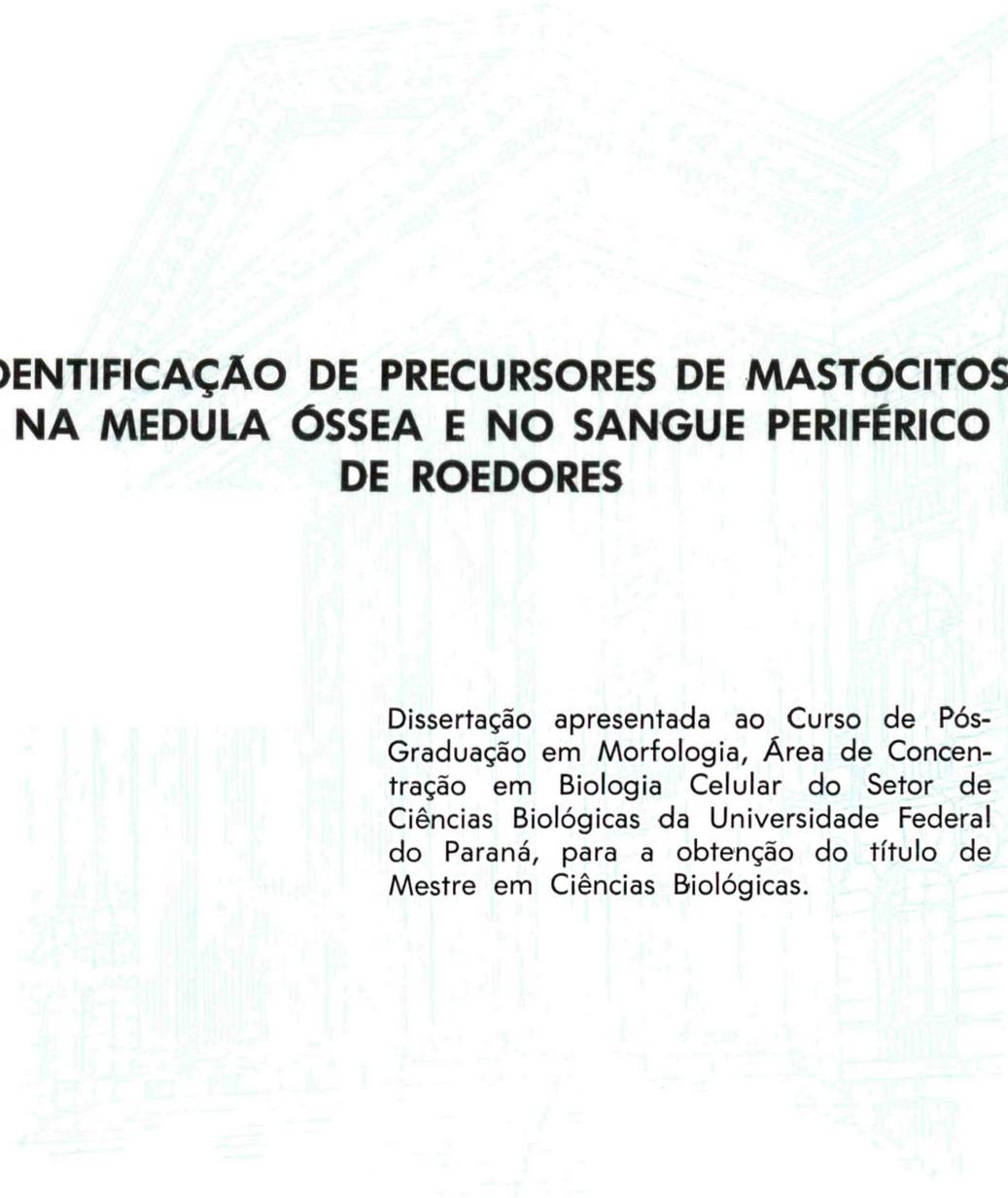


ANA CRISTINA GONÇALVES GRODZKI



**IDENTIFICAÇÃO DE PRECURSORES DE MASTÓCITOS  
NA MEDULA ÓSSEA E NO SANGUE PERIFÉRICO  
DE ROEDORES**

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  
1999

ANA CRISTINA GONÇALVES GRODZKI

**IDENTIFICAÇÃO DE PRECURSORES DE MASTÓCITOS  
NA MEDULA ÓSSEA E NO SANGUE PERIFÉRICO  
DE ROEDORES**

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.

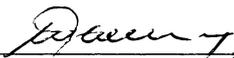
CURITIBA

1999

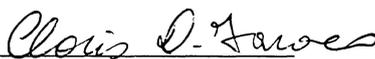
PÓS-GRADUAÇÃO EM MORFOLOGIA  
BIOLOGIA CELULAR  
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

PARECER

A Comissão Examinadora de Dissertação de mestrado “IDENTIFICAÇÃO DE PRECURSORES DE MASTÓCITOS NA MEDULA ÓSSEA E NO SANGUE PERIFÉRICO DE ROEDORES”, de autoria da Pós-Graduanda ANA CRISTINA GRODZKI, composta pelos Professores: Dra. Maria Célia Jamur (como orientadora), Dra. Lúcia Helena Faccioli e Dra. Cloris Ditzel Faraco, atribui individualmente as seguintes notas: Dra. Maria Célia Jamur, nota 10,0 (dez); Dra. Lúcia Helena Faccioli, nota 10,0 (dez); Dra. Cloris Ditzel Faraco, nota 10,0 (dez). De acordo com o Regimento interno do Curso, a candidata foi aprovada com a nota: 10 (dez), para a devida publicação o trabalho deve sofrer as modificações sugeridas. Curitiba, 11 de Fevereiro de 1999.

  
Dra. Maria Célia Jamur

  
Dra. Lúcia Helena Faccioli

  
Dra. Cloris Ditzel Faraco

Aos meus pais

Ana Maria e Leocadio Grodzki

Agradeço a Deus pela amizade, harmonia e amor em nossa casa, pelo incentivo nas minhas decisões e pelo carinho que me conforta nos momentos difíceis.

Aos meus irmãos

Leo Eduardo e Luiz Fernando

Obrigada por acreditarem, torcerem e estarem ao meu lado sempre. Adoro vocês.

À  
Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Célia Jamur  
Seu exemplo de competência e  
responsabilidade nos faz acreditar num  
futuro melhor para a ciência e para este  
país.

# AGRADECIMENTOS

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria Célia Jamur pela minha formação e informação, pelo exemplo de responsabilidade e honestidade na ciência, pelas oportunidades, amizade e carinho durante toda a minha vida acadêmica.

À Dr<sup>a</sup> Constance Oliver por sua participação na minha vida profissional, trazendo excelentes sugestões e soluções. Agradeço ainda por sua infinita paciência ao me ajudar com os computadores e com o meu inglês, e também pelo carinho, amizade, e nosso delicioso convívio familiar.

À minha amiga do coração, Andréa Novais Moreno, agradeço a Deus ter colocado você no meu caminho. Aprendi muito com você, não só na parte profissional, que muito me auxiliou na confecção desta dissertação, como também na parte emocional, que me ajudou a desvendar alguns dos mistérios das diferentes relações humanas. Muito obrigada pelo incentivo, carinho, compreensão e alegria que nos impulsionam a cada dia, mais adiante.

À amiga, Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Claudia Feijó Ortolani Machado. Seu incentivo e exemplo foram decisivos durante os períodos que considero os mais importantes na minha vida profissional. Obrigada pela sua palavra amiga e pelos empurrõezinhos nos momentos de dúvida.

À amiga Luciana de Fátima Chaves de Mello por sua amizade e carinho e por nossas valiosas discussões no laboratório.

À amiga Gabriela de Almeida Ferreira, pelos nossos prazerosos dias de experimentos e discussões intercalados com boas gargalhadas.

À amigona Maria Verônica Dávila pela nossa simples e deliciosa amizade cultivada durante este mestrado, que transformou estes dois anos de trabalho em ótimos momentos a serem lembrados sempre.

Ao amigo Luiz Fernando Fávaro, pelos momentos de descontração que só você é capaz de criar nos dias mais cinzentos e frios desta cidade.

As meninas e meninos do laboratório: Lu, Déa, Clau, Gabi, Beta, Eliana, João, Prof<sup>a</sup> Cloris, Prof<sup>a</sup> Lea, Prof<sup>a</sup> Cecílinha, Prof<sup>a</sup> Carla, Ve, Sonia, Gui, Renatinha, Marisa, Fabiana e Andrezinho pela nossa agradável rotina.

Aos professores Luiz Fernando Fávaro, Manoel C. T. Quintilham e Cecília B. Helm Niederheitmann na reposição de aulas no período do meu estágio no NIH, muito importante para a confecção desta dissertação. Agradeço também pelas inúmeras tardes que dispensaram ao meu lado me auxiliando com o preparo das aulas.

Ao Cellular Imaging Core Facility, National Institute of Dental and Cranialfacial Research, NIH, na pessoa de seu diretor Dr. William D. Swaim pelos ensinamentos sobre microscopia eletrônica de varredura e pela utilização do microscópio Confocal a Laser.

Aos professores e amigos do Departamento de Biologia Celular, obrigada pelo apoio profissional, pelo afeto e amizade durante todos os anos de estágio, docência e mestrado.

As secretárias e amigas Gerizalda Guimarães Julião Bernardo e Marlene Bonifácio Camargo, pelo carinho e valioso apoio nos bastidores do meu mestrado.

Ao Centro de Microscopia Eletrônica da UFPr, principalmente à Vera Regina F. Piontek, pela ajuda nas reproduções fotográficas.

Aos colegas de Pós - Graduação, que me confiaram a representação discente no colegiado deste curso, obrigada pela ajuda na construção de mais um ano da nossa história.

Ao Cândido José Thomaz Pereira, bioterista da UFPr, pelo auxílio no aprendizado da coleta de sangue dos animais.

Ao Departamento de Morfologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto pelo uso do Microscópio Eletrônico de Transmissão e do Microscópio Confocal.

Aos técnicos do Departamento de Morfologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Márcia Sirlene Zardin Graeef, Maria Tereza P. Maglia, José Augusto Maulin e Domingos Soares de Souza Filho pelo auxílio prestado.

Ao Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, em especial a Alexandra Rosa Vieira Dias pelo auxílio técnico com a citometria de fluxo.

# SUMÁRIO

Lista de Figuras _____	VIII
Resumo _____	X
Summary _____	XI
I. Introdução _____	1
II. Revisão de Literatura _____	2
III. Material e Métodos _____	12
IV. Resultados _____	19
V. Figuras _____	24
VI. Tabelas _____	37
VII. Gráfico _____	40
VIII. Discussão _____	41
IX. Conclusões _____	47
Referências Bibliográficas _____	48

# LISTA DE FIGURAS

1. Mastócitos derivados da medula óssea imunomarcados com mAb BGD6 -----	24
2. Mastócitos derivados da medula óssea isolados pelo mAb AA4 conjugado a esferas magnéticas -----	25
3. Isolamento sequencial por esferas magnéticas -----	26
4. Precursor de mastócito separado por isolamento sequencial e imunomarcado com mAb anti - CD34 -----	27
5. Mastócitos isolados da medula óssea de ratos que foram injetados intraperitonealmente com água destilada -----	28
6. Citometria de fluxo de células da medula óssea -----	29
7. Caracterização ultraestrutural de mastócitos derivados da medula óssea imunomarcados com o mAb BC4 e mAb anti - IgE -----	30
8. Mastócitos bem imaturo e imaturo apresentando imunomarcção para o mab BGD6 -----	31
9. Mastócitos isolados da medula óssea com esferas magnéticas conjugadas ao mAb AA4 -----	32
10. Precursores de mastócitos obtidos através do isolamento sequencial com mAb AA4 e mAb BGD6 -----	33

11. Mastócito imaturo incubado na ausência de anticorpo primário -----	34
12. Mastócitos isolados do sangue periférico de ratos com esferas magnéticas conjugadas ao mAb BGD6 -----	35
13. Mastócitos isolados do sangue periférico de ratos com esferas magnéticas conjugadas ao mAb AA4 -----	36

## RESUMO

Estudos sobre a maturação de mastócitos têm sido dificultados pela falta de marcadores específicos para mastócitos e os mastócitos imaturos não podem ser identificados apenas pelas suas características morfológicas. Os mastócitos imaturos não apresentam grânulos citoplasmáticos típicos de mastócitos e possuem características morfológicas semelhantes a outros tipos celulares. No presente estudo, mastócitos derivados da medula óssea de ratos e camundongos foram identificados e caracterizados por métodos imunquímicos. A análise por citometria de fluxo e a contagem direta de células isoladas imunomagneticamente ou imunomarcadas, mostram que os mastócitos representam aproximadamente 2,4% da população total de células da medula óssea. Com a conjugação a esferas magnéticas de anticorpos monoclonais (mAbs) específicos para mastócitos, mAb BGD6 e mAb AA4, foi possível isolar uma população pura de mastócitos da medula óssea. Mastócitos em três distintos estágios de maturação foram identificados: maduro, imaturo e bem imaturo. Estas células têm o seu tamanho variando entre 3 e 13  $\mu\text{m}$  e são imunomarcadas positivamente pelo mAb AA4 e pelo mAb BGD6. Elas também são positivas para o receptor de alta afinidade para IgE, IgE e c-kit. Utilizando isolamento sequencial com o mAb AA4 seguido pelo mAb BGD6, um precursor comprometido com a linhagem de mastócitos também pode ser identificado. Estes precursores comprometidos perfazem 0,02% das células da medula óssea, são células indiferenciadas e apresentam os antígenos de superfície c-kit e CD 34. Mastócitos não são encontrados no sangue circulante, porém seus precursores devem migrar da medula óssea para os tecidos periféricos, através da circulação. Foi utilizado o modelo da depleção de mastócitos peritoneais, através da lise pela injeção intraperitoneal de água destilada, para estimular a migração de precursores durante o repovoamento da cavidade peritoneal. Utilizando este modelo, pela primeira vez, uma pequena população de precursores de mastócitos foram isolados do sangue circulante,  $< 1/10^6$  células. Morfologicamente e fenotipicamente, estes mastócitos circulantes assemelham-se aos mastócitos bem imaturos encontrados na medula óssea. Os resultados apresentados indicam a presença, na medula óssea, de uma população de mastócitos em todos os estágios de maturação, desde o precursor comprometido até o mastócito maduro. No entanto, este estudo demonstra que pelo menos os mastócitos bem imaturos podem circular pelo sangue durante o repovoamento de sítios periféricos.

## SUMMARY

Studies of mast cell maturation have been hampered because there have been no specific markers for mast cells and the immature mast cells are not easily identified based solely on morphological characteristics. Immature mast cells lack the cytoplasmic granules typical of mature mast cells as well as sharing morphological features with other cell types. In the present study, rat and mouse bone marrow derived mast were identified and characterized using immunochemical methods. By flow cytometry, and by direct counting of immunostained or immunomagnetically isolated cells, the mast cells represent approximately 2.4% of the total cell population in bone marrow. By conjugating the mast cells specific monoclonal antibodies (mAbs), mAb AA4 and mAb BGD6, to magnetic beads, it was possible to isolate a pure population of mast cells from bone marrow. Three distinct stages of maturation were identified, mature, immature and very immature. These cells ranged in size from 13  $\mu\text{m}$  – 3  $\mu\text{m}$  and immunostained positively with mAb AA4 and mAb BGD6. They were also positive for the high affinity IgE receptor, IgE and c-kit. In addition, using sequential isolation first with mAb AA4 and then mAb BGD6, a committed mast cell precursor also could be identified. This cell makes up only 0.02% of the cells in the bone marrow, has a very undifferentiated morphology, and consistent with being a mast cell precursor, is c-kit and CD34 positive. Although mast cells are thought to migrate from the bone marrow to peripheral sites in the tissue through the circulation, mast cells have not been seen in circulating blood. Lysis of peritoneal mast cells by distilled water was used in order to stimulate the migration of mast cells from the bone marrow into the peripheral circulation during repopulation of the peritoneal cavity. Using this model system, for the first time very small numbers of mast cells,  $<1/10^6$  cells, could be isolated from circulating blood. Morphologically and phenotypically, these circulating mast cells resembled the very immature mast cells present in bone marrow. The results of this investigation demonstrate that mast cells are present in the bone marrow in all stages of maturation ranging from committed precursor to mature mast cell. Furthermore, this study indicates that at least the very immature mast cells can circulate through the blood during repopulation of peripheral sites.

## **I. INTRODUÇÃO**

# I. INTRODUÇÃO

O mastócito maduro apresenta um grande número de grânulos citoplasmáticos metacromáticos, os quais permitem sua distinção morfológica de outros tipos celulares. No entanto, desde a sua origem até a sua completa maturação, o mastócito passa por uma série de modificações bioquímicas e morfológicas que impedem a sua identificação em estágios iniciais da diferenciação.

Os mastócitos originam-se de uma célula fonte hematopoiética, e possivelmente migram através da circulação sanguínea e atingem a sua maturidade nos tecidos conjuntivos que povoam. Estas células, colaborando com o sistema imune, desempenham um importante papel na defesa do organismo nos processos alérgicos, reações inflamatórias e na expulsão de parasitas.

Por muito tempo os mastócitos foram identificados exclusivamente pelos seus componentes granulares, o que gerou uma falha na sua identificação, pois as células imaturas que possuem raros ou nenhum grânulo citoplasmático, deixaram de ser estudadas. A identificação, caracterização e principalmente purificação dos precursores de mastócitos facilitaria outros estudos sobre a sua maturação e poderia levar ao desenvolvimento de novas intervenções farmacológicas que regulariam a função dos mastócitos.

No presente trabalho, a utilização de anticorpos monoclonais específicos para mastócitos possibilitou a identificação, caracterização e purificação das células pertencentes à linhagem de mastócitos presentes na medula óssea e no sangue periférico. Dois destes anticorpos monoclonais específicos para a superfície de mastócitos, o mAb AA4 e o mAb BGD6, foram conjugados a esferas magnéticas, permitindo o isolamento de populações puras de mastócitos nos seus diferentes estágios de maturação e a sua posterior caracterização.

## **II.REVISÃO DE LITERATURA**

## II. REVISÃO DE LITERATURA

Segundo METCALF e colaboradores (1997), os mastócitos são células repletas de grânulos metacromáticos identificadas pela primeira vez por Paul Erlich, em 1877, juntamente com os basófilos. Por muito tempo não se fez distinção entre estes dois tipos celulares, justamente por apresentarem algumas características semelhantes, tais como: a produção de histamina e receptores de alta afinidade para a imunoglobulina E (IgE). Ambos são originados da célula fonte hematopoiética, no entanto, possuem diferenças incontestáveis em relação à sua morfologia, localização *in vivo*, conteúdo de mediadores, marcadores de superfície, respostas a agentes químicos e fatores de crescimento (SCHWARTZ & KEPLEY, 1994). Antes da comprovação experimental das diferenças fenotípicas e funcionais destas células, alguns autores mencionaram a possibilidade dos basófilos do sangue se diferenciarem em mastócitos nos tecidos ou sugeriram a existência de um precursor comum a estas duas células (ZUCKER-FRANKLIN, 1980). Alguns autores utilizando anticorpos não específicos para mastócitos como marcadores, sugeriram também que mastócitos e células da linhagem monocítica provavelmente compartilhavam um precursor da medula óssea (HAMANN et al., 1995).

Os grânulos presentes no citoplasma dos mastócitos coram-se metacromaticamente por corantes básicos devido a sua alta concentração em heparina, uma proteoglicana altamente sulfatada. Além da heparina, os grânulos de mastócitos podem acumular outras proteoglicanas como condroitin sulfato E, aminas biogênicas, proteases neutras e fatores quimiotáticos (SCHWARTZ & KEPLEY, 1994).

Estas células possuem receptores de membrana de alta afinidade para a IgE (FC $\epsilon$ RI), amplamente distribuídos na superfície celular. CHEN e ENERBACK, em 1994, demonstraram imunocitoquimicamente a presença deste receptor na superfície celular dos mastócitos e, após a infecção pelo nematóide *Nippostrongylus brasiliensis*, observaram que o número de moléculas de IgE ligadas aos receptores aumentou significativamente em relação aos animais não infectados, indicando que alguns dos

receptores de IgE foram previamente ocupados por IgE nativo. Através de análise realizada por FACS, *fluorescence activated cell sorter*, THOMPSON e colaboradores, em 1990, mostraram que células da medula óssea de murinos, cultivadas e marcadas com IgE conjugada a FITC, aumentam de tamanho e expressam progressivamente mais receptores de IgE na sua superfície com o decorrer do cultivo.

A ativação dos mastócitos pode se dar por muitos estímulos, dependentes ou não do FC $\epsilon$ RI. A ativação independente do FC $\epsilon$ RI inclui ligação com o sistema complemento, com o SCF (stem cell factor) e interações com fibroblastos (HOGABOAM et al., 1998) e células T (BHATTACHARYYA et al., 1998). Quando a ativação é dependente do FC $\epsilon$ RI as IgE são interligadas por antígenos multivalentes, promovendo o intercruzamento e agregação dos receptores na superfície da célula. Esta agregação dos receptores determina a desgranulação dos mastócitos que então liberam os agentes vasoativos e fatores quimiotáticos (GORDON et al., 1990, SWAIM, et al., 1994). O FC $\epsilon$ RI é constituído por 3 subunidades ( $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ ), e a subunidade  $\alpha$  é o sítio de ligação da IgE, já que é a subunidade exposta à superfície externa da célula (METZGER, 1992). A liberação dos mediadores químicos está associada a fenômenos alérgicos de hipersensibilidade imediata, hipersensibilidade retardada, permeabilidade e integridade vascular, imunorregulação e potencialidade para toxicidade de eosinófilos e de macrófagos. Segundo ROTTEM et al., 1992, o FC $\epsilon$ RI poderia apresentar outras funções fisiológicas, que não as envolvidas com a desgranulação celular, já que está presente nas células bem imaturas, antes destas apresentarem sua completa maturação granular. O papel fisiológico inicial do FC $\epsilon$ RI poderia ser o de mediador na produção de linfocinas sem a indução de desgranulação celular (THOMPSON et al., 1990). Assim, o mastócito é considerado um importante componente para reações inflamatórias, mas sua ampla desgranulação pode produzir reações anafiláticas graves nos organismos (GALLI et al., 1992).

As RBL- 2H3, células da leucemia basofílica de ratos, são células tumorais correspondentes a mastócitos de mucosa ( SWEITER et al., 1992). Estas células têm sido amplamente utilizadas como modelo de estudo para maior esclarecimento sobre a estrutura e função do FC $\epsilon$ RI e para estudos de transdução de

sinais envolvidos na secreção de mediadores (SWIETER et al., 1993; SIRAGANIAN et al., 1988). Estes estudos demonstraram que, diferentes interações destas células com a matriz extracelular podem modular a resposta inflamatória.

Os mastócitos são células residentes do tecido conjuntivo e se localizam preferencialmente em locais de potencial entrada de substâncias e microorganismos nocivos, isto é, em associação com vasos e nervos e em proximidade das superfícies que fazem face para o ambiente externo (METCALFE et al., 1997). Em murinos, os mastócitos foram subdivididos em mastócitos de mucosa (MMC) e mastócitos de tecido conjuntivo (CTMC) de acordo com diferenças observadas na localização, conteúdo granular e resposta a fatores e células que induzem o desenvolvimento. Os mastócitos de mucosa são encontrados particularmente na lâmina própria intestinal e os mastócitos de tecido conjuntivo estão presentes principalmente na pele e cavidade peritoneal (ENERBACK, 1981). Em humanos, a heterogeneidade dos mastócitos é basicamente expressa em função da presença de distintas proteases nos grânulos:  $M_T$  ; mastócitos contendo triptase e,  $M_{CT}$  ; mastócitos contendo tanto triptase quanto quimase (SCHWARTZ, 1993). Mas, recentemente concluiu-se que os mastócitos, tanto humanos quanto murinos, possuem uma heterogeneidade muito grande em relação as suas proteínas granulares, dependendo dos tecidos onde são encontrados e podendo em camundongos, variar até de linhagem para linhagem (HUNT & STEVENS, 1995).

Dependendo das condições a que estas células são expostas, podem ser encontrados diferentes tipos de mastócitos, os quais podem apresentar fenótipos de mastócitos de mucosa ou de tecido conjuntivo (MITSUI et al., 1993). Estas células podem ainda sofrer transdiferenciação, de um tipo para outro, de acordo com o ambiente (VALENT et al., 1991). Mastócitos derivados da medula óssea, quando cultivados, apresentam um fenótipo de mastócito de mucosa (MACDONALD et al., 1998), mas quando estas mesmas células são injetadas na cavidade peritoneal de camundongos deficientes em mastócitos, adquirem fenótipo de mastócito de tecido conjuntivo (NAKANO et al., 1985). Mastócitos de tecido conjuntivo também podem alterar seu fenótipo para mastócitos de mucosa se injetados na mucosa estomacal de

camundongos deficientes em mastócitos (SONODA et al., 1986; KANAKURA et al., 1988).

Apesar da localização final dos mastócitos nos tecidos conjuntivos e nas mucosas, experimentos *in vivo* e *in vitro* mostram claramente que estas células são derivadas dos tecidos hematopoiéticos (KITAMURA et al., 1979(b); KITAMURA et al., 1981; YUEN et al., 1988; GALLI., 1990). Utilizando camundongos WW, deficientes em mastócitos, KITAMURA e colaboradores (1979 b) observaram um aumento no número de mastócitos em vários locais após o transplante de células da medula óssea de camundongos normais. Estes pesquisadores observaram ainda que os grupos de mastócitos se originavam de uma única célula precursora. Após injetar células da medula óssea de camundongos com grânulos gigantes, *bg/bg*, misturadas a células da medula óssea de camundongos normais, mais de 95% dos grupos de células consistiam de apenas um tipo celular. Estas descobertas estão de acordo com os estudos feitos por HATANAKA e colaboradores, em 1979, que observaram que as células precursoras de mastócitos migram através do sangue e vão proliferar nos tecidos onde amadurecem. Em experimentos *in vitro*, células morfológicamente semelhantes a mastócitos se desenvolvem, em cultivo com meio semi-sólido, a partir de progenitores multipotentes de murinos. Destes experimentos conclui-se que a célula fonte hematopoiética derivada da medula óssea tem a capacidade de originar células hematopoiéticas e mastócitos, estes após circularem pela corrente sanguínea e se alojarem nos tecidos (KITAMURA et al., 1981).

Após o cultivo de células do sangue humano (DENBURG et al., 1983) e do sangue de ratos (ZUCKER - FRANKLIN et al., 1981), foram identificadas células, possivelmente precursoras de mastócitos, por possuírem histamina nos grânulos e apresentarem características de mastócitos detectadas por métodos histoquímicos e ultraestruturais. Os experimentos por parabiose mostram que o repovoamento de mastócitos em tecidos é muito lento e o trânsito pela corrente sanguínea muito rápido, sugerindo uma desprezível concentração de células precursoras no sangue periférico (KITAMURA et al., 1979 a). Com a injeção de células mononucleares do sangue periférico, da medula óssea e do baço em camundongos deficientes em mastócitos,

SONODA e colaboradores (1982), puderam identificar, posteriormente, mastócitos granulados nos sítios de injeção. KASUGAI e colaboradores, em 1995, demonstraram que a infecção por *Nippostrongylus brasiliensis* parece induzir a invasão e proliferação de precursores de mastócitos do sangue periférico para o intestino delgado, por observarem uma diminuição no número de células mononucleadas no sangue e consequente aumento no tecido infectado.

Apesar de vários experimentos fortalecerem a idéia de tráfego destas células pela circulação, sua observação *in vivo* ainda não foi possível (HUFF et al., 1995; SMITH & WEIS, 1996), no entanto, dois modelos de migração das células do sangue para os tecidos foram propostos. Um dos modelos sugere que os precursores de mastócitos sejam rapidamente removidos da corrente sanguínea e acumulados em áreas com o microambiente favorável à sobrevivência e diferenciação das células. Este modelo é chamado randômico (VALENT et al., 1991; KITAMURA et al., 1993). O outro modelo, chamado regulável, propõe a expressão sequencial de moléculas de adesão na superfície celular permitindo a evasão das células da corrente sanguínea e consequente ocupação dos tecidos, seguindo interações específicas de receptores - ligantes (SMITH & WEIS, 1996).

A ausência de mastócitos granulados na circulação sob condições normais tem fortalecido o conceito de que, mastócitos alcançam sua maturidade fenotípica e funcional após estabelecerem um sítio de residência, onde frequentemente são observados em maior proximidade com células da matriz do tecido conjuntivo. Então, um papel essencial no desenvolvimento de mastócitos e consequente maturação tem sido atribuído a fatores do microambiente (VALENT et al., 1991; SWIETER et al., 1993 ).

Células precursoras de mastócitos são seletivas na utilização de citocinas adequadas para sua expansão e diferenciação *in vitro*. Inúmeros estudos têm explorado os efeitos das diversas citocinas sobre a diferenciação e maturação dos mastócitos, e normalmente a maior eficiência tem sido atribuída ao fator de crescimento de mastócitos (*stem cell factor - SCF, steel factor* ou *kit-ligand*) e à interleucina 3 (IL-3) agindo simultaneamente (DURAND et al., 1994; YUAN et al., 1998). Alguns estudos

mostraram que os efeitos do SCF e IL-3 são específicos em células derivadas da medula óssea quando comparados a células derivadas do sangue periférico em termos de potencial de promoção de crescimento destas células (ROTTEM et al., 1994 a). Há possibilidade ainda de algum fator de diferenciação estar associado à membrana plasmática de fibroblastos (MITSUI et al., 1993).

O SCF é a principal citocina indutora de diferenciação de mastócitos, sendo produzido por células endoteliais e outras células do estroma, como os fibroblastos. Este fator pode ser encontrado na sua forma solúvel ou ligado a membrana das células que o produzem, atuando como orientador na migração e distribuição de precursores de mastócitos, e como fator de diferenciação no mesmo sítio de ligação (VALENT, 1994). O SCF é produzido como uma proteína transmembrana com 3 subunidades unidas. A maior subunidade possui 189 aminoácidos e é de domínio extracelular. A subunidade composta de 21 aminoácidos tem domínio transmembrana, sendo a de 36 aminoácidos, intracitoplasmática. A clivagem de aproximadamente 163 aminoácidos extracelulares forma dímeros ativos que, além de proporcionar o desenvolvimento de mastócitos, atuam na hemocitopoese, sobrevivência e proliferação de células germinativas e desenvolvimento de melanócitos, sem a necessidade de contato celular (GALLI, 1993). No entanto, de acordo com RENNICK e colaboradores, em 1995, o SCF não é capaz de estimular o crescimento de progênies de mastócitos na ausência de células acessórias como fibroblastos e células T. Todos os subtipos de mastócitos em todos os órgãos expressam o receptor de superfície para SCF, o receptor tirosina-quinase, c-kit (CD117) (KITAMURA et al., 1993). A expressão do c-kit aumenta durante a maturação de mastócitos e, em mastócitos maduros a ligação de SCF a este receptor, induz a secreção de mediadores multifuncionais (VALENT et al., 1994).

A IL-3 é uma glicoproteína que promove o aparecimento, proliferação e diferenciação de células progenitoras de várias linhagens da medula óssea, que inclui eritrócitos, linfócitos, monócitos, granulócitos e mastócitos (SCHRADER, 1986; IHLE & WEINSTEIN, 1986; TAKAUE et al., 1990). A IL-3 sozinha não é capaz de desencadear o desenvolvimento de mastócitos de mucosa de murinos, mas a sua presença é

essencial na atuação conjunta com outros fatores em cultivos de células. Esta glicoproteína é produzida por células T ou pelo próprio mastócito, através da sua ativação mediada pelo FC $\epsilon$ RI e desempenha um papel importante na inflamação, atuando no recrutamento de neutrófilos, macrófagos e eosinófilos (WODNAR - FILIPOWICS et al., 1989; BURD et al., 1991).

A ativação de mastócitos mediada pelo receptor de alta afinidade para IgE, além de produzir IL3, produz GM-CSF (*granulocyte-macrophage colony stimulating factor*) que também tem papel na hematopoiese. O GM-CSF, porém, não estimula a proliferação em mastócitos derivados da medula óssea ou sangue periférico (ROTTEM et al., 1994 a).

Mastócitos podem sintetizar e liberar citocinas que são chaves regulatórias, como IL- 4, IL- 5, IL- 6, IL- 8 e TNF - $\alpha$  (*tumor necrosis factor -  $\alpha$* ), e podem eliminar bactérias Gram-negativas pela liberação de TNF- $\alpha$  , induzindo o rápido recrutamento de neutrófilos para o sítio de infecção (ERB et al., 1996). Os mastócitos humanos e de camundongos podem também produzir e secretar VPF (*vascular permeability factor*) e VEGF ( *vascular endothelial cell growth factor*) que contribuem para o aumento da permeabilidade vascular e angiogênese nos processos dependentes de FC $\epsilon$ RI (BOESIGER et al., 1998). A liberação de citocinas como IL- 3 e IL- 4, mediadas pelo FC $\epsilon$ RI, também pode servir como um sistema parácrino ou autócrino na proliferação e diferenciação de mastócitos (GALLI, 1990).

Os mastócitos podem aderir à matriz extracelular espontaneamente pela vitronectina, pela laminina e fibronectina, pela ativação ou agregação do FC $\epsilon$ RI. Esta adesão provavelmente é mediada por integrinas, já que pode ser bloqueada por peptídeos contendo a sequência RGD (arginina, glicina e ácido aspártico). A expressão das integrinas é regulada por IL-3 e SCF durante a diferenciação de mastócitos. Além da adesão a fibroblastos e a matriz extracelular, os mastócitos podem interagir com células endoteliais sob condições patológicas, após o rompimento da membrana plasmática (METCALF et al., 1997).

Alguns autores sugerem que as células precursoras de mastócitos possam apresentar a morfologia de uma célula linfóide (NAKAHATA et al., 1986; KANAKURA et al., 1988; VALENT et al., 1991; CHEN & ENERBACK, 1994), e a separação de células positivas para FC $\epsilon$ RI em culturas de medula óssea murina usando FACS, confirmou que pelo menos 50% das células com 1 semana de cultivo não apresentavam características de mastócitos, mas consistiam de células mononucleares contendo poucos ou nenhum grânulo (THOMPSON et al., 1990). O comprometimento com a linhagem de mastócitos e a expressão de proteases associadas a mastócitos podem anteceder a migração para os tecidos (RODEWALD et al., 1996), assim como a expressão de FC $\epsilon$ RI pode anteceder a formação de grânulos citoplasmáticos (ROTTEM et al., 1994 b). Neste caso, aspectos morfológicos não são eficientes para a identificação de células comprometidas com a linhagem de mastócitos. Foram desenvolvidos então, anticorpos para possibilitar a identificação de células imaturas comprometidas com a linhagem de mastócitos em meio a outras células presentes nos tecidos estudados. LERNER et al., 1991, mostraram que anticorpos monoclonais que se ligam à superfície de mastócitos humanos morfológicamente identificáveis reconhecem o receptor de SCF. Entretanto, outras células nos primeiros estágios de diferenciação também respondem a este fator de crescimento e, apenas durante a maturação e diferenciação, as outras células de origem hematopoiética diminuem a produção de c-kit e passam a depender de outros fatores de crescimento linhagem-específicos. O receptor de alta afinidade para IgE também poderia funcionar como marcador, mas há uma pequena população de células progenitoras com alto poder proliferativo que ainda não expressam FC $\epsilon$ RI. KINZER et al., 1995, descreveram um anticorpo monoclonal específico (K-1) anti uma proteína de membrana com 161 KD expressa em mastócitos, porém esta mesma molécula foi encontrada na superfície de alguns macrófagos e de outras células hematopoiéticas.

As células hematopoiéticas são derivadas de células que apresentam CD34 em sua superfície. AGIS et al., 1993, utilizando células do cordão umbilical, mostraram que a depleção de células mononucleadas positivas para CD34 resultou em uma perda de mastócitos no cultivo. No entanto, a depleção de células positivas para

CD14 (presente na linhagem monocítica) e CD17 (presente na linhagem basofílica) não alteraram a diferenciação das células em mastócitos. Em cultivo de células derivadas do sangue periférico humano, células positivas para CD34 e CD117, e negativas para FCεRI, também se diferenciaram em mastócitos (ROTTEM et al., 1994 b). Estes dados sugerem que o progenitor circulante de mastócitos é uma célula positiva para CD34 e CD117, e negativa para CD14 e CD17, formando uma única linhagem celular comprometida a se diferenciar em mastócitos dentro do sistema hematopoiético (BEGHINI et al., 1998). As células positivas para CD34 reconhecem células endoteliais por expressarem integrinas, comprovando a possibilidade de migração deste tipo celular para os tecidos (VALENT, 1994). ORFAO e colaboradores, 1996, mostraram que mastócitos derivados da medula óssea de humanos expressam CD117, CD33 e possuem alta reatividade para o anticorpo anti - IgE, mas foram negativas para CD34.

Estudos sobre os processos de proliferação e maturação de mastócitos foram realizados durante o repovoamento da cavidade peritoneal, utilizando modelos experimentais baseados na depleção dos mastócitos peritoneais de rato. A injeção intraperitoneal de água destilada causa a lise e desaparecimento dos mastócitos, tanto da cavidade peritoneal quanto do mesentério (FAWCETT, 1955). Deste modo, é possível acompanhar o repovoamento da cavidade peritoneal por células imaturas, provavelmente provenientes da circulação, e sua conseqüente maturação (MENDONÇA et al., 1986; GRECA, 1991; MORENO et al., 1997). Este modelo nos permitiu investigar o possível tráfego de mastócitos através da circulação, uma vez que durante o repovoamento deve existir um recrutamento de células precursoras as quais podem ser encontradas no sangue circulante.

A maioria dos estudos acima descritos mostram que a falta de marcadores específicos da linhagem de mastócitos impossibilita a identificação de mastócitos imaturos e seus precursores *in vivo*. Anticorpos monoclonais específicos contra antígenos de superfície de mastócitos foram utilizados para identificar os mastócitos imaturos encontrados na cavidade peritoneal (FARACO et al., 1997). O anticorpo mais utilizado foi o mAb AA4, que reconhece os gangliosídeos do tipo GD1b

na membrana plasmática de células da linhagem de leucemia basofílica de rato (RBL-2H3) e em mastócitos dos tecidos (GUO et al., 1989). Estes gangliosídeos são encontrados somente em mastócitos e em uma pequena população de células da medula óssea (OLIVER et al., 1992). Outro anticorpo monoclonal utilizado foi o mAb BGD6 que se liga a proteínas específicas da membrana de mastócitos (HAMAWY et al., 1992).

Com mAb AA4 conjugado a esferas magnéticas Dynabeads - 450 tosylativadas foi possível isolar mastócitos peritoneais de rato e também derivados da medula óssea (JAMUR et al., 1997 a).

A identificação e a caracterização da linhagem de mastócitos presentes na medula óssea, desde a célula precursora à madura, bem como de precursores de mastócitos na corrente sanguínea foram demonstrados no presente estudo utilizando anticorpos específicos. Estes anticorpos conjugados a esferas magnéticas possibilitaram também o isolamento de populações puras de mastócitos, derivados da medula óssea e presentes no sangue periférico.

### **III.MATERIAL E MÉTODOS**

### **III.MATERIAL E MÉTODOS**

#### **1. OBTENÇÃO DAS CÉLULAS**

Foram utilizados ratos Wistar, de ambos os sexos, pesando em média 250 gramas e camundongos Balbc de ambos os sexos, com 10 a 12 semanas de idade. Estes animais foram fornecidos pelo biotério do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná e pelo Centro de Bioterismo da UNICAMP, respectivamente.

Foram colhidos a medula óssea do fêmur de ratos e camundongos Balbc e o sangue periférico de ratos. Com o objetivo de estimular a migração de células precursoras da medula óssea para sítios periféricos, os ratos receberam intraperitonealmente a injeção de 20 ml de água destilada. Os animais controles não foram injetados ou receberam injeção intraperitoneal de 20 ml de solução salina. A medula óssea foi colhida do canal medular do fêmur com auxílio de uma injeção de salina tamponada com fosfato (PBS) contendo 2% de soro albumina bovina (BSA), 1000/ml unidades de DNase e 1000/ml unidades de heparina. As células da medula óssea foram dissociadas por sucessivas aspirações com pipeta Pasteur e passadas através de filtros Nytex 25 $\mu$ m. Foram então lavadas em PBS contendo 2% de BSA, aproximadamente 5 centrifugações de 5 minutos, a 1000 rpm. O sedimento de células foi ressuspenso em 2 ml de PBS + BSA a 2%. Aproximadamente 8 ml de sangue, por rato, foi colhido através de punção cardíaca com seringa previamente heparinizada para evitar a coagulação sanguínea. Para obtenção de uma suspensão homogênea de células, o sangue foi diluído em PBS contendo 2% de BSA na proporção de 1:5. O sangue e a medula óssea dos ratos foram retirados 12, 24 e 48 horas, após a depleção da cavidade peritoneal pela injeção intraperitoneal de água destilada.

## 2. ANTICORPOS:

O mAb AA4 reconhece o gangliosídeo GD1b específico da superfície de mastócitos (GUO et al., 1989), o mAb BGD6 possui reatividade para proteínas específicas da superfície celular de mastócitos (HAMAWY et al., 1992) e o mAb BC4 reconhece a subunidade  $\alpha$  do receptor de IgE (BASCIANO et al., 1986). Os anticorpos foram purificados do fluido ascítico pela precipitação com sulfato de amônia e a seguir por cromatografia de troca iônica em coluna de DE-52 (mAb BGD6, mAb BC4 e mAb AA4). Os anticorpos mAb BC4 e mAb AA4 usados são IgG $\gamma_1$ , e o mAb BGD6 é uma IgG $\gamma_2b$ . Também foram utilizados o mAb anti - IgE (Biosource International, Camarillo, CA), para identificar a IgE ligada ao receptor, o anticorpo policlonal, anti - c-kit (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) e o mAb anti - CD34 (PharMyngen, San Diego, CA).

## 3. CONJUGAÇÃO DE ANTICORPOS A ESFERAS MAGNÉTICAS

Os anticorpos mAb AA4 e mAb BGD6 foram conjugados a esferas magnéticas tosyl ativadas (JAMUR et al. 1997 a).

As esferas magnéticas (Dynabeads M 450 Tosylactivated, Dynal, Lake Success, NY), foram misturadas até formar uma suspensão uniforme. A seguir, o anticorpo mAb AA4, na concentração de 300  $\mu\text{g/ml}$ , foi dissolvido em solução tampão de borato a 0,05M, pH 9,5. Foi então adicionado a esta solução um volume igual de esferas magnéticas. As esferas magnéticas foram incubadas por 24 horas à temperatura ambiente no rotor com velocidade lenta e constante. Após a incubação procederam-se as lavagens com PBS contendo BSA a 0,1%, através de separação magnética utilizando o Concentrador de Partículas Magnéticas (CPM). A suspensão de esferas magnéticas com o anticorpo mAb AA4 foi lavada 3 vezes por 10 minutos, lavada por mais 30 minutos no rotor à temperatura ambiente e lavada por 24 horas a 4°C com 0,1% de BSA em PBS. As esferas magnéticas conjugadas com o mAb AA4 foram ressuspensas na concentração  $4 \times 10^8$  /ml (30 mg/ml) e armazenadas a 4°C em PBS com 0,1% de BSA.

Foram também utilizadas esferas magnéticas para a conjugação do mAb BGD6 na concentração de 200 µg/ml. Após 10 minutos de incubação a 37°C foi adicionado 0,5 % de BSA para auxiliar na orientação dos anticorpos, durante o acoplamento realizado por 24 horas, a 37°C. A seguir, a suspensão de esferas com o anticorpo mAb BGD6 foi lavada em PBS + BSA 0,1% por 5 minutos a 4°C. O tampão Tris 0,2 M + 0,1% de BSA , pH 8,5, foi utilizado para lavagem de 4 horas a 37°C para bloquear os radicais tosil livres. As esferas magnéticas conjugadas ao mAb BGD6 foram novamente lavadas por 5 minutos em PBS + BSA 0,1% a 4°C, ressuspensas em PBS com 0,1% de BSA e estocadas a 4°C, a uma concentração final de  $4 \times 10^8$  esferas por ml (30 mg/ml).

#### **4. SEPARAÇÃO IMUNOMAGNÉTICA:**

As células da medula óssea e as células do sangue foram incubadas com esferas magnéticas na proporção de 3 esferas para cada célula, durante 7 a 12 minutos, à temperatura ambiente, em rotor com velocidade lenta e constante.

Após a incubação, as células foram lavadas em PBS + BSA a 2% e 5 vezes em PBS com o auxílio do CPM. A população de células positivas, ligadas as esferas magnéticas conjugadas com os anticorpos específicos mAb AA4 e mAb BGD6, foi isolada da população de células negativas através do CPM. As células negativas foram estocadas e posteriormente analisadas e contadas, servindo como controle.

Em alguns experimentos as células negativas obtidas após o isolamento com o mAb AA4 foram submetidas a um isolamento sequencial com o mAb BGD6.

#### **5. QUANTIFICAÇÃO:**

Alíquotas contendo células da medula óssea foram coradas com solução aquosa de azul de toluidina a 0,1%, contendo 1% de ácido acético, pH 2,8. Algumas alíquotas foram submetidas a imunoperoxidase utilizando os anticorpos monoclonais AA4 e anti IgE. As células do sangue foram coradas com May-Grünwald 0,25% em metanol (Sigma, St. Louis, MO). Tanto as células da medula óssea como as do sangue foram

quantificadas em câmara de Neubauer antes e após a separação imunomagnética. O número obtido na contagem inicial das populações totais de células, da medula óssea e do sangue, determinou a concentração de esferas imunomagnéticas utilizadas para o isolamento das células. Após o isolamento por esferas magnéticas conjugadas ao mAb AA4, as células da medula óssea positivas e negativas para este anticorpo foram quantificadas. As células negativas provenientes do isolamento pelo mAb AA4 foram submetidas a separação imunomagnética pelo mAb BGD6 conjugado a esferas magnéticas, e as células positivas e negativas resultantes desta separação também foram quantificadas.

## **6. MORFOMETRIA:**

O volume celular foi calculado a partir de medidas do diâmetro de células isoladas por esferas magnéticas conjugadas ao mAb AA4. Um total de 150 células foram medidas com um mínimo de 25 células para cada estágio de maturação. As medidas foram realizadas em células fotografadas em microscopia de campo claro, coradas com azul de toluidina e comparadas com medidas de eletromicrografias de células que foram positivas após imunomarcção. Devido ao potencial erro de medidas de seções ultrafinas de células, todos os dados aqui apresentados são de células medidas em campo claro.

## **7. IMUNOFLUORESCÊNCIA:**

As células foram aderidas em lamínulas cobertas com CELL TAK (Becton Dickinson Labware, Collaborative Biomedical Products, Bedford, MA) e então fixadas em paraformaldeído 2% (Ladd Research Industries, Burlington, VT) em metanol a -20°C por 5 minutos. A seguir as células foram lavadas 2 vezes em PBS, 1 vez em PBS contendo 0,1M de glicina, 2 vezes em PBS e incubadas por 1 hora com o mAb AA4 (2,5 µg/ml), com o mAb BGD6 (10 µg/ml), com o mAb BC4 (0,5 µg/ml), com mAb anti IgE (5 µg/ml), com o policlonal anti c-kit (10 µg/ml) e com mAb anti CD34 (5 µg/ml) em PBS + 1% de BSA. Posteriormente, as células foram lavadas em PBS contendo 1% de BSA e

lavadas por 30 minutos em PBS. Foram utilizados como anticorpos secundários fragmentos Fab'<sub>2</sub> de IgG de jumento anti- camundongo e anti- coelho conjugado com fluoresceína (FITC) ou com Texas Red (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA), diluídos em PBS na concentração de 1:50 (25 µg/ml). Após 30 minutos de incubação com o anticorpo secundário, as células foram lavadas 5 vezes com PBS, lavadas em água bidestilada e montadas em Fluormount (EM Science, Fort Washington, PA).

O material foi observado e fotografado em microscópio de fluorescência Microphot-FX NIKON e microscópio de varredura confocal LEICA.

## **8. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO:**

### **8.1. FIXAÇÃO DE ROTINA:**

Após a separação imunomagnética, as células do sangue foram imersas em 2% de glutaraldeído, 2% de paraformaldeído (Ladd Research Industries, Burlington, VT) e 0,05% de CaCl<sub>2</sub> em tampão cacodilato por 1 hora à temperatura ambiente. As células foram lavadas em PBS e processadas para microscopia eletrônica de rotina.

### **8.2. 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 contendo as células foi imerso em 5 ml da solução fixadora composta de 0,05% de glutaraldeído, 2% de paraformaldeído, 0,025% de CaCl<sub>2</sub>, em 0,1M de tampão cacodilato, pH7,4, em placa de Petri de 3,5 mm de diâmetro. As células foram então submetidas a radiação por 5 a 8 segundos. O tempo de fixação foi previamente determinado pela calibragem do microondas (JAMUR et al., 1995). Imediatamente após a fixação, foi adicionado PBS a suspensão de células. A seguir, as células foram lavadas em PBS, PBS contendo 0,1 M de glicina e novamente em PBS.

## 9. IMUNOPEROXIDASE:

As células da medula óssea total, após isoladas e fixadas, foram incubadas com o mAb BC4 (0,5 µg/ml), anti IgE (5µg/ml) e anti CD34 (5 µg/ml) diluídos em PBS contendo 1% de BSA. Após a incubação com os anticorpos primários as células foram lavadas com PBS + 1% de BSA, PBS por 30 minutos e PBS + 1% de BSA. A seguir, as células foram incubadas com o fragmento Fab'<sub>2</sub> de IgG de jumento conjugado a peroxidase de rábano (HRP) diluído 1:50 em PBS + 1% de BSA, concentração final de 25 mg/ml, por 1 hora a temperatura ambiente. 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 (Polysciences, Inc. Warrington, PA) e 250 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 1%), por 30 minutos a temperatura ambiente. Para a microscopia de campo claro a peroxidase endógena foi bloqueada pela incubação prévia das amostras por 30 minutos em 3% de peróxido de hidrogênio em metanol, a temperatura ambiente.

## 10. PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS:

As células foram incluídas em ágar a 1,5 % para facilitar as etapas seguintes do processamento. A seguir, foram pós-fixadas em tetróxido de ósmio (OsO<sub>4</sub>) (EM Sciences) a 2% por 1 hora a temperatura ambiente, desidratadas em série crescente de etanol e incluídas em EMBED 812 (EM Sciences). Os cortes finos foram obtidos com navalha de diamante e contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo (REYNOLDS, 1963) por 10 minutos cada e, então, observados em microscópio eletrônico de transmissão.

## 11. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA:

As células após isoladas foram aderidas em lamínulas cobertas com CELL TAK e a seguir, fixadas em 2 % de glutaraldeído, 2% de paraformaldeído (Ladd) e 0,05% de cloreto de cálcio, por 4 horas a temperatura ambiente e lavadas 3 vezes em tampão cacodilato 0,1M. Após a fixação as células foram imersas em tetróxido de ósmio

a 1% por aproximadamente 2 horas, lavadas em tampão cacodilato 0,1M por 15 minutos, 5 vezes. As células foram tratadas com tiocarbazida a 1% em água bidestilada por 10 minutos, lavadas por 15 minutos, 5 vezes, em água bidestilada e novamente, impregnadas por solução de ósmio a 1% aquoso por 30 minutos. Estas etapas que precederam a desidratação foram repetidas 2 vezes para garantir a condutividade do material. As células foram então lavadas em água destilada, desidratadas em série crescente de etanol e foram dissecadas pelo ponto crítico utilizando o gás carbônico. As lamínulas foram montadas em suportes com cimento a base de carbono e cobertas com paládio - ouro. As amostras foram observadas e fotografadas em microscópio eletrônico de varredura JEOL-CF.

## 12. CITOMETRIA DE FLUXO:

As células da medula óssea de ratos foram lavadas em PBS + 2% de BSA e incubadas com IgG normal de rato (5  $\mu$ g/ ml) para bloquear sítios inespecíficos. A seguir, as células foram lavadas novamente em PBS + 2% de BSA, incubadas com o mAb AA4 conjugado à fluoresceína (FITC) em PBS + 1% de BSA por 1 hora a temperatura ambiente, lavadas em PBS + 1% de BSA e, lavadas 5 vezes em PBS. A suspensão celular foi analisada no sistema de *Fluorescence Activated Cell Sorter* (FACS) (Becton Dickinson Labware, Bedford, MA) utilizando o programa Lysis II.

## **IV. RESULTADOS**

## **IV. RESULTADOS**

Com a metodologia utilizada foi possível identificar e caracterizar a linhagem de mastócitos derivados da medula óssea e identificar mastócitos bem imaturos no sangue periférico.

### **MEDULA ÓSSEA**

Utilizando a imunomarcação por anticorpos específicos para antígenos de superfície de mastócitos, foi possível identificar os vários estágios de maturação da população de mastócitos na medula óssea de ratos e camundongos.

#### **1. IDENTIFICAÇÃO DA LINHAGEM DE MASTÓCITOS POR MICROSCOPIA DE CAMPO CLARO E FLUORESCÊNCIA:**

Uma pequena população de células foi identificada, na medula óssea, como pertencente à linhagem de mastócitos por apresentar imunofluorescência positiva quando marcada com os anticorpos mAb AA4, mAb BC4, mAb anti-IgE e mAb BGD6 (Fig. 1).

Após identificada, esta população de células foi isolada da medula óssea através da separação imunomagnética utilizando o mAb AA4 e o mAb BGD6 conjugados a esferas magnéticas. Com o isolamento por esferas conjugadas ao mAb AA4, uma população de células de diferentes tamanhos foi separada da medula óssea total (Fig. 2A) . Esta mesma população de células é positiva para o anticorpo anti-c-kit (Fig. 2B). As células isoladas pelo mAb AA4, marcaram positivamente para os anticorpos BC4, anti - IgE, BGD6 e anti - c-Kit (Fig 2B), (Tabela 1). As células isoladas pelo mAb BGD6, apresentaram imuno reação positiva para os anticorpos monoclonais AA4, BC4, anti - c-Kit e anti - IgE (Tabela 1).

Com o isolamento sequencial, onde as células da medula óssea foram primeiramente isoladas pelo mAb AA4 e, posteriormente, a população de células negativas resultante deste isolamento foram isoladas pelo mAb BGD6 (Fig. 3), pode-se obter uma população reduzida de células muito pequenas que foram imunomarcadas pelo mAb anti - CD34 em camundongos (Fig. 4).

A medula óssea foi retirada de alguns animais que foram injetados intraperitonealmente com água destilada. As células da medula óssea destes animais também foram isoladas pelo mAb AA4 e pelo mAb BGD6 e apresentaram imunomarcção positiva para o mAb anti - c-kit (Fig. 5A) e o mAb anti - IgE (Fig. 5B).

## **2. QUANTIFICAÇÃO EM CÂMARA DE NEUBAUER:**

As células isoladas da medula óssea pelo mAb AA4 conjugado a esferas magnéticas correspondem a 2,42 % do total de células da medula óssea, não havendo isolamento preferencial por qualquer dos estágios de diferenciação (Tabela 2). A mesma porcentagem foi encontrada quando as células foram marcadas por imunoperoxidase com o mAb AA4 e com o mAb anti-IgE.

Quando a população negativa de células obtidas após a separação com mAb AA4, foi submetida ao isolamento sequencial com o mAb BGD6, apenas 0,02% do total de células da medula, foi isolado.

As células isoladas 2 dias após a injeção intraperitoneal de água destilada correspondem a 0,63% do total de células da medula óssea e após o isolamento sequencial, 0,33% destas células foram separadas apenas pelo mAb BGD6 (Gráfico).

## **3. CITOMETRIA DE FLUXO:**

As células da medula óssea de ratos marcadas com o mAb AA4 também foram submetidas a citometria de fluxo e o resultado obtido confirmou as contagens anteriores realizadas em Câmara de Neubauer, após isolamento imunomagnético. Com a citometria de fluxo foi observada uma população de células de tamanhos variados, apresentando alta intensidade de fluorescência para o mAb AA4, que corresponde a 2,82 % do total de células da medula óssea (Fig. 6).

#### 4. CARACTERIZAÇÃO ULTRAESTRUTURAL DOS MASTÓCITOS EM MATURAÇÃO:

Foi observado que os anticorpos mAb BC4 e mAb anti-IgE marcaram uniformemente a membrana plasmática dos mastócitos bem imaturos, imaturos e maduros derivados da medula óssea (Figs. 7). As células incubadas na ausência de anticorpo primário, utilizadas como controle, não apresentaram imunomarcagem na membrana (Fig. 11). Os mastócitos imunomarcados puderam ser classificados em 3 estágios distintos de maturação, com base na sua morfologia e morfometria, em bem imaturos, imaturos e maduros.

**Mastócitos bem imaturos:** possuem um núcleo volumoso que ocupa grande parte da célula e apresentam raros grânulos citoplasmáticos. A quantidade de organelas também é reduzida, exceto pela presença marcante de mitocôndrias na maioria das células observadas. Estas células têm seu diâmetro variando de 3 a 6  $\mu\text{m}$  (Figs. 7A e 7D).

**Mastócitos Imaturos:** têm como característica marcante a presença de grânulos fortemente eletrondensos de tamanhos variados e o aparelho de Golgi bem desenvolvido. Diferentemente das células bem imaturas nas quais o núcleo ocupa a maior parte da célula, nestas células o núcleo se localiza, frequentemente, na periferia da célula, apresentando muitas vezes uma concavidade. O diâmetro das células referentes a este estágio de maturação varia de 6 a 10  $\mu\text{m}$  (Figs. 7B e 7E).

**Mastócitos Maduros:** apresentam o citoplasma repleto de grânulos, poucas organelas citoplasmáticas e o núcleo é frequentemente central e esférico. Os mastócitos completamente diferenciados apresentam o diâmetro variando de 10 a 13  $\mu\text{m}$  (Figs. 7C e 7F).

O mAb BGD6 também marca os mastócitos (Fig.8) nos 3 estágios de maturação identificados pelos anticorpos mAb AA4, BC4 e anti-IgE. Além destas, imunomarcou positivamente a membrana plasmática de uma célula indiferenciada, completamente desprovida de grânulos (Fig. 10B).

As células isoladas através de esferas magnéticas conjugadas ao mAb AA4 e incubadas com o mAb BC4 apresentaram imuno reação positiva na sua superfície, quando observadas ao microscópio eletrônico de transmissão (Figs. 9). Com a técnica de isolamento imunomagnético foi possível confirmar a identidade das células da linhagem de mastócitos, comparando a ultraestrutura das células observadas na medula óssea total com as isoladas e ainda, detectar a presença de mais de um antígeno específico para mastócito na superfície destas células.

As células indiferenciadas que foram obtidas pelo isolamento sequencial com os mAb AA4 e mAb BGD6 conjugados a esferas magnéticas, apresentaram o núcleo volumoso, muitas mitocôndrias, citoplasma completamente desprovido de grânulos e projeções citoplasmáticas curtas. Detalhes da superfície celular foram observados por microscopia eletrônica de varredura, demonstrando que estas projeções são curtas e se distribuem homogeneamente na membrana celular (Fig. 10A). Estas células são negativas para os anticorpos mAb AA4, mAb BC4 e anti-IgE (Fig. 10B), porém imunorreagem positivamente quando marcadas com o anti - CD 34 (Fig. 10C), (Tabela 1).

## 5. ANÁLISE MORFOMÉTRICA:

Os mastócitos derivados da medula óssea apresentam um aumento de diâmetro e de volume que acompanham a maturação celular. Os mastócitos derivados da medula óssea têm seu diâmetro variando de 3 a 13  $\mu\text{m}$ . Medindo-se o diâmetro de células em eletromicrografias, nas quais os estágios de maturação podem ser facilmente determinados, confirmaram-se os dados obtidos por microscopia de campo claro. Estes resultados também demonstraram que a maioria da população de mastócitos residentes da medula óssea é de células imaturas ( 59,5 %), com algumas células maduras ( 29,8 %) e poucas bem imaturas ( 10,7 %) (Tabela 3).

## SANGUE PERIFÉRICO

### 1. IDENTIFICAÇÃO DE PRECURSORES DE MASTÓCITOS:

Em animais que receberam a injeção intraperitoneal de água destilada, as células isoladas pelo mAb BGD6 conjugado a esferas magnéticas apresentaram imunofluorescência positiva para os anticorpos mAb BGD6 (Fig. 12A), mAb anti - IgE (Fig. 12B), mAb AA4 (Fig. 12C), anti - c-kit e mAb BC4 (dados não mostrados). As células isoladas pelo mAb AA4 foram submetidas ainda a dupla marcação pelo mAb BGD6 e pelo anticorpo policlonal anti-c-Kit para confirmar a sua identidade como células precursoras de mastócitos (Figs. 13). No entanto, não foram observadas diferenças no número ou nas características das células observadas 12, 24 e 48 horas após a depleção da cavidade peritoneal.

Nenhum tipo celular foi isolado do sangue de animais controle com a utilização de esferas magnéticas conjugadas aos anticorpos mAb AA4 e mAb BGD6.

Através do isolamento sequencial da população de células do sangue periférico pelo mAb AA4 e, a seguir, pelo mAb BGD6, não foi possível a observação de células aderidas as esferas magnéticas conjugadas com o mAb BGD6 em animais que receberam injeção intraperitoneal de água destilada, ou controles.

As células do sangue de animais tratados com injeção intraperitoneal de água destilada foram isoladas pelos mAb AA4 e mAb BGD6 conjugados a esferas magnéticas, no entanto, não foram isoladas pelo mAb BGD6 no isolamento sequencial.

### 2. QUANTIFICAÇÃO:

Com o isolamento de células do sangue colhidas 12, 24 e 48 horas após a depleção da cavidade peritoneal, por esferas magnéticas conjugadas ao mAb BGD6, foi encontrado menos que uma célula aderida as esferas para cada  $10^6$  células circulantes, independentemente do tempo decorrido após a depleção da cavidade peritoneal.

## **V. FIGURAS**

FIG.01 – Mastócitos em diferentes estágios de maturação, colhidos da medula óssea de ratos, apresentando imunofluorescência positiva para o mAb BGD6 (setas). Barra = 5  $\mu$ m.

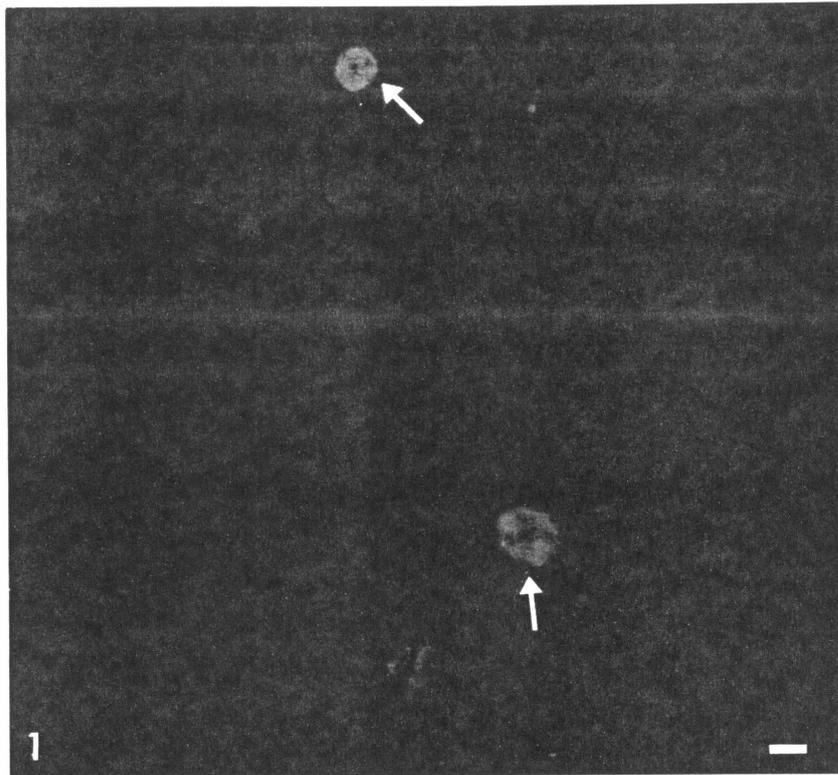


FIG. 02 - Mastócitos derivados da medula óssea isolados pelo mAb AA4 conjugado a esferas magnéticas. Barras = 5  $\mu$ m.

A - Mastócitos em vários estágios de maturação, corados com azul de toluidina a 0,1% (cabeça de seta). Esferas magnéticas (setas).

B - Mastócitos isolados apresentando imunofluorescência positiva para c-kit (cabeça de seta). Esferas magnéticas (setas).

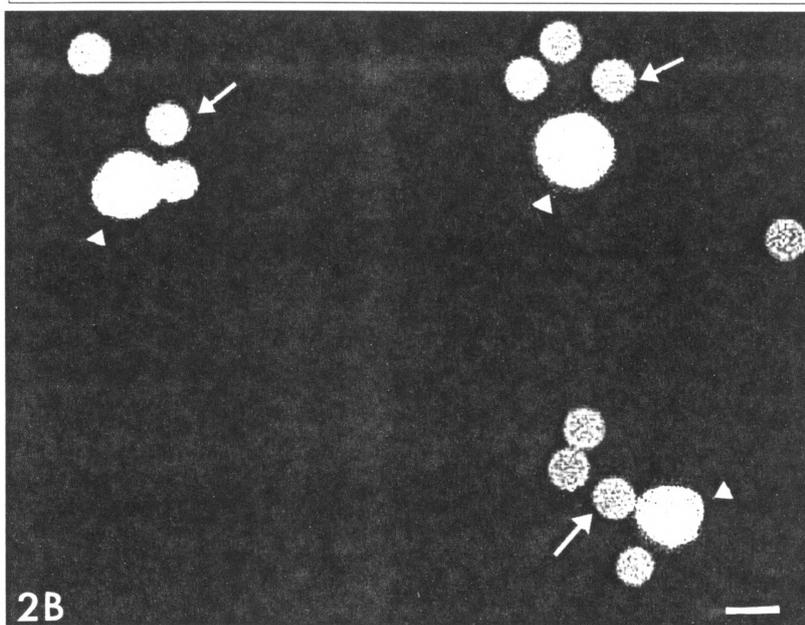
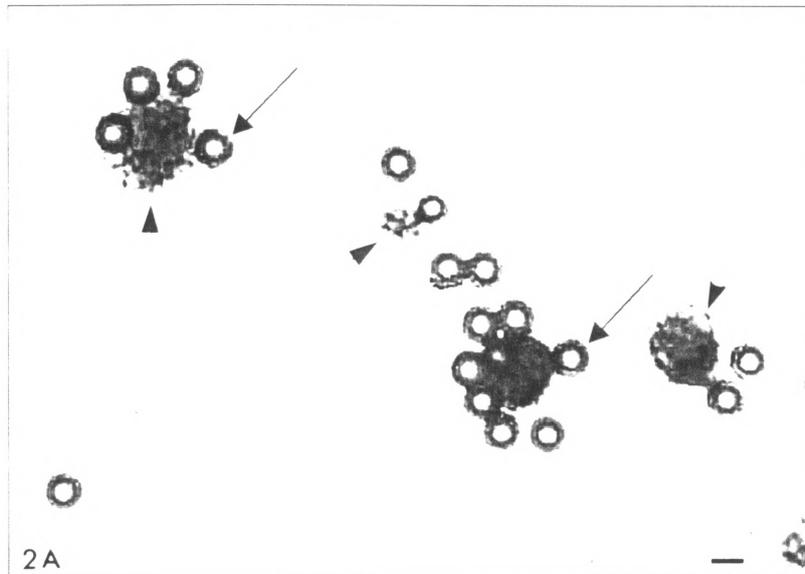


FIG. 03 - O isolamento sequencial utilizando o mAb AA4 e, a seguir, o mAb BGD6 conjugados a esferas magnéticas, permite a identificação de células ainda indiferenciadas, precursor comprometido de mastócitos.

# Isolamento de Mastócitos com Esferas Magnéticas

FIG. 3

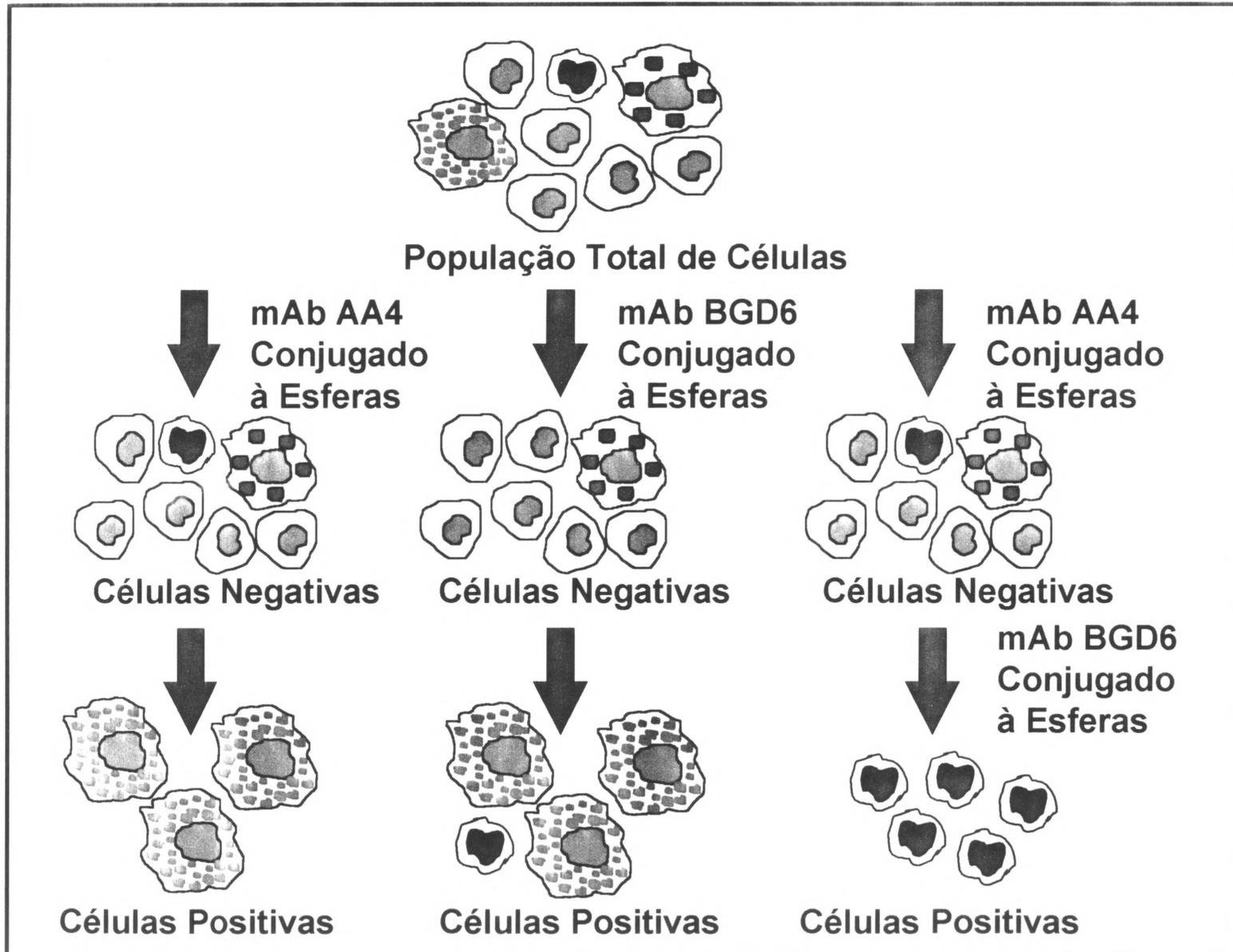


FIG. 04 - Célula indiferenciada, precursor comprometido para mastócito, separado da medula óssea por isolamento sequencial, pelo mAb AA4 seguido do mAb BGD6 conjugados a esferas magnéticas (seta), apresentando imunofluorescência positiva para o mAb anti - CD34 (cabeça de seta). Barra = 5 $\mu$ m.

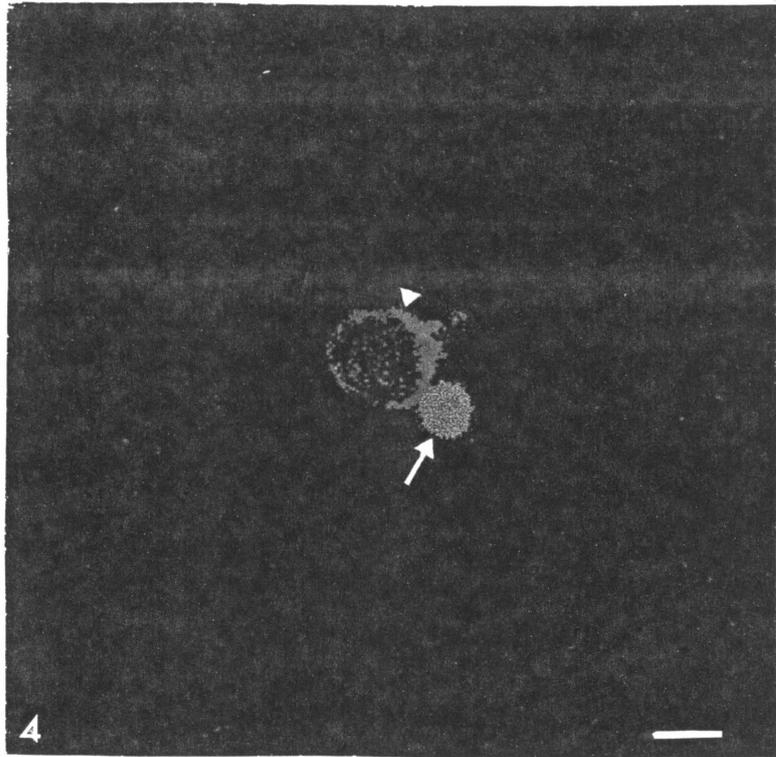


FIG. 05 - Mastócitos isolados da medula óssea de ratos que foram injetados intraperitonealmente com água destilada. Barras = 5  $\mu$ m.

A - Mastócito isolado por esfera magnética conjugada com o mAb AA4 (seta) e imunomarcado com o mAb anti - c-kit (cabeça de seta).

B - Mastócito isolado por esfera magnética conjugada com o mAb BGD6 (seta) e imunomarcado com o mAb anti - IgE (cabeça de seta).

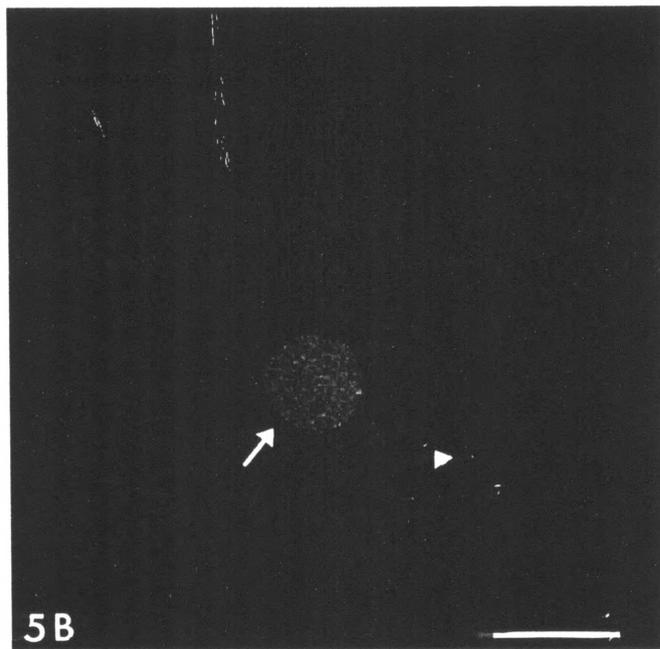
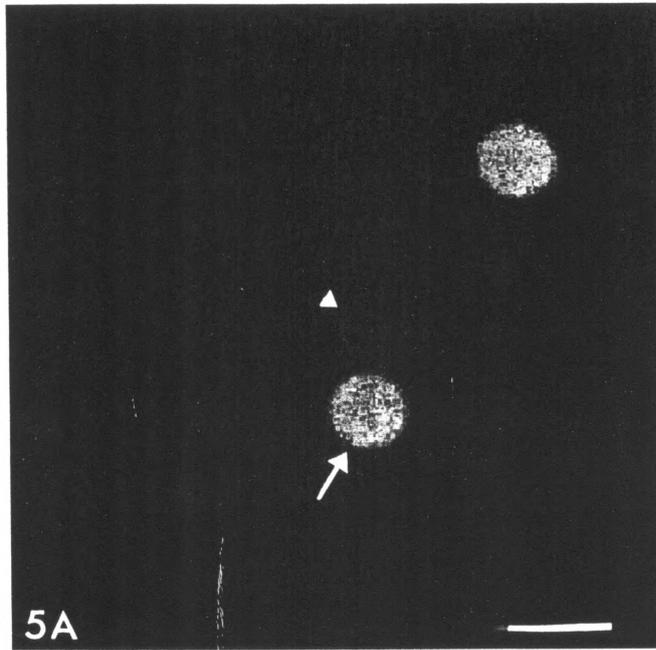
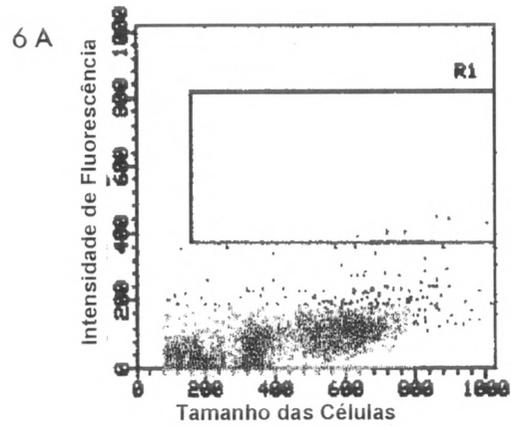


FIG. 06 - Citometria de Fluxo de células da medula óssea.

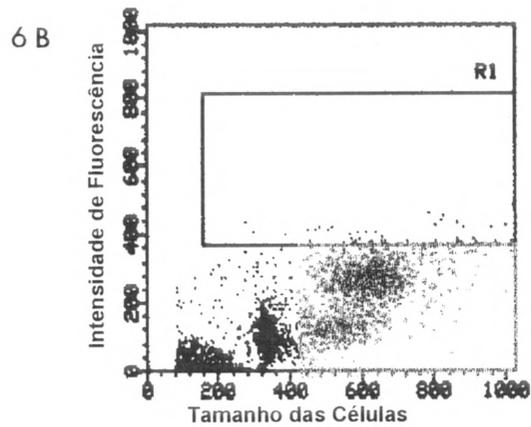
A - Células não marcadas (controle), 0,43 % corresponde a fluorescência de fundo.

B - Células imunomarcadas com mAb AA4. A população de mastócitos é constituída de células de diferentes tamanhos e representam 2,82 % do total de células analisadas.



```

----- Region Stats -----
File: #111/28/0M001 Sample: 001
Date: 8/ 6/98 Time: 18:00:44 Ungated Sample
Selected Preference: Geometric/Channel
Parameters: FSC-H(LIN),FL1-H(LOG)
Total= 10000 Gated= 10000
Rgn  Events % Gated % Total      Xmean      Ymean Px,Py resX, resY
-----
1 R1      43      0.43      0.43      856.42      427.26  1, 3 1024, 1024
  
```



```

----- Region Stats -----
File: #111/28/0M002 Sample: 002
Date: 8/ 6/98 Time: 18:01:38 Ungated Sample
Selected Preference: Geometric/Channel
Parameters: FSC-H(LIN),FL1-H(LOG)
Total= 50000 Gated= 50000
Rgn  Events % Gated % Total      Xmean      Ymean Px,Py resX, resY
-----
1 R1     1625      3.25      3.25      772.48      413.85  1, 3 1024, 1024
  
```

FIG. 07 - Caracterização ultraestrutural de mastócitos derivados da medula óssea. Mastócitos bem imaturos (A e D), imaturos (B e E) e maduros (C e F) apresentando imunorreação positiva na membrana plasmática para os mAb BC4 (A - C) e mAb anti- IgE (D - F) (setas). O Complexo de Golgi (CG) e mitocôndrias (M) são organelas bem evidentes nos mastócitos imaturos. Centríolos (C). Grânulos citoplasmáticos (G). Núcleo (N). Barras = 1  $\mu$ m.

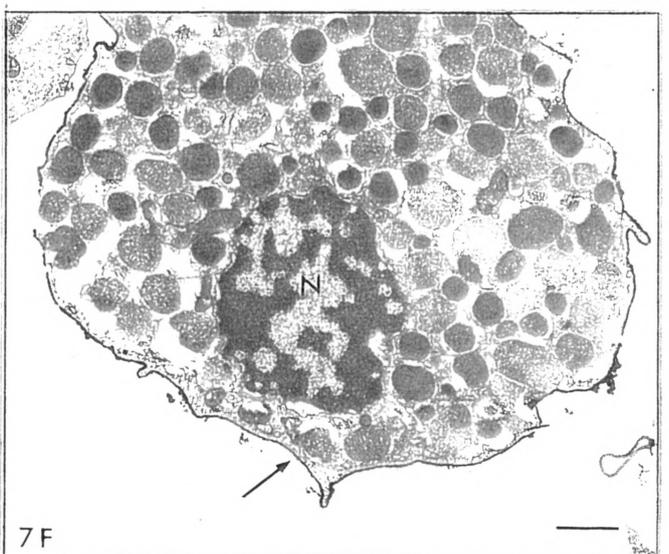
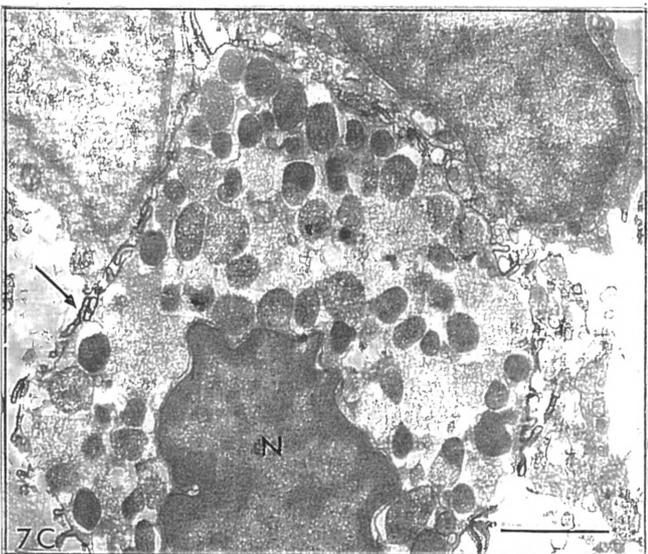
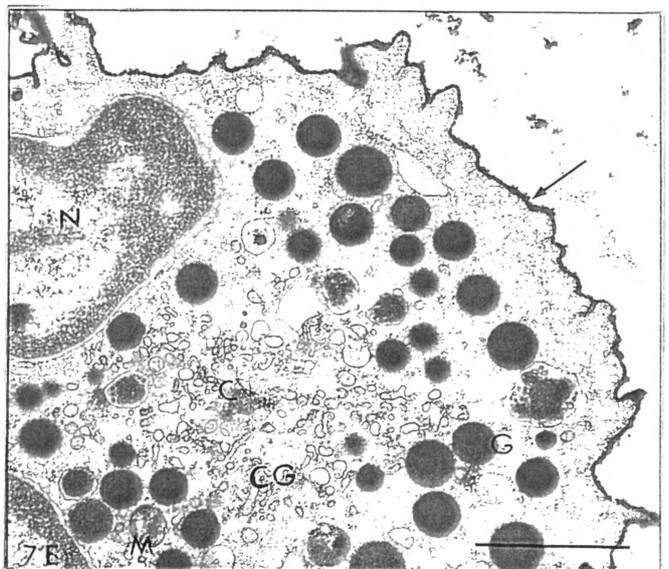
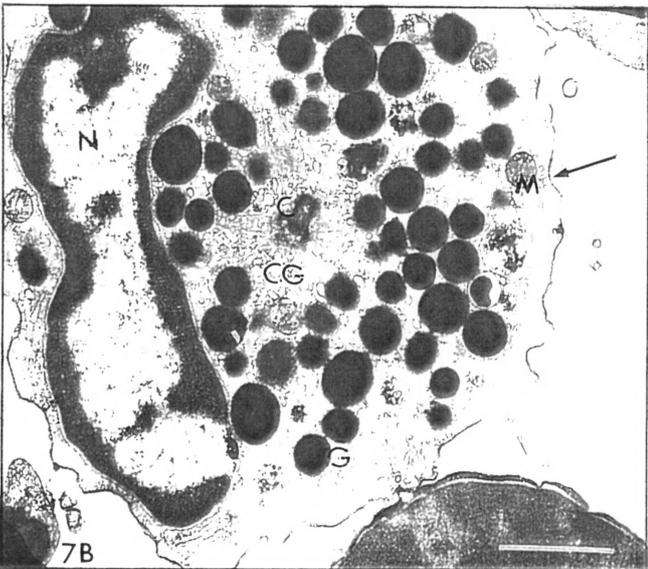
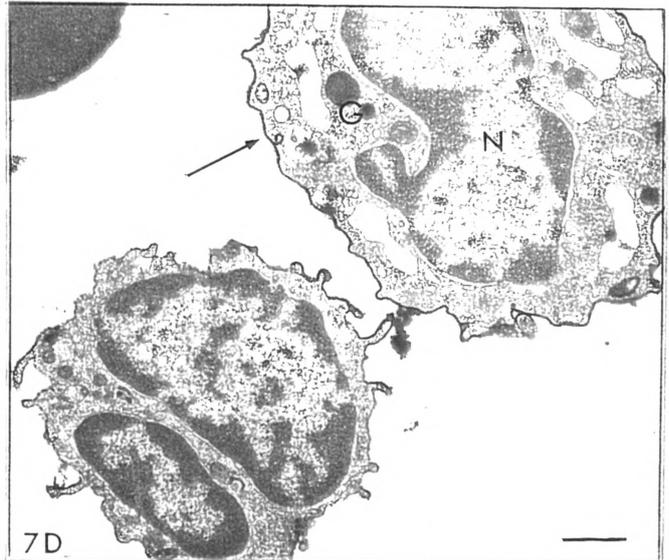
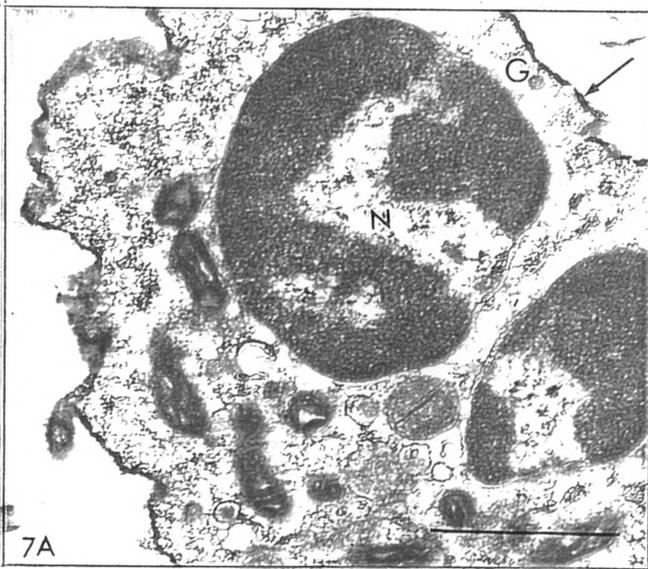


FIG. 08 - Mastócitos imaturo (IM) e bem imaturo (BIM) apresentando imunomarcção de superfície para o mAb BGD6 (setas). Complexo de Golgi (CG). Centríolo (C). Mitocôndria (M). Grânulos citoplasmáticos (G) Núcleo (N). Barra = 1µm.

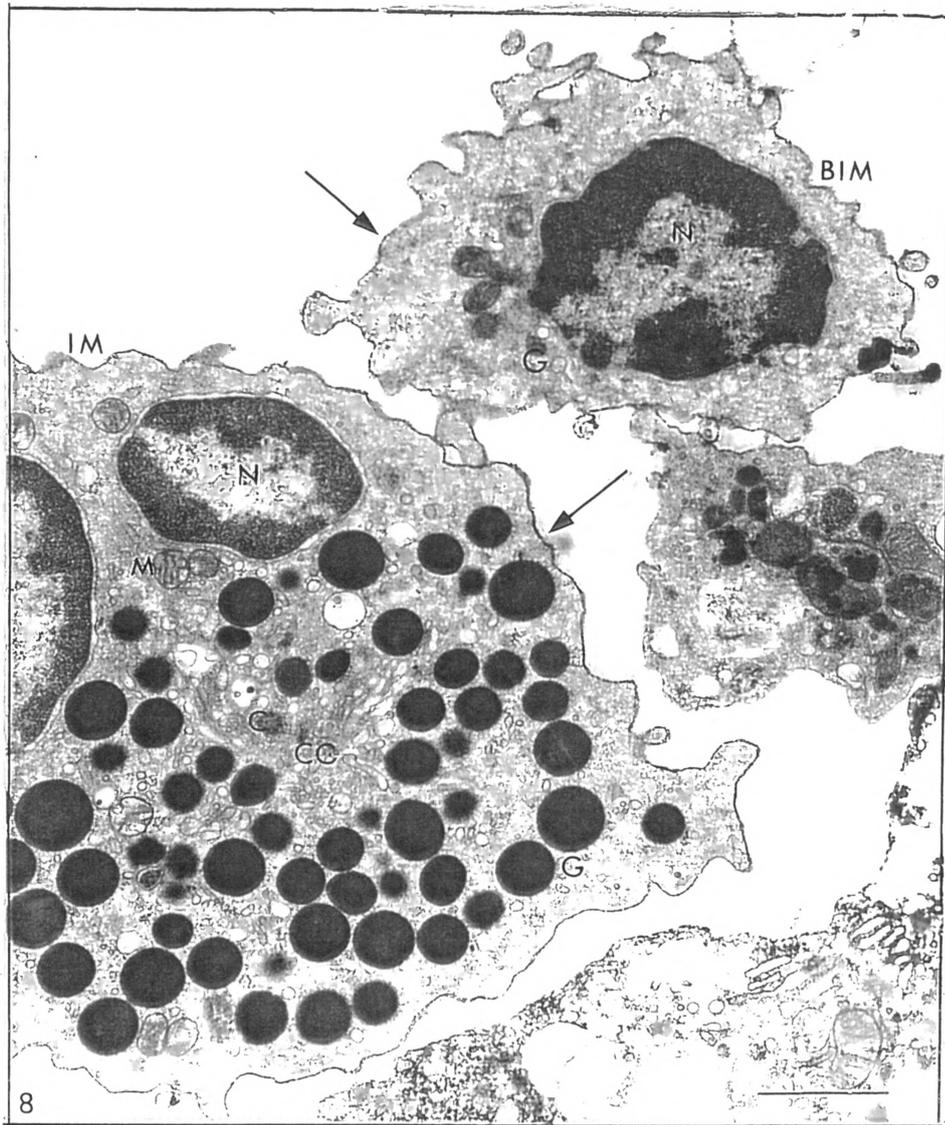


FIG. 09 - Mastócitos em todos os estágios de maturação foram isolados da medula óssea com esferas magnéticas conjugadas ao mAb AA4 (cabeças de seta). (A) Mastócitos maduros são reconhecidos pela morfologia característica, isto é, citoplasma repleto de grânulos (G). (B) Mastócitos imaturos, com poucas organelas e alguns grânulos (G) distribuídos no citoplasma, e bem imaturos (C), com o núcleo (N) ocupando a maior parte do citoplasma, apresentam imunomarcagem positiva de superfície para o mAb BC4 (setas). Barra = 1  $\mu$ m

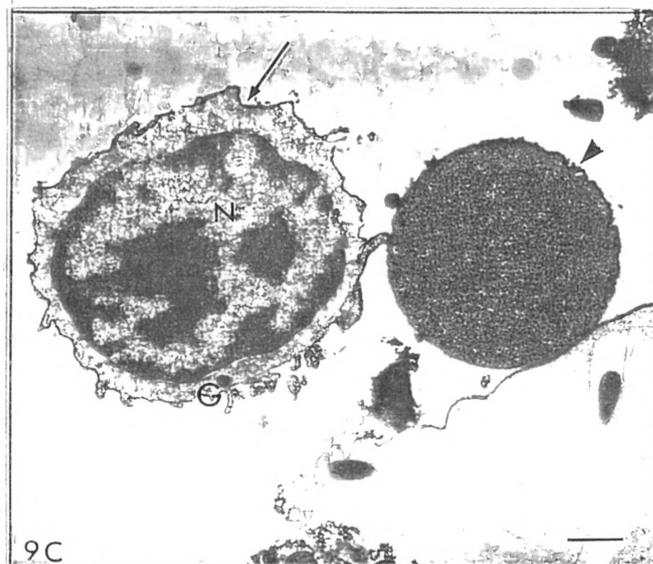
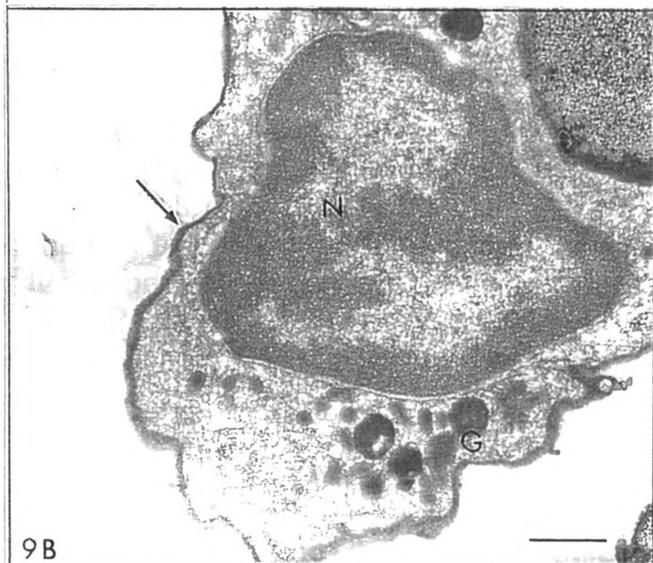
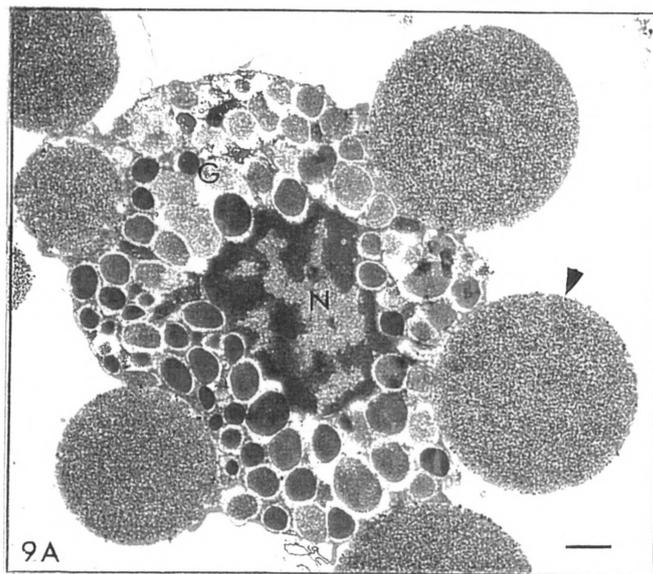


FIG. 10 -Precusores de mastócitos obtidos através do isolamento sequencial com mAb BGD6. Através de microscopia eletrônica de varredura (A) e transmissão (B) pode-se observar os prolongamentos curtos na superfície das células (setas) isoladas pelo mAb BGD6 conjugado a esferas magnéticas (cabeças de seta). (C) Estas células não apresentam grânulos citoplasmáticos, mas possuem muitas mitocôndrias (M), núcleo volumoso e imunorreação de superfície positiva para o mAb anti - CD34 (seta). Barras = 1 $\mu$ m

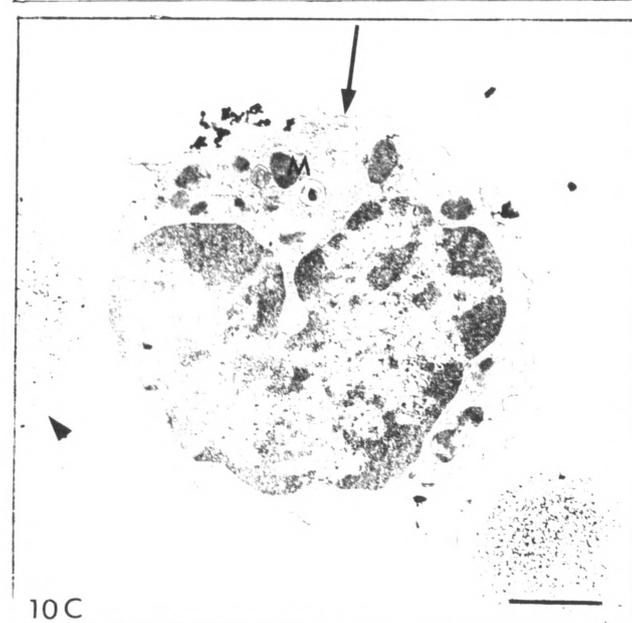
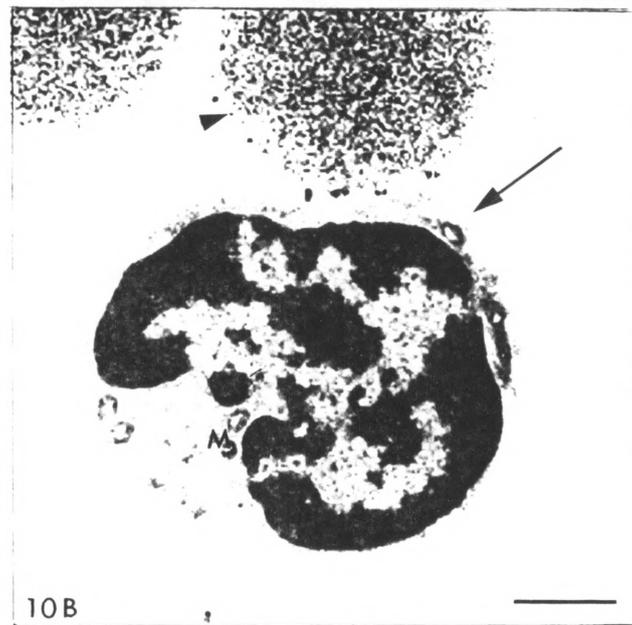
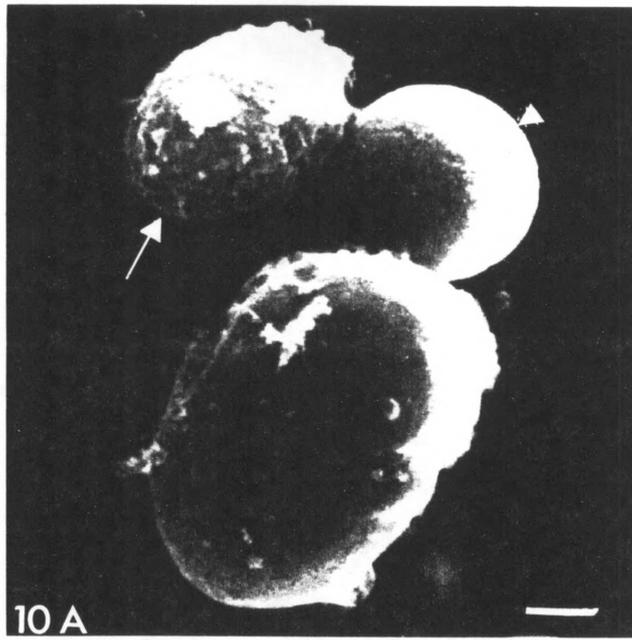


FIG. 11 - Mastócito imaturo incubado na ausência de anticorpo primário. Observar a ausência de marcação na membrana celular. Núcleo (N). Grânulos citoplasmáticos (G). Barra = 1 $\mu$ m

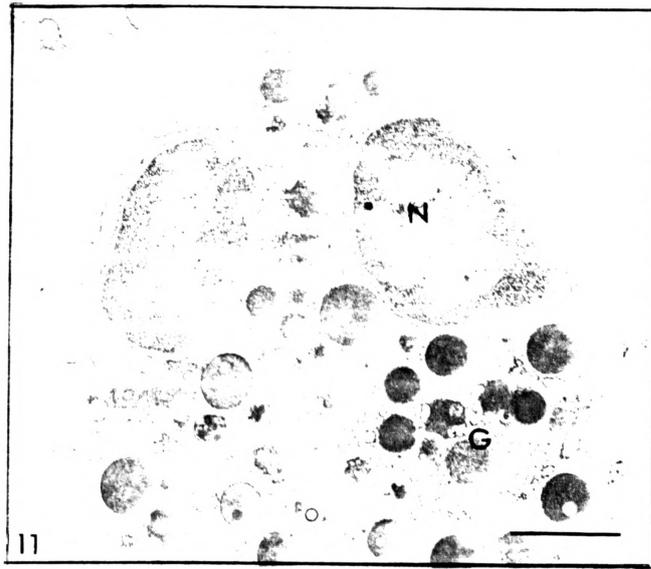


FIG. 12 - Mastócitos colhidos do sangue periférico de ratos 24 horas após a injeção intraperitoneal de água destilada. Os mastócitos foram isolados por esferas magnéticas conjugadas ao mAb BGD6 (setas) e apresentam imunofluorescência positiva na superfície para os mAb BGD6 (A), mAb anti IgE (B) e mAb AA4 (C) (cabeças de setas). Barras = 5  $\mu$ m

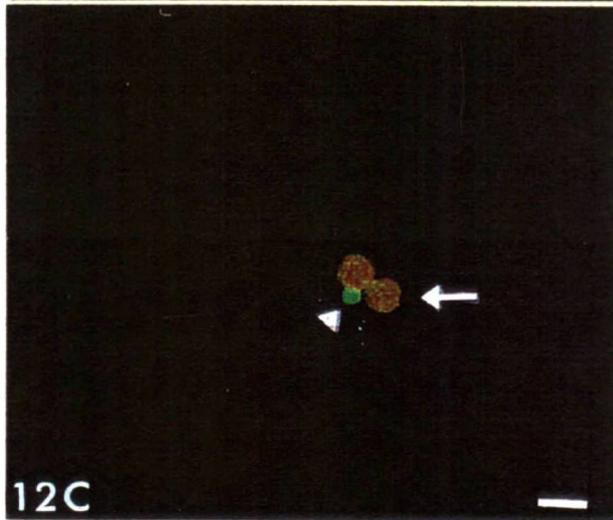
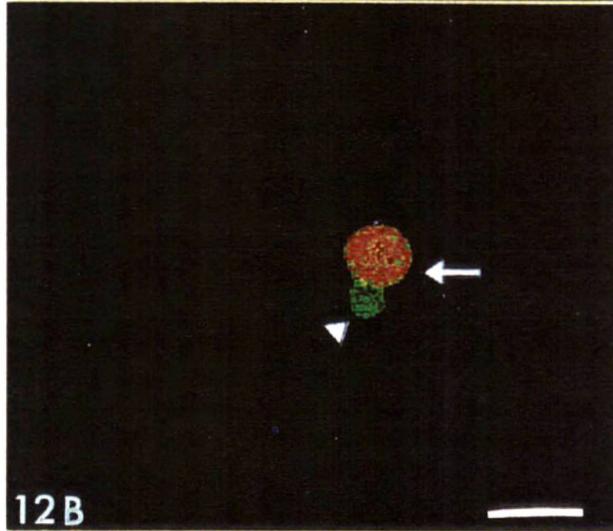
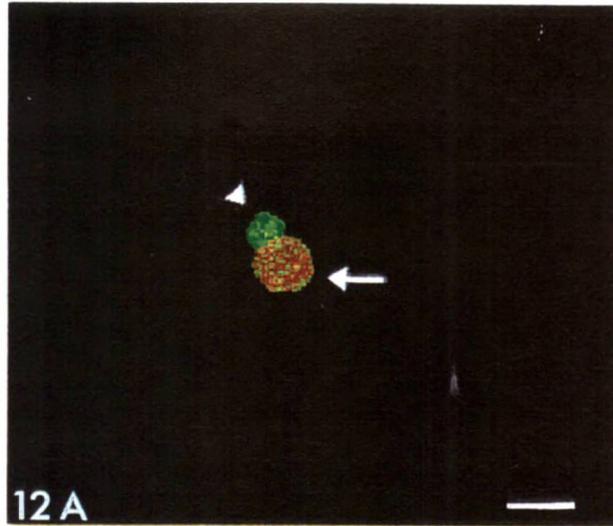
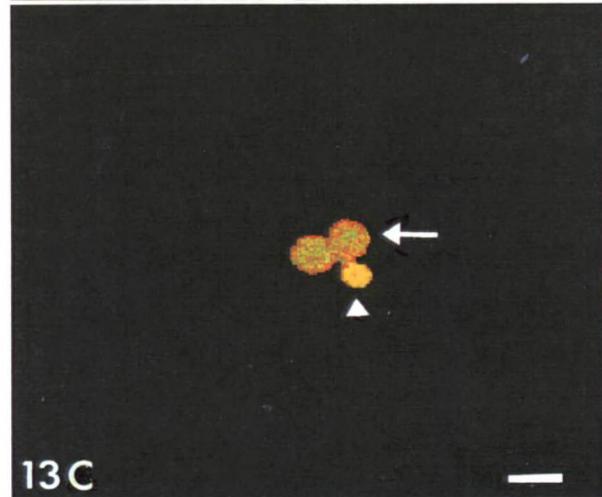
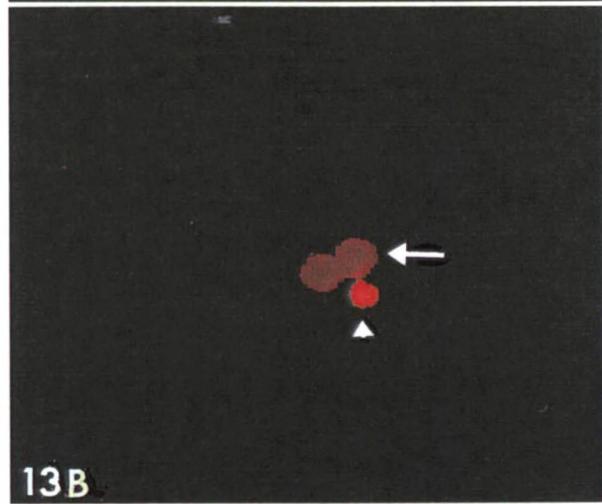
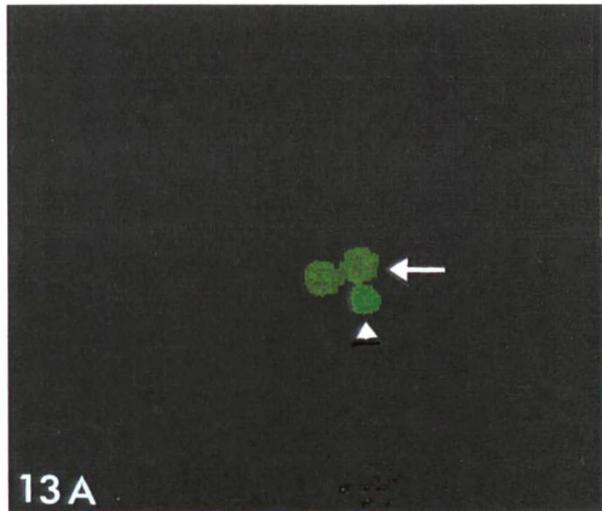


FIG. 13 - Mastócito colhido do sangue periférico de ratos 24 horas após a injeção intraperitoneal de água destilada. Através de análise em microscópio confocal observou-se que mastócitos isolados pelo mAb AA4 conjugado a esferas magnéticas (setas) apresentaram imunomarcação positiva para os mAb anti c-kit (FITC) (A) e mAb BGD6 (Texas Red) (B) (cabeças de setas). Em C observa-se a dupla marcação com anti- c-kit e mAb BGD6 distribuídos na superfície da mesma célula. Barra = 5  $\mu$ m.



## **VI. TABELAS**

**TABELA 1: COMPARAÇÃO ENTRE OS ESTÁGIOS DE MATURAÇÃO DOS MASTÓCITOS DERIVADOS DA MEDULA ÓSSEA E SANGUE PERIFÉRICO**

Anticorpos	<i>Medula óssea</i>				<i>Sangue</i>
	Mastócitos Maduros	Mastócitos Imaturos	Mastócitos Bem Imaturos	Células Indiferenciadas	Células precursoras
AA4	+	+	+	-	+
BC4	+	+	+	-	+
Anti - IgE	+	+	+	-	+
Anti - c - kit	+	+	+	+	+
BGD6	+	+	+	+	+
CD34©	+	+	+	+	*
Diâmetro	10-13 $\mu\text{m}$	6-10 $\mu\text{m}$	3-6 $\mu\text{m}$	< 3 $\mu\text{m}$	3-6 $\mu\text{m}$

© O anticorpo anti CD 34 foi utilizado apenas em camundongos.

\* Não determinado.

TABELA 2: QUANTIFICAÇÃO DE MASTÓCITOS DA MEDULA ÓSSEA

Número de animais	Número total de células $\pm$ SD	Número de mastócitos $\pm$ SD	% de mastócitos $\pm$ SD
30	$2,0 \pm 0,9 \times 10^7$	$4,6 \pm 0,4 \times 10^5$	$2,4 \pm 0,6$

SD = desvio padrão

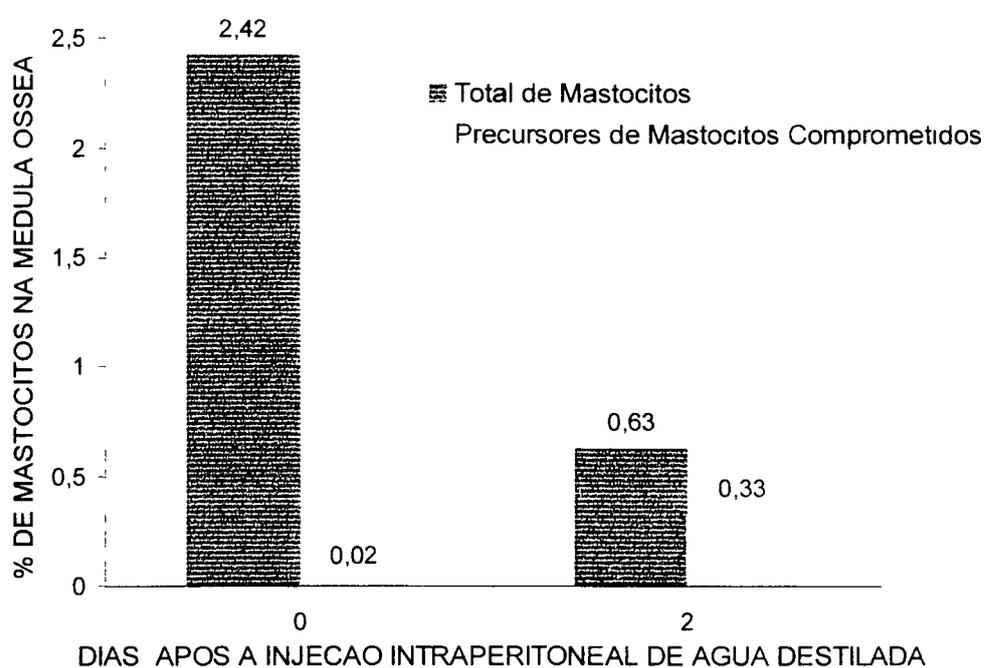
**TABELA 3: ANÁLISE MORFOMÉTRICA DE MASTÓCITOS DA MEDULA ÓSSEA**

Estágios de maturação	Porcentagem	diâmetro ( $\mu\text{m}$ ) $\pm$ SD	Faixa de Variação ( $\mu\text{m}$ )	Volume ( $\mu\text{m}^3$ ) $\pm$ SD	Faixa de Variação ( $\mu\text{m}^3$ )
Bem Imaturo	10,7	5,2 $\pm$ 0,84	3 - 6	69,7 $\pm$ 29,5	15 - 115
Imaturo	59,5	7,9 $\pm$ 1,13	6 - 10	266 $\pm$ 11,5	115 - 525
Maduro	29,8	11 $\pm$ 2,12	10 - 13	671,7 $\pm$ 170,4	525 - 1500

SD: desvio padrão

## **VII. GRÁFICO**

**VARIAÇÃO DAS POPULAÇÕES DE MASTOCITOS  
DA MEDULA OSSEA APOS A DEPLEÇÃO  
DA CAVIDADE PERITONEAL**



Observar que a população total de mastócitos da medula óssea diminui de 2,42 % para 0,63 % enquanto as células indiferenciadas, precursores de mastócitos, aumentam de 0,02 % para 0,33 %.

## **VIII. DISCUSSÃO**

## VIII. DISCUSSÃO

Utilizando anticorpos específicos foi possível isolar, identificar e caracterizar, *in vivo*, mastócitos em todos os estágios de maturação, na medula óssea de ratos e camundongos. Os diferentes estágios de maturação dos mastócitos e seus precursores ainda não haviam sido descritos pela falta de marcadores específicos. Estudos prévios tinham como base apenas a identificação morfológica e a marcação dos componentes dos grânulos citoplasmáticos (JAMUR et al., 1986; JAMUR & VUGMAN, 1988a). Desta forma, as células precursoras de mastócitos, ainda desprovidas de grânulos, não haviam sido identificadas. Alguns dos marcadores imunológicos utilizados recentemente também deixaram dúvidas sobre a identificação correta dos precursores dos mastócitos, por se ligarem à superfície de outros tipos celulares, como monócitos e macrófagos (HAMANN et al., 1995; KINZER et al., 1995), ou por apresentarem baixa afinidade para mastócitos (STRACKE et al., 1987). Os anticorpos utilizados neste trabalho para a identificação das células da linhagem de mastócitos, apresentam alta afinidade por componentes específicos da membrana plasmática destas células, e a observação simultânea de mais de um marcador de superfície nos estágios analisados, não deixa dúvidas quanto a identificação destas células com a sua linhagem. Foi possível então isolar, identificar e caracterizar os mastócitos da medula óssea, e classificar a linhagem em 3 estágios de maturação morfológicamente distintos: mastócitos bem imaturos, mastócitos imaturos e mastócitos maduros (Fig. 7 e 9). Através da análise morfométrica foi possível confirmar que ocorre um desenvolvimento progressivo durante a maturação das células precursoras, evidenciado pelo aumento no tamanho e volume das células. Este processo de maturação é paralelo ao desenvolvimento morfológico, caracterizado principalmente pelo aumento no número de grânulos citoplasmáticos. O aumento do número de grânulos durante a maturação também foi observado em mastócitos que repovoaram a cavidade peritoneal (MENDONÇA et al., 1986) e em ratos jovens e recém-nascidos (JAMUR et al., 1997b).

As células encontradas na medula óssea, nos três estágios de maturação, apresentaram o receptor de alta afinidade para IgE (FC $\epsilon$ RI) demonstrado através da imunomarcação pelos mAb BC4 e mAb anti-IgE. LANTZ & HUFF em 1995, detectaram um número reduzido do receptor FC $\epsilon$ RI em células da medula óssea após aproximadamente 3 dias de cultivo e observaram um aumento nos níveis de expressão do receptor, de um modo geral, coincidindo com a formação de grânulos metacromáticos. Os achados de LANTZ & HUFF também estão de acordo com os nossos dados de desenvolvimento progressivo de células observadas na medula óssea. Os estudos de THOMPSON e colaboradores, em 1990, demonstraram o surgimento de 75% de células positivas para FC $\epsilon$ RI contra 25% de células identificáveis morfologicamente como mastócitos por coloração com azul de toluidina, em 1 semana de cultivo, sugerindo o aparecimento do FC $\epsilon$ RI antes do surgimento dos grânulos dos mastócitos. No entanto, nossos resultados demonstram que células bem imaturas, identificadas por imunomarcação, já expressam o receptor FC $\epsilon$ RI concomitantemente com o surgimento de um ou dois grânulos ortocromáticos, que podem ser identificados somente a nível de microscopia eletrônica.

Utilizando esferas magnéticas conjugadas ao mAb AA4 foi possível isolar e quantificar os mastócitos da medula óssea, nos seus diferentes estágios de maturação, os quais perfazem uma população de aproximadamente 2,4% do total de células residentes da medula óssea. Este número foi confirmado por citometria de fluxo que demonstrou também que a população selecionada por imunofluorescência positiva para o mAb AA4 apresentou heterogeneidade em tamanho.

Após o isolamento sequencial utilizando o mAb AA4 e o mAb BGD6 conjugados a esferas magnéticas, obteve-se uma pequena população de células indiferenciadas na medula óssea. Estas células indiferenciadas são extremamente pequenas e completamente desprovidas de grânulos, e foram positivas para o mAb BGD6. Elas apresentam características morfológicas e fenotípicas que as enquadram em um estágio que antecede o de mastócito bem imaturo, pois não apresentam ainda, o receptor de alta afinidade para IgE, mas possuem os antígenos de superfície CD34 e c-kit. O antígeno CD34 está presente nas células fonte (stem cells) e nas células da

linhagem de mastócitos, diminuindo sua expressão com o avanço da maturação (JAMUR et al., 1998). A presença deste antígeno na célula ainda indiferenciada BGD6 positiva, sugere que a mesma seja um precursor comprometido com a linhagem de mastócitos. O receptor c-kit, tirosina-quinase, tem como ligante o fator de crescimento para mastócitos (stem cell factor - SCF). Este receptor está presente em precursores de diferentes linhagens celulares da medula óssea, no entanto, está presente em mastócitos e ausente em basófilos, permitindo a distinção entre estas células durante o processo de maturação. Nossos dados sobre as células indiferenciadas unipotentes comprometidas com a linhagem de mastócitos, estão de acordo com as pesquisas desenvolvidas, *in vitro*, por LANTZ & HUFF, 1995, e ROTTEM et al., 1994a, que identificaram mastócitos após cultivar células derivadas do sangue periférico humano positivas para CD34 e CD117 (c-kit) e negativas para FC $\epsilon$ RI. AGIS et al., em 1993, demonstraram que o cultivo de células do cordão umbilical depletado de células CD34 positivas, resultou em uma perda de mastócitos. Ainda, BEGHINI et al., 1998 sugerem que o progenitor circulante de mastócitos seja uma célula positiva para CD34 e CD117, e negativa para CD14, presente em monócitos e CD17, encontrado em basófilos (AGIS et al., 1993). Estas células constituem, portanto, uma única linhagem celular comprometida a se diferenciar em mastócitos dentro do sistema hematopoiético. Nossos dados concordam com as características fenotípicas das células unipotentes indiferenciadas sugeridas pelos autores acima mencionados, porém células que não expressam o receptor FC $\epsilon$ RI só foram encontradas na medula óssea.

O aparecimento de mastócitos imaturos na cavidade peritoneal, observados durante o repovoamento, após a depleção da cavidade peritoneal pela água destilada (MORENO et al., 1997), sugere que estas células possam migrar da medula óssea para o sangue e deste para os sítios periféricos. Em condições normais, mastócitos não foram encontrados no sangue periférico. Alguns pesquisadores sugerem que a ausência de mastócitos maduros no sangue seja parte de um processo de retenção de células na medula óssea autorregulado pela expressão de moléculas de superfície envolvidas no eficiente endereçamento celular. O surgimento de tais moléculas de endereçamento deve ser paralelo à maturação. A expressão sequencial

de moléculas de adesão na superfície permite que as células extravasem da corrente sanguínea e entrem nos tecidos seguindo interações específicas receptor -ligante (SMITH & WEISS, 1996).

No entanto, mastócitos foram encontrados quando células do sangue humano e do sangue de ratos foram cultivados, o que sugere a existência de precursores no sangue (ZUCKER - FRANKLIN et al., 1981, DENBURG et al., 1983). Nossos experimentos mostram que durante o processo de repovoamento da cavidade peritoneal, após a injeção de água destilada, houve uma redução da linhagem de mastócitos na medula óssea. Estes dados sugerem que estas células pudessem estar trafegando através da corrente sanguínea para repovoar a cavidade peritoneal depletada pela água destilada. Utilizando este modelo foi possível então, pela primeira vez, isolar, identificar e caracterizar, as células precursoras de mastócitos na corrente sanguínea.

A célula precursora de mastócitos que identificamos no sangue periférico, *in vivo*, possui o receptor tirosina-quinase para SCF, o c-kit. Além do c-kit, as células precursoras de mastócitos encontradas no sangue apresentaram a subunidade  $\alpha$  do receptor de alta afinidade para IgE, detectada pelo mAb BC4. O receptor (FC $\epsilon$ RI) presente nestas células é capaz de ligar IgE. Também foram detectados os gangliosídeos associados ao receptor FC $\epsilon$ RI, através do mAb AA4 e proteínas específicas de mastócitos, as quais foram imunomarcadas pelo mAb BGD6. As células indiferenciadas, ou seja, os precursores de mastócitos comprometidos presentes na medula óssea e reconhecidos pelo mAb BGD6 após o isolamento sequencial, não foram isolados do sangue periférico. RODEWALD e colaboradores, em 1996, cultivando sangue fetal murino, encontraram células que expressam c-kit, não expressam o FC $\epsilon$ RI, mas apresentam o citoplasma com muitos grânulos metacromáticos. No entanto, estas células encontradas no sangue fetal murino não foram caracterizadas fenotipicamente por métodos imunquímicos anteriormente ao cultivo celular. De acordo com os nossos resultados, as células precursoras encontradas no sangue já expressam o receptor FC $\epsilon$ RI, mas não apresentam grânulos metacromáticos detectáveis por microscopia de luz. Outros pesquisadores já sugeriam que as células precursoras de mastócitos

apresentam o receptor FC $\epsilon$ RI e poucos grânulos, e poderiam se assemelhar morfológicamente a linfócitos (CHEN & ENERBACK, 1994; VALENT et al., 1989).

Os mastócitos imaturos encontrados na corrente sanguínea após a depleção por água destilada são estimados em aproximadamente 1 célula para cada  $10^6$  das células circulantes. Os experimentos por parabiose mostraram que o repovoamento de mastócitos em tecidos é muito lento e o trânsito pela corrente sanguínea muito rápido, sugerindo uma desprezível concentração de células precursoras no sangue periférico (KITAMURA et al., 1979a). Portanto, o número destas células é extremamente reduzido, o que dificultou a realização de estudos ultraestruturais.

Nossos resultados estão de acordo com KITAMURA et al., 1989 e KITAMURA et al., 1993, que sugerem que os precursores de mastócitos sejam rapidamente removidos da corrente sanguínea e concentrados em áreas com microambiente favorável, o que permite a sua sobrevivência e diferenciação.

Quando células da medula óssea, baço e sangue de camundongos bege (bg/bg), os quais possuem mastócitos com grânulos gigantes, foram injetados em camundongos deficientes em mastócitos (W/W), foi observado que nos sítios de injeção, surgiram mastócitos. A partir do número de mastócitos gigantes que surgiram nestes sítios, foram estimados os possíveis precursores existentes na medula óssea, baço e sangue periférico sendo respectivamente 1, 0,2 e 2 células em cada  $10^6$  células (SONODA et al., 1982). Apesar dos autores utilizarem um cálculo estimativo, o número de precursores de mastócitos estimados após a injeção de sangue foi muito próximo dos nossos resultados. O número de precursores estimados a partir da injeção local de células da medula óssea, foi cinco vezes maior que de sangue, mostrando que a quantidade de células precursoras no sangue periférico é bem menor quando comparada com a da medula óssea.

Os precursores de mastócitos comprometidos, ainda indiferenciados, encontrados na medula óssea são provavelmente responsáveis pela proliferação da população de mastócitos na medula, visto que 2 dias após a injeção intraperitoneal de água destilada, o número destas células indiferenciadas aumenta de 0,02 % para

0,33%. No entanto, a população total de mastócitos decresceu de 2,4% para 0,63%, no mesmo período estudado (Gráfico). Estes dados indicam a existência de um processo de migração de mastócitos da medula óssea para repovoar a cavidade peritoneal após a sua depleção.

Até o presente estudo, os mastócitos não haviam sido detectados no sangue periférico, por seus precursores não apresentarem características clássicas de mastócitos. O não reconhecimento destas células resultou na falta de informações sobre o mecanismo pelo qual estas são direcionadas para os tecidos durante o seu processo normal de renovação (NILSSON et al., 1994).

A caracterização morfológica e fenotípica dos estágios de maturação dos mastócitos e a possibilidade de isolamento de populações puras destas células, permitirão estudos futuros que venham esclarecer o mecanismo de recrutamento da linhagem de mastócitos da medula óssea. Através da caracterização das moléculas de adesão existentes na sua superfície será possível investigar o processo de migração e interação dos mastócitos com os diferentes tecidos, visto que acúmulos de mastócitos são encontrados em diferentes doenças inflamatórias, incluindo asma (LAITINEN et al., 1993) e alergia (ENERBACK et al., 1986).

A identificação da linhagem de precursores de mastócitos na medula óssea e no sangue abre perspectivas para estudos futuros que envolvem diferentes processos onde possa existir recrutamento e proliferação de mastócitos, tais como mastocitose, asma, alergias e infecções parasitárias.

## **IX. CONCLUSÕES**

## IX. CONCLUSÕES

Os dados obtidos mostram que:

1. na medula óssea podem ser observados mastócitos em 3 estágios distintos de maturação: bem imaturos, imaturos e maduros;
2. a população de mastócitos da medula óssea, em todos os estágios de maturação, representa aproximadamente 2,42 % das células;
3. o isolamento sequencial com o mAb AA4 e mAb BGD6 permitiu isolar uma célula indiferenciada, um precursor comprometido de mastócito que corresponde a 0,02% das células residentes da medula óssea;
4. mastócitos bem imaturos ( $<1$  célula a cada  $10^6$ ) foram encontrados na corrente sanguínea, após a depleção da cavidade peritoneal pela injeção de água destilada;
5. a depleção dos mastócitos da cavidade peritoneal causa a diminuição da população total de mastócitos da medula óssea, aumento do número de precursores de mastócitos comprometidos na medula óssea e o aparecimento de mastócitos bem imaturos no sangue periférico.
6. a medula óssea funciona como um reservatório de mastócitos que poderão suprir sítios periféricos durante os processos de recrutamento.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGIS, H.; WILLHEIN, M.; SPEERR, 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 - 11831, 1986.
- BEGHINI, A .; CAIROLI, R.; MORRA, E.; LARIZZA, L. In vivo differentiation of mast cells from acute myeloid leukemia blasts carrying a novel activating ligand-independent c-kit mutation. **Blood Cells Mol. Dis.**, v. 24, p. 262-270, 1998.
- BHATTACHARYYA, S.P.; DRUKER, I.; RESSHEF, T.; KIRSHENBAUM, A.S.; METCALF, D.D.; MEKORI, Y.A. Activated T lymphocytes induce degranulation and cytokine production by human mast cells following cell-to-cell contact. **J. Leukoc. Biol.**, v. 63, p. 337-341, 1998.
- BOESIGER, J.; TSAI, M.; MAURER, M.; YAMAGUCHI, M.; BROWN, L.F.; CLAFFEY, K.P.; DVORAK, H.F.; GALLI, S.J. Mast cells can secrete vascular permeability Factor/ vascular endothelial cell growth factor and exhibit enhanced release after immunoglobulin E-dependent upregulation of FC epsilon receptor I expression. **J. Exp. Med.**, v. 21, p. 1135-1145, 1998.
- 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; ENERBÄCK, 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.
- DENBURG, J.A .; RICHARDSON, M.; TELIZYN,S.; BIENENSTOCK, J. Basophil / mast cell precursors in human peripheral blood. **Blood**, v. 61, p. 775-780, 1993.
- DURAND, D.; MIGLIACCIO, G.; YEE, N.; 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, p. 3667-3674, 1994.

- ENERBACK, L. The gut mast cell. **Monogr. Allergy.**, v. 17, p. 222 - 232, 1981.
- ENERBACK, L.; PIPKORN, U.; GRANERUS, G. 1986. Intraepithelial migration of nasal mucosal mast cells in hay fever. **Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.**, v. 80, p. 44, 1986.
- ERB, K. J.; HOLLOWAY, J. W.; LE GROS, G. Innate immunity: Mast cells in the front line. **Current Biol.**, v. 6, n. 8, p. 941 - 942, 1996.
- ERHLICH, 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. histochem.** v. 99, p. 23 - 27, 1997.
- FAWCET, D.W. An experimental study of mast cell degranulation and regeneration. **Anat. Rec.**, v. 121, p. 29-43, 1955.
- GALLI, S. J. Biology of disease. New insights into "The riddle of mast cells": Microenvironmental regulation of mast cells development and phenotypic heterogeneity. **Lab. Inv.**, v. 62, n. 1, 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 England J. Med.** v. 328, n. 4 p. 257 - 264, 1993.
- 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.; BRENNAN, M. J.; SIRAGANIAN, R. P.; GINSBURG, V. Monoclonal antibody AA4, which inhibits binding of IgE to high affinity receptors on rat basophilic leukemia cells, binding to the novel - galactosyl derivatives of ganglioside GD1b. **J. Biol. Chem.**, v. 264, p. 13267 - 13272, 1989.

- HAMANN, K.; HAAS, N.; GRABBE, J.; WELKER, P.; CZARNETZKI, B.M. Two novel mast cell phenotypic markers, monoclonal antibodies Ki-MC1 e Ki-M1P, identify distinct mast cell subtypes. *J. Dermatol.*, v. 133, p. 547 - 552, 1995.
- HAMAWY, M. M; OLIVER, C; SIRAGANIAN, R. P. Inhibition of IgE binding to RBL-2H3 cells by a monoclonal antibody (BD<sub>6</sub>) to a surface protein other than the high affinity receptor. *J. Immunol.*, v. 148, p. 524 - 531, 1992.
- HATANAKA, K.; KITAMURA, Y.; NISHIMUNE, Y. Local development of mast cells from bone marrow - derived precursors in the skin of mice. *Blood.*, v. 53, n. 1, p. 142 - 147, 1979.
- HOGABOAM, C.; KUNKEL, S.L.; STRIETER, R.M.; TAUB, D.D.; LINCOLN, P.; STANDIFORD, T.J.; LUKACS, N.W. Novel role of transmembrane SCF for mast cell activation and eotaxin production in mast cell-fibroblast interactions. *J. Immunol.*, v. 160, p. 6166-6171, 1998.
- HUFF, T.F.; LANTZ, C.S.; RYAN, J.J.; LEFTWICH, J.A. Mast cell- committed progenitors. In: *Biological and Molecular Aspects of Mast Cell and Basophil Differentiation and Function*. Y. Kitamura, S. Yamamoto, S.J. Galli, M.W. Greaves. **Raven Press**, New York, p. 105-117, 1995.
- HUNT, J.E.; STEVENS, R.L. Mouse mast cell proteases. In: *Biological and Molecular Aspects of Mast Cell and Basophil Differentiation and Function*. Y. Kitamura, S. Yamamoto, S.J. Galli, M.W. Greaves. **Raven Press**, New York, p. 149-160, 1995.
- IHLE, J.N. ; WEINSTEIN, Y. Immunological regulation of hematopoietic / lymphoid stem cell differentiation by interleukin-3. *Adv.Immunol.*, v. 39, p. 1-50, 1986.
- 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 cells maturation. *Cell. Mol. Biol.*, v. 34, n.1, p. 27 - 31, 1988 (a).
- JAMUR, M. C.; FARACO, C. D.; LUNARDI, L. O; OLIVER, C. Microwave fixation improves antigenicity of a glutaraldehyde - sensitive antigens while preserving ultrastructural detail. *J. Histochem. Cytochem.*, v. 43, n.3, p. 307 - 311, 1995.
- JAMUR, M. C.; GRODZKI, A. C. G.; MORENO, A. N.; SWAIM, W. D.; SIRAGANIAN, R. P.; OLIVER C. Immunomagnetic isolation of rat bone marrow derived and peritoneal mast cells. *J. Histochem. Cytochem.*, v. 45, n. 12, p. 1715 - 1722, 1997 (a).

- JAMUR, M. C.; LUNARDI, L. O; VUGMAN, I. Mast cell maturation in young rats: a histofluorescence and cytochemical study. **Acta Histochem.**, v. 99, p. 379-389, 1997 (b).
- JAMUR, M. C.; GRODZKI, A. C.G.; MELLO, L.F.C.; MORENO, A. N.; SIRAGANIAN, R.P.; OLIVER, C. Depletion of mast cells from the peritoneal cavity results in an increase and undifferentiated mast cell from bone marrow and the appearance of mast cells in the circulation. **Mol. Biol. Cell**, v. 9, p. 377a, 1998.
- KANAKURA, Y.; THOMPSON, H.; NAKANO, T.; YAMAMURA, T.; ASAI, H.; KITAMURA, Y.; METCALF, 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.
- KASUGAI, T.; TEI, H.; OKADA, M.; HIROTA, S.; MORIMOTO, M.; YAMADA, M.; NAKAMA, A.; ARIZONO, N.; KITAMURA, Y. Infection with *Nippostrongylus brasiliensis* induces invasion of mast cell precursors from peripheral blood to small intestine. **Blood**, v. 85, p. 1334-1340, 1995.
- KINZER, C. A.; KEEGAN, A. D.; PAUL, W. E. Identification of FcεRI<sup>neg</sup> 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.; HATANAKA, K.; MURAKAMI, M.; SHIBATA, H. Presence of mast cell precursors in peripheral blood of mice demonstrated by parabiosis. **Blood**, v. 53, p. 1085-1088, 1979 (a).
- KITAMURA, Y.; MATSUDA, H; HATANAKA, K. Clonal nature of mast - cell cluster formed in W/W<sup>v</sup> mice after bone marrow transplantation. **Nature.**, v. 281, p. 154 - 155, 1979 (b).
- KITAMURA, Y; YOKOYAMA, M; MATSUDA, H; OHNO, T; MORI, K. J. Spleen colony forming cell as common precursor for tissue mast cells and granulocytes. **Nature.**, v. 291, 159 - 160, 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.

- LAITINEN, L.A. ; LAITINEN, A. ; HAAHTELA, T. Airway mucosal inflammation even in patients with newly diagnosed asthma. **Am. Rev. Respir. Dis.**, v. 147, p. 697, 1993.
- LANTZ, C.S. ; HUFF, T.F. Murine KIT<sup>+</sup> lineage - bone marrow progenitors express FC $\gamma$ -RII but do not express FC $\epsilon$ RI until mast cell granule formation. **J. Immunol.**, v.154, p. 355-362, 1995.
- 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.
- MACDONALD, A.J.; PICK, J.; BISSONNETTE, E.Y.; BEFUS, A.D. Rat mucosal mast cells: the cultured bone marrow-derived mast cell is biochemically and functionally analogous to its counterpart in vivo. **Immunol.**, v. 93, p. 533-539, 1998.
- MENDONÇA, V. O.; VUGMAN, I. ; JAMUR, M. C. Maturation of adult rat peritoneal and mesenteric mast cells. A Morphological and histofluorescence study. **Cell Tiss. Res.**, v. 243, p. 635 - 639, 1986.
- METCALFE, D. D.; BARAM, D.; MEKORI, Y. A. Mast Cells. **Physiol. Reviews**, v. 77, n. 4, p. 1033 - 1079, 1997.
- METZGER, H.; The receptor with high affinity for IgE. **Immunol. Rev.**, v. 125, p. 37 - 48, 1992.
- MITSUI, H.; FURITSU, T.; DVORAK, A.M.; IRANI, A-M.A.; SCHWARTZ,L.B.; INAGAKI, N.; TAKEI, M.; ISHIZAKA, K.; ZSEBO, K.M.; GILLIS, S.; ISHIZAKA, T. Development of human mast cells from umbilical cord blood cells by recombinant human and murine c-kit ligand. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 90, p. 735-739, 1993.
- MORENO, A. N; ORTOLANI - MACHADO, C. F; MELLO, L. F. C.; OLIVER, C.; JAMUR, M. C. Depletion of peritoneal mast cells correlates with a reduction in bone marrow mast cells. **Mol. Biol. Cell.**, v. 8, p. 456 a, 1997.
- NAKAHATA, T.; KOBAYASHI, T.; SHIGURO, A.; TSUJIK; 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, <sup>a</sup>; DANAYAMA, 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<sup>v</sup> 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.
- NILSSON, G.; BUTTERFIELD, J.H.; NILSSON, K.; SIEGBAHN, A. Stem cell factor is a chemotactic factor for human mast cells. **J. Immunol.**, v. 153, p. 3717-3723, 1994.
- 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 produces changes similar of those seen with Fc $\epsilon$  receptor activation. **J. Cell Biol.** v. 116, n. 3, p. 635 - 646, 1992.
- ORFAO, A.; ESCRIBANO, L.; VILLARUBIA, J.; VELASCO, J.L.; CERVERO, C.; CIUDAD, J.; NAVARRO, J.L.; SAN MIGUEL, J.F. Flow cytometric analysis of mast cells from normal and pathological human bone marrow samples: identification and enumeration. **Am. J. Pathol.**, v. 149, p. 1493-1499, 1996.
- 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.
- RODEWALD, H. R.; DESSING, M.; DVORAK, A. M; GALLI, S. J.; Identification of a committed precursor for the mast cell lineage. **Science.**, v. 271, p. 729 - 876, 1996.
- ROTTEM, M.; BARBIERI, S.; KINET, J-P.; METCALFE, D. D. Kinetics of the appearance of FC $\epsilon$ RI-bearing cells in interleukin-3-dependent mouse bone marrow cultures: Correlation with histamine content and mast cells maturation. **Blood**, v. 79, p. 972, 1992.
- ROTTEM, M.; HULL, G.; METCALFE, D. D. Demonstration of differential effects of cytokines on mast cells derived from murine bone marrow and peripheral blood mononuclear cells. **Exp. Hematol.**, v. 22 p. 1147 - 1155, 1994 (a).
- ROTTEM, M.; OKADA, T.; GOFF, J.P.; METCALFE, D. D. Mast cells cultured from the peripheral blood of normal donors and patients with mastocytosis originate from a CD 34+/ FC $\epsilon$ RI- cell population. **Blood**, v. 84, p. 2489-2496, 1994 (b).
- SCHRADER, J. W. The panspecific hemopoietin of activated lymphocytes (interleukin 3). **Annu. Ver. Immunol.**, v. 4, p. 205-230, 1986.

- SCHWARTZ, L. B. Heterogeneity of human mast cells. In: The mast cell in health and disease. M.A . Kaliner and D.D. Metcalf. New York: Dekker, p. 219-236, 1993.
- SCHWARTZ, L. B. ; KEPLEY, C. Development of markers for human basophils and mast cells. **J. Allergy. Clin. Immunol.** v. 94, n. 6, 1231 - 1240, 1994.
- SIRAGANIAN, R. P. Mast cells and basophils. IN: GALLI J. I.; GOLDSTEIN, I. M.; SNYRDERMAN, R. **Inflammation: basic principles and clinical correlates.** New York: Raven Press, p. 513 - 542, 1988.
- SMITH, T. J. ; WEIS, J. H. Mucosal T cells and mast cells share common adhesion receptors. **Immunol. Today**, v.17, n.2, p. 60 - 63, 1996.
- SONODA, T.; OHNO, T.; KITAMURA, Y. Concentration of mast - cell progenitors in bone marrow, spleen, and blood of mice determined by limiting dilution analysis. **J. Cell. Physiol.**, v. 112, p. 136 - 140, 1982.
- 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<sup>v</sup> mice. **J. Immunol.**, v. 137, p. 1319-1322, 1986.
- SWAIM, W.D.; MINOGUCHI,K.; OLIVER, C.; HAMAWY, M.M.; KIHARA, H.; STEPHAN, V.; BERENSTEIN,E.H.; SIRAGANIAN, R.P. The anti-ganglioside monoclonal antibody AA4 induces protein tyrosine phosphorylations, but not granulation in rat basophilic leukemia cells. **J. Biol. Chem.**, v. 269, p. 19466-19478, 1994.
- 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.
- SWIETER, M.; HAMAWY, M.M.; SIRAGANIAN, R.P.; MERGENHAGEN, S. E. Mast cells and their microenvironment: The influence of fibronectin and fibroblasts on the functional repertoire of rat basophilic leukemia cells. **J. Periodontol.**, v. 64, p. 492-496, 1993.
- STRACKE, M.L.; BASCIANO, L.K.; FISCHLER, C.; BERENSTEIN, E.H.; SIRAGANIAN, R.P. Characterization of monoclonal antibodies produced by immunization with partially purified IgE receptor complexes. **Mol. Immunol.**, v. 24, p. 347-356, 1987.
- TAKAUE, Y.; KAWANO, Y.; READING, C.L.; WATANABE, T.; ABE, T.; NINOMIYA, T.; SHIMIZU, E.; OGURA, T.; KURODA, Y.; YOKOBAYASHI, A.;

- NAKAHATA, T.; ASANO, S.; VENTURA, G. Effects of recombinant human G-CSF, GM-CSF, IL-3, and IL-1 $\alpha$  on the growth of purified human peripheral blood progenitors. **Blood**, v. 76, p. 330-335, 1990.
- THOMPSON, H.L.; METCALFE, D.D.; KINET, J.P. Early expression of high-affinity receptor for Immunoglobulin E (FC $\epsilon$ RI) during differentiation of mouse mast cells and human basophils. **J. Clin. Invest.**, v. 85, p. 1227-1233, 1990.
- VALENT, P.; ASHMAN, L.K.; HINTERBERGER, W.; ECKERSBERGER, F.; MAJDIC, O.; LECHNER, H.; BETTELHEIM, P. Mast cell typing: demonstration of a distinct hematopoietic cell type and evidence for immunophenotypic relationship to mononuclear phagocytes. **Blood**, v. 73, p. 1778-1785, 1989.
- 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. The riddle of mast cell: kit (CD117) - ligand as the missing link? **Immunol. Today**, v. 15, p. 111-114, 1994.
- WODNAR-FILIPOWICZ, A.; HEUSSER, C.H.; MORONI, C. Production of the hematopoietic growth factors GM-CSF and interleukin-3 by mast cells in response to IgE receptor-mediated activation. **Nature**, v. 339, p. 150-152, 1989.
- YUAN, Q.; GURISH, M.F.; FRIEND, D.S.; AUSTEN, K.F.; BOYCE, J.A. Cutting edge: generation of a novel stem cell factor-dependent mast cell progenitor. **J Immunol.**, v. 161, p. 5143-5146, 1998.
- YUEN, E; BROWN, R. D; VANDERLULBBE, L; RICKARDK, K. A; KRONENBERG, H. Identification and characterization of human hematopoietic mast cell colonies. **Exp. Hematol.**, v. 16, p. 896 - 902, 1988.
- 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 peritoneal blood. **Blood.**, v. 58, p. 544-551, 1981.