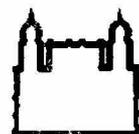




**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ**



UFBA

Curso de Pós-Graduação em Patologia

FIOCRUZ

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**UM ENSAIO DE ADESÃO OTIMIZADO PARA O
ESTUDO DE INTERAÇÕES ENTRE MACRÓFAGOS E
TECIDO CONJUNTIVO BASEADO NO ENSAIO DE
STAMPER-WOODRUFF**

DJALMA GOMES FERRÃO CARVALHAL

Salvador - Bahia
2001



001634

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ**

Curso de Pós-Graduação em Patologia

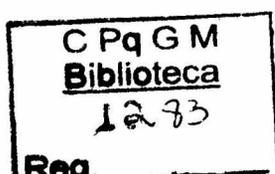
**UM ENSAIO DE ADESÃO OTIMIZADO PARA O ESTUDO DE
INTERAÇÕES ENTRE MACRÓFAGOS E TECIDO
CONJUNTIVO BASEADO NO ENSAIO DE STAMPER-
WOODRUFF**

Mestrando: Djalma Gomes Ferrão Carvalhal

Orientador: Washington Luís Conrado dos Santos

Dissertação apresentada para
cumprimento parcial dos
requisitos para obtenção do grau
de Mestre em Patologia
Experimental.

Salvador – Bahia
2001



Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz / FIOCRUZ – Salvador – BA

Carvalho, Djalma Gomes Ferrão
C331e Um estudo de adesão otimizado para o estudo de interações
entre macrófagos e tecido conjuntivo baseado no ensaio de
Stamper-Woodruff / Djalma Gomes Ferrão Carvalho. –
Salvador: Universidade Federal da Bahia / CPqGM /
FIOCRUZ, 2001.
77p. : ils.

Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental)-
Universidade Federal da Bahia, 2001.

1. Macrófagos. 2. Moleculas de adesão celular. 3.
Leishmania. I. Título.

CDU 576:616.993

ESTUDO DE ADERÊNCIA
2001

NEP/11/01
5/10/01

UM ENSAIO DE ADESÃO OTIMIZADO PARA O ESTUDO DE INTERAÇÕES ENTRE
MACRÓFAGOS E MATRIZ CONJUNTIVA BASEADO NO ENSAIO DE STAMPER-WOODRUFF

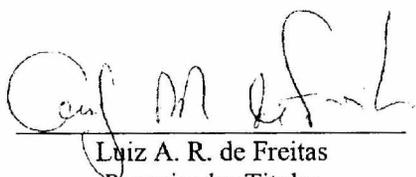
DJALMA GOMES FERRÃO CARVALHAL

FOLHA DE APROVAÇÃO

COMISSÃO EXAMINADORA



Dr. Wilson Savino
Pesquisador Titular
IOC - FIOCRUZ



Luiz A. R. de Freitas
Pesquisador Titular
CPqGM - FIOCRUZ



Dr. Lain Pontes de Carvalho
Pesquisador Titular
CPqGM - FIOCRUZ

Dedico esta Dissertação
A minha esposa Grace e minha filha Laís.
Aos meus amigos que tanto me incentivaram, em especial
ao Dr. Washington Luís Conrado dos Santos.

FONTES DE FINANCIAMENTO:

- PAPES – 0250.250.320
- CNPq – Bolsa de mestrado
- Pronex

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Washington Luís Conrado dos Santos pelo incentivo constante, por sua inestimável amizade, pelo exemplo a ser seguido e pela competente orientação para realização deste trabalho.

Ao Dr. Lain Pontes de Carvalho pelas críticas, sugestões, correções de trabalhos para congressos e pela inestimável presteza e eficiência com que conduz o Laboratório de Imunologia Molecular e Celular.

Ao Dr. Geraldo Gileno pelos momentos de elucubração intelectual e incentivo.

À Dra. Patrícia S. Tavares Veras pelas sugestões e ensinamentos relativos a Biologia Celular.

Ao Dr. Aryon Barbosa-Jr. pelo apoio e presteza com que se prontificou para realizar a quantificação dos experimentos.

Ao Dr. Antonio José O. dos Santos por ter providenciado a síntese dos peptídios usados nos ensaios de bloqueio.

Ao Dr. Ricardo Ribeiro e Milena Soares pela disponibilidade e presteza com que colocaram equipamentos a minha disposição.

À Dra. Iracema Andrade Nascimento por sua competente orientação na iniciação científica, sem a qual jamais teria despertado a paixão que nutro por fazer ciência.

À Ana Maria Fiscina Vaz Sampaio pela valorosa contribuição na normatização da dissertação e das referências bibliográficas.

À Sra. Rosália Meire de Oliveira da Silva por sua inestimável ajuda e competência em todos os momentos do curso de Mestrado.

Aos amigos do Laboratório de Imunologia Celular e Molecular: Fábio Castro, Moacir Paranhos, Paulo Aguiar, Márcia Teixeira, Dra. Neci Matos Soares, Dra. Neuza Alcântara de Carvalho, Elivani Sacramento de Jesus, Lenita Ramires e Marco Silvano pelo companheirismo durante todo o período em que estive no laboratório.

À Tânia de Faria pelo apoio na elaboração dos recursos visuais e de editoração necessários no desenvolvimento desse trabalho.

Ao Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz da Fundação Oswaldo Cruz pela disponibilidade de espaço físico, pessoal e equipamentos.

Às pessoas que, apesar de não citadas nominalmente, contribuíram para o êxito deste trabalho.

	Pág.
SUMÁRIO	
LISTA DE ABREVIATURAS	VIII
RESUMO	IX
ABSTRACT	X
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 O processo de migração celular	2
1.2 Moléculas envolvidas no processo de adesão e migração celular	5
1.2.1 Selectinas e sialomucinas	5
1.2.2 Integrinas e moléculas da superfamília das imunoglobulinas	8
1.3 Participação e função das integrinas nas ligações entre leucócitos e a matriz conjuntiva	10
1.4 Mecanismos envolvidos na regulação das integrinas	11
1.5 Químioatraentes clássicos e quimiocinas	14
1.6 Métodos de estudo da adesão celular	17
1.7 O modelo de adesão de Stamper-Woodruff	18
2 OBJETIVOS	22
2.1 Objetivo geral	22
2.2 Objetivos específicos	22
3 JUSTIFICATIVA	23
4 MATERIAL E MÉTODOS	24
4.1 Indução de inflamação aguda em camundongos BALB/c	24
4.2 Preparação dos blocos e secções de pele inflamada de camundongo BALB/c	24
4.3 Cultivo de macrófagos da linhagem J774	25
4.4 Obtenção de macrófagos peritoneais	25
4.5 Isolamento de monócitos humanos	26
4.6 Ensaio de adesão com secções de pele	26
4.7 Envolvimento de cátions divalentes no processo de adesão	27
4.8 Efeito da ativação de macrófagos no processo de adesão	27
4.9 Imunohistoquímica	28
4.10 Ensaio de inibição da adesão de células J774 a pele inflamada de camundongos BALB/c	29
4.11 Aplicação do ensaio no estudo da adesão de células infectadas por parasitos intracelulares	29
4.12 Análise estatística	31

5	RESULTADOS	32
5.1	Estabelecimento preliminar das condições do ensaio	32
5.2	Análise dos sítios preferenciais de adesão	32
5.3	Avaliação da concentração ideal de células a serem utilizadas nos ensaios de adesão	33
5.4	Avaliação da preservação dos sítios de adesão em tecidos congelados e frescos	36
5.5	Avaliação da importância da simulação do fluxo no processo de adesão	36
5.6	Análise da participação de cátions divalentes (Ca^{++} e Mg^{++})	39
5.7	Efeito da ativação celular sobre o processo de adesão	39
5.8	Identificação das moléculas de adesão envolvidas na interação macrófago/matriz conjuntiva	42
5.8.1	Identificação das moléculas de adesão expressas na pele de camundongos de linhagem BALB/c, após indução de inflamação	42
5.8.2	Identificação de moléculas envolvidas no processo de adesão de células J774 à pele de bolsão inflamatório de camundongos de linhagem BALB/c	42
5.9	Interferência do estado funcional das células no processo de adesão	43
6	DISCUSSÃO	50
7	CONCLUSÕES/SUMÁRIO DOS RESULTADOS	55
8	REFERÊNCIAS	56

LISTA DE ABREVIATURAS

6CKINE	“6 cysteine chemokine” (quimiocina 6 cisteína)
ANOVA	análise de variância
BCA-1	“B-cell attracting chemokine” (quimiotático de células B)
BLC	“B lymphocyte chemoattractant” (químioatraente de linfócitos B)
C5a	produto derivado da clivagem do componente C5 do complemento
CCR	receptores de quimiocinas da família CC
CLA	“cutaneous lymphocyte antigen” (antígeno de linfócitos cutâneo)
CR	receptores de quimiocinas da família C
CX₃CR	receptores de quimiocinas da família CX ₃ C
CXCR	receptores de quimiocinas da família CXC
EDTA	“ethylene diamine tetraacetic acid” (ácido etileno diamino-tetracético)
EGTA	“ ethyleneglycol-bis (β-aminoethyl ether)— N,N'-tetraacetic acid” [bi-etilenoglicol (éter β-aminoetil)— N,N'- ácido tetracético.
ELC	“EB/1-ligand chemokine” (quimiocina ligante de EB/1)
ENA	“epithelial-cell-derived neutrophil activating peptide” (peptídeo ativador de neutrófilos derivado de células epiteliais)
fMLP	“formylmethionylleucylphenylalanine” (formil metil leucil fenilalanina)
GCP-2	“granulocyte chemoattractant protein-2” (proteína químioatraente de granulócitos)
GlyCAM	“glycosylation-dependent cell adhesion molecule” (molécula de adesão celular dependente de glicosilação)
GRO	“growth-related oncogene” (oncogene relacionado ao crescimento)
HBSS	“Hanhks' Balanced Salts” (solução balanceada de sais Hanhks)

H-CAM	“homing-associated cell adhesion molecule” (molécula de adesão celular associada a endereçamento)
HCC	“Hemofiltrate CC chemokine” (hemofiltrado de quimiocina CC)
HEV	“high endothelial venules” (vênulas de endotélio alto)
I-309	polipeptídeo secretado por linfócitos T humanos ativados
iC3b	produto intermediário da clivagem do fator C3b do complemento
ICAM	“intercellular adhesion molecule” (molécula de adesão intercelular)
IFN	“interferon”
IL	interleucina
IP-10	“interferon- γ inducible protein” (proteína induzida por interferon- γ)
LARC	“liver and activation-regulated chemokine” (quimiocina regulada por ativação e pelo fígado)
LC	“lymphoid tissue chemokine” (quimiocina de tecido linfóide)
LFA	“leukocyte function–associated antigens” (antígeno associado a função leucocitária)
LIX	“lipopolysaccharide-induced CXC chemokine” (CXC quimiocina induzida por LPS)
LPS	lipopolissacarídeo
LTB4	leucotrieno B4
MAC	“macrophage adhesion molecule” (molécula de adesão de macrófagos)
MAdCAM	“mucosal addressin cell adhesion molecule” (molécula de adesão celular adressina de mucosa)
MCP	“monocyte chemotatic protein” (proteína quimiotática de macrófagos)
MDC	“macrophage-derived chemokine” (quimiocina derivada de macrófagos)
MIG	“monokine induced by interferon- γ ” (monocina induzida por interferon- γ)

MIP	“macrophage inflammatory protein” (proteína inflamatória de macrófagos)
NAP-2	“neutrophil-activating peptide” (peptídeo ativador de neutrófilos)
NCAM	“neuronal cell adhesion molecule” (molécula de adesão de células nervosas)
PAF	“platelet-activating factor” (fator de ativação plaquetária)
PBP	“platelet basic protein” (proteína básica de plaquetas)
PBS	“phosphate buffered saline” (salina tamponada com fosfato)
PBSF	“pre-B-cell growth stimulatory factor” (fator estimulador de crescimento de pré-células B)
PECAM	“platelet-endothelial adhesion molecule” (molécula de adesão plaqueta-endotélio)
PF	“platelet factor” (fator plaquetário)
PMA	forbol miristato acetato
PSGL	“P-selectin-glycoprotein ligand” (glicoproteína ligante de P-selectina)
RANTES	“regulated on activation, normal T cell expressed and secreted” (quimiocina regulada pela ativação de linfócitos T normais)
RPMI	“Roswell Park Memorial Institute” (meio de cultura)
SDF	“stromal-cell-derived factor” (fator derivado de células estromais)
TECK (TARC)	“thymus-expressed chemokine” (quimiocina expressa no timo)
VCAM	“vascular cell adhesion molecule” (molécula de adesão vascular)
VLA	“very late antigen” (antígeno de aparecimento tardio)

RESUMO

UM ENSAIO DE ADESÃO OTIMIZADO PARA O ESTUDO DE INTERAÇÕES ENTRE MACRÓFAGOS E TECIDO CONJUNTIVO BASEADO NO ENSAIO DE STAMPER-WOODRUFF. **Djalma Gomes Ferrão Carvalho**. O objetivo deste trabalho é desenvolver um ensaio de adesão, baseado no ensaio de Stamper-Woodruff, para o estudo das interações entre macrófagos e matriz conjuntiva. Foram induzidos bolsões inflamatórios em camundongos da linhagem BALB/c para obtenção de secções de pele inflamada, e células macrofágicas da linhagem J774G.8 foram utilizadas na padronização do ensaio. Secções de 7 μm de espessura foram colocadas em lâminas de vidro, fixadas com acetona e bloqueadas com BSA. Foi estabelecida a concentração de 10^6 células/100 μl como a mais apropriada para a realização do ensaio, através de diluições seriadas. Células J774G.8 sem tratamento prévio ou tratadas com: ácido tetraacético diamino etileno, Mn^{++} , lipopolissacarídeo, forbol miristato acetato, zimosan, os peptídios CS-1 e RGD, os anticorpos anti-CD49d ou contra a cadeia $\beta 2$ de integrinas, foram adicionadas às secções e incubadas por 30 minutos à temperatura ambiente. Como resultado, as células macrofágicas aderem preferencialmente às áreas de inflamação. A adesão das células é dependente de cátions divalentes e pode ser modulada por substâncias que promovam a ativação celular. Além disso, a adesão mediada por integrinas pode ser inibida por peptídios RGD e CS-1 ou com anticorpos contra integrinas da família $\beta 1$ e $\beta 2$. A adesão das células macrofágicas é inibida mais intensivamente pela infecção com *Leishmania* mas não com a infecção por *Mycobacterium* ou por fagocitose de partículas de látex. Desta forma, o ensaio desenvolvido foi capaz de demonstrar a especificidade da adesão de células macrofágicas pela matriz conjuntiva bem como de sugerir a existência de mecanismos específicos de regulação das interações entre macrófagos e a matriz conjuntiva durante a infecção por *Leishmania*.

Palavras-chave: 1. Macrófagos. 2. Moléculas de adesão 3. Tecido conjuntivo.

Abstract

AN ADHESION ASSAY OPTIMIZED TO STUDY THE INTERACTIONS BETWEEN MACROPHAGES AND CONNECTIVE TISSUE BASED IN THE STAMPER-WOODRUFF ASSAY. **Djalma Gomes Ferrão Carvalho**. The aim of this work was to develop an adhesion assay, based on the Stamper-Woodruff's assay to study the interactions between macrophages and the connective matrix. Inflammatory pouches were produced in BALB/c mice to obtain inflamed skin sections, and J774G.8 macrophage cell line was applied to standardize the assay. Sections of 7 μ m thick were placed onto glass slides, fixed with acetone and blocked with bovine serum albumin. The cell concentration of 10⁶/100 μ l was proved to be most appropriate for the assay, through serial dilutions. J774G.8 cells, with or without ethylene diamine tetraacetic acid, Mn⁺⁺, Lipopolysaccharide, phorbol myristate acetate, zymosan, CS-1, RGD peptide, antibodies anti-CD49d or against β 2 chain integrin treatment, were added onto the sections and incubated for 30 minutes at room temperature. Macrophage cells adhered preferentially to inflamed areas. The adhesion of cells was dependent on divalent ions and could be modulated by substances that promote cell activation. Moreover, the adhesion mediated by integrin can be inhibited either by RGD or CS-1 peptides or by antibodies against integrins of the β 1 or β 2 sub-family. Adhesion of macrophage cells was intensively inhibited by infection with *Leishmania* and was not affected by infection with *Mycobacterium* or by endocytosis of latex beads. Thus, the developed assay was able to show the specific adhesion of macrophages to connective matrix, as well to illustrate a specific downregulation of macrophage adhesion to inflamed skin in *Leishmania* infection.

Key-words: 1. Macrophages. 2. Adhesion molecules; 3. Connective tissue

1 INTRODUÇÃO

Os leucócitos originam-se na medula óssea e a partir daí iniciam o processo de migração para os diferentes tecidos do organismo. Enquanto a maioria das subpopulações de leucócitos apresentam-se maduras já na medula óssea, a população de linfócitos T migra para o timo, onde completa o seu desenvolvimento (AMSEN & KRUISBEEK, 1998). Os leucócitos atuam tanto na imunidade inata quanto na adquirida, desempenhando um papel essencial nos processos de vigilância imunológica, resposta inflamatória, desenvolvimento do organismo e homeostase (BUTCHER & PICKER, 1996). No transcurso entre os diferentes tecidos, a adesão dos leucócitos é uma etapa essencial na interação com outras células ou componentes da matriz conjuntiva (MULLER & RANDOLPH, 1999). Este processo é mediado por moléculas de adesão, e sofre a influência de fatores microambientais, inclusive quimiotáticos, presentes nos tecidos (HAELENS et al., 1996).

O desenvolvimento de ensaios experimentais de adesão e migração celular tem permitido a identificação dos mecanismos celulares e moleculares envolvidos na recirculação (STAMPER & WOODRUFF, 1976) e no recrutamento de leucócitos (WERR et al., 2000). O conhecimento de como e porque os leucócitos direcionam-se para um determinado sítio tecidual é de suma importância para o entendimento de processos patogênicos.

Neste trabalho adaptamos o ensaio de adesão de STAMPER-WOODRUFF ao estudo de interações entre células macrofágicas e o tecido conjuntivo. Células macrofágicas são importantes efetores dos processos inflamatórios e de defesa

contra infecção (MULLER & RANDOLPH, 1999). Em alguns processos inflamatórios/infecciosos, os macrófagos constituem o principal elemento celular presente nas lesões (ALEXANDER et al., 1999), daí a importância do estabelecimento de um método de estudo das interações entre macrófagos/tecido conjuntivo. Além disso, a utilização deste método servirá para permitir a melhor compreensão da gênese de doenças e definição de possíveis estratégias terapêuticas.

1.1 O processo de migração celular

Os leucócitos circulam continuamente entre o sangue, os órgãos linfóides e os demais tecidos, incluindo sítios de inflamação (HARLAN, 1985; PICKER, 1992).

Inicialmente, é preciso distinguir recirculação como um processo continuamente realizado por linfócitos no mecanismo de vigilância imunológica, do recrutamento de células para sítios de inflamação. Assim, linfócitos virgens recirculam preferencialmente entre o sangue e os tecidos linfóides, mas depois de ativados no linfonodo podem migrar para os tecidos podendo ser retidos nos locais periféricos onde o antígeno for apresentado (HICKEY, 1991; SPRINGER, 1994; BAUVOIS et al., 1996). Macrófagos, por sua vez, constituem uma população variada de células que se originam a partir de monócitos que migraram do sangue para os tecidos diferenciando-se em células residentes (células de Kupfer, micróglia, células de Langerhans), podendo ser novamente estimulados e migrar para linfonodos drenantes após contato com o antígeno (Moll, 2000). Uma outra população de

macrófagos (macrófagos inflamatórios) tem sua origem em monócitos do sangue periférico que são recrutados para os sítios de inflamação (TAKAHASHI et al., 1996). Ela apresenta um fenótipo diferente das células residentes: expressão de mieloperoxidase, incremento da capacidade fagocítica e potencial para gerar metabólitos tóxicos de oxigênio e nitrogênio (TAKAHASHI et al., 1996; BOSQUE et al., 1997).

Nos processos inflamatórios ocorre a expressão de sinais locais nos tecidos lesados que promovem o recrutamento de leucócitos, que, retidos nos sítios de inflamação contribuem para neutralização do agente agressor e para o desenvolvimento da resposta imune (ISSEKUTZ & MOVAT, 1980).

O endotélio vascular é a primeira interface entre células circulantes e os tecidos. A saída dos leucócitos da corrente sangüínea ocorre através de uma seqüência de eventos que pode ser resumida em cinco etapas: (1) contato aleatório dos leucócitos com o endotélio vascular; (2) rolamento dos leucócitos sobre a superfície endotelial; (3) adesão firme ao endotélio; (4) diapedese e (5) direcionamento para os sítios: inflamatórios ou de endereçamento (CARLOS & HARLAN, 1994; SPRINGER, 1994; HOGG & BERLIN, 1995; VESTWEBER, 2000). Cada uma destas etapas é regida por uma ou mais moléculas de adesão expressas em superfície celular. Na fase de rolamento ocorre a interação entre selectinas e moléculas contendo carboidratos, expressas por leucócitos e células endoteliais respectivamente (BEVILACQUA & NELSON, 1993; LASKY, 1992; VESTWEBER, 1999). No processo de adesão firme ocorre a interação entre moléculas da família das integrinas dos leucócitos com moléculas da superfamília gênica das

imunoglobulinas expressas na superfície endotelial (GAHMBERG et al., 1999). Na diapedese ocorre interações entre integrinas e moléculas da superfamília das imunoglobulinas, além de interações homofílicas entre moléculas desta mesma superfamília [PECAM/PECAM, (STOCKINGER et al., 1990)].

Após os leucócitos atravessarem o endotélio vascular, algumas integrinas do tipo β_1 (HEMLER, 1991) e provavelmente β_2 (BAUVOIS et al., 1996) passam a interagir com componentes macromoleculares da matriz conjuntiva e/ou moléculas de adesão expressas por células residentes e/ou inflamatórias atraídas para o sítio de inflamação (CARLOS & HARLAN, 1994; SPRINGER, 1994).

O recrutamento de células para os sítios de inflamação requer, pois, a interação célula/célula (leucócito/endotélio) e célula/tecido conjuntivo (leucócito/componentes da matriz conjuntiva e leucócitos/células nos sítios de inflamação). Estas interações dependem de vários fatores, incluindo o estado de ativação celular e fatores quimiotáticos, que determinam se a célula permanecerá ou não em determinado local.

A mobilização/permanência de leucócitos nos sítios de inflamação influencia diretamente o curso de doenças inflamatórias, entre elas a artrite reumatóide (JALKANEN et al., 1996), a encefalite auto-imune experimental (YEDNOCK et al., 1992), a doença auto-imune da tireóide (KABEL et al., 1990), e possivelmente, as formas desfigurantes da leishmaniose tegumentar (TAPIA et al., 1994).

1.2 Moléculas envolvidas no processo de adesão e migração celular

1.2.1 Selectinas e sialomucinas

A adesão dos leucócitos ao endotélio envolve uma seqüência de etapas. No primeiro momento, os leucócitos apresentam uma série rápida de aderências reversíveis ao endotélio, através de projeções delgadas. Isso permite uma redução na velocidade do leucócito e rolamento sobre a célula endotelial (LEY et al., 1991). Esta aderência fraca e rolamento leucocitário são mediados por um grupo de moléculas conhecidas como E (endotelial), P (plaqueta) e L (leucócito) selectinas expressas tanto nos leucócitos quanto nas células endoteliais [veja Tabela 1] (LAWRENCE & SPRINGER, 1991).

As selectinas possuem, em sua porção N-terminal, um domínio com homologia com lectinas [moléculas que reconhecem açúcares] (LASKY ET al., 1989; BEVILACQUA & NELSON, 1993), e sendo dependente de íons Ca^{++} . As moléculas reconhecidas pelas selectinas incluem as sialomucinas, moléculas contendo um tetrassacarídeo, sialil Lewis X (sLe^x), sialil Lewis A (sLe^a) e outros açúcares, incluindo glicolipídios sulfatados (BEVILACQUA et al., 1991). O incremento da expressão de selectinas e seus ligantes podem ocorrer em tecidos ativados por citocinas, mediadores químicos da inflamação, produtos bacterianos e uma série de fatores produzidos ou liberados durante os processos inflamatórios (CYBULSKY et al., 1988; ULEVITCH & TOBIAS, 1995; DAVENPECK et al., 1998; JILMA et al., 1999; TURUNEN et al., 1995).

As sialomucinas são moléculas protéicas, ricas em serinas e treoninas, altamente glicosiladas, com estruturas bastante prolongadas, e que possuem regiões ricas em açúcar orto-ligadas. Algumas moléculas desta família apresentam em sua estrutura domínios similares ao da superfamília gênica das imunoglobulinas, como é o caso do MAdCAM. Além desta, outras sialomucinas como PSGL-1, GlyCAM-1, que estão presentes no endotélio vascular e servem como ligantes para L-selectina (LASKY, 1992; ROSEN, 1993), contribuindo na adesão dos leucócitos.

Tabela 1: Moléculas de adesão envolvidas nas interações monócito-endotélio e macrófago-matriz conjuntiva.

MOLÉCULA DE ADESÃO		DISTRIBUIÇÃO	RECEPTOR PRESENTE NO ENDOTÉLIO, LEUCÓCITO OU MATRIZ
Nome	Nomenclatura CD		
E-selectina	CD 62E	endotélio	molécula contendo sLe ^x , CLA
L-selectina [§]	CD 62L	leucócitos	molécula contendo sLe ^x MAdCAM1, CD34, GlyCAM1
P-selectina	CD 62P	endotélio, plaquetas	PSGL-1, molécula contendo sLe ^x
ICAM-1 [§]	CD 54	endotélio, leucócitos	LFA1, Mac1, CD34
ICAM-2 [§]	CD 102	endotélio	LFA1
PECAM1 [§]	CD 31	endotélio, leucócitos	PECAM1
VCAM1	CD 106	endotélio, algumas células macrofágicas	VLA4, $\alpha 4\beta 7$
LFA1 [§]	CD 11a	leucócitos	ICAM1, ICAM2
Mac1 [§]	CD 11b	leucócitos	ICAM1, iC3b, Fator B
p150,95 [§]	CD 11c	leucócitos	iC3b, ?
VLA1 [#]	CD 49a	leucócitos	Col, LN
VLA2 [§]	CD 49b	leucócitos	Col, LN
VLA3 [#]	CD 49c	leucócitos	Col, LN, Fn
VLA4 [§]	CD 49d	leucócitos (não neutrófilos)	VCAM1, TS, Fn
VLA5 [§]	CD 49e	leucócitos	Fn
VLA6 [§]	CD 49f	leucócitos	LN
H-CAM	CD 44	leucócitos, endotélio	Ácido hialurônico

? = receptor não identificado

TS = trombospondina, Fn = fibronectina, LN = laminina, Col = colágeno

[§] Moléculas de adesão expressas por macrófagos;

[#] Moléculas com baixa expressão em macrófagos (KLINGEMANN, 1989; HEMLER, 1991).

1.2.2 Integrinas e moléculas da superfamília gênica das imunoglobulinas

A adesão firme de leucócitos a outras células e componentes da matriz extracelular é mediada por receptores da família das integrinas (Tabela 1). Integrinas são proteínas transmembranares cuja porção citoplasmática se liga ao citoesqueleto, e seus domínios extracelulares se ligam a moléculas presentes nos componentes da matriz extracelular ou moléculas de adesão intercelular (ICAMs) presentes em outras células. Cada integrina consiste em um heterodímero composto por uma cadeia α e uma β , não covalentemente ligadas. Até o momento são conhecidas 8 subunidades das cadeias β e 16 subunidades das cadeias α (ROSEMBERG et al., 1999). As integrinas são agrupadas de acordo com as subunidades beta as quais podem se associar com diferentes cadeias α . Assim, 22 diferentes tipos de integrinas estão descritos na literatura.

As cadeias alfa têm muitas características estruturais em comum.

1) Elas apresentam aproximadamente sete repetições em *tandem*, de aproximadamente 60 aminoácidos, que possuem homologia com as estruturas dos “braços” das proteínas ligadoras de Ca^{++} , calmodulina e troponina, sendo que três ou quatro destas regiões contribuem para ligação com cátions divalentes (Ca^{++} e Mg^{++}). Contudo, a especificidade para cátions divalentes varia de acordo com a cadeia alfa usada pela integrina. Assim, $\alpha_L\beta_2$ e $\alpha_2\beta_1$ requerem magnésio, enquanto $\alpha_5\beta_1$ precisa de cálcio (HOGG, 1991).

2) Elas apresentam uma região de 180 aminoácidos similar aos domínios encontrados em proteínas da matriz cartilaginosa (fator de von Willebrand) e ao fator B do complemento, inserida entre os sítios de ligação de cátions divalentes e repetições em *tandem*. O domínio citoplasmático de muitas cadeias alfa é constitutivamente fosforilado e apresenta uma seqüência conservada (KXGFFKR) que se liga à calreticulina; esta seqüência parece ser crítica para a modulação da avidéz das integrinas (O'TOOLE et al., 1994).

As cadeias β apresentam repetições em *tandem* de quatro regiões ricas em cisteína, as quais são essenciais para a manutenção da estrutura terciária da integrina, sendo conservadas nos diferentes tipos de cadeias β . A porção N-terminal apresenta uma seqüência de aproximadamente 100 aminoácidos, que é crítica para a manutenção do heterodímero α/β . O domínio citoplasmático da subunidade β , bem como o da subunidade α , são necessários para modulação da avidéz (CARLOS & HARLAN, 1994). Defeitos decorrentes de mutações pontuais nestas regiões levam à ausência de expressão de $\beta 2$ integrinas em leucócitos. A ausência da cadeia $\beta 2$ leva ao desenvolvimento de uma doença conhecida como LAD tipo I (leukocyte adhesion deficiency type I), que determina um defeito no recrutamento de neutrófilos para os sítios de inflamação (ARNAOUT, 1990). Apesar da ausência de neutrófilos, outros leucócitos, como macrófagos e eosinófilos, são capazes de migrar para os tecidos inflamados nos pacientes com esta deficiência (HARLAN, 1993).

Os contra-receptores das integrinas na superfície endotelial e de outros leucócitos possuem domínios similares aos domínios V e C de imunoglobulinas (GAHMBERG et al., 1998). São portanto, moléculas da superfamília gênica das

imunoglobulinas. As principais moléculas de adesão desta família são: ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3, NCAM, VCAM-1, PECAM-1 E MAdCAM-1. Elas podem ser expressas por leucócitos (ICAM-1-3), células endoteliais (ICAM-1-2 e VCAM-1), células endoteliais altas de linfonodos profundos (MAdCAM-1) e fibroblastos (ICAM-1). Algumas destas moléculas como ICAM-1, VCAM-1 e PECAM-1 funcionam como importantes receptores celulares para as integrinas no processo de migração leucocitária (GAHMBERG et al., 1999).

1.3 Participação e função das integrinas nas ligações entre leucócitos e a matriz conjuntiva

As interações integrinas/matriz conjuntiva estão associadas à geração de sinais importantes para a migração direcional, proliferação, diferenciação fenotípica e sobrevivência celular (BACHMAN, 1997; PORTER & HOGG, 1998; WHITE et al., 1999; SANCHEZ et al., 1999). Muitos destes fenômenos estão intimamente relacionados com a função de células inflamatórias.

Um bom exemplo da função das integrinas pode ser ilustrado pelos linfócitos que expressam integrinas VLA-4 e VLA-5, as quais reconhecem diferentes domínios na fibronectina, uma das principais glicoproteínas da matriz extracelular (WAYNER et al., 1989; GARCIA-PARDO et al., 1990; YABKOWITZ et al., 1993); VLA-4 se liga à região CS1 da fibronectina, na qual a seqüência peptídica EILDV (CLEMENTS et al., 1994) é crítica, e também a seqüências RGD (YANG et al., 1998); VLA-5 reconhece as seqüências repetidas do tripeptídeo RGD (MOULD et al., 1991). A ligação dos

receptores de fibronectina contribuem para eventos críticos da resposta imune, incluindo adesão e migração leucocitária (YIN, 1999).

Apesar das células T apresentarem os receptores VLA-4 e 5 para fibronectina, experimentos utilizando superfícies recobertas de fibronectina mostraram que as células T aderem pouco na ausência de ativação por citocinas, reconhecimento de antígenos, ligação do CD2, CD28 ou outros estímulos, os quais tornam as integrinas competentes para mediar a adesão celular sem mudança substancial na intensidade destas na membrana plasmática (MACDOWALL, 1998). A exata natureza dessa adesividade é desconhecida, mas há evidências de que resulte de mudanças conformacionais nas integrinas (MACDOWALL, 1998), alteração nas taxas de difusão de integrinas para a membrana celular, mudanças na concentração local de integrinas, organização do citoesqueleto ou interações citoesqueleto/integrina (SHENOI et al., 1999).

1.4 Mecanismos envolvidos na regulação das integrinas

As moléculas de integrinas podem ser reguladas de forma quantitativa ou qualitativa. A regulação quantitativa envolve a translocação de moléculas armazenadas em grânulos citoplasmáticos, enquanto que mudanças qualitativas envolvem alterações da afinidade e/ou avidéz das integrinas expressas sobre a superfície celular podendo ser mais importante para o processo de migração celular do que mudanças quantitativas (CARLOS & HARLAN, 1990).

A modulação da afinidade das integrinas envolve a propagação de mudanças conformacionais dos domínios citoplasmáticos para os domínios extracelulares responsáveis pela ligação receptor/contra-receptor (SASTRY & HORWITZ, 1993; HOGG et al., 1993), determinando o remodelamento do citoesqueleto da célula (HUGHES & PFAFF, 1998). Por outro lado a modulação da avidéz envolve a ligação multivalente de integrinas por seus ligantes.

Em verdade, mudanças tanto na afinidade das integrinas por seus contra-receptores bem como na avidéz não são mutuamente exclusivas e a contribuição relativa de cada um destes eventos na relação receptor/contra-receptor varia de acordo com o tipo de integrina e o contexto celular (HOGG & LANDIS, 1993; CARLOS & HARLAN, 1994).

Para que ocorram mudanças qualitativas, isto é, alteração do estado funcional das moléculas de integrinas expressas nos leucócitos, são necessários estímulos exógenos que desencadeiem mudança de estado conformacional da molécula levando a uma alta afinidade pelo seu ligante.

Os estímulos exógenos que desencadeiam a ativação de integrinas podem ser: a ligação das selectinas, expressas pelos leucócitos, por seus contra-receptores (SMITH et al., 1993); produtos bacterianos, como LPS (DAVENPECK et al., 1998); citocinas, a exemplo de GM-CSF e IL-5 (WILLIAMS et al., 1998; SUN et al., 1999); quimiocinas (SIZANE et al., 1999; SANCHEZ-MADRID & DEL POZO, 1999), discutidas mais adiante; quimioatraentes como C5a e fMLP (ALTIERE & EDGINGTON, 1988; LAFRENIE et al., 1996); ativadores de proteínas cinases C

como o forbol miristato acetato (NAGAHATA et al., 1996) e fagocitose de partículas de zimosan (THORNTON et al., 1996).

Atualmente, muitos estudos tentam documentar um possível papel da fosforilação de tirosina na regulação da adesão celular. Assim, alguns trabalhos mostram que a fosforilação de tirosina dependente de integrina medeia a transdução de sinal e a organização do citoesqueleto nos sítios de adesão focal, e que as proteínas fosforiladas acumulam-se nas adesões mediadas por integrinas. A perda de cinases da família SRC afeta tanto a cinética de adesão como a sinalização mediada por integrinas. Dados experimentais sugerem que a fosforilação de proteínas contendo tirosina podem aumentar a adesão celular sugerindo que tirosina-fosfatases, bem como cinases, podem afetar a adesão celular (SHENOI, 1999).

Além de migração celular, a adesão mediada por integrinas é requerida para resposta proliferativa a fatores de crescimento em diversos tipos celulares. Na ausência de adesão, estes fatores induzem um sinal abortivo. O sinal dependente de adesão requer a mediação de integrinas que ativem as cascatas enzimáticas de tirosinas-cinases. Apesar das integrinas não possuírem atividade de cinase, a porção citoplasmática delas pode associar-se com algumas tirosina-cinases, direta ou indiretamente (SHENOI, 1999).

1.5 Quimioatraentes clássicos e quimiocinas

Os quimiotáticos constituem um amplo grupo de substâncias, incluindo produtos bacterianos (fMLP e LPS) e endógenos (como C5a e leucotrieno-B4). Recentemente foram adicionadas a este grupo citocinas (intercrinas ou quimiocinas) com potente ação quimiotática (LUSTER, 1998) e capacidade discriminatória, agindo de maneira mais ou menos específica sobre diferentes populações de leucócitos (tabela II e III).

Tabela II: Quimiotáticos clássicos e células alvo.

GRUPO	QUIMIOTÁTICO	CÉLULA ALVO
Endógenos	C5a, LTB4, PAF	Neutrófilos, eosinófilos, monócitos, basófilos
Exógenos	Formil-metil-peptídio, LPS	neutrófilos

(ROSEMBERG et al., 1999)

As quimiocinas são as substâncias mais importantes na ativação e regulação de moléculas de adesão durante o tráfego leucocitário. Elas são proteínas de 8-10 Kd produzidas por diferentes tipos celulares e atuam, ao ligarem-se a receptores específicos, na migração e direcionamento de leucócitos para os sítios inflamatórios e de endereçamento.

Os estímulos que desencadeiam a secreção de quimiocinas podem ser: produtos bacterianos, C5a, LTB4, IFNs e citocinas pro-inflamatórias (STRIETER, 1996). As quimiocinas são agrupadas, de acordo com o resíduo de cisteína presente

na porção N-terminal, em quatro famílias: CXC, CC, C e CX₃C (Tabela III). A família CXC apresenta um aminoácido separando os dois primeiros resíduos de cisteína; a família CC apresenta os resíduos adjacentes; a família C apresenta apenas um resíduo de cisteína e tem apenas um representante que é a linfotactina. A família CX₃C apresenta três aminoácidos entre os dois primeiros resíduos de cisteína (ROLLINS, 1997; LUSTER 1998; MANTOVANI, 1999).

Os receptores para quimiocinas são proteínas que atravessam a membrana celular sete vezes. Eles são estruturalmente relacionados e apresentam-se acoplados à proteína G (PREMARCK & SCHALL, 1996); são portanto capazes de transmitir sinais para o interior da célula; que resultam em modificações estruturais nas moléculas de adesão celular, aumento da afinidade de integrinas, intensificação da expressão de integrinas e/ou aumento da afinidade/avidéz pelos ligantes expressos nos sítios de migração (CARLOS & HARLAN, 1994; PREMARCK & SCHALL, 1996).

Existe uma grande variedade de receptores os quais são agrupados de acordo com a classe de quimiocinas a que respondem (Tabela IV). Além disso, um receptor pode responder a um ou mais tipos de quimiocinas possibilitando que diferentes populações leucocitárias respondam ao estímulo induzido pela quimiocina (WELLS et al., 1999; PELCHEN-MATTHEWS et al., 1999; ROSSI & ZLOTNIK, 2000).

Tabela III: Principais quimiocinas e células alvo

Família	Quimiocinas	Células alvo
C-C	MCP-1	Monócitos, basófilos, linfócitos T de memória, células NK
	MCP-2, 3 e 4	Monócitos, eosinófilos, linfócitos T de memória, células NK
	MIP-1 α , β	Monócitos, células T, basófilos, eosinófilos, neutrófilos
	RANTES	Monócitos, células T, eosinófilos, células dendríticas, células NK
	Eotaxina	Eosinófilos
	I-309	Monócitos
C	Linfotactina	Células NK
C-X-C	ENA-78, LIX	Neutrófilos
	NAP-2	Neutrófilos, basófilos
	IL-8	Neutrófilos, basófilos
	PF-4	Fibroblasto, células endoteliais
	IP-10	Linfócitos T ativados, células NK, células endoteliais(?)
	MIG	Linfócitos ativados
	SDF-1	Linfócitos T e B
	GRO α , β e γ	Neutrófilos, melanócitos, células endoteliais(?)
C-X ₃ -C	Neurotaxina/fractalcina	Neutrófilos, monócitos, macrófagos

(LUSTER, 1998; PELCHEN-MATTHEWS et al., 1999)

A ação coordenada de moléculas de adesão do endotélio e quimiotáticos determina uma seqüência de sinais (códigos de área) que selecionam o tipo de célula inflamatória e indica o sítio de migração nas diferentes etapas da inflamação ou recirculação leucocitária (SPRINGER, 1994; ROSSI & ZLOTNIK, 2000).

Tabela IV: Principais receptores de quimiocinas

Receptor de quimiocinas	Ligantes
CXCR1	IL-8, GCP-2
CXCR2	IL-8, GCP-2, GRO α , β e γ , ENA-78, PBP
CXCR3	MIG, IP-10, I-TAC
CXCR4	SDF-1/PBSF
CXCR5	BLC/BCA-1
CCR1	MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES, HCC-1,2,3 e 4
CCR2	MCP-1, MCP-2, MCP-3 e MCP-4
CCR3	Eotaxina-1, eotaxina 2, MCP-3
CCR4	TARC, MDC, MIP-1 α , RANTES
CCR5	MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES
CCR6	MIP-3 α /LARC
CCR7	MIP-3 β /ELC, 6Ckine/LC
CCR8	I-309
CCR9	TECK
XCR1	Linfotactina
CX ₃ CR1	Fractalcina/neurotoxina

(PELCHEN-MATTHEWS et al., 1999; ROSSI & ZLOTNIK, 2000)

1.6 Métodos de estudo da adesão celular

Os estudos *in vivo* do processo de migração celular em algumas patologias baseiam-se em estratégias de inoculação de células marcadas com corantes fluorescentes ou com isótopos radioativos, os quais permitem discriminar o trajeto e a localização das células (LAPPIN et al., 1999). *In vitro*, os modelos de migração celular utilizam secções de tecido (STAMPER & WOODRUFF, 1976), componentes purificados da matriz conjuntiva extracelular ou câmaras com monocamadas de

células endoteliais (PRYCE et al., 1994), sobre os quais os leucócitos são adicionados. Estes modelos permitem a avaliação dos sítios e cinética de adesão das moléculas envolvidas no processo de adesão e migração celular.

1.7 O modelo de adesão de Stamper & Woodruff

No modelo de adesão, descrito por STAMPER-WOODRUFF (1976), 5×10^6 linfócitos são colocados sobre secções de linfonodo obtidas com criostato, em uma mesa rotatória a velocidade de 80 rpm e à temperatura de 7 °C. Após 30 minutos, as células não-aderentes são removidas por uma cuidadosa lavagem com PBS sendo então fixadas, coradas e examinadas ao microscópio. Este ensaio permitiu que STAMPER & WOODRUFF (1976) confirmassem que linfócitos do sangue aderem ao endotélio alto, e que esta seria a via de recirculação leucocitária.

STAMPER & WOODRUFF (1976) notaram que populações de diferentes órgãos aderem de modo diferente à HEV, por exemplo, linfócitos provenientes do timo aderem menos às HEV do que populações obtidas do baço, linfonodo ou do ducto torácico. Uma série de estudos posteriores mostram que esta aderência é mediada por selectinas (JALKANEN et al., 1986).

Variação na temperatura ou no tipo de fixação dos diferentes tipos de tecido, antes dos ensaios de adesão, interferem com o experimento. STAMPER-WOODRUFF (1976) utilizaram glutaraldeído para fixar as secções de linfonodo. VORA et al. (1995) mostraram, porém, que a fixação com glutaraldeído promove um

“efeito carpete” em ensaios de adesão a secções de cérebro, ou seja, os linfócitos aderem por toda a secção indiscriminadamente. Assim, muitos autores têm preferido a fixação com 1% de paraformaldeído (SAWADA et al., 1993), acetona (CHAKRAVORTY et al., 1999) ou mesmo utilizam tecido sem fixação (VORA et al., 1995; YEDNOCK et al., 1992). Isso pode sugerir que diferentes tecidos têm características específicas que modificadas pelo processo de fixação induzem a maior ou menor adesão não-específica de células.

Quanto à temperatura, STAMPER & WOODRUFF (1977) chamam a atenção para que a adesão específica de linfócitos às HEV só ocorre à temperatura de 7°C. Enquanto que temperaturas mais altas (21 e 37°C) levam a uma diminuição da especificidade do ensaio (STAMPER & WODRUFF, 1977). O fenômeno foi revisto por VORA et al., (1995), que observaram uma diminuição de 60% da adesão específica à HEV na temperatura de 22°C e de 90% na temperatura de 37°C. Nestas temperaturas um maior número de células aderiram a sítios não-vasculares. Ainda que nestes estudos a aderência a sítios não-vasculares seja considerada inespecífica, GROBER et al. (1993) ressaltam que estas interações são, provavelmente, mediadas por receptores de potencial significância funcional.

Na verdade, como mostrado por diferentes autores, a adesão de linfócitos em baixas temperaturas é mediada por moléculas de adesão envolvidas no rolamento de leucócitos como as selectinas, uma vez que a ligação de linfócitos à HEV pode ser inibida por D-manose e L-fucose (YEDNOCK et al., 1987), pelo anticorpo 2H5 contra Sialyl Lewis X — um oligossacarídeo reconhecido pelas selectinas — (SAWADA et al., 1993), pela ação da sialidase (ROSEN et al., 1989) e pelo

tratamento dos linfócitos com agentes quelantes de Ca^{++} — EDTA e EGTA — (WOODRUFF et al., 1977). É provável também que, à temperatura de 7°C , integrinas como VLA-4 e LFA-1 em estados de baixa afinidade contribuam para a rolagem de linfócitos sobre HEV (YEDNOCK et al., 1987).

Como revisado acima, o estado funcional das integrinas dos leucócitos pode variar entre baixa e alta afinidade. Esta passagem do *status* de baixa afinidade para alta afinidade pode decorrer da ação direta de substâncias nas moléculas de integrinas como cátions divalentes (ALTIERI, 1991; LABADIA et al., 1998), anticorpos (REZZONICO et al., 2000) e etc., ou por estímulos que levem à ativação celular (DAVENPECK et al., 1998). O aumento da afinidade resulta de mudanças conformacionais e da avidéz (mobilização) dos receptores na superfície celular (MACDOWALL et al., 1998). Todos estes processos são dependentes de energia e não estão ativados à baixas temperaturas (CLEMENTS, 1994).

A adesão de linfócitos ainda pode ser inibida por agentes que suprimem a glicólise (iodoacetato) ou a fosforilação oxidativa — azida — (WOODRUFF et al., 1977), pela ação de inibidores de proteínas cinases como Genesteína, inibidor competitivo dos sítios de ligação de ATP, Tifostina Ag 490, inibidor seletivo da cinase JAK-2 (CONSTANTIN et al., 1999).

Em resumo: (1) ausência de ativação das integrinas em baixas temperaturas pode justificar a não-aderência à matriz e células do tecido conjuntivo no ensaio clássico de STAMPER-WOODRUFF, enquanto o (2) aumento da temperatura favorecendo ao uso de energia para a ativação de integrinas leva a um aumento das

ligações a sítios intersticiais que não vasculares, interpretado originalmente como adesão inespecífica.

Desta maneira, BARBÉ et al. (1996) demonstraram, que à temperatura ambiente ($\cong 25^{\circ}\text{C}$), eritroblastos aderem ao redor dos macrófagos em secções de medula óssea e que esta adesão pode ser inibida parcialmente por α -VLA-5.

Também em ensaios de adesão de linfócitos, realizados em temperatura ambiente, as células aderem a áreas túbulo-intersticiais em secções de tecido renal de pacientes com glomerulonefrite e rejeição aguda a transplante. Esta adesão é inibida predominantemente pelo peptídeo CS1 ou anticorpos anti VLA-4 (CHAKRAVORTY et al., 1999).

Apesar destas evidências, as interações leucócitos/tecido conjuntivo foram pouco exploradas e não há estudos sistemáticos sobre os elementos que interferem na especificidade destas ligações *in vitro*. Desta forma, neste trabalho, pretendemos adaptar o ensaio de STAMPER-WOODRUFF para o estudo das interações entre macrófagos e tecido conjuntivo. Esperamos assim, estabelecer os parâmetros necessários para os estudos funcionais *in vitro* das interações macrófago/tecido conjuntivo. Temos em perspectiva a utilização destes ensaios no estudo de patologias, especialmente infecções intracelulares por patógenos que têm como alvo as células macrofágicas.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Adaptar o ensaio de adesão de células a secções de tecido — ensaio de STAMPER & WOODRUFF (1976) — para o estudo das interações entre células macrofágicas e o tecido conjuntivo.

2.2 Objetivos específicos

1. Avaliar a adesão de células macrofágicas à matriz conjuntiva de pele normal ou transformada por processo inflamatório.
2. Determinar os componentes moleculares (moléculas de adesão celular e macromoléculas da matriz conjuntiva) que participam do processo:
 - a- dependência de cátions divalentes (Ca^{++} e Mg^{++}).
 - b- bloqueio dos sítios de adesão com:
 - Anticorpos monoclonais contra moléculas de adesão;
 - Peptídeos contendo seqüência RGD e LDV, reconhecidos por receptores de fibronectina.
3. Definir modelos de aplicação da técnica adaptada.

3 JUSTIFICATIVA

Existem poucos estudos explorando as interações de leucócitos com o tecido conjuntivo em sua organização nativa. Consideramos importante a padronização de um ensaio de adesão baseado no modelo de STAMPER-WOODRUFF (1976) para utilização no estudo das interações celulares com componentes matriciais e células do tecido conjuntivo. Isto permitirá a (1) avaliação das interações das células com o conjunto dos constituintes do tecido matricial, impossível de ser obtida utilizando componentes purificados; (2) permitirá também a análise comparativa das interações celulares nos diferentes processos inflamatórios.

Assim, nos propusemos a adaptar o ensaio de adesão originalmente descrito por STAMPER-WOODRUFF para o uso no estudo das interações de células macrofágicas com a matriz conjuntiva. Para isso utilizamos células da linhagem J774 e secções de pele de camundongo BALB/c a fim de determinar as condições experimentais mais apropriadas para a execução dos experimentos. Demonstraremos também algumas possibilidades de utilização do ensaio.

Como enfatizamos na introdução, escolhemos células macrofágicas pelo seu papel central na defesa e gênese de lesão em doenças infecciosas e parasitárias; especialmente àquelas causadas por patógenos intracelulares.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Indução de inflamação aguda em camundongos BALB/c

Camundongos isogênicos da linhagem BALB/c, de idade variável entre 8 a 12 semanas obtidos do Biotério do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz (Fiocruz, Salvador), foram utilizados para indução de inflamação aguda (bolsão inflamatório). Os animais foram anestesiados com éter etílico e então submetidos a tricotomia do dorso. Em seguida foi injetado 5 ml de ar e 200 µl de óleo de soja com 0,1% de óleo de cróton, gentilmente cedido por Dr. Luiz Antônio Rodrigues de Freitas (Laboratório de Patologia e Biologia Celular, CPqGM/Fiocruz/Salvador), por animal. Os animais foram então acondicionados adequadamente no biotério de experimentação em regime alimentar e hídrico *ad libitum*. Todo o trabalho foi desenvolvido de acordo com as normas da comissão de ética em pesquisa da Fiocruz.

4.2 Preparação dos blocos e secções de pele inflamada de camundongo BALB/c

Após três dias da indução de inflamação com óleo de cróton, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e a pele do dorso, com o bolsão inflamatório, foi removida e cortada perpendicularmente à epiderme em fragmentos de aproximadamente 3 mm de espessura. Esses fragmentos de tecidos foram embebidos em Histo prep (Fisher Scientific, LA, CA), congelados em nitrogênio líquido e mantidos a -70° C, até a realização dos ensaios de adesão.

No dia de realização dos ensaios, um bloco foi selecionado para ser cortado em um micrótomo de congelação Leica CM1780 com a finalidade de se obter secções de pele inflamada de 7 μ m de espessura. As secções foram colocadas sobre lâminas de vidro, previamente recobertas com gelatina, que em ensaios prévios mostrou-se capaz de induzir uma adesão mínima dos macrófagos, e mantidas sobre o gelo até o início do ensaio de adesão.

4.3 Cultivo de macrófagos da linhagem J774G.8

Células macrofágicas de linhagem J774G.8 de camundongos BALB/c, obtidos do banco de células do Rio de Janeiro (BCRJ Nº CRO28), foram cultivados em RPMI 1640 (Gibco, Grand Island, NY, EUA) suplementado com 10% de soro bovino fetal (Hyclone Lab Logan, Utah, EUA) inativado pelo calor, contendo 60 μ g/ml de gentamicina e 2mM de L-glutamina (Sigma, St. Louis, EUA). As células foram cultivadas em garrafas plásticas estéreis (Costar, New York, EUA) mantidas em estufa à temperatura de 37°C e 5% de CO₂ até confluência das células. Ao atingir a fase de confluência, as células foram removidas dos frascos de cultura com HBSS sem Ca⁺⁺ e Mg⁺⁺ (Sigma) frio, lavadas duas vezes por centrifugação a 1600 rpm por 5 minutos em HBSS sem Ca⁺⁺ e Mg⁺⁺, ressuspensas em RPMI completo na concentração de 2x10⁶ células/ml. As células foram distribuídas em tubos não-aderentes, de acordo com os diferentes tratamentos a serem utilizados, e incubadas por 24 horas à 37°C e 5% de CO₂ até a realização do ensaio de adesão.

4.4 Obtenção de macrófagos peritoniais

Camundongos BALB/c foram inoculados com 3 ml de tioglicolato por via intraperitoneal. Após três dias, foram sacrificados para realização da lavagem peritoneal com 10 ml de HBSS. As células obtidas foram lavadas duas vezes em HBSS e ressuspensas em RPMI completo na concentração de 2×10^6 células/ml. Tipicamente estas preparações apresentavam uma pureza acima de 70% de células com granulosidade compatível com células macrofágicas em exame de citometria de fluxo. As células foram distribuídas em tubos não-aderentes, de acordo com o grupo de tratamento a ser testado, e incubadas por 24 horas à 37°C e 5% de CO₂ até a realização do ensaio de adesão.

4.5 Isolamento de monócitos humanos

Monócitos humanos normais foram isolados a partir de bolsas de sangue periférico obtido do Hemocentro do Estado da Bahia (Hemoba). O sangue foi diluído 1:2 em RPMI, e 20 ml desta solução foi adicionada sob 10 ml Ficcoll-Hypaque (Sigma) em tubos de polipropileno de 50ml e centrifugado a 1600 RPM por 30 minutos e na temperatura de 20°C. Os mononucleares obtidos neste gradiente foram lavados em HBSS (Sigma) e ressuspensos em 2,5 ml de RPMI contendo 70% de Percoll (Sigma), sobre esta solução foram adicionados 2,5 ml de RPMI contendo 50%, 40% e 25% (3ml) de Percoll e centrifugado a 3400 RPM por 15 minutos à temperatura ambiente, para separação dos monócitos. A pureza da população de monócitos obtida estava tipicamente acima de 87% (medida por citometria de fluxo,

utilizando granulidade como parâmetro). As células foram lavadas duas vezes em HBSS e ressuspensas em RPMI completo (contendo 10% de SBF, 2mM de glutamina, 2,2 g/l de bicarbonato) em uma concentração de 2×10^6 células/ml. Foram então, incubados em tubos não aderentes a 37° C e 5% CO₂, por 24 h.

4.6 Ensaio de adesão com secções de pele

Para a realização dos ensaios de adesão, as secções de pele inflamada foram secas a temperatura ambiente por 10 minutos, fixadas com acetona por 3 minutos, lavadas com PBS com Ca⁺⁺ e Mg⁺⁺ (0,5 mM), incubadas com uma solução de HBSS mais 4mg/ml de albumina sérica bovina (Sigma) por 20 minutos à temperatura ambiente e novamente lavadas em PBS contendo Ca⁺⁺ e Mg⁺⁺. As células previamente incubadas em tubos não-aderentes e submetidas a diferentes tratamentos foram lavadas duas vezes em HBSS e ressuspensas na concentração de 10^7 células/ml e adicionadas sobre as secções (10^6 células/secção), por 30 minutos à temperatura ambiente e sobre uma mesa rotatória a 80 rpm. Ao término do período de incubação, as lâminas foram lavadas 3x em PBS, para remoção das células não-aderentes, fixadas com 2% de glutaraldeído (Sigma), por 10 minutos e coradas em hematoxilina eosina, para posterior exame dos sítios preferenciais de adesão e quantificação das células aderidas.

A quantificação das células aderidas foi feita utilizando um analisador e processador de imagens [Leica Quantimet Q500MC (Leica Cambridge, Cambridge, UK)], onde foram realizadas captura da imagem, usando a objetiva de 10x, de três áreas de $0,065\text{mm}^2$ por secção para quantificação das células aderidas. Após a

captura da imagem, foi feita a quantificação direta e automática das células aderidas. Para tal, ajustamos o equipamento com os seguintes comprimentos de onda: vermelho entre 0 a 193nm, verde entre 0 a 255nm e azul 0 a 205nm.

4.7 Envolvimento de cátions divalentes no processo de adesão

Macrófagos J774G.8 foram incubados por 24 h em tubos não aderentes, como descrito anteriormente, lavados 2 vezes com HBSS sem Ca^{++} e Mg^{++} e ressuspensos em HBSS com 10% de SBF, contendo EDTA ou Mn^{++} (Sigma) na concentração de 2 mM, e em seguida adicionados sobre as secções.

4.8 Efeito da ativação de macrófagos no processo de adesão

Macrófagos J774G.8 foram tratados com lipopolissacarídeo [LPS (Sigma)] em diferentes concentrações ou incubados com partículas de zimosan, gentilmente cedidas pela Dr.^a Patrícia S. T. Veras (Laboratório de Patologia e Biologia Celular CPqGM/Fiocruz), na proporção de dez partículas por macrófago por 24 horas antes dos ensaios. Além destes, foi utilizado forbol miristato acetato [PMA (Sigma)], na concentração de 1ng/ml por 10 minutos, antes da adesão às secções.

4.9 Imunohistoquímica

Secções de pele congelada do bolsão inflamatório foram colhidas em lâminas com poli L-lisina (Sigma), secas por 15 minutos à temperatura ambiente e fixadas com acetona -20°C por 3 minutos. Após esta etapa as secções foram lavadas com PBS, incubadas com 50 μl de uma solução de PBS contendo azida e H_2O_2 por 45 minutos (bloqueio da peroxidase endógena). Foram lavadas com PBS e incubadas com 50 μl de HBSS contendo 4 mg/ml de soro normal de cabra (Sigma) por 45 minutos (bloqueio dos sítios de ligações inespecíficas). Foram então incubadas com o anticorpo primário [MAC-1 ou H-CAM (Pharmlingen, CA, EUA)] ou IgG de rato (produzido em nosso laboratório), como controle negativo, na concentração de 1 $\mu\text{g/ml}$, por 18 horas em câmara fria (4°C).

No dia seguinte, as secções foram lavadas com PBS a 0,2% de Tween 20 (Sigma), incubadas por uma hora com anticorpo biotilado anti IgG de rato (Sigma) na diluição de 1:1000, lavadas três vezes com PBS contendo 0,2% de Tween. Foram então incubadas por 45 minutos com strepto-avidina (Amersham Pharmacia, SP, BR) diluída 1:800 e lavadas com PBS. Depois disso, a reação foi revelada com uma solução de PBS contendo 3 mg de 3,3'diaminobenzidina (Sigma) e 10 μl de H_2O_2 . Finalmente, as secções foram contra-coradas com Hematoxilina (Sigma).

4.10 Ensaio de inibição da adesão de células J774G.8 a pele inflamada de camundongos BALB/c

A fim de se determinar as potenciais moléculas de adesão envolvidas no processo foram realizados experimentos de bloqueio com peptídios: CS-1 — DELPQLVTLPHPNLHGPEILDVPST —, fragmento de fibronectina que contém o tripeptídio LDV reconhecido pela integrina α_4 (WEEKS et al., 1991; KOMORIYA et al., 1991) e RGD -RGDS- (Sigma) a fim de bloquear, respectivamente, VLA-4 e VLA-5. Como controles foram utilizadas dois peptídios com seqüência similar, porém truncadas, um com CS-1 — DELPQLVTLPHPNLHGPPVTSELID — e o outro com RGD -GRGES- [tCS-1 e tRGD, cedidos gentilmente por Dr. Antônio José O. dos Santos (Amgen- Canada) (WEEKS et al., 1991; KOMORIYA et al., (1991)]. Além disso, também foram usados anticorpos monoclonais contra integrinas que possuem a cadeia β_2 (clone game 46, Pharmingen, CA, EUA) e contra a cadeia α_4 (clone R 1-2, Pharmingen). Como isótipos controle foram utilizados o clone R3-34 (IgG1, Pharmingen) e o clone R35-38 (IgG2b, Pharmingen). Assim, células e secções foram tratadas previamente com 1 mg/ml de peptídios ou com anticorpos, 25 μ g por 10^6 células e 20 μ g/ml para as secções, durante 30 minutos a temperatura ambiente antes da adesão às secções de pele.

4.11 Aplicação do ensaio no estudo da adesão de células infectadas por parasitas intracelulares

Em alguns experimentos, células J774G.8 foram infectadas com *Leishmania amazonensis* (cepa WHOM/Br88-BA-125-Leila) ou *Mycobacterium avium* da variante virulenta (gentilmente cedidas pela Dr.^a Patrícia S. T. Veras), também foram realizados experimentos com macrófagos humanos e peritoniais infectados com *Leishmania*, para avaliar a potencial interferência da infecção de parasitos intracelulares no processo de adesão dos macrófagos ao tecido conjuntivo da pele. As células foram incubadas por 24h em tubos não aderentes (Falcon) com promastigotas de *Leishmania* ou *Mycobacterium* ou partículas de látex de 3 μm (Sigma), na proporção de 10 microorganismos ou partículas de látex por macrófago, à 37°C e 5% de CO₂. A taxa de infecção ou a fagocitose de látex foi avaliada por coloração com *Giemsa*, Zielh-Nielsen ou hematoxilina-eosina. (fig. 4.1).

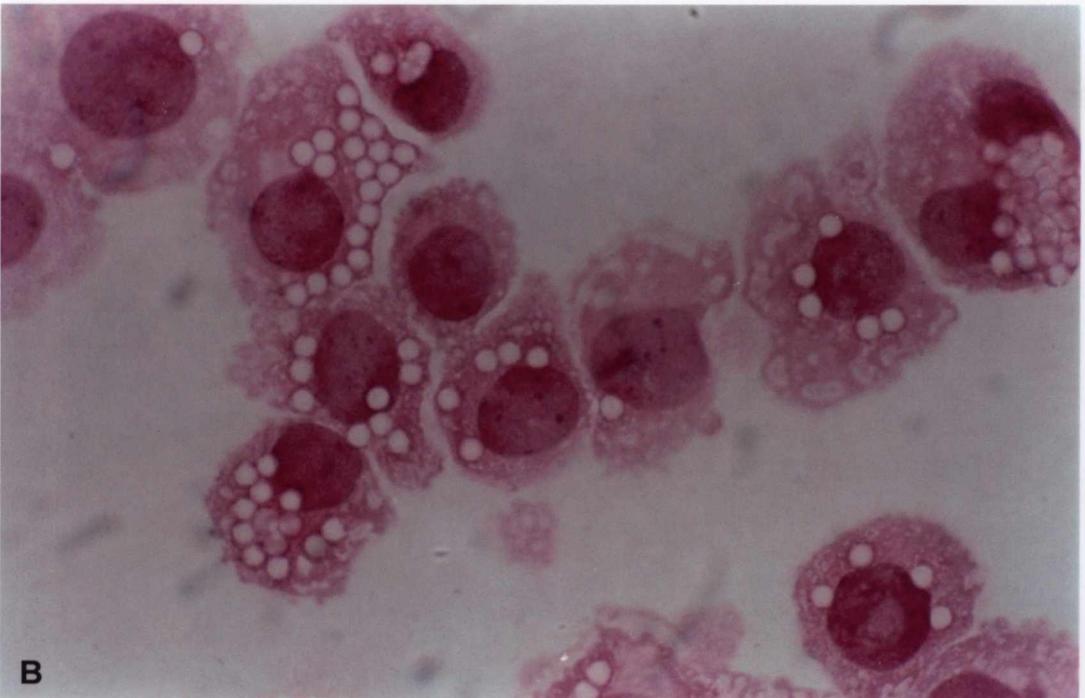
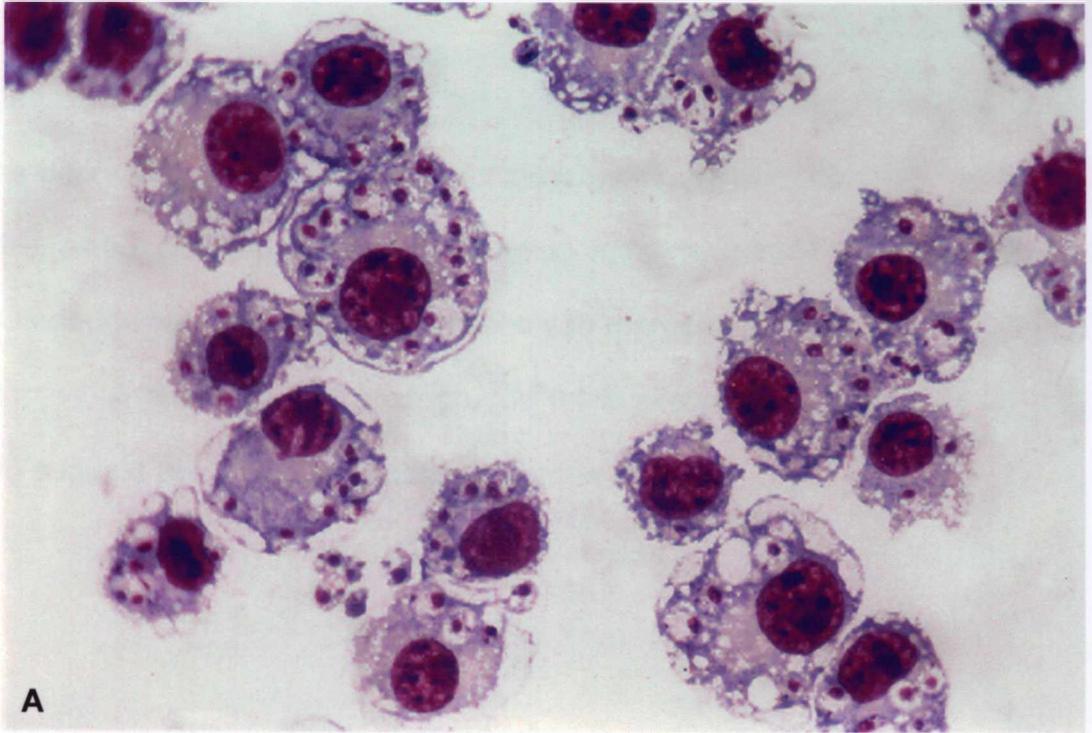


Figura 4.1: Células J774 após fagocitose de *Leishmania amazonensis* (A) e após fagocitose de partículas de látex de 3µm (B). Aumento de 1000X.

4.12 Análise estatística:

Cada tratamento foi realizado em pelo menos triplicata com três contagens em áreas diferentes previamente selecionadas e equivalentes em cada secção. Os resultados estão apresentados como médias mais ou menos o erro padrão da média. Os dados apresentados nos gráficos são representativos de pelo menos três experimentos. A diferença entre os grupos foi avaliada pela análise de variância (ANOVA) seguido pelo teste de Student-Newman-Keuls.

5 RESULTADOS

5.1 Estabelecimento preliminar das condições do ensaio

Em ensaios preliminares a fixação das secções com glutaraldeído, como utilizado por STAMPER-WOODRUFF (1976), levou a uma adesão indiscriminada de células por toda a secção, um “efeito tapete”. Optamos, por isso, pela fixação com acetona, a qual possibilitou uma discriminação melhor das áreas de adesão (conforme descrito mais adiante). Adotamos a agitação a uma velocidade de 80 rpm para a realização dos ensaios, baseado em dados da literatura que mostram que esta velocidade permite uma interação adequada de células com o substrato de adesão (STAMPER & WOODRUFF, 1976; YEDNOCK et al., 1987; ROSEN et al., 1989). Utilizamos 100 μ l da suspensão de células por ser um volume suficiente para cobrir secções e permitir a distribuição da suspensão de maneira uniforme em um círculo de 1cm de diâmetro, mantido o tempo de incubação (TURUNEN et al., 1995; TOPPILA et al., 1997; NAKANO et al., 1997). O ensaio foi realizado à temperatura ambiente, resultando em uma adesão firme das células, não desfeita mesmo após múltiplas lavagens com PBS (ver abaixo). Nestas condições as células aderem a áreas específicas nas secções de pele inflamada e apresentam espalhamento do citoplasma (Fig.5.1).

5.2 Análise dos sítios preferenciais de adesão

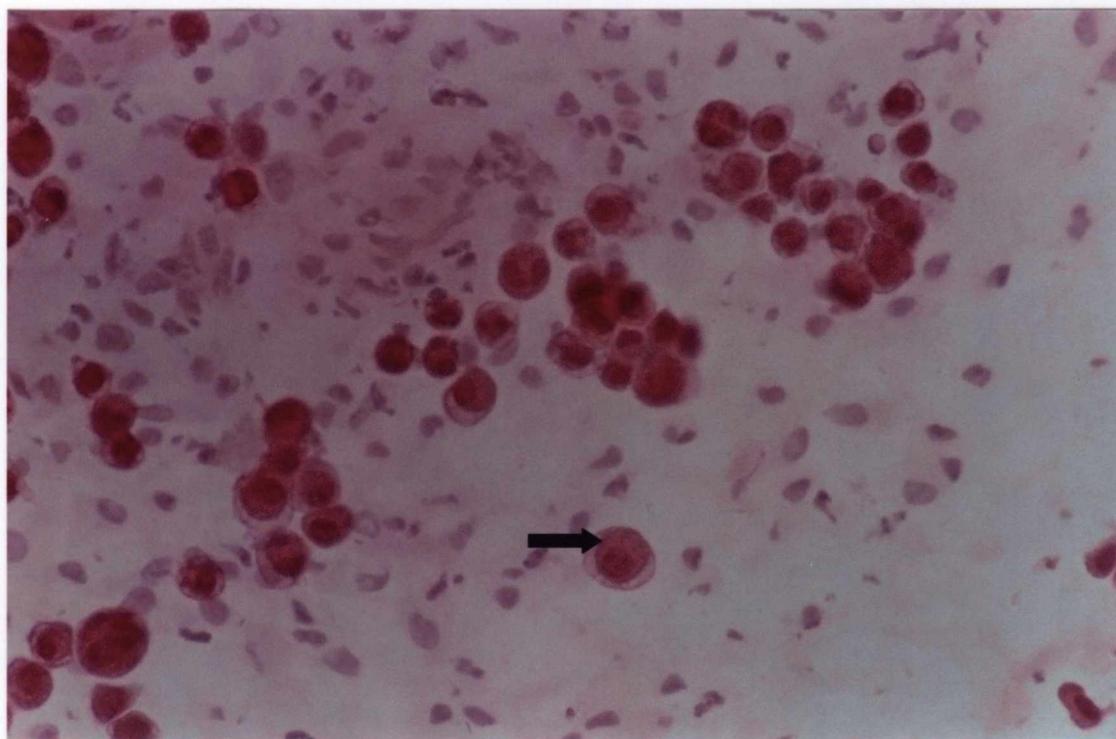
Nas condições descritas acima, células macrofágicas de linhagem J774 aderem preferencialmente a regiões inflamadas da pele, que circundam o bolsão

inflamatório induzido com óleo de cróton (fig. 5.2A), existindo pouquíssima ou nenhuma adesão nas áreas de tecido normal. Há também uma maior frequência de células aderidas a áreas de regeneração epitelial, em relação ao epitélio normal (fig. 5.2B).

5.3 Avaliação da concentração ideal de células a serem utilizadas nos ensaios de adesão

A partir dos resultados iniciais procuramos otimizar as condições para realização dos ensaios, determinando a concentração adequada de células, preservação dos sítios de adesão pós congelamento das secções e necessidade da simulação de fluxo durante a etapa de coincubação das células com as secções.

Foram realizados ensaios de adesão com diferentes concentrações de células a fim de se determinar a concentração ideal para utilização nos ensaios seguintes (fig. 5.3). O uso de concentrações de células entre $2,5 \times 10^5$ – 1×10^6 apresentou uma correlação linear com $p=0,002$ e representa o intervalo da curva de adesão que permite, portanto, detectar mais facilmente modificações geradas por manipulação experimental no sistema.



5.1 - Espalhamento do citoplasma das células após o ensaio de adesão.

Macrófagos J774 após 24h de incubação em tubos não-aderentes foram adicionados sobre secções de pele inflamada de camundongo BALB/c, na concentração de 10^6 células por secção e sobre uma mesa rotatória a velocidade de 80rpm. As células aderidas apresentam espalhamento do citoplasma sobre o substrato de adesão (seta). Aumento de 430X

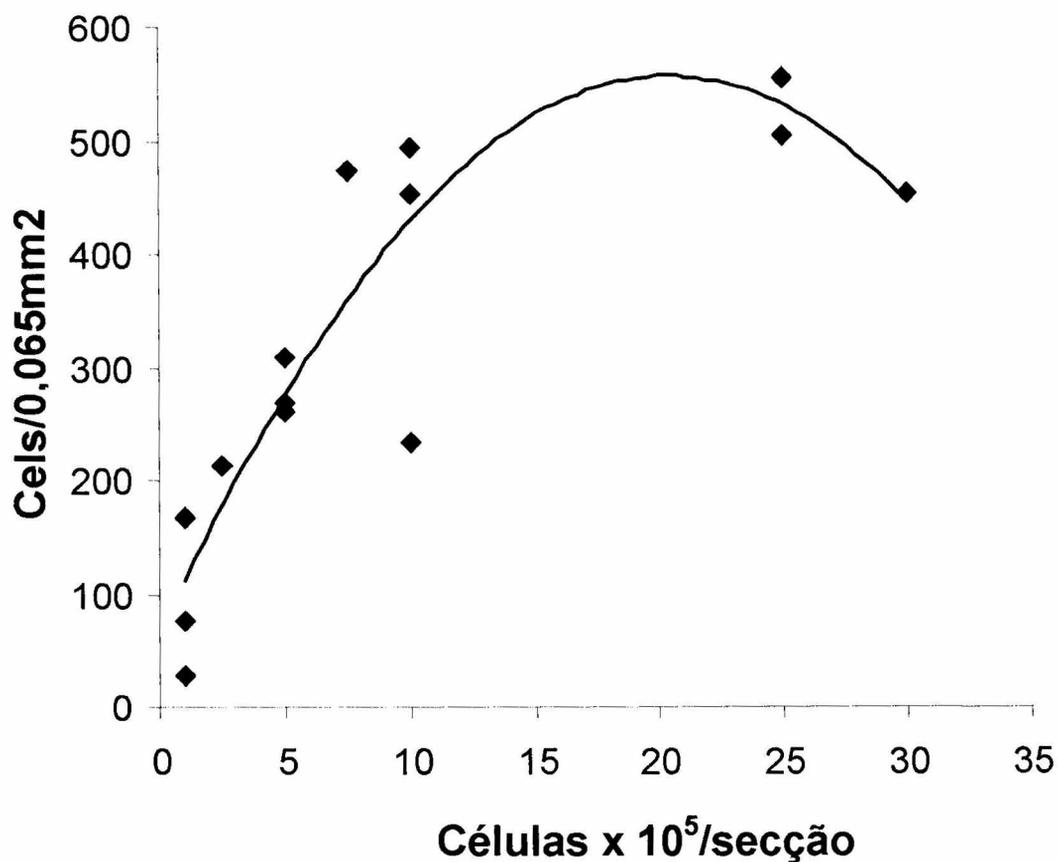


Figura 5.3 - Curva de tendência da adesão de células J774 sobre pele inflamada de Camundongo BALB/c. Diferentes concentrações de células foram adicionadas sobre as secções nas condições descritas na figura 5.1. Após, a realização do ensaio procedeu-se a quantificação das células aderidas. Resultados de três experimentos.

5.4 Avaliação da preservação dos sítios de adesão em tecidos congelados e frescos

A fim de determinar se os sítios de adesão para macrófagos do tecido conjuntivo permanecem estáveis após a estocagem das secções em freezer -70°C , foram realizados ensaios de adesão utilizando-se: (1) secções cortadas no dia do ensaio, utilizadas após não mais que 3 horas e (2) secções estocadas, previamente, a -70°C por 24h (fig. 5.4). Foi observado nos três experimentos realizados uma tendência à diminuição da adesão quando se utiliza secções estocadas. No entanto, esta diminuição da adesão não foi estatisticamente significativa em nenhum dos experimentos.

5.5 Avaliação da importância da agitação durante o processo de adesão

Avaliou-se o efeito da agitação sobre o processo de adesão macrófago/matriz através da realização do ensaio sob agitação em uma mesa rotatória ou utilizando-se secções sobre uma superfície imóvel (fig. 5.5). Houve uma tendência à diminuição da adesão nos ensaios realizados sem agitação (dois experimentos). Esta diferença, contudo, não foi estatisticamente significativa ($p > 0,05$).

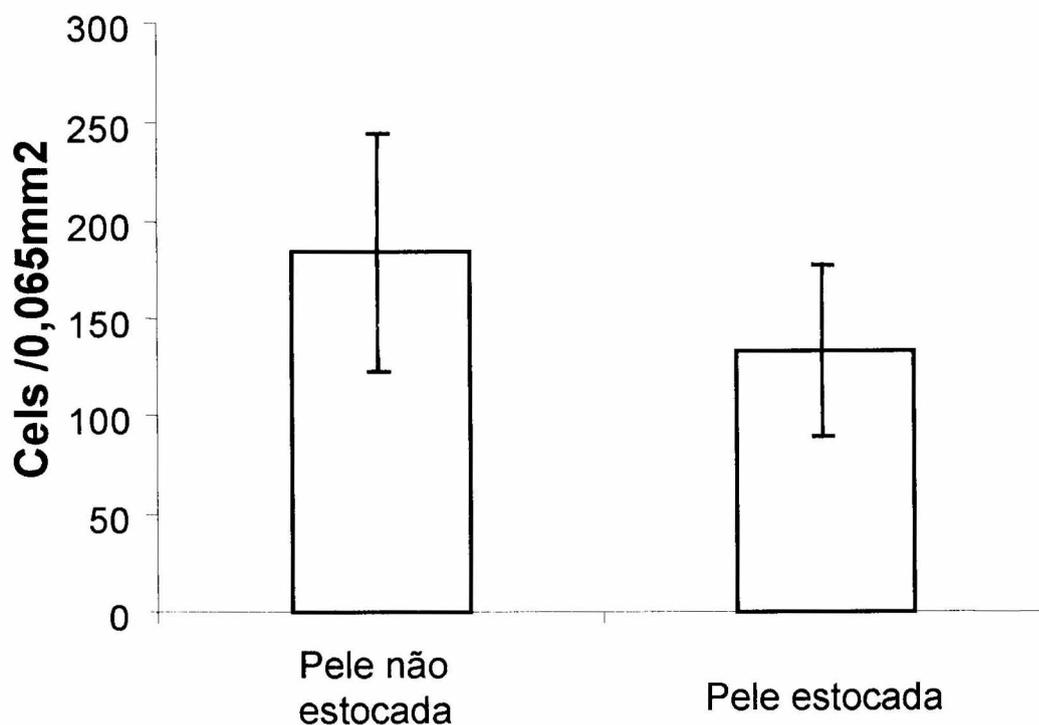


Figura 5.4 - Avaliação da preservação dos sítios de adesão. Secções de pele inflamada de camundongo BALB/c foram estocadas a -70°C e usadas 24h depois para comparação com a adesão utilizando-se pele não estocada. Apesar da diminuição da aderência a pele estocada a diferença não foi significativa entre os dois grupos. Resultado representativo de três experimentos.

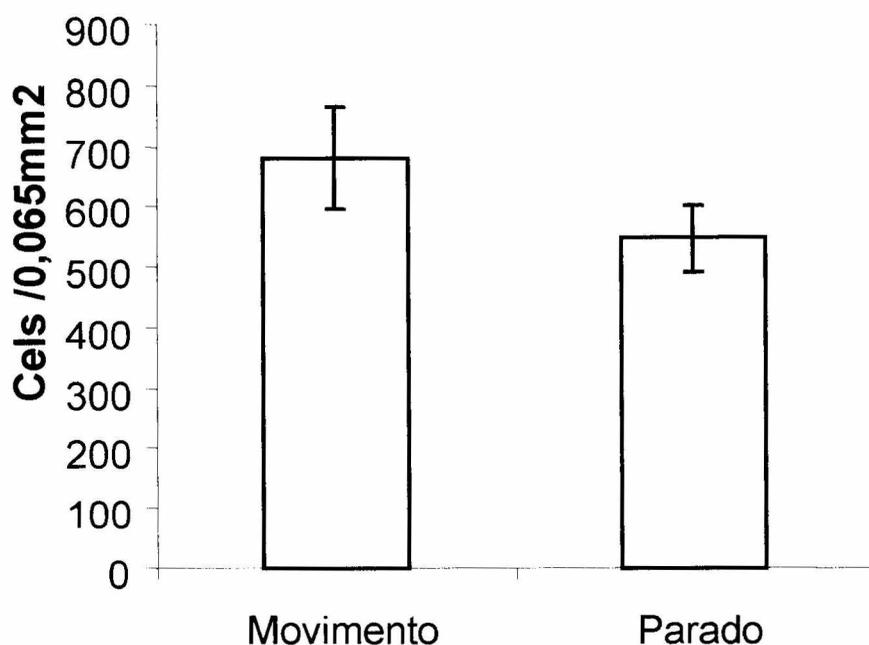


Figura 5.5 - Efeito da agitação durante o ensaio de adesão. Grupos de lâminas contendo secções de pele inflamada de camundongo BALB/c foram colocadas sobre uma plataforma giratória a 80 rpm (Movimento) ou sobre uma superfície imóvel (Parado), e sobre estas secções foram adicionadas 100µl de solução contendo 10^6 macrófagos. Apesar da discreta redução na aderência das células nas secções paradas, a diferença não foi estatisticamente significativa ($p > 0,05$). Resultado representativo de três experimentos.

5.6 Análise da participação de cátions divalentes (Ca^{++} e Mg^{++})

Sabendo-se que as interações por integrinas, as moléculas mais freqüentemente implicadas nas interações célula/matriz conjuntiva, são dependentes da presença de cátions divalentes (STEWART et al., 1998), realizamos experimentos nos quais estes íons foram removidos para avaliarmos seu efeito sobre a adesão celular. O tratamento das células com 2 mM de EDTA, um quelante de íons divalentes, promove a diminuição da adesão das células à secção de pele inflamada enquanto o tratamento com 2 mM de Mn^{+2} promove o aumento da adesão. Sugerindo o envolvimento de moléculas de integrinas no processo (fig. 5.6).

5.7 Efeito da ativação celular sobre o processo de adesão

A ativação celular pode modular a expressão de moléculas de adesão ou alterar a afinidade/avidez da adesão mediada por integrinas das células pelos receptores expressos no substrato de adesão. Para testar este efeito, incubamos as células J774 com diferentes concentrações de: LPS, PMA ou zimosan. O tratamento com LPS por 24 horas promove o aumento da adesão celular. Este efeito atinge o máximo na concentração de 1 $\mu\text{g/ml}$ de LPS e diminui em concentrações de 10 e 20 ng/ml (fig. 5.7), esta diminuição está associada ao decréscimo da viabilidade das células (avaliada pela exclusão em azul tripan).

O tratamento com Zimozan por 24 horas ou PMA por 15 minutos (fig. 5.8) promoveram um significativo aumento da adesão de células J774.

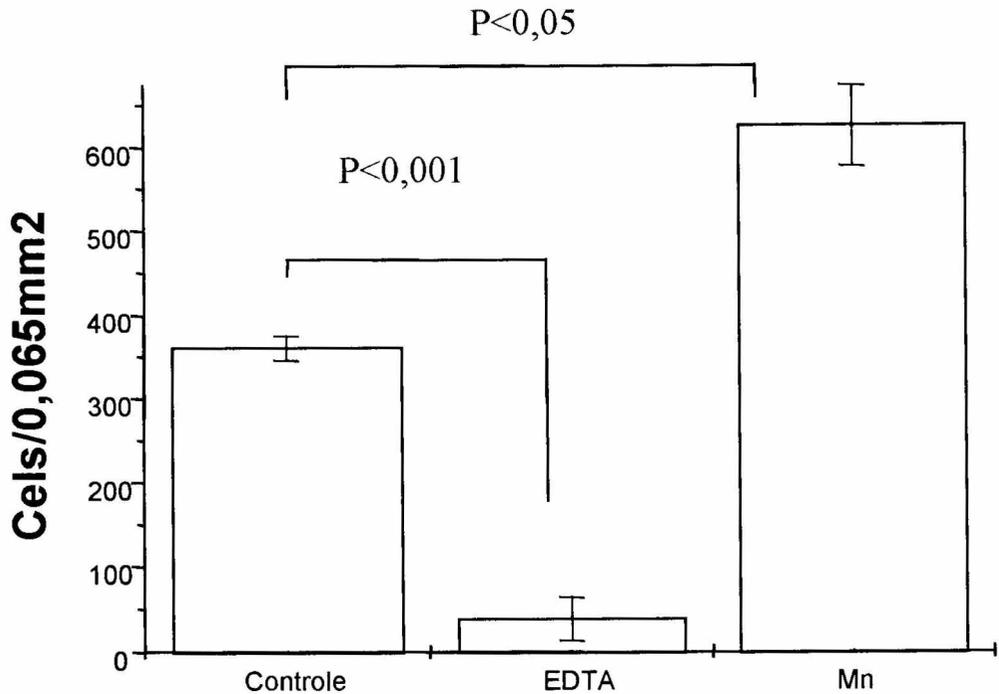


Figura 5.6 - Avaliação da participação de cátions divalentes no processo de adesão de células J774. Células sem tratamento (controle), tratadas com EDTA (2mM) ou tratadas com Mn^{++} (2mM), foram adicionadas sobre secções de pele inflamada, conforme descrito na figura 5.1. O tratamento com EDTA diminuiu a adesão de células J774 enquanto que o tratamento com Mn^{++} levou a um aumento do processo de adesão quando comparado com o grupo controle. Resultado representativo de quatro experimentos.

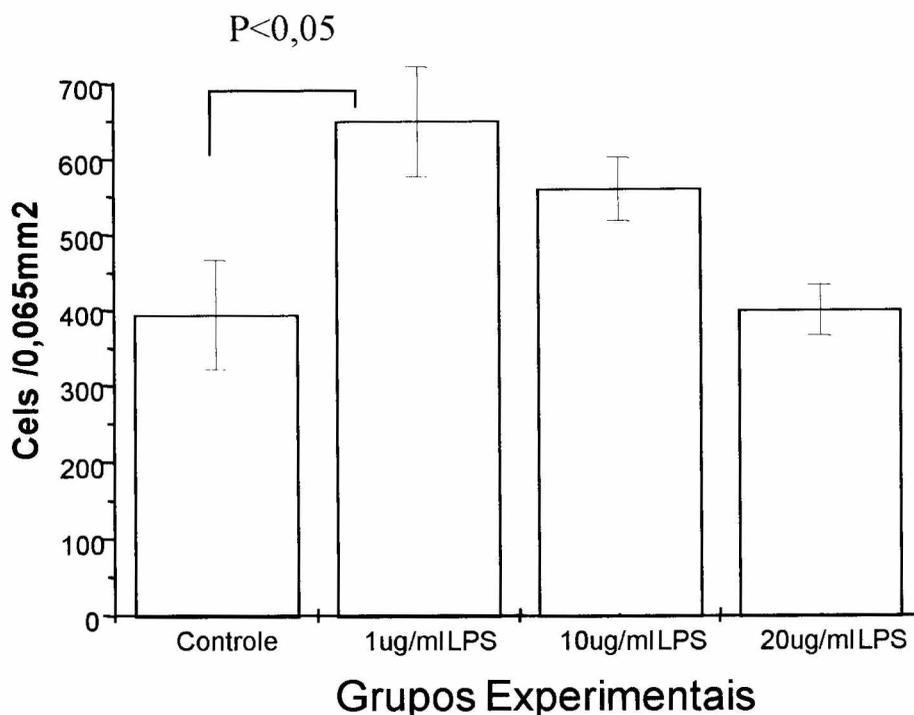


Figura 5.7 - Efeito do LPS sobre o processo de adesão de células J774. Macrófagos foram tratados por 24h com diferentes concentrações de LPS e coincubados com secções de pele inflamada de camundongo BALB/c. O LPS induziu o máximo de aumento da adesão na concentração de 1µg/ml, concentrações maiores promoveram uma diminuição da viabilidade celular. Resultado representativo de quatro experimentos (p<0,05).

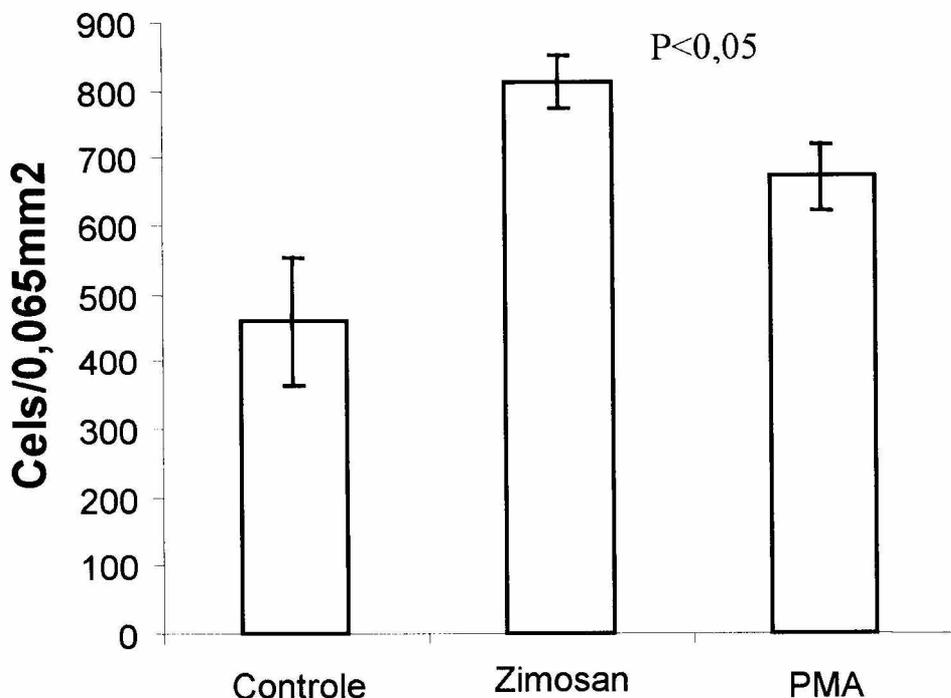


FIGURA 5.8 - Efeito do zimosan e PMA sobre o processo de adesão. Macrófagos J774 foram incubados por 24h com partículas de zimosan, na proporção de 10 partículas/célula, ou com 1 ng/ml de PMA, por 15 minutos antes das células serem adicionadas sobre secções de pele inflamada de camundongo BALB/c. Tanto zimosan quanto PMA foram capazes de induzir um aumento significativo da adesão, zimosan 76% e PMA 46% em relação ao controle ($p < 0.05$), resultado representativo de 3 experimentos.

5.8 Identificação das moléculas de adesão envolvidas na interação macrófago/matriz conjuntiva

5.8.1 Identificação de moléculas de adesão expressas na pele de camundongos de linhagem BALB/c, após indução de inflamação aguda

As moléculas de adesão expressas nas secções de pele inflamada utilizadas nos ensaios de adesão foram identificadas através de imunohistoquímica. O anticorpo contra MAC-1 (fig. 5.9) identificou células distribuídas difusamente no infiltrado inflamatório com características morfológicas de macrófagos e neutrófilos. O anticorpo contra H-CAM marcou uma maior variedade de células no infiltrado inflamatório, além de células basais da epiderme.

5.8.2 Identificação das moléculas envolvidas no processo de adesão de células J774 à pele de bolsão inflamatório de camundongos de linhagem BALB/c

Foram realizados ensaios de bloqueio de adesão utilizando-se peptídios e/ou anticorpos monoclonais. A incubação, prévia, das células e secções com os peptídios RGD e CS-1, antes da adesão às secções de pele, levou a uma diminuição da aderência celular [37%(fig. 5.10A)]. Indicando o envolvimento de integrinas da família β_1 e/ou contendo a cadeia α_4 ou α_5 . Uma redução na adesão ainda mais expressiva foi observada (45,74%) na presença de anticorpos e peptídios (figura 5.10B), que interferem com as interações envolvendo integrinas do grupo α_4 (CS1 e CD 49d) e anticorpo contra integrinas da família β_2 .

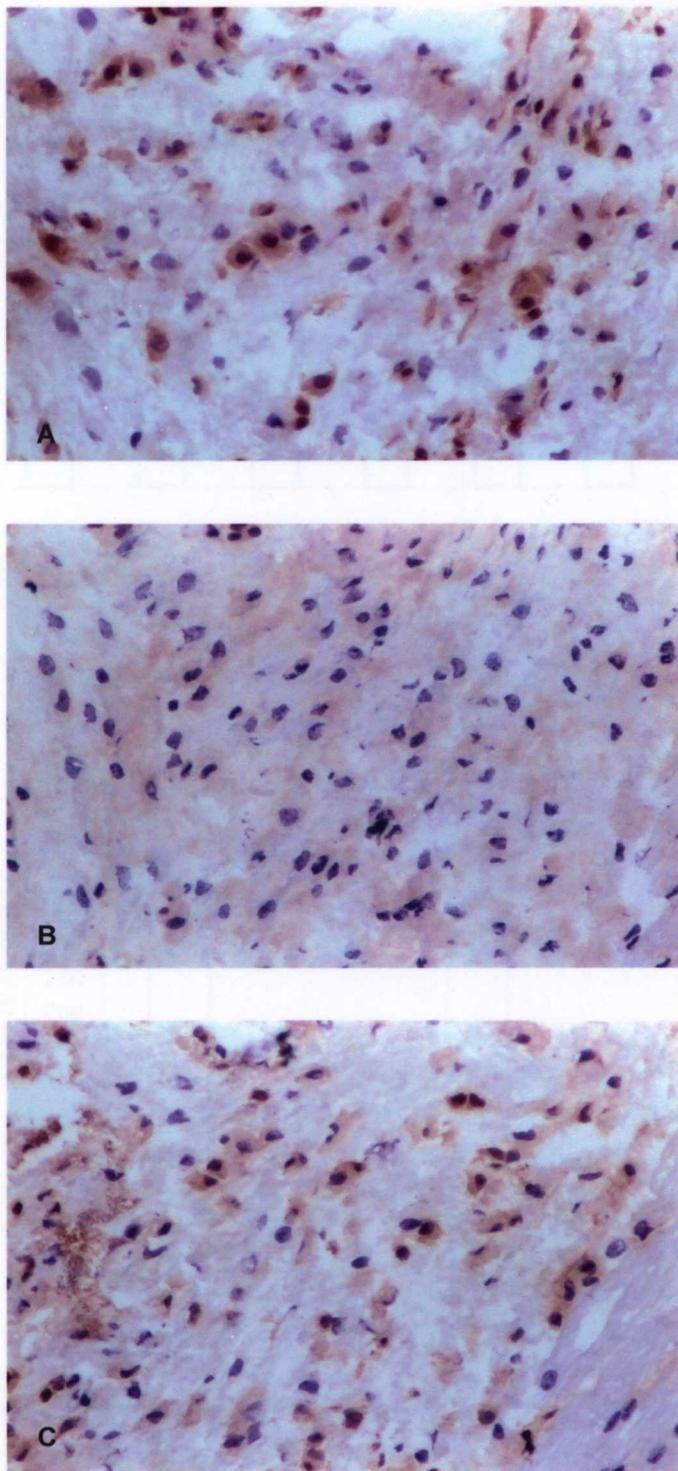


Figura 5.9 - Detecção de MAC-1 e H-CAM em secções de pele inflamada através de imunohistoquímica. O anticorpo contra MAC-1 (A) identificou células distribuídas difusamente no infiltrado inflamatório com características de macrófagos e neutrófilos, (B) Controle negativo e (C) H-CAM marcou uma maior variedade de células no infiltrado inflamatório. Aumento de 430X em A, B e C.

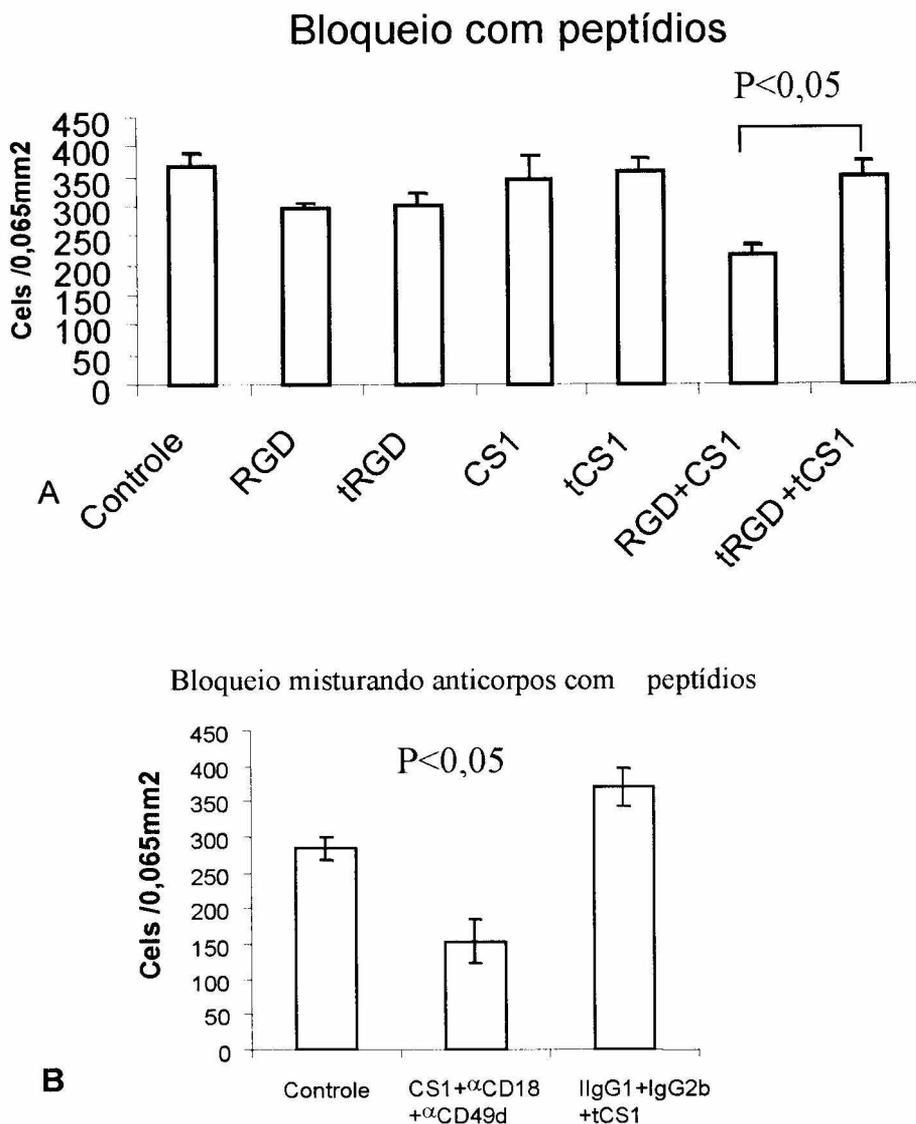


Figura 5.10 - Ensaio de bloqueio com peptídios RGD e CS-1 e anticorpos α -CD18 e α -CD49d. Macrófagos J774 e secções de pele inflamada foram tratadas, previamente, por 30 minutos à temperatura ambiente, com 1mg/ml de peptídios (A) CS1, RGD ou com as seqüências truncadas destes peptídios (tRGD ou tCS1) ou com anticorpos monoclonais (B) contra as cadeias α_4 e β_2 de integrinas (α -CD18 e α -CD49d na concentração de 20 μ g/ml para as secções e 25 μ g/10⁶ células), após o tratamento as células foram adicionadas sobre as secções. Os resultados são representativos de dois experimentos.

5.9 Interferência do estado funcional das células no processo de adesão

Para verificar se a infecção parasitária ou fagocitose mudam a interação das células macrofágicas com a matriz conjuntiva infectamos células J774 com *Leishmania* ou incubamos com partículas de látex de 3 μm por 18h. A infecção por *Leishmania amazonensis* (Lma) leva a diminuição da adesão de macrófagos J774/G8 a secções de pele inflamada em comparação com células normais (controle) e macrófagos incubados com partículas de látex de 3 μm (fig. 5.11). A diminuição da adesão de células infectadas também foi observada com macrófagos peritoniais (fig. 5.12A) e monócitos de sangue periférico humano (fig. 5.12B).

A fim de avaliar se outros patógenos intracelulares são capazes de modificar o perfil de adesão, células J774 foram infectadas com *Mycobacterium avium* (fig. 5.13). A infecção por *M. avium* não foi capaz de modificar o perfil de adesão em relação ao controle ou mesmo exibir a diminuição de adesão observada com a infecção por *Leishmania*. Sugerindo que mecanismos específicos operam na regulação do processo de adesão de células infectadas por *Leishmania* à matriz conjuntiva.

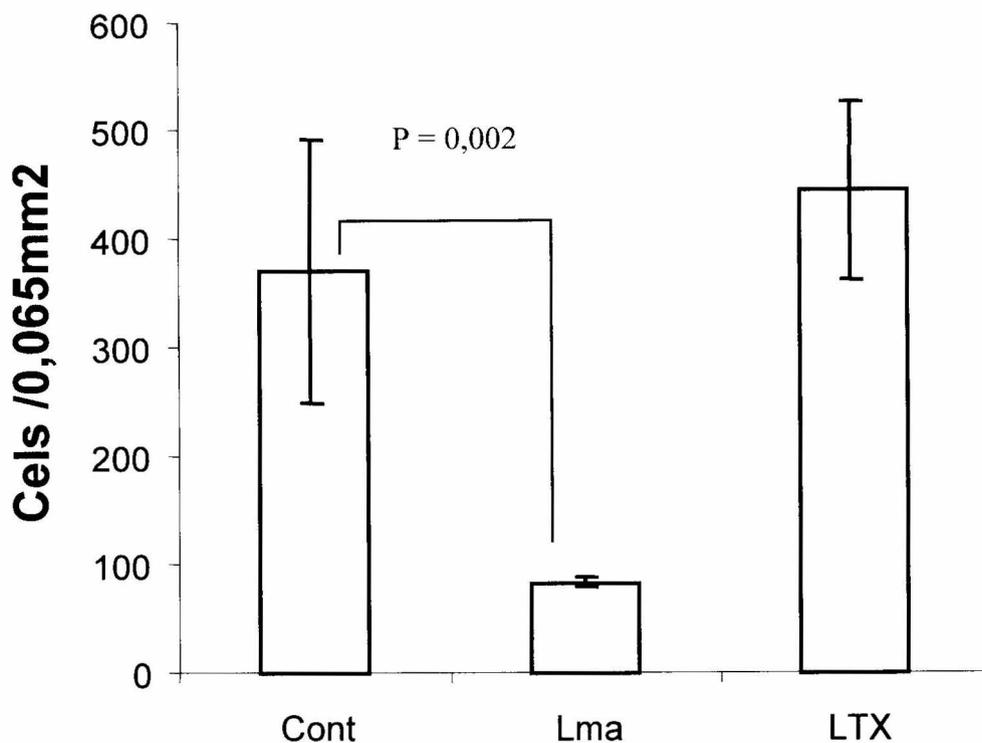
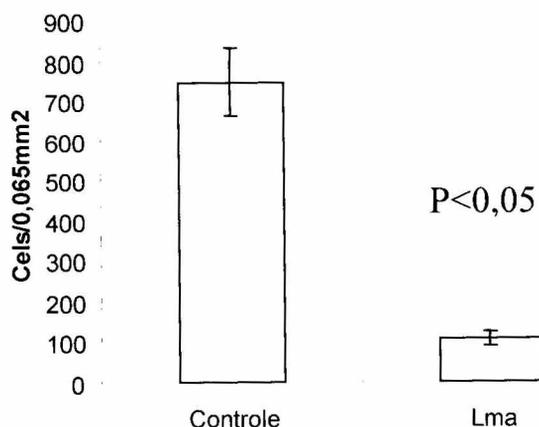


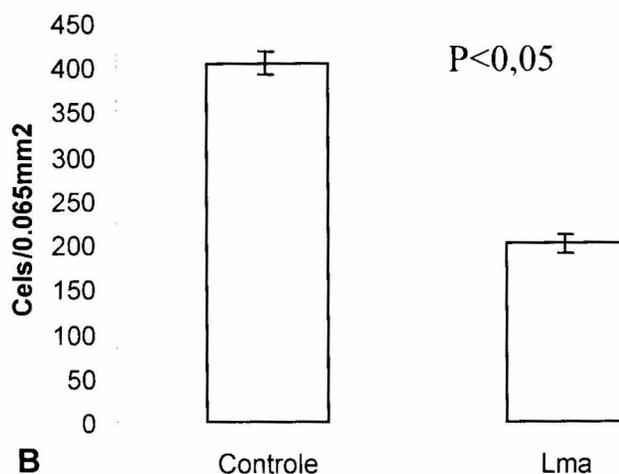
Figura 5.11 - Efeito da infecção intracelular de $M\phi$ J774 por *Leishmania amazonensis*. Macrófagos normais (Cont), infectados com *Leishmania amazonensis* (Lma), na proporção de 10 parasitos por macrófago, ou incubadas com partículas de látex (LTX) de 3 μm de diâmetro (10 partículas por macrófago) foram incubados por 24h em tubos não-aderentes. Após este período, as células foram adicionadas sobre as secções nas condições descritas na figura 5.1 e avaliou-se o percentual de infecção dos macrófago (90,8%). Somente a infecção por *L. amazonensis* promoveu uma diminuição da adesão ($p=0,002$). Resultado representativo de nove experimentos.

Adesão de macrófagos peritoniais



A

Adesão de monócitos humanos



B

Figura 5.12 - Efeito da infecção intracelular de (A) M ϕ peritoniais ou (B) monócitos humanos por *Leishmania amazonensis*. Os macrófagos foram previamente infectados com *Leishmania amazonensis* na proporção de 10 leishmanias por macrófago, 24h antes dos ensaios de adesão. A infecção por *L. amazonensis* promoveu uma diminuição da adesão em ambos os tipos celulares. Resultado correspondente a um experimento com macrófagos peritoniais ($p < 0.05$) e é representativo de dois experimentos com monócitos humanos ($p < 0.05$).

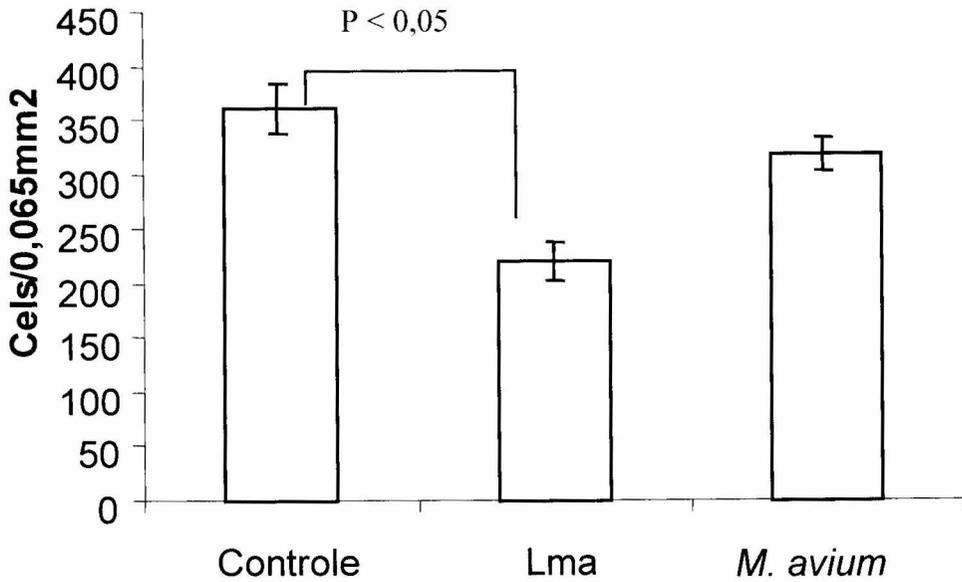


Figura 5.13 - influência da infecção de *Micobacterium avium* sobre a adesão celular. Células J774 normais (controle), células infectadas com *Leishmania amazonensis* (Lma) ou com *Mycobacterium avium* (*M. avium*), na proporção de 10 parasitos/M ϕ , foram incubadas por 24h em tubos não-aderentes e utilizadas no ensaio de adesão. Somente a infecção por *L. amazonensis* produziu diminuição da adesão ($p < 0,05$). Resultado representativo de três experimentos.

6. DISCUSSÃO

Neste trabalho padronizamos um ensaio de adesão, à temperatura ambiente, que possibilita o estudo das interações de células macrofágicas com o tecido conjuntivo (incluindo componentes matriciais e células da matriz conjuntiva, *in vitro*). Além disso, demonstramos a possibilidade de uso deste sistema para a investigação dos mecanismos patogênicos de doenças infecciosas. O ensaio de Stamper-Woodruff tem sido realizado, na maioria dos trabalhos, à baixa temperatura e a adesão fora das vênulas de endotélio alto era considerada como adesão inespecífica (STAMPER & WOODRUFF, 1976; VORA et al., 1994), ou seja, as condições do ensaio eram otimizadas para o estudo das relações leucócitos/endotélio alto. No presente trabalho mostramos portanto, pela primeira vez, que um ensaio semelhante ao de STAMPER-WOODRUFF pode ser realizado para a avaliação de interações de macrófagos com tecido conjuntivo.

Quais evidências oferecem suporte à utilização do ensaio conforme proposto neste trabalho?

(I) Padrão de aderência de células macrofágicas discrimina as áreas de inflamação em relação às áreas normais da pele. Conforme descrito na introdução desta dissertação, o processo de adesão de leucócitos ao tecido conjuntivo é mediado por moléculas de adesão e modulado pela presença de quimiotáticos com especificidade definida para diferentes populações celulares. O tecido conjuntivo é modificado nas áreas de inflamação, tornando-se mais apto para promover o recrutamento de células inflamatórias; isto é parcialmente determinado por uma maior oferta de sítios de adesão através de moléculas como a fibronectina (SANTOS

et al., 1994), as quais possuem sítios de ligação para as moléculas de integrinas, como VLA-4 e VLA-5, presentes na superfície dos leucócitos (MOULD e al., 1991; CLEMENTS et al., 1994; YANG et al., 1998). Além da fibronectina, outras moléculas presentes na matriz conjuntiva, como trombospondina (YABKOWITS et al., 1993) e a própria fibrina (KUIJPER et al., 1997), são capazes de dar suporte à adesão de leucócitos ativados (ver tabela 1). A oferta de receptores é ainda incrementada pela chegada de leucócitos e aumento do número de células residentes, como os fibroblastos, que oferecem sítios adicionais de adesão (STEINHAUSER et al., 1998). Na verdade, o processo de inflamação estabelece uma seqüência de modificações no painel de moléculas de adesão e quimiotáticos que resultam em mudanças de populações celulares no infiltrado. Neste estudo avaliamos a capacidade de adesão do macrófago, que é um dos tipos celulares mais presentes em infiltrados inflamatórios; por isso escolhemos secções de pele com um processo inflamatório de três dias de evolução em que a análise histológica evidencia a presença destas células (Fig. 5.1) e portanto, indiretamente, sítios de aderência e quimiotáticos apropriados. Neste tecido, foi nítida a predileção dos macrófagos pelas áreas de inflamação. Isto é uma forte indicação de que o ensaio por nós padronizado é capaz de revelar adesões celulares específicas.

(II) A aderência observada nos ensaios descritos neste trabalho é dependente de cátions divalentes, os quais são requeridos no processo de adesão mediado por moléculas de selectinas e integrinas (ver introdução). A oferta de cátions divalentes para ligação aos domínios das selectinas ou de integrinas pode ser reduzida pelo uso do EDTA, inibindo drasticamente a adesão celular, ao contrário da adição de íons de manganês, que aumenta a aderência. Apesar de não excluirmos a

participação de selectinas no processo de adesão de macrófagos ao tecido conjuntivo, as características da adesão observada em nosso sistema: (a) adesão forte, não deslocada após múltiplas lavagens das secções com PBS, (b) espalhamento citoplasmático das células aderidas (Fig. 5.1) e (c) incremento da adesão com o íon manganês (Fig. 5.5); sugerem que as integrinas são as principais moléculas envolvidas na adesão de macrófagos no nosso sistema, e, mais uma vez, apontam para a especificidade das adesões.

(III) Ativação celular aumenta a aderência das células às secções. Isto também corrobora com a especificidade das interações entre leucócitos e matriz conjuntiva em nosso sistema. É notório que leucócitos ativados aderem mais fortemente a diferentes substratos: monocamadas de células endoteliais (GAUTAM et al., 2000) e componentes matriciais (HAUZENBERGER et al., 1994). No nosso sistema, a ativação dos macrófagos com PMA, zimosan ou LPS aumentou a aderência às secções de pele. O incremento da adesão, apesar de significativo, foi menor do que o observado em alguns sistemas *in vitro* como monocamadas de endotélio (SHEN et al., 1998) e componentes purificados da matriz extracelular (PUIG-KROGER et al., 2000). Uma das possíveis justificativas, para a diferença quantitativa entre nossos achados e os de outros autores, é de que ativadores como o fator C5a e/ou quimiocinas atuem nas áreas de inflamação da pele e, *per si*, sejam capazes de determinar a ativação celular, evitando que o tratamento com zimosan ou PMA leve a um grande efeito em função do estado de ativação da célula. Em experimentos futuros, o tratamento enzimático para remoção de quimiocinas ligadas a heparan sulfato ou bloqueio de quimiocinas específicas podem esclarecer melhor este aspecto. Outra possibilidade é a de que as células J774, utilizadas neste ensaio, que

são células transformadas e que produzem de forma constitutiva IL-1 (O'FARRELL et al., 1998), já possuem um considerável grau de ativação que possibilite a adesão mais efetiva aos substratos. Em verdade, a proporção de células J774 aderidas nos ensaios foi usualmente maior do que a adesão de monócitos de sangue periférico humano.

(IV) A aderência de macrófagos ao tecido conjuntivo observada em nosso experimento pode ser bloqueada por anticorpos contra integrinas ($\beta 1$ e $\beta 2$) e por peptídios com seqüências correspondentes a sítios de ligação celular presentes em componentes matriciais. Isoladamente, nem anti-CD49d, anti- $\beta 2$, RGD e CS-1 foram capazes de diminuir a adesão de forma significativa. Contudo, a diminuição da adesão foi maior com a mistura contendo CS-1, anti-CD49d e anti- $\beta 2$ em comparação com as misturas que contêm os peptídios RGD e CS-1. O bloqueio com a combinação de CS1, anti-CD49d e anti- $\beta 2$ não foi completo. Algumas possibilidades podem ser aventadas para justificar a adesão remanescente: (1) a utilização de moléculas completas de anticorpo, contendo as porções Fc e Fab, pode ter contribuído na ligação cruzada entre células ou célula substrato de adesão, ou seja, a porção Fc do anticorpo pode ligar-se ao receptor Fc de uma célula e a porção Fab a molécula reconhecida na superfície de outra célula, além desta possibilidade, pode ocorrer a ligação cruzada envolvendo a ligação das duas porções Fab, presentes no anticorpo, a diferentes células; (2) outras moléculas como selectinas, as quais se ligam a moléculas contendo açúcares; HCAM, que liga a heparan sulfato; moléculas de adesão da superfamília das imunoglobulinas, como PECAM/PECAM (ligação homotípica), poderiam também estar participando do processo de adesão. Além disso, (3) o painel de pares de moléculas de adesão não

é completamente conhecido, de forma que adesão remanescente tem sido observada em alguns sistemas *in vitro* mais simples do que o apresentado aqui (SHANG & ISSSEKUTZ, 1998).

(V) A infecção de células macrofágicas por *Leishmania* diminui a adesão de forma mais intensa do que o observado nos ensaios de bloqueio, reforçando as idéias explicitadas acima. Esta diminuição da adesão não é observada com a infecção por *Mycobacterium* ou com a fagocitose de partículas de látex, sugerindo que mecanismos específicos existentes na infecção pela *Leishmania* estejam operando na hiporegulação da adesão de células macrofágicas à matriz conjuntiva. Por sua vez, observamos que a diminuição da adesão pela infecção com *Leishmania* variou quando comparamos diferentes experimentos. Não sabemos a causa desta variação. Em uma avaliação preliminar observamos correlações, significativas, da taxa de infecção e do número de parasitos por macrófago com a diminuição da adesão, utilizando o ensaio de adesão a secções.

Finalmente, em nossos ensaios, a realização de experimentos utilizando uma mesa rotatória, com a função de promover a agitação das células sobre a pele, produziu uma maior adesão de células do que na ausência de agitação, embora isto não tenha sido estatisticamente significativo. É possível que a agitação possibilite a ativação de selectinas através do rolamento das células sobre o substrato, seguida pela ativação de integrinas (LUND-JOHANSEN et al., 1992). Além disso, a agitação aumenta a chance de encontro das moléculas de adesão expressas sobre a superfície das células macrofágicas com seus respectivos contra-receptores expressos nas secções de pele.

No nosso sistema, a concentração ideal de células para uso no ensaio situa-se na faixa de $2,5 \times 10^5$ a 10^6 células por secção, bem abaixo da concentração de 6×10^6 linfócitos utilizada por STAMPER-WOODRUFF (1976), mas igual a concentração de 10^6 monócitos utilizado por YEDNOCK et al. (1992). Talvez esta diferença na concentração ideal de células reflita não só a natureza da célula utilizada como também o tipo de substrato de adesão usado.

7 CONCLUSÕES/SUMÁRIO DOS RESULTADOS

1. É possível utilizar o sistema de adesão aqui descrito para estudar interações específicas de leucócitos a tecido conjuntivo da pele, já que esta especificidade foi comprovada pelos seguintes achados:

- a. há sítios preferenciais de adesão em áreas de inflamação;
- b. a adesão depende da presença de cátions divalentes;
- c. a ativação celular aumenta a adesão das células;
- d. a adesão é dependente de integrinas da família $\beta 1$ e $\beta 2$;
- e. a infecção por *Leishmania*, e não por *Mycobacterium*, interfere com a aderência macrófago-matriz.

2. Foram estabelecidas condições ótimas para a realização do ensaio com células macrofágicas:

- a. fixação das secções com acetona;
- b. $2,5 \times 10^5$ a 10^6 células por circunferência de 1cm de diâmetro.

3. Foi verificado que o ensaio, pode ser realizado nas seguintes condições (o que não se encontra descrito na literatura):

- a. com secções de tecido cutâneo previamente estocadas;
- b. na ausência de agitação durante a realização do ensaio.

8 REFERÊNCIAS.

ALEXANDER, J.; SATOSKAR, A. R.; RUSSEL, D. G. *Leishmania* species: models of intracellular parasitism. **J. Cell. Sci.**, **18**: 2993-3002, 1999.

AMSEN, D.; KRUISBEEK, A. M. Thymocyte selection: not by TCR alone. **Immunol. Rev.** **165**: 209-229, 1998.

ALTIERI, D. C. Occupancy of CD11b/CD18 (MAC-1) divalent ion binding site(s) induces leukocyte adhesion. **J. Immunol.**, **147**: 1891-1898, 1991.

ALTIERI, D. C.; EDINGTON, T. S. A monoclonal antibody reacting with distinct adhesion molecules defines a transition in the functional state of the receptor CD11b/CD18 (Mac-1). **J. Immunol.** **141** :2656-60, 1988.

ARNAOUT, M. A. Leukocyte adhesion molecules deficiency: its structural basis, pathophysiology and implications for modulating the inflammatory response. **Immunology**, **114**: 145-180, 1990.

BARBÉ, E.; HUITINGA, I.; DÖPP, E. A.; BAUER, J.; DIJKSTRA, C. D. A novel bone marrow frozen section assay for studying hematopoietic interactions in situ: the role of stromal bone marrow macrophages in erythroblast binding. **J. Cell Science**, **109**: 2937-2945, 1996.

BAUVOIS, B.; WEYENBERGH, J. V.; ROUILLARD, D.; WIETZERBIN, J. TGF- β 1-stimulated adhesion of human mononuclear phagocytes to fibronectin and laminin is abolished by IFN- γ : Dependence on α 5 β 1 and β 2 integrins. **Exp. Cell Res.**, **222**: 209-217, 1996.

BEVILACQUA, M.; BUTCHER, E.; FURIE, B.; FURIE, B.; GALLATIN, M.; GIMBRONE, M.; HARLAN, J.; KISHIMOTO, K.; LASKY, L.; MCEVER, R. Selectins: a family of adhesion receptors. **Cell.**, **67**: 233, 1991.

BEVILACQUA, M. P.; NELSON, R. M. Selectins. **J. Clin. Invest.**, **91**: 379-387, 1993.

BOSQUE, F.; BELKAID, Y.; BRIEND, E.; HEVIN, B.; LEBASTARD, M.; SOUSSI, N.; MILON, G. The biology of macrophages. **Pathol. Biol.**, **45**: 103-109, 1997.

BUTCHER, E. C.; PICKER, L. J. Lymphocyte homing and homeostasis. **Science**, **272**: 60-66, 1991.

CARLOS, T. M.; HARLAN, J. M. Membrane proteins involved in phagocyte adherence to endothelium. **Immunol. Rev.** **114**: 5-28, 1990.

CARLOS, T. M.; HARLAN, J. M. Leukocyte-endothelial Adhesion Molecules. **Blood**, **84**: 2068-2101, 1994.

CHAKRAVORTY, S. J.; HOWIE, A. J.; COCKWELL, P.; ADU, D.; SAVAGE, C. O. S. T lymphocyte adhesion mechanisms within inflamed human kidney. **Am. J. Pathol.**, **154**: 503-514, 1999.

CLEMENTS, J. M.; NEWHAM, P.; SHEPHERD, M.; GILBERT, R.; DUDGEON, T. J.; NEEDHAM, L. A.; EDWARDS, R. M.; BERRY, L.; BRASS, A.; HUMPHRIES, M. J. Identification of a key integrin-binding sequence in VCAM-1 homologous to the LDV active site in fibronectin. **J. Cell. Sci.**, **107**: 2127-2135, 1994.

COLLINS, T. Adhesion Molecules in Leukocyte Emigration. **Sci. Am.**, : 28-37, 1995.

CONSTANTIN, G.; LAUDANNA, C.; BROKE, S.; BUTCHER, E. C. Inhibition of experimental autoimmune encephalomyelitis by tyrosine kinase inhibitor. **J. Immunol** **162**: 1144-1149, 1999.

CYBULSKY, M. I.; MCCOMB, D. J.; MOVAT, H. Z. Neutrophil leukocyte emigration induced by endotoxin. Mediator roles of interleukin 1 and tumor necrosis factor alpha 1. **J. Immunol.**, **140**: 3144-3149, 1988.

DAVENPECK, K. L.; ZAGORSKI, J.; SCHLEIMER, R. P.; BOCHNER, B. S. Lipopolysaccharide-induced leukocyte rolling and adhesion in the rat mesenteric microcirculation: regulation by glucocorticoids and role of cytokines. **J. Immunol.**, **161**: 6861-6870, 1998.

GAHMBERG, C. G.; VALMU, L.; FAGERHOLM, S.; KOTOVUORI, P.; IHANUS, E.; TIAN, L.; PESSA-MORIKAWA, T. Leukocyte integrins and inflammation. **Cell. Mol. Life Sci.**, **54**: 549-555, 1998.

GAHMBERG, C. G.; VALMU, L.; TIAN, L.; KOTOVUORI, P.; FAGERHOLM, S.; KOTOVUORI, A.; KANTOR, C.; HILDEN, T. Leukocyte adhesion--a fundamental process in leukocyte physiology. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, **32**: 511-517, 1999.

GARCIA-PARDO, A.; WAYNER, E. A.; CARTER, W. G.; FERREIRA-JUNIOR, O. C. Human B lymphocytes define an alternative mechanism of adhesion to fibronectin: the interaction of the $\alpha 4\beta 1$ integrin with LHGPEILDVPST sequence on the type III connecting segment is sufficient to promote cell attachment. **J. Immunol.**, **144**: 3361-3366, 1990.

GAUTAM, N.; HERWALD, H.; HEDQVIST, P.; LINDBOM, L. Signaling via beta(2) integrins triggers neutrophil-dependent alteration in endothelial barrier function. **J. Exp. Med.**, **191**: 1829-1839, 2000.

GROBER, J. S.; BOWEN, B. L.; EBLING, H.; ATHEY, B.; THOMPSON, C. B.; FOX, D. A.; STOOLMAN, L. M. Monocyte-endothelial adhesion in chronic rheumatoid arthritis. In situ detection of selectin and integrin-dependent interactions. **J. Clin. Invest.**, **91**: 2609-2619, 1993.

HAELENS, A.; WUYTS, A.; PROOST, P.; STRUYF, S.; OPDENAKKER, G.; VAN DAMME, J. Leukocyte migration and activation by murine chemokines.

Immunobiology, **95**: 499-521, 1996.

HARLAN, J. M. Leukocyte adhesion deficiency syndrome: insights into the molecular basis of leukocyte emigration. **Clin. Immunol. Immunopathol.**, **67**: S16-24, 1993.

HARLAN, J. M. Leukocyte-endothelial interactions. **Blood**, **65**: 513-525, 1985.

HAUZENBERGER, D.; KLOMINEK, J.; SUNDQVIST, K. G. Functional specialization of fibronectin-binding beta 1-integrins in T lymphocyte migration. **J. Immunol.**, **153**: 960-971, 1994.

HEMLER, M. E. VLA proteins in the integrin family: Structures, functions, and their role on leukocytes. **Annu. Rev. Immunol.**, **8**: 365-400, 1990.

HICKEY, W. F. Migration of hematogenous cells through the blood-brain barrier and the initiation of CNS inflammation. **Brain Pathol.**, **1**: 97-105, 1991.

HOGG, N.; BERLIN, C. Structure and function of adhesion receptors in leukocyte trafficking. **Immunol. Today**, **16**: 327-330, 1995.

HOGG, N.; HARVEY, J.; CABANAS, C.; LANDIS, R. C. Control of leukocyte integrin activation. **Am. Rev. Respir. Dis.**, **148**: S55-59, 1993. Suplemento II

HOGG, N. An integrin overview. **Chem. Immunol.**, **50**: 1-12, 1991.

HUGHES, P. E.; PFAFF, M. Integrin affinity modulation. **Trends Cell Biol.** **8**: 359-364, 1998.

ISSEKUTZ, A. C.; MOVAT, H. Z. The in vivo quantitation and kinetics of rabbit neutrophil leukocyte accumulation in the skin in response to chemotactic agents and *Escherichia coli*. **Lab. Invest.**, **42**: 310-317, 1980.

JALKANEN, S.; STEERE, A. C.; FOX, R. I.; BUTCHER, E. C. A distinct endothelium cell recognition system that controls lymphocyte traffic into inflamed synovium. **Science**, **233**: 556-558, 1986.

JILMA, B.; BLANN, A.; PERNERSTORFER, T.; STOHLAWETZ, P.; EICHLER, H. G.; VONDROVEC, B.; AMIRAL, J.; RICHTER, V.; WAGNER, O. F. Regulation of adhesion molecules during human endotoxemia. No acute effects of aspirin. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, **159**: 857-863, 1999.

KABEL, P. J.; VAN DINTHER, A.; DE HAAN-MEULMAN, M.; BERGHOUT, A.; VOORBIJ, H. A.; DREXHAGE, H. A. A diminished adherence of blood lymphocytes of patients with thyroid autoimmune disease to high endothelial venules in the thyroid and the thyroid-draining lymph nodes. **Autoimmunity**, **5**: 247-256, 1990.

KLINGEMANN, H. G.; DEDHAR, S. Distribution of integrins on human peripheral blood mononuclear cells. **Blood**, **74**: 1348-1354, 1989.

KOMORIYA, A.; GREEN, L. J.; MERVIC, M.; YAMADA, S. S.; YAMADA, K. M.; HUMPHRIES, M. J. The minimal essential sequence for a major cell type-specific adhesion site (CS1) within the alternatively spliced type III connecting segment domain of fibronectin is leucine-aspartic acid-valine. **J. Biol. Chem.**, **266**: 15075-15079, 1991.

KUIJPER, P. H.; GALLARDO TORRES, H. I.; LAMMERS, J. W.; SIXMA, J. J.; KOENDERMAN, L.; ZWAGINGA, J. J. Platelet and fibrin deposition at the damaged vessel wall: cooperative substrates for neutrophil adhesion under flow conditions. **Blood**, **89**: 166-175, 1997.

LABADIA, M. E.; JEANFAVRE, D. D.; CAVINESS, G. O.; MORELOCK, M. M. Molecular regulation of the interaction between leukocyte function-associated antigen-1 and soluble ICAM-1 by divalent metal cations. **J. Immunol.**, **161**: 836-842, 1998.

LAFRENIE, R. M.; YAMADA, K. M. Integrin-dependent signal transduction. **J. Cell Biochem.**, **61**: 543-553, 1996.

LAPPIN, M. B.; WEISS, J. M.; DELATTRE, V.; MAI, B.; DITTMAR H.; MAIER, C.; MANKE, K.; GRABBE, S.; MARTIN, S.; SIMON, J. C. Analysis of mouse dendritic cell migration in vivo upon subcutaneous and intravenous injection. **Immunology**, **98**: 181-188, 1999.

LASKY, L. A.; SINGER, M. S.; YEDNOCK, T. A.; DOWBENKO, D.; FENNIE, C.; RODRIGUES, H.; NGUYEN, T.; STACHEL, S.; ROSEN, S. D. Cloning of a lymphocyte homing receptor reveals a lectin domain. **Cell**, **56**: 1045-1055, 1989.

LASKY, L. A. Selectins: Interpreters of cell-specific carbohydrate information during inflammation. **Science** **258**: 964-969, 1992.

LAWRENCE, M. B.; SPRINGER, T. A. Leukocyte roll on a selectin at physiologic flow rates: distinction from and pre-requisite for adhesion through integrins. **Cell**, **65**: 859-873-, 1991.

LEY, K.; GAEHTGENS, P.; FENNIE, C.; SINGER, M. S.; LASKY, L. A.; ROSEN, S. D. Lectin-like cell adhesion molecule 1 mediates leukocyte rolling in mesenteric venules in vivo. **Blood**, **77**: 2553-2555, 1991.

LUND-JOHANSEN, F.; OLWEUS, J.; HOREJSI, V.; SKUBITZ, K. M.; THOMPSON, J. S.; VILELLA, R.; SYMINGTON, F. W. Activation of human phagocytes through carbohydrate antigens (CD15, sialyl-CD15, CDw17, and CDw65). **J. Immunol.**, **148**: 3221-3229, 1992.

LUSTER, A. D. Chemokines--chemotactic cytokines that mediate inflammation. **N. Engl. J. Med.**, **338**: 436-445, 1998.

MACDOWALL, A.; LEITINGER, B.; STANLEY, P.; BATES, P. A.; RANDI, A. M.; HOGG, N. The I domain of integrin leukocyte function-associated antigen-1 is involved in a conformational change leading to high affinity binding to ligand intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1). **J. Biol. Chem.**, **273**: 27396-27403, 1998.

MANTOVANI, A. The chemokines. System: redundancy for robust outputs. **Immunol. Today**, **20**: 254-257, 1999.

MOLL, H. Epidermal Langerhans cells are critical for immunoregulation of cutaneous leishmaniasis. **Immunol. Today**, **14**: 383-387, 1993.

MOULD, A. P.; KOMORIYA, A.; YAMADA, K. M.; HUMPHRIES, M. J. The CS5 peptide is a second site in the IIICS region of fibronectin recognized by the integrin alpha 4 beta 1. Inhibition of alpha 4 beta 1 function by RGD peptide homologues. **J. Biol. Chem.**, **266**: 3579-3585, 1991.

MULLER, W. A.; RANDOLPH, G. J. Migration of leukocytes across endothelium and beyond: molecules involved in the transmigration and fate of monocytes. **J. Leukoc. Biol.**, **66**: 698-704, 1999.

NAGAHATA, H.; HIGUCHI, H.; NODA, H.; TAMOTO, K.; KUWABARA, M. Adhesiveness for extracellular matrices and lysosomal enzyme release from normal and beta 2 integrin-deficient bovine neutrophils. **Microbiol. Immunol.**, **40**: 783-786, 1996.

NAKANO, H.; TAMURA, T.; YOSHIMOTO, T.; YAGITA, H.; MIYASAKA, M.; BUTCHER, E. C.; NARIUCHI, H.; KAKIUCHI, T.; MATSUZAWA, A. Genetic defect in T lymphocyte-specific homing into peripheral lymph nodes. **Eur. J. Immunol.**, **27**: 215-221, 1997.

O'FARRELL, A. M.; LIU, Y.; MOORE, K. W.; MUI, A. L. IL-10 inhibits macrophage activation and proliferation by distinct signaling mechanisms: evidence for Stat3-dependent and independent pathways. **Embo J.**, **17**: 1006-1018, 1998.

O'TOOLE, E. T.; HANTGAN, R. R.; LEWIS, J. C. Localization of fibrinogen during aggregation of avian thrombocytes. **Exp. Mol. Pathol.**, **61**: 175-190, 1994.

PELCHEN-MATTHEWS, A.; SIGNORET, N.; KLASSE, P. J.; FRAILE-RAMOS, A.; MARSH, M. Chemokine receptor trafficking and viral replication. **Immunol. Rev.**, **168**: 33-49, 1999.

PICKER, L. J. Mechanisms of lymphocyte homing. **Curr. Opin. Immunol.**, **4**: 277-86, 1992.

PORTER, J. C.; HOGG, N. Integrins take partners: cross-talk between integrins and other membrane receptors. **Trends Cell Biol.**, **8**: 390-396, 1998.

PREMARCK, B. A.; SCHALL, T. J. Chemokine receptor: Gateways to inflammation and infection. **Nature Med.**, **2**: 1174-1178, 1996.

PRYCE, G.; SANTOS, W. L. C.; MALE, D. An assay for the analysis of lymphocyte migration across cerebral endothelium in vitro. **J. Immunol. Methods**, **167**: 55-63, 1994.

PUIG-KROGER, A.; SANZ-RODRIGUES, F.; LONGO, N.; SANCHEZ-MATEOS, P.; BOTELLA, L.; TEIXIDO, J.; BERNABEU, C.; CORBI, A. L. Maturation-dependent expression and function of the CD49d integrin on monocyte-derived human dendritic cells. **J. Immunol.**, **165**: 4338-4345, 2000.

REZZONICO, R.; CHICHEPORTICHE, R.; IMBERT, V.; DAYER, J. M. Engagement of CD11b and CD11c beta2 integrin by antibodies or soluble CD23 induces IL-1beta production on primary human monocytes through mitogen-activated protein kinase-dependent pathways. **Blood**, **95**: 3868-3877, 2000.

ROLLINS, B. Chemokines. **Blood**, **90**: 909-928, 1997.

ROSEN, S. D.; CHI, S.; TRUE, D. D.; SINGER, M. S.; YEDNOCK, T. A. Intravenously injected sialidase inactivates attachment sites for lymphocytes on high endothelial venules. **J. immunol.**, **142**: 1895-1902, 1989.

ROSEN, S. D. Ligands for L-selectin: where and how many. **Res. Immunol.**, **144**: 699-703, 1993.

ROSEMBERG, H. F.; GALLIN, J. I. Inflammation. In: Paul, W. E. **Fundamental Immunology**. 4ed. – Philadelphia: Lippincott-Raven, 1999. Cap. 32, p. 1051-1066

ROSSI, D.; ZLOTNIK, A. The biology of chemokines and their receptors. **Annu. Rev. Immunol.**, **18**: 217-242, 2000.

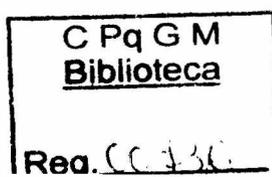
SANCHEZ, C.; DOMENECH, N.; VAZQUEZ, J.; ALONSO, F.; EZQUERRA, A.; DOMINGUEZ, J. The porcine 2A10 antigen is homologous to human CD163 and related to macrophage differentiation. **J. Immunol.**, **162**: 5230-5237, 1999.

SANCHEZ-MADRID, F.; DEL POZO, M. A. Leukocyte polarization in cell migration and immune interactions. **Embo J.**, **18**: 501-511, 1999.

SANTOS, W. L.; ANDRADE, Z. A.; ROCHA, H. Dynamics of connective matrix deposition in acute experimental E. coli pyelonephritis in rats. **Exp. Toxicol. Pathol.**, **46**: 63-69, 1994.

SASTRY, S. K.; HORWITZ, A. F. Integrin cytoplasmatic domains: mediators of cytoskeletal linkages and extra and intracellular initiated transmembrane signaling. **Curr. Opin. Cell. Biol.**, **5**: 819-831, 1993.

SAWADA, M.; TAKADA, A.; OHWAKI, I.; TAKAHASHI, N.; TATENO, H.; SAKAMOTO, J.; KANNAGI, R. Specific expression of a complex sialyl Lewis X antigen on high endothelial venules of human lymph nodes: possible candidate for L-selectin ligand. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, **193**: 337-347, 1993.



SHANG, X. Z.; ISSEKUTZ, A. C. Contribution of CD11a/CD18, CD11b/CD18, ICAM-1 (CD54) and -2 (CD102) to human monocyte migration through endothelium and connective tissue fibroblast barriers. **Eur. J. Immunol.**, **28**: 1970-1979, 1998.

SHENOI, H.; SEAVITT, J.; ZHELEZNYAK, A.; THOMAS, M. L.; BROWN, E. J. Regulation of integrin-mediated T cell adhesion by the transmembrane protein tyrosine phosphatase CD45. **J. Immunol.**, **162**: 7120-7127, 1999.

SOZZANI, S.; ALLAVENA, P.; VECCHI, A.; MANTOVANI, A. The role of chemokines in the regulation of dendritic cell trafficking. **J. Leukoc. Biol.**, **66**: 1-9, 1999.

SPRINGER, T. A. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. **Cell**, **76**: 301-314, 1994.

STAMPER JUNIOR, H. B.; WOODRUFF, J. J. An in vitro model of lymphocyte homing. I. Characterization of the interaction between thoracic duct lymphocytes and specialized high-endothelial venules of lymph nodes. **J. Immunol.** **119**: 772-780, 1977.

STAMPER JUNIOR, H. B.; WOODRUFF, J. J. Lymphocyte homing into lymph nodes: in vitro demonstration of selective affinity of recirculating lymphocytes for high-endothelial venules. **J. Exp. Med.**, **144**: 828-833, 1976.

STEINHAUSER, M. L.; KUNKEL, S. L.; HOGABOAM, C. M.; EVANOFF, H.; STRIETER, R. M.; LUKACS, N. W. Macrophage/fibroblast coculture induces macrophage inflammatory protein-1alpha production mediated by intercellular adhesion molecule-1 and oxygen radicals. **J. Leukoc. Biol.**, **64**: 636-641, 1998.

STEWART, M. P.; MCDOWALL, A.; HOGG, N. LFA-1-mediated adhesion is regulated by cytoskeletal restraint and by a Ca²⁺-dependent protease, calpain. **J. Cell. Biol.**, **140**: 699-707, 1998.

STOCKINGE, H.; GADD, S. J.; EHER, R.; MAJDIC, O.; SCHREIBER, W.; KASINRERK, W.; STRASS, B.; SCHNABL, E.; KNAPP, W. Molecular characterization and functional analysis of the leukocyte surface protein CD 31. **J. Immunol.**, **145**: 3889-3897, 1990.

STRIETER, R. M.; STANDIFORD, T. J.; HUFFNAGLE, G. B.; COLLETI, L. M.; LUKACS, N. W.; KUNKEL, S. L. "The good, the bad, and the ugly". The role of chemokines in models of human disease. **J. Immunol.**, **156**: 3583-3586, 1996.

SUN, Q.; JONES, K.; MCCLURE, B.; CAMBARERI, B.; ZACHARAKIS, B.; IVERSEN, P. O.; STOMSKI, F.; WOODCOCK, J. M.; BAGLEY, C. J.; D'ANDREA, R.; LOPEZ, A. F. Simultaneous antagonism of interleukin-5, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, and interleukin-3 stimulation of human eosinophils by targeting the common cytokine binding site of their receptors. **Blood**, **94**: 1943-51, 1999.

TAKAHASHI, K.; NAITO, M.; TAKEYA, M. Development and heterogeneity of macrophages and their related cells through their differentiation pathways. **Pathol. Int.**, **46**: 473-485, 1996.

TAPIA, F. J.; CACERES-DITTMAR, G.; SANCHEZ, M. A. Inadequate epidermal homing leads to tissue damage in human cutaneous leishmaniasis. **Immunol. Today**, **15**: 160-165, 1994.

THORNTON, B. P.; VETVICKA, V.; PITMAN, M.; GOLDMAN, R. C.; ROSS, G. D. Analysis of the sugar specificity and molecular location of the beta-glucan-binding lectin site of complement receptor type 3 (CD11b/CD18). **J. Immunol.**, **156**: 1235-1246, 1996.

TOPPILA, S.; LAURONEN, J.; MATTILA, P.; TURUNEN, J. P.; PENTTILA, L.; PAAVONEN, T.; RENKONEN, O.; RENKONEN, R. L-selectin ligands in rat high endothelium: multivalent sialyl Lewis x glycans are high-affinity inhibitors of lymphocyte adhesion. **Eur. J. Immunol.**, **27**: 1360-1365, 1997.

TURUNEN, J. P.; MAJURI, M. L.; SEPPO, A.; TIISALA, S.; PAAVONEN, T.; MIYASAKA, M.; LEMSTRÖM, K.; PENTILLÄ, L.; RENKONEN, O.; RENKONEN, R. *De novo* expression of endothelial sialyl Lewis a and sialyl Lewis x during cardiac transplant rejection: superior capacity of a tetravalente sialyl x oligosaccharide in inhibiting L-selectin-dependent lymphocyte adhesion. **J. Exp. Med.**, **182**: 1133-1142, 1995.

ULEVITCH, R. J.; TOBIAS, P. S. Receptor-dependent mechanisms of cell stimulation by bacterial endotoxin. **Annu. Rev. Immunol.**, **13**: 437-457, 1995.

VESTWEBER, D.; BLANKS, J. E. Mechanisms that regulate the function of the selectins and their ligands. **Physiol. Rev.**, **79**: 181-213, 1999.

VESTWEBER, D. Molecular mechanisms that control endothelial cell contacts. **J. Pathol.**, **190**: 281-291, 2000.

VORA, A. J.; PERRY, M. E.; HOBBS, C.; DUMONDE, D. C.; BROWN, K. A. Selective binding of peripheral blood lymphocytes to the walls of cerebral vessels in frozen sections of human brain. **J. Immunol. Meth.**, **180**: 165-180, 1995.

WAYNER, E. A.; GARCIA-PARDO, A.; HUMPHRIES, M. J.; MCDONALD, J. A.; CARTER, W. G. Identification and characterization of T lymphocyte adhesion receptor for an alternative cell attachment domain (CS-1) in plasma fibronectin. **J. Cell Biol.**, **109**: 1321-1330, 1989.

WEEKS, B. S.; KLOTMAN, M. E.; DHAWAN, S.; KIBBEY, M.; RAPPAPORT, J.; KLEINMAN, H. K.; YAMADA, K. M.; KLOTMAN, P. E. HIV-1 infection of human T lymphocytes results in enhanced alpha 5 beta 1 integrin expression. **J. Cell Biol.**, **114**: 847-853, 1991.

WERR, J.; JOHANSSON, J.; ERIKSSON, E. E.; HEDQVIST, P.; RUOSLAHTI, E.; LINDBOM, L. Integrin alpha(2)beta(1) (VLA-2) is a principal receptor used by neutrophils for locomotion in extravascular tissue. **Blood**, **95**: 1804-1809, 2000.

WHITE, S. R.; DORSCHIED, D. R.; RABE, K. F.; WOJCIK, K. R.; HAMANN, K. J. Role of very late adhesion integrins in mediating repair of human airway epithelial cell monolayers after mechanical injury. **Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.**, **20**: 787-96, 1999.

WOLK, K.; DOCKE, W. D.; VON BAEHR, V.; VOLK, H. D.; SABAT, R. Impaired antigen presentation by human monocytes during endotoxin tolerance. **Blood**, **96**: 218-223, 2000.

WOODRUFF, J. J.; KATZ, M.; LUCAS, L. E.; STAMPER JUNIOR, H. B. An in vitro model of lymphocyte homing. II. Membrane and cytoplasmic events involved in lymphocyte adherence to specialized high-endothelial venules of lymph nodes. **J. Immunol.**, **119**: 1603-1610, 1977.

YABKOWITS, R.; DIXIT, V. M.; GUO, N.; ROBERTS, D. D.; SHIMIZU, Y. Activated T-cell adhesion to thrombospondin is mediated by the $\alpha 4\beta 1$ (VLA-4) and $\alpha 5\beta 1$ (VLA-5) integrins. **J. Immunol.**, **151**: 149-158, 1993.

- YANG, Y.; CARDARELLI, P. M.; LEHNERT, K.; ROWLAND, S.; KRISSENSSEN, G. W. LPAM-1 (integrin alpha 4 beta 7)-ligand binding: overlapping binding sites recognizing VCAM-1, MAdCAM-1 and CS-1 are blocked by fibrinogen, a fibronectin-like polymer and RGD-like cyclic peptides. **Eur. J. Immunol.**, **28**: 995-1004, 1998.
- YEDNOCK, T. A.; STOOLMAN, L. M.; ROSEN, S. D. Phosphomannosyl-derivatized beads detect a receptor involved in lymphocyte homing. **J. Cell Biol.**, **104**:713-723, 1987.
- YEDNOCK, T. A.; CANNON, C.; SANCHEZ-MADRID, F.; STEINMAN, L.; KARIN, N. Prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis by antibodies against alpha 4 beta 1 integrin. **Nature**, **356**: 63-66, 1992.
- YIN, Z.; GIACOMELLO, E.; GABRIELE, E.; ZARDI, L.; AOTA, S.; YAMADA, K. M.; SKERLAVAJI, B.; DOLIANA, R.; COLOMBATTI, A.; PERRIS, R. Cooperative activity of alpha4beta1 and alpha4beta7 integrins in mediating human B-cell lymphoma adhesion and chemotaxis on fibronectin through recognition of multiple synergizing binding sites within the central cell-binding domain. **Blood**, **93**: 1221-30, 1999.