

Ivani Aparecida de Souza



**Migração de neutrófilos induzida por enterotoxinas
estafilocócicas para a cavidade peritoneal de
camundongos: Participação de macrófagos**

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo (a) candidato (a) <i>Ivani Aparecida de Souza</i> e aprovada pela Comissão Julgadora. <i>26/11/99</i>

*Tese apresentada ao Instituto de Biologia da
Universidade Estadual de Campinas para
obtenção do título de Doutor em Biologia
Funcional e Molecular.*

Área de Concentração: Fisiologia

Orientadora: Profa. Dra. Glaci Ribeiro da Silva

Universidade Estadual de Campinas

Campinas

1999

20001761



UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	TIUNICAMP
	So 89m
V.	Ex
TOMBO BC/	40076
PROC.	278/00
C	☐
D	☒
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	27/04/00
N.º CPO	

CM-00130654-3

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP**

Souza, Ivani Aparecida de
So89m Migração de neutrófilos induzida por enterotoxinas estafilocócicas para a cavidade peritoneal de camundongos: participação de macrófagos/Ivani Aparecida de Souza. -- Campinas, SP: [s.n], 1999.
 121f: illus.

Orientadora: Glaci Ribeiro da Silva
 Tese(doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Enterotoxinas. 2. Macrófagos. 3. Inflamação neurogênica. I. Silva, Glaci Ribeiro da. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Data de Defesa: 26 / 11 / 1999

BANCA EXAMINADORA

Titulares

Profa. Dra. Glaci Ribeiro da Silva (Orientadora)

Prof. Dr. José Carlos Gomes

Profa. Dra. Yara Cury

Prof. Dr. Miguel Arcanjo Areas

Prof. Dra. Alba Regina Maria Souza Brito

Suplentes

Prof. Dr. Edgard Ferro Collares

Profa. Dra. Sandra Helena Poselli Farsky

Dedico este trabalho

A meus pais, Cassimiro e Maria Izabel, pela abnegação, pelo apoio e por terem renunciado a seus sonhos em favor dos meus.

Maravilhoso será, se um dia eu merecer de meus filhos, o mesmo orgulho que hoje sinto de vocês

Àqueles que, com olhos humildes, falam-nos de sua vontade de viver, ou seja, aos animais que, solicitados pela Ciência, foram sacrificados em prol desta pesquisa, o meu respeito e a minha eterna gratidão

... Conta-se que, uma vez, em casa de Pedro, Tadeu, revoltado contra os dominadores de Roma e contra os rabinos do Sinédrio, reclamava sobre a discórdia e o sofrimento reinantes entre o povo, resultantes das deficiências políticas da época.

Jesus, então, ter-lhe-ia perguntado:

- Tadeu, como interpreta você a felicidade?
- Senhor, a felicidade é a paz de todos.

E Jesus ponderou:

- Compreendo, mas gostaria de saber como você se sentiria realmente feliz?

E Tadeu enunciou:

- Mestre, suponho que eu atingiria a suprema felicidade se:
- Pudesse alcançar a compreensão dos outros;
- Pudesse confiar em meus semelhantes;
- Tivesse o respeito de todos;
- Não falassem mal de mim;
- Se houvesse cordialidade entre todos;
- Se todos vissem o meu sincero propósito de acertar;
- Se não houvesse a indiferença, a calúnia, o sarcasmo, a suspeita e a impiedade entre os homens;
- Se a maldade, esse fantasma de dor, não existisse no meu caminho;
- Se meus parentes, afeiçoados e amigos me buscassem, não pelo que aparento ser nas imperfeições do corpo, mas pelo conteúdo de boa vontade que conservo em minha alma;
- Se todos que caminham comigo me concedessem o direito de ser feliz à minha maneira, desde que não prejudicasse ninguém. Resumindo, eu queria ser compreendido, respeitado e estimado por todos.

Calou-se o apóstolo e todos os presentes esperavam que Jesus fizesse uma comprida dissertação, mas o Mestre fixou os olhos no discípulo e falou com franqueza e doçura:

- Tadeu, se você procura a alegria e a felicidade do mundo inteiro, PROCEDA COM OS OUTROS, COMO DESEJA QUE OS OUTROS PROCEDAM COM VOCÊ...

Néio Lúcio

Agradecimentos

Estarei sempre cometendo graves omissões ao formular uma lista de agradecimentos, pois tenho a convicção de que todos, sem exceção, que participaram de meu círculo de relacionamento exerceram e exercerão um papel fundamental na minha formação pessoal e profissional. Deste modo, peço desculpas, antecipadamente, àqueles que não forem mencionados nesta breve lista.

À Profa. Dra. Glaci Ribeiro da Silva, pela oportunidade de crescimento científico, pela amizade e pela orientação.

Ao Prof. Dr. Stephen Hyslop, pelo auxílio na elaboração dos manuscritos e pela agradável convivência nos últimos meses.

Ao Prof. Dr. Edson Antunes, pela amizade, pelas valiosas sugestões e pela doação das várias drogas utilizadas.

Aos Profs. Drs. Sérgio Henrique Ferreira e Fernando Queiroz Cunha pela oportunidade de realização de um estágio, que resultou no aprendizado de grande parte das técnicas empregadas neste trabalho.

Aos docentes do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, pelo convívio e pela utilização dos recursos deste Departamento.

Aos docentes do Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Biologia da UNICAMP, pela simpatia com que sempre me acolheram.

À coordenadoria da subcomissão de pós-graduação do Departamento de Fisiologia e Biofísica, pela paciência e apoio constantes.

Ao Prof. Dr. Ary Domingos do Amaral, pela sua participação ativa no aprimoramento de meus conhecimentos em Fisiologia.

Aos funcionários do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp, pelas facilidades proporcionadas e pelo carinho com que me trataram durante a realização deste trabalho.

Aos funcionários do Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Biologia da Unicamp, pela dedicação e pela amizade.

Ao Miguel Borges da Silva e ao Adilson José Thomaz, pelo cuidado e dedicação aos animais do Biotério do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp.

Ao Helinho, pelo carinho, pelo apoio aos meus estudos e principalmente pela compreensão de minhas ausências.

Aos amigos, Lúcia, Simone, Pamela, Sônia, Gildo, Yoko, Janaína e Cogo, pela amizade e gratificante convivência.

À amiga Carla, pelo auxílio na realização de algumas etapas técnicas deste trabalho e pela sua alegria que amenizou vários momentos difíceis.

À Alessandra, pela amizade, apoio e incentivo constantes.

A todos que, por motivos alheios à minha vontade, não me compreenderam ou não se fizeram compreender, por terem me ensinado o verdadeiro sentido da paciência e da resignação.

À FAPESP, ao FAEP/Unicamp e ao CNPq pela concessão de bolsa e auxílios financeiros, sem os quais a realização deste trabalho seria impossível.

Sumário

Lista de Abreviações

Lista de Ilustrações

Lista de Materiais

Resumo

1. Introdução	01
1.1 Reação Inflamatória	02
1.2 Participação dos macrófagos na reação inflamatória aguda	07
1.3 Enterotoxinas estafilocócicas	10
Objetivos	13
 2. Materiais e Métodos	14
2.1 Animais	15
2.2 Enterotoxinas estafilocócicas	15
2.3 Condições experimentais	15
2.4 Migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal	16
2.5 Migração de neutrófilos para a bolsa de ar subcutânea	17
2.6 Efeito da polimixina B sobre a migração de neutrófilos induzida por SEA ou SEB	17
2.7 Pré-tratamento com inibidores e antagonistas farmacológicos	18
2.7.1 Drogas utilizadas	18
2.7.2 Esquemas de tratamento	18
2.8 Efeito do aumento do número de macrófagos peritoneais sobre a migração de neutrófilos, induzida por SEA ou SEB	19

2.9 Efeito da depleção de macrófagos peritoneais sobre a migração de neutrófilos induzida por SEA ou SEB	19
2.10 Incubação <i>in vitro</i> de macrófagos peritoneais de camundongos com enterotoxinas estafilocócicas	20
2.11 Contaminação dos componentes quimiotáticos para neutrófilos com endotoxina bacteriana	21
2.12 Caracterização parcial das substâncias quimiotáticas para neutrófilos, liberadas por macrófagos estimulados com SEs	22
2.12.1 Influência da temperatura	22
2.12.2 Efeito de inibidores de síntese protéica	22
2.12.3 Efeito de enzimas proteolíticas	22
2.12.4 Ultrafiltração dos sobrenadantes	23
2.13 Efeito de inibidores e antagonistas farmacológicos sobre a liberação dos componentes quimiotáticos para neutrófilos	23
2.13.1 Drogas utilizadas	23
2.13.2 Esquemas de tratamento	24
2.14 Efeito de inibidores e antagonistas farmacológicos sobre a migração de neutrófilos induzida pelo sobrenadantes das incubações de macrófagos com SEs	24
2.14.1 Drogas utilizadas	24
2.14.2 Esquema de tratamento	25
2.15 Naálise Estatística	25
2.16 Preparo do soluções drogas e reagentes	26
2.16.1 BN52021	26
2.16.2 BWA4C	26
2.16.3 BW755C	26
2.16.4 Capsaicina	27
2.16.5 Ciclohexemida	27

3.5 Liberação de componentes quimiotáticos para neutrófilos por macrófagos incubados <i>in vitro</i> com SEA ou com SEB	43
3.6 Caracterização parcial dos componentes quimiotáticos para neutrófilos presentes nos SM-SEA e SM-SEB	51
3.7 Participação de macrófagos peritoneais residentes sobre a migração de neutrófilos, induzida pelo SM-SEA ou pelo SM-SEB	56
3.8 Efeito de inibidores e antagonistas farmacológicos sobre a migração de neutrófilos, induzida pelos SM-SEA ou SM-SEB	60
3.9 Efeito de antagonistas seletivos para receptores NK ₁ e NK ₂ de taquicininas sobre a migração de neutrófilos induzida pelos SM-SEA ou SM-SEB	60
4. Discussão	63
5. Conclusões	81
Summary	84
6. Referências Bibliográficas	86
Apêndices	105

Lista de Abreviações

AA	Ácido araquidônico
ANOVA	Análise de variância
BSA	Bolsa de ar subcutânea (“Air-pouch”)
C5a	Quinto componente do sistema complemento-ativado
CEMIB	Centro Multi-Institucional de Bioterismo da Unicamp
CHM	Ciclohexemida
CTRY	Quimotripsina
CMT	Cimetidina
CO	Ciclooxigenase
CPS	Capsaicina
Dexa	Dexametasona
F	Filtrado coletado em membranas de ultrafiltração
fMLP	N-formil-metionil-leucil-fenilalanina
IL-1	Interleucina-1
IL-2	Interleucina-2
IL-6	Interleucina-6
IL-8	Interleucina-8
Indo	Indometacina
INF-γ	Interferon- γ
ip	Intraperitoneal
KRF	Krebs-Ringer fosfato
LO	Lipoxigenase
LPS	Lipopolisacarídeo bacteriano
LTB₄	Leucotrieno B ₄
MIP-1	Proteína inflamatória de macrófagos-1
MIP-2	Proteína inflamatória de macrófagos-2
MNCF	Fator quimiotático para neutrófilos liberado de macrófagos estimulados com LPS
N	Cavidades estimuladas com salina

N^w	Cavidades não submetidas à lavagem com salina estéril
PAF	Fator de ativação plaquetária
PBS	Salina fosfatada estéril
PMX	Polimixina B
q.s.	Quantidade suficiente para
R	Ressuspensão do material retido em membranas de ultrafiltração
SEA	Enterotoxina estafilocócica do tipo A
SEB	Enterotoxina estafilocócica do tipo B
SEs	Enterotoxinas estafilocócicas
SM-RPMI	Sobrenadantes de macrófagos estimulados com RPMI
SM-SEA	Sobrenadantes da incubação <i>in vitro</i> de macrófagos com SEA
SM-SEB	Sobrenadantes da incubação <i>in vitro</i> de macrófagos com SEB
SP	Substância P
Tg	Meio tioglicolato de sódio
TNF-α	Fator de necrose tumoral- α
TRY	Tripsina
W	Cavidades previamente lavadas com salina estéril

Lista de Ilustrações

Tabela 1. Curva dose-resposta da migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de camundongos, induzida por SEA ou por SEB	33
Tabela 2. Variação temporal da migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de camundongos, induzida por SEA ou por SEB	34
Figura 1. Efeito da incubação de soluções de SEA, SEB ou LPS com polimixina B sobre a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de camundongos	36
Figura 2. Migração de neutrófilos, induzida por SEA ou por SEB, para a bolsa de ar subcutânea	37
Figura 3. Influência do aumento no número de macrófagos peritoneais sobre a migração de neutrófilos, induzida por SEA ou por SEB em camundongos	39
Figura 4. Influência da diminuição no número de macrófagos peritoneais residentes sobre a migração de neutrófilos, induzida por SEA ou por SEB, em camundongos	40
Figura 5. Efeito do pré-tratamento com inibidores e antagonistas farmacológicos sobre a migração de neutrófilos, induzida por SEA ou por SEB, para a cavidade peritoneal de camundongos	42
Figura 6. Liberação de componentes quimiotáticos para neutrófilos por macrófagos estimulados <i>in vitro</i> com SEA ou SEB	45
Figura 7. Efeito da incubação, com polimixina B, dos sobrenadantes de macrófagos estimulados com SEA ou SEB, sobre a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal	46
Figura 8. Efeito da variação do período de pré-incubação ou de incubação sobre a liberação de componentes quimiotáticos para neutrófilos por macrófagos estimulados com SEA ou com SEB	47

Tabela 3. Influência do pH, temperatura e da presença de cálcio, magnésio e glicose no meio de incubação, sobre a liberação de componentes quimiotáticos para neutrófilos nos SM-SEA ou SM-SEB	50
Figura 9. Efeito da temperatura sobre a atividade quimiotática para neutrófilos dos sobrenadantes de macrófagos incubados com SEA ou SEB	52
Figura 10. Efeito da ciclohexemida sobre a liberação dos componentes quimiotáticos para neutrófilos no sobrenadante de macrófagos incubados com SEA ou com SEB	53
Figura 11. Efeito da incubação dos sobrenadantes de macrófagos estimulados com SEA ou com SEB com tripsina ou com quimotripsina sobre a migração de neutrófilos	54
Figura 12. Efeito da ultrafiltração dos sobrenadantes de macrófagos incubados com SEA ou com SEB sobre a migração de neutrófilos	57
Figura 13. Influência do aumento no número de macrófagos peritoneais sobre a migração de neutrófilos induzida por SM-SEA ou por SM-SEB em camundongos	58
Figura 14. Influência da diminuição no número de macrófagos peritoneais residentes sobre a migração de neutrófilos induzida por SM-SEA ou por SM-SEB	59
Figura 15. Efeito do pré-tratamento dos animais com inibidores ou antagonistas farmacológicos sobre a migração de neutrófilos, induzida pelos sobrenadantes da incubação de macrófagos com SEA ou com SEB	61
Figura 16. Efeito do pré-tratamento dos animais com antagonistas seletivos para receptores NK ₁ e NK ₂ de taquicininas sobre a migração de neutrófilos, induzida pelos sobrenadantes da incubação de macrófagos com SEA ou com SEB	62

Lista de Materiais

BN52021

Esta droga foi gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Edson Antunes do Departamento de Farmacologia, FCM, Unicamp

BW755C

Esta droga foi gentilmente cedida pelo Profa. Dra. Célia Regina Carlini do Departamento de Bioquímica, IB, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

BWA4C

Esta droga foi gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Edson Antunes do Departamento de Farmacologia, FCM, Unicamp

Polimixina B

Sigma Chem. Co. (St. Louis, EUA)

Ciclohexemida

Sigma Chem. Co. (St. Louis, EUA)

Cimetidina

Sigma Chem. Co. (St. Louis, EUA)

Capsaicina

Sigma Chem. Co. (St. Louis, EUA)

Corante Cristal Violeta

Merck (Darmstadt, Alemanha)

Dexametasona

Prodome

Dextrana

Sigma Chem. Co. (St. Louis, EUA)

DMSO

Sigma Chem. Co. (St. Louis, EUA)

Heparina

Roche

Indometacina

Sigma Chem. Co. (St. Louis, EUA)

Lipopolissacarídeo de *E. Coli*

Sigma Chem. Co. (St. Louis, EUA)

Corante May Grünwald's

Merck (Darmstadt, Alemanha)

Sais e Reagentes

Merck (Darmstadt, Alemanha)

SR140333

Esta droga foi gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Edson Antunes do Departamento de Farmacologia, FCM, Unicamp

SR48968

Esta droga foi gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Edson Antunes do Departamento de Farmacologia, FCM, Unicamp

Quimotripsina

Sigma Chem. Co. (St. Louis, EUA)

Meio de cultura RPMI 1640

Sigma Chem. Co. (St. Louis, EUA)

Tripsina

Sigma Chem. Co. (St. Louis, EUA)

Enterotoxina estafilocócica do tipo A

Sigma Chem. Co. (St. Louis, EUA)

Enterotoxina estafilocócica do tipo B

Sigma Chem. Co. (St. Louis, EUA)

Soro albumina bovina

Sigma Chem. Co. (St. Louis, EUA)

Substância P

Esta droga foi gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Edson Antunes do Departamento de Farmacologia, FCM, Unicamp

Tioglicolato de sódio

Difco

Corante vital Azul de Trypan

Merck (Darmstadt, Alemanha)

Tween 80

Sigma Chem. Co. (St. Louis, EUA)

Resumo

Este trabalho descreve a participação de macrófagos sobre o influxo de neutrófilos, induzido pelas enterotoxinas estafilocócicas A (SEA) e B (SEB) em cavidades peritoneais de camundongos. Nossos resultados demonstraram que estas toxinas induzem influxo de neutrófilos, dose e tempo-dependente, para a cavidade peritoneal de camundongos. Este fenômeno foi quantitativamente menor, quando estas SEs foram injetadas em uma cavidade artificial, desprovida de células residentes, tal como a bolsa de ar subcutânea.

A migração de neutrófilos, induzida por estas toxinas, foi potencializada em cavidades peritoneais com o número basal de macrófagos aumentado pelo pré-tratamento com Tg, e, reduzida em cavidades com número de macrófagos diminuído, através da lavagem prévia com salina estéril, confirmando a hipótese de que a habilidade destas toxinas em induzir migração de neutrófilos *in vivo* está correlacionada com o número de macrófagos.

O influxo de neutrófilos induzido por estas SEs, na cavidade peritoneal, foi reduzido em animais pré-tratados com os seguintes inibidores e antagonistas farmacológicos: dexametasona; inibidor de lipoxigenase (BWA4C); antagonista de PAF (BN52021); antagonista H_2 de histamina (cimetidina); depletor de neuropeptídeos de fibras C sensoriais (capsaicina), mas não foi reduzido com o uso de um inibidor da ciclooxigenase (indometacina). Estes dados sugerem que os mediadores inflamatórios envolvidos na infiltração de neutrófilos produzida por estas SEs incluem metabólitos da LO, PAF, histamina e neuropeptídeos de fibras C sensoriais.

Os sobrenadantes resultantes da incubação *in vitro* de macrófagos peritoneais de camundongos com SEA (SM-SEA) ou com SEB (SM-SEB), induzem migração de neutrófilos *in vivo*. A liberação das substâncias

quimiotáticas para neutrófilos nestes sobrenadantes depende de pH e temperatura próximos ao fisiológico e da presença de cálcio, magnésio e da glicose no meio de incubação, sugerindo que estas substâncias são secretadas por um processo ativo.

A ciclohexemida, um inibidor de síntese proteica, inibe a liberação destas substâncias quimiotáticas para neutrófilos. Além disto, a atividade quimiotática do SM-SEA ou do SM-SEB é reduzida após o aquecimento a 100°C. Estes resultados sugerem que as substâncias quimiotáticas para neutrófilos, descritas neste trabalho, são proteínas termolábeis.

A liberação destas proteínas, foi dose e tempo-dependente e foi inibida pelo pré-tratamento dos macrófagos com dexametasona mas não com indometacina ou com BW755C.

A proteína presente no SM-SEA possui peso molecular maior que 100.000, enquanto que a proteína presente no SM-SEB possui peso molecular entre 1.000-3.000. A migração de neutrófilos induzida pelo SM-SEB envolve mediadores tais como metabólitos da LO, PAF e histamina, enquanto que estes mediadores não participam da resposta migratória induzida pelo SM-SEA, sugerindo que estas proteínas possuem características distintas e induzem acúmulo de neutrófilos por mecanismos distintos.

Em ambos os casos, a migração de neutrófilos foi reduzida em animais pré-tratados com capsaicina ou com SR140333 (antagonista seletivo de receptores de taquicininas NK₁), mas não em animais pré-tratados com SR48968 (antagonista seletivo de receptores de taquicininas NK₂), sugerindo que estas proteínas induzem migração via liberação de substância P.

Nossos resultados contribuem para o melhor esclarecimento do mecanismo de ação das SEs e sugerem que produtos de macrófagos modulam o influxo neutrófilos induzido por estas toxinas.

1. Introdução

1.1 Reação Inflamatória

A reação inflamatória é considerada uma resposta de defesa do organismo, ou mais especificadamente, dos tecidos vascularizados, contra a invasão por agentes infecciosos, por danos físicos, químicos ou traumáticos (ROCHA & SILVA, 1978).

A primeira fase da reação inflamatória é denominada de fase aguda sendo que, dependendo do estímulo ser ou não persistente, esta reação pode tornar-se crônica, podendo, muitas vezes, ser prejudicial ao organismo. Frequentemente, após a fase aguda, ocorre a resolução do processo em razão da eliminação dos agentes causadores (SEDGWICK & WILLOUGHBY, 1985).

Várias substâncias, denominadas de mediadores da inflamação, são formadas e liberadas concomitante ou sequencialmente no foco inflamatório. A origem destes mediadores pode ser plasmática (fatores do sistema complemento, bradicinina) ou celular (histamina, serotonina, prostaglandinas, fator de ativação plaquetária, leucotrienos, citocinas e outros). Estes mediadores estão envolvidos na gênese e ou manutenção dos eventos característicos do processo inflamatório agudo (eventos vasculares e celulares). O grau de desenvolvimento destes eventos, normalmente, está correlacionado à gravidade e à extensão da lesão (FERENCÍK & STVRTINOVÁ, 1996).

Os fenômenos vasculares da reação inflamatória aguda incluem:

- 1) Vasodilatação, com conseqüente aumento de fluxo sanguíneo no foco inflamatório. Os metabólitos do ácido araquidônico (AA), via ciclooxygenase (CO), tais como prostaglandinas da série E e a prostaciclina, bem como a bradicinina, histamina e óxido nítrico são os principais mediadores

inflamatórios responsáveis pela vasodilatação (HURLEY, 1978; WILLIAMS, 1985; MONCADA *et al.*, 1991).

2) Aumento de permeabilidade vascular, com conseqüente passagem de proteínas plasmáticas para o interstício, as quais não seriam filtradas em condições fisiológicas. O aumento de permeabilidade vascular somado ao aumento da pressão de filtração, por causa da vasodilatação, leva à formação do edema inflamatório. Este fenômeno deve-se à ação de mediadores sobre as células endoteliais venulares, induzindo contração das mesmas, o que permite a passagem de moléculas de alto peso molecular, tais como as proteínas plasmáticas, para o tecido inflamado (WILLIAMS, 1985; MAJNO, 1985). Entre estes mediadores citam-se: cininas, histamina, serotonina, leucotrienos, fator de ativação plaquetária (PAF), o quinto componente do sistema complemento (C5a) e substâncias liberadas localmente, das terminações nervosas (taquicininas e o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina) (WILLIAMS, 1985; BRAIN & WILLIAMS, 1985; HUA, 1986).

Um outro fator importante que contribui para a formação de edema é a presença de leucócitos na microcirculação envolvida no foco inflamatório. Esta correlação está baseada na verificação de que muitos estímulos inflamatórios, tais como o lipopolissacarídeo bacteriano (LPS), zimosan, leucotrieno B₄ (LTB₄), C5a e o N-formil-metionil-leucil-fenilalanina (fMLP) não são capazes de induzir edema em animais de laboratório que se tornaram leucopênicos. Além disto, a reposição dos leucócitos aos níveis normais restaura a formação do edema induzido por estes estímulos (WEDMORE & WILLIAMS, 1981; ISSEKUTZ, 1984).

A mobilização adequada dos leucócitos, da microcirculação para o foco inflamatório, é também uma etapa fundamental para a defesa do organismo

contra os agentes lesivos (HARKNESS, 1981; RICEVUTI & MAZZONE, 1987).

Muitas células envolvidas na resposta inflamatória já estão presentes nos tecidos, tais como as células endoteliais, mastócitos e células mononucleares residentes, enquanto que outras chegam ao foco inflamatório provenientes do sangue, como é o caso dos leucócitos polimorfonucleares (neutrófilos, eosinófilos e basófilos) e as células mononucleares (monócitos e linfócitos) (DALE & FOREMAN, 1989).

Tem-se demonstrado que a adesão de leucócitos à parede do endotélio vascular envolve uma série de processos complexos de interações específicas, entre moléculas de adesão presentes nos leucócitos e nas superfícies das células endoteliais (HARLAN, 1985; BEVILACQUA *et al.*, 1989; OSBORN, 1990; MACKAY & IMHOF, 1993). Estas moléculas de adesão são classificadas, quanto à sua estrutura molecular, em 3 famílias: selectinas, integrinas e superfamílias das imunoglobulinas (CRONSTEIN & WEISSMAN, 1993).

Utilizando-se várias condições experimentais, concluiu-se que os diversos eventos envolvidos na migração celular seguem basicamente os seguintes passos: 1) “rolling” (deslizamento) dos leucócitos pela parede dos vasos, através de interações entre os leucócitos e as células endoteliais; esta etapa envolve principalmente as selectinas e integrinas. 2) Ativação de leucócitos por ação de agentes quimiotáticos ou integrinas; 3) Adesão de alta afinidade, devido à mudança conformacional do leucócito por ação das integrinas. 4) Migração dos leucócitos do lúmen vascular para o espaço extravascular (SMITH *et al.*, 1991; MACKAY & IMHOF, 1993; ROSSI & HELLEWELL, 1994).

Os neutrófilos são as primeiras células que chegam ao foco inflamatório, sendo predominantemente encontrados no exsudato formado nos estágios iniciais da maioria dos processos inflamatórios. A principal função dos neutrófilos é a fagocitose dos estímulos que desencadearam a reação inflamatória. Para a digestão destas substâncias, os neutrófilos possuem estocados, em diferentes tipos de grânulos citoplasmáticos, um conjunto de substâncias com atividades enzimáticas. Assim, nos grânulos azurófilos encontram-se, principalmente, lisoenzimas, mieloperoxidasas, elastases, catepsinas, hidrolases ácidas, entre outras. Os grânulos específicos contêm principalmente, lisoenzimas, collagenases e lactoferrina. (DALE, 1984; LEHRER *et al.*, 1988). Além da utilização do conteúdo destes grânulos, o processo de fagocitose ativa o metabolismo oxidativo celular, caracterizado por aumento de consumo de oxigênio e ativação da via hexosemonofosfato, com geração de radicais livres derivados do oxigênio e de produtos do seu metabolismo, os quais também possuem atividade microbicida (BAGGIOLINE, 1984; DOHERTY & JANUSZ, 1994). Embora as funções, tanto dos radicais livres como do conteúdo destes grânulos citoplasmáticos, sejam a digestão e (ou) morte do material fagocitado, observa-se, freqüentemente, a destruição do tecido inflamado em virtude da ação destas substâncias, as quais podem ser secretadas pelos leucócitos presentes no foco, ou então, serem liberadas após a morte dos mesmos (DALE, 1984; MACHLIN & BENDICH, 1987; DOHERTY & JANUSZ, 1994).

A resposta mais precoce dos neutrófilos, no processo de migração, é a sua adesão à parede do endotélio venular. Vários mediadores inflamatórios, entre os quais a interleucina-1 (IL-1), fator de necrose tumoral- α (TNF- α), LTB₄, PAF e C5a podem aumentar a adesividade entre os neutrófilos e as

células endoteliais (MACMILLAN & FOSTER, 1988; LEHRER *et al.*, 1988).

As substâncias que induzem migração de neutrófilos podem ser divididas em substâncias endógenas e exógenas. Os fatores quimiotáticos endógenos são liberados pelas células do organismo, quando estimuladas, ou então, são ativadas a partir de um precursor inativo. Dentre estes fatores, podemos citar: LTB₄, IL-1, TNF, linfocinas e peptídeos liberados por macrófagos (ALTMAN, 1978; SMITH, FORD-HUTCHINSON, BRAY, 1980; REYNOLDS, 1983; WILKINSON, 1984; FANTONE, 1985; BECK *et al.*, 1986; CYBULSKY, COLDITZ, MOVAT, 1986; MING, BERSANI, MANTOVANI, 1987; MACMILLAN & FOSTER, 1988). Estes dados mostram claramente, que vários mediadores liberados no foco inflamatório são quimiotáticos para neutrófilos.

Os fatores quimiotáticos exógenos não devem ser confundidos com substâncias exógenas que induzem migração de neutrófilos. Enquanto que, estas últimas induzem migração indiretamente, ou seja, através da liberação e (ou) ativação dos fatores quimiotáticos endógenos, os fatores quimiotáticos exógenos agem diretamente nos neutrófilos, ativando os seus mecanismos de locomoção e aderência. Entre estas substâncias são citados o peptídeo fMLP, os demais formil-peptídeos e a caseína (WILKINSON, 1984).

Conforme mencionado anteriormente o recrutamento de neutrófilos para o sítio inflamatório envolve vários mediadores endógenos com propriedades quimiotáticas tais como o C5a (YANCEY, 1989), LTB₄ (MACMILLAN & FOSTER, 1988) e as interleucinas, IL-1, TNF- α (FACCIOLI, *et al.*, 1990), e IL-8 (RIBEIRO *et al.*, 1991). O mecanismo pelo qual estes mediadores induzem influxo de neutrófilos pode estar relacionado com a ativação dos mecanismos de locomoção e aderência dos neutrófilos, como é o caso do C5a

(RIBEIRO *et al.*, 1997) ou também, via estimulação de mastócitos ou macrófagos residentes com conseqüente liberação de fatores quimiotáticos para neutrófilos. Dentre os mediadores que podem induzir a liberação de fatores quimiotáticos por células residentes, podemos citar a IL-1, TNF- α , IL-8 e o LTB₄ (RIBEIRO *et al.*, 1991; RIBEIRO *et al.*, 1997; FACCIOLI *et al.*, 1990).

Além disto, substâncias liberadas localmente de terminações nervosas sensoriais, como é o caso da substância P (SP), também são capazes de promover acúmulo de leucócitos nos tecidos inflamados (FOREMAN, 1987; WALSH *et al.*, 1995). A SP e o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina, são os principais responsáveis pelo desenvolvimento da inflamação neurogênica, que pode ser provocada pela estimulação elétrica, química e ou mecânica de neurônios sensoriais. A inflamação neurogênica envolve ainda eventos tais como vasodilatação, extravasamento de proteínas plasmáticas e ativação de mastócitos (INOUE *et al.*, 1997). É importante ressaltar que a ativação de mastócitos, pode resultar na liberação de mediadores com propriedades quimiotáticas para neutrófilos, como por exemplo o LTB₄ que é considerado o principal responsável pela infiltração de leucócitos, observada na pele de camundongos administrados com SP (FOREMAN, 1987; IWAMOTO *et al.*, 1993).

1.2 Participação dos macrófagos na reação inflamatória aguda

Atualmente, o conceito de que os macrófagos participam exclusivamente da fase crônica da reação inflamatória não encontra mais suporte na literatura. Assim, tem-se demonstrado que os macrófagos residentes têm importante papel no desenvolvimento de vários eventos descritos como fase aguda da reação

inflamatória, podendo ser considerados como células de alarme (FERREIRA, 1980). Estas células são responsáveis pela iniciação da mobilização de neutrófilos, da circulação para as regiões de dano tissular e também pelo desencadeamento de outros eventos inflamatórios, tais como edema e dor (CUNHA & FERREIRA, 1986). Estes fenômenos envolvem citocinas, entre as quais a IL-1, interleucina-8 (IL-8), TNF- α e interferon- γ (INF- γ) (AKIRA, HIRANO, KISHIMOTO, 1990; SHERRY & CERAMI, 1991; DINARELLO, 1993), sendo os macrófagos a principal fonte das mesmas. Deve-se ressaltar ainda, que os macrófagos são encontrados em quase todos os tecidos e fluidos do organismo (EDELSON, 1980).

Os macrófagos, quando expostos a uma variedade de agentes inflamatórios, podem sofrer profundas modificações morfológicas e bioquímicas, normalmente acompanhadas da aquisição e (ou) perda de funções. Normalmente, essas modificações funcionais, denominada de estado de ativação, são também acompanhadas de alterações quantitativas e qualitativas na secreção de vários produtos. Este estado ativado pode ser alcançado *in vitro*, pela exposição de macrófagos a substâncias tais como o LPS (ADMAS & HAMILTON, 1988), polirribonucleotídeos sintéticos (EVANS & ALEXANDER, 1976) e ainda RNA poli A(+), obtido de baço de camundongos infectados com *Trypanossoma cruzi* (BERTOLONI & DE LUCCA, 1986). Algumas das modificações funcionais mais importantes incluem: aumento da taxa de oxidação de glicose (POULTER & TURK, 1975), aumento de síntese protéica (KELLER *et al.*, 1974), secreção e aumento da síntese de enzimas lisossomais (GORDON, 1976), expressão de novos antígenos de superfície (KAPLAN & MORHANAKUNAR, 1977), aumento de responsividade a estímulos quimiotáticos (MELTZER, JONES, BOETCHER, 1975), aumento da

liberação de intermediários reativos de oxigênio (NATHAN & ROOT, 1977) e de nitrogênio (MONCADA, PLAMER, HIGGS, 1991) e aumento na produção e liberação de IL-1 e TNF- α (NATHAN, 1987; ADAMS & HAMILTON, 1988).

O conceito de que os macrófagos desempenham importante papel na migração de neutrófilos para o foco inflamatório, é apoiado pela verificação de que a migração destas células, em resposta a estímulos inflamatórios exógenos, (carragenina, LPS, toxina A do *Clostridium difficile* e zymosan) é potencializada, quando o número de macrófagos é artificialmente aumentado, através do pré-tratamento dos animais com meio tioglicolato (HARMSEN & HAVEL, 1990; KLEIN, CUNHA, FERREIRA, 1995; RIBEIRO *et al.*, 1997). Por outro lado, a habilidade destas substâncias em induzir migração de neutrófilos é reduzida em animais cuja a população de macrófagos peritoneais foi depletada através da lavagem prévia das cavidades com salina estéril (SOUZA *et al.*, 1988).

Além disto, sabe-se que macrófagos peritoneais de ratos, quando incubados *in vitro* com LPS, liberam para o meio de incubação, um fator quimiotático para neutrófilos (MNCF) com peso molecular de 54.000. A migração de neutrófilos induzida pelo MNCF, possui uma característica peculiar, pois não é afetada pelo pré-tratamento dos animais com glicocorticóides. Vários autores têm sugerido que o MNCF pode ser o mediador final da migração de neutrófilos induzida por vários estímulos inflamatórios, incluindo as citocinas, IL-1, TNF- α , INF- γ (CUNHA & FERREIRA, 1986; FACCIOLI *et al.*, 1990; RIBEIRO *et al.*, 1990; RIBEIRO *et al.*, 1997).

1.3 Enterotoxinas estafilocócicas

As enterotoxinas estafilocócicas (SEs) pertencem à uma família de proteínas tóxicas que são produzidas e excretadas por algumas cepas de *Staphylococcus aureus*. Estas toxinas são responsáveis pela maioria das intoxicações alimentares em humanos, podendo causar várias alterações fisiopatológicas que podem levar à incapacitação, choque e morte (LECLAIRE, *et al.*, 1995).

A SEs são proteínas básicas com peso molecular entre 25.000 - 30.000, estáveis em meio ácido, resistentes ao aquecimento e à digestão por enzimas proteolíticas. Estas toxinas são estruturalmente semelhantes entre si e foram classificadas por critérios imunológicos, em cinco tipos diferentes designados alfabeticamente de A a E (BERGDOLL, 1979; 1989; IANDOLO, 1989).

O(s) mecanismo(s) de ação *in vivo* destas toxinas ainda não foram claramente elucidados, devido à falta de um modelo animal e de um sistema experimental adequado (FREER & ARBUTHNOTT, 1986; BERGDOLL & CHESNEY, 1991; BOBAK & GUERRANT, 1992; MICUSAN & THIBODEAU, 1993). No entanto, vários autores têm sugerido que as manifestações enteropatológicas destas toxinas podem envolver a estimulação de três tipos celulares principais: os neurônios do trato-gastrointestinal, macrófagos e linfócitos, sendo este último estimulado somente quando estas toxinas são administradas sistemicamente (MICUSAN & THIBODEAU, 1993).

De acordo com estes autores, a estimulação dos neurônios sensoriais do trato gastrointestinal é seguida pela liberação de neuropeptídeos, que podem incluir a substância P (MICUSAN & THIBODEAU, 1993), o principal

mediador da inflamação neurogênica (FOREMAN, 1987; PARTSCH & MATUCCI-CERINIC, 1992). Estes neuropeptídeos agiriam então em mastócitos, levando à liberação de IL-1, TNF- α , histamina, serotonina e leucotrienos (MICUSAN & THIBODEAU, 1993; SEKÁLY, 1993; BOBAK & GUERRANT, 1992; JETT *et al.*, 1990).

Trabalhos recentes em nosso laboratório, têm sugerido que, tanto a enterotoxina estafilocócica do tipo A (SEA) como a do tipo B (SEB) induzem em camundongos, inflamação do tipo neurogênica. Esta hipótese está baseada na observação de que a capsaicina, uma substância classicamente empregada para depletar as fibras C sensoriais do seu conteúdo de neuropeptídeos, é capaz de reduzir acentuadamente o edema e a exsudação plasmática causada por estas SEs na pata de camundongos (DESOUZA, BERGDOLL, RIBEIRO-DASILVA, 1996; DESOUZA & RIBEIRO-DASILVA, 1998). Estes dados mostram ainda, que existe uma correlação entre os resultados obtidos no modelo experimental de inflamação em camundongos com o modelo experimental de enterotoxemia provocadas por estas toxinas em humanos, sugerindo portanto, que o nosso modelo experimental poderia ser útil para se estudar melhor o mecanismo de ação destas toxinas.

Várias toxinas bacterianas são capazes de estimular células de defesa do nosso organismo, a liberarem mediadores inflamatórios (MISFELDT *et al.*, 1990; FLEMING, IANDOLO, CHAPES, 1991; MELLO FILHO *et al.*, 1997). Os macrófagos são uma das principais células que, quando ativadas por estas toxinas, passam a liberar mediadores tais como: prostaglandinas, LTB₄, IL-1, IL-8, TNF- α e óxido nítrico. Estes mediadores estão envolvidos em vários eventos da reação inflamatória, incluindo a migração de leucócitos, aumento de permeabilidade vascular, febre e dor (FERREIRA, 1993; DINARELLO, 1991;

KLUGER, 1991).

Além disto, conforme mencionado anteriormente, existem várias evidências experimentais de que os mastócitos, macrófagos e linfócitos também desempenham importante papel no desenvolvimento dos eventos fisiopatológicos das SEs (SCHEUBER *et al.*, 1987; MICUSAN & THIBODEAU, 1993). Estas células, quando estimuladas com SEs, são capazes de liberar mediadores inflamatórios tais como histamina, serotonina, leucotrienos e citocinas tais como: IL-1, interleucina-2 (IL-2), interleucina-6 (IL-6), IL-8, TNF- α e INF- γ (SCHEUBER *et al.*, 1987, MARRACK & KAPPLER, 1990; HASKÓ *et al.*, 1998).

Os neutrófilos são as principais células envolvidas na resposta de defesa do organismo contra os *Staphylococcus aureus* (HILL *et al.*, 1976). Além disto, acentuado acúmulo destas células também pode ser observado durante as gastroenterites induzidas por SEs em humanos (ZEHAVI-WILLNER, SHENBERG, BARNES, 1984).

As SEs compartilham várias propriedades biológicas com o LPS, tais como aumento dos níveis de fibrinogênio no plasma, febre e liberação de TNF- α por células mononucleares (BERGDOLL & CHESNEY, 1991). O acúmulo de neutrófilos em exsudatos inflamatórios, induzidos pelo LPS, é controlado por macrófagos peritoneais residentes, que quando estimulados *in vitro* com esta endotoxina, liberam o MNCF, que parece ser o principal mediador deste fenômeno (CUNHA & FERREIRA, 1986).

Diante do exposto acima, pareceu-nos de fundamental importância, caracterizar o influxo de neutrófilos induzido por SEs para a cavidade peritoneal de camundongos, procurando investigar a participação de macrófagos neste fenômeno.

Embora todas as SEs possuam quase a mesma estrutura e sequência de aminoácidos e compartilhem de várias propriedades biológicas, autores como LECLAIRE *et al.* (1995) acreditam que o mecanismo pelos quais estas toxinas causam os seus efeitos característicos diferem, de acordo com o tipo de SE causadora. Por este motivo, procuramos caracterizar, neste trabalho, os eventos celulares da resposta inflamatória induzida por duas SEs disponíveis no mercado, a SEA e a SEB.

Objetivos

Esta tese teve como objetivo principal investigar a participação de macrófagos sobre o influxo de neutrófilos, induzido pela SEA ou pela SEB, em cavidades peritoneais de camundongos.

Para isto, os seguintes parâmetros foram investigados:

- ❶ Influência da população de macrófagos peritoneais residentes sobre a migração de neutrófilos, induzida por estas duas toxinas.
- ❷ Caracterização farmacológica dos possíveis mediadores inflamatórios envolvidos na migração de neutrófilos induzida por estas SEs.
- ❸ Produção, *in vitro*, de fatores quimiotáticos para neutrófilos, por macrófagos peritoneais de camundongos, incubados com SEA ou com SEB.

2. Materiais e Métodos

2.1 Animais

Foram usados camundongos Swiss, machos, pesando 25 a 30g, provenientes do Centro Multi-Institucional de Bioterismo da Unicamp. Esses animais foram transferidos para o Biotério do Departamento de Farmacologia, pelo menos 24 h antes dos experimentos, onde foram mantidos a 24°C, com iluminação diária de 12 h e com água e alimentação *ad libitum*.

2.2 Enterotoxinas Estafilocócicas

Tanto a SEA como a SEB foram dissolvidas em salina fosfatada estéril e as soluções estoques armazenadas na geladeira. As diluições subseqüentes também foram feitas utilizando-se PBS ou meio de cultura RPMI1640 como veículo, imediatamente antes do uso das toxinas.

2.3 Condições experimentais

Todos os protocolos experimentais foram realizados em condições assépticas, utilizando-se para isto uma câmara de fluxo laminar vertical. Tanto as soluções, como as vidrarias utilizadas, foram autoclavadas a 127°C, durante 1 h.

2.4 Migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal

A migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de camundongos, foi avaliada de acordo com técnica descrita por SOUZA *et al.* (1988). Para isto, os animais foram divididos em grupos (n=5), sendo que o grupo-controle recebeu uma injeção intraperitoneal de 0,1 ml do veículo (PBS) e os grupos tratados receberam 0,1 ml de soluções de SEA (16-64 µg/cavidade), SEB (62,5-250 µg/cavidade), ou de LPS (50-800 ng/cavidade; controle-positivo). A migração de neutrófilos foi avaliada 4, 12, 24 e 72 h após a injeção dos estímulos inflamatórios. Para isto, os animais foram sacrificados, sendo a cavidade peritoneal lavada em seguida, com 3 ml de PBS contendo heparina (5UI/ml) e soro albumina bovina a 0,1%. Após leve massagem, retirou-se o maior volume possível do lavado.

A contagem total de leucócitos foi realizada em câmara de Neubauer, utilizando-se 20 µl do lavado, diluídos em 400 µl de solução Turk.

A contagem diferencial de leucócitos foi realizada após a confecção de lâminas, sendo que para isto 80µl do lavado foram centrifugados em citocentrífuga. As lâminas foram coradas a seguir, com corante May-Grünwalds e a leitura feita em um microscópio óptico com aumento de 1000 vezes (objetiva de imersão em óleo). Em cada lâmina, foram contadas 100 células, diferenciando 4 tipos celulares: neutrófilos, eosinófilos, mononucleares e mastócitos. O número de cada tipo celular foi calculado a partir da porcentagem encontrada, em relação ao número total de células.

2.5 Migração de neutrófilos para a bolsa-de-ar subcutânea (“Air-pouch”)

A bolsa de ar subcutânea (BSA) foi produzida de acordo com o método descrito por EDWARDS, SEDGWICK, WILLOUGHBY (1981). Para isto, os animais foram anestesiados com éter e receberam uma injeção de 5 ml de ar estéril, na pele do dorso. Três dias após, a cavidade formada foi mantida injetando-se mais 2,5 ml de ar estéril. No sexto dia após a primeira injeção, os animais foram divididos em grupos (n=5), sendo que o grupo-controle recebeu 0,1 ml de PBS e os grupos tratados receberam 0,1 ml de soluções de SEA (32 µg/ml), SEB (62,5 µg/cavidade) ou de dextrana (300 µg/cavidade; controle positivo).

Os animais foram sacrificados 12 h após a injeção dos estímulos e a avaliação da migração de neutrófilos seguiu o procedimento descrito no item 2.4.

2.6 Efeito da polimixina B sobre a migração de neutrófilos induzida por SEA ou SEB

A polimixina B (PMX) foi utilizada para avaliar a possível contaminação das soluções de SEA ou de SEB com endotoxina bacteriana. Assim, soluções de SEA (0,3 mg/ml) ou de SEB (2,5 mg/ml) ou ainda de LPS (2-8 µg/ml) foram incubadas por 10 min com PMX (3,5 mg/ml), a 37°C. Ao final deste período, estas soluções foram injetadas na cavidade peritoneal dos animais e a migração de neutrófilos avaliada 12 h após (MORRISON & JACOBS, 1976).

2.7 Pré-tratamento com inibidores e antagonistas farmacológicos

2.7.1 Drogas utilizadas

- Inibidor da síntese de citocinas e da fosfolipase A₂
Dexametasona (Dexa); 0,5 mg kg⁻¹ (BARJA-FIDALGO *et al.*, 1992).
- Inibidor da ciclooxigenase
Indometacina (Indo); 5 mg kg⁻¹ (HENRIQUES *et al.*, 1987).
- Inibidor da lipoxigenase
BWA4C; 10 mg kg⁻¹ (TATESON *et al.*, 1988).
- Antagonista dos receptores H₂ da histamina
Cimetidina (CMT); 2 mg kg⁻¹ (SCHEUBER *et al.*, 1985).
- Antagonista do fator de ativação plaquetária
BN52021; 10 mg kg⁻¹ (BARJA-FIDALGO *et al.*, 1992).
- Depletor de neuropeptídeos de fibras C sensoriais
Capsaicina (CPS); solução a 10 % (ALBER *et al.*, 1989).

2.7.2 Esquemas de tratamento

Todas as drogas mencionadas acima foram preparadas imediatamente antes de cada protocolo experimental. Com exceção da capsaicina, que foi aplicada topicamente, por um período de 8 dias (ALBER *et al.*, 1989), as demais drogas foram administradas subcutâneamente 1 h antes da injeção dos estímulos.

2.8 Efeito do aumento do número de macrófagos peritoneais sobre a migração de neutrófilos induzida por SEA ou SEB

O número de macrófagos peritoneais residentes foi aumentado pelo pré-tratamento com meio tioglicolato de sódio (Tg) (2 ml/cavidade, de uma solução a 3%, p/v em H₂O estéril), como descrito por RIBEIRO *et al.* (1990). Após 4 dias, SEA (16 µg/cavidade), SEB (62,5 µg/cavidade) ou LPS (200 ng/cavidade) foram injetados na cavidade peritoneal destes animais e a migração de neutrófilos foi avaliada 12 h após a administração destes estímulos.

A eficácia do pré-tratamento com Tg foi analisada através do número de macrófagos encontrados na cavidade de animais que receberam apenas Tg, comparado ao número de macrófagos encontrados em cavidades que receberam, nas mesmas condições, salina estéril em vez de Tg.

2.9 Efeito da depleção de macrófagos peritoneais sobre a migração de neutrófilos induzida por SEA ou SEB

A depleção de macrófagos foi realizada através da lavagem das cavidades peritoneais com salina estéril, de acordo com o método descrito por SOUZA *et al.* (1988). Para isto, os animais foram anestesiados com éter e 2 agulhas foram inseridas na cavidade abdominal. Salina estéril (0,9%; 5 ml) foi injetada pela agulha inserida perto do esterno. A seguir, as cavidades foram massageadas levemente durante 1 minuto e o lavado coletado através de outra agulha inserida na região inguinal. Esta operação foi repetida três vezes.

Ao final, aproximadamente 95% da salina injetada foi recuperada. Este

procedimento reduziu, em 90%, a população de células presentes nas cavidades peritoneais, as quais foram recuperadas nos lavados. Nos animais controles (“sham”), as agulhas foram inseridas, mas a salina não foi injetada. A SEA (32 µg/cavidade), a SEB (62,5 µg/cavidade) ou o LPS (100 ng/cavidade) foram administrados tanto em animais com cavidades lavadas como nos animais controle (“sham”). A migração de neutrófilos foi avaliada 4 h após a injeção de cada estímulo.

2.10 Incubação *in vitro* de macrófagos peritoneais de camundongos com enterotoxinas estafilocócicas

Os macrófagos foram obtidos de cavidades peritoneais de camundongos previamente tratados com Tg (2 ml/cavidade de uma solução a 3%, p/v em H₂O estéril). Após 4 dias, os animais (n=5) foram sacrificados e as células da cavidade peritoneal (95% macrófagos) colhidas com 5 ml de RPMI contendo 5 UI/ml de heparina.

Os lavados peritoneais foram então transferidos para placas de Petri estéreis, que foram incubadas a 37°C, durante 1 h, em estufa com ar atmosférico, contendo 5% de CO₂. No final desta incubação, os sobrenadantes foram descartados e as placas, com os macrófagos aderidos, lavadas três vezes com PBS estéril, para eliminar as células não aderentes.

Após a aderência, os macrófagos foram estimulados por 5, 15, 30 ou 60 minutos, a 37°C, com RPMI 1640 (controle), SEA (2,5 µg/ml), SEB (5 µg/ml) ou LPS (5 µg/ml). Ao final das incubações, as soluções contendo os estímulos foram descartadas e os macrófagos lavados três vezes com PBS estéril. A seguir, estas células foram novamente incubadas com 4 ml de RPMI, na

ausência dos estímulos, por 30, 60, 120 ou 180 minutos, a 37°C. Ao final deste período, os sobrenadantes foram coletados, centrifugados, esterilizados (em filtros da Millipore com poros de 0,22 µm) e testados quanto a sua habilidade em induzir migração de neutrófilos em cavidades peritoneais de camundongos, de acordo com a técnica descrita no item 2.4. O número de células aderidas foi determinado ao final do período de incubação, diluindo-se 20 µl da suspensão celular, obtida por raspagem do fundo das placas, em 400 µl de líquido de Turk. Em média, o número de células foi equivalente a 4×10^6 células/placa. Essas células apresentaram viabilidade maior que 90%, determinada pelo método de exclusão com o corante vital Azul de Tripan a 0,1%. O percentual de células viáveis foi determinado por leitura em microscópio ótico, considerando-se como célula viável aquela que não se corou (CUNHA & FERREIRA, 1986).

Em protocolos com objetivo de se determinar as condições ideais de liberação das substâncias quimiotáticas para neutrófilos, nos sobrenadantes das incubações de macrófagos com SEA ou com SEB, o meio de cultura RPMI foi substituído por Krebs-Ringer fosfato (KRF). Esta substituição teve como objetivo facilitar alterações no meio de incubação tais como temperatura (4-45°C), pH (6,0-8,0) e concentração de cálcio, magnésio, ou de glicose.

2.11 Contaminação dos componentes quimiotáticos para neutrófilos com endotoxina bacteriana

Para avaliar a possível contaminação, com endotoxina bacteriana, dos sobrenadantes provenientes das incubações de macrófagos com SEA ou com SEB, os mesmos foram incubados por 10 min com PMX (3,5 µg/ml), de acordo com a técnica descrita no item 2.6.

2.12 Caracterização parcial das substâncias quimiotáticas para neutrófilos liberadas por macrófagos estimulados com SEs

2.12.1 Influência da temperatura

Os sobrenadantes provenientes da incubação de macrófagos com SEA ou com SEB, foram incubados durante 30 minutos, a 37, 56 ou 100°C. Ao final, as soluções foram resfriadas e injetadas nas cavidades peritoneais de camundongos (CUNHA & FERREIRA, 1986).

2.12.2 Efeito de inibidores de síntese protéica

Para isto, os macrófagos foram pré-incubados por 30 minutos em RPMI 1640, contendo ciclohexemida (9 µg/ml). Procedeu-se então a estimulação dos macrófagos com as SEs e à fase de liberação dos componentes quimiotáticos, na presença deste inibidor. Ao final, estes sobrenadantes foram testados quanto a sua habilidade em induzir migração de neutrófilos na cavidade peritoneal de camundongos (CUNHA & FERREIRA, 1986).

2.12.3 Efeito de enzimas proteolíticas

Neste caso, os sobrenadantes foram incubados com tripsina (100-200µg/ml) ou com quimotripsina (100µg/ml), durante 1 h, na temperatura de 37°C (CALDERON, WILLIAMS, UNANUE, 1974). Ao final deste período, as soluções foram então testadas quanto a capacidade de induzir migração de neutrófilos em cavidades peritoneais de camundongos.

2.12.4 Ultrafiltração dos sobrenadantes

Os sobrenadantes das incubações de macrófagos estimulados com SEA, foram colocados em um aparelho de ultrafiltração (Amicon Corporation), equipado com membranas capazes de reter substâncias com peso molecular acima de 10.000 (YM-10), 30.000 (YM-30) ou 100.000 (YM-100). No caso dos sobrenadantes obtidos da incubação com SEB, utilizamos ainda membranas capazes de reter substâncias com peso molecular acima de 3.000 (YM-3) ou 1.000 (YM-1). Em ambos os casos, o material retido foi ressuspensão, no volume inicial, em PBS estéril. Tanto o material retido como o material filtrado foram esterilizados e utilizados como estímulos para avaliação da resposta migratória para neutrófilos.

2.13 Efeito de inibidores e antagonistas farmacológicos sobre a liberação dos componentes quimiotáticos para neutrófilos

2.13.1 Drogas utilizadas

- Inibidores da síntese de citocinas e da fosfolipase A₂

Dexametasona (Dexa); 5 µg/ml (CUNHA & FERREIRA, 1986).

- Inibidor da ciclooxigenase

Indometacina (Indo); 5 µg/ml (CUNHA & FERREIRA, 1986).

- Inibidor da ciclooxigenase e da lipoxigenase

BW755 C; 20 µg/ml (CUNHA & FERREIRA, 1986).

2.13.2 Esquemas de tratamento

As placas que continham macrófagos foram pré-incubadas em meios de cultura, contendo cada droga mencionada acima, por períodos de 1 h (Dexa) ou 30 minutos (Indo ou BW755C), antes do período de estimulação com as SEs. A seguir, procedeu-se à fase de estimulação dos macrófagos com a toxina e à fase de liberação dos componentes em meios de cultura que continham cada droga mencionada (CUNHA & FERREIRA, 1986).

2.14 Efeito de inibidores e antagonistas farmacológicos sobre a migração de neutrófilos induzida pelos sobrenadantes das incubações de macrófagos com SEs

2.14.1 Drogas utilizadas

- Inibidor da síntese de citocinas e da fosfolipase A₂

Dexametasona (Dexa); 0,5 mg kg⁻¹ (CUNHA & FERREIRA, 1986).

- Inibidor da ciclooxigenase

Indometacina (Indo); 5 mg kg⁻¹ (CUNHA & FERREIRA, 1986).

- Inibidor da lipoxigenase

BWA4C; 10 mg kg⁻¹ (TATESON *et al.*, 1988).

- Inibidor da ciclooxigenase e da lipoxigenase

BW755C; 100 mg kg⁻¹ (RANDALL *et al.*, 1980).

- Antagonista dos receptores H₂ da histamina

Cimetidina (CMT); 2 mg kg⁻¹ (SCHEUBER *et al.*, 1985)

- Antagonista do fator de ativação plaquetária (PAF)

BN52021; 10 mg kg⁻¹ (BARJA-FIDALGO *et al.*, 1992).

- Depletor de neuropeptídeos de fibras C sensoriais
Capsaicina (CPS); soluções a 10 % (ALBER *et al.*, 1989).
- Antagonista de receptor NK₁
SR140333; 100 µg kg⁻¹ (IONUE *et al.*, 1997).
- Antagonista de receptor NK₂
SR48968; 1 mg kg⁻¹ (INOUE *et al.*, 1997).

2.14.2 Esquemas de tratamento

O BW755C foi administrado, por via oral, 1 h antes (RANDALL *et al.*, 1980), a capsaicina foi aplicada, topicamente, por um período de 8 dias (ALBER *et al.*, 1989) e o SR140333 e o SR48968 foram administrados endovenosamente, imediatamente antes da injeção *ip* dos sobrenadantes ou de SP (20 nmol/cavidade; controle-positivo). Todas as demais drogas foram injetadas *sc*, 1 h antes da injeção dos estímulos.

2.15 Análise Estatística

Os resultados estão expressos como média ± EPM. Os dados de pré-tratamento foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis, precedido por análise de variância (ANOVA). Os demais resultados foram avaliados pelo teste de “t” Student não pareado. Em ambos os testes, foram consideradas significativas diferenças com $p < 0,05$.

2.16 Preparo de soluções, drogas e reagentes

2.16.1 BN52021 (ginkgolide B, 3-(1,1-dimetiletil)-hexahidro-1,4-7b-trihidroxi-8-metil-9H-1,7 α (epoximetano-1H, 6 α H-ciclopenta (c) furo (2,3-b) furo (3',2':3,4) ciclopenta (1,2-d) furan - 5,9, 12 (4H)-triona)

Este antagonista foi dissolvido imediatamente antes de cada experimento, inicialmente em 0,1 ml de hidróxido de sódio a 10% e o volume final completado com PBS estéril (BARJA-FIDALGO *et al.*, 1992).

2.16.2 BWA4C (N-(3-fenoxicinamil) ácido acetohidroxamico)

Este inibidor foi dissolvido imediatamente antes de cada experimento, inicialmente em 0,1 ml de dimetil sulfóxido e o volume final completado com salina 0,9%.

2.16.3 BW755C ([3-(amino-1-3 trifluorometilfenil)-2-pirazolina hidrocloreídrico])

Uma solução-estoque desta substância foi inicialmente dissolvida em 0,1 ml de etanol absoluto, sendo o seu volume completado para 1ml com salina 0,9%. Em cada experimento, partia-se desta solução-estoque, sendo as diluições feitas em salina 0,9% (RANDALL *et al.*, 1980).

2.16.4 Capsaicina (trans-8-metil-N-vanilil-6-nonamida)

Uma solução-estoque de capsaicina a 10 % foi feita em etanol absoluto e mantida em geladeira. Para a aplicação tópica da droga, esta solução-estoque foi diluída em Tween 80 e NaCl 0,15 Mol/L, na proporção de 1:1:8 (solução-estoque de capsaicina: tween 80: NaCl 0,15 Mol/L) (ALBER *et al.*, 1989).

2.16.5 Ciclohexemida

Este inibidor de síntese protéica foi dissolvido, em meio RPMI estéril, imediatamente antes de cada experimento.

2.16.6 Cimetidina

Este antagonista foi dissolvido imediatamente antes de cada experimento, com PBS estéril (SCHEUBER *et al.*, 1985).

2.16.7 Corante May-Grünwalds

2,5 g de corante May-Grünwalds

Metanol absoluto q.s. 1 L

2.16.8 Corante vital Azul de Tripan

0,01 g de corante vital Azul de Tripan

Salina a 0,9 % q.s. 10 ml

2.16.9 Dexametasona

Esta droga foi diluída, em salina (0,9%), imediatamente antes de cada protocolo experimental, a partir de ampolas na concentração de 4 mg/ml.

2.16.10 Dextrana

A Dextrana foi dissolvida imediatamente antes de cada experimento, em PBS estéril (RIBEIRO *et al.*, 1991).

2.16.11 Indometacina

Em cada protocolo experimental, utilizou-se uma solução de indometacina (1mg/ml), diluída em carbonato de sódio a 5% (CURRY & BROWN, 1982). As diluições subseqüentes foram feitas em salina 0,9%.

2.16.12 Líquido de Turk

3 ml de ácido acético glacial

0,1 ml de uma solução de Cristal violeta a 1%

Água destilada q.s. 100 ml

2.16.13 Meio de cultura RPMI 1640

10,4 g de RPMI 1640

2 g de bicarbonato de sódio

Água destilada q.s. 1 L

2.16.14 Polimixina B

Este antibiótico foi dissolvido imediatamente antes de cada experimento, com PBS estéril (BARJA-FIDALGO *et al.*, 1992).

2.16.15 Quimotripsina

A quimotripsina foi dissolvida em meio RPMI estéril, imediatamente antes de cada experimento.

2.16.16 Solução salina tamponada (PBS)

5 ml de tampão fosfato 1M

50 ml de NaCl 1.5 M

Água deionizada q.s. 500 ml

A solução trabalho foi obtida pela diluição (1:10) da solução acima.

2.16.17 Solução PBS de lavagem

10 ml de PBS concentrado

1 ml de soro albumina bovina

0,1 ml de Heparina 5000 UI/ml

Água deionizada q.s. 100 ml

2.16.18 SR140333 ((S)1-{2-[3-(3,4-diclorofenil)-1-(3-iso-propoxifenilacetil) piperidina-3-il]etil}-4-fenil-1-azoniabicyclo[2.2.2]octana, clorida)

Este antagonista foi dissolvido imediatamente antes de cada experimento, com PBS estéril (IONUE *et al.*, 1997).

2.16.19 SR48968 ((S)-N-metil-N[4-(4-acetilamino-4-fenilpiperidino)-2-(3,4,-ciclorofenil)butil]benzamida)

Este antagonista foi dissolvido imediatamente antes de cada experimento, com PBS estéril (IONUE *et al.*, 1997).

2.16.20 Substância P

A substância P foi dissolvida imediatamente antes de cada experimento, com PBS estéril (SALEH *et al.*, 1998).

2.16.21 Meio tioglicolato de sódio (Tg)

A solução de Tg foi feita em água destilada e, posteriormente, esterilizada em autoclave.

2.16.22 Tripsina

Esta enzima proteolítica foi dissolvida, em meio RPMI estéril, imediatamente antes de cada experimento.

3. Resultados

3.1 Migração de neutrófilos induzida pela SEA ou pela SEB para a cavidade peritoneal de camundongos

Nossos resultados mostraram que tanto a SEA (16-64 µg/cavidade) como a SEB (62,5-250 µg/cavidade), quando injetadas na cavidade peritoneal de camundongos, induzem aumento significativo no número de neutrófilos, quando comparado aos números encontrados na cavidade de animais que receberam PBS (controle). Embora em ambos os casos este efeito tenha sido proporcional às doses de toxinas utilizadas (Tabela 1), a SEA parece ser mais potente do que a SEB na indução de tal efeito. Assim, para obter-se uma migração semelhante àquela observada com 32µg de SEA ($19 \pm 3 \times 10^5$ neutrófilos/cavidade), foi necessário utilizar uma dose 8 vezes maior (250 µg/cavidade) de SEB ($18 \pm 3 \times 10^5$ neutrófilos/cavidade) (Tabela 1).

Os dados apresentados na Tabela 2 revelam que após a administração de SEA ou SEB nas cavidades peritoneais, o recrutamento máximo de neutrófilos foi observado na 12^a h. Por outro lado, o influxo de neutrófilos produzido pela SEB tem duração maior do que 72 h enquanto que, com a SEA, este efeito desaparece 72 h após a injeção da toxina.

Tabela 1. Curva-dose resposta da migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de camundongos, induzida por SEA ou por SEB.

SEA ($\mu\text{g}/\text{cavidade}$)	Neutrófilos/cavidade ($\times 10^5$) 12 h após	% Variação
Controle (PBS)	$3,0 \pm 0,3$	—
16	$9,0 \pm 1,5^*$	200
32	$19,0 \pm 3,0^*$	533
64	$21,0 \pm 3,0^*$	600
SEB ($\mu\text{g}/\text{cavidade}$)	Neutrófilos/cavidade ($\times 10^5$) 12 h após	% Variação
Controle (PBS)	$3,5 \pm 0,3$	—
62,5	$13,0 \pm 2,0^*$	271
125,0	$14,0 \pm 1,0^*$	300
250,0	$18,0 \pm 3,0^*$	414

Cada valor representa a média $\pm$ EPM de 5 animais. $*p < 0,05$ em relação ao grupo que recebeu PBS em vez das toxinas (Teste “t” Student não pareado).

Tabela 2. Variação temporal da migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de camundongos, induzida por SEA ou por SEB.

Tempo, h	Neutrófilos/cavidade ($\times 10^5$)		
	Controle	SEA	SEB
	FBS	32 μ g/cavidade	250 μ g/cavidade
4	$2 \pm 0,5$	$16 \pm 1,0^*$	$16 \pm 1,0^*$
12	$3 \pm 0,5$	$19 \pm 3,0^*$	$18 \pm 3,0^*$
24	$2 \pm 0,4$	$10 \pm 2,0^*$	$14 \pm 1,0^*$
72	$2 \pm 0,5$	$2 \pm 0,5$	$8 \pm 2,0^*$

Cada valor representa a média $\pm$ EPM de 5 animais. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle (Teste “t” Student não pareado).

A incubação de soluções de SEA ou de SEB com PMX não modificou a habilidade destas toxinas em induzir migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de camundongos. Por outro lado, a incubação de LPS (200-800 ng/cavidade), nas mesmas condições, com PMX, reduziu significativamente a capacidade desta endotoxina em induzir migração de neutrófilos (Figura 1).

3.2 Migração de neutrófilos, induzida pela SEA ou pela SEB, para a bolsa de ar subcutânea ("air-pouch")

Os dados ilustrados na Figura 2 revelam que estas duas SEs são mais eficazes em causar recrutamento de neutrófilos para a cavidade peritoneal do que para a BSA, pois, quando injetadas em BSA, estas toxinas exibiram influxo de neutrófilos quantitativamente menor, quando comparado com aquele observado em cavidades peritoneais. O mesmo resultado não foi obtido com a administração de dextrana (controle positivo) que exibiu, em ambas as cavidades, acentuado recrutamento de neutrófilos.

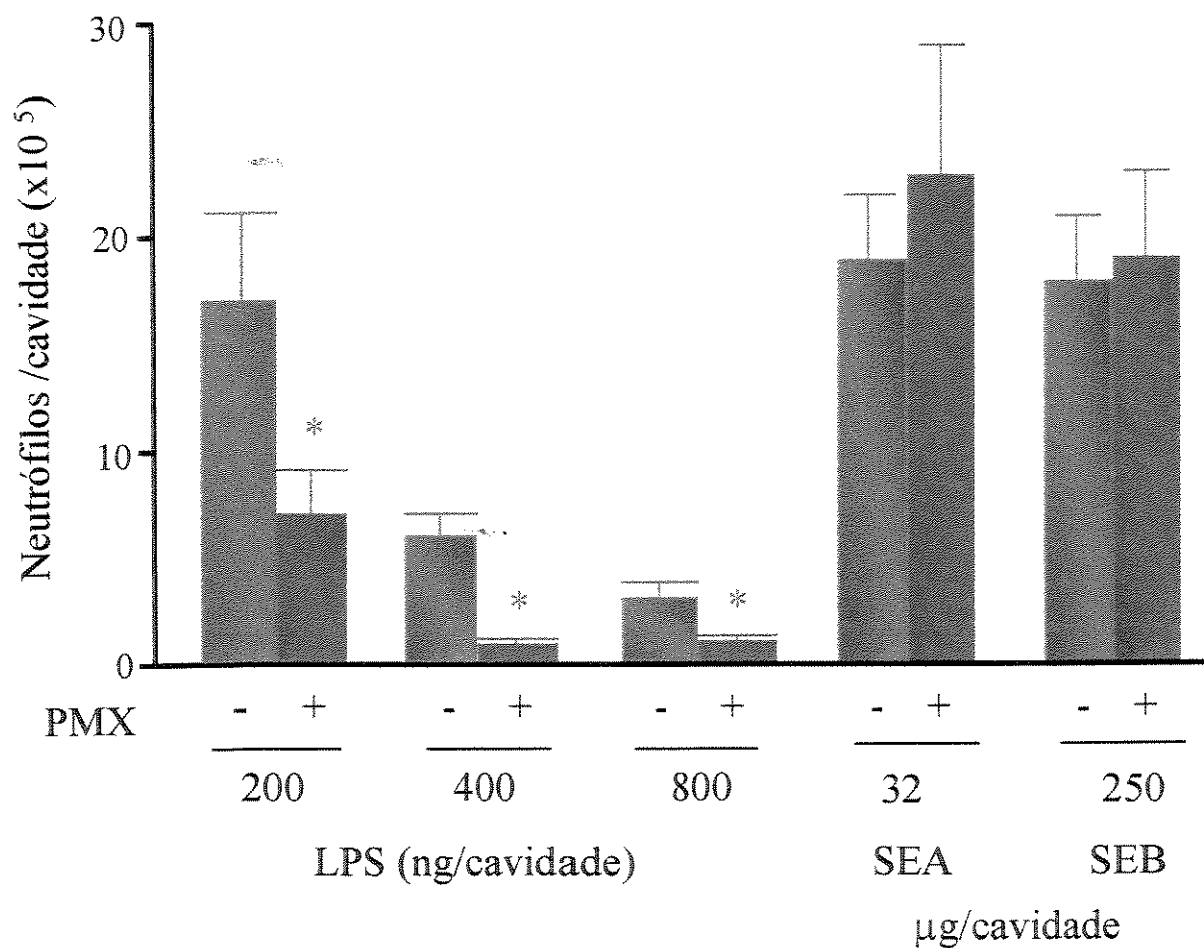


Figura 1. Efeito da incubação das soluções de SEA (0,3 mg/ml) SEB (2,5 µg/ml) ou de LPS (4-8 µg/ml) com polimixina B (3,5 µg/ml) sobre a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de camundongos. Cada barra representa a média $\pm$ EPM de 5 animais. * $p < 0,05$ em relação aos grupos que receberam SEA, SEB ou LPS não incubados com PMX (Teste Kruskal-Wallis precedido de ANOVA).

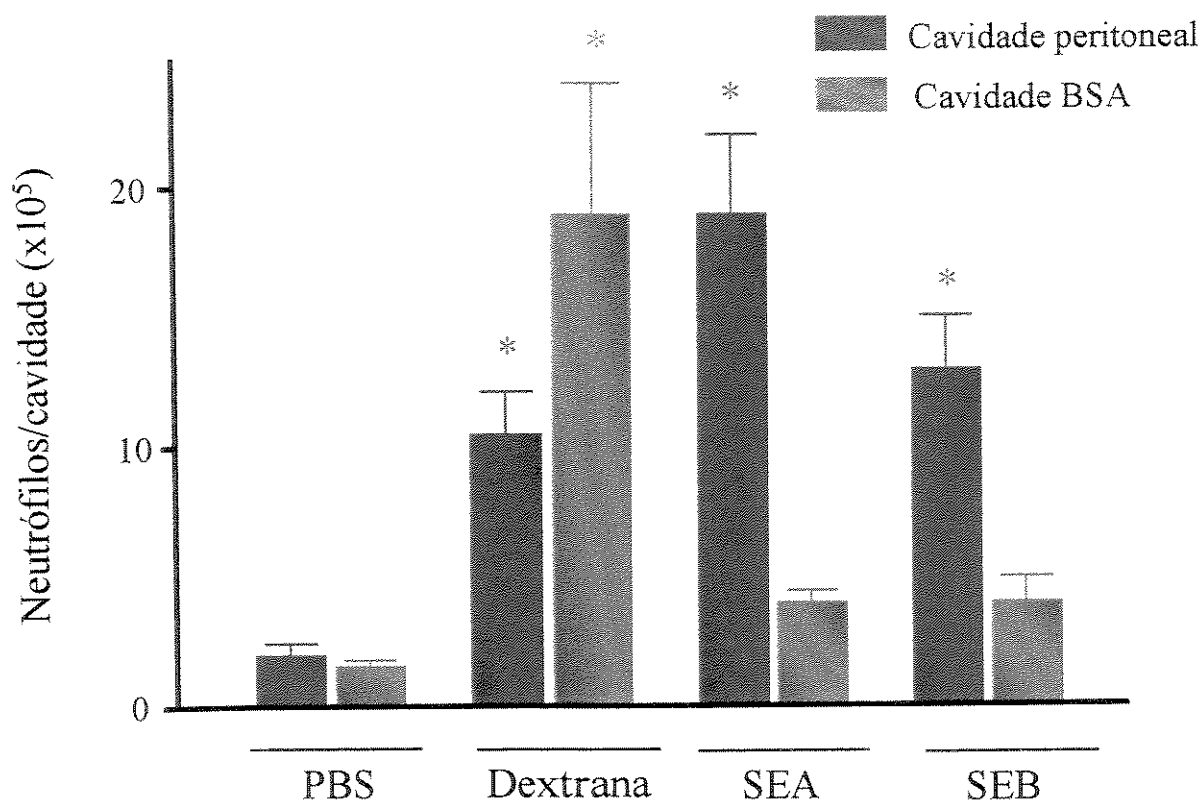


Figura 2. Migração de neutrófilos induzida por SEA ou por SEB para a bolsa de ar subcutânea. A migração de neutrófilos foi avaliada 12 h após a injeção de SEA (32 µg/cavidade), SEB (62,5 µg/cavidade) ou Dextrana (300 µg/cavidade) na cavidade BSA ou na cavidade peritoneal. Cada barra representa a média ± EPM de 5 animais. *p<0,05 em relação aos grupos receberam PBS em vez dos estímulos (Teste “t” Student não pareado).

3.3 Participação de macrófagos peritoneais sobre a migração de neutrófilos induzida pela SEA ou pela SEB

Nos animais em que o número de macrófagos peritoneais foi aumentado por meio do pré-tratamento (4 dias antes) com Tg, tanto a SEA como a SEB exibiram migração de neutrófilos cerca de 200% maior do que aquela observada em cavidades que receberam salina como pré-tratamento e que, portanto, não sofreram alterações no número de macrófagos (Figura 3). A efetividade deste pré-tratamento em aumentar o número de macrófagos residentes está ilustrada no Painel A, desta mesma Figura, onde podemos observar que, após este pré-tratamento, o número de macrófagos encontrados na cavidade peritoneal é cerca de 220 % maior, quando comparado ao número encontrado em cavidades que receberam salina em vez de Tg.

Por outro lado, em animais que tiveram as cavidades peritoneais submetidas à lavagem prévia com salina estéril, procedimento este que reduz em 85% o número de células residentes (Figura 4; painel A), observamos que tanto a SEA como a SEB foram menos efetivas em induzir migração de neutrófilos (Figura 4).

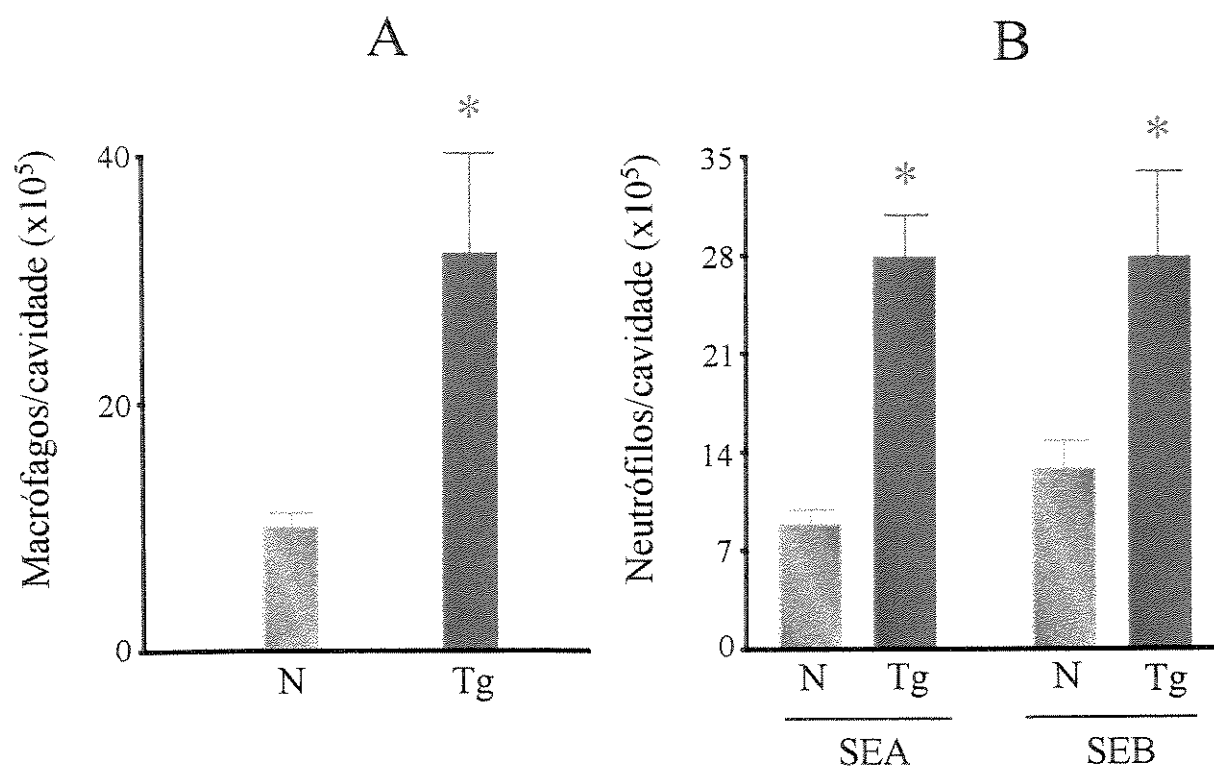


Figura 3. Influência do aumento no número de macrófagos peritoneais sobre a migração de neutrófilos induzida por SEA ou por SEB na cavidade peritoneal de camundongos. Painei A: Número de macrófagos em cavidades injetadas com salina (N) ou em cavidades estimuladas com tioglicolato (Tg); Painei B: Migração de neutrófilos induzida por SEA (16 µg/cavidade) ou por SEB (62,5 µg/cavidade) em cavidades N ou em cavidades Tg. O Tg a 3% (2 ml/cavidade) foi injetado ip 4 dias antes da administração das toxinas e a migração de neutrófilos avaliada 12 h após a injeção das toxinas. Cada barra representa a média ± EPM de 5 animais. *p<0,05 em relação aos grupos que receberam salina em vez de Tg (Teste Kruskal-Wallis precedido de ANOVA).

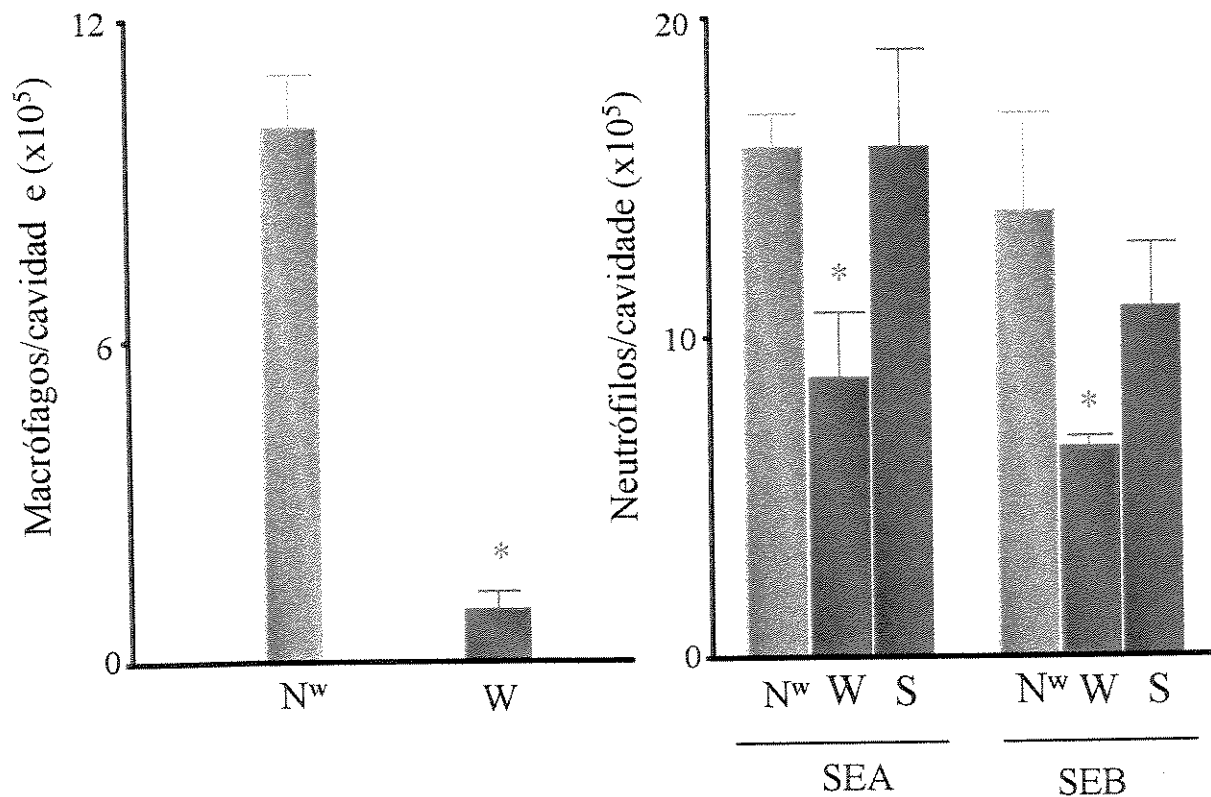


Figura 4. Influência da diminuição no número de macrófagos peritoneais residentes sobre a migração de neutrófilos induzida por SEA ou por SEB na cavidade peritoneal de camundongos. Painei A: Número de macrófagos em cavidades não submetidas à lavagem com salina estéril (N^w) ou em cavidades previamente lavadas com salina estéril (W); Painei B: Migração de neutrófilos induzida por SEA ou por SEB em cavidades N^w, W ou “shams” (S). A lavagem das cavidades com salina estéril foi realizada de acordo com o método descrito no item Materiais e Métodos. A migração de neutrófilos foi avaliada 4 h após a injeção das toxinas. Cada barra representa a média $\pm$ EPM de 5 animais. *p<0,05 em relação aos grupos N ou S. (Teste Kruskal-Wallis precedido de ANOVA).

3.4 Envolvimento de mediadores inflamatórios na migração de neutrófilos induzida, pela SEA ou pela SEB, para a cavidade peritoneal de camundongos

Os dados ilustrados na Figura 5 mostram também, que o influxo de neutrófilos induzido por SEA ou por SEB foi significativamente reduzido com o pré-tratamento dos animais com BWA4C. Por outro lado, o pré-tratamento dos animais com Indo (5 mg kg^{-1}) não interferiu no fenômeno migratório induzido tanto por SEA como por SEB.

Além disto, o BN52021, um antagonista de PAF, também causou inibição significativa da atividade migratória de ambas as toxinas (Figura 5).

Verificamos igualmente a participação da histamina e de neuropeptídeos de fibras C sensoriais neste fenômeno, pelo uso do anti-histamínico CMT (antagonista de receptores H_2 da histamina) e da CPS, substância capaz de depletar os neuropeptídeos de fibras C sensoriais. Nossos dados mostram que a CMT é eficaz em inibir a resposta migratória de neutrófilos, induzida tanto por SEA como por SEB, para a cavidade peritoneal de camundongos (Figura 5). O mesmo fato foi observado com a CPS, que causou inibição em torno de 56% no influxo de neutrófilos produzido pela SEA ou pela SEB em camundongos.

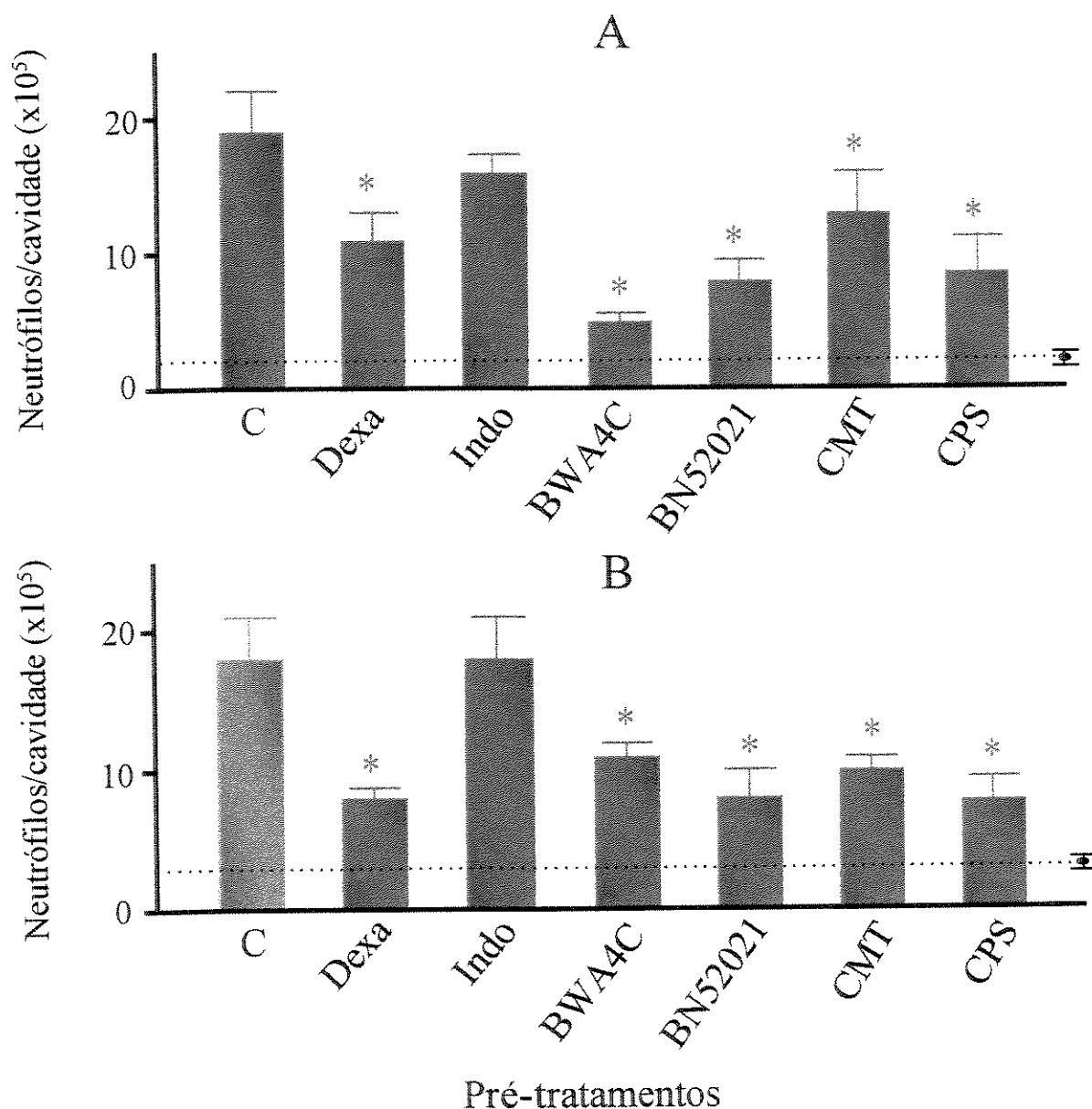


Figura 5. Efeito do pré-tratamento com inibidores ou antagonistas farmacológicos sobre a migração de neutrófilos induzida por SEA ou por SEB para a cavidade peritoneal de camundongos. Painel A: Migração de neutrófilos induzida pela SEA; Painel B: Migração de neutrófilos induzida pela SEB. As drogas indicadas na Figura acima foram administradas de acordo com o esquema descrito no item Materiais e Métodos. A migração de neutrófilos foi avaliada 12 h após a injeção de SEA (32 $\mu\text{g}/\text{cavidade}$) ou SEB (250 $\mu\text{g}/\text{cavidade}$). Cada barra representa a média $\pm$ EPM de 5 animais. A linha tracejada representa a média dos grupos que receberam PBS em vez das toxinas. * $p < 0,05$ em relação aos grupos sem pré-tratamento (C) (Teste Kruskal-Wallis precedido de ANOVA).

3.5 Liberação de componentes quimiotáticos para neutrófilos por macrófagos incubados *in vitro* com SEA ou com SEB.

Nossos dados mostraram que os sobrenadantes provenientes da incubação *in vitro* de macrófagos peritoneais de camundongos com SEA (SM-SEA; 0,625-2,5 $\mu\text{g/ml}$) ou com SEB (SM-SEB; 1,25-5 $\mu\text{g/ml}$) são capazes de induzir acentuado influxo de neutrófilos para a cavidade peritoneal de camundongos enquanto que o sobrenadante da incubação destas células somente com o meio de cultura, não exibiu atividade quimiotática para neutrófilos (Figura 6). Além disto, em ambos os casos, a liberação dos prováveis componentes quimiotáticos para neutrófilos, nestes sobrenadantes, é proporcional às doses de toxinas utilizadas como estímulo (Figura 6).

A incubação dos SM-SEA ou SM-SEB com PMX não modificou a habilidade destes sobrenadantes em induzir migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de camundongos. Por outro lado, a incubação de LPS, (200-800 ng/cavidade) nas mesmas condições, com PMX, reduziu significativamente a capacidade desta endotoxina em induzir migração de neutrófilos (Figura 7).

A liberação destes componentes quimiotáticos para neutrófilos depende, as mesma forma do tempo de estimulação dos macrófagos com as toxinas. Assim, os sobrenadantes obtidos de macrófagos que foram estimulados apenas 5 minutos com SEA ou SEB já exibiram significativo efeito quimiotático para neutrófilos. O pico máximo de migração foi observado com a injeção de SM-SEA ou SM-SEB obtidos de incubações de macrófagos, por 30 minutos, com as respectivas toxinas. Observamos também, queda significativa na migração de neutrófilos, induzida com SM-SEA ou SM-SEB, obtidos de macrófagos

estimulados por 60 minutos com as toxinas (Figura 8).

Os dados ilustrados na Figura 8 mostram que o melhor tempo de incubação dos macrófagos para se obter quantidades maiores de componentes quimiotáticos para neutrófilos, nos SM-SEA ou SM-SEB, está em torno de 60 a 120 minutos.

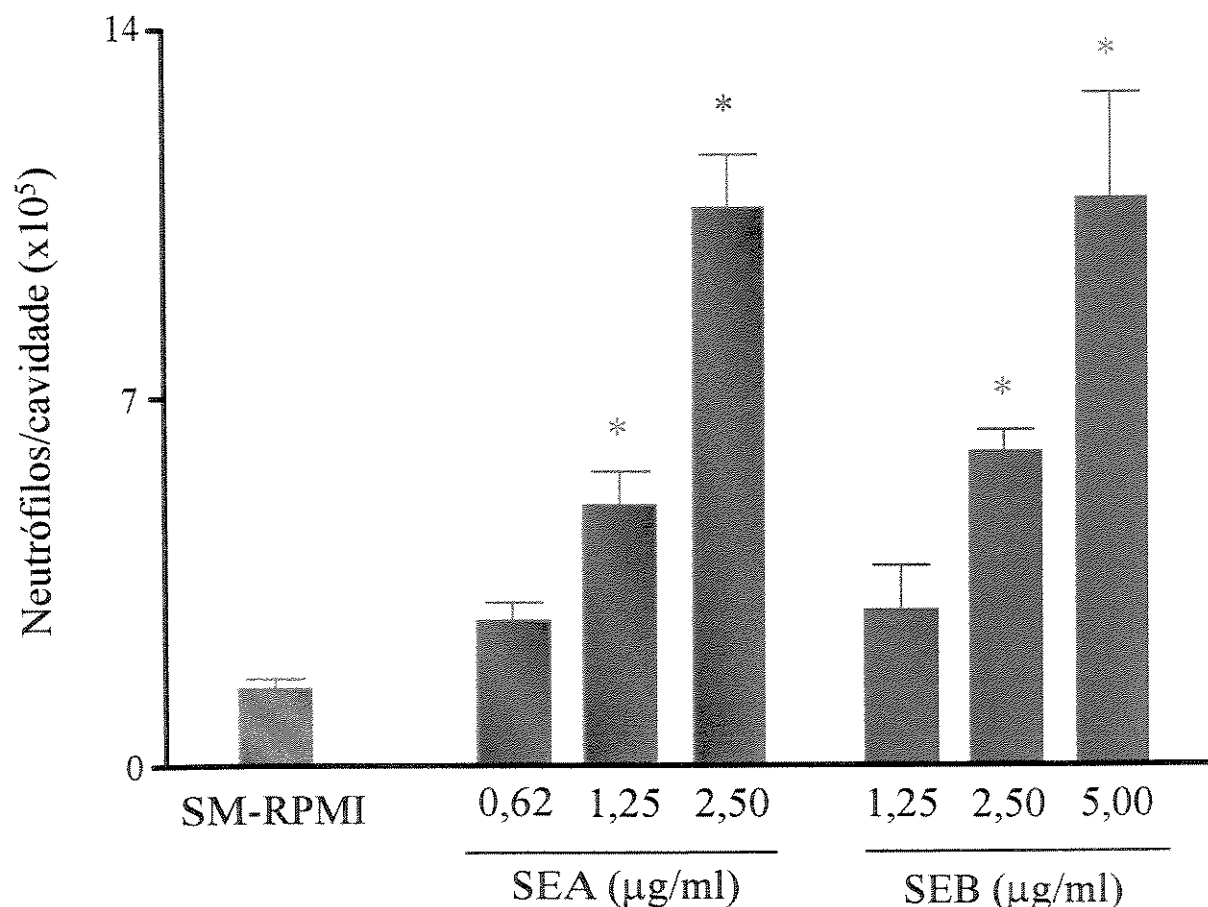


Figura 6. Liberação de componentes quimiotáticos para neutrófilos por macrófagos estimulados *in vitro* com SEA ou com SEB. Os macrófagos foram obtidos de cavidades peritoneais pré-estimuladas (4 dias antes) com Tg a 3%. Cada ponto representa a migração de neutrófilos para as cavidades peritoneais de camundongos induzidas pela injeção *ip* de 0,2 ml das seguintes soluções: sobrenadante de macrófagos estimulados com RPMI (SM-RPMI; controle); sobrenadantes de macrófagos estimulados com SEA (SM-SEA); sobrenadante de macrófagos estimulados com SEB (SM-SEB). A migração de neutrófilos foi avaliada 12 h após a injeção dos sobrenadantes. Cada ponto representa a média $\pm$ EPM de 5 animais. * $p < 0,05$, em relação ao grupo que recebeu o sobrenadante da incubação de macrófagos com RPMI (Teste “t” Student não pareado).

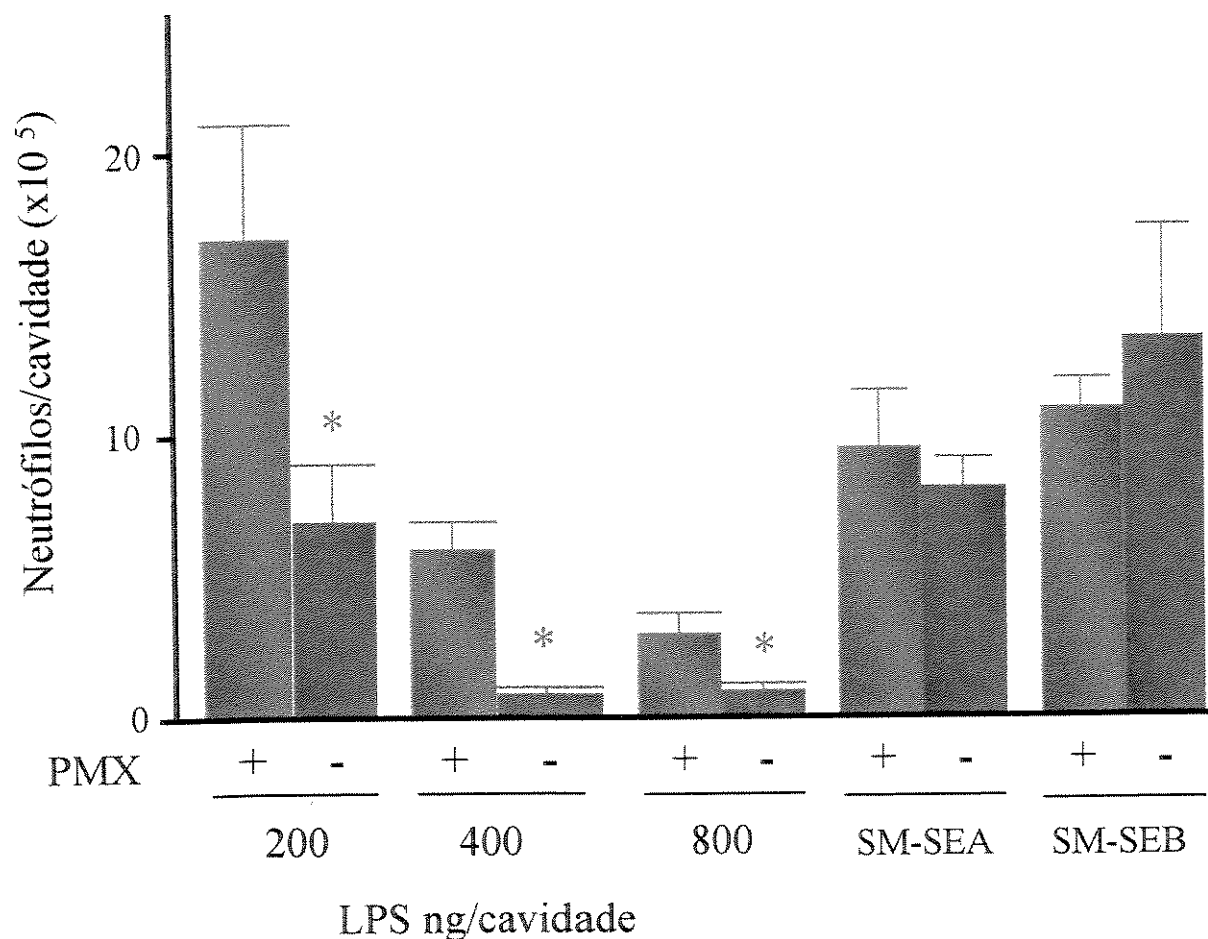


Figura 7. Efeito da incubação, com polimixina B, dos sobrenadantes das incubações de macrófagos com SEA ou SEB sobre migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de camundongos. Soluções de sobrenadantes de macrófagos incubados com SEA ou com SEB ou ainda soluções de LPS (4-8 $\mu\text{g/ml}$) foram incubados por 10 min, com PMX (3,5 $\mu\text{g/ml}$). Ao final deste período, estas soluções foram injetadas *ip* e a migração de neutrófilos avaliada 12 h após. Cada barra representa a média $\pm$ EPM de 5 animais. * $p < 0,05$ em relação aos grupos que receberam os sobrenadantes ou o LPS não incubados com PMX (Teste Kruskal-Wallis precedido de ANOVA).

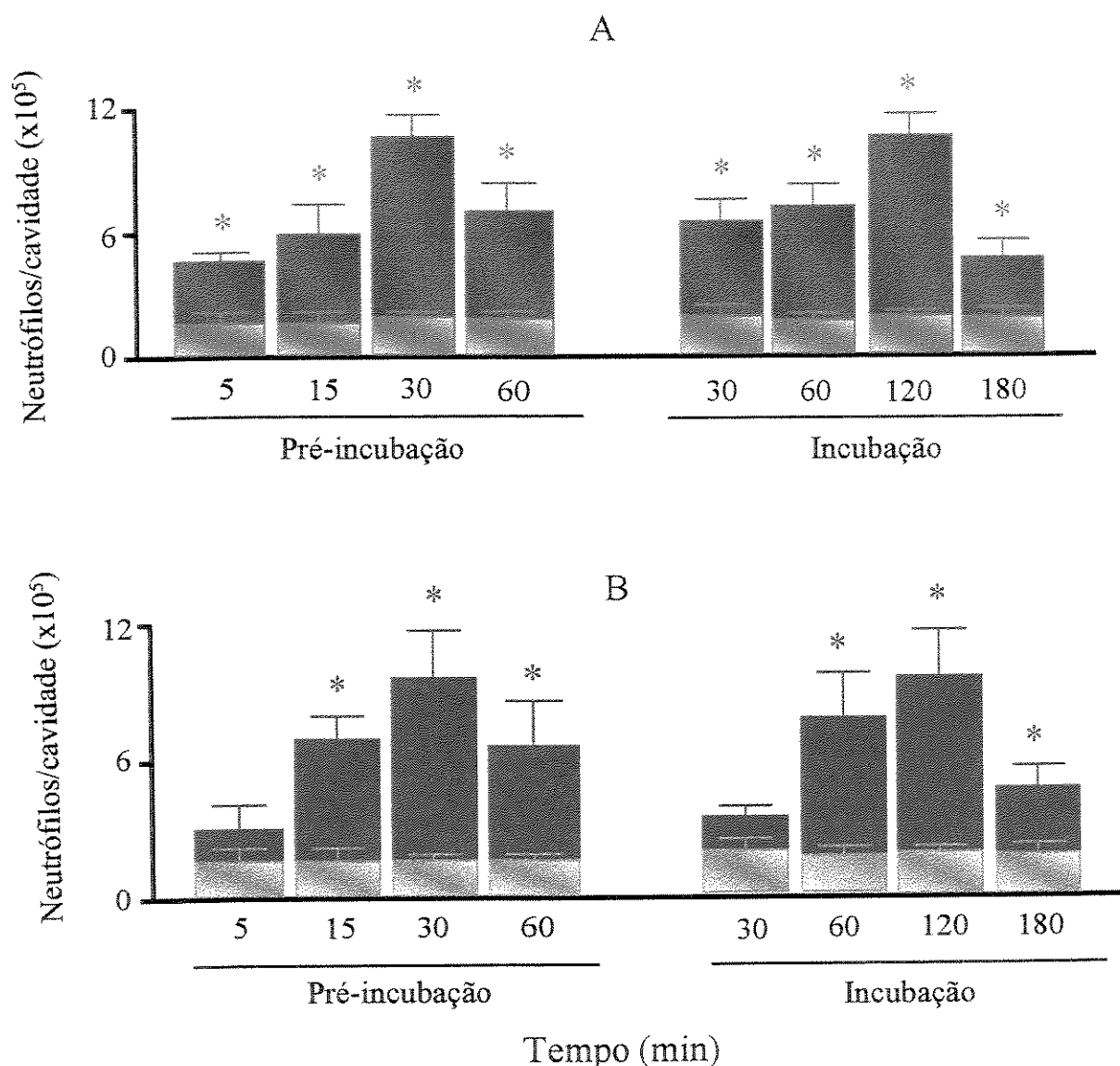


Figura 8. Efeito da variação do período de pré-incubação ou de incubação sobre a liberação de componentes quimiotáticos para neutrófilos por macrófagos estimulados com SEA ou com SEB. Painel A: Migração de neutrófilos induzida pelo sobrenadante de macrófagos estimulados com SEA (SM-SEA; 2,5 $\mu\text{g/ml}$); Painel B: migração de neutrófilos induzida pelo sobrenadante de macrófagos estimulados com SEB (SM-SEB; 5 $\mu\text{g/ml}$). A migração de neutrófilos para as cavidades peritoneais de camundongos foi induzida pela injeção *ip* de 0,2 ml de sobrenadante de macrófagos estimulados com RPMI (controle), SM-SEA ou SM-SEB obtidos em diferentes períodos de pré-incubação ou de incubação. A migração de neutrófilos foi avaliada 12 h após a injeção dos sobrenadantes. Cada barra representa a média $\pm$ EPM de 5 animais. * $p < 0,05$, em relação ao grupo que recebeu o sobrenadantes da incubação de macrófagos com RPMI (Teste “t” Student não pareado).

Para viabilizar os procedimentos experimentais que envolviam alterações no meio de incubação tais como pH, na temperatura e concentrações de cálcio, magnésio e glicose, o meio RPMI, utilizado na maioria dos nossos experimentos, foi substituído por tampão Krebs-Ringer fosfato (KBF). A utilização do KBF como meio de incubação, não interferiu com a liberação dos componentes quimiotáticos para neutrófilos nos SM-SEA ou SM-SEB e com a viabilidade dos macrófagos.

Os resultados obtidos neste estudo mostram que as condições ideais para que ocorra a liberação de componentes quimiotáticos para neutrófilos nos SM-SEA ou SM-SEB, incluem temperatura e pH do meio de incubação próximos ao fisiológico. Assim, um influxo de neutrófilos quantitativamente maior foi somente observado com a injeção de SM-SEA ou SM-SEB obtidos a 37°C ou em pH 7,0 a 7,5 (Tabela 3).

Nossos dados mostram também que a presença de íons cálcio e magnésio, no meio de incubação é necessária para que a liberação dos componentes quimiotáticos ocorra. Assim, em ambos os casos, a ausência de íons cálcio ou de magnésio, ou ainda de ambos, na solução KBF, resultou em queda significativa na liberação dos componentes quimiotáticos para neutrófilos.

A ausência de glicose na solução KBF, também reduz significativamente, a liberação destes componentes quimiotáticos para neutrófilos (Tabela 3).

Além disto, o SM-SEA mantém a sua atividade quimiotática para neutrófilos, mesmo após 48 h de armazenamento em geladeira (4°C) (Temperatura ambiente: $10 \pm 1,8 \times 10^5$ neutrófilos/cavidade; 4°C: $10,2 \pm 2,0 \times 10^5$ neutrófilos/cavidade). O mesmo resultado não se observou, quando o SM-SEB foi submetido a estas mesmas condições (Temperatura ambiente: $11 \pm 1,0$

$\times 10^5$ neutrófilos/cavidade; 4°C: $1,7 \pm 0,2 \times 10^5$ neutrófilos/cavidade). Além disto, o SM-SEA mostrou-se resistente a 3 ciclos sucessivos de congelamento (-20°C) e descongelamento (temperatura ambiente) (SM-SEA não submetido aos ciclos de congelamento e descongelamento: $10,6 \pm 1,0 \times 10^5$ neutrófilos/cavidade; SM-SEA submetido aos ciclos de congelamento e descongelamento: $9,3 \pm 1,7 \times 10^5$ neutrófilos/cavidade), enquanto que o SM-SEB perdeu a sua habilidade em induzir migração de neutrófilos, após tal procedimento (SM-SEB não submetido aos ciclos de congelamento e descongelamento: $8,4 \pm 1,0 \times 10^5$ neutrófilos/cavidade; SM-SEB submetido aos ciclos de congelamento e descongelamento: $2,0 \pm 0,4 \times 10^5$ neutrófilos/cavidade).

Tabela 3. Influência do pH, temperatura e da presença de cálcio, magnésio e glicose no meio de incubação, sobre a liberação de componentes quimiotáticos para neutrófilos nos SM-SEA ou SM-SEB.

A pH	Neutrófilos/cavidade		
	Controle	SM-SEA	SM-SEB
6,0	1,5 ± 0,1	3,6 ± 0,9*	5,8 ± 1,0*
6,5	2,0 ± 0,4	4,8 ± 0,9*	5,8 ± 1,2*
7,0	1,3 ± 0,2	10,9 ± 2,6*	10,0 ± 1,0*
7,5	1,6 ± 0,4	7,9 ± 0,9*	8,7 ± 1,3*
8,0	2,0 ± 0,4	3,9 ± 0,4*	2,7 ± 0,8
B Temperatura °C			
4	2,0 ± 0,3	4,3 ± 0,6*	3,5 ± 1,0
37	2,0 ± 0,4	12,0 ± 2,0*	9,9 ± 1,3*
45	1,8 ± 0,3	3,8 ± 0,6*	2,6 ± 0,3
C Meio de Incubação (KRF)			
Completo	1,3 ± 0,2	12,0 ± 0,2*	10,0 ± 1,0*
- Ca ⁺⁺	1,7 ± 0,5	4,0 ± 0,6*	2,3 ± 0,3
- Mg ⁺⁺	1,8 ± 0,2	4,7 ± 1,0	4,3 ± 1,0
- Ca ⁺⁺ e Mg ⁺⁺	2,0 ± 0,2	4,5 ± 1,0*	2,6 ± 0,6
- Glicose	2,0 ± 0,3	2,5 ± 0,5	3,0 ± 0,6

A migração de neutrófilos para cavidades peritoneais de camundongos foi induzida pela injeção *ip* de SM-SEA ou SM-SEB, obtidos em diferentes faixas de pH (A), temperatura (B) e na ausência de íons cálcio, magnésio ou glicose (C). A migração de neutrófilos foi avaliada 12 h após a injeção dos sobrenadantes. Os valores representam a média ± EPM de 5 animais. * $p < 0,05$ em relação aos grupos que receberam os sobrenadantes da incubação de macrófagos com KBF a 37°C, em pH 7,0 e na presença de cálcio, magnésio e glicose (Teste “t” Student não pareado).

3.6 Caracterização parcial dos componentes quimiotáticos para neutrófilos presentes nos SM-SEA e SM-SEB

Ambos os sobrenadantes perderam a atividade quimiotática para neutrófilos quando aquecidos por 30 minutos à 100°C, porém continuaram a exibir tal atividade quando submetidos ao aquecimento pelo mesmo período, a 37°C ou a 56°C (Figura 9).

Uma outra característica físico-química importante destes componentes é que, em ambos os casos, a liberação dos mesmos foi significativamente afetada quando os macrófagos foram pré-tratados com um inibidor de síntese protéica, como é o caso da ciclohexemida (9 µg/ml) (Figura 10).

Conforme ilustra a Figura 11, a incubação, tanto do SM-SEA como do SM-SEB, durante 1 h, com tripsina (200 µg/ml) não modificou a atividade destes componentes em induzir recrutamento de neutrófilos para a cavidade peritoneal de camundongos. Entretanto, quando incubados, nas mesmas condições, com quimotripsina (100 µg/ml), a atividade quimiotática em ambos os casos foi significativamente reduzida.

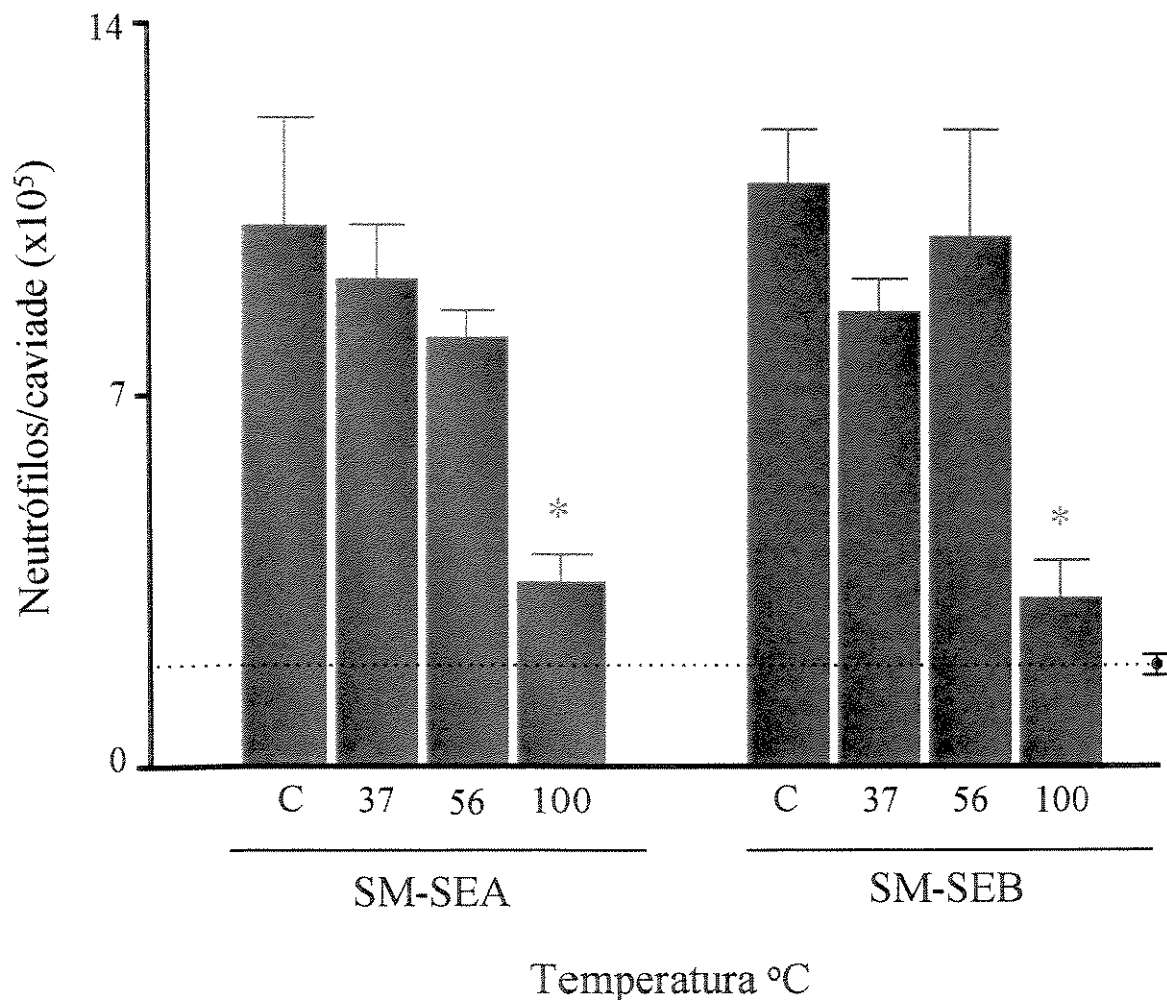


Figura 9. Efeito da temperatura sobre a atividade quimiotática para neutrófilos dos sobrenadantes de macrófagos incubados com SEA ou SEB. As barras representam a migração de neutrófilos induzidas pelos sobrenadantes de macrófagos estimulados com SEA (SM-SEA) ou com SEB (SM-SEB) não aquecidos (C), ou quando submetidos ao aquecimento a 37, 56 e 100°C, durante 30 minutos. A migração de neutrófilos foi avaliada 12 h após a injeção dos sobrenadantes. Cada barra representa a média $\pm$ EPM de 5 animais. A linha tracejada representa a média dos grupos que receberam sobrenadante de macrófagos estimulados com RPMI. * $p < 0,05$ em relação aos grupos que receberam os sobrenadantes que não foram submetidos ao aquecimento (Teste “t” Student não pareado).

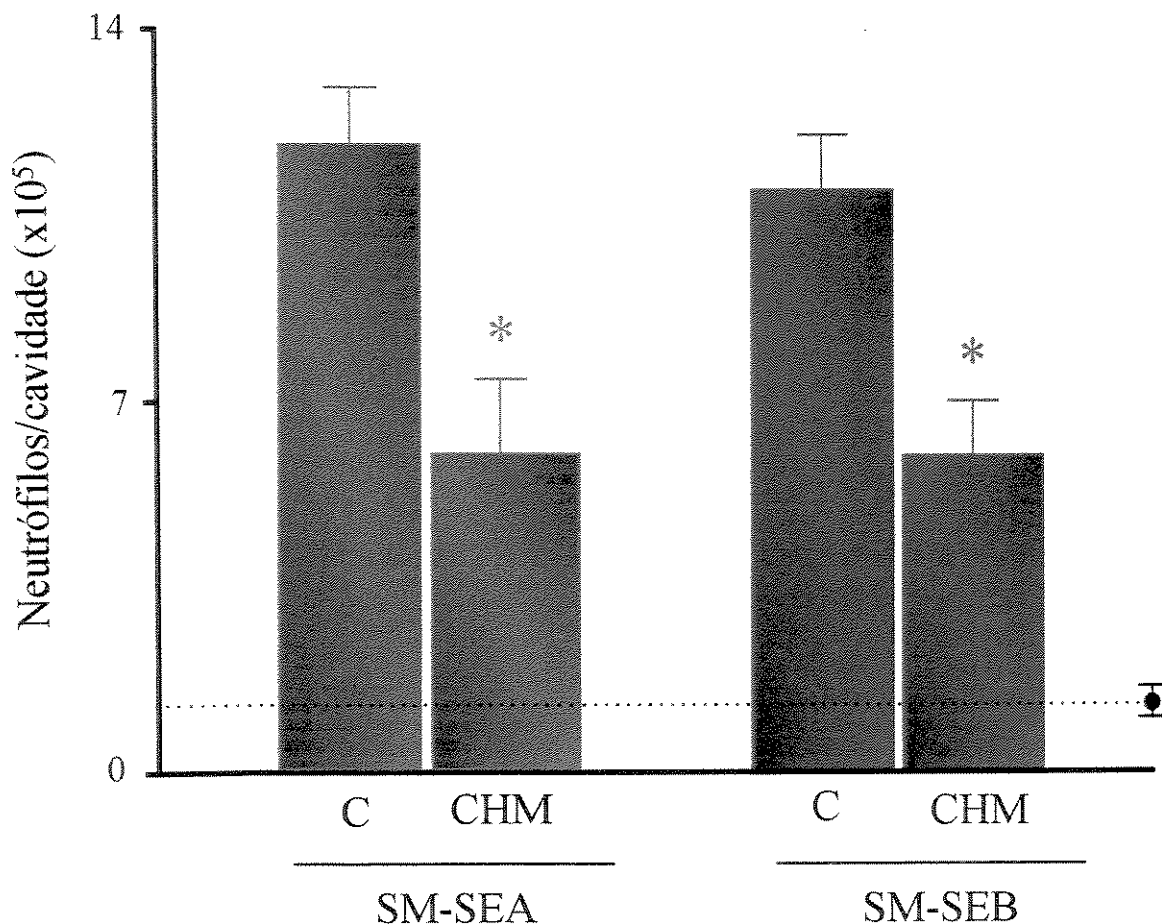


Figura 10. Efeito da ciclohexemida sobre a liberação dos componentes quimiotáticos para neutrófilos, no sobrenadante de macrófagos incubados com SEA ou com SEB. Os sobrenadantes foram obtidos de macrófagos não pré-tratados ou pré-tratados com ciclohexemida (9µg/ml; CHM). A migração de neutrófilos foi avaliada 12 h após a injeção dos estímulos. Cada barra representa a média $\pm$ EPM de 5 animais. A linha tracejada representa a média dos grupos que receberam sobrenadantes de macrófagos incubados com RPMI *p<0,05 em relação aos grupos que receberam os sobrenadantes da incubação de macrófagos não pré-tratados com ciclohexemida (C) (Teste "t" Student não pareado).

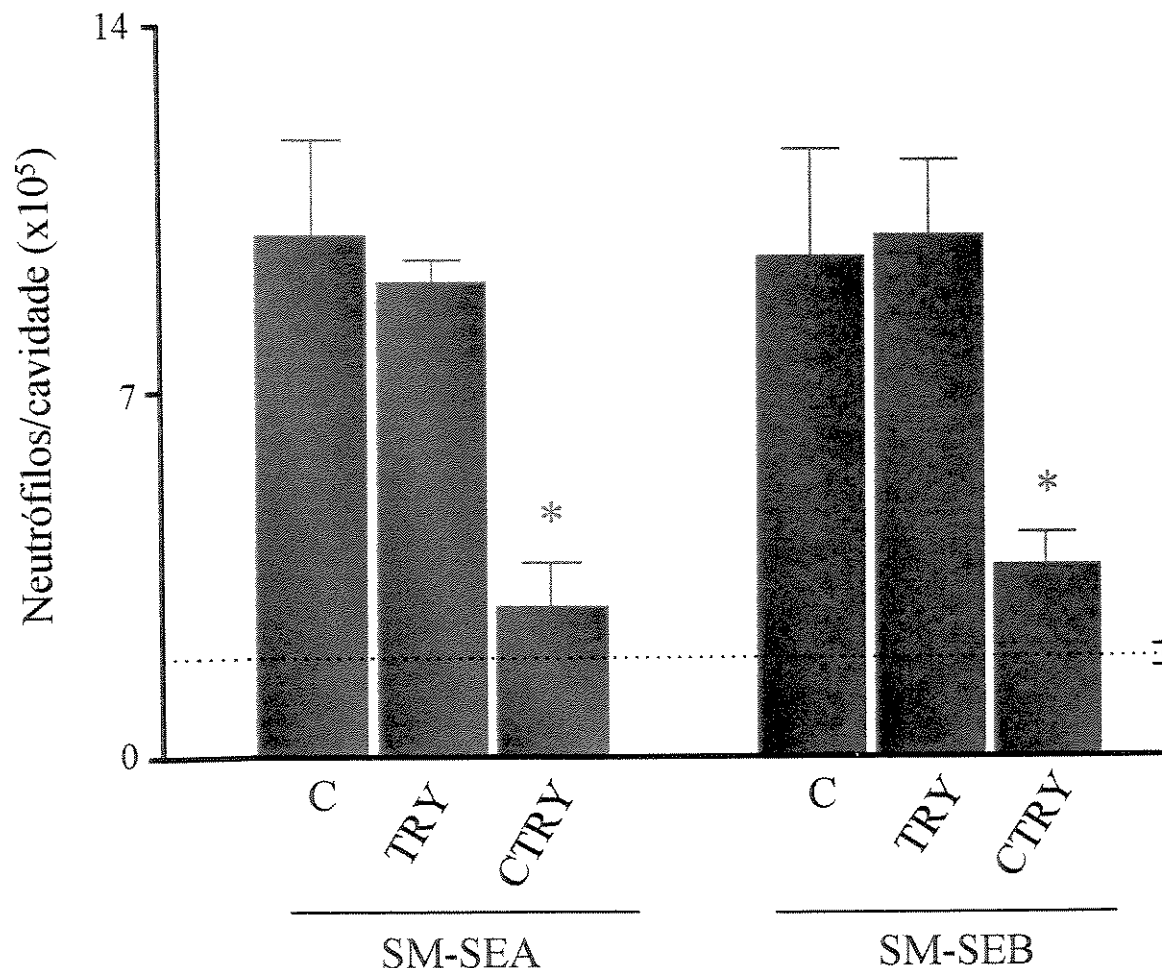


Figura 11. Efeito da incubação dos sobrenadantes de macrófagos estimulados com SEA ou com SEB, com tripsina ou com quimotripsina, sobre a migração de neutrófilos. Os sobrenadantes provenientes da incubação de macrófagos com SEA ou com SEB foram incubados por 30 minutos, a 37°C com as seguintes soluções: tripsina (200µg/ml; TRY) ou quimotripsina (100 µg/ml; CTRY). A migração de neutrófilos foi avaliada 12 h após a injeção dos estímulos. Cada barra representa a média $\pm$ EPM de 5 animais. A linha tracejada representa a média dos grupos que receberam sobrenadantes de macrófagos com RPMI. * $p < 0,05$ em relação aos grupos que receberam os sobrenadantes que não foram incubados com as enzimas proteolíticas (C) (Teste "t" Student não pareado).

Em relação ao SM-SEA, somente a parte retida após ultrafiltração em membranas capazes de reter moléculas com peso molecular maior que 10.000, induziu a um aumento significativo no número de neutrófilos para a cavidade peritoneal de camundongos (Figura 12). Quando estes sobrenadantes foram submetidos a uma outra ultrafiltração utilizando agora uma membrana que restringe a passagem de moléculas com peso molecular acima de 30.000 observamos que, novamente somente a parte retida nesta membrana foi capaz de induzir um significativo influxo de neutrófilos. Quando a parte retida na membrana de 30.000 foi submetida a uma outra membrana, capaz de restringir moléculas com peso molecular acima de 100.000, observamos que a substância quimiotática para neutrófilos presente no SM-SEA, novamente ficou retida (Figura 12).

A Figura 12 contém ainda dados referentes à investigação do peso molecular do componente quimiotático para neutrófilos presente nos SM-SEB. Neste caso, apenas as moléculas presentes no filtrado das membranas de 10.000, exibiram atividade quimiotática para neutrófilos. De posse destes dados, submetemos então o SM-SEB a uma membrana capaz de restringir a passagem de moléculas com peso molecular acima de 3.000. Novamente observamos que somente as moléculas filtradas, nesta membrana foram capazes de promover recrutamento de neutrófilos para o peritônio de camundongos. Quando este sobrenadante foi submetido a mais uma membrana de ultrafiltração, com o propósito de restringir a passagem de moléculas com peso molecular acima de 1.000, observamos que as moléculas retidas nesta membrana, foram capazes de promover migração de neutrófilos.

3.7 Participação de macrófagos peritoneais residentes sobre a migração de neutrófilos induzida pelo SM-SEA ou pelo SM-SEB

Os dados ilustrados na figura 13 mostram que o influxo de neutrófilos, induzido pelo SM-SEA ou pelo SM-SEB, foi quantitativamente semelhante em cavidades pré-tratadas com Tg (4 dias antes) ou em cavidades que receberam salina como pré-tratamento e que, portanto, não sofreram alterações no número de macrófagos. O painel A desta figura ilustra a efetividade do pré-tratamento dos animais com Tg, ao aumentar o número de macrófagos residentes.

Tanto o SM-SEA como o SM-SEB foram também eficazes em induzir acúmulo de neutrófilos em cavidades depletadas de células residentes, por meio da lavagem prévia com salina estéril, procedimento este que reduz em 85% o número destas células (Figura 14).

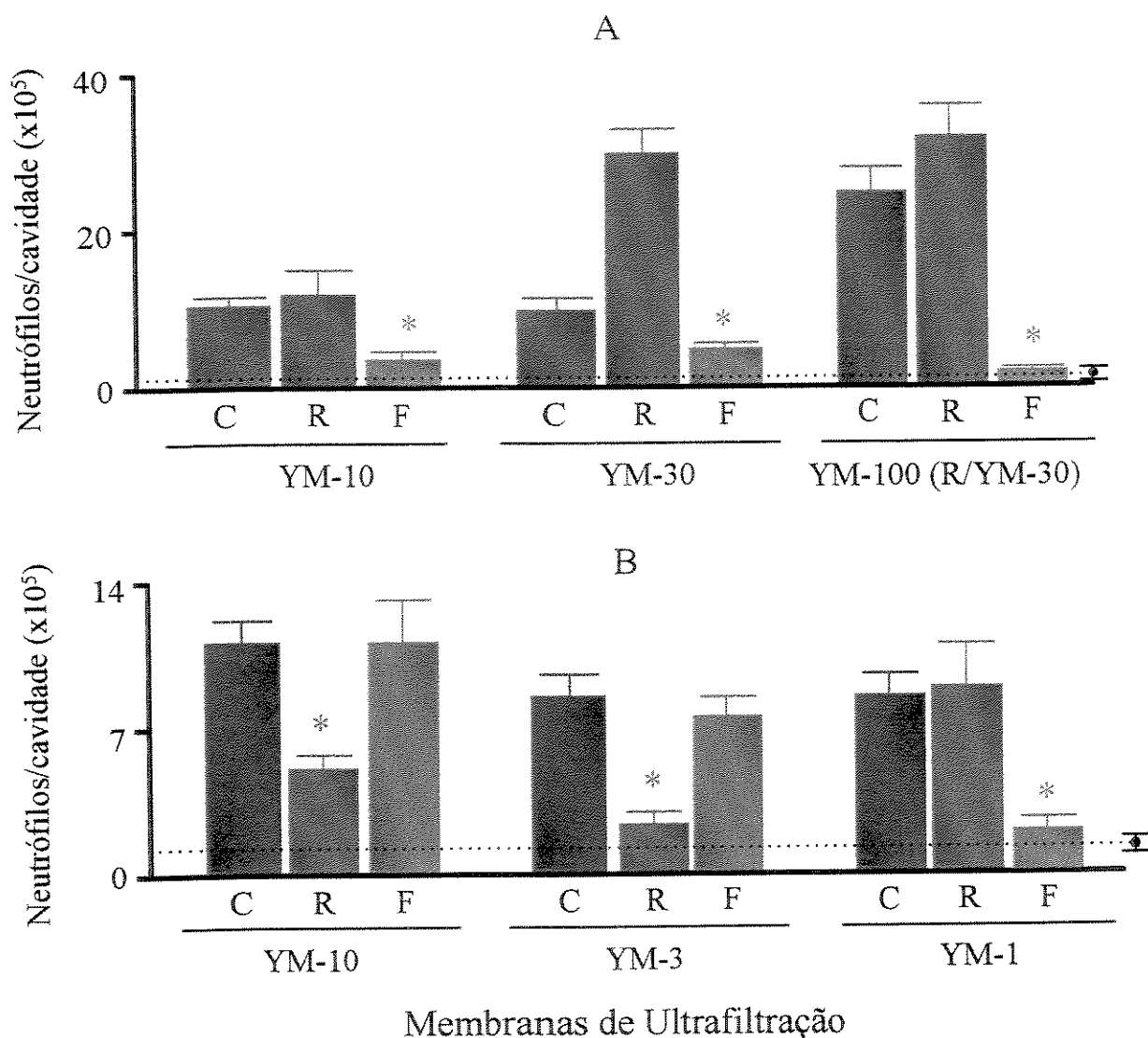


Figura 12. Efeito da ultrafiltração dos sobrenadantes de macrófagos incubados com SEA ou com SEB sobre a migração de neutrófilos. Painel A: sobrenadantes de macrófagos incubados com SEA; Painel B: sobrenadantes de macrófagos incubados com SEB. As barras representam as migrações de neutrófilos induzidas pelas seguintes soluções: sobrenadantes não submetidos a ultrafiltração (C); ressuspensão do material retido nas membranas após a ultrafiltração (R); filtrado coletado após ultrafiltração (F). A migração de neutrófilos foi avaliada 12 h após a injeção dos estímulos. Cada barra representa a média $\pm$ EPM de 5 animais. As linhas tracejadas representam a média dos grupos que receberam sobrenadantes de macrófagos incubados com RPMI. * $p < 0,05$ em relação aos grupos que receberam os sobrenadantes que não foram ultrafiltrados (Teste “t” Student não pareado).

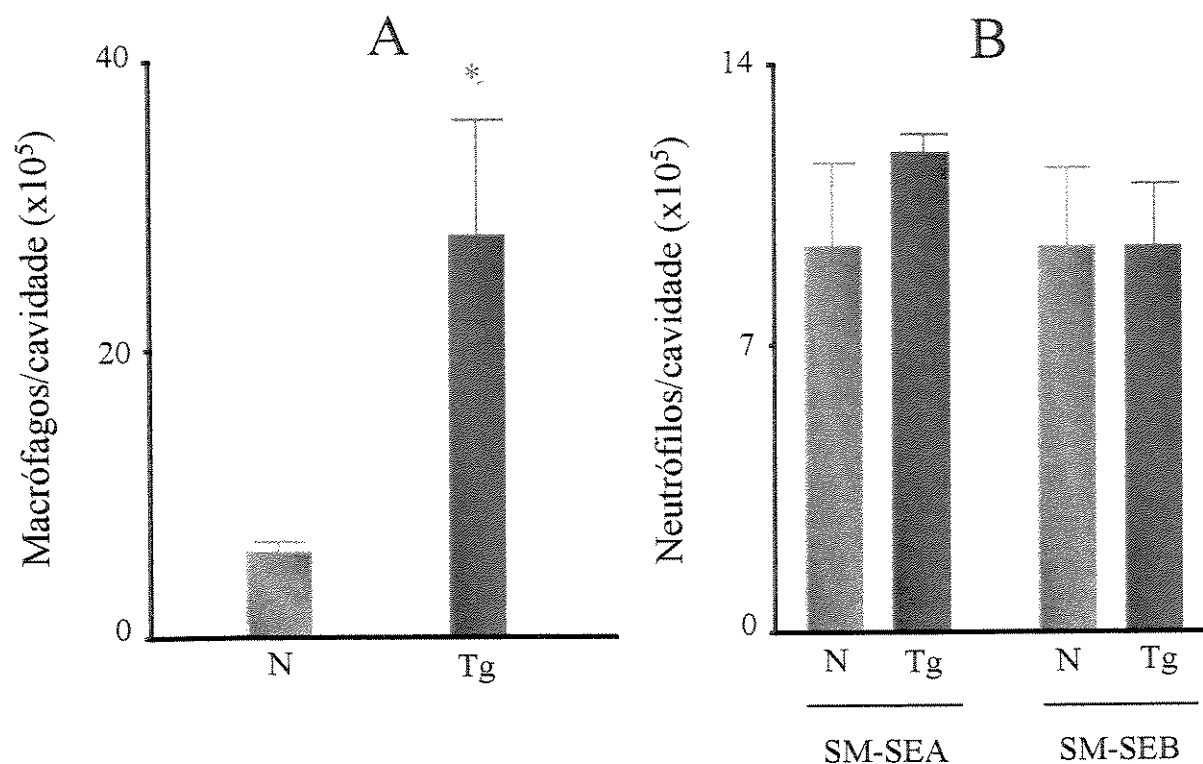


Figura 13. Influência do aumento no número de macrófagos peritoneais sobre a migração de neutrófilos induzida por SM-SEA ou por SM-SEB em camundongos. Painei A: Número de macrófagos em cavidades injetadas com salina (N) ou em cavidades estimuladas com meio tioglicolato (Tg); Painei B: Migração de neutrófilos induzida por SM-SEA ou por SM-SEB em cavidades N ou em cavidades Tg. O Tg a 3% (2 ml/cavidade) foi injetado ip 4 dias antes da administração dos sobrenadantes. A migração de neutrófilos foi avaliada 4 h após a injeção dos sobrenadantes. Cada barra representa a média $\pm$ EPM de 5 animais. *p<0,05 em relação aos grupos sem pré-tratamento (Teste Kruskal-Wallis precedido de ANOVA).

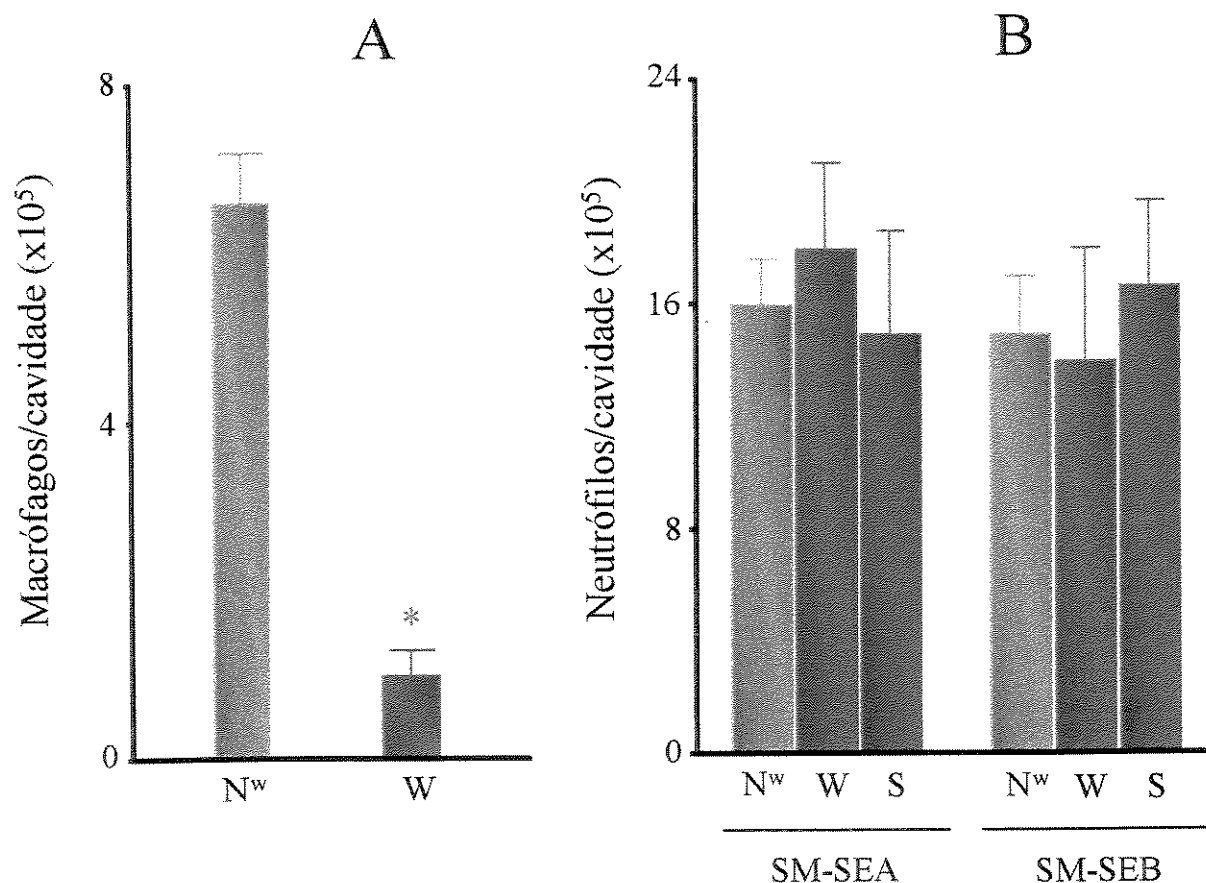


Figura 14. Influência da diminuição no número de macrófagos peritoneais residentes sobre a migração de neutrófilos induzida por SM-SEA ou por SM-SEB em camundongos. Painei A: Número de macrófagos em cavidades não submetidas à lavagem com salina estéril (N^w) ou em cavidades previamente lavadas com salina estéril (W); Painei B: Migração de neutrófilos induzida por SM-SEA ou por SM-SEB em cavidades N^w, W ou “shams” (S). A lavagem das cavidades com salina estéril foi realizada de acordo com o método descrito no item Materiais e Métodos. A migração de neutrófilos foi avaliada 4 h após a injeção dos sobrenadantes. Cada barra representa a média $\pm$ EPM de 5 animais. *p<0,05 em relação aos grupos sem pré-tratamento (Teste Kruskal-Wallis precedido de ANOVA).

3.8 Efeito de inibidores e antagonistas farmacológicos sobre a migração de neutrófilos induzida pelos SM-SEA ou SM-SEB.

Na Figura 15, podemos observar que os pré-tratamentos dos animais com Dexametasona, BW755C, BWA4C ou com Indometacina não foram eficazes em inibir a migração de neutrófilos, observada após o estímulo com SM-SEA. O BN52021 e a CMT também não foram eficazes em inibir o influxo de neutrófilos, induzido pelo SM-SEA. No entanto, em animais pré-tratados com CPS, uma substância capaz de depletar os neuropeptídeos de fibras C sensoriais, observamos uma inibição de 72% na migração de neutrófilos (Figura 15).

Por outro lado, o pré-tratamento dos animais com todos os antagonistas descritos acima, com exceção da Indometacina, ao contrário do que foi observado com o SM-SEA, causaram redução significativa na resposta migratória para neutrófilos do SM-SEB (Figura 15).

3.9 Efeito de antagonistas seletivos para receptores NK₁ e NK₂ de taquicininas sobre a migração de neutrófilos induzida pelos SM-SEA ou SM-SEB.

Em animais pré-tratados com SR140333, um antagonista seletivo para receptores NK₁ de taquicininas, observamos redução significativa do acúmulo de neutrófilos, induzido pelo SM-SEA ou pelo SM-SEB. Por outro lado, não observamos alterações no influxo de neutrófilos, induzido por estes sobrenadantes, em animais que foram pré-tratados com SR48968, um antagonista de receptores NK₂ de taquicininas. Esta figura ilustra ainda que resultados semelhantes foram observados em relação à migração de neutrófilos induzida pela SP (20 nmol/cavidade), que foi utilizada em nossos protocolos experimentais como controle positivo (Figura 16).

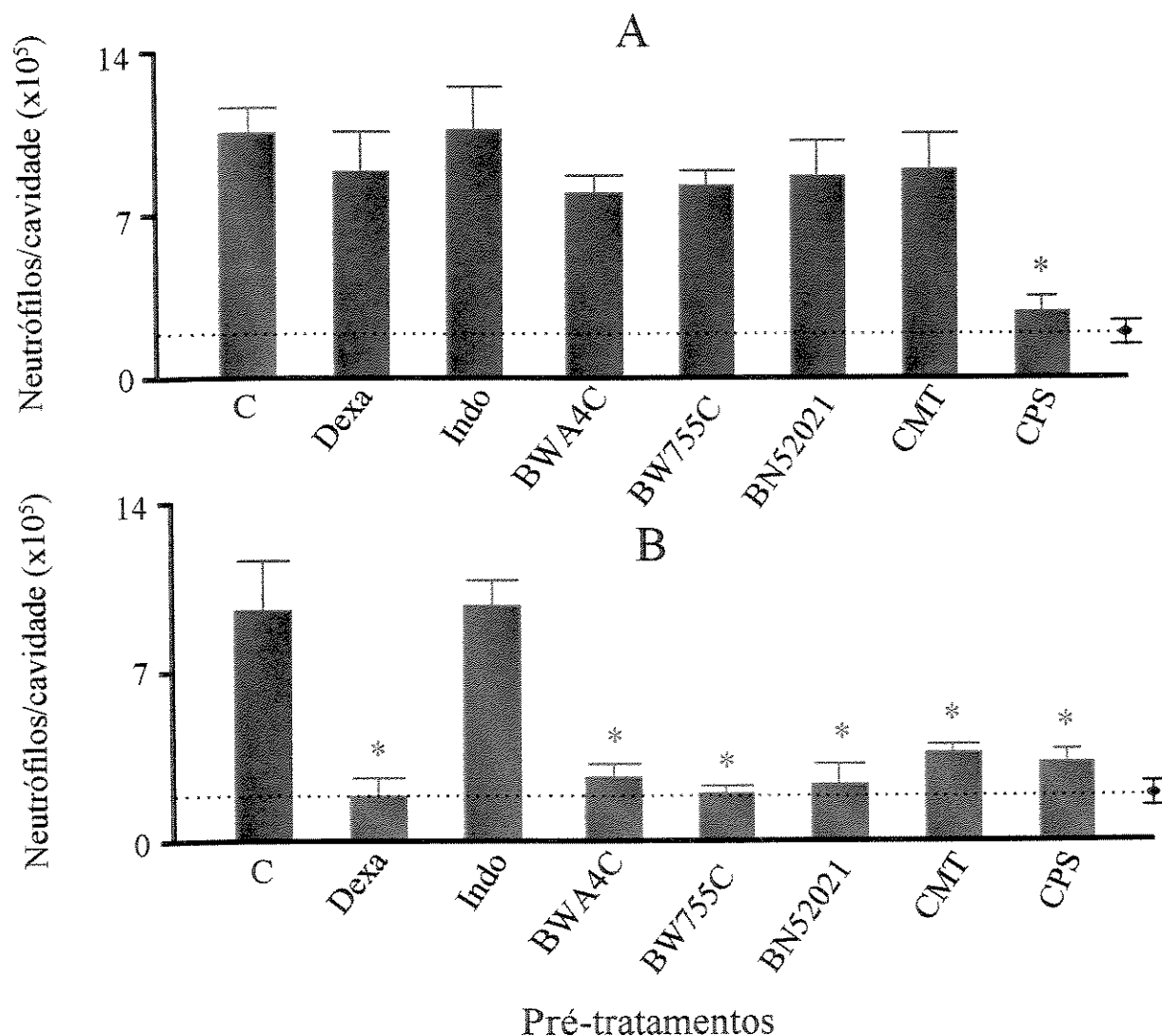


Figura 15. Efeito do pré-tratamento dos animais com inibidores ou antagonistas farmacológicos sobre a migração de neutrófilos induzida pelos sobrenadantes da incubação de macrófagos com SEA ou com SEB. Painel A: sobrenadante da incubação de macrófagos com SEA; Painel B: sobrenadante da incubação de macrófagos com SEB. As drogas foram administradas nos tempos e nas doses descritas no item Materiais e Métodos. A migração de neutrófilos foi avaliada 12 h após a injeção dos estímulos. As linhas tracejadas representam a média dos grupos que receberam sobrenadantes da incubação de macrófagos com RPMI. Cada barra representa a média $\pm$ EPM de 5 animais. *p<0,05 em relação aos grupos sem pré-tratamento (C) (Teste Kruskal-Wallis precedido de ANOVA).

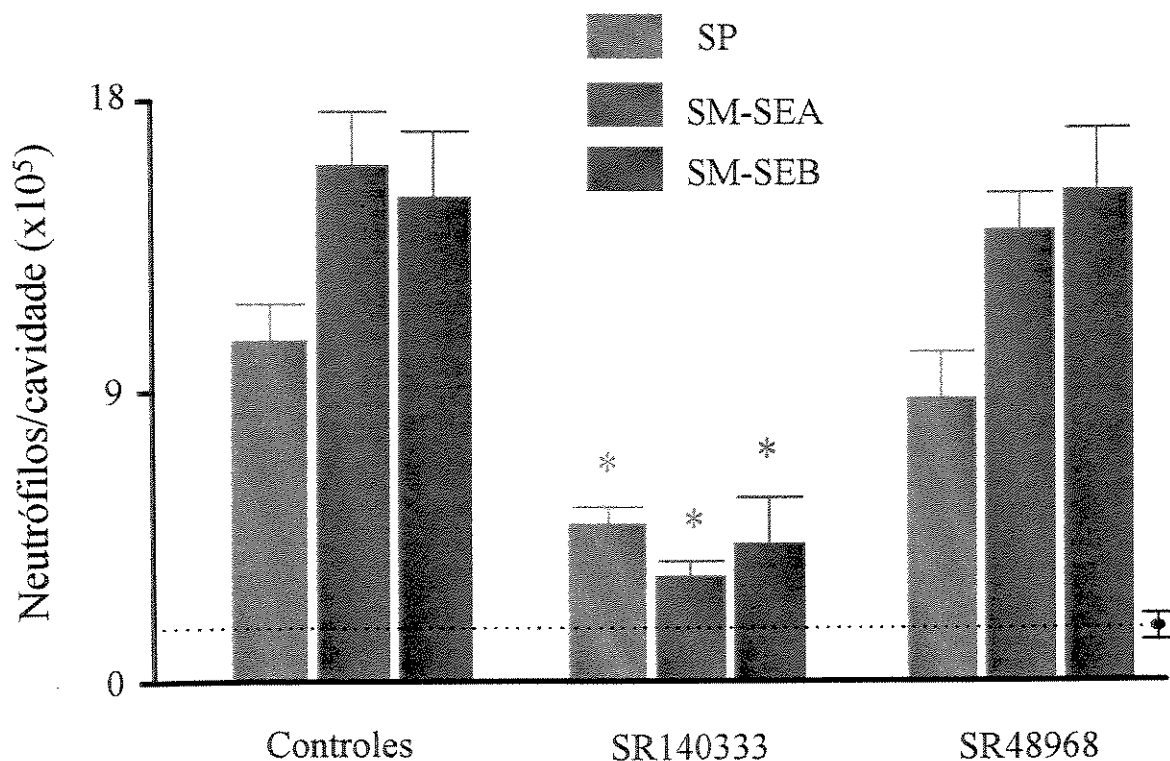


Figura 16. Efeito do pré-tratamento dos animais com antagonistas seletivos para receptores NK₁ e NK₂ de taquicinininas sobre a migração de neutrófilos induzida pelos sobrenadantes da incubação de macrófagos com SEA ou com SEB. O SR140333 (100 µg/kg), antagonista NK₁, e o SR 48968 (1 mg/kg), antagonista NK₂ foram administrados endovenosamente imediatamente antes da administração dos sobrenadantes de macrófagos estimulados com SEA ou com SEB ou da SP (20 nmol/cavidade). A migração de neutrófilos foi avaliada 4 h após a injeção dos estímulos. Cada barra representa a média ± EPM de 5 animais. A linha tracejada representa a média dos grupos que receberam sobrenadantes de macrófagos incubados com RPMI. *p<0,05 em relação aos grupos sem pré-tratamento (C) (Teste Kruskal-Wallis precedido de ANOVA).

4. Discussão

Os presentes resultados indicam que tanto a SEA como a SEB são capazes de induzir migração significativa de neutrófilos, dose e tempo dependente, para a cavidade peritoneal de camundongos. O efeito quimiotático para neutrófilos, exibido por estas duas SEs, é modulado pelo número de células residentes na cavidade peritoneal e foi significativamente inibido com o uso de vários antagonistas ou inibidores farmacológicos tais como a Dexametasona, BWA4C, BN52021, CMT e CPS (DESOUZA & RIBEIRO-DASILVA, 1996;1998).

A migração de neutrófilos, dose e tempo dependente, observada após a injeção *ip* tanto de SEA como de SEB, é contrastante com a reduzida migração causada por estas toxinas na bolsa de ar subcutânea, uma cavidade em que a população de células residentes é consideravelmente menor em relação à cavidade peritoneal (RIBEIRO *et al.*, 1991). Em adição a estas observações, nossos dados também mostraram que a migração de neutrófilos, produzida por estas duas SEs, foi potencializada em cavidades peritoneais onde o número basal de macrófagos foi aumentado pelo pré-tratamento com Tg. Além disto, em cavidades peritoneais, onde o número de macrófagos foi reduzido por lavagem com salina estéril, observamos inibição na resposta migratória induzida por estas SEs. Portanto, todos os fatos descritos acima são indicações de que estas duas SEs produzem migração de neutrófilos por um mecanismo indireto dependente do número de macrófagos na cavidade peritoneal de camundongos, inespecífico e multimediado (DESOUZA & RIBEIRO-DASILVA, 1996; 1998).

É importante ressaltar que mediadores tais como prostaglandinas, LTB₄, IL-1, IL-8, TNF- α e óxido nítrico são liberados por macrófagos ativados por toxinas bacterianas. Estes mediadores estão envolvidos em vários eventos da reação inflamatória, tais como migração de leucócitos, aumento de

permeabilidade vascular, febre e dor (MISFELDT *et al.*, 1990; FLEMING *et al.*, 1991; MELLO FILHO *et al.*, 1997; FERREIRA, 1993; DINARELLO, 1991; KLUGER, 1991). Além disto, de acordo com as hipóteses mais recentes, os macrófagos são considerados células alvo das SEs, através da qual mediadores tais como IL-1, IL-6, TNF- α , e leucotrienos podem ser liberados e ter um papel crucial no desenvolvimento dos efeitos enteropatológicos destas toxinas em humanos (MICUSAN & THIBODEAU, 1993; SEKÁLY, 1993; BOBAK & GUERRANT, 1992; JETT *et al.*, 1990).

Embora não se tenha conhecimento ainda do(s) mecanismo(s) pelos quais as SEs causam seus efeitos (SEKÁLY, 1993; BOBAK & GUERRANT, 1992; JETT *et al.*, 1990; BERGDOLL & CHESNEY, 1991), sabe-se que estes podem ser diferentes de acordo com a toxina causadora (LECLAIRE *et al.*, 1995). Em trabalhos anteriores, sugerimos que, embora a SEA e a SEB sejam capazes de induzir inflamação neurogênica na pata de camundongos, a reação inflamatória local assume características diferentes de acordo com tipo de SE utilizada como estímulo, principalmente no que diz respeito aos mediadores envolvidos. Assim, a resposta edematogênica produzida pela SEA na pata de camundongos envolve os metabólitos da CO, enquanto que aquela produzida pela SEB envolve os metabólitos da LO (DESOUZA *et al.*, 1996; DESOUZA & RIBEIRO-DASILVA, 1997).

Com relação aos eventos celulares da resposta inflamatória induzida por estas toxinas, observamos que a SEA parece ser cerca de 8 vezes mais potente do que a SEB em promover migração de neutrófilos. Assim, 16 μ g de SEA foram suficientes para triplicar o número de neutrófilos na cavidade peritoneal de camundongos, enquanto que com a SEB foram necessárias doses $\geq 62,5$ μ g (DESOUZA & RIBEIRO-DASILVA, 1996; 1998) para se obter uma migração

quantitativamente comparável àquela produzida pela SEA. Além, disto, enquanto que a migração de neutrófilos, induzida pela SEA, parece ter duração aproximada de 24 h, com a SEB este fenômeno continua a ser observado mesmo após 72 h da sua administração (DESOUZA & RIBEIRO-DASILVA, 1996; 1998). Portanto, tanto as diferenças encontradas no perfil de migração de neutrófilos como de edema em camundongos (DESOUZA *et al.*, 1996; DESOUZA & RIBEIRO-DASILVA, 1997) são evidências claras de que o mecanismo pelo qual estas toxinas induzem inflamação diferem de acordo com a SE utilizada como estímulo.

Pequenas doses de LPS são capazes de promover acentuado acúmulo de neutrófilos, sugerindo que uma contaminação das soluções de SEA ou de SEB com esta endotoxina poderia ser a responsável pela migração de neutrófilos, observada em nossos experimentos. Para descartar tal possibilidade, realizamos alguns protocolos experimentais, em que soluções de LPS (200-800 ng/cavidade), SEA (32 µg/cavidade) ou de SEB (250 µg/cavidade) foram incubadas com polimixina B, um antibiótico capaz de inativar o LPS (CUNHA & FERREIRA, 1986; BARJA-FIDALGO *et al.*, 1992). Os resultados obtidos demonstram claramente que as soluções de SEs utilizadas não estavam contaminadas com LPS, pois, mesmo após a incubação com polimixina B, estas toxinas continuaram a induzir migração de neutrófilos quantitativamente semelhante àquela observada com soluções não submetidas à incubação com polimixina B. Por outro lado, com soluções de LPS incubadas com este antibiótico, notificamos inibição acentuada na habilidade desta endotoxina em induzir migração de neutrófilos. Além disto, doses maiores de 200 ng por cavidade de LPS não foram efetivas em induzir recrutamento de neutrófilos, fato este que está de acordo com dados de literatura, mostrando que a endotoxina, em altas doses, exibe efeito antiinflamatório,

caracterizado pela incapacitação dos neutrófilos em migrarem para o sítio inflamado (SMITH, FORD-HUTCHINSON, WALKER, 1977; ROSENBAUN *et al.*, 1983; ROCHA & FERREIRA, 1986).

A liberação de citocinas com propriedade quimiotática para neutrófilos, de células na cavidade peritoneal, poderia ser a causa do recrutamento de neutrófilos frente ao estímulo com estas toxinas. No caso específico da SEA, trabalhos recentes na literatura têm demonstrado que macrófagos alveolares quando estimulados com esta toxina, liberam IL-8 (MILLER, COHEN, PETERSON, 1996 a; MILLER, *et al.*, 1996b). Portanto, a exemplo do que ocorre em outros modelos experimentais (RIBEIRO *et al.*, 1991; BETJES *et al.*, 1996; ZEILLEMAKER *et al.*, 1995), a liberação de IL-8 poderia explicar o influxo de neutrófilos, provocado pela SEA em camundongos. Porém, é importante considerar que esta citocina induz migração de neutrófilos por um mecanismo indireto, que depende da estimulação de células residentes, tais como os mastócitos, com conseqüente liberação de outras citocinas ou fatores quimiotáticos para neutrófilos (RIBEIRO *et al.*, 1991).

Outras citocinas provenientes de macrófagos tais como IL-1, IL-6, TNF- α e INF- γ , também induzem migração de neutrófilos, tanto *in vivo* como *in vitro*, e estão envolvidas em muitos eventos das respostas inflamatória e imune (BECK *et al.*, 1986; CYLBULSKI *et al.*, 1986; HENDERSON & PETTPHER, 1988; FACCIOLLI *et al.*, 1990; LINDLEY *et al.*, 1988; COLDITZ *et al.*, 1989). Conforme mencionado anteriormente, as SEs são capazes de estimular células mononucleares a liberar IL-1, IL-6 e TNF- α (MICUSAN & THIBODEAU, 1993; SEKÁLY, 1993; BOBAK & GUERRANT, 1992; JETT *et al.*, 1990). O mecanismo pelo qual IL-1, TNF- α e INF- γ induzem migração de neutrófilos está correlacionado com a estimulação de macrófagos residentes que, quando

incubados *in vitro* com estas citocinas, são capazes de liberar fatores quimiotáticos para neutrófilos (CUNHA & FERREIRA, 1986; RAMPART & WILLIAMS, 1988; FACCIOLLI *et al.*, 1990; HARMSSEN & HAVEL, 1990; RIBEIRO *et al.*, 1991; 1995). Assim, nossos resultados não descartam a possibilidade de um envolvimento destas citocinas no influxo de neutrófilos induzido por SEA ou SEB.

O influxo de neutrófilos induzido pela SEA ou pela SEB na cavidade peritoneal de camundongos, foi significativamente inibido pelo pré-tratamento dos animais com dexametasona ou com BWA4C, mas não foi afetado com o uso da indometacina, o que sugere que os produtos da LO, tais como o LTB₄, poderiam estar envolvidos no recrutamento de neutrófilos, observado após a injeção destas duas SEs. No entanto, autores como RIBEIRO *et al.* (1995) acreditam que o LTB₄ também induz migração de neutrófilos por um mecanismo indireto, que depende da liberação de outros mediadores (ou fatores quimiotáticos para neutrófilos) de macrófagos residentes.

Nossos dados mostraram que o composto BN52021, um antagonista de PAF, é capaz de causar redução significativa na migração de neutrófilos produzida por estas duas SEs, sugerindo que este mediador poderia estar sendo produzido durante a resposta inflamatória induzida por estas toxinas e desempenhar um importante papel no influxo de neutrófilos (DESOUZA & RIBEIRO-DASILVA, 1996; 1998). O PAF é considerado um potente agente quimiotático para neutrófilos e pode ser liberado por células tais como os basófilos, macrófagos, plaquetas e os próprios neutrófilos, em resposta a uma variedade de estímulos lesivos (BRAQUET *et al.*, 1987; WATANABE *et al.*, 1994). A atividade quimiotática do PAF está correlacionada ao fato deste mediador ser capaz de aumentar a adesividade entre os neutrófilos e as células

endoteliais (HUMPHREY, HANAHAN, PINCKARD, 1982; MACMILLAN & FOSTER, 1988; LEHRER *et al.*, 1988).

Demonstramos recentemente que tanto a SEA como a SEB induzem edema neurogênico na pata de camundongos (DESOUZA *et al.*, 1996; DESOUZA & RIBEIRO-DASILVA, 1997). Esta hipótese está baseada no fato de que a capsaicina, uma substância capaz de depletar as fibras C sensoriais do seu conteúdo de neuropeptídeos, é capaz de reduzir acentuadamente o edema e o extravasamento plasmático, induzido por estas duas SEs, na pata de camundongos. A SP é o principal mediador da inflamação neurogênica (FOREMAN, 1987; WALSH *et al.*, 1995) e parece estar também envolvida nos efeitos patofisiológicos da SEs (ALBER *et al.*, 1989; MICUSAN & THIBODEAU, 1993). A inflamação neurogênica pode ser induzida pela estimulação elétrica (ou química) de neurônios sensoriais e envolve uma série de eventos inflamatórios tais como vasodilatação, formação de edema e acúmulo de leucócitos (WALSH *et al.*, 1995).

A migração de neutrófilos, produzida por SEA ou por SEB, na cavidade peritoneal de camundongos foi significativamente inibida pelo pré-tratamento dos animais com capsaicina (DESOUZA & RIBEIRO-DASILVA, 1996; 1998), o que reforça a nossa hipótese de que estas toxinas induzem a uma inflamação neurôgenica em camundongos. Além disto, o provável envolvimento da SP neste fenômeno estabelece mais uma correlação positiva entre os efeitos destas toxinas em camundongos e aqueles observados em humanos, (MICUSAN & THIBODEAU, 1993) sugerindo, novamente, que o modelo experimental de inflamação em camundongos poderia ser útil para se esclarecer melhor o mecanismo de ação das SEs.

Um número considerável de mediadores, provenientes de mastócitos, está

também envolvido na resposta inflamatória induzida pela SP, tais como histamina e o LTB₄. Estes mediadores são considerados como os principais responsáveis pela infiltração de leucócitos, observada na pele de camundongos administrados com SP (FOREMAN, 1987; IWAMOTO & NADEL, 1989).

Este fato poderia explicar nossos resultados, mostrando que a migração induzida por SEA ou SEB foi reduzida quando os animais foram pré-tratados com CMT, antagonista de receptores H₂ da histamina, ou com o BWA4C (DESOUZA & RIBEIRO-DASILVA, 1996; 1998). Estes resultados podem ainda constituir uma evidência de que não só os macrófagos, como também os mastócitos, poderiam participar da mobilização de neutrófilos para o foco inflamatório, frente ao estímulo com SEs. Neste contexto, é lícito considerar ainda que a estimulação de neurônios sensoriais, com conseqüente liberação de neuropeptídeos e estimulação de mastócitos é também uma importante etapa no desenvolvimento dos eventos patofisiológicos destas toxinas em humanos (SCHEUBER *et al.*, 1987; MICUSAN & THIBODEAU, 1993).

Com o intuito de investigar melhor a participação de macrófagos sobre a migração de neutrófilos induzida por SEs, realizamos uma série de protocolos experimentais em que macrófagos peritoneais, provenientes de camundongos pré-tratados (4 dias antes) com meio tioglicolato de sódio, foram incubados *in vitro* com estas duas toxinas. Os resultados obtidos neste estudo mostraram que os sobrenadantes resultantes da incubação *in vitro* de macrófagos com SEA (SM-SEA) ou com SEB (SM-SEB), quando injetados *ip* em camundongos, são capazes de induzir migração de neutrófilos. Estes dados sugerem, portanto, que substâncias com propriedade quimiotática para neutrófilos são produzidas, quando macrófagos são estimulados com SEs, confirmando a nossa hipótese de que estas células desempenham um papel modulatório na infiltração de

neutrófilos provocada por estas duas SEs *in vivo* (DESOUZA & RIBEIRO-DASILVA, 1996; 1998).

A possível contaminação dos sobrenadantes com endotoxina bacteriana, também poderia explicar o influxo de neutrófilos observado em nossos protocolos experimentais. Para descartar tal possibilidade, incubamos os sobrenadantes, ou soluções de LPS, com polimixina B (CUNHA & FERREIRA, 1986). Assim, mesmo após a incubação com polimixina, estes sobrenadantes, mas não o LPS, continuaram a induzir migração de neutrófilos, descartando assim a hipótese de que a migração tenha sido causada por contaminação com endotoxina bacteriana.

A liberação dos componentes quimiotáticos para neutrófilos nos SM-SEA ou no SM-SEB é um fenômeno que ocorre de uma maneira-dose e tempo-dependente e não envolve morte celular, uma vez que, em todos os protocolos experimentais, aproximadamente 95% dos macrófagos mostraram-se viáveis. Nossos resultados também mostraram que, tanto o SM-SEA como o SM-SEB, obtidos após 60 minutos de pré-incubação com as toxinas, ou após 3 h de incubação com o meio de cultura, foram capazes de induzir significativa migração de neutrófilos. Estes resultados podem estar refletindo o fato de que, nestes períodos, a atividade funcional destas células estavam aumentadas, uma vez que as mesmas foram mantidas em condições ideais de temperatura, pH e nutrientes. É importante ressaltar que, os macrófagos são considerados como células essencialmente secretoras, podendo liberar mais de 100 substâncias ativas em eventos da reação inflamatória aguda, bem como em uma série de eventos fisiológicos. A secreção de muitas destas moléculas depende do estado metabólico dos macrófagos que, por sua vez, depende da interação dos mesmos com o microambiente (NATHAN, 1987; PENDINO & LASKIN, 1995).

Além disto, a liberação destas substâncias parece ser dependente de pH e

temperatura próximos ao fisiológico, e da presença de íons cálcio, magnésio e da glicose. Diante do exposto, podemos então considerar que, macrófagos estimulados *in vitro* com SEA ou com SEB secretam, por um processo ativo, substâncias quimiotáticas para neutrófilos.

Nossos resultados indicam da mesma forma que as substâncias quimiotáticas para neutrófilos, presentes nos SM-SEA ou SM-SEB, possuem natureza protéica. Esta hipótese está baseada em resultados, mostrando que estes sobrenadantes perdem a habilidade em induzir migração de neutrófilos quando aquecidos por 30 minutos, a 100°C. Por outro lado, em ambos os casos, estas proteínas com atividade quimiotática para neutrófilos parecem possuir em sua sequência de aminoácidos, ligações peptídicas de tirosina, triptofano e fenilalanina. Estes fatos estão baseados nas observações de que ambos os componentes tiveram as suas atividades quimiotáticas comprometidas após a incubação com quimotripsina, uma enzima proteolítica apropriada para hidrolisar ligações peptídicas de tirosina, triptofano e fenilalanina (STRYER, 1992). Por outro lado, a incubação destes componentes com uma outra enzima proteolítica, a tripsina, não interferiu com a atividade quimiotática para neutrófilos dos mesmos. A tripsina é uma enzima específica para a hidrólise de ligações peptídicas de lisina e arginina (STRYER, 1992), sugerindo que estas ligações não fazem parte da estrutura protéica das substâncias quimiotáticas para neutrófilos secretadas por macrófagos estimulados com SEA ou com SEB.

A inativação da atividade quimiotática dos SM-SEA ou do SM-SEB pelo aquecimento e o fato destes componentes serem sensíveis à ação de enzimas proteolíticas, descartam ainda a possibilidade de que a atividade quimiotática dos mesmos seja devido a uma contaminação dos sobrenadantes com as SEs, pois estas toxinas são proteínas termoestáveis e resistentes à ação de tais enzimas

(BERGDOLL, 1989; IANDOLO, 1989).

Macrófagos pré-tratados *in vitro* com ciclohexemida, um inibidor de síntese protéica, parecem liberar pequenas quantidades destes componentes quimiotáticos para neutrófilos nos sobrenadantes. Esta última observação sugere ainda que estas substâncias não são previamente sintetizadas e estocadas pelos macrófagos e sim sintetizadas imediatamente após o contato destas células com as toxinas.

O mecanismo pelos quais as SEs causam os seus efeitos característicos, em humanos, podem ser diferentes, de acordo com o tipo de SE causadora (LECLAIRE *et al.*, 1995). Em trabalhos anteriores, demonstramos que a resposta edematogênica induzida pela SEA em camundongos, difere daquela observada com a SEB, principalmente em relação aos mediadores inflamatórios envolvidos (DESOUZA *et al.*, 1996; DESOUZA & RIBEIRO-DASILVA, 1997). Nos resultados apresentados nesta tese, observamos que o peso molecular da substância quimiotática para neutrófilos presente no SM-SEA é maior do que 100.000, enquanto que o peso molecular da substância presente no SM-SEB parece estar entre 1.000 e 3.000. Todas estas observações sugerem que, embora a migração de neutrófilos, causada por estas toxinas, na cavidade peritoneal de camundongos, se desenvolva dentro de um padrão semelhante, principalmente no que diz respeito aos mediadores envolvidos (DESOUZA & RIBEIRO-DASILVA, 1996, 1998), macrófagos estimulados *in vitro* com estas toxinas liberam componentes quimiotáticos para neutrófilos com características distintas. Esta hipótese foi ainda confirmada com resultados mostrando que, enquanto o componente quimiotático presente no SM-SEA foi capaz de resistir a vários ciclos de congelamento e descongelamento, o componente presente no SM-SEB perdeu a atividade quimiotática após tais procedimentos. Além disto, o SM-SEA

continua a possuir atividade quimiotática para neutrófilos mesmo após vários dias de armazenamento em geladeira, enquanto que o SM-SEB perde quase totalmente a atividade quimiotática quando armazenado, nestas condições, por períodos maiores do que 48 h.

Vários autores demonstraram que o acúmulo de neutrófilos em exsudatos inflamatórios, induzido pelo LPS, é controlado por células peritoneais residentes (RUSSO, 1980; MERRIL *et al.*, 1980; HERMANOWICZ & NAWARKA, 1986; ISSEKUTZ, MEGYERI, ISSEKUTZ, 1987; LEE, 1987; SCHRODER *et al.*, 1987). Além disto, sabe-se que macrófagos estimulados *in vitro* com esta endotoxina liberam, para o meio de cultura, um fator quimiotático para neutrófilos (MNCF) (CUNHA & FERREIRA, 1986). O MNCF é uma proteína com peso molecular de 54.000, com atividade do tipo lectina (RIBEIRO *et al.*, 1995; BARUFFI, CUNHA, FERREIRA, 1993), que parece ser o principal mediador envolvido no recrutamento de neutrófilos, induzido por vários estímulos inflamatórios com propriedade quimiotática para neutrófilos, tais como IL-1, TNF- α e IFN- γ (FACCIOLLI *et al.*, 1990; RIBEIRO *et al.*, 1990;1995).

As SEs compartilham várias atividades biológicas com o LPS (BERGDOLL & CHESNEY, 1991). Desta maneira, o fato da incubação *in vitro* de macrófagos com SEA ou com SEB, também resultar na liberação de proteínas quimiotáticas para neutrófilos, pode significar uma possível semelhança entre o mecanismo de ação destas toxinas e aquele anteriormente descrito para o LPS, em induzir influxo de neutrófilos para o foco inflamatório (CUNHA & FERREIRA, 1986; ISSEKUTZ *et al.*, 1987). No entanto, nossos resultados não nos permitem concluir que as proteínas quimiotáticas presentes nos SM-SEA ou SM-SEB e o MNCF, sejam substâncias similares.

Assim, enquanto que o componente quimiotático presente no SM-SEB

parece possuir peso molecular entre 1.000-3.000, o MNCF possui peso molecular de 54.000. Além disto, a migração de neutrófilos induzida pelo MNCF em ratos não é afetada pelo pré-tratamento dos animais com dexametasona (CUNHA & FERREIRA, 1986; BARUFFI, *et al.*, 1993), ao contrário do se observa com outros mediadores conhecidos por participar da infiltração de neutrófilos, durante a resposta inflamatória, tais como IL-1, TNF- α e IFN- γ , LTB₄ e o C5a (FACCIOLLI *et al.*, 1990; RIBEIRO *et al.*, 1991, 1997). Em nossos experimentos, a migração de neutrófilos, causada pelo SM-SEB, foi reduzida nos 80% em animais tratados com dexametasona. O peso molecular da substância quimiotática presente no SM-SEA (>100.000) também parece excluir a possibilidade de que este componente quimiotático seja similar ao MNCF. Ao contrário do que foi observado com o SM-SEB, a migração de neutrófilos induzida pelo SM-SEA não foi afetada em animais tratados com dexametasona.

Os glicocorticóides inibem a liberação de muitas substâncias biologicamente ativas, incluindo substâncias quimiotáticas para neutrófilos tais como os metabólitos do AA ou citocinas (HIGGS & VANE, 1983; FLOWER, 1988; FANTUZZI & GHEZZI, 1993; KLEIN *et al.*, 1995). Em nossos experimentos, o pré-tratamento *in vitro* dos macrófagos com dexametasona (5 μ g/ml), resultou na redução de 30% na atividade quimiotática do SM-SEB e de 71% na atividade SM-SEA, sugerindo, portanto, que esta droga é capaz de inibir a liberação dos componentes quimiotáticos para neutrófilos induzido por estas toxinas. Por outro lado, drogas antiinflamatórias não esteroidais tais como a indometacina e o BW755C não tiveram efeito sobre a atividade quimiotática para neutrófilos do SM-SEA ou do SM-SEB, o que nos permite sugerir que metabólitos do AA, não poderiam ser responsáveis pela atividade quimiotática destes componentes. Além disto, os componentes quimiotáticos presentes no SM-

SEA ou no SM-SEB parecem possuir peso molecular maior do que as substâncias derivadas de fosfolípidos de membranas celulares com atividade quimiotática para neutrófilos (PAF, produtos da lipoxigenases e ciclooxigenases).

O peso molecular do componente quimiotático para neutrófilos presente no SM-SEB (1.000-3.000) sugere que, citocinas tais como IL-1, TNF- α , INF- γ , IL-8 e o C5a, não são responsáveis pela atividade quimiotática para neutrófilos deste componente (DINARELLO, 1994; CUNHA & FERREIRA, 1986). Além disto, o influxo de neutrófilos, para a cavidade peritoneal de ratos, induzido por IL-1, IL-8, TNF- α , INF- γ e LTB₄ é dependente do número de células residentes (FACCIOLI *et al.*, 1990; RIBEIRO *et al.*, 1995), com conseqüente liberação de fatores quimiotáticos para neutrófilos (RIBEIRO *et al.*, 1991; RIBEIRO *et al.*, 1997; FACCIOLI *et al.*, 1990), e o influxo de neutrófilos, induzido tanto pelo SM-SEA como pelo SM-SEB, não é alterado em cavidades peritoneais com número de macrófagos aumentados (pré-tratamento com Tg) ou diminuídos (lavagem das cavidades com salina estéril). A incubação tanto do SM-SEA como do SM-SEB a 56°C, procedimento que inativa o C5a (COLLINS *et al.*, 1991), não resultou em diminuição de atividade quimiotática em ambos os casos, o que significa mais uma evidência de que este mediador não poderia ser responsável pela atividade quimiotática para neutrófilos observada com a injeção ip do SM-SEA ou do SM-SEB. No entanto, nossos resultados não descartam a possibilidade de que, as citocinas e ou os mediadores citados acima, possam estar sendo liberados durante o desenvolvimento da migração de neutrófilos induzida pelas proteínas quimiotáticas presente nestes sobrenadantes.

Vários autores têm demonstrado que macrófagos de camundongos estimulados com LPS são capazes de secretar proteínas com propriedade quimiotática para células polimorfonucleares humanas, denominadas de proteínas

inflamatórias de macrófagos (MIP)-2, MIP-1 α e MIP-1 β (WOLPE *et al.*, 1988, 1989; DAVATELIS, *et al.*, 1988; WIDMER *et al.*, 1993; SHANLEY *et al.*, 1995 SCHMAL *et al.*, 1996). Embora estas proteínas sejam estruturalmente semelhantes, o peso molecular das proteínas que fazem parte das MIP-1 está em torno de 8.000, enquanto que o peso molecular da MIP-2 está em torno de 6.000 (WOLPE *et al.*, 1988, 1989; WIDMER *et al.*, 1993). Estes fatos descartam também a possibilidade de que estas proteínas sejam responsáveis pela atividade quimiotática para neutrófilos, observada com a administração do SM-SEA ou do SM-SEB.

Recentemente, descrevemos que o influxo de neutrófilos produzido por SEA ou por SEB em cavidades peritoneais de camundongos, além de serem modulados por macrófagos residentes, envolve mediadores inflamatórios tais como os metabólitos da LO, PAF, histamina e neuropeptídeos de fibras C sensoriais (DESOUZA & RIBEIRO-DASILVA, 1996; 1998).

Os metabólitos da LO desempenham importante papel na resposta migratória induzida pelo SM-SEB, pois o pré-tratamento dos animais com Dexametasona, BWA4C ou BW755C, mas não com a Indo, foram bastante eficazes em inibir o recrutamento de neutrófilos, observado após o estímulo com este sobrenadante. Observamos também que o pré-tratamento dos animais com um antagonista de PAF resultou numa inibição significativa do influxo de neutrófilos induzido pelo SM-SEB. Os mesmos mediadores citados acima parecem estar envolvidos na resposta quimiotática para neutrófilos produzida pela SEB na cavidade peritoneal de camundongos (DESOUZA & G. RIBEIRO-DASILVA, 1996). Estes resultados sugerem que, embora os macrófagos modulem o influxo de neutrófilos induzido pela SEB, por meio da liberação de um componente quimiotático com características diferentes daqueles conhecidos, o mecanismo pelo qual este

componente induz migração provavelmente envolve a estimulação de outros tipos celulares, como por exemplo, os mastócitos, que estariam sendo responsáveis pela liberação dos mediadores mencionados acima; entretanto mesmo com uma redução de aproximadamente 90% na população de células residentes, a resposta migratória deste sobrenadante não foi modificada. Este fato não descarta a possibilidade de que a quantidade reduzida de células residentes, nas cavidades submetidas à lavagem, possa estar sendo estimulada pela substância quimiotática para neutrófilos, presente neste sobrenadante, a liberar os mediadores quimiotáticos citados acima.

Por outro lado, o influxo de neutrófilos induzido pelo SM-SEA parece não envolver os metabólitos da LO, CO e o PAF, pois o pré-tratamento dos animais com Dexametasona, BW44C, BW755C, Indo ou BN52021 não tiveram efeito sobre a migração de neutrófilos induzida por este sobrenadante. Os mesmos antagonistas e inibidores farmacológicos citados foram também eficazes em reduzir a resposta migratória da SEA em cavidades peritoneais de camundongos (DESOUZA & RIBEIRO-DASILVA, 1998). Este fato sugere que o componente quimiotático liberado por macrófagos estimulados com SEA induz influxo de neutrófilos por um mecanismo direto, sem envolver a liberação de outros mediadores, podendo então ser considerado um dos mediadores envolvidos na resposta migratória desta toxina *in vivo*. Além disto, estes dados mostram mais uma vez que os componentes quimiotáticos para neutrófilos presentes no SM-SEA ou no SM-SEB são substâncias distintas, que possuem mecanismos de ação diferentes em induzir migração de neutrófilos.

Nós temos demonstrado que os neuropeptídeos de fibras C sensoriais participam tanto dos eventos vasculares, como da infiltração de neutrófilos, produzida tanto por SEA como por SEB em camundongos. Esta é uma forte

evidência de que as SEs induzem inflamação do tipo neurogênica neste modelo animal (DESOUZA *et al.*, 1996; DESOUZA & RIBEIRO DA-SILVA, 1996; 1997; 1998).

Os resultados apresentados neste trabalho revelam ainda que a resposta quimiotática para neutrófilos tanto do SM-SEA como do SM-SEB foi reduzida em animais pré-tratados com CPS, uma substância amplamente utilizada para promover depleção de neuropeptídeos (principalmente SP e o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina) de fibras C sensoriais (FOREMAN, 1987). As propriedades inflamatórias da SP, incluindo acúmulo de leucócitos, formação de edema e vasodilatação local depende da interação deste neuropeptídeo com receptores NK₁ de taquicininas (YANO *et al.*, 1989; TAKEDA *et al.*, 1991; GUARD & WATSON, 1991; WALSH *et al.*, 1995). Em nossos resultados, observamos também que a migração de neutrófilos, induzida pelo SM-SEA ou pelo SM-SEB, foi reduzida em animais pré-tratados com antagonista seletivo de receptores de taquicininas NK₁ (SR140333), mas não com antagonista seletivo para receptores de taquicininas NK₂ (SR48968). Estes resultados são sugestivos de que as substâncias quimiotáticas presentes nestes sobrenadantes são capazes de promover a liberação de SP, que parece desempenhar um papel fundamental na resposta migratória destas substâncias. Além disto, a resposta migratória do SM-SEB, mas não do SM-SEA, foi inibida com o uso de um antagonista de receptores H₂ de histamina, sugerindo portanto que, a exemplo de outros modelos experimentais de inflamação neurogênica, os mastócitos poderiam participar ativamente na seqüência de eventos que levam ao recrutamento de neutrófilos induzido pelo SM-SEB. Pôr outro lado, o não envolvimento de histamina na quimiotaxia para neutrófilos, induzida pelo SM-SEA talvez indique que, neste caso, os mastócitos não tenham um papel relevante, e que a SP, que é igualmente

um poderoso agente quimiotático para neutrófilos, poderia estar contribuindo para a migração observada após o estímulo com SM-SEA (FOREMAN, 1987; PARTSCH & MATUCCI-CERNIC, 1992).

A IL-1 também pode induzir à liberação de SP, que parece estar envolvida ativamente no recrutamento de neutrófilos *in vivo*, induzido por esta interleucina (PERRETI *et al.*, 1993). Embora o mecanismo pelo qual a IL-1 promova a liberação de SP ainda não esteja definido, vários autores têm descrito que a migração de neutrófilos induzida por esta interleucina não é afetada em animais pré-tratados com o SR140333, um antagonista de receptores NK₁ de taquicininas (PINTER *et al.*, 1998). A habilidade deste antagonista em inibir o influxo de neutrófilos, induzido pelo SM-SEA ou pelo SM-SEB, pode constituir, portanto, em mais uma evidência de que a IL-1 não estaria presente nestes sobrenadantes.

Os resultados apresentados nesta tese contribuem para o melhor esclarecimento do mecanismo de ação da SEs e sugerem que produtos de macrófagos tem um importante papel no influxo de neutrófilos induzido por estas toxinas.

5. Conclusões

SUMMARY

In this study, the role of macrophages in the neutrophil migration induced by staphylococcal enterotoxins A (SEA) and B (SEB) into the mouse peritoneal cavity was investigated. SEA and SEB induced dose- and time-dependent neutrophil migration into the mouse peritoneal cavity.

This migration was potentiated when the macrophage population was increased by pre-treating the mice with thioglycolate, and was reduced when the peritoneal cavities were washed with sterile saline. These results indicated that the neutrophil recruitment induced by these toxins was dependent on the number of resident macrophages.

Dexamethasone inhibited the neutrophil migration induced by SEA and SEB. A similar response was observed with the PAF receptor antagonist (BN52021), the histamine H₂ receptor (cimetidine), the lipoxygenase inhibitor (BWA4C) and a sensory C-fiber neuropeptide depletor (capsaicin). In contrast, indomethacin had no effect on the neutrophil chemotaxis. Thus, lipoxygenase metabolites, PAF, histamine and neuropeptides from sensory neurons play an important role in the neutrophil migration induced by SEA and SEB.

When stimulated with SEA or SEB *in vitro*, mouse peritoneal macrophages secreted thermolabile proteins which induced neutrophil migration into the peritoneal cavities of naive mice. The release of these proteins was dose- and time-dependent and was inhibited by dexamethasone but not by indomethacin or BW755C.

The molecular mass of the neutrophil chemotactic protein secreted by SEB-stimulated macrophages was 1-3 kDa while that of the protein secreted

by SEA was > 100 kDa. The neutrophil migration induced by supernatants from SEB-stimulated macrophages involved inflammatory mediators such as lipoxygenase metabolites, PAF and histamine. In contrast, these same mediators had no role in the neutrophil migration induced by supernatants from SEA-stimulated macrophages, suggesting that the neutrophil chemotactic proteins described above, induce neutrophil accumulation by different mechanisms.

Capsaicin and neurokinin₁ (NK₁) receptor antagonist SR140333 reduced the neutrophil recruitment induced by supernatants from macrophage monolayers stimulated with SEA or SEB. In contrast, the neurokinin₂ (NK₂) receptor antagonist SR48968 had no effect on the neutrophil migratory response of the supernatants. These results suggest that the neutrophil migration induced by these chemotactic proteins may involve the release of neuropeptides such as SP from sensory neurons.

In conclusion, macrophage products may play an important role in the neurogenic inflammation induced by SEA and SEB by releasing specific chemotactic proteins.

Nossos dados sugerem que tanto a SEA como a SEB induzem significativa migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de camundongos. Esta migração não teve a mesma magnitude quando observada na bolsa de ar subcutânea, sugerindo, portanto, que a migração causada por estas toxinas é modulada, em parte, por células residentes.

Concordando com a hipótese acima, nossos dados também revelam que a habilidade destas toxinas em induzir migração de neutrófilos está correlacionada com o número de macrófagos residentes na cavidade peritoneal, sugerindo portanto que a migração causada por estas toxinas é modulada, em parte, por células residentes.

Vários mediadores inflamatórios estão envolvidos na infiltração de neutrófilos, produzida por estas SEs, tais como os metabólitos da LO, PAF e histamina. Os neuropeptídeos de fibras C sensoriais participam deste fenômeno, o que reforça a nossa hipótese de que estas SEs produzem uma inflamação neurogênica em camundongos.

Macrófagos de camundongos estimulados *in vitro* com SEA ou com SEB, liberam nos sobrenadantes, de maneira dose e tempo-dependente, componentes protéicos, quimiotáticos para neutrófilos. Em ambos os casos, estas proteínas são termolábeis e possuem ligações peptídicas de tirosina, triptofano e fenilalanina.

Nossos dados também indicam que a proteína quimiotática para neutrófilos presente no SM-SEA possui peso molecular acima de 100.000, enquanto que a proteína presente no SM-SEB possui peso molecular entre 1.000-3.000. Além

disto, a resposta quimiotática para neutrófilos do SM-SEB envolve mediadores inflamatórios tais como metabólitos da LO e o PAF, enquanto que estes mediadores não desempenham papel relevante na resposta migratória induzida pelo SM-SEA. Estes dados sugerem, portanto, que as proteínas quimiotáticas para neutrófilos presentes nos SM-SEA e no SM-SEB são substâncias diferentes e possuem mecanismos distintos para induzir influxo de neutrófilos para o foco inflamatório.

O mecanismo pelo qual tanto o SM-SEA como o SM-SEB induzem migração de neutrófilos envolve também, a estimulação de terminações nervosas sensoriais com conseqüente liberação de neuropeptídeos. Além disto, em ambos os casos, a utilização de um antagonista seletivo para receptores NK₁ de taquicininas resultou na redução da resposta migratória para neutrófilos.

Estes resultados contribuem o melhor esclarecimento do mecanismo de ação das SEs e sugerem que produtos de macrófagos têm importante papel durante a resposta inflamatória induzida por estas toxinas.

6. Referências Bibliográficas

- ADAMS, D.O. & HAMILTON, T.A. - Phagocytic cells: cytotoxic activities of macrophages. In: **Inflammation: basic principles and clinical correlates**. Gallin, J.I.; Goldstein, I.M. and Snyderman, R. (Eds). Raven Press Ltd, New York, 1988, 471-492.
- AKIRA, D.O.; HIRANO, T.; KISHIMOTO, T. - Biology of multifunctional cytokines: IL-6 and related molecules (IL-1 and TNF). **FASEB. J.** 4: 2860-2867, 1990.
- ALBER, G.; SCHEUBER, H.P.; RECK, B.; SAILER-KRAMER, B.; HARTMANN, A.; HAMMER, D.K. - Role of substance P immediate-type skin reactions induced by staphylococcal enterotoxin B in unsensitized monkeys. **J. Allergy Clin. Immunol.** 84: 880-885, 1989.
- ALTMAN, L.C. - Chemotactic lymphokines: a review. In: **Leukocyte chemotaxis**. Gallin, J.C. and Quie, P.G. (Eds). Raven Press, 1978, 267-287.
- BAGGIOLINI, M. - Phagocytes use oxygen to kill bacteria. **Experientia** 40: 906-909, 1984.
- BARJA-FIDALGO, C.; CARLINI, C.R.; GUIMARÃES, J.A.; FLORES, C.A.; CUNHA, F.Q.; FERREIRA, S.H. - Role of resident macrophages in canatoxin-induced *in vivo* neutrophil migration. **Inflammation** 16: 1-11, 1992.
- BARUFFI, M.D.; CUNHA, F.Q.; FERREIRA, S.H. - Macrophage-released neutrophil chemotactic factor (MNCF) induces PMN-neutrophil migration through lectin-like activity. **Agents Actions** 38: C54-C56, 1993.
- BECK, G.; HABICHT, G.S.; BENACH, J.L.; MILLER, F. - Interleukin I: a common endogenous mediator of inflammation and the local Shawartzman reaction. **J. Immunol.** 136: 3025-3031, 1986.

- BERGDOLL, M.S. In: **Food borne infections and intoxications**. Reimann, H. and Bryan, F.L. (Eds), Academic Press, New York, 1979, 443-494.
- BERGDOLL, M.S. In: **Staphylococci and staphylococcal infections**. Reimann, H. and Bryan, F.L. (Eds), Academic Press, London, 1989, 462-512.
- BERGDOLL, M.S. & CHESNEY, P.J. In: **Toxic shock syndrome**. Bergdoll, M.S. and Chesney, P.J. (Eds), CRC Press, Boston, 1991, 51-73.
- BERTOLONI, M.C. & DE LUCCA, F.L. - Poly (A)-containing RNA from spleens of mice with Chagas disease triggers *in vitro* macrophage resistance to *Trypanosoma cruzi*. **J. Protozool.** **33**: 81-86, 1986.
- BETJES, M.G.; VISSER, C.E.; ZEMEL, D.; TUK, C.W.; STRUIJK, D.G.; KREDIET, R.T.; ARISZ, L.; BEELEN, R.H. - Intraperitoneal interleukin-8 and neutrophil influx in the initial phase of a CAPD peritonitis. **Perit. Dial. Int.** **16**: 385-392, 1996.
- BEVILACQUA, M.P.; STENGALIN, S.; GIMBRONE, M.A.; SEED, B. - Endothelium leukocyte adhesion molecule-1: an inducible receptor for neutrophils related to complement regulatory proteins and lectins. **Science** **243**: 1160-1167, 1989.
- BOBAK, D.A. & GUERRANT, R.L. - New developments in enteric bacterial toxins. **Adv. Pharmacol.** **23**: 85-101, 1992.
- BRAIN, S.D. & WILLIAMS, T.J. - Inflammatory oedema induced by synergism between calcitonin gene-related peptide (CGRP) and mediators of increased vascular permeability. **Br. J. Pharmacol.** **86**: 855-860, 1985.
- BRAQUET, P.; TOUQUI, L.; SHEN, T.Y.; VARGAFTIG, B.B. - Perspectives in platelet-activating factor research. **Pharmacol. Rev.** **39**: 97-113, 1987.

- CALDERON, J.; WILLIAMS, R.T.; UNANUE, E.R. - An inhibitor of cell proliferation released by cultures of macrophages. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 71: 4273-4277, 1974.
- COLDITZ, I.G.; ZWAHLEN, R.; DEWALD, B.; BAGGIOLINI, M. - *In vivo* inflammatory activity of neutrophil-activating factor, a novel chemotactic peptide derived from human monocytes. **Am. J. Pathol.** 134: 755-762, 1989.
- COLLINS, P.D.; JOSE, P.J.; WILLIAMS, T.J. - The sequential generation of neutrophil chemoattractant protein in acute inflammation in the rabbit *in vivo*. **J. Immunol.** 146: 677-684, 1991.
- CRONSTEIN, B.N. & WEISSMAN, G. - The adhesion molecules of inflammation. **Arthritis Rheum.** 136: 147-152, 1993.
- CUNHA, F.Q. & FERREIRA, S.H. - The release of a neutrophil chemotactic factor from peritoneal macrophages by endotoxin: inhibition by glucocorticoids. **Eur. J. Pharmacol.** 129: 65-76, 1986.
- CURRY, H.S. & BROWN, A.E. - Preparation and stability of indomethacin solutions. **J. Physiol. Pharmacol.** 60: 988-992, 1982.
- CYBULSKY, M.I.; COLDITZ, I.G.; MOVAT, H.Z. - The role of interleukin-1 in neutrophil leukocyte emigration induced by endotoxin. **Am. J. Pathol.** 124: 367-372, 1986.
- DALE, M.M. - The neutrophil leukocyte. In: **Textbook of immunopharmacology**. Dale, M.M. and Foreman, J.C. (Eds), Blackwell Scientific Publications, 1984, 36-52.



- DALE, M.M. & FOREMAN, J.C. - Introduction to immunology and pathology of host defence mechanisms. In: **Textbook of Immunopharmacology**. Dale, M.M. and Foreman, J.C. (Eds), Blackwell Scientific Publications, 1989, 401-411.
- DAVATELIS, G.; TEKAMP-OLSON, P.; WOLPE, S.D.; HERMSEN, K.; LUEDKE, C.; GALLEGOS, C.; COIT, D.; MERRYWEATHER, J.; CERAMI, A. - Cloning and characterization of a cDNA for murine macrophage protein (MIP), a novel monokine with inflammatory and chemokinetic properties. **J. Exp. Med.** **167**: 1939-1944, 1988.
- DESOUZA, I.A.; BERGDOLL, M.S.; RIBEIRO-DASILVA, G. - Pharmacological characterization of the mouse paw edema induced by staphylococcal enterotoxin B. **J. Nat. Toxins** **5**: 61-71, 1996.
- DESOUZA, I.A. & RIBEIRO-DASILVA, G. - Neutrophil migration induced by staphylococcal enterotoxin type A in mice: a pharmacological analysis. **Eur. J. Pharmacol.** **363**: 189-195, 1998.
- DESOUZA, I.A. & RIBEIRO-DASILVA, G. - The pharmacological profile of mouse hind paw inflammation induced by staphylococcal enterotoxin type A. **Inflamm. Res.** **46**: 361-365, 1997.
- DESOUZA, I.A. & RIBEIRO-DASILVA, G. - Resident macrophages modulate the neutrophil migration induced by staphylococcal enterotoxin B into the mouse peritoneal cavity. **J. Nat. Toxins** **5**: 341-350, 1996.
- DINARELLO, C.A. - The interleukin-1 family: 10 years of discovery. **FASEB J.** **8**: 1314-1325, 1994.
- DINARELLO, C.A. - Modalities for reducing interleukin-1 activity in disease. **TIPS** **14**: 155-159, 1993.

- DINARELLO, C.A. - The proinflammatory cytokines interleukin-1 and tumour necrosis factor and treatment of septic shock syndrome. **J. Infect. Dis.** **163**: 1177-1184, 1991.
- DOHERTY, N.S. & JANUSZ, M.J. - Neutrophil proteases: their physiological and pathological roles. In: **Handbook of immunopharmacology**. Hellewell, P.G. and Williams, T.J. (Eds). Academic Press, 1994, 55-94.
- EDELSON, P.J. - Monocytes and macrophages: aspects of their cell biology. In: **Handbook of inflammation**. Weissmann, G. (Ed). Elsevier, 1980, 469-495.
- EDWARDS, J.C.W.; SEDGWICK, A.D.; WILLOUGHBY, D.A. - The formation of a structure with the features of synovial lining by subcutaneous injection of air: an *in vivo* tissue culture system. **J. Pathol.** **134**: 147-156, 1981.
- EVANS, R. & ALEXANDER, P. - Mechanisms of extracellular killing of nucleated mammalian cells by macrophages. In: **Immunobiology of the macrophage**. Nelson, D.S. (Ed). Academic Press, New York, 1976, 535-543.
- FACCIOLI, L.H.; SOUZA, G.E.P.; CUNHA, F.Q.; POOLE, S.; FERREIRA, S.H. - Recombinant interleukin 1 and tumour necrosis factor induce neutrophil migration *in vivo* by indirect mechanisms. **Agents Actions** **30**: 344-349, 1990.
- FANTONE, J.C. - Mechanisms of chemotactic factor stimulation of polymorphonuclear leukocyte: modulation by prostaglandins. In: **Inflammatory mediators**. Higgs, G.A. and Williams, T.J. (Eds). MacMillan, 1985, 127-148.
- FANTUZZI, G. & GHEZZI, P. - Glucocorticoids as cytokine inhibitors: role in neuroendocrine control and therapy of inflammation disease. **Med. Inflamm.** **2**: 263-266, 1993.

- FERENCÍK, M. & STVRTINOVÁ, V. - Endogenous control and modulation of inflammation. **Folia Biol. Praha** **42**: 47-55, 1996.
- FERNANDEZ, H.N.; HENSON, P.M.; OTANI, A.; HUGLI, T.E. - Chemotactic response to human C3a and C5a anaphylatoxins. **J. Immunol.** **120**: 109-112, 1978.
- FERREIRA, S.H. - Are macrophages the body's alarm cells? **Agents Actions** **10**: 229-230, 1980.
- FERREIRA, S.H. - The role of interleukins and nitric oxide in the mediation of inflammation pain and its control by peripheral analgesics. **Drugs** **46**: 1-9, 1993.
- FLEMING, S.D.; IANDOLO, J.J.; CHAPES, S.K. - Murine macrophage activation by staphylococcal exotoxins. **Infect. Immun.** **59**: 4049-4055, 1991.
- FLOWER, R.J. - Lipocortin and the mechanism of action of the glucocorticoids. **Br. J. Pharmacol.** **94**: 987-1015, 1988.
- FOREMAN, C.J. - Peptides and neurogenic inflammation. **Br. Med. Bull.** **43**: 386-400, 1987.
- FREER, J.H. & ARBUTHNOTT, J.P. In: **Pharmacology of bacterial toxins**. Dorner, S., Drews, J. (Eds), Pergamon Press, Oxford, 1986, 571-633.
- GORDON, S. - Macrophage neutral proteinases and chronic inflammation. **Ann. N.Y. Acad. Sci.** **278**: 176-182, 1976.
- GUARD, S. & WATSON, S.P. - Tachykinin receptor types: classification and membrane signalling mechanism. **Neurochem. Int.** **18**: 149-165, 1991.

- HARKNESS, R.A. - The characteristic cell of acute inflammation. The polymorphonuclear neutrophil leukocyte, and its biochemistry. **Mol. Aspects Med.** 4: 191-207, 1981.
- HARLAN, J.M. - Leukocyte-endothelial interaction. **Blood** 65: 513-525, 1985.
- HARMSSEN, A.G. & HAVEL, E.A. - Role of tumour necrosis factor and macrophages in lipopolysaccharide-induced accumulation of neutrophil in cutaneous air pouches. **Infect. Immun.** 58: 297-301, 1990.
- HASKÓ, G.; VIRÁG, L.; EGNACZYK, G.; SALZMAN, A.L.; SZABÓ, C. - The crucial role of IL-10 in the suppression of the immunological response in mice exposed to staphylococcal enterotoxin B. **Eur. J. Immunol.** 28: 1417-1425, 1998.
- HENDERSON, B. & PETTIPHER, E.R. - Comparison of the *in vivo* inflammatory activities after intra-articular injection of natural and recombinant IL-1 β in the rabbit. **Biochem. Pharmacol.** 37: 4171-4176, 1988.
- HENRIQUES, M.G.M.O.; SILVA, P.M.R.; MARTINS, M.A.; FLORES, C.A.; CUNHA, F.Q.; ASSREUY-FILHO, J.; CORDEIRO, R.S.B. - Mouse paw edema. A new model for inflammation ? **Braz. J. Med. Biol. Res.** 20: 243-249, 1987.
- HERMANOWICZ, A. & NAWARKA, Z. - Normal chemotactic migration of polymorphonuclear leukocytes stimulated with mononuclear-derived chemotactic factor in ulcerative colitis. **Int. Archs. Allergy. Appl. Immunol.** 81: 63-68, 1986.
- HIGGS, G.A. & VANE, J.R. - Inhibition of cyclooxygenase and lipoxygenase. **Br. Med. Bull.** 39: 265-268, 1983.

- HILL, H.R.; ESTENSEN, R.D.; HOGAN, N.A.; QUIE, P.G. - Severe staphylococcal disease associated with allergic manifestations, hyperimmunoglobulinemia E, and defective neutrophil chemotaxis. **J. Lab. Clin. Med.** **88**: 796-806, 1976.
- HUA, X. - Tachykinins and calcitonin gene-related peptide in relation to peripheral functions of capsaicin-sensitive sensory neurons. **Acta. Physiol. Scand.** **551**: 1-44, 1986.
- HUMPHREY, D.M.; HANAHAN, D.J.; PINCKARD, R.N. - Induction of leukocytic infiltrates in rabbit skin by acetyl glyceryl ether phosphorylcholine. **Lab. Invest.** **47**: 227-234, 1982.
- HURLEY, J.V. - The sequence of early events. In: **Handbook of experimental pharmacology**. Vane, J.R. and Ferreira, S.H. (Eds), Springer-Verlag, 1978, 26-67.
- IANOLO, J.J. - Genetic analysis of extracellular toxins of *Staphylococcus aureus*. **Annu. Rev. Microbiol.** **43**: 375-402, 1989.
- INOUE, H.; ASAKA, T.; NAGATA, N.; KOSHIHARA, Y. - Mechanism of mustard oil-induced skin inflammation in mice. **Eur. J. Pharmacol.** **333**: 231-240, 1997.
- ISSEKUTZ, A.C. - Role of polymorphonuclear leukocytes in the vascular responses of acute inflammation. **Lab. Invest.** **50**: 605-607, 1984.
- ISSEKUTZ, A.C.; MEGYERI, P.; ISSEKUTZ, T. - Role for macrophage products in endotoxin-induced polymorphonuclear leukocyte accumulation during inflammation. **Lab. Invest.** **56**: 49-59, 1987.
- IWAMOTO, I. & NADEL, J.A. Tachykinin receptor subtype that mediates the increase in vascular permeability in guinea pig skin. **Life. Sci.** **44**: 1089-1095, 1989.

- JETT, M.; BRINKLEY, W.; NEILL, R.; GEMSKI, P.; HUNT, R. - *Staphylococcal aureus* enterotoxin B challenge of monkeys: correlation of plasma levels of arachidonic acid cascade products with occurrence of illness. **Infect. Immun.** **58**: 3494-3499, 1990.
- KAPLAN, A.M. & MORHANAKUNAR, R. - Expression of a new cell surface antigen on activated murine macrophages. **J. Exp. Med.** **146**: 1461-1467, 1977.
- KELLER, R.; KEIST, W.; IVATT, R.J. - Functional and biochemical parameters of activation related to macrophage cytostatic effects on tumor cells. **Int. J. Cancer.** **14**: 675-682, 1974.
- KLEIN, A.; CUNHA, F.Q.; FERREIRA, S.H. - The role of lymphocytes in the neutrophil migration induced by ovalbumin in immunized rats. **Immunology** **84**: 577-584, 1995.
- KLUGER, M.J. - Fever, role of pyrogens and cryogens. **Physiol. Rev.** **71**: 93-127, 1991.
- LECLAIRE, R.D.; KELL, W.M.; SADIK, R.A.; DOWNS, M.B.; PARKER, G.W. - Regulation of staphylococcal enterotoxin B-elicited nitric oxide production by endothelial cells. **Infect. Immun.** **63**: 539-546, 1995.
- LEE, T.H. - Interactions between alveolar macrophages, monocytes and granulocytes: implications for airway inflammation. **Am. Rev. Resp. Dis.** **135**: S14-S17, 1987.
- LEHRER, R.L.; GANZ, T.; SELSTED, M.E.; BABIOR, B.M.; CURNUTTE, J.T. - Neutrophils and host defence. **Ann. Int. Med.** **109**: 127-142, 1988.

LINDLEY, I.; ASCHAUER, H.; STEIFERT, J.M.; LAM, C.; BRUNOWSKI, W.; KOWNTAZKI, E.; THELEN, M.; PEVERI, P.; DEWALD, B.; VON TSCHARNER, V.; WALTZ, A.; BAGGIOLINI, M. - Synthesis and expression in *Escherichia coli* of the gene encoding monocyte-derived neutrophil-activating factor: biological equivalence between natural and recombinant neutrophil activating factor. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** **85**: 9199-9206, 1988.

MACHLIN, L.J. & BENDICH, A. - Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients. **FASEB. J.** **1**: 441-445, 1987.

MACKAY, C.R. & IMHOF, B.A. - Cell adhesion in the immune system. **Immunol. Today** **14**: 99-102, 1993.

MACMILLAN, R.M. & FOSTER, S.J. - Leukotriene B₄ and inflammatory disease. **Agents Actions** **24**: 114-119, 1988.

MAJNO, G. - Inflammatory mediators: where are they going? In: **Inflammatory mediators**. Higgs, G.A. and Williams, T.J. (Eds). MacMillan, 1985, 1-6.

MARRACK, P. & KAPPLER, J. - The staphylococcal enterotoxins and their relatives. **Science** **248**: 705-711, 1990.

MELLO FILHO, A.A.; SOUZA, M.H.L.P.; LYERLY, D.M.; CUNHA, F.Q.; LIMA, A.A.M.; RIBEIRO, R.A. - Role of tumour necrosis factor and nitric oxide in the cytotoxic effects of *Clostridium difficile* toxin A and toxin B on macrophages. **Toxicon** **35**: 743-752, 1997.

MELTZER, M.S.; JONES, M.C.; BOETCHER, D.A. Increased chemotactic responses of macrophages from BCG-infected mice. **Cell. Immunol.** **17**: 268-273, 1975.

- MERRIL, W.W.; NAEGEL, G.P.; MATTHAY, R.A.; REYNOLDS, H.Y. - Alveolar macrophage-derived chemotactic factor kinetics of *in vitro* production and partial characterization. **J. Clin. Invest.** **65**: 268-276, 1980.
- MICUSAN, V.V. & THIBODEAU, J. - Superantigens of microbial origin. **Semin. Immunol.** **5**: 3-11, 1993.
- MILLER, E.J.; COHEN, S.; PETERSON, B.T. - Peptide inhibitor of interleukin-8 (IL-8) reduces staphylococcal enterotoxin-A (SEA) induced neutrophil trafficking to the lung. **Inflamm. Res.** **45**: 393-397, 1996^a.
- MILLER, E.J.; NAGAO, S.; CARR, F.K.; NOBLE, J.M.; COHEN, A.B. - Interleukin-8 is a major neutrophil chemotaxin from human alveolar macrophages stimulated with staphylococcal enterotoxin A (SEA). **Inflamm. Res.** **45**: 386-392, 1996b.
- MING, W.J.; BERSANI, L.; MANTOVANI, A. - Tumor necrosis factor is chemotactic for monocytes and polymorphonuclear leukocytes. **J. Immunol.** **138**: 1469-1474, 1987.
- MISFELDT, M.L.; LEGAARD, P.K.; HOWELL, S.E.; FORNELLA, M.; LEGRAND, R.D. - Induction of interleukin-1 from murine peritoneal macrophages by *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A. **Infect. Immun.** **58**: 978-998, 1990.
- MONCADA, S.; PALMER, R.M.J.; HIGGS, E.A. - Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. **Pharmacol. Rev.** **43**: 109-142, 1991.
- MORRISON, D.C. & JACOBS, P.M. - Inhibition of lipopolysaccharide-initiated activation of serum complement by polymyxin B. **Infect Immun.** **13**: 298-301, 1976.
- NATHAN, C.F. - Secretory products of macrophages. **J. Clin. Inv.** **79**: 319-326, 1987.

- NATHAN, C.F. & ROOT, R.K. - Hydrogen peroxidase release from mouse peritoneal macrophages: dependence on sequential activation and triggering. **J. Exp. Med.** **146**: 1648-1653, 1977.
- OSBORN, L. - Leukocyte adhesion to endothelium in inflammation. **Cell** **62**: 3-6, 1990.
- PARTSCH, G. & MATUCCI-CERINIC, M. Effect of substance P and somatostatin on migration of polymorphonuclear (PMN) cells *in vitro*. **Inflammation** **16**: 539-547, 1992.
- PENDINO, J.K. & LASKIN, D.L. - Macrophages and inflammatory mediators in tissue injury. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.** **35**: 655-677, 1995.
- PERRETI, M.; AHLUWALIA, A.; FLOWER, R.J.; MANZINI, S. - Endogenous tachykinins play a role in IL-1 accumulation: involvement of NK₁ receptors. **Immunology** **80**: 73-77, 1993.
- PINTER, E.; BROWN, B.; HOULT, J.R.; BRAIN, S.D. - Lack of evidence for tachykinin NK₁ receptor-mediated neutrophil accumulation in the rat cutaneous microvasculature by thermal injury. **Eur. J. Pharmacol.** **369**: 91-98, 1998.
- POULTER, L.W. & TURK, J.L. Studies on the effects of soluble lymphocyte products (lymphokines) on macrophage physiology: early changes in enzyme activity and permeability. **Cell. Immunol.** **20**: 12-16, 1975.
- RAMPART, M. & WILLIAMS, T.J. - Evidence that neutrophil accumulation induced by interleukin-1 requires both local protein biosynthesis and neutrophil CD18 antigen expression *in vivo*. **Br. J. Pharmacol.** **94**: 1143-1150, 1988.

- RANDALL, R.W.; EAKINS, K.W.; HIGGS, G.A.; SALMON, J.A.; TATESON, J.E. - Inhibition of arachidonic acid cyclooxygenase and lipoxygenase of leukocytes by indomethacin and compound BW755C. **Agents Actions** 10: 553-555, 1980.
- RANKIN, J.A.; SYLVESTER, I.; SMITH, S.; YOSHIMURA, T.; LEONARD, E.J. - Macrophages cultured *in vitro* release leukotriene B₄ and neutrophil attractant activation protein (interleukin-8) sequentially in response to stimulation with lipopolysaccharide and zymosan. **J. Clin. Invest.** 80: 1554-1564, 1990.
- REYNOLDS, H.Y. - Lung inflammation: Role of endogenous chemotactic factors in attracting polymorphonuclear granulocytes. **Am. Rev. Respir. Dis.** 127: S55- S67, 1983.
- RIBEIRO, R.A.; CUNHA, F.Q.; FERREIRA, S.H. - Recombinant gamma interferon causes neutrophil migration mediated by the release of a macrophage neutrophil chemotactic factor. **Int. J. Exp. Pathol.** 71: 717-725, 1990.
- RIBEIRO, R.A.; FLORES, C.A.; CUNHA, F.Q.; FERREIRA, S.H. - IL-8 causes *in vivo* neutrophil migration by a cell-dependent mechanism. **Immunology** 73: 472-477, 1991.
- RIBEIRO, R.A.; FLORES, C.A.; CUNHA, F.Q.; FERREIRA, S.H.; DELUCCA, F.L. - Partial characterization of the RNA from LPS-stimulated macrophages that induces the release of chemotactic cytokines by resident macrophages. **Mol. Cell. Biochem.** 148: 105-113, 1995.
- RIBEIRO, R.A.; SOUZA-FILHO, M.V.P.; SOUZA, M.H.L.; OLIVEIRA, S.H.P.; COSTA, C.H.S.; CUNHA, F.Q.; FERREIRA, S.H. - Role of resident mast cells and macrophages in the neutrophil migration induced by LTB₄, fMLP and C5a des arg. **Int. Arch. Immunol.** 112: 27-35, 1997.

- RICEVUTI, G. & MAZZONE, A. - Clinical aspects of neutrophil locomotion disorders. **Biomed. Pharmacoth.** **41**: 355-367, 1987.
- ROCHA, E. & SILVA, M. - A brief history of inflammation. In: **Handbook of experimental pharmacology**. Vane, J.R. and Ferreira, S.H. (Eds). Springer-Verlag, 1978, 6-25.
- ROCHA, N.P. & FERREIRA, S.H. - Restoration by levamisole of endotoxin inhibited neutrophil migration, oedema and increased vascular permeability induced by carrageenin. **Eur. J. Pharmacol.** **122**: 87-92, 1986.
- ROSENBAUN, J.T.; HARTIALA, K.T.; WEBSTER, R.O.; HOWES, E.L.; GOLDSTEIN, I.M. - Anti-inflammatory effects of endotoxin. **Am. J. Pathol.** **113**: 291-299, 1983.
- ROSSI, A.G. & HELLEWELL, P.G. - Mechanism of neutrophil accumulation in tissues. In: **Handbook of immunopharmacology**. Hellewell, P.G. and Williams, T.J. (Eds). Academic Press, London, 1994, 223-243.
- RUSSO, M. - The role of macrophages in the chemotactic response of polymorphonuclear leukocytes to bacterial lipopolysaccharides. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.** **164**: 326-330, 1980.
- SALEH, T.S.F.; VIANNA, R.M.J.; CRECZYNSKI-PASSA, T.B.; CHAKRAVARTY, S.; MAVUNKEL, B.J.; KYLE, D.J.; CALIXTO, J.B. - Oral anti-inflammatory action of NPC 18884, a novel bradykinin B₂ receptor antagonist. **Eur. J. Pharmacol.** **363**: 179-187, 1998.
- SAMUELSON, B. - Leukotrienes: mediators of immediate hypersensitivity reaction and inflammation. **Science** **229**: 568-574, 1983.

- SCHEUBER, P.H.; DENZILINGER, C.; WILKER, D.; BECK, G.; KEPPLER, D.; HAMMER, D.K. - Staphylococcal enterotoxin B as a non-immunological mast cell stimulus in primates: the role of endogenous cysteinyl leukotrienes. **Int. Arch. Allerg. Immunol.** **82**: 289-291, 1987.
- SCHEUBER, P.H.; GOLECKI, R.J.; KICKHOFEN, B.; SCHEEL, D.; BECK, G.; HAMMER, D.K. - Skin reactivity of unsensitized monkeys upon challenge with staphylococcal enterotoxin B: a new approach for investigating site of toxin action. **Infect. Immunol.** **50**: 869-876, 1985.
- SCHMAL, H.; SHANLEY, T.P.; JONES, M.L.; FRIEDL, H.P.; WARD, P.A. - Role for macrophage inflammatory protein-2 in lipopolysaccharide-induced lung injury in rats. **J. Immunol.** **156**: 1963-1972, 1996.
- SCHRODER, J.M.; MROWIETZ, U.; MORITA, E.; CHRISTOPHERS, F. - Purification and partial biochemical characterization of a human monocyte-derived, neutrophil-activating peptide that lacks interleukin-I activity. **J. Immunol.** **139**: 3474-3483, 1987.
- SEDGWICK, A.D. & WILLOUGHBY, D.A. - Initiation of the inflammatory response and its prevention. In: **Handbook of inflammation**. Bonta, I.L.; Bray, M.A. and Parnham, M.J. (Eds). Elsevier, 1985, 27-47.
- SEKÁLY, R.P. - Bacterial superantigens. **Semin. Immunol.** **5**: 1-4, 1993.
- SHANLEY, T.P.; SCHMAL, H.; FRIEDL, P.H.; JONES, M.L.; WARD, P.A. - Role of macrophage inflammatory protein-1 α (MIP-1 α) in acute lung injury in rats. **J. Immunol.** **154**: 4793-4802, 1995.

- SHERRY, B. & CERAMI, A. - Small cytokine superfamily. **Curr. Opin. Immunol.** **3**: 56-60, 1991.
- SMITH, C.W.; KISHIMOTO, T.K.; ABBASS, O.; HUGHES, B.; ROTHLEIN, R.; MCINTERE, L.V.; BUTCHER, E.; ANDERSON, D.C. - Chemotactic factors regulate lectin adhesion molecule 1 (LECAM-1) dependent neutrophil adhesion to cytokine-stimulated endothelial cells *in vitro*. **J. Clin. Invest.** **87**: 609-615, 1991.
- SMITH, M.J.H.; FORD-HUTCHINSON, A.W.; BRAY, M.A. - Leukotriene B: A potential mediators of inflammation. **J. Pharm. Pharmacol.** **32**: 517-518, 1980.
- SMITH, M.J.H.; FORD-HUTCHINSON, A.W.; WALKER, J.R. - Anti-inflammatory activity of bacterial endotoxin. **J. Pharm. Pharmacol.** **29**: 702-704, 1977.
- SOUZA, G.E.P.; CUNHA, F.Q.; MELLO, R.; FERREIRA, S.H. - Neutrophil migration induced by inflammatory stimuli is reduced by macrophage depletion. **Agents Actions** **24**: 377-380, 1988.
- STRYER, L. - **Bioquímica**. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1992, 82-92.
- TAKEDA, Y.; CHOU, K.B.; TAKEDA, J.; SACHAIS, B.S.; KRAUSE, J.E. - Molecular cloning, structural characterization and functional expression of the human substance P receptor. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** **179**: 1232-1240, 1991.
- TATESON, J.E.; RANDALL, R.W.; REYNOLDS, C.H.; JACKSON, W.P.; BHATTACHERJEE, P.; SOLMON, J.A.; GARLAND, L.G. - Selective inhibition of arachidonate 5-lipoxygenase by novel acetohydroxamic acids: biochemical assessment *in vitro* and *ex vivo*. **Br. J. Pharmacol.** **94**: 528-538, 1988.

- WALSH, D.T.; WEG, V.B.; WILLIAMS, T.J.; NOURSHARGH, S. - Substance P-induced inflammatory responses in guinea-pig skin: the effect of specific NK₁ receptor antagonists and the role of endogenous mediators. **Br. J. Pharmacol.** **114**: 1343-1350, 1995.
- WATANABE, M.; ARAKIDA, Y.; TANABE, J.; SUGIDACHI, A.; HIRASAWA, N.; MUE, S.; OHUCHI, K. - Pharmacological analysis of neutrophil chemotactic factor production by leukocytes and roles of PAF in allergic inflammation in rats. **Br. J. Pharmacol.** **111**: 123-130, 1994.
- WEDMORE, C.V. & WILLIAMS, T.J. - Control of vascular permeability by polymorphonuclear leukocytes in inflammation. **Nature** **289**: 646-650, 1981.
- WIDMER, U.; MANOGUE, K.R.; CERAMI, A.; SHERRY, B. - Genomic cloning and promoter analysis of macrophage inflammatory protein (MIP)-2, MIP-1 α , and MIP-1 β , members of the chemokine superfamily of proinflammatory cytokines. **J. Immunol.** **150**: 4996- 5012, 1993.
- WILKINSON, P.C. - Cellular accumulation and inflammation. In: **Textbook of immunopharmacology**. Dale, M.M. and Foreman, J.C. (Eds), Blackwell Scientific Publication, 1984, 217-232.
- WILLIAMS, T.J. - Vascular responses and their suppression in vasodilatation and edema. In: **Handbook of inflammation**. Bonta, I.L.; Bray and M.A.; Parnhan, M.J. (Eds). Elsevier, 1985, 49-59.
- WOLPE, S.D.; DAVATELIS, G.; SHERRY, B.; BEUTLER, B.; HESSE, D.G.; NGUYEN, H.T.; MOLDAWER, L.L.; NATHAN, C.F.; LOWRY, S.F.; CERAMI, A. - Macrophages secrete a novel heparin-binding protein with inflammatory and neutrophil chemokinetic properties. **J. Exp. Med.** **167**: 570-581, 1988.

- WOLPE, S.D.; SHERRY, B.; JUERS, D.; DAVATELIS, G.; YURT, R.W. - Identification and characterization of macrophage inflammatory protein 2. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** **86**: 612-616, 1989.
- YANCEY, K.B. - Biological properties of human C5a: selected *in vitro* and *in vivo* studies. **Clin. Exp. Immunol.** **71**: 207-212, 1989.
- YANO, H.; WERSHILL, B.K.; ARIZONO, N.; GALLI, S.J. - Substance P-induced augmentation of cutaneous vascular permeability and granulocyte infiltration in mice is mast cell dependent. **J. Clin. Invest.** **84**: 1276-1286, 1989.
- ZEHAVI-WILLNER, T.; SHENBERG, E.; BARNES, A. - *In vivo* effect of staphylococcal enterotoxin A on peripheral blood lymphocytes. **Infect Immun.** **44**: 401-405, 1984.
- ZEILLEMAKER, A.M.; MUL, F.P.; HOYNCK-VAN-PAPENDRECHT, A.A.; KUIJPERS, T.W.; ROOS, D.; LEGUIT, P.; VERBRUGH, H.A. - Polarized secretion of interleukin-8 by human mesothelial cells: a role in neutrophil migration. **Immunology** **84**: 227-232, 1995.

Apêndices

RESIDENT MACROPHAGES MODULATE THE NEUTROPHIL MIGRATION INDUCED BY STAPHYLOCOCCAL ENTEROTOXIN B INTO THE MOUSE PERITONEAL CAVITY

Ivani A. Desouza and G. Ribeiro-DaSilva¹

Department of Pharmacology, Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas
C. P. 6111, 13081-970, Campinas, S. Paulo, Brazil.

(Received 13 October 1995; Accepted 5 March 1996)

ABSTRACT

Staphylococcal enterotoxin B (SEB) induces a long-lasting neutrophil migration into mouse peritoneal cavity. This migratory effect is dependent on the number of resident macrophages population. Dexamethasone (0.5 mg/kg) inhibits the neutrophil migration induced by 250 µg of SEB by 55%. A similar response is observed when the mice are pretreated with the PAF-acether antagonist BN52021 (10 mg/kg; 55% inhibition), the H₂ antagonist cimetidine (2 mg/kg; 44% inhibition) or with BWA4C, a drug which inhibits arachidonic acid lipooxygenation (10 mg/kg; 38% inhibition). In contrast, neither indomethacin (5 mg/kg) nor diphenhydramine (2 mg/kg) reduces the chemotactic activity of SEB. These same mediators are also responsible for the recently described phlogistic reaction in the mouse hindpaw and the emesis and pseudo-allergy produced by this toxin in monkeys. These data strengthen our hypothesis that the SEB-mediated phlogistic reaction in mice is a valuable model for investigating the pathophysiologic mechanism of the enterotoxemias produced by this toxin.

INTRODUCTION

Staphylococcal enterotoxins (SE), produced by certain strains of *Staphylococcus aureus*, are the common causes of food poisoning. The mode of action of these toxins is still unknown, mainly because SE induce symptoms only in primates (Bergdoll, 1983, 1989; Bobak and Guerrant, 1992; Freer and Arbuthnott, 1986).

Recently, it was suggested by Desouza *et*

al. (1995) that phlogistic reaction in mice is a valuable model for investigating the pathophysiologic mechanism of enterotoxemias produced by the staphylococcal enterotoxin type B (SEB). SEB induces a neurogenic edema in the mouse hindpaw which involves lipooxygenase metabolites and is partially prevented by pretreating the mice with a PAF-acether antagonist, capsaicin or histamine H₁ or H₂ receptor antagonists (Desouza, 1993; Desouza *et al.*, 1995).

¹To whom all correspondence should be addressed (Fax 55-19-2392968 and telephone 2397482).

Some of the results of the study were presented at the XVIII Congreso Latinoamericano de Ciencias Fisiológicas, Montevideo, Uruguay, 12-16 April, 1994.

Research supported by FAPESP (Nº 95/0390-3). I.A.D. is the recipient of a FAPESP Fellowship (Nº 94/0210-2). This work is part of a thesis to be submitted by I.A.D. to the Biological Institute, State University of Campinas, as partial fulfillment of the requirements for the PhD.

Neutrophils appear to be the major factor in the host's defense mechanism against *Staphylococcus aureus* (Hill *et al.*, 1976). Indeed, the accumulation of neutrophils is a prominent feature of SEB-induced gastroenteritis (Crawley, 1966; Sugiyama and McKissic Jr, 1966; Zehavi-Willner *et al.*, 1984).

SE are potent inducers of macrophages activation (Bergdoll and Chesney, 1991). Resident macrophages participate in the control of neutrophil migration to the site of inflammation by acting as "alarm cells" and triggering several mechanisms which ultimately protect the host from injurious stimuli (Adams and Hamilton, 1984).

Lipoxygenase metabolites as well as other lipid derivatives are well-known mediators of inflammation (Samuelsson, 1983). Among these, LTB₄ and PAF-acether are produced by macrophages and have been described as chemotactic agents for neutrophils *in vivo* as well as *in vitro* (Ford-Hutchinson *et al.*, 1984; Codiltz *et al.*, 1984; Spector *et al.*, 1988).

The experiments described in this paper were designed to investigate the SEB-induced neutrophil migration into the mouse peritoneal cavity. The participation of resident macrophages and the possible mechanisms involved in the toxin-induced chemotaxis were also examined.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Male Swiss white mice (20 - 25 g) were housed in temperature- controlled rooms and received water and food *ad libitum* until used.

SEB

Highly purified SEB (chemical purity > 99 %) was used throughout the experiments. The toxin was prepared by Prof. M. S. Bergdoll of the Food Research Institute (Madison, WI, USA). All the experiments were performed using the same lot of toxin which was dissolved in distilled water and stored at - 30°C at a concentration of 1 mg/ml.

Neutrophil Migration

SEB (25 - 250 µg) was injected intraperitoneally (ip), diluted in 0.1 ml of phosphate-buffered saline (PBS). Control animals received 0.1 ml of PBS alone. Neutrophil migration was measured 4, 12, 24 and 72 h after injection of the toxin.

To check for a possible contamination of the SEB solutions, 3 ml samples containing SEB (250 µg) or bacterial endotoxin from *Escherichia coli* (LPS, 200 ng) were incubated for 10 min with polymyxin B (3.5 µg/ml) and tested for their ability to induce neutrophil migration (Barja-Fidalgo *et al.*, 1992).

Peritoneal Cell Harvesting and Counting

The cells of the peritoneal cavity were harvested by lavage of the cavities with 3 ml of PBS-heparin (5 IU/ml) - BSA (0.1%). The number of cells was determined by counting as described elsewhere (Souza *et al.*, 1988). The results are reported as the number of cells per cavity.

Increase of Peritoneal Macrophages Population by Thioglycollate Pretreatment

Groups of six mice were treated ip with 2 ml of thioglycollate (3% w/v). Three days later, the animals were injected ip with SEB (250 µg/0.1 ml PBS). Neutrophil migration was evaluated after 12 h.

Peritoneal macrophages depletion by peritoneal lavage

The method used was previously described by Souza *et al.* (1988). Mice were anesthetized with ethyl ether and three hypodermic needles were inserted into the abdominal cavity. Sterile saline (10 ml) was injected through the needle placed near the sternum. The abdominal cavity was then gently massaged for 1 min and the peritoneal fluid collected via the two needles inserted into the inguinal region. This operation was repeated three times and 95% of the injected saline was recovered. If blood was detected visually in the lavage fluid, the animal was discarded. Control (sham) mice were manipulated in the same way described above but no fluid was injected or withdrawn.

Thirty minutes after this procedure, the peritoneal macrophage population was estimated in half the mice of each group by injecting 3 ml of PBS-heparin-BSA, as described above. The other animals of the group received SEB (250 µg/0.1 ml PBS, ip) and the neutrophil migration was estimated 12 h later.

Drug Pretreatments

To test the effectiveness of the dose-time-schedule employed LPS was used as a positive control. All drugs were administrated subcutaneously (sc) 1 h before the ip injection of SEB (250 µg/0.1 ml PBS) or LPS (200 ng/0.1 ml PBS) and their effects on the peritoneal neutrophil migration induced by these toxins was evaluated. The

Table 1. Dose-response of SEB-induced neutrophil migration into the mouse peritoneal cavity.

Dose (µg)	Neutrophils/cavity (x 10 ⁵)		% variation
	Control	Treated	
25.0	4.0 ± 0.3	7 ± 1.0*	+ 75
62.5	4.0 ± 0.3	13 ± 2.0*	+ 225
125.0	3.0 ± 0.9	14 ± 1.0*	+ 367
250.0	3.0 ± 0.5	18 ± 3.0*	+ 500

SEB diluted in 0.1 ml of PBS was injected ip, at the indicated doses while the control animals received 0.1 ml of PBS alone. The neutrophil counts were obtained 12 h after SEB administration. Data are reported as the mean ± S.E.M. of six mice. Variations (percent) were calculated taking control values as 100%. * P < 0.05, compared with the control group (Student's unpaired t-test).

Table 2. Time-course of the neutrophil migration induced by SEB into mouse peritoneal cavity.

Time (h)	Neutrophils/cavity (x 10 ⁵)	
	Control	Treated
4	2.0 ± 0.3	16 ± 1.0*
12	3.0 ± 0.9	18 ± 3.0*
24	2.0 ± 0.5	14 ± 1.0*
72	2.0 ± 0.5	8 ± 2.0*

The dose of SEB used was 250 µg/cavity. The neutrophil counts were obtained at the indicated times after SEB administration. Data are reported as the mean ± S. E. M. of six mice. *P < 0.05, compared with the control group (Student's unpaired t-test).

following anti-inflammatory drugs were used at the indicated doses: dexamethasone (0.5 mg/kg; Barja-Fidalgo *et al.*, 1992), indomethacin (5 mg/kg; Henriques *et al.*, 1987), BWA4C (N-(3-phenoxybenzyl) acetohydroxamic acid), 10 mg/kg; Tateson *et al.*, 1988), diphenhydramine (2 mg/kg; Scheuber *et al.*, 1985), cimetidine (2 mg/kg; Scheuber *et al.*, 1985) and BNS2021 (Ginkgolide B, 3 - (1,1 -dimethylethyl) - hexahydro - 1,4 - 7b - trihydroxy - 8 - methyl - 9H - 1, 7α (epoxymethano - 1H, 6αH - cyclopenta (c) furo (2,3 - b) furo (3', 2': 3,4) cyclopenta (1,2 - d) furan - 5, 9, 12 (4H) - trione); 50 mg/kg; Barja-Fidalgo *et al.*, 1992).

Statistical analysis

The data are reported as the means ± S.E.M. for six animals. The results from the pretreatment experiments were compared using ANOVA followed by the Kruskal-Wallis test (p < 0.05). The other data were compared by Student's unpaired t-test (p < 0.05).

RESULTS

Marked neutrophil migration was observed following SEB injection into mouse peritoneal cavity. Table 1 and 2 show the migratory response to increasing concentrations of toxin (25 to 250 µg) and the time course of the neutrophil migration induced by 250 µg of SEB, respectively. The neutrophil recruitment induced by SEB was dose- and time-dependent and lasted for more than 72 h, although the maximum neutrophil migration occurred between 4 and 12 h after toxin injection.

The incubation of SEB (250 µg) with polymyxin B (3.5 µg/ml) did not reduce its chemotactic activity, whereas the incubation of LPS (200 ng) with the same dose of polymyxin reduced the corresponding neutrophil migration into the peritoneal cavity (Fig. 1).

Figure 2A shows a significant increase (approximately five-fold) in the peritoneal macrophage population in mice pretreated

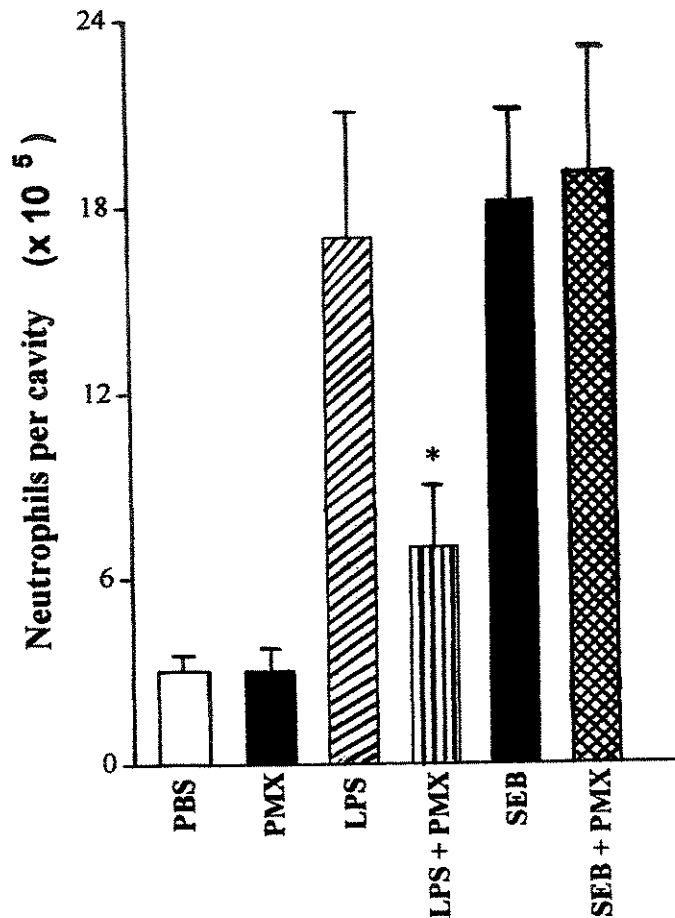


Figure 1. The effect of Polymyxin B on the neutrophils migration induced by SEB or LPS to mouse peritoneal cavity.

Polimixin B (30 $\mu\text{g}/\text{cavity}$) was injected ip with SEB (250 $\mu\text{g}/\text{cavity}$) or LPS (200 ng/cavity) and the neutrophils count was determined 12 h thereafter. The data are the mean $\pm$ S.E.M. for six mice. * $P < 0.05$, compared with no pretreatment (Kruskal-Wallis test).

with thioglycollate and a marked reduction (83%) in the number of these cells in saline washed animals, when compared with normal mice. Figure 2B shows that in thioglycollate-treated animals the neutrophil migration observed 12 h after an ip injection of SEB (62.5 $\mu\text{g}/\text{mouse}$) was greater than in normal mice injected with the same dose of SEB. On the other hand, 4 h after peritoneal lavage, the neutrophil migration induced by SEB (62.5 μg) was significantly reduced compared with sham-manipulated mice (Figure 2C).

Figure 3 shows that under our experimental conditions, pretreatment with dexamethasone (0.5 mg/kg) inhibited the neutrophil migration induced by 250 μg of SEB by 55%. A similar response was observed with the PAF-acether antagonist BN 52021 (10 mg/kg , 55% inhibition), the H_2 antagonist cimetidine (2 mg/kg , 44% inhibition) and with BWA4C, a drug which inhibits arachidonic acid lipooxygenation (10 mg/kg , 38% inhibition). In contrast, to the foregoing, neither indomethacin (5 mg/kg) nor diphenhydramine (2 mg/kg) had any

effect on the chemotaxis induced by SEB. All of the above drugs inhibited the neutrophil migration induced by LPS (positive control, data not shown).

DISCUSSION

Our results show that SEB causes

neutrophil emigration to the mouse peritoneal cavity. This migratory effect was dependent on resident peritoneal macrophages population and was inhibited when the animals were previously treated with certain anti-inflammatory drugs.

These data also confirm the existence of

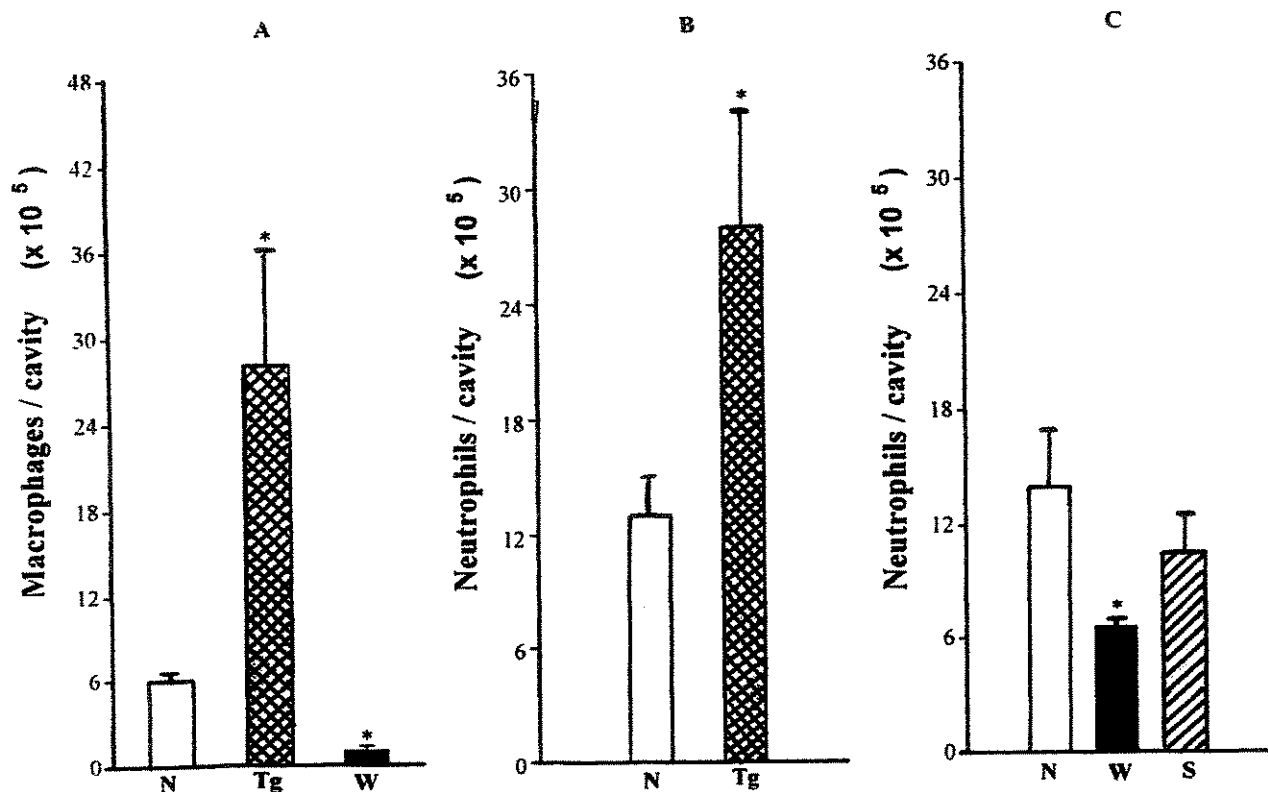


Figure 2. The effect of the increasing (Tg) or decreasing (W) the peritoneal macrophage population on neutrophil migration induced by SEB.

Panel A shows the macrophage population in nontreated (N), tioglycollate-pretreated cavities (Tg), and peritoneal washed cavities (W). Panel B shows the neutrophil migration induced by SEB (62.5 $\mu\text{g}/\text{cavity}$) in normal (N) and Tg groups. Panel C shows the neutrophil migration induced by SEB (62.5 $\mu\text{g}/\text{cavity}$) in saline-washed (W) and Sham (S) groups. The data represent the mean $\pm$ S.E.M. for six mice. * $P < 0.05$, compared with no pretreatment (Kruskal-Wallis test).

a positive correlation between SFB-induced neutrophil chemotaxis into the mouse peritoneal cavity (Table 2) and the recently described hindpaw edema in this same species (Desouza *et al.*, 1995) since both phenomena peak between 4 and 12 h and are long-lasting. As exudate is the principal component of this edema, the positive correlation between the edema and the neutrophil infiltration suggests that neutrophils are one of the components of this exudate.

SEB generates chemotactic activity for neutrophils *in vitro* when incubated with normal rabbit or human serum. The chemotactic factor generated by SEB differs from that generated by LPS since it is heat-labile and is not observed when rat serum replaces human serum (Craig *et al.*, 1971). In our experiments, the possibility that the SEB effects were due to LPS contamination can be ruled out since treatment of the toxin solution with polymyxin B did not inhibit its neutrophil migratory response, contrary to what was observed for LPS (see Fig. 1).

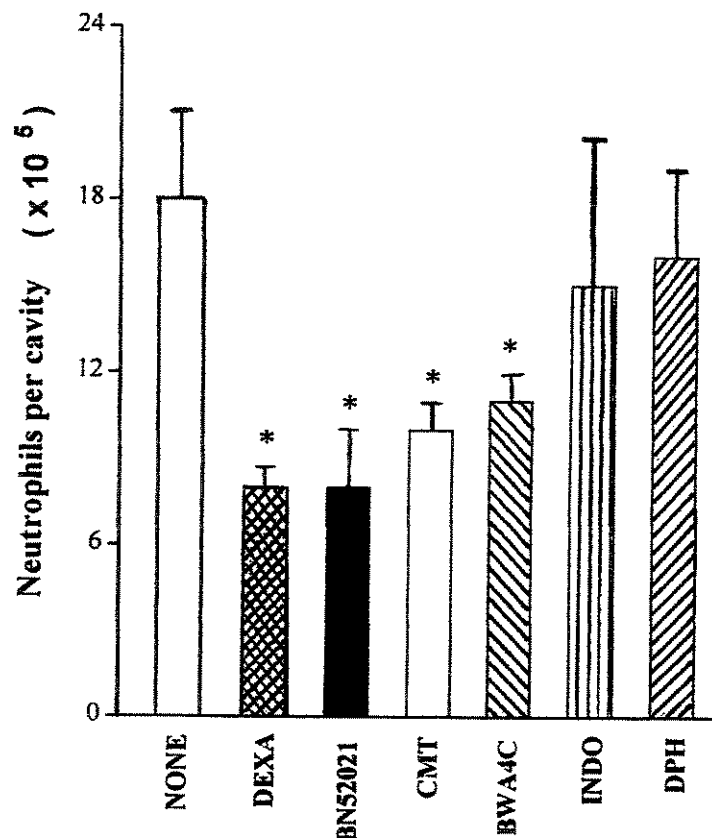


Figure 3. The effects of different anti-inflammatory drugs on the neutrophils migration induced by SEB to mouse peritoneal cavity.

Drugs were given sc 1 h before SEB (250 μ g/cavity) injection. The neutrophils count was obtained 12 h after SEB administration. None = no pretreatment, DEXA = dexamethasone (0.5 mg/kg), CMT = cimetidine (2 mg/kg), Indo = indomethacin (5 mg/kg), and DPH = diphenhydramine (2 mg/kg). The data are mean $\pm$ S.E.M. for six mice. *P < 0.05, compared with no pretreatment (Kruskal-Wallis test).

SEB is a potent inducer of several endogenous mediators including IL-1, TNF- α and IFN- γ (Bergdoll and Chesney, 1991). IL-1 and TNF- α (Faccioli *et al.*, 1990), as well as IFN- γ (Ribeiro *et al.*, 1990) have been shown to stimulate macrophages to release a neutrophil chemotactic factor (MNCF) *in vitro*. In contrast to that occurring with the above cytokines, the MNCF-induced *in vivo* neutrophil migration is independent of the number of resident macrophages and is observed even in dexamethasone-pretreated animals (Souza *et al.*, 1988; Faccioli *et al.*, 1990). In our experiments, the neutrophil migration induced by SEB was dependent on the number of resident peritoneal cavity macrophages (Fig. 2) and was partially inhibited by dexamethasone (Fig. 3).

The SEB-induced neutrophil chemotaxis was blocked by pretreating the mice with BNS2021, cimetidine or BWA4C, but not by indomethacin or diphenhydramine (Fig. 3). Therefore, PAF-acether, the H₂ histamine receptor and lipoxygenase products seem to be involved in the observed neutrophil recruitment. More specifically, neutrophils have been observed to produce leukotrienes during the phagocytosis of *Staphylococcus aureus* (Hill *et al.*, 1976; Henricks *et al.*, 1985).

The same mediators cited above are also responsible for the recently described phlogistic reaction in the mouse hindpaw (Desouza *et al.*, 1995) as well as for the emesis and pseudo-allergy produced by the toxin in monkeys (Scheuber *et al.*, 1985, 1987a,b; Denzlinger *et al.*, 1986; Alber *et al.*, 1989). These observations add additional support to our previous hypothesis (Desouza *et al.*, 1995) that the SEB-mediated phlogistic reaction in mice is a valuable model for investigating the pathophysiologic mechanism of the enterotoxemias produced by this toxin. However, the relative high

doses of SEB required to induce neutrophil migration to the peritoneal cavity (≥ 25 μ g of toxin) compared to those that induce mouse hind paw edema (6.25 - 50 μ g of toxin; Desouza *et al.*, 1995) suggest that the later model is to be preferred as an assay for SEB.

H₁ histamine receptors are involved in the SEB-induced mouse paw edema (Desouza *et al.*, 1995) and in the pseudoallergy produced by the toxin in monkeys (Scheuber *et al.*, 1985) but not in vomiting, the major symptom of SEB poisoning (Scheuber *et al.*, 1985). In our experiments, diphenhydramine was not able to block the neutrophil chemotactic activity of SEB (Fig. 3). However, our present observation agrees with data indicating that neutrophils possess H₂ histamine receptors which are involved in the mechanism of chemotaxis (Hill *et al.*, 1976).

The edema induced by SEB in the mouse hindpaw is a clinical manifestation of neurogenic inflammation (Desouza *et al.*, 1995). Substance P (SP), the main neuropeptide mediator of neurogenic inflammation (Foreman, 1987), also induces neutrophil chemotaxis (Partsch and Matucci-Cerinic, 1992). Thus, it is possible that SP may be involved in SEB-induced neutrophil migration, although this peptide is not present in macrophages but occurs in sensory neurons (Foreman, 1987).

In conclusion, our data show that SEB induces a neutrophil migration into the mouse peritoneal cavity that is partly modulated by inflammatory mediators produced by resident macrophages. The precise mechanisms whereby SEB stimulates the latter cells to produce this neutrophil recruitment remains to be studied.

ACKNOWLEDGMENTS

Research supported by FAPESP (N°

95/0390-3). The authors wish to express their sincere thanks to Prof. M.S. Bergdoll for his generous gift of SEB. We are also grateful to Dr. Carlos Alberto Flores for useful suggestions, to Dr. Edson Antunes and Mr. José Ernani Zambelli for kindly providing some of the drugs used, to Dr. Stephen Hyslop for editorial assistance, and to Prof. Aquiles E. Pietrabuena for statistical advice. I.A.D. is the recipient of a FAPESP fellowship (N° 94/0210-2).

REFERENCES

- Adams, D.O., and Hamilton, T.A. (1984). The cell biology of macrophage activation. *Ann. Rev. Immunol.* **2**, 283-318.
- Alber, G., Scheuber, H.P., Reck, B., Sailer-Kramer, Hartmann, A., and Hammer, D.K. (1989). Role of substance P immediate-type skin reactions induced by staphylococcal enterotoxin B in unsensitized monkeys. *J. Allergy Clin. Immunol.* **84**, 880-885.
- Barja-Fidalgo, C., Carlini, C. R., Guimarães, J. A., Flores, C. A., Cunha, F. Q., and Ferreira, S. H. (1992). Role of resident macrophages in canatoxin-induced *in vivo* neutrophil migration. *Inflammation* **16**, 1-11.
- Bergdoll, M.S. (1983). In: *Staphylococci and Staphylococcal Infections*. C. Adam, and C. S. F. Easmon (Eds.), pp. 559-593. Academic Press, London.
- Bergdoll, M.S. (1989). In: *Foodborne Bacterial Pathogens*. M. P. Doyle (Ed.), pp. 463-512. Maxwell Press, New York.
- Bergdoll, M.S., and Chesney, P.J. (1991). In: *Toxic Shock Syndrome*. M.S. Bergdoll, and P. J. Chesney (Eds.), pp. 51-73. CRC Press, Boston.
- Bobak, D.A., and Guerrant, R.L. (1992). New developments in enteric bacterial toxins. *Adv. Pharmacol.* **23**, 85-101.
- Codiltz, I. G., and Movat, H. Z. (1984). Kinetics of neutrophil accumulation in acute inflammatory lesions induced by chemotaxins and chemotaxigens. *J. Immunol.* **133**, 2163-2168.
- Craig C. P., Norman J. S., McGann, V., and William S. I. (1971). Chemotactic activity generated by staphylococcal enterotoxin B. *Infect. Immunol.* **3**, 94-99.
- Crawley, G. J., Gray, I., Leblanc, W. A., and Blanchard, J. W. (1966). Blood binding distribution and excretion of staphylococcal enterotoxins in monkeys. *J. Infect. Dis.* **116**, 48-56.
- Denzlinger, C., Guhlmann, A., Scheuber, H. P., Wilker, D., Hammer, K. D., and Keppler, D. (1986). Metabolism and analysis of cysteinyl leukotrienes in the monkey. *J. Biol. Chem.* **261**, 15601-15606.
- Desouza, I.A. (1993). The use of mice as an animal model to study the staphylococcal enterotoxins. Master's Thesis. State University of Campinas, Campinas (S. Paulo), Brazil.
- Desouza, I.A., Bergdoll, M.S., and Ribeiro-DaSilva, G. (1996). Pharmacological characterization of the mouse paw edema induced by staphylococcal enterotoxin B. *J. Natural Toxins* **5**, 61-71.
- Faccioli, L. H., Souza, G. E. P., Cunha, F. Q., Poole, S., and Ferreira, S. H. (1990). Recombinant interleukin 1 and tumor necrosis factor induce neutrophil migration *in vivo* by indirect mechanisms. *Agents Actions* **30**, 344-349.
- Ford-Hutchinson, A. W., Brunet, G., Savard, P., and Charleston, S. (1984). Leukotriene B₄ polymorphonuclear leukocytes and inflammatory exudates in the rat. *Prostaglandins* **28**, 13-27.
- Foreman, C.J. (1987). Peptides and neurogenic inflammation. *Br. Med. Bull.* **43**, 386-400.
- Freer, J. H., and Arbuthnott, J. P. (1986).

- In: Pharmacology of Bacterial Toxins. Dorner and J. Drews (Eds.), pp 571-633. Pergamon, Oxford.
- Henriques, M.G.M.O., Silva, P.M.R., Martins, M.A., Flores, C.A., Cunha, F.Q., Assreuy-Filho, J., and Cordeiro, R.S.B. (1987). Mouse paw edema. A new model for inflammation? Braz. J. Med. Biol. Res. **20**, 243-249.
- Henricks, P.A.J., Van Der Tol, M., and Verhoef, J. (1985). Production of leukotriene B₄ by polymorphonuclear leukocytes during phagocytosis of *Staphylococcus aureus*. Agents Actions **18**, 379-380.
- Hill, H.R., Estensen, R.D., Hogan, N.A., and Quie, P.G. (1976). Severe staphylococcal disease associated with allergic manifestations, hyperimmunoglobulinemia E, and defective neutrophil chemotaxis. J. Lab. Clin. Med. **88**, 796-806.
- Partsch, G., and Matucci-Cerinic, M. (1992). Effect of substance P and somatostatin on migration of polymorphonuclear cells *in vitro*. Inflammation **16**, 539-547.
- Ribeiro, R.A., Cunha, F.Q., and Ferreira, S.H. (1990). Recombinant gamma interferon causes neutrophil migration mediated by the release of a macrophage neutrophil chemotactic factor. Int. J. Exp. Pathol. **71**, 717-725.
- Samuelsson, B. (1983). The Leukotrienes: An Introduction. Adv. Prostagl. Thromb. Leukotr. Res. Ser. **9**, 1-17.
- Scheuber, P.H., Golecki, R.J., Kickhofen, B., Scheel, D., Beck, G., and Hammer, D.K. (1985). Skin reactivity of unsensitized monkeys upon challenge with staphylococcal enterotoxin B: A new approach for investigating the site of toxin action. Infect. Immun. **50**, 869-876.
- Scheuber, P.H., Denzlinger, C., Wilker, D., Beck, G., Keppler, D., and Hammer, D.K. (1987 a). Cysteinyl leukotrienes as mediators of staphylococcal enterotoxin B in the monkey. Eur. J. Clin. Invest. **17**, 455-459.
- Scheuber, P.H., Denzlinger, C., Wilker, D., Beck, G., Keppler, D., and Hammer, D.K. (1987 b). Staphylococcal enterotoxin B as a non-immunological mast cell stimulus in primates: The role of endogenous cysteinyl leukotrienes. Int. Arch. Allerg. Immunol. **82**, 289-291.
- Souza, G. E. P., Cunha, F. Q., Mello, R., and Ferreira, S. H. (1988). Neutrophil migration induced by inflammatory stimuli is reduced by macrophage depletion. Agents Actions **24**, 377-380.
- Spector, A. A., Gordon, J. A., and Moore, S.A. (1988). Hydroxy-eicosatetraenoic acids (HETEs). Prog. Lipid Res. **27**, 271-278.
- Sugiyama, H., and McKissic, Jr., E.M. (1966). Leukocytic response in monkeys challenged with staphylococcal enterotoxin. J. Bacteriol. **92**, 349-352.
- Tateson, J.E., Randall, R.W., Reynolds, C.H., Jackson, W.P., Bhattacharjee, P., Solmon, J.A., and Garland, L.G. (1988). Selective inhibition of arachidonate 5-lipoxygenase by novel acetohydroxamic acids: biochemical assessment *in vitro* and *ex vivo*. Br. J. Pharmacol. **94**, 528-538.
- Zehavi-Willner, T., Shenberg, E., and Barnes, A. (1984). *In vivo* effect of staphylococcal enterotoxin A on peripheral blood lymphocytes. Infect. Immun. **44**, 401-405.

Neutrophil migration induced by staphylococcal enterotoxin type A in mice: a pharmacological analysis

Ivani A. Desouza, Glaci Ribeiro-DaSilva *

Department of Pharmacology, Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas, P.O. Box 6111, CEP 13081-970, Campinas, SP, Brazil

Received 16 September 1998; revised 27 October 1998; accepted 30 October 1998

Abstract

Staphylococcal enterotoxin type A induced marked neutrophil migration into the mouse peritoneal cavity and was dependent on the number of resident macrophages. This migratory response was dose- (16–64 µg of staphylococcal enterotoxin type A/cavity) and time-dependent, peaking at 12 h and disappearing after 72 h. Dexamethasone (0.5 mg/kg) inhibited the neutrophil migration induced by staphylococcal enterotoxin type A (32 µg; 42% inhibition). A similar response was observed with the platelet-activating factor-acether receptor antagonist, BN 52021 (ginkgolide B, 3-(1,1-dimethylethyl)-hexahydro-1,4,7b-trihydroxy-8-methyl-9H-1,7α (epoxymethano-1H,6αH-cyclopenta (c) furo (2,3-b) furo (3', 2': 3,4) cyclopenta (1,2-d) furan-5, 9, 12 (4H)-trione); 10 mg/kg; 57% inhibition), the histamine H₂ receptor antagonist, cimetidine (2 mg/kg; 31% inhibition), the lipoxigenase inhibitor, BWA4C (N-(3-phenoxy-cinnamyl) acetohydroxamic acid); 10 mg/kg; 73% inhibition), and capsaicin (*trans*-8-methyl-N-vanilyl-6-nonamide), a sensory C-fiber neuropeptide depletor. In contrast, indomethacin (5 mg/kg) had no effect on staphylococcal enterotoxin type A-induced chemotaxis. We conclude that the peritonitis induced by staphylococcal enterotoxin type A in mice is macrophage-dependent. The mechanism whereby staphylococcal enterotoxin type A stimulates macrophages to induce neutrophil recruitment remains to be elucidated. © 1998 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

Keywords: Staphylococcal enterotoxin type A; Staphylococcal enterotoxin type B; Neutrophil migration; Macrophage; Skin air-pouch; Neurogenic inflammation; Peritoneal cavity; Interleukin-8

1. Introduction

The enterotoxins produced by *Staphylococcus aureus* are the most common cause of food poisoning in humans (Iandolo, 1989). These toxins comprise a group of closely related proteins (25 to 30 kDa) that are classified into several immunological types designated A to E (Iandolo, 1989). A unique feature of staphylococcal enterotoxins is their ability to provoke emesis and diarrhea in humans and other primates (Bergdoll, 1989). This illness has been characterized as acute because the classic signs of intoxication may occur within 2 h. Although such signs may last 8–12 h, in humans and experimental animals, they usually disappear after 24–72 h (Jett et al., 1990). Neutrophils appear to be the major cell type involved in the host's defense against *S. aureus* (Hill et al., 1976), and the accumulation of neutrophils is a prominent feature

of staphylococcal enterotoxins-induced gastroenteritis (Zehavi-Willner et al., 1984).

Although much is known about the structural organization of the various types of staphylococcal enterotoxins, the mechanism by which they act remains unknown, mainly because staphylococcal enterotoxins induce symptoms only in primates (Freer and Arbuthnott, 1986; Bobak and Guerant, 1992).

Based on similarities between the in vivo pharmacological profile of the mediators responsible for the paw edema and the neutrophil migration into the peritoneal cavity caused by staphylococcal enterotoxin type B in mice (Desouza, 1993; Desouza and Ribeiro-DaSilva, 1996; Desouza et al., 1996) on the one hand, and the vomiting, the main symptom of food poisoning and of experimental enterotoxemia with staphylococcal enterotoxins in monkeys (Scheuber et al., 1985, 1987a,b; Denzlinger et al., 1986; Alber et al., 1989) on the other, we have proposed that the phlogistic reaction in mice may serve as a valuable model for investigating the pathophysiological mechanism of enterotoxemias.

* Corresponding author. Tel.: +55-19-788-8173; Fax: +55-19-289-2968; E-mail: ribersil@obelix.unicamp.br

Staphylococcal enterotoxin type B induces a long-lasting neutrophil migration into the mouse peritoneal cavity (Desouza and Ribeiro-DaSilva, 1996). This migratory effect is dependent on the number of resident macrophages. Dexamethasone inhibits the neutrophil migration induced by staphylococcal enterotoxin type B. A similar response is observed when the mice are pretreated with the BN52021, a platelet-activating factor-acether receptor antagonist, cimetidine, a histamine H_2 receptor antagonist, or BWA4C, an inhibitor of arachidonic acid lipoxygenation. In contrast, neither indomethacin nor diphenhydramine reduces the chemotactic activity of staphylococcal enterotoxin type B.

Staphylococcal enterotoxins are exoproteins with superantigen properties. In addition to their role in the pathophysiology of food poisoning, these toxins also have a profound effect on the immune system. In vitro, the staphylococcal enterotoxins are strong T-cell activators and in mice, staphylococcal enterotoxin type A has a specificity for V β 1, 3, 10, 11 and 17 T-cell receptors (Bobak and Guerrant, 1992). Staphylococcal enterotoxin type B and staphylococcal enterotoxin type A have the same general structure but are different entities as shown by their antigenic unrelatedness (Bergdoll, 1973). Moreover, staphylococcal enterotoxin type A is unique in that it is the first zinc-binding staphylococcal enterotoxin whose structure has been determined (Schad et al., 1995).

In this work, through the use of inhibitors, we have investigated the pharmacological mediators involved in the neutrophil migration induced by staphylococcal enterotoxin type A into the mouse peritoneal cavity and compared these with those previously reported for staphylococcal enterotoxin type B (Desouza and Ribeiro-DaSilva, 1996). To determine whether the toxin-induced chemotaxis was cell-dependent, the migratory effect of the toxin was also evaluated using the 6-day old skin air-pouch technique which provides an artificial cell-free environment.

2. Materials and methods

2.1. Animals

These studies were approved by the Animals Committee of Brazilian College of Experimental Animals in accordance with the procedures laid down by the Universities Federation for Animal Welfare. Male Swiss mice (25–30 g) were housed in temperature-controlled rooms and received water and food ad libitum until used.

2.2. Work conditions

All the procedures described below were carried out under aseptic conditions in a laminar flow cabinet. The material used was autoclaved at 127°C for 1 h and all solutions were prepared with autoclaved, deionized water.

2.3. Staphylococcal enterotoxin type A

The toxin was dissolved in sterile distilled water stored at -20°C at a concentration of 1 mg/ml.

2.4. Contamination with bacterial endotoxin

To check for possible contamination of the staphylococcal enterotoxin type A solutions with bacterial endotoxin, samples containing staphylococcal enterotoxin A (32 μg) or lipopolysaccharide from *Escherichia* (200–800 ng) were incubated for 10 min with polymyxin B (3.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) and tested for their ability to induce neutrophil migration.

2.5. Neutrophil migration

2.5.1. Peritoneal cavities

Staphylococcal enterotoxin type A (16–64 μg) injected intraperitoneally (i.p.), in 0.1 ml of sterile phosphate-buffered saline. Control animals received 0.1 ml sterile phosphate-buffered saline alone. Neutrophil migration was assessed 4, 12, 24 and 72 h after injection of toxin.

2.5.2. Skin air-pouches

Six-day old air-pouches were produced in the dorsal skin of mice as described previously (Edwards et al., 1981). The back of the mice were shaved and 5 ml sterile air were injected subcutaneously. Three days later, 2.5 ml of sterile air was again injected to maintain patency. Six days after the initial injection, the pouches were injected with staphylococcal enterotoxin type A (64 μg) or dextran (300 μg , in 0.1 ml of sterile phosphate-buffered saline). Control animals received 0.1 ml of sterile phosphate-buffered saline alone. Neutrophil migration was assessed 12 h after the injection of toxin or dextran.

2.6. Peritoneal cell harvesting and counting

The cells in the peritoneal cavity or air pouches were harvested by lavage of the cavities with 3 ml of sterile phosphate-buffered saline–heparin (5 IU/ml)–bovine serum albumin (0.1%) solution. Total and differential counts were performed as described elsewhere (Souza et al., 1988). The results are reported as the number of cells per cavity.

2.7. Changes in the number of peritoneal macrophages

2.7.1. Pretreatment with thioglycolate

To increase the number of peritoneal macrophages, groups of five mice were injected with thioglycolate (2% of sterile 3% w/v solution, i.p.). Three days later, animals were injected with staphylococcal enterotoxin type

Table 1
Dose-dependence of staphylococcal enterotoxin type A-induced neutrophil migration into the mouse peritoneal cavity

SEA (μg)	Neutrophils/cavity ($\times 10^5$)	Fold-increase
0	3.0 ± 0.3	–
16	9.0 ± 1.5^a	3
32	19.0 ± 3.0^a	6
64	21.0 ± 3.0^a	7

Staphylococcal enterotoxin type A (SEA) was injected i.p. in 0.1 ml of sterile phosphate-buffered saline; the control animals received 0.1 ml of sterile phosphate-buffered saline alone. The neutrophil counts were obtained 12 h after staphylococcal enterotoxin type A administration. The data represent the mean $\pm$ S.E.M. of five mice. $^aP \leq 0.05$, compared with the control group (Student's unpaired *t*-test).

A ($16 \mu\text{g}/0.1 \text{ ml}$ sterile phosphate-buffered saline, i.p.). Neutrophil migration was evaluated after 12 h.

2.7.2. Peritoneal lavage

The number of peritoneal macrophages was reduced as described by Souza et al. (1988). Mice were anesthetized with ethyl ether and three hypodermic needles were inserted into the abdominal cavity. Sterile saline (10 ml) was injected through the needle placed near the sternum. The abdominal cavity was then gently massaged for 1 min and the peritoneal fluid collected via the two needles inserted into the inguinal region. This operation was repeated three times and 95% of the injected saline was recovered. If blood was detected visually in the lavage fluid, the animal was discarded. Control (sham) mice were manipulated as described above but no fluid was injected or withdrawn. Thirty minutes after this procedure, the peritoneal macrophage population was estimated in half of the mice of each group by injecting 3 ml of sterile phosphate-buffered saline–heparin–bovine serum albumin solution, as described above. The other animals of the group received staphylococcal enterotoxin type A ($32 \mu\text{g}/0.1 \text{ ml}$ sterile phosphate-buffered saline, i.p.) and the neutrophil migration was estimated 12 h later.

2.8. Pharmacological investigation with different drugs

To test the effectiveness of the dose- and time-schedules employed, lipopolysaccharide from *E. coli* was used as a positive control. Except for capsaicin (*trans*-8-methyl-*N*-vanillyl-6-nonamide), which was applied topically as a 1% solution (as described by Alber et al., 1989), all drugs were administered subcutaneously (s.c.) 1 h before the i.p. injection of staphylococcal enterotoxin type A ($32 \mu\text{g}/0.1 \text{ ml}$ sterile phosphate-buffered saline) or lipopolysaccharide from *E. coli* (200 ng/0.1 ml sterile phosphate-buffered saline). The following drugs were used at the indicated doses: dexamethasone (0.5 mg/kg; Barja-Fidalgo et al., 1992), indomethacin (5 mg/kg; Henriques et al., 1987), BWA4C (*N*-(3-phenoxybenzyl) acetohydroxamic acid),

10 mg/kg; Tateson et al., 1988), cimetidine (2 mg/kg; Scheuber et al., 1985) and BN52021 (ginkgolide B, 3-(1,1-dimethylethyl)-hexahydro-1,4-7b-trihydroxy-8-methyl-9-*H*,7 α (epoxymethano-1*H*,6 α *H*-cyclopenta (*c*) furo (2,3-*b*) furo (3', 2': 3,4) cyclopenta (1,2-*d*) furan-5, 9, 12 (4*H*)-trione); 50 mg/kg; Barja-Fidalgo et al., 1992).

2.9. Drugs and chemicals

BN52021 was generously provided by Dr. Edson Antunes (Department of Pharmacology, State University of Campinas). BWA4C was a gift from Prof. Célia Regina Carlini (Department of Biochemistry, Federal University of Rio Grande do Sul). Staphylococcal enterotoxin type A, indomethacin, cimetidine, capsaicin, dexamethasone and polymyxin B were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA). The others chemicals were of the highest grade available.

2.10. Statistical analysis

The data are reported as the mean $\pm$ S.E.M. for five animals. The results from the pretreatment experiments were compared using analysis of variance followed by the Kruskal–Wallis test ($P \leq 0.05$). The other data were compared by Student's unpaired *t*-test ($P \leq 0.05$).

3. Results

Tables 1 and 2 show the migratory response to increasing concentrations of staphylococcal enterotoxin type A (16–64 $\mu\text{g}/\text{cavity}$) and the time course of the neutrophil migration induced by 32 μg of staphylococcal enterotoxin type A/cavity, respectively. The neutrophil recruitment induced by staphylococcal enterotoxin type A was dose- and time-dependent and lasted more than 24 h. This migratory effect peaked at 12 h and disappeared by 72 h.

The incubation of staphylococcal enterotoxin type A (32 $\mu\text{g}/\text{cavity}$) with polymyxin B (3.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) did not interfere with the toxin's chemotactic activity, whereas the

Table 2
Time-course of the staphylococcal enterotoxin type A-induced neutrophil migration into the mouse peritoneal cavity

Time (h)	Neutrophils/cavity ($\times 10^5$)	
	Control	Treated
4	3.0 ± 1.0	16.0 ± 1.0^a
12	3.0 ± 0.5	19.0 ± 3.0^a
24	3.0 ± 1.0	10.0 ± 1.0^a
72	2.0 ± 0.5	2.0 ± 0.5^a

The dose of staphylococcal enterotoxin type A was 32 $\mu\text{g}/\text{cavity}$. The neutrophil counts were obtained at the indicated times after staphylococcal enterotoxin type A administration. The data represent the mean $\pm$ S.E.M. of five mice. $^aP \leq 0.05$, compared with the control group (Student's unpaired *t*-test).

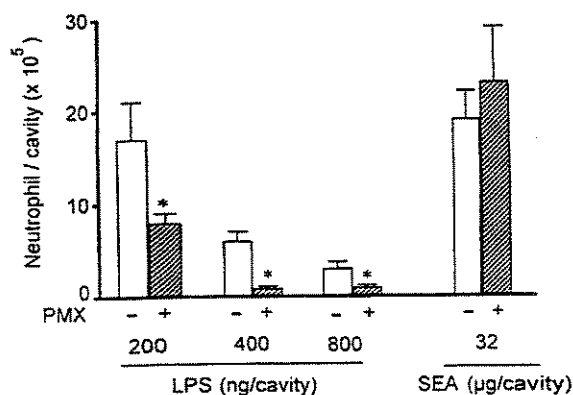


Fig. 1. The effect of polymyxin B on staphylococcal enterotoxin type A and lipopolysaccharide from *E. coli*-induced neutrophil migration into the mouse peritoneal cavity. Polymyxin B (PMX; 30 µg/cavity) was injected i.p. with staphylococcal enterotoxin type A (SEA-32 µg/cavity) or lipopolysaccharide from *E. coli* (LPS-200–800 ng/cavity) and the neutrophils counted 12 h later. The data are the mean $\pm$ S.E.M. for five mice. * $P \leq 0.05$, compared with the response in the absence of PMX (Kruskal–Wallis test).

incubation of lipopolysaccharide from *E. coli* (200–800 ng) with the same dose of polymyxin reduced the corresponding neutrophil migration into the peritoneal cavity (Fig. 1).

Fig. 2A shows a significant increase (approximately fivefold) in the peritoneal macrophage population of mice pretreated with thioglycolate and a marked reduction (83%) in the number of these cells after peritoneal lavage. In thioglycolate-treated animals, the neutrophil migration observed 12 h after an i.p. injection of staphylococcal enterotoxin type A (32 µg/cavity) was about three times greater than in normal mice injected with the same dose of

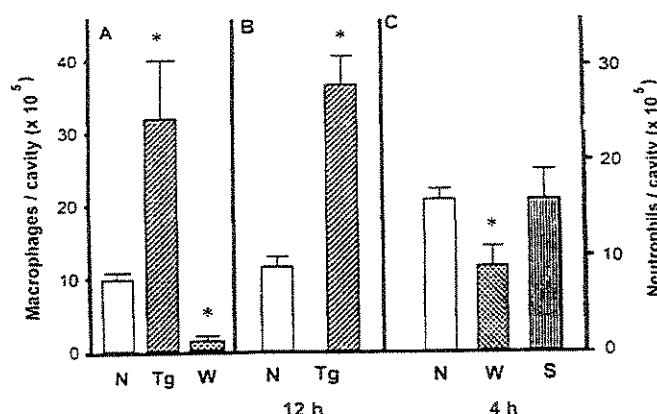


Fig. 2. The effect of increasing (Tg) or decreasing (W) the peritoneal macrophage population on the neutrophil migration induced by staphylococcal enterotoxin type A. Panel A shows the macrophage population in nontreated (N), thioglycolate-pretreated (Tg), and washed (W) peritoneal cavities. Panel B shows the neutrophil migration induced by staphylococcal enterotoxin type A (SEA-16 µg/cavity) in normal (N) and Tg mice after 12 h and Panel C shows the neutrophil migration induced by SEA (32 µg/cavity) in N, saline-washed (W) and sham (S) groups. The data are the mean $\pm$ S.E.M. for five mice. * $P \leq 0.05$, compared with the corresponding N group (Kruskal–Wallis test).

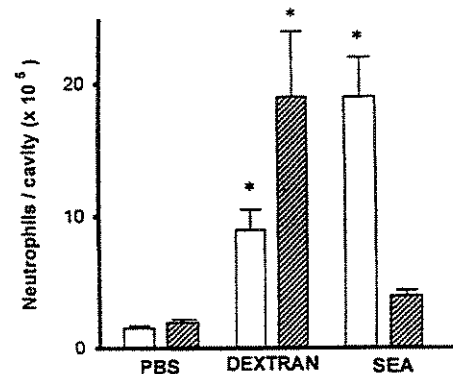


Fig. 3. Neutrophil migration induced by staphylococcal enterotoxin type A in 6-day old air-pouches. Staphylococcal enterotoxin type A (SEA-32 µg/cavity) or dextran (300 µg/cavity) in 0.1 ml of sterile phosphate buffered saline was injected i.p. (rectangle) or into 6-day old air-pouch (rectangle with diagonal lines) while the control animals received 0.1 ml of sterile phosphate-buffered saline alone. The number of neutrophils was obtained 12 h after SEA or dextran administration. The data are the mean $\pm$ S.E.M. for five mice. * $P \leq 0.05$, compared with the corresponding PBS group (Student's unpaired *t*-test).

staphylococcal enterotoxin type A (Fig. 2B). On the other hand, 4 h after peritoneal lavage, the neutrophil migration induced by staphylococcal enterotoxin type A (32 µg/cavity) was significantly reduced compared with the sham-manipulated mice (Fig. 2C).

Dextran (positive control, 300 µg/cavity) caused neutrophil migration into the peritoneal cavity and 6-day old air-pouches. In contrast, the chemotactic activity of staphylococcal enterotoxin type A (32 µg/cavity) was observed only in the peritoneal cavity; staphylococcal enterotoxin type A showed no pro-migratory activity in 6-day air pouches (Fig. 3).

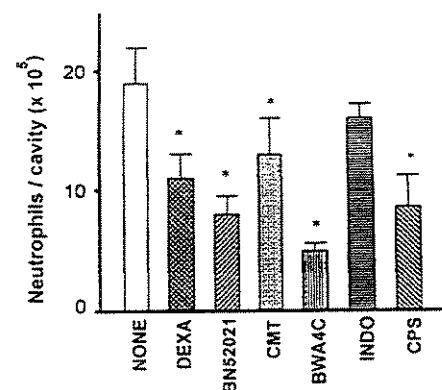


Fig. 4. The effects of anti-inflammatory drugs on the staphylococcal enterotoxin type A-induced neutrophil migration into the mouse peritoneal cavity. Drugs were given s.c. 1 h before staphylococcal enterotoxin type A (32 µg/cavity) and the number of neutrophils was determined 12 h after staphylococcal enterotoxin type A administration. None, no pretreatment; DEXA, dexamethasone (0.5 mg/kg), CMT, cimetidine (mg/kg), INDO, indomethacin (5 mg/kg) and CPS, capsaicin. The data are the mean $\pm$ S.E.M. for five mice. * $P \leq 0.05$, compared with the group without pretreatment (Kruskal–Wallis test).

Pretreatment with dexamethasone (0.5 mg/kg) inhibited by 42% the neutrophil migration induced by 32 µg of staphylococcal enterotoxin type A. A similar response was observed with the platelet-activating factor-acether receptor antagonist, BN 52021 (10 mg/kg; 57% inhibition), the histamine H₂ receptor antagonist, cimetidine (2 mg/kg; 31% inhibition), the lipoxygenase inhibitor, BWA4C (10 mg/kg; 73% inhibition) and capsaicin, a sensory C-fiber neuropeptide depletor. In contrast, indomethacin (5 mg/kg) had no effect on staphylococcal enterotoxin type A-induced chemotaxis (Fig. 4). All of the above drugs, except capsaicin, inhibited the neutrophil migration induced by lipopolysaccharide from *E. coli* (positive control, data not shown).

4. Discussion

Staphylococcal enterotoxin type A caused a long-lasting, dose- and time-dependent neutrophil migration into the mouse peritoneal cavity (Tables 1 and 2). This migratory effect was dependent on the number of resident macrophage and was inhibited when the animals were previously treated with various anti-inflammatory drugs.

The dose- and time-dependent neutrophil migration observed following the injection of staphylococcal enterotoxin type A into mouse peritoneal cavities contrasts with the inability of the toxin to induce neutrophil migration into subcutaneous air pouches (Fig. 3), a test which is sensitive to direct chemotactic substance (Ribeiro et al., 1991). This observation suggests that the chemotactic activity of staphylococcal enterotoxin type A is indirect and mediated by resident cells.

Interleukin-8 is a major neutrophil chemotaxin produced by human alveolar macrophages stimulated with staphylococcal enterotoxin type A (Miller et al., 1996a,b). This cytokine causes neutrophil migration by an indirect mechanism, possibly via the release of another cytokine from the resident cells (Ribeiro et al., 1991). It is therefore possible that, as in other models of neutrophil recruitment to the peritoneum (Ribeiro et al., 1991; Zeillemaker et al., 1995; Betjes et al., 1996), Interleukin-8 may mediate the staphylococcal enterotoxin type A-induced peritonitis described above.

The staphylococcal enterotoxin type A-induced neutrophil chemotaxis was blocked by pretreating the mice with BN52021, cimetidine or BWA4C but not by indomethacin (Fig. 4). Therefore, platelet-activating factor-acether, the histamine H₂ receptor and lipoxygenase products seem to be involved in neutrophil recruitment. The broad spectrum of drugs which inhibit this response may reflect the fact that staphylococcal enterotoxin type A stimulates various cell types including T-cells and mast cells (Micusan and Thibodeau, 1993). In particular, mast cells are able to release all of the mentioned above mediators. Thus, two or more cell types are probably involved in

staphylococcal enterotoxin type A-stimulated neutrophil migration.

Staphylococcal enterotoxin type A is a potent inducer of several endogenous mediators including interleukin-1, tumor necrosis factor-α and interferon-γ (Bergdoll and Chesney, 1991). Interleukin-1 and tumor necrosis factor-α (Faccioli et al., 1990), as well as interferon-γ (Ribeiro et al., 1990) stimulate macrophages to release a neutrophil chemotactic factor in vitro. The neutrophil migration induced by this factor in vivo is independent of the number of resident macrophages and is observed even in dexamethasone-pretreated animals (Souza et al., 1988; Faccioli et al., 1990). In our experiments, the neutrophil migration induced by staphylococcal enterotoxin type A was dependent on the number of resident macrophages (Fig. 2) and was partially inhibited by dexamethasone (Fig. 4).

Lipopolysaccharide from *E. coli* can both stimulate and inhibit neutrophil migration (Rosenbaum et al., 1983). To exclude the possibility of contamination with lipopolysaccharide from *E. coli*, solutions of staphylococcal enterotoxin type A were incubated with polymyxin B (Cunha et al., 1989; Barja-Fidalgo et al., 1992). As shown in Fig. 1, the neutrophil migration responses to staphylococcal enterotoxin type A were not affected by polymyxin B whereas those to lipopolysaccharide from *E. coli* (200 ng) was.

Exudate is the principal component of the phlogistic response produced by staphylococcal enterotoxin type A and staphylococcal enterotoxin type B in the mouse hind-paw (Desouza et al., 1996; Desouza and Ribeiro-DaSilva, 1997). Although neutrophils are one of the components of staphylococcal enterotoxin type B-induced exudate (Desouza and Ribeiro-DaSilva, 1996), this is apparently not the case with staphylococcal enterotoxin type A since there was no correlation between the time-course of staphylococcal enterotoxin type A-induced mouse paw edema and the neutrophil migration. Thus, the staphylococcal enterotoxin type A-induced paw edema peaks 2 h after the toxin administration and is followed by a sharp decrease at 4 h (Desouza and Ribeiro-DaSilva, 1997), whereas the neutrophil migration peaked between 4 h and 12 h (Table 2) and disappeared only at 72 h.

Resident macrophages are involved in the neutrophil migration produced by staphylococcal enterotoxin type A (Fig. 2) and a similar response has been described for staphylococcal enterotoxin type B (Desouza and Ribeiro-DaSilva, 1996). However, staphylococcal enterotoxin type A was about four times more potent than staphylococcal enterotoxin type B in promoting neutrophil migration. Thus, while the i.p. injection of 16 µg of staphylococcal enterotoxin type A tripled the neutrophil population after 12 h (Table 1), a response of similar magnitude was observed only with an staphylococcal enterotoxin type B dose of ≥ 62.5 µg (Desouza and Ribeiro-DaSilva, 1996). Accordingly, we recently suggested the existence of a divergent mechanism in staphylococcal enterotoxin type

A- and staphylococcal enterotoxin type B-induced mouse paw edema (Desouza et al., 1996; Desouza and Ribeiro-DaSilva, 1997).

Substance P is the main peptide mediator of neurogenic inflammation and capsaicin depletes sensory neurons of their neuropeptides (Foreman, 1987). The mouse hindpaw edema induced by staphylococcal enterotoxin type A is a clinical manifestation of neurogenic inflammation (Desouza and Ribeiro-DaSilva, 1997). This conclusion was reinforced by the observation that capsaicin blocked the chemotactic effect of staphylococcal enterotoxin type A (Fig. 4). Thus, substance P may be involved in staphylococcal enterotoxin type A-induced neutrophil migration, although this peptide is not present in macrophages but occurs in sensory neurons (Foreman, 1987). Substance P-induced tissue swelling and granulocyte infiltration in mice are associated with mast cell degranulation and the neutrophil infiltration seen following the intradermal injection of substance P into mouse skin is mast-cell dependent (Yano et al., 1989). Thus, mast cells may be important intermediates between the release of neuropeptides and the local alterations in vascular tone, permeability and granulocyte infiltration following the administration of staphylococcal enterotoxin type A.

5. Conclusion

Macrophages are involved in the peritonitis induced by staphylococcal enterotoxin type A in mice. The mechanism whereby staphylococcal enterotoxin type A stimulates macrophages to induce neutrophil recruitment remains to be elucidated.

Acknowledgements

Ivani A. Desouza is the recipient of a FAPESP fellowship (No. 94/0210-2). This work is part of a thesis to be submitted by Ivani A. Desouza to the Institute of Biology, State University of Campinas, in partial fulfillment of the requirements for a PhD degree. Grant support: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de S. Paulo (FAPESP; Grant No. 95/0390-3 and 96/5410-5) and Fundo de Apoio ao Ensino e à Pesquisa da UNICAMP (FAEP/UNICAMP; Grant No. 0263/95). We are grateful to Dr. Edson Antunes for kindly providing some of the drugs used, to Dr. Stephen Hyslop for editorial assistance and to Prof. Aquiles E. Pietrabuena for statistical advice.

References

Alber, G., Scheuber, H.P., Reck, B., Sailer-Kramer, B., Hartmann, A., Hammer, D.K., 1989. Role of substance P immediate-type skin

- reactions induced by staphylococcal enterotoxin B in unsensitized monkeys. *J. Allergy Clin. Immunol.* 84, 880–885.
- Barja-Fidalgo, C., Carlini, C.R., Guimarães, J.A., Flores, C.A., Cunha F.Q., Ferreira, S.H., 1992. Role of resident macrophages in canatoxin-induced in vivo neutrophil migration. *Inflammation* 16, 1–11.
- Bergdoll, M.S., 1973. *Staphylococci* and staphylococcal infections. In: Adlam, C., Easmon, C.S.F. (Eds.), Academic Press, London, pp. 559–593.
- Bergdoll, M.S., 1989. Foodborne bacterial pathogens. In: Doyle, M.F. (Ed.), Maxwell Press, New York, pp. 463–512.
- Bergdoll, M.S., Chesney, P.J., 1991. Toxic shock syndrome. In: Bergdoll M.S., Chesney, P.J. (Eds.), CRC Press, Boston, pp. 51–73.
- Betjes, M.G., Visser, C.E., Zemel, D., Tuk, C.W., Struijk, D.G., Kredie R.T., Arisz, L., Beelen, R.H., 1996. Intraperitoneal interleukin-8 and neutrophil influx in the initial phase of a CAPD peritonitis. *Peritoneal Dial. Int.* 16, 385–392.
- Bobak, D.A., Guerrant, R.L., 1992. New developments in enteric bacterial toxins. *Adv. Pharmacol.* 23, 85–101.
- Cunha, F.Q., Souza, G.E.P., Souza, C.A.M., Cerqueira, B.C.S., Ferreira S.H., 1989. In-vivo blockage of neutrophil migration by LPS mimicked by a factor released from LPS-stimulated macrophages. *B. J. Exp. Pathol.* 70, 1–8.
- Denzlinger, C., Guhlmann, A., Scheuber, H.P., Wilker, D., Hamme K.D., Keppler, D., 1986. Metabolism and analysis of cysteinyl leukotrienes in the monkey. *J. Biol. Chem.* 261, 15601–15606.
- Desouza, I.A., 1993. The use of mice as an animal model to study the staphylococcal enterotoxins. Master's thesis. State University of Campinas, Campinas, São Paulo, Brazil.
- Desouza, I.A., Ribeiro-DaSilva, G., 1996. Resident macrophages modulate the neutrophil migration induced by staphylococcal enterotoxin into mouse peritoneal cavity. *J. Nat. Toxins* 5, 341–350.
- Desouza, I.A., Ribeiro-DaSilva, G., 1997. The pharmacological profile of mouse hind paw inflammation induced by staphylococcal enterotoxin type A. *Inflamm. Res.* 46, 361–365.
- Desouza, I.A., Bergdoll, M.S., Ribeiro-DaSilva, G., 1996. Pharmacological characterization of the mouse paw edema induced by staphylococcal enterotoxin B. *J. Nat. Toxins* 5, 61–71.
- Edwards, J.C.W., Sedgwick, A.D., Willoughby, D.A., 1981. The formation of a structure with the features of synovial lining by subcutaneous injection of air: an in vivo tissue culture system. *J. Pathol.* 137, 147–156.
- Faccioli, L.H., Souza, G.E.P., Cunha, F.Q., Poole, S., Ferreira, S.J., 1990. Recombinant interleukin 1 and tumor necrosis factor induce neutrophil migration in vivo by indirect mechanisms. *Agents Acta* 30, 344–349.
- Foreman, C.J., 1987. Peptides and neurogenic inflammation. *Br. Med. Bull.* 43, 386–400.
- Freer, J.H., Arbuthnot, J.P., 1986. Pharmacology of bacterial toxins. Dorner, S., Drews, J. (Eds.), Pergamon, Oxford, pp. 571–633.
- Henriques, M.G.M.O., Silva, P.M.R., Martins, M.A., Flores, C.A., Cunha F.Q., Assreuy-Filho, J., Cordeiro, R.S.B., 1987. Mouse paw edema: a new model for inflammation? *Braz. J. Med. Biol. Res.* 20, 243–247.
- Hill, H.R., Estensen, R.D., Hogan, N.A., Quie, P.G., 1976. Severe staphylococcal disease associated with allergic manifestations, hypogammaglobulinemia E, and defective neutrophil chemotaxis. *J. Clin. Med.* 88, 796–806.
- Iandolo, J.J., 1989. Genetic analysis of extracellular toxins of *Staphylococcus aureus*. *Annu. Rev. Microbiol.* 43, 375–402.
- Jett, M., Brinkley, R., Neil, P., Hunt, R., 1990. *Staphylococcus aureus* enterotoxin B challenge of monkeys: correlation of plasma levels of arachidonic acid cascade products with occurrence of illness. *Inf. Immun.* 58, 3494–3499.
- Micusan, V.V., Thibodeau, J., 1993. Superantigens of microbiological origin. *Semin. Immunol.* 5, 3–11.
- Miller, E.J., Nagao, S., Carr, F.K., Noble, J.M., Cohen, A.B., 1995.

- Interleukin-8 (IL-8) is a major neutrophil chemotaxin from human alveolar macrophages stimulated with staphylococcal enterotoxin A (SEA). *Inflamm. Res.* 45, 386–392.
- Miller, E.J., Cohen, A.B., Peterson, B.T., 1996b. Peptide inhibitor of interleukin-8 (IL-8) reduces staphylococcal enterotoxin-A (SEA) induced neutrophil trafficking to the lung. *Inflamm. Res.* 45, 393–397.
- Ribeiro, R.A., Cunha, F.Q., Ferreira, S.H., 1990. Recombinant gamma interferon causes neutrophil migration mediated by the release of a macrophage neutrophil chemotactic factor. *Int. J. Exp. Pathol.* 71, 717–725.
- Ribeiro, R.A., Flores, C.A., Cunha, F.Q., Ferreira, S.H., 1991. IL-8 causes in vivo neutrophil migration by a cell-dependent mechanism. *Immunology* 73, 472–477.
- Rosenbaum, J.T., Hartiala, K.T., Webster, R.O., Howes, E.L., Goldstein, I.M., 1983. Antiinflammatory effects of endotoxin. *Am. J. Pathol.* 113, 291–299.
- Schad, E.M., Zaitseva, I., Zaitseva, V.N., Dohlsten, M., Kulland, T., Schlievert, P.M., 1995. Crystal structure of the superantigen staphylococcal enterotoxin type A. *EMBO J.* 14, 3292–3301.
- Scheuber, P.H., Golecki, R.J., Kickhofen, B., Scheel, D., Beck, G., Hammer, D.K., 1985. Skin reactivity of unsensitized monkeys upon challenge with staphylococcal enterotoxin B: a new approach for investigating the site of toxin action. *Infect. Immun.* 50, 869–876.
- Scheuber, P.H., Denzlinger, C., Wilker, D., Beck, G., Keppler, D., Hammer, D.K., 1987a. Cysteinyl leukotrienes as mediators of staphylococcal enterotoxin B in the monkey. *Eur. J. Clin. Invest.* 17, 455–459.
- Scheuber, P.H., Denzlinger, C., Wilker, D., Beck, G., Keppler, D., Hammer, D.K., 1987b. Staphylococcal enterotoxin B as a non-immunological mast cell stimulus in primates: the role of endogenous cysteinyl leukotrienes. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 82, 289–291.
- Souza, G.E.P., Cunha, F.Q., Mello, R., Ferreira, S.H., 1988. Neutrophil migration induced by inflammatory stimuli is reduced by macrophage depletion. *Agents Actions* 24, 377–380.
- Tateson, J.E., Randall, R.W., Reynolds, C.H., Jackson, W.P., Bhattacharjee, P., Solmon, J.A., Garland, L.G., 1988. Selective inhibition of arachidonate 5-lipoxygenase by novel acetohydroxamic acids: biochemical assessment in vitro and ex vivo. *Br. J. Pharmacol.* 95, 528–538.
- Yano, H., Wershil, B.K., Arizono, N., Galli, S.J., 1989. Substance P-induced augmentation of cutaneous vascular permeability and granulocyte infiltration in mice is mast cell-dependent. *J. Clin. Invest.* 83, 1276–1286.
- Zehavi-Willner, T., Shenberg, E., Barnes, A., 1984. In vivo effect of staphylococcal enterotoxin A on peripheral blood lymphocytes. *Infect. Immun.* 44, 401–405.
- Zeilemaker, A.M., Mul, F.P., Hoyne-van-Papendrecht, A.A., Kuijper T.W., Roos, D., Leguit, P., Verbrugh, H.A., 1995. Polarized secretion of interleukin-8 by human mesothelial cells: a role in neutrophil migration. *Immunology* 84, 227–232.

British Journal of Pharmacology

EDITORIAL OFFICE

16 Angel Gate, 326 City Road
London EC1V 2SG

Telephone: 020-7417 0432

Fax: 020-7417 0430

Chairman of the Editorial Board
Professor D.A. Brown, FRS
5 October 1999

Managing Editor
Dr. P.K. Moore

Dr Ivani A Desouza
Department of Pharmacology
Faculty of Medical Sciences
State University of Campinas
Cidade Universitária "Zeferino Vaz"
PO Box 6111, CEP 13084-970
Campinas, SP
Brazil

Dear Dr Desouza

Thank you for having submitted a manuscript entitled "Role of a neutrophil chemotactic component released from mouse peritoneal macrophages on the neutrophil migration induced by staphylococcal enterotoxin type A" by I A Desouza & G Ribeiro-DaSilva for publication in the British Journal of Pharmacology.

Unfortunately, however, the declaration of copyright was incorrectly worded and so I have enclosed a form for you to complete. It is essential that each Author should sign to comply with the Journal's requirements. Please note that papers will not be published without this declaration. I would be grateful if you would return it to me as soon as possible.

In any further correspondence or enquiries, please use the above address and telephone number, referring to manuscript number **991196**.

Yours sincerely



Gina Ramlakhan
Editorial Assistant

Enc.

Role of a neutrophil chemotactic component released from mouse peritoneal
macrophages on the neutrophil migration induced by staphylococcal enterotoxin
type A

^{*1}Ivani A. Desouza & ²G. Ribeiro-DaSilva

¹Department of Physiology and Biophysics, Institute of Biology, State University of
Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil.

²Department of Pharmacology, Faculty of Medical Sciences, State University of
Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil.

^{*}Corresponding author: Ivani A. Desouza, Department of Pharmacology, Faculty of
Medical Sciences, State University of Campinas (UNICAMP), Cidade
Universitária “Zeferino Vaz”, PO BOX 6111, CEP 13084-970, Campinas, SP,
Brazil; Tel.: +55-19-788-8173; Fax +55-19-2892968; E-mail:
ivanidesouza@uol.com.br

Abstract

1. Mouse macrophage monolayers stimulated with staphylococcal enterotoxin A (SEA) actively secrete a neutrophil chemotactic component (MNCC-SEA) which is a thermolabile protein with molecular mass > 100 kDa.
2. The release of this protein was dose- and time-dependent and was inhibited 71% by dexamethasone but not by indomethacin or BW755C. Dexamethasone (0.5 mg/kg), indomethacin, (5 mg/kg), BWA4C (10 mg/kg), BW755C (50 mg/kg), BN52021 (10 mg/kg), cimetidine (2 mg/kg) and the neurokinin₂ (NK₂) receptor antagonist SR48968 had no effect on the neutrophil migration induced by MNCC-SEA.
3. In contrast, capsaicin (1% topically) and the neurokinin₁ (NK₁) receptor antagonist SR140333 (100 µg/kg) reduced the neutrophil recruitment induced by this neutrophil chemotactic component. These results confirm that macrophages play a key role in the neutrophil recruitment induced by SEA and suggest that this function is mediated by the release of a neutrophil chemotactic protein that is different from currently known chemotactic mediators such IL-1, TNF-α, INF-γ, IL-8, MNCF, LTB₄, PAF and the complement component C5a.
4. The neutrophil migration induced by MNCC-SEA may involve the stimulation of sensory neurons resulting in the release of neuropeptides such as SP.

Key words: Staphylococcal enterotoxin type A; neutrophil migration; macrophages; neurogenic inflammation; peritoneal cavity; interleukins

1. Introduction

Staphylococcus aureus secretes several toxins known as staphylococcal enterotoxins (SE) which are the major cause of food poisoning in man. These antigenically related proteins are classified immunologically into several types designated A to E and G to I (Iandolo, 1989; Munson *et al.*, 1998).

Although much is known about the structural organization of the various types of SE, the mechanism by which they act remains unknown, mainly because SE induce symptoms only in primates (Bobak & Guerrant, 1992; Micusan & Thibodeau, 1993).

Previous studies have demonstrated that in man, the pathophysiological events of SE may be mediated by the release of inflammatory mediators such as histamine, serotonin and leukotrienes as well as cytokines such as interleukin-1 (IL-1), interleukin-2 (IL-2), interleukin-6 (IL-6), interleukin-8 (IL-8), tumour necrosis factor- α (TNF- α), and interferon- γ (IFN- γ) from cells such as mast cells, macrophages and lymphocytes (Haskó *et al.*, 1998; Micusan & Thibodeau, 1993; Marrack & Kappler, 1990; Scheuber *et al.*, 1987)

Bacterial toxins are known to stimulate the release of several inflammatory mediators from host cells (Mello Filho *et al.*, 1997; Fleming *et al.*, 1991; Misfeldt *et al.*, 1990). Macrophages are one of the main resident cell types that can be activated by several of these toxins to release prostaglandins, leukotriene B₄ (LTB₄), IL-1, IL-8, TNF- α and nitric oxide (NO). These mediators trigger inflammatory events such as leukocyte emigration, vascular permeability, fever and pain (Ferreira, 1993; Dinarello, 1991; Kluger, 1991).

Neutrophils are the major cell type involved in the host's defense against *Staphylococcus aureus* (Hill *et al.*, 1976). The accumulation of neutrophils is a prominent feature of SE-induced gastroenteritis (Zehavi-Willner *et al.*, 1984) and

the emigration of these cells from circulating blood to the site of injury is a crucial event during the inflammatory process. This complex phenomenon is mediated by various substances including the complement component C5a (Klein *et al.*, 1995; Fernandez *et al.*, 1978), LTB₄ (Samuelson, 1983), the cytokines IL-1, IL-8, TNF- α and IFN- γ (Ribeiro *et al.*, 1990, 1991; Faccioli *et al.*, 1990; Rankin *et al.*, 1990; Colditz *et al.*, 1989) and a macrophage-derived neutrophil chemotactic factor (MNCF) (Cunha & Ferreira, 1986).

Several laboratories have shown that neutrophil recruitment *in vivo* is controlled mainly by resident macrophages which may play an important role in the initiation of neutrophil mobilization to the inflamed site (Klein *et al.*, 1995; Harmsen & Havel, 1990; Merrill *et al.*, 1980; Ferreira *et al.*, 1980). Thus, the neutrophil migration into the peritoneal cavity induced by exogenous stimuli such as carrageenin, lipopolysaccharide from *Escherichia coli* (LPS), *Clostridium difficile* toxin A and zymosan (Ribeiro *et al.*, 1997; Klein *et al.*, 1995) is enhanced when the number of macrophages is increased by pretreating the animals with thioglycollate, and diminished after depletion of the peritoneal macrophage population by lavage of the cavity (Souza *et al.*, 1988).

Recently, we suggested that staphylococcal enterotoxin type A (SEA) and type B (SEB) induce neutrophil migration into the mouse peritoneal cavity via a mechanism that involves lipoxygenase metabolites, histamine, platelet-activating factor-acether (PAF) and neuropeptides from sensory neurons. Resident macrophages had a crucial role in the peritonitis induced by these toxins in this experimental model (Desouza & Ribeiro-DaSilva, 1996, 1998).

Since the biological effects of SE and bacterial endotoxins (lipopolysaccharide) are similar in several aspects (Bergdoll & Chesney, 1991), and since the neutrophil migration induced by endotoxin in rats is dependent on a neutrophil chemotactic factor produced by macrophages (Cunha & Ferreira, 1986),

we have investigated the role of macrophage products in the neutrophil migration during peritonitis induced by SEA in mice.

2. Materials and Methods

2.1. Animal experimentation guidelines

These studies were approved by the Animal Ethics Committee of the Brazilian College for the use of Experimental Animals in accordance with the procedures laid down by the Universities Federation for Animal Welfare. Male Swiss mice (25-30 g) were housed in temperature-controlled rooms and received water and food *ad libitum* until used.

2.2. Working conditions

All the procedures described below were carried out under aseptic conditions in a laminar flow cabinet. The material used was autoclaved at 127°C for 1 h and all solutions were prepared with autoclaved, deionized water.

2.3. Staphylococcal enterotoxin type A

The toxin was dissolved in sterile phosphate-buffered saline and stored at -20°C at a concentration of 1 mg/ml.

2.4. *In vitro* release of neutrophil chemotactic component from peritoneal macrophages stimulated with SEA

Mouse peritoneal macrophages were harvested with sterile RPMI1640 medium (pH 7.4) four days after an intraperitoneal (i.p.) injection of sterile thioglycollate solution (3% w/v, 2 ml/cavity) and allowed to adhere to plastic tissue culture dishes for 1 h at 37°C in an atmosphere of air containing 5% CO₂ as previously described (Cunha & Ferreira, 1986). Nonadherent cells were removed by washing the dishes three times with sterile phosphate-buffered saline. The adherent population (95% macrophages) was incubated for 5, 15, 30 or 60 min with

RPMI (control; N=5) or with SEA (0.62-2.50 $\mu\text{g/ml}$; N=5). Subsequently, the supernatants were discarded and the cells washed another three times with sterile phosphate-buffered saline. This wash was followed by a final incubation with 4 ml of RPMI medium without SEA for 30, 60, 120 or 180 min at 37°C in an atmosphere of air containing 5% CO₂. The method described by Boyse et al. (1964) was used to determine the viability of macrophages exposure to the toxin. To test for the possible release of a chemotactic component, cell-free incubation medium was sterilized (Millipore filters, 0.22 μm) and assayed by injecting aliquots (0.2 ml) into the peritoneal cavity of naive mice.

2.5. Neutrophil migration assay

The chemotactic activity of supernatants from SEA-stimulated macrophage monolayers was assayed by intraperitoneal (i.p.) injection (0.2 ml/cavity) in naive mice. Control animals received 0.2 ml of supernatant from macrophages monolayers exposed to RPMI alone. Twelve hours later, the cells were harvested from the peritoneal cavity by washing the cavities with 3 ml of a phosphate buffered saline-heparin (5 IU/ml)- bovine serum albumin (0.1%) solution. Total and differential cell counts were determined as described elsewhere (Souza *et al.*, 1988). The results were reported as the number of cells per cavity.

2.6. Contamination with bacterial endotoxin

To check for possible contamination of the supernatants with bacterial endotoxin, samples of these or lipopolysaccharide (200-800 ng) from *Escherichia coli* were incubated for 10 min with polymyxin B (3.5 $\mu\text{g/ml}$) and tested for their ability to induce neutrophil migration.

2.7. Determination of the ideal conditions for the release of chemotactic component by SEA-stimulated macrophages

These experiments were carried out using sterile Krebs-Ringer buffer instead of RPMI medium. The supernatants were obtained from macrophages stimulated by SEA at different pH values (6-8) or at different temperatures (4-45°C) or in Krebs-Ringer buffer solution without calcium, magnesium or glucose.

2.8. Partial characterization of the neutrophil chemotactic component released by SEA-stimulated macrophages

The nature of the neutrophil chemotactic component releases by SEA-stimulated macrophages was investigated by examining the neutrophil migration of the supernatants: a) after heating for 30 min at 37°, 56° and 100°C, (Klein *et al.*, 1995; Cunha & Ferreira, 1986), b) after incubation for 60 min with trypsin (200 µg/ml) or chymotrypsin (100 µg/ml) (Calderon *et al.*, 1974) and c) after pre-treatment of the macrophage monolayers with cycloheximide (9 µg/ml). In this latter case, cycloheximide was added to the incubation medium 30 min before the toxin challenge and was maintained throughout the incubation (Cunha & Ferreira, 1986). In control, experiments cycloheximide (9 µg/ml), trypsin (200 µg/ml) and chymotrypsin (100 µg/ml) were added to the supernatants of macrophage monolayers stimulated only with SEA.

2.9. Ultrafiltration of the supernatants from macrophages stimulated with SEA

Supernatants from of SEA-treated macrophage monolayers were filtered through Amicon YM 10, YM 30 or YM 100 membranes. The residue was further washed with sterile phosphate-buffered saline and reconstituted to the original volume. All solutions were assayed for neutrophil migration in naive mice.

2.10. Pharmacological investigation with different drugs

Lipopolysaccharide from *E. coli* was used as a positive control to test the effectiveness of the dose and time schedules employed. Capsaicin (trans-8-methyl-N-vanilyl-6-nonamide) was applied topically as a 1% solution (Alber *et al.*, 1989).

The neurokinin₁ (NK₁) receptor antagonist SR140333 ((*S*)-1-{2-[3-(3,4-dichlorophenyl)-1-(3-isopropoxyphenylacetyl)piperidin-3-yl]ethyl}-4-phenyl-1-azoniabicyclo[2.2.2.]octane chloride, 100 µg/kg; Ionue *et al.*, 1997) or the neurokinin₂ (NK₂) receptor antagonist SR48968 ((*S*)-*N*-methyl-*N*[4-(4-acetylamino-4-phenylpiperidino)-2-(3,4,-dichlorophenyl)butyl]benzamide, 1 mg/kg; Ionue *et al.*, 1997) were administer intravenously immediately before the i.p. injection of supernatants from macrophages stimulated with SEA (0.2 ml/cavity) or LPS (200 ng/cavity).

All the other drugs were administer subcutaneously (sc) 1 h before the i.p. injection of supernatants from SEA-stimulated macrophages. The following drugs were used at the indicated doses: dexamethasone (0.5 mg/kg; Barja Fidalgo *et al.*, 1992), indomethacin (5 mg/kg; Henriques *et al.*, 1987), BWA4C (N-(3-phenoxy-cinnamyl) acetohydroxamic acid), 5 mg/kg; Tateson *et al.*, 1988), BW755C ([3-(amino-1-3 trifluoromethyl phenyl)-2-pyrazoline hydrochloride], 50

mg/kg; Randall *et al.*, 1980), cimetidine (2 mg/kg; Scheuber *et al.*, 1985) and BN52021 (ginkgolide B, 3-(1,1-dimethylethyl)-hexahydro-1,4-7b-trihydroxy-8-methyl-9H-1,7 α (epoxymethano-1H, 6 α H-cyclopenta (c) furo (2,3-b) furo (3',2':3,4) cyclopenta (1,2-d) furan-5, 9, 12 (4H)-trione); 10 mg/kg; Barja-Fidalgo *et al.*, 1992).

2.11. Drugs and chemicals

BN52021, NK₁ receptor antagonist SR140333 and NK₂ receptor antagonist SR48968 were generously provided by Dr Edson Antunes (Department of Pharmacology, State University of Campinas). BW755C was generously provided by Prof. Célia Regina Carlini (Department of Biochemistry, Federal University of Rio Grande do Sul). Staphylococcal enterotoxin type A, indomethacin, cimetidine, capsaicin, dexamethasone and polymyxin B were purchased from (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA). The other chemicals were of the highest grade available.

2.12. Statistical analysis

The data are reported as the mean $\pm$ SEM for five animals. The results from the pretreatment experiments were compared using analysis of variance followed by the Kruskal-Wallis test ($p < 0.05$). The other data were compared using Student's unpaired t-test ($p \leq 0.05$).

3. Results

Marked neutrophil recruitment was observed following the injection into mice of supernatants from mouse SEA-stimulated peritoneal macrophages (Figure 1A). The release of this neutrophil chemotactic component was proportional to the SEA concentration (0.62-2.5 $\mu\text{g/ml}$); the concentrations used had no effect on macrophage viability. For the highest concentration of SEA tested (2.5 $\mu\text{g/ml}$) the maximal neutrophil migration was obtained 2 h after a 30 min pre-incubation of macrophage monolayers with the toxin (Figure 1 B,C).

Incubating the supernatants from SEA-stimulated macrophages with polymyxin B (3.5 $\mu\text{g/ml}$) did not reduce their chemotactic activity, whereas that of LPS (200-800 ng) was reduced (Figure 2).

Incubating supernatants from SEA-stimulated macrophages at 100°C for 30 min or with chymotrypsin (100 $\mu\text{g/ml}$), but not trypsin (200 $\mu\text{g/ml}$), for 60 min abolished the neutrophil chemotactic activity (Figure 3 A,B). Pre-treating the SEA-stimulated macrophage monolayers with cycloheximide (9 $\mu\text{g/ml}$) inhibited release of the chemotactic component (Figure 3 C). No effect on neutrophil migration was observed when the above substances were added to supernatants collected from SEA-stimulated macrophages.

All of the neutrophil chemotactic activity was found in the material retained after ultrafiltration of the supernatants through an Amicon YM-10 membrane; the ultrafiltrate did not induce neutrophil migration. The stimulatory activity was also retained by YM-30 and YM-100 membranes. Curiously, the material retained by the YM-30 membrane was about three times more potent than the unfiltered supernatant (Figure 4).

Pre-treating the mice with dexamethasone (0.5 mg/kg) had no effect on the neutrophil migration induced by the supernatants of SEA-treated macrophages. A

similar response was observed with the dual inhibitor of arachidonic acid metabolism BW755C (50 mg/kg), indomethacin (5 mg/kg), the lipoxygenase inhibitor BWA4C (10 mg/kg), the PAF receptor antagonist BN52021 (10 mg/kg) and the histamine H₂ receptor antagonist cimetidine (2 mg/kg). On the other hand, mice pre-treated with capsaicin, a sensory C-fiber neuropeptide depletor, or with the NK₁ receptor antagonist SR140333 (100 µg/kg), there was a significant reduction in the neutrophil migration induced by supernatants from SEA-stimulated macrophages. In contrast, the NK₂ receptor antagonist SR48968 (1 mg/kg) did not inhibit neutrophil migration. A similar profile of inhibition was observed for the neutrophil migration induced by substance P (20 nmol /cavity; positive control). All of the above drugs, except capsaicin, inhibited the neutrophil migration induced by LPS (positive control, data not shown).

Discussion

In this study, we have provided evidence for the presence of a neutrophil chemotactic component in supernatants from mice peritoneal macrophages incubated with SEA (Figure 1). These results reinforce our previous hypothesis about a modulatory role for macrophages in the neutrophil migration induced by this toxin *in vivo* (Desouza & G. Ribeiro-DaSilva, 1998) and are in line with the suggested role of macrophages in the pathophysiological events triggered by SE (Micusan & Thibodeau, 1993).

The MNCC-SEA was a thermolabile protein, the release of which was abolished by pre-treating the macrophage monolayers with cycloheximide, an inhibitor of protein synthesis. Although this protein was sensitive to digestion by chymotrypsin (100 $\mu\text{g/ml}$ for 60 min) it retained its activity after four freeze-thaw cycles (10 ± 1.8 vs 9.3 ± 1.7 neutrophils per cavity $\times 10^5$) and after storage at 4°C for 48 h (10.6 ± 1.0 vs 10.2 ± 2.0 neutrophils per cavity $\times 10^5$) (Figure 3). The release of MNCC-SEA from macrophages was apparently active secretory process since the release occurred without cell damage, there was a requirement for metabolic energy (glucose) the presence of divalent cations (Ca^{2+} or Mg^{2+}) and optimal release occurred at 37°C and physiological pH (data not shown).

Bacterial endotoxin can stimulate and inhibit neutrophil migration (Rosenbaum *et al.*, 1983). To discarded the involvement of LPS supernatants from macrophage monolayers stimulated with SEA were incubated with polymyxin B (Barja-Fidalgo *et al.*, 1992; Cunha & Ferreira, 1986). As shown in Figure 2, the neutrophil migration responses to these supernatants were not affected by polymyxin B whereas that to LPS was. This observation confirms that the neutrophil migratory response observed was in fact attributable to the presence of a neutrophil chemotactic substance in the supernatants and not to the presence of

endotoxin.

Several chemotactic mediators released at the inflammatory site are involved in neutrophil recruitment, including the complement component C5a (Fernandez *et al.*, 1978), arachidonic acid metabolites such as LTB₄ (Samuelsson, 1983) and cytokines such as IL-1 β , TNF- α and IL-8 (Ribeiro *et al.*, 1991; Faccioli *et al.*, 1990; Colditz *et al.*, 1989). Some of these substances, such as C5a, may have a direct chemotactic effect on neutrophils (Yancey, 1989), whereas others such as IL-1, TNF- α and LTB₄ may act indirectly through mechanisms dependent on the number of resident cells, and on endothelial reactivity (Ribeiro *et al.*, 1991; Faccioli *et al.*, 1990).

Macrophages incubated *in vitro* with LPS (Cunha & Ferreira, 1986), IL-1, TNF- α (Faccioli *et al.*, 1990) and INF- γ (Ronaldo *et al.*, 1990) release a neutrophil chemotactic factor, known as MNCF (macrophage-derived neutrophil chemotactic factor) which is a lectin-like protein with a molecular mass of the 54 kDa (Baruffi *et al.*, 1993; Cunha & Ferreira, 1986).

The neutrophil migration induced by MNCF in rats is unaffected by the number of resident peritoneal cells, or by pretreatment of the rats with dexamethasone (Souza *et al.*, 1988). The observation that glucocorticoids did not affect the neutrophil migration induced by MNCF distinguished this factor from other known neutrophil chemotactic mediators such as IL-1, TNF, IL-8, INF- γ , C5a and LTB₄ whose activity is inhibited by dexamethasone (Ribeiro *et al.*, 1991; Faccioli *et al.*, 1990).

SEA-stimulated mouse macrophage monolayers also released an MNCF-like mediator since the chemotactic activity of the supernatants was not affected by dexamethasone (Figure 5). The neutrophil migratory response was also unaffected by the number of resident peritoneal macrophages, since the neutrophil migration in

thioglycollate-treated mice, a treatment which increases the peritoneal macrophage population, was similar to that in non pre-treated mice (10 ± 1.8 vs 13 ± 1.5 neutrophils per cavity $\times 10^5$). These results also indicate that cytokines such as IL-1, TNF- α , INF- γ are not responsible for the neutrophil chemotactic activity of MNCC-SEA. IL-8, another potent leukocyte chemoattractant cytokine, is the major neutrophil chemotaxin produced by human alveolar macrophages stimulated with SEA (Miller *et al.*, 1996 a,b). However, this cytokine may be an exception since its chemotactic activity is dependent on mast cells (Ribeiro *et al.*, 1991).

In laboratory animals, SE elicits several effects similar to those for LPS (Bergdoll & Chesney, 1991). Our demonstration that mouse peritoneal macrophages also released a MNCF-like protein after incubation with SEA *in vitro* indicates another biological activity shared by SEA.

Evidence against the similarity between the neutrophil chemotactic component present in supernatants from SEA-stimulated macrophages and MNCF comes from the molecular weight of these substances. MNCC-SEA has a molecular weight greater than 100,000 (Figure 4) whereas the molecular weight of the MNCF is 54,000 (Cunha & Ferreira, 1986).

LPS-stimulated murine macrophages (RAW 264.7 cells) also release two proteins termed macrophage inflammatory proteins 1 (MIP-1) and 2 (MIP-2) (Wolpe *et al.*, 1988,1989). These proteins are potent chemoattractants for polymorphonuclear leukocytes (Widmer *et al.*, 1993). However, the molecular weight for MNCC-SEA obtained here ($>100,000$) excludes the possibility that MIP-1 or MIP-2 (MW 6,000-8,000) is responsible for the chemotactic activity described above.

Glucocorticoids can inhibit the release of many biologically active substances, including neutrophil chemotactic mediators such as metabolites of arachidonic acid or cytokines (Klein *et al.*, 1995; Fantuzzi & Ghezzi, 1993). Pre-

treating the macrophage monolayers with dexamethasone (5 $\mu\text{g/ml}$) reduced the release of MNCC-SEA by 71%. This results may reflect the fact that the effectiveness of this drug on SEA- mediated neutrophil recruitment (Desouza & Ribeiro-DaSilva, 1998) is not through a direct action on the migratory cells but indirectly by inhibiting the release of an endogenous chemotactic mediator such as MNCC-SEA.

Since neither indomethacin, a specific cyclooxygenase inhibitor, nor BW755C, a dual inhibitor of arachidonic acid metabolism, had any effect on the release of MNCC-SEA *in vitro*, arachidonic acid metabolites are unlikely be responsible for the neutrophil chemotactic activity of the protein described here (data not shown). MNCC-SEA has an apparent molecular weight greater than that of chemotactic substances derived from cell phospholipids such as PAF and lipoygenase or cyclooxygenase products (Figure 4).

Human and mouse macrophages are able to produce the C5a precursor (Whaley & Ferguson, 1981). The neutrophil migration induced by C5a in rats is inhibited by dexamethasone (Ribeiro *et al.*, 1997; Faccioli *et al.*, 1990) and occurs by a mechanism independent of resident cells. Thus, the possibility that C5a could be responsible for the activity of the MNCC-SEA can be discarded because the MNCC-SEA induced neutrophil migration in dexamethasone pre-treated animals, its migratory response was independent of resident cells, and the molecular weight of the MNCC-SEA was greater than the C5a component (Figure 4). In support for this conclusion, MNCC-SEA activity was unaffected by incubation for 30 min at 56°C (Figure 3A), a procedure which inactivates the C5a component. Moreover, the MNCC-SEA did not release histamine when incubated with mouse peritoneal mast cells (Krebs Ringer phosphate buffer histamine release: $1.53 \pm 0.76\%$; 48/80 compound histamine release: $68 \pm 8.0\%$; MNCC-SEA histamine release: $1.5 \pm$

0.86%), a characteristic property of the anaphylatoxins C3a and C5a (Cunha & Ferreira, 1986; Sauder *et al.*, 1984).

The SEA-induced neutrophil influx into the mouse peritoneal cavity was blocked by pretreating the mice with BN52021, cimetidine, BWA4C, or BW755C but not by indomethacin. Therefore, PAF, the histamine H₂ receptor and lipoxygenase products seem to be involved in the neutrophil recruitment induced by this toxin in mice (Desouza & Ribeiro-DaSilva, 1998). This broad spectrum of drugs which can inhibit the SEA-induced neutrophil migratory response had no effect on the MNCC-SEA-induced neutrophil migration (Figure 5). This finding reinforces our suggestion that the MNCC-SEA may be one of the main chemotactic mediators responsible for SEA-induced neutrophil migration *in vivo*.

We recently suggested that SP may be involved in the paw edema and neutrophil recruitment induced by SEA or SEB in mice. This conclusion was based on the observation that capsaicin, a pharmacological tool widely utilized to deplete sensory neurones of their peptide content, reduced the inflammatory response induced by these toxins in mice (Desouza & Ribeiro-DaSilva, 1996, 1997; 1998; Desouza *et al.*, 1996).

SP, released by afferent nerve terminals, is the main neuropeptide involved in the neurogenic inflammation (Partsch & Matucci-Cerinic, 1992; Foreman, 1987) and may be involved in the pathophysiological events of SE (Scheuber *et al.*, 1987). Neurogenic inflammation, which can be induced by electrical or chemical stimulation of sensory neurones, involves a number of inflammatory events such as local vasodilatation, oedema formation and leukocyte accumulation. All of these components of the inflammatory response can also be elicited by the administration of SP (Walsh *et al.*, 1995; Yano *et al.*, 1989). Moreover, a number of mast cell-derived mediators have been implicated in the inflammatory responses elicited by SP, including histamine and LTB₄, which could mediate part of the leukocyte

infiltration in mouse skin (Foreman, 1987; Iwamoto *et al.*, 1993). The inflammatory properties of SP appear to be mediated primarily via its interaction with the NK₁ receptor (Guard & Watson, 1991), a member of the G-protein-coupled receptor superfamily (Takeda *et al.*, 1991).

There was a significant reduction (73%) in the neutrophil migration induced by MNCC-SEA in mice pre-treated with capsaicin (Figure 5). A similar response was observed in mice pre-treated with the specific NK₁ receptor antagonist SR140333, but not with the NK₂ receptor antagonist SR48968. These observations further support to our hypothesis about the involvement of SP in the SEA-mediated phlogistic reaction in mice (Desouza & Ribeiro-DaSilva, 1996, 1997, 1998; Desouza *et al.*, 1996) and suggest that the MNCC-SEA-induced neutrophil migration *in vivo* involves neurotachykinins such as SP.

SP may be released by IL-1 and thus contribute to the neutrophil recruitment elicited by cytokines *in vivo*. Although the mechanism by which IL-1 can release this tachykinin remains unclear, there is evidence that this phenomenon is not affected by the NK₁ receptor antagonist SR140333, indicating that the neutrophil accumulation induced by this cytokine is not mediated by NK₁ receptors (Perretti *et al.*, 1993; Pinter *et al.*, 1998), in contrast to that observed with MNCC-SEA (Figure 5).

5. Conclusion

Our results confirm that macrophages play a key role in the neutrophil recruitment induced by SEA. This function is mediated by the release of a neutrophil chemotactic protein (MNCC-SEA) that is different from the currently known chemotactic mediators such as IL-1, TNF- α , INF- γ , IL-8, MNCF, LTB₄, PAF, the complement component C5a and MIP-1 or MIP-2. MNCC-SEA may induce neutrophil migration by stimulating sensory neurons to release neuropeptides such as SP.

Acknowledgements

Ivani A. Desouza is the recipient of a FAPESP fellowship (No 94/0210-2).

This work is part of a thesis to be submitted by Ivani A. Desouza to the Institute of Biology, State University of Campinas, in partial fulfillment of the requirements for a PhD degree.

Animal experimentation guidelines were followed in all experiments.

Grant support: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (No. 95/0390-3) and Fundo de Apoio ao Ensino e à Pesquisa da UNICAMP (No. 0263/95).

The authors thank Dr. Edson Antunes for kindly providing some of the drugs used, Dr. Stephen Hyslop for editorial help and to Prof. Dr. Aquiles E. Pietrabuena for statistical advice.

6. References

- ALBER, G., SCHEUBER, H.P., RECK, B., SAILER-KRAMER, B., HARTMANN, A. & HAMMER, D.K. (1989). Role of substance P immediate-type skin reactions induced by staphylococcal enterotoxin B in unsensitized monkeys. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **84**, 880-885.
- BARJA-FIDALGO, C., CARLINI, C.R., GUIMARÃES, J.A., FLORES, C.A., CUNHA, F.Q. & FERREIRA, S.H. (1992). Role of resident macrophages in canatoxin-induced *in vivo* neutrophil migration. *Inflammation.*, **16**, 1-11.
- BARUFFI, M.D., CUNHA, F.Q. & FERREIRA, S.H. (1993). Macrophage-released neutrophil chemotactic factor (MNCF) induces PMN-neutrophil migration through lectin-like activity. *Agents Actions.*, **38**, C54-C56.
- BERGDOLL, M.S. & CHESNEY, P.J. (1991). Toxic shock syndrome. In: *Toxic shock syndrome*. eds. Bergdoll, M.S. & Chesney, P.J. pp. 51-73, CRC Press: Boston.
- BOBAK, D.A. & GUERRANT, R.L. (1992). New developments in enteric bacterial toxins. *Adv. Pharmacol.*, **23**, 85-101.
- BOYSE, E.A., OLD, L.J. & CHOUROULINKOV, I. (1964). Cytotoxic test for demonstration of mouse antibody. *Methods Med. Res.*, **10**, 39-47.
- CALDERON, J., WILLIAMS, R.T. & UNANUE, E.R. (1974). An inhibitor of cell proliferation released by cultures of macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **71**, 4273-4277.

- COLDILTZ, I.G., ZWAHLEN, R., DEWALD, B. & BAGGIOLINI, M. (1989). *In vivo* inflammatory activity of neutrophil-activating factor, a novel chemotactic peptide derived from human monocytes. *Am. J. Pathol.*, **134**, 755-762.
- CUNHA, F.Q. & FERREIRA, S.H. (1986). The release of a neutrophil chemotactic factor from peritoneal macrophages by endotoxin: inhibition by glucocorticoids. *Eur. J. Pharmacol.*, **129**, 65-76.
- DESOUZA, I.A., BERGDOLL, M.S. & RIBEIRO-DASILVA, G. (1996). Pharmacological characterization of the mouse paw edema induced by staphylococcal enterotoxin B. *J. Nat. Toxins.*, **5**, 61-71.
- DESOUZA, I.A. & RIBEIRO-DASILVA, G. (1996). Resident macrophages modulate the neutrophil migration induced by staphylococcal enterotoxin B into mouse peritoneal cavity. *J. Nat. Toxins.*, **5**, 341-350.
- DESOUZA, I.A. & RIBEIRO-DASILVA, G. (1997). The pharmacological profile of mouse hind paw inflammation induced by staphylococcal enterotoxin type A. *Inflamm. Res.*, **46**, 361-365.
- DESOUZA, I.A. & RIBEIRO-DASILVA, G. (1998). Neutrophil migration induced by staphylococcal enterotoxin type A in mice: a pharmacological analysis. *Eur. J. Pharmacol.*, **363**, 189-195.
- DINARELLO, C.A. (1991). The proinflammatory cytokines interleukin-1 and tumour necrosis factor and treatment of septic shock syndrome. *J. Infect. Dis.*, **163**, 1177-1184.

- FACCIOLI, L.H., SOUZA, G.E.P., CUNHA, F.Q., POOLE, S. & FERREIRA, S.H. (1990). Recombinant interleukin 1 and tumor necrosis factor induce neutrophil migration *in vivo* by indirect mechanisms. *Agents Actions.*, **30**, 344-349.
- FANTUZZI, G. & CHEZZI, P. (1993). Glucocorticoids as cytokine inhibitors: role in neuroendocrine control and therapy of inflammatory disease. *Med. Inflam.*, **2**, 263-266.
- FERNANDEZ, H.N., HENSON, P.M., OTANI, A. & HUGLI, T.E. (1978). Chemotactic response to human C3a and C5a anaphylatoxins. *J. Immunol.*, **120**, 109-112.
- FERREIRA, S.H. (1980). Are macrophages the body's alarm cells? *Agents Actions.*, **10**, 229-230.
- FERREIRA, S.H. (1993). The role of interleukins and nitric oxide in the mediation of inflammatory pain and its control by peripheral analgesics. *Drugs.*, **46**, 1-9.
- FLEMING, S.D., LANDOLO, J.J. & CHAPES, S.K. (1991). Murine macrophage activation by staphylococcal exotoxins. *Infect. Immun.*, **59**, 4049-4055.
- FOREMAN, C.J. (1987). Peptides and neurogenic inflammation. *Br. Med. Bull.* **43**, 386-400.
- GUARD, S. & WATSON, S.P. (1991). Tachykinin receptor types: classification and membrane signalling mechanism. *Neurochem. Int.*, **18**, 149-165.

- ARMSEN, A.G. & HAVEL, E.A. (1990). Role of tumor necrosis factor and macrophages in lipopolysaccharide-induced accumulation of neutrophils in cutaneous air pouches. *Infect. Immun.*, **58**, 297-301.
- ASKÓ, G., VIRÁG, L., EGNACZYK, G., SALZMAN, A.L. & SZABÓ, C. (1998). The crucial role of IL-10 in the suppression of the immunological response in mice exposed to staphylococcal enterotoxin B. *Eur. J. Immunol.*, **28**, 1417-1425.
- ENRIQUES, M.G.M.O., SILVA, P.M.R., MARTINS, M.A., FLORES, C.A., CUNHA, F.Q., ASSREUY-FILHO, J. & CORDEIRO, R.S.B. (1987). Mouse paw edema. A new model for inflammation? *Braz. J. Med. Biol. Res.*, **20**, 243-249.
- ILL, H.R., ESTENSEN, R.D., HOGAN, N.A. & QUIE, P.G. (1976). Severe staphylococcal disease associated with allergic manifestations, hyperimmunoglobulinemia E, and defective neutrophil chemotaxis. *J. Lab. Clin. Med.*, **88**, 796-806.
- ANDOLO, J.J. (1989). Genetic analysis of extracellular toxins of *Staphylococcus aureus*. *Annu. Rev. Microbiol.*, **43**: 375-402.
- IOUE, H., ASAKA, T., NAGATA, N. & KOSHIHARA, Y. (1997). Mechanism of mustard oil-induced skin inflammation in mice. *Eur. J. Pharmacol.*, **333**, 231-240.

- KLEIN, A., CUNHA, F.Q. & FERREIRA, S.H. (1995). The role of lymphocytes in the neutrophil migration induced by ovalbumin in immunized rats. *Immunology.*, **84**, 577-584.
- KLUGER, M.J. (1991). Fever, role of pyrogens and cryogens. *Physiol. Rev.*, **71**, 93-127.
- MARRACK, P. & KAPPLER, J. (1990). The staphylococcal enterotoxins and their relatives. *Science.*, **248**, 705-711.
- MELO FILHO, A.A., SOUZA, M.H.L.P., LYERLY, D.M., CUNHA, F.Q., LIMA, A.A.M. & RIBEIRO, R.A. (1997). Role of tumor necrosis factor and nitric oxide in the cytotoxic effects of *Clostridium difficile* toxin A and toxin B on macrophages. *Toxicon.*, **35**, 743-752.
- MERRIL, W.W., NAEGEL, G.P., MATTHAY, R.A. & REYNOLDS, H.Y. (1980). Alveolar macrophage-derived chemotactic factor kinetics of *in vitro* production and partial characterization. *J. Clin. Invest.*, **65**, 268-276.
- MICUSAN, V.V. & THIBODEAU, J. (1993). Superantigens of microbial origin. *Semin. Immunol.*, **5**, 3-11.
- MILLER, E.J., NAGAO, S., CARR, F.K., NOBLE, J.M. & COHEN, A.B. (1996a). Interleukin-8 is a major neutrophil chemotaxin from human alveolar macrophages stimulated with staphylococcal enterotoxin A (SEA). *Inflamm. Res.*, **45**, 386-392.

- MILLER, E.J., COHEN, S. & PETERSON, B.T. (1996b). Peptide inhibitor of interleukin-8 (IL-8) reduces staphylococcal enterotoxin-A (SEA) induced neutrophil trafficking to the lung. *Inflamm. Res.*, **45**, 393-397.
- MISFELDT, M.L., LEGAARD, P.K., HOWELL, S.E., FORNELLA, M. & LEGRAND, R.D. (1990). Induction of interleukin-1 from murine peritoneal macrophages by *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A. *Infect. Immun.*, **58**, 978-998.
- MUNSON, S.H., TREMAINE, M.T., BETLEY, M.J. & WELCH, R.A. (1998). Identification and characterization of staphylococcal enterotoxin types G and I from *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.*, **66**, 3337-3348.
- PARTSCH, G. & MATUCCI-CERINIC, M. (1992). Effect of substance P and somatostatin on migration of polymorphonuclear (PMN) cells *in vitro*. *Inflammation.*, **16**, 539-547.
- PERRETTI, M., AHLUWALIA, A., FLOWER, R.J. & MANZINI, S. (1993). Endogenous tachykinins play a role in IL-1 accumulation: involvement of NK₁ receptors. *Immunology.*, **80**, 73-77.
- PINTER, E., BROWN, B., HOULT, J.R. & BRAIN, S.D. (1998). Lack of evidence for tachykinin NK₁ receptor-mediated neutrophil accumulation in the rat cutaneous microvasculature by thermal injury. *Eur. J. Pharmacol.*, **369**, 91-98.

- RANDALL, R.W., EAKINS, K.W., HIGGS, G.A., SALMON, J.A. & TATESON, J.E. (1980). Inhibition of arachidonic acid cyclooxygenase and lipoxygenase of leukocytes by indomethacin and compound BW755 C. *Agents Actions.*, **10**, 553-555.
- RANKIN, J.A., SYLVESTER, I., SMITH, S., YOSHIMURA, T. & LEONARD, E.J. (1990). Macrophages cultured *in vitro* release leukotriene B₄ and neutrophil attractant activation protein (interleukin-8) sequentially in response to stimulation with lipopolysaccharide and zymosan. *J. Clin. Invest.*, **80**, 1554-1564.
- RIBEIRO, R.A., CUNHA, F.Q. & FERREIRA, S.H. (1990). Recombinant gamma interferon causes neutrophil migration mediated by the release of a macrophage neutrophil chemotactic factor. *Int. J. Exp. Pathol.*, **71**, 717-725.
- RIBEIRO, R.A., FLORES, C.A., CUNHA, F.Q. & FERREIRA, S.H. (1991). IL-8 causes *in vivo* neutrophil migration by a cell-dependent mechanism. *Immunology.*, **73**, 472-477.
- RIBEIRO, R.A., SOUZA-FILHO, M.V.P., SOUZA, M.H.L., OLIVEIRA, S.H.P., COSTA, C.H.S., CUNHA, F.Q. & FERREIRA, S.H. (1997). Role of resident mast cells and macrophages in the neutrophil migration induced by LTB₄, fMLP and C5a des arg. *Int. Arch. Immunol.*, **112**, 27-35.
- ROSENBAUM, J.T., HARTIALA, K.T., WEBSTER, R.O., HOWES, E.L. & GOLDSTEIN, I.M. (1983). Antiinflammatory effects of endotoxin. *Am. J. Pathol.*, **113**, 291-299.

- SAMUELSSON, B. (1983). Leukotrienes: mediators of immediate hypersensitivity reaction and inflammation. *Science*, **229**, 568-574.
- SAUDER, D.N., MOUNESSA, N.L., KATZ, S.I., DINARELLO, C.A. & GALLIN, J.I. (1984). Chemotactic cytokines: the role of leukocytic pyrogen and epidermal cell thymocyte-activating factor in neutrophil chemotaxis. *J. Immunol.*, **132**, 828-833
- SCHEUBER, P.H., DENZLINGER, C., WILKER, D., BECK, G., KEPPLER, D. & HAMMER, D.K. (1987). Staphylococcal enterotoxin B as a non-immunological mast cell stimulus in primates: the role of endogenous cysteinyl leukotrienes. *Int. Arch. Allerg. Immunol.*, **82**, 289-291.
- SCHEUBER, P.H., GOLECKI, R.J., KICKHOFEN, B., SCHEEL, D., BECK, G. & HAMMER, D.K. (1985). Skin reactivity of unsensitized monkeys upon challenge with staphylococcal enterotoxin B: a new approach for investigating the site of toxin action. *Infect. Immun.*, **50**, 869-876.
- SOUZA, G.E.P., CUNHA, F.Q., MELLO, R. & FERREIRA, S.H. (1988). Neutrophil migration induced by inflammatory stimuli is reduced by macrophage depletion. *Agents Actions*, **24**, 377-380.
- TAKEDA, Y., CHOU, K.B., TAKEDA, J., SACHAIS, B.S. & KRAUSE, J.E. (1991). Molecular cloning, structural characterization and functional expression of the human substance P receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **179**, 1232-1240.

- TATESON, J.E., RANDALL, R.W., REYNOLDS, C.H., JACKSON, W.P., BHATTACHERJEE, P., SOLMON, J.A. & GARLAND, L.G. (1988). Selective inhibition of arachidonate 5-lipoxygenase by novel acetohydroxamic acids: biochemical assessment *in vitro* and *ex vivo*. *Br. J. Pharmacol.*, **94**, 528-538.
- WALSH, D.T., WEG, V.B., WILLIAMS, T.J. & NOURSHARGH, S. (1995). Substance P-induced inflammatory responses in guinea-pig skin: the effect of specific NK₁ receptor antagonists and the role of endogenous mediators. *Br. J. Pharmacol.*, **114**, 1343-1350.
- WHALEY, K. & FERGUNSON, A. (1981). Molecular aspects of complement activation. *Mol. Asp. Med.*, **4**, 209-214.
- WIDMER, U., MANAGUE, K.R., CERAMI, A. & SHERRY, B. (1993). Genomic cloning and promoter analysis of macrophage inflammatory protein (MIP)-2, MIP-1 α , and MIP-1 β , members of the chemokine superfamily of proinflammatory cytokines. *J. Immunol.*, **150**, 4996-5012.
- WOLPE, S.D., DAVATELIS, G., SHERRY, B., BEUTLER, B., HESSE, D.G., NGUYEN, H.T., MOLDAWER, L.L., NATHAN, C., LOWRY, S.F. & CERAMI, A. (1988). Macrophages secrete a novel heparin-binding protein with inflammatory and neutrophil chemokinetic properties. *J. Exp. Med.*, **167**, 570-581.

- WOLPE, S.D., SHERRY, B., JUERS, D., DAVATELIS, G., YURT, R.W. & CERAMI, A. (1989). Identification and characterization of macrophage inflammatory protein-2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 612-620.
- ZEHAVI-WILLNER, T., SHENBERG, E. & BARNES, A. (1984). *In vivo* effect of staphylococcal enterotoxin A on peripheral blood lymphocytes. *Infect. Immun.*, **44**, 401-405.
- YANCEY, K.B. (1989). Biological properties of human C5a: selected *in vitro* and *in vivo* studies. *Clin. Exp. Immunol.*, **71**, 207-212.
- YANO, H., WERSHIL, B.K., ARIZONO, N. & GALLI, S.J. (1989). Substance P-induced augmentation of cutaneous vascular permeability and granulocyte infiltration in mice is mast cell dependent. *J. Clin. Invest.* **84**, 1276-1286.

Legends to Figures

Figure 1. The release of neutrophil chemotactic component by SEA-stimulated macrophages.

Panel A shows the neutrophil migration 12 h after the administration of supernatants obtained by incubating macrophage monolayers with RPMI (■) or SEA (■ ; 0.62-2.50 $\mu\text{g/ml}$) at 37°C for 30 min. Panels B and C show the influence on the pre-incubation and incubation times, respectively, on the release of the neutrophil chemotactic component by SEA (2.5 $\mu\text{g/ml}$)-stimulated macrophages. The macrophage viability after treatment with SEA was 93%. The data are the mean $\pm$ S.E.M. of five mice. * $p < 0.05$, compared with the control group (Student's unpaired t-test).

Figure 2. The effect of polymyxin B on the neutrophil chemotactic activity of the supernatants from SEA-stimulated macrophages.

Polymyxin B (PMX; 3 $\mu\text{g/cavity}$) was injected i.p. with supernatants from macrophages stimulated with SEA (SEA-SMØ) or lipopolysaccharide from *E. Coli* (LPS, 200-800 ng/cavity) and the neutrophil counts then determined 12 h later. The data are the mean $\pm$ S.E.M. for five mice. * $p < 0.05$, compared with the response in the absence of PMX (Kruskal-Wallis test).

Figure 3. Partial characterization of the neutrophil chemotactic component release by SEA-stimulated macrophages.

Panel A shows the neutrophil migration into the mouse peritoneal cavity induced by 0.2 ml of supernatant from SEA-stimulated macrophages incubated for 30 min at 37°, 56° or 100°C. Panel B shows the neutrophil chemotactic activity after incubation with trypsin (200 µg/ml) or chymotrypsin (100 µg/ml). Panel C shows the neutrophil migration induced by supernatants from macrophage monolayers pretreated with cycloheximide (9 µg/ml). The data represent the mean $\pm$ S.E.M. for five mice. The dotted line indicates the neutrophil migration induced by supernatants from RPMI-stimulated macrophages. * $p < 0.05$, compared with control (C) group (Student's unpaired t-test).

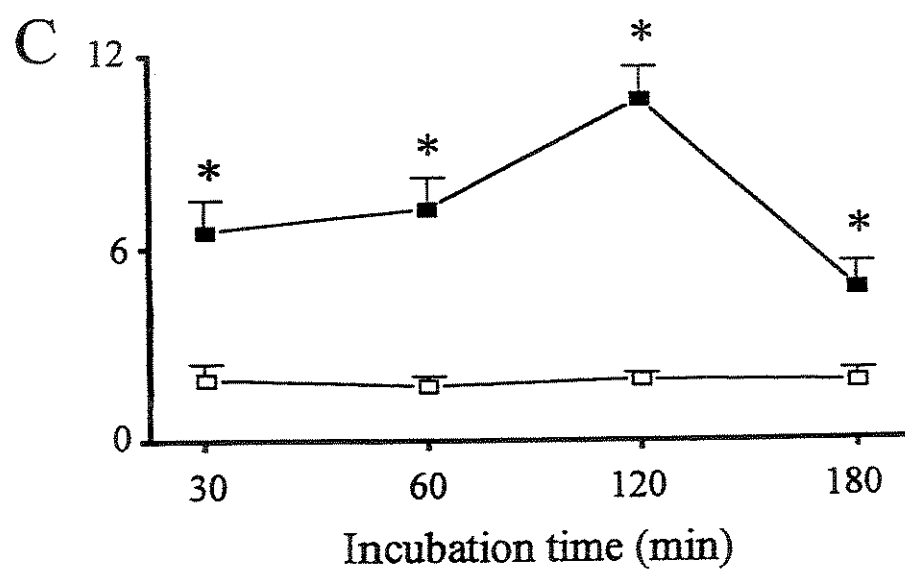
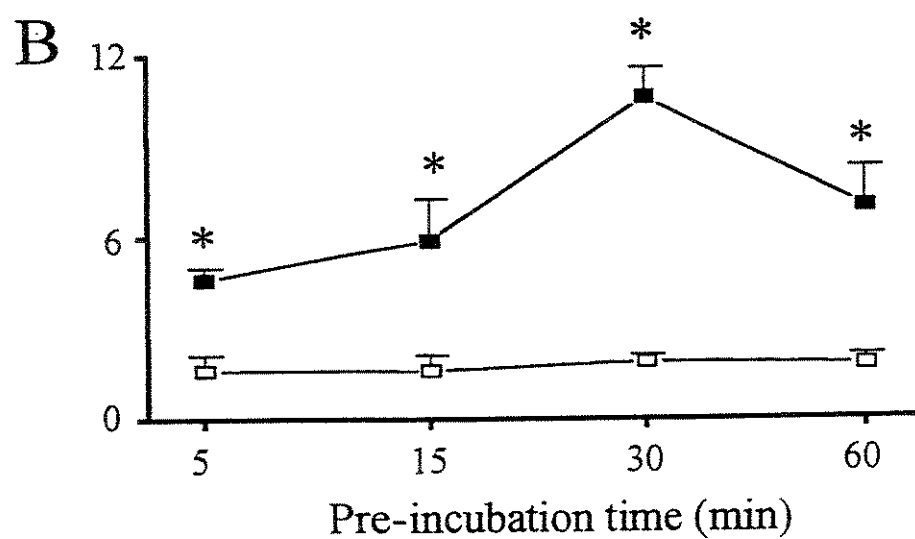
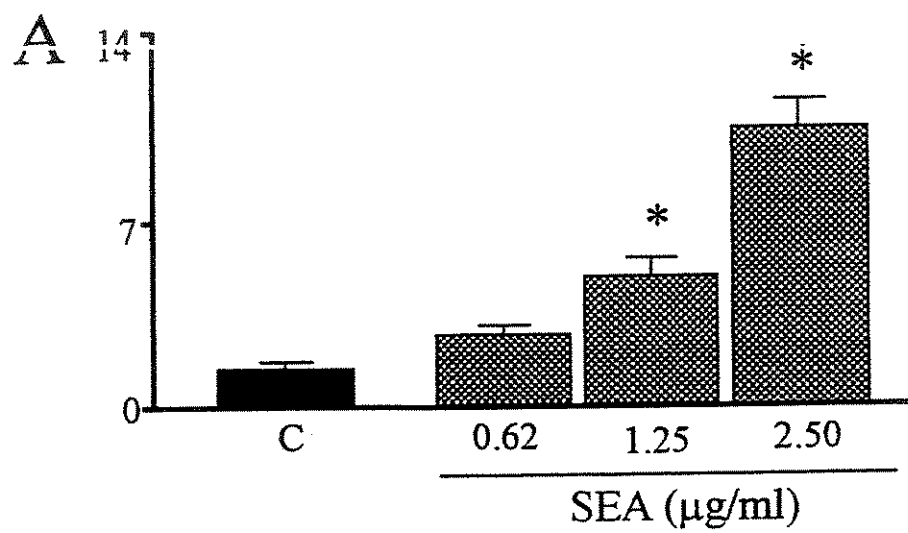
Figure 4. Neutrophil chemotactic activity of the retained material and filtrate of macrophage supernatants filtered through YM membranes.

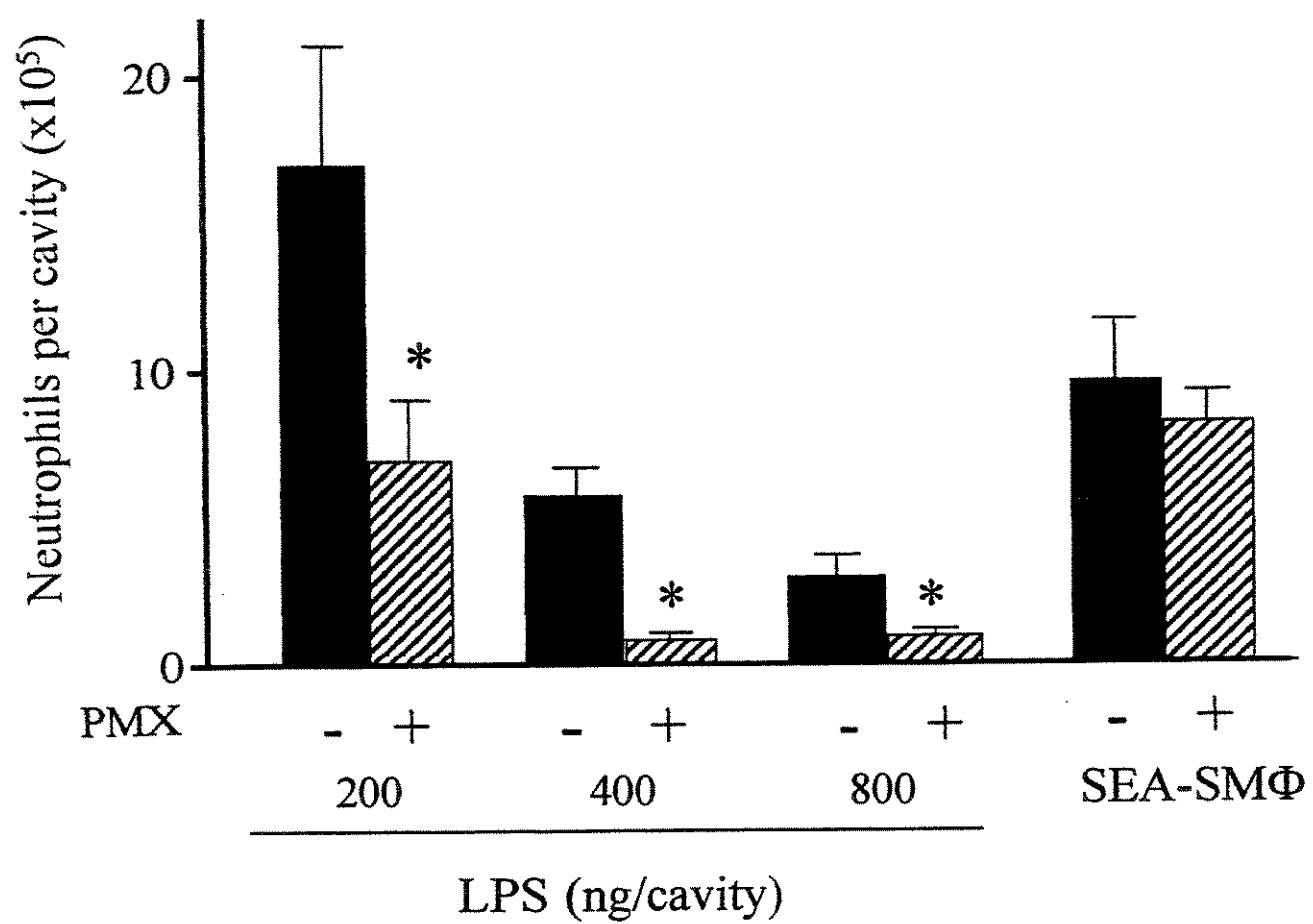
Supernatants from SEA-treated macrophage monolayers were filtered through Amicon YM-10, YM-30 or YM-100 membranes. The retained material was further washed with sterile phosphate-buffered saline and reconstituted to the original volume. The residue (R) and the ultrafiltrate (F) were assayed for their ability to induce neutrophil migration into the mouse peritoneal cavity. The data represent the mean $\pm$ S.E.M. for five mice. The dotted line indicates the neutrophil migration induced by supernatants from RPMI-stimulated macrophages. * $p < 0.05$, compared to the neutrophil migration induced by supernatant that was not filtered (C) (Student's unpaired t-test).

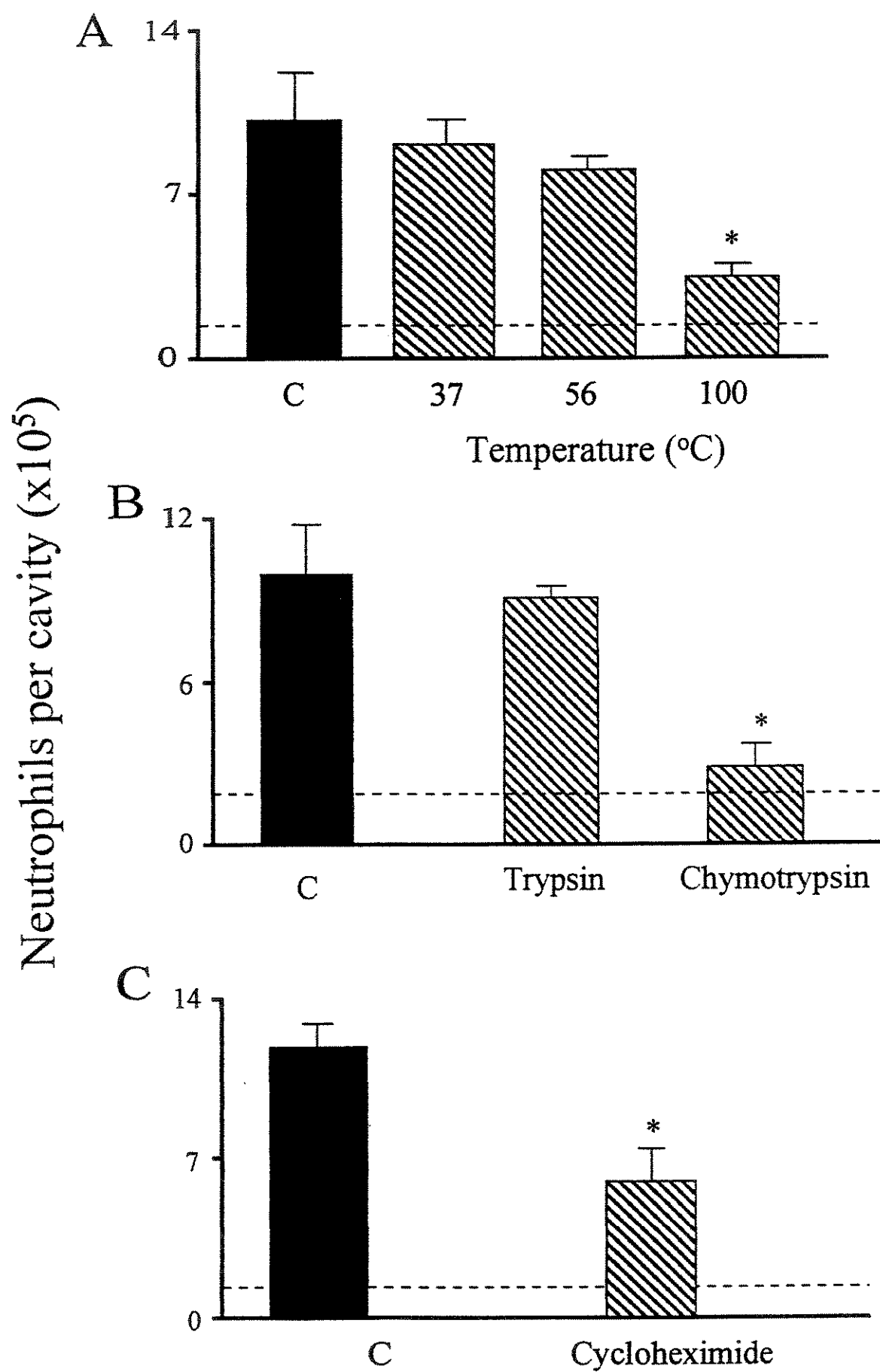
Figure 5. The effect of various drugs on the neutrophil migration induced by supernatants from SEA-stimulated macrophages.

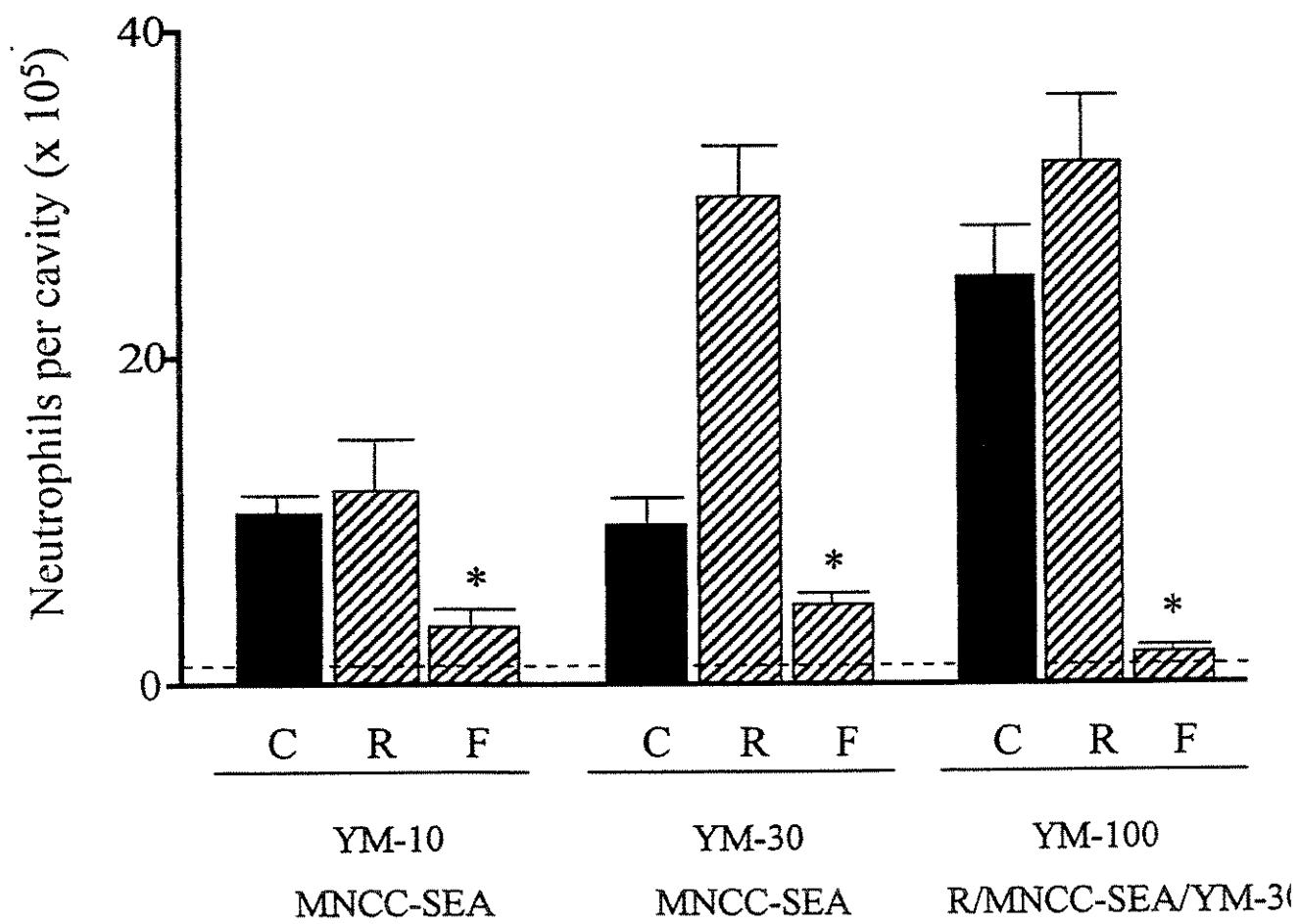
Capsaicin (CPS) was applied topically for 8 days. Dexamethasone (Dexa, 0.5 mg/kg), indomethacin (Indo, 5 mg/kg), BWA4C (5 mg/kg), BW755C (50 mg/kg), BN52021 (10 mg/kg) and cimetidine (CMT, 2 mg/kg) were given 1 h before the injection of the macrophage supernatants (MNCC-SEA) and the neutrophil migration was obtained 12 h later. The NK₁ receptor antagonist SR140333 (100 µg/kg) or the NK₂ receptor antagonist SR48968 (1 mg/kg) was given intravenously immediately before the injection of MNCC-SEA or substance P (20 nmol/cavity) and the neutrophil migration was determined 4 h after. The data represent the mean $\pm$ S.E.M. for five mice. The dotted line indicates the neutrophil migration induced by supernatants from RPMI-stimulated macrophages.* $p < 0.05$, compared with the group without pretreatment (C) (Kruskal-Wallis test).

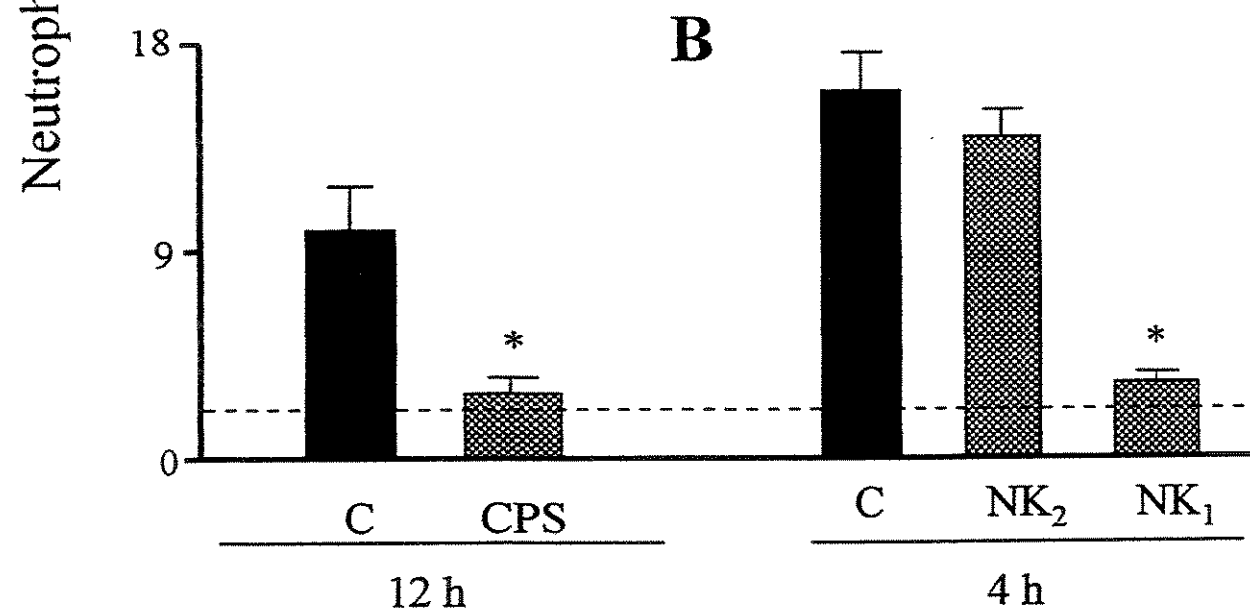
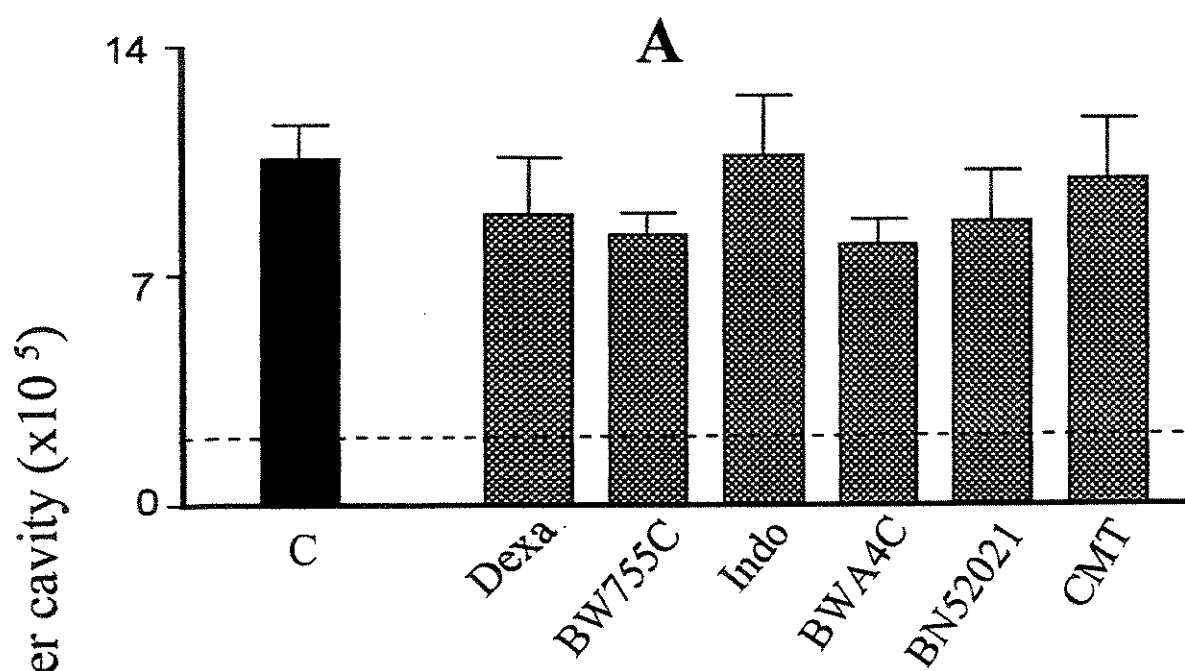
Neutrophils per cavity ($\times 10^5$)











British Journal of Pharmacology

EDITORIAL OFFICE
16 Angel Gate, 326 City Road
London EC1V 2SG

Telephone: 0171-417 0432
Fax: 0171-417 0430

Chairman of the Editorial Board
Professor D.A. Brown, FRS

Managing Editor
Dr. P.K. Moore

5 October 1999

Dr Ivani A Desouza
Department of Pharmacology
Faculty of Medical Sciences
State University of Campinas
Cidade Universitária "Zeferino Vaz"
PO Box 6111, CEP 13084-970
Campinas, SP
Brazil

Dear Dr Desouza

Thank you for having submitted a manuscript entitled "Evidence for the involvement of a macrophage-derived chemotactic factor in the neutrophil recruitment induced by staphylococcal enterotoxin B in mice" by I A Desouza and G Ribeiro-DaSilva for publication in the British Journal of Pharmacology.

Unfortunately, however, the declaration of copyright was incorrectly worded and so I have enclosed a form for you to complete. It is essential that each Author should sign to comply with the Journal's requirements. Please note that papers will not be published without this declaration. I would be grateful if you would return it to me as soon as possible.

In any further correspondence or enquiries, please use the above address and telephone number, referring to manuscript number **991195**.

Yours sincerely



Sue Barnes
Editorial Assistant

Enc.

Evidence for the involvement of a macrophage-derived chemotactic factor in the
neutrophil recruitment induced by staphylococcal enterotoxin B in mice

*¹ Ivani A. Desouza & ²G. Ribeiro-DaSilva

¹Department of Physiology and Biophysics, Institute of Biology, State University of
Campinas, UNICAMP, Campinas, SP, Brazil.

²Department of Pharmacology, Faculty of Medical Sciences, State University of
Campinas, UNICAMP, Campinas, SP, Brazil.

*Corresponding author: Ivani A. Desouza, Department of Pharmacology, Faculty of
Medical Sciences, State University of Campinas, Cidade Universitária “Zeferino Vaz”,
PO BOX 6111, CEP 13084-970, Campinas, SP Brazil; Tel.: +55-19-788-8173; Fax
+55-19-2892968; E-mail: ivanidesouza@uol.com.br

Abstract

1. Macrophage stimulated with staphylococcal enterotoxin type B (SEB) showed a dose- and time-dependent release of a neutrophil chemotactic component. This component was thermolabile protein with a molecular weight between 1,000-3,000 and was actively secreted by macrophages.
2. The release of this component was inhibited (30%) by dexamethasone but not by indomethacin or BW755C. Dexamethasone (0.5 mg/kg) also inhibited the neutrophil migration induced by this neutrophil chemotactic protein by 80%. A similar inhibition was observed in mice pretreated with BWA4C (10 mg/kg; 72%), BW755C (50 mg/kg; 79%), BN52021 (10 mg/kg; 75%), cimetidine (2 mg/kg; 61%), capsaicin (0.1% topically; 65%), neurokinin₁ receptor antagonist SR140333 (100 µg/kg; 71%), but not by indomethacin and the neurokinin₂ receptor antagonist SR48968. These results confirm that macrophages play a key role in the neutrophil recruitment induced by SEB.
3. The novel neutrophil chemotactic protein described here is different from the currently known chemotactic cytokines IL-1, TNF- α , INF- γ , MNCF and other chemotactic mediators such as leukotrienes, PAF and the fifth complement component. Our results suggest that this chemotactic component induces neutrophil migration by stimulating sensory neurons and, secondarily mast cells.

Key words: Staphylococcal enterotoxin type B; neutrophil migration; macrophages; neurogenic inflammation; peritoneal cavity; interleukins

1. Introduction

Staphylococcal enterotoxins (SE) belong to a family of exoproteins (25-30 kD) produced by several strains of *Staphylococcus aureus* (Bergdoll, 1989) which are classified into eight distinct immunological types (A-E and G-I). These toxins are the most common cause of acute food poisoning in humans (Iandolo, 1989; Munson *et al.*, 1998).

Although the mechanism of action of SE is still unknown (Freer & Arbuthnott, 1986; Bobak & Guerrant, 1992), experiments *in vivo* have been suggested that the enteropathogenic manifestations may involve the stimulation of sensory neurons in the gastrointestinal tract followed by the release of neuropeptides, including substance P (SP) (Micusan & Thibodeau, 1993), the main peptide mediator of neurogenic inflammation (Foreman, 1987; Partsch & Matucci-Cerinic, 1992). Based on the observation that capsaicin, a sensory C-fiber neuropeptide depletor, was able to reduce the paw edema and the neutrophil migration induced by staphylococcal enterotoxin type A (SEA) or type B (SEB) in mice, we recently hypothesized that the phlogistic reaction induced by these toxins in this experimental model is a manifestation of neurogenic inflammation with the possible involvement of SP (Desouza *et al.*, 1996; Desouza & Ribeiro-DaSilva, 1996, 1997, 1998). These data also demonstrated a strong similarity between SEB-induced inflammation in mice and experimental enterotoxemia in monkeys (Scheuber *et al.*, 1985; Alber *et al.*, 1989; Micusan & Thibodeau, 1993) and suggested that the murine model may be useful for investigating the pathophysiological mechanism of SE.

Bacterial toxins are able to stimulate the release of several inflammatory mediators from host cells (Misfeldt *et al.*, 1990; Fleming *et al.*, 1991; Mello Filho *et al.*, 1997). Macrophages are one of the main resident cell types that can be activated by

bacterial toxins to release prostaglandins, leukotriene B₄ (LTB₄), interleukin-1 (IL-1), interleukin-8 (IL-8), tumour necrosis factor- α (TNF- α) and nitric oxide (NO). These mediators trigger inflammatory events such as leukocyte emigration, vascular permeability, fever and pain (Ferreira, 1993; Dinarello, 1991; Kluger, 1991). Cells such as mast cells, macrophages and lymphocytes may also play a role in the pathophysiological responses to SE (Scheuber *et al.*, 1987; Micusan & Thibodeau, 1993) by releasing inflammatory mediators such as histamine, serotonin, leukotrienes and cytokines (IL-1, 2, 6, and 8, TNF- α , and interferon- γ) (Scheuber *et al.*, 1987, Marrack & Kappler, 1990; Haskó *et al.*, 1998).

Neutrophils are the major cell type involved in the host's defense against *Staphylococcus aureus* (Hill *et al.*, 1976), and the accumulation of neutrophils is a prominent feature of SE-induced gastroenteritis (Zehavi-Willner *et al.*, 1984). The emigration of neutrophils from circulating blood to the site of injury is a crucial event during the inflammatory process. This complex phenomenon is mediated by various substances including the complement component C5a (Fernandez *et al.*, 1978; Klein *et al.*, 1995), LTB₄ (Samuelson, 1983), IL-1, IL-8, TNF- α and interferon- γ (IFN- γ) (Faccioli *et al.*, 1990; Rankin *et al.*, 1990; Ribeiro *et al.*, 1990, 1991; Colditz *et al.*, 1989) and a macrophage-derived neutrophil chemotactic factor (MNCF) (Cunha & Ferreira, 1986).

In acute inflammation, resident macrophages act as "alarm cells" and play an important role in the initiation of neutrophil migration to the inflamed site (Merril *et al.*, 1980; Ferreira *et al.*, 1980). Neutrophil recruitment *in vivo* is controlled mainly by resident macrophages (Klein *et al.*, 1995; Harmsen & Havel, 1990). Thus, neutrophil migration into the peritoneal cavity in response to exogenous stimuli such as carrageenin, lipopolysaccharide from *Escherichia coli* (LPS), *Clostridium difficile* toxin A and zymosan (Klein *et al.*, 1995; Ribeiro *et al.*, 1997) is enhanced when the number of macrophages is increased by pretreatment with thioglycollate and diminished after

depletion of the peritoneal macrophage population by lavage of the cavity (Souza *et al.*, 1988).

Recently, we suggested that SEA and SEB induce neutrophil migration into the mouse peritoneal cavity via a mechanism that involves lipoxygenase metabolites and resident macrophages (Desouza *et al.*, 1996; Desouza & Ribeiro-DaSilva, 1998). The biological effects of SE and bacterial endotoxins (lipopolysaccharide) are similar in several aspects (Bergdoll & Chesney, 1991). Since the neutrophil migration induced by endotoxin in rats is dependent on a neutrophil chemotactic factor produced by macrophages (Cunha & Ferreira, 1986), we have investigated the role of macrophage products in neutrophil migration during peritonitis induced by SEB in mice.

2. Materials and Methods

2.1. Animals experimentation guidelines

These studies were approved by the Animals Committee of the Brazilian College of Animal Experimentation in accordance with the procedures laid down by the Universities Federation for Animal Welfare. Male Swiss mice (25-30 g) from the University's Central Animal Services unit were housed in temperature-controlled rooms and received water and food *ad libitum* until used.

2.2. Working conditions

All the procedures described below were carried out under aseptic conditions in a laminar flow cabinet. The material used was autoclaved at 127°C for 1 h and all solutions were prepared with autoclaved, deionized water.

2.3. Staphylococcal enterotoxin type B

The toxin was dissolved in sterile phosphate-buffered saline and stored at 20°C at a concentration of 1 mg/ml.

2.4. *In vitro* release of neutrophil chemotactic component by SEB-stimulated macrophages

Mouse peritoneal macrophages were harvested with sterile RPMI1640 medium (pH 7.4) four days after an intraperitoneal injection of sterile thioglycollate solution (3% w/v, 2 ml/cavity) and allowed to adhere to plastic tissue culture dishes for 1 h at 37°C in an atmosphere of air containing 5% CO₂ as previously described (Cunha & Ferreira, 1986). Nonadherent cells were removed by washing the dishes three times with sterile phosphate-buffered saline. The adherent population (95% macrophages) was incubated for 5, 15, 30 or 60 minutes with RPMI (control; n=5) or with SEB (1.25-5.0 µg/ml;

n=5). Subsequently, the supernatants were discarded and the cells washed another three times with sterile phosphate-buffered saline. This washing was followed by a final incubation with 4 ml of RPMI medium without SEB for 30, 60, 120 or 180 minutes at 37°C in an atmosphere of air containing 5% CO₂. The method described by Boyse *et al.* (1964) was used for determining the viability of macrophages after SEB treatment. To determine the ideal conditions for the release of chemotactic factor by macrophages, experiments were done using sterile Krebs-Ringer buffer instead of RPMI medium. The supernatants obtained from macrophages stimulated with SEB at different pH values (6-8) or temperatures (4-45°C) or with Krebs-Ringer buffer solution without calcium, magnesium or glucose. To test for the possible release of a chemotactic component, the cell-free incubation fluids were sterilized (Millipore filters, 0.22 µm) and assayed by injecting aliquots (0.2 ml) into the peritoneal cavity of naive mice.

2.5. Neutrophil migration assay

The chemotactic activity of each sample of supernatants from SEB-stimulated macrophage monolayers was assayed by intraperitoneal (i.p.) injection (0.2 ml/cavity) in naive mice. Control animals received 0.2 ml of the supernatant from RPMI-stimulated macrophage monolayers. After 12h, the peritoneal cavity cells were harvested by lavage of the cavities with 3 ml of a phosphate-buffered saline-heparin (5 IU/ml)-bovine serum albumin (0.1%, w/v) solution. Total and differential cell counts were determined as described elsewhere (Souza *et al.*, 1988). The results were reported as the number of cells per cavity.

2.6. Contamination with bacterial endotoxin

To check for possible contamination of the supernatants of SEB-stimulated macrophages with bacterial endotoxin, samples of the supernatants or *Escherichia coli* lipopolysaccharide (LPS; 200-800 ng) were incubated for 10 min with polymyxin B (3.5 µg/ml) and tested for their ability to induce neutrophil migration.

2.7. Partial characterization of the neutrophil chemotactic component release SEB-stimulated macrophages

The neutrophil chemotactic component released by SEB-stimulated macrophages was partially characterized by the following experiments: a) The neutrophil migration induced by SEB-stimulated macrophage supernatants, was examined in mice after heating the supernatants for 30 minutes at 37°, 56° and 100°C (Cunha & Ferreira, 1986; Klein *et al.*, 1995), b) The supernatants were incubated for 60 minutes with trypsin (200 µg/ml) or chymotrypsin (100 µg/ml) (Calderon *et al.*, 1974) prior to testing for neutrophil migration and c) The SEB -stimulated macrophage monolayers were treated with cycloheximide (9 µg/ml) prior to testing for the release of the chemotactic component. In this case, cycloheximide was added to the incubation medium 30 minutes before the SEB challenge and was maintained throughout the experiment (Cunha & Ferreira, 1986). For the controls, cycloheximide (9 µg/ml), trypsin (200 µg/ml) and chymotrypsin (100 µg/ml) were added separately to supernatants from macrophage monolayers stimulated only with SEB.

2.8. Ultrafiltration of the supernatants from SEB-stimulated macrophages

The supernatants of SEB-treated macrophage monolayers were filtered through Amicon YM 10, YM 3 and YM 1 membranes. The retained material was washed with sterile phosphate-buffered saline and reconstituted to the original volume. All solutions were assayed for neutrophil chemotactic activity in naive mice.

2.9. Pharmacological investigation with different drugs

The effectiveness of the dose and time schedules used in these experiments was confirmed using LPS as a positive control. Capsaisin (trans-8-methyl-N-vanilyl-6-nonamide) was applied topically as a 1% solution (as described by Alber *et al.*, 1989).

The neurokinin₁ receptor antagonist SR140333 ((S)-1-{2-[3-(3,4-dichlorophenyl)-1-(3-isopropoxyphenylacetyl)piperidin-3-yl]ethyl}-4-phenyl-1-azoniabicyclo[2.2.2.]octane, chloride, 100 µg/kg; Ionue *et al.*, 1997) and the neurokinin₂ receptor antagonist SR48968 ((S)-N-methyl-N[4-(4-acetylamino-4-phenylpiperidino)-2-(3,4,-dichlorophenyl)butyl]benzamide, 1 mg/kg; Ionue *et al.*, 1997) were administered intravenously immediately before ip injection of the supernatants from macrophages stimulated with SEB (0.2 ml/cavity) or LPS (200 ng/cavity).

All the others drugs were administered subcutaneously (sc) 1 h before the ip injection of the supernatants from macrophages stimulated with SEB (0.2 ml/cavity) or LPS. The following drugs were also used: dexamethasone (0.5 mg/kg; Barja Fidalgo *et al.*, 1992), indomethacin (5 mg/kg; Henriques *et al.*, 1987), BWA4C (N-(3-phenoxy-cinnamyl) acetohydroxamic acid), 5 mg/kg; Tateson *et al.*, 1988), BW755C ([3-(amino-1-3 trifluoromethyl phenyl)-2-pyrazoline hydrochloride], 50 mg/kg; Randall *et al.*, 1980), cimetidine (2 mg/kg; Scheuber *et al.*, 1985) and BN52021 (ginkgolide B, 3-(1,1-dimethylethyl)-hexahydro-1,4-7b-trihydroxy-8-methyl-9H-1, 7α (epoxymethano-1H, 6αH-cyclopenta (c) furo (2,3-b) furo (3',2':3,4) cyclopenta (1,2 - d) furan-5,9,12 (4H)-trione); 10 mg/kg; Barja-Fidalgo *et al.*, 1992).

2.10. Drugs and chemicals

BN52021, the neurokinin₁ receptor antagonist SR140333 and the neurokinin₂ receptor antagonist SR48968 were generously provided by Dr. Edson Antunes (Department of Pharmacology, State University of Campinas). BW755C was generously provided by Dr. Célio Regina Carlini (Department of Biochemistry, Federal

University of Rio Grande do Sul). SEB, indomethacin, cimetidine, capsaicin, dexamethasone and polymyxin B were purchased from (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA). The other chemicals were of highest grade available.

2.11. Statistical analysis

The data are reported as the mean $\pm$ SEM for five mice. The results from the pretreatment experiments were compared using analysis of variance followed by the Kruskal-Wallis test. The other data were compared by Student's unpaired t-test. In both cases, a p value < 0.05 indicated significance.

3. Results

The supernatants cultured from mouse peritoneal macrophages stimulated with SEB contained a neutrophil chemotactic component that induced significant neutrophil recruitment into the peritoneal cavity of naive mice when compared to mice injected with supernatants from RPMI-stimulated macrophage monolayers (Figure 1A). The release of this neutrophil chemotactic component into the supernatant was proportional of the SEB concentrations (1.25-5 $\mu\text{g/ml}$) used to stimulate the macrophages; there was no effect on macrophage viability (Figure 1A).

As shown in Figure 1B, varying the length of the pre-incubation (5-60 min) of the macrophage monolayers with SEB (5 $\mu\text{g/ml}$) influenced the amount of neutrophil chemotactic component released into the supernatants. The amount of neutrophil chemotactic component released also varied with the length of time the macrophages cultured after pre-incubation with SEB (30-180 min).

Incubation of the supernatant from SEB-stimulated macrophages with polymyxin B (3.5 $\mu\text{g/ml}$) did not affect the chemotactic activity, whereas the incubation of LPS (200-800 ng) with the same dose of polymyxin reduced the corresponding neutrophil migration into the mouse peritoneal cavity (Figure 2).

The pH of the incubation medium had a marked effect on the macrophage response to SEB. Release of the neutrophil chemotactic component was optimal at pH 7.0 ($10.0 \pm 1.0 \times 10^5$ neutrophils per cavity) and decreased 2-fold at pH 6.0-6.5 ($5.8 \pm 1.0 \times 10^5$ and $5.8 \pm 1.2 \times 10^5$ neutrophils per cavity). No neutrophil recruitment was observed when the supernatant was obtained at pH 8.0 ($2.7 \pm 0.8 \times 10^5$ neutrophils per cavity). The SEB-stimulated release of the neutrophil chemotactic component was also temperature-dependent since no release was observed at 4°C ($3.5 \pm 1.0 \times 10^5$ neutrophils per cavity) or 45°C ($2.6 \pm 0.3 \times 10^5$ neutrophils per cavity); optimal release occurred at 37°C ($9.9 \pm 1.3 \times 10^5$ neutrophils per cavity). The neutrophil migration induced by the chemotactic component decreased from $10.0 \pm 1.0 \times 10^5$ to 2.3 ± 0.3 ,

4.3 ± 1.0 and $2.6 \pm 0.6 \times 10^5$ neutrophils per cavity when calcium, magnesium or both ions, respectively, were omitted from the medium. Removal of glucose from the medium also strongly inhibited the neutrophil influx ($10.0 \pm 1.0 \times 10^5$ vs $3.0 \pm 0.6 \times 10^5$ neutrophils per cavity).

Incubating the supernatant from SEB-stimulated macrophages at 100°C for 30 minutes or with chymotrypsin ($100 \mu\text{g/ml}$) but not trypsin ($200 \mu\text{g/ml}$) for 60 minutes abolished the capacity to induce neutrophil migration into mouse peritoneal cavities (Figure 3 A and B). Pre-treating SEB-stimulated macrophages with cycloheximide ($9 \mu\text{g/ml}$) also inhibited the release of the chemotactic component. No effect on neutrophil migration was seen when the above drugs were added to the supernatants from SEB-stimulated macrophages (Figure 3 C).

The material retained after ultrafiltration of supernatants through an Amicon YM-10 (MWCO 10,000), did not induce neutrophil migration into mouse peritoneal cavities, whereas the ultrafiltrate did. The same results were obtained with an Amicon YM-3 (MWCO 3,000) membrane. In contrast, the neutrophil chemotactic activity of the supernatants was retained by an Amicon YM-1 (MWCO 1,000) membrane (Figure 4).

Pretreating the mice with dexamethasone (0.5 mg/kg) reduced the neutrophil migration induced by the supernatant of SEB-stimulated macrophages by 80% (Table 1). A similar response was observed with the lipoxygenase inhibitor BWA4C (10 mg/kg ; 72% inhibition), the dual inhibitor of arachidonic acid metabolism BW755C (50 mg/kg ; 79% inhibition), the PAF receptor antagonist BN52021 (10 mg/kg ; 75% inhibition), the histamine H_2 receptor antagonist cimetidine (2 mg/kg ; 61% inhibition) and capsaicin, a sensory C-fiber neuropeptide depletor. In contrast, indomethacin (5 mg/kg) had no effect on the neutrophil migration. All of the above drugs, except capsaicin, inhibited the neutrophil migration induced by LPS (positive control, data not shown).

The neutrophil migration was significantly reduced (71%) by pretreating the mice with the neurokinin₁ receptor antagonist SR140333 (100 µg/kg). The neurokinin₂ receptor antagonist SR48968 (1 mg/kg) had no effect on neutrophil migration. A similar response on neutrophil migration was seen with SP (20 nmol /cavity; positive control) (Figure 5).

Discussion

The incubation of mouse peritoneal macrophages with SEB *in vitro* resulted in a dose- and time-dependent release of a component able to induce neutrophil migration into the abdominal cavities of naive mice (Figure 1). These results reinforce our previous supposition that resident macrophages modulate the neutrophil migration induced by SE into the mouse peritoneal cavity (Desouza & G. Ribeiro-DaSilva, 1996, 1998) and agree with other observations about the role of these cells in the pathophysiological events associated with enterotoxemias caused by these toxins (Micusan & Thibodeau, 1993).

The chemotactic component was a thermolabile protein, since it was inactivated at 100°C and its release was abolished by pretreating the macrophages with cycloheximide, an inhibitor of protein synthesis (Figure 3). The component was also sensitive to digestion by chymotrypsin (100 µg/ml for 60 min; Figure 3B) and a marked reduction in its activity occurred after four freeze-thaw cycles ($8.4 \pm 1.0 \times 10^5$ vs $2 \pm 0.4 \times 10^5$ neutrophils per cavity) or when maintained at 4°C for 48 h ($11 \pm 1.0 \times 10^5$ vs $2 \pm 0.4 \times 10^5$ neutrophils per cavity). SEB appears to induce the release of this neutrophil chemotactic component from macrophages by an active secretory process, since the release occurred without cell damage, required metabolic energy and the presence of divalent cations (Ca^{2+} and Mg^{2+}) and was optimal at 37° C and physiological pH.

Escherichia coli lipopolysaccharide can stimulate and inhibit neutrophil migration (Rosenbaum *et al.*, 1983). To exclude the possibility of contamination with *E. coli* lipopolisaccharide, supernatants from SEB-stimulated macrophages were incubated with polymyxin B (Cunha & Ferreira, 1986; Barja-Fidalgo *et al.*, 1992). As shown in Figure 2, the resulting neutrophil migration was not affected by polymyxin B whereas that to LPS was inhibited.

Macrophages incubated *in vitro* with LPS release MNCF into the supernatant (Cunha & Ferreira, 1986). This factor is a protein with lectin-like activity (Baruffi *et al.*,

1993), and was considered to be the final mediator in the neutrophil recruitment by various other stimuli, including cytokines such as IL-1 β and TNF- α and INF- γ and mediators such as LTB₄ (Faccioli *et al.*, 1990; Collins *et al.*, 1991; Ribeiro *et al.*, 1997).

In laboratory animals, SEB elicits effects similar to several of those described for LPS (Bergdoll & Chesney, 1991). Our demonstration that mice peritoneal macrophages are also able to release a neutrophil chemotactic protein after incubation *in vitro* with SEB represents another biological activity that these toxins share with LPS.

However, our results suggest that the chemotactic protein released by macrophages stimulated with SEB is not the same protein released by macrophages incubated with LPS since the molecular weight of the MNCF is greater than 10,000 (Cunha & Ferreira, 1986) whereas SEB-induced neutrophil chemotactic protein has a molecular weight of 1,000-3,000 (Figure 4).

The neutrophil migration induced by the MNCF is unaffected by pre-treatment of the animals with glucocorticoids (Cunha & Ferreira, 1986). This finding distinguishes this factor from other known neutrophil chemotactic mediators since the neutrophil migration induced by IL-1, TNF- α , IL-8, the complement component C5a and LTB₄ in rats is inhibited by dexamethasone (Faccioli *et al.*, 1990; Ribeiro *et al.*, 1991, 1997). The neutrophil migration induced by the chemotactic component from SEB-stimulated peritoneal macrophages was reduced 80% in dexamethasone pre-treated mice (Table 1), probably through the inhibition of neutrophil-endothelium adhesion, one of the mechanisms by which glucocorticoids can inhibit the recruitment of these cells to inflamed tissues (Cronstein *et al.*, 1992; Cecilio *et al.*, 1997).

The chemotactic mediators thought to be involved in neutrophil migration into inflamed tissues include the complement component fragment C5a (Yancey, 1989), LTB₄; (MacMillan & Foster, 1988) and cytokines such as IL-1, TNF- α , and IL-8 (Faccioli *et al.*, 1990; Ribeiro *et al.*, 1991). Some of these substances, such as the fifth

complement component, may have a direct chemotactic action on neutrophils (Yancey, 1989), whereas others may act indirectly through mechanisms which depend upon the resident cells of the tissues and on the endothelium (Faccioli *et al.*, 1990; Ribeiro *et al.*, 1991).

Glucocorticoids can also inhibit the release of many biologically active substances, including neutrophil chemotactic mediators such as cytokines and metabolites of arachidonic acid (Fantuzzi & Ghezzi, 1993; Klein *et al.*, 1995). Our experiments showed that pre-treating the macrophage monolayers with dexamethasone (5 µg/ml) *in vitro* reduced the release of the SEB-induced neutrophil chemotactic component by 30%. On the other hand, based on the observation that neither indomethacin, a specific cyclooxygenase inhibitor, nor BW755C, a dual inhibitor of arachidonic acid metabolism, had no effect *in vitro* on the release of the neutrophil chemotactic component by SEB-stimulated macrophages, we conclude that arachidonic acid metabolites do not contribute to the neutrophil chemotactic activity described in the present paper (data not shown). In addition, this chemotactic protein has a molecular weight greater than chemotactic substances derived from cell phospholipids such as PAF and lipoxygenase or cyclooxygenase products (Figure 4).

The molecular weight (1,000-3,000) of this SEB-induced neutrophil chemotactic component from macrophages also excludes the possibility that cytokines such as IL-1, TNF-α, IFN-γ and IL-8 or the fifth complement component are responsible for this chemotactic activity.

LPS-stimulated murine macrophages (RAW 264.7 cells) also release two proteins termed macrophage inflammatory proteins 1 (MIP-1) and 2 (MIP-2) (Wolpe *et al.*, 1988,1989). These proteins are potent chemoattractants for polymorphonuclear leukocytes (Widmer *et al.*, 1993). However, the molecular weight for SEB-induced neutrophil chemotactic component from macrophages obtained here (1,000- 3,000) excludes the possibility that MIP-1 or MIP-2 (MW 6,000-8,000) is responsible for the

chemotactic activity described above.

There is good evidence that the neutrophil migration into rat peritoneal cavities induced by the above cytokines is dependent on the number of resident macrophages (Faccioli *et al.*, 1990), although IL-8 may be an exception since its chemotactic activity is dependent on mast cells (Ribeiro *et al.*, 1991). In contrast, the neutrophil migration induced by supernatants from SEB-stimulated macrophages was unaffected by the number of resident peritoneal macrophages, since a migratory response of similar magnitude was observed in thioglycollate-treated mice (a treatment able to increase the peritoneal macrophage population by fivefold) and non-pre-treatment mice ($9.6 \pm 2 \times 10^5$ vs $9.6 \pm 1.5 \times 10^5$ neutrophils per cavity).

The neutrophil migration induced by the SEB-induced macrophage neutrophil chemotactic component was reduced by pretreating the mice with BN52021, cimetidine, BWA4C, BW755C but not by indomethacin (Table 1). Therefore, PAF, the histamine H₂ receptor and lipoxygenase products appears to be involved in the neutrophil recruitment. The broad spectrum of drugs which inhibited this response may reflect the fact that other cell types are probably involved.

Mast cells have an important role in inflammatory processes through their ability to release of several mediators which have neutrophil chemotactic activity (Rao *et al.*, 1994; Ribeiro *et al.*, 1997). In particular, IL-8 is a potent leukocyte chemoattractant able to induce neutrophil migration by stimulating the release of a neutrophil chemotactic factor from mast cells (Ribeiro *et al.*, 1991).

SP, released by afferents nerve terminals, is the main neuropeptide involved in neurogenic inflammation (Foreman, 1987; Partsch & Matucci-Cerinic, 1992) and may have a role in the pathophysiological events of SE (Scheuber *et al.*, 1987). Neurogenic inflammation, which may be induced by electrical or chemical stimulation of sensory neurons, involves a number of inflammatory events such as local vasodilatation, oedema formation and leukocyte accumulation. All these components of the

inflammatory response are also elicited by the administration of SP (Yano *et al.*, 1989; Walsh *et al.*, 1995). Moreover, a number of mast cell-derived mediators such as histamine and LTB₄ have been implicated in the inflammatory responses elicited by SP and may partly mediate the leukocyte infiltration into mouse skin (Foreman, 1987; Iwamoto *et al.*, 1993). The inflammatory properties of SP appear to be mediated primarily via its interaction with neurokinin-1 receptors (Guard & Watson, 1991) which are members of the G-protein-coupled receptor superfamily (Takeda *et al.*, 1991).

We recently suggested that SP may be involved in the paw edema and in the neutrophil recruitment induced by SEA or SEB in mice. This conclusion was based on the observation that capsaicin, which depletes sensory neurons of their peptides, reduced the inflammatory response induced by these toxins in mice (Desouza *et al.*, 1996; Desouza & G. Ribeiro-DaSilva, 1996, 1997, 1998).

Our results here also showed an significant reduction (65%) in the neutrophil migration in capsaicin pre-treated mice (Table 1). A similar response was obtained in mice pre-treated with a specific neurokinin₁ receptor antagonist SR140333, but not with the neurokinin₂ receptor antagonist SR48968 (Figure 5). These observations add additional support to our previous hypothesis about the involvement of SP in the SEB-mediated phlogistic reaction in mice (Desouza *et al.*, 1996; Desouza & G. Ribeiro-DaSilva, 1996, 1997, 1998). These results also suggest that macrophages are able to release a pro-inflammatory neutrophil chemotactic component when stimulated with SEB and that this component induces neurogenic inflammation.

As SP-induced tissue swelling and granulocyte infiltration in mice are associated with mast cell degranulation and the neutrophil infiltration seen following the intradremal injection of SP into mouse skin is mast-cell dependent (Yano *et al.*, 1989), we can conclude that mast-cells may be a important intermediate in the release of neuropeptides and the local alterations in vascular tone, permeability and neutrophil infiltration seen following the administration of the chemotactic component described

here. This conclusion could also explain the involvement of inflammatory mediators such as leukotrienes, histamine and PAF in this phenomenon.

5. Conclusion

In conclusion, our results confirm that macrophages play a key role in neutrophil recruitment following stimulation by SEB. This function is mediated by the release of a neutrophil chemotactic protein that is different from the currently known chemotactic cytokines IL-1, TNF- α , IFN- γ , MNCF and other chemotactic mediators such as leukotrienes, PAF, the fifth complement component and MIP-1 or MIP-2. Our results also suggest that the neutrophil migration stimulated by this novel neutrophil chemotactic component may involve the release of neuropeptides from sensory neurons and the secondary stimulation of mast cells. However, the mechanism whereby this macrophage product stimulates sensory neurons remains to be elucidated.

Acknowledgements

Ivani A. Desouza is the recipient of a FAPESP fellowship (N° 94/0210-2).

This work is part of a thesis to be submitted by Ivani A. Desouza to the Institute of Biology, State University of Campinas, in partial fulfillment of the requirements for a PhD degree.

Animal experimentation guidelines were followed in all experiments.

Grant support: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (No. 95/0390-3) and Fundo de Apoio ao Ensino e à Pesquisa da UNICAMP (No. 0263/95).

We are grateful to Dr. Edson Antunes for kindly providing some of the drugs used, to Dr. Stephen Hyslop for editorial assistance and to Prof. Aquiles E. Pietrabuena for statistical advice.

References

- ALBER, G., SCHEUBER, H.P., RECK, B., SAILER-KRAMER, B., HARTMANN, A., & HAMMER, D.K. (1989). Role of substance P immediate-type skin reactions induced by staphylococcal enterotoxin B in unsensitized monkeys. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **84**, 880-885.
- BARJA-FIDALGO, C., CARLINI, C.R., GUIMARÃES, J.A., FLORES, C.A., CUNHA, F.Q. & FERREIRA, S.H. (1992). Role of resident macrophages in canatoxin-induced *in vivo* neutrophil migration. *Inflammation.*, **16**, 1-11.
- BARUFFI, M.D., CUNHA, F.Q. & FERREIRA, S.H. (1993). Macrophage-released neutrophil chemotactic factor (MNCF) induces PMN-neutrophil migration through lectin-like activity. *Agents Actions*, **38**, C54-C56.
- BERGDOLL, M.S. (1989). Foodborn Bacterial Pathogens. In: Doyle, M. P. (Ed.), Maxwell Press, New York, pp. 463-512.
- BERGDOLL, M.S. & CHESNEY, P.J. (1991). Toxic shock syndrome. In: Bergdoll, M.S., Chesney, P.J. (Eds.), CRC Press, Boston, pp. 51-73.
- BOBAK, D.A. & GUERRANT, R.L. (1992). New developments in enteric bacterial toxins. *Adv. Pharmacol.*, **23**, 85-101.
- BOYSE, E.A., OLD, L.J. & CHOUROULINKOV, I. Cytotoxic test for demonstration of mouse antibody. *Methods Med. Res.*, **10**, 39-47.

- CALDERON, J., WILLIAMS, R.T. & UNANUE, E.R. (1974). An inhibitor of cell proliferation released by cultures of macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **71**, 4273-4277.
- CECILIO, C.A., COSTA, E.H., UCELLI, P., CHAVES, C.A.A., TOFFOLI, M.C., FLORES, C.A., CUNHA, F.Q., FERREIRA, S.H. & TAMASHIRO, W.M.S.C. (1997). The neutrophil migration induced by tumour necrosis factor alpha in mice is unaffected by glucocorticoids. *Med. Inflam.*, **6**, 46-52.
- COLDILTZ, I.G., ZWAHLEN, R., DEWALD, B. & BAGGIOLINI, M. (1989). *In vivo* inflammatory activity of neutrophil-activating factor, a novel chemotactic peptide derived from human monocytes. *Am. J. Pathol.*, **134**, 755-762.
- COLLINS, P.D., JOSE, P.J. & WILLIAMS, T.J. (1991). The sequential generation of neutrophil chemoattractant protein in acute inflammation in the rabbit *in vivo*. *J. Immunol.* **146**, 677-684.
- CRONSTEIN, B.N., KIMMEL, S.C., LEVIN, R.I., MARTINIUK, F. & WEISSMANN, G. (1992). A mechanism for the antiinflammatory effects of corticosteroids: the glucocorticoid receptor regulates leukocyte adhesion to endothelial cells and expression of endothelial-leucocyte adhesion molecule 1 and intercellular adhesion molecule 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 9991-9996.
- CUNHA, F.Q. & FERREIRA, S.H. (1986). The release of a neutrophil chemotactic factor from peritoneal macrophages by endotoxin: inhibition by glucocorticoids. *Eur. J. Pharmacol.*, **129**, 65-76.

- DESOUZA, I.A., BERGDOLL, M.S. & RIBEIRO-DASILVA, G. (1996). Pharmacological characterization of the mouse paw edema induced by staphylococcal enterotoxin B. *J. Nat. Toxins.*, **5**, 61-71.
- DESOUZA, I.A. & RIBEIRO-DASILVA, G. (1996). Resident macrophages modulate the neutrophil migration induced by staphylococcal enterotoxin B into mouse peritoneal cavity. *J. Nat. Toxins.*, **5**, 341-350.
- DESOUZA, I.A. & RIBEIRO-DASILVA, G. (1997). The pharmacological profile of mouse hind paw inflammation induced by staphylococcal enterotoxin type A. *Inflamm. Res.*, **46**, 361-365.
- DESOUZA, I.A. & RIBEIRO-DASILVA, G. (1998). Neutrophil migration induced by staphylococcal enterotoxin type A in mice: a pharmacological analysis. *Eur. J. Pharmacol.*, **363**, 189-195.
- DINARELLO, C.A. (1991). The proinflammatory cytokines interleukin-1 and tumour necrosis factor and treatment of septic shock syndrome. *J. Infect. Dis.*, **163**, 1177-1184.
- FACCIOLI, L.H., SOUZA, G.E.P., CUNHA, F.Q., POOLE, S. & FERREIRA, S.H. (1990). Recombinant interleukin 1 and tumor necrosis factor induce neutrophil migration *in vivo* by indirect mechanisms. *Agents Actions*, **30**, 344-349.
- FANTUZZI, G. & CHEZZI, P. (1993). Glucocorticoids as cytokine inhibitors: role in neuroendocrine control and therapy of inflammatory disease. *Med. Inflamm.*, **2**, 263-266.

- FERNANDEZ, H.N., HENSON, P.M., OTANI, A. & HUGLI, T.E. (1978). Chemotactic response to human C3a and C5a anaphylatoxins. *J. Immunol.*, **120**, 109-112.
- FERREIRA, S.H. (1980). Are macrophages the body's alarm cells? *Agents Actions*. **10**, 229-230.
- FERREIRA, S.H. (1993). The role of interleukins and nitric oxide in the mediation of inflammatory pain and its control by peripheral analgesics. *Drugs*. **46**, 1-9.
- FOREMAN, C.J. (1987). Peptides and neurogenic inflammation. *Br. Med. Bull.* **43**, 386-400.
- FLEMING, S.D., IANDOLO, J.J. & CHAPES, S.K. (1991). Murine macrophage activation by staphylococcal exotoxins. *Infect. Immun.* **59**, 4049-4055.
- FREER, J.H. & ARBUTHNOTT, J.P. (1986). Pharmacology of bacterial toxins. In: Dorner, S., Drews, J. (Eds.), Pergamon, Oxford, pp. 571-633.
- GUARD, S. & WATSON, S.P. (1991). Tachykinin receptor types: classification and membrane signalling mechanism. *Neurochem. Int.*, **18**, 149-165.
- HARMSSEN, A.G. & HAVEL, E.A. (1990). Role of tumor necrosis factor and macrophages in lipopolysaccharide-induced accumulation of neutrophils in cutaneous air pouches. *Infect. Immun.*, **58**, 297-301.

- HASKÓ, G., VIRÁG, L., EGNACZYK, G., SALZMAN, A.L. & SZABÓ, C. (1998). The crucial role of IL-10 in the suppression of the immunological response in mice exposed to staphylococcal enterotoxin B. *Eur. J. Immunol.*, **28**, 1417-1425.
- HENRIQUES, M.G.M.O., SILVA, P.M.R., MARTINS, M.A., FLORES, C.A., CUNHA, F.Q., ASSREUY-FILHO, J. & CORDEIRO, R.S.B. (1987). Mouse paw edema. A new model for inflammation? *Braz. J. Med. Biol. Res.*, **20**, 243-249.
- HILL, H.R., ESTENSEN, R.D., HOGAN, N.A. & QUIE, P.G. (1976). Severe staphylococcal disease associated with allergic manifestations, hyperimmunoglobulinemia E, and defective neutrophil chemotaxis. *J. Lab. Clin. Med.*, **88**, 796-806.
- LANDOLO, J.J. (1989). Genetic analysis of extracellular toxins of *Staphylococcus aureus*. *Annu. Rev. Microbiol.*, **43**, 375-402.
- INOUE, H., ASAKA, T., NAGATA, N. & KOSHIHARA, Y. (1997). Mechanism of mustard oil-induced skin inflammation in mice. *Eur. J. Pharmacol.*, **333**, 231-240.
- IWAMOTO, I. & NADEL, J.A. (1989). Tachykinin receptor subtype that mediates the increase in vascular permeability in guinea pig skin. *Life Sci.*, **44**, 1089-1095.
- KLEIN, A., CUNHA, F.Q. & FERREIRA, S.H. (1995). The role of lymphocytes in the neutrophil migration induced by ovalbumin in immunized rats. *Immunology*. **84**, 577-584.

- KLUGER, M.J. (1991). Fever, role of pyrogens and cryogens. *Physiol. Rev.*, **71**, 93-127.
- MACMILLAN, R.T. & FOSTER, S.J. (1988). Leukotrine B₄ and inflammatory diseases. *Agents Actions*. **24**, 114-117.
- MARRACK, P. & KAPPLER, J. (1990). The staphylococcal enterotoxins and their relatives. *Science*. **248**, 705-711.
- MELO FILHO, A.A., SOUZA, M.H.L.P., LYERLY, D.M., CUNHA, F.Q., LIMA, A.A.M. & RIBEIRO, R.A. (1997). Role of tumor necrosis factor and nitric oxide in the cytotoxic effects of *Clostridium difficile* toxin A and toxin B on macrophages. *Toxicon*. **35**, 743-752.
- MERRIL, W.W., NAEGEL, G.P., MATTHAY, R.A. & REYNOLDS, H.Y. (1980). Alveolar macrophage-derived chemotactic factor kinetics of *in vitro* production and partial characterization. *J. Clin. Invest.*, **65**, 268-276.
- MICUSAN, V.V. & THIBODEAU, J. (1993). Superantigens of microbial origin. *Semin. Immunol.* **5**, 3-11.
- MISFELDT, M.L., LEGAARD, P.K., HOWELL, S.E., FORNELLA, M. & LEGRAND, R.D. (1990). Induction of interleukin-1 from murine peritoneal macrophages by *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A. *Infect. Immun.*, **58**, 978-998.

- MUNSON, S.H., TREMAINE, M.T., BETLEY, M.J. & WELCH, R.A. (1998). Identification and characterization of staphylococcal enterotoxin type G and I from *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.*, **66**, 3337-3348.
- PARTSCH, G. & MATUCCI-CERINIC, M. (1992). Effect of substance P and somatostatin on migration of polymorphonuclear (PMN) cells *in vitro*. *Inflammation*. **16**, 539-547.
- RANDALL, R.W., EAKINS, K.W., HIGGS, G.A., SALMON, J.A. & TATESON, J.E. (1980). Inhibition of arachidonic acid cyclooxygenase and lipoxigenase of leukocytes by indomethacin and compound BW755C. *Agents Actinos*, **10**, 553-555.
- RANKIN, J.A., SYLVESTER, I., SMITH, S., YOSHIMURA, T. & LEONARD, E.J. (1990). Macrophages cultured *in vitro* release leukotriene B₄ and neutrophil attractant activation protein (interleukin-8) sequentially in response to stimulation with lipopolysaccharide and zymosan. *J. Clin. Invest.* **80**, 1554-1564.
- RAO, T.S., CURRIE, J.L., SHAFFER, A.F. & ISALSON, P.C. (1994). *In vivo* characterization of zymosan-induced mouse peritoneal inflammation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **269**, 917-925.
- RIBEIRO, R.A., CUNHA, F.Q. & FERREIRA, S.H. (1990). Recombinant gamma interferon causes neutrophil migration mediated by the release of a macrophage neutrophil chemotactic factor. *Int. J. Exp. Pathol.*, **71**, 717-725.

- RIBEIRO, R.A., FLORES, C.A., CUNHA, F.Q. & FERREIRA, S.H. (1991). IL-8 causes *in vivo* neutrophil migration by a cell-dependent mechanism. *Immunology*, **73**, 472-477.
- RIBEIRO, R.A., SOUZA-FILHO, M.V.P., SOUZA, M.H.L., OLIVEIRA, S.H.P., COSTA, C.H.S., CUNHA, F.Q. & FERREIRA, S.H. (1997). Role of resident mast cells and macrophages in the neutrophil migration induced by LTB₄, fMLP and C5a des arg. *Int. Arch. Immunol.*, **112**, 27-35.
- ROSENBAUM, J.T., HARTIALA, K.T., WEBSTER, R.O., HOWES, E.L. & GOLDSTEIN, I.M. (1983). Antiinflammatory effects of endotoxin. *Am. J. Pathol.*, **113**, 291-299.
- SAMUELSON, B. (1983). Leukotrienes: mediators of immediate hypersensitivity reaction and inflammation. *Science*. **229**, 568-574.
- SCHEUBER, P.H., DENZLINGER, C., WILKER, D., BECK, G., KEPPLER, D. & HAMMER, D.K. (1987). Staphylococcal enterotoxin B as a non-immunological mast cell stimulus in primates: the role of endogenous cysteinyl leukotrienes. *Int. Arch. Allerg. Immunol.*, **82**, 289-291.
- SCHEUBER, P.H., GOLECKI, R.J., KICKHOFEN, B., SCHEEL, D., BECK, G. & HAMMER, D.K. (1985). Skin reactivity of unsensitized monkeys upon challenge with staphylococcal enterotoxin B: a new approach for investigating the site of toxin action. *Infect. Immun.*, **50**, 869-876.

- SOUZA, G.E.P., CUNHA, F.Q., MELLO, R. & FERREIRA, S.H. (1988). Neutrophil migration induced by inflammatory stimuli is reduced by macrophage depletion. *Agents Actions.*, **24**, 377-380.
- TAKEDA, Y., CHOU, K.B., TAKEDA, J., SACHAIS, B.S. & KRAUSE, J.E. (1991). Molecular cloning, structural characterization and functional expression of the human substance P receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **179**, 1232-1240.
- TATESON, J.E., RANDALL, R.W., REYNOLDS, C.H., JACKSON, W.P., BHATTACHERJEE, P., SOLMON, J.A. & GARLAND, L.G. (1988). Selective inhibition of arachidonate 5-lipoxygenase by novel acetohydroxamic acids: biochemical assessment *in vitro* and *ex vivo*. *Br. J. Pharmacol.*, **94**, 528-538.
- WALSH, D.T., WEG, V.B., WILLIAMS, T.J. & NOURSHARGH, S. (1995). Substance P-induced inflammatory responses in guinea-pig skin: the effect of specific NK₁ receptor antagonist and the role of endogenous mediators. *Br. J. Pharmacol.*, **114**, 1343-1350.
- WIDMER, U., MANAGUE, K.R., CERAMI, A. & SHERRY, B. (1993). Genomic cloning and promoter analysis of macrophage inflammatory protein (MIP)-2, MIP-1 α , and MIP-1 β , members of the chemokine superfamily of proinflammatory cytokines. *J. Immunol.*, **150**, 4996-5012.
- WOLPE, S.D., DAVATELIS, G., SHERRY, B., BEUTLER, B., HESSE, D.G., NGUYEN, H.T., MOLDAWER, L.L., NATHAN, C., LOWRY, S.F. & CERAMI, A. (1988). Macrophages secrete a novel heparin-binding protein with inflammatory and neutrophil chemokinetic properties. *J. Exp. Med.*, **167**, 570-581.

- WOLPE, S.D., SHERRY, B., JUERS, D., DAVATELIS, G., YURT, R.W. & CERAMI, A. (1989). Identification and characterization of macrophage inflammatory protein-2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 612-620.
- ZEHAVI-WILLNER, T., SHENBERG, E. & BARNES, A. (1984). *In vivo* effect of staphylococcal enterotoxin A on peripheral blood lymphocytes. *Infect. Immun.*, **44**, 401-405.
- YANCEY, K.B. (1989). Biological properties of human C5a: selected *in vitro* and *in vivo* studies. *Clin. Exp. Immunol.*, **71**, 207-212.
- YANO, H., WERSHIL, B.K., ARIZONO, N. & GALLI, S.J. (1989). Substance P-induced augmentation of cutaneous vascular permeability and granulocyte infiltration in mice is mast cell dependent. *J. Clin. Invest.*, **84**, 1276-1286.

LEGENDS TO FIGURES

Figure 1. Release of neutrophil chemotactic component by SEB-stimulated macrophages.

Panel A shows the neutrophil migration observed 12 h after the administration of supernatants obtained by incubating macrophage monolayers with RPMI (■) or SEB (■ ; 1.25-5.00 $\mu\text{g/ml}$) at 37°C for 30 minutes. The inset shows the macrophage viability after treatment with SEB. Panel B shows the influence of the duration of pre-incubation with SEB on the release of the chemotactic factor. In these experiments, the supernatants were collected 120 minutes after the end of the indicated pre-incubation periods. This panel also shows the time-dependent release of chemotactic factor after pre-incubation of the cells with SEB (5 $\mu\text{g/ml}$) for a fixed time (30 minutes). The data are the mean $\pm$ S.E.M. of five mice. * $p < 0.05$, compared with the control group (Student's unpaired t-test).

Figure 2. Polymyxin B does not inhibit the activity of the neutrophil chemotactic component released by SEB-stimulated macrophages.

Polymyxin B (PMX; 30 $\mu\text{g/cavity}$) was injected i.p. concomitantly with the supernatants SEB-stimulated (SEB-M) or *Escherichia coli* lipopolysaccharide (LPS 200-800 ng/cavity) and the neutrophil migration was assessed 12 h later. The data are the mean $\pm$ S.E.M. for five mice. * $p < 0.05$, compared with the response in the absence of PMX (Kruskal-Wallis test).

Figure 3. Partial characterization of the neutrophil chemotatic component release by SEB-stimulated macrophages.

Panel A shows the effect of temperature on the activity of supernatants (0.2 ml) from SEB-stimulated macrophages to induce neutrophil migration into mouse peritoneal cavities. The supernatants were incubated for 30 minutes at the indicated temperatures before injection into mice. Panel B shows the neutrophil chemotactic activity of the supernatants after incubation with trypsin (200 $\mu\text{g/ml}$) or chymotrypsin (100 $\mu\text{g/ml}$). Panel C shows the neutrophil migration induced by the neutrophil chemotactic component from macrophage monolayers pretreated with cycloheximide (9 $\mu\text{g/ml}$). The columns represent the mean $\pm$ S.E.M. for five mice. The dotted line indicates the neutrophil migration induced by supernatants from RPMI-stimulated macrophages. * $p < 0.05$, compared with the control group (Student's unpaired t-test).

Figure 4. Ultrafiltration of the supernatant from SE-stimulated macrophages.

The supernatant from SEB-stimulated macrophage monolayers was filtered through Amicon YM-10, YM-3 and YM-1 membrane. The retained material was washed with sterile phosphate-buffered saline and reconstituted to the original volume. The retained material (R) and the ultrafiltrate (F) were then assayed for their ability to induce neutrophil migration into the mouse peritoneal cavity (a 12 h time point was used). The columns are the mean $\pm$ S.E.M. for five mice. The dotted line indicates the neutrophil migration induced by supernatants from RPMI-stimulated macrophages. * $p < 0.05$, compared with the neutrophil migration induced by supernatant which was not ultrafiltrated (Student's unpaired t-test).

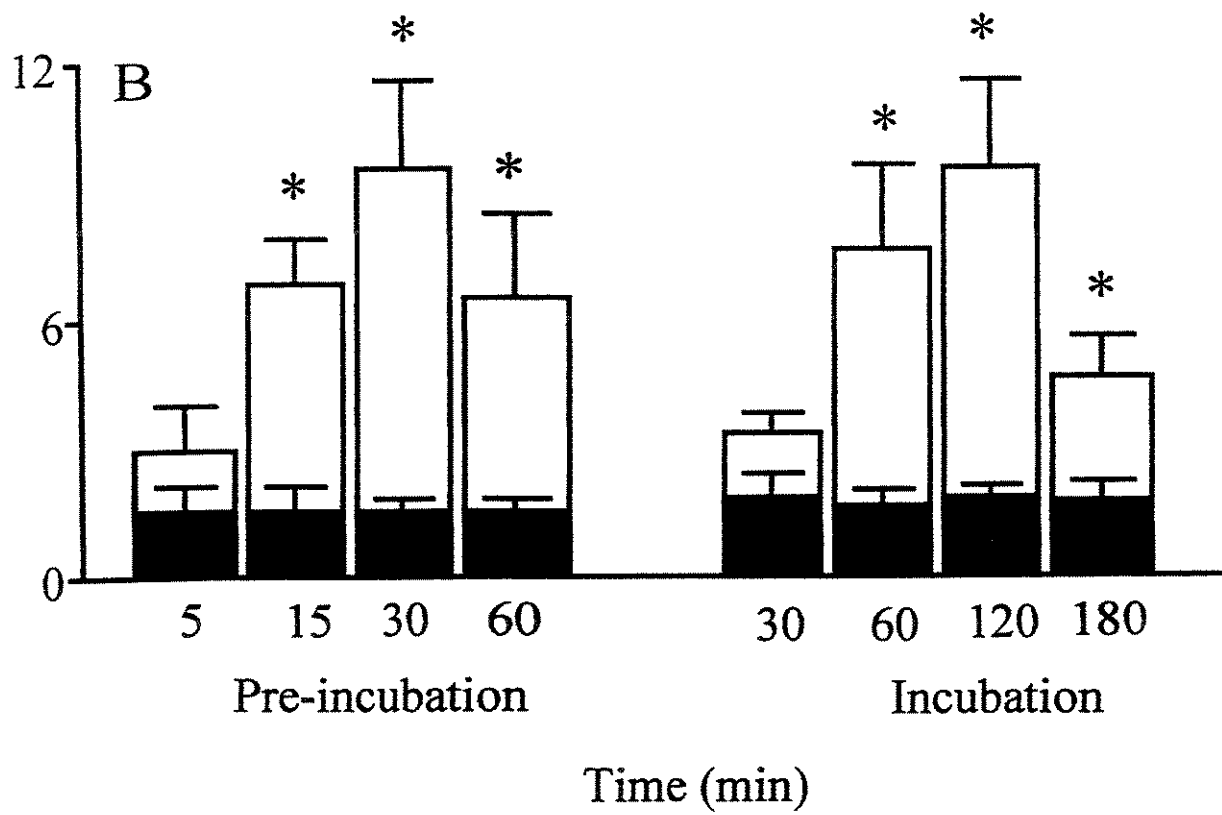
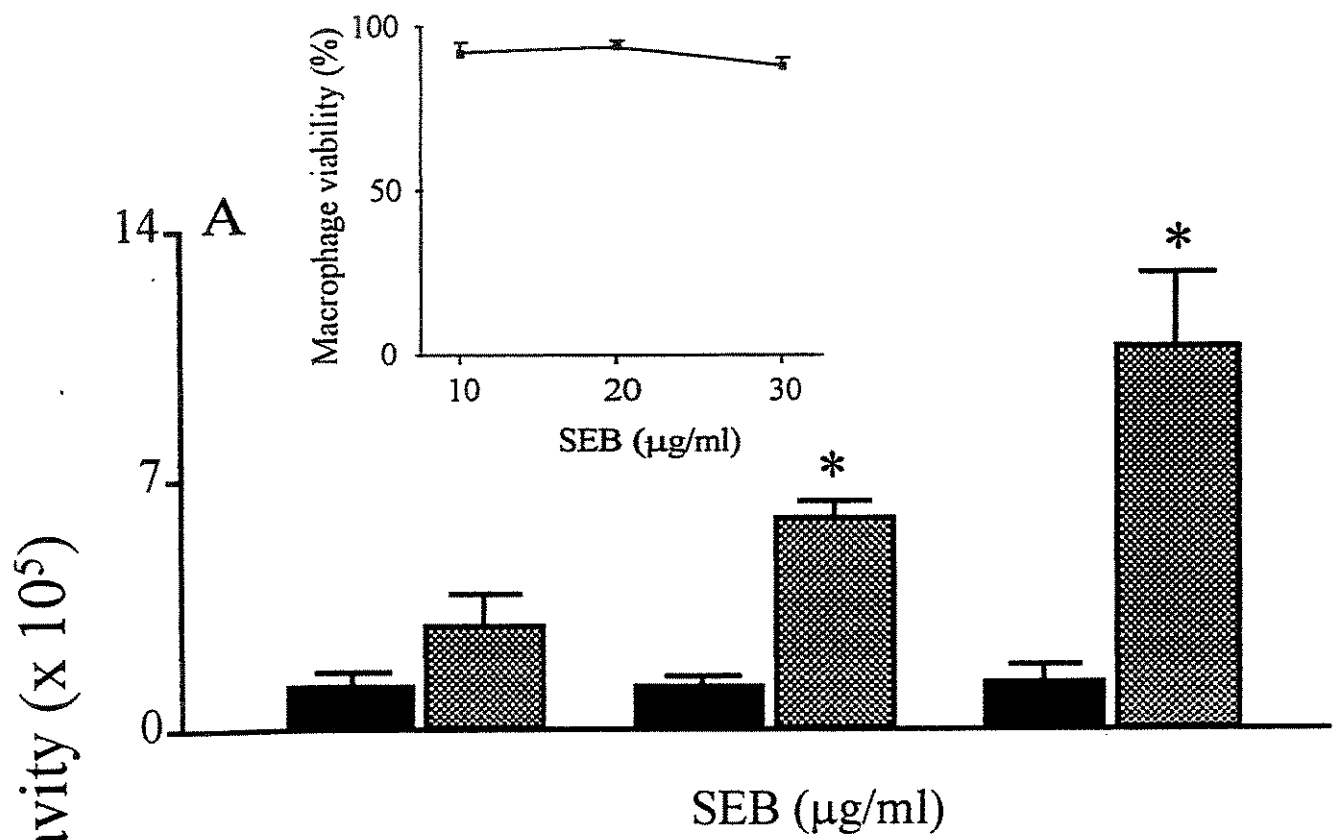
Figure 5. The neurokinin₁ receptor antagonist SR140333 but not the neurokinin₂ receptor antagonist SR48968 inhibits the neutrophil migration induced by supernatants from SEB-stimulated macrophages.

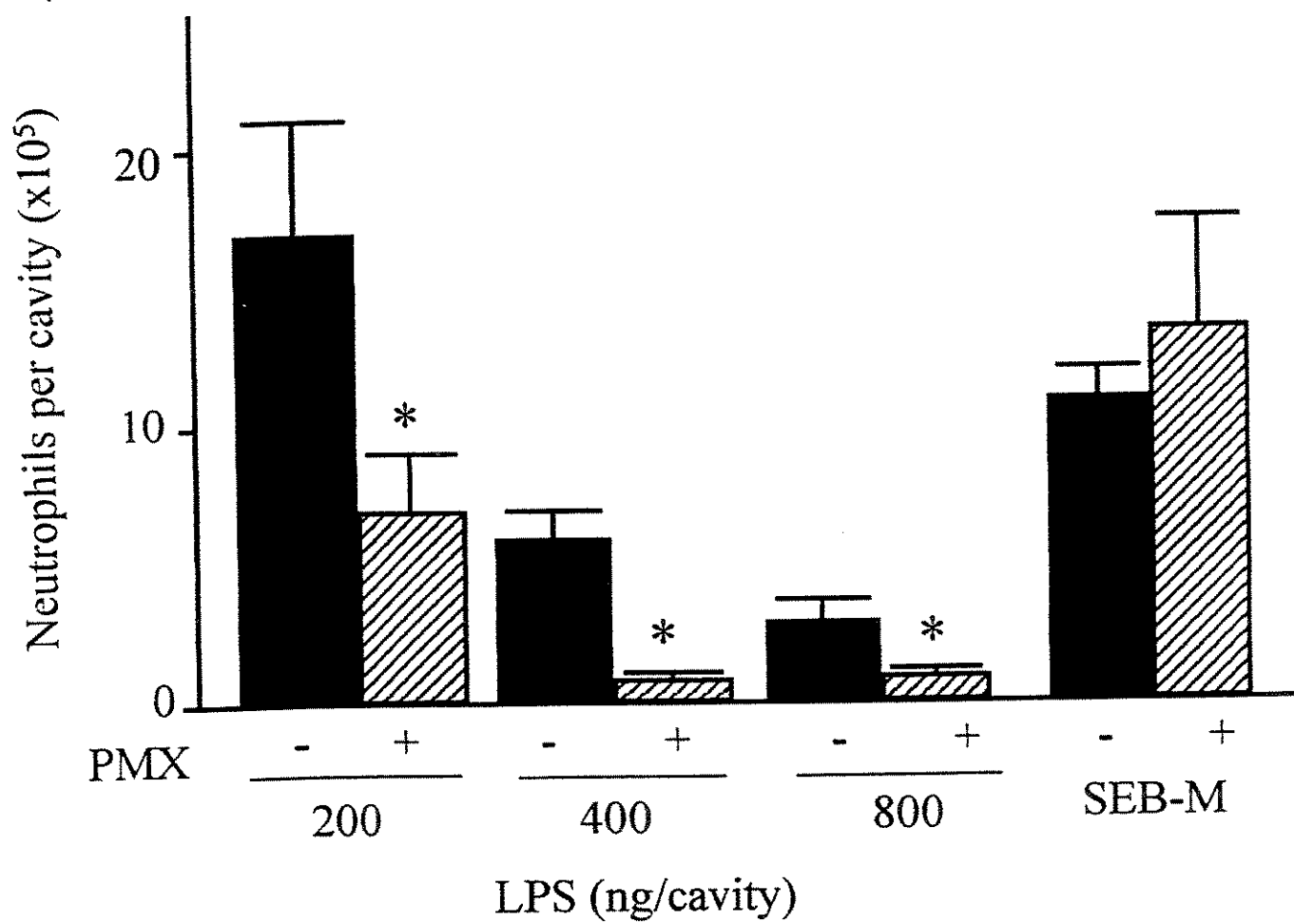
The neurokinin₁ (NK₁) receptor antagonist SR140333 (100 µg/kg) and the neurokinin₂ (NK₂) receptor antagonist SR48968 (1 mg/kg) were given intravenously immediately before the injection of supernatants from macrophages stimulated with SEB (0.2 ml/cavity) or SP (20 nmol/cavity). The number of neutrophils was determined 4 h later. The columns represent the mean $\pm$ S.E.M. for five mice. The dotted line indicates the neutrophil migration induced by supernatants from RPMI-stimulated macrophages. * $p < 0.05$, compared with the control (C) group (Kruskal-Wallis test).

Table 1. The effects of different inhibitors and antagonists on the neutrophil migration into the mouse peritoneal cavity.

Treatment	Neutrophils/ cavity ($\times 10^5$)	Inhibition (%)	Pharmacology
Control (RPMI)	1.9 ± 0.2	—	—
MNCC-SEB	9.6 ± 2.0	—	Macrophage derived neutrophil chemotactic component
MNCC-SEB + DEXA (0.5 mg/kg, s.c.)	$1.9 \pm 0.7^*$	80	Inhibitor of cytokine synthesis and phospholipase A ₂
MNCC-SEB + INDO (5 mg/kg, s.c.)	9.8 ± 1.0	NS	Cyclooxygenase inhibitor
MNCC-SEB + BWA4C (5 mg/kg, s.c.)	$2.7 \pm 0.5^*$	72	Lipoxygenase inhibitor
MNCC-SEB + BW755C (50 mg/kg, s.c.)	$2.0 \pm 0.3^*$	79	Dual cyclo- and lipoxygenase inhibitor
MNCC-SEB + BN52021 (10 mg/kg, s.c.)	$2.4 \pm 0.8^*$	75	PAF antagonist
MNCC-SEB + CMT (2 mg/kg, s.c.)	$3.7 \pm 0.3^*$	61	Histamine H ₂ receptor antagonist
MNCC-SEB + CPS (0.1 %, topically)	$3.3 \pm 0.5^*$	65	Sensory C-fiber neuropeptide depletor

Dexamethasone (DEXA), indomethacin (INDO), BWA4C, BW755C, BN52021 and cimetidine (CMT) were given 1 h before the injection of supernatants from macrophages stimulated with RPMI (Control) or SEB (5 μ g/ml; MNCC-SEB). Capsaicin (CPS) was applied topically for 8 days before the injection of supernatants. Neutrophil counts were obtained 12 h after the challenge with MNCC-SEB. The data are mean $\pm$ S.E.M. for five mice. * $p < 0.05$, compared with the non-pre-treated group (Kruskal-Wallis test).





Neutrophils per cavity ($\times 10^5$)

