

ELIANA CAMPAGNOLO

DEMONSTRAÇÃO DE MITOSES EM PRECURSORES DE MASTÓCITOS QUE
REPOVOAM O MESENTÉRIO DE RATO

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
grau de mestre em Ciências Biológicas.

CURITIBA
1998

A. DEUS

“Mas os que esperam no Senhor renovam as suas forças, sobem com asas como águias, correm e não se cansam, caminham e não se fatigam.”

Isaías, 40 : 31

Aos meus pais, Palmirino e Cristina:

Enfrentei muitas preocupações, e fiquei sem saber qual o caminho a seguir, porém em vocês encontrei forças para passar por tudo isso. A confiança que vocês depositaram em mim permitiram que eu atingisse mais esta meta. Muito obrigada, pelo amor e compreensão.

Á

Prof^a Dr^a Maria Célia Jamur, minha orientadora. Com você aprendi, que sem determinação não é possível chegar a lugar algum. Sua paciência, foi decisiva para que o objetivo deste trabalho fosse alcançado. A você, meus sinceros agradecimentos.

AGRADECIMENTOS

A Dr^a Constance Oliver, (ONR - NIH, EUA), pela contribuição tão preciosa, não medindo esforços para ajudar na finalização deste trabalho.

Agradeço ao Dr. Willian D. Swain, Diretor do “Cellular Imaging Core Facility” do National Institutes of Health, pelo uso do microscópio confocal.

À CAPES, Coordenação do Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pela Bolsa de Mestrado concedida.

Ao Office Naval Research (ONR) e ao National Institutes of Health (NIH) pelo auxílio financeiro necessário a realização deste trabalho.

Ao Valdir pelo amor e paciência, sempre presentes. Muitas vezes chorei, e em você encontrei conforto sincero, compreensão, e otimismo, essenciais em todas etapas da minha vida. Com você aprendi que todos os obstáculos são transponíveis. Muito obrigada por compartilhar comigo os momentos mais difíceis, da realização deste trabalho.

A Luciana, por me auxiliar durante este percurso. Muito obrigada por compartilhar com você o período mais crítico da realização deste trabalho, e pelo seu otimismo e carinho constantes.

A Andréa e Ana Cristina, pelo apoio prestado e sobretudo pela alegria contagiante. Meus sinceros agradecimentos.

Aos meus queridos irmãos Sônia e Agnaldo, por compartilharem comigo este momento tão especial.

Aos meus adoráveis sobrinhos, Carolina, Henrique, Mariana e Rafael, pelo carinho desinteressado. Vocês são muito especiais para mim, fazem parte da minha vida.

Aos caríssimos cunhados José Jácomo e Ana Paula pela alegria e torcida.

À minha prima Ivanil, sou eternamente grata pelo carinho com que me recebeu, quando aqui cheguei.

As amigas de laboratório, Roberta e Gabriela, pelo carinho no decorrer do curso.

As amigas Maria Laura, Vera Lúcia, Sônia, Verônica e demais alunos do curso da Pós - Graduação pelo incentivo e torcida, ao longo desta caminhada.

As amigas Néia, Janet e Vânia, pelo exemplo de determinação e entusiasmo que me incentivaram a atingir esta meta.

As queridas amigas Diva, Maria José e Florinda, que mesmo distantes não deixaram de me apoiar, que eu sempre possa contar com vocês, obrigada.

As amigas Marilda, Marisa e Miriam pelo carinho durante este período.

A Sra. Irma e Jonas pela recepção carinhosa, numa fase tão delicada.

A Marlene Bonifácio de Camargo, secretária do Curso de Pós - Graduação em Morfologia - Biologia Celular, por sua cooperação e atenção sempre constantes.

Aos professores do Departamento de Biologia Celular da UFPr., em especial aos professores Claudia Feijó Ortolani Machado, Cloris Dietzel Faraco, Marco Antônio Randi, Márcia Helena Mendonça e Luis Fernando Fávaro pela colaboração prestada.

Aos professores do Curso de Pós - Graduação em Morfologia - Biologia Celular, pelos ensinamentos transmitidos.

A Coordenação do Curso de Pós - Graduação em Morfologia - Biologia Celular, na pessoa do Prof. Dr. Ciro Alberto Ribeiro.

Ao Laboratório de Histotecnologia, na pessoa do Sr. Herculano dos Reis Filho.

As bibliotecárias do Setor de Ciências Biológicas, pela cordial atenção.

Aos funcionários do biotério da UFPr, pelo cuidado com os animais.

À todos que de qualquer forma contribuíram para realização deste trabalho, nesta fase muito especial em minha vida.

SUMÁRIO

Lista de Figuras.....	viii
Resumo.....	x
Summary.....	xi
I - Introdução.....	1
II - Revisão de Literatura.....	4
III - Material e Métodos.....	13
IV - Resultados.....	17
V - Figuras.....	20
VI - Discussão.....	29
VII - Conclusões.....	34
Anexos.....	35
Referências Bibliográficas.....	37

LISTA DE FIGURAS

FIGURA	PÁGINA
01 - Mesentério de ratos corados com Giemsa.....	20
02 - Mesentério de ratos corados com Giemsa.....	21
03 - Mesentério de ratos corados com Giemsa.....	22
04 - Quantificação dos núcleos mitóticos e não mitóticos do mesentério..... de animais controle e tratados	23
05 - Comparação do número de mitoses.....	24
06 - Mitoses coradas com Sytox Green.....	25
07 - Mastócitos em mitose imunomarcados com o anticorpo monoclonal..... BGD6 e corados com Sytox Green	25
08 - Detalhe de um mastócito em mitose corado com Sytox Green.....	26
09 - Mastócito imunomarcado com o anticorpo monoclonal BGD6.....	26
10 - Detalhe de um mastócito em divisão celular imunomarcado..... com o anticorpo monoclonal BGD6 e corado com Sytox Green	26
11 - Mesentério controle.....	27

- 12 - Aspecto de um mastócito em mitose observado em.....28
microscopia confocal
- 13 - Imagem confocal mostrando um corte lateral de um mastócito.....28
em mitose

RESUMO

A injeção intraperitoneal de água destilada resulta na lise e desaparecimento dos mastócitos do mesentério. No presente estudo, investigamos o processo de proliferação dos mastócitos imaturos, durante o repovoamento do mesentério, 2 dias após a injeção de água destilada. Com objetivo de bloquear as células em mitose, a vimblastina foi injetada na cavidade peritoneal, 24 horas após a água destilada. A porcentagem de células em mitose foi determinada em fragmentos de mesentério corados com Giemsa. Nos fragmentos colhidos de animais que foram injetados com ambos, água destilada e vimblastina, 18,45% das células estavam em mitose. Quando os animais foram injetados apenas com água destilada, somente 0,46% das células estavam em mitose e nos fragmentos de animais injetados somente com vimblastina, foi observado que 2,64% das células estavam em mitose. Não foram observadas figuras mitóticas nos animais controles. O anticorpo monoclonal (mAb) BGD6 foi utilizado em associação com o corante nuclear Sytox Green, com a finalidade de confirmar se as células em mitose eram precursoras de mastócitos. Com esta técnica foi possível verificar que as células em mitose também foram imunomarcadas com o mAb BGD6. Com a varredura obtida pela microscopia confocal foi possível observar a marcação pontuada do mAb BGD6 distribuída na superfície celular dos mastócitos e os cromossomos localizados no interior da célula. Um outro efeito da vimblastina, foi a redução do número de mastócitos do mesentério. Nos animais controle, 4,27% das células dos fragmentos de mesentério foram identificadas como mastócitos, após a coloração com Giemsa. No entanto, houve um decréscimo na porcentagem de mastócitos maduros para 2,03%, após o tratamento com vimblastina. Estes resultados demonstram que os precursores de mastócitos proliferam no mesentério por divisão mitótica.

SUMMARY

In rats, intraperitoneal injection of distilled water results in the lysis and disappearance of mast cells from the mesentery. In the present study, the process of proliferation of immature mast cells during repopulation of the mesentery 2 days after injection of distilled water was investigated. Vinblastine was injected into the peritoneal cavity 24 hours after distilled water in order to block the cells in mitosis. The per cent of cells in mitosis was determined using Giemsa stained mesentery fragments. In fragments collected from animals injected with both distilled water and vinblastine, 18.45% of the cells were in mitosis. In contrast, only 0.46% of the cells were in mitosis when the animals were injected with distilled water alone and 2.64% of the cells were in mitosis in mesentery fragments from animals injected only with vinblastine. No mitotic figures were observed in control animals. In order to confirm that the mitotic cells were mast cell precursors the mast cell specific antibody, mAb BGD6 was used in combination with the nuclear stain Sytox Green. With this technique it was possible to verify that the cells immunostained with mAb BGD6 were indeed mitotic. With scanning confocal microscopy, the characteristic punctate staining of mAb BGD6 was observed on the surface of the mast cells with the chromosomes in the interior of the cell. Another effect of the vinblastine was a reduction in the number of mature mast cells in the mesentery. In control animals 4.27% of cells in the mesentery fragments were mast cells as identified by Giemsa staining. Following treatment with vinblastine, the per cent of mature mast cells fell to 2.03%. These results demonstrate that the mast cell precursors in the mesentery proliferate by mitotic division.

I - INTRODUÇÃO

I - INTRODUÇÃO

Os mastócitos são classificados como células efetoras do sistema imune devido às suas propriedades funcionais específicas, associadas à resposta alérgica do tipo lenta e imediata. Pesquisas mostram ainda, que estas células estão envolvidas em inúmeras respostas inflamatórias, imunológicas, neoplásicas, metabólicas e reparativas. Estas respostas estão relacionadas com o alto conteúdo de potentes mediadores químicos armazenados nos seus grânulos (GALLI, 1984; GALLI, 1993). Os mastócitos se caracterizam pela presença de receptores de superfície com alta afinidade para a porção Fc da imunoglobulina E (IgE) (ISHIZAKA & ISHIZAKA, 1984). Quando os antígenos se ligam a moléculas de IgE, que estão ligadas à superfície dos mastócitos, ocorre a ligação cruzada dos receptores. Este evento desencadeia uma série de alterações, resultando na desgranulação dos mastócitos e conseqüentemente na liberação dos mediadores químicos, tais como a histamina e outros fatores de ativação presentes nos grânulos destas células, os quais são responsáveis pelos processos alérgicos e inflamatórios (SIRAGANIAN, 1988).

A participação de mastócitos em diferentes processos biológicos faz com que os estudos dos fenômenos em que estas células estão envolvidas, sejam de relevante importância.

Os mastócitos são derivados de uma célula progenitora hematopoiética originada na medula óssea (KITAMURA *et al.*, 1981; YUEN *et al.*, 1988; GALLI, 1990). A partir da medula óssea, os precursores de mastócitos migram para o

tecido conjuntivo, proliferam e se diferenciam em mastócitos maduros (KITAMURA *et al.*, 1979; HATANAKA, *et al.*, 1979).

O estudo do repovoamento de mastócitos do mesentério e do lavado peritoneal de ratos, após a lise destas células pela injeção intraperitoneal de água destilada, demonstra que mastócitos imaturos são encontrados próximos aos vasos sanguíneos do mesentério 8 a 12 dias após a injeção (FAWCETT, 1955). No entanto, MENDONÇA *et al.* (1986) utilizando o mesmo modelo experimental, encontraram mastócitos imaturos no mesentério, 5 dias após a injeção intraperitoneal de água destilada. Os mastócitos imaturos observados, já continham grânulos metacromáticos, o que permitia a sua identificação. No entanto, os estudos que envolvem mastócitos bem imaturos, ainda desprovidos de grânulos, foram dificultados pela ausência de marcadores específicos para mastócitos (VALENT *et al.*, 1991; CHEN & ENERBACK, 1994; SCHWARTZ, 1994; RODEWALD *et al.*, 1996). Ainda, a falta de marcadores dificultou o estudo relacionado com a proliferação de mastócitos nos tecidos. MENDONÇA *et al.* (1986) não conseguiram demonstrar se a repopulação do mesentério ocorria por divisão mitótica.

Recentemente foram produzidos anticorpos monoclonais que reconhecem antígenos específicos da superfície de mastócitos. Estudos utilizando estes anticorpos monoclonais mostram que é possível identificar e isolar células precursoras de mastócitos (JAMUR *et al.*, 1997).

O presente trabalho teve como objetivo investigar e caracterizar "*in vivo*" o processo de proliferação de mastócitos durante o repovoamento do mesentério de

ratos, após a lise pela água destilada. Um bloqueador mitótico foi injetado nos animais, durante o período de repovoamento, permitindo que o processo de proliferação pudesse ser analisado e quantificado. A identificação das células em mitose, como pertencentes a linhagem de mastócitos, foi realizada pelo uso de um anticorpo monoclonal BGD6 que reconhece proteínas específicas da superfície de mastócitos.

A identificação dos mastócitos durante o processo de proliferação e diferenciação e o entendimento destes mecanismos, abre perspectivas para estudos futuros de processos patológicos nos quais estas células estejam envolvidas.

II – REVISÃO DE LITERATURA

II - REVISÃO DE LITERATURA

De acordo com os relatos de PRETLOW *et al.* (1970), os mastócitos são células que foram identificadas e descritas pela primeira vez por VON RECKLINGHAUSEN (1863), como células granulares do tecido conjuntivo. Segundo estes autores, somente mais tarde, EHRLICH (1877) descreveu a metacromasia presente nos grânulos de mastócitos dos tecidos conjuntivos humanos. Os mastócitos são células que apresentam tempo de vida longo, possuem uma vasta distribuição anatômica e são encontradas em todos os tecidos vascularizados. Estas células podem ser observadas abaixo da superfície epitelial, adjacentes aos vasos sanguíneos e linfáticos, próximas aos nervos periféricos e células musculares lisas, no aparelho gastrointestinal, no respiratório, no genital e no urinário (GALLI, *et al.*, 1993). Em alguns animais como ratos e camundongos, os mastócitos são encontrados livres na cavidade pleural e peritoneal (METCALFE *et al.*, 1981; GALLI *et al.*, 1984). Desta forma, os mastócitos estão estrategicamente posicionados para interagir rapidamente com áreas expostas à antígenos. Os mastócitos produzem e estocam em seus grânulos citoplasmáticos mediadores biologicamente ativos. Entre os mediadores pré-formados são encontradas as aminas biogênicas, como a histamina (RILEY 1953), a serotonina, presente em ratos (BENDITT *et al.*, 1955) e em camundongos (PADAWER, 1966; RITZEN, 1966) e a dopamina, encontrada em bovinos (FALCK, 1964; COUPLAND & HEATH, 1966). Ainda estão presentes nos grânulos, fatores quimiotáticos, enzimas, proteases neutras e

proteoglicanas como a heparina, que confere a metacromasia aos grânulos (SIRAGANIAN, 1988).

Os mastócitos são células multifuncionais do sistema imune e têm papel crucial nos processos de alergia, reparação dos tecidos e defesa de hospedeiros (ERB *et al.*, 1996; SMITH & WEIS, 1996). Estas células possuem na sua superfície receptores de alta afinidade para IgE (ISHIZAKA & ISHIZAKA, 1984). Estes receptores são compostos por três subunidades: uma cadeia α , que corresponde ao sítio de ligação para IgE (BASCIANO *et al.*, 1986), uma cadeia β , com duas porções citoplasmáticas, sendo a maior parte intramembranosa e duas cadeias γ , cada uma com uma porção intramembranosa e uma cauda citoplasmática (METZGER, 1992).

A interação entre antígenos multivalentes e a IgE, ligada a superfície celular, inicia uma série de eventos biológicos que culminam com a liberação da histamina e a produção de citocinas (GORDON *et al.*, 1990). Após a liberação de mediadores pré-formados, como a histamina, são gerados os fatores ativos neo-formados, associados a membrana, tais como: o fator de ativação plaquetária (SCHWARTZ & AUSTEN, 1984), os produtos da oxidação do ácido araquidônico (STEVENS & AUSTEN, 1989). Os mastócitos também podem ser ativados através de produtos gerados durante a ativação do complemento ou por peptídeos encontrados nos venenos de animais (METCALFE *et al.*, 1997). Agentes físicos, tais como: lesão, traumatismo, calor e idade, também podem promover a liberação destes mediadores (GALLI *et al.*, 1986).

Devido a sua participação em diferentes processos, vários aspectos da biologia dos mastócitos têm sido estudados, tais como: origem, diferenciação, maturação e proliferação.

Uma série de estudos foram realizados "*in vivo*" por KITAMURA *et al.* (1977; 1981) e "*in vitro*" por SCHRADER, *et al.* (1981) e NAKAHATA, *et al.* (1982) para demonstrar a relação dos mastócitos com a "stem cell" hematopoiética. Os experimentos foram realizados em camundongos geneticamente deficientes em mastócitos, através de transplante de células da medula óssea de camundongos normais. Os camundongos deficientes, após receberem transplante de células de medula óssea de camundongos normais, passaram a desenvolver populações de mastócitos em vários tecidos, inclusive no mesentério. Baseados nestas observações os autores sugeriram que os mastócitos se originam a partir de uma progênie de "stem cell" hematopoiética multipotente. SONODA *et al.*, (1982) também demonstraram que células mononucleares do sangue periférico de camundongos normais +/+, quando injetadas diretamente na pele de camundongos W/W^v, geneticamente deficientes em mastócitos, desenvolvem colônias destas células nos sítios de injeção.

Os precursores de mastócitos não foram identificados morfológicamente, nem na medula óssea e nem nos tecidos, por falta de marcadores específicos (ODARJUK *et al.*, 1989). No entanto, existem sugestões que estes progenitores comprometidos a originar mastócitos, possam ser encontrados no sangue circulante (VALENT *et al.*, 1991). Alguns pesquisadores sugerem que seja uma célula

sanguínea mononucleada a mais provável candidata a precursora de mastócito (VALENT *et al.*, 1989). GALLI *et al.*, (1984) sugerem que células progenitoras possam migrar da medula óssea para vários tecidos e desenvolver diferentes fenótipos sob a influência do ambiente. Alternativamente, as células progenitoras podem se diferenciar em várias células precursoras com fenótipos distintos e migrar para tecidos alvo específicos. VALENT *et al.*, (1991) sugerem que progenitores de mastócitos comprometidos são supostamente originados, no local, por células progenitoras mais imaturas ou por progenitores hematopoiéticos não comprometidos, derivados da medula óssea. Outras investigações sugerem que as células progenitoras parecem ser desprovidas de grânulos e apresentam um espectro único de propriedades funcionais e fenotípicas (JARBOE *et al.*, 1989).

Os mastócitos de roedores podem ser classificados, no mínimo, em duas populações fenotipicamente distintas. Quando estas células são encontradas principalmente na lâmina própria e no epitélio de mucosas são denominadas mastócitos de mucosa (MMC). Os mastócitos encontrados no fluido peritoneal, pele, mesentério, musculatura própria do estômago, são classificados como mastócitos do tecido conjuntivo (CTMC) (ENERBACK *et al.*, 1981). Numerosos relatos documentam a capacidade de certas populações de mastócitos sofrerem alterações fenotípicas a partir de MMC para CTMC e vice-versa (KOBAYASHI *et al.*, 1986). Tal heterogeneidade é regulada por muitos fatores incluindo certas citocinas. Estas citocinas atuam como sinais intercelulares que estimulam a proliferação, diferenciação e maturação dos mastócitos. Atuam ainda, na sua

sobrevivência e modulam suas funções efetoras, como a liberação de mediadores (GALLI *et al.*, 1990). Produtos solúveis de linfócitos e de células semelhantes participam do crescimento da população de mastócitos, como a Interleucina 3 (IL-3). ROTTEM *et al.* (1993) cultivaram células da medula óssea de camundongo na presença de IL-3 e após 4 a 5 semanas, observaram que 85% de todas as células do cultivo eram mastócitos. A interleucina-4 (IL-4) em conjunto com a IL-3, auxilia, "*in vitro*", a proliferação de mastócitos peritoneais (TSUJI *et al.*, 1990). No entanto, quando apenas a IL-4 foi utilizada na ausência de IL-3, houve uma redução no estímulo de proliferação (ROTTEM *et al.*, 1994). A interleucina-9 (IL-9), usada em conjunto com a IL-3, aumenta a proliferação de mastócitos de camundongo cultivados a partir de mastócitos derivados da medula óssea (HULTNER *et al.*, 1990). A IL-10, usada em combinação com IL-3 ou IL-4 aumenta a proliferação de mastócitos (THOMPSON *et al.*, 1991). Juntos estes dados sugerem que a IL-3 é indispensável para o crescimento de mastócitos murinos *in vitro*. No entanto, o processo de maturação dos mastócitos requer fatores adicionais, os quais são obtidos por intermédio das células estromais, responsáveis pela diferenciação dos progenitores de mastócitos e pela manutenção da viabilidade destas células *in vitro*. FURITSU *et al.* (1989) cultivaram células do cordão umbilical de humanos e demonstraram que a diferenciação *in vitro* de mastócitos, a partir de seus progenitores, é induzida por células estromais distintas como os fibroblastos 3T3. Experimentos realizados com camundongos demonstraram os mesmos resultados (GALLI *et*

al.,1990). O fator envolvido na interação das células estromais com os mastócitos, além de identificado, foi clonado e recebeu várias denominações: “stem cell factor” (ZSEBO *et al.*, 1990, MARTIN *et al.*, 1990), “steel factor” (SLF) (WITTE, 1990, WILLIAMS *et al.*, 1992) e “mast cell growth factor” (MGF) (COPELAND *et al.*, 1990, ANDERSON *et al.*, 1990).

A maioria dos estudos sobre a origem, maturação e proliferação dos mastócitos foram realizadas “in vitro” (SCHRADER, *et al.*,1981 e NAKAHATA, *et al.*,1982). No entanto, FAWCETT (1955) estudou o repovoamento do mesentério de rato por mastócitos, após a lise dos mesmos por injeção intraperitoneal de água destilada e observou que, mastócitos jovens contendo poucos grânulos metacromáticos, apareceram no mesentério próximo aos vasos sanguíneos 8 a 12 dias após injeção, sendo que na sexta semana o mesentério já se apresentava totalmente repovoado. MENDONÇA *et al.*, (1986) utilizando o mesmo modelo experimental conseguiram observar mastócitos jovens já no 5º dia após a injeção intraperitoneal de água destilada, localizados próximo aos vasos sanguíneos. Estes autores não encontraram figuras mitóticas durante o repovoamento do mesentério por mastócitos. No entanto, alguns investigadores procuraram detectar a presença de mitoses em mastócitos e associar ao seu processo de proliferação nos tecidos. PAFF *et al.*, (1947), encontraram mitoses em mastócitos maduros de cães com neoplasia. MAXIMOW (1906) observou que mastócitos podem ser encontrados em mitose nos tecidos de vertebrados em raras ocasiões. BENSLEY (1952), mostrou mastócitos em mitose somente após a injeção

subcutânea de histamina. HUNT & HUNT (1957) demonstraram figuras mitóticas em mastócito, corados com azul de toluidina, de mesentério de ratos injetados com o composto 48/80, um agente liberador de histamina. ALLEN (1961) relatou a ocorrência de mitose em mastócitos diferenciados, em apenas uma de dez distensões de mesentério de um único rato, o qual não recebeu nenhum tipo de tratamento. Mais tarde, ALLEN (1962) utilizando autoradiografia e o método de Feulgen- verde de metila observou, em mesentério de rato normal, 0,49% de mastócitos em mitose.

A falta de marcadores específicos para mastócitos e seus precursores dificultam o estudo de proliferação destas células. RIMMER *et al.*, (1984) descreveram sete anticorpos monoclonais, com especificidade para componentes dos grânulos de mastócitos maduros. No entanto, estes anticorpos reconhecem a mesma molécula nas células parenquimais do fígado, células epiteliais dos túbulos renais e eritrócitos maduros de humanos. ODARJUK *et al.*, (1989) produziram o anticorpo monoclonal IWFF2, o qual reconheceu um antígeno na membrana de mastócitos de ratos, porém este mesmo anticorpo também reconheceu o antígeno em outras células do tecido. KINZER *et al.*, (1995) demonstraram que o anticorpo monoclonal (K-1), era específico para proteína de membrana (p-161) de 161kD, expressa em mastócitos de camundongos, contudo esta proteína também é reconhecida em macrófagos.

Na tentativa de obter melhores conhecimentos sobre a funcionalidade do receptor da IgE (Fc ϵ RI), foram produzidos anticorpos monoclonais específicos

para as subunidades: α (BASCIANO *et al.*, 1986), β (BERENSTEIN *et al.*, 1990) e γ (JAMUR & OLIVER, 1996) do receptor. GUO *et al.*, (1989) produziram o anticorpo monoclonal AA4, uma subclasse de IgG que reconhece o α -galactosil derivado dos gangliosídeos G_{D1b} , específico da membrana de mastócitos. Estes anticorpos foram produzidos a partir de células da leucemia basofílica de rato (RBL-2H3) que apresentam homologia aos mastócitos da mucosa (SELDIN *et al.*, 1985; WOLDEMUSSIE & BEAVEN, 1986). OLIVER *et al.*, (1992) demonstraram que o mAb AA4, além de reconhecer mastócitos em todos os tecidos, reconheceu também uma população de células pouco diferenciadas na medula óssea de ratos, que poderiam ser precursoras dos mastócitos. FARACO *et al.*, (1997) foram os primeiros a identificar mastócitos peritoneais bem imaturos utilizando o mAb AA4, durante o repovoamento da cavidade peritoneal de rato, após injeção intraperitoneal de água destilada. HAMAWY *et al.*, (1992) produziram um outro anticorpo monoclonal denominado BGD6 que se liga com proteínas específicas (50-60 kDa) da superfície de mastócitos. Estas proteínas foram encontradas em mastócitos da medula óssea de rato, em todos os estágios de maturação, incluindo células extremamente indiferenciadas (JAMUR *et al.*, 1996).

No presente trabalho utilizamos o mAb BGD6, como marcador de mastócitos, para investigar se o processo de proliferação destas células, durante o repovoamento do mesentério, ocorre por divisão celular.

III – MATERIAL E MÉTODOS

III - MATERIAL E MÉTODOS

01. OBTENÇÃO DO TECIDO

Foram utilizados cerca de 105 ratos albinos Wistar, adultos machos, pesando 250g, fornecidos pelo biotério do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná. O primeiro grupo de animais recebeu uma injeção intraperitoneal, única, de 20 ml de água destilada, aquecida a 37°C (FAWCETT 1955; MENDONÇA *et al.*, 1986). O segundo grupo recebeu injeção intraperitoneal de solução salina 0,9%, e vinte e quatro horas após foi injetado com 4 mg/Kg do peso corporal (KELLY *et al.*, 1978) de Velban - Sulfato de Vimblastina (Eli Lilly do Brasil Ltda, São Paulo) diluída em 1 ml de solução fisiológica. O terceiro grupo de ratos recebeu uma injeção intraperitoneal de água destilada e vinte e quatro horas após, foi também injetado intraperitonealmente com 4 mg/Kg do peso corporal com Sulfato de Vimblastina. O grupo de animais controle foi injetado com solução salina a 0,9%, ou não foi injetado. Os animais foram sacrificados 2 dias após o tratamento inicial.

02. MICROSCOPIA DE CAMPO CLARO

2.1 FIXAÇÃO E COLORAÇÃO COM GIEMSA

Foram retirados os fragmentos do mesentério dos animais experimentais e controle, os quais foram fixados em formol a 10% em PBS (salina tamponada com fosfato), lavados em água destilada, distendidos em lâminas histológicas e secos

em placa aquecedora a 45°C. Na sequência, foi feita a remoção das faixas de tecido adiposo e as lâminas foram hidratadas e coradas com Giemsa, lavadas em água destilada, desidratadas em álcool, diafanizadas em xilol e montadas em Permount. O material foi fotografado em microscópio Zeiss Axiophot.

2.2 QUANTIFICAÇÃO

Foram contados um total de 100.403 núcleos distribuídos aleatoriamente nas “janelas” do mesentério, regiões delimitadas pela faixa de tecido adiposo, perfazendo um total de 1792 campos quantificados, em 51 lâminas. O mesmo número médio de núcleos foi contado em cada grupo experimental estudado. Os valores apresentados referem - se a média entre vários experimentos num mesmo grupo. As contagens foram realizadas em microscópio Zeiss Axiophot com objetiva de imersão de 63x.

03. MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA

3.1 FIXAÇÃO DO MESENTÉRIO POR MICROONDAS

Para este procedimento foi utilizado um forno de microondas convencional (Montgomery Ward mod. 8035) com rendimento máximo de 550 watts de potência e 2450 MHz. Os fragmentos de mesentério foram colocados em um molde de silicone contendo 0,5 ml de formaldeído a 2% (Ladd Research Industries; Burlington, VT) em PBS e irradiados por 12 a 13 segundos. O tempo de fixação pode ser determinado após calibragem do forno de microondas (JAMUR *et al.*, 1995). Após

fixados, os fragmentos foram lavados duas vezes em PBS e permeabilizados em metanol a - 20°C, por 5 minutos. A seguir, os fragmentos foram lavados duas vezes em PBS, lavados em PBS + glicina a 0,1 M e novamente em PBS.

3.2 COLORAÇÃO NUCLEAR

Após a fixação por microondas, alguns fragmentos foram corados por 10 minutos com Sytox Green (Molecular Probes, Eugene, Oregon) numa concentração de 25 nM, em PBS. A seguir, os fragmentos foram lavados em PBS, distendidos em lâminas silenizadas (EM Science, Fort Washington) e, após a remoção das faixas de tecido adiposo, os mesmos foram montados em Fluormont (EM Science).

04. IMUNOMARCAÇÃO

Após fixados como no item 3.1, os fragmentos do mesentério foram incubados em suspensão com o mAb BGD6 (10 µg/ml) por 1 hora, a temperatura ambiente. Este anticorpo reconhece proteínas específicas da superfície celular dos mastócitos. O anticorpo foi diluído em PBS contendo 1% de BSA. No controle foi omitido o anticorpo primário no meio de incubação. Após a incubação, os fragmentos foram lavados com PBS + 1% de BSA e lavados por 30 minutos em PBS. A seguir, incubados por 30 minutos com o anticorpo secundário, fragmento F (ab')₂ de IgG de jumento anti camundongo conjugado com Texas Red (Jackson Immuno Research, Avondale, PA) numa diluição de 1:50 (25 µg/ml) em PBS. Logo após, os fragmentos foram lavados por 10 minutos em PBS e montados em

Fluormont. O material foi fotografado em microscópio (Nikon) e analisado em microscópio confocal (Leica).

IV - RESULTADOS

IV - RESULTADOS

01. MICROSCOPIA DE CAMPO CLARO:

A injeção intraperitoneal de água destilada causa lise e desaparecimento dos mastócitos do mesentério. Com a coloração de Giemsa não foi possível identificar mastócitos nos fragmentos de mesentério obtidos dois dias após a injeção intraperitoneal de água destilada (Fig. 1B, 2C), porém foi possível identificar figuras mitóticas nas células do tecido conjuntivo (Fig. 3C). No mesentério de animais controle foi possível observar a presença de muitos mastócitos irregularmente distribuídos com citoplasma repleto de grânulos, (Fig. 1A, 2A e 3A). Nos animais injetados intraperitonealmente com sulfato de vimblastina foram observados alguns núcleos em divisão celular. Também foram observados mastócitos maduros, semelhantes aos presentes no grupo controle, sendo que alguns apresentaram sinais de desgranulação. (Fig. 2B e 3B). Nos fragmentos de mesentério colhidos, dois dias após a injeção intraperitoneal de água destilada, acompanhada de injeção intraperitoneal de sulfato de vimblastina, foram observadas inúmeras figuras mitóticas (Fig. 2D e 3D).

02. QUANTIFICAÇÃO:

Com os resultados obtidos através da quantificação foi possível identificar diferenças significativas na quantidade de células observadas em divisão celular

nos animais tratados. Nos fragmentos de mesentério de animais controle não foram observadas figuras de mitose nos vários campos analisados (Figs. 4 e 5). No mesentério de animais injetados intraperitonealmente com água destilada, observou-se que 0,46 % dos núcleos estavam em divisão celular (Figs. 4 e 5). Nos animais injetados intraperitonealmente com sulfato de vimblastina, foi possível notar um aumento no número de núcleos em divisão celular, que atingiu 2,64% (Figs. 4 e 5). Nos fragmentos de mesentério colhidos dois dias após a injeção intraperitoneal de água destilada, acompanhada da injeção intraperitoneal de sulfato de vimblastina foi observado que 18,45% das células estavam em mitose (Figs. 4 e 5) e Tabela I. Também foi verificado que a injeção intraperitoneal de sulfato de vimblastina promoveu uma redução no número de mastócitos do mesentério destes animais quando comparados com os dos animais controle. Os animais controle apresentaram 4,27% de mastócitos, enquanto que, apenas 2.03% de mastócitos foram encontrados nos animais injetados intraperitonealmente com sulfato de vimblastina (Tabela II).

03. MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA:

3.1 COLORAÇÃO COM SYTOX GREEN

Com esta coloração os núcleos das células do mesentério e figuras mitóticas puderam ser observadas nos fragmentos de mesentério de animais tratados. Tanto os núcleos como os cromossomos mitóticos apresentaram fluorescência positiva (Fig. 6 e 8).

3. 2 IMUNOFLUORESCÊNCIA

Com o objetivo de identificar se as células que estavam em mitose eram mastócitos, os fragmentos do mesentério dos animais injetados intraperitonealmente com água destilada, acompanhada da injeção intraperitoneal de sulfato de vimblastina, foram imunomarcados com o mAb BGD6. As células positivas para o anticorpo monoclonal BGD6 apresentaram fluorescência positiva na membrana celular (Fig. 9) Quando os fragmentos imunomarcados foram corados com Sytox Green, foi possível observar nas figuras mitóticas os cromossomos fluorescentes (Figs.7,10,12,13). Com a dupla marcação foi possível identificar que a maioria das figuras mitóticas pertencia aos mastócitos, pois estas também estavam imunomarcados pelo mAb BGD6 (Fig. 7). Na ausência do anticorpo primário não foi possível identificar as células, pela falta de marcação (Fig 11).

A resolução da microscopia confocal, permitiu visualizar cromossomos individualizados no interior das células e, principalmente, identificar a marcação pontuada na membrana celular, típica do mAb BGD6, específico para mastócito (Fig.12). A imagem possibilitou ainda, avaliar o tamanho destas células, as quais apresentam dimensões próximas às do núcleo das células mesoteliais (Fig 12). A figura 13 mostra uma visão lateral da mesma célula, que foi girada a 90°. Nesta imagem é possível observar a co-localização da proteína específica para mastócitos, distribuída somente na superfície celular, enquanto os cromossomos são observados no interior da célula. Esta informação confirma ainda, que marcação do mAb BGD6 é restrita à membrana plasmática.

V – FIGURAS

FIG. 01 - Mesentério corado com Giemsa.

A - Animal controle. Aspecto de uma "janela" do mesentério. Observar a grande quantidade de mastócitos (setas).
Aumento: 115 x.

B - Fragmento observado dois dias após injeção intraperitoneal de água destilada. Notar ausência de mastócitos.
Aumento: 115 x.

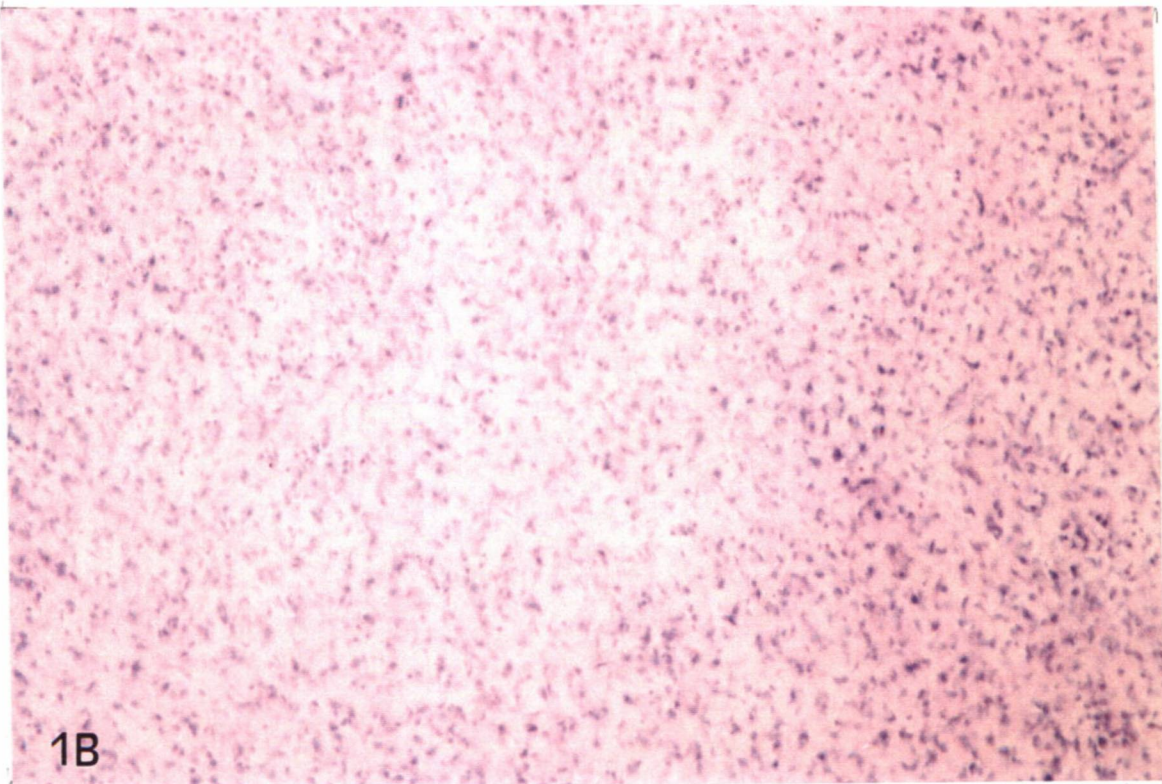
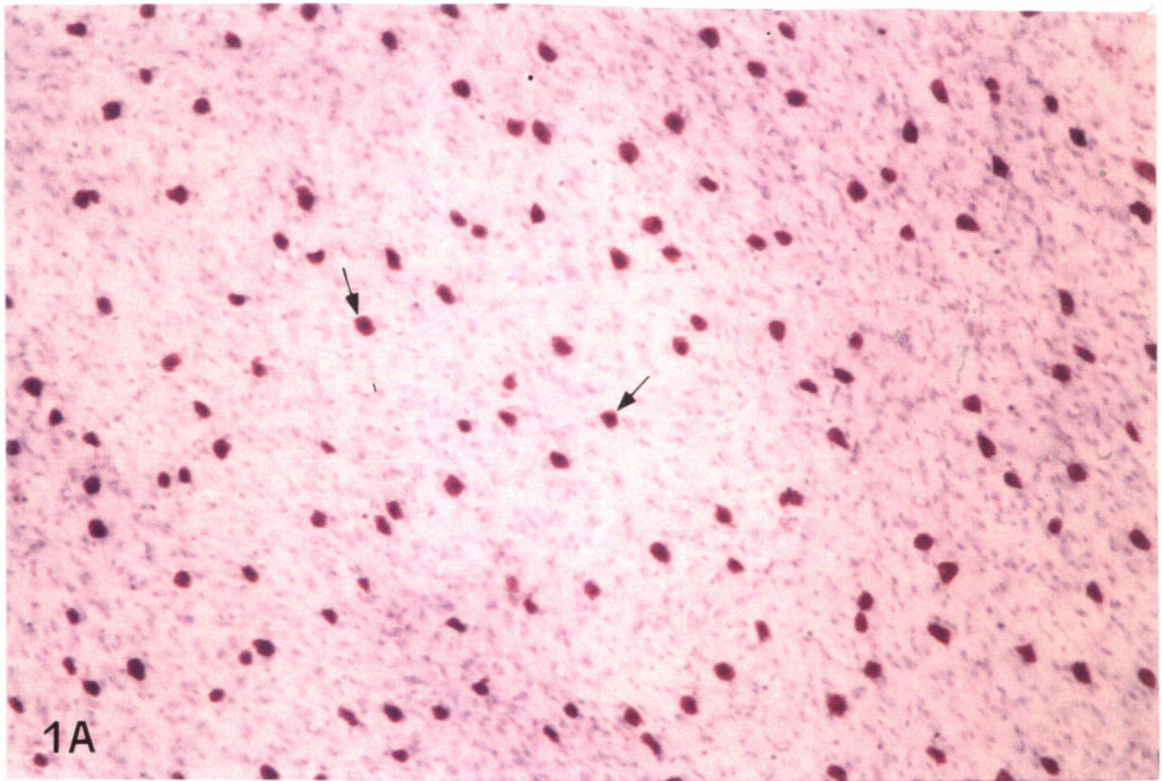


FIG. 02 - Mesentério corado com giemsa

A - Animal controle. Observar mastócitos maduros com citoplasma repleto de grânulos (setas).

Aumento: 225 x.

B - Animais sacrificados dois dias após a injeção intraperitoneal de sulfato de vimblastina. Observar mastócitos maduros (seta).

Aumento: 225 x.

C - Dois dias após a injeção intraperitoneal de água destilada. Notar a ausência de mastócitos maduros.

Aumento: 225 x.

D - Após a injeção intraperitoneal de água destilada e de injeção intraperitoneal de sulfato de vimblastina. Notar as figuras mitóticas (cabeça de setas) e ausência de mastócitos maduros.

Aumento: 225 x.

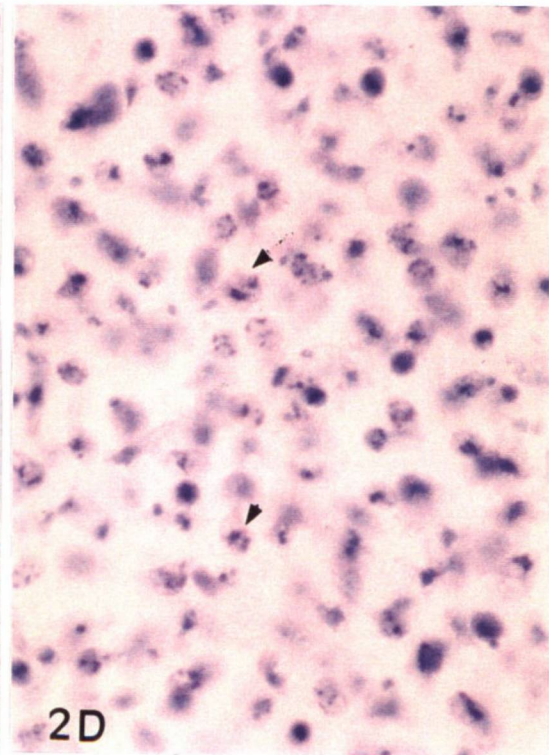
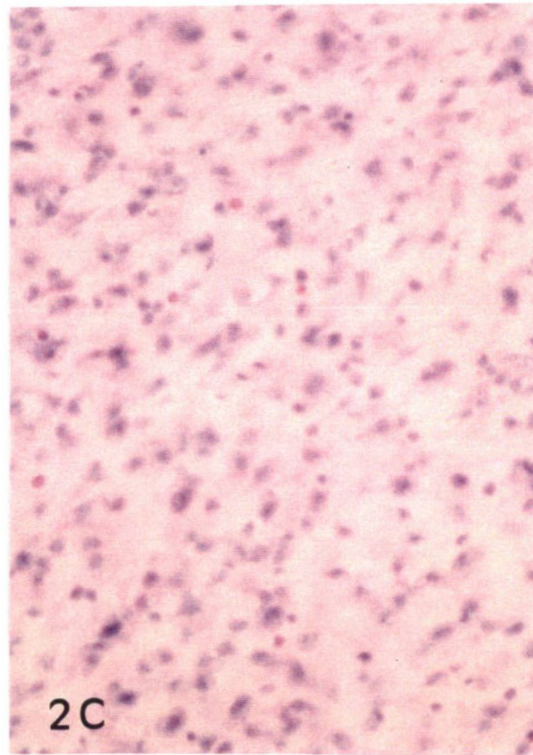
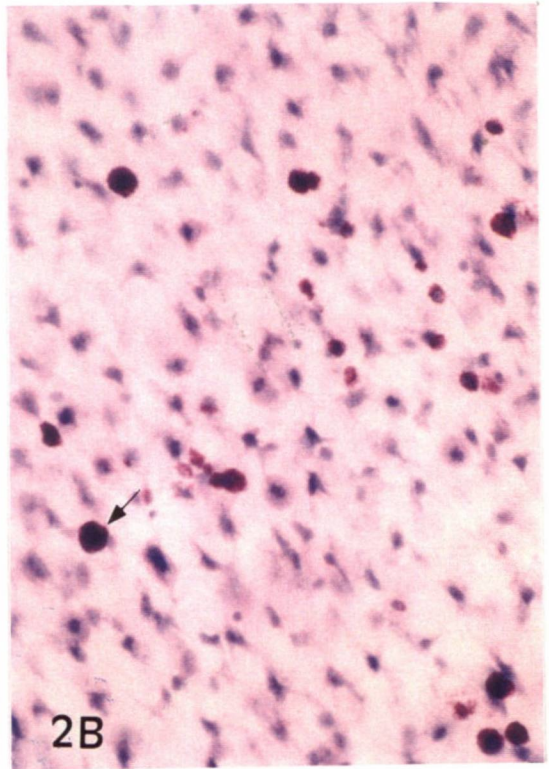
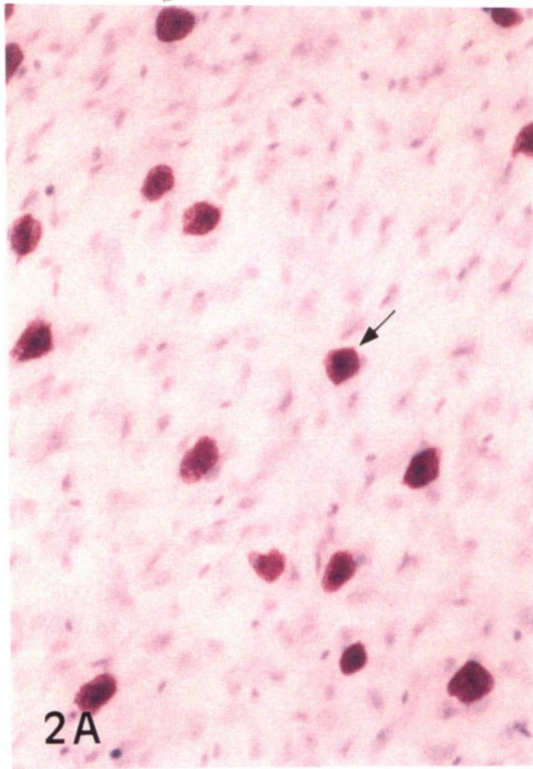


FIG. 03. Mesentério corado com Giemsa

A - Animal controle. Observar mastócitos maduros intactos (seta).
Aumento: 450x.

B - Dois dias após a injeção intraperitoneal de sulfato de vimblastina. Notar os mastócitos maduros intactos (setas) e alguns com sinais de desgranulação (cabeça de seta). Notar poucas figuras mitóticas.
Aumento: 450x.

C - Dois dias após a injeção de água destilada. Notar a ausência de mastócitos maduros. Observar núcleos em mitose (seta).
Aumento: 450x.

D - Dois dias após a injeção intraperitoneal de água destilada e de injeção intraperitoneal de sulfato de vimblastina. Notar inúmeros núcleos em mitose (setas).
Aumento: 450x.

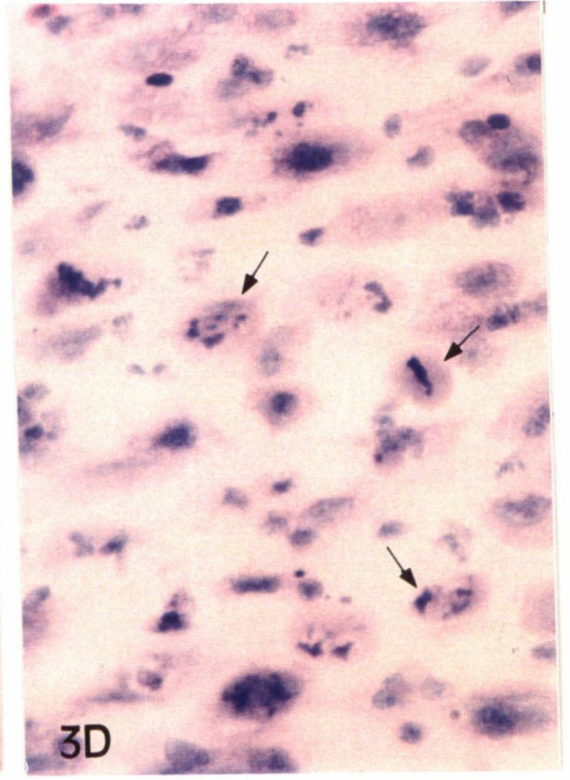
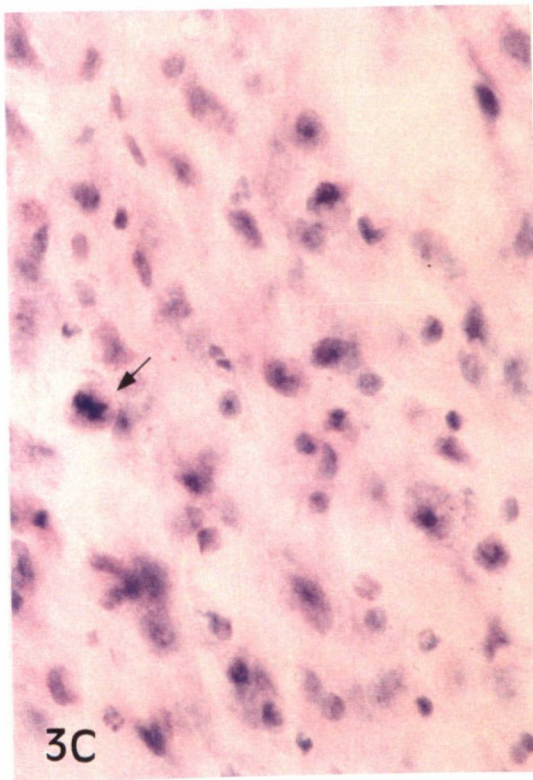
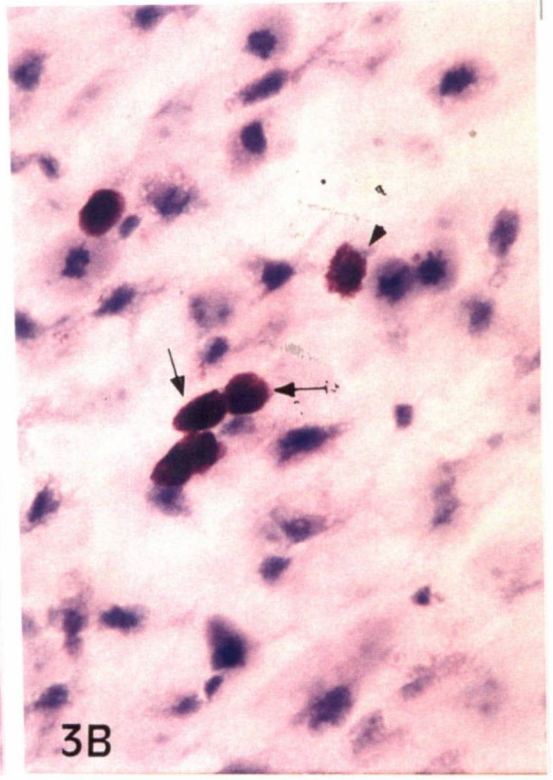
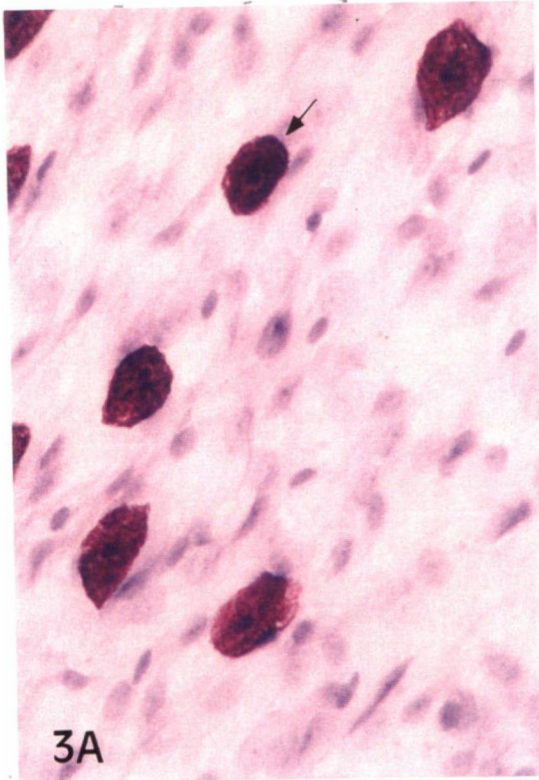
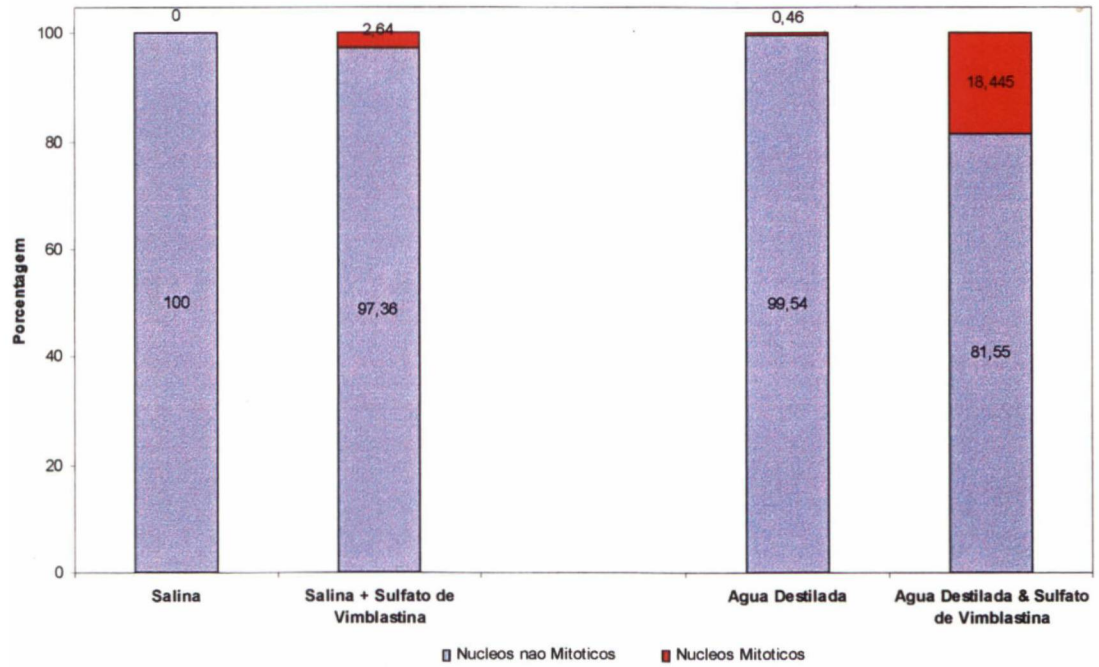


FIG. 04 - Quantificação de núcleos mitóticos e não mitóticos do mesentério de animais controle e tratados. Ocorre um aumento sensível no número de figuras mitóticas dos animais que foram injetados com salina e com vimblastina. Este aumento no número de mitoses é ainda maior nos animais injetados com água destilada.

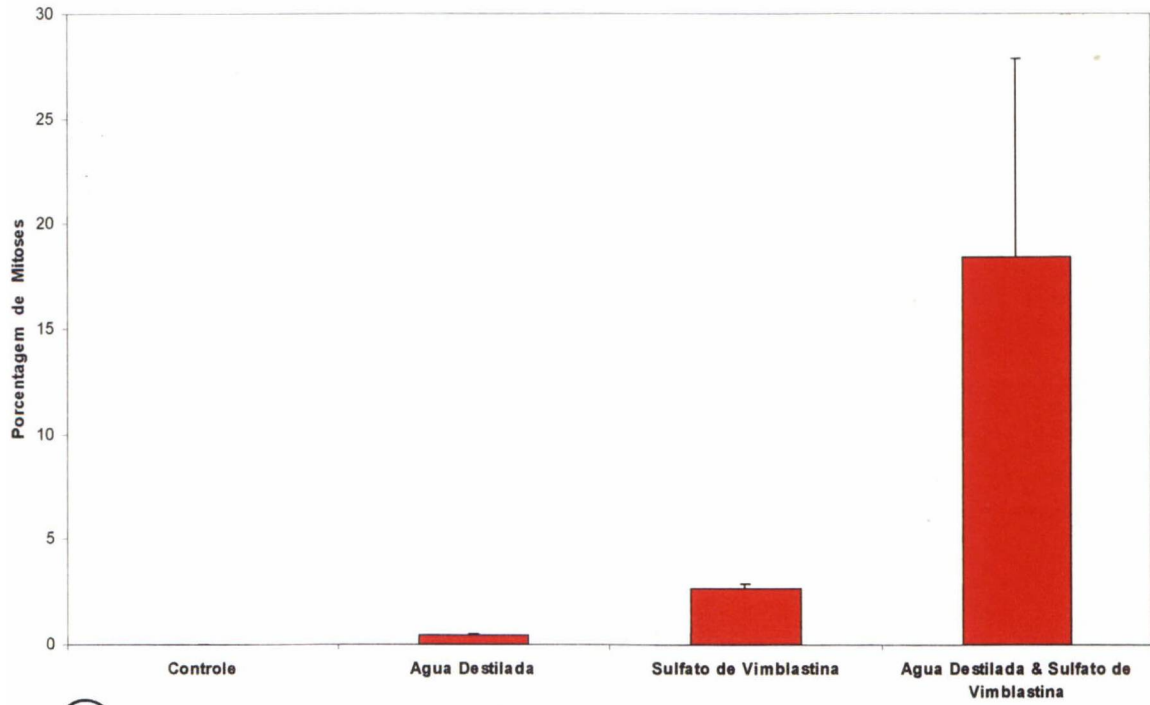
A Injeção de Vimblastina Interrompe o Processo Mitótico



4

Fig. 05 - Comparação do número de mitoses, durante o repovoamento de mesentério de ratos após a lise pela injeção intraperitoneal de água destilada, em relação aos animais controle. Nos animais injetados com salina, a injeção de vimblastina causa um discreto aumento no número de mitoses. No entanto, um aumento significativo de figuras mitóticas ocorre em animais que receberam previamente, a injeção de água destilada.

A Injeção de Água Destilada Resulta no Aumento de Mitoses



5

FIG. 06, 07 - Mesentério observado dois dias após injeção de água destilada e 24 horas após injeção de sulfato de vimblastina.

6 - Após a coloração com Sytox Green observar os núcleos mitóticos (cabeça de seta).
Aumento: 350 x.

7 - A imunomarcação com mAb BGD6 (vermelho) permite demonstrar que os núcleos mitóticos corados com Sytox Green (verde), pertencem aos mastócitos (cabeça de setas).
Aumento: 350 x.

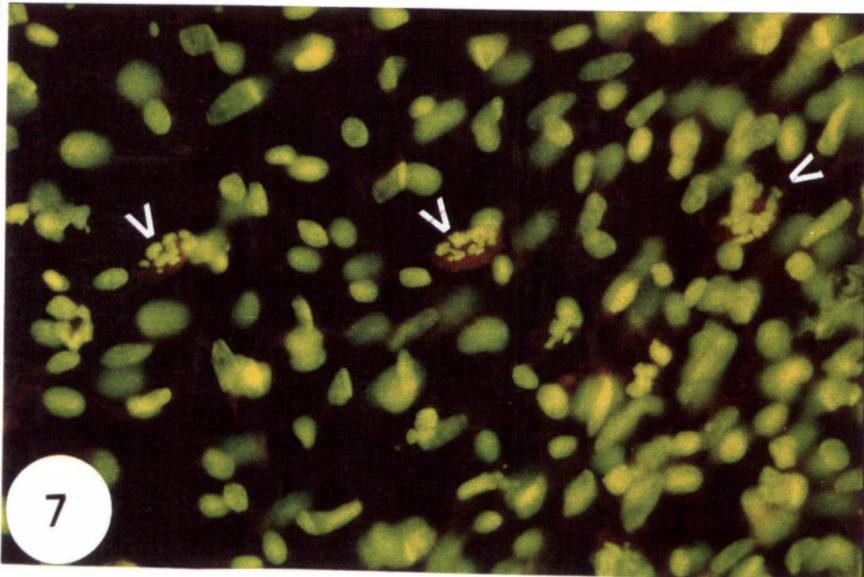
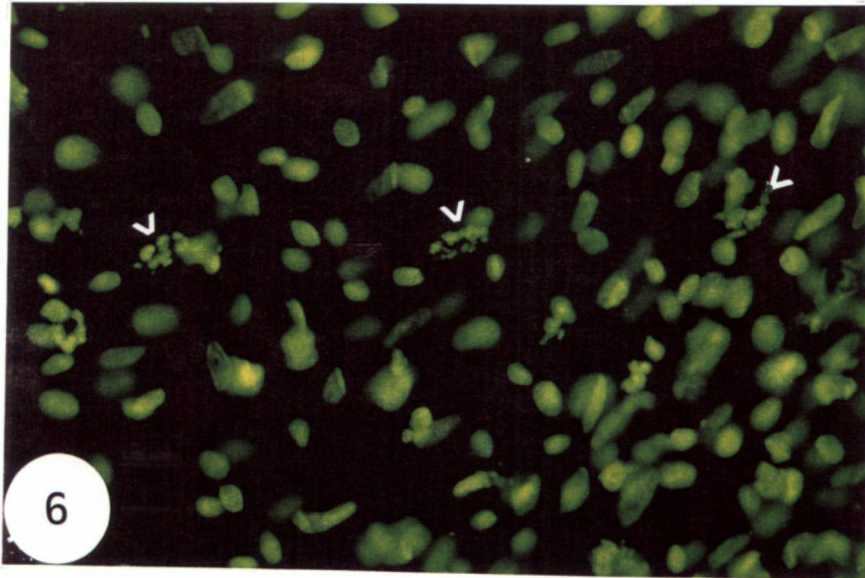


FIG. 08-10 - Mesentério observado dois dias após a injeção intraperitoneal de água destilada, seguida de injeção intraperitoneal de sulfato de vimblastina.

8 - Observar a figura mitótica fluorescente, após coloração com Sytox Green (cabeça de seta).

Aumento: 700 x.

9 - Mastócito imunomarcado com mAb BGD6. Notar imunofluorescência positiva para o BGD6, na superfície celular (cabeça de seta).

Aumento: 700 x.

10 - Detalhe de um mastócito em divisão celular. Notar intensa fluorescência do núcleo mitótico, revelada pelo Sytox Green, e a superfície celular positiva ao BGD6 (cabeça de seta).

Aumento: 700 x.

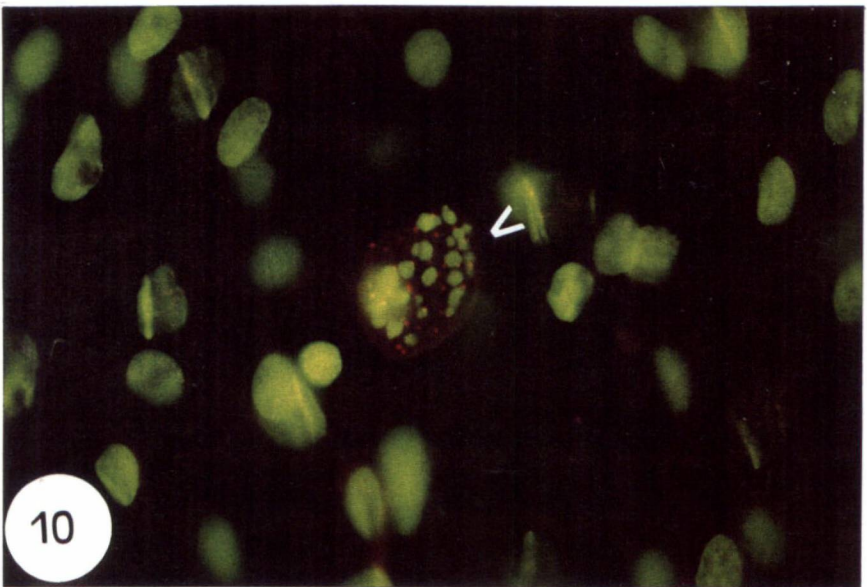
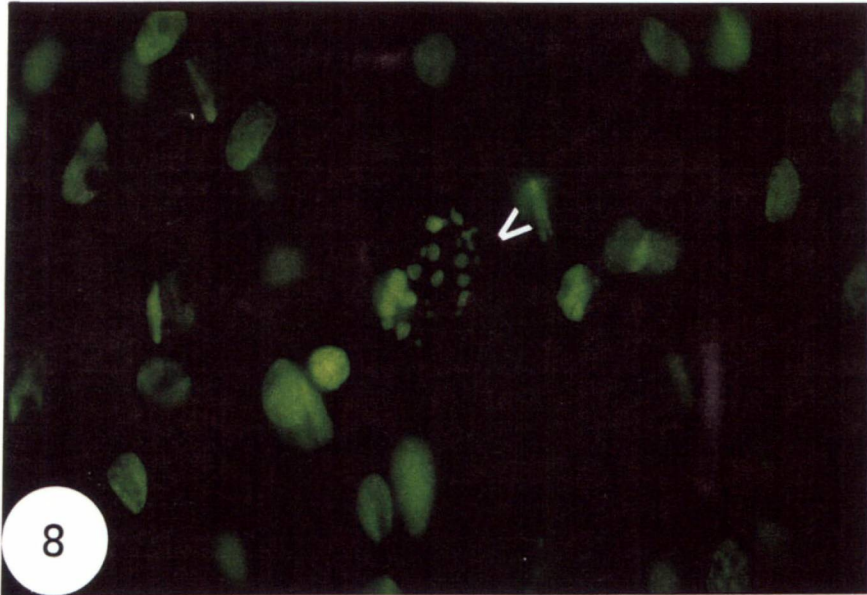


Fig. 11 - Mesentério incubado na ausência de anticorpo primário. Notar ausência mastócitos marcados.
Aumento: 325 x

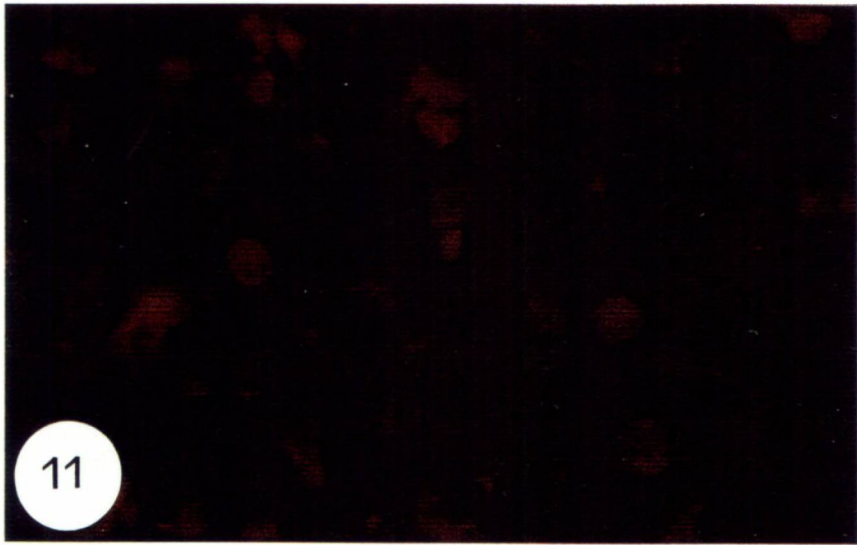


FIG. 12, 13 - Mesentério observado dois dias após a injeção intraperitoneal de água destilada, seguida de injeção intraperitoneal de sulfato de vimblastina. Imagens observadas ao microscópio confocal.

12 - Observar um mastócito imunomarcado na superfície com BGD6 (seta). Notar a distribuição dos cromossomos no interior da célula (cabeça de seta).

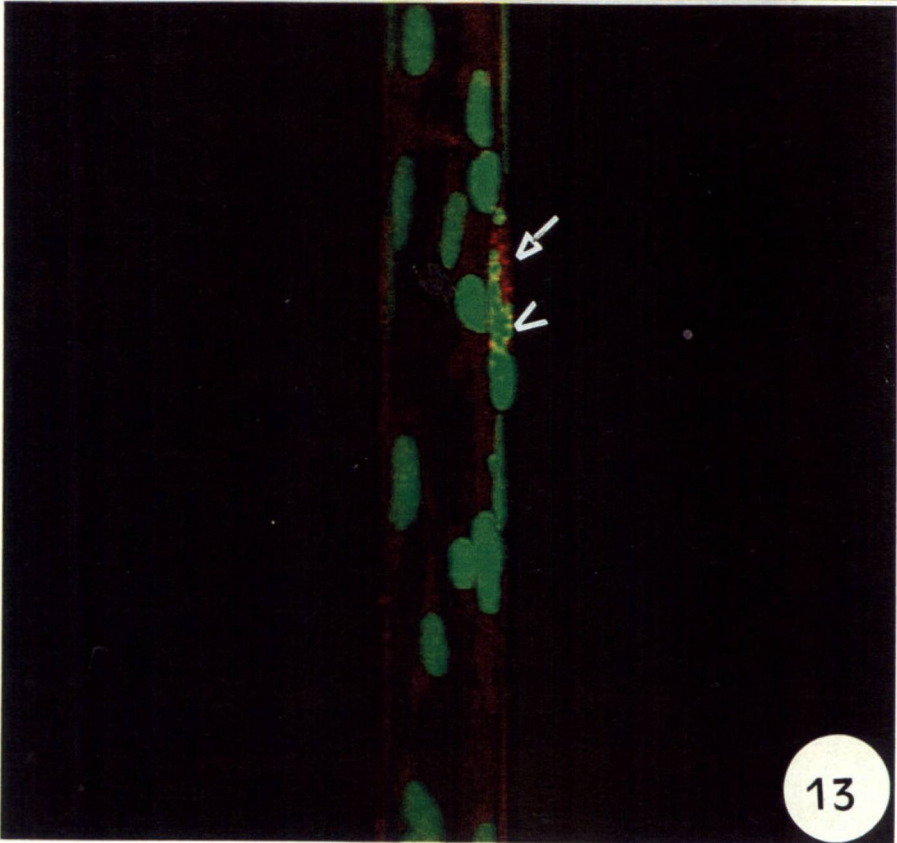
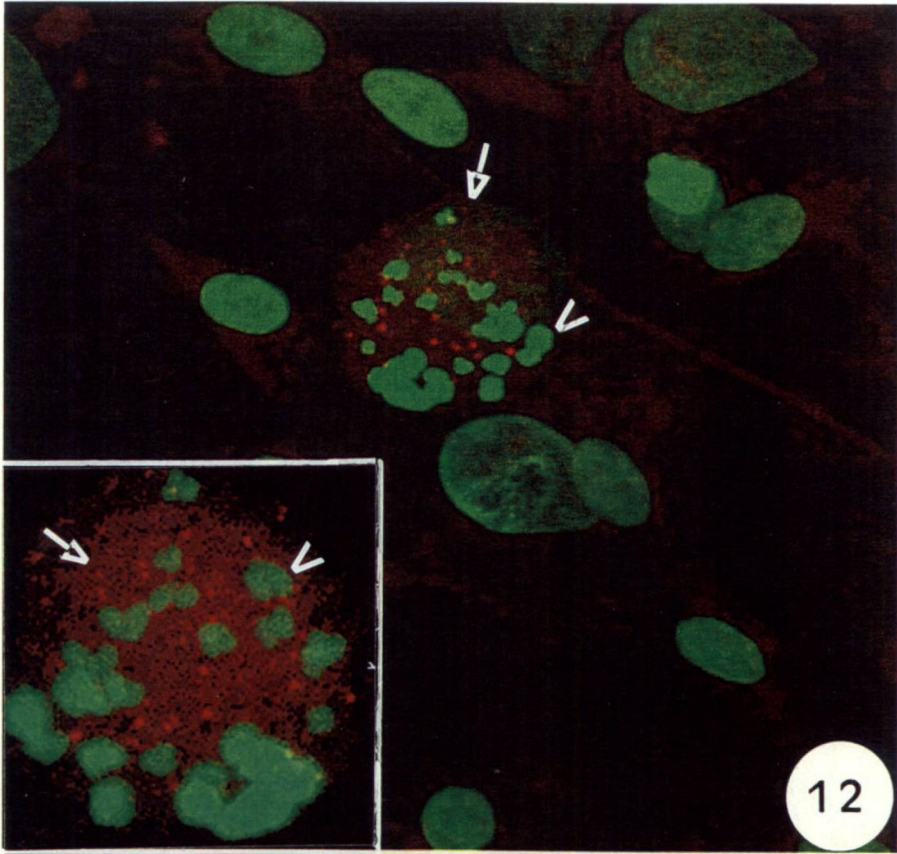
Aumento: 1500 x

Inset: Mostra a distribuição pontuada característica da marcação do BGD6, na membrana do mastócito (seta). Notar os cromossomos individualizados (cabeça de setas).

Aumento: 2250 x

13 - Notar a distribuição da proteína na superfície celular (seta), enquanto os cromossomos corados com Sytox Green estão localizados intracelularmente (cabeça de seta). Vista lateral da célula observada na Figura 12.

Aumento: 1500 x



VI – DISCUSSÃO

VI – DISCUSSÃO

Com a utilização do anticorpo monoclonal BGD6, que reconhece proteínas específicas da superfície de mastócitos, foi possível demonstrar que os mastócitos imaturos que estão repovoando o mesentério, após a injeção intraperitoneal de água destilada, proliferam por divisão mitótica. JAMUR *et al.* (1996) utilizando anticorpo monoclonal BGD6, específico para proteínas da superfície de mastócitos, isolaram uma população pura de mastócitos da medula óssea em todos os estágios de maturação. Utilizando este mesmo anticorpo conseguimos, pela primeira vez, identificar os mastócitos imaturos, desprovidos de grânulos metacromáticos, durante o repovoamento do mesentério de rato, 2 dias após a injeção intraperitoneal de água destilada. Além de identificar as células precursoras de mastócitos foi possível investigar o seu mecanismo de proliferação.

Os estudos realizados por FAWCETT (1955) e MENDONÇA *et al.* (1986) demonstraram que o repovoamento do mesentério de ratos, após a lise dos mastócitos pela injeção intraperitoneal de água destilada, ocorre por mastócitos jovens ou imaturos que surgem num período superior a 5 dias. Estes mastócitos imaturos só puderam ser identificados por possuírem alguns grânulos metacromáticos. No entanto, MORENO *et al.* (1997) utilizando o mesmo modelo experimental, identificaram 2 dias após a injeção de água destilada, mastócitos peritoneais bem imaturos, desprovidos de grânulos metacromáticos. Estas células, porém, foram identificadas graças a imunomarcação com o anticorpo monoclonal AA4, específico para gangliosídeos de mastócitos (OLIVER *et al.*, 1992). A

caracterização dos mastócitos em seus estágios iniciais de maturação era dificultada pela falta de marcadores específicos (VALENT *et al.*, 1989; ODARJUK, *et al.*, 1989). A maioria das investigações eram baseadas no estágio de maturação dos grânulos e utilizavam métodos histoquímicos (COMBS *et al.*, 1965), técnicas citoquímicas ultraestruturais (JAMUR *et al.*, 1986; JAMUR & VUGMAN, 1988a) e o padrão do conteúdo granular (DVORAK, 1991). Desta forma, só poderiam ser identificados mastócitos que já apresentassem grânulos. Anteriormente a este estudo, portanto, não havia métodos específicos para a identificação de mastócitos do mesentério, em estágios iniciais de diferenciação. Muitos anticorpos foram descritos até então, porém não eram específicos para mastócitos, uma vez que marcavam outros tipos celulares. RIMMER *et al.* (1984) descreveram sete anticorpos monoclonais que, além de marcarem componentes dos grânulos de mastócitos, também reconheciam o mesmo antígeno em células parenquimais do fígado, células epiteliais dos túbulos renais e eritrócitos maduros de humanos. Outro anticorpo monoclonal, o IWFF2, além de reconhecer um antígeno na superfície de mastócitos, imunomarcava também outras células do tecido (ODARJUK *et al.*, 1989). KINZER *et al.* (1995) produziram o anticorpo monoclonal (K-1) específico para proteína de membrana (p-161) de mastócitos de camundongos, contudo, esta proteína também era encontrada em macrófagos.

A falta de marcadores específicos para mastócitos também comprometeu os estudos relacionados com a origem e a migração destas células. Como já foi

demonstrado por KITAMURA *et al.* (1977; 1981) e NAKAHATA (1982), a origem dos mastócitos ocorre a partir da progênie da uma "stem cell" hematopoiética multipotente. Mais tarde, SCHRADER *et al.* (1981) e YUEN *et al.* (1988) cultivaram células da medula óssea e do cordão umbilical de humanos, em ágar semi-sólido e observaram que estas células formavam colônias com características de mastócitos. Estes achados sugerem que o repovoamento do mesentério e da cavidade peritoneal deve ocorrer através de precursores de mastócitos que migram da medula óssea para estes locais. MORENO *et al.* (1997) confirmaram esta hipótese demonstrando que a linhagem de mastócitos imaturos da medula óssea decresce, durante o repovoamento da cavidade peritoneal.

Até o presente, nenhum estudo havia demonstrado que os precursores de mastócitos se dividem no tecido. Novamente, a falta de marcadores específicos para mastócitos, tornava difícil a observação de mitose nestas células. Alguns estudos tentaram demonstrar figuras mitóticas em mastócitos maduros de mesentério de rato, com métodos de coloração de rotina. No entanto, estes resultados são de difícil interpretação (ALLEN, 1961). Este autor já mencionava a dificuldade de demonstrar mitoses em precursores de mastócitos, pela falta de grânulos metacromáticos. ALLEN (1962) tentou ainda, estudar mitoses destes mastócitos utilizando a timidina tritiada, porém não observou mitoses marcadas. HUNT & HUNT (1957), descreveram figuras mitóticas em mastócitos do mesentério de ratos que haviam recebido injeção intraperitoneal do agente liberador de histamina 48/80. PADAWER (1957) contestou, declarando que

estas células observadas em mitose poderiam ser fibroblastos, os quais se dividiam após ingestão de grânulos metacromáticos das células danificadas. Ainda, JAMUR & VUGMAN. (1988b), demonstraram que os mastócitos submetidos a ação do composto 48/80, não são lisados e podem ressintetizar seus grânulos, o que não explica uma reposição destas células por divisão celular. COMBS *et al.* (1965) descreveram mitose em mastócitos imaturos de ratos, no período embrionário e neonatal, utilizando coloração de azul de alcian mais safranina, portanto estas células já possuíam grânulos. YONG (1980) utilizando o mesmo método histoquímico, associado à técnica de autoradiografia, observou resultados semelhantes em ratos recém nascidos e observou baixa incidência de atividade mitótica, em ratos adultos.

A utilização do bloqueador mitótico, sulfato de vimblastina, permitiu quantificar e demonstrar um grande número de células em mitose. O mecanismo de ação do sulfato de vimblastina está relacionado com a inibição da formação do fuso mitótico. Ao se ligar aos dímeros da tubulina, a vimblastina previne sua polimerização em microtúbulos, bloqueando a divisão celular que, na maioria das vezes, estaciona no período de metáfase (SIRAGANIAN, 1988). Os resultados obtidos com a quantificação dos fragmentos de mesentério dos animais que receberam intraperitonealmente água destilada, seguida de injeção intraperitoneal de sulfato de vimblastina, demonstraram um índice mitótico superior ao observado naqueles animais injetados intraperitonealmente apenas com água destilada. Inicialmente estes resultados sugerem que as células que apareceram durante o

repovoamento do mesentério, após a lise pela injeção intraperitoneal de água destilada, sejam as precursoras de mastócitos. Estas sugestões se baseiam no fato de que a população de mastócitos que desapareceu pela lise da água destilada deveria ser reposta. A imunomarcção do mesentério com o anticorpo monoclonal BGD6, associada com a coloração pelo Sytox Green, veio a confirmar estes dados, demonstrando que as células imunomarcadas com o anticorpo estavam em mitose.

Um outro efeito do sulfato de vimblastina, observado, foi a redução do número de mastócitos maduros do mesentério dos animais injetados intraperitonealmente com esta substância, em relação aos animais controle. Alguns dos mastócitos observados, também apresentavam sinais de desgranulação. Como já foi descrito, os mastócitos possuem microtúbulos que estão inseridos na membrana celular e nos grânulos, podendo ativar a secreção dos grânulos ou promover o movimento dos mesmos (SIRAGANIAN, 1988). Desta forma, sugerimos que o sulfato de vimblastina possa promover uma alteração nos microtúbulos dos mastócitos maduros, provocando uma desgranulação mais severa em algumas destas células, as quais deixaram de ser identificadas.

VII – CONCLUSÕES

VII - CONCLUSÕES

01. Utilizando o anticorpo monoclonal BGD6 foi possível identificar precursores de mastócitos durante o repovoamento do mesentério de ratos.

02. Os mastócitos bem imaturos, identificados pelo mAb BGD6, proliferam por divisão celular para repovoar o mesentério.

03. A utilização do sulfato de vimblastina permitiu a quantificação e a análise do processo de proliferação de mastócitos.

ANEXOS

TABELA I. Quantificação dos núcleos mitóticos e não mitóticos do mesentério de animais controle e tratados durante o repovoamento, após a lise pela água destilada.

	Total de Núcleos	Núcleos Não Mitóticos	Núcleos Mitóticos	% Núcleos Não Mitóticos	% Núcleos Mitóticos
Controle	12.743	12.743	0	100	0
Sulfato de Vimblastina	11.633	11.326	307	97.36	2.64
Água Destilada	15.302	15.230	72	99.54	0.46
Água Destilada + Sulfato de Vimblastina	10.287	8.371	1.916	81.56	18.45

TABELA II. Diferença entre o número de mastócitos maduros observados nos animais controle e nos animais injetados somente com sulfato de vimblastina

	Total de Células	Total de Mastócitos	% de Mastócitos
Controle	12.743	544	4,27
Sulfato de Vimblastina	11.633	236	2.03

**REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS**

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLEN, A. M. Mitosis in mast cells of a rat. **Anat. Rec.** v. 139, p. 13 - 21, 1961.
- ALLEN, A. M. Deoxyribonucleic acid syntesis and mitosis in mast cells of the rat. **Lab. Invest.**, v. 11, n. 2, p. 188 - 191, 1962.
- ANDERSON, D. M.; LYMAN, S. D.; BAIRD, A.; WIGNALL, J. M.; EISENMAN, J.; RAUCH, C.; MARCH, C. J.; BOSWELL, H. S.; GIMPEL, S. D.; COSMAN, D.; WILLIAMS, D.E. Molecular cloning of mast cell growth factor, a hemapoietin that is active in both membrane bound and soluble forms. **Cell.**, v. 63, p. 235 - 243, 1990.
- 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.
- BENDITT, E. P.; WONG, R.; ARASE, M. 5 Hydroxytryptamine in mast cells. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.** , v. 90, p. 303 - 304, 1955.
- BENSLEY, S. H. On the origin of mast cell. **Anat. Rec.**, v. 112, p. 310, 1952 (abstract).
- BERENSTEIN, E. H.; KOH, C. Y.; FISCHLER.; SIRAGANIAN, R. P. Monoclonal antibodies to the hight affinity FcεR do not release histamine. **FASEB**, v. 4, n. 7, p. 1054, 1990.
- CHEN, X. J; ENERBÄCK, L. Application of an immunocolloid gold technique for the ultraestrutural demonstration of IgE - receptor complexes on rat mast cells. **APMIS**, v. 102, p. 729 - 735, 1994.
- COMBS, J. W.; LAGUNOFF, D.; BENDITT, E. P. Differentiation and proliferation of embryonic mast cells of the rat. **J. Cell. Biology.**, v. 25, p. 577 - 592, 1965.
- COPELAND, N. G.; GILBERT, G. J.; CHO, B. C.; DONOVAN, P. J.; JENKINS, N. A.; COSMAN, D.; ANDERSON, D.; LYMAN, S. D.; WILLIAMS, D. E. Mast cell growth factor maps near the Steel locus on mouse chromosome 10 and is deleted in a number of Steel alleles. **Cell.**, v. 63, p. 175 - 183, 1990.
- COUPLAND, R. E.; HEATH, I. D. Chromaffin cells, mast cells and melanin. II The chromaffin cells of the liver capsule and gut in ungulates. **J. Endocrinol.**,v. 22, p. 71 - 76, 1966.

- DVORAK, A. M. **Blood Cell Biochemistry. Basophil and Mast Cell Degranulation and Recovery.** Plenum Press, NY., v. 4, 1991.
- ENERBACK, L. The gut mast cell. **Monogr. Allergy.**, v. 17, p. 222 - 232, 1981.
- 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.
- FALCK, B.; OWMAN, C. A detailed methodological description of the fluorescence method for the cellular demonstration of biogenic monoamines. **Acta. Univ. Ludensis** v. 2, p. 7, 1965.
- 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.
- FAWCETT, D. W. An experimental study of mast cell degranulation and regeneration. **Anat. Rec.**, v. 121, p. 29 - 43, 1955.
- FURITSU, T.; SAITO, H.; DVORAK, A. M.; SCHWARTZ, L. B.; IRANI, A-MA; BURDICK, J.F.; ISHIZAKA, K.; ISHIZAKA, T. Development of human mast cells in vitro. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 86: p.10039 - 10043, 1989.
- GALLI, S. J; DVORAK, H. F; DVORAK, . M. Basophils and Mast Cells. Morphologic insights into their biology secretory patterns and function. **Prog. Allergy.**, v. 34, p. 1, 1984.
- GALLI, S. J. New approaches for the analysis of mast cell maturation, heterogeneity, and function. **Federation Proceedings.**, vol. 46, n. 5, p. 1906 - 1914, 1986.
- 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. New concepts about the mast cell. **New England J. Med.** v. 328, n. 4 p. 257 - 264, 1993.
- 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.
- HAMAWY, M. M.; OLIVER, C.; SIRAGANIAN, R. P. Inhibition of IgE binding to RBL-2H3 cells by a monoclonal antibody (BD₆) 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.
- HULTNER, L.; DRUEZ, C.; MOELLER, J. Mast cell growth enhancement activity (MEA) is structurally related and functionally identical to the novel mouse T cell growth factor P₄₀ TCGFIII. **Eur. J. Immunol.**, v. 20, p. 1413 - 1416, 1990.
- HUNT, T. E.; HUNT, E. A. Mitotic activity of mast cells. **Proc.Soc. Exp. Biol. Med.**, v. 94, p. 166 - 169, 1957.
- ISHIZAKA, T.; ISHIZAKA, K. Activation of mast cells for mediator release through IgE receptors. **Prog. Allergy.**, v.34, p.188 - 235, 1984.
- JAMUR, M. C.; VUGMAN, I.; HAND, A. R. Ultrastructural and cytochemical studies of acid phosphatase and trimetaphosphatase in rat peritoneal mast cells developing in vivo. **Cell. Tissue Res.**, v. 244, p. 557 - 563, 1986
- JAMUR, M. C.; VUGMAN, I. Cytochemical demonstration of basic proteins in rat peritoneal mast cells maturation. **Cell. Mol. Biol.**, v. 34, n.1, p. 27 - 31, 1988a.
- JAMUR, M. C.; VUGMAN, I. Rat peritoneal mast cell regranulation and acid phosphatase and trimetaphosphatase activity induced after stimulation by 48/80. A fluorescence, ultrastructural and cytochemical study. **Cell. Mol. Biol.**, v. 34, n. 3, p. 231 - 237, 1988b.
- 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.; HAMAWY, M. M.; GRODZKI, A. C. G.; SIRAGANIAN, R. P.; OLIVER, C. Identification of a putative mast cell precursor using mast cell specific antibody BGD6. **Mol. Biol. Cell.**, p. 151 a 1996.

- JAMUR, M. C.; OLIVER, C. Binding of antibody to the gamma subunit of Fc ϵ RI in rat basophilic leukemia cells results in morphological changes without inducing histamine release. **Cell. Tissue Res.**, v. 284, p. 153 - 159, 1996.
- JAMUR, M. C.; GRODZKI, A. C. G.; MORENO, A. N.; SWAIM, W. D.; SIRAGANIAN, R. P.; OLIVER C. Immunomagnetic isolation of rat bone marrow derived and peritoneal mast cells. **J. Histochem. Cytochem.**, v. 45, n. 12, p. 1715 - 1722, 1997.
- JARBOE, D. L.; MARSHALL, J. S.; RANDOLPH, T. R.; KUKOLJA, A.; HUFF, T. F. The mast cell - committed progenitor.I. Description of a cell capable of IL - 3 - independent proliferation and differentiation without contact with fibroblast. **J. Immunol.**, v.142, n. 7, p. 2405 - 2417, 1989.
- KELLY, R. B.; OLIVER, C; HAND, A. R.; The effects of vinblastine on acinar cells of the exorbital lacrimal gland of the rat. **Cell Tissue Res.**, v. 195, p. 227 - 237, 1978.
- KINZER, C. A.; KEEGAN, A. D.; PAUL, W. E. Identification of Fc ϵ RI^{neg} mast cells in mouse bone marrow cell cultures. Use of a Monoclonal Anti- p161 Antibody. **J. Exp. Med.**; v. 182, p. 575 - 579, 1995.
- KITAMURA, Y.; SHIMADA, M.; HATANAKA, K.; MIYANO, Y. Development of mast cells from grafted bone marrow cells in irradiated mice. **Nature.**, v. 268, p. 442 - 443, 1977.
- KITAMURA, Y.; MATSUDA, H; HATANAKA, K. Clonal nature of mast - cell cluster formed in W/W^v mice after bone marrow transplantation. **Nature.**, v. 281, p. 154 - 155, 1979.
- KITAMURA, Y; YOKOYAMA, M; MATSUDA, H; OHNO, T; MORI, K. J.Spleen colony forming cell as commom precursor for tissue mast cells and granulocytes. **Nature.**, v. 291, 159 - 160, 1981.
- KOBAYASHI, T.; NAKANO, T.; NAKAHATA, T.; ASAI, HIDEKAZU.; YAGI, Y.; TSUJI, K.; KOMIYAMA, A.; AKABANE, T. Formation of mast cell colonies in methylcellulose by mouse peritoneal cells and differentiation of these cloned cells in both the skin and the gastric mucosa of W/W^v mice: evidence that a common precursor can give rise to both "connective tissue - type" and "mucosal" mast cells. **J. Immunol.**, v. 136, n. 4, p. 1378 - 1384, 1986.
- MARTIN, F. H.; SUGGS, S.V.; LANGLEY, K. E.; LU, H. S.; TING, J.; OKINO, K. H.; MORRIS, P. H, McNIECE, I. K.; JACOBSON, F. W.; MENDIAZ, E. A.; BIRKETT, N. C.; SMITH, K. A.; JOHNSON, M. J.; PARKER, V. P.; FLORES, J. C.; PATEL, A. C.; FISHER, E. F.; ERJAVEC, H. O.; HERRERA, C. J.; WYPPYCH, J.;

- SACHDEV, R. K.; POPE, J. A LESLIE, I.; WEN, D.; LIN, C. H.; CUPPLES, R. L.; ZSEBO, K. M. Primary structure and functional expression of rat and human stem cell factor DNAs. **Cell**. v. 63, p. 203 - 221, 1990.
- MAXIMOW, A. Uber entzündliche Bindegewebsneubildung beim Axolotl. **Beitr. Path. Anat.**; v. 39, p. 333 - 372, 1906.
- 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.; KALINER, M.; DONLON, M. A. The mast cell. **Crit. Rev. Immunol.**, v. 2, p. 23 - 74, 1981.
- 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.
- 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.**, 8 (nov) 456 a, 1997.
- NAKAHATA, T.; SPICER, S. S.; CANTEY, J. R.; OGAWA, M. Clonay assay of mouse mast cell colonies in methylcellulose culture. **Blood.**, v. 60, p. 352 - 361, 1982.
- ODARJUK, J.; ROSSOW, N.; KARAWAJEW, L. Investigation of mast cell differentiation in vivo by use of monoclonal antibodies. **Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.**, v. 90, p. 261 - 266, 1989.
- OLIVER, C.; SAHARA, N.; KITANI, S.; ROBBINS.; A. R.; MERTZ, L. M.; SIRAGANIAN, R. P. Binding of monoclonal antibody AA4 to gangliosides on rat basophilic leukemia cells produces changes similar of those seen with Fc ϵ receptor activation. **J. Cell Biol.** v. 116, n. 3, p. 635 - 646, 1992.
- PAFF, G. H.; BLOOM, F.; REILLEY. The morphology and behavior of neoplastic mast cells cultivated in vitro. **J. Exp. Med.**, v. 86, p. 117 - 124, 1947.
- PADAWER, J. Studies on mammalian mast cells. **Trans. N.Y. Acad. Sci.**, v. 19, p. 690 - 713, 1957.
- PADAWER, J. Some studies on the fluorescence of mast cells after paraformaldehyde treatment. **Z. Zellforsch.**, v. 75, p.178 - 200, 1966.

- PRETLOW, T. G; CASSADY, I. M. Separation of mast cells in successive stages of differentiation using programmed gradient sedimentation. **American Journal of Pathology.**, v. 61, n. 3, p. 323 - 337, 1970.
- RILEY, J. F.; WEST, G. B. The presence of histamine in tissue mast cells. **J. Physiol., Lond.**, v. 120, p. 528 - 537, 1953
- RIMER, E. F.; TUBERVILLE, C.; HORTON, M. A. Human mast cells detected by monoclonal antibodies. **J. Clin. Pathol.**, v. 37, p. 1249 - 1255, 1984.
- RITZÉN, M. Quantitative fluorescence microspectrophotometry of 5 hydroxytryptamine-formaldehyde products in models and in mast cells. **Exp. Cell. Res.**, v.45, p.178 - 194, 1966.
- 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.; GOFF, J. P.; ALBERT, J. P.; METCALFE, D. D. The effects of stem cell factor on the ultrastructure of FcεRI+ cells developing in IL-3 dependent murine bone marrow - derived cell cultures. **J. Immunol.**, v. 151, p. 4950 - 4963, 1993.
- 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.
- SCHRADER, J. W.; LEWIS, S. J.; CARK - LEWIS, ICULVENOR, J. G. The persisting (P) cell: histamine content, regulation by a T cell - derived factor, origin from a bone marrow precuros, and relationship to mast cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 78, n.1, p. 323 - 327, 1981.
- SCHWARTZ, L. B. ; AUSTEN, K. F. Structure and function of the chemical mediators of mast cells. **Prog. Allergy.**, v. 34, p. 271 - 321, 1984.
- 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.
- SELDIN, D. C.; ADELMAN, S.; AUSTEN, K. F.; STEVENS, R. L, HEIN.; A.; CAUFIELD, J. P.; WOODBURY, R.G. Homology of the rat basophilic leukemia cell and the rat mucosal mast cell. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 82, p. 3871 - 3875, 1985.

- 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.
- STEVENS, R. L.; AUSTEN, K. F. Recent advances in the cellular and molecular biology of mast cells. **Immunol. Today**., v. 10, p. 381 - 386, 1989.
- THOMPSON-SNIPES L.; DHAR, V.; BOND, M. W, MOSMANN T. R. ; MOORE, K. W.; RENNICK, D. M. Interleukin 10: A novel stimulatory factor for mast cells and their progenitors. **J. Exp. Med.**, v. 173, p. 507 - 510, 1991.
- TSUJI, K.; NAKAHATA, T.; TAKAGI, M.; KOBAYASHI, T.; ISHIGURO, A.; KIKUCHI, T.; NAGANUMA, K.; KOIKE, K.; MIYAJIMA, A.; ARAI, K. I, AKABANE, T. Effects of interleukin-3 and interleukin-4 on the development of "connective tissue-type" mast cells: Interleukin-3 supports their survival and interleukin-4 supports their proliferation synergistically with interleukin-3. **Blood**., v. 75, p. 421 - 427, 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, n. 7, 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.
- VON RECKLINGHAUSEN F: Ueber eiter und bindegewebskorpechen. **Virchow Arch. Path. Anat.**, v. 28, p. 17 - 199, 1863
- WILLIAMS, D. E.; de VRIES, P.; NAMEN, A. E.; WIDMER, M. B.; LYMAN, S. D.; The Steel factor. **Dev. Biol.**, v. 151, p. 368 - 376, 1992.
- WITTE, U. N.; Steel locus defines new multipotent growth factor. **Cell**., v. 63, p. 5 - 6, 1990.
- WOLDEMUSSIE, E.; BEAVEN, M. A. Rat mast cell / basophil heterogeneity related to cell maturation. IN. BEFUS, A. D et. al. **Mast Cell Differentiation and Heterogeneity**. Raven. Press. NY.; 1986, p. 257 - 262.

- YONG, L. C. A combined histochemical and autoradiographic study of the distribution and maturation of peritoneal mast cells in the rat. **Experientia.**, v. 36, n. 4, p. 451 - 452, 1980.
- 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.
- ZSEBO, K. M.; WYPYCH, J.; McNIECE, I. K.; LU, H. S.; SMITH, K. A.; KARKARE, S. B.; SACHDEV, R. K.; YUSCHENKOFF, V. N.; BIRKETT, N. C.; WILLIAMS, L. R.; SATYAGAL, V. N.; TUNG, W.; BOSSELMAN, R. A.; MENDIAZ, E. A.; LANGLEY, K. E.; Identification, purification, and biological characterization of hematopoietic stem cell factor from buffalo rat liver- conditioned medium. **Cell.** v. 63, p. 195 - 201, 1990.