

aderidas foi retirado e foi então adicionado meio Eagle sem soro. Em seguida as células foram incubadas a 37°C por 1 hora e posteriormente fixadas com PF 4% em PBS;

- c) T₄ - foi realizado o mesmo procedimento do T₁, porém, o tempo de incubação das células em meio Eagle sem soro foi de 4 horas e fixadas.

Após a incubação nos tempos T₀, T₁ e T₄, as células foram fixadas por 30 minutos a temperatura ambiente, e foi realizada a imunomarcagem para localização da fibronectina onde as células foram incubadas com anticorpo monoclonal anti-fibronectina humana, obtido em camundongo (SIGMA) na diluição 1:100 em PBS pH 7,2 durante 1h e, posteriormente, revelada através de métodos imunocitoquímicos de imunoperoxidase e imunofluorescência.

Para contagem das células imunomarcadas com FN através do método da peroxidase, foram analisadas 3 lamínulas de cada tempo de incubação (T₀, T₁ e T₄). Em cada lamínula foram observados 20 campos, com aproximadamente 50 células, corridos em horizontal, e foram relacionados os dados como número de células isoladas e agrupadas e número de grupos celulares que apresentavam marcação para FN na região de contato. Aplicou-se o teste x² para comparar a significância destas ocorrências nos diferentes tempos de plaqueamento.

b) Laminina

Para a verificação de laminina na superfície dos macrófagos alveolares, foi realizada imunomarcagem com anticorpo anti-laminina. Células do LBA foram plaqueadas em lamínulas de vidro por 30 minutos a 37°C, o sobrenadante foi descartado, as células aderidas foram fixadas e em seguida processadas para imunofluorescência. As células foram incubadas com anticorpo monoclonal anti-laminina humana (DAKO) na diluição 1:100.

Imunofluorescência

As células plaqueadas por 30 minutos foram fixadas em paraformaldeído a 4% em PBS pH 7,2, e

parte foi incubada com anticorpo monoclonal anti-laminina humana (DAKO) na diluição 1:100 em PBS pH 7,2 por 1 hora, e a outra parte foi incubada com anticorpo monoclonal anti-fibronectina humana, obtido em camundongo (SIGMA), na diluição 1:100 em PBS pH 7,2 durante 1h. Posteriormente todas as lamínulas foram incubadas com anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado com FITC (SIGMA), na diluição 1:80 em PBS pH 7,2 por 1 hora, posteriormente lavado e montado.

Imunoperoxidase

Após a incubação nos tempos T₀, T₁ e T₄, as células aderidas às lamínulas foram fixadas com paraformaldeído a 4% em PBS pH 7,2 por 30 minutos à temperatura ambiente. As células foram incubadas com anticorpo monoclonal anti-fibronectina humana, obtido em camundongo (SIGMA), na diluição 1:100 em PBS pH 7,2 durante 1h, posteriormente incubadas com anticorpo secundário biotilado (SIGMA) na diluição 1:80 e, em seguida, incubada com Streptavidina conjugada com peroxidase (SIGMA) na diluição 1:80 e revelada com AEC (DAKO). Não foi realizada imunomarcagem pelo método da peroxidase para LN, uma vez que não houve marcação para esta proteína na imunofluorescência.

Resultados

Lavado Broncoalveolar

A contagem diferencial das células do LBA dos 5 pacientes está exposta na tabela 1.

Padrão da imunocitoquímica e imunofluorescência

Macrófagos alveolares obtidos do LBA apresentaram uma marcação pericelular para fibronectina enquanto os linfócitos não demonstraram tal marcação. Nos métodos de imunoperoxidase e imunofluorescência foram observadas marcações intensas para fibronectina na região de contato entre as células (Figuras 1a-c, 2a-b). A imunofluorescência

Tabela 1: Contagem diferencial das células do LBA

Paciente	Total de Células X10 ⁶	Macrófagos alveolares	Linfócitos	Neutrófilos	Eosinófilos
1	2,3	57%	41%	<1%	<1%
2	1,8	47%	51%	<1%	1%
3	1,8	67%	32%	-	-
4	2,1	54%	41%	3%	-
5	1,9	56%	41%	<1%	<1%

para laminina não demonstrou marcação nos macrófagos alveolares ativados.

Relação entre células isoladas e agrupadas que apresentaram marcação para FN

Os resultados mostraram que, em média, 60% das células plaqueadas por 30 minutos apresentaram-se de forma isolada, e 40% agrupadas. No entanto, após 1 e 4 horas do plaqueamento, a média de células isoladas (90%) e agrupadas (10%) não mostrou alterações significativas ($p > 0,05$) (Tabela 2). Através do teste χ^2 observamos que as médias obtidas em T_0 eram significativamente diferentes dos Tempos T_1 e T_4 , onde $p < 0,05$. Entre os grupos de células observados em 30 minutos de plaqueamento, pudemos observar grupos com muitas células (Figura 1a); já nos tempos de 1 e 4 horas de plaqueamento, a observação de grupos com um grande número de células tornava-se difícil e, em média, eram observados grupos de 2 a 3 células (Figura 1b-c).

Relação entre os grupos celulares que apresentavam ou não marcação para fibronectina na região de adesão

Em alguns grupos de células pudemos observar a presença de uma forte marcação para FN na região de contato entre as células. Estes grupos podiam se apresentar constituídos por um único tipo celular (apenas macrófagos) (Figura 1a-c), ou ainda apresentar outros tipos celulares (linfócitos interagindo com macrófagos) (Figura 3a-b). A partir desta observação, determinamos a relação dos grupos com ou sem FN na região de adesão. Os resultados mostraram que, em média, 15% das células agrupadas apresentavam FN na região de adesão, independentemente do tempo de plaqueamento, ou seja, essas médias não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) (Tabela 3).

Relação entre os linfócitos e FN

Os linfócitos obtidos do LBA não apresentaram marcação para FN. No entanto, algumas vezes, quando em contato com macrófagos, estes linfócitos apresentaram uma intensa marcação na região de contato entre estas duas células (Figura 3b).

Discussão

Já está bem estabelecido que monócitos e macrófagos aderem a células (linfócitos, células endoteliais e outros tipos celulares) e a componentes da matriz extracelular (fibronectina e laminina), através de estruturas adesivas específicas da superfície celular (13). Estudos sobre os efeitos de proteínas da matriz extracelular em macrófagos de-

monstram que a FN, LN, colágeno tipo I e tipo IV afetam profundamente o desenvolvimento e a funcionalidade dos macrófagos (14).

A FN foi encontrada em níveis elevados no fluido do LBA de pacientes com sarcoidose (12). Para a verificação do papel da FN entre as células do LBA foram realizados métodos imunocitoquímicos para localizar esta glicoproteína adesiva. Nossos resultados demonstraram uma marcação pericelular para FN nos macrófagos alveolares. Já foi demonstrado que macrófagos derivados de monócitos em cultura sintetizam e secretam FN mas não depositam uma matriz pericelular (15). Em nossos estudos também observamos que linfócitos não apresentam marcação pericelular para FN, porém, quando em contato com macrófagos alveolares, podem exibir uma marcação na região de adesão. Existem evidências de que linfócitos produzam FN ou moléculas FN-like (16, 17), mas a habilidade da síntese estaria relacionada com o estado de ativação destas células (18). Linfócitos CD4+ podem fazer ligações estáveis com o complexo MHC e, através da ligação com receptores de células T (TCR), podem exibir auto-regulação a adesão por integrinas ligantes de FN e ICAM-1. Foi demonstrado que a adesão das células T pela FN e ICAM-1 aumenta fortemente a liberação de citocinas e proliferação das células T (19).

Em nossos resultados também pudemos observar que macrófagos alveolares são capazes de formar grupos entre si ou com linfócitos, e que muitas vezes esta associação era mediada pela FN. Um evento semelhante foi demonstrado entre células dendríticas e células T, em cultura. Tais células demonstravam uma agregação típica e esta associação física era relacionada a um mecanismo antígeno-independente o qual facilitaria o reconhecimento de moléculas HLA e peptídeos antigênicos por receptores da célula T (20, 21).

Outro resultado que parece ser relevante é a manutenção da porcentagem de células agrupadas que apresentavam marcação para FN na região de adesão. Estes grupos se mantiveram constantes nos tempos de 30 minutos, 1 hora e 4 horas de plaqueamento. Desse modo, pode-se concluir que a FN possui um importante papel na manutenção da interação celular. Se isso é verdade, é possível que os grupos de células que se formaram na ausência de FN na região de adesão, logo se desfizeram, aumentando assim o número de células isoladas encontradas nos tempos de 1 e 4 horas após o plaqueamento. Sabe-se que a apresentação de antígenos é um evento

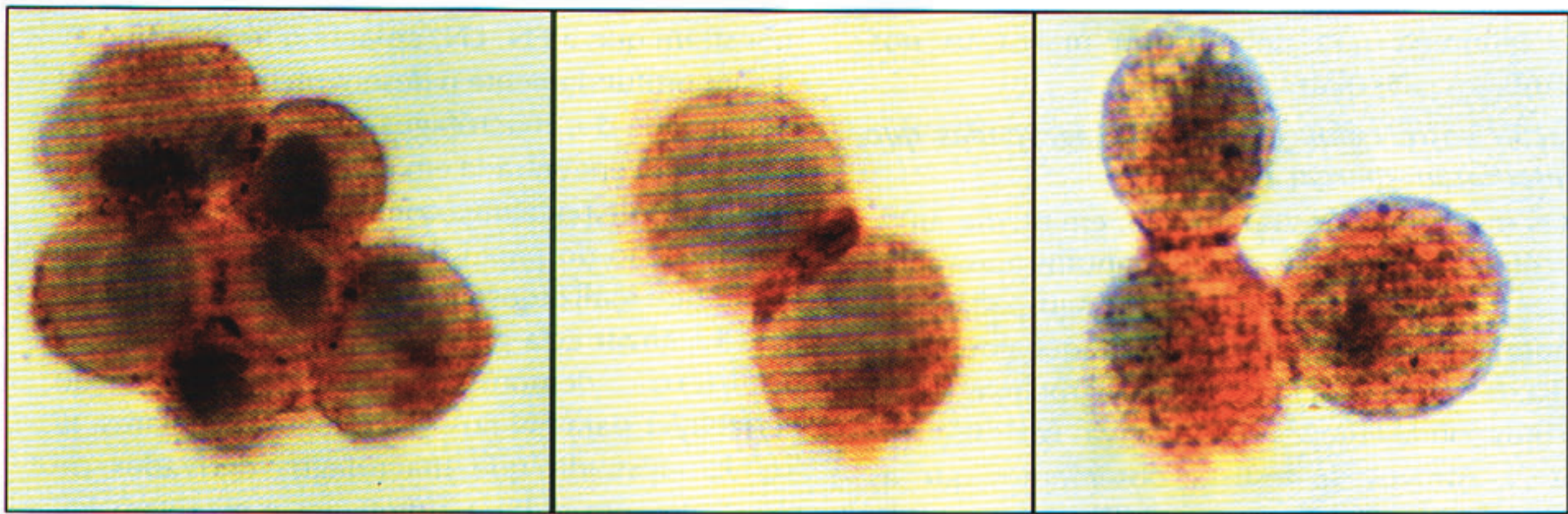


Figura 1a

Figura 1b

Figura 1c

Figuras 1a (2.150 X), 1b (2.150 X) e 1c (2.150 X) - Macrófagos alveolares marcados através de métodos de imunoperoxidase apresentam uma marcação pericelular para FN. Esta imunomarcação apresentou-se bastante intensa na região de contato entre os macrófagos alveolares.

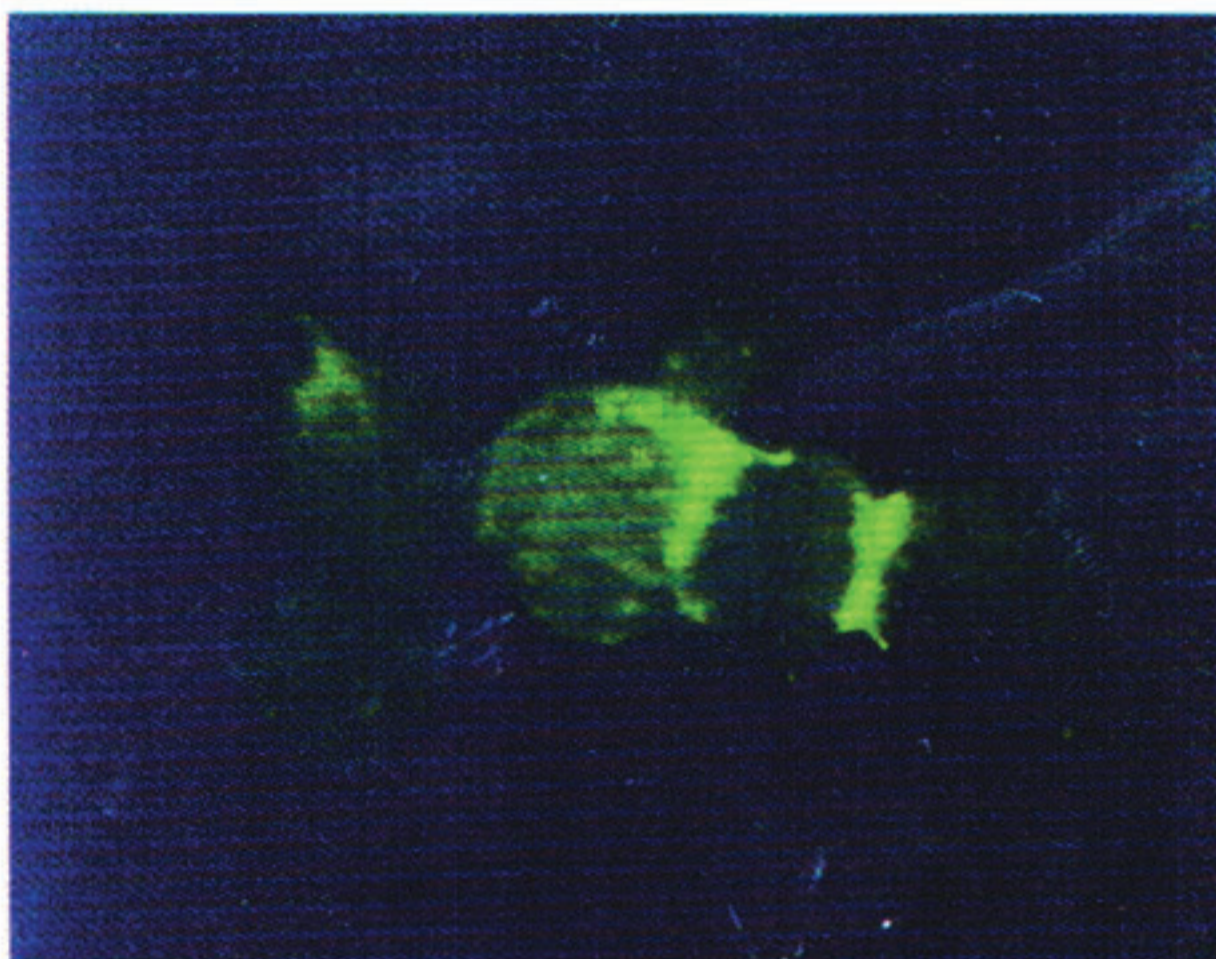


Figura 2a

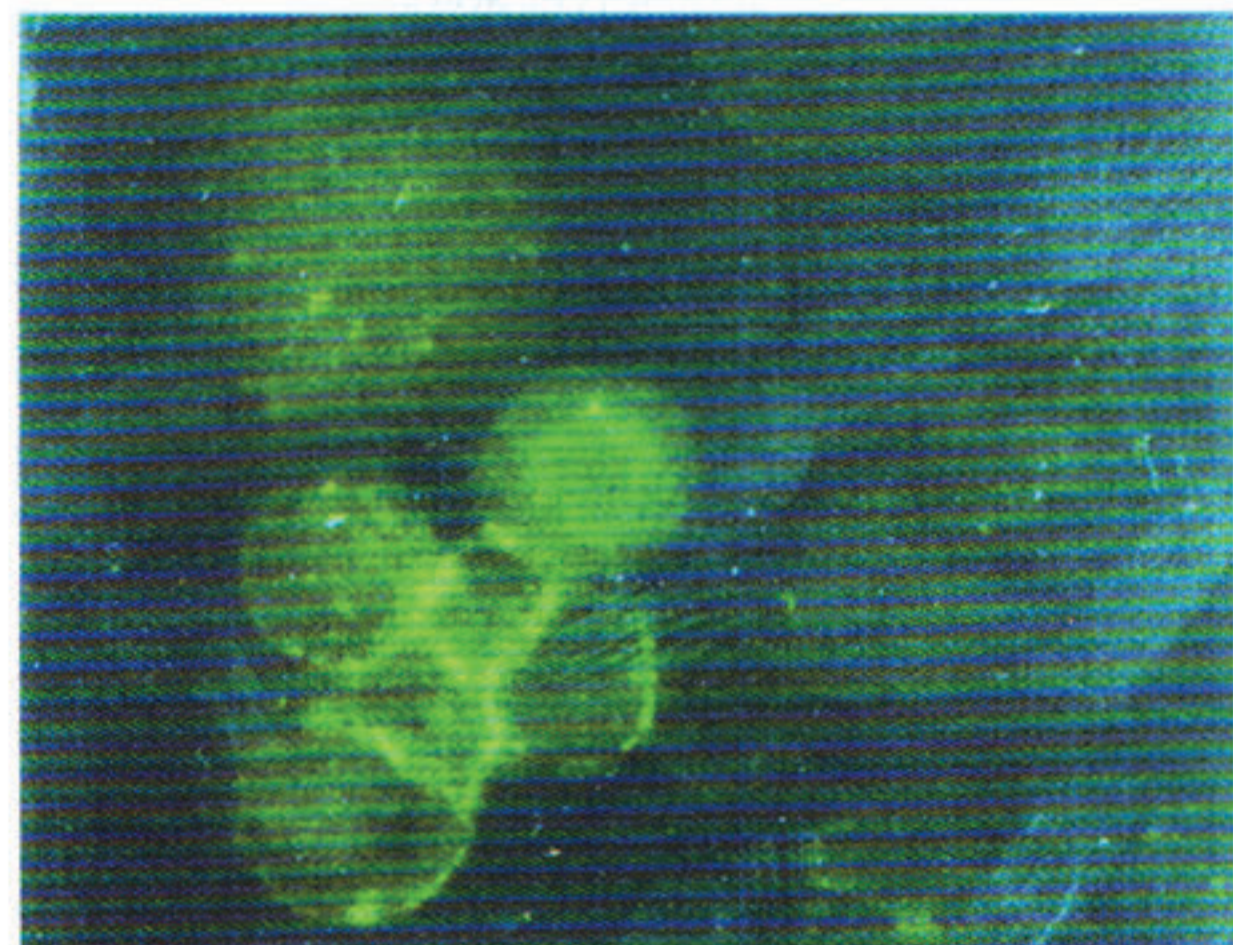


Figura 2b

Figuras 2a (860 X) e 2b (860 X) - Através do método de imunofluorescência também é observada uma forte marcação para FN na região de adesão entre grupos de macrófagos alveolares.

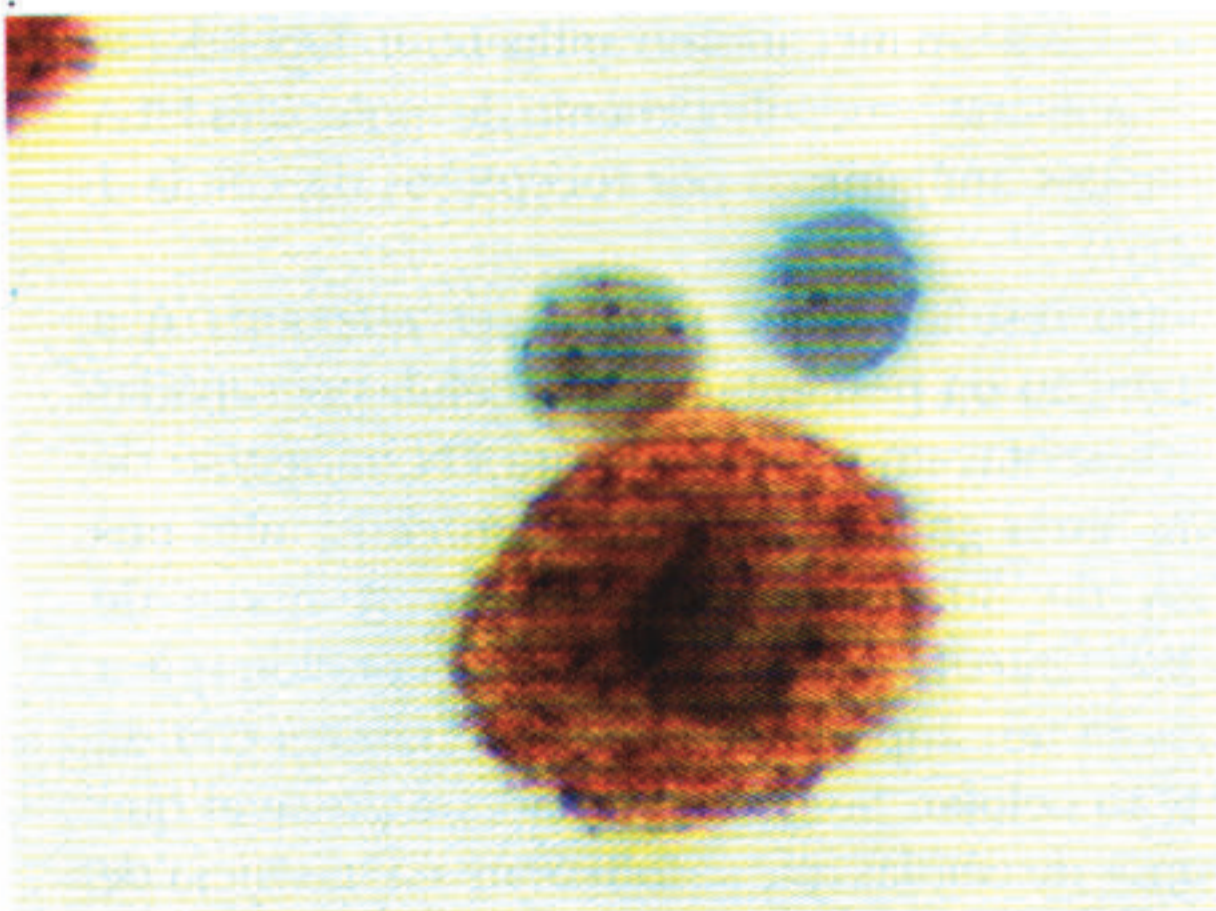


Figura 3a

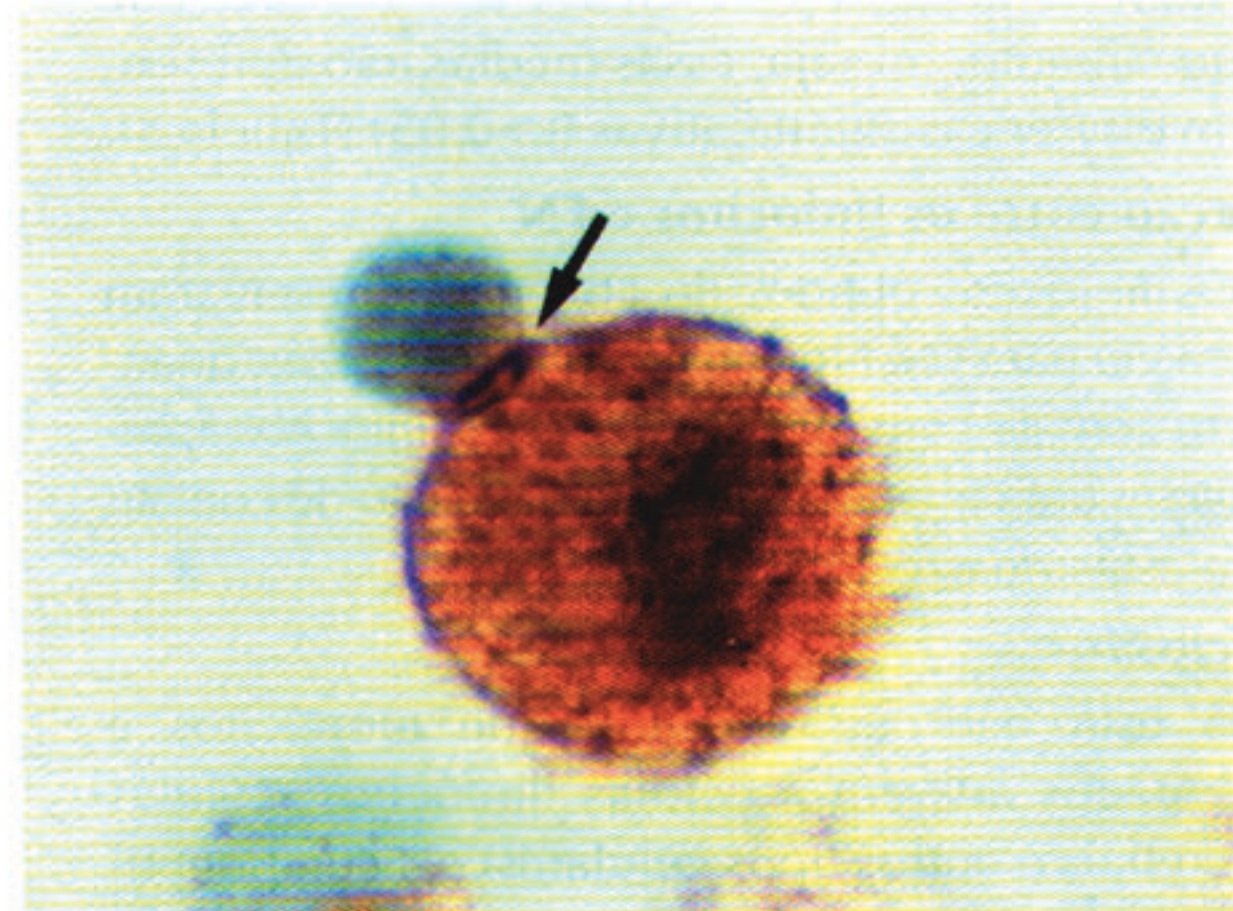


Figura 3b

Figuras 3a (2.150 X) e 3b (2.150 X) - Interação entre macrófagos alveolares e linfócitos T. Método de imunoperoxidase. Linfócitos T não apresentam marcação para FN, porém, quando interagem com macrófagos alveolares podem apresentar uma forte marcação para FN na região de adesão entre estas células (seta).

Tabela 2

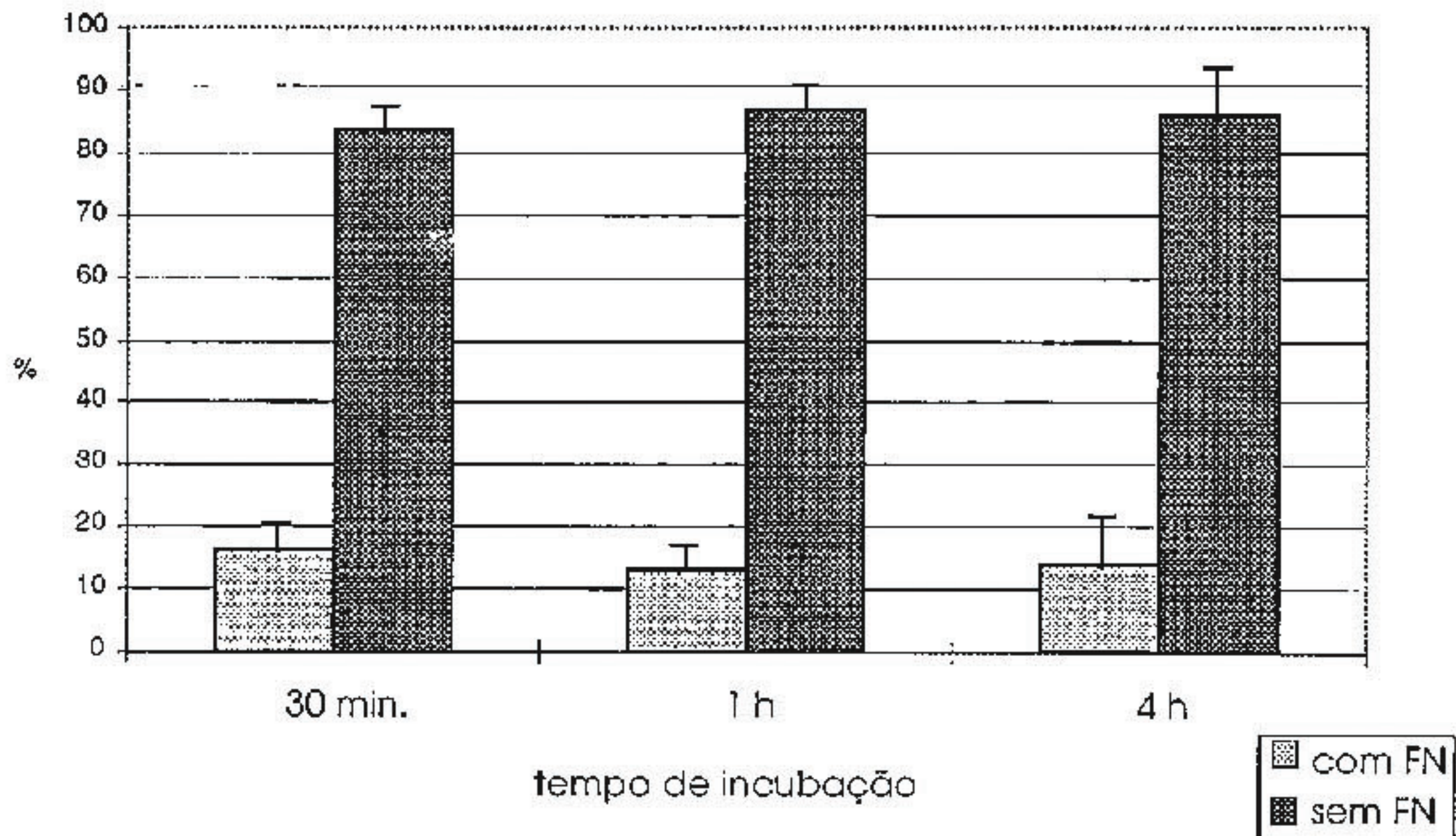
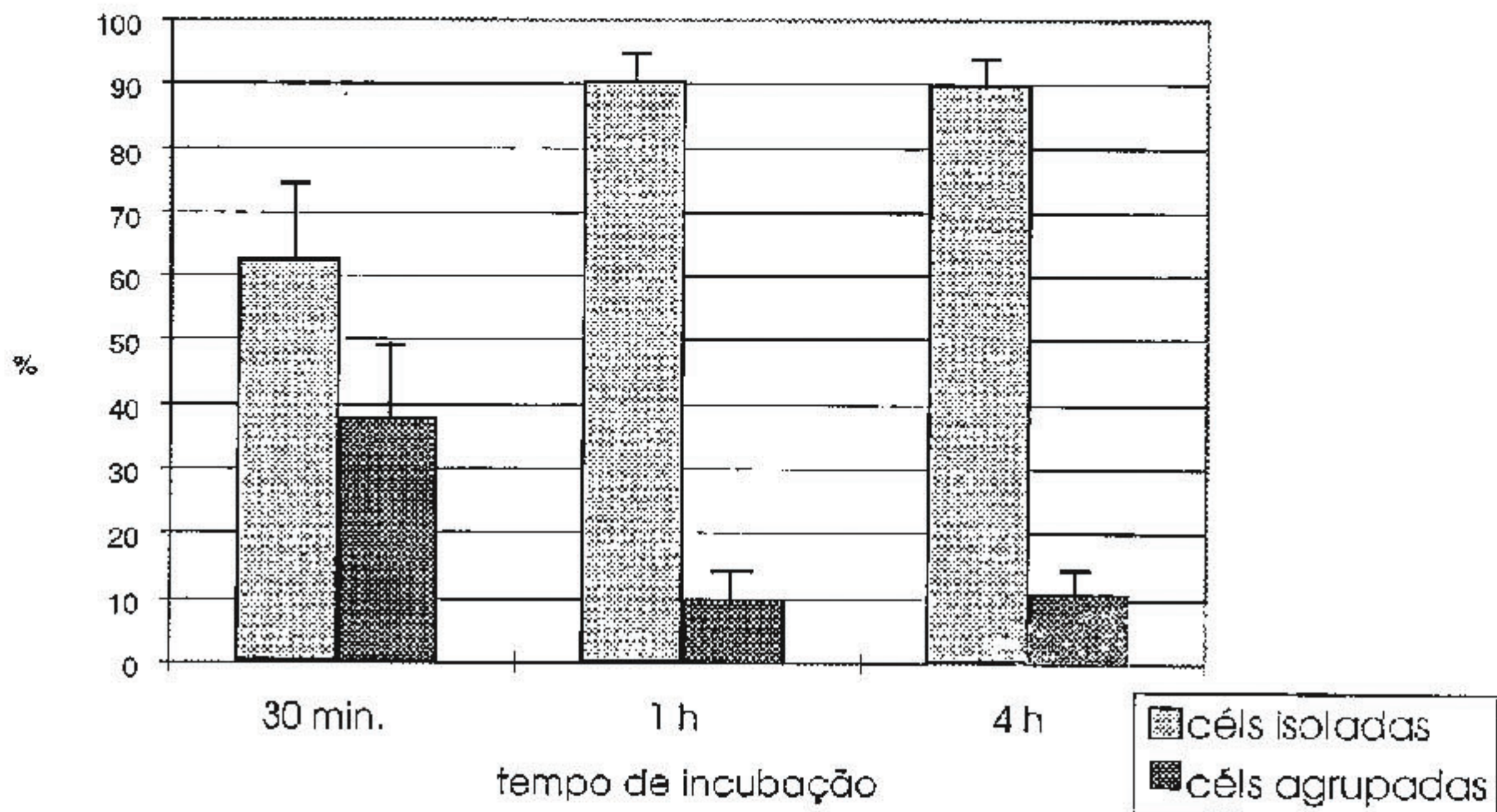


Tabela 3



dependente de tempo (22). Portanto, estes resultados sugerem que a FN pode estar envolvida no mecanismo que envolve a ativação de linfócitos T por macrófagos alveolares através de contato direto, e também que esta glicoproteína possa contribuir para um mecanismo de apresentação de antígenos entre estas duas células.

Macrófagos têm a habilidade de se ligar a laminina exógena através de receptores específicos

e a responder a laminina *in vitro*. Enquanto a FN possui um importante papel na ativação dos macrófagos, a laminina apresenta falhas na ativação destas células. Também já foi descrito que a laminina inibe a adesão das células da série mononuclear fagocítica e aumenta a atividade fagocítica dos macrófagos (2). Apesar da presença de receptores para laminina em macrófagos, nossos resultados não a demonstraram em macrófagos alveolares ativados

humanos. Esta glicoproteína não participa nos processos de interação entre macrófagos alveolares e linfócitos T de pacientes com sarcoidose pulmonar ativa. Assim, concluímos que a fibronectina participa na interação de macrófagos alveolares e linfócitos T, servindo como uma molécula acessória na apresentação de antígenos.

Referências Bibliográficas

- 1-Pilewsky JM, Albeida SM. Adhesion molecules in the lung. *Am Rev Respir Dis* 1993; 148 (suppl: S):31-37.
- 2-Ohki K, Kohashi O. Laminin promotes proliferation of bone marrow-derived macrophages and macrophage cell lines. *Cell Struct Funct* 1994; 19:63-71.
- 3-Lundahl J, Eklund A, Halldén G, Sköld CM. Adhesion properties of human alveolar macrophages with respect to extracellular matrix components and chemotactic agonists. *Immunol Lett* 1996; 53:121-124.
- 4-Akiyama SK, Nagata K, Yamada KM. Cell surface receptors for extracellular matrix components. *Biochim Biophys Acta* 1990; 1031:9*-110.
- 5-Fireman EM, Ben Efrain S, Greif J, Kivity S, Topilsky MR. Suppressor cell activity of human alveolar macrophages in interstitial lung diseases. *Clin Exp Immunol* 1988; 73:111-116.
- 6-Strausz J, Mannel DN, Pfeifer S, Borkowski A, Ferlinz R, Müller-quernheim J. Spontaneous eumonokine release by alveolar macrophages in chronic sarcoidosis. *Int Arch Allergy Immunol* 1991; 96:68-75.
- 7-Lem VM, Lipscomb MF, Weissler JC, et al. Bronchoalveolar cells from sarcoid patients demonstrate enhanced antigen presentation. *J Immunol* 1985; 135:1766-1771.
- 8-Striz I, Wang YM, Kalaydoglu O, Costabel U. Expression of alveolar macrophage adhesion molecules in pulmonary sarcoidosis. *Chest* 1992; 102:882-886.
- 9-Striz I, Wang YM, Svarcová I, Trnka L, Sorg C, Costabel U. The phenotype of alveolar macrophages and its correlation with immune cells in bronchoalveolar lavage. *Eur Respir J* 1993; 6:1287-1294.
- 10-Lohmann-Mathes ML, Steinmüller C, Franke-Ullmann G. Pulmonary macrophages. *Eur Respir J* 1994; 7:1678-1689.
- 11-Dayer J-M, Isler P, Nicod LP. Adhesion molecules and cytokine production. *Am Rev Respir Dis* 1993; 148:570-574.
- 12-Rennard SI, Hunnughake GW, Bitterman PB, Crystal RG. Production of fibronectin by the human alveolar macrophage: mechanism for the recruitment of fibroblast to sites of tissue injury of the interstitial lung diseases. *Proc Natl Acad Sci* 1981; 78:7147-51.
- 13-Pietro J, Eklund A, Patarrouyo M. Regulated expression of integrins and other adhesion molecules during differentiation of monocytes into macrophage. *Cell Immunol* 1994; 156 (1): 191-211.
- 14-Armstrong JN, Chapes SK. Effects of extracellular matrix proteins on macrophage differentiation, growth, and function. Comparison of liquid and agar culture systems. *J Exp Zool* 1994; 269(3): 178-187.
- 15-Alitalo A, Hovi T, Vaheri A. Fibronectin is produced by human macrophages. *J Exp Med* 1980; 151:602-613.
- 16-Godfrey HP, Canfield LS, Haak-Frendscho M, Melancon-Kaplan J. Relationship of human macrophage agglutination factor to other fibronectins. *Immunol* 1989; 67:321-327.
- 17-Sundqvist KG, Wanger L, Heimdahl A, Lönnqvist B, Hauzenberger D. Fibronectin associated with infiltrating T lymphocytes. Evidence for in situ localization in biopsies and synthesis in vitro. *Eur J Immunol* 1991; 21: 299-303.
- 18-Hauzenberger D, Martin N, Johansson S, Sundqvist K-G. Characterization of lymphocyte fibronectin. *Exp Cell Res* 1996; 222:312-318.
- 19-Brunmark A, O'Rourke AM. Augmentation of mature CD4+ T Cell responses to isolated antigenic class II proteins by fibronectin and intercellular adhesion molecule-1. *J Immunol* 1997; 159(4): 1676-1685.
- 20-Inaba K, Romni N, Steinman RM. An antigen-independent contact mechanism as an early step in T-cell proliferative responses to dendritic cell. *J Exp Med* 1989; 170:527-542.
- 21-Steinman RM. The dendritic cell system and role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol* 1991; 9:271-296.
- 22-Mellman I, Turley SJ, Steinman RM. Antigen processing for amateurs and professionals. *Trends in Cell Biol* 1998; 8:231-237.