CARLA APARECIDA CECÍLIO

TNFα INDUZ MIGRAÇÃO DE NEUTRÓFILOS PARA CAVIDADES PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS TRATADOS COM GLICOCORTICÓIDE

Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas na área de Imunologia.

ORIENTADOR: PROFa. Dra. WIRLA MARIA DA SILVA CUNHA TAMASHIRO

Departamento de Microbiologia e Imunologia
Instituto de Biologia
Universidade Estadual de Campinas
Campinas - São Paulo
- 1995 -

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato(a) Carla Aparecida Cecílio
e aprovada pela Comissão Julgadora.
Wirla Maria da C Tamashiro
13/07/95

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

UNIDADE BC
N.º CHAMADA:
T/UNICAMP
C324t
V. Ex
TOMBO BC/25684
PROC. 433/95
C [ ] D [x]
PREÇO R$ 11,00
DATA 28/09/95
N.º CPD CM-00076786-5

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA CENTRAL - UNICAMP

Cecílio, Carla Aparecida
C324t TNF α induz migração de neutrófilos para cavidades peritoneais de camundongos tratados com glicocorticóide / Carla Aparecida Cecílio. -- Campinas, SP : [s.n.] , 1995.

Orientador : Wirla Maria da Silva Cunha Tamashiro.
Dissertação(mestrado) - Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia..

1. Células - Migração. 2. Macrófagos. 3. Glicocorticóides. 4. Camundongo como animal de laboratório. 5.* TNF I. Tamashiro, Wirla Maria da Silva Cunha. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Aos meus pais, Maria e Maurílio, que acompanharam meu trabalho e apoiaram mais este passo de minha vida.

À orientadora Wirla Maria da Silva Cunha Tamashiro, porque essa história jamais seria escrita sem a sua presença. Se hoje sou o que sou é porque em minha jornada, o calor de sua amizade e confiança abriram caminhos para essa conquista.

À amiga Célia Aparecida Almeida Chaves Garcia, porque toda sua dedicação e amizade foram muito importantes para essa vitória.

Às vezes, ouço passar o vento. E acho que só para ouvir passar o vento, vale a pena ter nascido.

Fernando Pessoa

AGRADECIMENTOS

- Às Instituições financeiras, CAPES e FAPESP, que possibilitaram a realização deste trabalho.

- Ao Departamento de Microbiologia e Imunologia da Universidade Estadual de Campinas, pela aprovação e colaboração deste trabalho.

- Aos Professores do Departamento de Microbiologia e Imunologia e de outros Departamentos da UNICAMP, pelos cursos ministrados, que muito contribuiram para minha formação profissional.

- Aos Departamentos de Farmacologia da Universidade Estadual de Campinas e Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP, que colaboraram com materiais e técnicas para o prosseguimento desta Tese.

- Aos Professores Antonio Condino Neto, Dagmar Ruth Stach-Machado, Fernando Queiróz Cunha, Júlia Keiko Sakurada e Leonilda B. dos Santos, que fizeram a análise prévia deste trabalho, pelas valiosas sugestões, que muito contribuiram para o aperfeiçoamento do manuscrito.

- A todos os funcionários do D.M.I. da UNICAMP, que direta ou indiretamente participaram da elaboração deste trabalho.

- Às amigas Sara de Jesus Oliveira, Márcia Cristina Formazin e Maria Ângela Orsi, que sempre estiveram junto a mim, inclusive nos momentos mais difíceis, sempre contribuindo com a minha formação.

- À Diretoria do Hospital Municipal de Paulínia, representada pelo Dr. Heitor S. de Barcelos Neto, que contribuiu para esta minha formação, quando proporcionou oportunidades para a minha participação em Congressos.

- À Coordenadoria de Enfermagem do Hospital Municipal de Paulínia, representada pela Enfermeira Inês da Silva, que não mediu esforços nessa minha caminhada de sucesso.

_ Às amigas de trabalho, Lúcia Maria Carlos e Lúcia de Cássia A. Ramos, pelo incentivo e apoio nos momentos em que eu mais precisei.

- À Diretoria atual do Hospital Municipal de Paulínia, representada pelos Drs: Antônio Pietrobom Neto e Carlos Henrique Mamud Arca, pela colaboração e incentivo.

- Às minhas irmãs, Cássia A. C. Scardoelli e Salete Do Carmo Cecílio, que estiveram sempre presentes nesta etapa de minha vida.

- À todas as pessoas, que sempre estiveram presentes, participando comigo nesta minha caminhada, os meus mais sinceros agradecimentos, pois esta conquista não foi só minha, mas de todos vocês.

- A DEUS, que me ofereceu mais esta oportunidade de vida, que com certeza, levarei para junto de mim.

ABREVIATURAS

ACF	Adjuvante Completo de Freund
ADCC	Citotoxicidade Celular Dependente de Anticorpos
AIF	Adjuvante Incompleto de Freund
Anti-mrTNF	Anticorpo anti-Fator de Necrose Tumoral recombinante murino
CAMs	Moléculas de Adesão de células endoteliais
CD	Grupo de Diferenciação
Cg	Carragenina
Dexa	Dexametasona
EPM	Erro Padrão da Média
FcγR	Receptor para a Fração Fc da Imunoglobulina G
G-CSF	Fator estimulador de Colônia de granulócitos
GM-CSF	Fator estimulador de colônia de granulócito-macrófago
HPA	Eixo Hipotalâmico-pituitário-adrenal
IFNβ	Interferon-β
IFNγ	Interferon-γ
IgE	Imunoglobulina isotipo E
IgG	Imunoglobulina isotipo G
IL	Interleucina
IL-1ra	Antagonista do receptor da Interleucina-1
IL-4R	Receptor da Interleucina-4
IL-13R	Receptor da Interleucina-13
LecCAMs	Moléculas de adesão celular tipo Lectinas
LPS	Lipopolissacarídeo de *E. coli*
LT	Linfotoxina
MNCF	Fator quimiotático para neutrófilo derivado de monócitos
mrTNF	Fator de necrose tumoral recombinante murino
NO	Óxido Nítrico
NRIF	Fator inibidor do recrutamento de neutrófilos
PAF	Fator ativador de plaquetas
PGE-2	Prostaglandina E-2
PMN	Polimorfonucleares-neutrófilos
rIL-1β	Receptor da Interleucina-1β
rIL-8	Receptor da Interleucina-8
TGF-β	Fator transformador do crescimento-β
TNF	Fator de necrose tumoral

SUMÁRIO

Pág.

I- **INTRODUÇÃO**..... 01

II- **MATERIAIS E MÉTODOS**..... 21

01. Animais de experimentação..... 21

1.1 Ratos..... 21

1.2 Camundongos..... 21

1.3 Coelhos..... 21

02. Principais soluções e reagentes utilizados..... 21

2.1 Solução salina tamponada com fosfato (PBS)... 21

2.2 Meio de Tioglicolato a 3%..... 22

2.3 Lipopolissacarídeo (LPS)..... 22

2.4 Carragenina (Cg)..... 22

2.5 Dexametasona (Dexa)..... 22

2.6 Meio de Cultura..... 22

2.7 Meio Completo..... 23

2.8 Fator de Necrose Tumoral recombinante murino. 23

03. Preparo de antissoro anti-rmTNFα..... 23

04. Preparo do sobrenadante de cultura de macrófagos de ratos..... 24

05. Preparo do sobrenadante de cultura de macrófagos de camundongos..... 24

06. Cultura de macrófagos peritoneais..... 25

07. Obtenção do sobrenadante da cultura..... 25

08. Teste de atividade indutora da migração de neutrófilos "*in vivo*"..... 26

09. Teste de atividade inibidora da migração de neutrófilos "*in vivo*"..... 27

10. Ensaio da atividade de TNF em Células WEHI 164 clone 13..... 28

11. Análise estatística..... 29

III- **RESULTADOS**..... 30

01. Efeito dos sobrenadantes de culturas de macrófagos sobre a migração de neutrófilos..... 30
02. Os componentes ativos presentes nos Fatores de ratos e camundongos não são espécie-específicos..... 36
03. Curva temporal da migração de neutrófilos e de células mononucleares induzida pelo Fator de camundongos..... 36
/ 04. Detecção de TNF em sobrenadante de cultura de macrófagos peritoneais de camundongos..... 41
05. Influência do TNFα contido no Fator de camundongos sobre a migração de neutrófilos..... 43
06. Efeito do TNFα recombinante murino sobre a migração de neutrófilos..... 45
07. Curva temporal da migração de neutrófilos e de células mononucleares induzida pelo mrTNFα..... 48
08. Efeito de anticorpos anti-TNFα sobre a migração de neutrófilos induzida pelo LPS..... 48
09. Efeito do pré-aquecimento do LPS e mrTNFα sobre a migração de neutrófilos..... 50
10. Efeito do pré-tratamento de camundongos com anticorpo anti-TNF sobre a migração de neutrófilos induzida pelo LPS..... 52
IV- **DISCUSSÃO**..... 54
V- **CONCLUSÕES**..... 61
VI- **RESUMO**..... 63
VII- **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**..... 65

INTRODUÇÃO

I. INTRODUÇÃO

O PROCESSO INFLAMATÓRIO

A inflamação é uma resposta dos organismos superiores à ação de agentes, sejam eles externos, como os microorganismos e toxinas ou derivados do próprio organismo (**DECKER, 1991; BARBOSA, 1993**). A resposta inflamatória caracteriza-se por ser uma reação estereotipada e por ocorrer em tecidos vascularizados.

A inflamação apresenta duas fases distintas. A primeira, que ocorre imediatamente após a exposição ao estímulo, é conhecida como fase aguda; e a segunda, caracterizada pela persistência do estímulo, com ou sem a eliminação do agente causador, é conhecida como fase crônica (**BARBOSA, 1993**).

Durante a inflamação aguda, o número de leucócitos na circulação aumenta temporariamente (**FURTH, 1988**). Estas células são atraídas para o sítio inflamatório por quimiotaxia e deixam os vasos sanguíneos por diapedese (**IVERSEN, 1989**). As primeiras células a surgirem nesta área são os polimorfonucleares-neutrófilos, seguidos pelos monócitos, linfócitos e alguns eritrócitos (**IVERSEN, 1989**). Os eritrócitos podem ficar retidos na parede dos vasos, provocando a trombose e aumentando a área de necrose. Como consequência, vênulas e arteríolas da vizinhança dilatam-se, surgindo os sinais clássicos da inflamação: calor, tumor, rubor e dor, este último, causado pelo aumento da compressão tecidual e pela liberação de produtos biologicamente ativos (**IVERSEN, 1989; SMITH *et alli*, 1992**).

Os aspectos bioquímicos da inflamação compreendem a atividade secretória por muitos tipos celulares, incluindo os granulócitos, que secretam enzimas lisossomais, os mastócitos,

que secretam serotonina e histamina, os macrófagos e linfócitos, que secretam citocinas ou linfocinas (**IVERSEN, 1989**).

Como células residentes de tecidos, os macrófagos constituem-se em células de "alarme" na inflamação (**FERREIRA, 1980**). Durante o processo inflamatório, os macrófagos são responsáveis pelo início da migração de neutrófilos para o sítio inflamado, através da secreção de produtos com atividade quimiotática (**FERREIRA, 1980; NATHAN, 1987; CUNHA *et alli*, 1986**). São responsáveis ainda pela produção do óxido nítrico (NO), o qual desempenha papel microbicida e citostático para uma ampla variedade celular (**NATHAN, 1987; MARLETTA, 1989**), bem como o de mediador da inflamação (**GORDON *et alli*, 1992**).

Durante a inflamação crônica, o sistema imune pode intensificar o processo de injúria tissular, ocasionando uma rápida proliferação de células parenquimais, fibroblastos e recrutamento de macrófagos, levando a doenças inflamatórias crônicas (**IVERSEN, 1989**). Assim, na tentativa de limitar o processo inflamatório com a remoção do agente causador ou sua morte, inicia-se o processo de modulação da reação inflamatória e a formação cicatricial, com eventual perda de função do tecido ou órgão (**IVERSEN, 1989**).

OS MACRÓFAGOS

Os fagócitos mononucleares ou macrófagos são definidos como células mononucleares aderentes *"in vitro"*, capazes de promover a fagocitose (**FURTH & COHN, 1968**). Os fagócitos mononucleares podem ser separados em dois grupos celulares: os fagócitos mononucleares circulantes ou monócitos do sangue periférico, e os macrófagos teciduais (**FURTH & COHN, 1968**).

Os macrófagos são originados de células precursoras da medula óssea (**FURTH, 1988**) e são encontrados em grande número em diversas áreas do corpo: submucosa, alvéolo pulmonar, espaço justaglomerular e perivascular, trabécula óssea e túbulos renais, etc... (**HUME & GORDON, 1983; LEE *et alli*, 1985**). Algumas dessas células apresentam papel importante na imunidade inata e adquirida e distribuem-se como células residentes por todos os tecidos de animais adultos normais, alterando suas propriedades endocíticas e biossintéticas após o recrutamento inflamatório e a ativação imune (**GORDON *et alli*, 1992**). Nos processos inflamatórios ou infecciosos, formadores de granulomas ou lesões tuberculóides, podem ocorrer migração crônica e acúmulo de macrófagos no local (**OSBORN, 1990**).

Vários progressos foram feitos no sentido de definir as atividades dos macrófagos em diferentes microambientes teciduais, bem como a sua ontogênese e interações com outras células. Métodos de biologia molecular e celular têm permitido a caracterização de receptores de membrana plasmática e produtos de secreção expressos por macrófagos (**GORDON *et alli*, 1992**). Além disso, o desenvolvimento de anticorpos monoclonais (MAcs) dirigidos contra antígenos de membrana tem permitido a identificação de diversas populações de macrófagos em tecidos murinos (**GORDON *et alli*, 1992**). A cinética de acúmulo de monócitos durante um processo inflamatório vai depender do modelo animal e do estímulo utilizados, que contribue com o afluxo de maiores ou menores quantidades de monócitos na circulação e de macrófagos no local onde o estímulo foi aplicado (**FURTH & COHN, 1968; FURTH *et alli*, 1973**). O aumento do número dessas células na circulação é ocasionado pela produção elevada de monócitos pela medula óssea (**FURTH *et alli*, 1973**).

A exposição de células mononucleares às endotoxinas ou ao

Lipopolissacarídeo (LPS), derivados de bactérias Gram-negativas, resulta numa variedade de alterações celulares tais como mudanças na expressão de receptores de membrana (**LENTEN & FOGELMAN, 1992**) e síntese de diversas proteínas como as citocinas e fatores de crescimento, assim como dos mediadores lipídicos da resposta inflamatória (**RAETZ, 1990**). Como mostra a **Tabela I**, os macrófagos são capazes de secretar, quando ativados, mais de cem substâncias com atividades biológicas bastante diversificadas (**NATHAN, 1987**).

Os macrófagos podem ainda expressar uma variedade de receptores de superfície específicos para células, proteínas da matriz extracelular e ligantes microbianos, os quais controlam seu crescimento, diferenciação e modulam suas atividades (**GORDON *et alli*, 1992**). Os macrófagos participam funcionalmente de modos diversos, a depender do estágio da resposta inflamatória, agindo como células de alarme, localizando o tecido onde o processo inflamatório está ocorrendo, ocasionando a vasodilatação e a hiperalgesia, promovendo a liberação de pirogênio endógeno (ocasionando a febre inflamatória), promovendo a migração de outros fagócitos (neutrófilos-polimorfonucleares) e influenciando as respostas imunológicas (revisto por **FERREIRA, 1980**).

Os monócitos se acumulam na maioria das reações inflamatórias sub-agudas ou crônicas como os exsudatos, granulomas, placas de gordura e ateroma (**ROSS, 1986**). Através da sua abundância, distribuição, motilidade, responsividade e versatilidade, os macrófagos podem influenciar a maioria das respostas imunes e inflamatórias, desde a hipersensibilidade aguda até a retardada, desde a agressão ao agente causador até o eventual reparo tecidual (**NATHAN, 1987**).

Assim, iniciando respostas vasculares através da vasodilatação e do aumento da permeabilidade venular,

TABELA 1- PRODUTOS SECRETADOS POR MACRÓFAGOS

PRODUTOS	FUNÇÕES
ENZIMAS	
- Ativadores de plasminogênio	- inflamação
- Elastase	- inflamação
- colagenases	- inflamação
- Componentes do complemento (C1, C2, Fator B, Fator D)	- microbicida e opsonizador da inflamação
- Fatores da coagulação (Via intrínseca: IX,X,V, protrobina) (Via extrínseca: VII)	- coagulação e reparo tecidual
- Lipoproteína lipase	- metabolismo de lipoproteínas
PROTEÍNAS PLASMÁTICAS	
- Componentes do complemento (C1, C2, C3, C4, C5, Fatores B e D)	- microbicida, inflamatória e opsonizadora
- Fatores da coagulação (VII, IX, X, V)	- coagulação e reparo tecidual
HORMÔNIOS POLIPEPTÍDEOS	
- Interleucinas	
IL-1 a e ß	- imunorregulatória
IL-6	- proliferação de Linfócitos T e plasmócitos
IL-8	- quimiotaxia
Fator de necrose tumoral (TNF)	- anti-tumor
Interferon (IFNß)	- anti-viral
- Fatores estimuladores de colônias (GM-CSF, G-CSF, M-CSF)	- reguladora da diferenciação celular
- TGF-ß	- imunorregulação
- PAF	- ativação plaquetária
SUBSTÂNCIAS DE BAIXO PESO MOLECULAR	
- O_2^- (ânion superóxido)	- microbicida, tumoricida
- H_2O_2 (peróxido de hidrogênio)	- microbicida, tumoricida
- OH (radical hidroxila)	- microbicida, tumoricida
- NO (óxido nítrico)	- inflamação
- Prostaglandinas (E_1, E_2)	- inflamação e imunorregulação
- Tromboxana B_2	- inflamação e imunorregulação
- Leucotrieno C	- inflamação e imunorregulação

Adaptada de: NATHAN, C. F. Secretory products of macrophages.**J. Clin. Invest., 79:** 319-326, 1987.

sensibilizando terminações sensórias da dor através de nociceptores, causando a migração de polimorfonucleares (PMN), induzindo a febre através da liberação de pirógenos endógenos e desencadeando a proliferação de células mononucleares na medula óssea, através dos fatores estimuladores de colônias, os macrófagos desencadeiam uma série de eventos inflamatórios agudos e crônicos (**FERREIRA, 1980**).

OS NEUTRÓFILOS: ADESÃO E MIGRACÃO CELULAR

As primeiras células a migrarem para o foco inflamatório são os neutrófilos (**IVERSEN, 1989**), que se aderem à superfície das células endoteliais dos vasos adjacentes ao local da inflamação.

Os PMN-meutrófilos migram por diapedese e marginalizam ao redor dos vasos sanguíneos, aderindo-se às suas parede através da interação entre seus receptores de membrana e os ligantes presentes nas células endoteliais (**BENESTAD & LAERUN, 1989**).

O acúmulo anormal de neutrófilos é observado em diversos estados inflamatórios, incluindo a injúria térmica, as doenças auto-imunes, tais como a Artrite Reumatóide e a Síndrome do Distress Respiratório Agudo (**RYAN & WORTHINGTON, 1992**).

Uma série de etapas estão envolvidas na ativação do endotélio e dos neutrófilos, as quais permitem a adesão e a diapedese. O acúmulo persistente de neutrófilos resulta em liberação de radicais tóxicos de oxigênio e de proteases, ocasionando um exacerbado dano tecidual. Numa sequência complexa de eventos, diversas moléculas de adesão estão envolvidas, sendo as suas expressões, pré-requisitos para os passos subsequentes (**RYAN & WORTHINGTON, 1992**).

Durante uma resposta inflamatória, várias famílias de

moléculas de adesão participam da cascata de eventos que levam à ligação dos leucócitos à vários tipos celulares como o endotélio e o epitélio. A ligação entre os receptores expressos sobre diferentes tipos celulares, em diferentes estágios de ativação, medeiam funções efetoras de leucócitos (**HOGG & LANDIS, 1993**). As interações iniciais entre as moléculas de adesão expressas por neutrófilos e endotélio podem ser de alta ou de baixa afinidade e podem resultar em motilidade e quimiotaxia dos leucócitos (**DOWNEY, 1994**).

O endotélio é um tecido dinâmico que controla, entre outros processos, o tráfego de moléculas e de células entre o sangue e os locais do desafio imunológico. Os leucócitos circulantes expõem ligantes que induzem a expressão de moléculas de adesão nas células endoteliais (CAMs). As CAMs quando estimuladas, mudam as propriedades de adesão do endotélio, que passam de um estado de repouso a ativado (**OSBORN, 1990**). Várias dessas moléculas já foram caracterizadas e clonadas, fornecendo detalhes de como os leucócitos são recrutados para a corrente sanguínea e guiados a seus alvos (**OSBORN, 1990**). As CAMs são seletivas para cada classe de leucócitos (neutrófilos, linfócitos e monócitos) que migram para o local da inflamação. Dentro de poucos minutos após o estímulo, os neutrófilos chegam ao local da inflamação, ativando outras células inflamatórias. Posteriormente, os linfócitos T e B e os monócitos chegam ao local inflamado, permanecendo alguns dias, destruindo células e moléculas estranhas ao organismo (**OSBORN, 1990**).

Além das CAMs, as selectinas têm um papel importante no processo inflamatório. A L-selectina, em particular a LAM-1 é expressa por cerca de 70% de neutrófilos e monócitos e é parcialmente responsável pela mobilização de neutófilos dentro do tecido inflamado "*in vivo*" e pela adesão de neutrófilos às

células endoteliais estimuladas "*in vitro*" com citocinas, tais como IL-1 e TNF (**RYAN & WORTHINGTON, 1992**).

Atualmente são conhecidos receptores de leucócitos e de células endoteliais pertencentes a três grupos estruturais: 1) a superfamília das Imunoglobulinas, 2) a família das Integrinas e, 3) a mais nova família descoberta, a das Selectinas (LecCAMs) (**OSBORN, 1990; McEVER, 1994**). As **Tabelas II e III** mostram as principais moléculas de adesão envolvidas no processo inflamatório: as integrinas e as selectinas.

Durante a inflamação, fatores quimioatraentes para neutrófilos são liberados por macrófagos no foco inflamatório. Dentre esses fatores, citam-se citocinas como o TNFα e Interleucinas como a IL-1, IL-6 e IL-8 (**BENDTZEN, 1988; DINARELLO, 1987; CASSATELLA *et alli*, 1992**). Citocinas liberadas por linfócitos T ativados também podem participar direta ou indiretamente dos processos inflamatórios. Entre elas destacam-se a IL-4, IL-10, IL-13, IFNγ e o TNFß.

O PAPEL DAS CITOCINAS NA INFLAMAÇÃO

As citocinas constituem um grupo de proteínas produzidas no decorrer da resposta imune e inflamatória. Dentre elas estão proteínas secretadas principalmente por linfócitos T e, muitas vezes referidas como linfocinas ou interleucinas (IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12 e IL-13), além dos fatores de crescimento e diferenciação celular (CSFs) como o Fator Estimulador de Colônia de Granulócito-Macrófago (GM-CSF), o Interferon-γ (IFNγ) e a Linfotoxina (LT) ou TNFß (**BOULAY & PAUL, 1992**). A terapia com citocinas liberadas por linfócitos vem sendo comumente usada em certas doenças com o objetivo de promover a imunomodulação (**POWRIE & COFFMAN, 1993**).

TABELA 2- FAMÍLIA DAS INTEGRINAS

INTEGRINAS	FUNÇÃO PRIMÁRIA	LIGANTES
LFA -1	Aderência	ICAM -1
MAC -1	Celular Imune	iC3b Fibrinogênio Fator X
p 150,95		iC3b
VLA -1	Morfogênese	?
VLA -2		Colágeno
VLA -3	e	Laminina Colágeno Fibronectina
VLA -4		?
VLA -5	Cicatrização	Fibronectina
VLA -6		Laminina
VLA -7		?
IIb/IIa	Morfogênese e Cicatrização	Fibronectina Fibrinogênio Vitronectina
VNR		Vitronectina

Abreviaturas: LFA-1 (antígeno associado a função de linfócitos MAC-1 (antígeno de macrófagos-1) p 150, 95 (proteína de 150,95 Kda); VLA (antígeno tardio; "very late antigen"); VNR (receptor de vitronectina); ICAM-1 (Molécula de adesão intercelular-1); iC3b (inativador de C3b).

Adaptado de: KISHIMOTO, T. K.; LARSON, R. S.; CORBI, A. L.; DUSTIN, M. L.; STAUNTON, D. E. & SPRINGER, T. A. Leukocyte Integrins. In Leucocyte Adhesion Molecules. **Springer-Verlag** (New York); 07-43, 1988.

TABELA 3- FAMÍLIA DAS SELECTINAS

SELECTINA	CD NOMENCLATURA	NOMES PRÉVIOS	EXPRESSOS POR	CÉLULAS ALVO	FUNÇÕES PROPOSTAS
L-Selectin	CD 62 L	LAM -1 LECAM -1	PMNs Monócitos Subgrupos de Linfócitos	Ativa células endoteliais, HEVs, PLN e ML	Recircula-ção de linfócitos Inflamação de neutrófilos (e outros leucócitos)
E-Selectin	CD 62 E	ELAM -1	Células endoteliais ativadas por citocinas	PMNs Monócitos Eosinófilos Subgrupos de Linfócitos Algumas células tumorais	Inflamação de leucócitos
P-Selectin	CD 62 P	GMP -140 PADGEM	Células endoteliais ativadas por citocinas	PMNs Monócitos Eosinófilos Subgrupos de Linfócitos Algumas células tumorais	Inflamação de tecidos

Abreviaturas:ELAM: molécula de adesão de endotélio ao linfócito; LECAM: molécula de adesão de leucócitos ao endotélio; **PMNs**: polimorfonucleares; HEVs: vênula do endotélio alto; PLN: linfócito periférico; ML: tecido linfóide mesentérico; LAM: molécula de adesão de linfócitos; GMP-140: proteína granular de membrana; PADGEM: fator ativador de plaquetas dependente de grânulos da membrana externa.

Adaptada de: 1) McEVER, R. P. Selectins. **Current Opinion in Immunology, 6:** 75-84, 1994; 2) LASKY, L. A. Selectins: Interpreters of Cell-Specific carbohydrate information during Inflammation. **Science, 258:** 964-969, 1992.

Os macrófagos são células que desempenham papel central na defesa contra doenças microbianas e neoplásicas, sendo importantes numa variedade ampla de processos reparadores de tecidos (**BENDTZEN, 1988**). Essas células desempenham também um papel importante no processo inflamatório, através da secreção de citocinas como: interleucina 1 (IL-1), interleucina 6 (IL-6), interleucina 8 (IL-8), Fator de Necrose Tumoral-α (TNFα) e outras (**DINARELLO, 1987**).

Assim, entre as citocinas liberadas por macrófagos e/ou linfócitos que apresentam atividade inflamatória, destacam-se: a IL-1, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-13, IFNγ e TNFα. Tais produtos são chamados de citocinas inflamatórias por regularem as interações celulares que ocorrem na inflamação e por serem responsáveis pela migração celular para o local apropriado, bem como pela ativação de células.

Várias substâncias, incluindo os lipopolissacarídeos e as exotoxinas (superantígenos) de origem microbiana, são capazes de ativar leucócitos e de estimular a produção de citocinas por essas células (**BENDTZEN, 1988; ANDERSSON *et alli*, 1992**).

As exotoxinas produzidas por bactérias Gram-positivas, como estafilococos, estreptococos e micoplasmas estão envolvidas em diferentes manifestações clínicas, como a septicemia e o choque séptico, que continuam sendo os principais causadores da morbidade e mortalidade em pacientes hospitalizados. Esses produtos bacterianos são capazes de ativar e induzir a síntese de diversas citocinas por linfócitos e monócitos do sangue periférico (**ANDERSSON *et alli*, 1992**).

As endotoxinas derivadas da parede de bactérias Gram-negativas são importantes estimuladores de macrófagos e desencadeam a maioria dos fenômenos fisiopatológicos observados em infecções por esse tipo de bactéria (**MORRISON & ULEVITCH, 1978**). Os efeitos da endotoxina bacteriana são desencadeados

pelo componente lipopolissacarídico (LPS), cuja porção lipídica é responsável pela maioria dos seus efeitos endotóxicos (**MORRISON & ULEVITCH, 1978; SCHUMANN *et alli*, 1990**). A estimulação de macrófagos com o LPS resulta na sua ativação e na síntese e liberação de citocinas como a IL-1, IL-6, e TNFα. Tais citocinas têm sido consideradas como importantes mediadores da patogenicidade da septicemia e do choque séptico causado por bactérias Gram-negativas (**GALLAY *et alli*, 1993**).

O TNF tem sido apontado como a principal citocina envolvida em diversas patologias vasculares (**GRAU & LOU, 1993**), dermatológicas (**PIGUET, 1993**), pulmonares e intestinais (**REMICK, 1993**), em parasitoses (**LUCAS *et alli*, 1993**), em crescimento de tumores e metástases (**MANNEL *et alli*, 1993**), em inflamação pancreática (**RUDDLE *et alli*, 1993**), na artrite reumatóide (**KOLLIAS, 1993**), na diabetes mellitus dependente de insulina (**MUELLER *et alli*, 1993**) e em vários problemas hematológicos (**ULICH *et alli*, 1993**)

Muitas doenças infecciosas resultam na estimulação da imunidade celular e regulação anormal de reações imunes celulares, que podem conduzir a autoimunidade e a doenças crônicas. Estas incluem as doenças reumáticas sistêmicas como a Artrite Reumatóide e doenças endócrinas órgão-específicas, como a Diabetes Mellitus e várias doenças tireoideanas. Desordens na imunidade mediada por células podem também contribuir para o desenvolvimento da Esclerose Múltipla, doenças pulmonares e outras (**BENDTZEN, 1988**). Em todas essas doenças, tem sido demonstrado o envolvimento do TNFα e do TNFß (**RUDDLE, 1992**).

Dados da literatura mostram que a produção *"in vitro"* de TNFα por macrófagos humanos ocorre após pequeno tempo de exposição ao LPS (**GALLAY *et alli*, 1993**). Da mesma forma, foi demonstrado que células do sangue periférico de ratos, de camundongos e humanas estimuladas por LPS produzem quantidades

significativas de TNF, medidas em ensaios de citotoxicidade, de maneira tempo e dose-dependente (**ESPEVIK & NISSEN-MEYER, 1986; FOSTER *et alli*, 1993**). Porém, o pré-tratamento de células sanguíneas humanas, murinas e de ratos com dexametasona ou pentoxifilina, via de regra, causa inibição dose e tempo-dependente na produção de TNFα induzida por LPS (**FOSTER *et alli*, 1993**).

Foi observado que a injúria térmica leva a um aumento simultâneo nos níveis de prostaglandina E-2 (PGE-2) e de TNF por macrófagos esplênicos de camundongos queimados. Geralmente, níveis elevados de PGE-2 levam a uma hiporregulação de TNF. Nos animais queimados, ao contrário, observou-se uma perda da regulação da síntese de TNF pela PGE-2. A administração prévia de indometacina (antiinflamatório não esteróide) nesses animais, restaurou parcialmente a sensibilidade à prostaglandina e, consequentemente, a regulação da síntese de TNF (**MOLLOY *et alli*, 1993**).

O TNFα e a IL-1 compartilham diversas atividades biológicas importantes (**DINARELLO, 1987**). Tem sido demonstrado que a associação de TNFα e IL-1 produz a intensificação de muitos efeitos sistêmicos e locais da IL-1 como: febre, sono e síntese de proteínas de fase aguda. Além disso, quando administradas juntas, as duas citocinas induzem um quadro semelhante ao observado no choque séptico e na hemorragia pulmonar, apresentando sinergismo nestas atividades. O TNF ativa diretamente neutrófilos e a IL-1 potencializa esta atividade, através de suas propriedades quimioatraentes.

Além do LPS, a Bradicinina, um importante mediador farmacológico da inflamação, pode produzir hiperalgesia de modo dose-dependente, quando injetada em patas de ratos. A administração de Bradicinina resulta em liberação de citocinas, como o TNFα, que por sua vez induz a liberação de outras

citocinas hiperalgésicas, responsáveis em gerar aminas pela via da ciclo-oxigenase, e de aminas simpatomiméticas. Seu efeito pode ser bloqueado pela indometacina (**FERREIRA *et alli*, 1993**). Também, observou-se que a Bradicinina e o TNFα desempenham papel importante na hiperalgesia induzida pela carragenina e pelo LPS (**FERREIRA *et alli*, 1993**).

Algumas citocinas produzidas por linfócitos T exercem atividades antiinflamatórias ao interferir com as funções de macrófagos. Dentre elas destacam-se a IL-4, a IL-10 e a IL-13, cujas atividades antiinflamatórias foram recentemente revistas por **de WAAL MALEFYT *et alli* (1993b)**.

A IL-4 e a IL-13 parecem afetar monócitos e macrófagos humanos de maneira similar, isto é, ambas promovem mudanças importantes na morfologia, no fenótipo e na função dos macrófagos. Existem evidências de que o receptor para IL-4 (IL-4R) e o receptor para IL-13 (IL-13R) compartilhem um componente comum, envolvido na transdução de sinais (**ZURAWSKI *et alli*. 1993**).

Macrófagos murinos e humanos estimulados com LPS produzem grandes quantidades de diferentes citocinas, inclusive IL-10. A IL-10 tem um efeito autorregulatório sobre os macrófagos, inibindo a síntese de IL-1, IL-6, IL-8, TNFα, GM-CSF, G-CSF e da própria IL-10. A IL-4 afeta de modo similar a produção dessas citocinas por macrófagos (**ZURAWSKI *et alli*. 1993**).

A IL-4, a IL-10 e a IL-13 também inibem a produção de IL-12 e INFγ em monócitos (**de WAAL MALEFYT *et alli*, 1993a, DOHERTY *et al*, 1993**). A IL-4 é ainda capaz de inibir a produção de citocinas por macrófagos ativados com IL-1, TNFα ou IFNγ (**LEE *et alli*, 1990; VELLENGA *et alli*, 1991**). Por outro lado, a IL-4 e a IL-13 aumentam a produção do antagonista do receptor de IL-1 (IL-1ra) em macrófagos ativados com LPS (**FENTON *et alli*, 1992; ORINO *et lli*, 1992; WONG *et alli*, 1993; de WAAL MALEFYT**

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

***et alli*, 1993b).**

A IL-4 e a IL-13 modulam a expressão de receptores para Fc de Imunoglobulinas sobre macrófagos. Essas citocinas induzem a expressão do receptor de baixa afinidade para IgE (FceRII; CD23) em macrófagos **(McKENZIE *et alli*, 1993)** porém, promovem hiporregulação dos receptores para IgG (FcγR; CD16, CD32, CD64) nessas células **(de WAAL MALEFYT *et alli*, 1993b).** Por outro lado, a IL-10 previne a hiporregulação de CD16 e CD32 e o IFNγ previne a hiporregulação de CD64 induzidas por IL-4 e IL-13 **(de WAAL MALEFYT *et alli*, 1993b)**. Uma vez que os receptores do tipo FcγR se correlacionam com a citotoxicidade mediada por anticorpo e complemento (ADCC) de monócitos, pode-se afirmar que a IL-4 e IL-13 interferem nos fenômenos de citotoxicidade mediados por essas células.

Foi recentemente demonstrado que a IL-10 **(CUNHA *et alli*, 1992)** inibe a produção de NO por macrófagos estimulados pelo LPS e IFNγ. **OSWALD *et alli* (1992a)** verificaram que IL-4, IL-10 e TGF-ß atuam sinergisticamente, inibindo a destruição intracelular de parasitas por macrófagos, por bloquear a produção de NO. A inibição da produção de NO induzida por IL-10 parece ser decorrente da inibição da produção de TNFα, o qual age como um cofator na ativação de monócitos, induzida pelo IFN γ **(OSWALD *et alli*, 1992b).**

A IL-10 inibe a expressão de moléculas de classe II do MHC por monócitos humanos, bem como inibe a hiperregulação dessas moléculas em monócitos ativados por IL-4 e IFNγ **(de WAAL MALEFYT *et alli*, 1992).** Por outro lado, a IL-10 inibe a produção de IL-2 por linfócitos T estimulados por antígeno associado às células apresentadoras. Assim, atribui-se a esses dois fatores a inibição da proliferação de linfócitos frente a antígenos, induzida pela IL-10 **(de WAAL MALEFYT *et alli*, 1992).**

Por sua atuação nas respostas inflamatória e imune,

sugere-se que a IL-10 possa ter aplicações terapêuticas em doenças inflamatórias agudas e crônicas, incluindo doenças auto-imunes, bem como é possível que ela possa desempenhar um papel importante suprimindo a rejeição a transplantes e na manutenção da tolerância **(de WAAL MALEFYT *et alli*, 1992).**

Citocinas liberadas por macrófagos ativados, como a IL-6, IL-8, TNFα, além de exercerem atividade pró-inflamatória, podem exercer também atividade antiinflamatória, tais como a inibição da adesão de neutrófilos a células endoteliais ativadas **(GIMBRONE *et alli*, 1989)** e inibição da migração de neutrófilos *"in vivo"* para o foco inflamatório **(OTSUKA *et alli*, 1990; HECHTMAN *et alli*, 1991; ULICH *et alli*, 1991; CUNHA & TAMASHIRO, 1992).**

CITOCINAS E MOBILIZAÇÃO CELULAR

Com relação à mobilização de células, tem sido demonstrado que diversas citocinas derivadas de monócitos/macrófagos ativados, tais como o TNFα, IL-1, IL-6 e IL-8, são capazes de promover a quimiotaxia de PMN-neutrófilos para o foco inflamatório **(BENDTZEN, 1988; DINARELLO, 1987).**

Em estudo recente, **RIBEIRO *et alli* (1991)** mostraram que as formas recombinantes da IL-8 (rIL-8) e da IL-1ß (rIL-1ß) também foram capazes de induzir a migração de neutrófilos para cavidades peritoneais de ratos. Esta atividade foi abolida pelo pré-tratamento dos animais com dexametasona ou pela depleção da população de células residentes. Esses resultados parecem indicar que a rIL-8 e a rIL-1ß são capazes de induzir a migração de neutrófilos *"in vivo"* por mecanismos indiretos, dependentes de células residentes **(RIBEIRO *et alli*, 1991).** Resultados semelhantes foram obtidos com o TNFα e TNFß

(**FACCIOLI *et alli*, 1990**).

DROGAS ANTI-INFLAMATÓRIAS: OS GLICOCORTICÓIDES

Os glicocorticóides atuam através do controle da taxa de síntese de proteínas, especificamente via indução da síntese de Lipocortina-1. A lipocortina-1 é um membro da família das Anexinas, proteínas que se ligam ao cálcio, bloqueando seu sítio de ligação original (**BURGOYONE & GEISOW, 1989**). O mecanismo de ação dos glicocorticóides envolve ainda a inibição da enzima fosfolipase-A2 e, por conseguinte, das vias das ciclo e lipo-oxigenases, bloqueando a geração de produtos derivados do ácido aracdônico e portanto, exercendo atividade antiinflamatória (**FLOWER & BLACKWELL, 1979; DI ROSA *et alli*, 1988**).

Durante o processo inflamatório agudo, os macrófagos tornam-se ativados e liberam mediadores solúveis, incluindo a IL-1, a IL-6 e o TNFα, que estimulam o eixo hipotalâmico-pituitárico-adrenal (HPA). A estimulação do HPA resulta em liberação de cortisol endógeno, o qual induz a síntese de lipocortina-1 nos locais da inflamação, controlando desta forma o processo inflamatório (**GOULDING & GUYRE, 1992**).

Além disso, os glicocorticóides afetam os leucócitos circulantes. Sua administração aumenta o número de PMN no sangue como resultado de maior taxa de penetração dessas células no sangue, vindas da medula óssea, e da menor taxa de remoção da circulação. Em contraste, o número de linfócitos, eosinófilos, monócitos e basófilos do sangue diminuem após a administração de glicocorticóides. Uma única dose de cortisol produz um declíneo de cerca de 70% nos linfócitos circulantes e de mais de 90% nos monócitos; isso ocorre entre quatro a seis

horas após a sua administração e tem duração de cerca de vinte e quatro horas **(GOODMAN & GILMAN, 1987)**.

O cortisol e seus análogos sintéticos têm também a capacidade de bloquear ou suprimir o desenvolvimento de calor, eritema, edema e sensibilidade locais, através dos quais se reconhece a inflamação. Os glicocorticóides inibem não só os primeiros fenômenos do processo inflamatório (edema, deposição de fibrina, dilatação capilar, migração de leucócitos para a área inflamada e atividade fagocitária), mas também as manifestações posteriores (proliferação de capilares e fibroblastos, deposição de colágeno e, ainda mais tarde, cicatrização). Porém, pode-se considerar como um dos fatores mais importante da ação antiinflamatória dos glicocorticóides a sua capacidade de inibir o recrutamento de neutrófilos e monócitos para a área afetada **(GOODMAN & GILMAN, 1987)**.

A dexametasona tem sido clinicamente indicada em muitos processos inflamatórios como glicocorticóide de escolha (**FORSYTH & TALBOT, 1992**). Sua ação antiinflamatória é bastante ampla, abrangendo o bloqueio de vários fenômenos que ocorrem durante a inflamação, tais como a liberação de citocinas (**CUNHA & FERREIRA, 1986; MUKAIDA *et alli*, 1992; LEW *et alli*, 1988; MUKAIDA *et alli*, 1991**) e a formação de edema (**DINARELLO, 1987**). O efeito inibidor da migração celular exibido pela dexametasona tem sido observado quando se utiliza diferentes estímulos inflamatórios. Assim, tem sido demonstrado que a dexametasona é capaz de bloquear a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de ratos, induzida por LPS e carragenina (**CUNHA, 1989**) e citocinas como o IFNγ (**RIBEIRO *et alli*, 1990**), IL-1 e TNF (**FACCIOLI *et alli*, 1990**) e IL-8 (**RIBEIRO *et alli*, 1991**).

O MNCF E O NRIF: FATORES COM ATIVIDADES PRÓ E ANTI-INFLAMATÓRIAS

CUNHA & FERREIRA (1986) mostraram que macrófagos peritoneais de ratos, estimulados com tioglicolato e ativados *"in vitro"* com LPS, liberam no sobrenadante de cultura, um fator quimiotático para neutrófilos, ativo em ratos pré-tratados com dexametasona. Essa atividade foi atribuída a uma nova citocina, denominada Fator quimiotático de neutrófilos derivados de monócitos (MNCF). Além disso, observaram que a migração de neutrófilos induzida *"in vivo"* pelo MNCF não podia ser reduzida pela depleção de células residentes das cavidades peritoneais de ratos, sugerindo que o MNCF era um mediador final nesse processo **(SOUZA *et alli*, 1988).**

O MNCF foi recentemente caracterizado como sendo uma proteína de 54 KDa, cuja atividade se faz através de um sítio ligante à D-Galactose **(DIAS-BARUFFI *et alli*, 1993).** Outros autores já haviam demonstrado anteriormente, que moléculas do grupo das LecCAMs promoviam interações do tipo proteínas-carboidratos entre células **(LASKY, 1991; LASKY, 1992).** É possível que o MNCF esteja relacionado a esse grupo de moléculas.

Além do MNCF, também foi detectado em sobrenadante de macrófagos peritoneais de ratos, estimulados *"in vitro"* com LPS, componente (s) com atividade inibidora de vários fenômenos inflamatórios, tais como: o edema e a migração de neutrófilos **(TAVARES *et alli*, 1989).** Essa atividade foi atribuída à presença de uma nova citocina, denominada Fator inibidor do recrutamento de neutrófilos (NRIF) **(TAVARES *et alli*, 1989; TAMASHIRO *et alli*, 1992).** O NRIF ainda não está bem caracterizado, porém é provável que ambas as atividades, NRIF e MNCF, possam ser devidas a um único fator **(TAVARES-MURTA *et***

***alli*, 1993).**

Como descrito acima, a produção dos fatores MNCF e NRIF foi originalmente observada em macrófagos peritoneais de ratos. Entretanto, a não disponibilidade, até o início do presente estudo, de citocinas inflamatórias recombinantes de ratos ou de anticorpos monoclonais contra as mesmas, dificultava a interpretação de alguns resultados obtidos com os fatores MNCF e NRIF. A mesma dificuldade não havia para o modelo murino.

Assim, no presente trabalho, nos propusemos a verificar, utilizando o mesmo protocolo descrito para a obtenção de MNCF e NRIF **(CUNHA & FERREIRA, 1986)**, se macrófagos peritoneais de camundongos também liberavam fatores com atividades similares, bem como caracterizar o fator encontrado.

OBJETIVOS

Os objetivos do presente trabalho foram:

1- verificar se macrófagos de camundongos, estimulados "*in vitro*" com LPS, liberavam fatores capazes de induzir o recrutamento de células para cavidades peritoneais de animais naive ou tratados com dexametasona.

2- verificar a existência de fator comparável ao NRIF nesses sobrenadantes.

3- verificar a espécie-especificidade dos fatores ativos encontrados nos sobrenadantes de cultura de macrófagos.

4- caracterizar o fator indutor da migração encontrado nos sobrenadantes de cultura de macrófagos e ativo em animais tratados com dexametasona.

MATERIAIS E MÉTODOS

II - MATERIAIS E MÉTODOS

01. Animais de experimentação

Os camundongos e ratos utilizados foram provenientes do Centro Multidisciplinar de Bioterismo (Cemib) do Campus da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Previamente aos experimentos (24 horas antes), os animais permaneceram em ambiente com temperatura controlada (23°-25°C), com ração e água em livre demanda, no Biotério do Departamento de Microbiologia e Imunologia (DMI) da UNICAMP.

1.1 Ratos

Foram utilizados ratos (***Ratus norvegicus***) Wistar, machos, pesando de 150 a 180 gramas, para obtenção de macrófagos peritoneais e em ensaios de migração celular.

1.2 Camundongos

Foram utilizados camundongos (***Mus muscullus***) Swiss, machos e fêmeas, pesando de 25 a 30 gramas, para a obtenção de macrófagos peritoneais. Nos ensaios de migração celular, foram usados Camundongos C57Bl/6, machos, pesando de 25 a 30 gramas.

1.3 Coelhos

Coelhos adultos do sexo feminino, provenientes do Biotério Central do Campus de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (USP), foram utilizados para imunização. Durante o período de imunização, os animais permaneceram no Biotério do DMI.

02. Principais soluções utilizadas

2.1 Solução salina tamponada com Fosfato (PBS)

A solução de cloreto de Sódio (0,15M) foi tamponada com fosfato (0,02M), em pH 7,4 e autoclavada.

2.2 Meio de Tioglicolato a 3%

O meio Tioglicolato, (Difco) foi utilizado a 3%, dissolvido em água desionizada e bidestilada estéril. Previamente à sua utilização, foi aquecido em forno microondas por 3 minutos.

2.3 Lipopolissacarídeo (LPS)

LPS, purificado de **E. coli 011B4** (Sigma), foi dissolvido em PBS, pH 7,4 na concentração de 5 ug/ml e estocado a -20° C. Antes do uso, esta solução foi submetida à sonicação por 30 minutos e diluída em salina fisiológica 0,15 M, quando necessário.

2.4 Carragenina (Cg)

A Carragenina (Sigma) foi sempre diluída pouco antes do uso em salina fisiológica e utilizada intraperitonealmente na dose de 500 ug/rato e 300 ug/camundongo, respectivamente, para promover reação inflamatória local.

2.5 Dexametasona (Dexa)

Dexametasona (Decadron, Prodome) é um glicocorticóide e foi utilizado na dose de 0,5 mg/kg peso.

2.6 Meio de Cultura

Utilizou-se o Meio RPMI 1640 com Glutamina, sem Bicarbonato de Sódio, produzido pela Flow Laboratories. Para cultura de macrófagos, o meio tinha a seguinte constituição final.

- Meio RPMI 1640 ..... 10,4 gramas/l
- Bicarbonato de Sódio ..... 2,0 gramas
- Hepes (Sigma)..... 2,2 gramas
- Agua Desionizada qsp ..... 1,0 litro

2.7 Meio Completo

Para o preparo do meio completo, utilizado no cultivo de células de linhagem, foram adicionados Gentamicina (50 ul/ml) e 10% de Soro Fetal Bovino (SFB; Hyclone Laboratories Inc., Logan, Utah) ao meio RPMI, contendo Hepes e Bicarbonato.

2.8 Fator de Necrose Tumoral recombinante murino (rmTNFα) e anticorpo monoclonal anti-TNF

TNFα recombinante murino (Genentech Inc., South San Francisco, CA, USA) foi obtido na concentração original de 0,98 mg/ml. No momento do uso, foi diluído em salina fisiológica 0,15 M, conforme indicado em Resultados. O hibridoma XT22.11, secretor de anticorpo anti-TNFα, nos foi cedido pelo **Prof. Fernando Q. Cunha** (Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP). Esse anticorpo foi purificado em Sepharose Proteína-G, a partir de liquído ascítico preparado em camundongos Balb/c nu/nu e, utilizado após diálise contra salina 0,15 M.

03. Preparo de antissoro anti-rmTNFα

Três coelhos adultos foram inoculados com 100 ug de TNFα recombinante murino, emulsificados em 50% Adjuvante Completo Freund (ACF) (Difco), através de injeções intradérmicas (id), em vários pontos do dorso.

Quinzenalmente, os animais receberam injeções id de 70 ug do antígeno emulsificado em Adjuvante Incompleto Freund (AIF)

(DIFCO). Após a quarta dose, os animais foram sangrados para obtenção do soro imune, que foi utilizado como soro total ou após a purificação da fração IgG, através de cromatografia de troca iônica em DAE-celulose, nos ensaios de neutralização da atividade citotóxica do TNFα. Na diluição final de 1:100, esse soro foi capaz de neutralizar completamente a atividade desenvolvida por 3,875 ng de TNFα recombinante murino.

04. Preparo do sobrenadante de cultura de macrófagos de ratos

Utilizou-se o exsudato inflamatório de cavidades peritoneais de ratos, que haviam recebido injeção intraperitoneal de 10 ml de tioglicolato 3% (p/v) no quarto dia anterior à coleta dos macrófagos. Esse intervalo de tempo foi determinado em estudos pilotos como ideal para aumentar a população de macrófagos peritoneais.

Os animais, após deslocamento cervical, tiveram a pele sobre o abdome rebatida e a cavidade abdominal injetada com 8 ml de meio de cultura RPMI 1640 com heparina (5UI/ml). Após leve massagem sobre o abdome, o conteúdo da cavidade peritoneal foi aspirado com uma pipeta Pasteur e depositado em placas de Petri de vidro e cultivado conforme descrito abaixo.

05. Preparo de sobrenadante de cultura de macrófagos de camundongos

Macrófagos peritoneais de camundongos foram obtidos de modo semelhante ao método descrito para ratos. Brevemente, 3 ml de tioglicolato 3% foi injetado intraperitonealmente quatro dias antes do experimento.

No dia do experimento, os camundongos receberam 4 ml de meio RPMI 1640 com heparina, intraperitonealmente. O conteúdo

da cavidade peritoneal foi aspirado, depositado em placas de Petri de plástico e cultivado como descrito abaixo.

06. Cultura de macrófagos peritoneais

As placas de cultura com o "lavado peritoneal" foram incubadas durante 60 minutos, à temperatura de 37°C em estufa contendo ar atmosférico umidecido e 5% de gás carbônico. Estas últimas condições foram observadas em todas as incubações no decorrer do experimento. Esta etapa tinha como objetivo a formação de monocamandas de macrófagos aderidos à superfície da placa de cultura.

Após o período de incubação, os sobrenadantes foram desprezados, e então procedeu-se à lavagem delicada das placas com PBS, por duas vezes, a fim de eliminar debris celulares e células não aderidas.

As monocamadas foram, então, recobertas com 5 ml de uma solução de meio de cultura (RPMI 1640), contendo 5 ug/ ml de LPS e colocadas novamente em incubação por 30 minutos. A endotoxina adicionada nesta etapa exerceu o papel de substância estimuladora dos macrófagos aderidos, para a liberação de fatores solúveis no meio.

07. Obtenção do sobrenadante da cultura

Decorrido o tempo de estimulação dos macrófagos pelo LPS, os sobrenadantes das placas de cultura foram descartados e as monocamadas lavadas três vezes com PBS, objetivando-se com isso a eliminação da endotoxina. As monocamadas foram recobertas com 5 ml (experimentos com ratos) e 3 ml (experimentos com camundongos) de meio RPMI 1640 e incubadas por 120 minutos. Os sobrenadantes das diversas placas foram reunidos e

centrifugados a 2.500 rpm, a 4°C, durante 20 minutos.

O "pool" de sobrenadantes foi então ultrafiltrado através de membrana Diaflo YM-10 (capacidade de reter material com peso molecular maior que 10 KDa). O material retido foi ressuspenso em PBS, pH 7,4 e usado no ensaio de atividade biológica conforme descrito abaixo.

08. Teste de atividade indutora da migração de neutrófilos *"in vivo"*

O ensaio para detecção de atividade indutora da migração de neutrófilos foi conduzido de modo semelhante ao descrito por **CUNHA & FERREIRA (1986).**

Brevemente: camundongos ou ratos foram previamente tratados com Dexametasona (0,5 mg/kg/0,2 ml) ou com salina fisiológica (0,2 ml/animal), por via subcutânea (sc). Uma hora após a injeção sc, os animais receberam uma injeção intraperitoneal (ip) dos sobrenadantes de culturas de macrófagos, estimulados *in vitro* com LPS, equivalente ao material liberado por 4 x 10^6 macrófagos, contido em 0,2ml (experimentos com camundongos) ou 3,0 ml (experimentos com ratos); de carragenina (300 ug/0,2 ml/camundongo ou 500 ug/3ml/rato); de lipopolissacarídeo (10 ng/0,2 ml/camundongo); ou de rmTNFα (100 ng/0,2 ml/animal). Os animais controles receberam volumes idênticos de salina fisiológica por via ip.

Os animais foram deixados em repouso por 5 horas ou por diferentes intervalos de tempo, quando indicado, e então sacrificados por deslocamento cervical. Em seguida, foram feitas lavagens das cavidades peritoneais e determinado o número total de células nos lavados, através da contagem em câmara de Neubauer. O número de neutrófilos nos lavados peritoneais foi determinado após coloração com o corante de

Rosenfeld, segundo indicações de **SOUZA & FERREIRA (1985).**

Em alguns experimentos utilizou-se o mrTNFα (100 ng/0,2 ml/animal) ou o LPS (0,5 ug/ml; 0,2 ml/animal), pré-aquecidos por 30 minutos, a 100°C. Como controle desses experimentos, os animais foram injetados com solução salina 0,15 M (0,2 ml/animal).

Também, em alguns experimentos de migração, foram testados sobrenadantes de culturas de macrófagos peritoneais de camundongos, rmTNFα (100 ng) ou LPS (50 ng) tratados com 200 ug da IgG de soro anti-mrTNFα (IgG a-TNFα), através de incubações a 37° C, durante 1 hora. Como controles desses experimentos, utilizou-se solução salina 0,15 M, contendo ou não quantidades idênticas de IgG anti-TNFα. Em outros experimentos, utilizou-se o anticorpo monoclonal anti-TNFα XT22.11 (100 ug/0,2 ml/animal) como pré-tratamento intraperitoneal, e o LPS (200 ng/0,2 ml/animal) como estímulo inflamatório intraperitoneal, uma hora após o pré-tratamento com o anticorpo. Os animais controles desses experimentos, pré-tratados ou não com o anticorpo, receberam injeções intraperitoneais de salina fisiológica 0,15 M (0,2 ml/animal).

Os resultados foram expressos como médias ± erro padrão da média do número de neutrófilos ou demais células por ml de lavado peritoneal.

09. Teste de atividade inibidora da migração de neutrófilos *"in vivo"*

O ensaio para detecção de atividade inibidora da migração de neutrófilos foi realizado através do pré-tratamento dos animais (camundongos e ratos) com os respectivos sobrenadantes de culturas de macrófagos, estimulados *in vitro* com LPS. Foram utilizados em cada animal o equivalente ao material liberado

por 4 x 10^6 macrófagos contidos em 0,2 ml, por via endovenosa (iv). Trinta minutos após a injeção iv, os animais receberam uma injeção intraperitoneal (ip) de carragenina (300 ug/0,5 ml/camundongo ou 500 ug/3,0 ml/rato) ou de salina fisiológica (volumes idênticos aos dos grupos experimentais).

Os animais foram deixados em repouso por cinco horas e então, sacrificados por deslocamento cervical. Em seguida, foram feitas lavagem peritoneais e determinado o número total de células, através da contagem em Câmara de Neubauer e o número de neutrófilos pela contagem diferencial após coloração **(SOUZA & FERREIRA, 1985)**. Os resultados foram expressos como médias ± erro padrão da média do número de neutrófilos por ml de lavado peritoneal.

10. Ensaio da atividade de TNF em células WEHI 164 clone 13

O conteúdo de TNF em sobrenadantes de culturas de macrófagos de ratos e camundongos foi mensurado pelo uso de linhagem de células altamente sensíveis ao TNF, a WEHI 164 clone 13, conforme descrito por **ESPEVICK & NISSEN-MAYER (1986)**.

A WEHI 164 foi cedida pelo **Dr. M. A. Palladino Jr.** (Genentech Inc., USA) e está sendo mantida em nosso laboratório. Nos ensaios, as células WEHI foram semeadas em microplacas (Costar 3596, Cambridge, MA, USA), na densidade de 4 x 10^4 células/orifício em 50 ml de meio completo. Cinquenta ml de cada diluição do sobrenadante de macrófagos foram adicionados em quadruplicata aos orifícios e as placas foram incubadas por 20 (vinte) horas em estufa, a 37°C com 5% de CO_2. Então, 10 ml de uma solução 3-4,5-dimethylthiazol-2-yl-3,5-diphenylformazam (5 mg/ml de PBS) (MTT, Sigma) foram adicionados em cada orifício e as placas incubadas por mais 4 (quatro) horas. Depois, 100 ul de isopropanol, contendo 0,04 N

de HCL, foram adicionados a cada orifício. Quinze minutos mais tarde, o grau de lise celular foi quantificado espectrofotometricamente a 570 nm (Multiskan MCC/340 MKII, Flow Laboratories). Devido a não disponibilidade de TNF de rato, as curvas padrões foram sempre realizadas com TNFα recombinante de camundongos, e o conteúdo de TNF nos materiais testados foi calculado por comparação com as quantidades padrões.

Os resultados correspondem à média dos dados obtidos em diferentes experimentos, e foram expressos em termos de concentração de TNF (ng/ml). Em todos os experimentos, foi usado anticorpo anti-mrTNF murino , obtido em coelhos, para estudar o envolvimento de citocina semelhante ao TNF nas amostras obtidas.

11. Análise estatística

Utilizou-se o teste t de Student para a comparação das médias obtidas nos diferentes experimentos realizados. O nível de significância foi determinado pelos valores de $p \leq 0,05$.

RESULTADOS

III - RESULTADOS

01. Efeito dos sobrenadantes de culturas de macrófagos sobre a migração de neutrófilos.

Para efeito de comparação foram obtidos sobrenadantes de cultura de macrófagos peritoneais de camundongos e de ratos, estimulados *in vitro* com LPS. Esses sobrenadantes foram utilizados em ensaios de indução e de inibição da migração de neutrófilos, em cavidades peritoneais de camundongos e ratos, respectivamente.

Similarmente ao observado por **CUNHA & FERREIRA (1986)**, os sobrenadantes de cultura de macrófagos de ratos obtidos aqui também mostraram a presença de fator(es) que induz(em) significativo recrutamento de neutrófilos ($p= 0,003$) para a cavidade peritoneal de ratos tratados com dexametasona (Figura 1).

A injeção endovenosa desses sobrenadantes, doravante chamados de Fator de ratos, também foi capaz de inibir de modo significativo ($p= 0,001$) a migração celular induzida pela administração intraperitoneal de carragenina (Figura 2).

Conforme pode ser verificado na Figura 3 (painel A), os sobrenadantes de cultura de macrófagos de camundongos, doravante chamado de Fator de camundongos, também induziram um significativo recrutamento de neutrófilos para a cavidade peritoneal de animais "naive" ($p= 0,015$) ou pré-tratados com dexametasona ($p< 0,001$). Não foram detectadas diferenças significativas entre os números médios de neutrófilos encontrados nos grupos tratados ou não com dexametasona e injetados com o Fator.

A Figura 3 (painel B) mostra ainda que a dexametasona, utilizada nesses ensaios, está com sua atividade anti-

inflamatória preservada já que a migração induzida pela carragenina, em animais pré-tratados com o glicocorticóide, foi significativamente inibida (p= 0,001).

Estes resultados parecem indicar que macrófagos de camundongos também liberam, sob estímulo com LPS, fator(es) capaz(es) de suplantar o efeito anti-inflamatório da dexametasona e desta forma, recrutar neutrófilos para o foco da inflamação.

O tratamento endovenoso de camundongos naive com o Fator de camundongos foi ainda capaz de inibir a migração induzida pela carragenina, conforme mostrado na Figura 4.

Este conjunto de resultados sugere que macrófagos de camundongos, estimulados com LPS, liberam fatores que atuam sobre neutrófilos, inibindo ou promovendo a sua migração para o foco inflamatório.

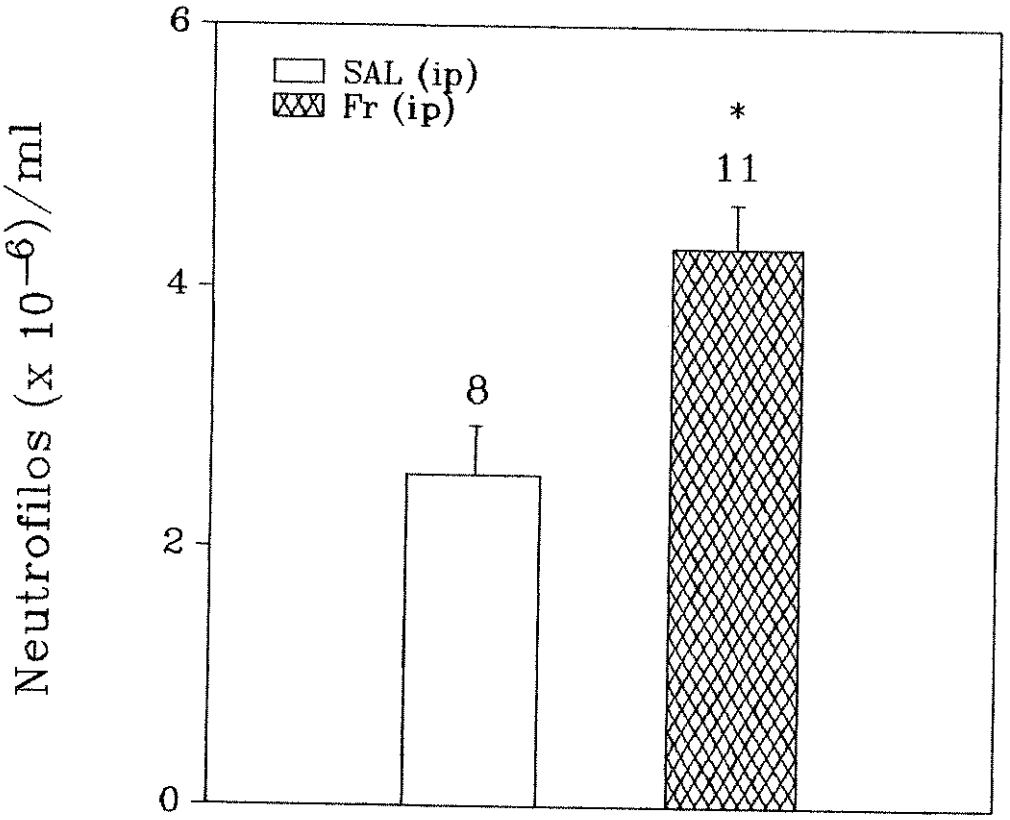

Figura 1 - Sobrenadante de cultura de macrófagos de ratos estimulados com LPS (Fator de ratos, Fr) induz migração de neutrófilos. As barras representam a migração de neutrófilos para as cavidades peritoneais de ratos induzida por injeção intraperitoneal (ip) de 3 ml de **Fr**, correspondente ao material obtido do cultivo de 4 x 10^6 macrófagos estimulados pelo LPS, ou por 3 ml de salina fisiológica (**Sal**). Os resultados estão expressos como as médias dos números de células/ml de lavado peritoneal ± o erro padrão da média (E.P.M.). Os números sobre as barras indicam a quantidade de animais utilizados em cada grupo experimental. Os asteriscos (*) indicam resultados estatisticamente significativos ao nível de $p \leq 0,05$ no teste t de Student.

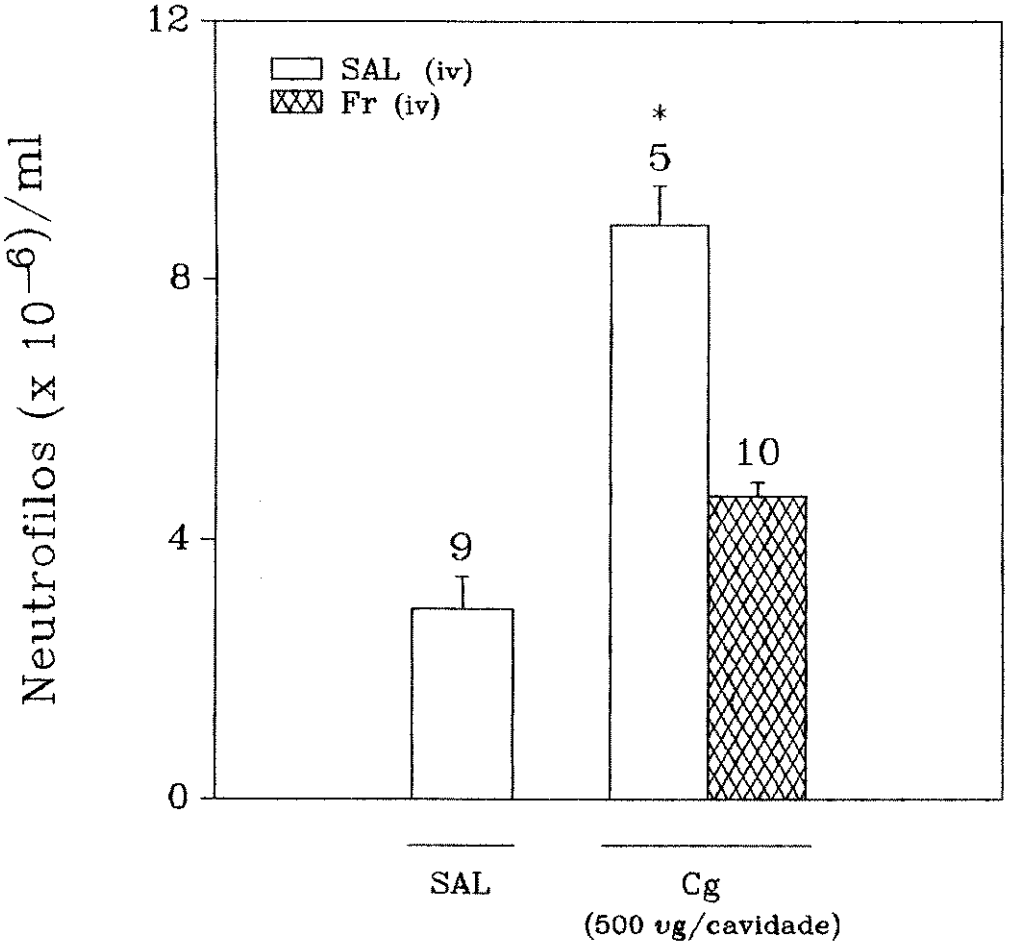

Figura 2 - Fator de ratos inibe a migração de neutrófilos induzida pela carragenina. As barras representam a migração de neutrófilos induzida pela injeção ip de carragenina (**Cg**; 500 µg/3 ml/animal) ou de salina fisiológica (**Sal**, 3 ml/animal). Os animais foram pré-tratados endovenosamente (iv), 1 h antes dos estímulos ip, com 0,2 ml de salina (**Sal**) ou com 0,2 ml de Fator de ratos (**Fr**), correspondente ao material liberado por 4 x 10^6 macrófagos estimulados pelo LPS. Os resultados estão expressos como descrito para a figura 1. Os números sobre as barras indicam a quantidade de animais utilizados em cada grupo experimental Os asteriscos (*) indicam resultados estatisticamente significativos ao nível de $p \leq 0,05$ no teste t de Student.

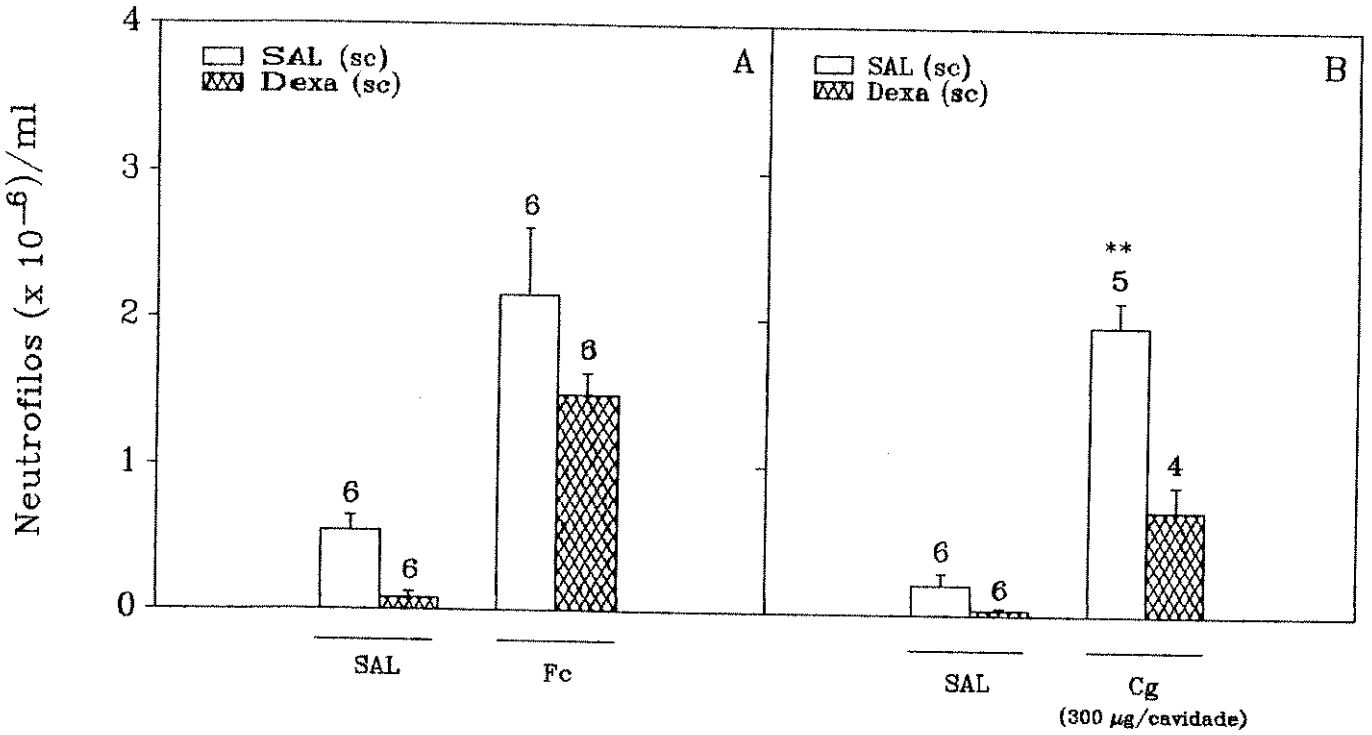

Figura 3 - Sobrenadante de cultura de macrófagos de camundongos estimulados com LPS (Fator de camundongos, Fc) induz migração de neutrófilos. *Painel A*, Migração de neutrófilos para as cavidades peritoneais de camundongos induzida pela administração ip de 0,2 ml do Fator de camundongos (**Fc**, 0,2 ml/animal), correspondente ao material liberado por 4 x 10^6 macrófagos estimulados pelo LPS. *Painel B*, Migração de neutrófilos induzida pela injeção ip de carragenina (**Cg**, 300 µg/0,2 ml/animal). Os animais foram pré-tratados por via subcutânea (sc), 1 h antes dos estímulos ip, com Salina (**Sal**, 0,2 ml/animal) ou com dexametasona (**Dexa**, 0,5 mg/Kg/0,2 ml/animal). Os resultados estão expressos como descrito para a figura 1. Os números sobre as barras indicam a quantidade de animais utilizados em cada grupo experimental. Os asteriscos (**) indicam resultados estatisticamente significativos ao nível de $p \leq 0,001$ no teste t de Student.

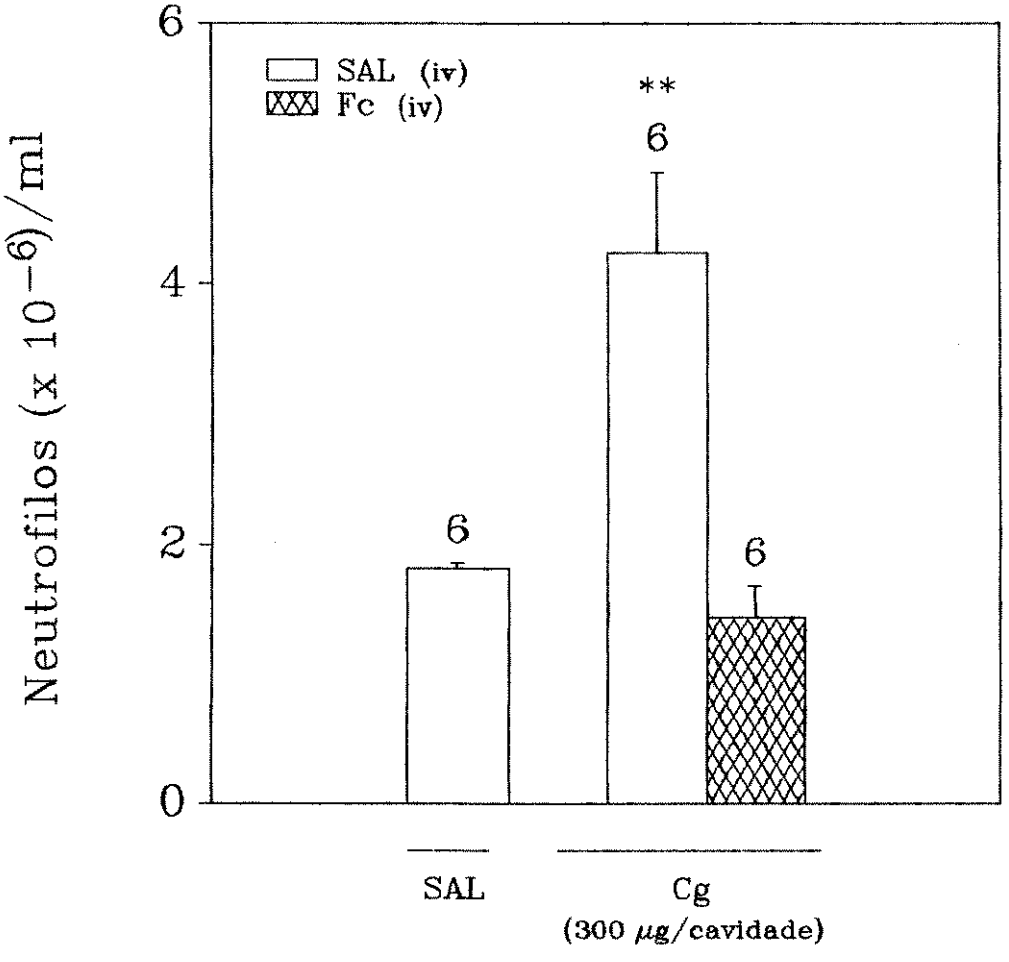

Figura 4 - Fator de camundongos inibe a migração de neutrófilos induzida pela carragenina. As barras indicam a migração de neutrófilos induzida pela injeção de carragenina (**Cg**, 300 μg/0,2 ml/animal) ou de Salina (**Sal**, 0,2 ml/animal). Os animais foram pré-tratados por via iv, 1 hora antes dos estímulos ip, com **Fc** (0,2 ml/animal), correspondente ao material liberado por 4 x 10^6 macrófagos estimulados pelo LPS, ou com Salina (**Sal**, 0,2 ml/animal). Os resultados estão expressos como descrito para a figura 1. Os números sobre as barras indicam a quantidade de animais utilizados em cada grupo experimental. Os asteriscos (**) indicam resultados estatisticamente significativos ao nível de $p \leq 0,001$ no teste t de Student.

02. Os componentes ativos presentes nos Fatores de ratos e camundongos não são espécie-específicos.

A administração intraperitoneal do Fator de ratos em camundongos e a do Fator de camundongos em ratos mostrou que esses fatores não atuam de modo espécie-específico, no que se refere a atividade indutora de migração, uma vez que o Fator de ratos foi capaz de induzir significativa migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de camundongos (Figura 5, Painel A) e vice-versa (Figura 5, Painel B), tratados ou não com dexametasona.

Ao contrário, nos ensaios de inibição da migração, o pré-tratamento com o Fator de ratos reduziu significativamente a migração de neutrófilos induzida em camundongos pela injeção intraperitoneal de carragenina (Figura 6, Painel B) porém, o mesmo não ocorreu quando o Fator de camundongos foi empregado para inibir a migração de neutrófilos em ratos (Figura 6, painel A).

03. Curva temporal da migração de neutrófilos e de células mononucleares induzida pelo Fator de camundongos.

Os experimentos descritos a seguir tiveram como objetivo verificar o perfil de células presentes no lavado peritoneal de animais tratados com o Fator de camundongos, ao longo das primeiras 96 horas após a injeção do estímulo. Para tal, injetou-se o Fator de camundongos em grupos experimentais, que foram sacrificados 2, 5, 10, 24, 48, 72 e 96 horas após o estímulo. Todos os animais foram tratados previamente com dexametasona. Como grupo controle foram utilizados animais que receberam Solução salina 0,15 M, por via intraperitoneal.

A figura 7 mostra que o Fator de camundongos, administrado

intraperitonealmente em animais pré-tratados subcutaneamente com o glicocorticóide, induz migração de neutrófilos, considerada máxima e estatisticamente significativa ($p < 0,001$) em relação aos controles, no intervalo entre 5 e 10 hs, após a injeção do estímulo. Os números de PMN-neutrófilos voltaram ao basal a partir da 24ª hora após administração do estímulo.

Conforme pode-se também observar na Figura 7, o Fator de camundongos foi capaz de induzir a migração de células mononucleares para a cavidade peritoneal de camundongos tratados com dexametasona. A migração desse tipo celular alcançou valores significativos ($p = 0,144$) em relação aos controles na 10ª hora após a injeção do estímulo, e se mantiveram elevados até o final do período de observação (96 hs).

Nos próximos experimentos, quando se desejava verificar migração de neutrófilos, foi definido o tempo de 5 hs após injeção do estímulo inflamatório para a coleta do lavado peritoneal e determinação da migração desse tipo celular.

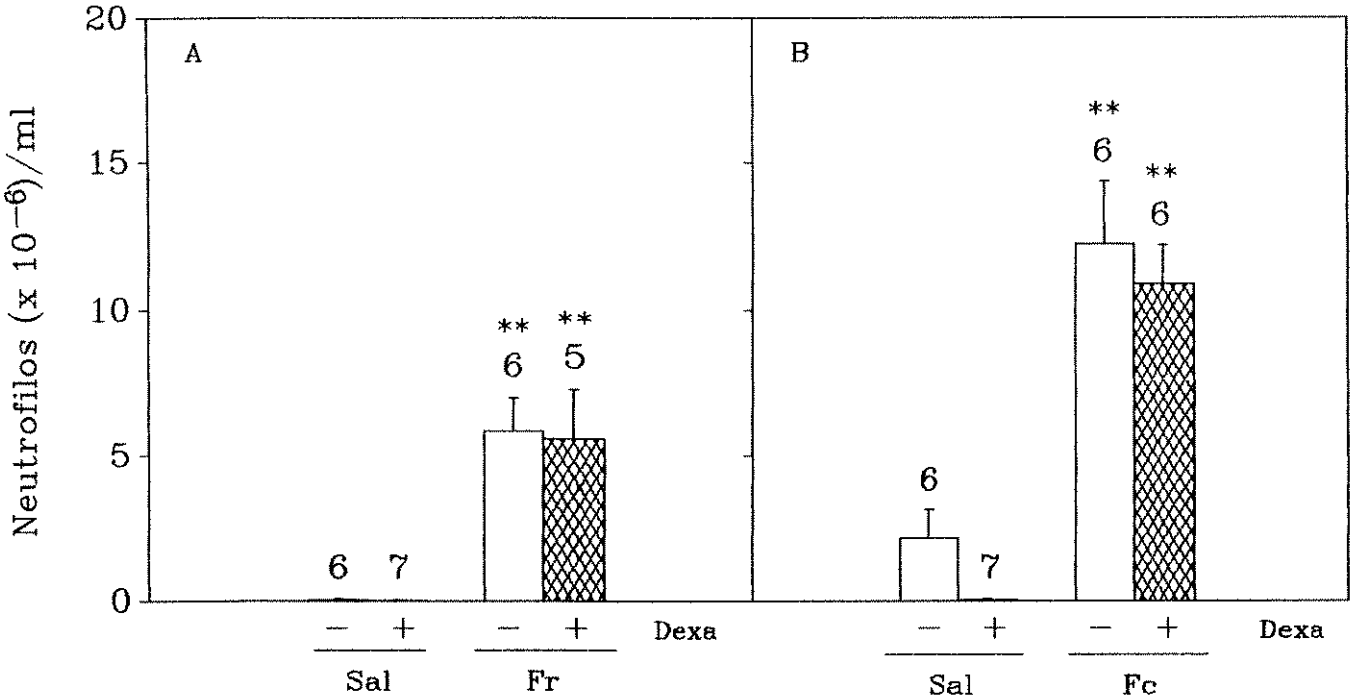

Figura 5 - Fatores de ratos (Fr) e de camundongos (Fc) não atuam de modo espécie-específico na indução de migração de neutrófilos para cavidades peritoneais. *Painel A*, Migração de neutrófilos induzida por injeção ip de Fator de ratos (**Fr**, 0,2 ml/animal), correspondente ao material liberado por 4 x 10^6 macrófagos estimulados pelo LPS, em cavidades peritoneais de camundongos. *Painel B*, Migração de neutrófilos induzida por injeção ip de Fator de camundongos (**Fc**, 3 ml/animal), correspondente ao material liberado por 4 x 10^6 macrófagos estimulados pelo LPS, em cavidades peritoneais de ratos. Os animais foram pré-tratados por via sc com dexametasona (**Dexa**, 0,5 mg/Kg/0,2 ml/animal) ou com salina (0,2 ml/animal), 1 h antes dos estímulos ip. Os resultados estão expressos como descrito para a figura 1. Os números sobre as barras indicam a quantidade de animais utilizados em cada grupo experimental. Os asteriscos (**) indicam resultados estatisticamente significativos ao nível de $p \leq 0,001$ no teste t de Student.

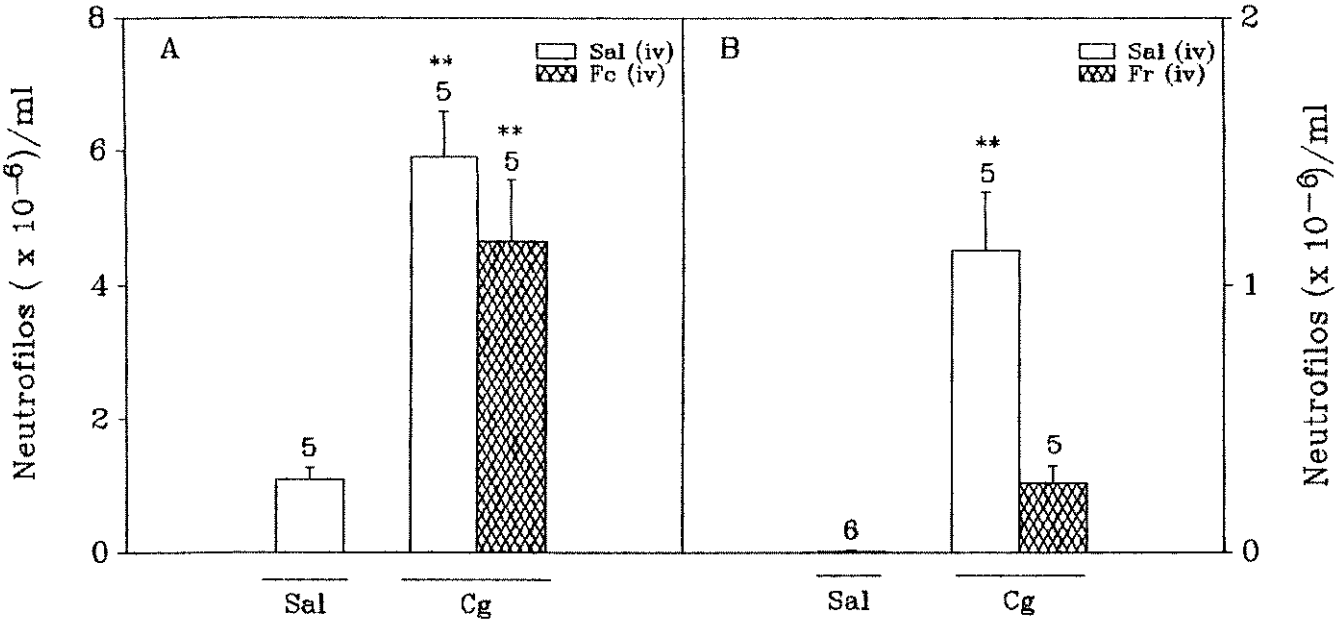

Figura 6 - Efeito da administração endovenosa dos Fatores de ratos (Fr) e de camundongos (Fc) sobre a migração de neutrófilos induzida pela carragenina. *Painel A*, Migração de neutrófilos em ratos pré-tratados por via iv com Fator de camundongos (**Fc**, 0,2 ml/animal), correspondente ao material liberado por 4 x 10^6 macrófagos estimulados pelo LPS. *Painel B*, Migração de neutrófilos em camundongos pré-tratados com Fator de ratos (**Fr**, 0,2 ml/animal), correspondente ao material liberado por 4 x 10^6 macrófagos estimulados pelo LPS. Os animais receberam injeção ip de carragenina (**Cg**, 300 µg/0,2 ml/camundongo ou 500 µg/3 ml/rato), 1 h após o tratamento endovenoso. Os animais controles desse experimento receberam injeções ip de salina (**Sal**, 0,2 ml/animal), 1 h após o tratameno endovenoso. Os resultados estão expressos como descrito para a figura 1. Os números sobre as barras indicam a quantidade de animais utilizados em cada grupo experimental. Os asteriscos (**) indicam resultados estatisticamente significativos ao nível de $p \leq 0,001$ no teste t de Student.

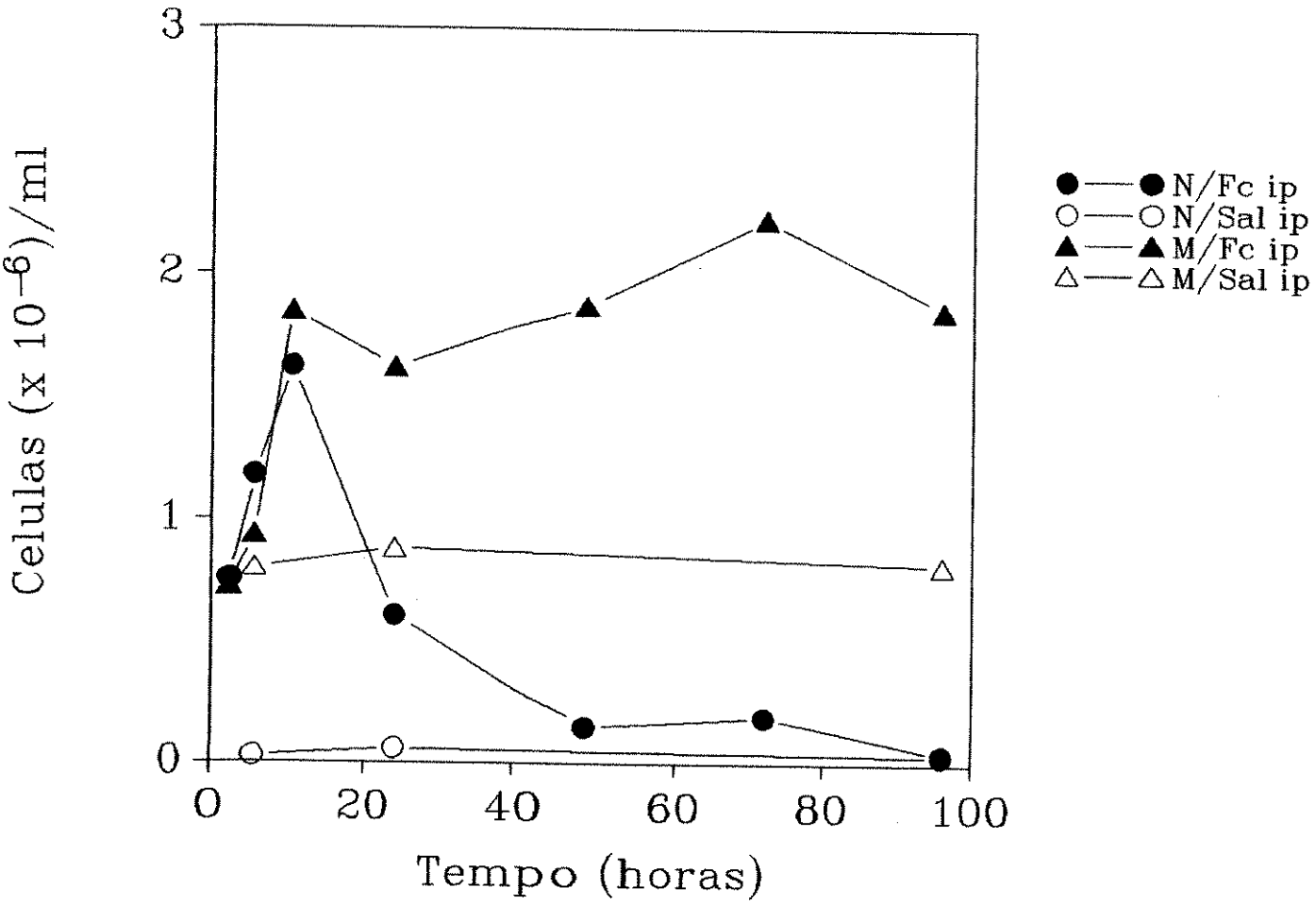

Figura 7 - Influência do tempo sobre a migração de células induzida pela injeção intraperitoneal de Fator de camundongos (Fc) em animais pré-tratados com dexametasona. Os triângulos cheios indicam os números médios de células mononucleares e os círculos cheios indicam os números médios de neutrófilos presentes nas cavidades peritoneais de camundongos injetados com Fc (0,2 ml/animal), correspondente ao material liberado por 4 x 10^6 macrófagos estimulados pelo LPS. Os triângulos vazios e os círculos vazios representam os números médios de células mononucleares e de neutrófilos, respectivamente, presentes nas cavidades peritoneais dos animais dos grupos controles, que foram injetados com salina (0,2 ml/animal). Todos os animais foram pré-tratados por via sc com dexametasona (0,5 mg/Kg/0,2 ml/animal), 1 h antes das injeções ip. Os animais foram sacrificados nos intervalos de tempo indicados na figura, em grupos de seis animais por tratamento. Os resultados foram analisados pelo teste t de Student, encontrando-se diferença estatisticamente significativa, ao nível de $p \leq 0,05$, apenas no número médio de neutrófilos presentes nas cavidades peritoneais dos animais entre 5 e 10 h após a injeção de Fc.

04. Detecção de TNF em sobrenadante de cultura de macrófagos peritoneais de camundongos.

Dados da literatura mostram que citocinas tais como IL-1, IL-6 e IL-8 e o TNF, são capazes de promover a quimiotaxia de PMN-neutrófilos para o foco inflamatório **(BENDTZEN, 1988; DINARELLO, 1987).**

O protocolo utilizado para obtenção dos Fatores de camundongos e ratos no presente trabalho permitia-nos prever a existência de pelo menos duas dessas citocinas nas preparações, isto é IL-1 e TNF. Assim, os experimentos descritos a seguir, tiveram por objetivo verificar se citocinas desse tipo estavam presentes nos Fatores obtidos de ratos e camundongos, para posteriormente verificar qual sua contribuição no recrutramento de neutrófilos para a cavidade peritoneal de camundongos tratados com dexametasona.

A pesquisa de TNF nos Fatores de ratos e de camundongos, realizada através de ensaios de citotoxicidade sobre células WEHI 164 clone 13, como descrito por **ESPEVICK & NISSEN-MAYER (1986),** revelou a presença de quantidades significativas dessa citocina nas preparações. Concentrações crescentes de mrTNFα foram empregadas para a obtenção de curvas padrões, a partir das quais se determinou a concentração de TNF presente nas amostras. Como pode-se observar na Tabela I, as diferentes partidas de Fator de camundongos e de ratos apresentaram quantidades de TNF que variaram entre 1,12 a 14,70 ng/ml, e 60,0 a 5.309,0 ng/ml, respectivamente.

ANIMAIS	PARTIDAS DE SOBRENADANTES DE MACRÓFAGOS	TNF (ng/ml)
RATOS	1	2.170,00
	2	5.309,00
	3	60,00
	4	74,00
	5	356,50
	6	ND*
CAMUNDONGOS	1	ND*
	2	3,20
	3	ND*
	4	6,36
	5	1,12
	6	ND*
	7	1,12
	8	14,70

Tabela 1- Detecção de TNF em sobrenadantes de cultura de macrófagos de ratos e de camundongos estimulados com LPS. A determinação das concentrações de TNF nas amostras de sobrenadantes de macrófagos foi realizada através de ensaios de citotoxicidade em células WEHI 164 clone 13, segundo **ESPEVICK & NISSEN-MEYER (1986)**, e deduzidas das curvas-padrões elaboradas a partir dos resultados obtidos com concentrações conhecidas de mrTNFα, utilizadas em cada ensaio. Os resultados representam a média de pelo menos três determinações, que foram realizadas em quadruplicata para cada diluição da amostra-teste.

* ND= não determinado

05. Influência do TNFα contido no Fator de camundongos sobre a migração de neutrófilos.

A influência do TNF na migração de neutrófilos, induzida pela administração do Fator de camundongos, foi investigada em ensaios de neutralização da citocina presente no Fator, através do uso de anticorpos anti-TNFα, contidos na fração IgG obtida de soro imune de coelhos (IgG a-TNFα). Conforme pode ser observado na Figura 8 (Painel A), o tratamento com a IgG a-TNFα não bloqueou significativamente a migração de neutrófilos induzida pelo Fator de camundongos, em animais naive. Ao contrário, a pré-incubação do Fator de camundongos com a IgG a-TNFα aboliu completamente a migração de neutrófilos (p= 0,002) induzida pelo Fator, em animais pré-tratados com a dexametasona (Figura 8, Painel B).

Esses resultados parecem indicar que várias citocinas com atividade indutora de migração de neutrófilos devem estar presentes nos sobrenadantes de culturas de macrófagos, estimulados *in vitro* com LPS. Porém, a migração de neutrófilos induzida pelo Fator de camundongos, em animais tratados com dexametasona, pode ser atribuída ao TNFα presente nessas preparações, uma vez que anticorpos específicos contra essa citocina bloquearam completamente a migração nesses animais.

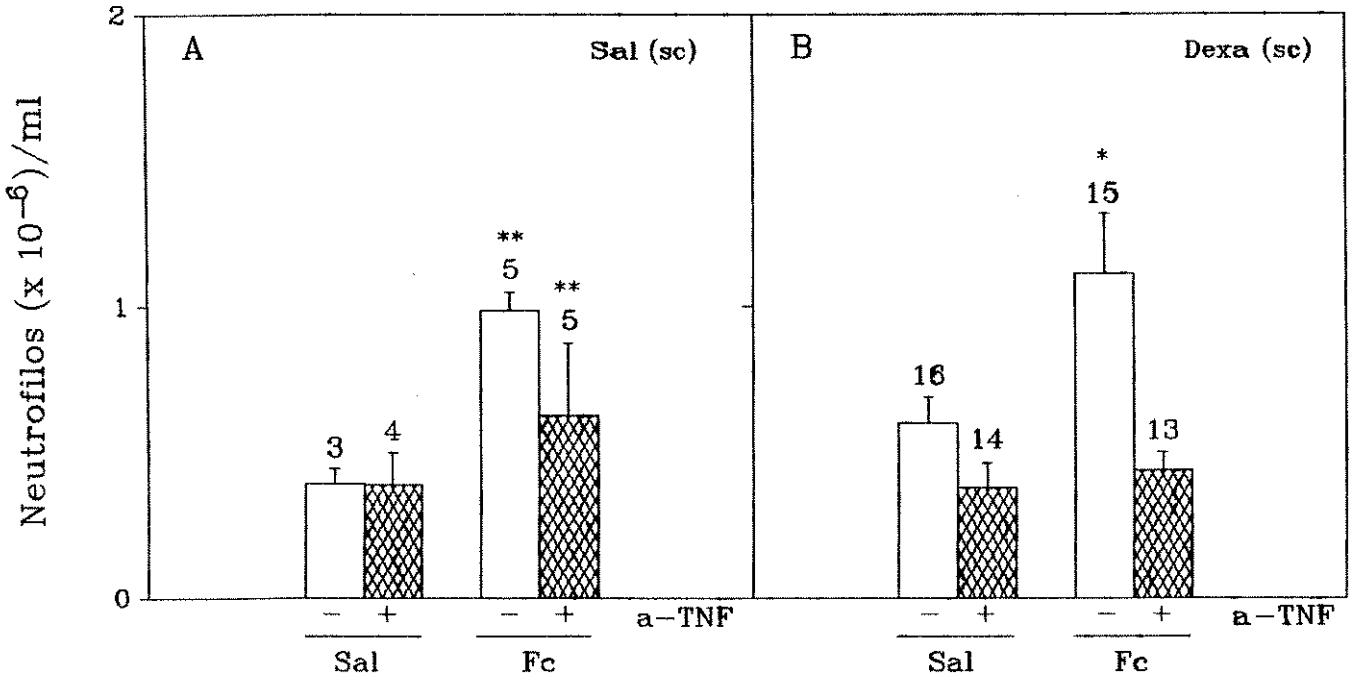

Figura 8 - Anticorpos anti-TNFα murino bloqueiam a migração de neutrófilos induzida pelo Fator de camundongos (Fc) em animais tratados com dexametasona. As barras representam a migração de neutrófilos induzida pela administração ip de Fc pré-incubado com anticorpos anti-TNFα (**a-TNF**; 0,2 ml de Fc em salina contendo 200 μg de IgG anti-TNFα/animal), ou com salina fisiológica (0,2 ml de Fc em salina/animal). Os animais dos grupos controles receberam injeções ip de salina fisiológica contendo anticorpo anti-TNFα (**a-TNF**; 0,2 ml de salina contendo 200 μg de IgG anti-TNFα/animal)ou de salina (0,2 ml/animal). Os camundongos foram pré-tratados por via subcutânea com salina fisiológica (**Sal**; 0,2 ml/animal, *Painel A*) ou com dexametasona (**Dexa**; 0,5 mg/Kg/0,2 ml/animal, *Painel B*), 1 h antes dos estímulos ip. Os resultados estão expressos como descrito para a figura 1. Os números sobre as barras indicam a quantidade de animais utilizados em cada grupo experimental. Os asteriscos indicam resultados estatisticamente significativos ao nível de $p \leq 0,05$ (*) ou $p \leq 0,001$ (**) no teste t de Student.

06. Efeito do TNFα recombinante murino sobre a migração de neutrófilos.

Na Figura 9 pode-se observar que a administração intraperitoneal de mrTNFα (0,1 μg/animal) foi capaz de induzir significativa migração de neutrófilos tanto para cavidades de camundongos "naive" como daqueles tratados com a dexametasona, não havendo diferença significativa entre ambos (p= 0,234).

A Figura 10 (Painel A) mostra que a administração de doses crescentes (0; 0,1; 1,0 e 10,0 μg/cavidade) de mrTNFα induziu, de modo dose-dependente, a migração de neutrófilos para cavidades peritoneais de camundongos, pré-tratados subcutaneamente com dexametasona. Nos experimentos subsequentes foi sempre utilizada a dose de 0,1 μg por cavidade, para induzir migração de neutrófilos em animais pré-tratados com dexametasona.

O painel B da Figura 10 mostra que a migração de neutrófilos para as cavidades peritoneais de camundongos, pré-tratados com dexametasona, induzida por mrTNFα, foi completamente abolida pela pré-incubação da proteína recombinante com a IgG a-TNFα (p= 0,001).

Esses resultados reforçam a hipótese de que seja o TNFα, presente no Fator de camundongos, a citocina responsável por suplantar o efeito anti-inflamatório da dexametasona em murinos.

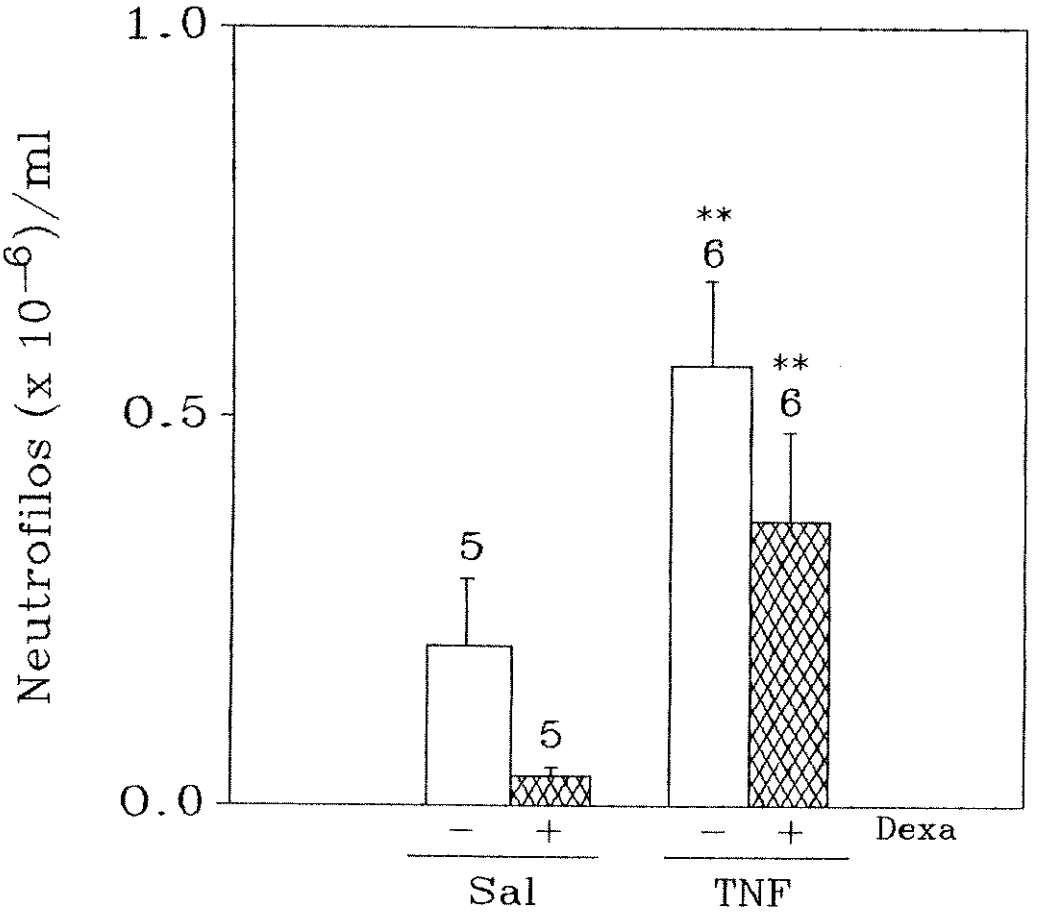

Figura 9- TNFα murino recombinante (mrTNFα) induz migração de neutrófilos para cavidades peritoneais de camundongos tratados ou não com glicocorticóide. As barras representam a migração de neutrófilos para as cavidades peritoneais de camundongos injetados por via ip com mrTNFα (**TNF**; 0,1 μg/0,2 ml/animal) ou com salina fisiológica (**Sal**; 0,2 ml/animal). Os animais foram pré-tratados por via sc com dexametasona (**Dexa**; 0,5 mg/Kg/0,2 ml/animal) ou com salina (0,2 ml/animal), 1 h antes das injeções ip. Os resultados estão expressos como descrito para a figura 1. Os números sobre as barras indicam a quantidade de animais utilizados em cada grupo experimental. Os asteriscos indicam resultados estatisticamente significativos ao nível de $p \leq 0,001$ (**) no teste t de Student. Não foi observada diferença significativa entre a migração induzida pelo mrTNFαem animais tratados ou não com a dexametasona.

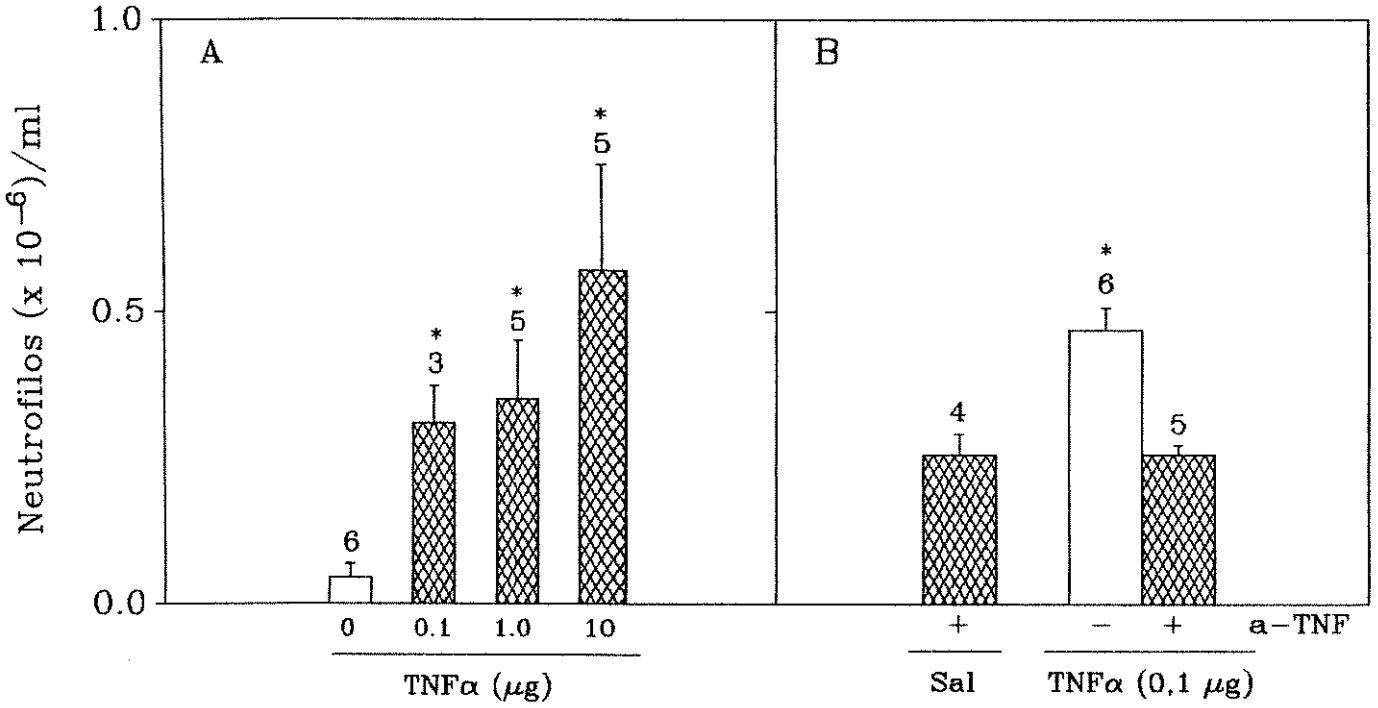

Figura 10 - Migração de neutrófilos induzida pelo mrTNFα em camundongos pré-tratados com dexametasona é dose-dependente e bloqueável com anticorpos específicos. *Painel A*, Migração de neutrófilos para as cavidades peritoneais de camundongos, induzidas por injeções de doses crescentes de mrTNFα (**TNFα**; 0; 0,1; 1,0; 10,0 μg em 0,2 ml de salina/cavidade). *Painel B*, Migração de neutrófilos induzida pela injeção ip de mrTNFα (**TNFα**; 0,1 μg de mrTNFα em 0,2 ml de salina/cavidade) ou de mrTNFα pré-incubado com anticorpo específico (**a-TNF**; 0,1 μg de mrTNFα em 0,2 ml de salina contendo 200 μg de IgG anti-TNFα/cavidade). Os grupos controles desse experimento receberam salina pré-incubada com anticorpo (**Sal**; 200 μg de IgG anti-TNFα em 0,2 ml de salina/cavidade). Todos os animais foram pré-tratados por via sc com dexametasona (0,5 mg/Kg/0,2 ml/animal), 1 h antes das injeções ip. Os resultados estão expressos como descrito para a figura 1. Os números sobre as barras indicam a quantidade de animais utilizados em cada grupo experimental. Os asteriscos indicam resultados estatisticamente significativos ao nível de $p \leq 0,05$ (*) no teste t de Student.

07. Curva temporal da migração de neutrófilos e de células mononucleares induzida pelo mrTNFα.

A Figura 11 mostra que injeções intraperitoneais de 0,1 μg de mrTNFα em camundongos pré-tratados subcutaneamente com a dexametasona foi capaz de induzir uma migração de neutrófilos tempo-dependente e considerada máxima e estatisticamente significativa, em relação aos controles, entre 5 e 10 horas após as injeções da citocina. Porém, não foram encontradas diferenças significativas entre os números médios de células mononucleares, ao longo de todo o período de observação (até 48 horas após o estímulo).

08. Efeito de anticorpos anti-TNFα sobre a migração de neutrófilos induzida pelo LPS.

Uma vez que os soros imunes anti-TNFα obtidos em coelhos foram preparados através da imunização dos animais com a citocina recombinante, e desta forma poderiam conter também anticorpos contra a endotoxina, experimentos foram realizados no sentido de verificar se a IgG purificada a partir desses soros seria capaz de reduzir o efeito inflamatório do LPS.

A pré-incubação do LPS com o anticorpo anti-TNF não foi capaz de reduzir sua capacidade de induzir a migração de neutrófilos para cavidades peritoneais de camundongos (dados não mostrados).

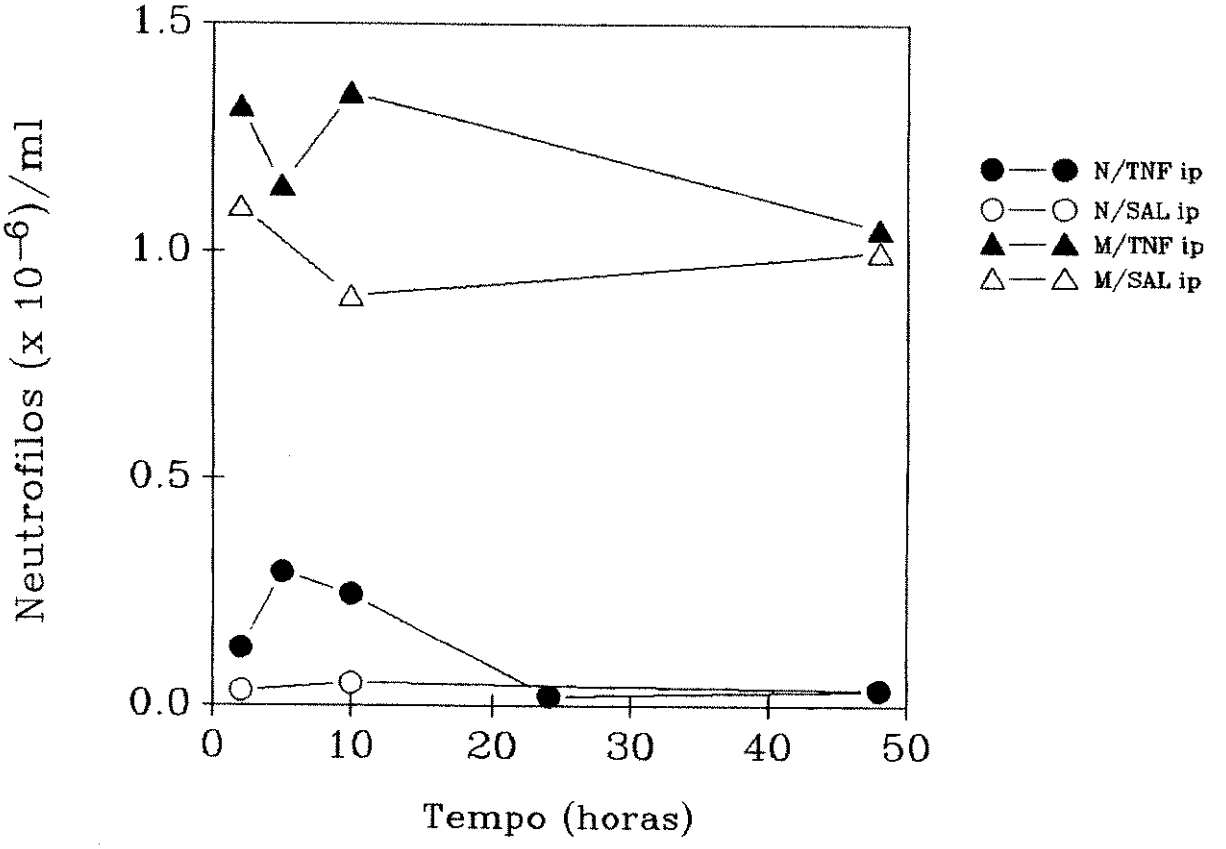

Figura 11 - Influência do tempo na migração celular induzida pelo mrTNFα em camundongos pré-tratados com dexametasona. Os triângulos cheios indicam os números médios de células mononucleares e os círculos cheios indicam os números médios de neutrófilos presentes nas cavidades peritoneais de camundongos injetados com mrTNFα (0,1 μg em 0,2 ml de salina/animal). Os triângulos vazios e os círculos vazios representam, respectivamente, os números médios de células mononucleares e de neutrófilos presentes nas cavidades peritoneais dos animais dos grupos controles, que foram injetados com salina (0,2 ml/animal). Todos os animais foram pré-tratados por via sc com dexametasona (0,5 mg/Kg/0,2 ml/animal), 1 h antes das injeções ip. Os animais foram sacrificados nos intervalos de tempo indicados na figura, em grupos de seis animais por tratamento. Os resultados foram analisados pelo teste t de Student, encontrando-se diferença estatisticamente significativa, ao nível de $p \leq 0,05$, apenas no número médio de neutrófilos presentes nas cavidades peritoneais dos animais entre 5 e 10 h após a injeção de mrTNFα.

09. Efeito do pré-aquecimento do LPS e mrTNFα sobre a migração de neutrófilos.

Sabe-se que proteínas recombinantes podem conter diferentes quantidades de LPS, como contaminantes. Por esta razão, os experimentos descritos a seguir tiveram por objetivo avaliar a participação da endotoxina na migração de neutrófilos, induzida pelo mrTNFα em uso.

Para tal, uma preparação da mrTNFα, contendo 0,5 μg/ml de proteína, e outra de LPS, contendo 0,5 μg/ml da endotoxina, foram aquecidas a 100^0 C por 30 minutos e a seguir injetadas intraperitonealmente em dois grupos de animais naive (0,2 ml/animal). Preparações semelhantes de LPS e de TNF, não aquecidos, foram respectivamente injetadas em outros dois grupos experimentais. Como controle desses experimentos foram utilizados animais que receberam solução salina 0,15 M, por via intraperitoneal (0,2 ml/animal).

Como pode-se observar na Figura 12, o pré-aquecimento do LPS não reduziu a capacidade da endotoxina de induzir a migração de neutrófilos para cavidades peritoneais de camundongos (p= 0,016). Ao contrário, e provavelmente pelo seu efeito desagregador, o aquecimento do LPS favoreceu a sua atividade inflamatória. Por outro lado, o pré-aquecimento do mrTNFα aboliu completamente sua capacidade de recrutar neutrófilos para o local da injeção do estímulo (p= 0,024).

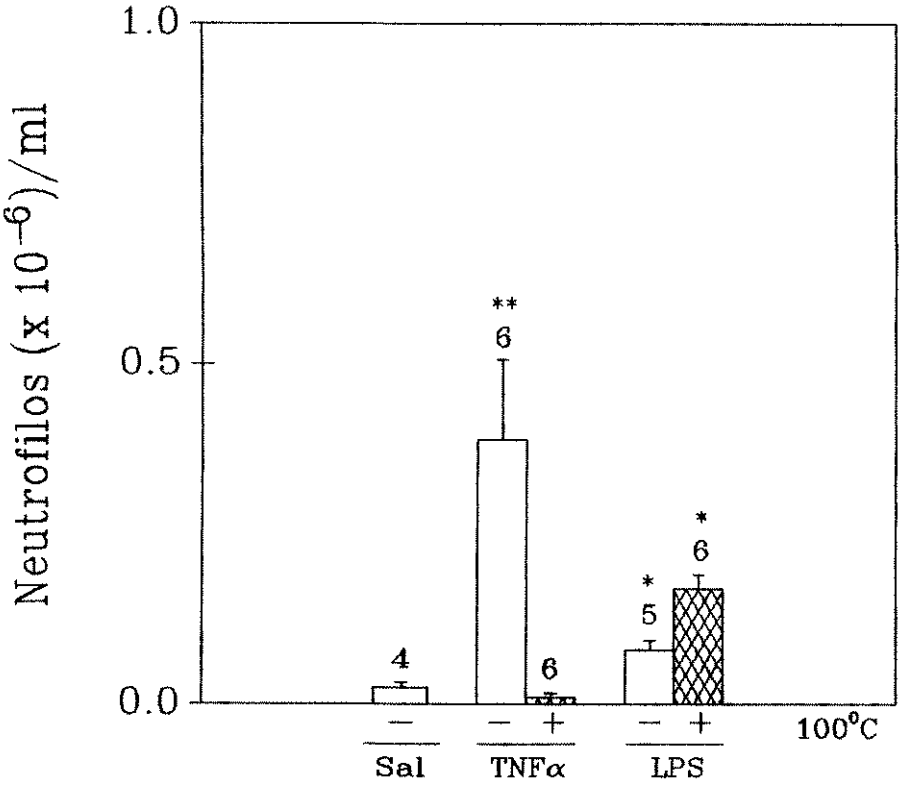

Figura 12 - Efeito do pré-aquecimento do LPS e do mrTNFα sobre a migração de neutrófilos em camundongos. As barras representam a migração de neutrófilos para cavidades peritoneais de camundongos induzida pela injeção de LPS (**LPS**;200 ng em 0,2 ml de salina/cavidade) ou de mrTNFα (**TNFα**;100 ng em 0,2 ml de salina/cavidade), pré-aquecidos ou não a 100°C. Os animais do grupo controle foram injetados por via ip com salina fisiológica (**Sal;** 0,2 ml/cavidade). Os resultados estão expressos como descrito para a figura 1. Os números sobre as barras indicam a quantidade de animais utilizados em cada grupo experimental. Os asteriscos indicam resultados estatisticamente significativos ao nível de $p \leq 0,05$ (*) e $p \leq 0,001$ (**) no teste t de Student.

10. Efeito do pré-tratamento de camundongos com anticorpo anti-TNF sobre a migração de neutrófilos induzida pelo LPS.

A figura 13 mostra que o pré-tratamento de camundongos com o anticorpo monoclonal XT22.11 anti-TNFα bloqueou completamente a migração de neutrófilos para as cavidades peritoneais desses animais, induzida pelo LPS.

O conjunto dos resultados obtidos no presente trabalho indicam que, tanto *"in vitro"* quanto *"in vivo"*, macrófagos peritoneais de camundongos estimulados com LPS liberam fator(s) quimiotático(s) para neutrófilos de animais tratados com dexametasona, e que esse fator é o TNFα

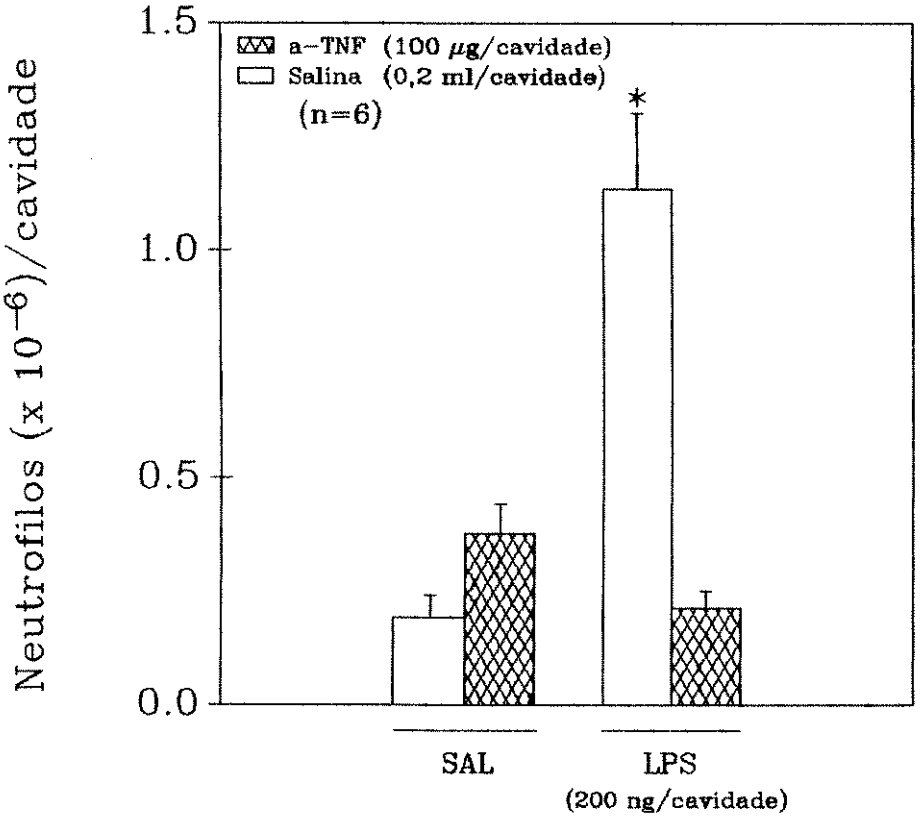

Figura 13 - Pré-tratamento de camundongos com anticorpo anti-TNF abole a migração de neutrófilos induzida pelo LPS. Grupos de camundongos foram pré-tratados através de injeção intraperitoneal com anticorpo monoclonal XT22.11 anti-TNFα (**a-TNF**; 100 μg/0,2ml/cavidade) ou com salina fisiológica (**Sal**; 0,2 ml/cavidade). Uma hora após as injeções ip, os animais receberam LPS ip como estímulo inflamatório (**LPS**; 200 ng/0,2 ml/cavidade). Os animais dos grupos controles receberam injeção intraperitoneal de salina fisiológica (0,2 ml/cavidade). As barras indicam a migração de neutrófilos induzidas pelos diferentes tratamentos. Os resultados estão expressos como descrito para a figura 1. Os asteriscos indicam resultados estatisticamente significativos ao nível de $p \leq 0,001$(**) no teste t de Student.

DISCUSSÃO

VI - DISCUSSÃO

A dexametasona tem sido clinicamente indicada em muitos processos inflamatórios como o glicocorticóide de escolha (**FORSYTH & TALBOT, 1992**) devido a sua ação antiinflamatória ampla, abrangendo o bloqueio de vários fenômenos que ocorrem durante a inflamação, tais como a formação de edema (**DINARELLO, 1987**), a migração de células para o foco inflamatório (**CUNHA & FERREIRA, 1986**) e a liberação de citocinas inflamatórias (**MUKAIDA *et alli*, 1992; LEW *et alli*, 1988; MUKAIDA *et alli*, 1991**).

O efeito inibidor da migração de neutrófilos exibido pela dexametasona tem sido observado quando se utiliza diferentes estímulos inflamatórios. Assim, foi demonstrado que a dexametasona é capaz de bloquear a migração de neutrófilos para cavidades peritoneais de ratos, induzida por LPS e carragenina (**CUNHA, 1989**).

Dados da literatura mostram que várias citocinas são capazes de induzir o recrutamento de neutrófilos para o sítio inflamatório, e entre elas destacam-se a IL-1 (**DINARELLO, 1987; BENDTZEN, 1988**), a IL-6 e o TNFα (**BENDTZEN, 1988**) e a IL-8 (**CASSATELLA *et alli*, 1992**). Porém, citocinas tais como o IFNγ, a IL-1, o TNFα e a IL-8 tiveram a sua atividade indutora de migração celular *"in vivo"* bloqueada pelo pré-tratamento dos animais com a dexametasona (**RIBEIRO *et alli*, 1990; FACCIOLI *et alli*, 1990; RIBEIRO *et alli*, 1991**)

Por outro lado, foi demonstrado que macrófagos peritoneais de ratos elicitados com tioglicolato e estimulados *"in vitro"* com LPS liberam no sobrenadante um fator capaz de induzir a migração de neutrófilos para cavidades peritoneais de animais tratados com dexametasona, denominado Fator quimiotático para neutrófilos derivado de macrófagos (MNCF) (**CUNHA & FERREIRA,**

1986). Evidências mais recentes indicam que o MNCF é uma proteína de 54 KDa, ligante de D-galactose, que induz migração de neutrófilos através de mecanismo direto, envolvendo a participação do sítio de ligação ao açúcar (**DIAS-BARUFFI *et alli*, 1993**).

Um dos objetivos do presente trabalho era verificar se macrófagos peritoneais de camundongos, estimulados com LPS, também eram capazes de liberar no sobrenadante de cultura uma atividade MNCF-símile, isto é um fator capaz de atuar em animais tratados com dexametasona. Assim, utilizando-se o mesmo protocolo descrito por **CUNHA & FERREIRA (1986)** para obtenção do MNCF, verificou-se que sobrenadantes derivados do cultivo de macrófagos peritoneais de camundongos, estimulados "*in vitro*" com LPS, foram capazes de induzir a migração de neutrófilos para cavidades peritoneais de camundongos naive ou pré-tratados com a dexametasona. Esses resultados sugeriam que macrófagos peritoneais de camundongos eram capazes de liberar, sob estímulo com o LPS, um fator semelhante ao MNCF de ratos.

Verificou-se ainda que a migração de neutrófilos induzida pelos fatores de rato e de camundongo, em animais pré-tratados com dexametasona, não ocorre de modo espécie-específico, isto é, o fator liberado por macrófagos de rato foi ativo em camundongos e vice-versa.

A cinética de migração celular em animais tratados com o fator de camundongos foi similar à que já havia sido observada anteriormente para o MNCF (**CUNHA, 1989**), ou seja, a migração de neutrófilos foi máxima ao redor de 10 h após a injeção intraperitoneal do estímulo. A migração máxima de células mononucleares ocorreu ao redor de 24 h, atingindo um platô até as 72h após a injeção de sobrenadante.

Por outro lado, foi verificado anteriormente que o sobrenadante de macrófagos de ratos, contendo o MNCF, quando

administrado endovenosamente em ratos naive, era capaz de bloquear a migração de neutrófilos induzida por diversos estímulos inflamatórios (**TAVARES *et alli*, 1989; TAMASHIRO *et alli*, 1992**). A atividade inibidora da migração de neutrófilos contida nos sobrenadantes de cultura de macrófagos foi inicialmente atribuída à presença de uma nova citocina nesses sobrenadantes, denominada Fator inibidor do recrutamento de neutrófilos (NRIF) (**TAMASHIRO *et alli*, 1992**). O NRIF ainda não está bem caracterizado, porém é provável que ambas as atividades, NRIF e MNCF, possam ser devidas a um único fator (**TAVARES-MURTA *et alli*, 1993**).

No presente trabalho, observou-se que o sobrenadante de cultura de macrófagos de camundongos, estimulados *"in vitro"* com LPS, quando administrado endovenosamente em camundongos, também foi capaz de bloquear a migração de neutrófilos induzida por injeção intraperitoneal de carragenina (figura 4) ou de LPS (dados não mostrados). Porém, ao contrário do que ocorreu para a indução de migração, o fator de camundongos não foi eficiente em bloquear o recrutamento de neutrófilos em ratos estimulados com carragenina.

Dados da literatura mostram que várias citocinas com atividade pró-inflamatória tais como IL-6, IL-8 e TNF (**CYBULSKY *et alli*, 1988; CANNON *et alli*, 1990; VAN ZEE *et alli*, 1991**) podem apresentar, sob certas circunstâncias, atividades antiinflamatórias, tais como inibição da adesão de neutrófilos a células endoteliais ativadas (**GIMBRONE *et alli*, 1989**) e inibição da migração de neutrófilos *"in vivo"* para o foco inflamatório (**OTSUKA *et alli*, 1990; HECHTMAN *et alli*, 1991; ULICH *et alli*, 1991**). Além disso, **CUNHA & TAMASHIRO (1992)** mostraram que a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de ratos, induzida pela carragenina, podia ser inibida pelo pré-tratamento dos animais com TNFα e/ou IL-8

recombinantes.

Assim, os resultados obtidos no presente trabalho sugeriam que no sobrenadante de cultura de macrófagos de camundongos poderiam estar presentes citocinas com as características acima descritas, isto é capazes de induzir ou de bloquear a migração celular, a depender das condições em que fossem apresentadas ao hospedeiro.

Com o objetivo de verificar que citocinas estariam envolvidas na indução da migração celular, foram realizados experimentos nos quais o fator de macrófagos de camundongos foi pré-incubado com anticorpos anti-TNFα, policlonal (IgG de coelho anti-rmTNFα) ou monoclonal (XT22.11, uma IgG de rato anti-TNFα) e, a seguir injetado intraperitonealmente em camundongos. Esse procedimento foi suficiente para abolir 100% da atividade indutora de migração contida em tais sobrenadantes, quando os animais haviam sido tratados previamente com a dexametasona. Em animais não tratados com dexametasona, a migração de neutrófilos induzida pelo fator de camundongos foi apenas parcialmente bloqueada pela sua pré-incubação com anticorpos anti-TNF. O conjunto desses resultados sugeriam que no sobrenadante de cultura de macrófagos de camundongos, estimulados "*in vitro*" com LPS, são liberadas diferentes citocinas capazes de induzir a migração de neutrófilos para o peritônio de camundongos porém, só o TNFα parece ser ativo em animais tratados com dexametasona.

Com o objetivo de verificar se o TNFα seria capaz de induzir migração de neutrófilos em camundongos, foram realizados experimentos nos quais empregou-se o TNFα murino recombinante (mrTNFα) como estímulo inflamatório. Os resultados obtidos mostraram que esta citocina foi capaz de induzir o recrutamento de neutrófilos para as cavidades peritoneais de camundongos pré-tratados ou não com a dexametasona, de modo

dose-dependente e com cinética semelhante à observada com os sobrenadantes de macrófagos murinos.

Uma vez que preparações de proteínas recombinantes podem conter quantidades variáveis de LPS como contaminante, foram realizados experimentos para verificar se o efeito observado com o uso do mrTNFα poderia ser atribuído à presença de endotoxina na preparação. Para isso, animais foram injetados com LPS ou mrTNFα, aquecidos ou não a 100°C, por 30 min. Esse tratamento geralmente resulta na destruição completa da atividade de proteínas termo-sensíveis, mas não afeta lipopolissacárides. Os resultados obtidos aqui mostraram que o aquecimento foi capaz de abolir completamente a migração de neutrófilos induzida pela proteína recombinante e, ao contrário favoreceu significativamente o recrutamento de neutrófilos induzido pelo LPS.

Esses resultados no entanto, não descartam a possibilidade de que quantidades extremamente baixas de endotoxina possam estar presentes na preparação de TNFα, atuando sinergisticamente com a proteína recombinante no recrutamento de neutrófilos. Todavia, quando animais pré-tratados com dexametasona foram estimulados intraperitonealmente com LPS, mesmo com doses tão altas quanto 500 ng por cavidade, não se observou migração significativa de neutrófilos para o peritônio desses animais (dados não mostrados).

Os neutrófilos representam a principal defesa contra vários patógenos. Desta forma, a migração eficiente dessas células, da circulação para o foco inflamatório, bem como a sua função apropriada são de fundamental importância na resolução de processos infecciosos (**LEHRER *et alli*, 1988**). A migração de neutrófilos para os sítios envolvidos requer a interação com estímulos solúveis, os quais são primariamente liberados por macrófagos ativados (**LINDLEY *et alli*, 1988**).

As endotoxinas e lipopolissacárides derivados de bactérias Gram-negativas são potentes estimuladores de macrófagos (**RAETZ, 1990**). **ANDERSSON *et alli* (1992)** mostraram que monócitos humanos, isolados do sangue periférico, estimulados com baixas doses de LPS acumulam TNFα, IL-8, IL-6, o antagonista do receptor de IL-1 (IL-1ra) e IL-10, ao nível do complexo de Golgi, bem como acumula IL-1 associado aos microtúbulos. Alguns autores têm mostrado que monócitos humanos rapidamente ligam LPS e que poucos minutos de exposição à endotoxina são suficientes para alcançar a ativação máxima necessária à liberação de TNF (**GALLAY *et alli*, 1993**).

Os resultados apresentados no presente trabalho mostraram que macrófagos peritoneais de camundongos estimulados *"in vitro"* por curta exposição ao LPS (30 min), liberam no sobrenadante de cultura, após a remoção do estímulo, quantidades detectáveis de TNF. Mostraram ainda, que tais sobrenadantes foram capazes de induzir a migração de neutrófilos para cavidades peritoneais de camundongos, fossem eles naive ou tratados com dexametasona.

Assim, com o objetivo de verificar se o LPS era também capaz de atuar *"in vivo"*, liberando TNFα na cavidade peritoneal de camundongos, realizou-se um experimento no qual grupos de animais foram pré-tratados ou não com anticorpo monoclonal anti-TNFα e a seguir, injetados endovenosamente com LPS. Nos animais não tratados com o anticorpo e injetados com LPS foi observada uma migração significativa de neutrófilos para a cavidade peritoneal, cinco horas após a injeção do estímulo. Ao contrário, no grupo que recebeu o anticorpo anti-TNF, previamente ao estímulo com LPS, a migração de neutrófilos não foi estatisticamente diferente dos grupos controles, isto é animais que receberam salina intraperitonealmente. Esses resultados mostram que o LPS atua, em camundongos de forma a

promover a liberação de TNF, provavelmente por macrófagos residentes, e que a citocina liberada é a responsável pela migração de neutófilos induzida pelo LPS.

É bem conhecido que glicocorticóides inibem a síntese de TNF e pensa-se que isto se correlacione com o efeito protetor dos glicocorticóides no choque endotóxico (**BRINCKERHOFF *et alli*, 1986; BERRY & SMITHE, 1964; BERTINE & BIANCHI, 1988**). Contudo, alguns estudos clínicos mostraram que os glicocorticóides podem não ser efetivos em tais situações (**BONE *et alli*, 1987**). Estudos *"in vitro"* têm mostrado que altas doses de LPS e Interferon-gama suplantam o efeito inibitório do glicocorticóide na estimulação de monócitos humanos para a liberação de ânions superóxido (**SZEFLER *et alli*, 1989**).

Assim, os resultados obtidos no presente estudo também são indicativos de que, a despeito da dexametasona poder inibir a migração induzida por diversas citocinas, ela não é capaz de ter o mesmo efeito sobre o TNF previamente liberado no sítio inflamatório.

CONCLUSÕES

V - CONCLUSÕES

1- Macrófagos peritoneais de camundongos, elicitados com tioglicolato e estimulados *"in vitro"* com LPS, liberaram nos sobrenadantes de cultura, fator(es) capaz(es) de induzir a migração de células inflamatórias (neutrófilos e mononucleares) em camundongos.

2- Esses sobrenadantes, quando injetados endovenosamente em camundongos, foram também capazes de inibir a migração de neutrófilos induzida por diferentes estímulos inflamatórios.

3- O fator indutor da migração de neutrófilos presente em sobrenadantes de macrófagos de camundongos, estimulados *"in vitro"* pelo LPS, não se mostrou espécie-específico, uma vez que foi também ativo em ratos.

4- O(s) fator(es) indutor(es) de migração celular obtido de macrófagos peritoneais de camundongos foi ativo em animais pré-tratados com dexametasona .

5- A migração de neutrófilos induzida pelos sobrenadantes de cultura de macrófagos, estimulados pelo LPS, foi atribuída à presença de TNF, uma vez que anticorpos anti-TNFα recombinante murino foram capazes de bloquear essa atividade nos animais tratados com dexametasona.

6- Quantidades significativas de TNF foram detectadas nos sobrenadantes de cultura de macrófagos de camundongos e ratos, estimulados *"in vitro"* por LPS.

7- Uma preparação de TNFα recombinante murino foi capaz de

induzir, de modo dose-dependente, a migração de neutrófilos para cavidades peritoneais de camundongos. A pré-incubação da proteína recombinante com anticorpos anti-mrTNFα bloqueou a migração de neutrófilos induzida pela citocina, em camundongos tratados ou não com dexametasona.

8- O aquecimento a 100°C aboliu completamente a atividade da proteína recombinante, descartando a participação do LPS, eventual contaminante da preparação, na indução de migração celular.

O conjunto desses resultados sugerem portanto que:

1- O TNFα liberado por macrófagos (obtidos de ratos ou camundongos) através da estimulação com o LPS, quando administrado em camundongos, é capaz de suplantar o efeito antiinflamatório da dexametasona.

2- Provavelmente, outras citocinas são liberadas de macrófagos estimulados com LPS, através do protocolo aqui utilizado, que induzem migração de células inflamatórias em camundongos. Entretanto, o TNFα parece ser a citocina responsável por essa atividade quando os sobrenadantes de macrófagos são empregados em animais tratados com dexametasona.

RESUMO

VI- RESUMO

Foi demonstrado anteriormente que macrófagos peritoneais de ratos, elicitados pelo tioglicolato e estimulados *"in vitro"* com lipopolissacarídeo (LPS) de *E. coli*, liberavam no sobrenadante de cultura fator indutor (MNCF) e inibidor (NRIF) da migração de neutrófilos para o foco inflamatório (**CUNHA & FERREIRA, 1986**; **TAVARES *et alli*, 1989, TAMASHIRO *et alli*, 1992**). O MNCF foi recentemente caracterizado como uma proteína de 54 KDa, cuja atividade se faz através de um sítio ligante à D-galactose (**DIAS-BARUFFI *et alli*, 1993**). Ao contrário de outras citocinas, o MNCF induz migração de neutrófilos em ratos pré-tratados com glicocorticóides. Resultados preliminares apontam que o NRIF e o MNCF são na verdade o mesmo fator (**TAVARES-MURTA *et alli*, 1993**).

No presente trabalho, procuramos investigar a produção de fatores similares ao MNCF/NRIF por macrófagos peritoneais de camundongos, estimulados *"in vitro"* com LPS, através de protocolo semelhante ao descrito por **CUNHA & FERREIRA (1986)**. Os resultados aqui obtidos mostraram que macrófagos de camundongos, sob estímulo com LPS, liberam fatores capazes de induzir a migração de neutrófilos para cavidades peritoneais de camundongos e ratos. Esses fatores também foram ativos em animais tratados com dexametasona, à semelhança do que ocorre com o MNCF.

Esses sobrenadantes foram capazes ainda de, quando administrados endovenosamente, inibir a migração de neutrófilos induzida por estímulos inflamatórios, similarmente ao NRIF.

A atividade indutora de migração de neutrófilos foi abolida desses sobrenadantes pela sua pré-incubação com anticorpos anti-TNF. Esses resultados sugeriam que o TNFα detectado nos sobrenadantes de cultura de macrófagos era a

citocina responsável pelas atividades biológicas do sobrenadante.

A administração de TNFα recombinante murino (mrTNFα) reproduziu os resultados encontrados com os sobrenadantes de macrófagos, isto é, foi capaz de induzir, de modo dose-dependente, a migração de neutrófilos para as cavidades peritoneais de camundongos pré-tratados com dexametasona. A migração de neutrófilos induzida pelo mrTNFα também foi bloqueada por anticorpo específico.

Observou-se ainda que o pré-tratamento dos animais com anticorpo monoclonal anti-TNFα bloqueou a migração de neutrófilos induzida pela administração intraperitoneal de LPS. Esses resultados reforçam a hipótese de que entre as citocinas liberadas por macrófagos, residentes ou ativados, o TNFα é a que induz migração de neutrófilos em camundongos tratados com dexametasona.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

VII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDERSSON, J.; NAGY, S.; BJORK, L.; ABRAMS, J.; HOLM, S. & ANDERSSON, U. Bacterial toxin-induced cytokine production studied at the single-cell level. **Immunol. Rev., 127:** 69-96, 1992.

BARBOSA, R. G. Fator quimiotático para neutrófilos liberado por macrófagos de cavidades pleurais. **Tese de Mestrado**, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, 1993.

BENDTZEN, K. Interleukin-1, interleukin-6 and tumor necrosis factor in infection, inflammation and immunity. **Immunol. Letters, 19:** 183-192, 1988.

BENESTAD, H. B. & LAERUM, O. D. The neutrophilic granulocyte. **Curr. Top. Pathol., 79:** 7-36, 1989.

BERRY, L. J. & SMYTHE, D. S. Effects of bacterial endotoxins on methabolism. VII- Enzyme induction and cortisone protection. **J. Exp. Med., 120:** 721-732, 1964.

BERTINI, R.; BIANCHI, M. G. & GHEZZI, P. Adrenalectomy sensitizes mice to the lethal effects of interleukin 1 and tumor necrosis factor. **J. Exp. Med., 167:** 1708-1712, 1988.

BONE, R. C.; FISHER JR, C. J.; CLEMMER, T. P.; SLOTMAN, G. J.; METZ, C. A. & BALK, R. A. Methylprednisolone Severe sepsis study group. A controlled clinical trial of high-dose methylprednisolone in treatment of severe sepsis and septic shock. **N. Engl. J. Med., 317**: 653, 1987.

BOULAY, J-L. & PAUL, W. E. The interleukin-4 family of lymphokines. **Curr. Opin. Immunol., 4:** 294-298, 1992.

BRINCKERHOFF, C.E.; PLUCINSKA, I.M.; SHELDON, L. A., & O'CONNOR, G.T. Half-life of synovial cell collagenase mRNA is modulated by phorbol myristate acetate but not by all-trans-retinoic acid or dexamethasone. **Biochemistry, 25:** 6378-6384,1986.

BURGOYNE, R. D. & GEISOW, M. J. The annexin family of calcium-binding proteins. **Cell Calcium, 10:** 1-10, 1989.

CANNON, J. G.; TOMPKINS, R. G.; GELFAND, J. A.; MICHIE, H. R.; STANFORD, G. G.; VAN DER MEER, J. W. M.; ENDRES, S.; LONNEMANN, G.; CORSETTI, J.; CHERNOW, B.; WILMORE, D. W.; WOLFF, S. M.; BURK, J. F. & Dinarello, C. A. Circulating interleukin-1 and tumor necrosis factor in septic shock and experimental endotoxin fever. **J. Infect. Dis., 161:** 79-84, 1990.

CASSATELLA, M. A.; BAZZONI, F.; CESKA, M.; FERRO, I.; BAGGIOLINI, M. & BERTON, G. IL-8 production by human polymorphonuclear leukocytes. **J. Immunol., 148:** 3216-3220, 1992.

CUNHA, F. Q. & FERREIRA, S. H. The release of a neutrophil chemotactic factor from peritoneal macrophages by endotoxin: inhibition by glucocorticoids. **Eur. J. Pharmacol., 129:** 65-76, 1986.

CUNHA, F. Q. Controle da migração de neutrófilos por fatores liberados de macrófagos estimulados com endotoxina de

Escherichia coli. **Tese de Doutorado**. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. 1989.

CUNHA, F. Q.; MONCADA, S. & LIEW, F. Y. IL-10 inhibits the induction of nitric oxide synthase by interferon-gamma in murine macrophages. **Biochem. Biophys. Res. Commun., 182:** 1155-1159, 1992.

CUNHA, F. Q. & TAMASHIRO, W . M. S. C. Tumour necrosis factor-alpha and interleukin-8 inhibit neutrophil migration *in vivo* and *in vitro*. **Mediators of Inflammation, 01:** 397-401, 1992.

CUNHA, F. Q.; SOUZA, G. E. P. & FERREIRA, S. H. Macrophages stimulated with lipopolysaccharide release a selective neutrophil chemotactic factor: an "*in vivo*" demonstration. **Braz. J. Med. Biol. Res., 19:** 775-777, 1986.

CYBULSKY, M. I.; CHAN, M. K. & MOVAT, H. Z. Acute inflammation and microthrombosis induced by endotoxin, IL-1, and TNF and their implication in gram-negative infection. **Lab. Invest., 58:** 365-378, 1988.

de WAAL MALEFYT, R.; FIGDOR, C. G.; HUIJBENS, R. MOHAN-PETERSON, S.; BENNETT, B.; CULPEPPER, J.; DANG, W.; ZURAWKI, G. & de VRIES, J. E. Effects of IL-13 on Phenothype, cytokine production, and cytotoxic function of human monocytes. **J. Immunol., 151:** 6370-6381, 1993a.

de WAAL MALEFYT, R.; FIGDOR, C. G. & de VRIES, J. E. Effects of interleukin-4 on monocyte functions: comparison to interleukin-13. **Res. Immunol., 143:** 629-633, 1993b.

de WAAL MALEFYT, R.; YSSEL, H.; RONCAROLO, M-G.; SPITS, H. & de VRIES, J.R. Interleukin-10. **Curr. Opin Immunol., 4:** 314-320, 1992.

DECKER, K. Molecular aspects of Inflammation. **Biol. Chem. Hoppe - Seyler, 372:** 235-244, 1991.

DI ROSA, M. SAUTEBIN, L. & CARNUCCIO, R. Phospholipase A2 and Lipocortins, Antiphospholipase Proteins. **Methods Enzymol., 163:** 23-31, 1988.

DIAS-BARUFFI, M.; CUNHA, F. Q.; FERREIRA, S. H. & ROQUE-BARREIRA, M. C. Macrophage-released neutrophil chemotactic factor (MNCF) induces PMN-neutrophil migration through lectin-like activity. **Agents and Actions, 38:** C 54-C 56, 1993.

DINARELLO, C. A. The biology of interleukin-1 and comparison to tumor necrosis factor. **Immunol. Letters, 16:** 227-232, 1987.

DOHERTY, T. M.; KASTRLEIN, R.; MENON, S.; ANDRADE, S. & COFFMAN, R. L. Modulation of murine macrophage function by IL-13. **J. Immunol., 151:** 7151-7160, 1993.

DOWNEY, G. P. Mechanisms of leukocyte motility and chemotaxis. **Curr. Opin. Immunol., 6:** 113-124, 1994.

ESPEVIK, T. & NISSEN-MEYER, J. A highly sensitive cell line, WEHI 164 clone 13, for measuring cytotoxix factor / tumor necrosis factor from human monocyte. **J. Immunol. Methods, 95:** 99- 105, 1986.

FACCIOLI, L. H.; SOUZA, G. E. P.; CUNHA, F. C.; POOLE, S. & FERREIRA, S. H. Recombinant interleukin-1 and tumor necrosis factor induce neutrophil migration *"in vivo"* by indirect mechanisms. **Agents and Actions, 30:** 344-348, 1990.

FENTON, M. J.; BURAS, J. A. & DONNELLY, R. P. IL-4 reciprocally regulates IL-1 and IL-1 receptor antagonist expression in human monocytes. **J. Immunol., 149:** 1283-1288, 1992.

FERREIRA, S. H. Are macrophages the body's alarm cells? **Agents and Actions, 10 (3):** 229-230, 1980.

FERREIRA, S. H.; LORENZETTI, B. B.; CUNHA, F. Q. & POOLE, S. Bradykinin release of TNF-α plays a key role in the development of inflammatory hyperalgesia. **Agents and Actions, 28:** C 7-C 9, 1993.

FLOWER, R. J. & BLACKWELL G. J. Anti-inflammatory steroids induce biosynthesis of a phospholipase A2 inhibitor which prevents prostaglandin generation. **Nature, 278:** 456-459, 1979.

FORSYTH, K, D. & TALBOT, V. Role of glucocorticoids in neutrophil and endothelial adhesion molecule expression and function. **Mediators of Inflammation, 01:** 101-106, 1992.

FOSTER, S. J.; McCORMICK, L. M.; NTOLOSI, B. A. & CAMPBELL, D. Production of TNF-α by LPS-stimulated murine, rat and human blood and its pharmacological modulation. **Agents and Actions, 38:** C 77-C 79, 1993.

FURTH, R VAN. Origin and Turnover of monocytes and macrophages.

Curr. Top. Pathol., 79: 125-149, 1988.

FURTH, R. VAN & COHN, Z. A. The origin and kinetics of mononuclear phagocytes. **J. Exp. Med., 128:** 415-435, 1968.

FURTH, R. VAN; DIESSELHOFF-DEN DULK, M. M. C. & MATTIE, H. Quantitative study on the production and kinetics of mononuclear phagocytes during an acute inflammatory reaction. **J. Exp. Med., 138:** 1314-1330, 1973.

GALLAY, P.; JONGENEEL, C. V.; BARRAS, C.; BURNIER, M.; BAUMGARTNER, J-D.; GLAUSER, M. P. & HEUMANN, D. Short time exposure to lipopolysaccharide is sufficient to activate human monocytes. **J. Immunol., 150:** 5086-5093, 1993.

GIMBRONE, M. A.; OBIN, M. S.; BROCK, A. F.; LUIS, E. A.; HASS, P. E.; HEBERT, C. A.; YIP, Y. K.; LEUNG, D. W.; LOWE, D. G.; KOHR, W. J.; DARBONNE, W. C.; BECHTOL, K. B. & BAKER, J. B. Endothelial interleukin-8: a novel inhibitor of leucocyte-endothelial interactions. **Science, 246:** 1601-1603, 1989.

GOODMAN, L. S. & GILMAN, A. G. Hormônio adrenocorticotrópico; Esteróides adrenocorticais e seus análogos sintéticos; Inibidores da biossíntese adrenocortical de esteróides. In: As Bases farmacológicas da terapêutica. Editores: Alfred Goodman Gilman, Louis S. Goodman, Theodore W. Rall & Ferid Murad **Ed. Guanabara, Koogan-S.A.**: 956-975, 1987.

GORDON, S.; FRASER, I.; NATH, D.; HUGHES, D. & CLARKE, S. Macrophages in tissues and "*in vitro*". **Curr. Opin. Immunol., 4:** 25-32, 1992.

GOULDING, N.J. & GUYRE, P. M. Regulation of inflammation by lipocortin 1. **Immunol. Today, 13:** 295-297, 1992.

GRAU, G. E. & LOU, J. TNF in vascular pathology: the importance of platelet-endothelium interactions. **Res. Immunol., 144:** 355-363, 1993.

HECHTMAN, D. H.; CYBULSKY, M. I.; FUCHS, H. J.; BAKER, J. B. & GIMBRONE, M. A. Intravascular IL-8. Inhibitor of polymorphonuclear leukocyte accumulation at sites of acute inflammation. **J. Immunol., 147:** 883-892, 1991.

HOGG, N. & LANDIS, R. C. Adhesion molecules in cell interaction. **Curr. Opin. Immunol., 5:** 383-390, 1993.

HUME, D. A. & GORDON, S. Mononuclear phagocyte system of the mouse defined by immunohistochemical localization of antigen $F_4/80$. **J. Exp. Med., 157:** 1704-1709, 1983.

IVERSEN, O.H. The cell kinetics of the inflammatory reaction. Introduction and overview. **Curr. Top. Pathol., 79:** 1-5, 1989.

KOLLIAS, G. Tumour necrosis factor: a specific trigger in arthritis. **Res. Immunol., 144:** 342-347, 1993.

LASKY, L. A. Lectin cell adhesion molecules (LEC-CAMs): a new family of cell adhesion proteins involved with inflammation. **J. Cell. Biochem., 45:** 139-146, 1991.

LASKY, L. A. Selectins: interpreters of cell-specific carbohydrate information during inflammation. **Science, 258:**

964-969, 1992.

LEE, J. D.; SWISHER, S. G.; MINEHART, E. H.; McBRIDE, W. H. & ECONOMOU, J. S. Interleukin-4 downregulates interleukin-6 production in human peripheral blood mononuclear cell. **J. Leukocyte Biol., 47:** 475-479, 1990.

LEE, S-H.; STARKEY, P. M. & GORDON, S. Quantitative analysis of total macrophage content in adult mouse tissues. **J. Exp. Med., 161:** 475-489, 1985.

LEHRER, R.I.; GANZ, T.; SELSTED, M. E.; BABIOR, B. M. & CURNUTTE, J. T. Neutrophils and host defense. **Ann. Intern. Med., 109:** 127-142, 1988.

LENTEN, B. J. V. & FOGELMAN, A. M. Lipopolysaccharide-induced inhibition of scavenger receptor expression in human momocyte-macrophages is mediated through tumor necrosis factor-a. **J. Immunol., 148:** 112-116, 1992.

LEW, W.; OPPENHEIM, J. J. & MATSUSHIMA, K. Analysis of the suppression of IL-1α and IL-1ß production in human peripheral blood mononuclear adherent cells by a glucocorticoid hormone. **J. Immunol., 140:** 1895-1902, 1988.

LINDLEY, I.; ASCHAUER, H.; SEIFERT, J. M.; LAM, C.; BRUNOWSKI, W.; KOWNATZKI, E.; THELEN, M.; PEVERI, P.; DEWALD, B.; von TSCHARNER, V.; WALZ, A. & BAGGIOLINI, M. Synthesis and expression in **Escherichia coli** of the gene encoding monocyte-derived neutrophil-activating factor: Biological equivalence between natural and recombinant neutrophil activating factor. **Proc Nat. Acad. Sci. USA, 85:** 9199, 1988.

LUCAS, R.; MAGEZ, S.; SONGA, B.; DARJI, A.; HAMERS, R. & BAETSELIER, P. A role for TNF during african trypanosomiasis: involvement in parasite control, immunosuppression and pathology. **Res. Immunol., 144:** 370-376, 1993.

MANNEL, D. N.; RUSCHOFF, J. & OROSZ, P. The role of TNF in tumor growth and metastasis. **Res. Immunol., 144:** 364-369, 1993.

MARLETTA, M. A. Nitric oxid: Biosynthetic and biological significance. **Trends Biol. Sci., 4:** 488-492, 1989.

McEVER, R. P. Selectins. **Curr. Opin. Immunol., 6:** 75-84, 1994.

McKENZIE, A. N. J.; CULPEPPER, J. A.; de WAAL MALEFYT, R.; BRIERE, F.; PUNNONEN, J.; AVERSA, G.; SATO, A.; COCKS, B. G.; MENON, S.; de VRIES, J. E.; BANCHEREAU, J. & ZURAWSKI, G. Interleukin-13 a T cell derived cytokine that regulates human monocyte and B cell function. **Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.), 90:** 3735, 1993.

MOLLOY, R. G.; O'RIORDAIN, M.; HOLZHEIMER, R.; NESTOR, M. COLLIS, K.; MANNICK, J. A. & RODRICK, M. L. Mechanism of increased tumor necrosis factor production after thermal injury. **J. Immunol., 151:** 2142-2149, 1993.

MORRISON, D. C. & ULEVICH, R. J. The effects of bacterial endotoxins on host mediation systems. **Am. J. Pathol., 93(2):** 526-617, 1978.

MUELLER, C.; IMBODEN, M. A.; HESS, M. W.; LAISSUE, J. A. & CARNAUD, C. C. TNF-α and insulin-dependent diabetes mellitus. **Res. Immunol., 144:** 331-335, 1993.

MUKAIDA, N.; GUSSELLA, G. L.; KASAHARA, T.; KO, Y.; ZACHARIAE, C. O. C.; KAWAI, T. & MATSUSHIMA, K. Molecular analysis of the inhibition of interleukin-8 production by dexamethasone in a human fibrosarcoma cell line. **Immunology, 75:** 674-679, 1992.

MUKAIDA, N.; ZACHARIAE, C. C. O.; GUSELLA, G. L. & MATSUSHIMA, K. Dexamethasone inhibits the induction of monocyte chemotactic-activating factor production by IL-1 or tumor necrosis factor. **J. Immunol., 146:** 1212-1215, 1991.

NATHAN, C. F. Secretory products of macrophages. **J. Clin. Invest., 79:** 319-326, 1987.

ORINO, E.; SONE, S.; NII, A. & OGURA, T. IL-4 up-regulates IL-1 receptor antagonist gene expression and its production in human blood monocytes. **J. Immunol., 149:** 925-931, 1992.

OSBORN, L. Leukocyte adhesion to endothelium in inflammation. **Cell, 62:** 03-06, 1990.

OSWALD, I. P.; GAZZINELLI, R. T.; SHER, A. & JAMES, S. L. IL-10 synergizes with IL-4 and transforming growth factor-ß to inhibit macrophage cytotoxic activity. **J. Immunol., 148:** 3578-3582, 1992a.

OSWALD, I. P.; WYNN, T. A.; SHER, A. & JAMES, S. L. Interleukin-10 inhibits macrophage microbicidal activity by

blocking the endogenous production of tumor necrosis factor-a required as a co-stimulatory factor for interferon-γ induced activity. **Proc. Natl. Acad. Sci. (Wash.), 89:** 8676, 1992b.

OTSUKA, Y.; NAGANO, Ka.; NAGANO, Ki.; HORI, K.; OH-ISHI, J-I.; HAYASHI, H.; WATANABE, N. & NIITSU, Y. Inhibition of neutrophil migration by tumor necrosis factor. **J. Immunol., 145:** 2639-2643, 1990.

PIGUET, P. F. TNF and the pathology of the skin. **Res. Immunol., 144:** 355-363, 1993.

POWRIE, F. & COFFMAN, R. L. Cytikine regulation of T-cell function: potencial for therapeutic intervention. **Immunol. Today., 14:** 270-274, 1993.

RAETZ, C. R. H. Biochemistry of endotoxins. **Annu. Rev. Biochem., 59:** 129-170. 1990.

REMICK, D. G. Lung and gut injury enduced by tumour necrosis factor. **Res. Immunol., 144:** 326-331, 1993.

RIBEIRO, R. A.; CUNHA, F. Q. & FERREIRA, S. H. Recombinant gamma-interferon causes neutrophil migration mediated by the release of a macrophage neutrophil chemotactic factor. **Int. J. Exp. Pathol., 71:** 717-725, 1990.

RIBEIRO, R. A.; FLORES, C. A.; CUNHA, F. Q. & FERREIRA, S. H. IL-8 causes *"in vivo"* neutrophil migration by a cell-dependent mechanism. **Immunology, 73:** 472-477, 1991.

ROSS, R. The pathogenesis of atherosclerosis - an update. **N. Engl. J. Med., 314:** 488-500, 1986.

RUDDLE, N. H. Tumor necrosis factor (TNF-α) and lymphotoxin (TNF-ß). **Curr. Opin. Immunol., 4:** 327-332, 1992.

RUDDLE, N. H.; PICARELLA, D.; KRATZ, A.; LI, C.-b. & FLAVELL, R. A. Probing the mechanism of TNF-α (Cachectin)-and TNF-ß (Lymphotoxin)- induced pancreatic inflammation with transgenic mice. **Res. Immunol., 144:** 336-342, 1993.

RYAN, U. S. & WORTHINGTON, R. E. Cell-cell contact mechanisms. **Curr. Opin. Immunol., 4:** 33-37, 1992.

SCHUMANN, R. R.; LEONG, S. R.; FLAGGS, G. W.; GRAY, P. W.; WRIGHT, S. D.; MATHISON, J. C.; TOBIAS, P. S. & ULEVITCH, R. J. Structure and function of lipopolysacharide binding protein. **Science, 249:** 1429-1431, 1990.

SMITH, W. B.; GAMBLE, J. R. & WADAS, M. A. Cytokines in the inflammatory response. **Interferons and Cytokines, 21:** 26-29, 1992.

SOUZA, G. E. P. & FERREIRA, S. H. Blockade by antimacrophage serum of the migration of PMN-neutrophil into the inflamed peritoneal cavity. **Agents and Actions, 17:** 97-103, 1985.

SOUZA, G. E. P.; CUNHA, F. Q.; MELLO, R. & FERREIRA, S. H. Neutrophil migration induced by inflammatory stimuli is reduced by macrophage depletion. **Agents and Actions, 24:** 377-380, 1988.

SZEFLER, S. J.; NORTON, C. E.; BALL, B.; GROSS, J. M.; AIDA, Y. & PABST, M. J. IFN-γ and LPS overcome glucocorticoid inhibition of priming for superoxide release in human monocytes. **J. Immunol. 142(11):** 3985, 1989.

TAMASHIRO, W. M. S. C.; TAVARES-MURTA, B. M.; CUNHA, F. Q.; ROQUE-BARREIRA, M. C.; NOGUEIRA, R. M. D. & FERREIRA, S. H. Neutrophil recruitment inhibitory factor: a possible candidate for a novel cytokine. **Mediators of Inflammation, 01:** 02-07, 1992.

TAVARES, B. M.; CUNHA, F. Q. & FERREIRA, S. H. Macrophages stimulated with lipopolysaccharide release a selective neutrophil recruitment inhibitory factor: an *"in vivo"* demonstration. **Braz. J. Med. Biol. Res., 22:** 733-736, 1989.

TAVARES-MURTA, B. M.; TAMASHIRO, W. M. S. C.; FREIRI, N. I. S.; CUNHA, F. Q.; ROQUE-BQRREIRA, M. C.; FERREIRA, S. H. NRIF e MNCF são separados de TNFα por afinidade a D-Galactose imobilizada. **Resumos VIII Reunião Anual da FESBE,** 1993.

ULICH, T. R.; SHIN, S. S. & del CASTILLO, J. Haematologic effects of TNF. **Res. Immunol., 144:** 347-354, 1993.

ULICH, T. R.; YIN, S.; GUO, K.; YI, E. S.; REMICK, D. & del CASTILLO, J. Intratracheal injection of endotoxin and cytokines. II. Interleukin-6 and Transforming growth factor beta inhibit acute inflammation. **Am. J. Pathol., 138:** 1097-1101, 1991.

VAN ZEE, K. J.; DEFORGE, L. E.; FISCHER, E.; MARANO, M. A.; KENNEY, J. S.; REMICK, D. G.; LOWRY, S. F. & MOLDAWER, L. L.

IL-8 in septic shock, endotoxemia and after IL-1 administration. **J. Immunol., 146:** 3478-3482, 1991.

VELLENGA, E.; DOKTER, W.; de WOLF, J. T. M.; van de VINNE, B.; ESSELINK, M. T. & HALIE, M. R. Interleukin-4 prevents the induction of G-CSF mRNA in human adherent monocytes in response to endotoxin and IL-1 stimulation. **Br. J. Haematol., 79:** 22-26, 1991.

WONG, H. L.; COSTA, G. L.; LOTZE, M. T. & WAHL, S. M. Interleukin (IL) 4 differentially regulates monocyte IL-1 family gene expression and synthesis in vitro and in vivo. **J. Exp. Med., 177:** 775-781, 1993.

ZURAWSKI, S. M.; VEGA JR, F.; HUYGHE, B. & ZURAWSKI, G. Receptors for interleukin-13 and interleukin-4 are complex and share a novel component that functions in signal tranduction. **EMBO J.; 12(7):** 2663-2670, 1993.