

# O PROCESSO INFLAMATÓRIO.

## 2. Componente e Eventos Celulares

G.H. Bechara & M.P.J. Szabó1

### INTRODUÇÃO

A participação de células no processo inflamatório começou a ser destacada na segunda metade do século XIX, dentre outros, com Virchow, Arnold e Metchnikoff, que descreveram o papel de células próprias do tecido e migratórias, bem como o fenômeno da fagocitose. No século atual, outras descobertas vieram enriquecer mais o nosso conhecimento sobre as células participantes da inflamação, como o envolvimento de mastócitos na reação tríplice cutânea descrita em 1927 por Lewis, o macrófago na constituição dos granulomas, o linfócito como célula imunocompetente.

A seguir, o leitor terá a oportunidade de conhecer um pouco sobre a morfologia e função destas e de outras células que estão presentes durante o desenvolvimento de uma reação inflamatória.

### CÉLULAS DO PROCESSO INFLAMATÓRIO

As células que participam da reação inflamatória foram classificadas por Spector (1980), da seguinte forma:

- *células endoteliais*
- *células próprias do tecido* (mastócitos, fibroblastos e macrófagos fixos)
- *células migratórias* (leucócitos sangüíneos)

#### **Células endoteliais**

Há poucos anos ainda se considerava a célula endotelial como uma *membrana celular passiva*, que forma a interface entre o sangue e os tecidos, dado a sua estrutura simples, com escassez de organelas celulares quando vista ao microscópio de luz. Na atualidade, nosso conceito de endotélio foi radicalmente mudado, pois ficou claro que a célula endotelial é um componente funcionalmente *ativo* da parede vascular, capaz de mostrar diversas propriedades *metabólicas, de síntese e regenerativas*, estando implicada na *regulação* de vários fenômenos, tais como: fluxo sangüíneo, coagulação, proliferação de células da parede vascular, reatividade imunológica, resposta do organismo a estímulos patogênicos.

---

1 Departamento de Patologia Veterinária, FCAV-UNESP, campus de Jaboticabal-SP.

Além do mais, há na atualidade evidência definitiva de que o termo *endotélio* não se refere a um único tipo celular, mas a uma família de células bastante heterogêneas, com estrutura, função e propriedades metabólicas distintas, até mesmo dentro de um mesmo órgão.

O endotélio é formado por um *epitélio pavimentoso simples*. A célula endotelial é pobre em mitocôndrias e lisossomas, mas possui uma quantidade regular de retículo endoplásmico rugoso-RER, complexo de Golgi proeminente e citomembrana rica em sistemas enzimáticos. É importante ressaltar a presença de miofibrilas e de proteínas no citoplasma, como actina e miosina, relacionadas com sua capacidade contrátil. As junções intercelulares variam um pouco, mas são características estruturas dos tipos *zonula occludens* e, em menor grau, *zonula adherens* (Fig. 1).

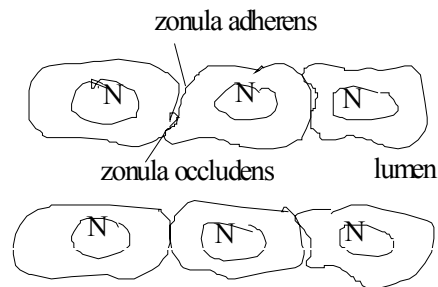


Fig. 1 - Tipos de junções entre células endoteliais

Entre as *funções* do endotélio podemos citar: limitada capacidade *fagocitária*, síntese de *colágeno tipo IV*, *elastina*, *laminina*, *fibronectina* e *glucosaminoglicos* e talvez outros componentes da *membrana basal*. Secretam *colagenases*, talvez para permitir a *gemação* endotelial para a *neovascularização*, *esteróides*, *prostaglandinas PGE<sub>2</sub>* e *PGF<sub>2α</sub>*, *prostaciclina-PGI<sub>2</sub>*, *tromboxano* e outros mediadores químicos importantes da *inflamação*. Participam da formação de elementos da *cascata da coagulação* e do fenômeno da *aderência leucocitária* graças à secreção da *molécula de adesão do endotélio a leucócitos (ELAM)*. Estes, por sua vez, contribuem com o mesmo fenômeno, secretando *moléculas de adesão intracitoplasmática (ICAM)*.

### **Células próprias do tecido**

**MASTÓCITOS:** São grandes células esféricas ou ovóides, localizadas de forma preferencial ao redor dos vasos sanguíneos e caracterizadas pela presença de grandes grânulos, que coram-se *metacromaticamente* (em vermelho) com azul de toluidina (Fig. 2). Aliás, seu nome vem do alemão, *mastzellen*, que significa célula granulosa. Esses grânulos contêm *heparina*, *histamina*, *dopamina*, *serotonina* e, provavelmente, *sacarídeos* e *ácido hialurônico*.

Recentemente, observou-se a heterogeneidade dos mastócitos e a probabilidade de haverem subclasses; o termo *típico* tem sido usado para os mastócitos do tecido conjuntivo subcutâneo e *atípico* para os de mucosa. Desempenham papel importante na *permeabilidade vascular aumentada* que ocorre na *alergia*, *urticária* e *choque anafilático*, e na prevenção da coagulação do sangue. Possuem receptores de membrana para a fração C<sub>3a</sub> do complemento (*anafilatoxina*) e para a porção Fc de IgE.

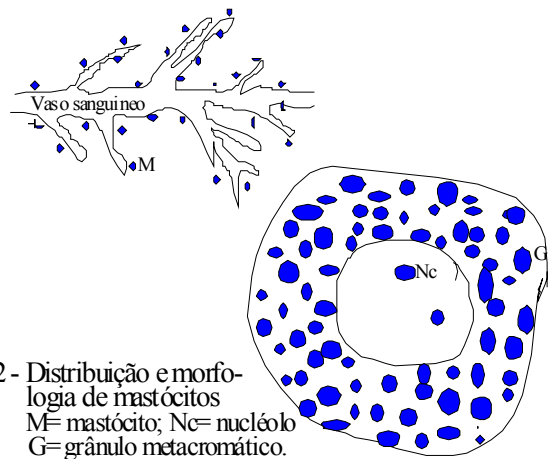


Fig.2 - Distribuição e morfologia de mastócitos  
M= mastócito; Nc= nucléolo  
G= grânulo metacromático.

**FIBROBLASTOS:** É a célula mais comum do tecido conjuntivo frouxo e seu formato depende essencialmente de sua localização. De um modo geral, é uma célula fusiforme ou estrelada, com núcleo alongado e hipocrômico nas células jovens (*fibroblastos*) ou fusiforme e hiperocrômico nas adultas (*fibrocitos*) (Fig. 3). O marcado desenvolvimento de seu RER e a existência de um nucléolo muito evidente indicam uma capacidade de síntese protéica intensa. Seu papel principal é a síntese de *colágeno* para a reparação de tecidos, e um tipo especial desta linhagem celular, o *miofibroblasto*, é fundamental para a *retração cicatricial*. À microscopia eletrônica, as fibrilas de *colágeno* apresentam uma *periodicidade* com bandas transversais, à semelhança de fibras musculares estriadas.

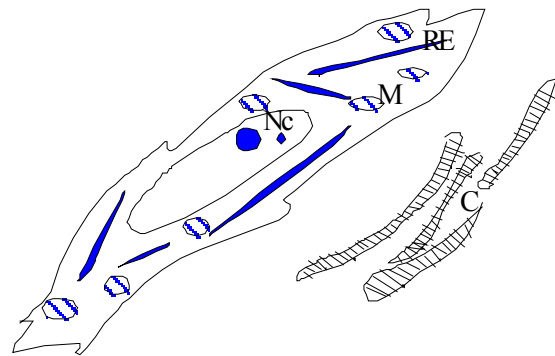


Fig. 3 - Fibroblasto jovem e fibrilas de colágeno  
Nc= nucléolo; M= mitocôndria; RE=retículo endoplasmático rugoso ;C= colágeno

**MACRÓFAGOS FIXOS OU RESIDENTES:** São derivados de monócitos circulantes, que se transformam em macrófagos fixos ao penetrarem os tecidos periféricos. Citam-se como macrófagos fixos ou residentes: *células de Kupffer* no fígado, *macrófagos alveolares* nos pulmões, *células da microglia* no tecido nervoso, *siderócitos* em órgãos linfóides, *macrófagos de cavidades serosas* (peritoneais e pleurais), e *histiócitos* do tecido conjuntivo (Fig. 4).

São células grandes, derivadas de um precursor na medula óssea, o promonoblasto.

Assim como os *macrófagos livres*, aqueles originados de *monócitos* circulantes na vigência de uma reação inflamatória, participam do *Sistema Fagocítico Mononuclear (SFM)* - expressão que substituiu na década de 60 a *Sistema Retículo Endotelial (SRE)*, ainda presente em muitos livros textos. Representam um dos mecanismos mais importantes de defesa celular a microorganismos, através da fagocitose. Outro aspecto de extrema importância destas células é a *apresentação antigênica a linfócitos*, após processamento do material digerido, para indução da resposta imune.

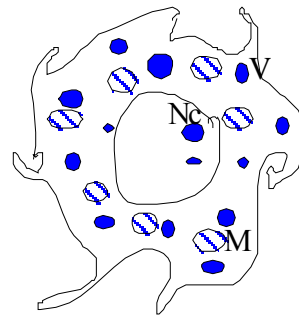


Fig. 4 - O macrófago residente.  
Nc= nucléolo; M= mitocôndria  
V= vesícula citoplasmática

### Células migratórias

**NEUTRÓFILOS:** São leucócitos *granulócitos polimorfonucleares-PMN*, formados na medula óssea, e como o próprio nome diz, possuem núcleo pleomórfico, multilobulado, citoplasma granuloso e medem cerca de 10  $\mu\text{m}$  de diâmetro. (Fig. 5). Estão envolvidos nas fases *iniciais* da inflamação, e em *infecções bacterianas*, particularmente as causadas por bactérias *piogênicas*, isto é, produtoras de pus, aparecem em elevado número no sangue e nos tecidos afetados (ex. *piometra* da cadela). Derivados de precursores da medula óssea, são células *terminais*, isto é, não se diferenciam em outro tipo celular, e possuem uma *vida média curta*, de aproximadamente *dois a três dias*. Este fato, e mais o de que são células *extremamente móveis*, explica em parte porque predominam nas fases iniciais do processo inflamatório em relação às demais células. Neutrófilos jovens apresentam núcleo em forma de ferradura (*neutrófilo bastonete*), enquanto os mais adultos, maduros, mostram núcleo bastante lobulado (*neutrófilo segmentado*). Dá-se os nomes de *neutrofilia* e *neutropenia*, respectivamente, ao aumento e à diminuição do número de neutrófilos na circulação periférica. As expressões *desvio à esquerda* e *desvio à direita* são utilizadas em Patologia Clínica para o aumento expressivo do número de bastonetes e segmentados na circulação, respectivamente. O citoplasma dos neutrófilos é rico em granulações, que não se coram pelos métodos usuais de coloração, pois não possuem afinidade por tais corantes - daí o nome *neutrófilos*. Estes grânulos, que são classificados em *primários, secundários e terciários*, de acordo com suas características de eletrondensidade à microscopia eletrônica, são ricos em enzimas digestivas, como *hidrolases, peroxidases e fosfatases ácidas*,

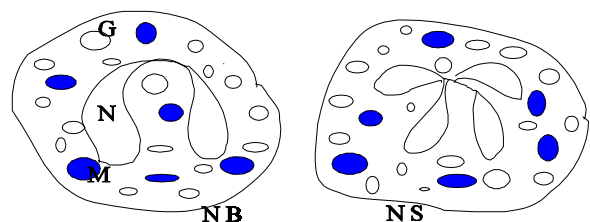


Fig. 5 - Neutrófilo bastonete (NB) e neutrófilo segmentado (NS). Notar a riqueza de grânulos citoplasmáticos (G) e mitocôndrias (M).

*lisozima*, etc. Os neutrófilos são caracteristicamente células *fagocitárias*, com uma membrana celular bastante aderente e suprimento lisossomal generoso em seu citoplasma. A *fagocitose* é acompanhada por uma atividade metabólica explosiva da célula, com grande *aumento no consumo de oxigênio*.

**EOSINÓFILOS:** Derivados de precursores da medula óssea, também são *células terminais* e granulócitos polimorfonucleares (PMN), medem cerca de 10  $\mu\text{m}$  de diâmetro e possuem atividade fagocitária, mas menos intensa. Seu núcleo é lobulado e o citoplasma possui grânulos eosinofílicos específicos, que apresentam *bandas equatoriais* como característica peculiar (Fig. 6), e que contém altas concentrações de *peroxidase* e uma *proteína principal básica* ("major basic protein - MBP"), que causa danos a *parasitas*, como já demonstrado para o *Shistosoma mansoni*. Os eosinófilos estão presentes em grande número (*eosinofilia*) nas *helminthoses* e em estados *alérgicos*, associados com *reações de hipersensibilidade do tipo I*, mediadas por *IgE* (reagínica). Aparentemente, a *histamina* é quimiotática especificamente para eosinófilos (Clark et al., 1975).

**BASÓFILOS:** São as células brancas menos numerosas no sangue circulante, correspondendo a 0,5 a 1,5% do total de leucócitos nas espécies animais. Medem de 10 a 12  $\mu\text{m}$  de diâmetro, possuem um núcleo bilobulado ou de formato irregular e citoplasma com grânulos basofílicos, cuja tonalidade varia do azul escuro ao roxo (Fig. 6). São portanto classificados como granulócitos PMN. Assim como os *mastócitos*, armazenam uma rica bateria de mediadores químicos como *histamina* e *serotonina*, por exemplo. E à semelhança dos mastócitos, são caracterizados por receptores que se ligam com grande afinidade à porção *Fc* da *IgE*. Apesar das semelhanças, não são idênticos àquelas células. Tem sido implicados em reações de *hipersensibilidade tardia*. Participam ativamente na resistência adquirida a *carrapatos*, como tem demonstrado resultados recentes de Szabó e Bechara, e que confirmam dados da literatura especializada (vide referências bibliográficas ao final).

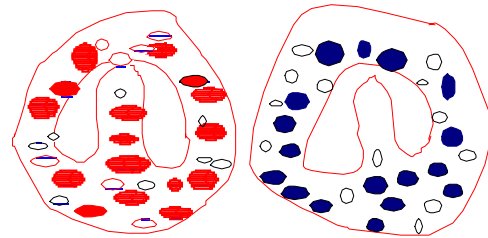


Fig. 6 - Eosinófilo à esquerda e basófilo à direita.

**LINFÓCITOS E PLASMÓCITOS:** Os linfócitos apresentam grande heterogeneidade morfológica e funcional, visto serem extremamente plásticos, e possuem considerável capacidade para mudar de tamanho e formato. São classificados pelos *histologistas* em *pequenos, médios e grandes linfócitos* de acordo com suas dimensões (8 a 12  $\mu\text{m}$ ) e pelos *imunologistas* em *linfócitos T e B*, conforme maturam, respectivamente, no *timo* e em órgãos semelhantes à *bursa de Fabricius* das aves.

Ainda segundo os imunologistas, há as células T auxiliares (*T helper-Th1 e Th2*) e as células T assassinas (*T killer*). Possuem núcleo esférico, oval ou denteado, mas não lobulado e são destituídos de grânulos específicos citoplasmáticos (Fig. 7); por isso são classificados como *agranulócitos mononucleares (MN)*. Ao contrário dos leucócitos PMN, não são células terminais, e *linfócitos B* podem diferenciar-se em *plasmócitos*, células produtoras de anticorpos (*imunoglobulinas*). Estes possuem um *núcleo excêntrico* ou periférico e um *citoplasma bem acidófilo*, associado a intensa síntese protéica; à microscopia eletrônica de transmissão mostram no citoplasma *RER* bem desenvolvido (Fig. 7).

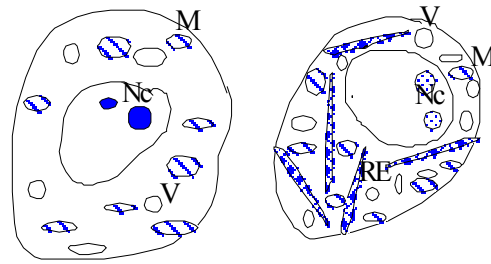


Fig. 7 - Linfócito à esquerda e plasmócito à direita. Notar riqueza de retículo endoplasmico (RE) no plasmócito. Nc= nucléolo; M= mitocôndria e V= vesícula citoplasmática

Os *linfócitos* se localizam em diversos tecidos e órgãos, às vezes aglomerados em *folículos linfóides*, mais proeminentes nas mucosas digestiva (placas de Peyer) e respiratória, favorecendo assim a resposta imune do hospedeiro. Linfócitos constituem-se em verdadeiro *apanágio da imunologia*. De fato, a maioria dos estudiosos consideram que eles estão presentes em situações de doença sempre que a *resposta imune* esteja envolvida. Por outro lado, os *patologistas* ensinam que *linfócitos* e outras células *MN* predominam na *fase crônica ou tardia* das reações inflamatórias. Isso se deve, segundo Paz e Spector (1963), primeiro porque são células "*lerdas*", de *baixa locomoção* e, segundo, porque apresentam *meia vida mais longa* que os PMN.

Entretanto, na segunda metade dos anos 70, Bechara e Garcia Leme demonstraram a participação destas células em reações inflamatórias *agudas, não imunes*, através da síntese e liberação de um ou mais fatores, que denominaram de *Fator pró-Inflamatório do Linfócito (FpIL)*. Os resultados destes experimentos vieram explicar porque a drenagem do *ducto torácico linfático* de pacientes humanos artríticos inibia parcialmente os sinais clínicos dos mesmos, e a reinfusão intravenosa dos linfócitos drenados exacerbava o quadro, como demonstrado por Pearson e colaboradores nos EUA, na década de 70. Mais tarde, demonstrou-se que estes linfócitos deveriam ser de uma subclasse específica, diferente de *linfócitos T* ou *B* totalmente diferenciados.

**MACRÓFAGOS LIVRES:** São semelhantes aos *macrófagos fixos*, anteriormente descritos, e derivados de precursores na medula óssea, os *promonoblastos*, que originam os *monócitos* circulantes. Na vigência de uma resposta inflamatória, ao migrarem para os tecidos, os monócitos diferenciam-se em *macrófagos*, células altamente especializadas na *fagocitose* de microorganismos e outros corpos estranhos ao organismo. Portanto, os *monócitos* não são células terminais, à semelhança dos linfócitos.

Os *macrófagos* secretam diversos mediadores, principalmente *citocinas*, como o *fator de necrose tumoral (TNF)*, *interleucinas (ILs)*, *fator ativador de plaquetas (PAF)*, o *fator de macrófagos quimiotático para neutrófilos*, descrito na

década de 80 por Cunha e Ferreira, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP. Eles concentram-se nos focos inflamatórios graças, pelo menos em parte, à ação do *fator inibidor da migração de macrófagos (MIF)*, citocina sintetizada por células ativadas. É sabido também que a  *fusão de macrófagos*  leva à formação de células gigantes, gigantócitos ou  *poliariontes de macrófagos* , como demonstrado nos anos 70 por Mariano - da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia-USP - e Spector na Inglaterra.

Deve-se destacar aqui que o macrófago é a  *célula principal*  do  *granuloma* , tipo especial de inflamação crônica ou persistente. A  *célula epitelióide* , assim chamada pela sua semelhança com a célula epitelial, deriva do macrófago, tem função secretória, e aparece também em reação granulomatosa, como na tuberculose

## **EVENTOS CELULARES**

O acúmulo de leucócitos, principalmente  *neutrófilos*  e células derivadas de  *monócitos* , é a característica mais importante da reação inflamatória, vindo a constituir-se no verdadeiro elemento do processo. Os leucócitos incorporam e degradam  *bactérias* ,  *complexos imunes*  e  *restos de células necróticas* , e as suas enzimas lisossomais contribuem de outras formas com a resposta defensiva do hospedeiro. Entretanto, leucócitos podem prolongar a inflamação e aumentar o dano tecidual pela liberação de enzimas, mediadores químicos e radicais livres, que são tóxicos para os tecidos.

A seqüência desses eventos leucocitários pode ser dividida, para fins didáticos, em:

- *marginação* ,
- *adesão*
- *migração e quimiotaxia*
- *fagocitose e degradação intracelular*
- *liberação extracelular de produtos leucocitários*

### **Marginação**

Em condições  *normais*  e, portanto, de fluxo sanguíneo rápido, leucócitos e eritrócitos constituem uma coluna  *central ou axial* , envolta por uma zona  *periférica*  de plasma, como representado na Figura 8.

A posição das células nessa coluna depende de seu tamanho relativo. Nos mamíferos, os  *glóbulos brancos* , maiores, ocupam o  *centro*  da coluna, zona de movimento mais rápido, enquanto que os  *glóbulos vermelhos* , a  *periferia*  da coluna.

Como o fluxo sanguíneo torna-se *mais lento* e os vasos tornam-se *dilatados* durante o desenvolvimento do *processo inflamatório*, a coluna axial mostra-se relativamente mais larga e a zona plasmática, mais estreita, devido ao extravasamento de plasma por *aumento da permeabilidade vascular*. À medida que o fluxo sanguíneo diminui, os glóbulos vermelhos aderem-se de forma a empilhar-se, o fenômeno do empilhamento ou *rouleaux*. Esses aglomerados de glóbulos vermelhos têm agora uma massa maior que a dos glóbulos brancos, os quais são deslocados para a periferia da coluna (Wilhelm, 1977). O deslocamento para fora das células brancas ocorre a baixas velocidades de fluxo, quando é apreciável a agregação de células vermelhas. Esse efeito não é observado a altas velocidades de fluxo, onde a força de arraste é de magnitude superior para romper os agregados eritrocíticos.

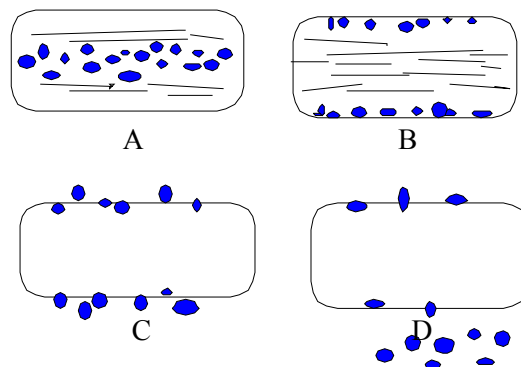


Fig. 8 - Fluxos axial (A) e periférico (B) de leucócitos em vaso sanguíneo. Diapedese (C) e infiltração (D) de leucócitos.

### Adesão

Numa área inflamada, os leucócitos de início aderem-se momentaneamente ao endotélio vascular (Fig. 8). A duração da aderência aumenta gradualmente até que finalmente os leucócitos permanecem em contato estreito com o endotélio (*pavimentação*). Esta situação expressa a resultante de duas forças: a *força de adesão* à parede vascular e a *força de arraste* do fluxo sanguíneo (Atherton e Born, 1972). Um aumento na força de adesão depende de alterações estruturais de moléculas responsáveis pela interação entre a superfície do leucócito e a superfície da célula endotelial. Estas interações têm considerável especificidade para granulócitos. Quando a força de arraste excede a força de adesão (arteríolas), o contato da célula com o endotélio não se processa.

Embora vários fatores possam influenciar a adesão (ex.:  $Ca^{++}$ , cargas elétricas de superfície), evidências recentes sugerem que a adesão leucocitária aumentada na inflamação envolve interações específicas entre "*moléculas de adesão*" presentes nos *leucócitos* e nas *superfícies endoteliais* (Hoover & Karnovsky, 1982). A expressão superficial dessas moléculas de adesão é induzida, aumentada ou alterada por agentes inflamatórios e mediadores químicos, tais como: *endotoxinas*, *C5a*, *peptídeos quimiotáticos*, *leucotrieno B4*, *PAF*, *IL-1*, *TNF*, *transferrina*, resultando em adesividade aumentada. Alguns agentes atuam sobre os leucócitos, outros nas células endoteliais e outros em ambos.

Um grupo de *moléculas de adesão* em *leucócitos* consiste de uma família de tres *glicoproteínas*. Em *leucócitos normais*, não estimulados, estão presentes em compartimentos vesiculares intracelulares, e são conhecidas pela sigla *ICAM*. As moléculas de adesão presentes em *endotélio* são as *ELAM*. O significado destas siglas já foi explicado anteriormente. Alguns mediadores inflamatórios, incluindo fragmentos quimiotáticos do *complemento*, estimulam o aumento rápido dessas



proteínas na superfície leucocitária, bem como a adesão aumentada dos leucócitos ao endotélio. Assim, pacientes com deficiência genética dessas proteínas de adesão apresentam infecções bacterianas recorrentes e aderência leucocitária deficiente.

### **Migração**

A *migração* se refere ao processo pelo qual leucócitos móveis escapam dos vasos sangüíneos para os tecidos perivasculares. *Neutrófilos, eosinófilos, basófilos, monócitos e linfócitos* se utilizam do mesmo caminho. Após *adesão*, os leucócitos se movem ligeiramente ao longo da superfície endotelial e inserem *pseudópodos* nas junções entre as células endoteliais. Eles deslizam através das junções interendoteliais alargadas, para assumir posição, eventualmente, entre a *membrana basal e a célula endotelial*. Aí podem permanecer por períodos curtos, mas atravessam depois a membrana basal e escapam para o espaço extravascular.

*Eritrócitos* também podem deixar os vasos sangüíneos, principalmente nas injúrias *severas*. Entretanto, ao contrário dos leucócitos, essa saída parece ser *passiva*, forçada pela *pressão intraluminal*, seguindo o caminho aberto pelos leucócitos.

O *tipo celular* presente em uma reação inflamatória *varia em número* com a *idade da lesão* e com a *natureza do estímulo*. Assim, na maioria dos tipos de inflamação *aguda*, predominam os *neutrófilos* nas primeiras *6 a 24 horas*, sendo substituídos pelos *linfócitos*, e células *derivadas de monócitos* (ex.: *macrófago*) em *24 a 48 horas*. Como já mencionado anteriormente, essa seqüência de eventos pode ser explicada de diversas maneiras, e os possíveis fatores implicados são:

1. os *neutrófilos* locomovem-se  *muito rapidamente*;
2. os *neutrófilos*, de *vida média curta*, desintegram-se e desaparecem depois de *24 a 48 horas*;
3. a migração de *monócitos* é mantida até muito tempo depois de cessada a de *neutrófilos*;
4. células *MN* em geral possuem *vida média mais longa* que a de *PMN*; e
5. fatores quimiotáticos para *neutrófilos* e *monócitos* podem ser ativados em tempos diferentes da reação.

Mas existem as exceções para esse padrão de exsudação celular. Assim, em *infecções virais* e na *nefrite intersticial da leptospirose canina*, *linfócitos* são recrutados em grandes números desde o início. Já na infecção por *Pseudomonas sp.* *neutrófilos* prevalecem de 2 a 4 dias no exsudato inflamatório. Szabó e Bechara têm observado infiltrados *neutrofilicos* na pele de *cães* infestados por *carrapatos*, natural ou experimentalmente, mesmo *vários dias* após a fixação dos ácaros, numa fase *tardia* da resposta, quando por exemplo em *cobaías* já predominam células *mononucleares*.

### **Fagocitose e Degradação Intracelular**

A *fagocitose* e a *liberação de enzimas* pelos *neutrófilos* e *macrófagos* constituem os dois principais benefícios do acúmulo de leucócitos no foco inflamatório. A *fagocitose* envolve três passos distintos, mas interrelacionados: i. a partícula a ser ingerida deve *aderir-se* à superfície do leucócito, fenômeno que

acompanha o *reconhecimento* pelo leucócito; ii. *endocitose*, ou ingestão com formação do vacúolo fagocítico (*fagossoma*); iii. *destruição* e/ou *degradação* do material ingerido. Em seguida, é apresentada breve descrição de cada passo.

**RECONHECIMENTO E ADESÃO.** Os *macrófagos* e *neutrófilos* podem ocasionalmente *reconhecer* e *ingerir* bactérias em ausência de soro (*opsonização*), mas a maioria dos microorganismos não são reconhecidos até que estejam revestidos por fatores séricos que ocorrem naturalmente, conhecidos por *opsoninas*. As duas opsoninas principais são os anticorpos das subclasses *IgG1* e a *IgG3*, de ocorrência presumivelmente natural contra partículas ingeridas, e o *C3b* (*fragmento opsônico C3*), gerado pela ativação do complemento por mecanismos imunes ou não. As partículas opsonizadas aderem a grupos de *receptores* correspondentes na superfície de neutrófilos e macrófagos - um grupo para o *fragmento Fc* das moléculas de *IgG* e o outro grupo para o *C3b*.

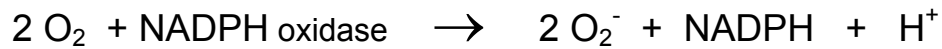
Trabalhos mais recentes (Mosher et al., 1981; Bevilacqua et al., 1981; Saba, 1982) indicam que a *fibronectina*, uma glicoproteína, contribui para o melhor desempenho do processo de fagocitose, talvez devido à sua capacidade de se ligar a numerosas substâncias extracelulares e também a superfícies celulares.

**ENDOCITOSE OU INGESTÃO.** A *ingestão* ocorre assim que o fagócito reconhece como *estranha* uma partícula. A ligação da partícula *opsonizada* à porção *Fc* da *IgG* é suficiente para iniciar a *endocitose*, mas a ligação aos receptores *C3b* requer uma ativação desses receptores antes da ocorrência da endocitose. Essa ativação pode ser feita pela ligação simultânea à *fibronectina* e *laminina extracelular* ou por produtos solúveis de linfócitos T estimulados, as *citocinas*. Durante a ingestão, extensões do citoplasma (*pseudopodes*) circundam o objeto a ser ingerido e englobam a partícula dentro de um vacúolo fagocítico, o *fagossomo*, formado pela invaginação da membrana citoplasmática da célula. A membrana limitante desse vacúolo fagocítico funde-se então com a membrana limitante do *grânulo lisossômico*, resultando na descarga do conteúdo dos grânulos dentro do agora chamado *fagolisossoma*. No decurso desse processo o *neutrófilo* e o *macrófago* degranulam-se progressivamente, seguindo-se um vazamento de enzimas hidrolíticas e de produtos metabólicos (ex.: *peróxido de hidrogênio*) do leucócito para o meio externo, provavelmente através de canais abertos do *fagolisossoma*. Este processo é chamado de "*regurgitação durante alimentação*"; é um mecanismo importante porque algumas das enzimas "*vomitadas*" têm atividade *proteolítica* e podem causar *dano tecidual*.

**DESTRUIÇÃO E/OU DEGRADAÇÃO.** O último passo na fagocitose de bactérias é a *morte* e a *degradação* da mesma. Duas categorias de mecanismos bactericidas são reconhecidos: os *dependente de oxigênio* e os *independente de oxigênio*.

i. **Mecanismos bactericidas dependentes de oxigênio:** a fagocitose é um mecanismo dependente de oxigênio que estimula numerosos eventos intracelulares, incluindo uma explosão respiratória ("*burst*"), glicogenólise, oxidação de glicose aumentada via ciclo da hexose-monofosfato e produção de metabólitos reativos de oxigênio (*radicais livres*). A geração dos metabólitos do oxigênio é atribuída à rápida ativação de uma oxidase (NADPH oxidase), que oxida o NADPH (dinucleotídeo

nicotinamida adenina); no processo reduz o oxigênio ao íon *superóxido* ( $O_2^-$ ), de acordo com a seguinte equação química:



O íon superóxido ( $2 O_2^-$ ) é então convertido em *água oxigenada* ou peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), principalmente por *desmutação espontânea*. A oxidase NADPH está presente na *membrana* ou, quando a membrana está invaginada, no *fagolisossoma*. Assim, o peróxido de hidrogênio é produzido no *lisossoma*. Esses metabólitos do oxigênio são as principais armas matadoras de bactérias, podendo atuar de duas maneiras:

- *Sistema dependente de mieloperoxidase ( $H_2O_2$ -mieloperoxidase-haleto)*: em que as quantidades de  $H_2O_2$  produzida no *fagolisossoma* são *insuficientes* para matar as bactérias. Entretanto, os grânulos azurrófilos dos neutrófilos contém a enzima *mieloperoxidase* (MPO), que, na presença de um haleto como o *cloreto* ( $Cl^-$ ), converte a  $H_2O_2$  em  $HOCl^o$ , um poderoso agente *antioxidante antimicrobiano*. Um mecanismo similar é efetivo contra *fungos, vírus, protozoários e helmintos*. Mas a maior parte de  $H_2O_2$  é quebrado pela *catalase* em  $H_2O$  e  $O_2$ , e parte é destruída pela ação da *glutathione oxidase*. *Monócitos* do sangue também contém grânulos com *MPO* e usam o sistema  $H_2O_2$ -MPO-haleto para a destruição *bacteriana*.
- *Sistema independente de mieloperoxidase (MPO)*: embora o sistema anterior seja um *bactericida* muito mais eficiente em *neutrófilos*, leucócitos *deficientes em mieloperoxidase* também são capazes de destruir bactérias, embora mais lentamente que células controle. O *sistema independente de MPO* também requer *oxigênio*. Os íons *superóxido* ( $2 O_2^-$ ) e *hidroxila* ( $OH^-$ ), extremamente reativos, também são formados durante o *metabolismo oxidativo*, foram responsabilizados nessa destruição. *Macrófagos maduros ativados* em diversas condições também produzem  $H_2O_2$  mas não possuem a *MPO*. Dessa forma podem matar *bactérias*, produzindo quantidades suficientes de  $H_2O_2$  ou outros *radicais tóxicos* como  $OH^-$

ii. **Mecanismos bactericidas independentes de oxigênio**: a morte bacteriana pode também ocorrer na ausência de uma explosão oxidativa, por substâncias presentes nos grânulos dos leucócitos. Estas incluem:

1. *proteína aumentadora da permeabilidade bacteriana* (BPI), uma proteína altamente catiônica associada ao grânulo e que causa alterações na permeabilidade da membrana mais externa de microorganismos;
2. *lisozima*, que hidroliza as ligações ácido-N-acetil-glucosamina murâmica, presentes no revestimento glicopeptídico de todas as bactérias;
3. *lactoferrina*, uma proteína fixadora de ferro presente em grânulos específicos;
4. *proteína básica principal*, uma proteína catiônica de *eosinófilos*, que possui uma ação *bactericida* limitada, mas que é citotóxica para muitos *parasitas*.

Após a morte bacteriana, *hidrolases ácidas* presentes em grânulos

azurrófilos degradam a bactéria no interior do *fagolisossoma*. O *pH* do *fagolisossoma* diminui para 4 a 5 após a fagocitose, sendo este o *pH* ótimo para a ação dessas enzimas.

Embora a maioria dos microorganismos sejam prontamente mortos por células *rastreadoras* (fagocíticas), alguns são suficientemente virulentos para destruir os seus captos. Outros, como o bacilo da tuberculose, são capazes de sobreviver no interior dos fagócitos, abrigando-se contra drogas antimicrobianas e outros mecanismos de defesa, p.e. anticorpos. Quando essas células fagocíticas migram através de linfáticos, infecções como a tuberculose podem se disseminar, é a conhecida *generalização precoce* ou *tardia* da tuberculose.

**LIBERAÇÃO EXTRACELULAR DE PRODUTOS LEUCOCITÁRIOS.** As perturbações da membrana, que ocorrem nos neutrófilos e monócitos após ligação receptor x elemento reagente durante a quimiotaxia e fagocitose, resultam na liberação de produtos não apenas no fagolisossoma, mas também no espaço intra e extracelular. Os produtos mais importantes são *enzimas lisossômicas*, *metabólitos ativos derivados do oxigênio* e *produtos do metabolismo do ácido aracdônico*, como as *prostaglandinas* e os *leucotrienos*. Esses produtos são potentes mediadores dos efeitos vascular e celular da inflamação e da lesão tecidual, e servem para amplificar os efeitos do estímulo inflamatório inicial.

A verdadeira liberação de enzimas lisossômicas durante a fagocitose ocorre de pelo menos tres maneiras:

1. *Regurgitação*, que pode ocorrer quando o vacúolo fagocítico permanece transitoriamente aberto para o exterior antes do fechamento completo do fagolisossoma, permitindo a saída de hidrolases lisossômicas;
2. *Endocitose invertida ou reversa*, que ocorre quando os leucócitos são expostos a materiais potencialmente ingeríveis (como imunecomplexos) em superfícies lisas como o endotélio capilar. A adesão dos imunecomplexos aos leucócitos inicia movimento de membrana, mas por causa da superfície lisa, a fagocitose não ocorre e as enzimas lisossômicas são liberadas para o meio. Tal fenômeno ocorre em determinadas formas de lesão glomerular induzida por complexos imunes; e
3. *Liberação citotóxica*, que ocorre quando o neutrófilo morre e sofre ruptura, com liberação de suas enzimas lisossomais para o espaço extracelular. Algumas partículas (cristais de uratos e sílica) são tóxicas para as membranas lisossomais, permitindo a liberação intracelular de enzimas lisossômicas.

### **Quimiotaxia**

O acúmulo de leucócitos no local da adesão, decorre da liberação ou ativação de mediadores químicos com atividade quimiotáxica sobre essas células. Estas substâncias determinam a *migração direcionada de leucócitos segundo um gradiente de concentração*. As células tendem a se acumular na fonte do gradiente, uma vez que o movimento contra o gradiente é inibido. Dessa forma a quimiotaxia pode ser definida como a *migração unidirecional das células*, determinada segundo um gradiente de concentração de substâncias quimiotáxicas, determinando o seu acúmulo. Em contraste, se uma substância é capaz de aumentar a taxa de locomoção, isto é, a velocidade, frequência de voltas ou magnitude de voltas, mas não é capaz de influenciar a direção de locomoção, as células poderão não tender a

se acumular porque não existe fator limitante que previna o seu movimento para longe da fonte de gradiente. Este movimento é definido como *quimiocinese*. *Quimiotaxia* e *quimiocinese* distinguem-se, portanto, do movimento aleatório das células. Substâncias quimiotáticas podem ser liberadas de tecidos traumatizados, geradas por sistemas enzimáticos presentes no plasma, formadas no curso de reações imunes ou podem ser isoladas de microorganismos.

#### PROCESSAMENTO DO SINAL QUIMIOTÁXICO

Para que uma célula possa se locomover é necessário que ela reconheça e venha a interagir com as substâncias quimiotáticas. Diversos trabalhos revelaram a presença de receptores específicos para agentes quimiotáticos, localizados sobre as membranas celulares de leucócitos. A fixação do elemento reagente ao receptor é rápida e, se aproximadamente 20% dos receptores forem ocupados, o fenômeno final será a migração.

Os fatores quimiotáticos induzem a locomção, secreção de enzimas lisossomais e aumento no consumo de oxigênio. A fixação do elemento reagente ao receptor é o primeiro passo e vários fenômenos bioquímicos são descritos na cadeia do processo em um período de tempo muito curto, como aumento de concentração do cálcio citosólico e de nucleotídeos cíclicos. Diversos trabalhos de Hirata (1979, 1980, 1981) indicam que o processamento do sinal quimiotático pode incluir a inativação da lipomodulina, a liberação do ácido aracdônico pela fosfolipase A2 e a subsequente formação de metabólitos bioativos, alguns dos quais induzem quimiotaxia, como o LTB4. Os produtos da via lipoxigenase são potentes indutores da quimiotaxia de PMN "in vitro". O turnover de fosfolipídeos, portanto, pode ter função relevante na quimioatração de PMN, monócitos e macrófagos.

#### AGENTES QUIMIOTÁXICOS

Para que um agente possa ser considerado uma substância quimiotática deve ser capaz de atrair leucócitos "in vitro". Assim, por exemplo, endotoxina é capaz de produzir acumulação de neutrófilos "in vivo", mas não "in vitro", dessa forma não é considerada substância quimiotática.

Podemos classificar os agentes quimiotáticos em:

1) *endógenos* { *derivados do plasma ou de células*

2) *exógenos*

#### AGENTES QUIMIOTÁXICOS ENDÓGENOS DERIVADOS DO PLASMA:

1. C5a e C5a desoxi arginina: são os mais importantes do plasma segundo Hugli e Morgan (1984). O C5a é altamente quimiotático para neutrófilos, eosinófilos, basófilos e monócitos. É liberado pela ativação do complemento ou por clivagem direta pela tripsina, proteases bacterianas e enzimas encontradas nos lisossomas de neutrófilos e macrófagos. O C5a é rapidamente convertido em C5a desoxi arginina, que também é quimiotática na presença de um polipeptídeo do soro chamado de coquemotoxina. O C5a também aumenta a adesão de leucócitos ao endotélio por

aumentar a expressão superficial de moléculas de adesão dos leucócitos.

2.fibrinogênio: é também uma fonte potencial de atividade quimiotática. Mas a atividade desses, em comparação com o C5a é negligenciável.

#### AGENTES QUIMIOTÁTICOS ENDÓGENOS DERIVADOS DE CÉLULAS:

1. leucotrieno B4 (LTB4): induz a adesão de leucócitos ao endotélio venular e é um potente agente quimiotático, equiparando-se ao C5a "in vitro", mas menos potente que os fatores do complemento "in vivo".

2. fator ativador de plaquetas (PAF): também aumenta a adesividade dos leucócitos ao endotélio, quimotaxia "in vitro" (tão efetivo como o LTB4) e induz infiltração leucocitária quando injetado na pele. Pode ser gerado por várias células como basófilos, neutrófilos, monócitos e endotélio.

3. citocinas: certos produtos polipeptídeos de linfócitos e monócitos ativados - chamados de linfocinas e monocinas, respectivamente - há muito foram implicados com respostas celulares na imunologia como por exemplo a proliferação e recrutamento de linfócitos. Recentemente, tornou-se claro que alguns destes produtos possuem efeitos adicionais e que desempenham papel importante na resposta inflamatória. Os dois mais importantes são a interleucina 1 (IL-1) e o fator de necrose tumoral (TNF). O primeiro é produzido por praticamente todos os tipos celulares. Isso ocorre quando as células são estimuladas "in vitro" por endotoxinas, imunocomplexos, toxinas, injúrias físicas e vários processos inflamatórios. Entre outros o IL-1 e o TNF induzem a síntese de moléculas de adesão de superfície que estimulam a adesão ao endotélio de neutrófilos, monócitos e linfócitos, também estimulam a síntese de PAF e a proliferação fibroblástica. E, de acordo com Mizel et al (1983) o IL-1 induz a quimiotaxia de PMN "in vitro".

4. constituintes lisossomais: possuem numerosas ações na inflamação entre eles a quimiotaxia, assim, por exemplo, proteínas catiônicas presentes nos grânulos azurófilos de neutrófilos são quimiotáticas para monócitos.

#### AGENTES QUIMIOTÁTICOS EXÓGENOS:

1.lecitinas: particularmente a concanavalina A

2.oligopeptídeos simples: derivados de bactérias como a E. coli e Staphilococcus aureus

### **Locomoção de Leucócitos**

Um leucócito estimulado por um fator quimiotático adquire rapidamente a forma polarizada, caracterizada pela delimitação de uma porção anterior (lamelipódio) e uma porção posterior (uropódio). Esta conformação decorre do aparecimento de

ondas de contração equatorial, perpendiculares ao eixo de polarização, iniciadas pela interação da substância quimiotóxica com o seu receptor, na superfície do leucócito.

Stossel (1982) resumiu o mecanismo da locomoção (também envolvido na fagocitose), de maneira simplificada, da seguinte forma:

- o fagócito se movimenta estendendo um pseudópodo que impulsiona o restante da célula na direção da extensão. O interior do pseudópodo é constituído por uma rede ramificada de filamentos compostos de actina e de uma proteína contrátil, a miosina. O fagócito utiliza a associação e dissociação rápidas de actina do monômero para a forma fibrilar, para expandir e contrair o pseudópodo. Esse fenômeno é controlado por íons de cálcio e inúmeras proteínas reguladoras. Estas incluem a proteína fixadora da actina, que organiza as fibras de actina em ângulos retos recíprocos, transformando o estado sol para gel; a gelsolina, que se fixa a uma extremidade de cada filamento de actina impedindo a reorganização; a acumentina que se fixa a extremidade oposta do filamento, revertendo a actina do estado gel para sol; calmodulina, uma proteína fixadora de cálcio que controla o arranjo das moléculas de miosina. Não se sabe exatamente como a miosina interage com a actina no pseudópodo para produzir a contração. Entretanto, o movimento depende muito do gradiente de cálcio intracitoplasmático, que afeta tanto a ação da gelsolina sobre a actina, quanto o arranjo dos filamentos de miosina. Essas alterações entre o estado gel e sol do citoplasma conferem o movimento direcionado. Sob influência da miosina, a rede de actina pode ser puxada de áreas gel com maior concentração de cálcio, para áreas sol com menor concentração.

## **MODELOS EXPERIMENTAIS PARA O ESTUDO DA QUIMIOTAXIA**

### **MODELO "IN VITRO"**

1. Modelo da quimiotaxia em câmara de Boyden: consiste de duas câmaras separadas por um filtro poroso, cujos poros devem ter um diâmetro de tamanho suficiente para permitir que as células o atravessem ativamente, com a utilização de esforço e não de forma casual ou passiva. As células que se deseja estudar são colocadas na câmara superior imersas em meio de cultivo adequado. O mesmo meio deve ser colocado na câmara inferior, onde deve ser dissolvida a substância quimiotóxica teste. Após uma incubação por período de tempo fixo (de 45 minutos a 2 horas ou mais), o filtro deve ser retirado, cuidadosamente lavado e corado. As células podem ser contadas ou a distância entre a primeira e a última camada de células pode ser medida com o auxílio do micrométrico do microscópio. Este modelo descrito por Boyden é intensamente utilizado em estudos de quimiotaxia com algumas variações, sendo de boa reprodutibilidade e baixo custo.

### **MODELO "IN VIVO"**

1. Método da pleurisia: o método da pleurisia pela carragenina ou outros irritantes permite avaliar o aumento da permeabilidade vascular, a quantidade de exsudato extravasado e o componente celular desse exsudato. Além disso, o fluido inflamatório pode ser colhido para quantificação e identificação de mediadores químicos da inflamação ou de proteínas através de técnicas adequadas.

Baseia-se na inoculação de irritantes em estudo na cavidade pleural na altura do quarto espaço intercostal de ratos. Após um período variável de tempo, dependente

do experimento em questão, os animais são sacrificados e, após lavagem, recolhe-se o exsudato e o líquido de lavagem com o auxílio de uma pipeta Pasteur para a observação dos parâmetros propostos pelo experimento.

Permite também o estudo do efeito de drogas que modulam a inflamação, quando então, o irritante empregado possui ação conhecida, como por exemplo a carragenina. Permite também variações como o emprego simultâneo do azul de Evans, p.e.

## **HORMÔNIOS E FUNÇÃO LEUCOCITÁRIA**

A insulina desempenha papel relevante na mobilidade de leucócitos polimorfonucleares, pois ocorre aumento da migração de tais células em pacientes diabéticos tratados com o hormônio (Baciu et al., 1967). Movat & Baum (1971) demonstraram que o índice quimiotático médio de PMN oriundos de diabéticos é significativamente menor que o de PMN oriundos de indivíduos normais.

Os corticosteróides induzem a formação de proteínas inibidoras da ação de fosfolipases (Di Rosa, 1989). São descritas tres proteínas com atividade antifosfolipase: macrocortina, lipomodulina e renocortina.

## **BIBLIOGRAFIA**

Dellman, H; Brown, E.M.: Histologia Veterinária. Guanabara Koogan - Rio de Janeiro, 1982. pp. 71-78.

Cheville, F.N.: Patologia Celular. Editorial Acribia - Zaragoza, 1980. pp. 79-80, 161-167.

Leme, J.G.; de Mello, S.B.V.; Falcão, R.P. & Rocha, J.R.O.: Lymphocytes in non-immune inflammation: a specific subclass of lymphoid cells? Br. J. exp. Path. 62: 172-181.

Movat, H.Z.: The Inflammatory Reaction. Elsevier, 1985. Amsterdam. pp. 203-229, 262-268

Pérez-Tamayo, R.: Introducción a la Patologia. Mecanismos de la enfermedad. Editorial Medica Panamericana, 2º edición, 1987, pp. 443-444.

Robins, S.L.; Cotran, R.S. & Kumar, V.: Pathologic Basis of disease. W.B. Saunders Company, 1989, pp. 45-59.

Spector, W.G.: An Introduction to General Pathology. Churchill Livingstone, 2nd edition, 1980, pp. 17-26.

Velo, G.P.; Willoughby, D.A. & Giroud G.P.: Future trends in Inflammation. Proceedings of an International Meeting on Inflammation; Verona, 28th - 30th June 1973. pp. 71- 74.



