

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**ULTRA-ESTRUTURA DO CITOESQUELETO DE MASTÓCITOS DA
CAVIDADE PERITONEAL DO *Calomys callosus* (RENGER, 1830).**

Dalcio Rodrigues

Monografia apresentada à Coordenação do Curso
de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de
Uberlândia, para obtenção do grau de Bacharel em
Ciências Biológicas.

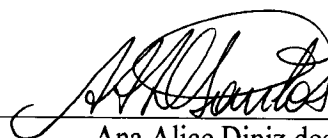
**UBERLÂNDIA - MG
Dezembro - 1999**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

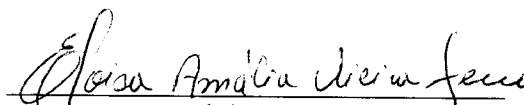
**ULTRA-ESTRUTURA DO CITOESQUELETO DE MASTÓCITOS DA
CAVIDADE PERITONEAL DO *Calomys callosus* (RENGER, 1830).**

Dalcio Rodrigues

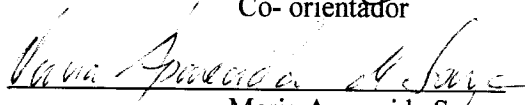
APROVADA PELA COMISSÃO EXAMINADORA EM 22/12/99. NOTA: 100



Ana Alice Diniz dos Santos
Orientador



Eloísa Amália Vieira Ferro
Co-orientador



Maria Aparecida Souza
Co-orientador

Ana Maria Coelho de Carvalho
Coordenadora do Curso

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
Av. Ana Maria Coelho Carvalho
Cidade Universitária, Uberlândia - MG - 38400-900

**UBERLÂNDIA – MG
DEZEMBRO – 1999**



AGRADECIMENTO

A todos aqueles que acreditaram e apoiaram a realização do meu trabalho.

SUMÁRIO

I – Introdução.....	5
II – Objetivos.....	9
III – Material e Métodos.....	10
3.1 – Purificação dos Mastócitos.....	10
3.2 – Ultra-estrutura do Citoesqueleto.....	11
IV – Resultados e Discussão.....	12
4.1 – Purificação dos mastócitos.....	12
4.2 – Ultra-estrutura do Citoesqueleto.....	13
V – Conclusões	15
VI – Documentação Fotográfica.....	16
VII – Referências Bibliográficas.....	35

I - INTRODUÇÃO

O gênero *Calomys* é composto por roedores da família Cricetídeos os quais pertencem a super família Muroidea, amplamente encontrados nas Américas Central e do Sul. Eles ocorrem em diferentes tipos de biomas como em floresta tropical, savanas, “caatingas”, pastagens e em residências humanas (MELO, 1981). É um roedor comumente encontrado em todo território brasileiro. Socialmente, esses animais apresentam relevante importância por serem reservatório do *Trypanosoma cruzi* (RIBEIRO, 1973), agente etiológico da doença de chagas e transmissores da febre hemorrágica argentina (JUSTINES & JOHNSON, 1969).

A biologia desses animais, bem como sua adaptabilidade sob condições laboratoriais foram estudadas por diversos autores (PETTER et al, 1967; JUSTINES & JOHNSON; 1970; MELLO, 1981).

Do ponto de vista reprodutivo, está estabelecido tratarem-se de animais poliétricos, com ciclo de aproximadamente 6 dias com estro pós-parto e apresentam um período gestacional de aproximadamente 22 dias (MELLO, 1981). Estes animais tem-se mostrado bastante susceptíveis a doenças infecciosas tais como a esquistossomose, leishmaniose e toxoplasmose (FAVORETO et al., 1994), o que tem proporcionado um excelente modelo biológico para o estudo destas doenças. Baseados nestes achados, atualmente existe uma forte tendência para a ampla utilização desta espécie em laboratório.

Os mastócitos são células, geralmente, esféricas com grânulos citoplasmáticos basófilos preenchendo quase todo o citoplasma. São encontrados praticamente em todos os tecidos vascularizados e são particularmente abundantes abaixo das superfícies epiteliais,

em áreas que entram em contato direto com substâncias exógenas, em associação com vasos sanguíneos e linfáticos, dentro e próximo de nervos periféricos e em certas espécies, dentro das cavidades pleural e peritoneal (PEARCE, 1986; GALLI, 1987; SANTOS & MACHADO, 1994; SANTOS, 1996; CHIARINI-GARCIA et al, in press). Portanto, os mastócitos podem interagir com células e elementos de vários tecidos, órgãos e cavidades do corpo (GREENBERG & BURNSTOCK, 1983; GALLI, 1987; CHIARINI-GARCIA et al, in press).

Os mastócitos constituem população heterogênea de células com propriedades morfológicas, bioquímicas e funcionais variando dentro de uma mesma espécie e entre espécies (CHIU & LAGUNOFF, 1972; BIENENSTOCK et al., 1987; SANTOS & MACHADO, 1994; SANTOS, 1996; CHIARINI-GARCIA et al, in press). Sabe-se, também, que os mastócitos têm origem na medula óssea (KITAMURA et al.,1987) e que células precursoras de mastócitos, não identificáveis morfológicamente, migram pela corrente sanguínea, invadem os tecidos conjuntivos, proliferam e diferenciam-se em mastócitos.

Nas células eucariotas superiores, devido à especialização e à complexidade de suas estruturas internas, existe a necessidade de mantê-las em locais apropriados no interior da célula e também controlar os seus movimentos. Devido a este fato, todas as células eucariotas possuem um esqueleto interno denominado citoesqueleto, que proporciona às células uma forma, capacidade de movimento, habilidade de arranjar as organelas e transportá-las de uma parte à outra da célula. O citoesqueleto é composto de uma rede de filamentos de proteínas, sendo os *filamentos de actina* e *microtúbulos* os mais importantes. Tais estruturas datam dos primeiros estágios da evolução, devido a serem encontrados quase intocados na maior parte dos seres eucariontes. Ambos estão envolvidos na geração do movimento celular. Os filamentos de actina, por exemplo, promovem o deslocamento individual de células eucariotas. Eles participam ativamente na contração muscular em animais. Os microtúbulos são geradores da força em *cílios* e *flagelos* - longas projeções da superfície celular, em forma de chicote, servem como instrumento de propulsão (ALBERTS et al., 1997). Tais estruturas que compõem o citoesqueleto são resistentes à extração com detergentes não-iônicos (Triton X-100). Os microtúbulos são estruturas longas e tubulares com diâmetro aproximado de 25 nm compostos de monômeros de tubulina.

A motilidade celular é muito complexa e acredita-se que uma célula eucariota forma mais de cem genes expressando proteínas motoras (VALLER & SHEETZ, 1996). Essas proteínas pertencem a três grandes super-famílias gênicas. A super-família das miosinas que usam os filamentos de actina como trilho e as super-famílias da cinesinas e dineínas que usam como trilhos os microtúbulos. No domínio motor dessas proteínas encontra-se o sítio catalítico de hidrólise do ATP e de interação com o citoesqueleto. Os motores moleculares usam a energia liberada da hidrólise do ATP para promover fenômeno de motilidade, como citocinese, cariocinese, transporte de vesículas, movimento ciliar e flagelar, contração muscular, etc.

ESPINDOLA et al (1996a,b) demonstraram que a miosina-V de cérebro e dineína compartilham de uma mesma cadeia leve de 10 KDa, sugerindo a hipótese de que tais proteínas estariam associadas a uma mesma organela e ou vesícula que serão transportadas na célula, trocariam o motor conforme utilizasse trilhos de actina ou de microtúbulos.

Após busca na literatura verificou-se que não há estudos ultra-estruturais sobre o citoesqueleto de mastócitos como também identificação e localização de proteínas associadas a este. As evidências da participação do citoesqueleto no processo de desgranulação e/ou liberação de seus mediadores sem desgranulação encontrados na literatura consultada foram através de observações indiretas utilizando experimentos bioquímicos (BÖTTINGER, 1987).

Os mastócitos participam diretamente do processo inflamatório, além de sua função na anafilaxia. Estas atividades dependem da presença de receptores da membrana plasmática que propiciam a adesão e interação dos mastócitos com outras células e glicoproteínas da matrix extracelular (HAMAWY et al., 1994). Quando os mastócitos são ativados ocorre elevada expressão de moléculas de adesão que promove a migração e localização destas células em sítios de inflamação, bem como a modulação de várias atividades decorrentes da geração de sinais que controlam a proliferação, secreção e reorganização do citoesqueleto (HAMAWY et al, 1994).

Assim, tornou-se atraente demonstrar o citoesqueleto dos mastócitos em animais não submetidos a estimulação para posteriormente analisar o citoesqueleto de mastócitos em animais sob estimulação para obter informações sobre o que pode ocorrer em determinadas condições fisiológica e patologias como, por exemplo, alergias, asma, bronquite, esquistossomose, toxoplasmose, etc. O entendimento das alterações do

citoesqueleto dessas células pode resultar em aplicações práticas inibindo a desgranulação dos mastócitos e prevenindo alterações fisiopatológicas provocadas pela liberação dos mediadores biologicamente ativos armazenados e/ou sintetizados “de novo” pelos mastócitos.



II – OBJETIVOS

O presente trabalho teve como finalidade:

- 1- Purificar mastócitos extraídos da cavidade peritoneal do *Calomys callosus*;
- 2- Demonstrar ultra-estruturalmente o citoesqueleto de mastócitos peritoneais do *Calomys callosus*.

III – MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados *Calomys callosus* machos adultos, com idade mínima de quatro meses, alimentados com ração para ratos, sementes de girassol, milho e água. Estes foram mantidos na sala de animais em experimento do setor de Histologia no bloco 2B do Campus Umuarama da Universidade Federal de Uberlândia, em gaiolas de 40cm de comprimento, 33cm de largura e 17cm de profundidade. Os animais utilizados foram mantidos em jejum durante 24 horas antes do experimento.

3.1- Purificação dos mastócitos

Os mastócitos foram isolados e purificados segundo modificação de métodos utilizados por ENERBACK & SVENSSON (1980); SVITKINA & VERKHOVSKY, (1995). Foi injetado na cavidade intraperitoneal de cada animal, no total de cinco animais por experimento, 5 ml de salina tamponada com fosfato (PBS: NaCl 1,3M, Na₂HPO₄ 80mM, KH₂PO₄ 20mM, KCl 30mM), pH 7,2 com liquemine a 0,1%. Após leve massagem, colheu-se, com o auxílio de uma seringa de 5ml, o máximo de exsudato possível. A suspensão celular, mantida no gelo, foi então centrifugada a 45 XGpor 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e ao sedimento foram acrescentados 8 ml de PBS, pH7,2 sem liquemine. Novamente a solução, uma vez homogeneizada suavemente, foi submetida a

uma nova centrifugação de 45 XG, por 10 minutos a 4 °C, com a finalidade de lavar e dar sequência ao processo de purificação dos mastócitos. O sedimento formado foi ressuspensionado em 9ml de Percoll (SIGMA) gradiente para separação celular, e as paredes dos tubos de ensaio foram lavadas com 0,5ml de PBS, pH 7,4. Após 10 minutos de repouso, a mistura foi centrifugada a 40 XG por 15 minutos a 4 °C. Finalmente as camadas média e superior da suspensão foram descartadas e a camada inferior, mais ou menos 2ml, onde se encontrava um concentrado de mastócitos, foi usada no experimento. Após cada etapa desta purificação, as células foram aderidas em lâminas de vidro, coradas com azul de toluidina a 1% borato de sódio a fim de comprovar a eficiência do processo. Os resultados foram analisados e documentados utilizando o fotomicroscópio (Reichert-Jung) – Polyvar do Centro de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal de Uberlândia.

3.2- Ultra-estrutura do citoesqueleto

Uma vez purificados, os mastócitos foram aderidos sobre telas de cobre revestidas por formvar a 0,8 % em dicloetano em câmara úmida a 37 °C, por 30 minutos. Em seguida, as telas foram lavadas suavemente em solução salina tamponada (PBS), pH 7,2 e as células pré-fixadas em uma solução a 4% de paraformaldeído, 0,5% de glutaraldeído em PBS, pH 7,2 por 10 minutos. As membranas celulares foram rompidas e as organelas extraídas com Triton X-100 (SIGMA) a 1% contendo inibidores de proteases (Imidazol 50mM, KCl 50mM, MgCl₂ 0,5mM, EDTA 0,1mM, EGTA 1,0mM, por 5 minutos. Posteriormente as células foram fixadas em glutaraldeído a 1% em água, por 10 minutos. Após lavagem em PBS, foram pós-fixadas em ósmio a 1% por 1 minuto, lavadas em água destilada e contrastadas com uranila a 2 % em 15, 10 e 5 segundos. Finalmente, as células foram desidratadas em álcool/acetona 50, 70, 90 e 100%, sendo assim submetidas a secagem ao ponto crítico, utilizando o aparelho de secagem CPD-30 da BAL-TEC.

Os resultados foram analisados e documentados em Microscópio Eletrônico de Transmissão (Zeiss EM-109) do Centro de Microscopia Eletrônica do departamento de Morfologia da Universidade Federal de Uberlândia.

IV – RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1- Purificação de mastócitos

O exsudato colhido da cavidade peritoneal dos animais demonstrou uma grande incidência e variedade de tipos celulares (Fig. 01). Para conseguir uma quantidade suficiente de células fez-se necessária a utilização de animais com idade mínima de 4 meses. Segundo INAGAKI et. al (1994) a quantidade de mastócitos no exsudato peritoneal aumenta significativamente a partir dessa idade. A presença de outros tipos celulares observada é comum também em outros animais (UVNÄS & THON, 1959).

A manutenção dos animais em jejum facilitou a colheita do exsudato peritoneal para posterior purificação dos mastócitos, diminuindo os riscos de contaminação do material por bactérias, caso ocorresse perfuração dos intestinos. O não rompimento de vasos sanguíneos, durante a injeção e retirada de solução salina tamponada (PBS), também evitou a contaminação do exsudato.

Após a primeira centrifugação, as células de maior densidade, inclusive os mastócitos, depositaram-se no fundo do tubo de ensaio, caracterizando assim uma imagem mais pura que as anteriores, porém ainda com uma considerável variedade de células além dos mastócitos (Fig. 02). Observou-se que o isolamento dos mastócitos por densidade de gradiente foi dependente de vários fatores externos como, por exemplo, temperatura, rotor da centrífuga usada e período do dia, sendo o mais apropriado o período da manhã, onde as células não se apresentavam em processo de desgranulação. Deve-se evitar centrifugações

de altas rotações que provocam o rompimento dos mastócitos liberando seus grânulos citoplasmáticos para o meio extracelular.

Os dados obtidos no presente trabalho estão de acordo com o descrito em camundongo e rato (POLAT, 1980; INAGAKI et al, 1994). Após as células serem lavadas em solução salina tamponada (PBS), pH 7,2 e centrifugadas pela segunda vez, notou-se um grau maior de pureza, ou seja, maior concentração de mastócitos na solução (Fig. 03).

Após a terceira e última centrifugação, utilizando-se o percoll, os mastócitos, por densidade de concentração, atravessaram o gradiente de percoll e depositaram livremente no fundo do tubo, formando um delicado sedimento que, quando ressuspensionado em PBS e corados com azul de toluidina, confirmaram a eficiência do processo de purificação, mesmo que na maioria das vezes, outros tipos celulares se fizeram presentes (Figs. 04, 05, e 06). A utilização do percoll, gradiente usado na etapa final de purificação, facilitou e permitiu melhor isolamento dos mastócitos como já mencionado por ENERBACK & SVENSSON (1980); SVITKINA & VERKHOVSKY, (1995). Os mastócitos são células de fácil aderência, sendo esta aderência aumentada, significativamente, quando feita em câmara úmida e a 37°C, porém foi diminuída após o uso de percoll. O uso de liquemine no tampão contribuiu bastante para a purificação, deixando a solução mais diluída e transparente. A metacromasia exibida pelos mastócitos após coloração com azul de toluidina facilitou sua identificação, destacando-os dos outros tipos celulares que ainda permaneceram após a última centrifugação.

4.2- Ultra-estrutura do citoesqueleto

No presente trabalho os primeiros resultados obtidos mostraram que os filamentos do citoesqueleto dos mastócitos purificados estavam mal preservados e fragmentados (Figs. 07 e 08) devido possivelmente da presença de proteases, como descrito por SVITKINA & VERKHOVSKY (1995). Após a adição de um coquetel contendo inibidores de proteases (Imidazol 50mM, KCl 50mM, MgCl₂ 0,5mM, EDTA 0,1mM, EGTA 1,0mM) na solução

de extração Triton X-100 a 1 %, o citoesqueleto foi claramente identificado, exibindo a presença de rica rede de estruturas filamentosas (Figs. 09, 10, e 11).

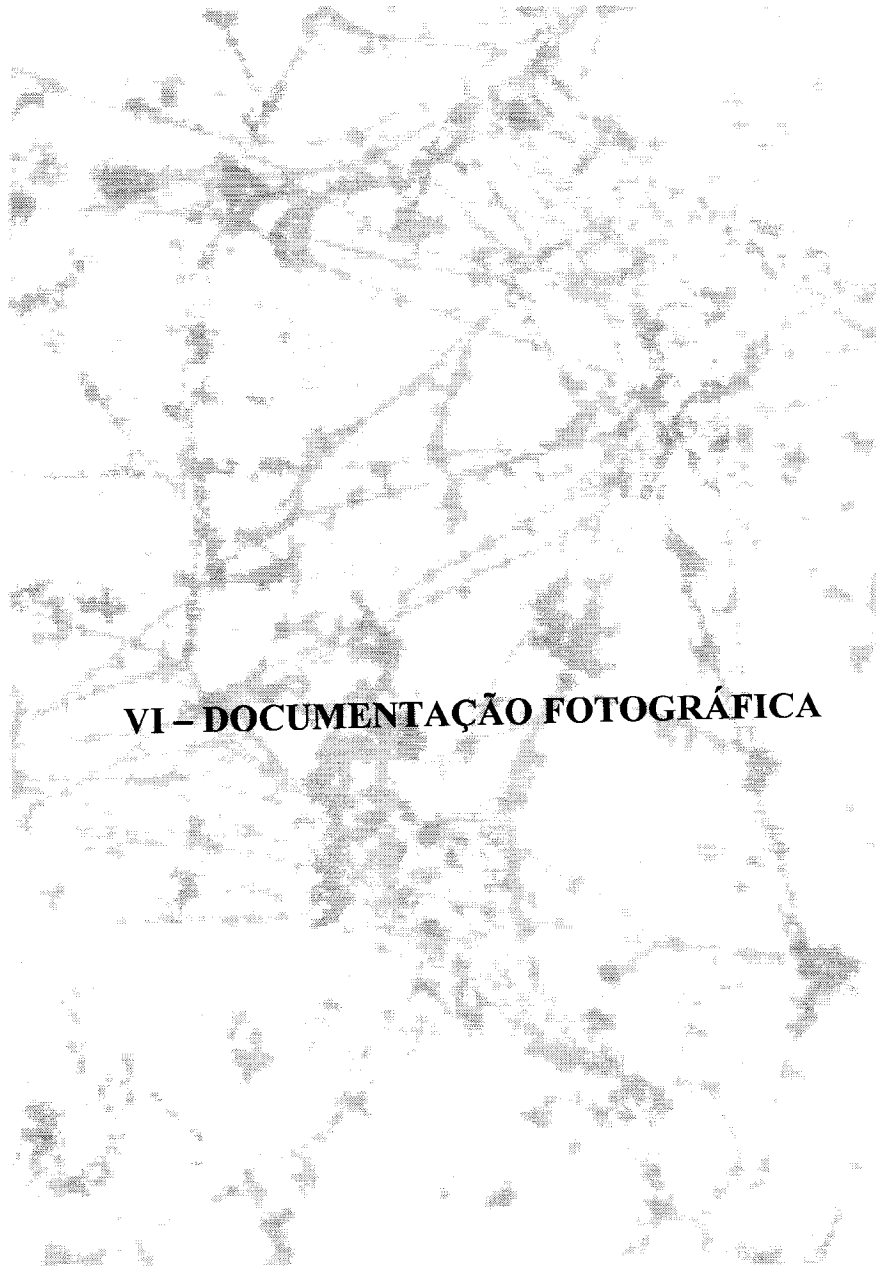
Quando as membranas são parcialmente permeabilizadas, o citoesqueleto se espalha através dos espaços específicos de rompimentos (Fig 12). A concentração de Triton X-100 é crucial para a permeabilização das membranas celulares, ficando estabelecida a concentração ideal em 1% para uma perfeita permeabilização de mastócitos; ainda que, em um mesmo experimento fosse observada a presença de mastócitos não permeabilizados, parcialmente e totalmente permeabilizados (Figs. 13, 14, 15, e 16). A delimitação citoplasmática foi claramente evidenciada nas células que, durante o processo de extração, foram parcialmente permeabilizadas (Fig. 17).

Os resultados obtidos na purificação dos mastócitos foram satisfatórios e suficientes para realização de experimentos posteriores de análise morfológica do citoesqueleto possibilitando a identificação específica das estruturas filamentosas através de imunomarcação.

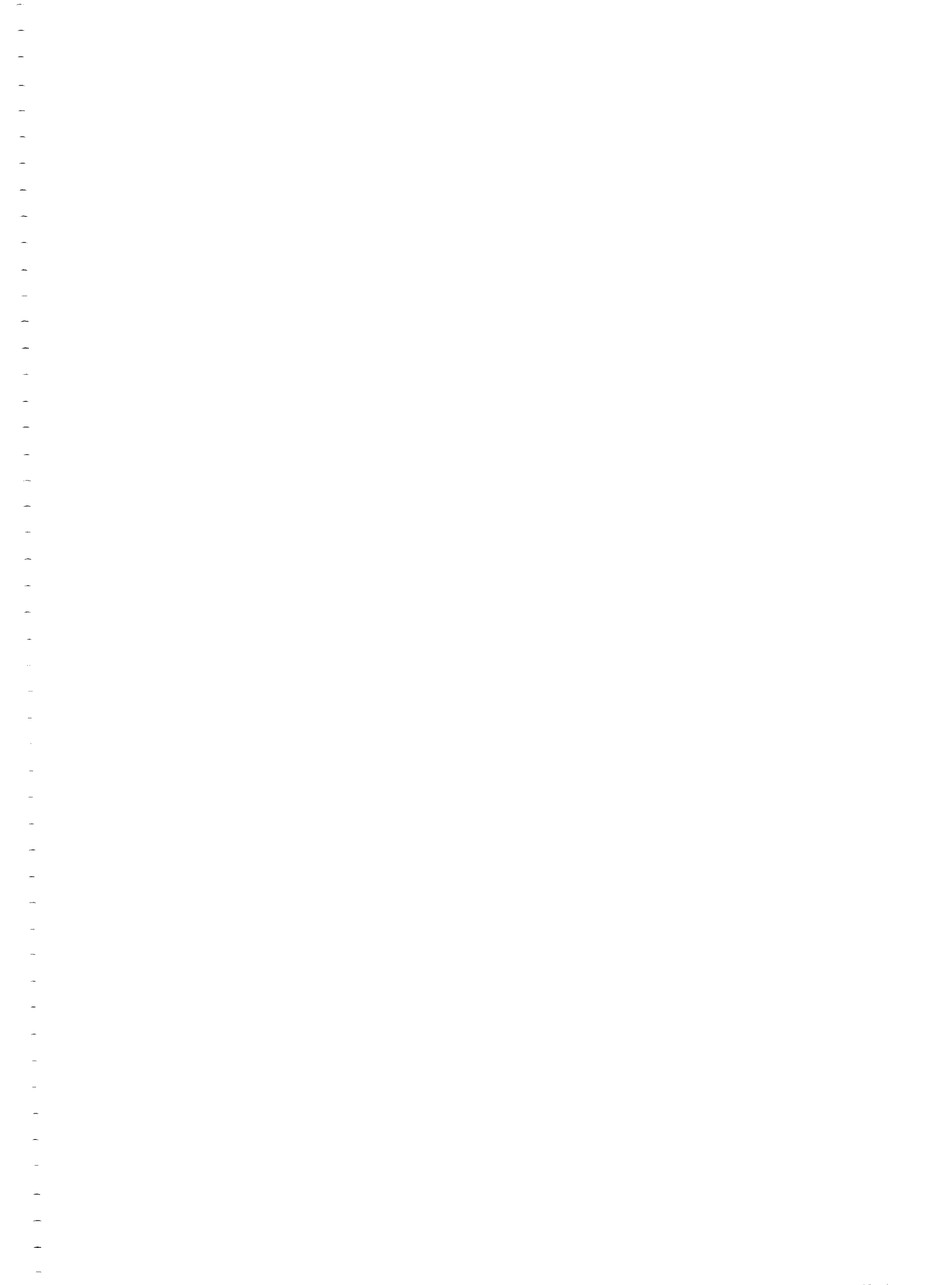
V – CONCLUSÕES

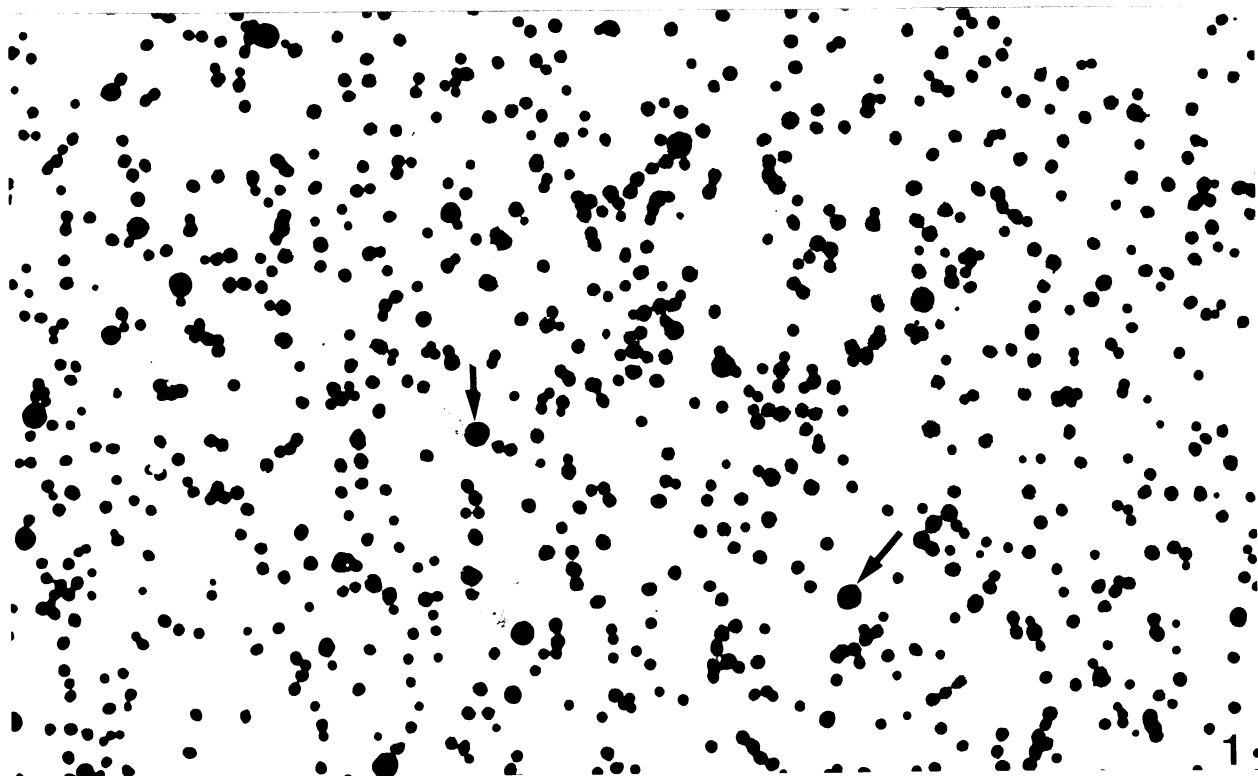
No presente trabalho concluímos que:

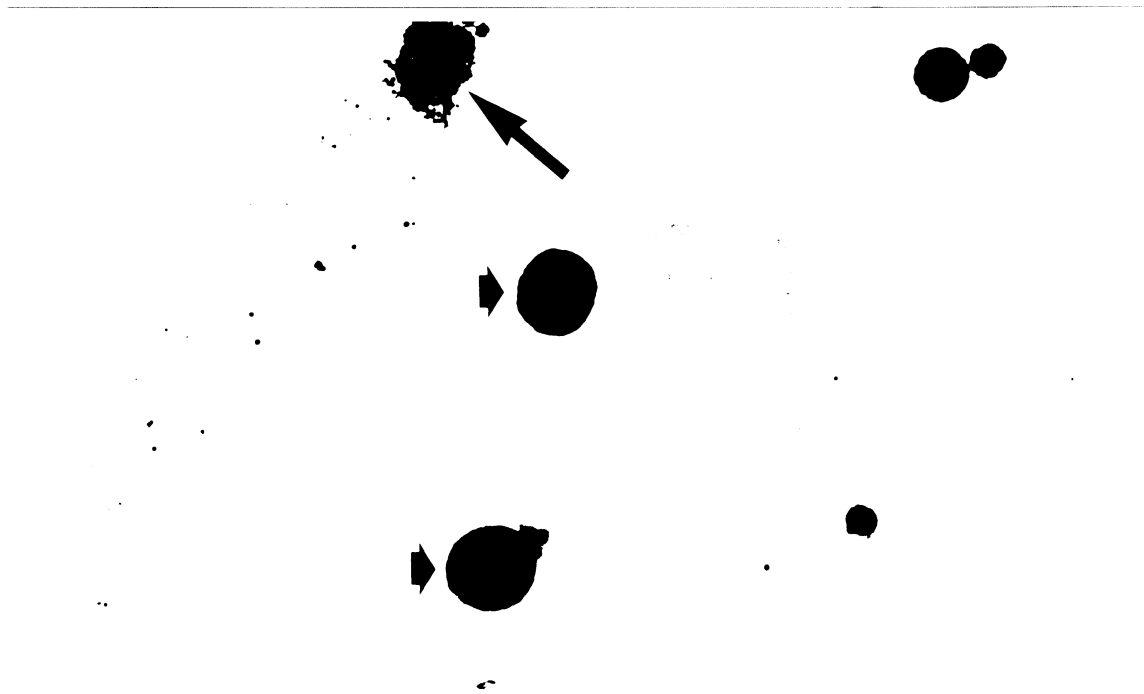
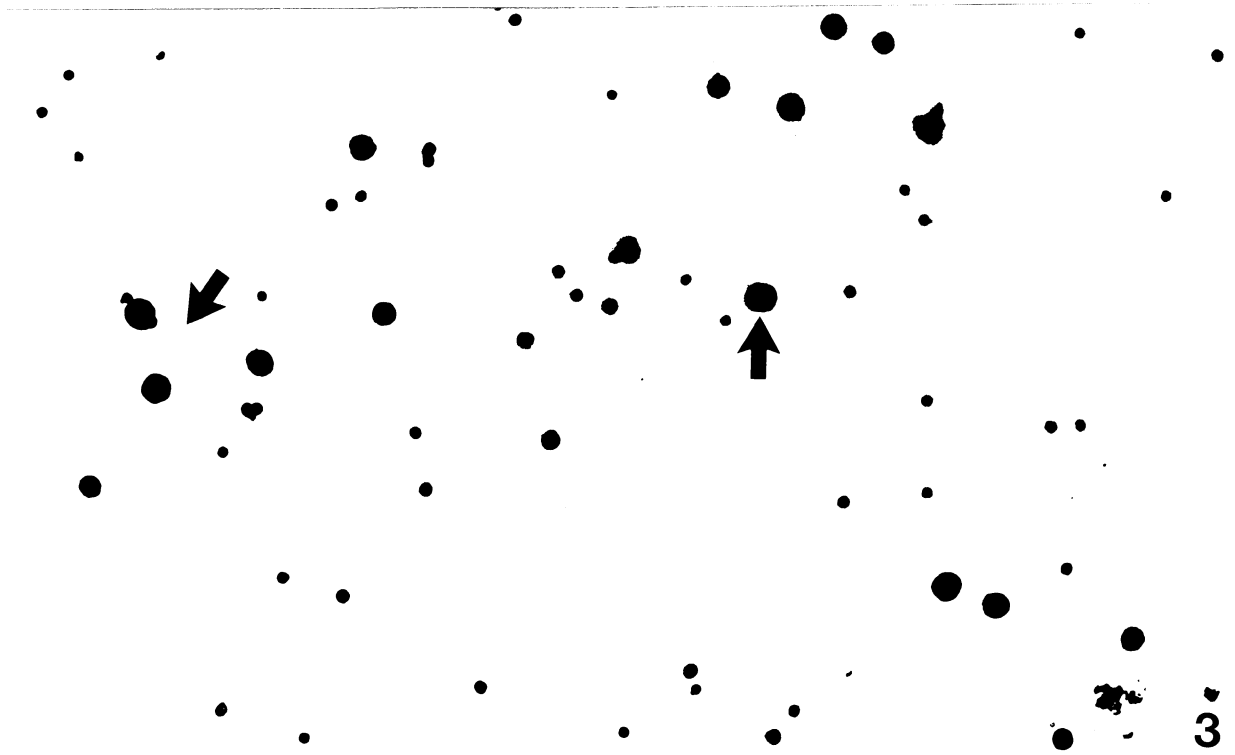
- 1-Os mastócitos estão presentes na cavidade peritoneal do *Calomys callosus* na idade adulta.
- 2-A metodologia utilizada permitiu a purificação dos mastócitos da cavidade peritoneal do *Calomys callosus*.
- 3- Ultra-estruturalmente, os mastócitos da cavidade peritoneal do *Calomys callosus* exibiram uma rica rede de estruturas filamentosas em toda a extensão do citoplasma.

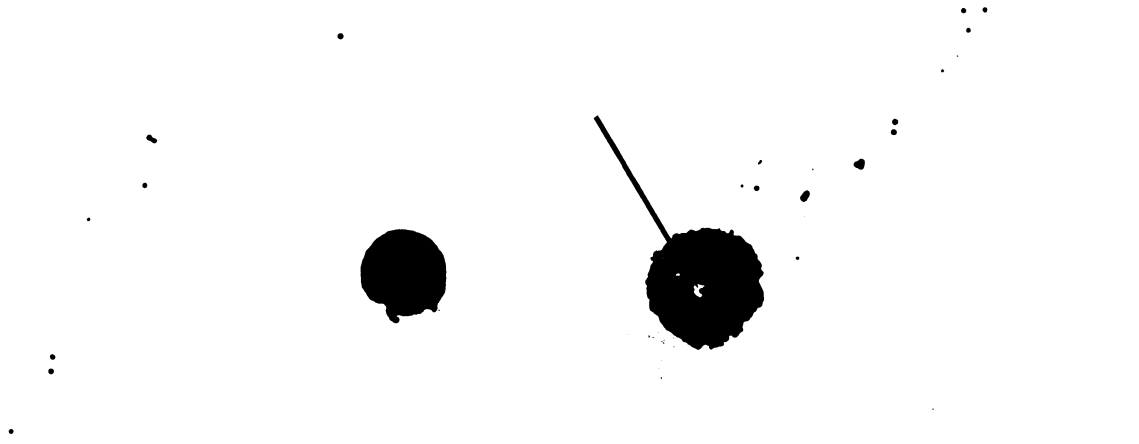


VI - DOCUMENTAÇÃO FOTOGRÁFICA

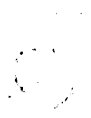




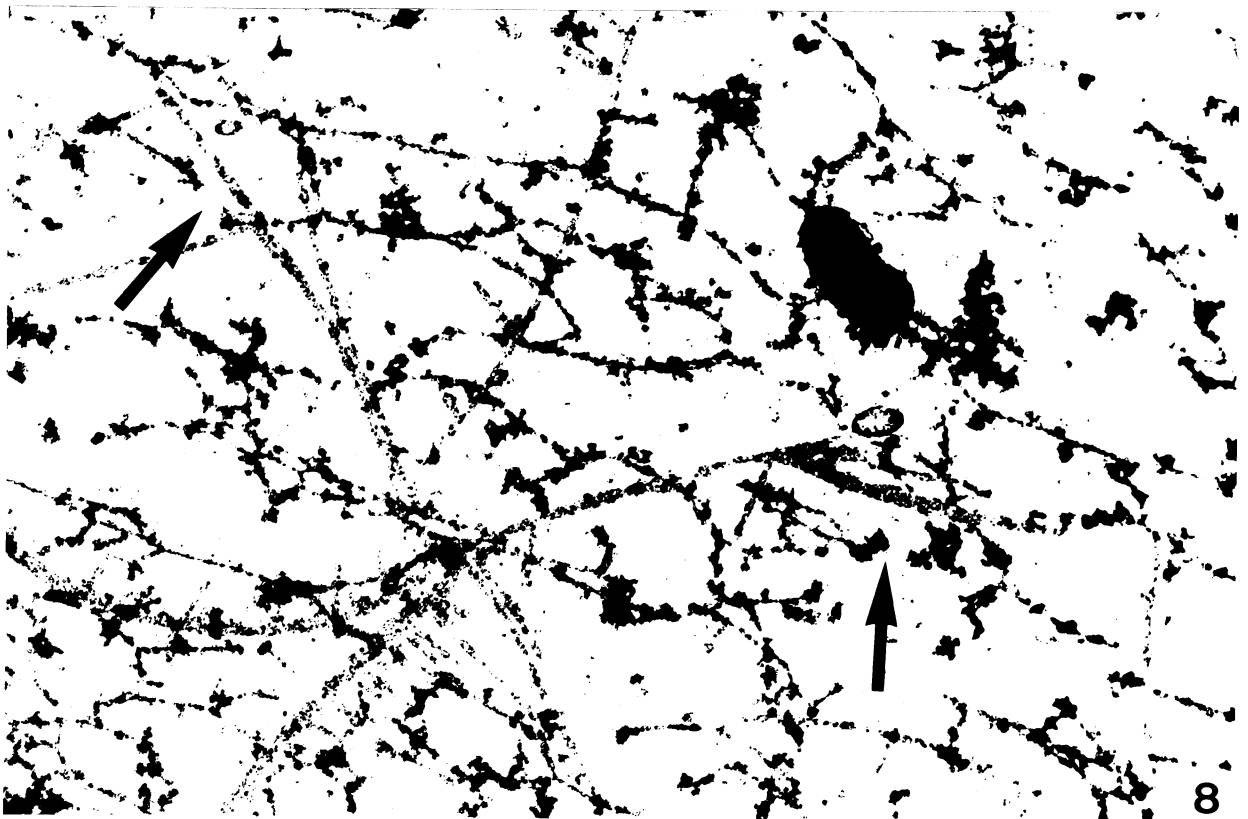
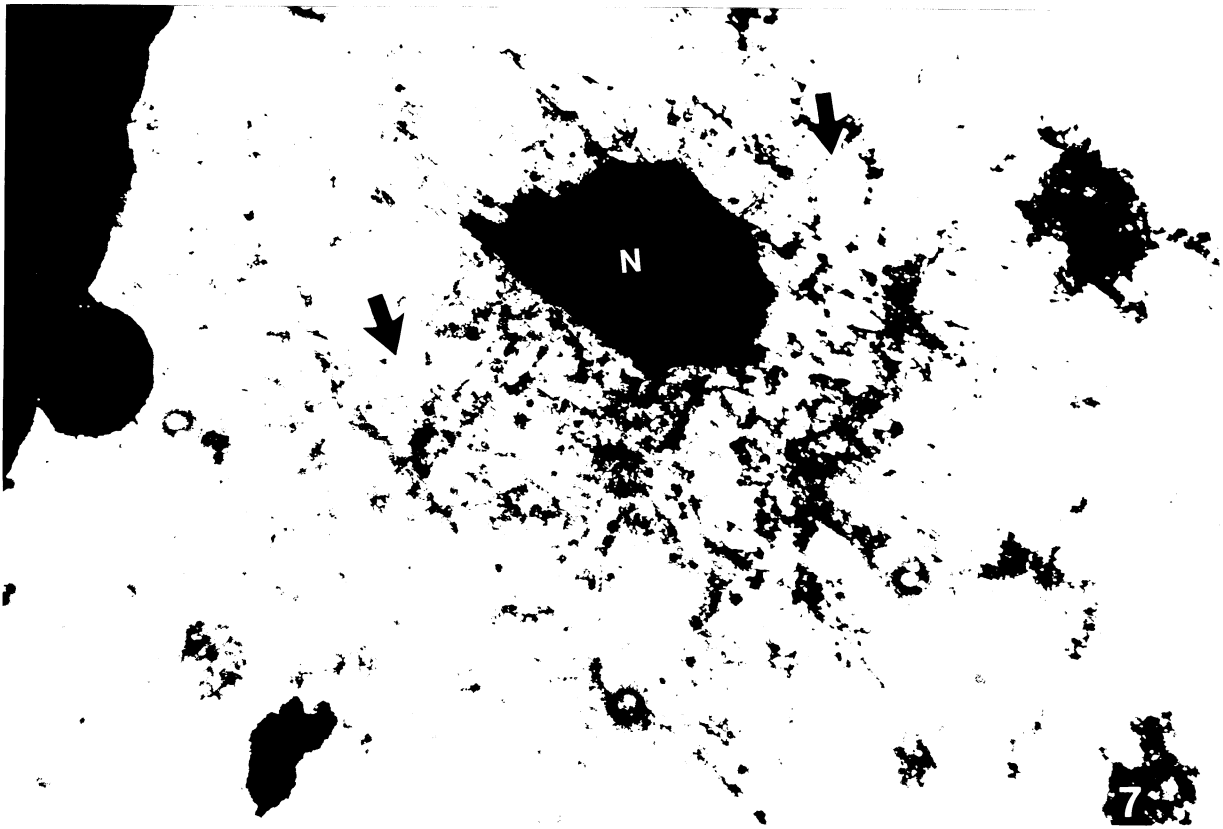


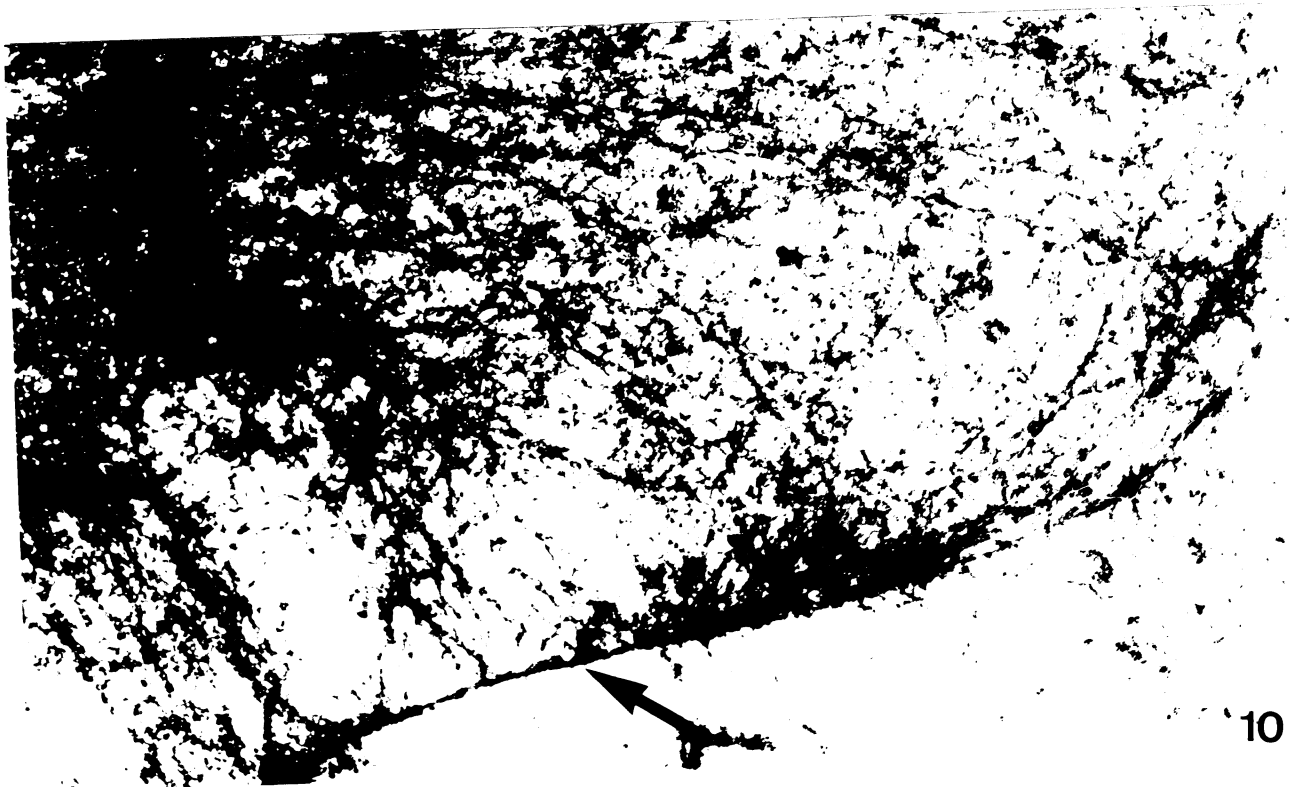
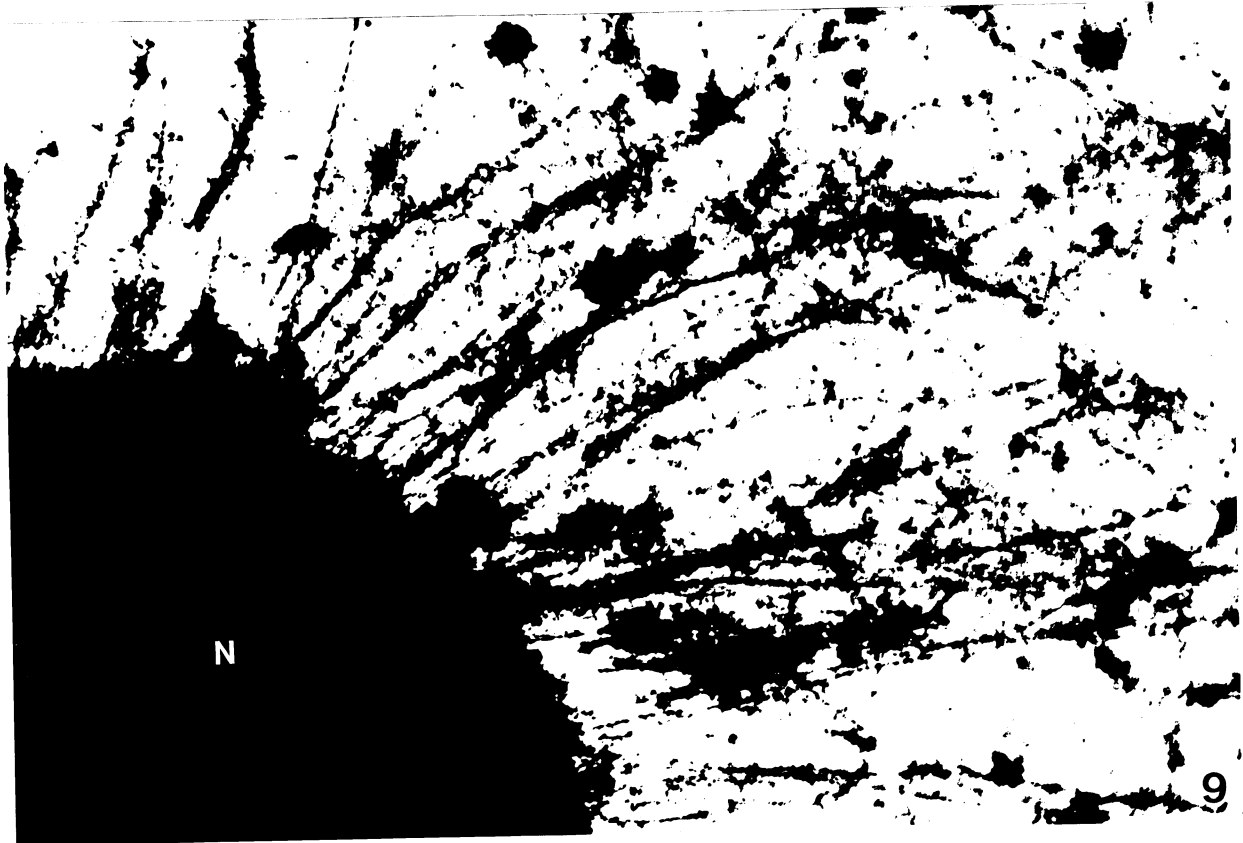


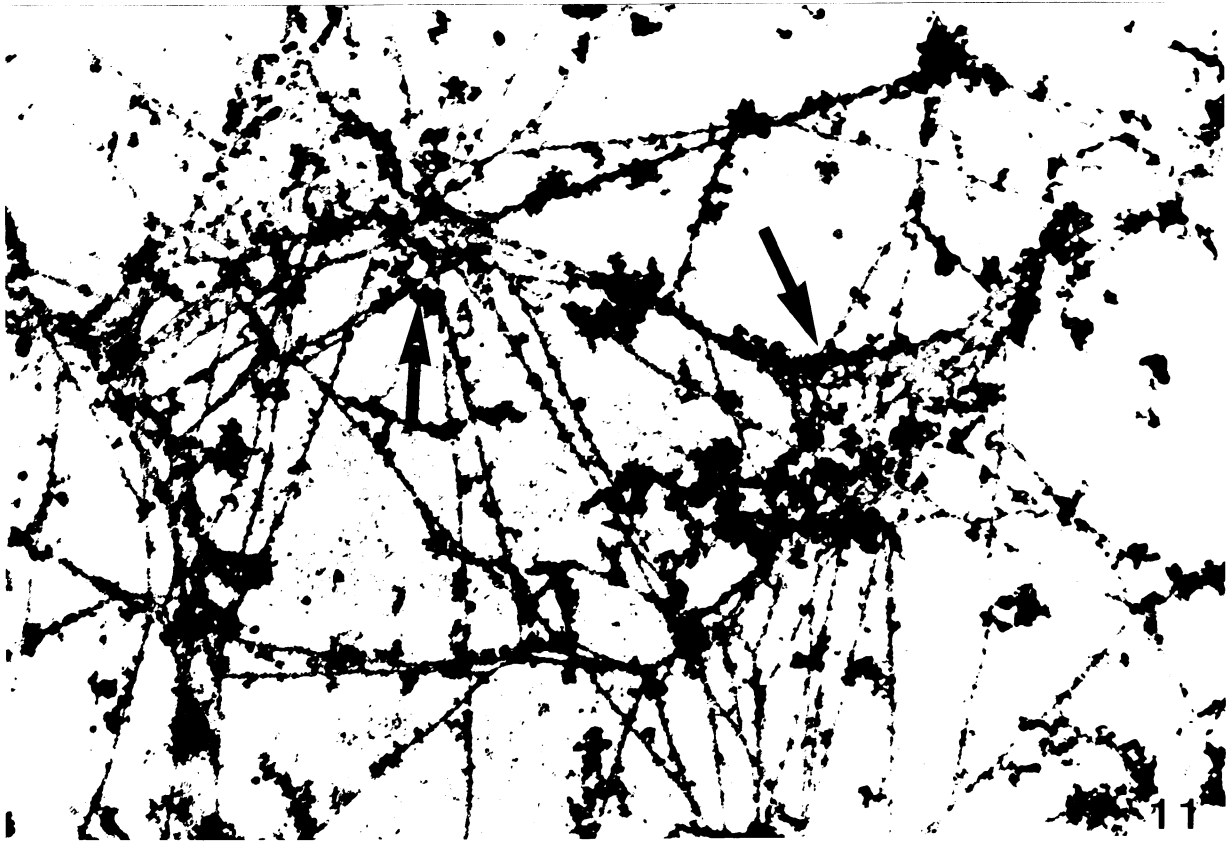
5



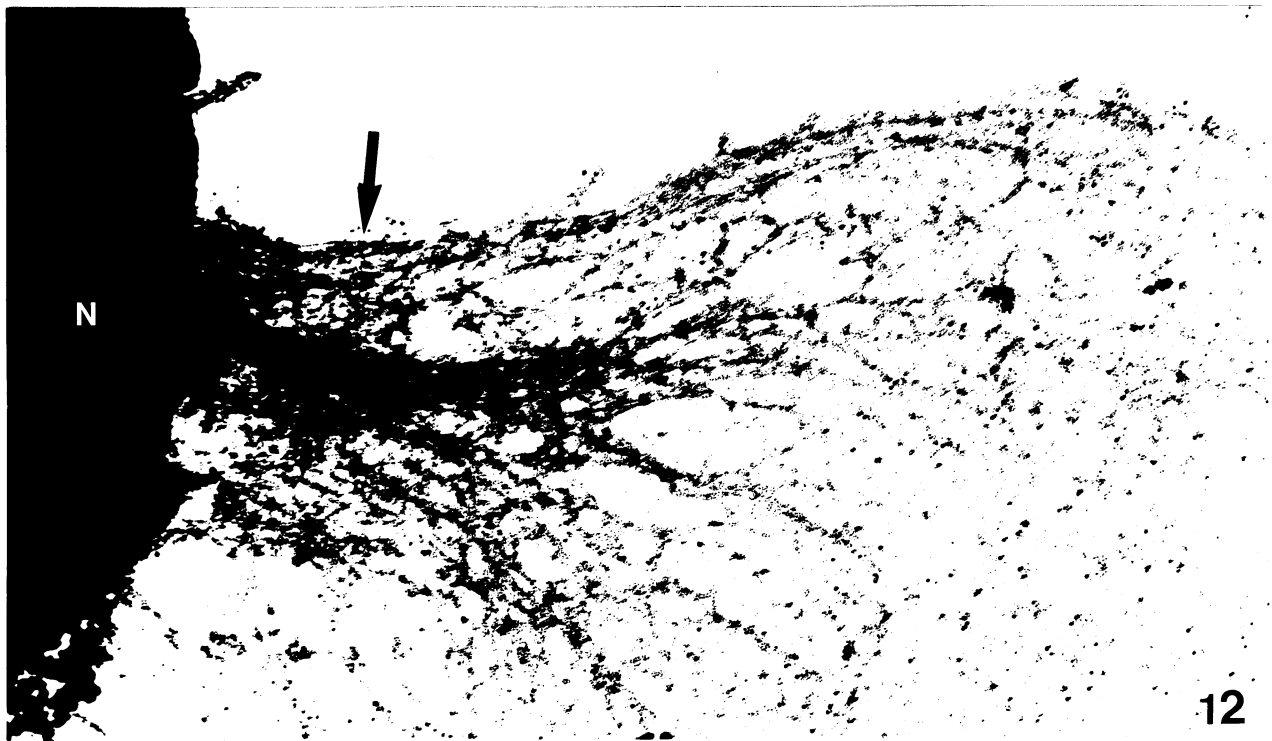
6



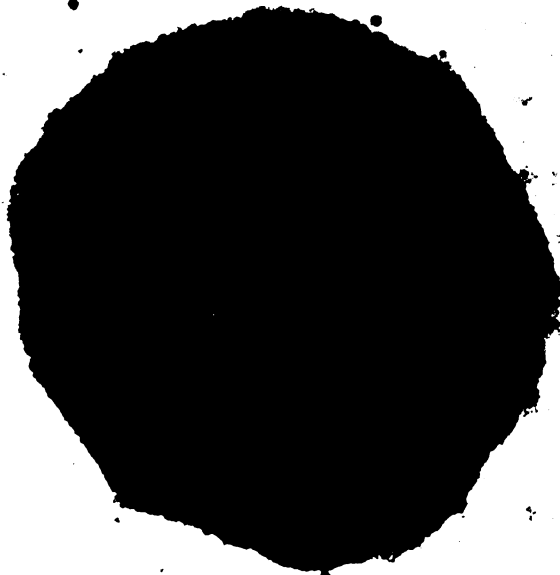




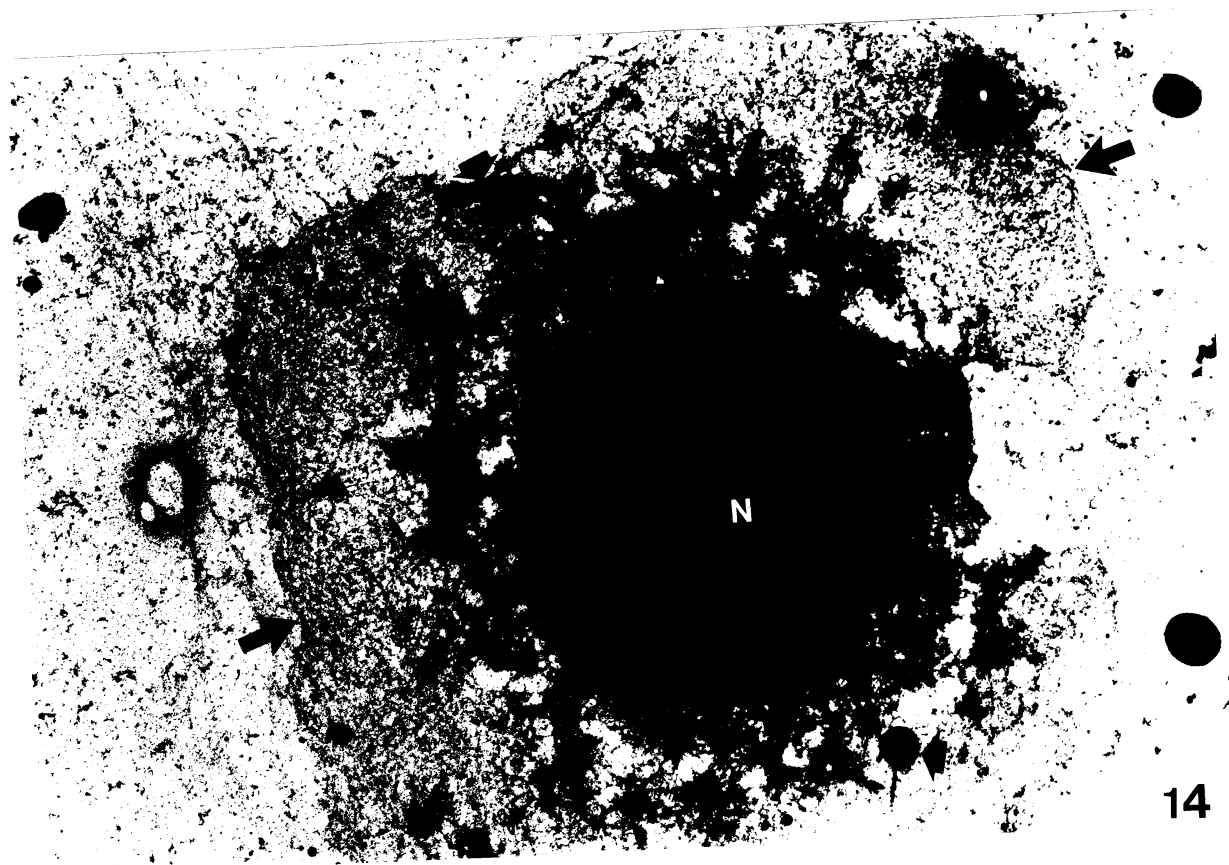
11



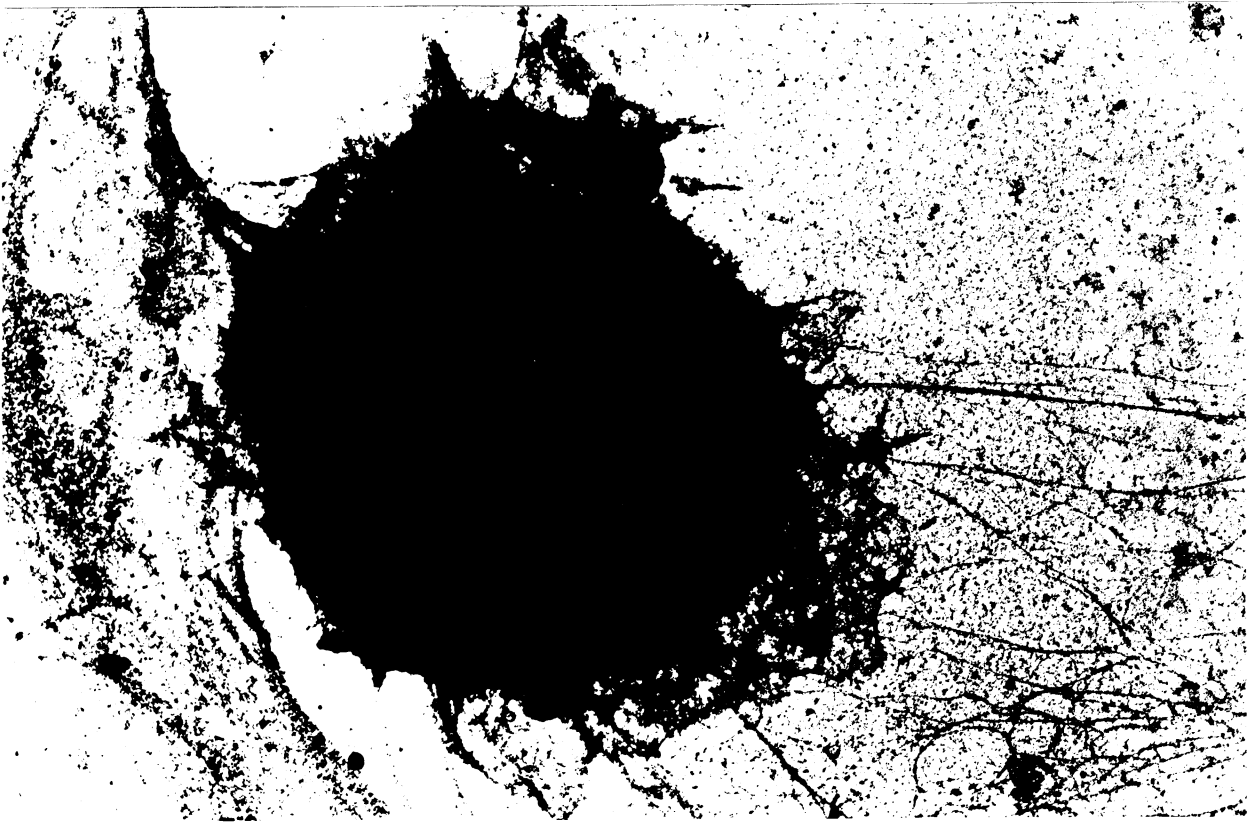
12

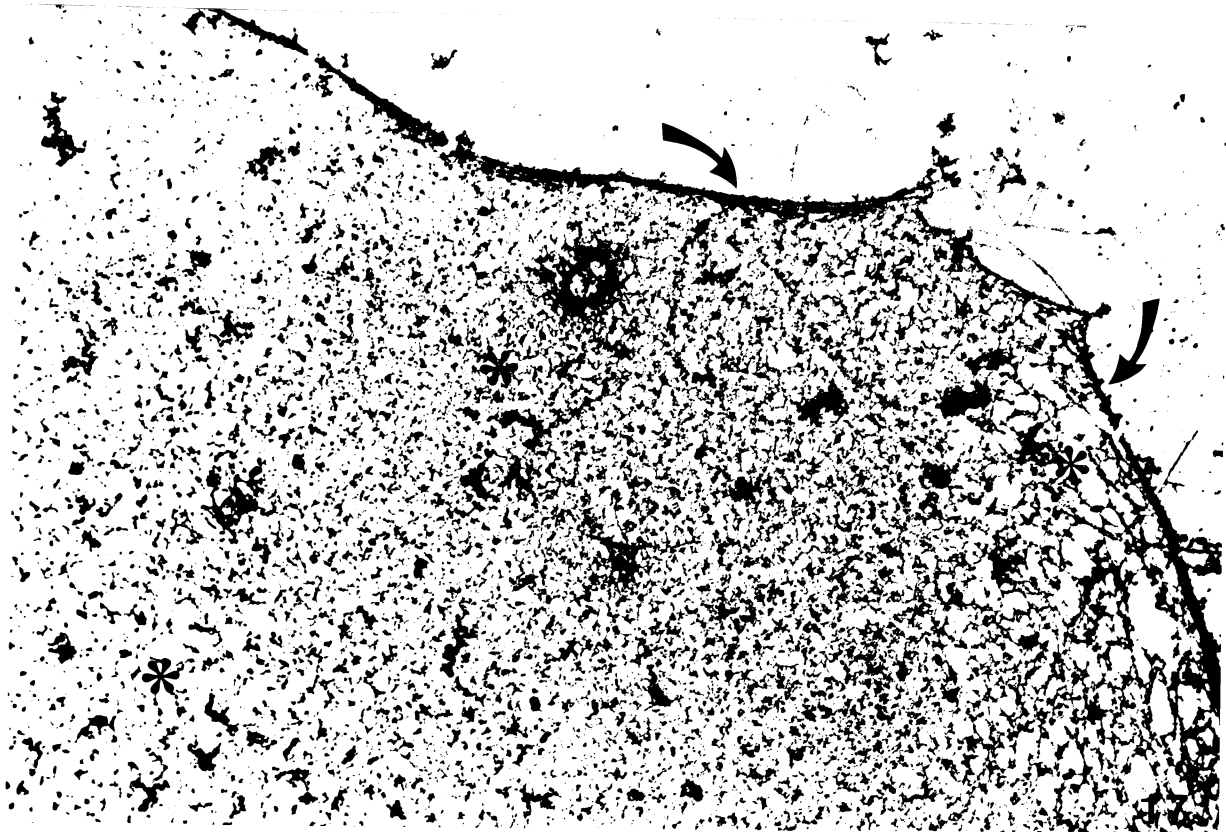



13



14







Fotomicrografias das células do lavado peritoneal de *Calomys callosus*, aderidas em lâminas de vidro e coradas com azul de toluidina-borato de sódio a 1%

FIGURA 1-Notam-se mastócitos (setas) entre outros tipos celulares antes do processo de purificação. 90X.

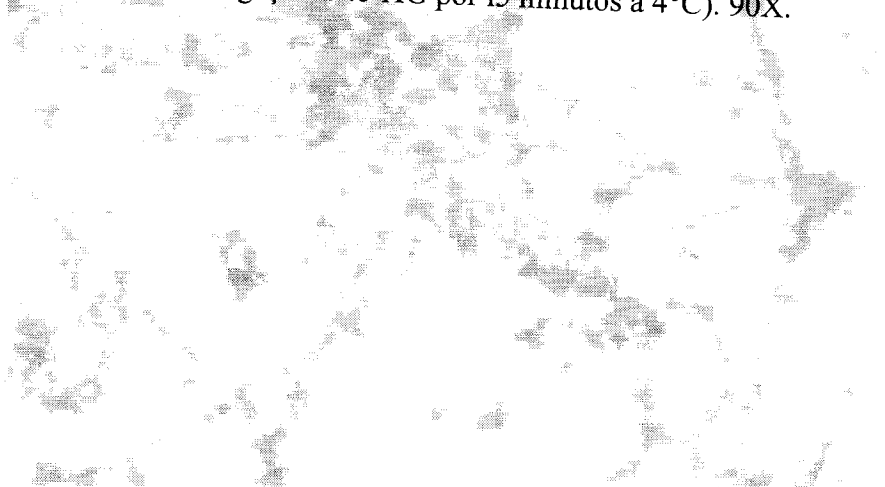


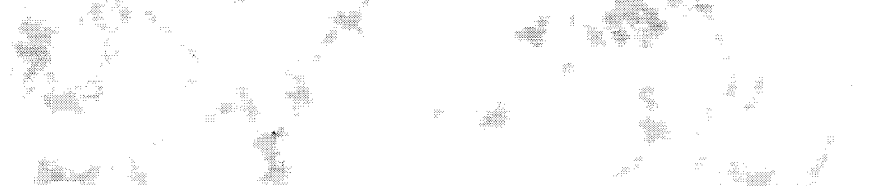
FIGURA 2-Mostra mastócitos (setas) entre outros tipos celulares, após a primeira etapa do processo de purificação (centrifugação a 45 XG por 15 minutos a 4°C). 90X.

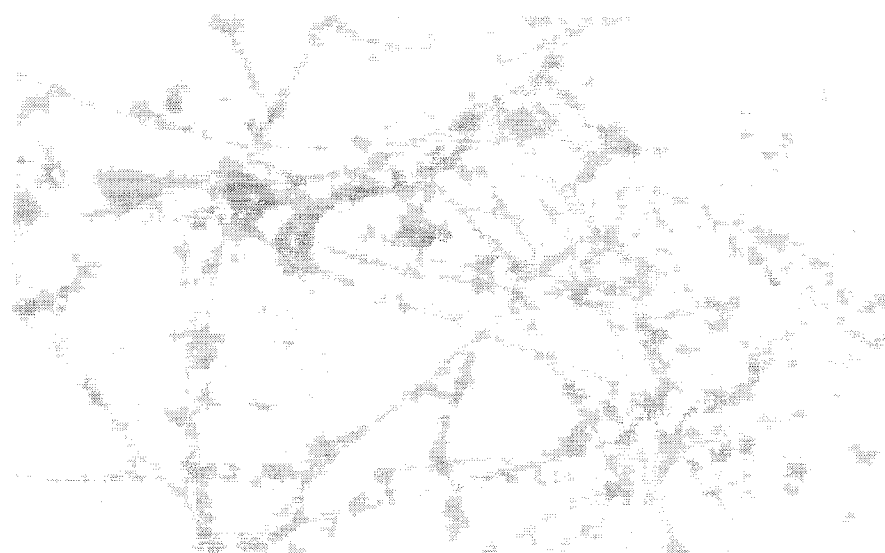


Fotomicrografias das células do exsudato da cavidade peritoneal de *Calomys callosus* aderidos em lâminas de vidro e coradas com azul de toluidina-borato de sódio a 1%.

FIGURA 3- Notam-se mastócitos (setas) entre outros tipos celulares obtidos após a segunda etapa do processo de purificação (centrifugação a 45 XG por 10 minutos a 4°C). 90X.

FIGURA-4- Mastócitos apresentando rompimento da membrana plasmática com exposição de grânulos citoplasmáticos (seta) e mastócitos íntegros (cabeças de setas), obtidos após a última etapa do processo de purificação (centrifugação a 40 XG, por 15 minutos a 4°C). 560X.





Fotomicrografias dos mastócitos do exsudato da cavidade peritoneal de *Calomys callosus* obtidos após a última etapa de purificação (ressuspensos em percoll e centrifugados a 40 XG, por 15 minutos a 4°C, descartadas as fases superior e média da suspensão), aderidos em lâminas de vidro e coradas com azul de toluidina-borato de sódio a 1%.

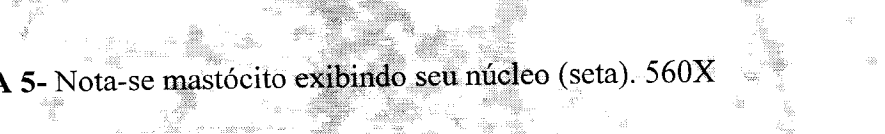
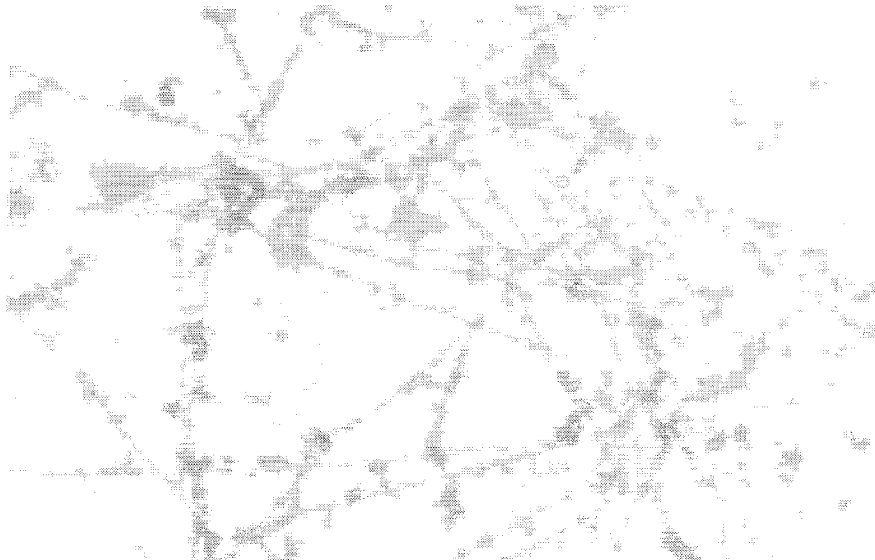


FIGURA 5- Nota-se mastócito exibindo seu núcleo (seta). 560X



FIGURA 6- Mostra o mastócito com seus grânulos citoplasmáticos preenchendo, praticamente todo o citoplasma. 870X

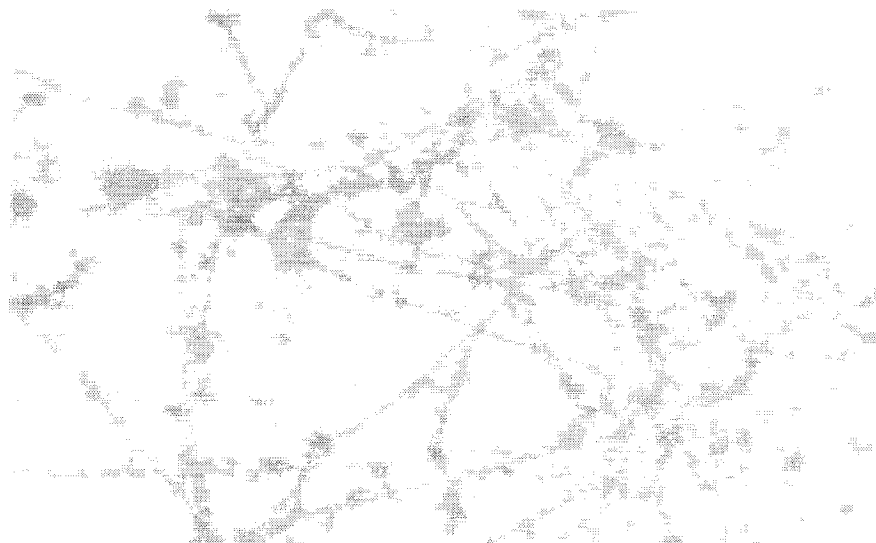


Electromicrografias do citoesqueleto de mastócitos isolados da cavidade peritoneal do *Calomys callosus* aderidas sobre telas de cobre revestidas por formvar em câmara úmida a 37° C, por 30 minutos, tratadas com Triton X-100 na ausência de inibidores de proteases.

FIGURA 7- Mastócito apresentando estruturas filamentosas fragmentadas (setas) e núcleo (N). 14700X

FIGURA 8- Detalhe de uma região de um mastócito exibindo estruturas filamentosas fragmentadas (setas). 48000X





Eletromicrografias do citoesqueleto de mastócitos isolados da cavidade peritoneal do *Calomys callosus* aderidos sobre telas de cobre revestidas por formvar em câmara úmida a 37° C, por 30 minutos, tratadas com Triton X-100 contendo inibidores de proteases.

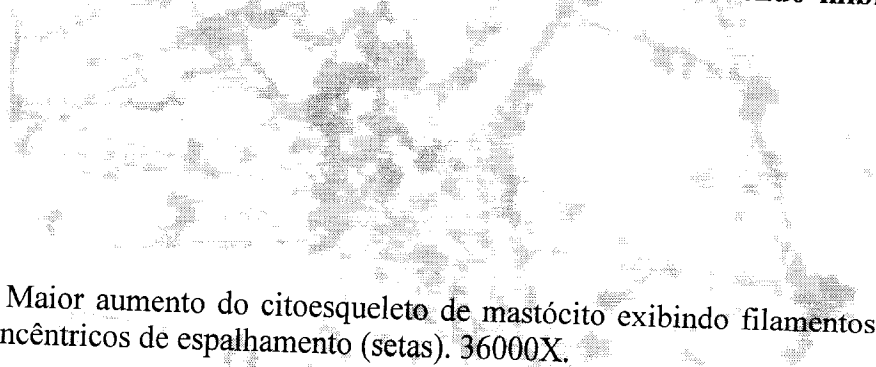


FIGURA 11- Maior aumento do citoesqueleto de mastócito exibindo filamentos íntegros com pontos concêntricos de espalhamento (setas). 36000X.

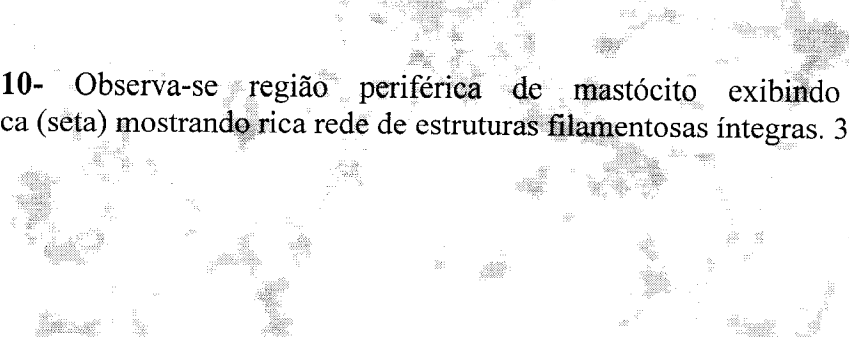
FIGURA 12- Mastócito parcialmente permeabilizado com exposição do citoesqueleto (seta). Núcleo (N). 32000X.




Electromicrografias do citoesqueleto de mastócitos isolados da cavidade peritoneal do *Calomys callosus* aderidos sobre telas de cobre revestidas por formvar em câmara úmida a 37° C, por 30 minutos, tratadas com Triton X-100 contendo inibidores de proteases.

FIGURA 9- Nota-se região periférica de mastócito exibindo rica rede de estruturas filamentosas. Núcleo (N). 36000X

FIGURA 10- Observa-se região periférica de mastócito exibindo delimitação citoplasmática (seta) mostrando rica rede de estruturas filamentosas íntegras. 30000X.





Electromicrografias do citoesqueleto de mastócitos isolados da cavidade peritoneal do *Calomys callosus* aderidos sobre telas de cobre revestidas por formvar em câmara úmida a 37° C, por 30 minutos, tratadas com Triton X-100 contendo inibidores de proteases.



FIGURA 13- Mastócito íntegro, sem exposição do citoesqueleto. 13000X

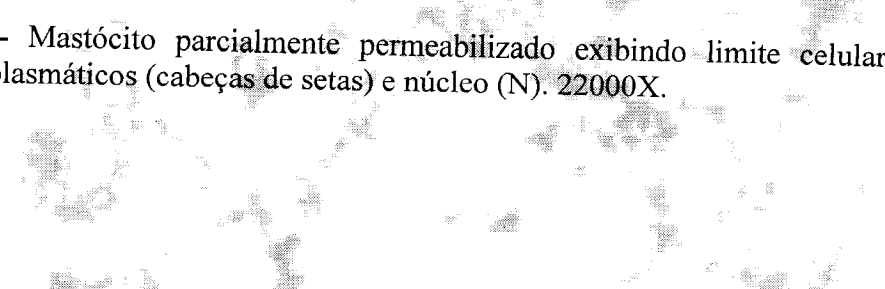



FIGURA 14- Mastócito parcialmente permeabilizado exibindo limite celular (setas), grânulos citoplasmáticos (cabeças de setas) e núcleo (N). 22000X.

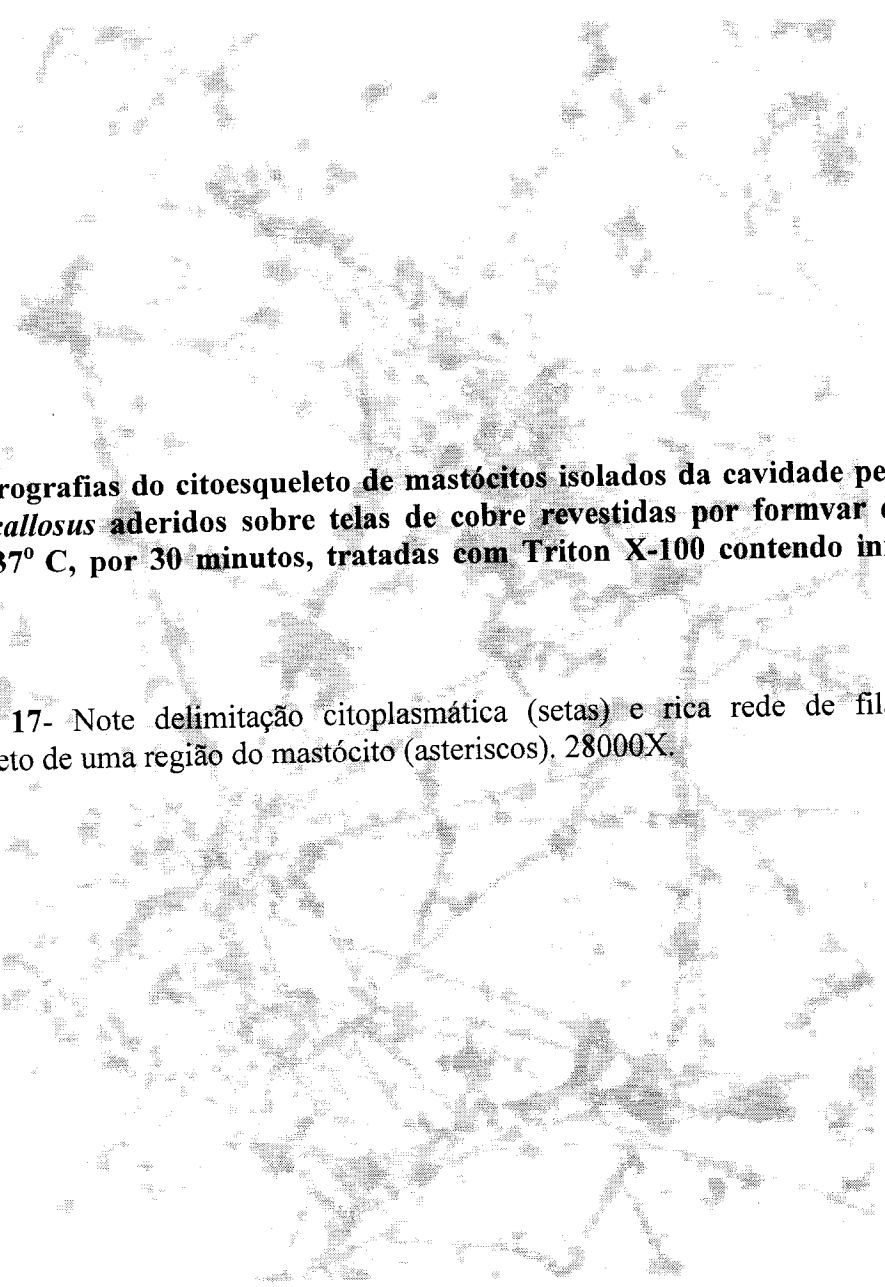


Eletromicrografias do citoesqueleto de mastócitos isolados da cavidade peritoneal do *Calomys callosus* aderidos sobre telas de cobre revestidas por formvar em câmara úmida a 37° C, por 30 minutos, tratadas com Triton X-100 contendo inibidores de proteases.

FIGURA 15- Mastócito parcialmente permeabilizado com exposição do citoesqueleto em algumas regiões do mesmo. 24000X.



FIGURA 16- Mastócito exibindo seus grânulos citoplasmáticos (setas). Núcleo (N). 17000X.

The image is a black and white electron micrograph showing a complex network of cytoskeletal filaments. The filaments are thin and interconnected, forming a dense mesh. There are several small, dark, star-shaped or asterisk-like structures scattered throughout the network. The overall appearance is that of a highly organized and interconnected cellular structure.

Eletromicrografias do citoesqueleto de mastócitos isolados da cavidade peritoneal do *Calomys callosus* aderidos sobre telas de cobre revestidas por formvar em câmara úmida a 37° C, por 30 minutos, tratadas com Triton X-100 contendo inibidores de proteases.

FIGURA 17- Note delimitação citoplasmática (setas) e rica rede de filamentos do citoesqueleto de uma região do mastócito (asteriscos), 28000X.

VII – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBERTS, B., BRAY, D., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K. WATSON, J.D. A Evolução da Célula e Células Diferenciadas e a Manutenção dos Tecidos. In: **Biologia Molecular da Célula**, ed. 3, Porto Alegre, Artes Médicas, p. 34-24, 1162-1212, 1997.
- BIENENSTOCK, J.; TOMIOKA, M.; STEAD, R.; ERNST, P.; JORDANA, M.; GAULDIE, J.; DOLOVICH, J. ; DENBURG, J. Mast Cell involvement in various inflammatory processes. **Amer. Rev. Resp. Dis.**, v. 135, n. 6, p. 95-98, 1987.
- BÖTTINGER, H.; REUNER, K. H.; & AKTDRIES, K. Inhibition of histamine release from rat mast cells by botulinum C₂ toxin. **Int. Archs. Allergy Appl. Immun.**, v. 84, p. 380-384, 1987.
- CHIU, H. & LAGUNOFF, D. Isolation and Adhesion of Mast Cell. **Histochemical Journal**, v. 4, p. 135-44, 1972.
- ENERBACK, L., SVENSSON, I. Isolation of Peritoneal Mast Cells by Centrifugation on Density Gradients of Percoll. **Journal Immunol Methods**, v. 39, n. 1-2, p. 135-45, 1980.
- ESPINDOLA, F. S.; SUTER, D. M.; LIN, C. H.; FORSCHER, P. & MOOSEKER, M. S. Localization of unconventional myosins V and VI in neurons. **Molecular Biology of the Cell**, v.7, p. 372, 1996a.
- ESPINDOLA, F. S.; CHENEY, R. E.; KING, S. M.; SUTER, D. M. & MOOSEKER, M. S. Myosin-V and dynein share a similar light chain. **Molecular Biology of the Cell**, v.7, p. 372, 1996b .
- FAVORETO Jr, S.; FERRO, E. A. V.; SILVA, M.; CLEMENTE, D.; RODRIGUES, J. R. Estudo da susceptibilidade de *Calomys callosus* a infecção experimental por *Toxoplasma gondii*. I SEMANA DE CIÊNCIAS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA. **Anais.....** 1.994.
- GALLI, S. J. New approaches for the analysis of mast cell maturation, heterogeneity, and function. **Federation Proc.**, v. 46, p. 1906-1914, 1987.

