

**CAROLINE RODRIGUES ALVES VALOIS**

**Estudo da expressão de moléculas de adesão celular durante a migração transendotelial dos leucócitos no pulmão de camundongos tratados com nanopartículas magnéticas recobertas com DMSA.**

**Brasília  
2006**

**CAROLINE RODRIGUES ALVES VALOIS**

**Estudo da expressão de moléculas de adesão celular durante a migração transendotelial dos leucócitos no pulmão de camundongos tratados com nanopartículas magnéticas recobertas com DMSA.**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília, como parte integrante dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

**Orientador: Prof. Dr. Ricardo Bentes de Azevedo**

**Brasília  
2006**

V198e

Valois, Caroline Rodrigues Alves.

Estudo da expressão de moléculas de adesão celular durante a migração transendotelial dos leucócitos no pulmão de camundongos tratados com nanopartículas magnéticas recobertas com DMSA / Caroline Rodrigues Alves Valois ; Ricardo Bentes de Azevedo, orientador. - Brasília, 2006.

xi, 89 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de Brasília, Faculdade de Ciências da Saúde, Mestrado em Ciências da Saúde, 2006.

1. Migração transendotelial. 2. Moléculas de adesão celular. 3. Fluido magnético. I. Azevedo, Ricardo Bentes (orient.) II. Título.

CDU 611.018 (043)

## DEDICATÓRIA

*Dedico esta dissertação...*

*Aos meus queridos pais, Celso e Marília, meus maiores exemplos de vida, que sempre me amaram, incentivaram e proporcionaram tranquilidade para que eu pudesse lutar por meus ideais com dignidade. A eles o meu eterno amor e gratidão.*

*Aos meus queridos irmãos, Igor e Leonardo, meus maiores amigos, pelo apoio e carinho sempre demonstrados ao longo de nossas vidas.*

*A todos aqueles que têm um sonho e ainda não conseguiram realizá-lo. Que esta dissertação lhes sirva de incentivo para continuar persistindo na busca de novos caminhos e possibilidades.*

## AGRADECIMENTO ESPECIAL

*Ao Prof. Dr. Ricardo Bentes de Azevedo*

*Meu querido orientador, que na grandeza de sua generosidade concede oportunidade a todos aqueles que o procuram, sonhando em um dia se tornarem cientistas. Exemplo de Professor. A ele o meu mais sincero agradecimento e a certeza de que todas as oportunidades a mim concedidas jamais serão esquecidas.*

## AGRADECIMENTOS

*Ao meu querido amigo Luciano Paulino, um grande exemplo de dedicação a ser seguido, agradeço pelo incentivo, atenção e sugestões importantíssimas para a elaboração desta dissertação.*

*Aos grandes pesquisadores Érica Tapajós, Fernanda Nogueles, Graziella Joanitti, João Paulo Longo, Maitê Mijan, Mônica Garcia, Natália Velloso, Renata Parca, Sacha Braun e Vanessa Velloso, meus queridos companheiros de laboratório, com os quais aprendi muito durante os anos de convivência, obrigada por todas as informações e experiências compartilhadas.*

*Ao Prof. Dr. Ruy Jaeger, exemplo de dedicação à atividade científica, agradeço por toda a atenção e ensinamentos valiosíssimos para a realização da parte experimental desta dissertação.*

*A preciosa equipe do Prof. Dr. Ruy Jaeger, incluindo as doutorandas Elaine Oliveira, Letícia Souza e Vanessa Freitas, obrigada pelo carinho que me receberam e a amizade desenvolvida no curto período de convivência.*

*Ao meu sempre orientador Prof. Dr. Antonio José Ribeiro de Castro, o qual, dispondo de muita paciência, orientou os meus primeiros trabalhos científicos, agradeço pelas palavras de incentivo nos momentos de dúvida.*

*A Profa. Dra. Emília Lima, por ter cedido, gentilmente, o fluido magnético utilizado na parte experimental desta dissertação.*

*Aos Professores Dr. Albino de Magalhães, Dr. Janildo Reis Jr. e Dra. Sônia Bão, pela confiança ao disponibilizar o uso do criostato e dos equipamentos de microscopia.*

*Aos técnicos Antônio Djalma Santos e José Felipe da Silva e a todos os demais funcionários da Universidade de Brasília, que sempre me compreenderam e nunca negaram esforços para auxiliar no meu desenvolvimento científico e profissional.*

*A Universidade de Brasília, que me acolheu como aluna e proporcionou a oportunidade de continuar os meus estudos.*

*A Capes, CNPq e Finatec, pelo apoio financeiro.*

*Agradeço também a todos que de forma silenciosa contribuíram para a realização desta dissertação.*

## RESUMO

O presente estudo avaliou a expressão das moléculas de adesão celular (CAMs): L-selectina, P-selectina, E-selectina, integrina- $\beta$ 2, Mac-1, LFA-1, integrina- $\beta$ 1, VLA-4 e VCAM-1 durante a migração transendotelial dos leucócitos no pulmão. Para isto, utilizou-se um modelo animal de inflamação pulmonar induzida por fluido magnético contendo nanopartículas magnéticas recobertas com ácido meso-2,3-dimercaptosuccínico (FM-DMSA). As análises foram realizadas em camundongos nos períodos de 4 e 12 horas após a administração do FM-DMSA e em animais controles. A atividade migratória induzida experimentalmente foi investigada por meio de lavagem bronco-alveolar. Microscopia de luz foi utilizada para verificar a distribuição de agregados de nanopartículas magnéticas e análise da morfologia do órgão. A expressão das CAMs foi investigada por meio de imunofluorescência indireta em cortes por congelação. De acordo com os resultados obtidos, o FM-DMSA estimula a migração transendotelial dos leucócitos nos períodos de 4 e 12 horas, com o mínimo de dano a esse órgão. L-selectina, P-selectina, integrina- $\beta$ 2, Mac-1, LFA-1 e VLA-4 participam da migração transendotelial dos leucócitos tanto na presença de um estímulo inflamatório como em condições fisiológicas, enquanto que E-selectina, integrina- $\beta$ 1 e VCAM-1 são encontradas apenas diante de um estímulo inflamatório. L-selectina, P-selectina, integrina- $\beta$ 2, Mac-1, LFA-1, integrina- $\beta$ 1 e VCAM-1 participam da migração transendotelial dos leucócitos em sítios pós-capilares e na microvascularização, enquanto que E-selectina e VLA-4 são encontradas apenas em sítios pós-capilares. E-selectina e LFA-1 têm seus níveis de expressão alterados em função do tempo. As vias de migração transendotelial CD18-dependente (integrina- $\beta$ 2, Mac-1 e LFA-1) e CD18-independente (integrina- $\beta$ 1 e VLA-4) podem contribuir mutuamente para a migração dos leucócitos no pulmão.

## ABSTRACT

The expression of the cell adhesion molecules (CAMs): L-selectin, P-selectin, E-selectin, integrin- $\beta$ 2, Mac-1, LFA-1, integrin- $\beta$ 1, VLA-4, and VCAM-1 during the transendothelial migration of leukocytes in the lung was evaluated. For this, an animal model of pulmonary inflammation was used, induced by a fluid containing magnetic nanoparticles coated with meso-2,3-dimercaptosuccinic acid (FM-DMSA). The analyses were conducted in mice at 4 and 12 hours following the administration of FM-DMSA and in control mice. The experimentally induced migratory activity was investigated using bronco-alveolar lavage. Light microscopy was used to verify the distribution of clusters of magnetic nanoparticles and to conduct histological analysis of lung tissue. The expression of CAMs was investigated by indirect immunofluorescence in frozen sections. According to the results obtained, FM-DMSA stimulates transendothelial migration of leukocytes at 4 and 12 hours, with minimal damage to the organ. L-selectin, P-selectin, integrin- $\beta$ 2, Mac-1, LFA-1, and VLA-4 participate in transendothelial migration of leukocytes both in the presence of inflammatory stimulation and in normal conditions. In contrast, E-selectin, integrin- $\beta$ 1, and VCAM-1 are found only during inflammatory stimulation. L-selectin, P-selectin, integrin- $\beta$ 2, Mac-1, LFA-1, integrin- $\beta$ 1, and VCAM-1 participate in transendothelial migration of leukocytes at post-capillary and microvascularized sites. In contrast, E-selectin and VLA-4 are found only in post-capillary sites. The expression levels of E-selectin and VLA-4 change over time. Leukocyte migration in lung can be partially CD-18 dependent (integrin- $\beta$ 2, Mac-1, and LFA-1) and partially CD-18 independent (integrin- $\beta$ 1 and VLA-4).

**LISTA DE ILUSTRAÇÕES**

<b>Figura 1.</b> Representação das etapas da migração transendotelial.	<b>08</b>
<b>Figura 2.</b> Principais CAMs envolvidas na migração transendotelial.	<b>09</b>
<b>Figura 3.</b> Aspecto do FM-DMSA e comportamento magnético do fluido.	<b>33</b>
<b>Figura 4.</b> Camundongo da raça <i>Swiss</i> .	<b>34</b>
<b>Figura 5.</b> Veia do animal e administração endovenosa do FM-DMSA.	<b>35</b>
<b>Figura 6.</b> Escalpe posicionado e incisão no átrio direito do coração.	<b>36</b>
<b>Figura 7.</b> Sistema utilizado para a perfusão cardíaca.	<b>36</b>
<b>Figura 8.</b> Traqueotomia e cateter introduzido na traquéia.	<b>37</b>
<b>Figura 9.</b> Dispositivo de três vias utilizado na lavagem bronco-alveolar.	<b>38</b>
<b>Figura 10.</b> Representação dos procedimentos para a obtenção do número de leucócitos totais.	<b>39</b>
<b>Figura 11.</b> Representação do preparo das amostras para a criomicrotomia.	<b>46</b>
<b>Figura 12.</b> Representação da técnica de imunofluorescência indireta.	<b>48</b>
<b>Figura 13.</b> Jogos de filtros utilizados para cada fluoróforo e cor resultante.	<b>49</b>
<b>Figura 14.</b> Número de leucócitos totais no lavado bronco-alveolar.	<b>54</b>
<b>Figura 15.</b> Fotomicrografias de pulmões de camundongos.	<b>56</b>
<b>Figura 16.</b> Fotomicrografias de imunofluorescência para L-selectina.	<b>58</b>
<b>Figura 17.</b> Fotomicrografias de imunofluorescência para P-selectina.	<b>60</b>
<b>Figura 18.</b> Fotomicrografias de imunofluorescência para integrina- $\beta$ 2.	<b>61</b>
<b>Figura 19.</b> Fotomicrografias de imunofluorescência para Mac-1.	<b>63</b>
<b>Figura 20.</b> Fotomicrografias de imunofluorescência para LFA-1.	<b>64</b>
<b>Figura 21.</b> Fotomicrografias de imunofluorescência para integrina- $\beta$ 1.	<b>66</b>
<b>Figura 22.</b> Fotomicrografias de imunofluorescência para VLA-4.	<b>67</b>
<b>Figura 23.</b> Fotomicrografias de imunofluorescência para VCAM-1.	<b>68</b>
<b>Figura 24.</b> Sumário dos principais resultados da imunofluorescência.	<b>69</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BSA	<i>Bovine serum albumin</i> / Albumina sérica bovina
CAMs	<i>Cell adhesion molecules</i> / Moléculas de adesão celular
DMSA	<i>Meso-2,3-dimercaptosuccinic acid</i> / Ácido meso-2,3-dimercaptosuccínico
DPOC	Doença pulmonar obstrutiva crônica
ELAM-1	<i>Endothelial-leukocyte adhesion-1</i> / Molécula de adesão leucócito-endotélio-1
ESL-1	<i>E-selectin ligand-1</i> / E-selectina ligante-1
FM-DMSA	Fluido magnético contendo nanopartículas magnéticas recobertas com DMSA
GLyCAM-1	<i>Glycosylation-dependent cell adhesion-1</i> / Molécula de adesão celular dependente da glicosilação-1
GMP-140	<i>Granule membrane protein-140</i> / Proteína de membrana granular-140
gp 150,95	<i>Glycoprotein 150,95</i> / Glicoproteína 150,95
H&E	Hematoxilina e eosina
Hs	Horas
IAP	<i>Integrin-associated protein</i> / Proteína associada a integrina
ICAM	<i>Intercellular adhesion molecule</i> / Molécula de adesão intercelular
IL-1	Interleucina-1
LAD-1	<i>Leukocyte adhesion deficiency-1</i> / Deficiência de adesão leucocitária-1
LAM-1	<i>Leukocyte adhesion molecule-1</i> / Molécula de adesão leucocitária-1
lbf/pol <sup>2</sup>	Libra força por polegada quadrada
LECAM ou LEC.CAM	<i>Leukocyte-endothelial cell adhesion molecule</i> / Molécula de adesão célula endotelial-leucócito

LFA-1	<i>Leukocyte function associated antigen-1</i> / Antígeno associado à função leucocitária-1
LPA	Lesão pulmonar aguda
LPS	Lipopolissacarídeo
Mac-1	<i>Macrophage antigen-1</i> / Antígeno macrofágico-1
Mad-CAM-1	<i>Mucosal addressin cell adhesion molecule-1</i> / Molécula de adesão celular dirigida à mucosa-1
P.A.	Pró-análise
PADGEM	<i>Platelet-activation-dependent granule external membrane protein</i> / Proteína de membrana externa granular dependente da ativação plaquetária
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> / Tampão fosfato-salina
PECAM-1	<i>Platelet endothelial cell adhesion molecule-1</i> / Molécula de adesão plaqueta-célula endotelial-1
PLSD	<i>Protected least significant difference</i> / Diferença mínima significativa protegida
PMA	<i>Phorbol myristate acetate</i> / Acetato de forbol miristato
PSGL-1	<i>P-selectin glycoprotein ligand-1</i> / Glicoproteína ligante da P-selectina-1
PVC	<i>Polyvinyl chloride</i> / Poli cloreto de vinila
SARA	Síndrome da angústia respiratória aguda
sLe	Syalil Lewis / Sialil Lewis
TRITC	<i>Tetramethylrhodamine isothiocyanate</i> / Isotiocianato de tetrarodamina
VCAM-1	<i>Vascular cell adhesion molecule-1</i> / Molécula de adesão celular vascular-1
VLA	<i>Very late antigen</i> / Antígeno muito tardio

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>01</b>
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA</b>	<b>05</b>
2.1 Migração transendotelial	06
2.2 Mecanismo geral da migração transendotelial	06
2.3 CAMs envolvidas na migração transendotelial	08
2.3.1 Família das selectinas	10
2.3.2 Família das integrinas	12
2.3.3 Superfamília das imunoglobulinas	17
2.4 CAMs e a migração transendotelial no pulmão	19
2.5 Fluidos magnéticos e o FM-DMSA	25
<b>3 OBJETIVO</b>	<b>29</b>
3.1 Objetivo geral	30
3.2 Objetivos específicos	30
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>31</b>
4.1 Parte I	32
4.1.1 Reagentes, utensílios e equipamentos	32
4.1.2 Fluido magnético	33
4.1.3 Procedência, seleção e manutenção dos animais	33
4.1.4 Grupos experimentais	34
4.1.5 Obtenção das amostras	35
4.1.6 Perfusão cardíaca	35
4.1.7 Lavagem bronco-alveolar	37
4.1.8 Número de leucócitos totais	38
4.1.9 Análise estatística dos resultados	40
4.2 Parte II	41
4.2.1 Reagentes, utensílios e equipamentos	41
4.2.2 Anticorpos e corante de ácido nucléico	42
4.2.3 Soluções	43
4.2.4 Fluido magnético e procedência, seleção e manutenção dos animais	44

4.2.5 Grupos experimentais	44
4.2.6 Obtenção das amostras	44
4.2.7 Preparo das amostras por congelação	45
4.2.8 Criomicrotomia	45
4.2.9 Imunofluorescência indireta	47
4.2.10 Análise histológica	49
4.2.10.1 Coloração com H&E	50
4.2.10.2 Coloração pelo método de Perls	51
<b>5 RESULTADOS</b>	<b>52</b>
5.1 Lavagem bronco-alveolar	53
5.2 Microscopia de luz	55
5.3 Imunofluorescência	57
5.3.1 Família das selectinas	57
5.3.2 Integrinas da subfamília $\beta$ 2	59
5.3.3 Integrinas da subfamília $\beta$ 1	65
5.3.4 Imunoglobulina VCAM-1	68
<b>6 DISCUSSÃO</b>	<b>70</b>
6.1 Da atividade migratória induzida pelo FM-DMSA	71
6.2 Da expressão das CAMs	74
<b>7 CONCLUSÃO</b>	<b>82</b>
<b>8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>84</b>

## **1 INTRODUÇÃO**

## 1 INTRODUÇÃO

A migração transendotelial, ou seja, o egresso dos leucócitos circulantes dos vasos sangüíneos para o parênquima tissular, constitui um evento de fundamental importância para os mecanismos de imunidade natural e adaptativa do organismo (LIU et al., 2004; MARTIN; FREVERT, 2005; NOURSHARGH; MARELLI-BERG, 2005). Por outro lado, o acúmulo de leucócitos nos compartimentos extravasculares também pode ocasionar lesão tecidual em decorrência da liberação demasiada de substâncias tóxicas, incluindo proteases e espécies reativas de oxigênio, resultando no desenvolvimento de quadros patológicos ou ainda contribuindo para o agravamento de doenças já estabelecidas (GUO; WARD, 2002).

No pulmão, a migração transendotelial está relacionada com a patogenia de doenças inflamatórias, como, por exemplo, a asma, a bronquite aguda e a doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) (BLOEMEN et al., 1997; DOERSCHUK, 2000; HAMID et al., 2003). Outras condições, ainda menos favoráveis, apresentam um alto índice de mortalidade, não tendo sido desenvolvido, até o momento, um tratamento específico para as mesmas. Dentre estas últimas pode-se citar a lesão pulmonar aguda (LPA) e a síndrome da angústia respiratória aguda (SARA) (ABRAHAM, 2003; GUO et al., 2002; O'BYRNE; POSTMA, 1999; SETHI; WAXMAN, 2001).

Diante desse quadro, a busca pelas bases moleculares que coordenam a migração transendotelial dos leucócitos no pulmão intensificou-se nas últimas décadas. Na diversidade de fatores endógenos avaliados para tanto, as moléculas de adesão celular (CAMs) ganharam destaque devido a sua possibilidade de aplicação clínica, seja funcionando como marcadores biológicos para as doenças

inflamatórias pulmonares, seja como alvos para fármacos ou agentes terapêuticos imunodirecionados (DEDRICK et al., 2003; KUENZ et al., 2005; LUSTER et al., 2005; ULBRICH et al., 2003).

As CAMs são moléculas expressas na superfície celular que, conforme a similaridade estrutural e funcional, apresentam-se divididas em cinco grupos: caderinas, mucinas, família das selectinas, família das integrinas e a superfamília das imunoglobulinas (ALBERTS et al., 2002; SIMON; GREEN, 2005). A participação de tais moléculas no processo de migração transendotelial dos leucócitos no pulmão tem sido amplamente investigada por meio de modelos animais de inflamação, onde o recrutamento dos leucócitos é induzido pela administração de ácidos, bactérias, citocinas, endotoxinas, proteínas do complemento e complexo imune (BURNS et al., 2003; WAGNER; ROTH, 2000). Apesar disso, os resultados obtidos até o momento ainda não são conclusivos, principalmente no que se refere às CAMs que constituem as famílias das selectinas e integrinas; o que suscita a necessidade da realização de novos estudos utilizando modelos experimentais *in vivo* que possam melhor representar as condições encontradas nas doenças inflamatórias pulmonares.

Para essa finalidade, a utilização dos fluidos magnéticos tem sido recentemente proposta na literatura (AZEVEDO et al., 2004; CHAVES, 2002; CHAVES et al., 2005; GARCIA, 2005). Os fluidos magnéticos são dispersões constituídas de nanopartículas magnéticas recobertas por uma camada molecular estabilizante, como, por exemplo, o ácido meso-2,3-dimercaptosuccínico (DMSA), num solvente carreador (HALBREICH et al., 1998; MASSART, 1982). As nanopartículas magnéticas podem ser sintetizadas a partir de várias ferritas cúbicas, incluindo a magnetita (MASSART, 1982; SUN et al., 2004). Estudos demonstraram

que o fluido magnético contendo nanopartículas de magnetita recobertas com DMSA (FM-DMSA) apresenta distribuição preferencial para o pulmão, onde desencadeia um quadro inflamatório de moderado a severo; podendo, desta maneira, ser utilizado como um agente indutor para o recrutamento dos leucócitos em modelos animais de inflamação pulmonar (AZEVEDO et al., 2004; CHAVES, 2002; GARCIA, 2005).

Tendo em vista as dúvidas presentes na literatura e a futura aplicabilidade clínica, planejou-se este trabalho a partir da compreensão das moléculas de adesão das famílias das selectinas e integrinas que participam da migração transendotelial dos leucócitos no pulmão, por meio de um modelo animal de inflamação ainda não explorado, no qual o recrutamento dos leucócitos é induzido pela administração do FM-DMSA.

## **2 REVISÃO DA LITERATURA**

## **2 REVISÃO DA LITERATURA**

### **2.1 Migração transendotelial**

Migração transendotelial é o termo utilizado para se referir ao conjunto de etapas que resultam no egresso dos leucócitos circulantes dos vasos sangüíneos para o parênquima tissular (LIU et al., 2004; MARTIN; FREVERT, 2005; NOURSHARGH; MARELLI-BERG, 2005). A migração transendotelial dos leucócitos pode ocorrer tanto em condições fisiológicas normais quanto na presença de um estímulo inflamatório (BURNS et al., 2003); e embora existam diferentes tipos de células leucocitárias, as quais, por sua vez, são classificadas em dois grupos: mononucleares (linfócitos e monócitos) e polimorfonucleares (neutrófilos, eosinófilos e basófilos), todos os leucócitos migram dos vasos sangüíneos para o parênquima tissular por meio de um mecanismo semelhante (WAGNER; ROTH, 2000).

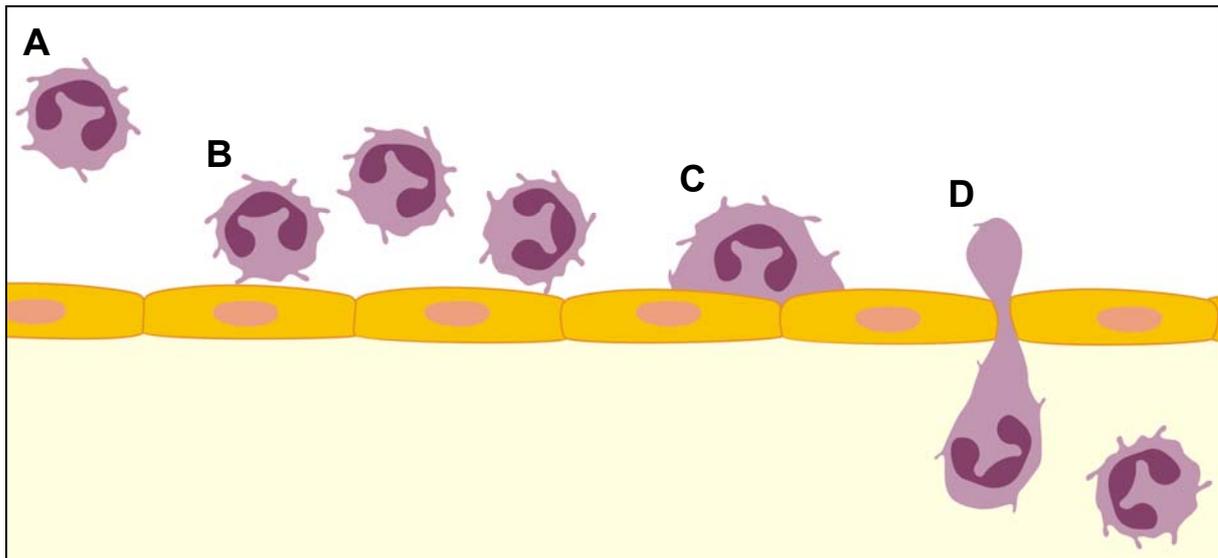
### **2.2 Mecanismo geral da migração transendotelial**

O comportamento das células leucocitárias durante a migração transendotelial foi amplamente avaliado *in vivo*, em vênulas pós-capilares localizadas na circulação sistêmica, e em modelos experimentais *in vitro*, utilizando células endoteliais derivadas das grandes veias (LIU et al., 2004; MARTIN; FREVERT, 2005;

NOURSHARGH; MARELLI-BERG, 2005). A partir de tais experimentos tornou-se possível estabelecer um mecanismo geral; o qual serve de base para o estudo da migração transendotelial dos leucócitos nas diferentes regiões do organismo, ainda que se reconheça a existência de diferenças em virtude do cenário único encontrado em alguns órgãos, dentre os quais se inclui o pulmão (BURNS et al., 2003; DOERSCHUK, 2000; WAGNER; ROTH, 2000). As principais diferenças encontradas no pulmão serão abordadas em um item à parte.

Posto isto, quatro etapas distintas podem ser observadas durante a migração transendotelial dos leucócitos (Figura 1). São elas: (1) marginação, onde os leucócitos assumem uma posição periférica ao longo da superfície das células endoteliais; (2) captura e rolamento, onde ocorre a adesão transitória dos leucócitos ao endotélio; (3) adesão, onde ocorre a firme união dos leucócitos às células endoteliais; e (4) diapedese, onde ocorre a passagem dos leucócitos por entre as células endoteliais em direção ao parênquima tissular (BURNS et al., 2003; LUSCINSKAS et al., 2002; SIMON; GREEN, 2005).

Com exceção da marginação, que é originada a partir de mudanças nas condições hemodinâmicas da circulação sanguínea (DOERSCHUK, 2000; WAGNER; ROTH, 2000), todas as demais etapas da migração transendotelial, ou seja, captura e rolamento, adesão e diapedese, são ocasionadas a partir de sucessivas interações celulares, as quais, por sua vez, são mediadas pela expressão de CAMs localizadas na superfície dos leucócitos e das células endoteliais, assim como de seus ligantes (BURNS et al., 2003; LUSCINSKAS et al., 2002; SIMON; GREEN, 2005).



**Figura 1.** Representação esquemática das etapas observadas durante a migração transendotelial dos leucócitos. A) Marginação; B) Captura e rolamento; C) Adesão; D) Diapedese. Com exceção da marginação (A), todas as demais etapas da migração transendotelial (B-D) são ocasionadas a partir de sucessivas interações celulares mediadas pela expressão de CAMs localizadas na superfície dos leucócitos e das células endoteliais.

### 2.3 CAMs envolvidas na migração transendotelial

As CAMs são moléculas expressas na superfície celular que atuam como mediadores da adesão célula-célula e célula-matriz extracelular (ALBERTS et al., 2002). Aliado a isto, durante a migração transendotelial, acredita-se que tais moléculas funcionem ainda como co-estimuladores da ativação leucocitária (SIMON; GREEN, 2005; WAGNER; ROTH, 2000). As CAMs apresentam-se divididas, conforme a similaridade estrutural e funcional, em cinco grupos: caderinas, mucinas, família das selectinas, família das integrinas e a superfamília das imunoglobulinas (ALBERTS et al., 2002; SIMON; GREEN, 2005). Para o propósito de discussão deste trabalho, as principais CAMs envolvidas no processo de migração

transendotelial dos leucócitos pertencem às famílias das selectinas e integrinas e à superfamília das imunoglobulinas (Figura 2).

CAMs		Outras designações	Distribuição	Ligantes
Família das selectinas	<b>L-selectina</b>	CD62-L, LECAM-1, LEC.CAM-1, LAM-1, MEL-14, Leu-18, TQ1, REG.56	Todos os leucócitos (exceto linfócitos T de memória)	sLe <sup>x</sup> , sLe <sup>a</sup> , PSGL-1, GLyCAM-1, podocalixina, CD34, Mad-CAM-1
	<b>P-selectina</b>	CD62P, LEC.CAM-3, PADGEM, GMP-140	Células endoteliais, plaquetas	sLe <sup>x</sup> , sLe <sup>a</sup> , PSGL-1
	<b>E-selectina</b>	CD62E, LEC.CAM-2, ELAM-1	Células endoteliais	sLe <sup>x</sup> , sLe <sup>a</sup> , PSGL-1, ESL-1
Família das integrinas	<b>LFA-1</b>	CD11a/CD18, $\alpha$ L/ $\beta$ 2	Todos os leucócitos (principalmente linfócitos)	ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3, componentes da matriz extracelular
	<b>Mac-1</b>	CD11b/CD18, $\alpha$ M/ $\beta$ 2	Todos os leucócitos	ICAM-1, ICAM-2, componentes da matriz extracelular
	<b>VLA-4</b>	CD49d/CD29, $\alpha$ 4/ $\beta$ 1, integrina- $\alpha$ 4	Linfócitos, monócitos, eosinófilos	VCAM-1, componentes da matriz extracelular
Superfamília das imunoglobulinas	<b>ICAM-1</b>	CD54	Células endoteliais, células epiteliais, todos os leucócitos	LFA-1, Mac-1
	<b>ICAM-2</b>	CD102	Células endoteliais, alguns leucócitos, plaquetas	LFA-1, Mac-1
	<b>VCAM-1</b>	CD106	Células endoteliais, algumas células dendríticas	VLA4, $\alpha$ D $\beta$ 2
	<b>PECAM-1</b>	CD31	Células endoteliais, todos os leucócitos, plaquetas	PECAM-1

**Figura 2.** Principais CAMs envolvidas na migração transendotelial dos leucócitos. LFA-1: antígeno associado à função leucocitária-1, Mac-1: antígeno macrófágico-1, VLA-4: antígeno muito tardio-4, ICAM: molécula de adesão intercelular, VCAM-1: molécula de adesão celular vascular-1, PECAM-1: molécula de adesão plaqueta-célula endotelial-1, LECAM ou LEC.CAM: molécula de adesão célula endotelial-leucócito, LAM-1: molécula de adesão leucocitária-1, PADGEM: proteína de membrana externa granular dependente da ativação plaquetária, GMP-140: proteína de membrana granular-140, ELAM-1: molécula de adesão leucócito-endotélio-1, sLe: sialil Lewis, PSGL-1: glicoproteína ligante da P-selectina-1, GLyCAM-1: molécula de adesão celular dependente da glicosilação-1, Mad-CAM-1: molécula de adesão celular dirigida à mucosa-1, ESL-1: E-selectina ligante-1.

### 2.3.1 Família das selectinas

As selectinas são proteínas transmembrana de cadeia única que contém um domínio extracelular amino-terminal (N-terminal) do tipo lectina (BARKHAUSEN et al., 2005; SIMON; GREEN, 2005). A família das selectinas é formada por três membros: L-selectina, P-selectina e E-selectina, denominados de acordo com a célula onde foram identificados pela primeira vez, ou seja, linfócito (L-selectina), plaqueta (P-selectina) ou célula endotelial (E-selectina) (BARKHAUSEN et al., 2005; WAGNER; ROTH, 2000).

As selectinas são encontradas exclusivamente em células relacionadas com a fisiologia vascular. Como exposto:

a) L-selectina é encontrada nas microvilosidades de todos os leucócitos, exceto na subpopulação de linfócitos T de memória; e é a única selectina expressa constitutivamente na superfície celular (BARKHAUSEN et al., 2005). Após a ativação leucocitária, a maior parte da L-selectina é liberada para o meio externo, por meio de clivagem proteolítica, dando origem a uma forma solúvel desta molécula, a qual permanece livre no plasma sangüíneo (WAGNER; ROTH, 2000). A autoproteólise (auto-ativação) da L-selectina pode ocorrer em condições fisiológicas ou após a estimulação por citocinas ou lipopolissacarídeo (LPS), uma endotoxina bacteriana (BARKHAUSEN et al., 2005; WAGNER; ROTH, 2000);

b) P-selectina é armazenada nos grânulos- $\alpha$  das plaquetas e em vesículas intracitoplasmáticas das células endoteliais, as quais são conhecidas como corpúsculos de Weibel-Palade; sendo transportada, em poucos minutos e de forma transitória, desde os grânulos secretores até a superfície celular, após a ativação do endotélio por trombina, histamina ou espécies reativas de oxigênio (WAGNER; ROTH, 2000).

Aliado a isto, a síntese de P-selectina nas células endoteliais também pode ser regulada a nível transcripcional por citocinas e LPS (BARKHAUSEN et al., 2005);

c) E-selectina é sintetizada e expressa de forma transitória no endotélio vascular somente após a estimulação das células endoteliais por citocinas, LPS ou substância P, um neuropeptídeo (WAGNER; ROTH, 2000). Após a estimulação, o nível máximo de expressão da E-selectina ocorre entre 4 e 6 horas, o qual é mantido por cerca de 48 horas e em seguida diminui progressivamente até desaparecer após 72 horas (AZUMA et al., 2000; BARKHAUSEN et al., 2005).

As selectinas reconhecem e se unem, por meio do domínio lectina, a diversos carboidratos, os quais se encontram usualmente conjugados a proteínas transmembrana presentes na superfície dos leucócitos (P-selectina e E-selectina) ou no endotélio (L-selectina) (BARKHAUSEN et al., 2005). Os carboidratos que parecem interagir mais fortemente com as selectinas correspondem as formas sializadas e fucosiladas do tetrassacarídeo sialil Lewis<sup>x</sup> (sLe<sup>x</sup>) e o seu isômero sialil Lewis<sup>a</sup> (sLe<sup>a</sup>). Tais carboidratos funcionam como ligantes para os três tipos de selectinas (BARKHAUSEN et al., 2005; WAGNER; ROTH, 2000). Adicionalmente, a glicoproteína ligante da P-selectina-1 (PSGL-1), uma mucina inicialmente definida como específica para a P-selectina, também funciona como ligante para L-selectina e E-selectina, ainda que com afinidades relativamente diferentes (BARKHAUSEN et al., 2005). Já outras mucinas, como a molécula de adesão celular dependente da glicosilação-1 (GLyCAM-1), a podocalixina e o CD34, funcionam como ligantes para a L-selectina, enquanto que a mucina E-selectina ligante-1 (ESL-1) tem sido reconhecida como ligante para a E-selectina (WAGNER; ROTH, 2000). A molécula de adesão celular dirigida à mucosa-1 (Mad-CAM-1), integrante da superfamília das

imunoglobulinas, também apresenta um domínio semelhante à mucina, o qual funciona como ligante para a L-selectina (BARKHAUSEN et al., 2005).

A interação das selectinas com os seus ligantes é de afinidade relativamente baixa (SIMON; GREEN, 2005). Isto ocasiona a união dos leucócitos à parede vascular (captura) e, ao mesmo tempo, permite que essas células rolem ao longo do endotélio (rolamento), impulsionadas pelo fluxo sanguíneo (ALBERTS et al., 2002; WAGNER; ROTH, 2000). Tais eventos compreendem uma das etapas iniciais da migração transendotelial dos leucócitos, a qual é chamada de captura e rolamento. Nesta etapa, o íntimo contato com as células endoteliais possibilita aos leucócitos encontrar fatores de ativação específicos, os quais, por sua vez, induzem sua firme união e posterior diapedese (BARKHAUSEN et al., 2005; SIMON; GREEN, 2005). Em caso da ausência destes fatores de ativação, os leucócitos perderão o contato com as células endoteliais e voltarão à corrente sanguínea (WAGNER; ROTH, 2000).

### **2.3.2 Família das integrinas**

As integrinas compreendem um amplo grupo de moléculas heterodiméricas constituídas por duas subunidades polipeptídicas transmembrana denominadas como cadeias  $\alpha$  e  $\beta$  (HYNES, 2002). A família se subdivide em diversas subfamílias dependendo da cadeia  $\beta$  que a constitui (HYNES, 2002; SIMON; GREEN, 2005). Ao todo 24 heterodímeros de integrinas, formados por 8 tipos de cadeia  $\beta$  e 18 tipos de cadeia  $\alpha$ , já foram identificados e novos tipos estão ainda sendo descobertos

(LUSCINSKAS; LAWLER, 1994; SIMON; GREEN, 2005; WAGNER; ROTH, 2000). De particular interesse para este estudo, a subfamília  $\beta 1$  consiste de uma cadeia  $\beta 1$ (integrina- $\beta 1$ ) ligada à cadeia  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$ ,  $\alpha 5$ ,  $\alpha 6$ ,  $\alpha 7$ ,  $\alpha 8$ ,  $\alpha 9$ ,  $\alpha 10$ ,  $\alpha 11$  ou  $\alpha V$  (LUSCINSKAS; LAWLER, 1994); enquanto que a subfamília  $\beta 2$  consiste de uma cadeia  $\beta 2$  (integrina- $\beta 2$ ) ligada à cadeia  $\alpha L$  (LFA-1: antígeno associado à função leucocitária-1),  $\alpha M$  (Mac-1: antígeno macrofágico-1),  $\alpha X$  (gp 150,95: glicoproteína 150,95) ou  $\alpha D$  ( $\alpha D\beta 2$ ) (HYNES, 2002). Apesar da maior parte das cadeias  $\alpha$  e  $\beta$  das integrinas corresponderem a antígenos de diferenciação leucocitária, somente as integrinas da subfamília  $\beta 2$  são usualmente designadas com a nomenclatura correspondente a tais antígenos, assim temos:  $\beta 2 = CD18$ ,  $\alpha L = CD11a$ ,  $\alpha M = CD11b$ ,  $\alpha X = CD11c$  e  $\alpha D = CD11d$  (LUSCINSKAS; LAWLER, 1994; SIMON; GREEN, 2005).

As integrinas da subfamília  $\beta 1$  são encontradas na maioria das células do organismo (HYNES, 2002; LUSCINSKAS; LAWLER, 1994). No que se refere às células leucocitárias, as integrinas de  $\beta 1\alpha 1$  a  $\beta 1\alpha 6$  são encontradas nos linfócitos, onde aumentam os níveis de expressão dias após a sua ativação e, por esta razão, também são conhecidas como antígeno muito tardio (VLA), assim temos:  $\beta 1\alpha 1 = VLA-1$ ,  $\beta 1\alpha 2 = VLA-2$ ,  $\beta 1\alpha 3 = VLA-3$ ,  $\beta 1\alpha 4 = VLA-4$ ,  $\beta 1\alpha 5 = VLA-5$  e  $\beta 1\alpha 6 = VLA-6$  (LUSCINSKAS; LAWLER, 1994). Aliado a isto, a integrina VLA-4 tem sido encontrada em monócitos e eosinófilos (YUSUF-MAKAGIANSAR et al., 2002). Em contrapartida, a expressão das integrinas da subfamília  $\beta 1$  não tem sido observada em neutrófilos e basófilos (YUSUF-MAKAGIANSAR et al., 2002). Já as integrinas da subfamília  $\beta 2$  são encontradas exclusivamente nas células leucocitárias; sendo que a integrina LFA-1 é encontrada principalmente em linfócitos, enquanto que as integrinas Mac-1, gp 150,95 e  $\alpha D\beta 2$  são encontradas em todos os tipos de leucócitos (HYNES, 2002; WAGNER; ROTH, 2000).

Por outro lado, embora as integrinas da subfamília  $\beta 1$  e  $\beta 2$  sejam expressas constitutivamente na superfície celular, ambas precisam ser ativadas para interagir com seus ligantes (HYNES, 2002). Tal ativação pode ocorrer na presença de agentes quimiotáticos ou citocinas; e é caracterizada por uma mudança na forma dessas integrinas, expondo os seus domínios de ligação localizados nas cadeias  $\alpha$  e  $\beta$ , tornando-as, assim, capazes de interagir com seus ligantes (WAGNER; ROTH, 2000).

As integrinas das subfamílias  $\beta 1$  e  $\beta 2$  reconhecem e se ligam a diversos componentes da matriz extracelular. Sendo assim, colágeno, fibroblasto, fibronectina, laminina e vitronectina funcionam como ligantes para as integrinas da subfamília  $\beta 1$ ; e o fibrinogênio funciona como ligante para as integrinas da subfamília  $\beta 2$  (BURNS et al., 2003). Em função disto, a possibilidade de tais integrinas atuarem como mediadores da migração dos leucócitos pela matriz extracelular tem sido avaliada por diversos autores (RIDGER et al., 2001; WANG et al., 2005; WERR et al., 1998). Acredita-se que tal fato pode ajudar a esclarecer os mecanismos pelos quais os leucócitos passam por entre as células endoteliais, durante a etapa de diapedese da migração transendotelial, e, posteriormente, se locomovem nos tecidos extravasculares (BURNS et al., 2003).

Nesse sentido, Werr e colaboradores, em 1998, utilizando microscopia intravital para avaliar a participação das integrinas  $\beta 1$  e  $\beta 2$  na migração dos leucócitos pela matriz extracelular, relataram que tal evento está fortemente relacionado com a expressão da integrina  $\beta 1$  nas células leucocitárias. Da mesma forma, Ridger e colaboradores, em 2001, observaram, por meio de microscopia eletrônica de transmissão, que a integrina  $\beta 1$  atua na migração dos leucócitos pelas regiões extravasculares do órgão pulmonar. Já Wang e colaboradores, em 2005,

demonstraram a participação das integrinas da subfamília  $\beta 1$  na migração dos leucócitos pela membrana basal perivascular. Aliado a isto, esses mesmos autores discutiram que a integrina  $\beta 1$  atua no processo de migração dos leucócitos pela matriz extracelular juntamente com proteases liberadas pelas próprias células leucocitárias. Fato este que já havia sido considerado por Wagner & Roth, em 2000.

Embora originalmente conhecidas como receptores para moléculas da matriz extracelular, as integrinas das subfamílias  $\beta 1$  e  $\beta 2$  também atuam como mediadores da união dos leucócitos às células endoteliais, por meio de interações heterotípicas com moléculas da superfamília das imunoglobulinas (BURNS et al., 2003; WAGNER; ROTH, 2000). Como exposto, a molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1) funciona como ligante para todas as integrinas da subfamília  $\beta 2$ , ainda que com afinidade relativamente baixa para LFA-1; a molécula de adesão intercelular-2 (ICAM-2) funciona como ligante para as integrinas Mac-1 e LFA-1; a molécula de adesão intercelular-3 (ICAM-3) funciona como ligante para as integrinas LFA-1 e  $\alpha D\beta 2$ ; e a molécula de adesão celular vascular-1 (VCAM-1) tem sido reconhecida como ligante para a VLA-4 (BURNS et al., 2003), embora existam evidências de que a VCAM-1 também pode interagir com outras integrinas, como, por exemplo, a  $\alpha D\beta 2$  (GRAYSON et al., 1998; VAN DER VIEREN et al., 1999).

Ao contrário das selectinas, as integrinas das subfamílias  $\beta 1$  e  $\beta 2$  interagem fortemente com seus ligantes localizados nas células endoteliais (SIMON; GREEN, 2005). Este fato resulta na firme união dos leucócitos à parede vascular, dando origem a uma outra etapa do processo de migração transendotelial, a qual é chamada de adesão (BURNS et al., 2003; SIMON; GREEN, 2005). As integrinas da subfamília  $\beta 2$  têm sido descritas como as principais moléculas que participam da adesão dos leucócitos ao endotélio durante a migração transendotelial. Talvez a

maior evidência desse envolvimento seja uma síndrome conhecida como deficiência de adesão leucocitária-1 (LAD-1), onde a presença de uma variedade de mutações na cadeia  $\beta 2$  das integrinas evita a formação de heterodímeros. Por conseguinte, as integrinas da subfamília  $\beta 2$  estão ausentes ou em quantidades inferiores a 10% nos leucócitos. Tal síndrome está associada à inabilidade das células leucocitárias se aderirem firmemente à parede dos vasos sanguíneos e, desta maneira, o acúmulo de leucócitos nos sítios de migração reduz significativamente. Indivíduos portadores desta condição sofrem repetidas infecções bacterianas, as quais podem levar até mesmo à morte (HAWKINS et al., 1992).

A capacidade das integrinas da subfamília  $\beta 2$  atuarem como mediadores da união dos leucócitos às células epiteliais, durante um evento chamado de migração transepitelial (considerando, neste caso, migrações epiteliais que não envolvem células endoteliais), também tem sido descrita na literatura (ZEN; PARKOS, 2003). Embora os ligantes para tais integrinas nas células epiteliais ainda não tenham sido identificados, estudos em modelos experimentais *in vitro*, utilizando células epiteliais do intestino, demonstraram a importância da integrina  $\beta 2$  e Mac-1 para o evento de migração transepitelial dos leucócitos como um todo (BURNS et al., 2003; ZEN; PARKOS, 2003). Neste sentido, um estudo bastante interessante foi realizado por Zen & Parkos, em 2003. Utilizando monocamada de células intestinais, esses autores observaram que cerca de 90% da migração transepitelial de células polimorfonucleares pôde ser inibida com anticorpos monoclonais contra Mac-1, assim como que leucócitos deficientes de integrina  $\beta 2$  não foram capazes de migrar pela barreira celular.

A despeito disso, a possibilidade da existência de uma via alternativa para a migração transepitelial dos leucócitos tem sido investigada no pulmão. Autópsia de

pacientes portadores da síndrome LAD-1, a qual foi descrita previamente, revelaram que a migração transepitelial dos leucócitos nesse órgão ocorre independentemente da presença de integrinas da subfamília  $\beta 2$  (HAWKINS et al., 1992). De fato, tem sido descrito na literatura que esse evento pode estar relacionado com a expressão de uma outra molécula, conhecida como CD47 ou proteína associada a integrina (IAP) (BURNS et al., 2003; ZEN; PARKOS, 2003). Por outro lado, Rosseau e colaboradores, em 2000, por meio de um modelo experimental *in vitro*, utilizando células epiteliais alveolares, observaram que a migração transepitelial de monócitos esteve fortemente relacionada com a expressão da integrina Mac-1. Assim, a participação das integrinas da subfamília  $\beta 2$  no evento de migração transepitelial dos leucócitos, principalmente no que se refere ao órgão pulmonar, ainda não está completamente esclarecida.

### **2.3.3 Superfamília das imunoglobulinas**

A superfamília das imunoglobulinas compreende uma variedade de proteínas de membrana de cadeia única que contêm um ou mais domínios com características semelhantes às imunoglobulinas (BURNS et al., 2003; SIMON; GREEN, 2005). Fazem parte desta superfamília uma variedade de CAMs que participam da migração transendotelial dos leucócitos, as quais são conhecidas como ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3, VCAM-1, Mad-CAM-1 e molécula de adesão plaqueta-célula endotelial-1 (PECAM-1). Conforme mencionado anteriormente, ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3, VCAM-1 e Mad-CAM-1 são ligantes para CAMs pertencentes às famílias

das selectinas ou integrinas. Já a PECAM-1 funciona como seu próprio ligante, uma vez que é capaz de realizar interações de carácter homofílico com moléculas do mesmo tipo expressas em outras células (WAGNER; ROTH, 2000).

No que se refere à distribuição, ICAM-1 é expressa constitutivamente nos leucócitos e nas células endoteliais e epiteliais, incluindo a superfície apical dos pneumócitos que recobrem os alvéolos pulmonares (BURNS et al., 2003; ZEN; PARKOS, 2003). VCAM-1 é encontrada, também de forma constitutiva, nas células endoteliais e em algumas células dendríticas (WAGNER; ROTH, 2000). Ambas ICAM-1 e VCAM-1 apresentam baixos níveis de expressão em condições fisiológicas normais, porém são sintetizadas após a estimulação por citocinas (BURNS et al., 2003; WAGNER; ROTH, 2000). ICAM-2 é expressa em alguns leucócitos, nas células endoteliais e nas plaquetas; e seus níveis de expressão não se alteram após a estimulação celular (SIMON; GREEN, 2005). ICAM-3 é encontrada em todos os leucócitos e nas células endoteliais (SIMON; GREEN, 2005). PECAM-1 é expressa constitutivamente nos leucócitos, nas células endoteliais e nas plaquetas. Nas células endoteliais, PECAM-1 está localizada principalmente nas regiões próximas às junções celulares, onde atua mediando a passagem dos leucócitos por entre as células endoteliais (etapa de diapedese), durante o processo de migração transendotelial (BURNS et al., 2003; WAGNER; ROTH, 2000).

## 2.4 CAMs e a migração transendotelial no pulmão

A descoberta das CAMs envolvidas no processo de migração transendotelial dos leucócitos no pulmão sempre interessou a comunidade científica, não apenas para o esclarecimento do evento em si, mas na esperança de utilizar tal informação no tratamento de patologias. Neste sentido, inúmeros estudos têm sido conduzidos em modelos animais de inflamação pulmonar induzida por ácidos, bactérias, citocinas, endotoxinas, proteínas do complemento e complexo imune (BURNS et al., 2003; DOERSCHUCK, 2000; WAGNER; ROTH, 2000). Em tais estudos a participação das CAMs é investigada por diferentes ferramentas de pesquisa, como, por exemplo, lavagem bronco-alveolar, citometria de fluxo, microscopia intravital, dosagem de proteínas, imunocitoquímica e técnicas de imunohistoquímica. Apesar disso, os resultados obtidos até o momento ainda não são conclusivos e na maioria das vezes mostram-se conflitantes, principalmente no que se refere à participação das moléculas de adesão das famílias das selectinas e integrinas.

### a) Selectinas

A migração transendotelial dos leucócitos em vênulas pós-capilares ocorre em órgãos como, por exemplo, a pele, o mesentério e as vias aéreas superiores (fossas nasais, faringe, laringe, traquéia e brônquios). Este processo, caracterizado em detalhes por meio de microscopia intravital, envolve a participação inicial das CAMs da família das selectinas, mediando a captura e o rolamento dos leucócitos ao longo da parede vascular (SIMON; GREEN, 2005). No entanto, estima-se que cerca de 97% dos leucócitos presentes no pulmão encontram-se distribuídos na sua rede de capilares (BURNS et al., 2003; DOERSCHUCK, 2000). Esta rede, composta de

40 a 100 segmentos interconectados, é constituída de vasos cujos diâmetros (2  $\mu\text{m}$ -15  $\mu\text{m}$ ) não são grandes o suficiente para permitir que o fenômeno de rolamento ocorra (WAGNER; ROTH, 2000). Desta maneira, tem sido descrito na literatura que as moléculas de adesão da família das selectinas não são requeridas para o processo de migração transendotelial dos leucócitos nos capilares pulmonares (BURNS et al., 2003; DOERSCHUCK, 2000).

Nesse sentido, um trabalho bastante interessante foi realizado por Burns e colaboradores, em 2001a. Estes autores, utilizando um modelo animal de inflamação pulmonar induzida por LPS, observaram que a administração de anticorpos monoclonais contra L-selectina, P-selectina e E-selectina não surtiu qualquer efeito no número de neutrófilos ou na quantidade de proteínas no lavado bronco-alveolar, concluindo que as selectinas não participam do processo de migração transendotelial de tais células no pulmão. Ainda de acordo com esses mesmos autores, este resultado deve-se ao fato de que os principais sítios de migração no pulmão são os capilares alveolares, onde o contato entre os neutrófilos e as células endoteliais se dá em função do pequeno diâmetro dos vasos; o que minimiza o requerimento de tais moléculas de adesão.

Posto isso, um mecanismo alternativo para explicar o seqüestro dos leucócitos nos capilares pulmonares foi proposto na literatura. Revisando tal mecanismo, Doerschuck, em 2000, relatou que o mesmo está relacionado com a perda das propriedades mecânicas dos leucócitos, particularmente da sua capacidade de se deformar. De uma forma mais detalhada, esse mesmo autor explicou que, embora sejam freqüentemente maiores, os leucócitos são capazes de se locomover pelos estreitos capilares pulmonares devido à flexibilidade do seu citoesqueleto, o qual confere aos mesmos a capacidade de se deformar e, assim,

assumir um aspecto mais alongado. Já na presença de um estímulo inflamatório, esta propriedade mecânica é perdida e, por conseguinte, os leucócitos voltam a ter uma forma mais arredonda. Como resultado, a diferença de tamanho que existe entre os leucócitos (6  $\mu\text{m}$  - 8  $\mu\text{m}$ ) e os capilares pulmonares (2  $\mu\text{m}$  - 15  $\mu\text{m}$ ) ocasiona a retenção física de tais células nos sítios de inflamação.

Embora se reconheça que a existência de tal mecanismo ainda não foi de fato provada (DOERSCHUCK, 2000), o mesmo ganhou fundamento mediante a avaliação da forma das células leucocitárias nos capilares pulmonares na presença ou não de um estímulo inflamatório. Neste contexto, um estudo considerado clássico foi realizado por Motosugi e colaboradores em 1996, onde, utilizando um modelo animal de inflamação pulmonar induzida por proteínas do complemento, esses autores observaram que os neutrófilos encontrados no pulmão dos animais tratados apresentavam-se mais arredondados do que os dos animais controles. Ainda neste mesmo estudo, avaliou-se, por meio de imunocitoquímica, a distribuição da proteína actina (um componente dos microfilamentos do citoesqueleto) nos neutrófilos de tais animais. Diante dos resultados obtidos, Motosugi e colaboradores propuseram que o estímulo inflamatório ocasiona uma rápida redistribuição da actina para a periferia dos neutrófilos, o que aumenta a rigidez dessas células, diminuindo, assim, a sua capacidade de se deformar; o que, por fim, resulta em formas mais arredondadas.

Por outro lado, também tem sido descrito na literatura que a retenção física dos neutrófilos nos capilares pulmonares ocorre apenas dentro do período de 1 minuto após a estimulação, requerendo a posterior atuação das CAMs da família das selectinas para manter os leucócitos retidos no interior desses vasos (DOYLE et al., 1997; KUBO et al., 1999). Tal fato pode ser exemplificado pelo estudo de Doyle e colaboradores, em 1997. Estes autores, utilizando um modelo animal de inflamação

pulmonar induzida por proteínas do complemento, observaram que nos animais deficientes de L-selectina ocorreu uma diminuição no número de leucócitos localizados nos capilares no período de 5 minutos, enquanto que no período de 1 minuto não houve diferença significativa em relação aos animais controles. Diante desses resultados, Doyle e colaboradores concluíram que a L-selectina não é requerida para o seqüestro inicial dos leucócitos, no entanto contribui para a manutenção de tais células por um longo período de tempo dentro dos capilares pulmonares. Aliado a isto, Kubo e colaboradores, em 1999, demonstraram a importância da atuação em conjunto da P-selectina neste mesmo processo.

Em contrapartida, outros autores demonstraram que a retenção física dos leucócitos por si só não é capaz de manter tais células dentro dos capilares pulmonares (KUEBLER et al., 1997; KUEBLER et al., 2000). Neste sentido, um estudo bastante interessante foi realizado por Kuebler e colaboradores, em 1997. Estes autores, por meio de microscopia intravital, observaram que a velocidade pela qual os leucócitos se deslocavam pelos capilares pulmonares eram maiores nos animais onde foi administrado fucoidina (um inibidor de L- e P-selectina) em relação aos controles, concluindo que a interação dos leucócitos com as células endoteliais mediada pela L- e P-selectina é necessária para manter os leucócitos nos capilares pulmonares. De forma semelhante, mas agora utilizando um modelo animal de inflamação pulmonar induzida por LPS e anticorpo monoclonal contra L-selectina, Kuebler e colaboradores corroboraram estes achados em 2000.

Já outros autores consideram a possibilidade de que as moléculas de adesão da família das selectinas atuem na migração transendotelial dos leucócitos no pulmão como estimuladores da expressão de outras moléculas de adesão na superfície das células leucocitárias, como, por exemplo, das integrinas da subfamília

$\beta 2$  (SIMON; GREEN, 2005; BURNS et al., 2003; WAGNER; ROTH, 2000). Esta hipótese é baseada em estudos avaliando a participação das CAMs da família das selectinas em sítios de migração pós-capilares. Um destes estudos foi realizado por Von Adrian e colaboradores, em 1991. Estes autores observaram, por meio de microscopia intravital, que a administração de anticorpos monoclonais contra L-selectina ocasionou um acentuado decréscimo no número de leucócitos firmemente aderidos ao endotélio de vênulas localizadas no mesentério de coelhos, concluindo que a expressão da L-selectina é necessária para a subsequente etapa de adesão mediada pelas integrinas da subfamília  $\beta 2$ .

#### b) Integrinas

Durante a migração transendotelial, os leucócitos aderem firmemente à parede dos vasos sanguíneos e posteriormente passam por entre as células endoteliais em direção ao parênquima tissular. Tais etapas são chamadas de adesão e diapedese (LUSCINSKAS et al., 2002; SIMON; GREEN, 2005). Nas vênulas pós-capilares da circulação sistêmica a adesão e a diapedese dos leucócitos é mediada pela expressão das integrinas da subfamília  $\beta 2$ , ou seja, ocorre por uma via CD-18 dependente (HAWKINS et al., 1992; LIU et al., 2004; WAGNER; ROTH, 2000). No entanto, estudos em modelos animais de inflamação, assim como a autópsia de pacientes portadores da síndrome LAD-1, revelaram que o mecanismo de migração transendotelial dos leucócitos no pulmão também pode ocorrer por uma via CD-18 independente (DOERSCHUCK et al., 1990; GUO et al., 2001; HAWKINS et al., 1992).

Nesse sentido, Doerschuck e colaboradores, em 1990, utilizando diferentes modelos animais de inflamação pulmonar e anticorpo monoclonal contra integrina- $\beta 2$ , concluíram que a migração transendotelial dos leucócitos por uma ou outra via

está diretamente relacionada com o tipo de estímulo inflamatório. Revisando tais estímulos, Doerschuck e colaboradores, em 2000, relataram que as bactérias Gram-negativas (como, por exemplo, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*), o LPS, a citocina IL-1, a imunoglobulina G e o acetato de forbol miristato (PMA) induzem a migração transendotelial dos leucócitos na maioria dos casos pela via CD-18 dependente; enquanto que tal migração ocorre predominantemente pela via CD-18 independente na presença de bactérias Gram-positivas (como, por exemplo, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus* do grupo B), do fragmento C5a do complemento e do ácido hidrocloreídrico.

Posto isso, uma série de estudos foram desenvolvidos com o intuito de estabelecer as CAMs que atuam como mediadores da interação entre as células leucocitárias e endoteliais durante a migração transendotelial via CD-18 independente; os quais, por sua vez, revelaram a participação das integrinas da subfamília  $\beta 1$ , assim como de seus ligantes, dentre os quais pode-se citar o VCAM-1 (BURNS et al., 2003; CHULUYAN; ISSEKUTZ, 1993; RIDGER et al., 2001).

Nesse contexto, um estudo bastante interessante foi realizado por Ridger e colaboradores, em 2001. Estes autores, utilizando um modelo animal de inflamação pulmonar via CD-18 independente, observaram que a administração de anticorpo monoclonal contra VLA-4 ocasionou um acentuado decréscimo no número de neutrófilos presentes no lavado bronco-alveolar de camundongos, concluindo que essa integrina da subfamília  $\beta 1$  media o mecanismo de migração transendotelial dos neutrófilos no pulmão pela via CD18-independente. Aliado a isto, neste mesmo estudo, mas agora utilizando em conjunto um modelo animal de inflamação pulmonar via CD-18 dependente, os autores observaram ainda que a administração de anticorpo monoclonal contra integrina- $\beta 1$  ocasionou um decréscimo no número

de neutrófilos presentes no lavado bronco-alveolar em ambos os modelos animais empregados. Somando-se estes resultados aos de microscopia eletrônica, Ridger e colaboradores concluíram que a integrina- $\beta$ 1 também participa da migração dos leucócitos pela matriz extracelular; evento este que, por sua vez, não está sujeito a via de migração transendotelial utilizada.

Em contrapartida, tem sido questionado na literatura a contribuição desses achados para o esclarecimento das CAMs envolvidas no processo de migração transendotelial dos leucócitos no pulmão (BURNS et al., 2003; WAGNER; ROTH, 2000). Tais questionamentos foram sintetizados por Wagner & Roth, em 2000. De acordo com esses autores, os estudos realizados até o momento resultaram em muitas informações no que se refere à resposta de cada uma das integrinas frente a diferentes estímulos inflamatórios, mas pouco em relação a quais dessas moléculas de adesão especificadamente participam da migração transendotelial dos leucócitos no pulmão. Por conseguinte, esses mesmos autores ainda ressaltaram a necessidade do estabelecimento de um modelo experimental *in vivo* que de fato possa representar as condições encontradas em humanos.

## **2.5 Fluidos magnéticos e o FM-DMSA**

Os fluidos magnéticos são dispersões constituídas de nanopartículas magnéticas recobertas por uma camada molecular estabilizante, como, por exemplo, ácido cítrico, ácido poliaspártico, dextran e DMSA, num solvente carreador orgânico ou inorgânico (HALBREICH et al., 1998; MASSART, 1982). As nanopartículas

magnéticas podem ser sintetizadas a partir de várias ferritas cúbicas, cuja composição geral é  $MFe_2O_4$ , onde o M representa um metal divalente que pode ser cobalto, magnetita, maguemita, manganês, níquel ou zinco (SUN et al., 2004). Dentre estes, nanopartículas de magnetita ( $Fe_3O_4$ ), com tamanho entre 4 e 15 nm, são freqüentemente utilizadas para a obtenção de soluções coloidais (como esclarecimento, denomina-se solução coloidal toda a mistura homogênea constituída de partículas com tamanho médio entre 1 e 100 nm) estáveis em meio fisiológico (MASSART, 1982; SUN et al., 2004).

Nos fluidos magnéticos, a interação da nanopartícula magnética com o solvente carreador é forte o bastante para que o comportamento magnético das nanopartículas seja transmitido para a dispersão como um todo (MASSART, 1982; ROSENSWEIG, 1985). Esta propriedade, juntamente com o fato da camada estabilizante permitir que outros agentes, como, por exemplo, anticorpos ou quimioterápicos, sejam associados às nanopartículas magnéticas, tem despertado o interesse de vários centros de pesquisa no que se refere ao emprego de tais dispersões para o diagnóstico e tratamento de patologias (BERKOVISKY et al., 1993).

Nesse sentido, estudos demonstraram a aplicabilidade dos fluidos magnéticos na condução de fármacos para alvos específicos no organismo, empregando-se magnetos externos (MAINARDES; SILVA, 2004). Já com a associação dos fluidos magnéticos à hipertermia, uma nova modalidade terapêutica está sendo desenvolvida, a magnetohipertermia. Nesta terapia um campo magnético é utilizado para induzir a vibração das nanopartículas magnéticas e, por conseguinte, o aumento da temperatura leva a lise e a morte da célula alvo (ITO et al., 2004). Um outro emprego dos fluidos magnéticos é na magnetoforese, processo pelo qual

ocorre à separação de células por meio de um campo magnético (DA SILVA et al., 1997). Os fluidos magnéticos podem ser utilizados ainda como agentes de contraste em exames de imagem por ressonância magnética (WEISSLEDER et al., 1990).

Aliado a isso, a possibilidade da utilização dos fluidos magnéticos para estimular a migração transendotelial dos leucócitos em modelos animais de inflamação pulmonar tem sido relatada na literatura (AZEVEDO et al., 2004; CHAVES, 2002; CHAVES et al., 2005; GARCIA, 2005). Chaves, em 2002, demonstrou, por meio de análise em microscopia de luz e ressonância magnética, que o FM-DMSA apresenta, nas primeiras vinte e quatro horas após a sua administração endovenosa, distribuição preferencial para o pulmão, onde desencadeia um quadro inflamatório de moderado a severo, caracterizado pela migração transendotelial dos leucócitos para o parênquima pulmonar. Tais achados foram confirmados posteriormente por Azevedo e colaboradores, em 2004.

De forma semelhante, Chaves e colaboradores, em 2005, observaram, por meio de imunohistoquímica, que o processo inflamatório desencadeado pelo FM-DMSA é acompanhado pelo aumento dos níveis de expressão da citocina interleucina-1 (IL-1) no pulmão. Esses mesmos autores discutiram ainda que a expressão de tal citocina pode estar relacionada com o estímulo pró-migratório induzido pelo FM-DMSA. Já Garcia, em 2005, avaliando os efeitos subcrônicos e crônicos do FM-DMSA no período de até noventa dias após a sua administração endovenosa, relataram que a migração dos leucócitos pode se estender pelo parênquima pulmonar e alcançar o epitélio de alvéolos e brônquios; e que, por conseguinte, o FM-DMSA pode servir como um modelo de estudo *in vivo* para a análise concomitante da migração transendotelial e transepitelial dos leucócitos no pulmão.

Já no que se refere aos outros fluidos magnéticos, estudos demonstraram que a distribuição preferencial para o pulmão encontrada com o FM-DMSA não se aplica para as demais dispersões também constituídos por nanopartículas magnéticas de magnetita, mas com diferentes coberturas estabilizantes (CHAVES, 2002; GARCIA, 2005). Garcia, em 2005, discutiu que o comportamento biológico dos fluidos magnéticos muda de acordo com a afinidade que a sua cobertura apresenta em relação aos diferentes tecidos do organismo. Desta maneira, vale a pena ressaltar que, até o momento, apenas o FM-DMSA apresentou um comportamento interessante no ponto de vista do emprego dos fluidos magnéticos como um agente estimulador da migração transendotelial dos leucócitos em modelos animais de inflamação pulmonar.

### **3 OBJETIVO**

### **3 OBJETIVO**

#### **3.1 Objetivo geral**

Considerando a literatura pertinente, este trabalho teve como objetivo contribuir para o conhecimento do mecanismo de migração transendotelial no pulmão, mediante o estudo da expressão das CAMs: L-selectina, P-selectina, E-selectina, integrina- $\beta$ 2, Mac-1, LFA-1, integrina- $\beta$ 1, VLA-4 e VCAM-1, durante o processo inflamatório induzido pela administração do FM-DMSA em camundongos.

#### **2.2 Objetivos específicos**

- a) Avaliar os efeitos da administração do FM-DMSA, nos períodos de 4 e 12 horas, sobre a atividade migratória dos leucócitos no pulmão;
- b) Analisar a expressão das CAMs: L-selectina, P-selectina, E-selectina, integrina- $\beta$ 2, Mac-1, LFA-1, integrina- $\beta$ 1, VLA-4 e VCAM-1, no transcurso da migração transendotelial dos leucócitos no pulmão, em animais controles e após a administração do FM-DMSA;
- c) Determinar a possível correlação entre a expressão dessas CAMs e a migração transendotelial dos leucócitos nas diferentes regiões do sistema circulatório pulmonar.

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

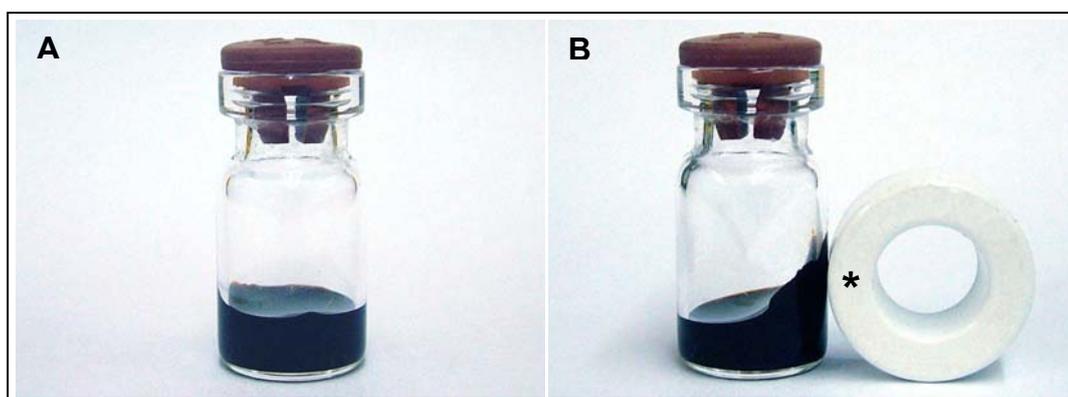
### 4.1 Parte I

#### 4.1.1 Reagentes, utensílios e equipamentos

Reagentes, utensílios e equipamentos	Fabricante
Bomba a vácuo TE-058	Tecnal Equipamentos para Laboratório, BRA
Câmara de Neubauer	C. A. Hausser & Son, EUA
Centrifuga Mikro 22R	Andreas Hettich GmbH & Co KG, ALE
Cloreto de Sódio 0,9%	Laboratório Farmacêutico Arboreto Ltda., BRA
Escalpe 27G	Becton, Dickinson Indústrias Cirúrgicas Ltda., BRA
Éter etílico pró-análise (P.A.)	Vetec Química Fina Ltda., BRA
Microscópio Axioskop	Zeiss, ALE
Ponteira de 1000 µL	Continental Lab Products, EUA
Ponteira de 10 µL	Continental Lab Products, EUA
Programa StatView	SAS Institute Inc., EUA
Tampão fofato-salina (PBS), pH 7,2	Laborclin Produtos para Laboratório Ltda., BRA
Seringa de 10 mL	Laboratórios Rymco S. A., COL
Seringa de 1 mL calibre 30G, BD Ultra-fine™ II	Becton, Dickinson Indústrias Cirúrgicas Ltda., BRA
Sonda de aspiração traqueal com tubo de poli cloreto de vinila (PVC) siliconizado nº 6	Embramed Indústria e Comércio Ltda., BRA

#### 4.1.2 Fluido magnético

Fluido magnético contendo nanopartículas de magnetita estabilizadas pelo recobrimento com DMSA (FM-DMSA), em meio aquoso, foi produzido e gentilmente cedido pela Profa. Dra. Emília Lima, do Laboratório de Química da Universidade de Goiás (Goiás, Brasil). O fluido magnético continha  $7 \times 10^{15}$  nanopartículas/cm<sup>3</sup> e o tamanho médio das nanopartículas de magnetita era de 8 nm (Figura 3).



**Figura 3.** A) Aspecto do FM-DMSA; B) Comportamento magnético do fluido. Note o deslocamento do fluido em direção a um campo magnético externo (ímã, asterisco).

#### 4.1.3 Procedência, seleção e manutenção dos animais

Foram utilizados dezoito camundongos Swiss, machos, pesando entre 30 e 35 gramas, com aproximadamente 90 dias de vida (Figura 4). Os animais foram fornecidos pelo biotério IQUEGO (Goiás, Brasil) após aprovação do projeto encaminhado ao Comitê de Ética no Uso Animal, Instituto de Ciências Biológicas,

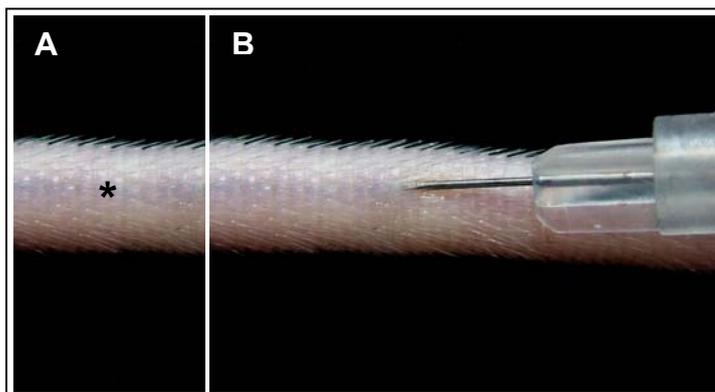
Universidade de Brasília (UnB). Os camundongos foram mantidos no Biotério do Departamento de Genética e Morfologia da UnB (GEM-IB-UnB), com temperatura, iluminação e higiene controlada, fornecimento de água e ração *ad libitum*, em gaiolas de 41 x 34 x 16 cm<sup>3</sup>.



**Figura 4.** Camundongo Swiss.

#### 4.1.4 Grupos experimentais

Os animais foram divididos em três grupos de acordo com os tratamentos a serem realizados. Cada grupo era composto por seis animais. Nos grupos 1 (FM-4 hs) e 2 (FM-12 hs) os animais receberam injeção única, via endovenosa (Figura 5), de 100  $\mu$ L de FM-DMSA e foram submetidos ao procedimento de perfusão cardíaca 4 e 12 horas após o tratamento, respectivamente. No grupo 3 (Controle) os animais não sofreram qualquer tipo de tratamento, servindo como controle.



**Figura 5.** A) Veia localizada na cauda do animal (asterisco); B) Administração endovenosa do FM-DMSA com seringa de 1 mL.

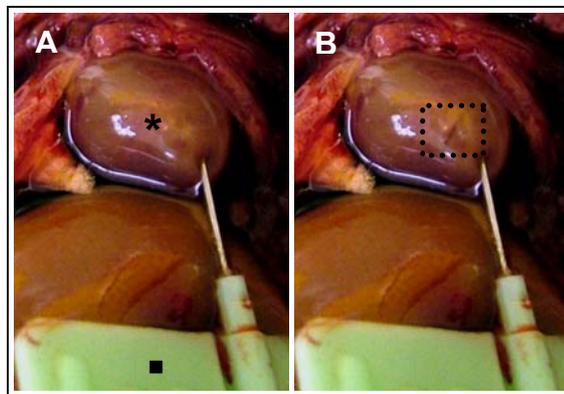
#### 4.1.5 Obtenção das amostras

No final de cada período experimental, os animais (n=6, para cada grupo) foram anestesiados com éter etílico. Imediatamente após, os animais foram submetidos à perfusão cardíaca, para lavagem bronco-alveolar.

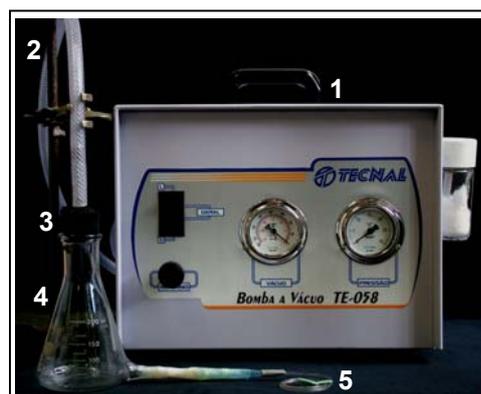
#### 4.1.6 Perfusão cardíaca

Esta técnica foi utilizada para a lavagem do sistema circulatório pulmonar. Assim, após a anestesia, os animais foram colocados em decúbito dorsal sobre mesa cirúrgica. Passou-se à incisão longitudinal mediana abdominal, seguida de ruptura do diafragma e remoção do esterno e costelas. O próximo passo foi à punção do ápice cardíaco com um escalpe. O escalpe foi introduzido até o ventrículo

esquerdo do coração. Passou-se a perfusão com solução de cloreto de sódio a 0,9%. Uma vez no ventrículo esquerdo, esta solução é impulsionada para o sistema circulatório via veia aorta. Imediatamente após realizou-se incisão no átrio direito do coração, para que fosse liberada a pressão do sistema circulatório do animal (Figura 6). A exsanguinação foi realizada durante o período de 8 minutos, sob pressão constante de 3 lbf/pol<sup>2</sup>. O sistema utilizado para impulsionar a solução de cloreto de sódio a 0,9% pelo sistema circulatório do animal está ilustrado na Figura 7.



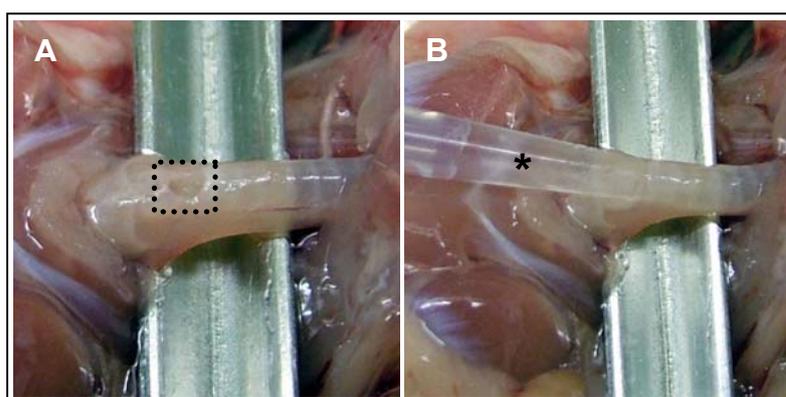
**Figura 6.** A) Escalpe (■) posicionado no ventrículo esquerdo do coração (asterisco); B) Incisão no átrio direito do coração (traçado retangular).



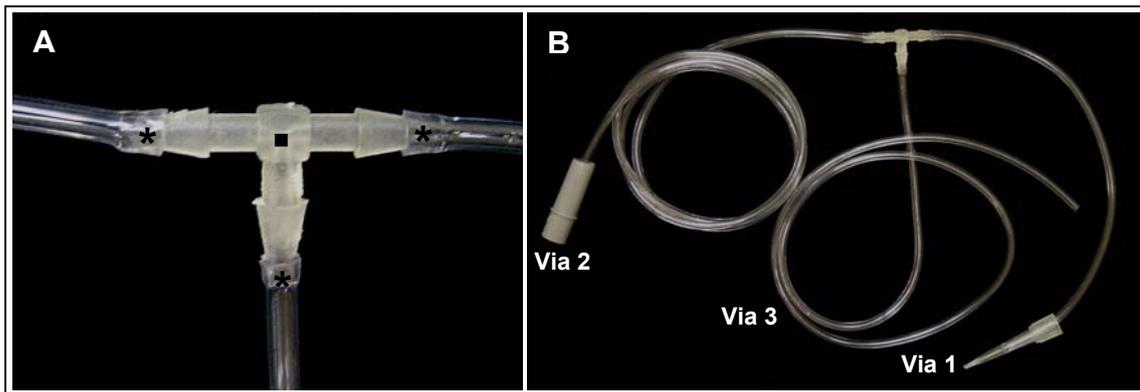
**Figura 7.** Sistema utilizado para a perfusão cardíaca. 1) Bomba a vácuo; 2) Haste de metal; 3) Rolha de borracha; 4) Erlenmeyer com saída lateral na base; 5) Ponteira de 1 mL, a qual foi utilizada como tubo de conexão, e escalpe.

#### 4.1.7 Lavagem bronco-alveolar

Esta técnica foi utilizada para a coleta dos leucócitos presentes nas vias aéreas respiratórias. Assim, imediatamente após a perfusão cardíaca, as traquéias dos animais foram expostas. Passou-se a realização de traqueotomia, seguida da inserção de um cateter no orifício originado (Figura 8). O próximo passo foi a realização de seis lavagens com 1 mL de PBS. Para isto, uma seringa de 10 mL foi acoplada a um tubo de PVC siliconizado, o qual por sua vez estava conectado ao cateter por meio de um dispositivo de três vias e outro tubo de PVC siliconizado. A seringa era utilizada para infundir lentamente e sob pressão o PBS nas vias aéreas respiratórias. Para a recuperação da solução infundida, utilizou-se a terceira via do dispositivo. Esta também encontrava-se conectada a um tubo de PVC siliconizado que conduzia a solução infundida ao recipiente de coleta, mantido a 4°C até o momento do uso (Figura 9).



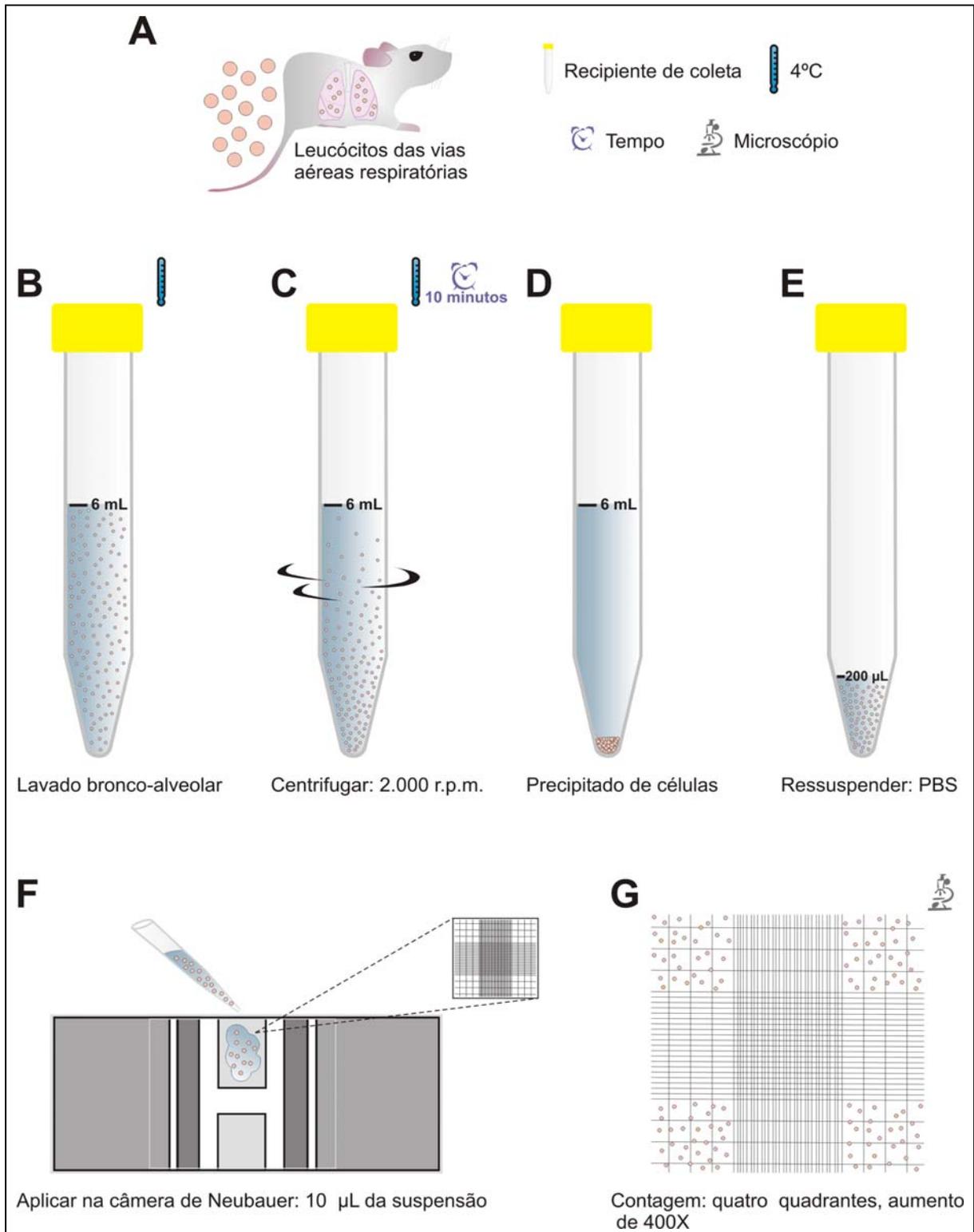
**Figura 8.** A) Traqueotomia. Note a presença de um orifício na traquéia do animal (traçado retangular); B) Cateter (asterisco) introduzido na traquéia do animal.



**Figura 9.** A) Dispositivo de três vias utilizado para a lavagem bronco-alveolar (■). Os tubos (asterisco) de PVC siliconizados conectados ao dispositivo foram obtidos a partir de sondas de aspiração traqueal; B) No tubo da via 1 é acoplada uma ponteira de 10 µL, a qual foi utilizada como cateter. No tubo da via 2 é acoplada uma seringa de 10 mL. A passagem do lavado bronco-alveolar pela Via 3 é controlada por meio do clampeamento do tubo com pinça hemostática.

#### 4.1.8 Número de leucócitos totais

O número de leucócitos totais nos lavados bronco-alveolares foi determinado em hemocítômetro de Neubauer. Para isto, o volume final da solução infundida (cerca de 6 mL para cada animal) foi centrifugado a 2.000 r.p.m, por um período de 10 minutos e a 4°C. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o precipitado resultante ressuspensionado em 200 µL de PBS. Passou-se a aplicação de 10 µL da suspensão no hemocítômetro de Neubauer. O próximo passo foi à contagem dos leucócitos, por meio de microscópio Axioskop, sob aumento de 400X. Foram contadas as células localizadas nos quatro quadrantes do hemocítômetro de Neubauer (Figura 10). Para possibilitar a determinação acurada do número de leucócitos totais, as suspensões que resultaram num número de células inferior a trinta foram novamente centrifugadas e ressuspensas em 50 µL ou 100 µL de PBS. A seguir, nova contagem foi realizada como descrito anteriormente.



**Figura 10.** Representação esquemática dos procedimentos para a obtenção do número de leucócitos totais.

Os números de leucócitos totais nas suspensões foram obtidos por meio das equações a seguir:

- Equação 1: número de leucócitos totais por mL da suspensão:

$$\text{N}^\circ \text{ de leucócitos por mL} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de leucócitos contados}}{\text{N}^\circ \text{ de quadrantes contados (=4)}} \times 10^4$$

- Equação 2: número de leucócitos totais em 50  $\mu\text{L}$ , 100  $\mu\text{L}$  ou 200  $\mu\text{L}$  da suspensão:

$$\text{N}^\circ \text{ de leucócitos em } 50 \mu\text{L} = \text{N}^\circ \text{ de leucócitos por mL} \times 0,05$$

$$\text{N}^\circ \text{ de leucócitos em } 100 \mu\text{L} = \text{N}^\circ \text{ de leucócitos por mL} \times 0,1$$

$$\text{N}^\circ \text{ de leucócitos em } 200 \mu\text{L} = \text{N}^\circ \text{ de leucócitos por mL} \times 0,2$$

#### 4.1.9 Análise estatística dos resultados

Os dados obtidos foram tratados estatisticamente por análise de variância com o teste PLSD de Fisher a um nível de significância fixado em  $P < 0,01$  (1%), utilizando-se o programa StatView.

## 4.2 Parte II

### 4.2.1 Reagentes, utensílios e equipamentos

Reagentes, utensílios e equipamentos	Fabricante
Ácido clorídrico	Vetec Química Fina Ltda., BRA
Albumina sérica bovina (BSA)	Sigma-Aldrich Co., EUA
Álcool anidro hidratado 99,3°	Zulu, BRA
Câmara úmida	Sigma-Aldrich Co., EUA
Citrato de sódio tribásico dihidratado	Sigma-Aldrich Co., EUA
Criostato Leica CM 1800	Leica Microsystems, ALE
Dako <i>pen</i>	Dako Diagnostika, ALE
Entellan	Merk, ALE
Eosina AG extra	Chroma Gesellschaft Schmid & CO., ALE
Ferrocianeto de potássio ( $K_4Fe(CN)_6$ ) P.A.	Vetec Química Fina Ltda., BRA
Papel filtro	J Prolab Comércio e Produto para Laboratório Ltda., BRA
Gelatina em pó	Vetec Química Fina Ltda., BRA
Hematoxilina	Doles Reagentes e Equipamentos para Laboratório Ltda., BRA
Hidróxido de sódio (NaOH) P.A.	Quimibrás Indústrias Químicas S.A., BRA
Lâminas	Carvalhoes Podutos para Laboratório Ltda., BRA
Lamínulas	Galvani Comércio e Indústria de Podutos Laboratoriais Ltda., BRA
Microscópio Axiophot	Zeiss, ALE
Paraformaldeído	Vetec Química Fina Ltda., BRA
PBS, pH 7,2	Laborclin Produtos para Laboratório Ltda., BRA
Pentano P.A.	Labsynth Produtos para Laboratório Ltda., BRA
Poli-L-lisina	Sigma-Aldrich Co., EUA

ProLong <i>antifade kit</i>	Molecular Probes, EUA
Sacarose cristalina grau I	Sigma-Aldrich Co., EUA
Tween 20	Sigma-Aldrich Co., EUA
Xileno P.A.	Vetec Química Fina Ltda., BRA
Vermelho neutro	Chroma Gesellschaft Schmid & CO.

#### 4.2.2 Anticorpos e corante de ácido nucléico

Todos os anticorpos primários foram produzidos em rato (*rat*) contra antígeno de camundongo (*mouse*).

Anticorpos primário		Diluição	Fabricante
<i>Rat anti-mouse</i> CD62E	(E-selectina)	1:50	BD Pharmingen, EUA
<i>Rat anti-mouse</i> CD62L	(L-selectina)	1:50	BD Pharmingen, EUA
<i>Rat anti-mouse</i> CD62P	(P-selectina)	1:50	BD Pharmingen, EUA
<i>Rat anti-mouse</i> CD18	(integrina- $\beta$ 2)	1:50	BD Pharmingen, EUA
<i>Rat anti-mouse</i> CD11b	(Mac-1)	1:50	BD Pharmingen, EUA
<i>Rat anti-mouse</i> CD11a	(LFA-1)	1:50	BD Pharmingen, EUA
<i>Rat anti-mouse</i> CD29	(integrina- $\beta$ 1)	1:50	BD Pharmingen, EUA
<i>Rat anti-mouse</i> CD49d	(VLA-4)	1:50	BD Pharmingen, EUA
<i>Rat anti-mouse</i> CD106	(VCAM-1)	1:50	BD Pharmingen, EUA

Anticorpo secundário	Diluição	Fabricante
Anti-rat IgG TRITC conjugate	1:100	Sigma-Aldrich Co., EUA

Corante de ácido nucléico	Diluição	Fabricante
SYTOX <i>green counterstaining</i>	1:300	Molecular Probes, EUA

## 4.2.3 Soluções

Soluções	Composição	
BSA a 2,5%	2,5% 1X	(p/v) BSA PBS pH 7,2
BSA a 5%	5% 1X	(p/v) BSA PBS pH 7,2
NaOH 0,1M	0,1 M	NaOH Água destilada
Reagente de Perls	2:1	(v/v) Solução A/ Solução B
Solução A - Perls	2%	(p/v) $K_4Fe(CN)_6$ Água destilada
Solução B - Perls	13%	(v/v) Ácido clorídrico Água destilada
Eosina a 0,5%	0,5%	(p/v) Eosina Água destilada
Gelatina a 7,5% e Sacarose a 15%	7,5% 15% 1X	(p/v) Gelatina (p/v) Sacarose PBS pH 7,2
Paraformaldeído a 4%	4% 1X	(p/v) Paraformaldeído PBS pH 7,2 NaOH 0,1M para clarear
2X SSC	300 mM 30 mM 15%	Cloreto de Sódio Citrato de Sódio Água nanopura pH 7,0
Sacarose a 15%	15% 1X	(p/v) Sacarose PBS pH 7,2
Tween 20 a 0,5%	0,5% 1X	(v/v) Tween 20 PBS pH 7,2
Vermelho neutro a 1%	1%	(p/v) Vermelho neutro Água destilada

#### **4.2.4 Fluido magnético e procedência, seleção e manutenção dos animais**

Idem aos itens descritos na Parte I.

#### **4.2.5 Grupos experimentais**

Os animais foram divididos em três grupos de acordo com os tratamentos a serem realizados. Cada grupo era composto por três animais. Nos grupos 1 (FM-4 hs) e 2 (FM-12 hs) os animais receberam injeção única, via endovenosa, de 100  $\mu$ L do FM-DMSA e foram mortos 4 e 12 horas após o tratamento, respectivamente. No grupo 3 (Controle) os animais não sofreram qualquer tipo de tratamento, servindo como controle.

#### **4.2.6 Obtenção das amostras**

No final de cada período experimental, os animais (n=3, para cada grupo) foram mortos por deslocamento cervical. Imediatamente após, foram coletados fragmentos transversais dos pulmões, com aproximadamente 7 x 2 mm<sup>2</sup>, para imunofluorescência indireta.

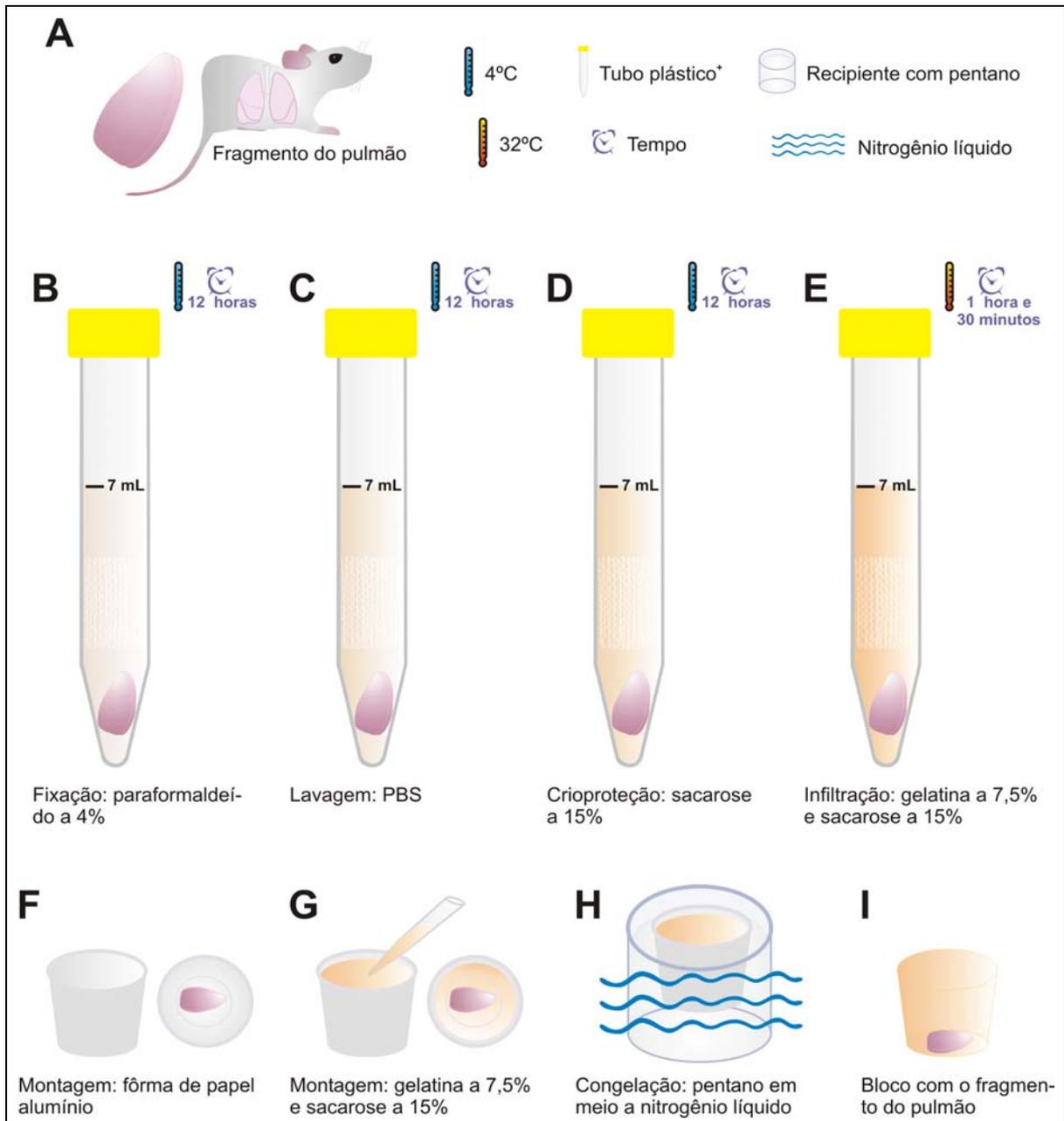
#### **4.2.7 Preparo das amostras por congelação**

Cada amostra foi inserida em tubo plástico identificado pelo número e grupo do animal, contendo paraformaldeído a 4% por um período de 12 horas, a 4°C. Após este período, as amostras foram lavadas em PBS durante 12 horas, a 4°C, para eliminação do fixador. Passou-se a crioproteção, por meio de sacarose a 15%. O tempo de crioproteção foi de 12 horas, a 4°C. O próximo passo foi à infiltração da gelatina, realizada com uma mistura de gelatina a 7,5% e sacarose a 15%, por um período de 1 hora e 30 minutos, a 32°C. A seguir as amostras foram montadas em blocos de gelatina a 7,5% e sacarose a 15%, moldados por fôrmas de papel alumínio. A congelação dos blocos foi realizada por meio de recipiente plástico contendo pentano, o qual, por sua vez, encontrava-se parcialmente imerso em nitrogênio líquido. Os blocos foram mantidos a -70°C até o momento do uso (Figura 11).

#### **4.2.8 Criomicrotomia**

Cortes seriados com 5 µm de espessura foram obtidos por meio de criostato Leica CM 1800, ajustado na temperatura de -28°C. Os cortes foram dispostos em lâminas previamente tratadas com poli-L-lisina. Para cada fragmento de pulmão foram obtidos, no total, vinte e quatro cortes: dezoito para o ensaio de

imunofluorescência indireta e seis para análise histológica. As lâminas foram mantidas a  $-70^{\circ}\text{C}$  até o momento do uso.

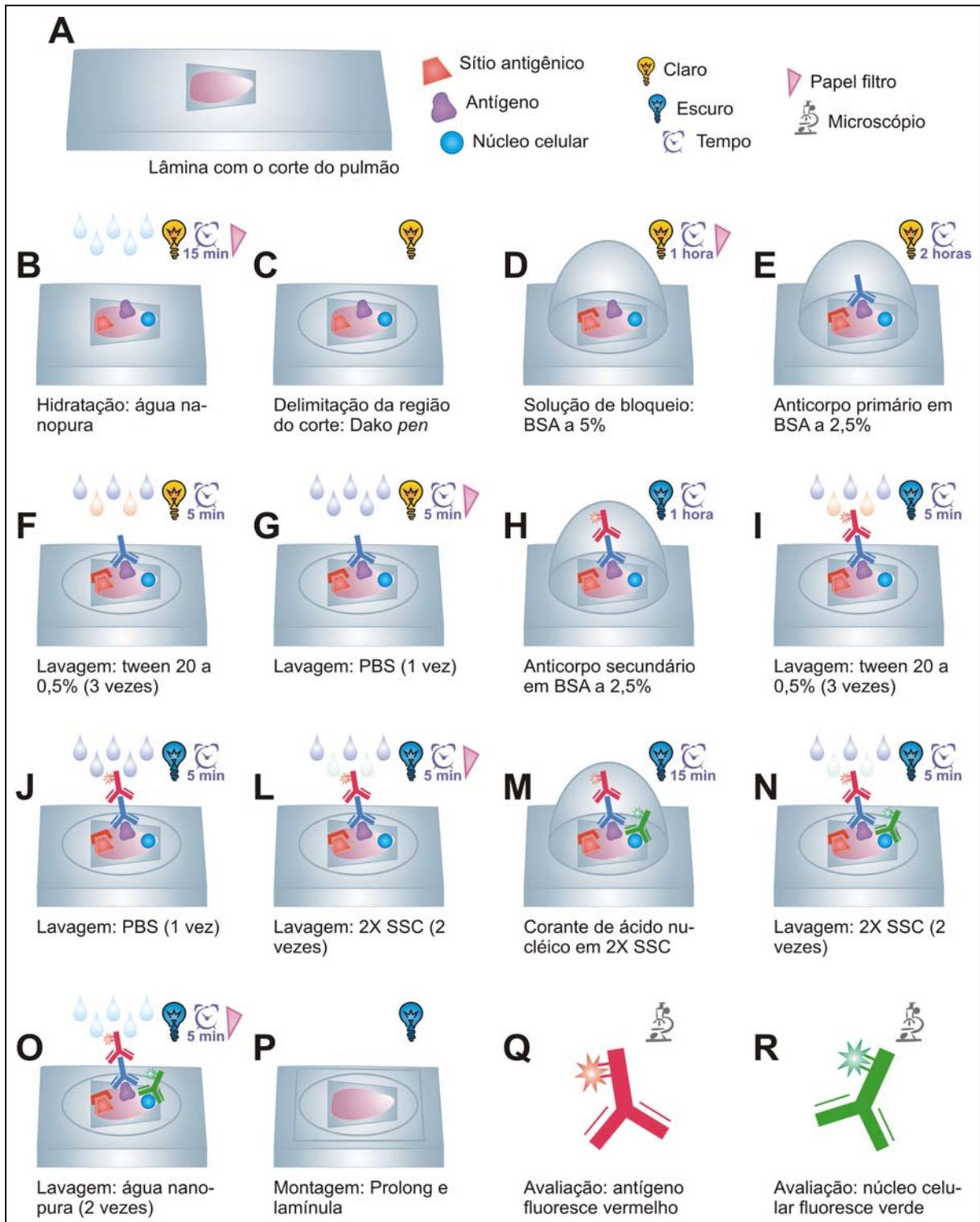


**Figura 11.** Representação esquemática do preparo das amostras para a criomicrotomia. \*Empregado em conjunto com gaze, para manter os fragmentos do pulmão completamente submerso nas soluções.

#### 4.2.9 Imunofluorescência indireta

Esta técnica consiste da utilização de anticorpos marcados com fluoróforos para identificação e localização de antígenos em preparados histológicos teciduais. Assim, após a obtenção dos cortes, as lâminas foram imersas em água nanopura por um período de 15 minutos para hidratação dos cortes. A seguir, o excesso de água foi removido com papel filtro e a região ao redor dos cortes delimitada por meio de Dako *pen* (caneta marcadora repelente de líquido), deixando-se uma margem e segurança. O próximo passo foi bloqueio dos sítios antigênicos, realizado com BSA a 5%. O tempo de bloqueio foi de 1 hora. A seguir, o excesso da solução de bloqueio foi removido e os cortes foram incubados com o anticorpo primário (anti- L-selectina, P-selectina, E-selectina, integrina- $\beta$ 2, Mac-1, LFA-1, integrina- $\beta$ 1, VLA-4 ou VCAM-1) diluído em BSA a 2,5%, na razão de 1:50, por um período de 2 horas. Passou-se a lavagens, realizadas três vezes com tween 20 a 0,5% e uma vez com PBS. O tempo de cada lavagem foi de 5 minutos. Após a última lavagem, o excesso de PBS foi removido e os cortes foram incubados com o anticorpo anti-IgG conjugado com isotiocianato de tetraiodamina (TRITC, anticorpo secundário), diluído em BSA a 2,5%, na razão de 1:100, por um período de 1 hora. Passou-se a lavagens, realizadas três vezes com tween 20 a 0,5%, uma vez com PBS e duas vezes com 2X SSC. O tempo de cada lavagem foi de 5 minutos. Após a última lavagem, o excesso de 2X SSC foi removido e os cortes foram incubados com SYTOX *green counterstaining*, diluído em 2X SSC, na razão de 1:300, por um período de 15 minutos, para identificação dos núcleos celulares. Passou-se a lavagens, realizadas duas vezes com 2X SSC e duas vezes com água nanopura. O

tempo de cada lavagem foi de 5 minutos. Após a última lavagem, o excesso de água foi removido e as lâminas foram montadas com Prolong e lamínulas (Figura 12).



**Figura 12.** Representação esquemática da técnica de imunofluorescência indireta utilizada. E e M não foram realizados nos controles negativos. Diluições: E= 1:50; H= 1:100; M= 1:300.

Todos os procedimentos foram realizados em câmara úmida, à temperatura ambiente. A partir da incubação do anticorpo secundário, os procedimentos também passaram a ser realizados no escuro. Os anticorpos primários e o SYTOX *green counterstaining* foram omitidos nos controles negativos. As lâminas foram colocadas para secar à temperatura ambiente, por um período de 48 horas, no escuro. Após a polimerização do Prolong, as lâminas foram acondicionadas em caixas plásticas envoltas em papel alumínio e filme PVC, a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Os cortes foram analisados no microscópio Axiophot, equipado com lâmpada de mercúrio, filtros para diferentes comprimentos de onda (Figura 13) e câmara fotográfica para aquisição de imagens.

Fluoróforo	Excitação	Filtro excitador	Espelho dicromático	Filtro de barreira	Cor resultante
SYTOX	Azul	BP 450-490 nm	FT 510 nm	LP 520 nm	Verde
TRITC	Verde	BP 530-585 nm	FT 600 nm	LP 615 nm	Vermelho

**Figura 13.** Jogos de filtros utilizados para cada fluoróforo e cor resultante.

#### 4.2.10 Análise histológica

A cada seis cortes para reação de imunofluorescência, foram coletados dois cortes para coloração pelo método de Perls e com hematoxilina e eosina (H&E). Os cortes foram analisados e fotografados no microscópio Axiophot, ajustado para microscopia de luz.

#### 4.2.10.1 Coloração com H&E

A coloração com H&E foi empregada para a análise da morfologia do pulmão. Para isto, as lâminas foram inicialmente submetidas a banhos em três soluções de xileno. A seguir passou-se a hidratação com uma série decrescente de soluções alcoólicas, variando entre 100% (3 soluções), 90%, 80% e 70%. O tempo de cada banho foi de 1 minuto. O próximo passo foi coloração com hematoxilina. O tempo de imersão no corante foi de 2 minutos. Após breve lavagem em água corrente, procedeu-se a coloração com eosina. O tempo de imersão no corante foi de 1 minuto. Para desidratação, as lâminas foram imersas três vezes em uma série crescente de soluções alcoólicas, variando entre 70%, 80%, 90% e 100% (3 soluções). A seguir as lâminas foram submetidas a banhos em três soluções de xileno. O tempo de cada banho foi de 1 minuto. Após o último banho, as lâminas foram montadas com Entellan e lamínulas e, finalmente, colocadas para secar a 37°C, por um período de 12 horas.

A hematoxilina cora em azul os núcleos celulares e outras estruturas de natureza ácida. A eosina cora o citoplasma e o colágeno em diversas tonalidades de vermelho.

#### 4.2.10.2 Coloração pelo método de Perls

O método de Perls foi empregado para a análise da distribuição dos agregados de nanopartículas magnéticas no pulmão. Para isto, as lâminas foram inicialmente submetidas a banhos em três soluções de xileno. A seguir passou-se a hidratação com uma série decrescente de soluções alcoólicas, variando entre 100% (3 soluções), 90%, 80% e 70%. O tempo de cada banho foi de 1 minuto. O próximo passo foi imersão em água destilada por 1 minuto. A seguir procedeu-se a coloração com o reagente de Perls. O tempo de imersão no reagente foi de 25 minutos. Após lavagem de 2 minutos em água corrente, procedeu-se a coloração com vermelho neutro. O tempo de imersão no corante foi de 2 minutos. Após breve lavagem em água corrente, procedeu-se a desidratação pela imersão das lâminas três vezes em uma série crescente de soluções alcoólicas, variando entre 70%, 80%, 90% e 100% (3 soluções). A seguir as lâminas foram submetidas a banhos em três soluções de xileno. O tempo de cada banho foi de 1 minuto. Após o último banho, as lâminas foram montadas com Entellan e lamínulas e, finalmente, colocadas para secar a 37°C, por um período de 12 horas.

O reagente de Perls cora em azul o  $\text{Fe}^{+3}$ . O vermelho neutro cora os núcleos celulares em vermelho.

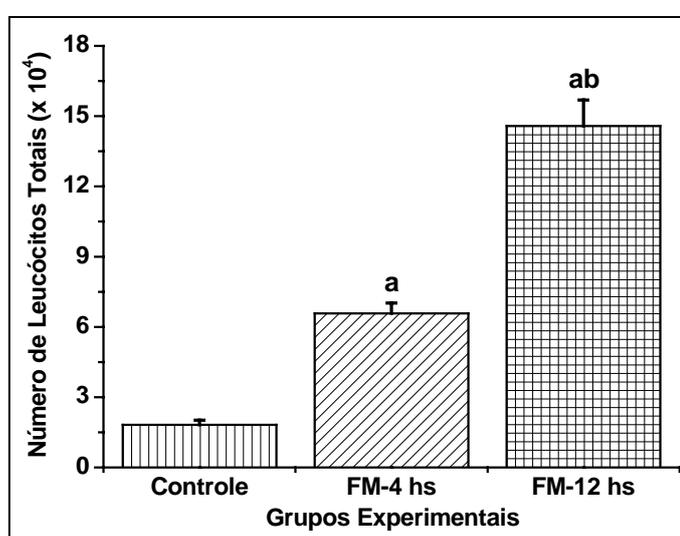
## **5 RESULTADOS**

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Lavagem bronco-alveolar

O número de leucócitos totais nos lavados bronco-alveolares permitiu a avaliação da atividade migratória de tais células no pulmão dos animais 4 e 12 horas após a administração do FM-DMSA e no grupo controle. Este último inclui animais que não foram tratados com o FM-DMSA. Os valores obtidos são apresentados na figura 14 como média  $\pm$  erro padrão de seis animais e na ordem de  $\times 10^4$  células.

A administração do FM-DMSA ocasionou o aumento progressivo na quantidade de leucócitos presentes no lavado bronco-alveolar ao longo dos períodos de análises. Quatro horas após a administração do FM-DMSA o número de leucócitos totais ( $6,58 \times 10^4 \pm 0,44 \times 10^4$ ) foi maior quando comparado ao controle ( $1,82 \times 10^4 \pm 0,20 \times 10^4$ ) ( $P < 0,01$ ). Já 12 horas após a administração do FM-DMSA o número de leucócitos totais ( $14,58 \times 10^4 \pm 1,11 \times 10^4$ ) foi maior quando comparado ao período de 4 horas após a administração do FM-DMSA e ao controle ( $P < 0,01$ ).

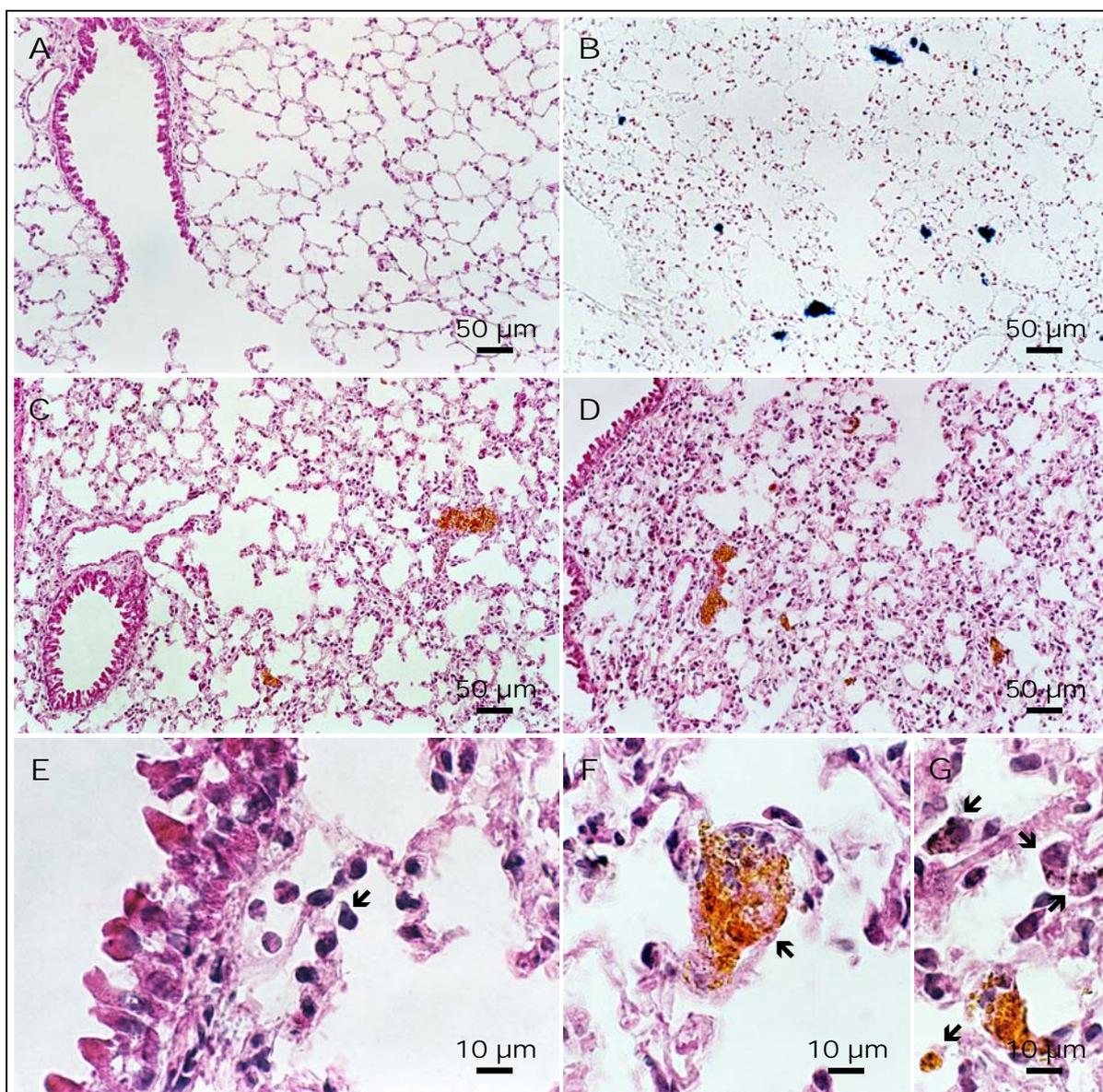


**Figura 14.** Número de leucócitos totais no lavado bronco-alveolar de camundongos nos períodos de 4 (FM-4 hs) e 12 horas (FM-12 hs) após a administração do FM-DMSA e no grupo controle (Controle). Os valores são apresentados como média  $\pm$  erro padrão de 6 animais e na ordem de  $\times 10^4$  células. (a)  $P < 0,01$  quando comparado ao controle. (b)  $P < 0,01$  quando comparado ao FM-4 hs.

## 5.2 Microscopia de luz

A morfologia do pulmão, assim como a distribuição dos agregados de nanopartículas magnéticas do FM-DMSA nesse órgão, foi avaliada por meio de microscopia de luz. A figura 15 mostra fotomicrografias de pulmões de animais tratados com FM-DMSA nos períodos de 4 e 12 horas e do grupo controle. Os agregados de nanopartículas magnéticas aparecem em marrom claro, para as preparações por H&E, ou azul da Prússia, para as preparações pelo método de Perls.

Nos animais do grupo controle a morfologia pulmonar mostrou-se inalterada, não tendo sido observado qualquer indício de processo inflamatório ou comprometimento estrutural do órgão (Figura 15A). Já 4 horas após a administração do FM-DMSA pôde-se observar o espessamento do parênquima pulmonar (Figura 15C) e, com uma frequência ainda pequena, leucócitos na luz de alvéolos (Figura 15E). Nesse período, agregados de nanopartículas magnéticas foram encontrados em vasos sanguíneos e na região perivascular (Figura 15B). Com 12 horas após a administração do FM-DMSA, o espessamento do parênquima pulmonar ainda podia ser observado (Figura 15D) e a presença de leucócitos na luz dos alvéolos foi mais freqüente. Nesse período, além de vasos sanguíneos e da região perivascular (Figura 15F), agregados de nanopartículas magnéticas foram encontradas no citoplasma de células leucocitárias (Figura 15G).



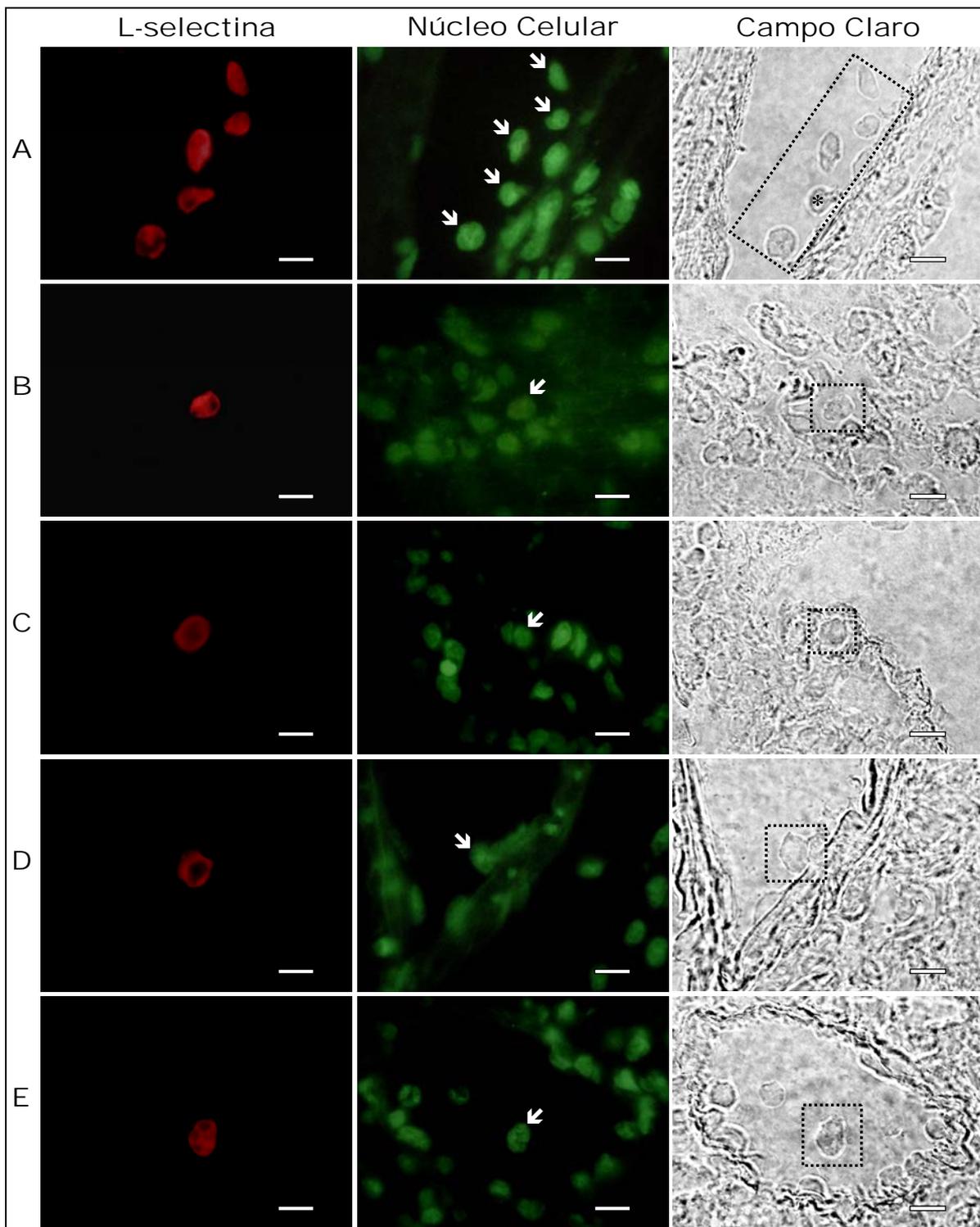
**Figura 15.** Fotomicrografias de pulmões de camundongos. Controle (A) e após a administração do FM-DMSA, 4 (B, C e E) e 12 horas (D, F e G). Coloração: A e C-F= H&E; B= método de Perl's. Em B agregados de nanopartículas magnéticas coradas em azul. Em C e D observa-se o espessamento do parênquima pulmonar em regiões contendo agregados de nanopartículas magnéticas (marrom claro). Em E leucócito na luz de alvéolo (seta). Em F presença de agregados de nanopartículas magnéticas dentro de vênula e na região perivascular (seta); e em G no citoplasma de leucócitos (setas).

### 5.3 Imunofluorescência

A expressão das CAMs foi analisada qualitativamente por meio de ensaios de imunofluorescência no pulmão dos animais 4 e 12 horas após a administração do FM-DMSA e no grupo controle. As imunomarcações em células leucocitárias revelaram a expressão das moléculas de adesão L-selectina, integrina- $\beta$ 2, Mac-1, LFA-1, integrina- $\beta$ 1 e VLA-4. Já imunomarcações no endotélio vascular revelaram a expressão das moléculas de adesão P-selectina, E-selectina e VCAM-1. Os resultados obtidos são apresentados nas figuras de 16 a 23 e sumarizados na figura 24. Achados semelhantes não foram encontrados nos controles negativos, onde foram omitidos os anticorpos primários e o marcador de núcleo (dados não mostrados).

#### 5.3.1 Família das selectinas

Leucócitos imunomarcados com L-selectina foram encontrados próximos ou justapostos ao endotélio de veias, vênulas e capilares no período de 4 horas após a administração do FM-DMSA (Figura 24). Enquanto que no período de 12 horas após a administração do FM-DMSA (Figura 16A-D) e no grupo controle (Figura 24), além de veias, vênulas e capilares, leucócitos imunomarcados foram encontrados em artérias. Imunomarcações em arteríolas também foram observadas 12 horas após a administração do FM-DMSA (Figura 16E).



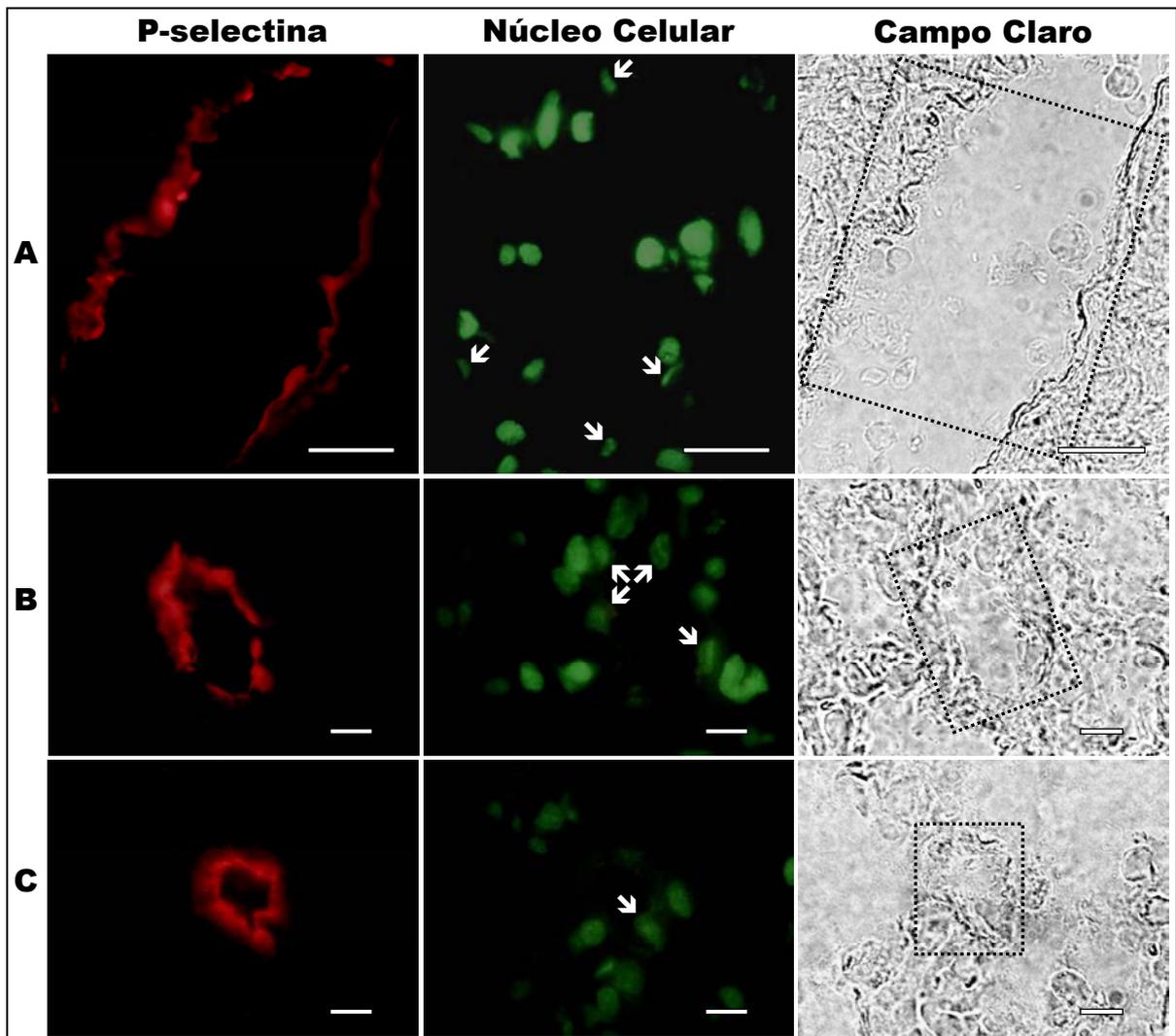
**Figura 16.** Fotomicrografias de imunofluorescência para L-selectina em pulmões de camundongos 12 horas após a administração do FM-DMSA. As letras indicam imagens de leucócitos em veia (A), vênula (B), capilar (C), artéria (D) e arteríola (E). Imunomarcações em vermelho revelam a expressão de L-selectina. As setas indicam o núcleo corado em verde dos leucócitos imunomarcados. Nas imagens de campo claro os traçados retangulares evidenciam a localização de tais leucócitos nas diferentes regiões do sistema circulatório pulmonar. Em A, asterisco mostra leucócito com agregados de nanopartículas magnéticas no citoplasma. Barras = 10  $\mu$ m.

Imunomarcações para P-selectina foram encontradas no endotélio de veias e vênulas nos períodos de 4 e 12 horas após a administração do FM-DMSA (Figura 24). Enquanto que no grupo controle, além de veias e vênulas, imunomarcações foram encontradas no endotélio de capilares (Figura 17A-C). No que se refere à E-selectina, imunomarcações foram encontradas apenas no endotélio de veias e vênulas e no período de 12 horas após a administração do FM-DMSA (Figura 24).

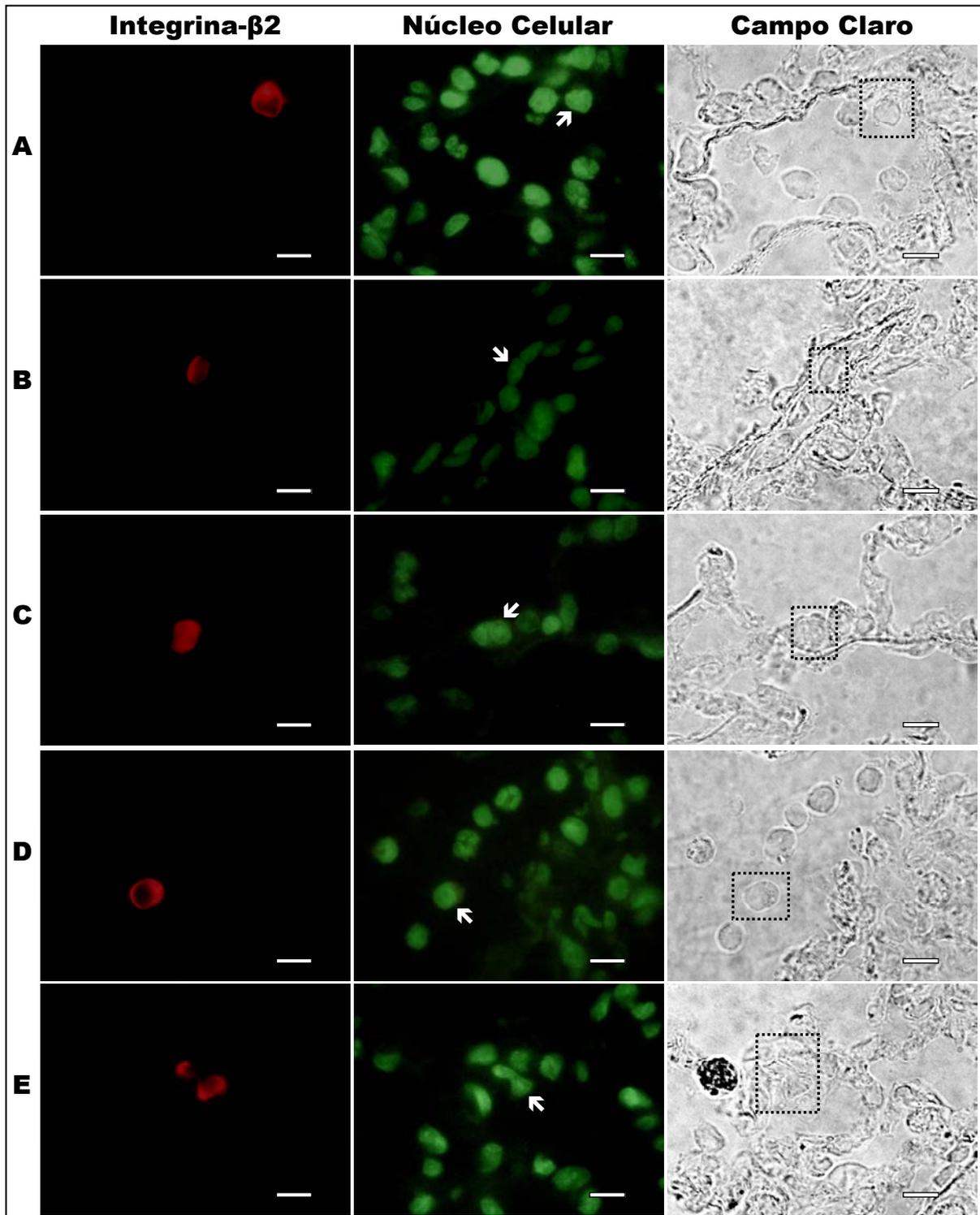
### **5.3.2 Integrinas da subfamília $\beta 2$**

Leucócitos imunomarcados com integrina- $\beta 2$  foram encontrados justapostos ao endotélio de veias, vênulas e capilares no período de 4 horas após a administração do FM-DMSA (Figura 18A-C). Enquanto que no período de 12 horas após a administração do FM-DMSA, além de veias, vênulas e capilares, leucócitos imunomarcados foram encontrados justapostos ao endotélio de artérias (Figura 24). Imunomarcações em leucócitos encontrados na luz de veias também foram observadas nos períodos de 4 (Figura 18D) e 12 (Figura 24) horas após a administração do FM-DMSA. Já no grupo controle, leucócitos imunomarcados foram encontrados justapostos ao endotélio de vênulas e artérias (Figura 24).

Além de vasos sanguíneos, leucócitos imunomarcados com integrina- $\beta 2$  também foram encontrados transpondo o epitélio alveolar no período de 4 horas após a administração do FM-DMSA (Figura 18E).



**Figura 17.** Fotomicrografias de imunofluorescência para P-selectina em pulmões de camundongos controles. As letras indicam imagens obtidas de veia (A), vênula (B) e capilar (C). Imunomarcações em vermelho revelam a expressão de P-selectina. As setas indicam o núcleo corado em verde das células endoteliais dos vasos sanguíneos imunomarcados. Nas imagens de campo claro os traçados retangulares evidenciam a localização de tais imunomarcações nas diferentes regiões do sistema circulatório pulmonar. Barras: A= 20  $\mu$ m; B e C= 10  $\mu$ m.

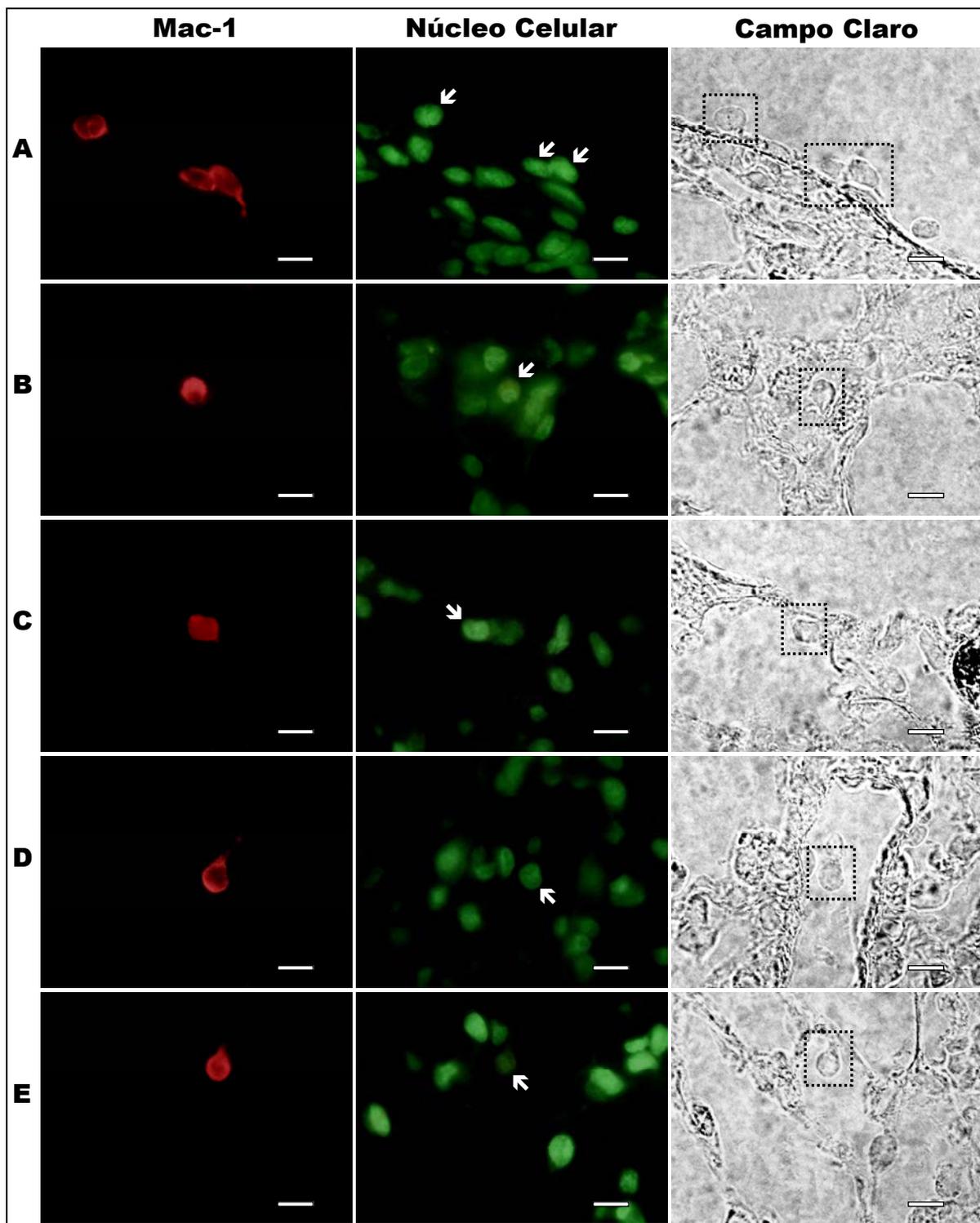


**Figura 18.** Fotomicrografias de imunofluorescência para integrina- $\beta$ 2 em pulmões de camundongos 4 horas após a administração do FM-DMSA. As letras indicam imagens de leucócitos justapostos ao endotélio de veia (A), vênula (B) e capilar (C); na luz de veia (D) e transpondo o epitélio alveolar (E). Imunomarcações em vermelho revelam a expressão de integrina- $\beta$ 2. As setas indicam o núcleo corado em verde dos leucócitos imunomarcados. Nas imagens de campo claro os traçados retangulares evidenciam a localização de tais leucócitos nas diferentes regiões dos pulmões. Barras = 10  $\mu$ m.

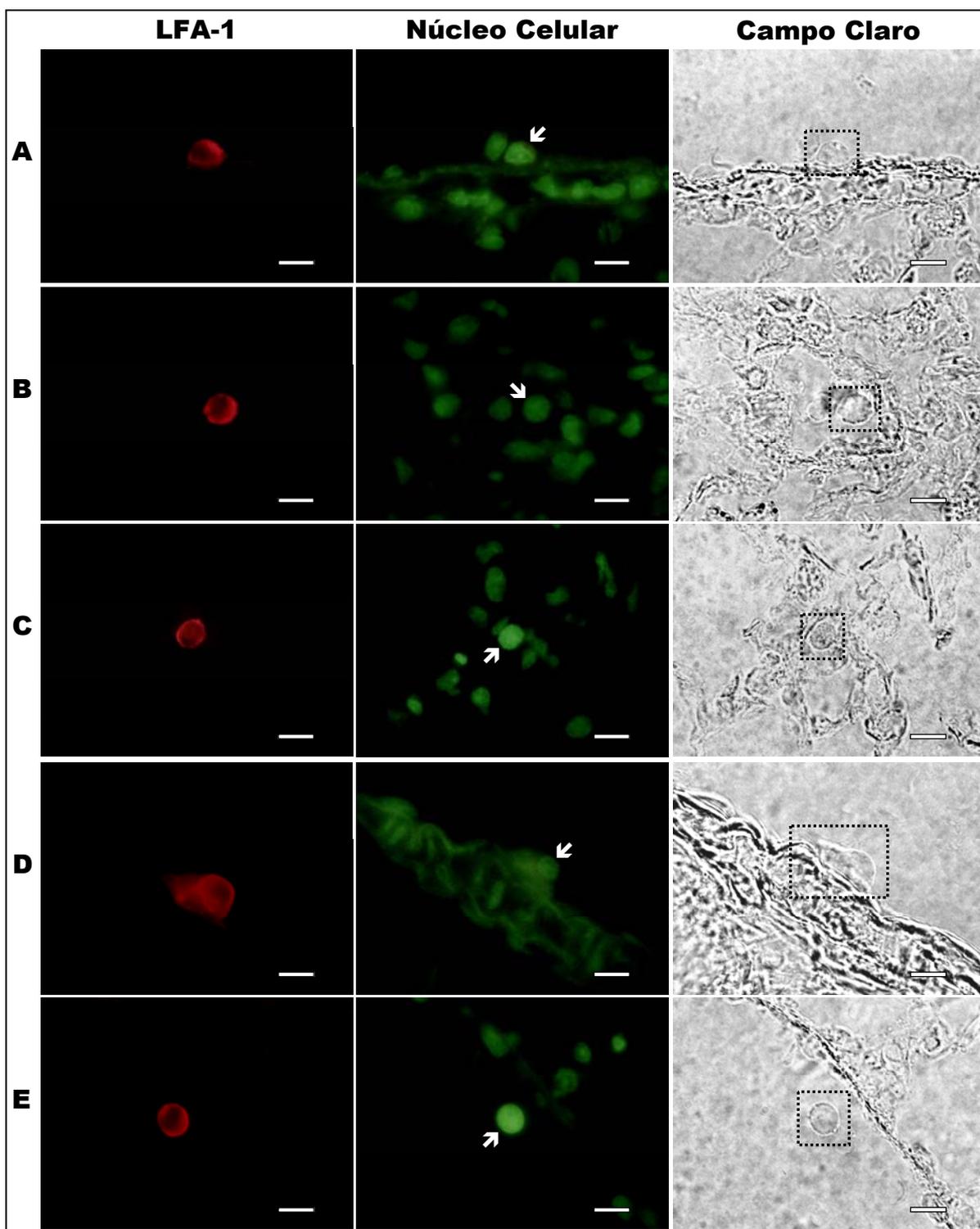
Imunomarcações para Mac-1 foram encontradas em leucócitos justapostos ao endotélio de veias, vênulas, capilares (Figura 19A-C) e artérias (Figura 24) no período de 4 horas após a administração do FM-DMSA. Enquanto que no período de 12 horas após a administração do FM-DMSA, leucócitos imunomarcados foram encontrados justapostos apenas ao endotélio de veias, vênulas e capilares (Figura 24). Imunomarcações em leucócitos encontrados na luz de veias também foram observadas nos períodos de 4 (Figura 19D) e 12 (Figura 24) horas após a administração do FM-DMSA. Já no grupo controle, leucócitos imunomarcados foram encontrados justapostos ao endotélio de veias e vênulas (Figura 24).

Além de vasos sangüíneos, leucócitos imunomarcados com Mac-1 também foram encontrados na luz alveolar no período de 4 horas após a administração do FM-DMSA (Figura 19E).

No que se refere à LFA-1, leucócitos imunomarcados foram encontrados justapostos ao endotélio de veias, vênulas e capilares no período de 4 horas após a administração do FM-DMSA (Figura 20A-C). Enquanto que no período de 12 horas após a administração do FM-DMSA, leucócitos imunomarcados foram encontrados justapostos apenas ao endotélio de veias (Figura 24). Imunomarcações em leucócitos encontrados na luz de veias também foram observadas nos períodos de 4 (Figura 20E) e 12 (Figura 24) horas após a administração do FM-DMSA. Já no grupo controle, leucócitos imunomarcados foram encontrados justapostos ao endotélio de veias, vênulas (Figura 24) e artérias (Figura 20D).



**Figura 19.** Fotomicrografias de imunofluorescência para Mac-1 em pulmões de camundongos 4 horas após a administração do FM-DMSA. As letras indicam imagens de leucócitos justapostos ao endotélio de veia (A), vênula (B) e capilar (C); e na luz de veia (D) e alvéolo. Imunomarcações em vermelho revelam a expressão de Mac-1. As setas indicam o núcleo corado em verde dos leucócitos imunomarcados. Nas imagens de campo claro os traçados retangulares evidenciam a localização de tais leucócitos nas diferentes regiões dos pulmões. Barras = 10  $\mu$ m.



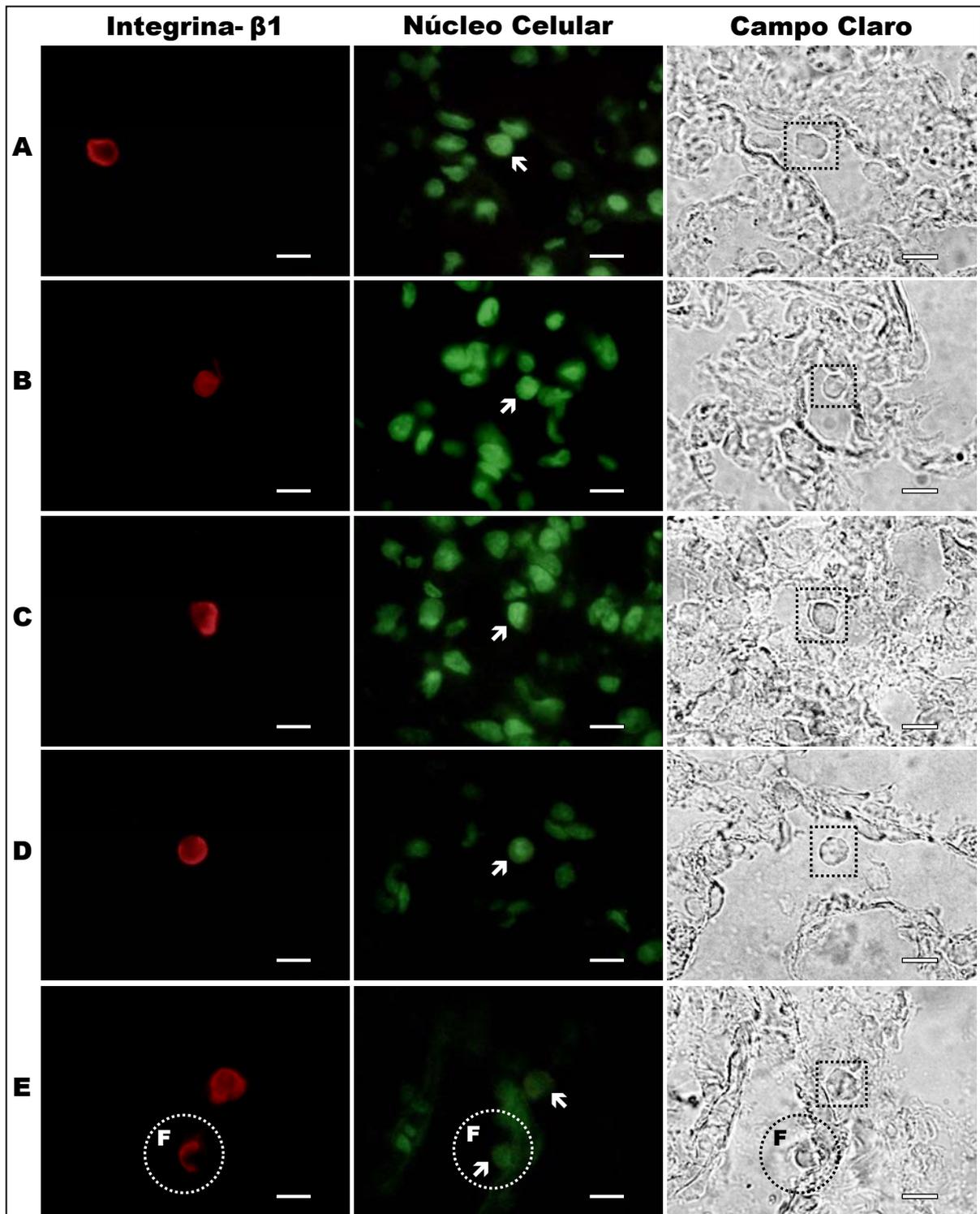
**Figura 20.** Fotomicrografias de imunofluorescência para LFA-1 em pulmões de camundongos. Controle (D) e no período de 4 horas após a administração do FM-DMSA (A-C e E). As letras indicam imagens de leucócitos justapostos ao endotélio de veia (A), vênula (B), capilar (C) e artéria (D); e na luz de veia (E). Imunomarcações em vermelho revelam a expressão de LFA-1. As setas indicam o núcleo corado em verde dos leucócitos imunomarcados. Nas imagens de campo claro os traçados retangulares evidenciam a localização de tais leucócitos nas diferentes regiões do sistema circulatório pulmonar. Barras = 10  $\mu$ m.

### 5.3.3 Integrinas da subfamília $\beta 1$

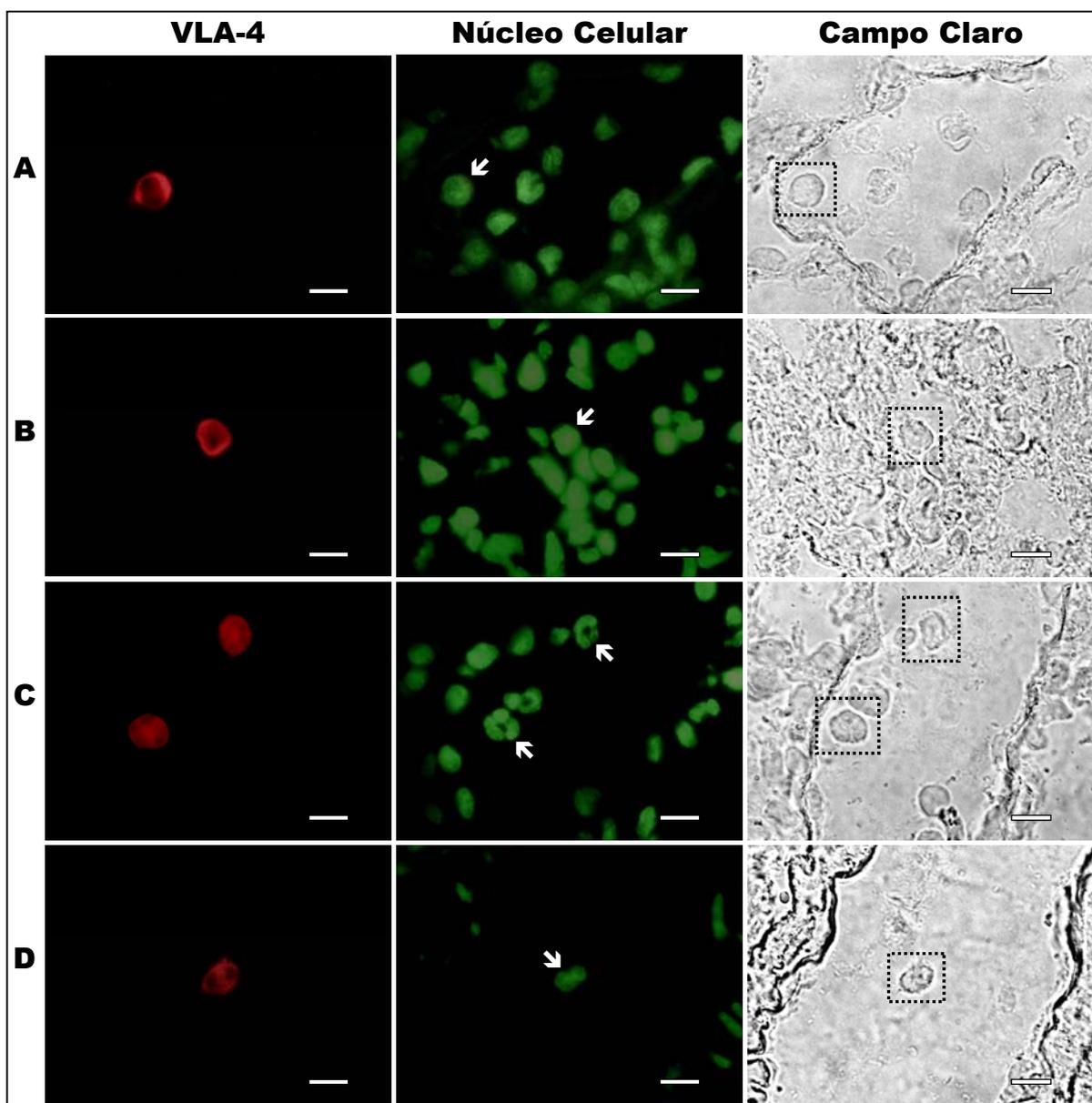
Leucócitos imunomarcados com integrina- $\beta 1$  foram encontrados justapostos ao endotélio de veias, vênulas e capilares no período de 4 horas após a administração do FM-DMSA (Figura 24). Imunomarcações em leucócitos encontrados na luz de veias também foram observadas no período de 4 horas após a administração do FM-DMSA (Figura 21D). Enquanto que no período de 12 horas após a administração do FM-DMSA, além de veias, vênulas e capilares, leucócitos imunomarcados foram encontrados justapostos ao endotélio de artérias (Figura 21A-C e F). Já no grupo controle, imunomarcações não foram encontradas (Figura 24).

Além de vasos sangüíneos, leucócitos imunomarcados com integrina- $\beta 1$  também foram observados no parênquima pulmonar nos períodos de 4 (Figura 24) e 12 (Figura 21E) horas após a administração do FM-DMSA.

Imunomarcações para VLA-4 foram encontradas em leucócitos, incluindo neutrófilos, justapostos ao endotélio de veias e vênulas nos períodos de 4 (Figura 22A e B) e 12 (Figura 24) horas após a administração do FM-DMSA. Imunomarcações em leucócitos encontrados na luz de veias e artérias também foram observadas nos períodos de 4 (Figura 22C e D) e 12 (Figura 24) horas após a administração do FM-DMSA. Já no grupo controle, leucócitos imunomarcados foram encontrados justapostos ao endotélio de vênulas (Figura 24).



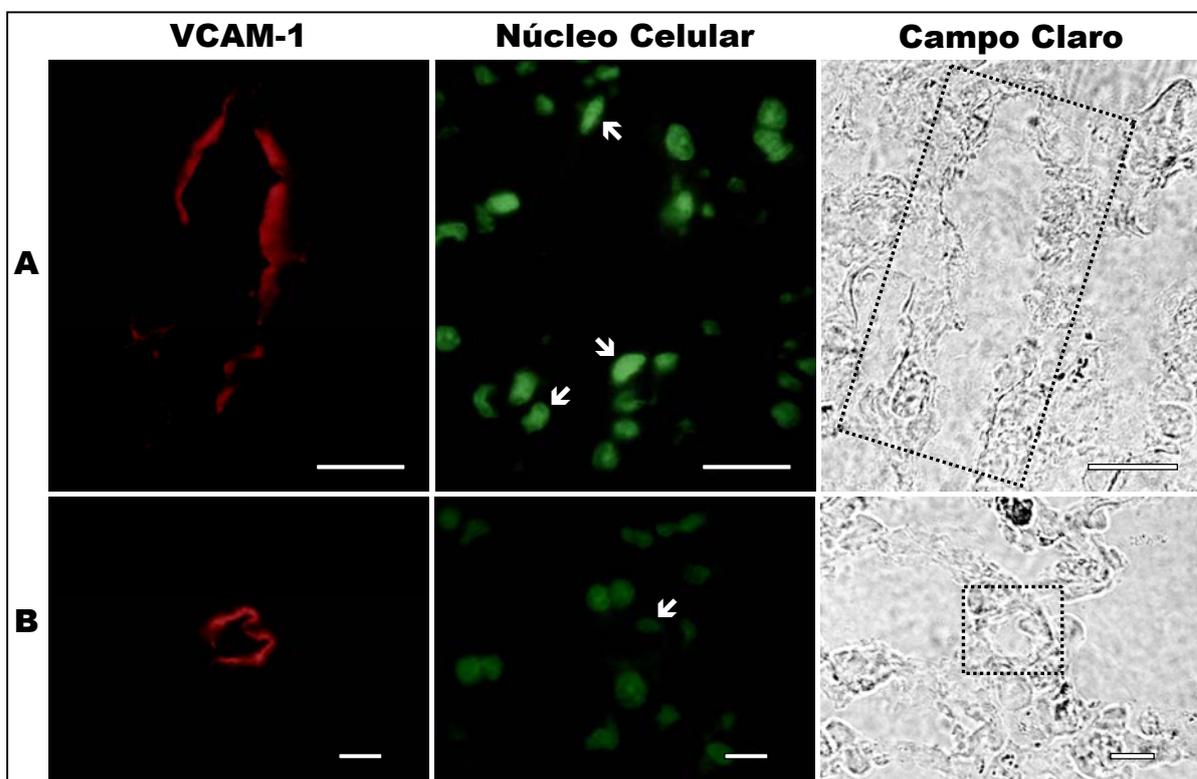
**Figura 21.** Fotomicrografias de imunofluorescência para integrina- $\beta$ 1 em pulmões de camundongos após a administração do FM-DMSA. Quatro (D) e 12 (A-C, E e F) horas. As letras indicam imagens de leucócitos justapostos ao endotélio de veia (A), vênula (B), capilar (C) e artéria (F); na luz de veia (D) e no parênquima pulmonar (E). Imunomarcações em vermelho revelam a expressão de integrina- $\beta$ 1. As setas indicam o núcleo corado em verde dos leucócitos imunomarcados. Nas imagens de campo claro os traçados retangulares e a letra F evidenciam a localização de tais leucócitos nas diferentes regiões dos pulmões. Barras = 10  $\mu$ m.



**Figura 22.** Fotomicrografias de imunofluorescência para VLA-4 em pulmões de camundongos 4 horas após a administração do FM-DMSA. As letras indicam imagens de leucócitos justapostos ao endotélio de veia (A) e vênula (B); e na luz de veia (C) e artéria (D). Imunomarcações em vermelho revelam a expressão de VLA-4. As setas indicam o núcleo corado em verde dos leucócitos imunomarcados. Nas imagens de campo claro os traçados retangulares evidenciam a localização de tais leucócitos nas diferentes regiões do sistema circulatório pulmonar. Barras = 10  $\mu$ m.

### 5.3.4 Imunoglobulina VCAM-1

No que se refere à VCAM-1, imunomarcações foram encontradas no endotélio de veias e capilares nos períodos de 4 (Figura 23A e B) e 12 (Figura 24) horas após a administração do FM-DMSA. Já no grupo controle, imunomarcações não foram encontradas.



**Figura 23.** Fotomicrografias de imunofluorescência para VCAM-1 em pulmões de camundongos 4 horas após a administração do FM-DMSA. As letras indicam imagens obtidas de veia (A) e capilar (B). Imunomarcações em vermelho revelam a expressão de VCAM-1. As setas indicam o núcleo corado em verde das células endoteliais dos vasos sanguíneos imunomarcados. Nas imagens de campo claro os traçados retangulares evidenciam a localização de tais imunomarcações nas diferentes regiões do sistema circulatório pulmonar. Barras: A= 20  $\mu$ m; B= 10  $\mu$ m.

CAMs/ Grupos		Veia	Vênula	Capilar	Artéria	Arteriola	Luz de vaso (a/v)	Parên-quima	Epitélio alveolar	Alvéolo
<b>L-selectina</b>	Controle	+	+	+	+	-	n.a.	-	-	-
	FM-4 hs	+	+	+	-	-	n.a.	-	-	-
	FM-12 hs	+	+	+	+	+	n.a.	-	-	-
<b>P-selectina</b>	Controle	+	+	+	-	-	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
	FM-4 hs	+	+	-	-	-	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
	FM-12 hs	+	+	-	-	-	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
<b>E-selectina</b>	Controle	-	-	-	-	-	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
	FM-4 hs	-	-	-	-	-	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
	FM-12 hs	+	+	-	-	-	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
<b>Integrina-<math>\beta</math>2</b>	Controle	-	+*	-	+*	-	-	-	-	-
	FM-4 hs	+*	+*	+*	-	-	+	-	+	-
	FM-12 hs	+*	+*	+*	+*	-	+	-	-	-
<b>Mac-1</b>	Controle	+*	+*	-	-	-	-	-	-	-
	FM-4 hs	+*	+*	+*	+*	-	+	-	-	+
	FM-12 hs	+*	+*	+*	-	-	+	-	-	-
<b>LFA-1</b>	Controle	+*	+*	-	+*	-	-	-	-	-
	FM-4 hs	+*	+*	+*	-	-	+	-	-	-
	FM-12 hs	+*	-	-	-	-	+	-	-	-
<b>Integrina-<math>\beta</math>1</b>	Controle	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	FM-4 hs	+*	+*	+*	-	-	+	+	-	-
	FM-12 hs	+*	+*	+*	+*	-	-	+	-	-
<b>VLA-4</b>	Controle	-	+*	-	-	-	-	-	-	-
	FM-4 hs	+*	+*	-	-	-	+	-	-	-
	FM-12 hs	+*	+*	-	-	-	+	-	-	-
<b>VCAM-1</b>	Controle	-	-	-	-	-	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
	FM-4 hs	+	-	+	-	-	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
	FM-12 hs	+	-	+	-	-	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.

**Figura 24.** Sumário dos principais resultados obtidos a partir do ensaio de imunofluorescência nos períodos de 4 (FM-4 hs) e 12 horas (FM-12 hs) após a administração do FM-DMSA e no grupo controle (Controle). + (observado); - (não observado); n.a. (não se aplica); a/v (artéria ou veia); \* (leucócito justaposto ao endotélio).

## **6 DISCUSSÃO**

## 6 DISCUSSÃO

### 6.1 Da atividade migratória induzida pelo FM-DMSA

Embora o FM-DMSA tenha demonstrado estimular a migração transendotelial dos leucócitos no pulmão (AZEVEDO et al., 2004; CHAVES, 2002; GARCIA, 2005), a cinética e a magnitude deste processo ainda não foram alvo de discussão e constituem variáveis importantes para o estabelecimento de modelos animais de inflamação nesse órgão. Tal fato conduziu ao desenvolvimento de experimentos iniciais para a caracterização da atividade migratória. A relevância de alguns dos achados orientou a avaliação das CAMs no modelo de estudo utilizado.

A lavagem bronco-alveolar é o melhor indicador da atividade migratória dos leucócitos no pulmão. Isto porque em condições fisiológicas as células leucocitárias estão presentes em quantidades muito pequenas ou até mesmo não-detectáveis nos alvéolos pulmonares, enquanto que diante de um estímulo inflamatório este número aumenta rapidamente (HECKEL et al., 2004; PARKER; TOWNSLEY, 2004). No presente estudo a lavagem bronco-alveolar foi utilizada em conjunto com o procedimento de perfusão cardíaca para evitar a contaminação das amostras coletadas com células provenientes do sangue, tornando os dados obtidos mais confiáveis. Além disto, o comprometimento estrutural do órgão foi avaliado por meio de microscopia de luz.

Os resultados mostraram o aumento no número de leucócitos no lavado bronco-alveolar nos grupos tratados com o FM-DMSA em relação ao controle

(Figura 14), confirmando a hipótese de que o FM-DMSA estimula a migração transendotelial dos leucócitos no pulmão nos períodos de 4 e 12 horas. Aliado a isto, na análise em microscopia de luz ficou evidente que tal migração se deu preferencialmente para o parênquima pulmonar e alvéolos (Figura 15). Este fato pode explicar a ausência de imunomarcações nas vias aéreas, incluindo brônquios e bronquíolos, durante a avaliação imunohistoquímica.

Em relação à cinética da atividade migratória, quando os grupos tratados com o FM-DMSA foram comparados entre si, observou-se o aumento progressivo no número de leucócitos no lavado bronco-alveolar ao longo do tempo, ou seja, os valores obtidos 12 horas após a administração do FM-DMSA foram maiores em relação ao período de 4 horas (Figura 14). Estes resultados são indicativos de que a atividade migratória induzida pelo FM-DMSA se manteve no decorrer de ambos os períodos de análises, o que possibilitou a avaliação da expressão das CAMs em função do tempo. Aliado a isto, com a análise dos resultados 4 e 12 horas após a administração do FM-DMSA, pôde-se observar a presença de leucócitos imunomarcados em diferentes etapas do processo de migração transendotelial, bem como no evento de migração pela matriz extracelular e de migração transepitelial (Figuras 16-24).

Por outro lado, foi interessante notar leucócitos imunomarcados com agregados de nanopartículas magnéticas no seu citoplasma (Figura 16). Essa mesma localização dos agregados de nanopartículas magnéticas foi observada durante a análise em microscopia de luz (Figura 15). Tais achados, em conjunto com a aplicabilidade dos fluidos magnéticos como agentes de contraste negativo (WEISSLEDER et al., 1990), sugerem que o FM-DMSA pode ser utilizado em modelos animais de inflamação pulmonar não apenas como um agente estimulador

da atividade migratória, mas também como uma ferramenta de pesquisa para o monitoramento *in vivo* dos leucócitos durante o processo de migração transendotelial no pulmão, utilizando-se, para isto, imagens de ressonância magnética.

No que se refere à amplitude da resposta migratória, os resultados mostraram que esta foi da ordem de milhares de células ( $10^4$ ). Na análise qualitativa em microscopia de luz encontrou-se ainda que a migração de tal número de células não ocasionou alterações morfológicas significativas nos pulmões dos animais tratados com o FM-DMSA em relação aos controles, tendo sido observado apenas o espessamento do parênquima pulmonar (Figura 15), condição esperada em se tratando de uma resposta inflamatória. Os aspectos relacionados com os efeitos deletérios dos fluidos magnéticos têm sido abordados na literatura. Garcia, em 2005, relatou que tal variável está relacionada com as características físicas e químicas das nanopartículas magnéticas, tais como o tipo de ferrita, o tamanho e a cobertura molecular estabilizante. Desta maneira, o fluido magnético utilizado no presente estudo, o qual continha nanopartículas magnéticas à base de magnetita, com 8 nm de diâmetro e recobertas com DMSA, demonstrou ser adequado para a avaliação das CAMs, uma vez que estimulou a migração transendotelial dos leucócitos no pulmão com o mínimo de dano a esse órgão.

## 6.2 Da expressão das CAMs

Considerando o propósito principal deste trabalho, avaliou-se a expressão das CAMs: L-selectina, P-selectina, E-selectina, integrina- $\beta$ 2, Mac-1, LFA-1, integrina- $\beta$ 1, VLA-4 e VCAM-1, durante a migração transendotelial dos leucócitos no pulmão.

Muito do que se sabe a respeito da função das selectinas (L-selectina, P-selectina e E-selectina) durante a migração transendotelial dos leucócitos advém de estudos na circulação sistêmica, onde os principais sítios de migração são as vênulas pós-capilares (LUSCINSKAS et al., 2002; BURNS et al., 2003). Nestas regiões as selectinas atuam mediando a união transitória dos leucócitos ao endotélio, em um processo chamado de rolamento (SIMON; GREEN, 2005). Ao contrário disto, estudos demonstraram que a migração transendotelial dos leucócitos no pulmão ocorre principalmente nos capilares (WAGNER; ROTH, 2000). Estes sítios consistem de múltiplos segmentos interconectados com diâmetros muitas vezes menores em comparação ao dos leucócitos e onde o fenômeno de rolamento não ocorre (BURNS et al., 2003; DOERSCHUK, 2000). Tais fatos levaram à hipótese de que as selectinas não seriam requeridas para a migração transendotelial dos leucócitos nos capilares pulmonares (BURNS et al., 2003; DOERSCHUK, 2000; WAGNER; ROTH, 2000).

No presente estudo, além de veias e vênulas, imunomarcações para L-selectina e P-selectina foram encontradas em capilares (Figuras 16 e 17), indicando que essas moléculas de adesão também participam da migração transendotelial dos leucócitos na microvascularização pulmonar. Entretanto, foi interessante notar que para a P-selectina tais imunomarcações restringiram-se ao grupo controle (Figura

24). Nos períodos de 4 e 12 horas após a administração do FM-DMSA foram observadas imunomarcações para P-selectina apenas em veias e vênulas (Figura 24). Conjuntamente estes resultados sugerem que na presença de um estímulo inflamatório a P-selectina participa da migração transendotelial dos leucócitos em sítios pós-capilares. Tal suposição poderia explicar o efeito inexpressivo no seqüestro de leucócitos dentro da microvascularização pulmonar, encontrado por diferentes autores, quando da utilização de anticorpos contra P-selectina em modelos animais de inflamação pulmonar (KUBO et al., 1999; MIYAO et al., 2005).

Por outro lado, os resultados do presente estudo indicam que as moléculas de adesão L-selectina e P-selectina não atuam apenas no evento de rolamento durante a migração transendotelial no pulmão, haja vista que as mesmas foram identificadas em regiões do sistema circulatório onde tal evento não ocorre, como é o caso dos capilares (BURNS et al., 2003; DOERSCHUK, 2000; WAGNER; ROTH, 2000).

De fato, outras duas funções tem sido atribuídas à L-selectina durante a migração transendotelial dos leucócitos no pulmão. A primeira considera a existência de uma cascata de sinalização, onde a ativação da L-selectina seria pré-requisito para a mobilização das integrinas na membrana plasmática das células leucocitárias, as quais participam da etapa seguinte do processo de migração transendotelial, onde ocorre a firme união dos leucócitos às células endoteliais (VON ADRIAN et al., 1991; SIMON; GREEN, 2005). A segunda considera que, embora a L-selectina não seja requerida para o seqüestro inicial dos leucócitos, tal molécula de adesão seria necessária para manter os leucócitos retidos por um longo período de tempo dentro dos capilares (DOYLE et al., 1997; KUBO et al., 1999; KUEBLER et al., 1997). Esta última possibilidade também foi sugerida para a P-selectina (KUBO et al., 1999).

Durante a análise da expressão das integrinas (integrina- $\beta$ 2, Mac-1, LFA-1, integrina- $\beta$ 1 e VLA-4) foram observadas imunomarcações em células leucocitárias que não se encontravam justapostas ao endotélio (Figuras 18-22 e 24). Tais achados são fortes indicativos de que a expressão das CAMs não ocorre necessariamente em função da etapa do processo de migração transendotelial em que os leucócitos se encontram e, por isto, não segue uma seqüência de ativação gradual. Desta maneira, é mais provável que a L-selectina atue mantendo o seqüestro dos leucócitos dentro dos capilares pulmonares. Tal fato também poderia explicar a expressão da P-selectina em capilares no grupo controle (Figuras 17 e 24).

No que se refere à E-selectina, imunomarcações foram encontradas apenas em veias e vênulas e 12 horas após a administração do FM-DMSA (Figura 24). A princípio estes achados poderiam sugerir que a E-selectina não participa da migração transendotelial dos leucócitos no período de 4 horas após a indução da resposta inflamatória no pulmão, contrariando alguns trabalhos que demonstraram este potencial (BEVILACQUA et al., 1989; SCHOLZ et al., 1996). No entanto, tem sido relatado que a síntese de E-selectina no endotélio dos vasos sangüíneos pulmonares pode requerer até 6 horas para alcançar níveis significativos (AZUMA et al., 2000; LANDOLT, 2002). Desta maneira, no presente estudo, imunomarcações no período de 4 horas após a administração do FM-DMSA não foram observadas provavelmente porque uma quantidade expressiva de E-selectina não havia sido sintetizada até então, o que dificultou a detecção de tal molécula de adesão pelo método de imunohistoquímica utilizado. Em contrapartida, o fato das imunomarcações terem sido encontradas em veias e vênulas indica que, na

presença de um estímulo inflamatório, a E-selectina, assim como a P-selectina, participa da migração transendotelial em sítios pós-capilares.

Adicionalmente, a observação de imunomarcações para L-selectina e P-selectina no grupo controle (Figura 24), o qual inclui animais que não foram tratados com o FM-DMSA, revelaram que tais moléculas de adesão também participam da interação entre as células leucocitárias e endoteliais em condições fisiológicas. Achados semelhantes não foram encontrados para a E-selectina (Figura 24), confirmando a tese de que esta molécula de adesão não é sintetizada no endotélio do sistema circulatório pulmonar na ausência de um estímulo inflamatório (BURNS et al., 2003; WAGNER; ROTH, 2000).

A migração transendotelial dos leucócitos no pulmão tem sido descrita como um evento resultante de duas vias distintas. Uma CD18-dependente e outra CD18-independente (BURNS et al., 2003; DOERSCHUCK et al., 1990; DOERSCHUCK et al., 2000; GUO et al., 2001). O termo “CD18” refere-se à subfamília  $\beta 2$  (integrina- $\beta 2$ ) da grande família das integrinas. Fazem parte desta subfamília as integrinas LFA-1 e Mac-1. Estas últimas são consideradas as principais CAMs que atuam na firme união dos leucócitos ao endotélio via CD18-dependente (WAGNER; ROTH, 2000). Já a via CD18-independente tem sido associada com as integrinas da subfamília  $\beta 1$  (integrina- $\beta 1$ ), especialmente com a VLA-4 e o seu ligante na célula endotelial VCAM-1 (BURNS et al., 2003; RIDGER et al., 2001).

No presente estudo leucócitos imunomarcados com integrina- $\beta 2$ , LFA-1 e Mac-1 foram encontradas em veias, vênulas e capilares (Figuras 18-20). No entanto, 12 horas após a administração do FM-DMSA leucócitos imunomarcados com LFA-1 não foram mais observados em vênulas e capilares (Figura 24), provavelmente devido à diminuição acentuada dos níveis de expressão da integrina LFA-1 nas

células leucocitárias com o decorrer do tempo. Embora a natureza deste processo não tenha ficado clara, tais resultados servem para o propósito de demonstrar a existência de diferenças funcionais entre as integrinas LFA-1 e Mac-1, acrescentando novos fatos àqueles já descritos na literatura (DING et al., 1999; GONZALEZ et al., 2005; NEELAMEGHAM et al., 1998; NEELAMEGHAM et al., 2000).

Por outro lado, foi interessante notar a presença de leucócitos imunomarcados com integrina- $\beta$ 2 e Mac-1 dentro de alvéolos ou atravessando a parede epitelial alveolar, em um claro processo de migração transepitelial (Figuras 18 e 19). Tais achados são fortes indicativos de que as CAMs integrina- $\beta$ 2 e Mac-1 também participam da migração transepitelial dos leucócitos para os alvéolos pulmonares. Desta maneira, pode-se inferir que terapias imunodirecionadas contra tais integrinas no pulmão atuariam inibindo dois eventos distintos, sendo estes a migração transendotelial e a transepitelial dos leucócitos.

No que se refere às integrinas da subfamília  $\beta$ 1, leucócitos imunomarcados com integrina- $\beta$ 1 foram encontrados em veias, vênulas e capilares (Figura 21), enquanto leucócitos imunomarcados com VLA-4 foram observados apenas em veias e vênulas (Figura 22). Tais resultados são indicativos de que a integrina VLA-4 participa da migração transendotelial dos leucócitos em sítios pós-capilares. Além disto, embora tenha sido relatado que a VLA-4 é expressa somente em linfócitos, monócitos e eosinófilos (YUSUF-MAKAGIANSAR et al., 2002), ficou evidente no presente estudo que essa integrina também está relacionada com a migração transendotelial dos neutrófilos no pulmão (Figura 22). Este fato poderia explicar a redução do número de neutrófilos no lavado bronco-alveolar, encontrado por diferentes autores, quando da utilização de anticorpos contra VLA-4 em modelos

animais de inflamação pulmonar (BURNS et al., 2001a; BURNS et al., 2001b; RIDGER et al., 2001).

Por outro lado, foi interessante notar leucócitos imunomarcados com integrina- $\beta$ 1 no parênquima pulmonar (Figura 21). Tais achados são fortes indicativos de que a integrina- $\beta$ 1 também participa da migração dos leucócitos pela matriz extracelular. De fato, embora se reconheça a ação de proteases liberadas pelos próprios leucócitos durante tal evento, a participação conjunta das integrinas da subfamília  $\beta$ 1 tem sido demonstrada por diversos autores (RIDGER et al., 2001; WANG et al., 2005; WERR et al., 1998). Acredita-se que essas integrinas atuam propiciando a união direta dos leucócitos aos componentes da matriz extracelular, incluindo colágeno, fibroblasto, fibronectina, laminina e vitronectina (BURNS et al., 2003; RIDGER et al., 2001; WANG et al., 2005; WERR et al., 1998). Desta maneira, os resultados do presente estudo corroboram a hipótese de que a migração dos leucócitos pela matriz extracelular envolve a ação das integrinas da subfamília  $\beta$ 1.

Em relação à imunoglobulina VCAM-1, além de veias, imunomarcações foram encontradas no endotélio dos capilares (Figura 23). Este resultado é aparentemente contraditório, uma vez que tal imunoglobulina tem sido amplamente relacionada com a expressão da integrina VLA-4 (LOBB; HEMLER, 1994; YUSUF-MAKAGIANSAR et al., 2002), e, conforme discutido anteriormente, leucócitos imunomarcados com tal integrina não foram encontrados em capilares. Uma explicação para isto seria o fato de que a VCAM-1 também pode servir como ligante para outras integrinas, conforme demonstrado por Grayson e colaboradores (1998) e Van der Vieren e colaboradores (1999). Outra possibilidade é que a VLA-4 tenha uma pequena participação na migração transendotelial dos leucócitos nos capilares pulmonares, não tendo sido a metodologia utilizada sensível o bastante para detectá-la. Levando-se em

consideração os achados descritos na literatura e os do presente estudo para E-selectina é possível que ambas as possibilidades tenham ocorrido.

Analisando conjuntamente os resultados obtidos para as integrinas da subfamília  $\beta 2$  e  $\beta 1$ , pode-se determinar a via de migração induzida pelo FM-DMSA. Chaves e colaboradores, em 2005, relataram que o FM-DMSA ocasiona o aumento dos níveis de IL-1 no pulmão. É amplamente conhecido que a IL-1 induz a migração pela via CD18-dependente (HELLEWELL et al., 1994). Apesar disso, no presente estudo, foram encontradas no pulmão imunomarcações referentes as integrinas que participam tanto da via CD18-dependente (integrina- $\beta 2$ , Mac-1 e LFA-1) quanto CD18-independente (integrina- $\beta 1$  e VLA-4). Aliado a isto, a presença de imunomarcações em capilares, os quais constituem o principal sítio de migração no pulmão (BURNS et al., 2003; DOERSCHUCK, 2000; WAGNER; ROTH, 2000), é um forte indicativo de que ambas as vias tiveram uma participação fundamental para o evento de migração transendotelial como um todo. Desta maneira, parece lícito afirmar que as vias CD18-dependente e CD18-independente podem co-existir, contribuindo mutuamente para a migração transendotelial dos leucócitos no pulmão.

Adicionalmente, a observação de imunomarcações para integrina- $\beta 2$ , Mac-1, LFA-1 e VLA-4 no grupo controle (Figura 24), o qual inclui animais que não foram tratados com o FM-DMSA, revelaram que tais integrinas também participam da interação entre as células leucocitárias e endoteliais em condições fisiológicas. Achados semelhantes não foram encontrados para integrina- $\beta 1$  e VCAM-1 (Figura 24), provavelmente porque na ausência de um agente agressor não há o desenvolvimento do estímulo adequado para desencadear o aumento dos níveis de expressão dessas moléculas de adesão na superfície das células leucocitárias ou endoteliais, conforme relatado por BURNS e colaboradores, em 2003.

Além de veias, vênulas e capilares, as doenças inflamatórias pulmonares também podem ocasionar o recrutamento de leucócitos para outros vasos sanguíneos (DOERSCHUK, 2000; DOYLE et al., 1997). No presente estudo foram encontradas células leucocitárias imunomarcadas com L-selectina, integrina- $\beta$ 2, Mac-1, LFA-1, integrina- $\beta$ 1 e VLA-4 em artérias e/ou arteríolas (Figuras 16, 20-22 e 24), indicando que essas moléculas de adesão também podem participar do evento de migração transendotelial em tais regiões do sistema circulatório pulmonar.

## **7 CONCLUSÃO**

## 7 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos, pode-se concluir que:

- A migração transendotelial dos leucócitos no pulmão é estimulada pela administração do FM-DMSA, nos períodos de 4 e 12 horas, com o mínimo de dano a esse órgão;
- As CAMs L-selectina, P-selectina, integrina- $\beta$ 2, Mac-1, LFA-1 e VLA-4 participam da migração transendotelial dos leucócitos no pulmão tanto na presença de um estímulo inflamatório como em condições fisiológicas. Já as moléculas de adesão E-selectina, integrina- $\beta$ 1 e VCAM-1 participam da migração transendotelial dos leucócitos no pulmão apenas diante de um estímulo inflamatório;
- As CAMs L-selectina, P-selectina, integrina- $\beta$ 2, Mac-1, LFA-1, integrina- $\beta$ 1 e VCAM-1 participam da migração transendotelial dos leucócitos em sítios pós-capilares e na microvascularização pulmonar. Já as moléculas de adesão E-selectina e VLA-4 participam da migração transendotelial dos leucócitos no pulmão apenas em sítios pós-capilares;
- As CAMs E-selectina e LFA-1 têm seus níveis de expressão no pulmão alterados em função do tempo;
- As vias de migração transendotelial CD18-dependente e CD18-independente podem co-existir, contribuindo mutuamente para a migração transendotelial dos leucócitos no pulmão.

## **8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAHAM, E. Neutrophils and acute lung injury. **Critical Care Medicine**, United States, v. 31, n. 4, p. S195-S199, apr. 2003.
- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Molecular biology of the cell**. 4th ed. New York: Garland Science, 2002. 1463p.
- AZEVEDO, R. B.; GARCIA, M. P.; CHAVES, S. B.; VELOSO, V. N.; PARCA, R. M.; LACAVALA, Z. G.; MORAIS, P. C. Lung leukocyte transepithelial migration induced by DMSA-coated magnetic nanoparticles. **Molecular Biology of the Cell**, United States, v.15, Suppl., p.109A-110A, nov. 2004.
- AZUMA, A.; TAKAHASHI, S.; NOSE, M.; ARAKI, K.; ARAKI, M.; TAKAHASHI, T.; HIROSE, M.; KAWASHIMA, H.; MIYASAKA, M.; KUDOH, S. Role of E-selectin in bleomycin induced lung fibrosis in mice. **Thorax**, England, v. 55, n. 2, p. 147-152, feb. 2000.
- BARKHAUSEN, T.; KRETTEK, C.; VAN GRIENSVEN, M. L-selectin: adhesion, signalling and its importance in pathologic posttraumatic endotoxemia and non-septic inflammation. **Experimental and Toxicologic Pathology: official journal of the Gesellschaft für Toxikologische Pathologie**, Germany, v. 57, n. 1, p. 39-52, aug. 2005.
- BERKOVISKY, B.M.; MECVEDEV, V.F.; KRAKOV, M.S. **Magnetic fluids: engineering applications**. New York: Oxford University Press, 1993. 243p.
- BEVILACQUA, M. P.; STENGELIN, S.; GIMBRONE, M. A. Jr.; SEED, B. Endothelial leukocyte adhesion molecule 1: an inducible receptor for neutrophils related to complement regulatory proteins and lectins. **Science**, United State, v. 243, n. 4895, p. 1160-1165, mar. 1989.
- BLOEMEN, P. G.; HENRICKS, P. A.; NIJKAMP, F. P. Cell adhesion molecules and asthma. Clinical and experimental allergy. **Journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology**, England, v. 27, n. 2, p. 128-141, feb. 1997.
- BURNS, A. R.; SMITH, C. W.; WALKER, D. C. Unique structural features that influence neutrophil emigration into the lung. **Physiological Reviews**, United States, v. 83, n. 2, p. 309-336, apr. 2003.
- BURNS, J. A.; ISSEKUTZ, T. B.; YAGITA, H.; ISSEKUTZ, A. C. The alpha 4 beta 1 (very late antigen (VLA)-4, CD49d/CD29) and alpha 5 beta 1 (VLA-5, CD49e/CD29) integrins mediate beta 2 (CD11/CD18) integrin-independent neutrophil recruitment to endotoxin-induced lung inflammation. **Journal of Immunology**, United States, v. 166, n. 7, p. 4644-4649, apr. 2001a.
- BURNS, J. A.; ISSEKUTZ, T. B.; YAGITA, H.; ISSEKUTZ, A. C. The beta2, alpha4, alpha5 integrins and selectins mediate chemotactic factor and endotoxin-enhanced neutrophil sequestration in the lung. **The American Journal of Pathology**, United States, v. 158, n. 5, p. 1809-1819, may, 2001b.
- CHAVES, S. B. **Efeitos biológicos de fluidos magnéticos a base de magnetita recoberta por DMSA em camundongos: análise por microscopia de luz, imunohistoquímica e ressonância magnética**. 2002. 54f. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal) – Instituto de Biologia, Universidade de Brasília, Brasília.
- CHAVES, S. B.; SILVA, L. P.; LACAVALA, Z. G. M.; MORAIS, P. C.; AZEVEDO, R. B. Interleukin-1 and interleukin-6 production in mice's lungs induced by 2, 3 meso-dimercaptosuccinic-coated magnetic nanoparticles. **Journal of Applied Physics**, United States, v. 97, n. 10, p. 915/1-915/3, may 2005.

CHULUYAN, H. E.; ISSEKUTZ, A. C. VLA-4 integrin can mediate CD11/CD18-independent transendothelial migration of human monocytes. **The Journal of Clinical Investigation**, United States, v. 92, n. 6, p. 2768-2777, dec. 1993.

DA SILVA, M.F.; SHÜTT, W.; TELLER, J.; HAFELI, U.; ZBOROWSKY, M. In: SHÜTT, W.; TELLER, J.; HAFELI, U.; ZBOROWSKY, M. **Scientific and Clinical applications of Magnetic Carriers: an Overview**. New York: Plenum Publishing Corp, 1997. 597p.

DEDRICK, R. L.; BODARY, S.; GAROVOY, M. R. Adhesion molecules as therapeutic targets for autoimmune diseases and transplant rejection. **Expert Opinion on Biological Therapy**, England, v. 3, n. 1, p. 85-95, feb 2003.

DING, Z.; BABENSEE, J. E.; SIMON, S. I.; LU, H.; PERRARD, J. L.; BULLARD, D. C.; DAI, X. Y.; BROMLEY, S. K.; DUSTIN, M. L.; ENTMAN, M. L.; SMITH, C. W.; BALLANTYNE, C. M. Relative contribution of LFA-1 and Mac-1 to neutrophil adhesion and migration. **Journal of Immunology**, United States, v. 163, n. 9, p. 5029-5038, nov. 1999.

DOERSCHUK, C. M. Leukocyte trafficking in alveoli and airway passages. **Respiratory Research**, England, v. 1, n. 3, p. 136-40, oct. 2000.

DOERSCHUK, C. M.; TASAKA, S.; WANG, Q. CD11/CD18-dependent and -independent neutrophil emigration in the lungs: how do neutrophils know which route to take? **American journal of respiratory cell and molecular biology**, United States, v. 23, n. 2, p. 133-136, aug. 2000.

DOERSCHUK, C. M.; WINN, R. K.; COXSON, H. O.; HARLAN J. M. CD18-dependent and -independent mechanisms of neutrophil emigration in the pulmonary and systemic microcirculation of rabbits. **Journal of Immunology**, United States, v. 144, n. 6, p. 2327-2333, mar. 1990.

DOYLE, N. A.; BHAGWAN S. D.; MEEK B. B.; KUTKOSKI G. J.; STEEBER D. A.; TEDDER T. F.; DOERSCHUK C. M. Neutrophil margination, sequestration, and emigration in the lungs of L-selectin-deficient mice. **The Journal of Clinical Investigation**, United States, v. 99, n. 3, p. 526-533, feb. 1997.

GARCIA, M. P. **Estudo in vivo dos efeitos sub-crônicos e crônicos de nanopartículas magnéticas à base de magnetita recobertas com DMSA**. 2005. 88f. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) – Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília.

GONZALEZ, A.; LENZI, H. L.; MOTTA, E. M.; CAPUTO, L.; SAHAZA, J. H.; COCK, A. M.; RUIZ, A. C.; RESTREPO, A.; CANO, L. E. Expression of adhesion molecules in lungs of mice infected with *Paracoccidioides brasiliensis* conidia. **Microbes and Infection / Institut Pasteur**, France, v. 7, n. 4, p. 666-673, apr. 2005.

GRAYSON, M.H.; VAN DER VIEREN, M.; STERBINSKY, S. A.; GALLATIN, W. M; HOFFMAN, P. A.; STAUNTON, D. E.; BOCHNER, B. S. Alphadbeta2 integrin is expressed on human eosinophils and functions as an alternative ligand for vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1). **The Journal of Experimental Medicine**, United States, v. 188, n. 11, p. 2187-2191, dec. 1998.

GUO, R.; WARD, P. A. Mediators and regulation of neutrophil accumulation in inflammatory responses in lung: insights from the IgG immune complex model. **Free Radical Biology & Medicine**, United States, v. 33, n. 3, p. 303-310, aug. 2002.

HALBREICH, A.; ROGER, J.; PONS, J.N.; GELDWERTH, D.; DA SILVA, M.F.; ROUDIER, M.; BACRI, J.C. Biomedical applications of maghemite ferrofluid. **Biochimie**, France, v. 80, p. 379 – 390, may-jun. 1998.

HAMID, Q.; TULIC', M. K.; LIU, M. C.; MOQBEL, R. Inflammatory cells in asthma: mechanisms and implications for therapy. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, United States, v. 111, n. 1, p. S5-S12, jan. 2003.

- HAWKINS H.K.; HEFFELFINGER S.C.; ANDERSON D.C. Leukocyte adhesion deficiency: clinical and postmortem observations. **Pediatric Pathology / affiliated with the International Paediatric Pathology Association**, United States, v. 12, n. 1, p. 119-130, jan-feb. 1992.
- HECKEL, K.; KIEFMANN, R.; DÖRGER, M.; STOECKELHUBER, M.; GOETZ, A. E. Colloidal gold particles as a new in vivo marker of early acute lung injury. **American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology**, United States, v. 287, n. 4, p. L867-L878, jun 2004.
- HELLEWELL, P. G.; YOUNG, S. K.; HENSON, P. M.; WORTHEN, G. S. Disparate role of the b2-integrin CD18 in the local accumulation of neutrophils in pulmonary and cutaneous inflammation in the rabbit. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, United States, v. 10, n. 4, p. 391-398, apr. 1994.
- HYNES, R. O. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. **Cell**, United States, v. 110, n. 6, p. 673-687, sep. 2002.
- ITO, A.; KUGA, Y.; HONDA, H.; KIKKAWA, H.; HORIUCHI, A.; WATANABE, Y.; KOBAYASHI, T. Magnetite nanoparticle-loaded anti-HER2 immunoliposomes for combination of antibody therapy with hyperthermia. **Cancer Letters**, Ireland, v. 212, n. 2, p. 167-175, aug. 2004.
- KUBO, H.; DOYLE, N. A.; GRAHAM, L.; BHAGWAN, S. D.; QUINLAN, W. M.; DOERSCHUK, C. M. L- and P-selectin and CD11/CD18 in intracapillary neutrophil sequestration in rabbit lungs. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, United States, v. 159, n. 1, p. 267-274, jan. 1999.
- KUEBLER, W. M.; BORGES, J.; SCKELL, A.; KUHNLE, G. E. H.; BERGH, K.; MESSMER, K.; GOETZ, A. E. Role of L-selectin in leukocyte sequestration in lung capillaries in a rabbit model of endotoxemia. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, United States, v. 161, n. 1, p. 36-43, jan. 2000.
- KUEBLER, W. M.; KUHNLE, G. E.; GROH, J.; GOETZ, A. E. Contribution of selectins to leucocyte sequestration in pulmonary microvessels by intravital microscopy in rabbits. **The Journal of Physiology**, England, v. 501, n. Pt2, p. 375-386, jun. 1997.
- KUENZ, B.; LUTTEROTTI, A.; KHALIL, M.; EHLING, R.; GNEISS, C.; DEISENHAMMER, F.; REINDL, M.; BERGER, T. Plasma levels of soluble adhesion molecules sPECAM-1, sP-selectin and sE-selectin are associated with relapsing-remitting disease course of multiple sclerosis. **Journal of neuroimmunology**, Netherlands, v. 167, n. 1-2, p. 143-149, oct. 2005.
- LANDOLT, G.; NEMKE, B. W.; DARIEN, B. J.; KRUSE-ELLIOTT, K. T. Effect of inhaled endotoxin on cardiopulmonary function and E-selectin expression in pigs. **American Journal of Veterinary Research**, United States, v. 63, n. 9, p. 1302-1308, sept. 2002.
- LIU, Y.; SHAW, S. K.; MA, S.; YANG, L.; LUSCINSKAS, F. W.; PARKOS, C. A. Regulation of leukocyte transmigration: cell surface interactions and signaling events. **Journal of Immunology**, United States, v. 172, n. 1, p. 7-13, jan. 2004.
- LOBB, R. R.; HEMLER, M. E. The pathophysiologic role of alpha 4 integrins in vivo. **The Journal of Clinical Investigation**, United States, v. 94, n. 5, p. 1722-1728, nov. 1994.
- LUSCINSKAS, F. W.; LAWLER, J. Integrins as dynamic regulators of vascular function. **The FASEB Journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, United States, v. 8, n. 12, p. 929-938, sep. 1994.
- LUSCINSKAS, F. W.; MA, S.; NUSRAT, A.; PARKOS, C. A.; SHAW, S. K. Leukocyte transendothelial migration: A junctional affair. **Seminars in Immunology**, England, v. 14, n. 2, p. 105-113, apr. 2002.
- LUSTER, A. D.; ALON, R.; VON ADRIAN, U. H. Immune cell migration in inflammation: present and future therapeutic targets. **Nature Immunology**, United States, v. 6, n. 12, p. 1182-1190, dec. 2005.

MAINARDES, R. M.; SILVA, L. P. Drug delivery systems: past, present, and future. **Current Drug Targets**, Netherlands, v. 5, n. 5, p. 449-455, jul. 2004.

MARTIN, T. R.; FREVERT, C. W. Innate immunity in the lungs. **Proceedings of the American Thoracic Society**, United States, v. 2, n. 5, p. 403-411, dec. 2005.

MASSART, R. **Magnetic fluids and process for obtaining them**. US Patent # 4329241, 1982.

MIYAO, N.; SUZUKI, Y.; TAKESHITA, K.; KUDO, H.; ISHII, M.; HIRAOKA, R.; NISHIO, K.; TAMATANI, T.; SAKAMOTO, S.; SUEMATSU, M.; TSUMURA, H.; ISHIZAKA, A.; YAMAGUCHI, K. Various adhesion molecules impair microvascular leukocyte kinetics in ventilator-induced lung injury. **American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology**, United States, 30 dec. 2005. Disponível em: <<http://ajplung.physiology.org/cgi/content/abstract/00365.2005v1>>. Acesso em: 10 jan. 2005.

MOTOSUGI, H.; GRAHAM, L.; NOBLITT, T. W.; DOYLE, N. A.; QUINLAN, W. M.; LI, Y.; DOERSCHUK, C. M. Changes in neutrophil actin and shape during sequestration induced by complement fragments in rabbits. **The American Journal of Pathology**, United States, v. 149, n. 3, p. 963-973, sep. 1996.

NEELAMEGHAM, S.; TAYLOR, A. D.; SHANKARAN, H.; SMITH, C. W.; SIMON, S. I. Hydrodynamic shear shows distinct roles for LFA-1 and Mac-1 in neutrophil adhesion to intercellular adhesion molecule-1. **Blood**, United States, v. 92, n. 5, p. 1626-1638, sep. 1998.

NEELAMEGHAM, S.; TAYLOR, A. D.; SHANKARAN, H.; SMITH, C. W.; SIMON, S. I. Shear and time-dependent changes in Mac-1, LFA-1, and ICAM-3 binding regulate neutrophil homotypic adhesion. **Journal of Immunology**, United States, v. 164, n. 7, p. 3798-3805, apr. 2000.

NOURSHARGH, S.; MARELLI-BERG, F. M. Transmigration through venular walls: a key regulator of leukocyte phenotype and function. **Trends in Immunology**, England, v. 26, n. 3, p. 157-165, mar. 2005.

O'BYRNE, P. M.; POSTMA, D. S. The Many faces of airway inflammation. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**. United States, v. 159, n. 5, p. S41-S63, may 1999.

PARKER, J. C.; TOWNSLEY, M. I. Evaluation of lung injury in rats and mice. **American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology**, United States, v. 286, n. 2, p. L231-L246, feb. 2004.

RIDGER, V. C.; WAGNER, B. E.; WALLACE, W. A.; HELLEWELL, P. G. Differential effects of CD18, CD29, and CD49 integrin subunit inhibition on neutrophil migration in pulmonary inflammation. **Journal of Immunology**, United States, v. 166, n. 5, p. 3484-3490, mar. 2001.

ROSENSWEIG, R.E. **Ferrohydrodynamics**. New York: Cambridge University Press, 1985. 344p.

ROSSEAU, S.; SELHORST, J.; WIECHMANN, K.; LEISSNER, K.; MAUS, U.; MAYER, K.; GRIMMINGER, F.; SEEGER, W.; LOHMEYER, J. Monocyte migration through the alveolar epithelial barrier: adhesion molecule mechanisms and impact of chemokines. **Journal of Immunology**, United States, v. 164, n. 1, p. 427-435, jan. 2000.

SCHOLZ, D.; DEVAUX, B.; HIRCHE, A.; PÖTZSCH, B.; KROPP, B.; SCHAPER, W.; SCHAPER, J. Expression of adhesion molecules is specific and time-dependent in cytokine-stimulated endothelial cells in culture. **Cell and Tissue Research**, Germany, v. 284, n. 3, p. 415-423, jun. 1996.

SETHI, J. M.; WAXMAN, A. B. Mediators of acute lung injury: a review. **Clinical Pulmonary Medicine**, United States, n. 8, v. 4, p. 214-225, jul. 2001.

SIMON, S. I.; GREEN, C. E. Molecular mechanics and dynamics of leukocyte recruitment during inflammation. **Annual Review of Biomedical Engineering**, United States, v. 7, n. 8, p. 151-185, aug. 2005.

- SUN, S.; ZENG, H.; ROBINSON, D. B.; RAOUX, S.; RICE, P. M.; WANG, S. X.; LI, G. Monodisperse  $MFe_2O_4$  (M = Fe, Co, Mn) nanoparticles. **Journal of the American Chemical Society**, United States, v. 126, n. 1, p. 273-279, jan. 2004.
- ULBRICH, H.; ERIKSSON, E. E.; LINDBOM, L. Leukocyte and endothelial cell adhesion molecules as targets for therapeutic interventions in inflammatory disease. **Trends in Pharmacological Sciences**, England, v. 24, n. 12, p. 640-647, dec. 2003.
- VAN DER VIEREN, M.; CROWE, D. T.; HOEKSTRA, D.; VAZEUX, R.; HOFFMAN, P. A.; GRAYSON, M. H.; BOCHNER, B. S.; GALLATIN, W. M.; STAUNTON, D. E. The leukocyte integrin alpha D beta 2 binds VCAM-1: evidence for a binding interface between I domain and VCAM-1. **Journal of Immunology**, United States, v. 163, n. 4, p. 1984-1990, aug. 1999.
- VON ANDRIAN, U. H.; CHAMBERS, J. D.; MCEVOY, L. M.; BARGATZE, R. F.; ARFORS, K. E.; BUTCHER, E. C. Two-step model of leukocyte-endothelial cell interaction in inflammation: distinct roles for LECAM-1 and the leukocyte beta 2 integrins in vivo. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, United States, v. 88, n. 17, p. 7538-7542, sep. 1991.
- WAGNER, J. G.; ROTH, R. A. Neutrophil migration mechanisms, with an emphasis on the pulmonary vasculature. **Pharmacological Reviews**, United States, v. 52, n. 3, p. 349-374, sep. 2000.
- WANG, S.; DANGERFIELD, J. P.; YOUNG, R. E.; NOURSHARGH, S. PECAM-1, alpha6 integrins and neutrophil elastase cooperate in mediating neutrophil transmigration. **Journal of Cell Science**, England, v. 118, n. 9, p. 2067-2076, may 2005.
- WEISSLEDER, R.; ELIZONDO, G.; WITTENBERG, J.; LEE, A.S.; JOSEPHSON, L.; BRADY, T.J. Ultrasmall superparamagnetic iron-oxide: an intravenous contrast agent for assessing lymphonodes with MR imaging. **Radiology**, United States, v. 175, n. 2, p. 494-498, may 1990.
- WERR, J.; XIE, X.; HEDQVIST, P.; RUOSLAHTI, E.; LINDBOM, L. Beta 1 integrins are critically involved in neutrophil locomotion in extravascular tissue in vivo. **The Journal of Experimental Medicine**, United States, v. 187, n. 12, p. 2091-2096, jun. 1998.
- YUSUF-MAKAGIANSAR, H.; ANDERSON, M. E.; YAKOVLEVA, T. V.; MURRAY, J. S.; SIAHAAN, T. J. Inhibition of LFA-1/ICAM-1 and VLA-4/VCAM-1 as a therapeutic approach to inflammation and autoimmune diseases. **Medicinal Research Reviews**, United States, v.22, n. 2, p. 146-167, mar. 2002.
- ZEN, K.; PARKOS, C. A. Leukocyte-epithelial interactions. **Current Opinion in Cell Biology**. United States, v.15, n. 5, p. 557-564, oct. 2003.