos em vários tecidos observados, como no mesentério, onde chegam a níveis similares àqueles encontrados em ratos normais. A relação entre as células hematopoiéticas multipotentes e a origem dos mastócitos foi investigada por KITAMURA et al. (1981); SHARADER et al. (1981) e NAKAHATA et al. (1982). Estes pesquisadores concluíram que o mastócito é uma progênie de uma célula fonte e que se diferencia da maioria de outras progênies da célula fonte, como os eritrócitos, granulócitos e plaquetas, que deixam o tecido hematopoiético somente após completar a sua diferenciação. Os precursores dos mastócitos migram através da corrente sanguínea (ZUCKER-FRANKLIN et al., 1981; SONODA et al., 1984) e quando chegam ao tecido conjuntivo

completam sua maturação e proliferam (HATANAKA et al., 1979; KITAMURA et al., 1979). Os precursores de mastócitos imaturos migram rapidamente através do sangue circulante até atingirem locais onde as citocinas do microambiente proporcionam sua sobrevivência e diferenciação (KITAMURA et al., 1993). SMITH e WEIS (1996) sugerem que receptores existentes nos mastócitos reconhecem um ligante endotelial, permitindo a entrada dos mastócitos imaturos pela lâmina própria e pelo epitélio. A produção de uma gama de citocinas multifuncionais pode representar um importante mecanismo, através dos quais os mastócitos influenciam processos fisiológicos, imunológicos e patológicos (GORDON et al., 1990). ROTTEM et al. (1991) sugerem, ainda, que os precursores de mastócitos não possuem papel fisiológico determinado, porém ao migrarem para os tecidos onde amadurecem, passam a exibir fenótipos específicos daquele tecido. O crescimento e diferenciação dos mastócitos e suas células progenitoras são regulados por fatores distintos e em particular pelo microambiente (VALENT et al., 1991).

CHEN e ENERBACK (1994) observaram células peritoneais agranulares que denominaram "tipo linfócito" as quais identificaram como precursores de mastócitos em estágios iniciais de diferenciação. Estas células foram observadas após imunomarcagem para IgE, utilizando o ouro coloidal conjugado a anti IgE. O número de receptores de IgE encontrado não mostrou relação com os processos de maturação e desenvolvimento dos mastócitos. Estes mastócitos imaturos possuem cromatina nuclear condensada, nucléolo grande, pró-grânulos imaturos e grande número de corpos lipídicos em seu citoplasma. No entanto, devido a similaridade funcional, muitos pesquisadores sugerem que mastócitos e basófilos se originem de um mesmo precursor (ZUCKER-FRANKLIN, 1980). Com a finalidade de caracterizar mastócitos e

basófilos, GLEICH e colaboradores (1986) utilizaram como parâmetro as atividades biológicas destas células, bem como sua importância nas doenças alérgicas. Os basófilos se originam na medula óssea, circulam pelo sangue e migram para os tecidos onde participam das reações imune e inflamatórias. Em contrapartida, mastócitos são oriundos de precursores da medula óssea que migram para os tecidos, onde proliferam e se diferenciam sobre a influência de fatores locais como a presença da interleucina-3, elaborada por células-T (GUY-GRAND et al., 1984; VALENT et al., 1991). Os mediadores químicos associados com os mastócitos e basófilos, podem auxiliar na caracterização destes tipos celulares. Os basófilos possuem heparina, condroitin-sulfato, dermatan-sulfato enquanto os mastócitos possuem heparina altamente sulfatada. Os basófilos apresentam proteases neutras em seus grânulos citoplasmáticos enquanto os mastócitos proteases tipo I (com atividade semelhante a quimiotripsina α). Os mastócitos possuem prostaglandina 2 em seu grânulos citoplasmáticos, que são ausentes nos grânulos de basófilos. Além disso, somente mastócitos apresentam receptores para c-kit (KITAMURA et al., 1993).

Dependendo do tecido, diferentes tipos de mastócitos podem ser encontrados, apresentando fenótipos distintos (ENERBACK, 1981; KITAMURA, 1989). Estes diferentes tipos de mastócitos são observados em algumas espécies de roedores e em humanos e são classificados como duas populações distintas: mastócitos do tecido conjuntivo (CTMC) e mastócitos de mucosa (MMC). Os CTMC estão presentes na pele, na cavidade peritoneal e no músculo do estômago e acumulam heparina e muita histamina em seus grânulos. Ao contrário, os MMC são proeminentes na camada mucosa do trato digestivo e contêm em seus grânulos sulfato de condroitina e pouca quantidade de histamina. Estas diferenças fenotípicas parecem ser influenciadas pelo

microambiente do tecido. Mastócitos derivados da medula óssea, quando cultivados (BMCMC), apresentam um fenótipo de MMC. Entretanto, BMCMC adquirem fenótipos de CTMC quando são injetados na cavidade peritoneal de camundongo W/W^v deficiente em mastócito (NAKANO et al., 1985). Ainda, CTMC podem mudar seu fenótipo para MMC quando injetados na mucosa estomacal de camundongo W/W^v (SONODA et al., 1986; KANAKURA et al., 1988).

A proliferação de mastócitos nos tecidos pode ser dependente de células-T sendo, então, mediada por interleucina-3 (IL-3); IL-4; IL-9 e IL-10. A IL-3 é uma glicoproteína com 28 kD que promove o aparecimento, proliferação e diferenciação de células progenitoras de várias linhagens celulares da medula óssea, que inclui eritrócitos, linfócitos, monócitos, granulócitos e mastócitos (SCHARADER, 1986; IHLE & WEINSTEIN, 1986). A IL-3 é produzida predominantemente por células-T sob estimulação antigênica ou mitogênica (NIEMEYER et al., 1989; OSTER et al., 1989) mas pode também ser ativada pelos mastócitos (PLAUT et al., 1989; WODNAR-FILIPOWICZ et al., 1989; BURD et al., 1991). Em determinadas situações, os mastócitos na presença de IL-3, podem ser capazes de influenciar sua própria proliferação. Esta proliferação pode ser inibida quando mastócitos derivados da medula óssea de camundongo foram cultivados na presença de um gangliosídeo exógeno GM3, que modula suas características (FUJIMAKI et al., 1995).

Estudos recentes mostram que fatores produzidos por células do estroma estimulam muitas atividades das células fontes (*stem cell factor* -SCF) e dos mastócitos, incluindo o seu desenvolvimento (VALENT et al., 1992; AGIS et al., 1993; GALLI et al., 1993). DURAND et al. (1994) observaram que o crescimento inicial de mastócitos humanos em cultura foi dependente de fibroblastos. Notaram, também, que a

combinação de vários fatores de crescimento, incluindo o SCF e a IL-3, foram capazes de aumentar a proliferação e crescimento de mastócitos humanos com alta eficiência. Ainda, foi detectado pelos autores que ocorre morte celular na ausência de SCF e/ou IL-3. As células observadas possuíam morfologia de mastócitos imaturos, sendo azul de toluidina positivos, CD33+, CD34-, CD35+, c-kit-. LERNER et al. (1991) demonstraram que anticorpos monoclonais se ligam na superfície de mastócitos humanos reconhecendo a proteína c-kit humana como receptor para o SCF. RENNICK et al. (1995), entretanto, demonstraram que na ausência de células acessórias (fibroblastos, células T) o SCF não é capaz de estimular o crescimento de progênes de mastócitos. Contudo, os autores observaram que o SCF exibe potente efeito promotor para o crescimento de mastócitos quando combinado com fibroblastos e cofatores específicos tais como: IL-3, IL-4 e IL-10. O SCF age como um competente fator de crescimento para progenitores de mastócitos e para mastócitos em determinados estágios de diferenciação, que ainda são influenciados por interações com os cofatores específicos. Investigações mais amplas têm demonstrado que IL-3 juntamente com SCF expande os grupos de progenitores de muitos tipos de células hematopoiéticas da medula óssea, incluindo, portanto, mastócitos e basófilos (SCHWARTZ & KEPLEY, 1994). SILLABER et al. (1994) observaram que *in vitro*, a IL-3 e IL-4 inibem a formação de mastócitos humanos dependentes de SCF. Porém, o mecanismo pelo qual o crescimento de mastócitos foi inibido pela IL-3 e IL-4 continua desconhecido.

Com objetivo de estudar a proliferação e maturação dos mastócitos, *in vivo*, foram utilizados modelos experimentais envolvendo mastócitos peritoneais de rato. O primeiro estudo sobre o repovoamento de mastócitos foi realizado por FAWCETT (1955), em mesentério de ratos que foram submetidos a injeção intraperitoneal de água

destilada, que causa lise e desaparecimento dos mastócitos peritoneais. As primeiras células contendo grânulos metacromáticos apareceram no mesentério oito a doze dias após, na adventícia de vasos do mesentério. Após algumas semanas, estas células aumentaram progressivamente em quantidade, tamanho e número de grânulos. Somente na sexta semana é que o mesentério estava totalmente repovoado.

MENDONÇA et al. (1986) estudaram o repovoamento e maturação dos mastócitos do lavado peritoneal após o seu desaparecimento causado pela injeção intraperitoneal de água destilada. Observaram que, no mesentério, mastócitos jovens são encontrados no quinto dia. Nos esfregaços de lavado peritoneal os mastócitos foram identificados no sétimo ou oitavo dia, e nos cortes de 0,5 μm já podiam ser observados no sexto dia. Demonstraram, ainda, que a heparina surge juntamente com a histamina do quinto ao sétimo dia, sendo a serotonina sintetizada mais tardiamente, aparecendo apenas em mastócitos maduros.

Muitos estudos *in vitro* também têm contribuído para o melhor entendimento do processo de diferenciação e maturação dos mastócitos. GINSBURG e LAGUNOFF (1967) observaram que mastócitos de camundongo cultivados durante 10 dias, quando observados ao microscópio eletrônico, apresentavam numerosas projeções vilosas e sinuosas em sua superfície. Possuíam poucas mitocôndrias e um complexo de Golgi bem desenvolvido, localizado próximo ao núcleo. O núcleo destes mastócitos imaturos são geralmente ovóides com chanfraduras. As características estruturais dos mastócitos em cultura são semelhantes as dos mastócitos imaturos de camundongo presentes no tecido conjuntivo embrionário descrito por COMBS (1971). COMBS (1971) observou, ultraestruturalmente, que os mastócitos de camundongos recém-nascidos e em cultura apresentavam o processo de diferenciação e maturação

morfologicamente idênticos. Descreve que durante o processo, ocorre um aumento no número de grânulos elétron- densos que vão preenchendo o citoplasma da célula. O sistema de membranas é reduzido nos mastócitos imaturos, exceto o complexo de Golgi que é bem desenvolvido na região perinuclear.

CZARNETZKI et al. (1979) estudaram *in vitro* o processo de maturação dos mastócitos e observaram que os mesmos se originam de pequenas células mononucleares. Através de microscopia eletrônica, demonstraram que após quinze dias, as células apresentavam características ultraestruturais de mastócitos maduros, como os descritos por LAGUNOFF (1972). Os mastócitos produzidos *in vitro* são menos diferenciados, quando comparados com os mastócitos peritoneais típicos (GALLI et al., 1984). Mastócitos clonados de camundongo são ultraestruturalmente semelhantes a mastócitos imaturos observados *in vivo*. Estes clones permitem uma investigação direta de seus processos bioquímicos e funcionais, pois os mastócitos podem crescer na ausência de outras células (GALLI et al., 1982). MARSHALL et al. (1994) observaram que mastócitos peritoneais de ratos com quatorze a quinze dias, continham aproximadamente 1/10 da quantidade de histamina obtida em mastócitos peritoneais de ratos adultos. A nível ultraestrutural, mastócitos jovens contêm relativamente poucos grânulos.

Alguns estudos realizados durante o processo de maturação *in vivo*, utilizaram a citoquímica ultraestrutural, com objetivo de identificar mastócitos peritoneais imaturos colhidos 6 dias após a depleção da cavidade peritoneal pela injeção de água destilada. As células imaturas apresentavam em seus grânulos reações citoquímicas que identificavam enzimas e proteínas básicas, estas com objetivo de diferenciar os mastócitos imaturos de macrófagos peritoneais. Estas células apresentavam núcleo

com chanfradura, retículo endoplasmático rugoso (RER) e aparelho de Golgi bem desenvolvidos, grande quantidade de mitocôndrias e pequenos grânulos citoplasmáticos (JAMUR et al., 1986; JAMUR & VUGMAN, 1988). DVORAK (1986) descreveu mastócitos imaturos como células que possuem um núcleo oval e lobulado, muitas especializações citoplasmáticas de superfície e citoplasma contendo pró-grânulos e vesículas. Estes pró-grânulos individuais continham o conteúdo empacotado pelo Golgi ativo e se agrupavam para formar os grânulos, o que sugere que os eventos da maturação incluem a condensação e homogeneização do conteúdo granular.

Segundo GALLI et al. (1982) células comprometidas a se diferenciarem em mastócitos já possuem o $FC\epsilon RI$, antes mesmo de apresentarem grânulos citoplasmáticos. Observaram, também, que mastócitos clonados expressam receptores de membrana plasmática ($FC\epsilon RI$) que liga IgE de camundongo em equilíbrio constante, similar ao que ocorre com os mastócitos peritoneais de camundongo normal. Estes dados levaram estes pesquisadores a sugerir que o $FC\epsilon RI$ é expresso no início do processo de maturação dos mastócitos, precedendo, portanto, a síntese dos grânulos citoplasmáticos e armazenagem de mediadores. Com base nestas evidências, células bem imaturas e desprovidas de grânulos citoplasmáticos, deixam de ser identificadas e quantificadas. RIMMER et al. (1984) utilizaram sete anticorpos monoclonais específicos para componentes dos grânulos de mastócitos hematopoiéticos e do tecido conjuntivo. No entanto, os pesquisadores descobriram que os anticorpos também se ligavam a moléculas do citoplasma de eritrócitos maduros, células parenquimais do fígado e outros tipos celulares hematopoiéticos. KINZER et al. (1995) descreveram um anticorpo monoclonal específico (K-1) anti uma proteína de membrana com 161 kD (p161)

expressa em mastócitos, porém esta mesma molécula foi encontrada na superfície de alguns macrófagos e de outras células hematopoiéticas.

Os resultados relatados pelos pesquisadores nos últimos dez anos demonstram que as células progenitoras de mastócitos não foram caracterizadas devido a falta de marcadores específicos.

Nos últimos anos foi produzida uma série de anticorpos contra as subunidades do FC ϵ RI, com objetivo de estudar o aspecto funcional deste receptor durante a liberação de histamina. A maioria destes anticorpos foi produzida contra a superfície celular da RBL-2H3, uma célula da linhagem da leucemia basofílica de rato. Esta denominação inicial foi erroneamente atribuída quando esta linhagem de células tumorais foi estabelecida. Estudos posteriores demonstraram que este tipo celular corresponde a mastócitos de mucosa (MMC) imaturos (WOLDEMUSSE & BEAVEN, 1986; SWEITER et al., 1992). Os anticorpos foram produzidos contra a subunidade α (BASCIANO et al., 1986), β (BERENSTEIN et al., 1990) e γ (JAMUR & OLIVER, 1996) do receptor de alta afinidade para IgE. Outros anticorpos monoclonais específicos contra componentes da membrana de mastócitos também foram produzidos. GUO et al. (1989) produziram um anticorpo monoclonal contra um gangliosídeo específico da membrana de mastócitos (mAb AA4). Este anticorpo pode atuar na modulação dos receptores de IgE, sendo que as alterações podem ser observadas morfológicamente (OLIVER et al., 1992). O mAb AA4 é específico para mastócitos de ratos (OLIVER et al., 1992) sendo também utilizado para marcar mastócitos peritoneais imaturos (FARACO et al., 1997).

HAMAWY et al. (1992) estudaram a inibição da ligação da IgE ao receptor, em células RBL-2H3, utilizando o anticorpo monoclonal BGD6. O mAb BGD6 também se

liga exclusivamente a proteínas da superfície da RBL-2H3 e de mastócitos da medula óssea (JAMUR et al., 1996) . Estes anticorpos monoclonais por serem específicos para mastócitos foram utilizados na identificação de progenitores de mastócitos na medula óssea (JAMUR et al., 1995).

III - MATERIAL E MÉTODOS

III - MATERIAL E MÉTODOS

01. OBTENÇÃO DO MATERIAL

Foram utilizados ratos Wistar, de ambos os sexos, pesando aproximadamente 250 gramas, fornecidos pelo biotério do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná. Os animais foram anestesiados com éter sulfúrico e assim mantidos pela utilização de um cone contendo algodão embebido no anestésico e colocado sobre uma placa de dissecação em posição inclinada. A seguir, foram injetados intraperitonealmente com 20 ml de água destilada. Como controle foram utilizados animais não injetados ou que receberam intraperitonealmente a injeção de solução salina a 0,9%. Os ratos foram sacrificados 2, 6 e 10 dias após a injeção intraperitoneal. O lavado peritoneal foi colhido com 20 ml de PBS (salina tamponada com fosfato) através de laparotomia e com o auxílio de pipeta Pasteur, após suaves massagens abdominais. O material foi centrifugado por 5 minutos a 1000 rpm e o sedimento foi ressuspendido em PBS e lavado com PBS através de centrifugações sucessivas. A medula óssea foi retirada do fêmur dos animais com auxílio de uma seringa contendo 1000 un/ml de heparina e de DNase. As células da medula óssea foram dissociadas com pipeta Pasteur e lavadas duas vezes em PBS contendo BSA (soro albumina bovina) a 2%, por centrifugação.

02. ANTICORPOS

Foram utilizados anticorpos monoclonais (mAbs), gentilmente cedidos pelo Laboratory of Immunology, National Institutes of Health. O mAb AA4 é específico para o gangliosídeo GD1b de superfície de mastócitos (GUO et al., 1989); o mAb BC4 reconhece a subunidade α do receptor de IgE (BASCIANO et al., 1986); o mAb anti IgE

(Biosource International, Camarillo, CA) , reconhece IgE ligada aos receptores de alta afinidade; o mAb BGD6 anti proteínas de superfície celular de mastócitos (HAMAWY et al., 1992). Os anticorpos foram purificados do fluido de ascites pela precipitação com sulfato de amônia e a seguir por cromatografia de troca iônica em coluna de DE-52 (mAb BC4 e BGD6) ou por HPLC (mAb AA4). Os anticorpos mAb BC4 e mAb AA4 usados são IgG γ_1 , e o mAb BGD6 é uma IgG $_2$ b.

03. CONJUGAÇÃO DOS ANTICORPOS A ESFERAS MAGNÉTICAS

As esferas magnéticas (Dynabeads M 450 Tosylactivated, Dynal), foram misturadas até formar uma solução uniforme. O mAb AA4 foi dissolvido em tampão Borato 0,05M pH 9,5 a uma concentração de 150 μ g/ml. A seguir, foi adicionado a esta solução um volume igual de esferas magnéticas. As esferas magnéticas foram incubadas com o mAb AA4 por 24 horas, a temperatura ambiente, em rotor com velocidade lenta. Após a incubação, procederam-se as lavagens com 5 ml de PBS + BSA a 0,1%, através de separação magnética utilizando o Concentrador de Partículas Magnéticas (CPM). A seguir, foram lavadas 3 vezes por 10 minutos, em PBS contendo 0,1% de BSA, lavadas por mais 30 minutos e, em seguida, por 24 horas a 4°C. As esferas magnéticas conjugadas com o mAb AA4 foram separadas com CPM e ressuspensas em PBS contendo BSA a 0,1%, numa concentração de 4×10^8 esferas por ml (30 mg/ml) e mantidas a 4°C (Fig. 01)

O mAb BGD6 e a IgG de Camundongo foram conjugados a esferas magnéticas numa concentração de 200 μ g/ml a 37°C. Após 10 minutos de incubação foi adicionado 0,5% de BSA para auxiliar na orientação dos anticorpos durante o acoplamento. Também foi utilizado o tampão Tris para bloquear os radicais tosil

livres. As esferas magnéticas conjugadas ao mAb BGD6 e ao IgG de Camundongo foram 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).

04. SEPARAÇÃO IMUNOMAGNÉTICA

As células peritoneais e da medula óssea foram lavadas duas vezes em PBS + 2% de BSA e centrifugadas por 5 minutos a 1000 rpm. O sedimento de células foi ressuspensas em 2 ml de PBS + BSA a 2% e incubadas com esferas magnéticas na proporção de 3 esferas para cada célula, durante 10 minutos, a temperatura ambiente, em rotor com velocidade lenta e constante.

Após a incubação, as células foram lavadas em PBS + BSA a 2% e 3 vezes em PBS com o auxílio do CPM. A população de células positivas ligadas a esferas magnéticas conjugadas com o anticorpo específico foi isolada da população de células negativas através do CPM. As células negativas foram estocadas para serem analisadas e contadas, servindo como controle (Fig 02).

05. QUANTIFICAÇÃO

As células da medula óssea e do lavado peritoneal foram coradas com solução aquosa de azul de toluidina pH 3,5 e contadas em câmara de Neubauer antes e após o isolamento. O número obtido na contagem inicial da população total de células determinou a concentração de esferas imunomagnéticas a serem utilizadas. Após a incubação foi contada uma alíquota do material contendo células ligadas a esferas magnéticas (população positiva) ou livres (população negativa), que perfazem o total

de células da cavidade peritoneal. Após o isolamento, também foram contadas as células da população positiva e da negativa.

06. MICROSCOPIA ÓPTICA

Após o isolamento, as células do lavado peritoneal foram submetidas a 2 lavagens em PBS , colocadas em lamínulas cobertas com CELL TAK (Becton Dickinson Labware, Collaborative Biomedical Products, Bedford, MA) e fixadas em formol a 10% por 20 minutos. A seguir, as lamínulas foram coradas com azul de toluidina pH 3,5 , desidratadas em série crescente de álcoois e diafanizadas em xilol. O material foi fotografado em microscópio OLYMPUS PM 10AD e Microphot FXA (NIKON).

07. MICROSCOPIA ELETRÔNICA

7.1 FIXAÇÃO DE ROTINA

As células peritoneais isoladas e imunoseparadas através do CPM foram fixadas em 2% de glutaraldeído, 2% de paraformaldeído contendo 0,05% de cloreto de cálcio, por 1 hora a temperatura ambiente e a seguir processadas para microscopia eletrônica de rotina (JAMUR et al., 1986). Os cortes finos, obtidos com navalha de diamante, foram contrastados com uranila e citrato de chumbo (REYNOLDS, 1963) e observados em microscópio eletrônico de transmissão.

7.2 FIXAÇÃO POR MICROONDAS

Foi utilizado um forno de microondas convencional (Montgomery Ward mod. 8035) com 550 watts de potência, que opera numa frequência de 2450 MHz. O sedimento foi ressuspenso em 5 ml da solução fixadora (0,05% de glutaraldeído; 2% de paraformaldeído; 0,025% de CaCl_2 em 0,1M de tampão cacodilato pH 7,4) e colocado numa placa de Petri com 3,5 mm de diâmetro, onde foi submetido a radiação por 5 a 7 segundos. O tempo de fixação é previamente determinado pela calibragem do forno de microondas (JAMUR et al., 1995). Imediatamente após a fixação, 10 ml de PBS foi adicionado a suspensão de células, que a seguir foram centrifugadas por 5 minutos a 1000 rpm. As células foram, então, lavadas por centrifugação, duas vezes em PBS, em PBS + Glicina 0,1M e novamente em PBS.

7.3 IMUNOMARCAÇÃO

As células do lavado peritoneal e da medula óssea foram incubadas com o mAb AA4 (2,5 $\mu\text{g/ml}$), anticorpo mAb BC4 (0,5 $\mu\text{g/ml}$) e o mAb anti IgE (5 $\mu\text{g/ml}$) diluídos em PBS contendo 1% de BSA.

Após a incubação as células foram lavadas com PBS + 1% de BSA, PBS por 30 minutos e PBS + 1% de BSA, para então, serem incubadas com fragmento Fab'₂ de IgG de jumento conjugado a peroxidase de rábano (HRP) diluído em PBS + 1% de BSA (concentração final de 25 mg/ml) por 1 hora a temperatura ambiente. A seguir, as células foram lavadas em PBS + 1% de BSA, PBS e em tampão cacodilato 0,1M (pH 7,4). Foram incubadas em meio contendo diaminobenzidina - DAB (12,5 ml de tampão

cacodilato, 12,5 mg de DAB e 250 μ l de H_2O_2 a 1%), por 30 minutos a temperatura ambiente.

7.4 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

As células foram embebidas em ágar a 2% para facilitar as etapas seguintes do processamento. A seguir, foram pós-fixadas em OsO_4 a 2% por 1 hora a temperatura ambiente, desidratadas em séries crescentes de etanol e incluídas em EMBED 812 (EM Sciences, Fort Washington, PA). Os cortes finos foram obtidos com navalha de diamante e contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo (REYNOLDS, 1963) por 10 minutos em cada e, então, observados em microscópio eletrônico de transmissão.

IV - RESULTADOS

IV - RESULTADOS

Os mastócitos imaturos da cavidade peritoneal, obtidos após a injeção intraperitoneal de água destilada, foram caracterizados através de métodos imunquímicos utilizando anticorpos monoclonais específicos contra antígenos da superfície de mastócitos.

01 - ISOLAMENTO DOS MASTÓCITOS

ANIMAIS CONTROLE

A utilização de esferas magnéticas conjugadas com os anticorpos mAb AA4 e BGD6 específicos à superfície de mastócitos foi muito eficiente, isolando 85% dos mastócitos da cavidade peritoneal de ratos não injetados e daqueles que receberam somente injeção intraperitoneal de solução salina 0,9%. Ao microscópio de luz, os mastócitos isolados estavam fortemente corados pelo azul de toluidina, apresentando a metacromasia característica de mastócitos maduros, sem alteração ou desgranulação. Não foi observado nenhum outro tipo celular do lavado peritoneal ligado às esferas magnéticas (Fig. 3A). As esferas magnéticas conjugadas com imunoglobulina normal (IgG) de camundongo não se ligaram a nenhum tipo celular, incluindo os mastócitos.

ANIMAIS TRATADOS

A injeção intraperitoneal de água destilada causou lise e desaparecimento dos mastócitos da cavidade peritoneal. Os mastócitos colhidos 2 dias após injeção através das esferas magnéticas conjugadas com mAb AA4, constituem uma população de células quase desprovidas de grânulos. As células isoladas e coradas pelo azul de toluidina, quando observadas ao microscópio de luz, não apresentaram grânulos metacromáticos, porém puderam ser identificadas como mastócitos imaturos por estarem ligadas especificamente às esferas magnéticas conjugadas com o mAb AA4, anti os gangliosídeos do tipo GD1b, específicos da superfície de mastócitos (Fig. 3B). Com o objetivo de identificar células indiferenciadas no lavado peritoneal de animais tratados foi utilizado esferas magnética conjugadas com mAb BGD6 que reconhece células progenitoras de mastócitos na medula óssea de rato e camundongo. No entanto os mastócitos isolados apresentaram o mesmo padrão morfológico das células isoladas pelas esferas magnéticas conjugadas com o mAb AA4, ou seja, células com poucos grânulos. No lavado peritoneal colhido seis dias após os animais terem a cavidade peritoneal depletada de mastócitos, também foram observadas, células isoladas pelas esferas imunomagnéticas, que já apresentavam alguns grânulos metacromáticos. A população de células ortocromáticas era maior em relação àquela observada no período de dois dias. Dez dias após a injeção de água destilada na cavidade peritoneal, a maioria dos mastócitos separados por imunomagnetismo já apresentava uma morfologia típica de mastócitos maduros, contendo muitos grânulos citoplasmáticos com metacromasia

acentuada. Mastócitos bem imaturos com pouco ou nenhum grânulo citoplasmático, ainda ortocromáticos, também foram observados (Fig. 04).

02 - QUANTIFICAÇÃO

Com a utilização de esferas magnéticas conjugadas com mAb AA4 que se ligam especificamente aos mastócitos, foi possível identificar os mastócitos maduros residentes da cavidade peritoneal e, principalmente, os mastócitos imaturos que apareceram durante o repovoamento da cavidade peritoneal, após a injeção de água destilada. Desta forma, foi possível realizar as contagens dos mastócitos ligados a estas esferas, em câmara de Neubauer. Ainda, através da quantificação foi possível analisar as alterações da população de mastócitos da medula óssea, ocorridas durante o processo de repovoamento da cavidade peritoneal.

2.1 CONTROLE

Utilizando a separação imunomagnética associada a coloração pelo azul de toluidina pH 3,5, foi possível determinar que cerca de 25% da população total de células residentes da cavidade peritoneal dos ratos que receberam ou não injeção de solução salina (controle) são mastócitos (Fig. 05 e 07).

2.2 REPOVOAMENTO DA CAVIDADE PERITONEAL

Dois dias após a injeção intraperitoneal de água destilada, verificou-se que somente 2,5% da população de células que repovoam a cavidade peritoneal são mastócitos imaturos, os quais foram separados pelas esferas magnéticas ligadas ao mAb AA4. Da mesma forma, foi observado que no período de 6 dias após a injeção intraperitoneal de água destilada o número de mastócitos que repovoa a cavidade peritoneal já atinge 11,5% dos mastócitos encontrados na cavidade peritoneal de ratos controle. No período de 10 dias foi observado que o repovoamento da cavidade peritoneal por mastócitos chega a 23,75%, o que corresponde a quase totalidade dos mastócitos encontrados em animais controle (Fig. 05 e 07).

2.3 MEDULA ÓSSEA

Os mastócitos na medula óssea de ratos injetados somente com solução salina (controle), assim como os dos não injetados, perfazem 2,4% da população de células da medula óssea (JAMUR et al., 1996). Os mastócitos isolados da medula óssea de ratos que há dois dias sofreram injeção intraperitoneal de água destilada correspondem apenas a 0,3% da população de células da medula óssea. Este número atinge 0,49% em animais com 6 dias de injeção e chega a 0,66% em ratos que foram injetados há 10 dias, correspondendo apenas 27,5% do total de mastócitos residentes da medula óssea (Fig. 06 e 07).

03. IDENTIFICAÇÃO ULTRAESTRUTURAL E IMUNOCITOQUÍMICA DOS MASTÓCITOS

3.1 MASTÓCITO MADURO

Mastócitos peritoneais colhidos de ratos não injetados ou que receberam intraperitonealmente solução salina 0,9% (controle) apresentaram ultraestrutura característica destas células, ou seja, muitos grânulos eletrondensos, poucas organelas no citoplasma, núcleo esférico e central. Estas células apresentam forte imunomarcacão na superfície após a imunoreacão com o mAb AA4, contra gangliosídeos específicos da membrana de mastócitos (Fig. 8A) e com o mAb anti IgE, que imuno reage com a IgE endógena ligada ao receptor (Fig. 8C).

3.2 MASTÓCITO IMATURO

3.2.1 CAVIDADE PERITONEAL

As células presentes na cavidade peritoneal dois dias após a injeção de água destilada apresentavam nenhum ou poucos grânulos pequenos e elétron-densos, citoplasma com muitas organelas, núcleo grande e chanfrado. A imunomarcacão dos antígenos específicos de mastócitos presentes na superfície destas células possibilitou a sua identificação como mastócitos imaturos. Os mastócitos imaturos obtidos dois dias após a injeção intraperitoneal apresentaram, portanto, reação positiva na superfície celular após a imunomarcacão com o mAb AA4 (Fig. 8B) e com o mAb anti IgE (Fig. 8D).

3.2.2 MEDULA ÓSSEA

Na população de mastócitos da medula óssea de ratos não injetados ou que receberam intraperitonealmente solução salina 0,9%, foram observados mastócitos em diferentes estágios de maturação. Na medula óssea, alguns mastócitos bem imaturos imunomarcados com mAb AA4 apresentaram características morfológicas muito semelhantes àquelas observadas nos mastócitos peritoneais imaturos, identificados 2 dias após a injeção intraperitoneal de água destilada (Figs. 9A e 9B). Mastócitos peritoneais e da medula óssea incubados na ausência dos anticorpos primários, não apresentaram imunomarcção na superfície (Fig. 9C).

3.3 CARACTERIZAÇÃO DOS MASTÓCITOS ISOLADOS

A separação imunomagnética através de esferas conjugadas com anticorpos específicos de superfície de mastócito permitiu o estudo do processo de repovoamento destas células, bem como facilitou a obtenção de populações puras de mastócitos maduros e em maturação. Ainda, proporcionou a caracterização dos mastócitos isolados através da identificação simultânea de mais de um antígeno específico em sua superfície.

3.3.1 ANIMAIS CONTROLE

Os mastócitos isolados dos ratos controle com mAb AA4 apresentaram poucas organelas e complexo de Golgi próximo ao núcleo central (Fig. 10A). Estes mastócitos apresentaram reação positiva para o mAb anti IgE apresentando forte imunomarcção de superfície revelada pela reação de imunoperoxidase (Fig. 8A). A subunidade α do receptor de IgE foi detectada

nos mastócitos através da utilização do anticorpo mAb BC4 que se liga especificamente a esta subunidade. Os mastócitos isolados e imunomarcados apresentaram reação positiva na membrana plasmática. Também foi possível isolar os mastócitos da cavidade peritoneal utilizando as esferas magnéticas conjugadas com mAb BGD6 contra outra proteína específica da superfície de mastócitos (Fig. 10B). Os mastócitos isolados com o mAb BGD6 apresentaram o mesmo padrão ultraestrutural dos mastócitos maduros isolados com o mAb AA4.

Na cavidade peritoneal dos animais adultos não injetados com água destilada ou que receberam apenas solução salina (controles), existe normalmente uma população muito pequena de células bem imaturas. Estas células imaturas puderam ser isoladas pelo mAb AA4 conjugado a esferas magnéticas e quando imunomarcadas, apresentaram reação positiva para o mAb anti IgE (Fig. 10C). Os mastócitos imaturos colhidos de animal controle também apresentaram morfologia semelhante aos mastócitos isolados dois dias após a injeção intraperitoneal de água destilada. Apresentaram núcleo volumoso e central, organelas abundantes e raros grânulos elétron-densos (Fig. 12A).

3.2.2 ANIMAIS TRATADOS

O isolamento imunomagnético associado a estudos ultraestruturais permitiu a caracterização de mastócitos em diferentes estágios de maturação. Dois dias após a depleção dos mastócitos na cavidade peritoneal, mastócitos imaturos foram isolados pelas esferas magnéticas conjugadas com mAb AA4 demonstrando a presença dos gangliosídeos do tipo GD1b específico da

superfície de mastócitos. Foi observada, nas células imaturas assim isoladas, a presença da subunidade α do receptor de alta afinidade ($Fc_\epsilon RI$) com o mAb BC4 (Fig. 11A) e a IgE endógena que está ligada ao $Fc_\epsilon RI$ com a utilização do mAb anti IgE (Fig. 12A). Ultraestruturalmente, estas células possuem as mesmas características descritas acima para mastócitos imaturos, tais como: núcleo grande, muitas organelas no citoplasma e poucos ou virtualmente nenhum grânulo. Esferas conjugadas com mAb BGD6, contra proteína específica de superfície de mastócito, também isolaram mastócitos imaturos que estavam repovoando a cavidade peritoneal, dois dias após a injeção de água destilada. Os mastócitos isolados foram imunomarcados com o mAb anti IgE e já revelaram a presença da IgE ligada aos receptores na superfície de mastócitos imaturos.

Seis dias após injeção intraperitoneal de água destilada, as células isoladas pelas esferas magnéticas conjugadas com mAb AA4 apresentaram ultraestrutura semelhante as células imaturas (JAMUR et al., 1986) com citoplasma apresentando algumas mitocôndrias, complexo de Golgi e retículo endoplasmático rugoso desenvolvidos, poucos e pequenos grânulos elétrondensos, núcleo periférico e bilobado. Após imunomarcagem com o mAb anti IgE, estes mastócitos isolados também revelaram a presença de IgE endógena ligada ao $Fc_\epsilon RI$ (Fig. 12B). Mastócitos imunoisolados com mAb AA4 e posteriormente marcados com o mAb BC4 também apresentaram forte reação na superfície celular, demonstrando a presença da subunidade α do receptor de IgE (Fig. 11B).

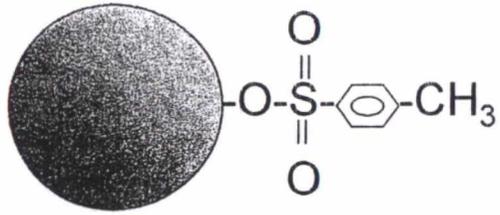
Dez dias após a injeção, a população de mastócitos isolada com o mAb AA4 era composta de células em diferentes estágios de maturação. Algumas

destas células apresentaram características morfológicas semelhantes a das células isoladas no segundo e sexto dias após a injeção intraperitoneal de água destilada. Estes mastócitos também foram imunomarcados com o mAb anti IgE (Fig. 12C) e com mAb BC4 (Fig. 11C) e reagiram positivamente. Também foram isolados mastócitos com características ultraestruturais típicas de um estágio mais avançado de maturação, próxima a dos mastócitos maduros, que apresentavam vários grânulos elétron-densos. O receptor de alta afinidade para IgE foi detectado nestes mastócitos com a utilização do mAb anti IgE. Mastócitos maduros, com citoplasma repleto de grânulos elétron-densos e anti IgE positivos, também foram observados nesta mesma população.

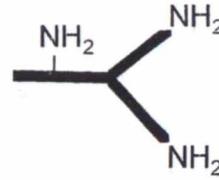
V - FIGURAS

FIG. 01 - Modelo apresentando a conjugação dos anticorpos específicos a esferas magnéticas utilizadas na separação das células.

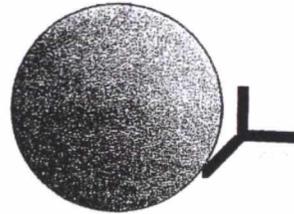
FIG.01



ESFERA MAGNÉTICA TOSILADA



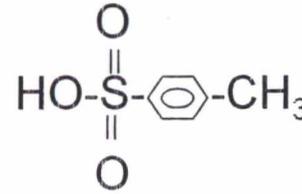
ANTICORPO MONOCLONAL ESPECÍFICO
PARA MASTÓCITO



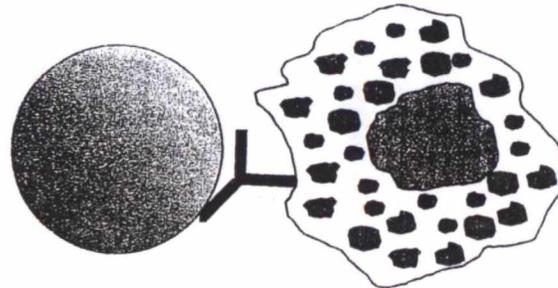
ESFERA MAGNÉTICA CONJUGADA COM O
ANTICORPO MONOCLONAL



+



GRUPO TOSIL



MASTÓCITO ISOLADO

FIG. 02 - Separação Imunomagnética dos mastócitos

A - Mastócitos peritoneais ligados às esferas magnéticas conjugadas com o anticorpo mAb AA4 específico para superfície celular, foram isolados com o auxílio do Concentrador de Partículas Magnéticas (CPM).

B - População positiva isolada após a incubação com as esferas magnéticas conjugadas.

Aumento: 640 x.

C - População negativa resultante da separação imunomagnética.

Aumento: 528 x.

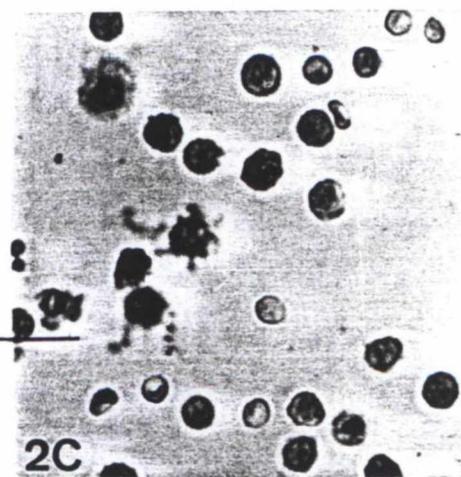
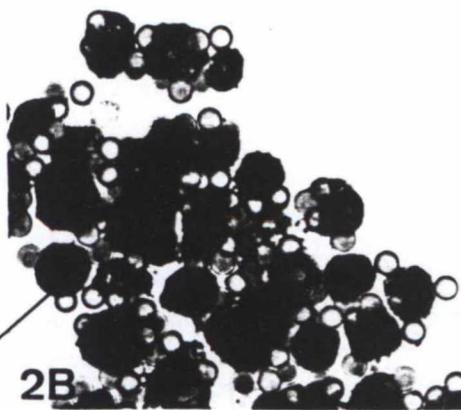
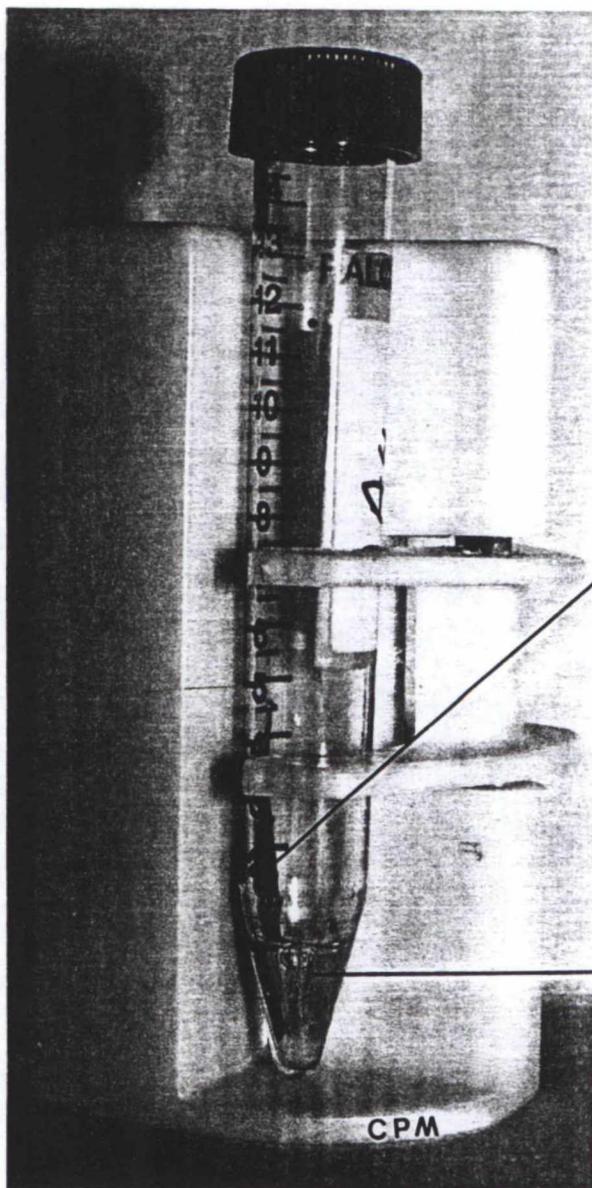


FIG. 03 - Mastócitos peritoneais corados com azul de toluidina pH 3,5

A - Mastócitos maduros (controle) isolados com esferas magnéticas conjugada com o mAb AA4 (setas) apresentando citoplasma repleto de grânulos metacromáticos.

Aumento: 400 x.

B - Mastócitos peritoneais imaturos colhidos dois dias após a injeção intraperitoneal de água destilada isolados com esferas magnéticas conjugadas com o mAb AA4 (seta). Notar a ausência de grânulos.

Aumento: 528 x.

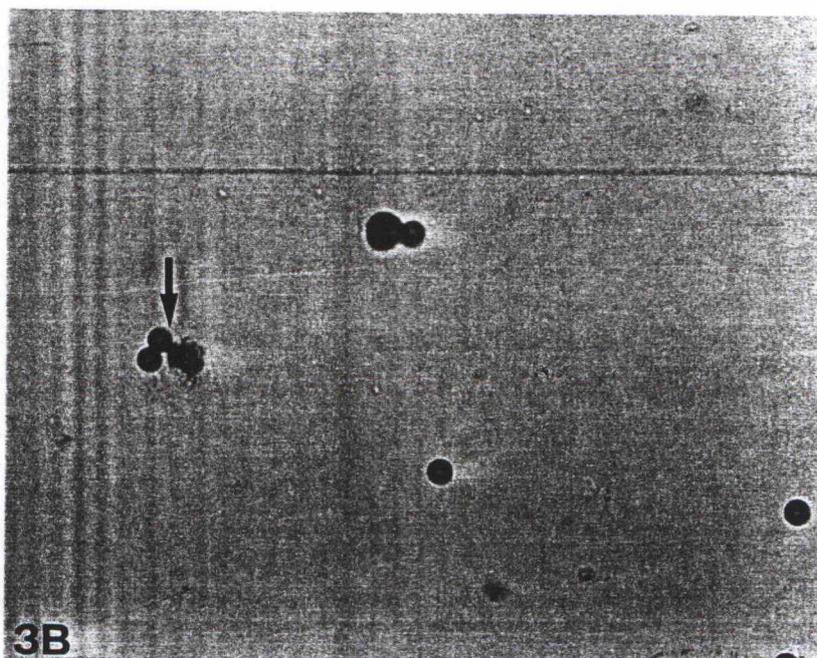
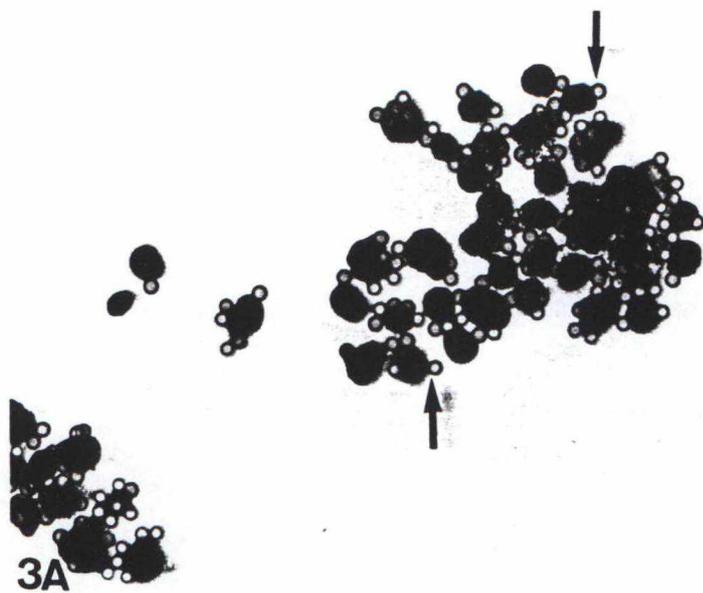




FIG. 04 - Lavado peritoneal colhido dez dias após a injeção intraperitoneal de água destilada. Observar mastócitos em diferentes estágios de maturação. Mastócitos imaturos, com poucos grânulos metacromáticos (setas) e mastócitos com citoplasma quase repleto de grânulos metacromáticos (cabeça de seta).
Aumento: 640 x.

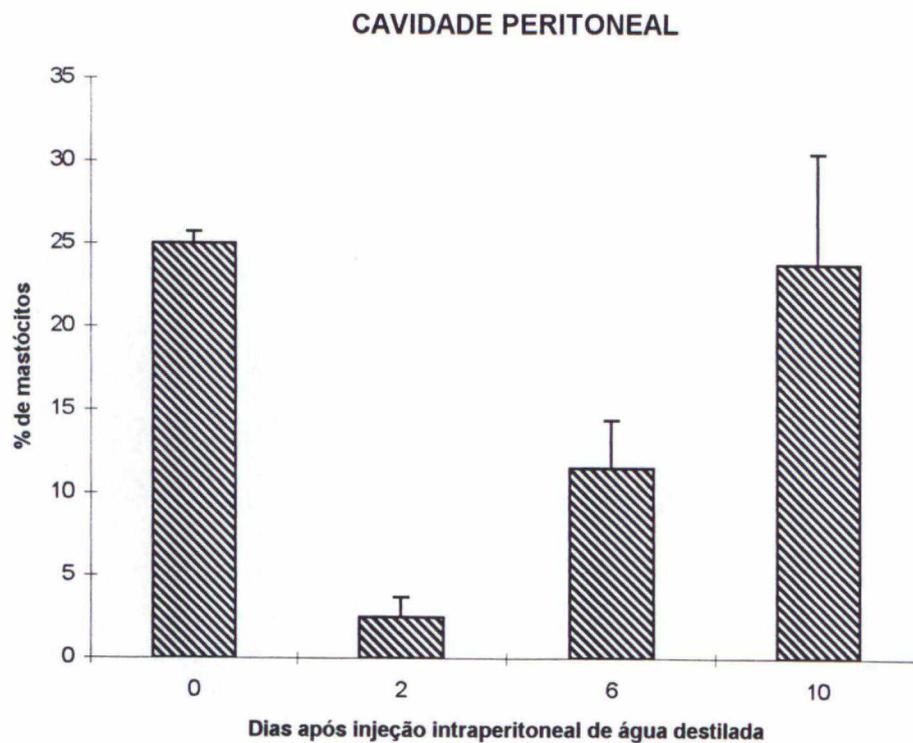


FIG. 05 - Quantificação dos mastócitos durante o repovoamento da cavidade peritoneal de rato, após injeção intraperitoneal de água destilada.

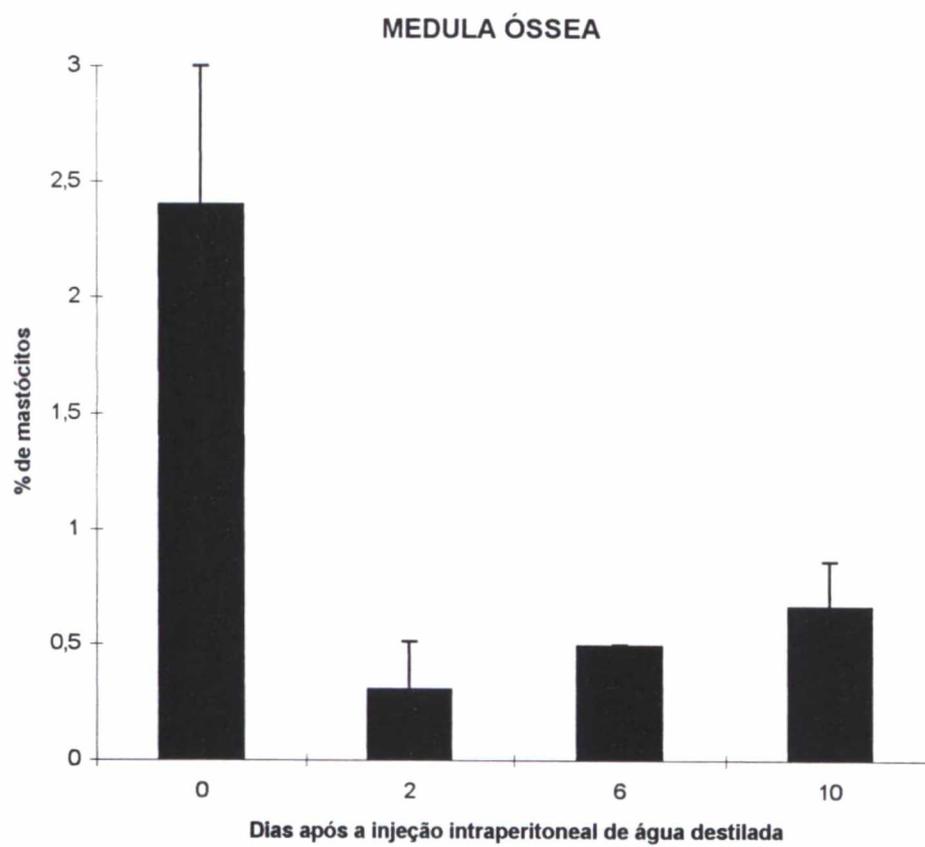


FIG. 06 - Quantificação dos mastócitos da medula óssea observados após depleção da cavidade peritoneal.

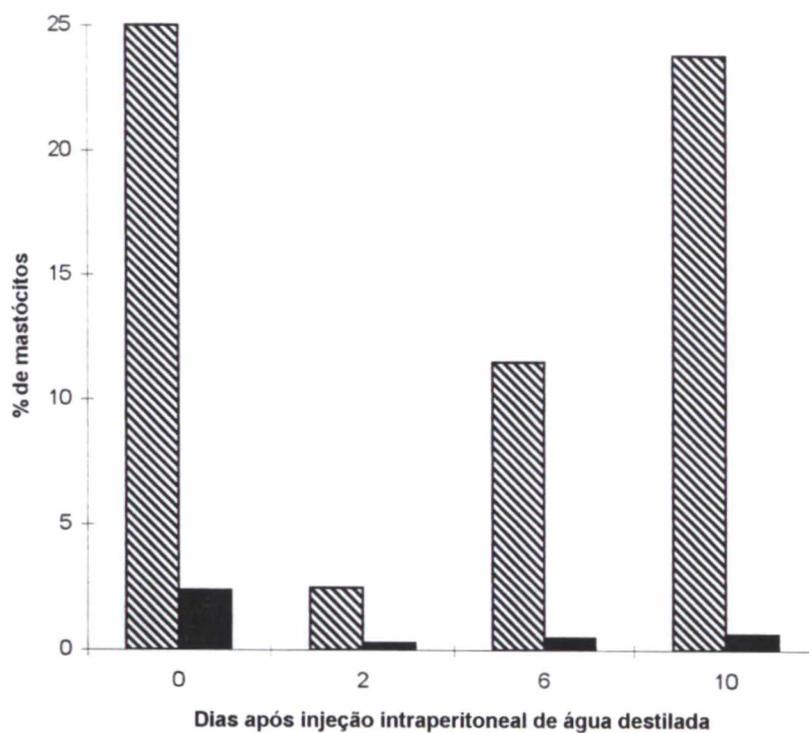


FIG. 07 - Comparação das alterações ocorridas na população de mastócitos peritoneais e da medula óssea, durante o repovoamento da cavidade peritoneal, após a injeção de água destilada.

FIG. 08 - Identificação Imunocitoquímica dos Mastócitos:

A - Mastócito maduro (controle) com citoplasma repleto de grânulos eletrôn-densos mostrando forte reação na superfície celular após a imunomarcagem com o mAb AA4 (setas). Observar que a célula adjacente não apresenta a imunoreação (cabeça de seta).

Aumento: 9.600 x.

B - Mastócito imaturo colhido dois dias após a injeção intraperitoneal de água destilada imunomarcado com o mAb AA4. Notar a forte imunoreação na superfície celular demonstrando a presença do gangliosídeo GD1b (setas). Observar, poucos grânulos citoplasmáticos (GC), muitas mitocôndrias (M), Complexo de Golgi (G) e RER bem desenvolvidos, e núcleo chanfrado (N). Observar outras células peritoneais negativas (cabeça de seta).

Aumento: 11.600 x.

C - Mastócito maduro (controle) imunomarcado pelo anticorpo mAb anti-IgE, apresentando citoplasma repleto de grânulos citoplasmáticos (cabeça de seta), complexo de Golgi próximo ao núcleo (G) e algumas mitocôndrias (M). Observar a forte imunoreação na superfície celular revelada pela peroxidase (setas).

Aumento: 11.550 x.

D - Mastócito imaturo colhido dois dias após a depleção da cavidade peritoneal pela água destilada apresentando forte imunoreação na superfície celular para o mAb anti-IgE (setas). Poucos e pequenos grânulos citoplasmáticos são observados (cabeça de seta).

Aumento: 10.000 x.

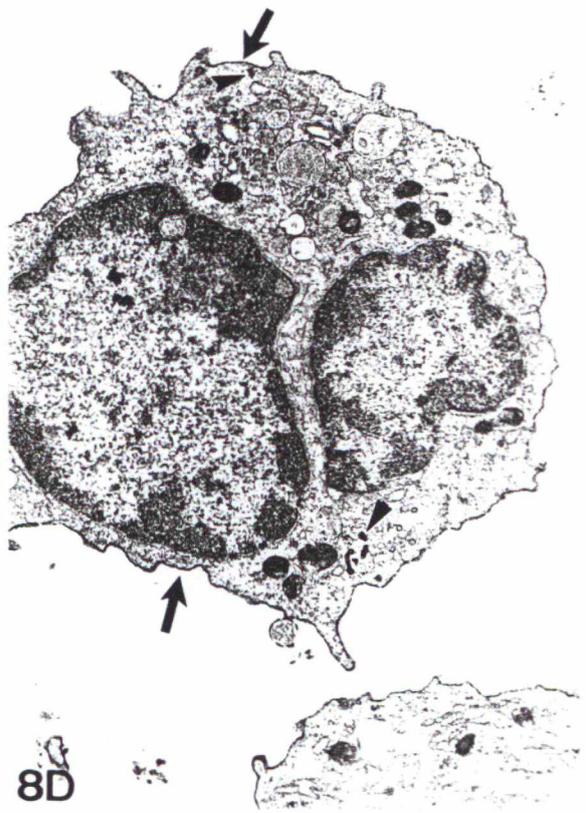
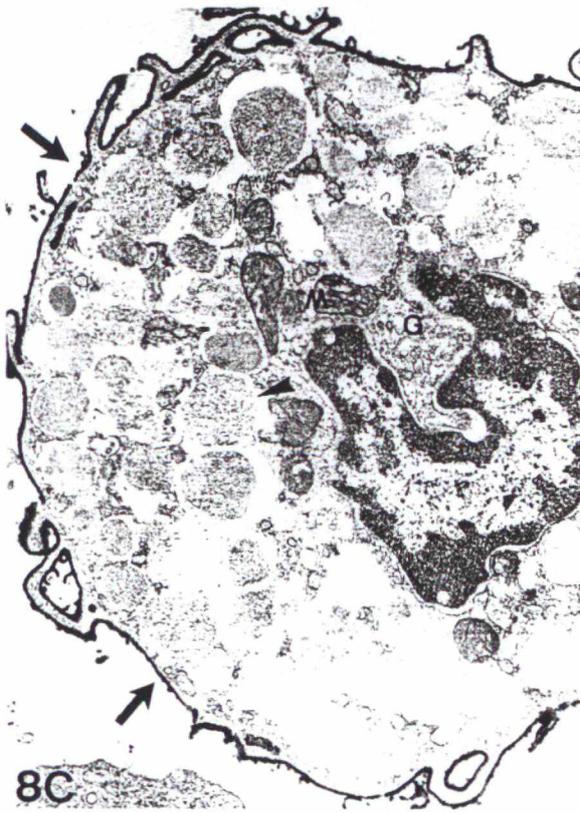
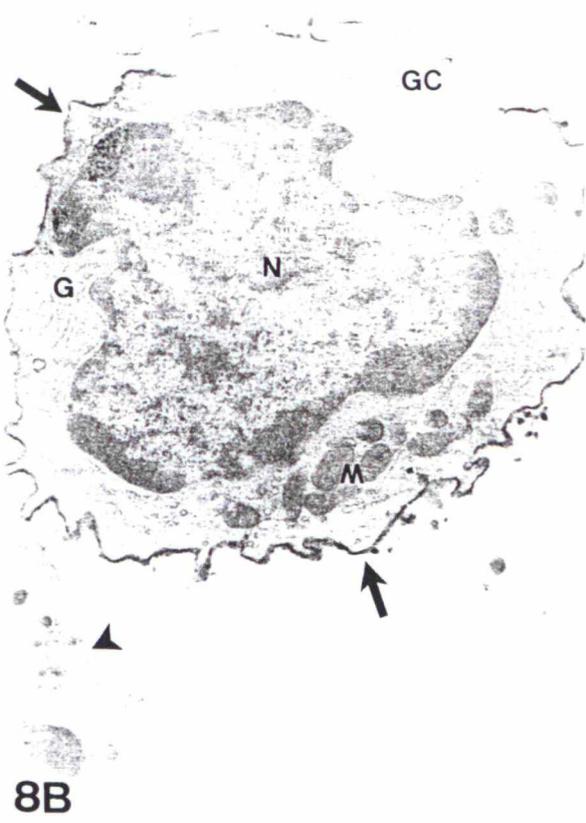
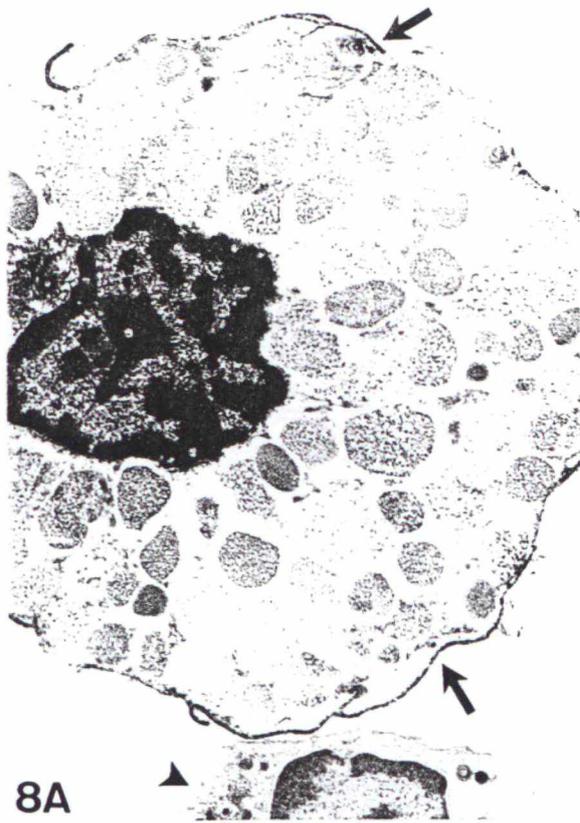


FIG. 09 - Mastócitos imaturos

A - Mastócito peritoneal imaturo colhido dois dias após a depleção, imunomarcado com mAb AA4. Observar forte imunoreação na superfície celular (setas). Observar a ausência de grânulos citoplasmáticos, e a presença de mitocôndrias (M). Núcleo central e volumoso (N). A célula adjacente não apresenta imunomarcação (cabeça de seta).

Aumento: 12.500 x.

B - Mastócito da medula óssea imaturo apresentando reação positiva para o mAb AA4 (setas). Notar que as características morfológicas são semelhantes as da figura acima (Fig. 09A).

Aumento: 19.500 x.

C - Mastócito imaturo (controle) incubado na ausência do anticorpo primário, não apresenta imunomarcação na superfície (setas).

Aumento: 19.500 x.

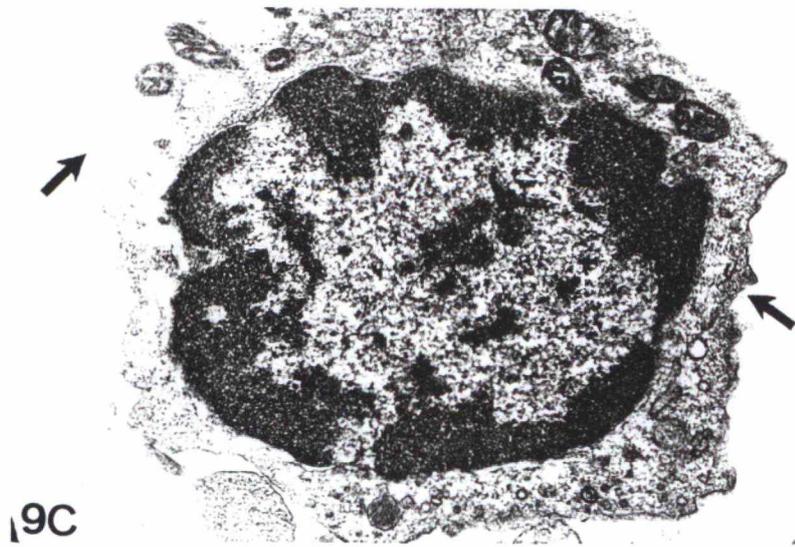
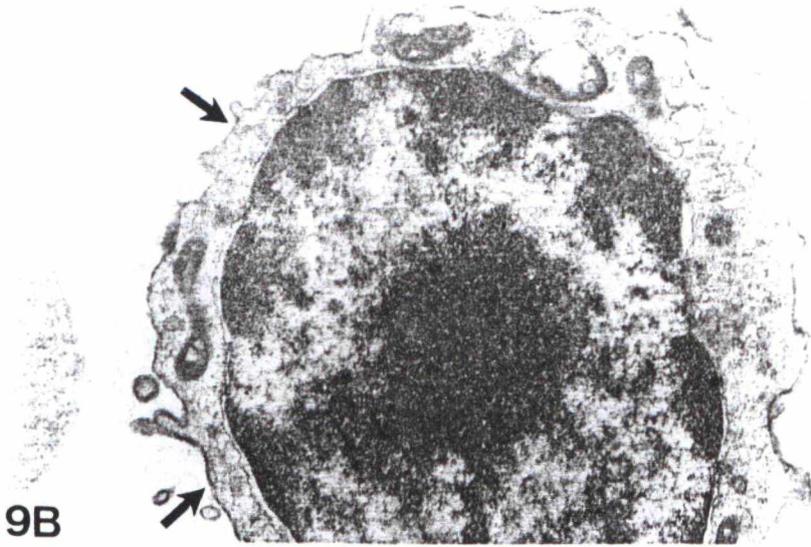
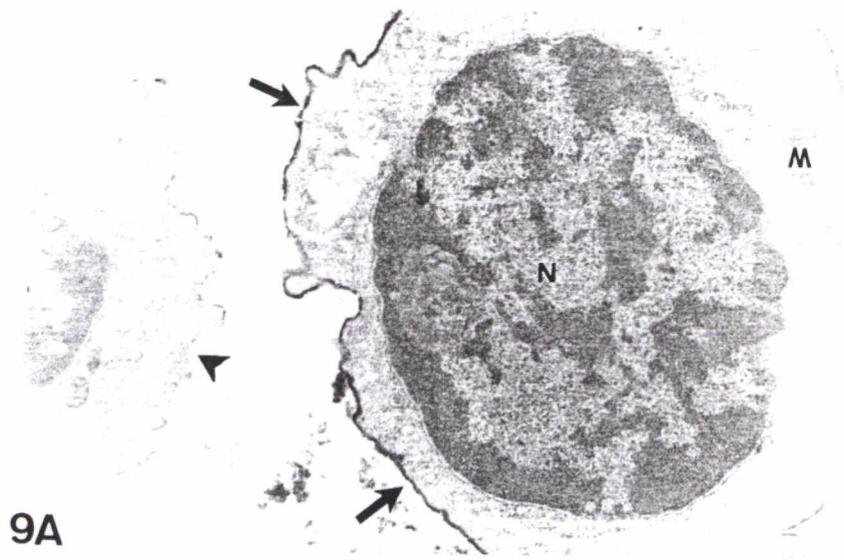


FIG. 10 - Mastócitos peritoneais isolados através da imunoseparação magnética.

A - Mastócito maduro (controle) isolado pelas esferas magnéticas (E) conjugadas com o mAb AA4. Observar o citoplasma repleto de grânulos eletrôn-densos e a presença de algumas mitocôndrias (seta)
Aumento: 6.600 x.

B - Mastócitos maduros (controle) isolados pelas esferas magnéticas conjugadas com o mAb BGD6.
Aumento: 5.800 x.

C - Mastócito imaturo, obtido no lavado peritoneal de animais controle, isolado com o mAb AA4 conjugado as esferas magnéticas, e imunomarcado com o mAb anti-IgE (setas). Observar a semelhança entre esta célula e a da Fig. 12A.
Aumento: 10.000 x.

FIG. 11 - Mastócitos peritoneais isolados com esferas magnéticas (E) conjugadas com mAb AA4 e imunomarcadas com o mAb BC4

A - Mastócito isolado dois dias após a injeção intraperitoneal de água destilada. Notar forte imunoreação na superfície celular (setas). Ausência de grânulos eletrôn-densos. Núcleo volumoso e central (N). Poucas mitocôndrias (M).
Aumento: 10.380 x.

B - Mastócito isolado e imunomarcado seis dias após a injeção intraperitoneal de água destilada. Observar a imunomarcacão na superfície celular (setas). Notar a presença de grânulos citoplasmáticos (cabeças de seta). Núcleo central (N). Mitocôndrias (M).
Aumento: 8.400 x.

C - Mastócito isolado dez dias após a depleção da cavidade peritoneal pela água destilada. Imunoreação positiva na membrana (setas). Notar maior quantidade de grânulos citoplasmáticos (cabeças de seta).
Aumento: 5.340 x.

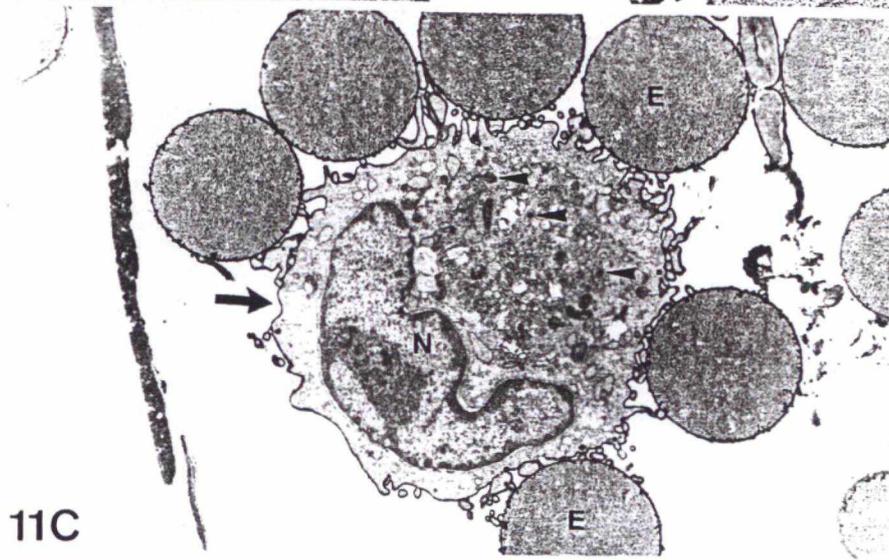
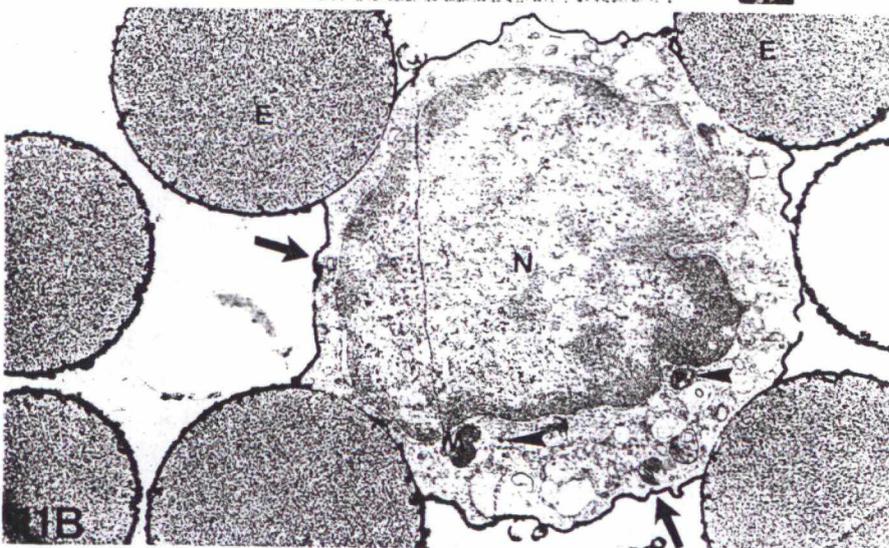
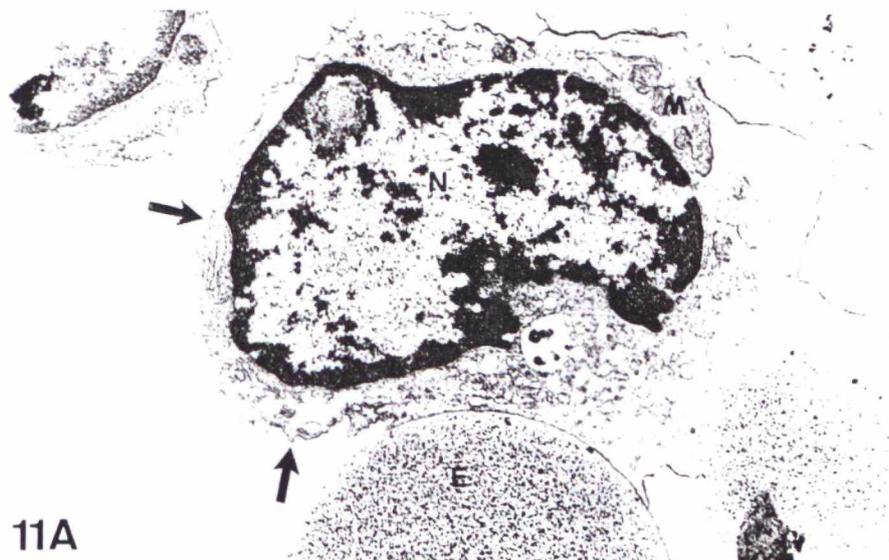
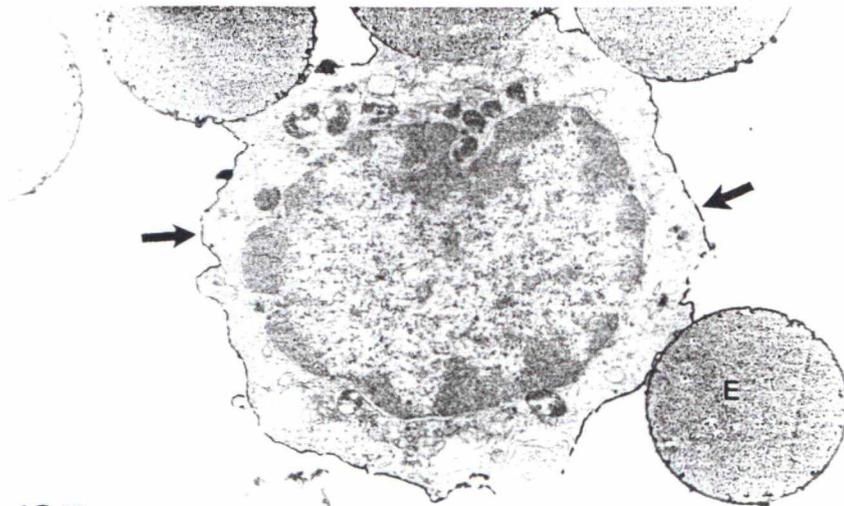
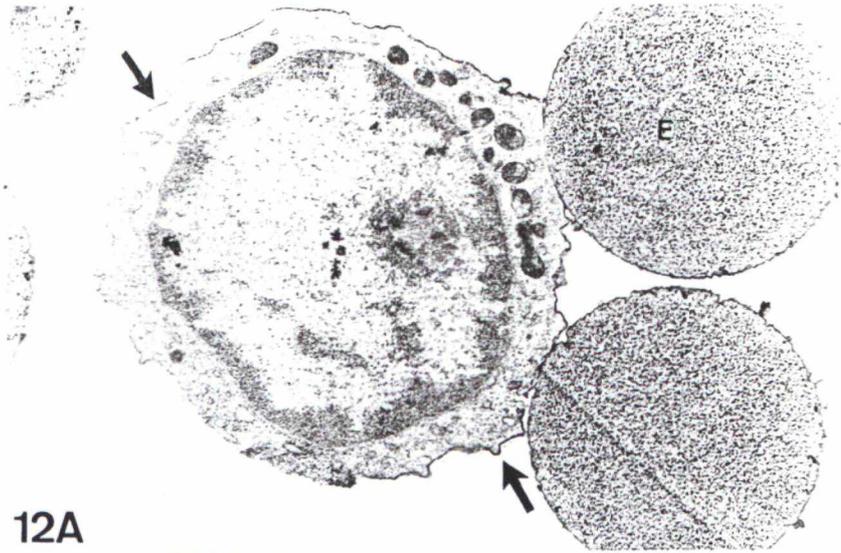


FIG. 12 - Mastócitos peritoneais isolados com esferas magnéticas (E) conjugadas com o mAb AA4 e imunomarcados com o mAb anti- IgE.

A - Mastócito peritoneal imaturo isolado dois dias após a injeção intraperitoneal de água destilada e imunomarcado (setas).
Aumento: 8.000 x.

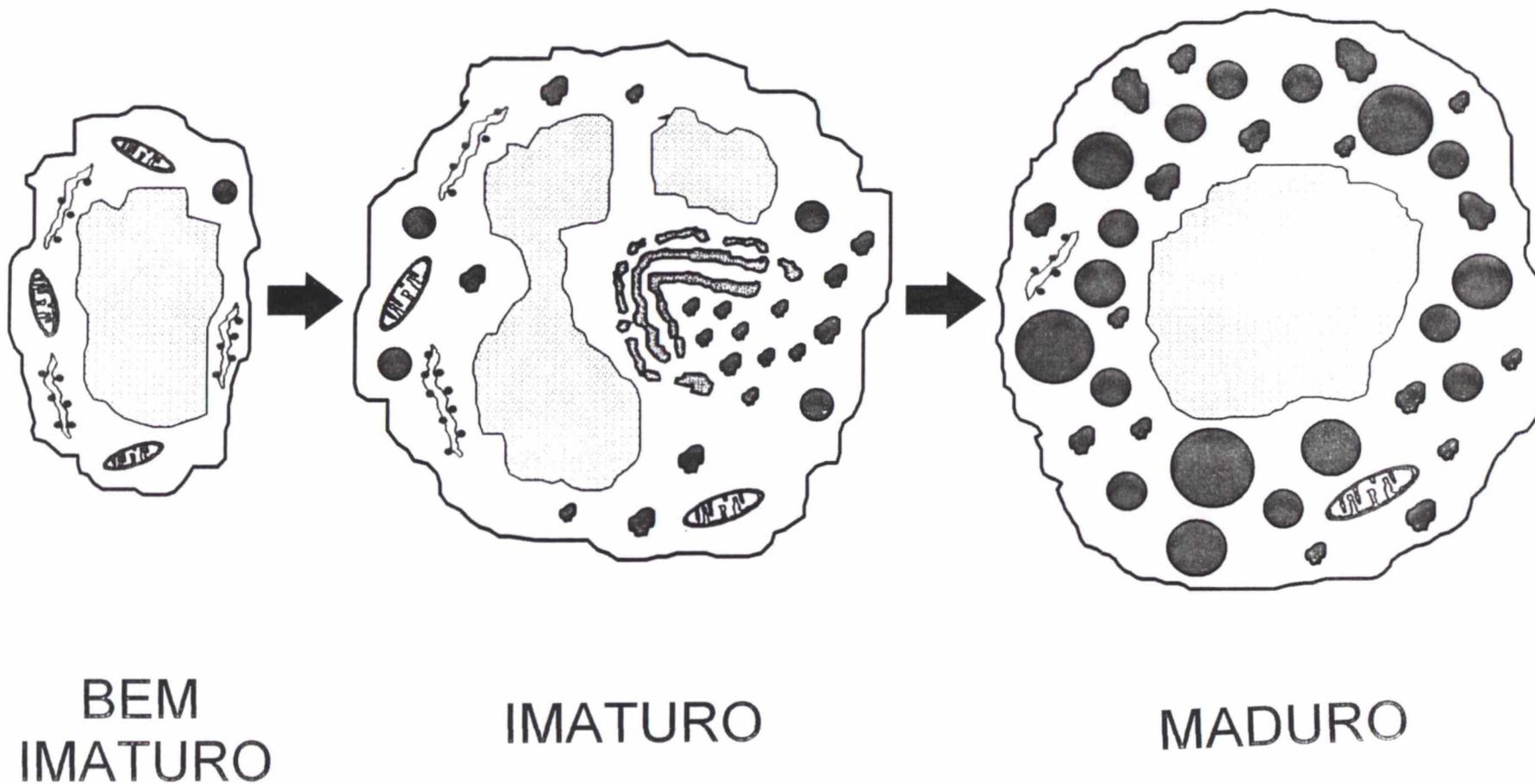
B - Mastócito peritoneal isolado seis dias após a depleção da cavidade peritoneal pela água destilada, apresentando forte imunoreação na superfície celular (setas).
Aumento: 7.950 x.

C - Mastócito peritoneal isolado dez dias após a injeção intraperitoneal de água destilada apresentando imunoreação positiva na superfície celular (setas). Núcleo chanfrado e central (N), complexo de Golgi bem desenvolvido (G), pequenos grânulos citoplasmáticos (cabeça de seta) e algumas mitocôndrias (M).
Notar a presença de grânulos citoplasmáticos maduros (GC) localizados na região oposta ao complexo de Golgi.
Aumento: 8.600 x.



MATURAÇÃO DOS MASTÓCITOS

FIG. 13



VI - DISCUSSÃO

VI - DISCUSSÃO

Com a utilização de anticorpos monoclonais específicos, que reconhecem moléculas da superfície de mastócitos, conjugados as esferas magnéticas, foi possível identificar e caracterizar a população de mastócitos que repovoam a cavidade peritoneal de ratos adultos. O repovoamento da cavidade peritoneal por mastócitos foi observado após a injeção intraperitoneal de água destilada, que causa lise e desaparecimento destas células (FAWCETT, 1955; MENDONÇA et al., 1986).

KITAMURA et al. (1978) demonstraram que os mastócitos se originam através da migração de células precursoras da medula óssea e que se diferenciam nos tecidos, apresentando, assim, fenótipos específicos (VALENT et al., 1991). Estas observações iniciais sobre a origem e diferenciação dos mastócitos demonstraram que estas células são oriundas da medula óssea e se diferenciam nos tecidos onde residem. Segundo ROTTEM e colaboradores (1991) os precursores de mastócitos não possuem um papel fisiológico determinado, porém ao migrarem para os tecidos onde amadurecem, passam a exibir fenótipos específicos daquele tecido.

A identificação de precursores de mastócitos e mastócitos em diferentes estágios de maturação sempre foi dificultada pela falta de marcadores específicos (ODARJUK et al., 1989). A maioria dos estudos eram baseados apenas na identificação morfológica (DVORAK, 1991) ou no conteúdo dos grânulos citoplasmáticos (COMBS, 1971; JAMUR et al., 1986; JAMUR & VUGMAN, 1988). Os resultados assim obtidos eram difíceis de serem interpretados, devido a especificidade dos métodos utilizados e ainda pelo fato

de os mastócitos imaturos muitas vezes não possuem grânulos, assemelhando-se morfológicamente, a outros tipos celulares (NAKAHATA et al., 1986; KANAKURA et al., 1988; CHEN & ENERBACK, 1994). Utilizando anticorpos específicos para componentes da membrana celular de mastócitos, conjugados a esferas magnéticas, conseguimos imunoseparar mastócitos imaturos provenientes da cavidade peritoneal e da medula óssea, mesmo desprovidos de grânulos metacromáticos, os quais não poderiam ser analisados a nível de microscopia de luz. MENDONÇA et al. (1986), utilizando o modelo experimental da injeção de água destilada, estudaram o repovoamento na cavidade peritoneal corando os mastócitos com azul de toluidina. Demonstraram que os mastócitos jovens aparecem no quinto dia no mesentério e no sexto dia no lavado peritoneal. No sétimo dia, encontraram no lavado peritoneal apenas 1,5 % do total de mastócitos encontrados no controle. Somente no décimo terceiro dia este valor atingiu 10%. Utilizando esferas magnéticas conjugadas ao mAb AA4 observamos que já aos dois dias após a injeção intraperitoneal de água destilada, a população de mastócitos peritoneais imaturos, desprovidos de grânulos metacromáticos, perfazia 10% do total de mastócitos da população controle. A população de mastócitos dos ratos controle correspondia a 25% do total das células do lavado peritoneal, quando estimada somente após a coloração com o azul de toluidina ou através de separação imunomagnética com o mAb AA4. No sexto dia de repovoamento os mastócitos já atingiam 46% do controle, aumentando para 95% no décimo dia. As diferenças encontradas entre os resultados descritos por MENDONÇA et al. (1986) e os nossos achados estão relacionadas com a especificidade do método utilizado. A identificação de mastócitos imaturos, desprovidos de

grânulos citoplasmáticos ou contendo grânulos ortocromáticos, ligados especificamente às esferas magnéticas conjugadas com mAb AA4 possibilitaram a sua quantificação. A imunoseparação magnética permitiu quantificar mastócitos, mesmo nos estágios iniciais de maturação, onde se apresentam praticamente desprovidos de grânulos. Nossos resultados mostram também que no sexto dia de repovoamento, um maior número de mastócitos imaturos pode ser observado e alguns deles apresentando grânulos metacromáticos. Dez dias após a injeção intraperitoneal de água destilada, o repovoamento da cavidade peritoneal por mastócitos é quase completo. No entanto, muitos mastócitos imaturos ainda estavam presentes no lavado peritoneal.

Além de identificar e quantificar os mastócitos imaturos durante o repovoamento da cavidade peritoneal, conseguimos comparar esses resultados com os encontrados na medula óssea colhida durante os mesmos períodos experimentais. Observamos que paralelamente ao repovoamento da cavidade peritoneal por mastócitos ocorre uma diminuição na população de mastócitos da medula óssea, que normalmente corresponde a cerca de 2,4% do total das células residentes (JAMUR et al., 1996). Através da quantificação dos mastócitos imunoseparados foi possível avaliar a dinâmica do processo de migração dos progenitores de mastócitos da medula óssea para cavidades e tecidos. Dois dias após a depleção de mastócitos peritoneais, a população de mastócitos da medula óssea decresce para 0,3%, aumentando para 0,49% em seis dias e para 0,66% aos 10 dias, o que corresponde a apenas 27,5% da população inicial de mastócitos da medula óssea. Inicialmente, nota-se uma sincronia entre os dois processos, porém a medula óssea parece necessitar de

um tempo mais longo para refazer a sua população de mastócitos. Estes dados também sugerem que os progenitores de mastócitos continuam migrando para repor a população de mastócitos peritoneais, pois, dez dias após a depleção, alguns mastócitos bem imaturos ainda são detectados no lavado peritoneal.

Alguns pesquisadores utilizaram anticorpos monoclonais na tentativa de caracterizar mastócitos imaturos, porém não eram específicos. KINZER et al. (1995) descreveram um anticorpo monoclonal específico anti uma proteína de membrana de mastócitos de camundongo, que porém marcava também macrófagos. CHEN e ENERBACK (1994) utilizaram o anti IgE conjugado ao ouro coloidal e observaram uma célula peritoneal agranular positiva para IgE, que denominaram “tipo linfócito”, a qual apresentava um grande número de partículas de ouro ligadas a sua superfície. Apenas a presença do receptor de alta afinidade para IgE não é suficiente para identificar mastócitos, já que o mesmo pode ser encontrado em basófilos (SIRAGANIAN, 1988). RIMMER e colaboradores (1984) utilizaram sete anticorpos monoclonais para componentes de grânulos de mastócitos hematopoiéticos, mastócitos do tecido conjuntivo e alguns outros tipos celulares. Além de não serem específicos para mastócitos, estes anticorpos marcariam apenas as células que já apresentassem grânulos, omitindo os estágios iniciais da maturação onde as células ainda não possuem grânulos.

Com a finalidade de caracterizar ultraestruturalmente os mastócitos peritoneais, utilizamos uma série de anticorpos monoclonais específicos contra antígenos de superfície de mastócitos. Os resultados foram obtidos graças a fixação por microondas (JAMUR et al., 1995), pois os antígenos estudados

eram sensíveis ao glutaraldeído. Utilizando o mAb AA4 foi possível caracterizar ultraestruturalmente os mastócitos bem imaturos, colhidos dois dias após a depleção da cavidade peritoneal. Estas células apresentavam características semelhantes às aquelas descritas acima por CHEN E ENERBACK (1994). FARACO et al. (1997), utilizando este mesmo anticorpo, observaram mastócitos em maturação, incluindo uma população de células imaturas, seis dias após a injeção de água destilada. Nossos resultados demonstram que dois dias após a depleção já é possível identificar mastócitos imaturos, ainda desprovidos de grânulos metacromáticos.

Utilizando as esferas magnéticas conjugadas a anticorpos monoclonais específicos foi possível isolar populações puras de mastócitos com uma eficiência de 85%. Esta técnica permitiu ainda, isolar células em diferentes estágios de maturação (Fig. 13), o que seria impossível utilizando centrifugação contra gradientes, pois os mastócitos imaturos sedimentariam com outros tipos celulares semelhantes (DVORAK, 1991).

Utilizando apenas a imunoseparação magnética com o mAb AA4 foi possível detectar a presença dos gangliosídeos do tipo GD1b específicos para mastócitos maduros (GUO et al., 1989; OLIVER et al., 1992) e imaturos (JAMUR et al., 1995; FARACO et al., 1997). Os mastócitos peritoneais maduros e imaturos também foram imunoseparados com o mAb BGD6, contra uma proteína específica da superfície de mastócitos (HAMAWY et al., 1992). Na medula óssea, o mAb BGD6 além de isolar os mesmos tipos celulares que o mAb AA4, também separa células precursoras completamente indiferenciadas (JAMUR et al., 1996). Estas células indiferenciadas,

entretanto, não foram identificadas com a imunoseparação de mastócitos peritoneais pelo mAb BGD6, dois dias após a depleção.

Com objetivo de melhor caracterizar os mastócitos peritoneais imaturos, após o isolamento utilizando as esferas magnéticas conjugadas ao mAb AA4, estes mastócitos foram imunomarcados com mAb BC4 (anti a subunidade alfa do receptor de alta afinidade para IgE), existente somente em mastócitos e basófilos (RA et al., 1989), e também observados em microscopia eletrônica. O receptor para IgE pode ser utilizado como marcador de mastócitos de ratos, uma vez que nestes animais os basófilos são extremamente raros ou ausentes (ENERBACK, 1986; BENTFELD et al., 1977; BENTFELD-BARKER & BANTON, 1980). Os mastócitos identificados como imaturos, observados nos períodos experimentais estudados, foram caracterizados pela forte imunomarcagem de superfície revelada pela peroxidase. Morfologicamente, os mastócitos imaturos observados dois dias após a injeção de água destilada apresentaram características típicas de célula com alta atividade de síntese protéica. O complexo de Golgi e RER eram bem desenvolvidos e as células apresentavam poucos ou nenhum grânulo elétron-denso. O núcleo era volumoso e algumas vezes bilobulado. Estes mastócitos representam um estágio inicial no processo de maturação, pela primeira vez identificados durante o processo de repovoamento da cavidade peritoneal. A IgE ligada a superfície celular dos mastócitos colhidos dois dias após a injeção intraperitoneal de água destilada foi detectada pelo mAb anti IgE. A imunoreação positiva observada na superfície celular indica que receptor para IgE detectado em mastócitos imaturos é funcional. Células peritoneais não caracterizadas e apresentando IgE ligada a superfície foram observadas por

CHEN e ENERBACK (1994). De acordo com nossos achados, mastócitos virtualmente desprovidos de grânulos já são positivos para anticorpos monoclonais específicos para componentes da membrana celular. Estes resultados sugerem que as células progenitoras estariam pré-determinadas a se diferenciar em mastócitos quando deixam a medula óssea.

Mastócitos bem imaturos residentes da medula óssea, apresentando características morfológicas e imunocitoquímicas semelhantes a dos mastócitos peritoneais imaturos, acima descritos, também foram por nós identificados. Nos animais controle, não injetados, encontramos poucas células imaturas, o que está de acordo com as observações de MENDONÇA et al. (1986). Estes mastócitos imaturos, quando isolados, apresentaram o mesmo padrão morfológico daqueles que foram separados com mAb AA4, após a depleção da cavidade peritoneal. Estas últimas observações confirmam a descrição dos mastócitos peritoneais bem imaturos, que foram identificados e caracterizados nos estágios iniciais de maturação durante o processo de repovoamento.

Os anticorpos monoclonais específicos para antígenos de superfície de mastócitos demonstram ser uma ferramenta muito importante na elucidação do comportamento de migração, maturação e diferenciação destas células, uma vez que podemos identificar todas as mudanças morfológicas e até bioquímicas que ocorrem nos mastócitos durante o processo de repovoamento. Sem esses marcadores não seria possível identificar e caracterizar mastócitos imaturos, uma vez que estas células não apresentam características típicas de mastócitos. Além disso, com a utilização das esferas magnéticas conjugadas com anticorpos monoclonais conseguimos estabelecer

um padrão quantitativo na migração dos mastócitos da medula óssea para a cavidade peritoneal durante o repovoamento. Os dados quantitativos observados na medula óssea durante o início do repovoamento da cavidade peritoneal mostram que grande parte da população de mastócitos da medula estaria migrando. Estes dados sugerem que células imaturas poderiam participar do repovoamento, completando sua maturação nos tecidos. Muitos pesquisadores, ao contrário, afirmam que somente precursores indiferenciados deixam a medula óssea (ROTTEM et al., 1991; VALENT et al., 1991).

A utilização de anticorpos monoclonais conjugados as esferas magnéticas permitiu o estudo de populações muito pequenas de mastócitos isolados e em diferentes estágios de maturação. Ainda, facilitou o estudo ultraestrutural destas populações purificadas e imunomarcadas, permitindo sua identificação e caracterização. Esta metodologia também abre caminhos para a elucidação de muitos aspectos da biologia dos mastócitos, facilitando estudos de migração, análises bioquímicas e cultivo de populações puras.

VII - CONCLUSÕES

VII - CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente trabalho mostram que:

01. A utilização de anticorpos monoclonais específicos para componentes da superfície celular de mastócitos possibilita a identificação de mastócitos peritoneais bem imaturos, desprovidos de grânulos, colhidos dois dias após a injeção intraperitoneal de água destilada .

02. A população de mastócitos na cavidade peritoneal corresponde a 25% do total da população de células.

03. Dois dias após a injeção intraperitoneal de água destilada, somente 2,5% das células que repovoam a cavidade peritoneal são mastócitos. Aos seis dias atingem 11,5% e ao final de 10 dias, a cavidade peritoneal está praticamente repovoada por mastócitos, que correspondem a 23,75% do total das células peritoneais.

04. Alterações drásticas na população de mastócitos da medula óssea são observadas durante o repovoamento da cavidade peritoneal. A população de mastócitos corresponde a 2,4% e diminui para 0,3%, dois dias após a depleção. Os mastócitos aumentam para 0,49%, seis dias após a injeção e atingem apenas 0,66% em dez dias.

05. Dez dias após a depleção, a população de mastócitos da cavidade peritoneal chega a 95%, enquanto a da medula óssea atinge apenas 27,5%.

06. O mAb AA4 imunomarcou mastócitos peritoneais imaturos permitindo sua identificação e caracterização ultraestrutural.

07. Os mastócitos peritoneais imaturos observados dois dias após a injeção intraperitoneal de água destilada apresenta características morfológicas idênticas a mastócitos imaturos isolados de animais adultos não injetados (controle).

08. Mastócitos peritoneais bem imaturos são morfológicamente semelhantes a mastócitos imaturos derivados da medula óssea.

09. Nos mastócitos imaturos, desprovidos de grânulos, é detectado o receptor de alta afinidade para IgE, através de imunomarcção com anti IgE, indicando que o mesmo é ativo e funcional.

10. A separação imunomagnética permitiu o isolamento de mastócitos em diferentes estágios de maturação, o estudo ultraestrutural de pequenas populações de mastócitos isolados e a sua caracterização através da imunomarcção de mais de uma molécula específica da superfície de mastócitos.

ANEXOS

TABELA I. Animais não injetados - Controle

	Número de Animais	Total de Células ± DP	Total de Mastócitos Isolados ± DP	% de Mastócitos
Lavado Peritoneal	24	$1 \pm 0.76 \times 10^7$	$2.5 \pm 0.76 \times 10^6$	25%
Medula Óssea	30	$2 \pm 0.9 \times 10^7$	$4.6 \pm 0.4 \times 10^5$	2.4%

DP = desvio padrão

TABELA II. Mastócitos isolados através das esferas magnéticas conjugadas com mAb AA4, dois dias após depleção da cavidade peritoneal de ratos pela água destilada

	Número de Animais	Total de Células ± DP	Total de Mastócitos Isolados ± DP	% de Mastócitos Isolados	% de Mastócitos em relação ao controle
Lavado Peritoneal	8	$18 \pm 14 \times 10^6$	$0.97 \pm 1.29 \times 10^6$	2.5%	10%
Medula Óssea	2	$16.45 \pm 8.4 \times 10^7$	$0.053 \pm 0.032 \times 10^7$	0.3%	12.5%

DP = desvio padrão

TABELA III. Mastócitos isolados através das esferas magnéticas conjugadas com mAb AA4, seis dias após depleção da cavidade peritoneal de ratos pela água destilada

	Número de Animais	Total de Células ± DP	Total de Mastócitos Isolados ± DP	% de Mastócitos Isolados	% de Mastócitos em relação ao controle
Lavado Peritoneal	3	$16 \pm 8.7 \times 10^6$	$7.3 \pm 4 \times 10^6$	11.5%	46%
Medula Óssea	2	$29.7 \pm 14.9 \times 10^7$	$0.124 \pm 0.01 \times 10^7$	0.49%	20.4%

DP = desvio padrão

TABELA IV. Mastócitos isolados através das esferas magnéticas conjugadas com mAb AA4, dez dias após depleção da cavidade peritoneal de ratos pela água destilada

	Número de Animais	Total de Células ± DP	Total de Mastócitos Isolados ± DP	% de Mastócitos Isolados	% de Mastócitos em relação ao controle
Lavado peritoneal	3	$25 \pm 8.5 \times 10^6$	$15 \pm 8.18 \times 10^6$	23,75%	95%
lula Óssea	2	$23.9 \pm 11.5 \times 10^7$	$0.144 \pm 0.014 \times 10^7$	0.66%	27.5%

DP = desvio padrão

**REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS**

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGIS, H.; WILLHEIM, M.; SPERR, W. R.; WILFING, A.; KROMER, E.; KABRNA, E. ; SPANBLOCHL, E.; STROBL, H.; GEISSLER, K.; SPITTLER, A.; BOLZ-NITULESCU, G.; MAJDIC, O.; LECHNER, K.; VALENT, P. Monocytes do not make mast cells when cultured in the presence of SCF. **J. Immunol.**, v. 151, p. 4221 - 4227, 1993.
- BASCIANO, L. K. ; BERENSTEIN, E. H. ; KMAK, L. ; SIRAGANIAN, R. P. Monoclonal antibodies that inhibit IgE binding. **J. Biol. Chem.**, v. 261, p. 11823, 1986.
- BENHAMOU, M ; SIRAGANIAN, R. P. Protein-tyrosine phosphorylation: an essential component of FcεRI signaling. **Immunol. Today**, v. 13, n. 6, p. 195 - 197, 1992.
- BENTFELD, M. E.; NICHOLS, B. A.; BAINTON, D. F. Ultrastructural localization of peroxidase in leukocytes of rat bone marrow and blood. **Anat. Rec.**, v. 187, p. 219, 1977.
- BENTFELD-BARKER, M. E.; BAINTON, D. F. Cytochemical localization of arylsulfatase B in rat basophils and mast cells. **J. Histochem.**, v.28, p. 1055, 1980.
- BERENSTEIN, E. H.; KOH, C. Y.; FISCHLER, C.; SIRAGANIAN, R. P. Monoclonal antibodies to the high affinity FcεR do not release histamine. **FASEB**, v. 4, n. 7, p. 1054, 1990.
- BURD, P. R.; ROGERS, H. W.; GORDON, J. R.; MARTIN, C. A.; JAYARAMAN, S.; WILSON, S. D.; DVORAK, A. M.; GALLI, S. J.; DORF, M. E. Interleukin-3-dependent and independent mast cells stimulated with IgE and antigen express multiple cytokines. **J. Exp. Med.**, v. 170, p. 245 - 257, 1991.
- CHEN, X. J.; ENERBACK, L. Application of an immunocolloid gold technique for the ultrastructural demonstration of IgE-receptor complexes on rat mast cells. **APMIS**, v. 102, p. 729 - 735, 1994.
- COMBS, J. W. An electron microscope study of mouse mast cells arising *in vivo* and *in vitro*. **J. Cell. Biol.**, v. 48, p. 676 - 684, 1971.
- CZARNETZKI, B. M.; HANNICH, D.; WIEDORF, H. In vitro studies on the development of rat peritoneal mast cells. **Immunobiol.**, v. 156, p. 470 - 476, 1979.
- DVORAK, A. M. Morphologic expressions of maturation and function can affect the ability to identify mast cells and basophils in man, guinea pig and mouse. **Mast Cell Differentiation and Heterogeneity**, p. 95-114, 1986.
- DVORAK, A. M.; SCHLEIMER, R. P.; LICHTENSTEIN, L. M. Morphologic mast cell cycles. **Cell Immunol.**, v. 105, p. 199-204, 1987.
- DVORAK, A. M. **Blood Cell Biochemistry. Basophil and Mast Cell Degranulation and Recovery**. Plenum Press, NY., v. 4, 1991.

- DVORAK, A. M.; MITSUI, H. and ISHIZAKA, T. Stimulation of partial development of human mast cells by supernatant fluid from mouse fibroblast cultures. **Clin.Exp.Allergy**, v. 24, p. 649 - 659, 1994.
- DURAND, B.; MIGLIACCIO, G.; YEE, N. S.; EDDLEMAN, K.; BYRON, T. H.; MIGLIACCIO, A. R.; ADAMSON, J. W. Long-term generation of human mast cells in serum-free cultures of CD34+ cord blood cells stimulated with stem cell factor and interleukin-3. **Blood**, v. 84, n. 11, p. 3667 - 3674, 1994.
- ENERBACK, L. The gut mast cell. **Monogr.Allergy**, v. 17, p. 222 - 232, 1981.
- ERLICH, P. Beitrage zur Kenntnis der Anilinfarburger und ihrer Verwendung in der mikroskopischen Technik. **Arch. Mikr. Anat.**, v. 13, p. 263 - 277, 1877.
- FARACO, C. D.; VUGMAN, I.; SIRAGANIAN, R. P.; JAMUR, M. C.; OLIVER, C. Immunocytochemical identification of immature rat peritoneal mast cells using a monoclonal antibody specific for rat mast cells. **Acta Hist.**, v. 99, p. 23 - 27, 1997.
- FAWCETT, D. W. An experimental study of mast cell degranulation and regeneration. **Anat. Rec.**, v. 121, p. 29 - 43, 1955.
- FROESE, A. Receptors for IgE on mast cells and basophils. **Prog.Allergy**, v. 34, p. 142 - 87, 1984.
- FUJIMAKI, H.; NOHARA, O.; KATAYAMA, N.; ABLE, T.; NOHARA, K. Ganglioside GM3 inhibits interleukin-3-dependent bone marrow-derived mast cell proliferation. **Int.Arch. Allergy Immunol.**, v. 107, p. 527, 1995.
- GALLI, S. J. ; DVORAK, A. M. ; MARCUM, J. A. ; ISHIZAKA, T. ; NABEL, G.; SIMONIAN, H. D.; PYNE, K.; GOLDIN, J. M.; ROSENBERG, R. D. ; CANIOR, H. and DVORAK, H. F. Mast cell clones: A model for analysis of cellular maturation. **J.Cell.Biol.**, v. 95, p. 435 -444, 1982.
- GALLI, S. J.; DVORAK, H. F.; DVORAK, A. M. 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 mast cells" : microenvironmental regulation of mast cell development and phenotypic heterogeneity. **Lab. Inv.**, v. 62, p. 5 - 33, 1990.
- GALLI, S. J.; TSAI, M.; GORDON, J. R.; GEISLER, E. N.; WERSHIL, B. K. Analyzing mast cell development and function using mice carrying mutations at W/c-kit or S1/MGF (SCF) loci. **Ann N Y Acad Sci.**, v. 664, p. 69, 1992.
- GALLI, S. J. New concepts about the mast cell. **New Engl. J. Med.**, v. 257, p. 328, 1993.

- GINSBURG, H.; LAGUNOFF, D. The IN VITRO differentiation of mast cells. **J.Cell.Biol.**, v. 35, p. 685 - 697, 1967.
- GINSBURG, H.; SHAHAR, B. D. and BEN-DAVID, E. Mast cell growth on fibroblast monolayers: two-cell entities. **Immunol.**, v. 45, p. 371 - 380, 1982.
- GLEICH, G.J., ACKERMAN,S.J., HISAMATSU, K.I., LEIFERMAN, K.M. Mast cell Heterogeneity : Biological and Clinical Significance. IN: BEFUS, A.D. et al. **Mast cell differentiation and heterogeneity**, Raven Press, New York, 347-366, 1986.
- GRECA, A. C. S. Estudo do repovoamento de mastócitos na cavidade peritoneal de rato. Curitiba, 1991. 50p. Tese de Mestrado da Universidade Federal do Paraná.
- GORDON, J. R.; BURD, P. R.; GALLI, S. J. Mast cells as a source of multifunctional cytokines. **Immunol. Today**, v. 11, p. 458 - 464, 1990.
- GUO, N.; HER, G. R.; REINHOLD, V. N.; BRENNAM, M. J.; SIRAGANIAN, R. P.; GINSBURG, V. Monoclonal antibody AA4 which inhibits binding of IgE to high affinity receptors on rat basophilic leukemia cells, binds to novel a-galactosyl derivatives of gangliosides GD1b. **J. Biol. Chem.**, v. 264, p. 13267 - 72, 1989.
- GUY-GRAND, D., DY, M., LUFFAN, G., VASSALI, P. Gut mucosal mast cells: origin, traffic and differentiation. **J.Exp.Med.**, v. 160, p. 12, 1984.
- 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.
- HATANAKA, K.; KITAMURA, Y.; NISHIMURE, Y. Local development of bone marrow-derived precursors in the skin of mice. **Blood**, v. 53, p. 142, 1979.
- HENDERSON, W. R. & KALINER, M. Mast cell degranule peroxidase: location, secretion and SRS-A inactivation. **J. Immunol.**, v. 122, n. 4, p. 1322 - 1328, 1979.
- HOLMGREN, H. & WILANDER, O. Bertrag zur Kenntnis der chemie und funktion der Ehrlichschen mastzellen. **Z. Mikrosk. Anat. Forsch.**, v. 42, p. 241 - 278, 1937.
- IHLE, J.N. & WEINSTEIN, Y. Immunological regulation of hematopoietic/lymphoid stem cell differentiation by interleukin-3. **Adv. Immunol.**, v. 39, p. 1 - 50, 1986.
- ISERSKY, C. ; METZGER, H.; BUELL, D. N. Cell cycle-associated changes in receptors for IgE during growth and differentiation of a rat basophilic leukemia cell line. **J. Exp. Med.**, v. 141, p. 1147 - 1162, 1975.
- ISERSKY, C. ; TAUROG, J. D. ; POY, G; METZGER, H. Triggering of cultured neoplastic mast cells by antibodies to the receptor for IgE. **J. Immunol.**, v. 121, p. 549 - 558, 1978.

- ISHIZAKA, T.; ISHIZAKA, K. Triggering of histamine release from rat mast cells by bivalent antibodies against IgE-receptors. **J. Immunol.**, v. 120, p. 800 - 805, 1978.
- ISHIZAKA, T.; ISHIZAKA, K. Activation of mast cells for mediator release through IgE receptors. **Prog. Allergy**, v. 34, p. 188 - 235, 1984.
- JAMUR, M. C.; VUGMAN, I.; HAND, A. R. Ultrastructural and cytochemical studies of acid phosphatase and trimetaphosphatase in rat peritoneal mast cells developing in vivo. **Cell Tissue Res.**, v. 244, p. 557 - 563, 1986.
- JAMUR, M. C.; VUGMAN, I. Cytochemical demonstration of basic proteins in rat peritoneal mast cell maturation. **Cell. Mol. Biol.**, v. 34, n. 1, p. 27 - 31, 1988.
- 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.**, v. 43, p. 307 - 311, 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.**, v. 284, p. 153 - 159, 1996.
- JAMUR, M. C.; GRODZKI, A. C. G.; MORENO, A. N.; SWAIM, W.D.; SIRAGANIAN, R. P.; CONSTANCE, O. Immunomagnetic isolation of rat bone marrow derived and peritoneal mast cells. **J. Histochem. Cytochem.**, 1996 (em publicação).
- JORPES, E.; HOLMGREN, H.; WILANDER, D. Über das Vorkommen von heparin in der gefaswand und in der augen. **Z. Mikrosk.**, v. 42, p. 279 - 301, 1937.
- KANAKURA, Y.; THOMPSON, H.; NAKANO, T.; YAMAMURA, T.; ASAI, H.; KITAMURA, Y.; METCALFE, D. D.; GALLI, S. J. Multiple bidirectional alterations of phenotype and changes in proliferative potential during *in vitro* and *in vivo* passage of clonal mast cell populations derived from mouse peritoneal mast cells. **Blood**, v. 72, p. 877 - 885, 1988.
- KINZER, C. A.; KEEGAN, A. D.; PAUL, W. E. Identification of FC ϵ RI^{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. et al. Decrease of mast cells in W/W mice and their increase by bone marrow transplantation. **Blood**, v. 52, n. 2, p. 145 - 148, 1978.
- KITAMURA, Y.; MATSUDA, H.; HATANAKA, K. Clonal mature of mast cell 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 cells and granulocytis. **Nature**, v. 291, p. 159 - 162, 1981.
- KITAMURA, Y. Heterogeneity of mast cells and phenotypic change between subpopulations. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 7, p. 59 - 76, 1989.
- KITAMURA, Y.; KASUGAI, T.; ARIZONO, N.; MATSUDA, H. Development of Mast cells and Basophils: Processes and Regulation Mechanisms. **Am. J. Med. Sci.**, v. 306, n. 3, p. 185 - 191, 1993.
- LAGUNOFF, D. Contributions of electron microscopy to the study of mast cells. **J. Invest. Dermatol.**, v. 58, p. 296 - 11, 1972.
- LERNER, N. B.; NOCKA, K. H.; COLE, S. R.; QIU, F.; STRIFE, A.; ASHMAN, L. K.; BESMER, P. Monoclonal antibody YB5.B8 identifies the human c-kit protein product. **Blood**, v. 77, p. 1876 - 1883, 1991.
- MARSHALL, J. S. ; KAWABORI, S. ; NIELSEN, L. ; BIENENSTOCK, J. Morphological and functional characteristics of peritoneal mast cells from young rats. **Cell. Tissue. Res.**, v. 276, p. 565 - 570, 1994.
- MENDONCA, V. O. ; VUGMAN, I. ; JAMUR, M. C. Maturation of adult rat peritoneal and mesenteric mast cells. A morphological and histofluorescence study. **Cell. Tissue. Res.**, v. 243, p. 635 - 639, 1986.
- METZGER, H.; ALCARAZ, G. ; HOHMAN, R. ; KINET, J. P. ; PRIBLUDA, V. and QUARTO, R. The receptor with high affinity for immunoglobulin E. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 4, p. 419 - 470, 1986.
- METZGER, H. The receptor with high affinity for IgE. **Immunol. Rev.**, v. 125, p. 37 - 48, 1992.
- NAKAHATA, T.; SPICER, S. S.; CANTER, J. R.; OGAWA, M. Clonal assay of mouse mast cell clones in methylcellulose culture. **Blood**, v. 60, p. 252, 1982.
- NAKAHATA, T.; KOBAYASHI, T.; SHIGURO, A.; TSUJIKI; NAGANUMA, K.; ANDO, O.; YAGI, Y.; TADOKOROK; AKABANE, T. Extensive proliferation of mature connective-tissue type mast cells in vitro. **Nature**, v. 324, p. 65 - 67, 1986.
- NAKANO, T.; SONODA, T.; HAYASHI, C.; YAMATODANI, A.; KANAYAMA, Y.; ASAI, H.; YONEZAWA, T.; KITAMURA, Y.; GALLI, S. J. Fate of bone marrow-derived cultured mast cells after intracutaneous, intraperitoneal and intravenous transfer into genetically mast cell deficient *W/W^v* mice: Evidence that cultured mast cells can give rise to both "connective tissue-type" and "mucosal" mast cells. **J. Exp. Med.**, v. 162:, p. 1025 -1043, 1985.

- NIEMEYER, C. M.; SIEFF, C. A.; MATHEY-PREVOT, B.; WIMPERIS, J. Z.; BIERER, B. E.; CLARK, S. C.; NATHAN, D. G. Expression of human interleukin-3 (multi-CSF) is restricted to human lymphocytes and T-cell tumor lines. **Blood**, v. 73, p. 945 - 951, 1989.
- 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. R. ; MERTZ, L. M. ; SIRAGANIAN, R. P. Binding of monoclonal antibody AA4 to gangliosides on rat basophilic leukemia cells produce changes similar to those seen with Fc3 receptor activation. **J. Cell. Biol.**, v. 116, p. 635, 1992.
- OSTER, W.; LINDEMANN, A.; MERLELSMANN, R.; HERRMENN, F. Production of macrophage-, granulocyte-, granulocyte-macrophage and multi colony - stimulating factor by peripheral blood cells. **Eur. J. Immunol.**, v. 19, p. 543 - 547, 1989.
- PLAUT, M.; PIERCE, J. H.; WATSON, C. J.; HANLEY-HYDE, J.; NORDAN, R. P.; PAUL, W. E. Mast cell lines produce lymphokines in response to cross - linkage of FC_εRI or to calcium ionophores. **Nature**, v. 339, p. 64 - 67, 1989.
- RA, C.; JOUVIN, M. H. E.; BLANK, U.; KINET, J. P. A macrophage Fc_γ receptor and mast cell receptor for IgE share an identical subunit. **Nature**, v. 341, p. 752 - 754, 1989.
- RENNICK, D.; HUNTE, B.; HOLLAND, G.; THOMPSON-SNIPES, L. Cofactors are Essential for Stem Cell Factor-Dependent Growth and Maturation of Mast Cell Progenitors: Comparative Effects of IL-3, IL-4, IL-10 and Fibroblasts. **Blood**, v. 85, n. 1, p. 57 - 65, 1995.
- REYNOLDS, E. S. The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. **J. Cell Biol.**, v. 17, p. 208, 1963.
- RIMMER, E. F.; TURBERVILLE, C.; HORTON, M. A. Human mast cells detected by monoclonal antibodies. **J. Clin. Pathol.**, v. 37, p. 1249 - 1255, 1984.
- ROSSI, G. ; NEWMAN, S. A.; METZGER, H. Assay and partial characterization of the solubilized cell surface receptor for immunoglobulin E. **J. Biol. Chem.**, v. 252, p. 704-711, 1977.
- ROTTEM, M.; KIRSHENBAUN, A. S.; METCALFE, D. D. Early development of mast cells. **Int. Arch. Allergy. Appl. Immunol.**, v. 94, p. 104 - 109, 1991.
- SCHRADER, J. W. The panspecific hemopoietin of activated lymphocytes (interleukin-3). **Annu. Rev. Immunol.**, v. 4, p. 205 - 230, 1986.

- SCHRADER, J. W.; LEWIS, S. J.; CLARK-LEWIS, I.; CULVENOR, J. G. The persisting (P) cell: histamine content, regulation by a T-cell derived factor, origin from a bone marrow precursor and relation-ship to mast cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 78, p. 323 - 327, 1981.
- SCHWARTZ, L. B. and KEPLEY, C. Development of markers for human basophils and mast cells. **J. Allergy. Immunol.**, v. 94, n. 6, p. 1231 - 1240, 1994.
- SILLABER, C.; SPERR, W. R.; AGIS, H.; SPANBLOCHL, E.; LECHNER, K. ; VALENT, P. Inhibition of Stem Cell Factor Dependent Formation of Human Mast Cells by Interleukin-3 and Interleukin-4. **Int. Arch. Allergy Immunol.**, v. 105, p. 264 - 268, 1994.
- SMITH, T. J. & WEIS, J. H. Mucosal T cells and mast cells share common adhesion receptors. **Immunol. Today**, v. 17, n. 2, p. 60 - 63, 1996.
- SIRAGANIAN, R. P. Mast cells and basophils. IN: GALLI, J. I. ; GOLDSTEIN, I. M.; SNYRDERMAN, R. **Inflamation: Basic principles and clinical correlates**. New York: Raven Press, 1988, p. 513 - 542.
- SONODA, T.; CHIEKO, H., KITAMURA, Y. Presence of mast cell precursor in the yolk sac of mice. **Develop. Biol.**, v. 97, p. 89 - 94, 1983
- SONODA, T. ; KANAYAMA, Y. ; HARA, H. ; HAYASHI, C.; TODOKORO, M.; YONEZAWA, T.; KITAMURA, Y. Proliferation of peritoneal mast cells in the skin of W/W^v mice that genetically lack mast cells. **J. Exp. Med.**, v. 160, p. 138 - 151, 1984.
- SONODA, S. ; SONODA, T. ; NAKANO, T. ; KANAYAMA, Y.; KANAKURA, Y.; ASAI, H.; YONEZAWA, T.; KITAMURA, Y. Development of mucosal mast cells after injection of a single connective tissue-type mast cells in the stomach mucosa of genetically mast cell-deficient W/W^v mice. **J. Immunol.**, v. 137, p. 1319 - 1322, 1986.
- SULLIVAN, A. L.; GRIMLEY, P. M.; METZGER, H. Electron microscopic localization of immunoglobulin E on the surface membrane of human basophils. **J. Exp. Med.**, v. 134, p. 1403 - 1416, 1971.
- SWIETER, M.; MERGENHAGEN, S. E.; SIRAGANIAN, R. P. Microenvironmental factors that influence mast cell phenotype and function. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, v. 199, p. 22 - 23, 1992.
- VALENT, P.; SILLABER, C.; BETTELHEIN, P. The growth and differentiation of mast cells. **Prog. Growth Factor Research**, v. 3, p. 27 - 41, 1991.
- VALENT, P. ; SPANBLOEL, E.; SILLABER, C.; SZEBO, K.; STROBL, H.; GEISSLER, K.; BETTELHEIM, P.; LECHNER, K. Induction of differentiation of human mast cells

from bone marrow and peripheral blood mononuclear cells by recombinant human stem cell factor kit-ligand in long term culture. **Blood**, v. 80, p. 2237 - 2245, 1992.

ZUCKER-FRANKLIN, D. Ultrastructural evidence for the common origin of human mast cells and basophils. **Blood**, v. 56, p. 534 - 540, 1980.

ZUCKER-FRANKLIN, D.; GRUSKY, G. ; HIRAYAMA, M.; SCHNIPPER, E. The presence of mast cell precursors in rat peripheral blood. **Blood.**, v. 58, p. 544 - 551, 1981.

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.

WOLDEMUSSIE, E.; BEAVEN, M. A. Rat mast cell/ basophil heterogeneity related to cell maturation. IN: BEFUS, A. D. et al. **Mast Cell Differentiation and Heterogeneity**. Raven.Press. NY., 1986 , p. 257-262.

YUEN, E.; BROWN, R. D.; VANDERLUBBE, L.; RICKARD, K. A.; KRONENBERG, H. Identification and characterization of human hematopoietic mast cell colonies. **Exp. Hematol.**, v. 16, p. 896 - 902, 1988.