

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

**MASTÓCITOS DO LINFONODO DA CAUDA DO PÂNCREAS DO GAMBÁ
Didelphis albiventris (DIDELPHIDEA). ASPECTOS ULTRA-ESTRUTURAIS E
FUNCIONAIS.**

GABRIELA LÍCIA SANTOS FERREIRA

ANA ALICE DINIZ DOS SANTOS

Orientadora

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

Uberlândia - MG

Dezembro - 1997

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

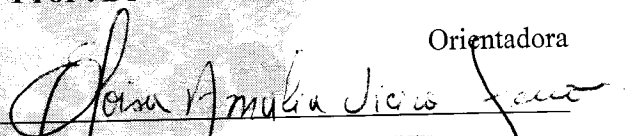
MASTÓCITOS DO LINFONODO DA CAUDA DO PÂNCREAS DO GAMBÁ
Didelphis albiventris (DIDELPHIDEA). ASPECTOS ULTRA-ESTRUTURAIS E
FUNCIONAIS.

GABRIELA LÍCIA SANTOS FERREIRA

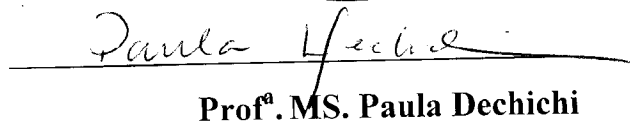
APROVADA PELA BANCA EXAMINADORA EM 12/12/97 Nota 10,0


Prof.^a Dr.^a Ana Alice Diniz dos Santos

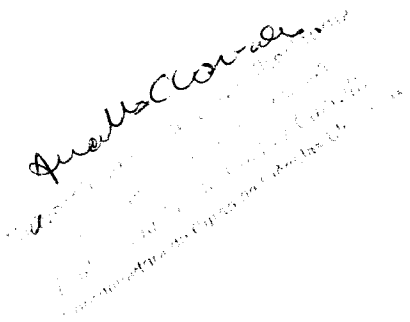
Orientadora


Prof.^a MS. Eloísa Amália Vieira Ferro

Co-orientadora


Prof.^a MS. Paula Dechichi

Co-orientadora


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

Uberlândia, 12 de dezembro de 1997.

“Uma nuvem não sabe porque se move em tal direção e em tal velocidade. Sente um impulso... é para este lugar que devo ir agora. Mas o céu sabe os motivos e desenhos por trás de todas as nuvens, e você também saberá, quando se erguer o suficiente para ver além dos horizontes.”

Richard Bach

**Aos meus pais, CELSO e EUSA, e ao meu irmãozinho,
ELIAS, as pessoas mais amadas e importantes da
minha vida! Pelo respeito e admirável apoio que
dispensam a mim.**

AGRADECIMENTOS

Agradeço:

à DEUS, pela beleza e perfeição da natureza;

à querida prof^a. ANA ALICE DINIZ DOS SANTOS, pelo exemplo de competência profissional, e por ter sempre à disposição tempo para ser uma educadora e uma amiga;

aos colegas do curso pela convivência, e aos amigos ANA PAULA BELELE, EVALDO GUIMARÃES, GISELE ANDREA SATRAPA, LEANDRO BARBOSA e MARCOS ANTÔNIO DE OLIVEIRA, pela amizade verdadeira e carinho. Os momentos de alegria e, até de tristeza, serão lembrados por mim sempre;

aos técnicos EMERSON e RUI, e à secretária JUSCÉLIA, por manterem o ambiente profissional tão agradável e familiar;

ao técnico HÉLGIO HEINISCH WERNECK, pelo eficiente serviço prestado e, principalmente, pelas lições de amizade e de vida;

aos professores do Setor de Histologia da UFU, em especial à professora ELOÍSA AMÁLIA VIEIRA FERRO pelo apoio, amizade e convívio agradável.

à minha prima-irmã HANNA LÍCIA FERREIRA SILVA, pela assistência na correção da monografia e à todos aqueles que de alguma maneira me auxiliaram.

RESUMO

Em linfonodos da cauda do pâncreas de gambás adultos estudaram-se os aspectos ultra-estruturais dos mastócitos e o comportamento desses frente ao tratamento crônico com o composto 48/80, usando-se métodos histológicos, morfométricos e ultra-estruturais. À microscopia eletrônica de transmissão os mastócitos da cápsula e do tecido linfóide foram semelhantes apresentando grânulos citoplasmáticos, em sua maioria, exibindo conteúdo homogêneo e elétron-denso, às vezes, com denteações assemelhando-se aos mastócitos da derme já descritos, exceto pela ausência da membrana basal. Os mastócitos localizados nos seios linfáticos foram nitidamente maiores, com grânulos citoplasmáticos também maiores, com diâmetro médio de $1,71 \pm 0,22 \mu\text{m}$ apresentando conteúdo de aspecto variado e, em sua maioria, exibindo elétron-densidade moderada e aspecto grumoso. Nos linfonodos da cauda do pâncreas de animais controles ao tratamento crônico com o composto 48/80 os mastócitos mantiveram as características histológicas e ultra-estruturais descritas anteriormente. Nos gambás tratados, os mastócitos da cápsula e do tecido linfóide mostraram nítido aumento da região do complexo de Golgi. Nos seios linfáticos ocorreu evidente diminuição: na quantidade dos mastócitos, na quantidade de grânulos citoplasmáticos por mastócito e no tamanho destes grânulos que apresentavam diâmetros, aparentemente, aproximados àqueles mostrados pelos mastócitos da cápsula e do tecido linfóide. Estes grânulos, em sua maioria, eram esféricos, alguns apresentavam denteações e, às vezes, saliência de um grânulo encaixada em denteação de outro. O conteúdo dos grânulos citoplasmáticos foi variado: muito elétron-denso e homogêneo (a maioria), com elétron-densidade moderada; com aspecto grumoso e, às vezes, com estrutura cristalóide em seu interior. Além disso, nos animais tratados os mastócitos encontrados nos seios linfáticos apresentaram inúmeras projeções citoplasmáticas, grânulos citoplasmáticos vazios, parcialmente vazios e, com frequência, fundidos formando canais intracitoplasmáticos indicativos de processo de desgranulação. Frequentemente, os mastócitos encontrados nos seios linfáticos

mostraram complexo de Golgi bastante desenvolvido com inúmeras microvesículas em suas proximidades; estruturas vesiculares contendo no seu interior microvesículas; estruturas vesiculares com conteúdo elétron-denso, isolado de sua membrana por um espaço elétron-lúcido, onde observou-se fusão de microvesículas com este conteúdo, assim como na superfície externa da membrana dessa mesma estrutura e algumas vesículas pequenas contendo grânulos elétron-densos. Maior quantidade de mitocôndrias e de estruturas filamentosas também foi evidente. Nossos estudos confirmaram a localização preferencial dos mastócitos nos seios linfáticos medulares nesse linfonodo e, que estes diferem dos mastócitos encontrados na cápsula e no tecido linfóide. Os mastócitos do tecido linfóide, da cápsula e dos seios linfáticos do linfonodo mostraram-se sensíveis ao tratamento crônico com composto 48/80, no entanto, nos mastócitos dos seios linfáticos ocorreram alterações morfológicas mais acentuadas.

Palavras-chaves: mastócito; composto 48/80; *D. albiventris*.

bladder structures with electron-dense contents isolated from it's membrane by a electron-lucid space, where microbladder fusion to these contents was observed, as done so on the external surface of the membrane of this same structure and on some small bladders containing electron-dense granules. A larger quantity of mitochondrias and filamentous materials was also evident. Our studies confirmed a prefered localization by the mast cells in the medular lymphatic sinuses in this lymph node (from the tail of the pancreas of adult opossum). We also confirmed that these particular mast cells are different from the mast cells found in the capsule and linfoid tissue. The mast cells of the linfoid tissue, capsule and lymphatic sinuses of the chronical treatment with a 48/80 compound, however in the mast cells of the lymphatic sinuses more severe morfological alterations occured.

Key-words: mast cells; 48/80 compound; *D. albiventris*

6- CONCLUSÕES.....	37
7- DOCUMENTAÇÃO FOTOGRÁFICA.....	38
8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	55

LISTA DE FIGURAS

Figs. 1 e 2- Mastócitos em seio linfático do linfonodo da cauda do pâncreas.....	40
Figura 3- Mastócito atípico presente no seio linfático do linfonodo da cauda do pâncreas.....	42
Figura 4- Mastócito típico de seio linfático ao lado de mastócito atípico do linfonodo da cauda do pâncreas.....	42
Figura 5- Mastócito no tecido linfóide do linfonodo da cauda do pâncreas....	44
Figura 6- Mastócito da cápsula do linfonodo da cauda do pâncreas.....	44
Figura 7- Mastócitos nos seios linfáticos do linfonodo da cauda do pâncreas do gambá controle ao tratamento crônico com o composto 48/80.....	46
Figura 8- Mastócitos nos seios linfáticos do linfonodo da cauda do pâncreas do gambá submetido ao tratamento crônico com o composto 48/80.....	46
Figura 9- Mastócito em seio linfático do linfonodo da cauda do pâncreas de animal controle ao tratamento crônico com o composto 48/80.....	48

Figura 10- Mastócito em seio linfático do linfonodo da cauda do pâncreas do gambá submetido ao tratamento crônico com o composto 48/80.....	48
Figs. 11-13 Mastócitos de seios linfáticos do linfonodo da cauda do pâncreas de gambás submetidos ao tratamento crônico com o composto 48/80.....	50
Figs.14-17 Mastócitos de seios linfáticos do linfonodo da cauda do pâncreas de gambás submetidos ao tratamento crônico com o composto 48/80.....	52
Figura 18- Mastócito de tecido linfóide do linfonodo da cauda do pâncreas de gambá submetido ao tratamento crônico com o composto 48/80.....	54
Figura 19- Mastócito de cápsula do linfonodo da cauda do pâncreas de gambá submetido ao tratamento crônico com o composto 48/80.....	54

1- INTRODUÇÃO

1.1- Mastócitos

Os mastócitos são células do tecido conjuntivo amplamente distribuídas pelo corpo das espécies de vertebrados já estudadas. São particularmente abundantes em áreas que entram em contato direto com substâncias exógenas, em associação com vasos sanguíneos e linfáticos, dentro e próximos de nervos periféricos, e em certas espécies dentro das cavidades pleural e peritoneal. Portanto, os mastócitos podem interagir com células e elementos de vários tecidos, órgãos e cavidades do corpo. Os mastócitos também participam das respostas de reações de hipersensibilidade imediata na pele (SOTER, 1983). Atualmente, sabe-se que os mastócitos constituem população heterogênea de células com propriedades morfológicas, bioquímicas e funcionais variando entre espécies e dentro de uma mesma espécie, inclusive no gambá *Didelphis albiventris*.

Morfológicamente são subdivididos em duas subpopulações: os mastócitos do tecido conjuntivo e os mastócitos de mucosa. A primeira encontra-se geralmente em

volta dos vasos e é constituída de células grandes com um citoplasma cheio de grânulos. A segunda subpopulação se restringe às mucosas, por exemplo do trato digestório e respiratório, e contém grânulos mais esparsos e maiores (MACEDO, 1989).

A heterogeneidade é um dos tópicos mais estudados e discutidos em relação aos mastócitos (revisões em GALLI, 1987; GLEICH, et al., 1986; ENERBACK, 1986; CHIARINI-GARCIA & MACHADO, 1992; CHIARINI-GARCIA, 1995; SANTOS & MACHADO, 1994; SANTOS, 1996). Estes estudos se intensificaram a partir de 1966 quando ENERBACK, estudando a mucosa intestinal de ratos detectou a presença de um tipo celular característico, denominado mastócito de mucosa. A heterogeneidade destes em relação aos mastócitos de tecido conjuntivo, baseia-se nos efeitos da fixação (ENERBACK, 1966a), nas propriedades de coloração (ENERBACK, 1966b), na resposta frente ao composto 48/80 (ENERBACK, 1966c) e na sua capacidade de armazenar aminas (ENERBACK, 1966d). Observa-se que, em mamíferos eutérios, os mastócitos apresentam grande heterogeneidade fenotípica e funcional possivelmente devido a: existência de linhagens distintas de mastócitos; processos celulares de maturação e diferenciação; estado funcional da célula e influência de fatores do microambiente (revisão em GALLI, 1986).

A partir da década de 80, os estudos sobre mastócitos direcionaram-se, principalmente, para a determinação de fatores do microambiente capazes de influenciar o fenótipo e a função dessa célula (GALLI, 1990, 1993; SWIETER et al., 1992), bem como para fatores que determinassem sua diferenciação (KITAMURA & FUJITA, 1989). Sabe-se, que os mastócitos têm origem na medula óssea (KITAMURA et al., 1987a) e que células precursoras de mastócitos, não identificáveis morfológicamente, migram pela corrente sanguínea, invadem os tecidos conjuntivos, proliferam e diferenciam-se em mastócitos. O microambiente, onde se alojam precursores ou são inoculados mastócitos já diferenciados, é decisivo para a expressão ou manutenção de um dado fenótipo (revisões em MILLER, 1980 e KITAMURA et al., 1987a,b). NOS linfonodos abdominais do gambá *Didelphis albiventris*, há populações de mastócitos morfológicamente diferentes (SANTOS, 1996). A bioquímica dos diversos microambientes é ainda desconhecida. No entanto, já se

uma ativação imunológica dos mastócitos, através da ligação do alérgeno à imunoglobulina E ligada à sua superfície (revisão em LEWIS & AUSTEN, 1981). Esta interação Ag-IgE age sobre o sistema adenil-ciclase-AMPc provocando uma série de eventos no mastócito, que culminam com a extrusão dos grânulos citoplasmáticos (AUSTEN, 1984). Assim, mediadores são liberados e exercem suas funções. Estes mediadores podem ser divididos em duas classes: aqueles que são pré-formados e estocados nos grânulos dos mastócitos; e aqueles que são sintetizados após a ativação dos mastócitos (PEARCE, 1986). Os mediadores pré-formados e estocados compreendem aminas (histamina e serotonina), proteases (carboxipeptidases e proteases neutras), outras enzimas (arissulfatase, peroxidase, beta-hexosaminidase), fatores quimiotáticos (para eosinófilos e neutrófilos), e as proteoglicanas: heparina e sulfato de condroitina (revisão em LEE et al., 1986; PEARCE, 1986). A presença e concentração de cada um destes mediadores, varia conforme a espécie e em tecidos diferentes na mesma espécie (PEARCE, 1986); assim como entre as espécies. O exemplo clássico refere-se à serotonina que, em roedores (AUSTEN, 1984) e no gambá *Didelphis albiventris* (MACHADO, 1980), é um dos constituintes dos grânulos. Ainda, a heparina presente nos grânulos dos mastócitos da mucosa do íleo do gambá *D. albiventris* (SANTOS & MACHADO, 1994).

Vários trabalhos mostram que mastócitos de diferentes espécies ou de diferentes tecidos de uma mesma espécie podem apresentar diferenças na reatividade ao composto 48/80. HÖGBERG & UVNÄS (1957) adiantaram a hipótese de que o composto 48/80 age pela ativação de uma enzima lítica que se fixa à membrana do mastócito, induzindo a liberação dos grânulos. Outra enzima que pode estar envolvida no processo de desgranulação é uma protease quimiotripsina-símile presente nos grânulos dos mastócitos (BENDITT & ARASE, 1959; LAGUNOFF & BENDITT, 1963).

1.2- Linfonodos

Os linfonodos ou gânglios linfáticos são estruturas geralmente ovóides, encapsuladas, que se interpõem no trajeto dos vasos linfáticos. Constituem-se basicamente de aglomerado de linfócitos que estão arranjados de forma ordenada sobre o estroma de células e fibras reticulares. São considerados órgãos linfóides secundários ou periféricos por participarem dos processos imunológicos, tanto na resposta imune quanto celular. Considerando sua posição estratégica, no trajeto do sistema linfático, atribui-se aos linfonodos duas funções na defesa do organismo: fagocitose através de macrófagos e resposta imune, devido a atuação de linfócitos B e T (revisão em FOSSUM & FORD, 1985). Estas atividades dificultam que antígenos presentes na linfa alcancem o sistema circulatório sem resposta defensiva.

Sabe-se hoje, que os linfonodos são capazes de exercer de modo eficaz suas funções devido a cooperação de outras células presentes dentro do órgão. Essas células são denominadas de acessórias ou não linfóides e dentre outras citam-se as células interdigitantes, células em véu, células dendríticas foliculares, macrófagos, granulócitos e mastócitos (FOSSUM & VAALAND, 1983; FOSSUM & FORD, 1985).

1.3- Gambá *Didelphis albiventris*

O gambá é um mamífero não eutério e o desenvolvimento intra-uterino de seus filhotes é em média de 13 dias, dirigindo-se após esta fase ao marsúpio onde completarão seu desenvolvimento embrionário. Os filhotes dirigem-se à bolsa marsupial com movimentos próprios até alcançarem suas tetas para fixarem-se e alimentarem-se. Devido esta característica o gambá é considerado ótimo modelo experimental para estudos em vários ramos das ciências biológica e biomédica. Para estudos embrionários é desnecessária a realização de cirurgias. Particularmente, quanto

ao sistema imunológico são peculiares já que o timo, o baço e os linfonodos só se desenvolvem quando o embrião está na bolsa marsupial (revisão em DEANE & COOPER, 1988).

A espécie *Didelphis albiventris* habita a América do Sul abrangendo os ecossistemas de Chaco, Cerrado e Caatinga. É encontrada com frequência no Triângulo Mineiro, Minas Gerais, em fazendas e em áreas urbanas de Uberlândia.

Sobre mastócitos em marsupiais a literatura é escassa, no entanto no gambá *D. albiventris* sabe-se que estas células são heterogêneas quanto aos aspectos histológicos e histoquímicos dependendo do órgão ou tecidos estudados (CHIARINI-GARCIA & MACHADO, 1992; SOARES et al., 1988; SANTOS, 1988; SANTOS & MACHADO, 1987; SANTOS & MACHADO, 1989; SANTOS & MACHADO, 1990; SANTOS & MACHADO, 1994). Além da presença de serotonina há, nos mastócitos de vários órgãos do gambá *D. albiventris*, histamina (FERRARI & MACHADO, 1980) e heparina (CHIARINI-GARCIA & MACHADO, 1992; SANTOS & MACHADO, 1994). Estudos ontogenéticos sobre linfonodos axilares, submandibulares, mesentérico e de mastócitos nestes órgãos foram realizados no gambá *D. albiventris* à microscopia de luz (CHIARINI-GARCIA, 1995; SANTOS, 1996). Recentemente foi identificado heterogeneidade na morfologia e distribuição dos mastócitos em diferentes linfonodos abdominais de *D. albiventris* (SANTOS, 1996; FERREIRA & SANTOS, 1997). O comportamento dos mastócitos em linfonodos axilares, submandibulares, da mucosa do íleo e da derme da orelha do gambá *D. albiventris* foi também estudado sob a ação do composto 48/80 (CHIARINI-GARCIA et al., 1997; SANTOS et al., 1997a,b).

Devida as características histológicas, a distribuição e a localização dos mastócitos serem heterogêneas entre linfonodos de diferentes regiões no gambá *D. albiventris* (CHIARINI-GARCIA & MACHADO, 1992; SANTOS, 1996). CHIARINI-GARCIA & MACHADO (1992) sugerem que este modelo biológico (gambá/mastócito/tecido linfóide) possa contribuir para o estudo das relações entre mastócitos e o tecido linfóide, bem como para elucidar a função dos mastócitos de seios medulares, tópico controverso mesmo em eutérios. Assim, torna-se atraente realizar estudos pormenorizados desse modelo experimental com o objetivo de investigar os mastócitos do linfonodo da cauda do pâncreas quanto as suas

características ultra-estruturais, possíveis interações com outras células e as características funcionais desses mastócitos.

2- OBJETIVOS

Descrever as características ultra-estruturais dos mastócitos do linfonodo da cauda do pâncreas.

Estudar o comportamento dos mastócitos do linfonodo da cauda do pâncreas frente ao tratamento com o composto 48/80.

3- MATERIAL E MÉTODOS

3.1- ANIMAIS

Foram utilizados treze gambás da espécie *D. albiventris* Lund, 1841 (Didelphidea) capturados nas proximidades do campus da Pampulha em Belo Horizonte, Minas Gerais, e mantidos na sala de manutenção de animais em experiência no Departamento de Morfologia da Universidade Federal de Minas Gerais, por tempo variável. Os gambás adultos receberam ração preparada de acordo com JURGELSKI, (1974): ração Cat Show (Purina), fígado bovino cru e água na proporção de 1 : 0,3 : 2,5. O fígado foi batido no liquidificador com parte da água e em seguida acrescentado à ração previamente umidecida com o restante da água. Essa mistura, de aspecto pastoso, foi conservada no freezer e oferecida, diariamente, aos animais na proporção de aproximadamente 80 a 100 g por animal. Além da ração, foi também oferecido frutas, água a vontade e, periodicamente, ovos e ossos de aves.

Para o estudo do comportamento dos mastócitos frente ao tratamento com o composto 48/80 foram utilizados animais irmãos capturados, ainda na bolsa marsupial.

Posteriormente, foram retirados das mães e mantidos em gaiolas isoladas até atingirem 130 dias de vida pós-natal. Os filhotes, quando isolados das mães, também receberam a alimentação referida anteriormente. Foram colhidos os linfonodos da cauda do pâncreas e processados de acordo com a metodologia descrita, a seguir:

3.2- MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

Os animais foram anestesiados com Nembutal à 3 % (30 mg/Kg de peso corporal). Os linfonodos da cauda do pâncreas de 3 gambás foram fixados por imersão em solução de Karnovsky modificada (glutaraldeído a 2,5 % e paraformaldeído a 2 %) em tampão cacodilato 0,1 M em pH 7,2 (KARNOVSKY, 1965), durante 17 horas a 4° C. Foram pós-fixados em tetróxido de ósmio reduzido (tetróxido de ósmio a 1 % em tampão cacodilato 0,1 M com ferrocianeto de potássio a 1,5 %) por 1 hora e 30 minutos à 4° C. Em seguida, foram lavados no tampão, desidratados em álcool etílico em concentrações crescentes, seguiram-se duas passagens em óxido propileno e foram mantidos sob agitação constante em mistura de óxido de propileno e resina à base de Epon na proporção de 2:1 (v/v), durante uma noite. No dia seguinte, foram colocados na resina pura, onde permaneceram por 1 hora à temperatura ambiente. Finalmente, foram incluídos devidamente orientados, e mantidos em estufa a 40° C por 1 hora. Após este processo, permaneceram em estufa à 60° C por 24 horas, no mínimo, para polimerização da resina e conseqüente endurecimento.

Os blocos com o material incluído foram aparados e preparados para microtomia na máquina de talhar (Reichert-Jung). Cortes semi-finos de 0,5 a 1 µm foram corados com azul de toluidina a 0,5 % em solução de borato de sódio 0,5 % à 80°C durante 30 a 60 segundos e diferenciados em álcool etílico a 50 % para selecionar-se a melhor área para ultramicrotomia.

Para os estudos ultra-estruturais, os cortes ultra-finos foram submetidos à dupla coloração com acetato de uranila a 3 % (WATSON, 1958) e citrato de chumbo a 1 % (REYNOLDS, 1963), e examinados ao microscópio eletrônico de transmissão EM-109 (ZEISS) da Universidade Federal de Uberlândia.

As medidas dos diâmetros dos grânulos dos mastócitos foram obtidas em eletromicrografias. Mediu-se 220 grânulos de 22 mastócitos de seios linfáticos. Para obtenção dos diâmetros médios dos grânulos expressos em micrômetros, somou-se o diâmetro maior com o menor de cada grânulo e dividiu-se por dois. Dos valores obtidos calculou-se a média e o desvio padrão.

3.3- TRATAMENTO COM O COMPOSTO 48/80

Neste estudo os animais foram submetidos ao tratamento crônico com o composto 48/80. Utilizaram-se dez gambás jovens irmãos, de duas proles com peso médio de 176,5 gramas e com SRL (Snout Rump Length- distância entre a extremidade do focinho e o ponto de inserção da cauda, segundo CUTTS et al., 1978) médio de 205,5 mm. Desses animais, seis (1 macho e 5 fêmeas) receberam duas doses diárias do composto 48/80 (Sigma) dissolvido em salina 0,9 % durante cinco dias. A droga foi injetada intraperitonealmente (pela manhã e a tarde) na concentração de 0,1 mg do composto/100 gramas de peso corporal, no primeiro dia. A cada dia foi acrescido 0,1 mg do composto 48/80 na mesma proporção em relação ao peso corporal, de modo que no 5º dia os animais receberam 0,5 mg/100 g de peso corporal. Os quatro animais restantes (1 macho e 3 fêmeas) foram utilizados como controles recebendo apenas os volumes correspondentes de salina. O volume/dose variou de 0,06 ml a 0,42 ml para os animais tratados e controles. Durante essa etapa, os animais não foram anestesiados. Após 30 minutos da última dose os animais foram anestesiados com nembutal à 3 %.

O comportamento dos mastócitos do linfonodo da cauda do pâncreas foi analisado à microscopia eletrônica de transmissão seguindo a metodologia descrita no ítem 3.2 e à microscopia de luz como descrito a seguir:

3.3.1- Microscopia de Luz

Os linfonodos foram fixados em solução de Carnoy (etanol absoluto: clorofórmio: ácido acético- 6 : 3 : 1) a 4°C por 24 horas. Após desidratação em etanol absoluto (3x), seguiu-se os procedimentos de rotina para inclusão em resina plástica a base de glicol metacrilato (Tecknovit 7.100 - KULZER). Cortes de 0,5 a 3 µm de espessura foram obtidos através de navalha de vidro. Os cortes foram distendidos em água destilada, colocados em lâminas histológicas e mantidos em temperatura ambiente para a secagem. Em seguida, estes foram corados por 1 minuto com solução aquosa de azul de toluidina O (Merck) a 0,5 % e borato de sódio 1 %.

4- RESULTADOS

4.1- Ultra-estrutura dos mastócitos do linfonodo da cauda do pâncreas.

Os mastócitos localizados, preferencialmente, nos seios linfáticos medulares apresentaram inúmeros grânulos citoplasmáticos esféricos ou ovais. Alguns desses grânulos faziam saliência na membrana plasmática ou alojavam-se em concavidades na superfície da membrana nuclear (Fig. 1). Esses grânulos foram heterogêneos quanto ao tamanho e quanto a elétrons-densidade de seu conteúdo. Apresentaram diâmetro médio de $1,71 \pm 0,22 \mu\text{m}$. Em sua maioria, exibiram conteúdo pouco elétron-denso com aspecto finamente granuloso (Fig. 1). Algumas mitocôndrias e complexo de Golgi também foram observados (Fig. 2). Nos seios linfáticos medulares foram também observados mastócitos exibindo características claramente distintas dos mastócitos típicos dessa região. Esses apresentaram-se, nitidamente menores, com menor quantidade de grânulos citoplasmáticos que eram, em sua maioria, esféricos e com conteúdo mais homogêneo e elétron-denso e, ainda alguns grânulos em forma de cesta ou irregulares (Figs. 3 e 4).

Os mastócitos presentes no tecido linfóide possuíam grânulos citoplasmáticos, frequentemente, esféricos e alguns com denteações. O conteúdo desses grânulos era elétron-denso e homogêneo (Fig. 5).

Na cápsula do linfonodo, observaram-se mastócitos com o citoplasma preenchido por grânulos, em sua maioria, esféricos com conteúdo elétron-denso e homogêneo. Alguns grânulos exibindo denteações também foram notados (Fig. 6).

4.2- Comportamento dos mastócitos do linfonodo da cauda do pâncreas frente ao composto 48/80

4.2.1- Microscopia de luz

Nos linfonodos da cauda do pâncreas dos animais controles ao tratamento com o composto 48/80, os mastócitos foram encontrados com maior frequência nos seios linfáticos medulares. Estes apresentaram o citoplasma repleto de grânulos citoplasmáticos, em sua maioria, esféricos e com conteúdo homogêneo (Fig. 7 e encarte).

Nos animais submetidos ao tratamento crônico com o composto 48/80 notou-se nítida diminuição na quantidade de mastócitos, nos seios linfáticos, e na quantidade de seus grânulos citoplasmáticos (Fig. 8 e encarte).

4.2.2- Microscopia Eletrônica de Transmissão

Os mastócitos encontrados nos seios linfáticos do linfonodo da cauda do pâncreas de animais controles mantiveram as características já descritas para os mastócitos de animais não submetidos ao tratamento crônico com o composto 48/80 (Fig. 9).

Os mastócitos localizados nos seios linfáticos, após tratamento com o composto 48/80 apresentaram projeções citoplasmáticas e quantidade variável de grânulos citoplasmáticos (Fig. 10). Estes grânulos, em sua maioria, foram esféricos, alguns com denteações e, às vezes, saliência de um grânulo encaixada em denteação de outro. O conteúdo dos grânulos citoplasmáticos foi variado: muito elétron-denso e homogêneo (a maioria); com elétron-densidade moderada; com aspecto grumoso e, às vezes, com estrutura cristalóide em seu interior (Fig. 10 e encarte). Identificaram-se, ainda, mastócitos com grânulos citoplasmáticos vazios ou parcialmente vazios, ao lado de outros exibindo conteúdo de elétron-densidade variada (Figs. 11 e 12) e grânulos fundidos, formando canais de desgranulação (Fig. 12). Identificaram-se mastócitos rompidos e grânulos citoplasmáticos no meio extracelular (Fig. 13). Além disso, mastócitos de seios linfáticos, freqüentemente, exibiram: complexo de Golgi bastante desenvolvido com inúmeras microvesículas, em suas proximidades e maior quantidade de mitocôndrias (Figs. 14 e 15); estruturas vesiculares contendo no seu interior apenas microvesículas (Fig. 15); e outras contendo além de microvesículas, conteúdo elétron-denso, isolado de sua membrana por um espaço elétron-lúcido, onde observou-se fusão de microvesículas com este conteúdo, assim como com a superfície externa da membrana dessa mesma estrutura vesicular (Fig. 16) e algumas vesículas pequenas contendo grânulos elétron-densos (Fig. 17).

No tecido linfóide identificaram-se mastócitos com formas variadas: esféricos, alongados ou irregulares. O conteúdo de seus grânulos citoplasmáticos variou entre elétron-densos e homogêneos; com elétron-densidade moderada; com aspecto grumoso. Também exibiram grânulos vazios ou parcialmente vazios e região de complexo de Golgi bastante desenvolvida (Fig. 18). Os mastócitos encontrados na

cápsula exibiram quantidade variável de grânulos citoplasmáticos. Estes, em sua maioria, apresentaram conteúdo elétron-denso e homogêneo, com ou sem denteação e complexo de Golgi desenvolvido (Fig.19).

5- DISCUSSÃO

Recentemente SANTOS (1996) estudando mastócitos dos linfonodos abdominais do gambá *Didelphis albiventris* detectou que a localização e as características histológicas dos mastócitos variavam de acordo com a procedência da linfa drenada por estes linfonodos. Deste modo, SANTOS (1996) agrupou os linfonodos de acordo com a localização preferencial e as características de seus mastócitos. Entre estes linfonodos, identificou que os mastócitos do linfonodo da cauda do pâncreas localizavam-se preferencialmente nos seios linfáticos e exibiam características histológicas diferentes daquelas apresentadas pelos mastócitos da derme, do íleo e de outros linfonodos abdominais desse animal, como por exemplo do linfonodo mesentérico, porém semelhantes às descritas para os mastócitos de seios linfáticos de linfonodos da cabeça, cervicais e dos membros do gambá *D. albiventris* (CHIARINI-GARCIA & MACHADO, 1992) e dos linfonodos cervicais do marsupial *Sminthopsis crassicaudata* (HAYNES, 1991). No presente trabalho foram estudados os mastócitos do linfonodo da cauda do pâncreas do gambá *Didelphis albiventris* e foram confirmadas as diferenças morfológicas e histométricas, em relação aos mastócitos encontrados no linfonodo mesentérico (SANTOS, 1996). À microscopia eletrônica de transmissão, os mastócitos de seios linfáticos do linfonodo da cauda do

pâncreas apresentaram grânulos cujo diâmetro médio é de $1,71 \pm 0,22 \mu\text{m}$. Esses grânulos foram semelhantes aos grânulos dos mastócitos dos seios linfáticos dos linfonodos da cabeça, cervicais e dos membros que localizavam-se preferencialmente nos seios linfáticos e apresentaram diâmetro médio de $1,53 \pm 0,34 \mu\text{m}$ (CHIARINI-GARCIA, 1995), porém são significativamente maiores do que os grânulos citoplasmáticos dos mastócitos identificados na mucosa do íleo, no linfonodo mesentérico e na derme cujos diâmetros médios são de $1,08 \pm 0,28 \mu\text{m}$, $0,53 \pm 0,09 \mu\text{m}$ e $0,51 \pm 0,12 \mu\text{m}$, respectivamente (SANTOS & MACHADO, 1994; SANTOS, 1996). É interessante ressaltar que no linfonodo mesentérico do gambá *Didelphis albiventris* os mastócitos localizam-se preferencialmente nos cordões medulares (SANTOS, 1996).

São intrigantes essas diferenças quanto a localização e aspectos morfológicos dos mastócitos de linfonodos do gambá *Didelphis albiventris* de diferentes regiões identificados por nós e por outros autores (CHIARINI-GARCIA & MACHADO, 1992; CHIARINI-GARCIA, 1995; SANTOS, 1996). Assim, é válido supor que a qualidade da linfa drenada por esses linfonodos possa ter algum papel na localização e no fenótipo dos mastócitos. Convém salientar, no entanto, que em ratos o linfonodo mesentérico apresenta numerosos mastócitos localizados em seios medulares (MAJEED, 1994). Em outros linfonodos de ratos (SAINTE-MARIE & PENG, 1990) e de camundongos (LOZZI et al., 1996), os mastócitos também predominam em seios linfáticos mas mantêm o fenótipo de mastócitos de tecido conjuntivo.

Sabe-se que alguns dos produtos sintetizados pelos mastócitos são estocados em seus grânulos citoplasmáticos (como: heparina, aminas biogênicas, proteases e carboxipeptidase), enquanto outros são produzidos “de novo”, os leucotrienos e as prostaglandinas (revisão em PEARCE, 1986; STEVEN & AUSTEN, 1989). Após estimulação imunológica e não imunológica, os mastócitos liberam uma variedade de substâncias para a matriz extracelular. O processo de liberação do conteúdo dos grânulos dos mastócitos pode ocorrer através de dois mecanismos básicos: a) desgranulação gradual (peacemeal), quando há liberação de produtos estocados sem

extrusão dos grânulos citoplasmáticos (ENERBACK & LOWHANGEM, 1979; DIMITRIADOU et al., 1990; KOPS et al., 1990; DVORAK et al., 1992); b) desgranulação anafilática, quando ocorre fusão dos grânulos entre si e destes com a membrana plasmática, ocorrendo solubilização e eliminação dos produtos estocados (RÖHLICH et al., 1971; ASKENASE et al., 1980; FRIEDMAN & KALINER, 1988).

Em trabalhos experimentais várias substâncias têm sido usadas para estudo dos processos de desgranulação dos mastócitos. Entre elas: os ionóforos de cálcio (KAZIMIERCZAK et al., 1978), polimixina B (LAGUNOFF, 1972), carbacol (DIMITRIADOU et al., 1990) e o composto 48/80 (ENERBACK, 1966c; ENERBACK & LUNDIN, 1974; ENERBACK & LOWHAGEN, 1979; CHIARINI-GARCIA, 1995; SANTOS, 1996). Segundo PEARCE (1982), o efeito dessas drogas é muito variável entre as espécies e mesmo em mastócitos de tecidos diferentes de uma mesma espécie. Entre essas drogas a mais estudada é o composto 48/80, que tem sido usada com frequência para caracterizar diferentes populações de mastócitos (ENERBACK, 1966c; SANTOS, 1996). O composto 48/80 é um produto da condensação do p-metaxifenetilmetilamina com o formaldeído.

RILEY & WEST (1955) demonstraram ser o composto 48/80 capaz de induzir o rompimento e desaparecimento dos mastócitos do tecido conjuntivo subcutâneo e do peritônio de rato, com concomitante depleção dos níveis teciduais de histamina, respondendo de maneira dose dependente (BLOOM & HAEGERMARK, 1965; RÖHLICH et al., 1971). Após desgranulação dos mastócitos peritoneais de rato, observa-se que alguns morrem, mas a maioria regranula. Entre 8 a 20 horas são encontrados na quantidade normal, apesar de apresentarem menor número de grânulos citoplasmáticos (FAWCETT, 1955). De fato, o efeito do composto 48/80 na liberação de histamina é secretor e não lítico (LAGUNOFF & MARTIN, 1983). RILEY & WEST (1955) também demonstraram a ocorrência de gradual recuperação, tanto do número de mastócitos, como do conteúdo de histamina.

É interessante frisar que a resposta dos mastócitos ao composto 48/80 varia com a espécie animal e em diferentes tecidos dentro da mesma espécie. Mastócitos de cobaias não são sensíveis ao composto 48/80, mesmo quando este composto é usado em doses letais (MOTA & VUGMAN, 1956a,b). Já os mastócitos de camundongo são

pouco sensíveis a esta substância (RILEY & WEST, 1955), enquanto os mastócitos de rato respondem de modo diferente dependendo do tecido (ENERBACK, 1966c). Sabe-se também, que a sensibilidade do mastócito ao composto 48/80 depende do estágio de maturação dessa célula (BEAVEN et al., 1983). Mastócitos de cão e gato também são sensíveis ao composto 48/80 (revisão em MOTA & VUGMAN, 1956a).

Pouco se sabe sobre o comportamento dos mastócitos do gambá, ou de qualquer outro marsupial, frente ao composto 48/80. SANTOS (1996) observou que no gambá *D. albiventris*, os mastócitos da derme e da submucosa do íleo apresentaram sinais de desgranulação à microscopia de luz e à microscopia eletrônica de transmissão, tanto pelo tratamento agudo como pelo tratamento crônico com o composto 48/80. No entanto, os mastócitos da mucosa do íleo somente apresentaram evidências de desgranulação no tratamento agudo. Em contraposição à diminuição do número de mastócitos da derme, pelo tratamento crônico, ocorreu aumento significativo no número dos mastócitos da mucosa do íleo. CHIARINI-GARCIA (1995) evidenciou em seus estudos no gambá *D. albiventris*, que o composto 48/80 também provocou intensa desgranulação em mastócitos de seios linfáticos de linfonodos cervicais e axilares, desse animal, comprovada à microscopia eletrônica de transmissão. Os grânulos citoplasmáticos liberados foram fagocitados pelos macrófagos dos seios linfáticos. Aqueles mastócitos de seios linfáticos que não se romperam apresentavam fusão das membranas dos grânulos formando canais intracitoplasmáticos que conectavam-se com o meio extracelular. Nesse caso, observou-se perda do conteúdo granular mas, aparentemente sem morte da célula. Já em mastócitos do tecido conjuntivo, as alterações não foram tão evidentes. À microscopia de luz esses mastócitos, expostos ao composto 48/80, mostraram-se com grânulos mais individualizados e em menor número. Ao microscópio eletrônico de transmissão não detectou alterações claras nos grânulos citoplasmáticos, mas sua quantidade era menor. O complexo de Golgi estava muito evidente e os filamentos citoplasmáticos foram mais frequentes.

Nossos resultados indicam claramente que os mastócitos do linfonodo da cauda do pâncreas de gambá respondem ao tratamento crônico com o composto 48/80. A nítida diminuição da quantidade dos mastócitos dos seios linfáticos e as alterações, tanto no aspecto do conteúdo dos grânulos como na quantidade desses grânulos, e a

freqüente fusão de grânulos formando canais intracitoplasmáticos são sinais indicativos de processos de desgranulação nesses mastócitos. De fato, essas alterações também foram observadas em mastócitos que desenvolviam processos de desgranulação em eutérios (RÖHLICH et al., 1971; LAGUNOFF, 1972) e no gambá *D. albiventris* (CHIARINI-GARCIA, 1995). Além disso evidenciamos nos mastócitos de seios linfáticos do linfonodo da cauda do pâncreas outras alterações que consideramos resultantes da ativação do processo de regranulação, como: presença de complexo de Golgi muito desenvolvido com inúmeras microvesículas em suas proximidades; estruturas vesiculares contendo no seu interior microvesículas; estruturas vesiculares com conteúdo elétron-denso, isolado de sua membrana por um espaço elétron-lúcido, onde observou-se fusão de microvesículas com este conteúdo, assim como com a superfície externa dessas estruturas vesiculares; algumas vesículas pequenas contendo grânulos elétron-densos e nítido aumento na quantidade de mitocôndrias e estruturas filamentosas. Algumas dessas alterações, que consideramos como evidências de processos de regranulação dos mastócitos, também foram descritas por COMBS (1966) e TAKEOKA et al. (1980) ao estudarem as fases de formação dos grânulos citoplasmáticos de mastócitos de rato. Ainda, a predominância de mastócitos atípicos nos seios linfáticos é indicativa do processo de regeneração ou de regranulação dos mastócitos que eliminaram o conteúdo de seus grânulos frente ao tratamento com composto 48/80. Isto é reforçado pelas observações de CHIARINI-GARCIA (1995) que, ao estudar a ontogenia dos mastócitos de seios linfáticos do gambá, percebeu que os primeiros mastócitos que surgiam exibiam as mesmas características apresentadas pelos mastócitos atípicos descritos por nós.

No presente trabalho os mastócitos da cápsula e do tecido linfóide mostraram pequenas alterações ao tratamento crônico com composto 48/80. No entanto, essa diferença não indica, necessariamente, serem estes mastócitos menos sensíveis ao composto 48/80. O tempo decorrido das injeções à colheita do material do órgão, pode ter sido ideal para os mastócitos de seios linfáticos, mas inadequado para os mastócitos de cápsula e do tecido linfóide. Para melhor entendimento da ação do composto 48/80 sob as diferentes populações de mastócitos nesse linfonodo, serão necessárias colheitas

após cada dose do experimento crônico para estabelecer a cinética do processo de desgranulação e de regranulação desses mastócitos.

6- CONCLUSÕES

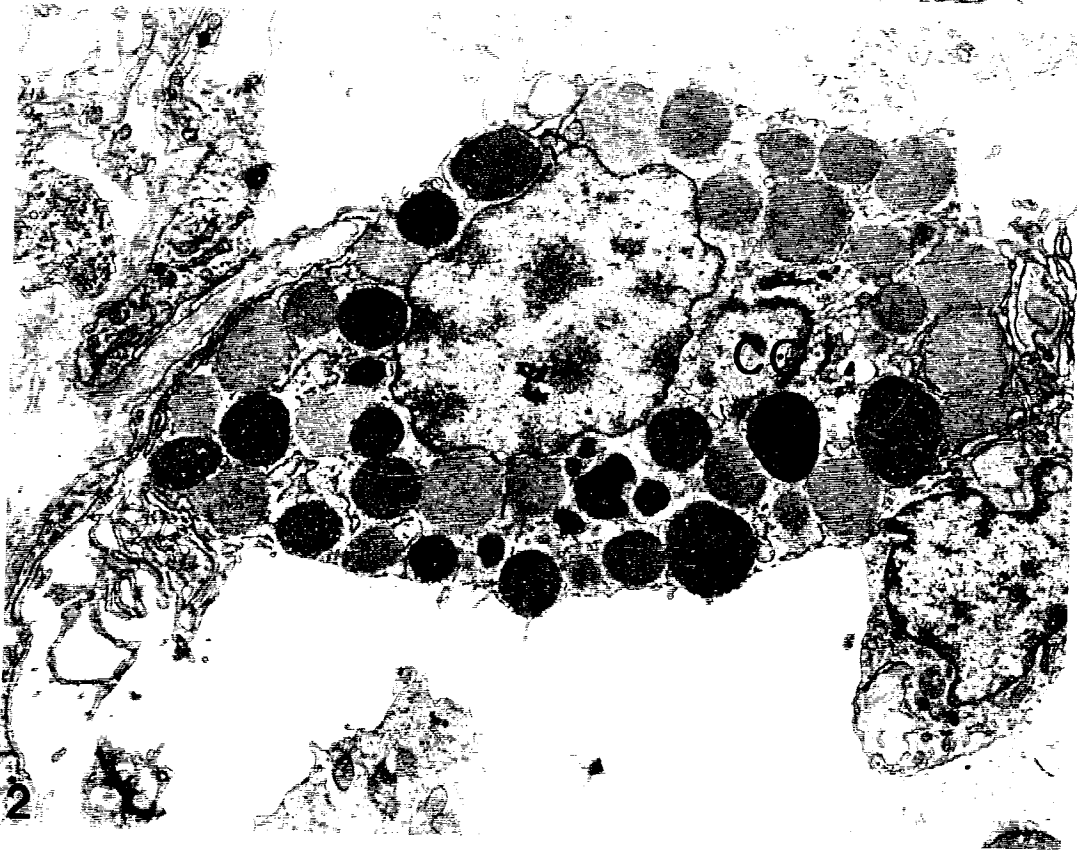
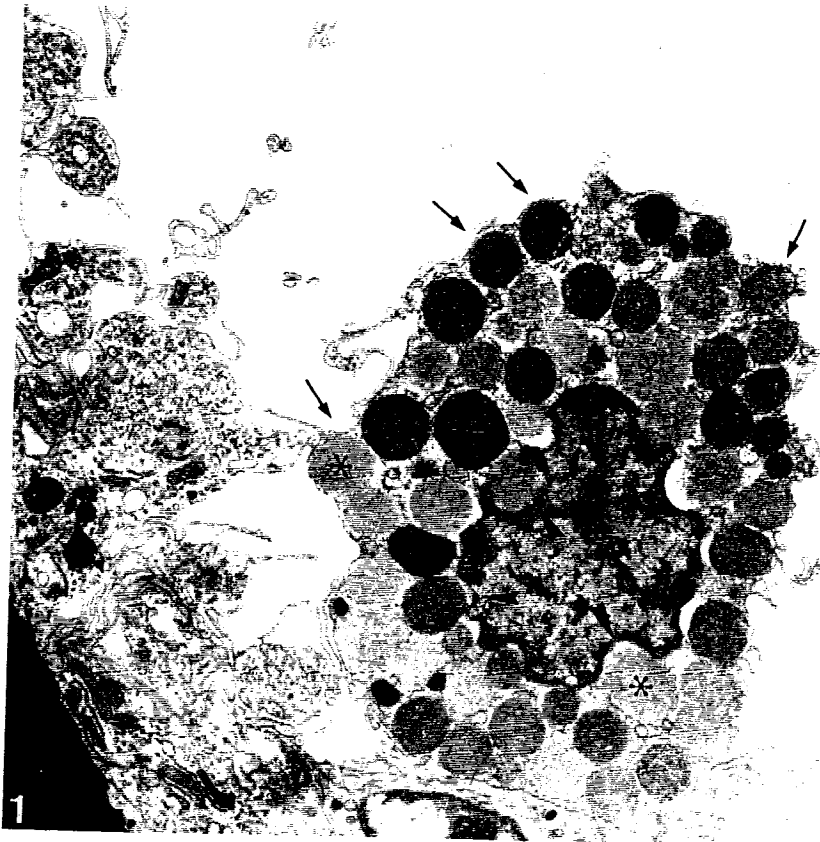
Os estudos dos mastócitos do linfonodo da cauda do pâncreas do gambá *D. albiventris* quanto a ultra-estrutura e o comportamento dessas células frente ao tratamento com o composto 48/80 permitem as seguintes conclusões:

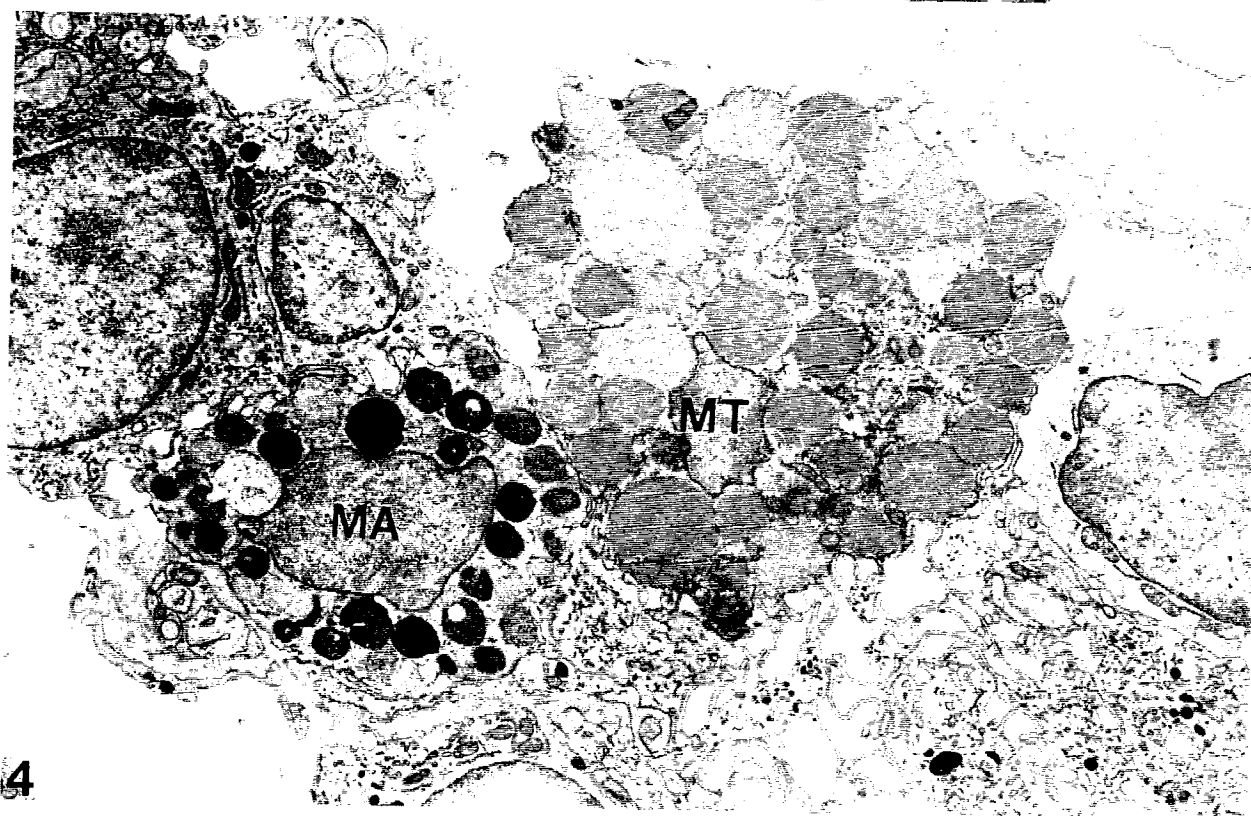
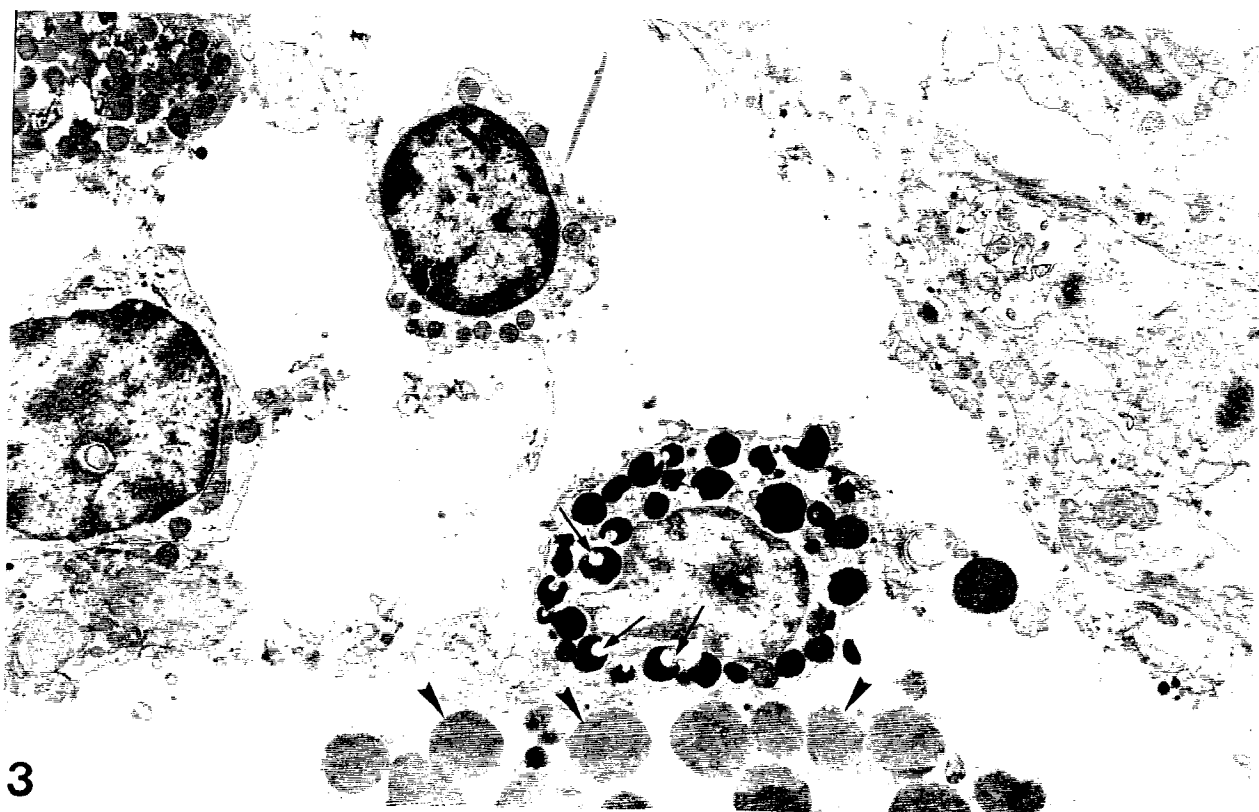
___ Os estudos ultra-estruturais realizados no linfonodo da cauda do pâncreas confirmam a localização preferencial dos mastócitos nos seios linfáticos medulares e, que estes diferem dos mastócitos encontrados na cápsula e no tecido linfóide;

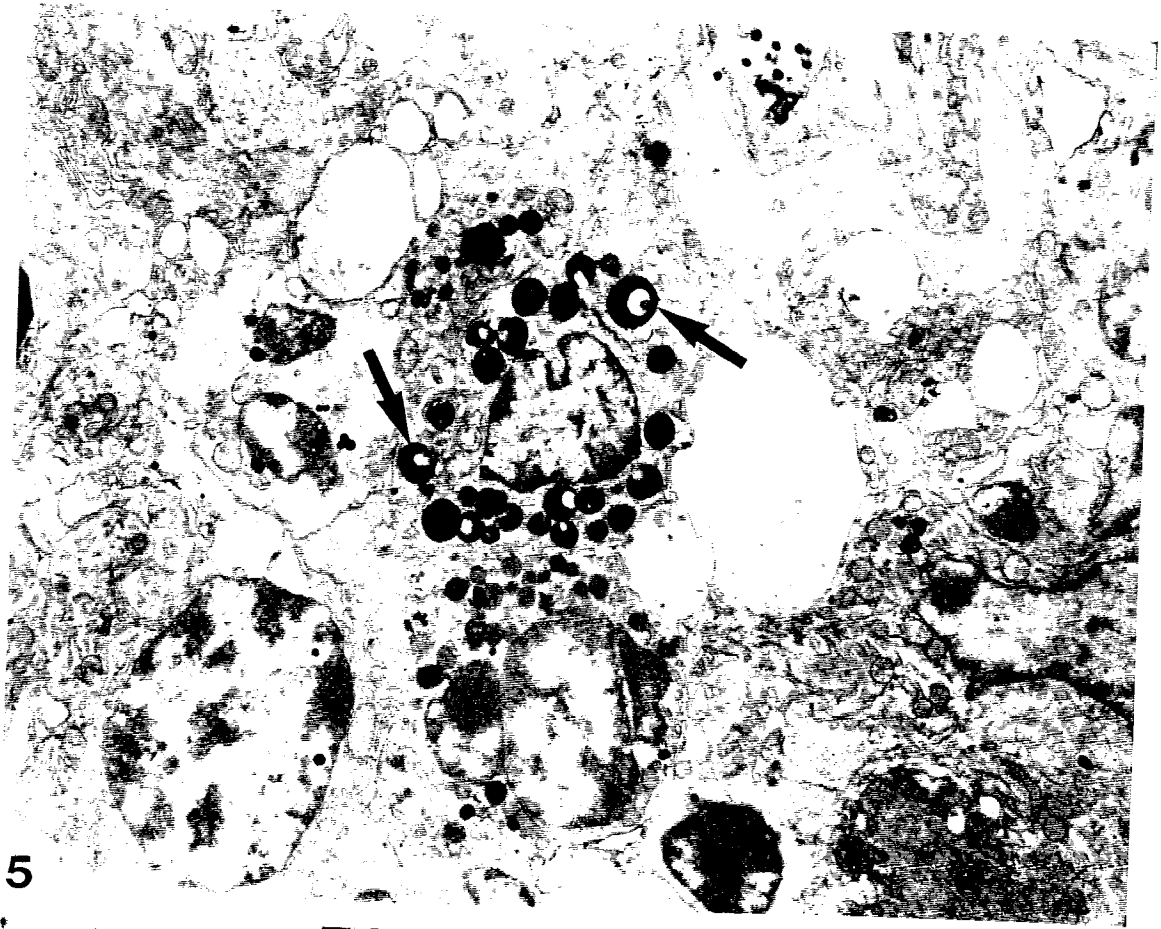
___ Nas dosagens e tempos usados no tratamento crônico com o composto 48/80 os mastócitos dos seios linfáticos, do tecido linfóide e da cápsula do linfonodo em estudo mostram alterações morfológicas que traduzem serem sensíveis a esse tratamento;

___ Nesse tratamento, os mastócitos dos seios linfáticos mostram alterações morfológicas mais acentuadas frente ao tratamento com o composto 48/80.

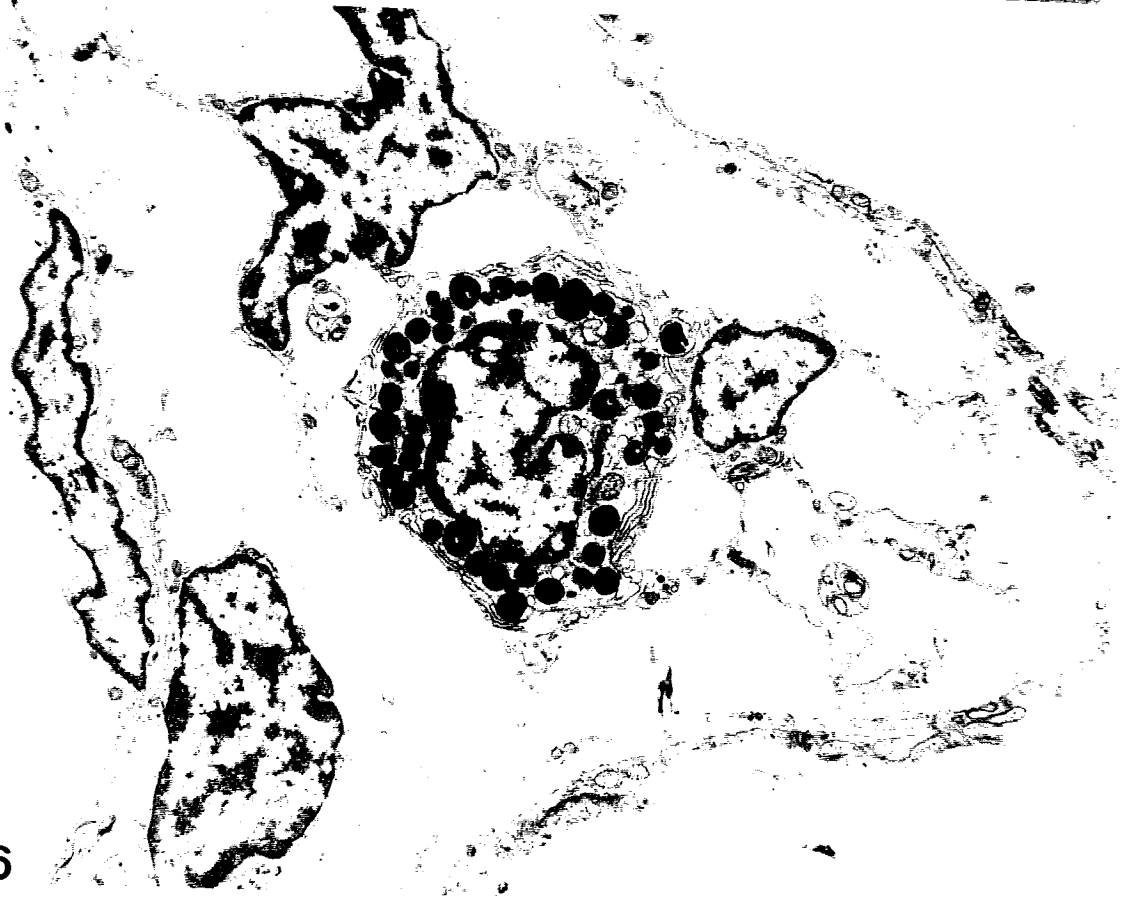
7- DOCUMENTAÇÃO FOTOGRÁFICA



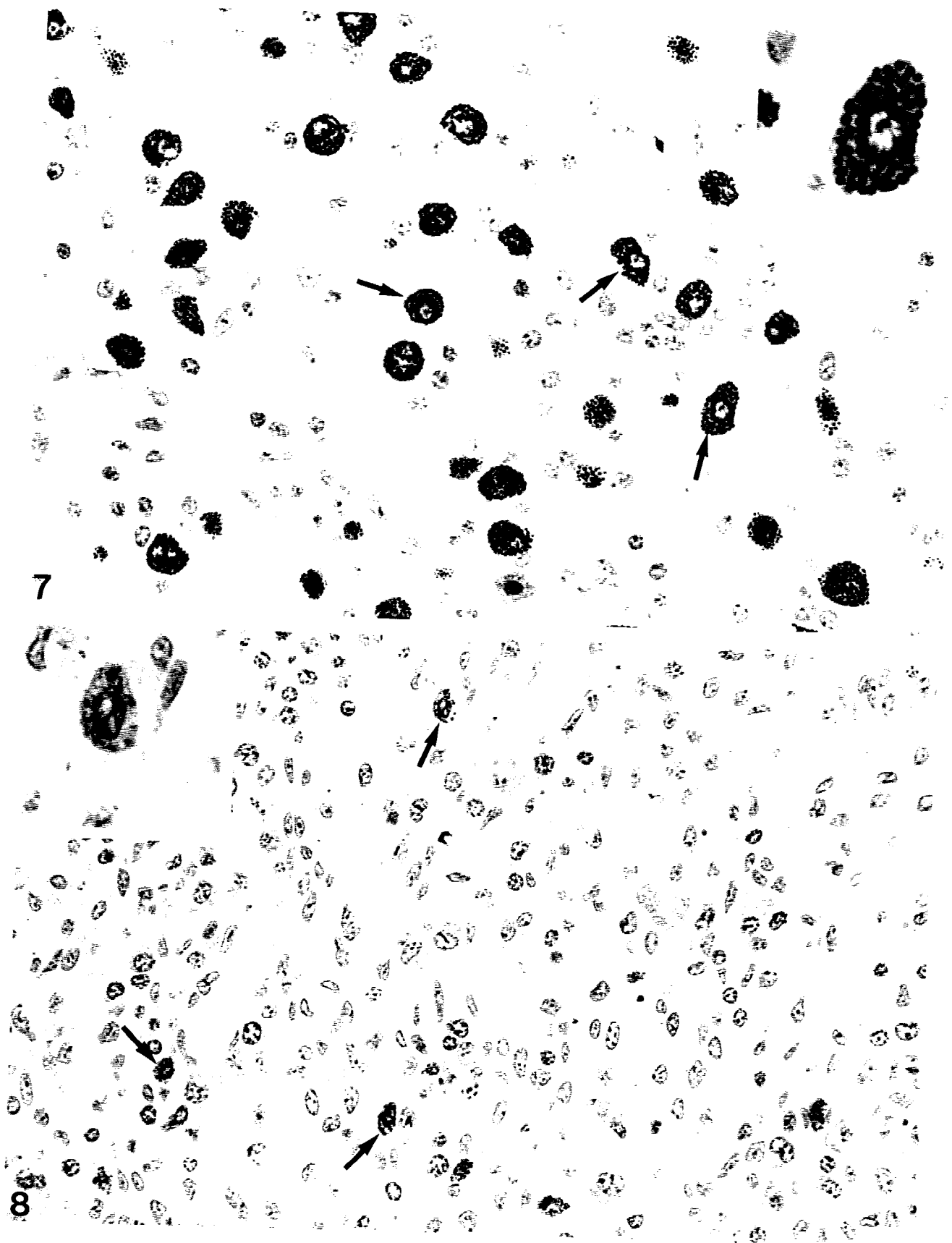


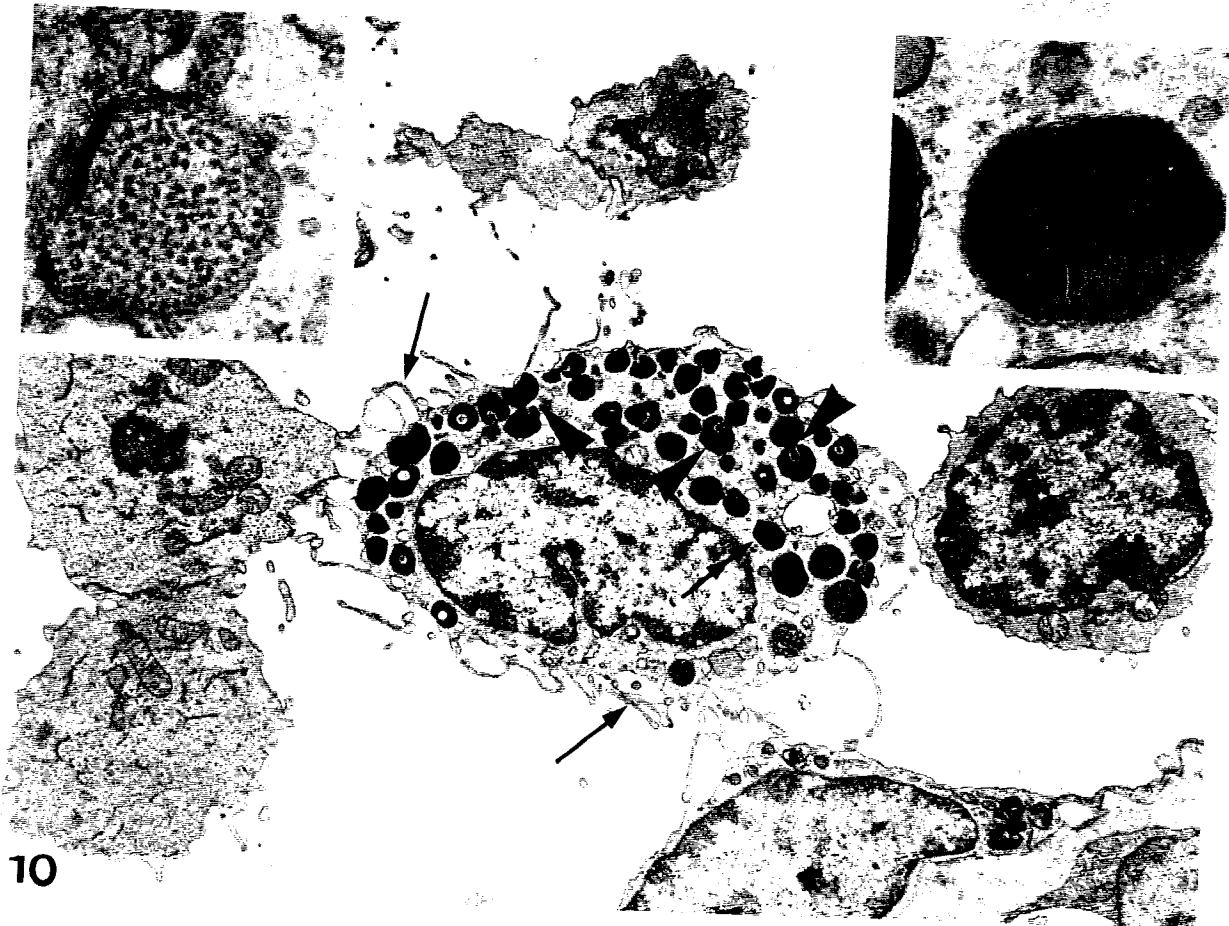
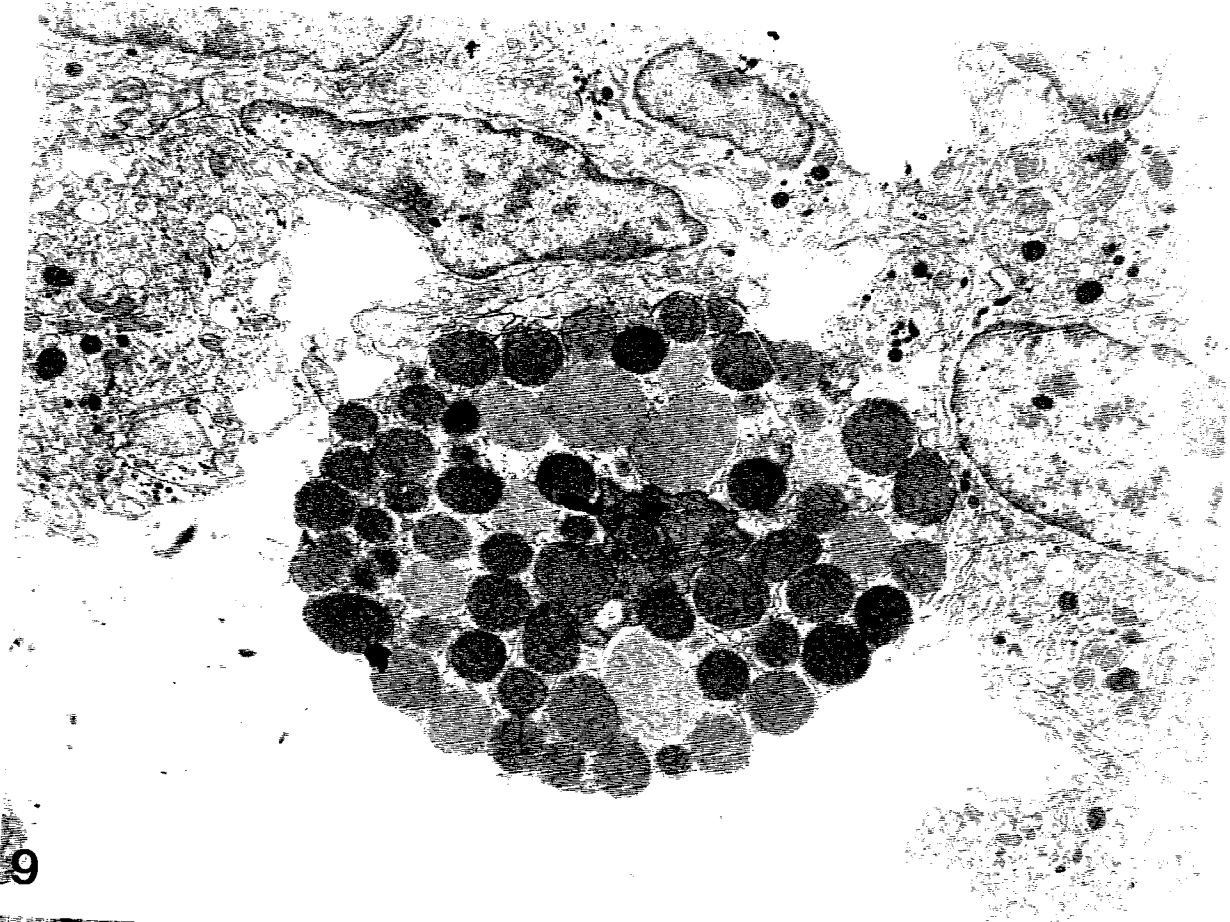


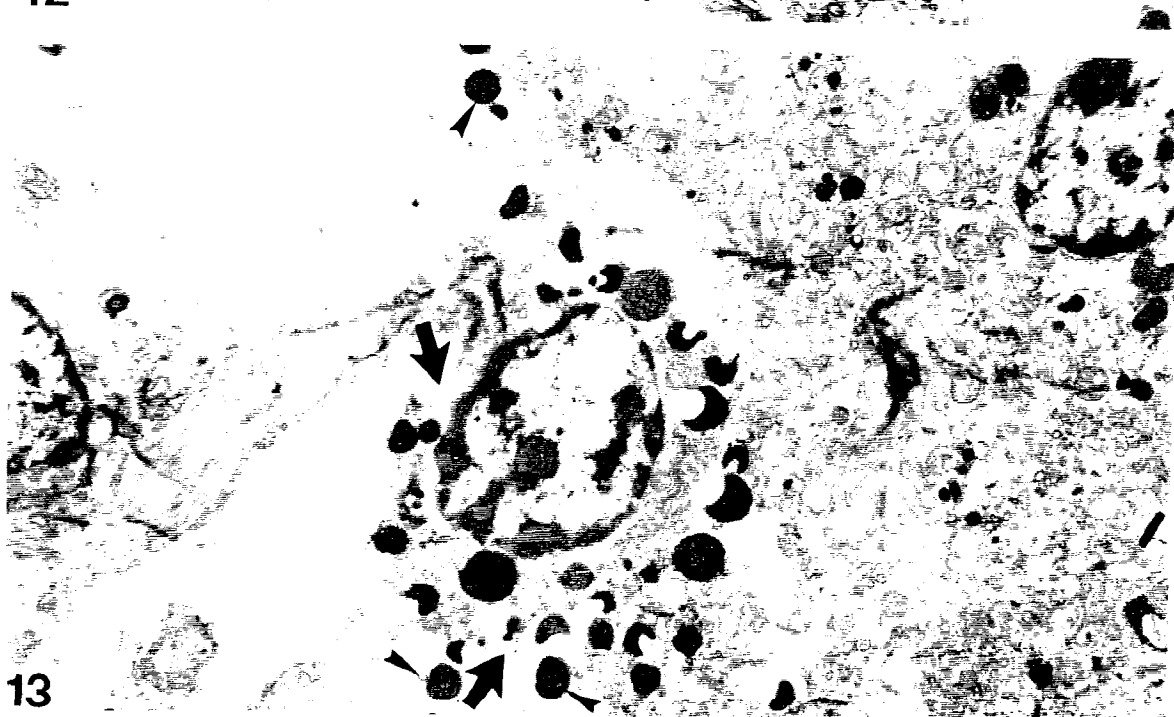
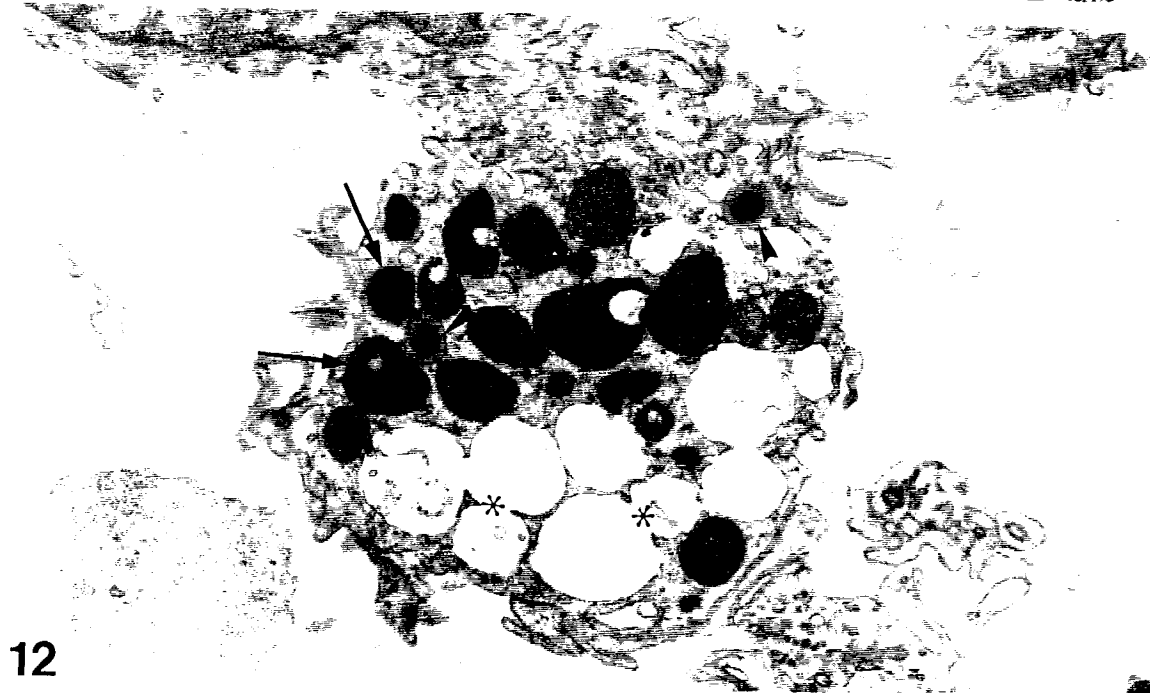
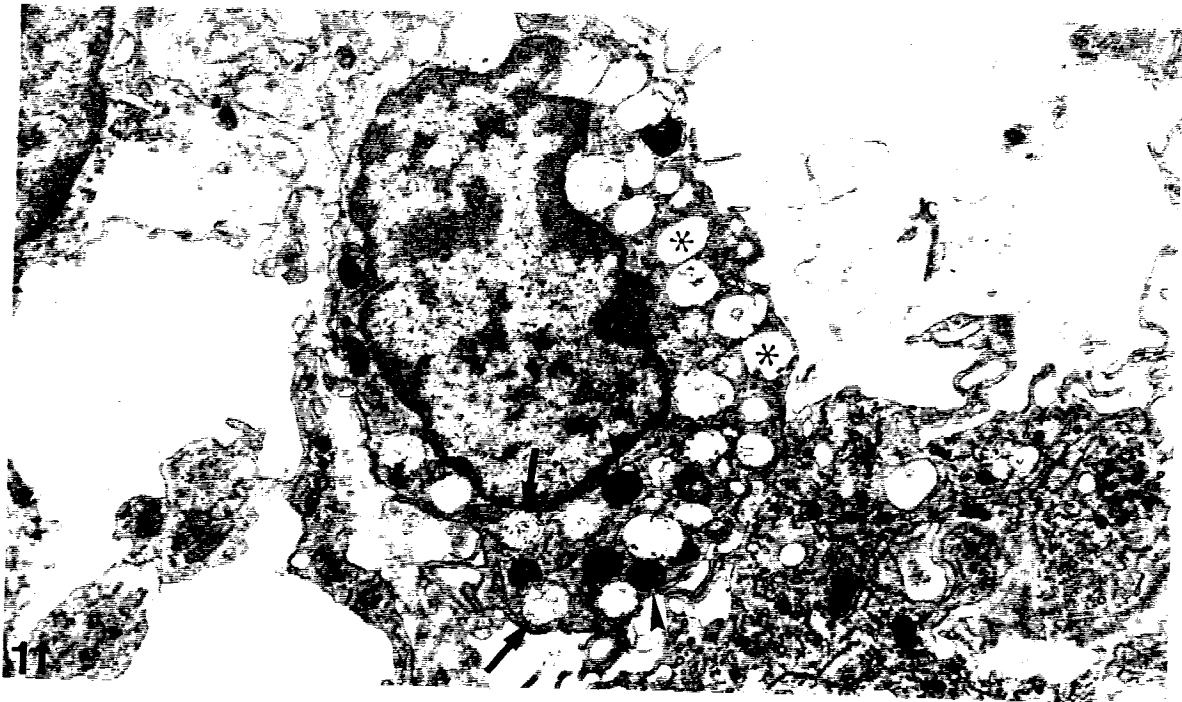
5

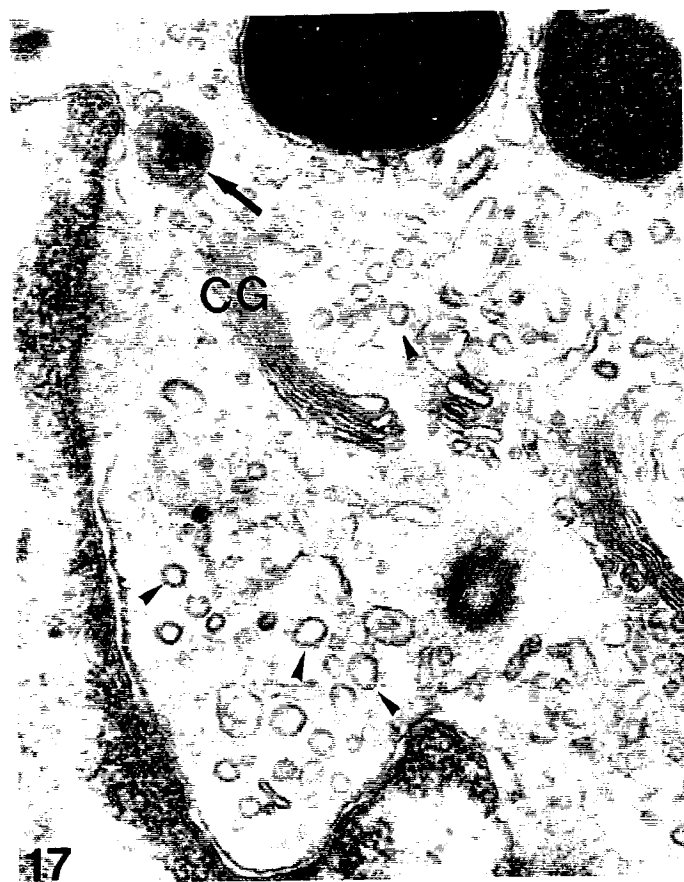
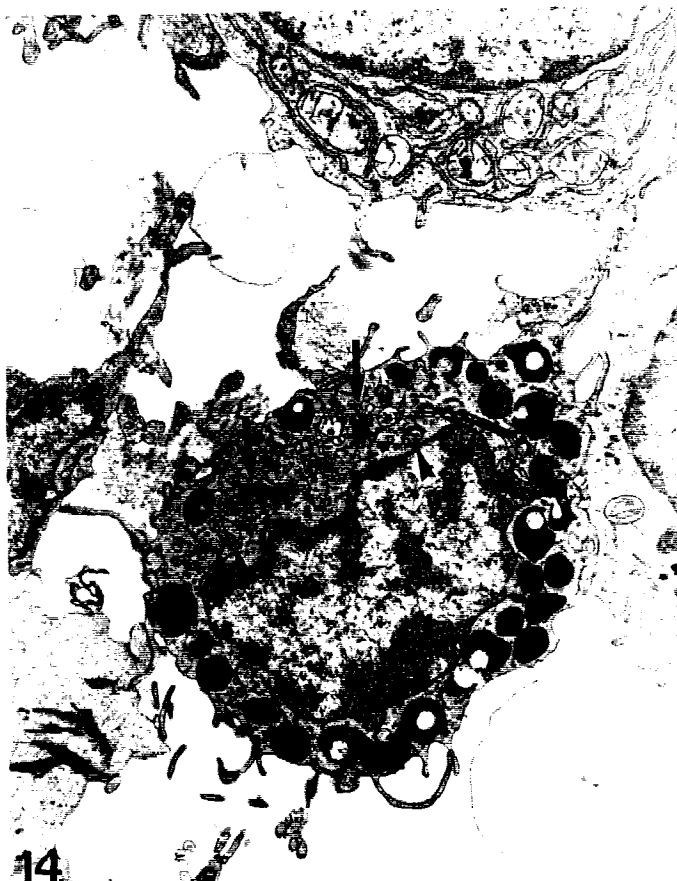


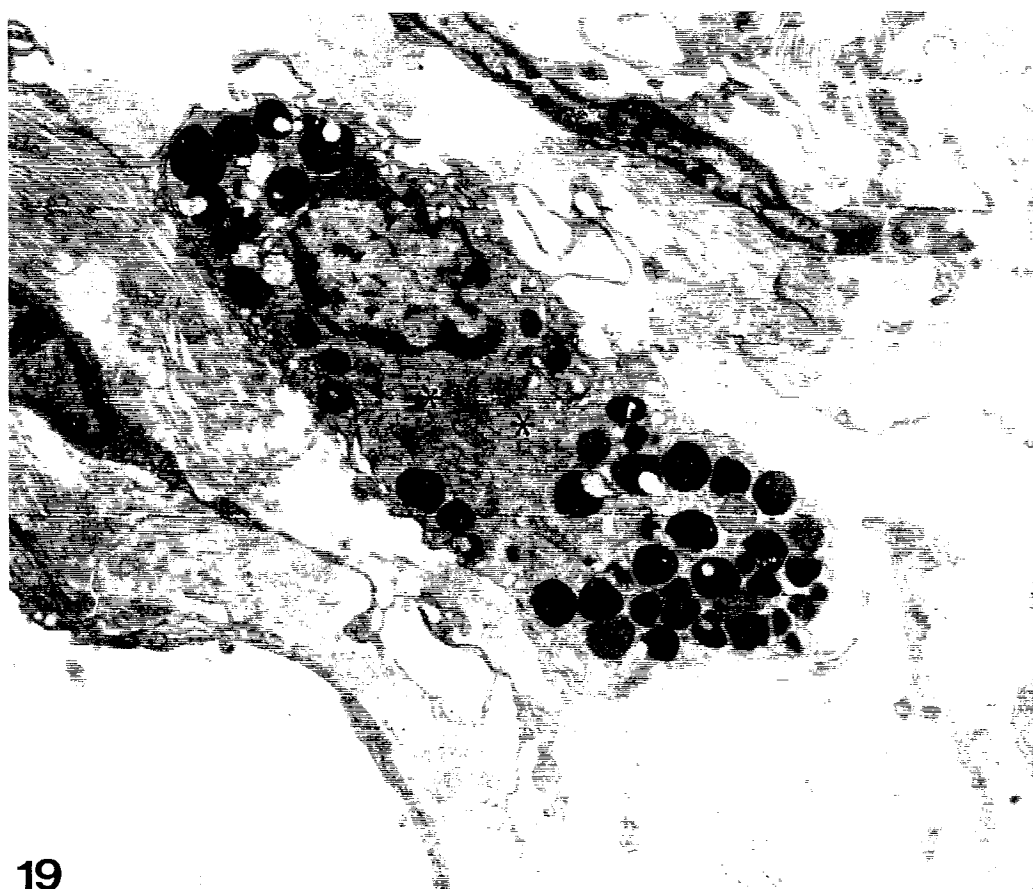
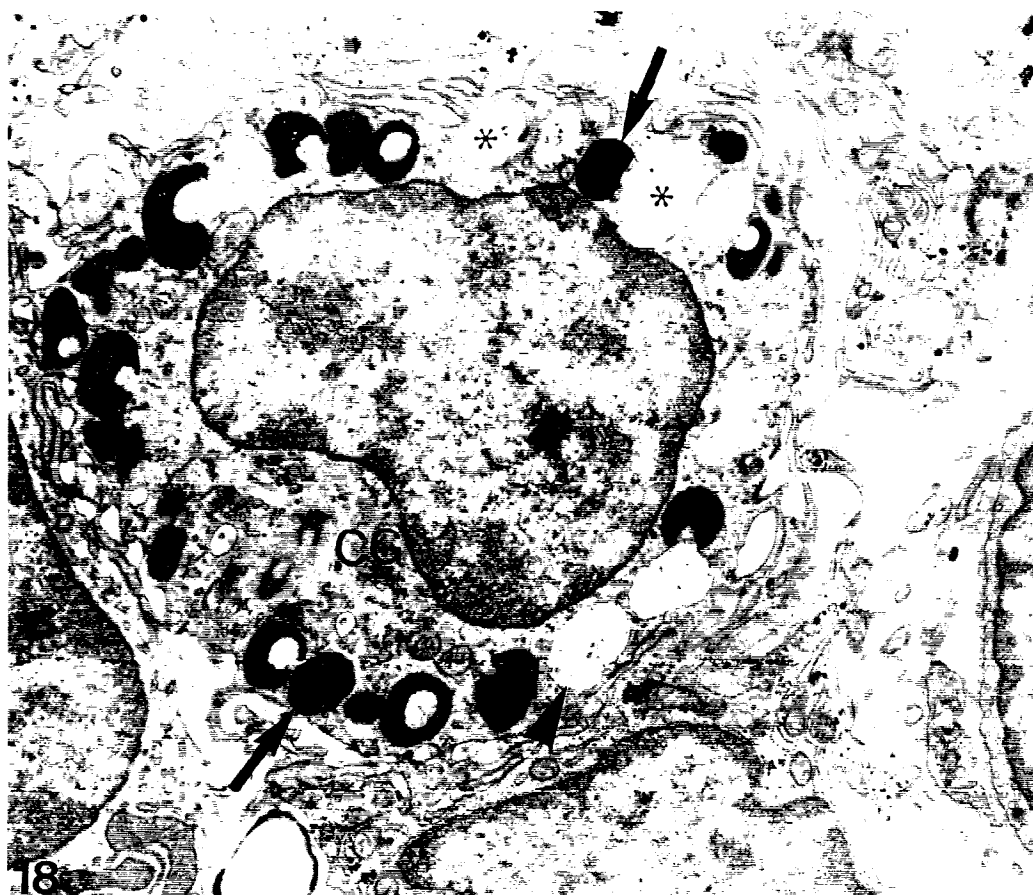
6











8-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASKENASE, P. W.; BURSZTAJN, S.; GERSHON, M. D.; GERSHON, R. K. Tcell-dependent mast cell degranulation and release of serotonin in murine delayed-type hypersensitivity. **J. Exp. Med.**, v. 152, p. 1358-1374, 1980.

AUSTEN, K. F. The heterogeneity of mast cell populations and products. **Hosp. Practice**, v. 19, n. 9, p. 135-146, 1984.

BEAVEN, M. A.; AIKEN, D. L.; WOLDESMUSSIE, E.; SOLL, A. H. Changes in histamine synthetic activity, histamine content and responsiveness to compound 48/80 with maturation of rat peritoneal mast cells. **J. Pharmacol. Exp. Therap.**, v.224, p. 620-626, 1983.

- BEHRENDT, H.; GOERTZ, W.; STANG-VOSS, C. Ultrastructural differences in isolated mast cell from various species. **Agents Actions**, v. 8, n. 4, p. 382-383, 1978.
- BENDITT, E. P. & ARASE, M. An enzyme in mast cell with properties like chymotrypsin. **J. Exp. Med.**, v. 110, p. 451-460, 1959.
- BLOOM, G. D. & HAEGERMARK, Ö. A study on morphological changes and histamine release induced by compound 48/80 in rat peritoneal mast cells. **Exp. Cell Res.**, v. 40, p. 637-654, 1965.
- CHIARINI-GARCIA, HÉLIO. **Heterogeneidade de mastócitos no gambá *Didelphis albiventris*, Lund, 1841; estudos histológicos, histométricos e histoquímicos em pele labial e linfonodo submandibular.** Belo Horizonte: Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, 1987. 130 p. Dissertação (Mestrado em Morfologia).
- CHIARINI-GARCIA, H. & MACHADO, C. R. S. Mast cell types and their distribution in the lymph nodes of opossum *Didelphis albiventris* (Marsupialia, Didelphidae). **Cell Tissue Res.**, v. 268, p. 571-574, 1992.
- CHIARINI-GARCIA. **Mastócitos do gambá *Didelphis albiventris* Lund, 1841: Estudo ontogenético, ultra-estrutural e funcional com ênfase em mastócitos de seios linfáticos.** Belo Horizonte: Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, 1993. 166 p. Dissertação (Doutorado em Morfologia).

- CHIARINI-GARCIA, H.; SANTOS, A. A. D.; & MACHADO, C.R. S. Morphological changes induced by the compound 48/80 in mast cells of the opossum *Didelphis albiventris*. **Acta Microscopica**, v. 6, p. 749-750, 1997.
- COMBS, J. W. Maturation of rat mast cells; an electron microscopy study. **J. Cell Biol.**, v. 31, p. 536-575, 1966.
- CUTTS, J. H.; KRAUSE, W. J.; LEESON, D. R. General observation on the growth and development of the young pouch opossum, *D. virginiana*. **Biol. Neonate**, v. 33, p. 264-272, 1978.
- DEANE, E. M. & COOPER, D. W. Immunological development of pouch young marsupials. In: TYNDALE - BISCOE, C. H., JANSSENS, P. A (ed.). **The developing marsupial; models for biomedical research** Berlin: Springer - Verlag, 1988. cap. 14, p. 190 - 199.
- DIMITRIADOU, V.; LAMBRACHT-HALL, M.; REICHLER, J.; THEOHARIDES, T. C. Histochemical and ultrastructural characteristics of rat brain perivascular mast cells stimulated with compound 48/80 and carbachol. **Neuroscience**, v.39, p. 209-224, 1990.

- DVORAK, A. M.; McLEOD, R. S.; ONDERDONK, A. B.; MONAHAN-EARLEY, R. A.; CULLEN, J. B.; ANTONIOLI, D. A.; MORGAN, E.; BLAIR, J. E.; ESTRELLA, P.; CISNEROS, R. L.; SILEN, W.; COHEN, Z. Ultrastructural evidence for piecemeal and anaphylactic degranulation of human gut mucosal mast cells in vivo. **Int. Arch. Allergy Immunol.**, v. 99, p. 74-83, 1992.
- ENERBACK, L. Mast cells in rat gastrointestinal mucosa; I- effects of fixations. **Acta Path. et Microbiol. Scandimav.**, v. 66, 289-302, 1966a.
- ENERBACK, L. Mast cells in rat gastrointestinal mucosa; II- dye bindings and metachromatic properties. **Acta Path. et Microbiol. Scandimav.**, 66 : 303 - 12, 1966b.
- ENERBACK, L. Mast cells in rat gastrointestinal mucosa; III- reactivity towards compound 48/80. **Acta Path. et Microbiol. Scandimav.**, 66 : 313 - 22, 1966c.
- ENERBACK, L. Mast cells in rat gastrointestinal mucosa IV- monoamine storing capacity. **Acta Pathol. Microbiol. Scand.**, 67 : 367 - 379, 1966d.
- ENERBACK, L. Mucosal mast cells in the rat and in man. **Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.**, 82 (3 - 4) : 249 - 55, 1986.

- ENERBACK, L. & LÖWHAGEN, G. B. Long term increase of mucosal mast cells in the rat induced by administration of compound 48/80. **Cell. Tissue Res.**, v. 214, p. 239-246, 1979.
- FAWCETT, D. W. An experimental study of mast cell degranulation and regranulation. **Anat. Rec.**, v. 121, p. 29-51, 1955.
- FERRARI, J. A. & MACHADO, C. R. S. Demonstração histoquímica de histamina em mastócitos de mesentério do gambá *Didelphis albiventris*. In: II CONGRESSO BRASILEIRO DE BIOLOGIA CELULAR E VII COLÓQUIO BRASILEIRO DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA, Rio de Janeiro, 1980. Resumos., Rio de Janeiro, 1980. p.182 - 3.
- FERREIRA, G. L. S. & SANTOS, A. A. D. Estudos ultra-estruturais dos mastócitos do linfonodo da cauda do pâncreas do gambá *Didelphis albiventris*. In: XIV SEMANA CIENTÍFICA DE ESTUDOS BIOLÓGICOS, Uberlândia, 1997. **Resumos....**, Uberlândia, 1997.p. 23.
- FOX, C. C.; DVORAK, A. M.; PETERS, S. P.; KAGEY-SOBOTKA, A.; LICHTENSTEIN, L. M. Isolation and characterization of human intestinal mucosal mast cells. **J. Immunol.**, v. 135, n. 1, p. 483-491, 1985.
- FRIEDMAN, M. M. & KALINER, M. Ultrastructural changes in human skin mast cells during antigen-induced degranulation in vivo. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 82, p. 998-1005, 1988.

- FOSSUM, S. & VAALAND, J. L. The architecture of rat lymph nodes. I: Combined light and electron microscopy of lymph node cell types. **Anat. Embriol.**, v. 167, p. 229 - 246, 1983.
- FOSSUM, S. & FORD, W. L. The organization of cell populations within lymph nodes; their origin, life history and functional relationships. **Histopathology**, v. 9, n. 5, p. 469-500, 1985.
- GALLI, S. J. Mast cell heterogeneity; can variation in mast cell phenotype be explained without postulating the existence of distinct mast cell lineage? In: BEFUS, A. D.; BIENESTOCK, J.; DENBURG, J. A., ed. Mast cell differentiation and heterogeneity. New York, Raven Press, p. 167-181, 1986.
- GALLI, S. J. New approaches for the analysis of mast cell maturation, heterogeneity and function. **Fed. Proc.**, v. 46, n. 5, p. 1906-1914, 1987.
- GALLI, S. J. New insights into "The riddle of the mast cells": microenvironmental regulation of mast cell development and phenotypic heterogeneity. **Laboratory Investigation**, v. 62, n. 1, p. 5-33, 1990.
- GALLI, S. J. New concepts about the mast cell. **New Engl. J. Med.**, v. 328, n. 4, p. 257-265, 1993.

GINSBURG, H., OLSON, E.C., HUFF, T. F., OKUDAIRA, H., ISHIZAKA, T.
Enhancement of mast cell differentiation in vitro by T cell factor (s). **Int. Archs. Allergy Appl. Immun.**, v. 66, p. 447-458, 1981.

GLEICH, G. J., ACKERMAN, S. J., HISAMATSU, I., LEIFERMAN, K. M. Mast cell heterogeneity; biological and clinical significance. In: BEFUS, A. D., BIENENSTOCK, J., DENBURG, J.A. (ed). Mast cells differentiation and heterogeneity. New York: Raven Press, 1986. p. 347 - 366.

HAYNES, J. I. Cervical lymph nodes and mast cells in the marsupial *Sminthopsis crassicaudata*. **Anat. Rec.**, v. 231, p. 7-13, 1991.

HÖGBERG, B. & UVNÄS, B. The mechanism of the disruption of mast cells produced by compound 48/80. **Acta Physiol. Scand.**, v. 41, p. 345-369, 1957.

JURGELSKI Jr, W. The opossum (*Didelphis virginiana* Kerr) as a biochemical model. I. Research perspective, husbandry and laboratory technics. **Lab. Anim. Scien.**, v. 24, p. 376-403, 1974.

KARNOVSKY, M. J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. **J. Cell Biol.**, v. 27, p. 137A-138A, 1965.

- KAZIMIERCZACK, W.; PATKAR, S. A. & DIAMANT, B. The mechanism of histamine release induced by ionophore X537A from isolated rat mast cells. **Acta Physiol. Scand.**, v. 102, p. 265-273, 1978.
- KITAMURA, Y. & FUJITA, J. Regulation of mast cell differentiation. **BioEssays**, v. 10, p. 193-195, 1989.
- KITAMURA, Y.; KANAKURA, Y.; FUJITA, J. & NAKANO, T. Differentiation and transdifferentiation of mast cells, a unique member of the hemopoietic cell family. **Internacional Journal of Cell Cloning**, v. 3, n. 2, p. 108-121, 1987a.
- KITAMURA, Y.; KANAKURA, Y.; SONODA, S.; ASAI, H. & NAKANO, T. Mutual phenotypic changes between connective tissue type and mucosal mast cells. **Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.**, v. 82, n. 3-4, p. 244-248, 1987b.
- KOPS, S. K.; THEOHARIDES, T. C.; CRONIN, C. T.; KASHGARIAN, M. G.; ASKENASE, P. W. Mast cell activation and vascular alterations in immediate-hypersensitivity-like reactions induced by T-cell derived antigen-binding factor. **Lab. Invest.**, v. 50, p. 421-434, 1984.
- KRÜGER, P. G.. Morphology of normal and secreting mast cells. **Acta. Otolaryngol. Suppl.**, v. 414, p. 23, 1984.

LAGUNOFF, D. Contributions of electron microscopy to the study of mast cells. **J. Invest. Dermatol.**, v. 58, p. 296-331, 1972.

LAGUNOFF, D. & BENDITT, E. P. Proteolytic enzymes of mast cells. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 103, p. 185, 1963.

LAGUNOFF, D.; & MARTIN, T. W. Agents that release histamine from mast cells. **Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v. 23, p. 331-351, 1983.

LEE, T. D. G.; SWIETER, M.; BEFUS, A. D. Mast cell responses to helminthy infection. **Parasitology Today**, v. 2, n. 7, p. 186-191, 1986.

LEWIS, R. A. & AUSTEN, K. F. Mediation of local homeostasis and inflammation by leukotrienes and other mast cell-dependent compounds. **Nature**, v. 293, p. 130-108, 1981.

LOZZI, S. P.; MACHADO, C. R. S.; GERKEN, S. E. & MOTA-SANTOS, T.A. Involvement of regional lymph nodes after penetration of *Shistosoma mansoni* Cercariae in naive and infected mice. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 91, n. 4, p. 491-498, 1996.

MACEDO, M. S. Hipersensibilidade imediata. In: CALICH, V. L. & VAZ, C. A. C., **Imunologia Básica**. Brasil, Artes Médicas, p. 245-274, 1989.

- MACHADO, C. R. S. Presença de serotonina em mastócitos de 3 espécies de marsupiais brasileiros. In: II Congresso Brasileiro de Biologia Celular e VII Colóquio Brasileiro de Microscopia Eletrônica, Rio de Janeiro, 1980. Resumos., Rio de Janeiro, 1980. p. 172 - 3.
- MAJEED, S. K. Mast cell distribution in rats. **Arzneim.-Forsch./Drug Res.**, v. 44, n. 3, p. 370-374, 1994.
- MILLER, H. R. P. The structure, origins and function of mucosal mast cells. **Biol. Cell.**, v. 39, p. 229-232, 1980.
- MOSMANN, T. R., BOND, M. W., COFFMAN, R. L., OHARA, J. & PAUL, W. E. T - Cell and mast cell lines respond to B - cell stimulatory factor 1. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA**, v. 83, n. 15, p. 5654-5659, 1986.
- MOTA, I. & VUGMAN, I. Action of compound 48/80 on the mast cells and histamine content of guinea-pig tissues. **Brit. J. Pharmacol.**, v. 11, p. 304-307, 1956a.
- MOTA, I. & VUGMAN, I. Effects of anaphylactic shock and compound 48/80 on the mast cells guinea-pig lung. **Nature**, v. 177, p. 427-429, 1956b.
- NABELL, G., GALLI, S. J.; DVORACK, H. F. & CANTOR, H. Inducer T lymphocytes synthesize a factor that stimulates proliferation of cloned mast cells. **Nature**, v. 291, p. 332-334, 1981.

- PEARCE, F. L. Funcional heterogeneity of mast cells from different species and tissues. **Klin. Wochenschr.**, v. 60, p. 954-957, 1982.
- PEARCE, F. L. On the heterogeneity of mast cells. **Farmacology**, v. 32, p. 61-71, 1986a.
- REYNOLDS, E. S. The use of lead citrate através high pH as an electro-opaque stain in electron microscopy. **J. Cell Biol.**, v. 17, p. 208-213, 1963.
- RILEY, J. F. & WEST, G. B. Tissue mast cells studies with a histamine-liberator of low toxicity (compound 48/80). **J. Path. Bact.**, v. 69, p. 269-282, 1955.
- RÖHLICH, P.; ANDERSON, P.; ÜVNAS, B. Electron microscope observations on compound 48/80-induced degranulation in rat mast cells. **J. Cell Biol.**, v. 51, p. 465-483, 1971.
- SAINTE-MARIE, G. & PENG, F. S. Mast cells and fibrosis in compartments of lymph nodes of normal, gnotobiotic, and athymic rats. **Cell Tissue Res.**, v. 261, p. 1-15, 1990.

- SANTOS, A. A. D. **Ocorrência de diferentes populações de mastócitos na orelha e no íleo do gambá *Didelphis albiventris* Lund, 1841 (Didelphidea, Marsupialia). Estudos Histológicos, Histoquímicos e Ultra-estruturais.** Belo Horizonte: Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, 1988. 120 p. Dissertação (Mestrado em Morfologia).
- SANTOS, A. A. D. & MACHADO, C. R. S. Demonstração histoquímica de heparina nos mastócitos de mucosa intestinal e do tecido conjuntivo do gambá *Didelphis albiventris* Lund, 1841. In: 39ª REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA PARA O PROGRESSO DA CIÊNCIA, Brasília, 1987. **Ciência e Cultura**, v. 39, n. 7, p. S78, 1987.
- SANTOS, A. A. D. & MACHADO, C. R. S. Estudo ultra-estrutural de mastócitos da derme da orelha e dos mastócitos da mucosa do íleo do gambá, *Didelphis albiventris* Lund, 1841. In: XII COLÓQUIO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA, Caxambú, 1989. Resumos. Caxambú, 1989. p. 189.
- SANTOS, A. A. D. & MACHADO, C. R. S. Electron microscopical evidence for a direct innervation of mucosal mast cell in the opossum *D. albiventris*. In: CONGRESO PANAMERICANO DE ANATOMIA, 9, CONGRESO PERUANO DE CIÊNCIAS MORFOLOGICAS, 4, ENCUENTRO NACIONAL DE ANATOMIA DO CHILE, 10, Trujillo, Peru, 1990. **Resumos...**, Trujillo, Peru, 1990. p. 155.

- SANTOS, A. A. D. & MACHADO, C. R. S. Histochemical and ultrastructural studies of mast cells in the intestinal mucosa and skin of the opossum *Didelphis albiventris*. **Histochemical Journal**, v. 26, p. 233-238, 1994.
- SANTOS, A. A. D. **Mastócitos da orelha, do íleo e de linfonodos abdominais do gambá *Didelphis albiventris* (Didelphidea, Marsupialia)**. Belo Horizonte: Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, 1996. 172 p. Dissertação (Doutorado em Morfologia).
- SANTOS, A. A. D.; CHIARINI-GARCIA, H. & MACHADO, C.R. S. Effect of compound 48/80 on the dermal and intestinal mast cells of the opossum *Didelphis albiventris*. **Acta Microscopica**, v. 6, p. 785-786, 1997.
- SANTOS, A. A. D.; CHIARINI-GARCIA, H. & MACHADO, C.R. S. Mast cells of the mesenteric lymph node of the opossum *Didelphis albiventris*. **Acta Microscopica**, v. 6, p. 787-788, 1997.
- SMITH, G. A. & RENNICK, D. M. Characterization of a murine lymphokine distinct from interleukin 2 and interleukin 3 (IL-3) possessing a T cell growth factor activity and a mast cell growth factor activity that synergizes with IL-3. **Immunology**, v. 83, p. 1857-1861, 1986.
- SOARES, J. C.; FERREIRA, A. L.; VUGMAN, I.; GONÇALVES, R. P. Ultrastructural differences among mast cells of several of the american opossum (*Didelphis azarae*, Marsupialia). **Arch. Anat. Embryol.**, v. 19, p. 37-46, 1988.

SOTER, Nicholas A. Mast cells in cutaneous inflammatory disorders. **J. Investigative Dermatology**, v. 80, p. S22-S5, 1983.

STEVENS, M. & AUSTEN, K. F. Recent advances in the cellular and molecular biology of mast cell. **Immunol. Today**, v. 10, p. 381-386, 1989.

SWIETER, M.; MERGENHAGEN, S. E. ; SIRAGANIAN, R. P. Microenviromental factors that influence mast cell phenotype and function. **Proc. Exp. Biol. Med.**, v. 199, n. 1, p. 22-33, 1992.

TAKEOKA, O.; HIDAKA, T.; IKEDA, N.; ASHIHARA, T. Granule formation in rat mast cell; study with serial ultrathin section. **Acta Pathol. Jpn.**, v. 30, n. A, p. 531-539, 1980.

WATSON, M. L. Staining of tissue section for electron microscopy with heavy metals. **J. Biophys. Biochem. Cytol.**, v. 4, p. 575, 1958.

