

**ALBERTO CONSOLARO**

**ATIVIDADE FAGOCITÁRIA DE MACRÓFAGOS E CÉLULAS  
GIGANTES MULTINUCLEADAS EM GRANULOMAS INDUZIDOS  
POR ESPONJAS DE POLICLOROVINIL.**

**Orientador: Prof. Dr. MÁRIO ROBERTO VIZIOLI**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do Grau de Mestre em Biologia e Patologia Buco-Dental-Área de Patologia.

**PIRACICABA  
1983**

**UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL**

DEDICÓ ESTE TRABALHO...

... aos meus pais, pela sãbia  
decisão de me fazer estudar,  
descobrimo assim o caminho  
da verdade...,

... à Marisa, Renata, Sílvio,  
pelo amor que me dedicam...,

... e àqueles que não baixam os  
braços nem perdem as convicções,  
aos que trabalham, aos que lutam,  
aos que buscam, às crianças e aos  
que acreditam que amanhã o sol  
vai brilhar.

*AGRADECIMENTOS*

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. MÁRIO ROBERTO VIZIOLI, Professor Titular Colaborador da Área de Patologia do Departamento de Diagnóstico Oral da Faculdade de Odontologia de Piracicaba da UNICAMP, pela segura e sábia orientação recebida durante este trabalho e pela sua amizade, dignidade e respeito ao próximo que sempre soube transmitir.

Ao Prof. Dr. ANTONIO CARLOS FERRAZ CORREA, Coordenador do Curso de Pós-Graduação em Biologia e Patologia Buco-Dental e ao Professor SAMIR TUFIC ARBEX, Coordenador Geral dos Cursos de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

Ao Prof. Dr. LOURENÇO BOZZO, Chefe da Área de Patologia do Departamento de Diagnóstico Oral da Faculdade de Odontologia de Piracicaba da UNICAMP, pelo estímulo e apoio com que sempre me incentivou.

Ao Prof. Dr. OSLEI PAES DE ALMEIDA, pelo exemplo de conduta e análise crítica, além do incentivo e espírito de solidariedade com que sempre me distinguiu.

Ao Prof. ALMIR LIMA DE CASTRO, Prof. Adjunto de Fisiologia da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, UNESP, pelo exemplo de vida e por ter me iniciado na vida universitária.

Ao Prof. Dr. MOUSTAFA MOHAMED EL-GUINDY,

Prof. Livre Docente de Bióquímica da Faculdade de Odontologia de Piracicaba da UNICAMP, pelas colaborações e sugestões oferecidas.

Ao Prof. AGRIPINO DE OLIVEIRA LIMA FILHO, Diretor Geral da Associação Prudentina de Educação e Cultura, pelo apoio financeiro e afetivo recebido durante o curso.

A todos os Professores do Curso de Pós-Graduação em Biologia e Patologia Buco-Dental da Faculdade de Odontologia de Piracicaba da UNICAMP, pelos ensinamentos, colaborações e orientações recebidas.

Ao técnico de Laboratório Sr. ANTONIO KERCHES, pela imprescindível colaboração nas partes técnica e fotográfica.

Aos meus colegas de Curso, em especial ao CID FERRAZ e esposa, pela solidariedade e amizade sempre recebidas.

Ao Magnífico Reitor Professor ATAULFO MARQUES MARTINS DA COSTA, da Universidade Federal de Uberlândia (MG), pelo apoio nunca negado ao Curso de Odontologia.

Ao Coordenador do Curso de Odontologia da Universidade Federal de Uberlândia (MG), Professor LUIZ MÁRIO GUIMARÃES GONÇALVES, e ao Chefe do Departamento de Odontologia Social e Preventiva Professor ODORICO COELHO DA COSTA NE

TO, pela compreensão e estímulo que dedicam ao corpo docente.

Aos meus colegas do Departamento, em especial da Unidade de Diagnóstico Estomatológico, pelo apoio sempre recebido.

À Bibliotecária Sra. BERENICE BELLESI DE CÉSARO, pelo atendimento pronto e gentil, e pela orientação segura na pesquisa bibliográfica deste trabalho.

À Srta MARTINA AMARAL e Sras ELIANA DE FÁTIMA OLIVEIRA SILVA, SUELY SOLIANI e MARIA HELENA V. PERON, pela colaboração nos serviços de datilografia e secretaria.

AOS MEUS ALUNOS, PELOS ESTÍMULOS QUE ALIMENTAM MINHA SEDE DE SABER.

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, auxiliaram na elaboração deste trabalho.

*SUMÁRIO*

## SUMÁRIO

1. Introdução .....	8
2. Revisão da Literatura .....	12
2.1. Macrófagos .....	13
2.1.1. Classificação .....	13
2.1.2. Origem .....	14
2.1.3. Quimiotaxia .....	18
2.1.4. Fagocitose .....	18
2.1.5. Resposta imune, ativação e proliferação ...	21
2.1.6. Capacidade mitótica .....	25
2.1.7. Produção de colágeno .....	26
2.2. Células epitelióides .....	27
2.3. Células gigantes multinucleadas inflamatórias ....	30
2.3.1. Morfologia .....	31
2.3.2. Origem e formação .....	32
2.3.3. Atividade celular .....	40
3. Material e Métodos.....	43
3.1. Seleção dos animais .....	44
3.2. Preparação das esponjas de PVC .....	44
3.3. Preparação da tinta nanquim .....	45
3.4. Implantação das esponjas .....	45
3.5. Sacrifício dos animais .....	46
3.6. Coloração com hematoxilina - eosina .....	46
3.7. Método de contagem celular .....	46
3.7.1. Método de contagem em campos microscópios isolados .....	46
3.7.2. Método de contagem total .....	46
3.8. Avaliação da atividade fagocitária e comportamento celular .....	48

4. Resultados .....	49
4.1. Método de contagem em campos microscópicos isolados.....	50
4.2. Método de contagem total .....	53
4.3. Comportamento celular e avaliação da atividade fagocitária .....	56
5. Discussão .....	59
6. Conclusões .....	69
7. Sinótese .....	72
8. Summary .....	75
9. Bibliografia .....	78
10. Ilustrações .....	90

*INTRODUÇÃO*

## 1. INTRODUÇÃO

O tecido de granulação é o constituinte básico da última fase do processo inflamatório: o processo de reparo. Quando induzido, o tecido de granulação pode ser usado, como modelo experimental, através do qual podemos estudar e pesquisar vários aspectos da formação e evolução do processo de reparo no organismo animal (VIZIOLI, 1975).

No tecido de granulação, a fagocitose é um dos fenômenos de fundamental importância para que o processo de reparo chegue a completar sua finalidade, que é a cura. A fagocitose é reconhecida desde Metchinkoff, 1892, (apud RYAN e MAJNO, 1977), como um mecanismo de defesa vital para o organismo. O processo da fagocitose consiste na captação e ingestão, pelas células especializadas, de material estranho que as cercam.

No homem, as células fagocitárias de maior importância são os neutrófilos e os monócitos, ambas migrando do sangue para os tecidos ainda nos estágios iniciais da inflamação, permanecendo, estas últimas, quase exclusivamente como células fagocitárias no processo de reparo (FLOREY, 1970).

A evolução do processo de reparo depende de vários fatores, entre os quais a maior ou menor atividade fagocitária dos macrófagos. Sendo assim, é de grande interesse o conhecimento sobre quando os macrófagos chegam ao tecido de granulação, bem como quando iniciam sua atividade fagocitária. No tecido de granulação induzido por esponja de PVC (policloro-vinil) temos, após certo tempo de implantação, o aparecimento de células gigantes multinucleadas. As células gigantes multinucleadas inflamatórias possuem de 2 a 200 núcleos cada uma, sendo reconhecidas pelos patologistas através de dois tipos morfológicos: 1) células gigantes multinucleadas inflamatórias

tipo corpo estranho, formadas em resposta à presença de partículas indigestas nos tecidos, cujos núcleos estão dispersos ao acaso no citoplasma, e; 2) células gigantes multinucleadas inflamatórias de Langhans, cujos núcleos estão dispostos na periferia da célula, consideradas típicas da tuberculose.

A origem das células gigantes multinucleadas inflamatórias tem sido muito pesquisada e discutida. ROIZMAN (1962) considerou-as como resultantes da fusão de macrófagos, no entanto SILVERMAN e SHORTER (1963) sugerem que as células gigantes multinucleadas inflamatórias são formadas a partir da fusão de histiócitos, apesar de reconhecer a possibilidade de ocorrer divisões amitóticas, mas consideram isto improvável. Estes histiócitos, segundo KAMINSKI e TOTO (1967), originam-se de células mesenquimais indiferenciadas localizadas perivascularmente no tecido conjuntivo. GILLMAN e WRIGHT (1966) afirmaram que as células gigantes multinucleadas inflamatórias são formadas a partir monócitos circulantes; SUTTON e WEISS (1966) por sua vez, observaram através da microscopia eletrônica, que antes da formação das células gigantes multinucleadas inflamatórias ocorre uma transformação sequencial de monócitos, células epitelióides e células gigantes multinucleadas inflamatórias, observações essas confirmadas por BLACK e EPSTEIN (1974). MARIANO e SPECTOR (1974) observaram que existe a necessidade de macrófagos recém-chegados da circulação para que ocorra a fusão com macrófagos "velhos", promovendo assim a formação de células gigantes multinucleadas inflamatórias. Para PAPADIMITRIOU e colaboradores (1979) a maioria das células gigantes multinucleadas inflamatórias são formadas a partir da fusão dos macrófagos do exsudato presente nos sítios inflamatórios.

O conhecimento sobre a capacidade fa-

gocitária das células gigantes multinucleadas inflamatórias é muito importante para o melhor entendimento sobre suas funções no tecido de granulação. PAPADIMITRIOU e colaboradores (1975) observaram que raramente as células gigantes multinucleadas inflamatórias fagocitavam eritrócitos, fungos e estafilococos tratados com antisoro heterólogo. Resultados semelhantes foram obtidos por MOSKALEWSKI e PTAK (1977) estudando a fagocitose de eritrócitos pelas células gigantes multinucleadas inflamatórias e macrófagos subcutâneos de ratos.

Estas observações, juntamente com novas informações sobre essas células, demonstram que ainda há muito o que se investigar no que concerne à origem e propriedades das células gigantes multinucleadas inflamatórias, principalmente "in vivo" no tecido de granulação. Sendo assim, o presente trabalho tem as seguintes proposições:

- 1). Determinar quando e em que fase experimental inicia-se o aparecimento dos macrófagos no tecido de granulação;

- 2). Determinar quando e em que fase experimental inicia-se o aparecimento das células gigantes multinucleadas inflamatórias no tecido de granulação;

- 3). Estudar a atividade fagocitária destas células no tecido de granulação;

- 4). Correlacionar o aparecimento das células gigantes multinucleadas inflamatórias e sua atividade fagocitária, com o aparecimento e atividade dos macrófagos no tecido de granulação.

REVISÃO DA LITERATURA

## 2- REVISÃO DA LITERATURA

O processo de reparo caracteriza-se pela formação do tecido de granulação, definido correntemente como uma inflamação crônica na qual observamos neoformação vascular, proliferação fibroblástica e presença de exsudato celular com predominância de linfócitos, plasmócitos, monócitos e macrófagos, além de células epitelióides e células gigantes multinucleadas inflamatórias em algumas circunstâncias, transformando-se no "Granuloma".

### 2.1. MACRÓFAGOS

Os fagócitos mononucleares são considerados os elementos mais importantes deste exsudato celular porque são essenciais na resposta inflamatória crônica, nas inflamações granulomatosas e na cicatrização (UNANUE, 1976).

#### 2.1.1. Classificação

As tentativas de classificação das células fagocitárias mononucleares iniciaram-se no século passado. Metchnikoff, 1892 (apud RYAN & MAJNO, 1977) agrupou-as no Sistema Macrofágico. Em 1924, Aschoff (apud HAYTHORN, 1929) enquadrou os fagócitos mononucleares no Sistema Retículo-endotelial (SRE), no qual estão incluídos os macrófagos, células endoteliais e células reticulares, e logo a seguir, o Sistema Retículo-histiocitário foi proposto por Volterra em 1927 (apud ZWEIFACH e colaboradores, 1974).

Mais uma tentativa no mesmo âmbito foi realizada por VAN FURTH e COHN em 1968. Esses autores dividiram os fagócitos mononucleares em dois grupos: os monócitos do sangue periférico e os macrófagos teciduais, esses últimos no baço, fígado, linfonodos, pulmão, peritônio e no tecido conjuntivo cutâneo cujas funções estão relacionadas com o reconhecimento e destruição de bactérias, materiais estranhos não microbianos, células teciduais e sanguíneas degeneradas.

VAN FURTH e colaboradores (1979) com base na origem, cinética e nas características morfológicas e funcionais dos fagócitos propuseram uma nova classificação, criando o Sistema Fagocitário Mononuclear (SFM), constituído pelos pró-monócitos, seus precursores medulares, monócitos do sangue periférico, macrófagos teciduais e as células gigantes multinucleadas inflamatórias, além de outras células fagocitárias com propriedades similares (ADAMS, 1979).

#### 2.1.2. Origem

A maioria das investigações realizadas sobre a origem dos macrófagos sugerem que seus precursores se encontram na medula óssea e na corrente sanguínea (EBERT e FLOREY, 1939; SPECTOR, 1969; MEURET, 1976; SINGER e colaboradores, 1979).

A evolução celular dos macrófagos em granulomas de doze semanas provocadas pela injeção de bacilos da tuberculose em óleo mineral no tecido subcutâneo de ratos albinos, foi estudada por SPECTOR e LYKKE

(1966), mostrando que o infiltrado mononuclear ocorria devido à migração dos monócitos sanguíneos, seguida de proliferação mitótica das primeiras células que passaram pela parede vascular, dando origem aos histiócitos e macrófagos somente após se dividirem, assumindo assim características próprias dessas células, permanecendo esta proliferação durante a persistência do processo inflamatório, que será sustentado pela constante migração celular monocítica.

Em culturas celulares foi observado, através de estudos autoradiográficos, que os macrófagos alveolares são derivados das células intersticiais que migram para o interior do alvéolo, levando BOWDEN e ADAMSON (1972) a sugerirem o compartimento intersticial intermediário entre o monócito sanguíneo e os macrófagos alveolares.

VAN FURTH e colaboradores (1973) promovendo inflamação aguda em cavidade peritoneal de camundongo observaram que o número de macrófagos aumentaram graças à migração de monócitos sanguíneos, acompanhada por um aumento no ritmo de proliferação dos pró-monócitos. A origem monocítica dos macrófagos peritoneais também foi demonstrada anteriormente por VOLKMAN (1966), utilizando marcação celular através da timidina marcada.

A relação entre a idade dos animais utilizados e renovação celular dos fagócitos foi pesquisada por DUNN e WILLOUGHBY (1975) que implantaram lamínulas de vidro em ratos recém-nascidos e demonstraram que ocorreu um aumento no número de células mononucleares aderidas às lamínulas de vidro implantadas nos ratos mais jovens,

quando comparadas com as implantadas em ratos adultos.

GOUD e VAN FURTH (1975) estudaram as características de crescimento dos monoblastos e observaram que a proliferação dos fagócitos mononucleares da medula óssea inicia-se pela divisão de monoblastos em dois pró-monócitos, que se dividem em dois monócitos, que não mais se multiplicam.

A importância dos monócitos circulantes e seus precursores medulares foi demonstrada por LING (1979) que injetando endovenosamente carbono coloidal em ratos jovens, que eram sacrificados em intervalos de um a quatorze dias. Através de cortes ultraestruturais observou que numerosas células fagocitárias estavam presentes, todas marcadas por partículas de carbono no interior do citoplasma, com características de monócitos, macrófagos jovens ou células da micróglia, concluindo assim que eram derivadas dos monócitos circulantes. STEWART e colaboradores (1981) pesquisando a origem dos fibroblastos e macrófagos no processo de reparo, concluíram que estes últimos originaram-se a partir de precursores da medula óssea e não das células fixas no local onde ocorreu a ferida provocada. LANGE e colaboradores (1979) chegaram a conclusões semelhantes utilizando autoradiografias e anticorpos fluorescentes em processo de reparo.

GALE e MORLEY (1980) utilizando "busulfan" provocaram anemia aplástica em animais de laboratório, nos quais estudaram a formação e o número de macrófagos em diferentes tecidos. A população dos macrófagos teciduais diminuiu, o mesmo ocorrendo com o recrutamento a partir de novos monócitos, particularmente quando em respos-

ta a um determinado estímulo. Estes resultados levaram GALE e MORLEY (1980) a concluírem que esta diminuição ocorria por terem provocado lesões nos precursores medulares dos macrófagos.

A origem dos macrófagos nos exsudatos inflamatórios a partir dos monócitos sanguíneos, segundo VOLKMAN e GOWANS (1965) não é universalmente aceita. Rebuck e colaboradores, 1961, (apud VOLKMAN e GOWANS, 1965), têm afirmado que os pequenos linfócitos podem atuar como precursores dos macrófagos, baseado em estudos com células mononucleares aderidas às lamínulas de vidro utilizadas na técnica de "skin window". Entretanto a origem dos macrófagos a partir de pequenos linfócitos não afasta a possibilidade de ocorrer também a transformação de monócitos em macrófagos, divididos pelo autor em dois grupos: os linfocitogênicos e os monocitogênicos, sendo microscopicamente impossível distingui-los.

VOLKMAN e GOWANS (1965), utilizando autoradiografias pelo método de Rebuck e colaboradores (1961), relatou em seus experimentos que a grande maioria dos pequenos linfócitos do sangue podem ser excluídos como possíveis antecedentes dos macrófagos em exsudatos. Esta possível origem dos macrófagos a partir de pequenos linfócitos foi relatada pela primeira vez por MAXIMOV (1925) quando afirmou que os monócitos responderiam prontamente a um estímulo, transformando-se rapidamente em macrófagos e células epitelíóides, o mesmo ocorrendo com os linfócitos, apesar de serem mais lentos. Para VERNON-ROBERTS (1969), na inflamação peritoneal alguns macrófagos são originários de pequenos linfócitos que migram da circulação para o foco inflamatório,

onde se transformam, influenciados por fatores liberados pelos leucócitos polimorfonucleares tipo neutrófilos.

### 2.1.3. Quimiotaxia

A quimiotaxia para os macrófagos, segundo DAYRENS e colaboradores (1980) é dada por dois grupos de substâncias: as citotaxinas, que agem diretamente, e as citotaxígenas, que estimulam a produção e secreção de substâncias quimiotáticas. Entre as citotaxinas estão as bactérias, infiltrados bacterianos, fração C5 do complemento (SYNDERMAN e colaboradores, 1975) e o fator quimiotático para macrófagos, sintetizado pelos linfócitos sensibilizados. As substâncias citotaxígenas compreendem bactérias, complexos imunes, fração C3 do complemento e seus pró-ativadores.

### 2.1.4. Fagocitose

Os macrófagos, como se sabe, possuem várias funções, entre as quais a principal é a fagocitose, basicamente um processo bioquímico (ROSSI e colaboradores, 1976; SBARRA e colaboradores, 1976), STOSSEL (1976) dividiu a fagocitose em sete eventos morfológicos: reconhecimento da partícula, recepção, transmissão, adesão, indução, movimentação e fusão dos pseudópodos. A fagocitose apesar de ser propriedade atribuída principalmente aos macrófagos ocorre também em outras células, mas através de um mecanismo único. Injeções intraperitoneais de fitohemaglutinina ou soro de bezerro induzem aparentemente um aumento da capacidade fa

gocitária nos macrófagos peritoneais de ratos cuja eritrofa-  
gocitose ocorre em duas fases, uma de união e outra de inges-  
tão. Esta inibição, segundo JENNINGS e HUGHES (1969) aconte-  
ce pelo bloqueio do sistema de união entre o eritrócito e ma-  
crófago por anticorpos anticelulares. Uma explicação possí-  
vel para a ação inibidora do soro antimacrófago se baseia no  
estímulo à pinocitose (COHN e BENSON, 1965), ficando a fago-  
citose de grandes partículas, tais como os eritrócitos, impe-  
dida.

Os macrófagos possuem em  
sua superfície vários tipos de receptores com os quais as  
partículas se ligam por um mecanismo imunológico e outro não  
imunológico (Rabinovitch, 1970, apud MARIANO e colaboradores,  
1976). Em cultura tecidual foi observado que os macrófagos  
maduros são portadores de receptores específicos para certas  
classes de imunoglobulinas livres ou nos complexos Ag-Ac,  
além de receptores para o complemento (GORDON e COHN, 1973).  
RABINOVITCH e DE STEFANO (1973) observaram "in vitro" que os  
receptores para o complemento em macrófagos estimulados na  
presença e ausência de soro são mais lábeis e requerem soro  
para sua produção e manutenção, ao contrário da aparente es-  
tabilidade dos receptores para IgG. MARIANO e colaboradores  
(1976), demonstraram que 90% das células aderidas à superfí-  
cie de lamínulas de vidro implantadas no tecido subcutâneo de  
camundongos, possuem receptores para IgG e C, além de outros  
tipos de receptores inespecíficos.

Os fagócitos mononucleares  
sintetizam e secretam várias substâncias intra e extracelula-  
res (DAVIES e ALLISON, 1976). Essas substâncias foram agrupa-

das por UNANUE e colaboradores (1976) em: a) enzimas que afetam as proteínas extracelulares (colagenase, elastase, proteases lisossomais e ativador do plasminogênio); b) substâncias envolvidas em processos de defesa (complemento, lisozima, interferon e outras), e; c) fatores que regulam a atividade de algumas células, entre os quais os fatores linfo-estimuladores que aumentam a síntese de DNA nos linfócitos, influenciam a maturação dos linfócitos T e interferem na diferenciação dos linfócitos B para produzirem anticorpos.

A atividade enzimática tem sido estudada e pesquisada através de vários métodos na tentativa de correlacioná-la com funções celulares e sua participação nos processos inflamatórios. A atividade da  $\beta$  glucuronidase foi estudada por métodos histoquímicos em inflamação experimental produzida pela inoculação de óleo de croton em pele de ratos, detectando-se um aumento progressivo nas fases precoces da inflamação, paralelamente à quantidade local de glicosaminoglicans e glicoproteínas, diminuindo a partir do fim da sexta semana (FEHER e colaboradores, 1971). BAR-ELI e GALLILY (1975) isolaram macrófagos da cavidade peritoneal de camundongos, ativando-os com tioglicolato, resíduos de bacilo da tuberculose e caseinato de sódio, demonstrando um aumento do nível celular de fosfatase ácida,  $\beta$  glucuronidase, catepsina e lisozima, em relação às células não ativadas. PAPADIMITRIOU e WYCHE (1976) mostraram que os macrófagos subcutâneos possuem maior concentração de desidrogenase, fosfatase ácida, hidrolases, RNAase II, lecitina e ácidos graxos livres, do que os macrófagos peritoneais.

Para DEAN (1977) e SCHNYDER e BAGGIOLINI (1978) as enzimas sintetizadas e secretadas pe-

los macrófagos estão envolvidas na destruição de proteínas e elementos celulares e extracelulares nos tecidos onde ocorre inflamação crônica. Atividade "in vitro" de três enzimas lisossomais em macrófagos peritoneais após a endocitose de endotoxina de E. coli (pinocitose) ou de partículas de látex (fagocitose), foi observada por MØRLAND (1979), demonstrando que a resposta das três enzimas lisossomais é diferente para cada agente indutor, indicando a existência de mecanismos separados de atividades enzimáticas. No entanto SCHNYDER e BAGGIOLINI (1979) afirmaram que os macrófagos estimulados e não estimulados são capazes de sintetizar as hidrolases lisossomais independentemente dos estímulos exteriores.

O mecanismo de indução da secreção de enzimas lisossomais nos macrófagos estava estabelecido que ocorria durante o estágio intracelular da fagocitose de materiais estranhos. DEAN e colaboradores (1979) conseguiram demonstrar que os macrófagos normais secretam enzimas em respostas a certos agentes que atuam somente a nível de membrana citoplasmática. A ativação e transformação de monócitos em macrófagos geralmente é acompanhada por acúmulo de grânulos densos positivos neutros com aumento considerável de fosfatase ácida, acentuadamente, catepsina,  $\beta$  glucuronidase, do número de mitocôndrias, de gotículas de lipídeos e de lisossomas. DONNA e colaboradores (1980) observaram que a atividade enzimática da fosfatase ácida e alcalina em macrófagos de larvas de Tenebrio molitor aumentaram acentuadamente quando estimulados por vários tipos de asbestos.

#### 2.1.5. Resposta imune, ativação e proliferação

A observação de que partículas com alto peso molecular ingeridas pelos macrófagos persistem no seu interior por longo tempo, levou ALLISON (1966) a sugerir que os macrófagos têm uma relevante função na resposta imune. CHEERS e WALLER (1975) afirmaram que a elevada atividade antibacteriana dos macrófagos hospedeiros intracelulares de bactérias é uma resposta dos mesmos às linfocinas liberadas pelos linfócitos T, sendo evidente 24 horas após a infecção, concluindo que a ativação dos macrófagos ocorre antes da infecção. Seguindo a mesma linha de pensamento, POULTER (1976) observou que o contato de culturas de macrófagos com linfocinas causava um rápido aumento do nível de oxidação da glicose, atuando assim como um fator de ativação dos macrófagos.

IZUMI e colaboradores (1975) injetaram ovoalbumina com adjuvante de Freund's em ratos imunizados, e através de autoradiografias, observaram um aumento no número de macrófagos sintetizando DNA, além de uma elevação no número de macrófagos peritoneais, o mesmo ocorrendo com os linfócitos periféricos, sendo o efeito imunológico específico. Nos ratos normais e imunizados a injeção de ovoalbumina era geralmente seguida por uma monocitose sanguínea.

A ativação dos macrófagos geralmente é seguida pela ativação das células T, como resultado da interação de produtos bacterianos e químicos com os macrófagos (UNANUE, 1976). Os fagócitos mononucleares representam células chaves na imunidade, devido à inter-relação entre os macrófagos e os linfócitos, principalmente os timo-dependentes, ressaltando porém que a indução imune para a ativação dos macrófagos, bem como a interação antígeno-macró-

fago, apesar de importante não é essencial, pois a mesma ocorre nos vários estágios da resposta imune. LIPSKY e ROSENTHAL (1975) estudaram a interação de linfócitos sensibilizados, antígenos processados e macrófagos, concluindo que a mesma representa uma correlação morfológica da ativação dos linfócitos.

A microscopia eletrônica e estudos autoradiográficos com uridina marcada, demonstraram radioatividade em linfócitos de baço de ratos, após a cultura por uma hora com macrófagos autólogos lavados intensamente. Esta radioatividade dos linfócitos em contato com macrófagos não estimulados era pequena, mas aumentava marcadamente após contato com macrófagos estimulados por antígeno. Diante desses resultados JONAS e colaboradores (1976) afirmaram que supostamente ocorre transferência de moléculas de RNA dos macrófagos para os linfócitos.

A proliferação dos macrófagos e sua ativação, bem como a estimulação linfocitária na cavidade peritoneal de camundongos, foi investigada durante a infecção com Toxoplasma gondii. A proliferação dos macrófagos teve seu início ao redor do primeiro dia, atingindo seu pico máximo ao redor do segundo dia, sendo acompanhada por qualquer estimulação linfocitária. De três-quatro dias a sete-onze dias uma considerável transformação blastóide ocorria nos linfócitos e simultaneamente uma substancial proliferação de macrófagos ocorria, com grande número de macrófagos ativados, além de alguns mostrarem síntese de DNA. Estes resultados levaram REIKVAN (1976, 1976) a sugerir que a proliferação precoce e tardia dos macrófagos são estimulados por diferentes mecanismos.

A indução para a proliferação de macrófagos depende, em parte de fatores mitogênicos solúveis produzidos no granuloma (SPECTOR e WYNNE, 1976), lembrando ainda que os macrófagos têm importante função secretora (CARR e WRIGHT, 1979).

A cultura de macrófagos peritoneais de ratos "in vitro" pode ser induzida à proliferação quando o meio de cultura for condicionado por outras células que liberam o Fator de Crescimento dos Macrófagos, uma substância considerada altamente específica liberada por células da linhagem fibroblástica (MAUEL e DEFENDI, 1971). WYNNE e colaboradores (1975) observaram que quando adicionavam exsudatos em culturas de macrófagos peritoneais de ratos, a proliferação celular, que estava paralizada anteriormente na fase G<sub>0</sub>, reiniciava, relacionando esta observação com a caracterização preliminar de um Fator Mitogênico Local presente no exsudato inflamatório.

STANLEY e colaboradores (1976) investigando os fatores que regulam a produção e diferenciação dos macrófagos, identificaram dois fatores muito importantes: o Fator Estimulador de Colônia, cujo efeito sobre os precursores da medula óssea estimula a proliferação e diferenciação em macrófagos; e o Fator de Crescimento dos Macrófagos que estimula a proliferação dos macrófagos no campo inflamatório, essencial no desenvolvimento dos granulomas e na defesa do hospedeiro em relação à disseminação de microorganismos.

Investigações sobre a síntese de DNA em macrófagos peritoneais estimulados pela presença de exsudato inflamatório agudo não mielógeno pleural

provocado por quatro diferentes irritantes, coletados após quatro horas, levou GIROUD e colaboradores (1977) a postularem que um Fator Mitogênico Inflamatório pode ser o responsável por este fenômeno, correlacionando-o com a concentração protéica nos exsudatos e com a atividade mitogênica observada. UNANUE e KIELY (1977), por sua vez, identificaram um Fator Mitogênico liberado pelos fagócitos mononucleares que estimulava a síntese de DNA nos tímócitos.

Através da inoculação de produtos de degradação tecidual promovida pelos macrófagos peritoneais de camundongos, PRIVALOVA e colaboradores (1976) observaram uma estimulação na granulocitopoiese, sugerindo uma possível importância do tecido destruído no autocontrole da resposta fagocitária. Para STANLEY e colaboradores (1976) os precursores medulares dos macrófagos são estimulados pelo Fator Estimulador de Colônia identificado por BUHLES (1979) cultivando células da medula óssea de ratos em meio de cultura líquido com Fator Hematocitopoiético Estimulador de Colônia, relatando a formação de macrófagos trinta horas após o início do experimento.

#### 2.1.6. Capacidade Mitótica

A capacidade dos macrófagos entrarem em mitose tem sido muito pesquisada. Através da implantação de lamínula de vidro no tecido subcutâneo de ratos, RYAN e SPECTOR (1970) observaram que os macrófagos inflamatórios entram no ciclo mitótico nas três categorias em que se apresentam: como células recentemente chegadas da circulação no campo inflamatório, como células de um "pool" de

alta renovação ou ainda como células de população largamente independente do recrutamento da medula óssea. VAN FURTH e colaboradores (1979) utilizando a técnica de "skin-window" obteve macrófagos subcutâneos que foram estudados "in vitro" através da incorporação de timidina marcada, concluindo que os macrófagos cutâneos não se dividem, ao contrário dos macrófagos de outras regiões.

#### 2.1.7. Produção de colágeno

STEWART e colaboradores (1981) considera difícil a distinção morfológica entre macrófagos e fibroblastos no processo de reparo através da microscopia óptica comum, sendo necessário para isso estudos ultraestruturais (ROSS, 1968). O exame citológico, dependendo da metodologia, mostra diferenças entre os dois tipos celulares, tais como a disparidade de seus tamanhos e as características de coloração, diferenças estas correlacionadas com as propriedades funcionais dessas células (STEWART e colaboradores (1982). Alguns investigadores têm aludido à potencialidade fagocitária dos fibroblastos, entre os quais KLINTWORTH (1969) que investigou a propriedade fagocitária dos fibroblastos em córneas de coelhos "in vivo" e "in vitro", que mostraram pronunciada capacidade de ingerir partículas de substâncias estranhas. Neste trabalho, o autor parte da premissa de que a fagocitose de partículas estranhas não é função específica desta linhagem celular, mas representa uma propriedade latente e clara dos fibroblastos.

Os macrófagos nos granulomas em desenvolvimento estão relacionados com a formação de

colágeno, pois KULONEN e POTILA (1980) observaram que a preparação dos macrófagos não tratados estimulava a incorporação de glicosamina aos mucopolissacarídeos, principalmente ao ácido hialurônico, além de promover a síntese de DNA e potencializar e aumentar diretamente a formação de prostaglandina e nucleotídeos cíclicos, induzindo à proliferação vascular.

Sabemos que a secreção enzimática pelos macrófagos tem várias funções e implicações no tecido de granulação, principalmente quando relacionada com o colágeno. Para DEPORTER (1979), existe pelo menos dois tipos de inibidores séricos para a colagenase:  $\alpha_2$  macroglobulina principalmente, e a  $\beta_1$  anticolagenase, ambas circulantes e com níveis locais em expectativas, sabendo-se que a  $\alpha_2$  macroglobulina tem sido mostrada em níveis elevados na inflamação crônica. Estas substâncias inibem a ação da colagenase no tecido de granulação, que se caracteriza pela intensa e progressiva produção de colágeno.

## 2.2. CÉLULAS EPITELIÓIDES

Na inflamação crônica granulomatosa, dependendo do agente causador e das condições locais e sistêmicas do hospedeiro, podemos ter a presença de células epitelióides e células gigantes multinucleadas inflamatórias. Os primeiros a estudarem a origem dos precursores das células epitelióides e células gigantes multinucleadas inflamatórias foram LAMBERT (1912) e Lewis, 1925-1927 (apud PAPADIMITRIOU & WYCHE, 1976), a partir dos quais várias investigações têm sido relatadas.

MAXIMOV (1925), estudando culturas de vários tecidos e de leucócitos sanguíneos com bacilo da tuberculose, concluiu que as células epitelióides e gigantes multinucleadas inflamatórias podem ter dupla origem. A primeira, a partir dos elementos fixos teciduais, tais como as células de Kupffer, células "endoteliais" do baço e outras; a segunda, a partir de elementos sanguíneos não granulados que migram para o local, especialmente os monócitos e linfócitos, sendo estes últimos mais lentos no processo de transformação.

A produção de granulomas em ratos pela indução de bacilos da tuberculose mortos, permitiram que DUMONT e SHELDON (1965) observassem a origem dos macrófagos e células epitelióides. Após três dias, a reação inflamatória possuía inúmeros PMN neutrófilos além de macrófagos com citoplasma denso e vacuolar ao seu redor, mas seis dias depois os macrófagos eram mais numerosos apresentando inúmeros bacilos da tuberculose no interior de seu citoplasma claro e vacuolar. Na periferia da reação inflamatória as células apresentam citoplasma pálido, abundante, acidófilo e ligeiramente granular, típico de células epitelióides, sendo estas células mais abundantes, predominando no granuloma. No 20º dia as células epitelióides eram mais numerosas ainda, e as células gigantes multinucleadas inflamatórias apareciam raramente. COHN e BENSON (1965) em culturas de monócitos relataram que após onze dias muitas alterações morfológicas ocorreram e as células epitelióides iniciavam a formação de grandes sincícios por fusão celular.

ELIAS e EPSTEIN (1968) produziram granulomas através da inoculação de sais de zircônio e berí-

lio em seres humanos sensíveis e não sensíveis. Nos indivíduos não sensíveis, observaram reação caracterizada pela presença de macrófagos que ingeriam grandes quantidades do metal indutor, acompanhados por uma inflamação crônica fibrótica; nos indivíduos sensíveis ocorreu a formação de granuloma epitelióide organizado, cujas células derivaram a partir de elementos celulares que apareciam perivascularmente dentro de duas semanas, quando o tubérculo estava organizado. Neste trabalho, os autores relataram ainda que as células epitelióides sintetizavam ativamente, mas sua atividade fagocitária era raramente observada, desenvolvendo gradativamente extensas e complexas interdigitações intercelulares.

O estudo em granulomas, realizado por PAPADIMITRIOU e SPECTOR (1971), levou-os a concluir que as células epitelióides nos granulomas derivam do influxo de macrófagos excedentes quanto ao número requerido para a ingestão de material não digerível, ou quando o irritante é digerível e não muito tóxico, mas suficiente para que os macrófagos sejam constantemente renovados. Foi relatado também que antes de assumirem características de células epitelióides, os macrófagos sofrem divisão celular.

Jonas-Willians e colaboradores, 1971, 1972 (apud BLACK & EPSTEIN, 1974) propuseram dois tipos de células epitelióides existentes nos granulomas tuberculosos. O tipo A ou células epitelióides secretoras contêm abundante retículo endoplasmático com superfície irregular, distinguindo-se do tipo B ou células epitelióides vesiculares, caracterizadas por numerosas vesículas no seu citoplasma que possui complexos de Golgi proeminentes. As células epitelióides tipo A ou secretoras aparecem com mais frequência

em tubérculos organizados, como os provocados por sais de zircônio e berílio e em áreas com necrose tecidual; já as células epitélióides tipo B ou vesiculares são vistas em tubérculos ou granulomas bem organizados e compactos. (BLACK e EPSTEIN, 1974).

### 2.3. CÉLULAS GIGANTES MULTINUCLEADAS INFLAMATÓRIAS

Entre as células presentes no exsudato da inflamação crônica granulomatosa, podemos ter a presença das células gigantes multinucleadas inflamatórias, incluídas no Sistema Fagocitário Mononuclear (SFM) por VAN FURTH e colaboradores (1972). As células gigantes multinucleadas inflamatórias são largamente distribuídas nos tecidos em processos fisiológicos e patológicos, nos quais têm importantes funções. HAYTHORN (1929) dividiu as células gigantes multinucleadas inflamatórias em dois grupos. No primeiro grupo, incluiu as células teciduais multinucleadas caracterizadas por divisões nucleares atípicas e associadas a processos proliferativos. No segundo grupo, incluiu as células gigantes multinucleadas inflamatórias que apresentam maior variação no tamanho e forma, geralmente associadas a processo inflamatórios e a inoculação de substâncias insolúveis e corpos estranhos, com raras figuras de mitose.

Langhans, 1868, em seu artigo original (apud HAYTHORN, 1929) afirmou que as células gigantes multinucleadas inflamatórias podem ocorrer por divisão nuclear ou por fusão celular formando uma única célula.

### 2.3.1. Morfologia

Normalmente na literatura encontramos dois tipos principais e mais conhecidos de células gigantes: as células gigantes multinucleadas inflamatórias tipo corpo estranho e as células gigantes multinucleadas inflamatórias de Langhans. Entretanto tem sido considerado que as células gigantes multinucleadas inflamatórias de Langhans, características da tuberculose, são apenas um tipo de célula gigante multinucleada inflamatória de corpo estranho (MAXIMOV, 1925; HAYTHORN, 1929), não podendo ser diferenciadas das células gigantes multinucleadas inflamatórias de outros granulomas exceto pela demonstração do bacilo no seu interior.

Para CAIN e KRAUS (1980) as células gigantes multinucleadas inflamatórias, costumeiramente denominadas células gigantes multinucleadas tipo corpo estranho, são caracterizadas por agregados de muitas células individuais, faltando organização interna, com seus núcleos distribuídos ao acaso por todo citoplasma, pertencendo a territórios individuais das antigas células que se uniram umas às outras, com centríolos localizados no interior de cada núcleo. Nas células gigantes multinucleadas inflamatórias organizadas, tradicionalmente descritas como tipo Langhans, as estruturas individuais não são reconhecidas, pois sua arquitetura interna é funcionalmente estruturada e altamente organizada, possuindo uma citosfera, larga e distante do núcleo, com múltiplos centríolos, além de abundantes microtúbulos e microfilamentos citoplasmáticos.

### 2.3.2. Origem e formação

A multiplicidade de relatos sobre a origem das células gigantes multinucleadas tipo corpo estranho indica que a questão está relacionada à natureza de sua formação. LAMBERT (1912) estudou as células gigantes multinucleadas inflamatórias em cultura de tecido, observando sua formação pela fusão das células mononucleares grandes e migrantes, provavelmente células endoteliais e células carnosas ou pulpares, afirmando que as células do tecido conjuntivo não participam de sua formação. ROIZMAN (1962) afirmou que a policariocitose induzida por diferentes agentes é similar quanto ao desenvolvimento e características estruturais, representando a mesma, um estágio irreversível de fusão celular. SILVERMAN e SHORTER (1963) sugeriram que as células gigantes multinucleadas tipo corpo estranho formadas na presença de esporos de Lycopodium eram inicialmente resultantes da fusão de histiócitos, apesar da possibilidade de ocorrer divisão amitótica, mas considera isto improvável. Injetando timidina triciada, observou que as células gigantes multinucleadas inflamatórias inicialmente não apresentavam marcação nuclear, o que ocorria somente depois de várias horas e vários dias.

SUTTON e WEISS (1966) pesquisando "in vitro" a transformação sequencial de monócitos, células epitelioídes e células gigantes multinucleadas inflamatórias através da microscopia eletrônica, observaram que no citoplasma dos monócitos há um aumento no número e tamanho dos lisossomas antes da fagocitose, durante a qual ocor-

re depleção dos mesmos, presentes em grande número e em várias formas nas células epitelióides e células gigantes multinucleadas inflamatórias jovens, nas quais gradativamente tornam pequenos e homogêneos, desaparecendo quase completamente nas células gigantes multinucleadas inflamatórias velhas. No mesmo trabalho, SUTTON e WEISS relatam que as células epitelióides contíguas exibiam interdigitações citoplasmáticas, onde as membranas citoplasmáticas se rompem; e as células epitelióides fundem-se para formarem uma célula gigante multinucleada inflamatória.

A implantação subcutânea de lamínulas de vidro em animais previamente injetados com timidina triciada, demonstrou que as células gigantes multinucleadas inflamatórias originam de macrófagos presentes no campo inflamatório (RYAN e SPECTOR) 1970; MARIANO e SPECTOR 1974. CAIN e KRAUS (1980) produziram granulomas em animais e os analisaram microscopicamente através de ultraestrutura e imunofluorescência, concluindo que o principal mecanismo de formação das células gigantes multinucleadas inflamatórias é a fusão das células mononucleares.

O estudo "in vivo" sobre a origem das células gigantes multinucleadas inflamatórias a partir de monócitos circulantes foi realizado por GILLMAN e WRIGHT (1966) em dois grupos experimentais diferentes, mas complementares. No primeiro grupo de animais foi injetada timidina triciada endovenosamente 18 horas ou 18 e 5 horas antes da inoculação subcutânea e/ ou intraperitoneal de esponjas de polivinil ou filtros de Millipore, e no segundo grupo foi injetada timidina triciada duas horas depois da inocula-

ção. Células gigantes multinucleadas inflamatórias contendo de cinco a dez núcleos foram comumente encontradas no terceiro dia de implantação da esponja ou filtro com grande número de núcleos marcados. Nos animais em que a timidina foi injetada após a implantação, não havia marcação nuclear.

A histogênese das células gigantes multinucleadas inflamatórias foi estudada por KAMINSKI e TOTO (1967) utilizando vinte camundongos que receberam injeções subcutâneas de esporos de Lycopodium clavus e injeções de timidina triciada em intervalos variados. Os animais eram sacrificados em intervalos de quatro horas a quinze dias e a região de inoculação retirada e estudada em séries histológicas através da autoradiografia e histoquímica. Os resultados obtidos constataram a proliferação perivascular de células mesenquimais localizadas no tecido conjuntivo que circundava os depósitos de esporos, células estas que em parte, marcadas pela timidina triciada, migravam para o local do depósito de esporos e se diferenciavam em histiócitos, que fusionavam para formarem células gigantes multinucleadas inflamatórias após três dias. KAMINSKI e TOTO (1967) puderam observar nas autoradiografias que as células gigantes multinucleadas inflamatórias não sintetizavam DNA, observando que estas células não se dividiam mitótica ou amitoticamente. Entretanto RYAN e SPECTOR (1970), implantando lamínulas de vidro em tecido subcutâneo de animais, puderam observar nas células gigantes multinucleadas inflamatórias, síntese de DNA após quatorze dias de experimento, mas estas não entravam em mitose. Os macrófagos, por sua vez, apresentavam síntese de DNA a partir do quarto ao sexto dia após a implantação da lamí

nula.

A formação de células gigantes multinucleadas inflamatórias por fusão de células contíguas foi observada por COMOGLIO e colaboradores (1971) em culturas de células de baço e embriões de galinhas, usando a microscopia eletrônica e histoquímica. As células que fusio-  
navam para formarem células gigantes multinucleadas inflama-  
tórias eram macrófagos e células reticulares indiferenciadas, em cujas superfícies da membrana celular foram observadas in-  
terdigitações com envolvimento do sistema lisossomal concomi-  
taneamente. PAPANICOLAOU e colaboradores (1973) usaram mi-  
croscopia eletrônica de varredura para estudar a superfície das células gigantes multinucleadas inflamatórias que apare-  
ciam na superfície das lamínulas implantadas no tecido subcu-  
tâneo de camundongos. Estas células apresentavam área cen-  
tral elevada e citoplasma caracterizado pela presença de pseudópodos na sua superfície além de elevações e depres-  
sões na mesma.

PAPANICOLAOU e colabora-  
dores (1973) implantaram tiras de Mellenex no tecido subcutâ-  
neo de ratos e observaram que após quatro semanas, as células gigantes multinucleadas inflamatórias representavam 25% das células aderidas. O conteúdo nuclear na segunda semana era grande, porém diminuía rapidamente nas semanas seguintes, mas o potencial de fusão permanecia inalterado durante o ex-  
perimento. O processo de fusão foi relatado como parcialmen-  
te dependente da transcrição do DNA, pois o tratamento com actinomicina D promoveu uma redução no índice de fusão e no número de núcleos nas células gigantes multinucleadas infla-

matórias. Outro fator que influenciou no potencial de fusão das células gigantes multinucleadas inflamatórias foi a fagocitose ativa, observada pela indução experimental pela carragenina.

A produção de granulomas organizados de células epitelióides por injeção intradérmica de suspensão diluída de sais de berílio e zircônio foi realizada por BLACK e EPSTEIN (1974), analisando-os em intervalos de cinco dias a treze meses, através da microscopia ótica e eletrônica. As células gigantes multinucleadas inflamatórias ocorriam comumente em tubérculos organizados com áreas de necrose, apresentando características citoplasmáticas diferentes das típicas células epitelióides secretoras, principalmente nos tubérculos edematosos rompidos, nos quais as células epitelióides apresentavam componentes citoplasmáticos mais parecidos com as células gigantes multinucleadas inflamatórias. Evidências de fusão não eram observadas, mas a fusão de membranas foram vistas entre células que possuíam características citoplasmáticas semelhantes. A marcação celular com timidina triciada permitiu observar que a divisão nuclear nas células gigantes multinucleadas inflamatórias não ocorria. Finalmente BLACK e EPSTEIN (1974) concluíram que as células epitelióides contendo vesículas e desenvolvidas em áreas injuriadas e necróticas eram as responsáveis pela formação das células gigantes multinucleadas inflamatórias, através do mecanismo de fusão celular.

Para MARIANO e SPECTOR

(1974) a fusão dos macrófagos é muito importante na formação das células gigantes multinucleadas inflamatórias, pois quan

do macrófagos são colocados em câmaras de difusão não ocorre sua formação, apesar de mostrarem grande atividade de divisão nuclear. Entretanto, quando estas câmaras são perfuradas, permitindo a entrada de células frescas, as células gigantes multinucleadas inflamatórias são formadas normalmente. A marcação com timidina triciada confirma a necessidade da chegada de macrófagos recém-chegados da circulação para que ocorra a fusão com macrófagos "velhos" formando células gigantes multinucleadas inflamatórias, além de observarem que o cariótipo destas células apresentam alta proporção de anormalidades cromossômicas. MARIANO e SPECTOR (1974) no mesmo experimento, observaram uma notável tendência dos macrófagos que entram em divisão celular, serem incorporados às células gigantes multinucleadas inflamatórias, nas quais ocorrem divisões nucleares sincronizadas ou não, sendo a maioria das mitoses resultantes de células mononucleares poliplóides. A proliferação dos macrófagos provavelmente é que controla e restringe o número de divisões celulares possíveis. Por seu turno isto depende também do rápido aparecimento de efeitos grosseiros nos cromossomos dos macrófagos que mesmo assim não são eliminados, mas sim incorporados nas células gigantes multinucleadas inflamatórias.

Estudos citoquímicos comparativos para peroxidase entre macrófagos residentes, macrófagos do exsudato e células gigantes multinucleadas inflamatórias mostraram que somente pequenos sincícios com dois a três núcleos apresentavam características semelhantes a macrófagos residentes, pois a grande maioria das células gigantes multinucleadas inflamatórias dos granulomas estudados a-

presentavam características similares aos macrófagos do exsudato, concluindo que a fusão destes últimos é responsável pela formação da maioria das células gigantes multinucleadas inflamatórias em sítios inflamatórios (PAPADIMITRIOU, 1979). Neste mesmo trabalho o autor pode observar que sincícios podem apresentar características de macrófagos residentes ou de macrófagos de exsudato, nunca de ambos ao mesmo tempo.

Investigações sobre a ação do soro antimacrófago mostraram que a fusão é precedida por um estágio de forte aderência com pronunciada duplicação da membrana nuclear, excluindo totalmente a probabilidade de células gigantes multinucleadas inflamatórias serem resultantes de divisões nucleares, pois macrófagos tratados com soro anticelular que entravam em mitose representavam 0,2% do total (PTAK e colaboradores, 1970). Este estágio de citoaderência, antes da formação das células gigantes multinucleadas inflamatórias, provavelmente ocorre por um acúmulo de mucopolissacarídeos ácidos na superfície de contato entre as células, o que facilita a fusão celular, estando envolvidos neste processo os cátions bivalentes da membrana celular (PTAK e CICHOCKI, 1972). Adicionando soro imune em meio de cultura para macrófagos GALINDO (1972) observou a ocorrência de uma potencialização na formação das células gigantes multinucleadas inflamatórias o mesmo ocorrendo quando adicionava líquido sobrenadante de macrófagos alveolares sensibilizados incubados no meio de cultura com macrófagos pois havia indução à formação de células gigantes multinucleadas inflamatórias. Estes resultados levaram-no a sugerir que a fusão dos macrófagos alveolares é mediada por um mecanismo imunológico.

A endocitose simultânea de partículas ou colóides, tem sido considerada (CHAMBERS, 1976) como um dos mecanismos de formação das células gigantes multinucleadas inflamatórias em granulomas, nos quais grupos fechados de macrófagos se unem e interiorizam partículas ou substâncias desnaturadas produzidas na inflamação crônica. Chambers (apud CHAMBERS, 1977), demonstrou que a união dos macrófagos ao material endocitogênico "in vitro" procedia a fusão, o mesmo ocorrendo nas observações de CHAMBERS (1977) "in vivo", concluindo que a fusão por endocitose simultânea está associada à interiorização da superfície da membrana dentro da mesma, o que viria acompanhada por uma perda de receptores de superfície, nos quais as partículas endocitogênicas aderiram, mas preservando os receptores de outras substâncias endocitogênicas.

BENNETT e MONTES (1973) sugeriram que o timo produz precursores para células epitelioides e células gigantes multinucleadas inflamatórias, no entanto PAPADIMITRIOU (1976) inoculando lamínulas de vidro em camundongos com e sem timo observou que as células gigantes multinucleadas inflamatórias não são derivadas deste órgão, considerando a fusão dos macrófagos timo-independente, apesar da influência do timo sobre o número de fagócitos mononucleares nos exsudatos.

Além da fusão celular, divisão mitótica ou amitótica e endocitose simultânea como mecanismos de formação das células gigantes multinucleadas inflamatórias, tem sido observado que as mesmas podem ser induzidas por vírus, como sugeriu POSTE (1970) e UEBA e colabora

dores (1976). Inoculando vírus no tecido linfóide de macacos, TAJIMA e KUDOW (1976) observaram que após sete a onze dias havia formação de células gigantes multinucleadas inflamatórias tipo WARTHIN-FINKELDEY no centro germinativo de folículos linfáticos, com células linfóides e reticulares identificadas no seu interior, além de divisão nuclear aberrante, res salvando porém que a fusão celular foi apenas postulada, mas não observada.

### 2.3.3. Atividade celular

A reorganização dos macrófagos recentemente fusionados à célula gigante multinucleada inflamatória permite a formação de características requeridas para a preservação e funcionamento do sincício. Estas células gigantes multinucleadas inflamatórias cumprem funções altamente especializadas que dependem da natureza do agente indutor e da duração de sua atividade, sendo de grande importância nesta adaptação os centríolos, microtúbulos e microfilamentos. Tudo isso, segundo CAIN e KRAUS (1980), sugere que no curso da reorganização estrutural existe respostas informacionais entre as células interdigitadas.

PAPADIMITRIOU e ARCHER

(1974) implantando filmes de plásticos no tecido subcutâneo de camundongos, pode observar pela cinemicrografia que as células gigantes multinucleadas inflamatórias apresentavam prolongamentos citoplasmáticos móveis que distendem e retraem explorando o substrato ao seu redor, aproximando estruturas. A histoquímica para enzimas realizada por PAPADIMITRIOU e WYCHE (1974) mostrou que as células gigantes multinucleadas in

flamatórias são metabolicamente muito ativas, estando implicados fenômenos sintéticos e degradativos. Os resultados obtidos indicam a existência de uma similaridade entre as células gigantes multinucleadas inflamatórias e os macrófagos, sendo várias atividades enzimáticas mais proeminentes nas células gigantes multinucleadas inflamatórias do que nos monócitos, macrófagos, e células epitelióides. Para PAPADIMITRIOU e WEE (1976), os macrófagos peritoneais e as células gigantes multinucleadas inflamatórias têm proporcionalmente a mesma capacidade de liberarem fosfatase ácida e  $\beta$  glucuronidase, sendo a proximadamente o mesmo mecanismo de secreção, além de considerarem este fenômeno de exocitose muito importante, pois pode auxiliar na destruição de materiais não fagocitados.

O potencial de fagocitose das células gigantes multinucleadas inflamatórias coletadas em tecido subcutâneo de ratos após inoculação de lamínulas de plástico, foi observado por PAPADIMITRIOU e colaboradores (1975). Em suas observações as células gigantes multinucleadas inflamatórias contendo mais de sete núcleos raramente fagocitavam fungos, estafilococos e eritrócitos tratados com anti-soro heterólogo. Muitos dos eritrócitos uniam-se às células gigantes multinucleadas inflamatórias que aumentavam de tamanho, mas dividindo-se o número de uniões pelo número de núcleos da célula gigante multinucleada inflamatória, observou-se que havia na realidade uma progressiva redução relativa do conteúdo nuclear aumentado, sugerindo que isto ocorria pela perda de receptores de superfície durante a fusão celular. MOSKALEWSKI e PTAK (1977) demonstraram que o máximo de eritrócitos fagocitados pelas células gigantes multinucleadas inflamatórias excedia aos encontrados nos macrófagos

subcutâneos, mas em relação ao número de núcleos, as células gigantes multinucleadas inflamatórias eram menos efetivas na fagocitose.

MARIANO e colaboradores

(1976) baseados em estudos estruturais demonstraram que 90% das células aderidas à superfície das lamínulas de vidro, implantadas no tecido subcutâneo de camundongos, possuem receptores para Ig G, C e do tipo inespecífico. Em 50% dessas células, consideradas macrófagos que sofreram transformação epitelioide e células gigantes multinucleadas inflamatórias após vinte e um dias, houve perda de seus receptores para Ig G, total ou parcialmente, afirmando que a perda desses receptores em granulomas pode proteger as bactérias com desvantagens para o hospedeiro.

MATERIAL E MÉTODOS

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. SELEÇÃO DOS ANIMAIS

No presente trabalho foram utilizados trinta ratos (*Rattus norvegicus*, Albinus, Wistar), adultos, com 120 dias de idade, machos, pesando entre cento e oitenta a duzentos e cinquenta gramas. Os ratos foram escolhidos no momento do nascimento e, após desmamados, foram alimentados com ração balanceada padrão água "ad libitum". Atingida a idade desejada, os ratos foram separados em dois grupos experimentais: grupo I ou grupo controle e, grupo II ou grupo experimental, os quais foram submetidos aos procedimentos de implantação das esponjas.

#### 3.2. PREPARO DAS ESPONJAS DE POLICLORO-VINIL (PVC)

As esponjas de PVC foram obtidas através das perfurações com fura-rôlhas em lâminas de esponjas de PVC sobre uma placa de cortiça. Após as perfurações, obtivemos fragmentos circulares de esponjas de PVC padronizados, medindo em média 0,8 x 0,8 x 0,8 cm, que foram esterilizadas em autoclave, e em seguida implantadas em doze ratos do grupo I ou controle.

Os fragmentos de esponja de PVC implantadas nos ratos do grupo II ou experimental, foram obtidos da mesma forma, mas uma vez esterilizadas, foram submergidas em tinta nanquim "Pelikan" durante trinta minutos, tempo suficiente para a impregnação de partículas de carvão em todo o fragmento. Após este procedimento, as esponjas impregnadas com tinta nan-

quim foram secas em estufa a 55°C.

O grupo I ou controle foi necessário para podermos comparar a reação tecidual frente à presença das partículas de carvão inoculadas juntamente com a esponja de PVC

### 3.3. PREPARAÇÃO DA TINTA NANQUIM "PELIKAN".

A tinta nanquim "Pelikan" obtida comercialmente, possui partículas de carvão, por nós consideradas muito grandes, além de muitas outras menores. Para obtermos uma tinta nanquim mais homogênea, centrifugamos a mesma durante trinta minutos a 6.000 r.p.m., após o que aproveitamos somente a parte líquida, desprezando o resíduo negro depositado no fundo do tubo da centrífuga.

### 3.4. IMPLANTAÇÃO DAS ESPONJAS

Após anestesia com éter sulfúrico, depilou-se a região dorsal mediana traseira dos animais, e praticou-se um incisão de aproximadamente, 1,5 cm, com bisturi de Bader-Parker e lâmina número 15, paralelamente ao longo eixo da coluna vertebral. Com auxílio de uma tesoura de ponta romba, procedeu-se à divulsão do tecido para facilitar a introdução da esponja. A esponja foi introduzida com uma pinça apropriada tão longe quanto possível da incisão (2 a 3 cm), a fim de evitar que o processo de cicatrização da incisão atingisse o tecido de granulação em desenvolvimento, interferindo no processo. Uma vez implantada a esponja, a incisão foi suturada com dois pontos separados. Todos estes procedimentos foram conduzidos sob rigorosas condições de assepsia (VIZIOLI, 1972).

### 3.5. SACRIFÍCIO DOS ANIMAIS

Todos os animais foram sacrificados por excesso de inalação de éter sulfúrico, no mesmo recipiente utilizado para a anestesia, aos 3, 6, 10, 13, 17, 21, 24, 28, 31, 35, 38, e 45 dias após a implantação da esponja.

### 3.6. COLORAÇÃO COM HEMATOXILINA E EOSINA

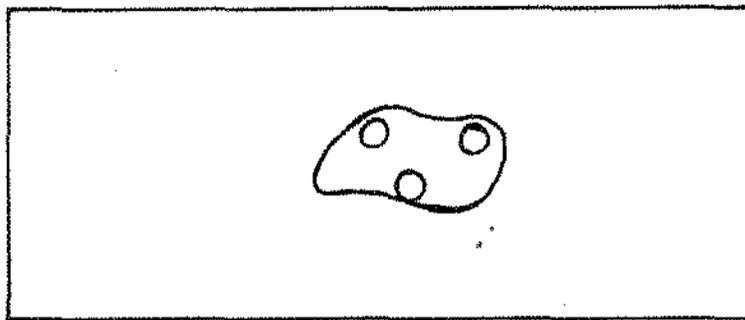
No grupo I e II, depois da remoção do tecido de granulação desenvolvido em cada animal, o mesmo foi lavado com soro fisiológico, fixado em formol neutro a 10% durante vinte e quatro horas, à temperatura ambiente. Após a fixação, os tecidos foram incluídos segundo a técnica de rotina, e corados com hematoxilina e eosina para identificação dos macrófagos e células gigantes multinucleadas inflamatórias e avaliação da atividade fagocitária celular no tecido de granulação.

### 3.7. MÉTODOS DE CONTAGEM CELULAR

#### 3.7.1. Métodos de contagem em campos microscópicos isolados

A contagem dos macrófagos e células gigantes multinucleadas inflamatórias por este método foi realizada em três lâminas de cada dia de retirada do tecido de granulação induzido pela implantação da esponja de PVC. Em todas lâminas a contagem realizou-se em três campos diferentes escolhidos aleatoriamente sobre a superfície do corte his-

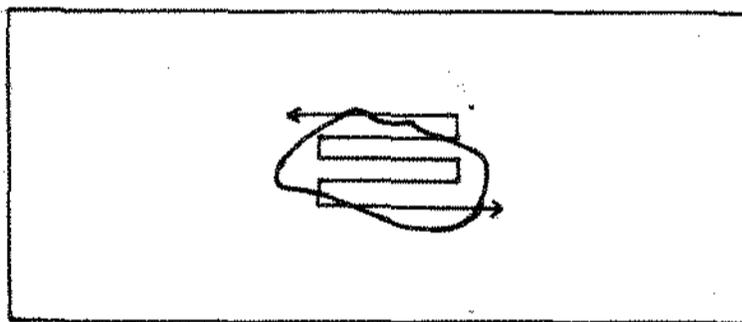
tológico com objetiva x100, em óleo de imersão, de microscópio ótico "Olympus CBA".



*Fig. 3.1. Representação esquemática da escolha dos campos isolados para contagem celular.*

### 3.7.2. Método de contagem total

Neste método, um corte histológico de cada dia de retirada do tecido de granulação induzido foi percorrido pela objetiva x100, em óleo de imersão, em toda sua superfície, na qual todos os macrófagos marcados pelas partículas de carvão e as células gigantes multinucleadas inflamatórias foram analisadas e contadas.



*Fig. 3.2. Representação esquemática da contagem celular pelo método de contagem total dos macrófagos e células gigantes multinucleadas inflamatórias.*

### 3.8. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE FAGOCITÁRIA E COMPORTAMENTO CELULAR

Na avaliação da atividade celular fagocitária no tecido de granulação, foram considerados macrófagos, somente as células que se apresentavam marcadas pelas partículas de carvão. Na contagem e avaliação da atividade fagocitária das células gigantes multinucleadas inflamatórias, as que apresentavam morfologia duvidosa foram desprezadas.

A avaliação da atividade fagocitária das células gigantes multinucleadas inflamatórias foi possível classificando-as em quatro graus crescentes desta atividade a saber:

GRAU 1: atividade fagocitária mínima (uma a dez partículas de carvão no citoplasma);

GRAU 2: atividade fagocitária moderada (onze a trinta partículas de carvão no citoplasma);

GRAU 3: atividade fagocitária intensa (de trinta e uma a cinquenta partículas de carvão no citoplasma);

GRAU 4: atividade fagocitária muito intensa: (mais de cinquenta e uma partículas).

Os resultados obtidos na contagem dos macrófagos e células gigantes multinucleadas inflamatórias, bem como na avaliação da atividade fagocitária, foram tratados estatisticamente, calculando-se média aritmética, desvio padrão e coeficiente de correlação de Pearson (VIEIRA, 1981).

**RESULTADOS**

## 4. RESULTADOS

### 4.1. MÉTODO DE CONTAGEM EM CAMPOS MICROSCÓPICOS ISOLADOS

A contagem dos macrófagos, realizada inicialmente no terceiro dia após a implantação da esponja de PVC no tecido de subcutâneo de ratos, mostrou que estas células estavam presentes na fase inicial de evolução do tecido de granulação em número considerável ( $\bar{x} = 29,3 \pm 6,7$ ), aumentando gradativamente até o vigésimo primeiro dia ( $\bar{x} = 91,3 \pm 15,39$ ). A partir do vigésimo quarto dia ( $\bar{x} = 79,6 \pm 6,59$ ) a contagem celular, apresentou pequenas variações, ora diminuindo, ora aumentando chegando ao quadragésimo quinto dia de evolução do tecido de granulação com ( $\bar{x} = 92,6 \pm 7,1$ ).

As células gigantes multinucleadas inflamatórias nos dez primeiros dias de evolução do tecido de granulação, apresentaram-se em números estatisticamente nulos. Os dados obtidos pelo método de contagem em campos microscópicos isolados para as células gigantes multinucleadas inflamatórias a partir do décimo terceiro dia não permitiram um tratamento estatístico adequado, mas pelos resultados obtidos, podemos observar que houve um aumento das células gigantes multinucleadas inflamatórias durante todo o experimento, como mostra o quadro a seguir:

DIA	MACRÓFAGOS			$\bar{X}$	S	CGMI			$\bar{X}$
3º	32	43	30	29,3	6,7	-	-	-	-
	25	25	35			-	-	-	
	27	20	27			-	-	-	
6º	41	33	56	47,6	12,5	2	-	-	-
	45	66	29			-	-	-	
	46	63	50			-	-	-	
10º	43	42	53	38,4	14,3	3	5	3	-
	10	58	32			-	-	-	
	31	31	46			-	-	-	
13º	47	40	74	53,5	12,9	3	2	1	2,0
	34	49	65			1	1	5	
	53	66	54			1	2	-	
17º	65	64	67	60,0	10,2	1	1	5	2,0
	55	69	42			1	1	2	
	45	65	68			4	-	-	
21º	112	89	82	91,3	15,3	4	2	7	2,7
	73	112	75			2	1	2	
	86	108	85			3	2	2	

Quadro. 4.1.a.

*Contagem dos macrófagos e células gigantes multinucleadas inflamatórias pelo método em campos isolados.*

DIA	MACRÓFAGOS			$\bar{X}$	S	CGMI			$\bar{X}$
249	90	77	75	79,6	6,59	3	4	4	4,2
	88	75	82			5	5	5	
	80	69	81			5	4	3	
289	83	70	101	82,4	10,7	4	4	4	3,6
	98	77	78			6	2	2	
	82	82	71			3	4	4	
319	73	94	83	76,7	17,6	3	3	6	3,8
	96	55	102			4	3	4	
	63	57	68			3	5	4	
359	95	87	95	89,1	15,4	3	5	4	3,9
	111	70	73			3	3	3	
	96	106	69			5	4	4	
389	73	72	84	71,3	9,7	4	5	5	4,0
	65	55	66			4	4	4	
	83	64	80			4	5	3	
459	90	93	92	92,6	7,1	5	8	5	5,9
	85	100	86			5	6	4	
	98	85	105			6	7	5	

Quadro 4.1.b. (continuação do quadro 4.1.a.)

Contagem dos macrófagos e células gigantes multinucleadas inflamatórias pelo método em campos isolados.

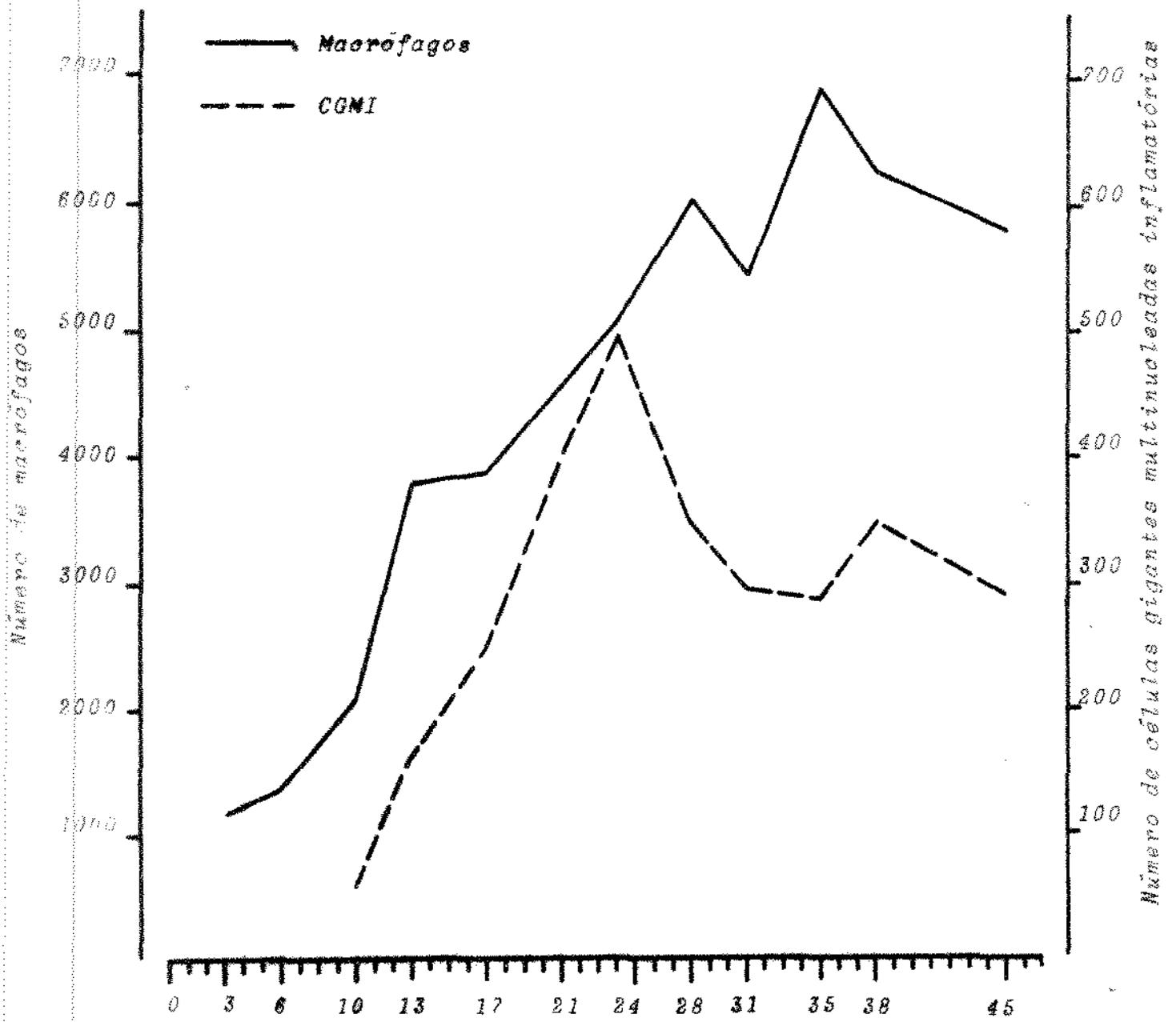
#### 4.2. MÉTODO DE CONTAGEM TOTAL

A contagem dos macrófagos por este método foi realizada inicialmente no terceiro dia após a implantação da esponja de PVC no tecido subcutâneo de rato, revelando que estas células estavam presentes em número considerável, 1148, desde o início de formação do tecido de granulação. A medida que o tecido de granulação evoluiu, os macrófagos aumentaram paulatinamente, atingindo 6334 no vigésimo oitavo dia, porém no trigésimo primeiro dia, observamos uma redução neste número para 5443, que logo a seguir, no trigésimo quinto dia, foi superado alcançando o número máximo de macrófagos obtido durante todo o experimento, 6904, a partir do qual observamos que houve queda deste número no trigésimo oitavo e quadragésimo quinto dia de evolução, 6.266 e 5806, respectivamente.

Com relação às células gigantes multinucleadas inflamatórias, elas aparecem no tecido de granulação somente no sexto dia, mas em número muito reduzido, estatisticamente nulo. No décimo dia elas estão presentes em pequeno número, 69, aumentando gradativamente até o vigésimo quarto dia de evolução do tecido de granulação (13º dia, 164, 17º dia, 257; 21º dia, 414; 24º dia, 493), apresentando a partir de então uma diminuição gradual, (28º dia, 344, 31º dia, 293; e 35º dia, 288), até o trigésimo oitavo dia quando ocorreu um pequeno aumento, 346, voltando a diminuir no quadragésimo quinto dia, 292, como podemos observar no quadro a seguir:

DIA	MACRÓFAGOS	CGMI	R
39	1148	-	-
69	1352	4	-
109	2065	69	0.9869
139	3782	164	0.9941
179	3866	257	0.9604
219	4583	414	0.9435
249	5064	493	0.9539
289	6334	344	0.8909
319	5443	293	0.8761
359	6904	288	0.8118
389	6266	346	0.8182
459	5806	292	0.8141

*Quadro 4.2. Contagem total dos macrófagos e células gigantes multinucleadas inflamatórias com coeficiente de correlação de Pearson (VIEIRA, 1981).*



*Número de dias após a implantação da esponja*

**GRÁFICO 4.1.** *Curvas obtidas através dos números revelados pelo método de contagem total dos macrófagos e células gigantes multinucleadas inflamatórias.*

#### 4.3. COMPORTAMENTO CELULAR E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE FAGOCITÁRIA

Durante a contagem dos macrófagos marcados pelo carvão, observou-se que inicialmente estavam localizados perifericamente à esponja de PVC implantadas, com distribuição uniforme no tecido de granulação até então formado. No entanto, a partir do vigésimo primeiro dia, os macrófagos marcados, estavam concentradas em determinadas áreas do tecido de granulação, onde apresentavam-se intensamente marcadas. Estas concentrações aumentaram consideravelmente a medida que o tecido de granulação evoluiu.

A morfologia das células gigantes multinucleadas inflamatórias nos primeiros períodos de experimento era caracterizada pela disposição irregular de seus núcleos no citoplasma, à semelhança das células gigantes multinucleadas tipo corpo estranho descritos por MARIANO (1976). A partir do décimo terceiro dia observamos a presença de células gigantes multinucleadas inflamatórias com dois tipos de morfologia quanto a distribuição nuclear no citoplasma, sendo o primeiro semelhante às células gigantes multinucleadas inflamatórias tipo corpo estranho, e o segundo tipo, que predominava a partir desta fase, apresentavam distribuição nuclear uniforme dispostos na periferia do citoplasma, semelhantes às células gigantes multinucleadas inflamatórias de Langhans.

Desde os primeiros dias de evolução do tecido de granulação, as células gigantes multinucleadas inflamatórias de ambos os tipos morfológicos mostravam atividade fagocitária pois estavam marcadas pelos carvão. Esta atividade fagocitária de acordo com a classificação empregada na metodologia deste trabalho, foi moderada durante todas as fases de e-

volução do tecido de granulação, o que não ocorreu com os macrófagos, cuja atividade fagocitária aumentava com a evolução do tecido de granulação.

DIAS	ATIV FAG				TOTAL
	C.	G.	M.	I.	
03	-	-	-	-	-
06	1	3	-	-	4
10	40	28	1	-	69
13	49	105	8	2	164
17	44	195	14	4	257
21	101	303	9	1	414
24	82	376	26	9	493
28	108	208	22	6	344
31	64	218	8	3	293
35	5	236	28	19	288
38	38	276	17	15	346
45	50	230	5	7	292

*Quadro 4.3. Atividade fagocitária das células gigantes multinucleadas inflamatórias no tecido de granulação de acordo com a classificação adotada na metodologia.*

*DISCUSSÃO*

## 5. DISCUSSÃO

Uma definição completa de granuloma é difícil, definindo-se-o correntemente como uma inflamação caracterizada por proliferação fibrobástica, neoformação vascular e pela presença de linfócitos, plasmócitos, monócitos e macrófagos, incluindo as células epitelióides e células gigantes multinucleadas inflamatórias, tendo como elementos principais, os macrófagos (WARD, 1975). O granuloma, segundo ADAMS (1976) apresenta três estágios: 1) desenvolvimento de um infiltrado de fagócitos mononucleares jovens ou monocítico; 2) agregação, maturação e organização destas células no interior do granuloma denominado maduro e; 3) posterior maturação destas células com formação de um granuloma denominado epitelióide. O granuloma considerado maduro, geralmente um granuloma de corpo estranho, é constituído por grupos distintos de macrófagos compactamente agregados, interdigitados e maduros; o granuloma epitelióide por sua vez, é similar, mas com células epitelióides caracterizado-o, pois os macrófagos, quando estimulados, transformam-se morfológicamente, adquirindo novas funções.

A maioria das investigações realizadas sobre a origem dos macrófagos, sugerem que seus precursores se encontram na medula óssea (EBERT e FLOREY, 1939; VOLKMAN, 1966; SPECTOR 1969; LING, 1979; VAN FURTH e colaboradores, 1969, 1973; MEURET, 1976; SINGER e colaboradores, 1979 e GALE, 1980), na qual os monoblastos dão origem a dois pró-monócitos que dividem em dois monócitos, que não mais se multiplicam quando liberados na corrente sanguínea (GOUD, 1975). Entretanto, a origem dos macrófagos nos exsudatos inflamatórios a partir de monócitos sanguíneos e seus precursores medulares, não é universalmente aceita, pois Rebeck e colaboradores (apud VOLKMAN e GOWANS, 1965)

afirmaram que os pequenos linfócitos podem atuar como precursores dos macrófagos, não afastando porém a origem monocítica dos mesmos, classificando-os em linfocitogênicos e monocitogênicos cuja diferenciação morfológica é praticamente impossível. Segundo VERNON-ROBERTS (1969) alguns macrófagos peritoneais podem ser linfocitogênicos a partir da influência de fatores liberados pelos leucócitos PMN neutrófilos, SPECTOR (1969, 1974) estabeleceu que os macrófagos dos granulomas derivam principalmente dos monócitos, mas que alguns podem se originar a partir de macrófagos fixos no tecido, também denominados histiócitos.

A cinética dos granulomas revelam dois modelos básicos: de baixa e alta renovação celular, sendo o primeiro induzido por substâncias inertes que darão origem a um granuloma maduro, cujos macrófagos contêm o agente irritante no seu interior. Neste tipo de granuloma a migração dos monócitos sanguíneos e a proliferação dos macrófagos são baixas, ocorrendo a manutenção do mesmo pelo longo tempo de vida dos macrófagos constituintes (RYAN e SPECTOR, 1970; PAPADIMITRIOU e SPECTOR 1972). Para RYAN e SPECTOR (1970) parte dos macrófagos nos granulomas de baixa renovação se mantém pela proliferação dos mesmos, que apresentavam síntese de DNA a partir do 4º ao 6º dia após a implantação de lamínulas de vidro no tecido subcutâneo de ratos.

Nos granulomas de alta renovação, geralmente do tipo epitelióide, induzido por substâncias relativamente tóxicas como óleo de parafina ou micobactérias, somente uma pequena parte dos macrófagos possuem o agente irritante no seu interior (PAPADIMITRIOU e SPECTOR, 1972; RYAN e SPECTOR, 1970). A migração e a proliferação dos macrófagos são muito ativas no granuloma de alta renovação, e os macrófagos

constituintes possuem um curto tempo de vida, ou seja alguns dias, ocorrendo a manutenção dos mesmos pela constante migração monocítica (ADAMS, 1976). O tempo de vida dos componentes celulares de um granuloma é variável, tendo os macrófagos nos granulomas de baixa renovação 5 a 8 semanas de vida média (SPECTOR, 1974).

Nos resultados obtidos em nosso trabalho, a partir do terceiro dia de evolução do granuloma ( $\bar{x} = 29,3 \pm 6,7$  e 1148, pelo método de contagem em campos isolados e de contagem total, respectivamente) até o vigésimo primeiro dia ( $\bar{x} = 91,3 \pm 15,3$  e 4583) o número de macrófagos obtidos foi crescente, a partir do qual ocorreram oscilações tais como: vigésimo quarto dia,  $\bar{x} = 79,6 \pm 6,59$  e 5064; vigésimo oitavo dia,  $\bar{x} = 82,4 \pm 10,7$  e 6334; trigésimo primeiro dia  $\bar{x} = 76,7 \pm 17,6$  e 5443; trigésimo quinto dia,  $\bar{x} = 89,1 \pm 15,4$  e 6904; trigésimo oitavo dia,  $\bar{x} = 71,3 \pm 9,7$  e 6266; quadragésimo quinto dia  $\bar{x} = 92,6 \pm 7,1$  e 5806.

Estes resultados sugerem que até o vigésimo primeiro dia - vigésimo oitavo dia o número de macrófagos aumentou gradativamente devido a migração dos monócitos circulantes para o local injuriado no qual eram ativados e induzidos à fagocitose do agente estranho, a esponja de PVC, e em pequena parte devido à proliferação dos macrófagos no tecido de granulação. A partir do vigésimo quarto dia o número de macrófagos oscilava, pois parte dos mesmos atingiram o seu tempo médio de vida, 5 a 8 semanas (SPECTOR 1974), sendo considerados macrófagos "velhos", e como tal podem morrer ou ainda participarem da formação das células gigantes multinucleadas inflamatórias presentes no granuloma desde o décimo dia de experimento. Devemos considerar que a partir do 21º dia, o granu

loma induzido pela esponja de PVC apresenta um considerável grau de maturação e fibrosamento, não ocorrendo provavelmente, a migração de monócitos sanguíneos para o local, permanecendo na região somente os macrófagos já maduros cujo tempo de vida é considerado longo.

A atividade fagocitária dos macrófagos, aumentou gradativamente à medida que o granuloma evoluiu, mas concomitantemente observamos que os mesmos se concentravam em determinadas áreas, o que dificultou a contagem pelo método de campos isolados. Estas concentrações podem ser explicadas pela possível liberação de fatores solúveis que influenciam a migração, proliferação e atividade dos macrófagos nos granulomas.

A proliferação dos macrófagos no foco inflamatório crônico é parte essencial do desenvolvimento dos granulomas e na defesa do hospedeiro em relação à disseminação de microorganismos. A indução para a proliferação de macrófagos depende, em parte, de fatores solúveis produzidos no granuloma (SPECTOR e WYNNE, 1976) que foram identificados por STANLEY e colaboradores (1976), denominando-os Fator Estimulador de Colônia e Fator de Crescimento dos Macrófagos. O primeiro, também denominado Fator Hematopoiético Estimulador de Colônia (BUHLES, 1979), tem efeito sobre os precursores da medula óssea, estimulando a proliferação dos mesmos, e o segundo, o Fator de Crescimento dos Macrófagos, estimula a proliferação destas células no campo inflamatório.

GIROUD e colaboradores (1977) postularam a existência do Fator Mitogênico Inflamatório como responsável pela proliferação dos macrófagos no granuloma, pois adicionando exsudato inflamatório em cultura de macrófagos peritoneais ocorreu um aumento na síntese de DNA, correlacionando-o com a alta concentração protéica dos exsudatos. Para

MAUEL e DEFENDI (1971) o Fator de Crescimento dos Macrófagos é uma substância considerada altamente específica, que seria liberada no granuloma por células da linhagem fibroblástica. RYAN SPECTOR (1970) estudando macrófagos subcutâneos de ratos através da implantação de lamínulas de vidro, afirmaram que os macrófagos inflamatórios entram no ciclo mitótico nas três categorias em que se apresentam: como células recentemente chegadas da circulação no campo inflamatório, como células de um "pool" de alta renovação, ou ainda como células de população largamente independente do recrutamento da medula óssea. Através da técnica de "skin-window", VAN FURTH e colaboradores (1975) obtiveram macrófagos subcutâneos que foram estudados "in vitro", concluindo que os macrófagos subcutâneos não se dividem, ao contrário do que ocorre nos de outras regiões.

A formação do granuloma depende muito do hospedeiro e do agente irritante. O evento inicial é a inflamação aguda e após 24 horas, os fagócitos mononucleares lembrando pró-monócitos e monócitos dominam o infiltrado leucocitário e iniciam a fagocitose do agente causador (ADAMS, 1976). Após o terceiro dia, nos granulomas induzidos pela implantação subcutânea de esponja de PVC, os macrófagos estavam marcados com partículas de carvão, o que vem demonstrar a sua atividade fagocitária logo após sua chegada no campo inflamatório. A partir do sexto dia, os granulomas, além dos macrófagos marcados pelas partículas de carvão, apresentam células gigantes multinucleadas inflamatórias, caracterizando microscopicamente um quadro típico de granuloma maduro ou de corpo estranho.

A formação das células gigantes multinucleadas inflamatórias induzidos por diferentes tipos de agentes são similares quanto ao desenvolvimento e características estruturais, representando a mesma, um estágio irreversível

de fusão celular (ROIZMAN, 1962). A origem das células gigantes multinucleadas inflamatórias tem sido reconhecida atualmente como resultante da fusão celular dos macrófagos no campo inflamatório (RYAN e SPECTOR, 1970 ; MARIANO e SPECTOR, 1974; CAIN e KRAUS, 1980). A confluência celular no granuloma epitelióide promove interdigitações citoplasmáticas das células epitelióides, nas quais a membrana citoplasmática rompe, ocorrendo a fusão celular (SUTTON e WEISS, 1966), interdigitações estas que foram também observadas por PAPADIMITRIOU e colaboradores (1973) através da microscopia eletrônica de varredura. Entretanto, SILVERMAN e SHORTER (1969) sugeriram que as células gigantes multinucleadas inflamatórias tipo corpo estranho são inicialmente resultantes da fusão de histiócitos, reconhecendo a possibilidade de ocorrer divisão amitótica, apesar de considerar isto improvável. A formação das células gigantes multinucleadas inflamatórias por fusão de histiócitos foi observada "in vivo" por KAMINSKI e TOTO (1967), mas GILLMAN e WRIGHT (1966) estudando "in vivo", com marcação celular pela timidina triciada, demonstrou brilhantemente que as mesmas se originam a partir dos monócitos circulantes.

KAMINSKI e TOTO (1967) demonstraram que as células gigantes multinucleadas inflamatórias não sintetizam DNA, não detectando divisão mitótica ou amitótica. Entretanto, RYAN e SPECTOR (1979), implantando lamínulas de vidro no tecido subcutâneo de ratos, puderam observar que as células gigantes multinucleadas inflamatórias sintetizavam DNA após 14 dias, porém não entravam em mitose, o mesmo sendo observado por BLACK e EPSTEIN (1974) e PTAK e colaboradores (1970).

Estudos citoquímicos comparativos para peroxidase, realizados por PAPADIMITRIOU (1979) revelaram que somente sincícios com dois a três núcleos apresen

tam características de macrófagos residentes, mas a grande maioria das células gigantes multinucleadas inflamatórias apresentavam características semelhantes às do macrófagos dos sítios inflamatórios. Para MARIANO e SPECTOR (1974) a fusão dos macrófagos é fundamental na formação das células gigantes multinucleadas inflamatórias, pois quando os macrófagos são colocados em câmaras de difusão cessa a formação das células gigantes multinucleadas inflamatórias, apesar de mostrarem grande atividade de divisão nuclear mas, quando estas câmaras foram perfuradas, permitindo a passagem de células frescas, as células gigantes multinucleadas inflamatórias são formadas normalmente. A marcação celular com timidina triciada confirma a necessidade da chegada de macrófagos recém-chegadas para que ocorra a fusão com macrófagos "velhos", formando células gigantes multinucleadas inflamatórias, além de observarem que os cariótipos destas células apresentavam alta proporção de anormalidades cromossômicas.

Esses dados ajudam a explicar as variações que ocorrem no número de macrófagos nos granulomas induzidos pela esponja de PVC depois do vigésimo primeiro dia até o quadragésimo quinto dia, pois nesta fase ocorre também em maior número as células gigantes multinucleadas inflamatórias. MARIANO e SPECTOR (1974) observaram que há uma tendência dos macrófagos em divisão celular, serem incorporados às células gigantes multinucleadas inflamatórias, nas quais ocorrem divisões nucleares sincronizadas ou não, sendo a maioria das mitoses resultantes de células mononucleares poliplóides.

A fusão dos macrófagos é precedida por um estágio de forte aderência, que provavelmente ocorre por um acúmulo de mucopolissacarídes ácidos na superfície de contato entre as células, estando envolvidas neste processo os cátions

bivalentes da membrana celular (PTAK e colaboradores, 1970; PTAK e CICHOCKI, 1972). Este processo pode ser potencializado pela adição de soro imune para macrófagos, o que levou GALINDO (1972) a sugerir uma mediação imunológica na formação das células gigantes multinucleadas inflamatórias. Além dos mecanismos propostos para fusão celular em granulomas tipo corpo estranho ou maduro pode ocorrer a endocitose simultânea, nos quais grupos fechados de macrófagos se unem e interiorizam partículas ou substâncias desnaturadas produzidas na inflamação crônica, promovendo a fusão celular (CHAMBERS, 1977).

Os resultados obtidos através do método de contagem total dos macrófagos e células gigantes multinucleadas inflamatórias marcadas pelas partículas de carvão, mostraram uma correlação positiva de 0,9539 no vigésimo quarto dia e correlação positiva de 0,8141 no quadragésimo quinto dia, sugerindo que a formação de células gigantes multinucleadas inflamatórias nos granulomas induzidos por esponja de PVC está intimamente relacionada com o número de macrófagos e com o ciclo de vida dos mesmos, pois as células gigantes multinucleadas inflamatórias puderam ser observadas em número significativo somente após o décimo dia, aumentando gradativamente até o vigésimo quarto dia (493 R=0,9539) a partir do qual diminuiu suavemente com pequenas oscilações.

A atividade fagocitária das células gigantes multinucleadas inflamatórias, segundo a classificação utilizada na metodologia do trabalho, foi considerada moderada durante todas as fases, o que não ocorreu com os macrófagos cuja atividade acentuava cada vez mais com a evolução do granuloma. Os resultados obtidos pela marcação citoplasmática com partículas de carvão nas células gigantes multinucleadas inflamatórias sugerem que pode ter ocorrido a fusão de macrófagos em fagocitose ou macrófagos "velhos"

com macrófagos recém-chegados da circulação, pois segundo PAPADIMITRIOU e colaboradores (1975) as células gigantes multinucleadas inflamatórias raramente apresentam atividade fagocitária, e quando ela está presente é menor que a dos macrófagos (MOSKALEWISKI e PTAK, 1977).

PAPADIMITRIOU observou através da cinemicrografia que as células gigantes multinucleadas inflamatórias apresentavam prolongamentos citoplasmáticos móveis que distendiam e retraíam explorando o substrato ao seu redor, aproximando estruturas, não relacionando este fenômeno com sua capacidade fagocitária. Estudos histoquímicos mostraram que as células gigantes multinucleadas inflamatórias são metabolicamente muito ativas, estando implicadas em fenômenos sintéticos e degradativos, pois alguns resultados conseguidos indicaram a existência de uma similaridade entre as células gigantes multinucleadas inflamatórias e os macrófagos, apesar de algumas atividades enzimáticas serem mais proeminentes nas células gigantes multinucleadas inflamatórias do que nos macrófagos e células epitelióides, podendo auxiliar através da exocitose, na destruição de materiais não fagocitados (PAPADIMITRIOU e WYCHE, 1976; PAPADIMITRIOU e WEE, 1976).

CONCLUSÕES

## 5. CONCLUSÕES

Dentro das condições experimentais do presente trabalho, concluímos que:

1. Os macrófagos estão presentes no granuloma induzido por esponja de PVC desde sua fase mais precocemente estudada (terceiro dia), aumentando gradativamente até o vigésimo primeiro e vigésimo oitavo dia, quando mantém-se com números variáveis dentro de uma determinada faixa até o quadragésimo quinto dia de evolução.

2. As células gigantes multinucleadas inflamatórias estão presentes no granuloma induzido por esponja de PVC somente após o décimo dia, aumentando seu número gradativamente até o vigésimo quarto dia, a partir do qual ocorre uma pequena diminuição, mantendo-se com pequenas variações até o quadragésimo quinto dia de evolução.

3. A atividade fagocitária dos macrófagos no granuloma induzido por esponja de PVC aumenta a medida que o granuloma evolui, concentrando-se em determinadas áreas, provavelmente em consequência da ação de fatores solúveis liberados no sítio inflamatório que influenciam sua migração e proliferação. Com relação às células gigantes multinucleadas inflamatórias, sua atividade fagocitária foi moderada em todas as fases de evolução do tecido de granulação.

4. Correlacionando o número de macrófagos, seu tempo de vida médio e sua atividade fagocitária,

com a fase de aparecimento das células gigantes multinucleadas inflamatórias e sua atividade fagocitária, além das evidências encontradas na literatura, podemos sugerir que a formação das células gigantes multinucleadas inflamatórias no granuloma induzido pela esponja de PVC ocorre por fusão celular de macrófagos "velhos" com macrófagos jovens ou recém-chegados da circulação.

SINÓPSE

## S I N Ó P S E

O granuloma induzido por esponja de policlorovinil (PVC) foi utilizado como modelo experimental, no qual o autor investigou o aparecimento e atividade fagocitária de macrófagos e de células gigantes multinucleadas. Foram utilizados trinta ratos divididos em dois grupos. No grupo I as esponjas foram implantadas no tecido subcutâneo dorsal, sendo considerado grupo controle e no grupo II, as esponjas de PVC implantadas foram impregnadas homogeneamente com partículas de carvão, para posterior marcação celular. Os granulomas formados foram removidos em períodos variáveis de três a quarenta e cinco dias após a implantação das esponjas, fixados e submetidos aos procedimentos de rotina para obtenção de cortes histológicos, corados pela hematoxilina e eosina.

O número de macrófagos e células gigantes multinucleadas inflamatórias foi determinado pelo método de contagem em campos microscópicos isolados, cujos resultados foram estatisticamente nulos, e pelo método de contagem total, no qual toda superfície do corte histológico foi percorrida, obtendo-se assim resultados estatisticamente significantes. A atividade fagocitária celular foi determinada pela contagem das partículas de carvão presentes no interior do citoplasma dos macrófagos e células gigantes multinucleadas presentes no granuloma.

O autor observou que os macrófagos es

tavam presentes no granuloma desde a fase mais precocemente observada, terceiro dia, aumentando gradativamente até o vigésimo oitavo dia, a partir do qual permanecia estável, dentro de determinada faixa, até o quadragésimo quinto dia, apesar de pequenas variações. A atividade fagocitária celular dos macrófagos aumentava a medida que o granuloma evoluía, concentrando-se em determinadas áreas do tecido de granulação levando o autor sugerir a ação de fatores solúveis liberados no sítio inflamatório, que influenciaram sua migração e proliferação.

As células gigantes multinucleadas iniciaram seu aparecimento no granuloma a partir do décimo dia, aumentando gradativamente até o vigésimo quarto dia, mostrando uma diminuição no vigésimo oitavo dia, permanecendo estável dentro de determinada faixa com pequenas variações, até o quadragésimo quinto dia, apresentando atividade fagocitária moderada em todas as fases de evolução, sugerindo a necessidade da fusão de macrófagos "velhos" com macrófagos jovens ou recém-chegados da circulação, para que ocorra a formação de células gigantes multinucleadas em granulomas induzidos por esponja de PVC.

SUMMARY

## S U M M A R Y

The granuloma induced by polyvinyl-chloride (PVC) sponge was used as an experimental model to study the arrival and the phagocitary activity of the macrophages and inflammatory multinucleate giant cells. It were used thirty (30) rats divided in two groups. In the first group (I), the polyvinyl-chloride sponge was implanted in the dorsal subcutaneous tissue and considered as control. In the second group (II), the PVC sponge were impregnated uniformly by carbon particles and then implanted. Granulomata were removed at 3, 6, 10, 13, 17, 21, 24, 28, 31, 35, 38 and 45 days after the implantation of the sponges, fixed in 10% formalin and then submitted to routine procedures, in order to obtain slices stained with haematoxylin and eosin.

The number of macrophages and inflammatory multinucleate cells were determined by counting isolated microscopic fields and by the total counting method where the whole lamina were observed. The results from isolated microscopic field were not considered because there is a impossibility to apply a statistical analysis. By the other hand, those got from the total counting method were submitted to Pearson's coefficient.

The author observed that the macrophages were present in granulamata since the 3rd day, increasing their quantity until the 28th and kept constant until the 45th day, in spite of small variations. The macrophage phago-

citary activity was increasing as the granuloma evolved, and the macrophages were concentrated in certain areas of the granuloma, what can suggest a possible action of a soluble factor present in the inflammatory field which would influence their migration and proliferation.

The multinucleated giant cells started to appear in granulomata on the 10th day, increasing their number gradually until the 24th, and then kept constant until the 45th day, with little variation. They presented moderated phagocitary activity in all their evolutive phases, suggesting the fusion of "old" with "young" or recently arrived macrophages from the blood stream, in order to form an inflammatory multinucleate giant cell in the sponge induced granuloma.

BIBLIOGRAFIA

## BIBLIOGRAFIA

- 01- ADAMS, Dolph O. Macrophages. Methods in enzymology, 58: 494-506, 1979.
- 02- \_\_\_\_\_. The granulomatous inflammatory response. Am. J. Pathol., 84: 164-91, 1976.
- 03- ALLISON, Anthony C. The role of lysosomes in pathology. Proc. Royal Soc. Med., 59: 867-71, 1966.
- 04- BAR-ELI, M. & GALLILY, R. The effect of macrophage hydrolytic enzyme levels on uptake and degradation of antigen and immune complexes. J. Reticuloendotelial Soc., 18: 317-28, 1975.
- 05- BENNETT, M. & MONTES, M. Graft-versus-host reactions in mice. Am. J. Pathol., 71: 119, 1973.
- 06- BLACK, Martin M. & EPSTEIN, William L. Formation of multinucleate giant cells in organized epithelioid cell granulomas. Am. J. Pathol., 74: 263-74, 1974.
- 07- BOWDEN, Drummond H. & ADAMSON, Ian Y. R. The pulmonary interstitial cell as immediate precursor of the alveolar macrophage. Am. J. Pathol., 68: 521-28, 1972.
- 08- BUHLES, Willian C. Jr. Studies on mononuclear phagocyte progenitor cells: morphology of cells and colonies in liquid culture of mouse bone marrow. J. Reticuloendoth Soc., 25: 363-78, 1979.
- 09- CAIN, H. & KRAUS, B. Mehrkernige Riesenzellen in Granulomen. Virchows Archiv. A., 385: 309-33, 1980.
- 10- CARR, I. & WRIGHT, J. The fine structure of macrophage granules in experimental granulomas in rodents. J. Anat., 128 : 479-87, 1979.

- 11- CHAMBERS, T. J. The mechanism of fusion of hamster macrophage serum. J. Path., 122: 163-73, 1976.
- 12- \_\_\_\_\_ . Studies the phagocytic capacity of macrophage polykarions. J. Path., 123: 65-77, 1977.
- 13- CHEERS, Christina & WALLER, Robyn. Activated macrophages in congenitally athymic "nude" mice and lethally irradiated mice. J. Immunol., 115: 844-7, 1975.
- 14- COHN, Zanvil A. & BENSON, Belinda. The differentiation of mononuclear phagocytes. J. Exp. Med., 121: 153-70, 1965.
- 15- COMOGLIO, Paolo M. et alii. Experimental study on development and behaviour of the multinucleated giant cells "in vitro". J. Reticuloendoth. Soc., 9: 397-408, 1971.
- 16- DAVIES, Philip & ALLISON, Anthony C. The macrophage as a secretory cell in chronic inflammation. Agents Actions, 6: 60-74, 1976.
- 17- DAYRENS, P. et alii. Aspect actuel de l'inflammation II. Rôle du macrophage, pharmacologie et thérapeutique anti-inflammatoire. Sem. Hop. Paris., 56: 901-10, 1980.
- 18- DEAN, Roger T. Lysosomes and protein degradation. Acta Biol. Med. Germ., 35: 1815-20, 1977.
- 19- DEAN, Roger T. et alii. Induction of macrophage lysosomal enzyme secretion by agents acting at the plasma membrane. Expl. Cell. Biol., 47: 454-62, 1979.
- 20- DEPORTER, D. A. The role of the macrophage in collagen resorption during chronic inflammation; a new look at an old hypothesis. Agents Actions, 9: 108-71, 1979.
- 21- DONNA, A. et alii. Acid e alkaline phosphatase in macro

- phages of Tenebrio molitor larvae stimulated with asbestos. Expl. Cell Biol., 48: 321-8, 1980.
- 22- DUMONT, Andre & SHELDON, Huntington. Changes in the fine structure of macrophages in experimentally produced tuberculous granulomas in hamsters. Lab. Invest., 14: 2.034-55, 1965.
- 23- DUNN, C. J. & WILLOUGHBY, D. The reponse of the newborn rat to injury II; histopathological aspects and mononuclear cell turnover. J. Path., 116: 195-201, 1975.
24. EBERT, R. H. & FLOREY, H. W. The extravascular development of the monocyte observed "in vivo". Br. J. Exp. Pathol., 20: 342-56, 1939.
- 25- ELIAS, Peter & EPSTEIN, William L. Ultrastructural observations on experimentally induced foreign body and organized epithelioid-cell granulomas in man. Am. J. Path., 58: 1.207-16, 1968.
- 26- FEHER, J. et alii. Histochemical demonstration of B-glucuronidase activity in experimental inflammation produced by croton oil in rats. Br. J. Exp. Path., 52: 23-26, 1971.
- 27- FLOREY, H. W. General pathology. 4. ed., Phyladelphia, W. B. Saunders, 1970. 1197 p.
- 28- GALE, Robert John & MORLEY Alexander Alan. The mononuclear phagocyte system in experimental chronic marrow failure. Exp. Hemat., 8: 16-24, 1980.
- 29- GALINDO, B. Antigen-mediated fusion of specifically sensitized rabbit alveolar macrophages. Infec. Immunity, 5: 583-94, 1972.
- 30- GILLMAN, T. & WRIGHT, L. J. Probable "in vivo" origin

- of multinucleated giant cells from circulating mononucle-  
 culars. Nature, 209: 263-5, 1966.
- 31- GIROUD, J. P. et alii. Stimulation of macrophage DNA  
 synthesis in culture by different types of acute non  
 immunological inflammatory exudates. Biomedicine, 27:  
 19-22, 1977.
- 32- GORDON, Saimon & COHN, Zanvil A. The macrophage. Intern.  
 Rev. Cytol., 36: 171-214, 1973.
- 33- GOUD, Theo J. L. M. & VAN FURTH, Ralph. Proliferative  
 characteristics of monoblasts grown in vitro. J. Exp.  
 Med., 142: 1200-17, 1975.
- 34- HAYTHORN, Samuel R. Multinucleated giant cells. Arch  
 Path., 7: 651-713, 1929.
- 35- IZUMI, S. et alii. Further observations on the immunolo  
 gical induction of DNA sybthesis in mouse peritoneal  
 macrophages. Role of products of activated lymphocytes.  
Int. Archs. Alergy Appl. Immun., 49: 573-84, 1975.
- 36- JENNINGS, John F. & HUGHES, Lynda A. Inhibition of pha  
 gocytosis by anti-macrophage antibodies. Nature, 221:  
 79-80, 1969.
- 37- JONAS, Von Ludwig et alii. Autoradiographische untersu  
 chungen zur frage des transfers markierter RNS von ma  
 crophagen auf lymphocyten. Acta Histocem. Bd., 56:  
 301-8, 1976.
- 38- KAMINSKI, Mitchell V. & TOTO, Patrick D. Histogênese of  
 foreign body giant cells. J. Dental Res., 46: 245-7,  
 1967.
- 39- KLINTWORTH, Gordon K. Experimental studies on the pha  
 gocytic capability of the corneal fibroblast. Am. J.  
 Path., 55: 283-94, 1969.

- 40- KULONEN, Eino & POTILA, Marita. Macrophages and the synthesis of connective tissue components. Acta Path. Microbiol. Scand., 88: 4-13, 1980.
- 41- LAMBERT, Robert A. The production of foreign body giant cells "in vitro". J. Exp. Med., 15: 510-5, 1912.
- 42- LANGE, M. A. et alii. On fibroblast and macrophage origin in granular tissue of cutaneous wounds. Arkh. Anat. Gistol. Embriol., 77: 22-8, 1979.
- 43- LING, E. A. Electron microscopic study of macrophages appearing in a stab wound of the brain of rats following intravenous injection of carbon particles. Arch. Histol. Jap., 42: 41-50, 1979.
- 44- LIPSKY, Peter E. & ROSENTHAL, Alan S. Macrophage-lymphocyte interaction. II. J. Exp. Med., 141: 138-53, 1975.
- 45- MARIANO, M. et alii. Immunological and iron-immunological phagocytosis by inflammatory macrophage epithelioid cells and macrophage polykaryons from foreign body granulomata. J. Path., 120: 151-9, 1976.
- 46- MARIANO, M. & SPECTOR, W. G. The formation and properties of macrophage polycaryons (inflammatory giant cells). J. Path., 113: 1-19, 1974.
- 47- MAUEL, J. & DEFENDI, V. Regulation of DNA synthesis in mouse macrophages. Exp. Cell Res., 65: 33-42, 1971.
- 48- MAXIMOW, Alexander A. Role of the nongranular blood leukocytes in the formation of the tubercle. J. Inf. Res., 37: 418-29, 1925.
- 49- MEURET, G. Origin, ontogeny and kinetics of mononuclear phagocytes. Adv. Exp. Med. Biol., 73PTA: 71-81, 1976.
- 50 MØRLAND, Berit. Studies on selective induction of lysso-

- somal enzyme activities in mouse peritoneal macrophages. J. Reticuloendoth. Soc., 26: 749-62, 1979.
- 51- MOSKALEWSKI, S. & PTAK, W. Inflammatory giant cells: immunophagocytosis and rosette formation. Folia Hist. Cytoch., 15: 271-5, 1977.
- 52- PAPADIMITRIOU, J. M. The influence of the thymus on multinucleate giant cell formation. J. Path., 118: 153-6, 1976.
- 53- \_\_\_\_\_. Role of resident and exudate macrophages in multinucleate giant cell formation. J. Path., 128: 93-7, 1979.
- 54- PAPADIMITRIOU, J. M. et alii. An analysis of the phagocytic potential of multinucleate foreign giant cells. Am. J. Path., 78: 343-53, 1975.
- 55- \_\_\_\_\_. Kinetics of multinucleate giant cell formation and their modification by various agents in foreign body reactions. Am. J. Path., 73: 349-63, 1973.
- 56- \_\_\_\_\_. Surface characteristics of macrophages, epithelioid and giant cells using scanning microscopy. Exptl. Cell Res., 76: 356-62, 1973.
- 57- PAPADIMITRIOU, J. M. & ARCHER, M. The morphology of murine foreign body multinucleate giant cells. J. Ultrastructure Res., 49: 372-86, 1974.
- 58- PAPADIMITRIOU, J. M. & SPECTOR, W. G. The origin, properties and fate of epithelioid cells. J. Path., 105: 187-203, 1971.
- 59- \_\_\_\_\_. The ultrastructure of high- and low-turnover inflammatory granulomata. J. Path., 106: 37-43, 1972.
- 60- PAPADIMITRIOU, J. M. & WEE, S. H. Selective release of

- lysosomal enzymes from cell population containing multinucleate giant cells. J. Path., 120: 193-9, 1976.
- 61- PAPADIMITRIOU, J. M. & WYCHE, P. A. An examination of murine foreign body giant cells using cytochemical techniques and thin layer chromatography. J. Path., 114: 75-83, 1974.
- 62- \_\_\_\_\_. A biochemical profile of glass-adherent cell populations containing multinucleated foreign body giant cells. J. Path., 119: 239-54, 1976.
- 63- POSTE, George. Virus-induced polykaryocytosis and the mechanism of cell fusion. Adv. Virus Res., 16: 303-56, 1970.
- 64- POULTER, L. W. Changes in macrophage status "in vivo" during infections with and immunity to Leishmania enriettii. Cell Immunol., 27: 17-25, 1976.
- 65- PRIVALOVA, L. I. et alii. The role of tissue macrophage destruction products in the granulocytopoiesis control. Biul. Ersp. Biol. Med., 82: 1480-2, 1976.
- 66- PTAK, W. et alii. Transformation of hamster macrophages into giant cells with antimacrophage serum. Nature, 225: 655-7, 1970.
- 67- PTAK, Włodzimierz & CICHOCKI, Tadeusz. The mechanisms of antimacrophage serum-induced fusion of hamster macrophages. Acta Histochem., 44: 116-21, 1972.
- 68- RABINOVITCH, M. & DE STEFANO, M. J. Particle recognition by cultured macrophages. J. Immunol., 110: 695-8, 1973.
- 69- REIKVAM, Asmund. Macrophage proliferation and activation during Toxoplasma gondii infection in mice: rela-

- tionship to lymphocyte stimulation. Acta Path. Scand.,  
84: 124-30, 1976.
- 70- \_\_\_\_\_. The macrophage response in mice after primary  
and secondary immunization with sheep red blood cells.  
Acta Path. Microbiol. Scand., 84: 161-7, 1976.
- 71- ROIZMAN, Bernard. Polykaryocytosis. Cold. Spring. Har-  
bour Symp. Quant. Biol., 27: 327-42, 1962.
- 72- ROSSI, F. et alii. The mechanism of control of phagocy-  
tic metabolism. Adv. Exp. Med. Biol., 73: 205-6, 1976.
- 73- RYAN, Graeme B. & MAJNO, Guido. Acute inflammation.  
Am. J. Path., 86: 185-276, 1977.
- 74- RYAN, Graeme B. & SPECTOR, W. G. Macrophage turnover in  
inflamed connective tissue. Proc. Roy. Soc. Lond., 175:  
269-92, 1970.
- 75- SBARRA, Anthony et alii. Biochemical functional and  
structural aspects of phagocytosis. Int. Rev. Exp.  
Biol., 16: 249-71, 1976.
- 76- SCHNYDER, Jorg & BAGGIOLINI, Marco. Role a phagocytosis  
in the activation of macrophages. J. Exp. Med., 148:  
1449-57, 1978.
- 77- \_\_\_\_\_. Secretion of lysosomal hidrolases by stimula  
ted and nonstimulated macrophages. J. Exp. Med., 148:  
435-50, 1979.
- 78- SILVERMAN, Lloyd & SHORTER, Roy G. Histogenesis of the  
multinucleated giant cell. Lab. Invest., 12: 985-90,  
1963.
- 79- SINGER, Jack W. et alii. Unicellular or multicellular  
origin of human granulocyte-macrophage colonies "in vi  
tro". Blood, 54: 1395-9, 1979.

- 80- SNYDERMAN, Ralph et alii. Quantification of mouse macrophage chemotaxis "in vitro": role of C5 for the production of chemotactic activity. Infect. Immunol., 11: 488-9, 1975.
- 81- SPECTOR, W. G. The granulomatosis inflammatory exudate. Int. Rev. Exp. Path., 18: 1-55, 1969.
- 82- SPECTOR, W. G. & LYKKE, A. W. J. The cellular evolution of inflammatory granulomata. J. Path. Bact., 92: 163-77, 1966.
- 83- SPECTOR, W. G. & WYNNE, K. M. Proliferation of macrophages in inflammation. Agents Actions, 6: 123-6, 1976.
- 84- STANLEY, E. R. et alii. Factors regulating macrophage production and growth identity of colony stimulating factor and macrophage growth factor. J. Exp. Med., 143: 631-47, 1976.
- 85- STEWART, Richard et alii. The wound fibroblast and macrophage. II: their origin studied in a human after bone marrow transplantation. Br. J. Surg., 68: 129-31, 1981.
- 86- \_\_\_\_\_. The wound fibroblast and macrophage. I: wound cell population changes observed in tissue culture. Br. J. Surg., 68: 125-8, 1982.
- 87- STOSSEL, Thomas P. The mechanism of phagocytosis. J. Reticuloendothel. Soc., 19: 237-45, 1976.
- 88- SUTTON, Jerry & WEISS, Leon. Transformation of monocyte in tissue culture into macrophages. J. Cell Biol., 28: 303-31, 1966.
- 89- TAJIMA, Masanori & KUDOW, Satoru. Morphology of the Whartin-Finkeldey giant cells in monkeys with experi-

- mentally induced measles. Acta Path. Jap., 26: 367-80, 1976.
- 90- UEBA, Noboru et alii. Multinucleated giant cell monolayers infected with japanese encephalitis viruses. Jap. J. Microbiol., 20: 1-9, 1976.
- 91- UNANUE, Emil R. Secretory function of mononuclear phagocytes. Am. J. Path., 83: 398-416, 1976.
- 92- UNANUE, Emil R. et alii. Regulation of immunity and inflammation by mediators from macrophages. Am. J. Path., 85: 465-78, 1976.
- 93- UNANUE, Emil R. & KIELY, Jeanne-Marie. Synthesis and secretion of a mitogenic protein by macrophages: description of a superinduction phenomenon. J. Immunol., 119: 925-31, 1977.
- 94- VAN FURTH, Ralph et alii. Characteristics of human mononuclear phagocytes. Blood, 54: 485-500, 1979.
- 95- \_\_\_\_\_. Quantitative study on the production and kinetics of mononuclear phagocytes during on acute inflammatory reaction. J. Exp. Med., 138: 1314-30, 1973.
- 96- \_\_\_\_\_. The mononuclear phagocyte system; a new classification of macrophage, monocytes and their precursor cells. Bull. N. H. O., 46: 845-52, 1972.
- 97- VAN FURTH, Ralph & COHN, Zanvil A. The origin and kinetics of mononuclear phagocytes. J. Exp. Med., 415-35, 1968.
- 98- VERNON-ROBERTS, B. Lymphocyte to macrophage transformation in the peritoneal cavity preceding the mobilization of peritoneal macrophages to inflamed areas. Nature, 222: 1286-8, 1969.

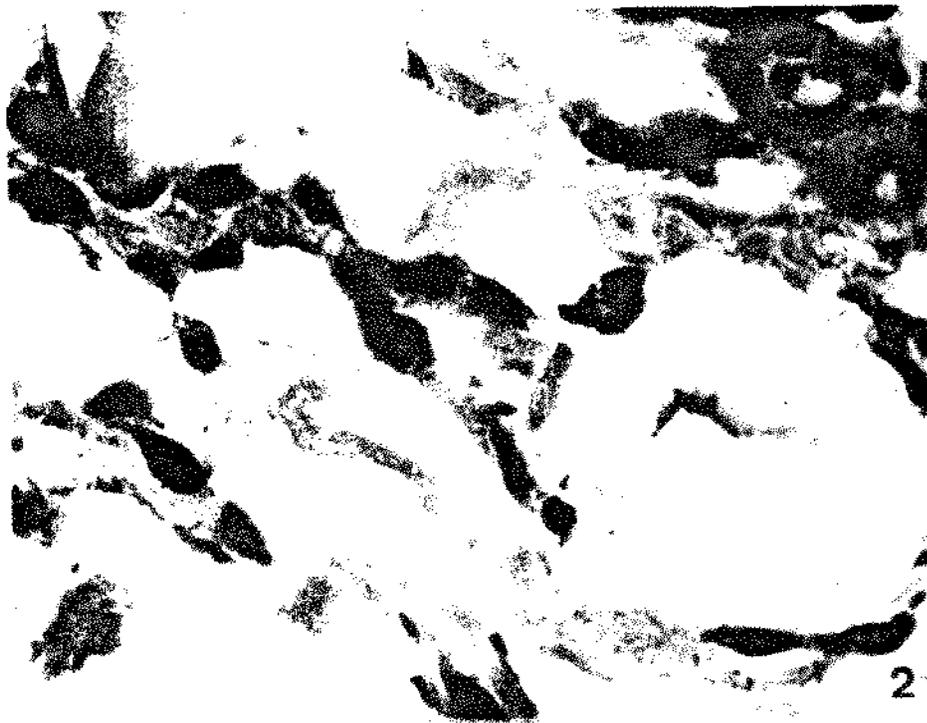
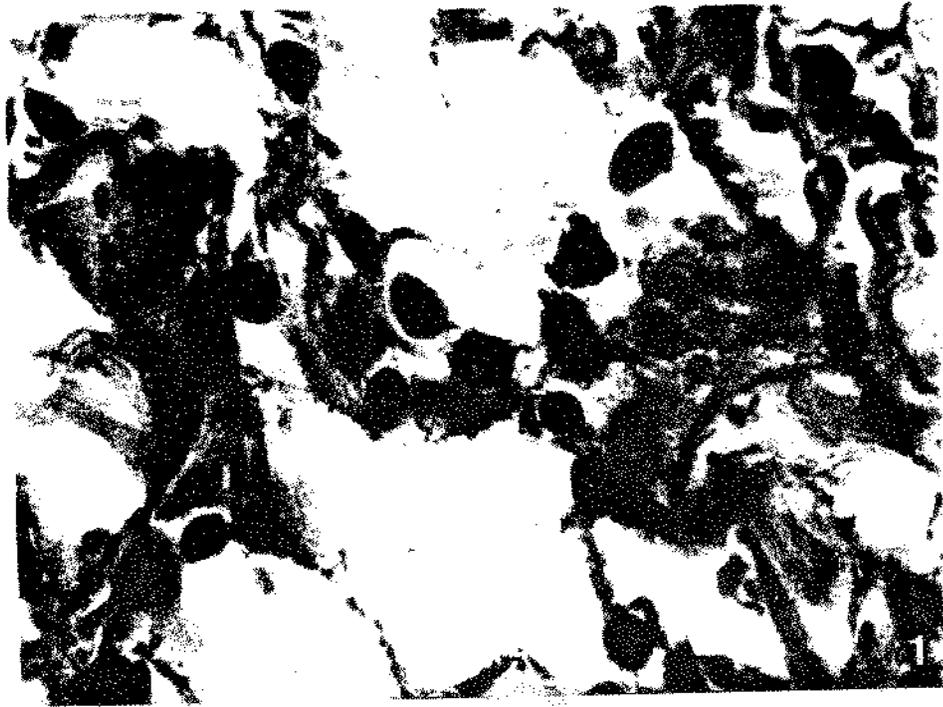
- 99- VIEIRA, Sônia. Introdução à bioestatística. Rio de Janeiro, Campus, 1981. p. 77-89.
- 100- VIZIOLI, Mário Roberto. Relação entre fosfomonoesterases e a síntese de colágeno e mucopolissacarídeos ácidos no tecido de granulação. Faculdade de Odontologia de Piracicaba, UNICAMP, 1975. 65p. (Tese Livre-Docência).
- 101- VIZIOLI, Mário Roberto et alii. Alkaline phosphatase activity and the development of rat sponge-induced granulation tissue. Acta Anat., 83: 60-9, 1972.
- 102- VOLKMAN, Alvin. The origin and turnover of mononuclear cells in peritoneal exsudates in rats. J. Exp. Med., 124: 241-53, 1966.
- 103- VOLKMAN, A. & GOWANS, J. L. The production of macrophages in the rat. Br. J. Exp. Path., 46: 50-61, 1965.
- 104- WARD, P. A. Inflammation; principles of patho-biology. 2 ed., New York, Oxford University Press, 1975. p. 97-140.
- 105- WYNNE, Katherine et alii. Macrophage proliferation "in vitro" induced by exsudates. Nature, 253: 636-7, 1975.
- 106- ZWEIFACH, B. W. et alii. The inflammatory process. 2. ed. New York, Academic Press, 1974.

ILUSTRAÇÕES

LEGENDAS

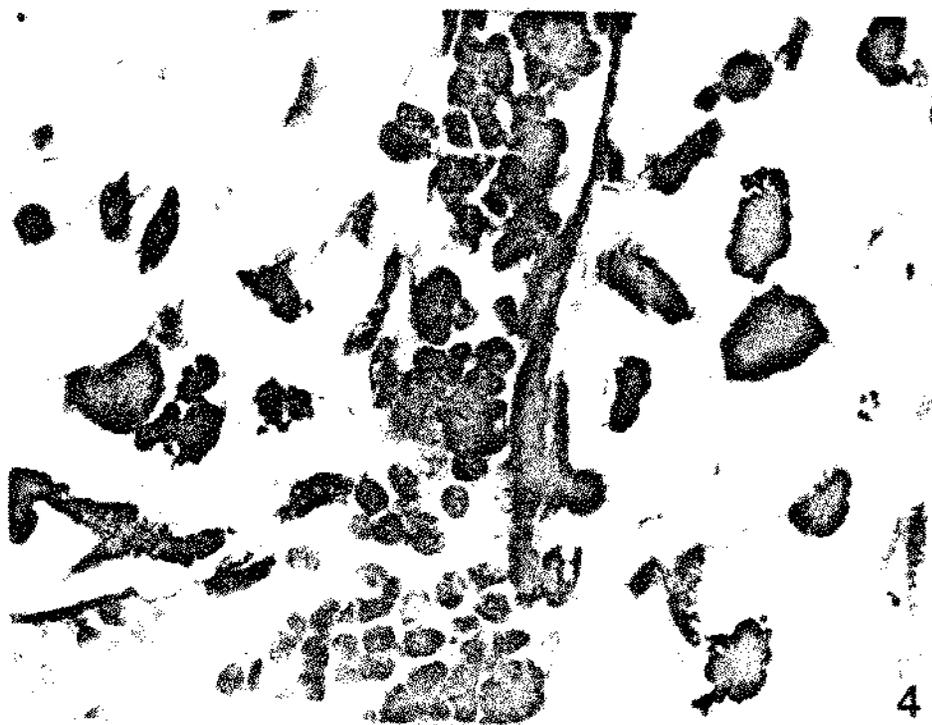
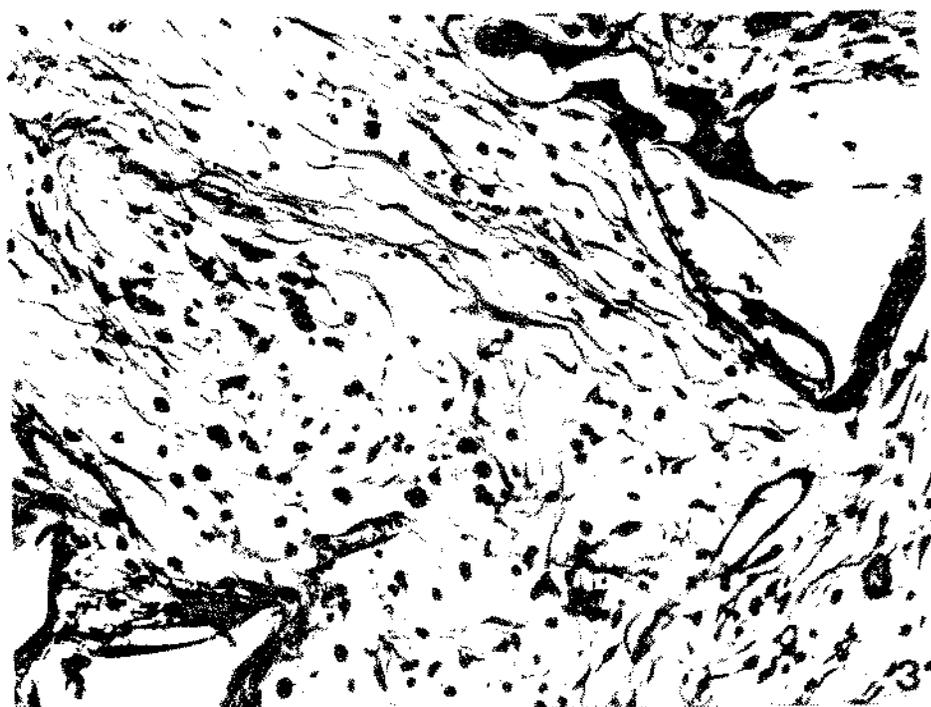
*Fig. 1. Macrófagos com partículas de carvão no citoplasma, em granuloma com 3 dias de evolução. Área periférica à esponja de PVC. 100X*

*Fig. 2. Macrófagos com partículas de carvão no citoplasma, em granuloma com 3 dias de evolução. Área mais central à esponja de PVC. 100 X*



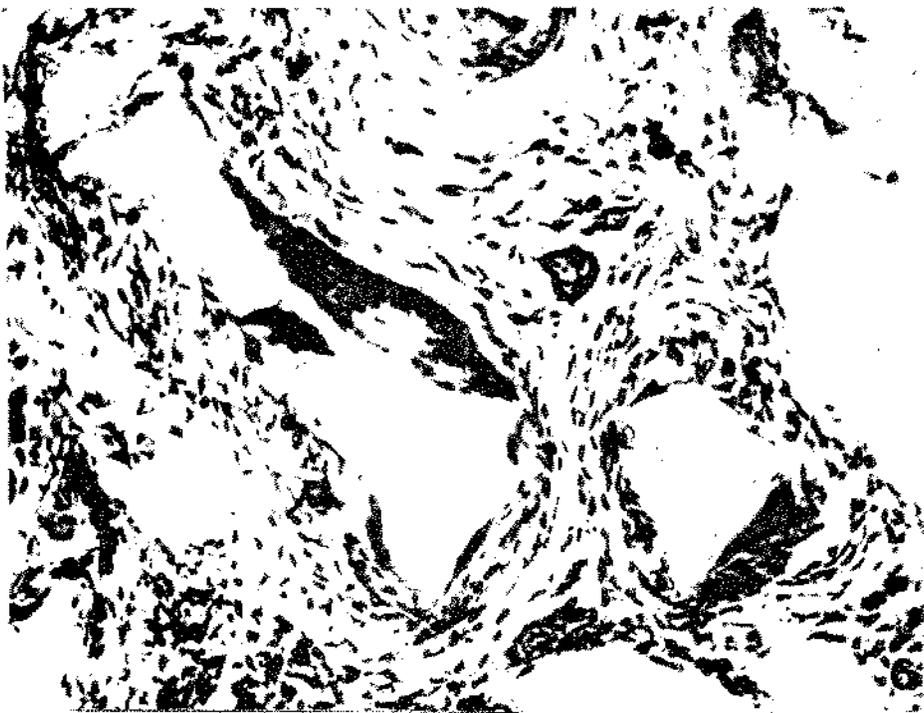
*Fig. 3. Tecido de granulação com 10 dias de evolução com macrófagos marcados pelas partículas de carvão. Ao redor dos fragmentos da esponja de PVC observamos sincícios e células gigantes multinucleadas com distribuição ao acaso no citoplasma, tipo corpo estranho. 40 X*

*Fig. 4. Macrófagos fagocitando partículas de carvão localizados próximos a um vaso sanguíneo pelo qual migraram seus precursores, os monócitos sanguíneos, em granuloma com 10 dias de evolução. 100 X*



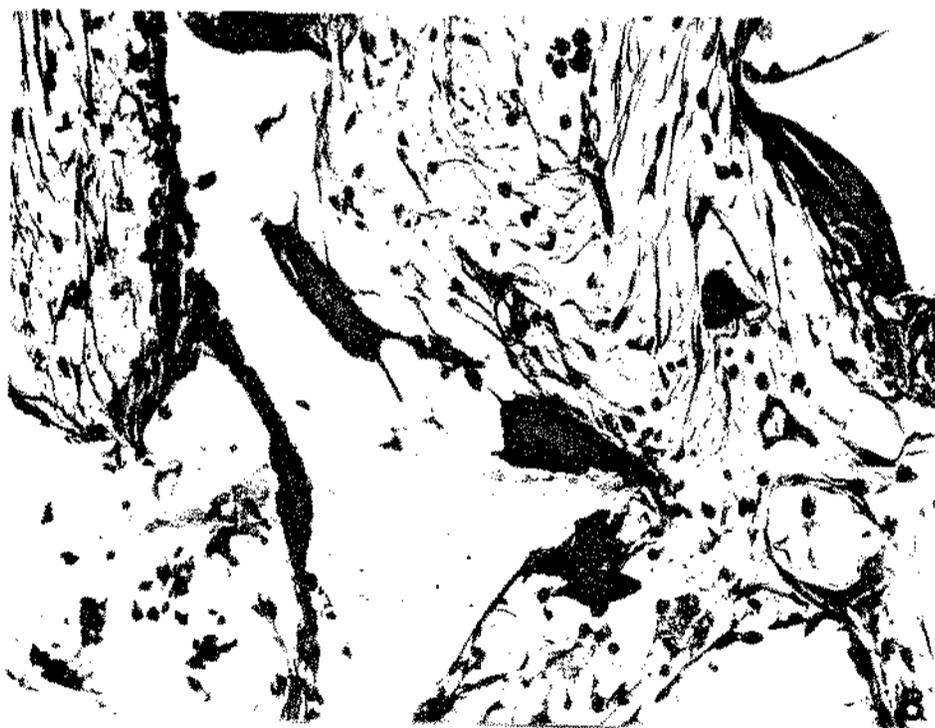
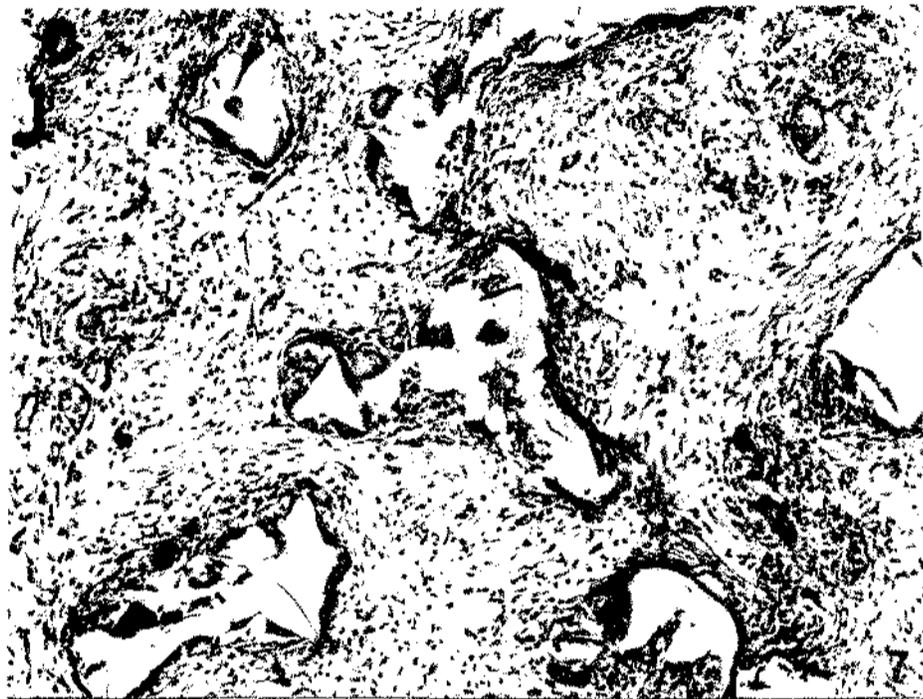
*Fig. 5. Tecido de granulação com treze dias de evolução. Algumas células gigantes multinucleadas mostram distribuição nuclear mais organizada, isto é, núcleos localizados na periferia da célula. 40 X*

*Fig. 6. Tecido de granulação com 13 dias de evolução. As células gigantes multinucleadas apresentam núcleos em números que variam de dois a dezenas de núcleos, tal como a localizada na parte central desta ilustração. 40 X*



*Fig. 7. Granuloma com 17 dias de evolução. A morfologia predominante das células gigantes multinucleadas inflamatórias é do tipo Langhans, com núcleos localizados na periferia da células. 10 X*

*Fig. 8. Tecido de granulação com 17 dias de evolução. As células gigantes multinucleadas inflamatórias apresentam atividade fagocitária moderada - 11 a 30 partículas de carvão*  
*40 X*



*Fig. 9. Tecido de granulação com 17 dias de evolução. Além de células gigantes multinucleadas tipo Langhans ao redor dos fragmentos de esponja de PVC observamos a presença de sincícios e células gigantes multinucleadas tipo corpo estranho. 40 X*

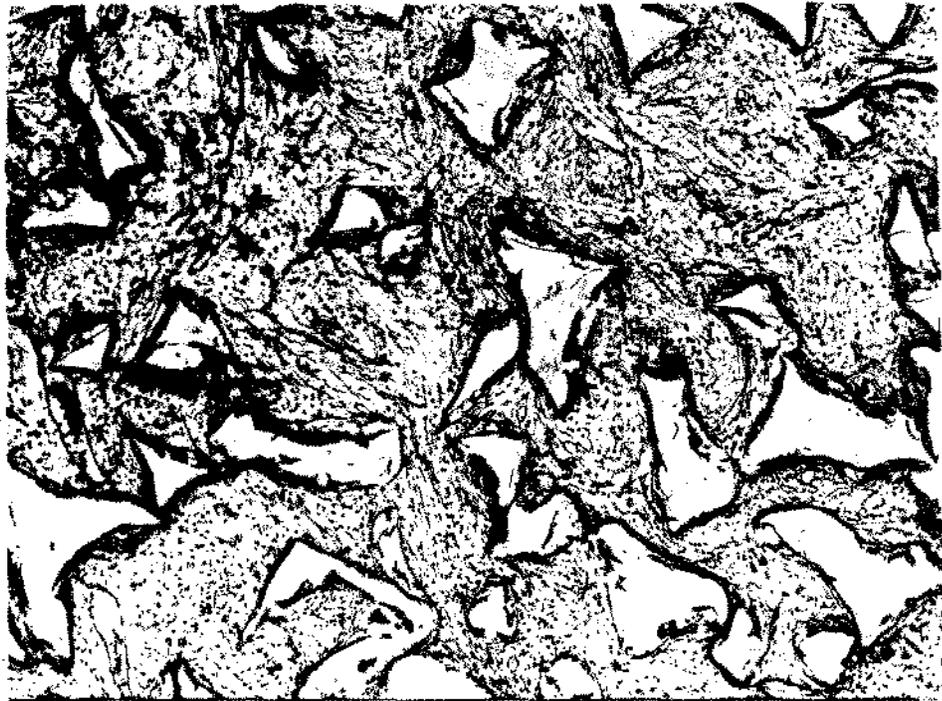
*Fig. 10. Célula gigante multinucleada inflamatória tipo Langhans com moderada atividade fagocitária. 100 X*



*Fig. 11. Granuloma com 21 dias de evolução. Os macrófagos estão distribuídos uniformemente em todo o tecido de granulação, apesar de pequenas concentrações em determinadas áreas. 10 X*

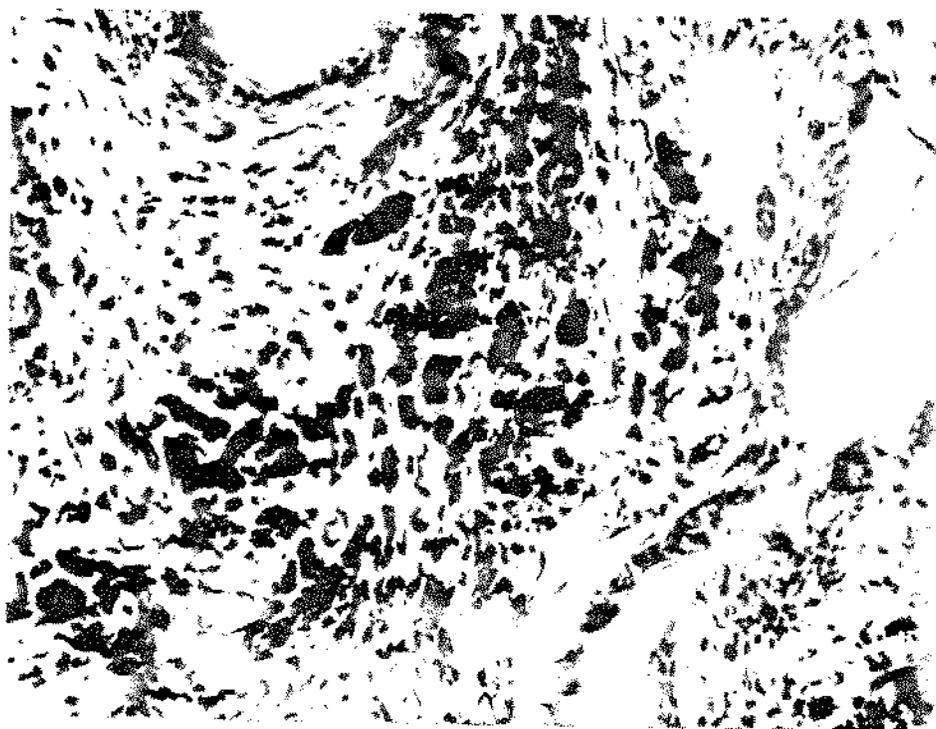
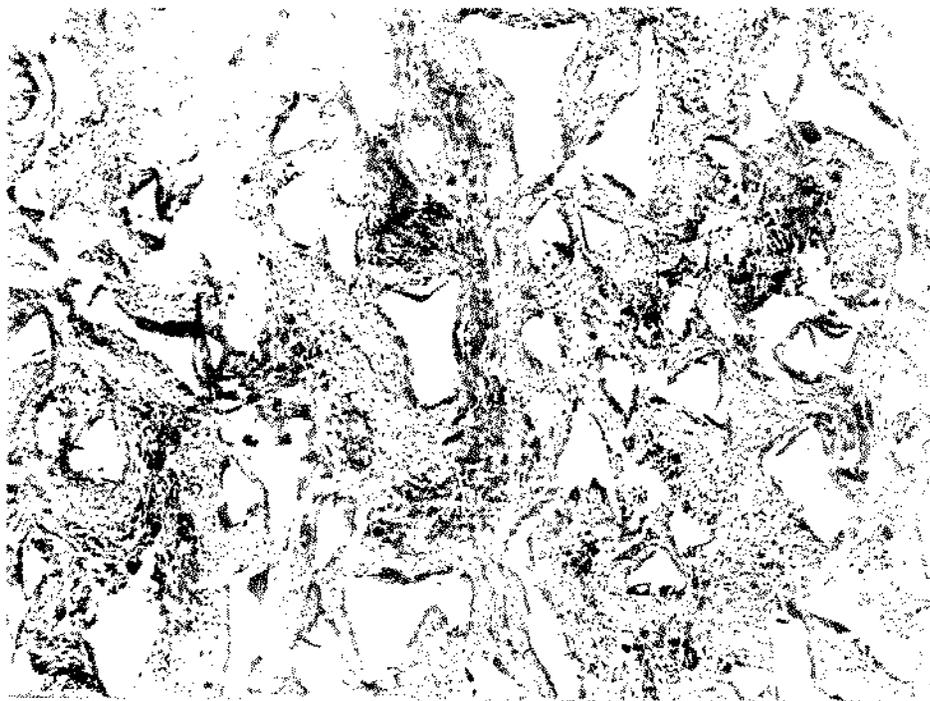
*Fig. 12. Tecido de granulação com 24 dias de evolução. Os macrófagos formam pequenas concentrações, mostrando intensa atividade fagocitária. 40 X.*

Bc/4883



*Fig. 13. Granuloma com 45 dias de evolução. Os macrófagos estão concentrados em determinadas áreas do tecido de granulação. 10 X*

*Fig. 14. Nas grandes concentrações de macrófagos no tecido de granulação com 45 de evolução, a atividade fagocitária é intensa, como mostra a marcação celular pelas partículas de carvão. 40 X*



*Fig. 15. Macrófagos com intensa atividade fagocitária. Tecido de granulação com 45 dias de evolução. 100X*

*Fig. 16. Célula gigante multinucleada inflamatória tipo Langhans com intensa atividade fagocitária. Tecido de granulação com 45 dias de evolução. 100 X*

