

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

ESTUDO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA DE CAMUNDONGOS:
PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO E DE CITOCINAS NO
ENVELHECIMENTO

Ellen Heidi Costa

Orientador: Wirla Maria da Silva Cunha Tamashiro

9902585

Este exemplar corresponde à redação final
da tese submetida pelo(a) candidato(a)
Ellen Heidi Costa
e aprovada pela Comissão Julgadora

29/10/98 Wirla msc tamashiro

Tese apresentada à Universidade Estadual de Campinas, como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas, na área de Imunologia.

CAMPINAS
1998

C823e

36213/BC



UNIDADE:	BC
N.º CHAMADA:	T/UM/1000
	C823e
V	Ex
TELEFONO BC:	36.213
PROC	229/99
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	21/01/99
N.º OPD	

CM-00120069-9

FICHA CATALOGRAFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

Costa, Ellen Heidi

C823e Estudo da resposta de camundongos: produção de óxido nítrico e de citocinas no envelhecimento /Ellen Heidi Costa. -- Campinas, SP:[s.n.], 1998.
63f.:ilus.

Orientador: Wirla Maria da Silva Cunha Tamashiro
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Biologia.

1. Óxido nítrico. 2. Inflamação. 3. Envelhecimento. I. Tamashiro, Wirla Maria da Silva Cunha. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Campinas, 29 outubro de 1998.

BANCA EXAMINADORA

TITULARES:

Profa. Dra. Wirla Maria da Silva Cunha Tamashiro (orientadora)..... *Wirla msc Tamashiro*

Profa. Dra. Dagmar Ruth Stach Machado *Dagmar Ruth Stach Machado*

Prof. Dr. Edson Antunes..... *Edson Antunes*

SUPLENTE:

Prof. Dr. Fernando de Queiroz Cunha.....

Aos meus pais, que
me apoiaram, permitindo
que o sonho se tornasse
realidade.

À minha querida vovó
Irene (*in memoriam*)
que, sem dúvida,
nunca deixou de olhar
por mim.

À mestre Wirla M.S.C. Tamashiro com carinho

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), que concedeu o apoio financeiro necessário ao desenvolvimento deste trabalho, através dos processos nº 94/4215-9 (Bolsa) e 94/6277-1 (Auxílio Pesquisa).

À querida amiga Patricia Ucelli, que me suportou nas horas mais difíceis e colaborou intensamente na realização desta tese.

Aos meus irmãos Erika, Evany, Evelyn e Edgar, ao meu cunhado Mário e meu sobrinho Mark pelo amor que sempre a mim dedicaram.

Ao meu irmão do coração Aparecido Fanhani pelo carinho, apoio e paciência.

Ao meu querido avô Nelson pelo apoio e palavras sábias.

Aos docentes, alunos e funcionários do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biologia da UNICAMP pela amizade.

Aos membros da banca examinadora pelas valorosas sugestões para a melhoria do presente trabalho.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste projeto de tese.

SUMÁRIO

	Pág.
RESUMO.....	1
INTRODUÇÃO.....	4
OBJETIVOS.....	19
MATERIAL E MÉTODOS.....	20
1. ANIMAIS.....	20
2. DOSAGEM DE NO ₂ ⁻ EM CÉLULAS PERITONEAIS ADERENTES.....	20
2.1. Coleta e cultura de células peritoneais.....	20
2.2. Estimulação das monocamadas de células com LPS e INF- γ e obtenção de sobrenadantes.....	21
2.2.1. Curva dose-resposta para LPS e IFN- γ	21
2.2.2. Curva de tempo de incubação com os estímulos.....	22
2.3. Dosagem de NO ₂ ⁻	22
3. CULTURA DOS HIBRIDOMAS E OBTENÇÃO DOS ASCITES.....	22
4. CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE DOS ASCITES.....	23
5. DOSAGEM DE PROTEÍNAS.....	24
6. DOSAGEM DAS CITOCINAS INFLAMATÓRIAS: IL-1, TNF- α e IL-10.....	24
6.1.a. Preparo dos sobrenadantes de células para dosagem de TNF- α e IL-1 α	24
6.1b. Preparo dos sobrenadantes de células para dosagem de IL-10.....	25
6.2. ELISA para TNF- α	25
6.3. ELISA para IL-1.....	26
6.4. ELISA para IL-10.....	27
7. WESTERN BLOT.....	27
7.1. Preparo das amostras.....	27
7.2. Eletroforese.....	28
7.3. Detecção da iNOS.....	28
RESULTADOS.....	30

I. Níveis de NO liberados in vitro por células de camundongos.....	30
II. Influência das doses de LPS e IFN- γ na produção do óxido nítrico: Curva dose-resposta.....	33
III. Influência dos tempos de incubação com os estímulos na produção do óxido nítrico: Curva temporal.....	36
IV. Expressão da iNOS por macrófagos peritoneais de camundongos naïve e elicitados.....	39
V. Níveis das citocinas inflamatórias IL-1 α , TNF- α e IL-10 liberadas in vitro por células aderentes de camundongos.....	40
DISCUSSÃO.....	44
CONCLUSÕES.....	51
BIBLIOGRAFIA.....	52

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

	Pág.
Tabela 1. Influência da idade sobre e a produção de NO por células aderentes dos lavados peritoneais de camundongos BALB/c.....	31
Tabela 2. Concentração média, por faixa etária, de NO ₂ ⁻ liberado por células aderentes.....	32
Tabela 3. Comparações dos níveis de NO liberado por células peritoneais de camundongos BALB/c das diferentes faixas etárias, estimulados com tioglicolato.....	33
Figura 1: Influência das doses de LPS e INF- γ na produção de óxido nítrico por células aderentes peritoneais de camundongos previamente elicitados pelo tioglicolato das diferentes faixas etárias indicadas na figura.....	35
Figura 2: Influência das doses de LPS e INF- γ na produção de óxido nítrico por células aderentes peritoneais de camundongos previamente elicitados pelo tioglicolato das diferentes faixas etárias indicadas na figura.....	37
Figura 3: Influência do tempo de incubação na produção de óxido nítrico por células aderentes peritoneais obtidas de camundongos naive, das faixas etárias indicadas na figura.....	38
Figura 4: Análise por Western blot de iNOS em células peritoneais de camundongos de diversas faixas etárias (2, 8, 32 e 72 semanas de idade), residentes ou elicitados pelo tioglicolato.....	39
Figura 5: Níveis de TNF- α liberados por células peritoneais aderentes de camundongos (residentes ou elicitadas) das diversas idades indicadas na figura.....	41
Figura 6: Níveis de IL-1 α liberados por células peritoneais aderentes de camundongos (residentes ou elicitadas) das diversas idades indicadas na figura.....	42
Figura 7: Níveis de IL-10 liberados por células peritoneais aderentes de camundongos (residentes ou elicitadas) das diversas idades indicadas na figura.....	43

LISTA DE ABREVIATURAS

- BSA** (Bovine Serum Albumine): Soro Albumina Bovina
- CD**: Cluster of Differentiation
- Con-A**: Concanavalina A
- D.O.** : Densidade Óptica
- EROS ou ERO**: Espécies Reativas de Oxigênio
- Fc**: Fragmento cristalizável das Imunoglobulinas
- FDM**: Fator Desativador de Macrófagos
- G-CSF**: Fatores Estimuladores de Colônias de Granulócitos
- GM-CSF**: Fatores Estimuladores de Colônias de Granulócitos-Macrófagos
- HEPES**: (N-[2- hydroxyethyl] piperazine- N' - [2- ethanesulfonic acid])
- IFN- γ** : Interferon gama
- IL-1 α** : Interleucina –1 alfa
- IL-1 β** : Interleucina -1 beta
- IL-2**: Interleucina – 2
- IL-5**: Interleucina – 5
- IL-6**: Interleucina – 6
- IL-4**: Interleucina – 4
- IL-8**: Interleucina - 8
- IL-10**: Interleucina – 10
- LECAM-1 ou L- selectina**: Leukocyte Cellular Adhesion Molecule -1
- LPS**: Lipopolissacarídeo bacteriano
- MAC-1(CD11c/CD18), iC_{3b}**: antígeno de superfície de células mielóides e natural killer (subunidade α^M da integrina CR3)
- MIP-1**: Macrophage Inhibitory Protein – 1
- NO(Nitric Oxide)**: Óxido Nítrico
- *NO**: Radical Óxido Nítrico centrado no Nitrogênio
- *NO₂**: Radical Dióxido de Nitrogênio
- NOS**: Sintase de Óxido Nítrico
- cNOS**: Sintase Constitutiva do Óxido Nítrico
- iNOS**: Sintase Induzível de Óxido Nítrico

O₂^{-•}: Radical Ânion Superóxido

PBS: Phosphate Buffered Saline

PHA: Fito-Hemaglutinina A

RLN: Radicais Livres do Nitrogênio

SDS (Sodium Dodecil Sulphate): Dodecil Sulfato de Sódio

SFB: Soro Fetal Bovino

T CD₄⁺: Linfócitos T CD₄⁺

TGFs: Fatores Transformadores de Crescimento

TH₁: Linfócitos T-helper 1

TH₂: Linfócitos T-helper 2

TNF- α : Fator de Necrose Tumoral alfa

RESUMO

A produção de óxido nítrico (NO) e das interleucinas pró-inflamatórias, IL-1 α , IL-10 e TNF- α , por células aderentes, residentes e/ou elicitadas, provenientes de camundongos eutímicos da linhagem BALB/c, no decorrer do seu desenvolvimento pós-natal, foi investigada no presente trabalho.

As células residentes das cavidades peritoneais de camundongos recém-natos (1-15 dias) foram capazes de liberar quantidades elevadas de NO ($59,08 \pm 3,31 \mu\text{Mol}/1 \times 10^6$ céls), quando estimuladas *in vitro* com LPS+IFN- γ . Ao contrário, células peritoneais residentes obtidas de camundongos com idade superior a 30 dias não liberaram quantidades mensuráveis de NO ($<5 \mu\text{Mol}/1 \times 10^6$ céls). As células provenientes de camundongos *naive* com 72 semanas de idade também foram capazes de liberar quantidades mensuráveis de NO após o estímulo com LPS + IFN- γ , entretanto em níveis bem inferiores àqueles observados nos camundongos neonatos ($7-14 \mu\text{Mol}/1 \times 10^6$ céls). As células dos animais das demais faixas etárias só foram responsivas ao estímulo *in vitro*, liberando em média $29,35 \pm 2,72 \mu\text{Mol}$ de NO/ 1×10^6 céls (adulto jovem de 4 a 24 semanas) e $61,04 \pm 9,01 \mu\text{Mol}$ de NO/ 1×10^6 céls (adulto velho de 32 semanas), quando provenientes de animais elicitados *in vivo* com tioglicolato. A produção de NO também foi elevada em camundongos de 15 dias ($63,88 \pm 5,34 \mu\text{Mol}$ de NO/ 1×10^6 céls) elicitados *in vivo* com tioglicolato.

Experimentos realizados para verificar se a ausência de produção de NO pelas células não primadas pelo tioglicolato, obtidas de animais com idade superior a 30 dias, se devia às doses de LPS + IFN- γ até então empregadas ou ao tempo de coleta após o estímulo não resultaram em uma mudança significativa do perfil anteriormente obtido. Os animais de todas

as idades empregadas responderam de forma dose-dependente aos estímulos utilizados, sendo que o estímulo que parece ter uma influência maior na produção de NO nas idades estudadas é o LPS, tanto nos camundongos previamente elicitados como nos *naive*, pois para uma mesma dose de IFN γ doses crescentes do lipopolissacáride produziram um aumento nos níveis do gás liberado.

A sintase de óxido nítrico induzível (iNOS) pode ser detectada por Western blot em lisados obtidos de células residentes e elicitadas de camundongos com até 8 semanas de idade. Nos animais mais velhos testados (32 e 72 semanas de idade) só foi possível a detecção da iNOS em lisados obtidos de células elicitadas pelo tioglicolato.

No que se refere a produção de IL-1 α , foi possível verificar que as células aderentes obtidas de animais jovens e velhos, previamente estimulados com tioglicolato, foram igualmente responsivas ao estímulo empregado *in vitro* (LPS). Em células residentes, no entanto, observou-se que os níveis dessa citocina foram mais baixos em animais jovens, elevando-se nos animais velhos (72 semanas de idade).

Por outro lado, a liberação de TNF- α não pode ser observada em sobrenadantes de cultura de células aderentes obtidas de cavidades peritoneais de animais *naive* de qualquer idade testada. A liberação de TNF- α só pode ser detectada em sobrenadantes de cultura quando as células aderentes foram obtidas de cavidades peritoneais previamente estimuladas com tioglicolato. Neste caso, os níveis de TNF- α foram baixos (433,8 e 143,10 pg/ml) em animais neonatos (1 e 2 semanas de idade, respectivamente) e se mostrou de 10 a 15 vezes mais elevada em animais com idade igual ou superior a 8 semanas.

Células residentes ou elicitadas com tioglicolato, obtidas de animais com idade superior a 8 semanas foram capazes de produzir IL-10 em níveis detectáveis. Entretanto, as

quantidades de IL-10 liberadas por células provenientes de animais previamente elicitados pelo tioglicolato foi 2,5 a 4 vezes menores do que as detectadas em células provenientes de cavidades não elicitadas.

De acordo com observações já relatadas na literatura, os resultados ora obtidos sugerem que durante o envelhecimento as células inflamatórias, particularmente os macrófagos, produzem de forma aumentada certos mediadores, tais como o TNF- α , bem como o óxido nítrico.

INTRODUÇÃO

A deterioração do sistema imune no envelhecimento (imunosenescência), tem sido apontada como a responsável pela crescente mortalidade e morbidade devido a infecções e, possivelmente doenças autoimunes e câncer na velhice (PAWELEC e SOLANA, 1997).

No começo dos anos 80, eram aceitas duas grandes teorias para explicar o processo do envelhecimento em organismos superiores. A primeira, denominada de teoria genética, postulava três hipóteses: 1) que o envelhecimento seria um processo natural, geneticamente programado, com genes regulando mais essa etapa do desenvolvimento. Desta forma, haveria então os supostos “genes de envelhecimento” que desligariam certas vias bioquímicas de uma maneira sequencial, levando àquilo que chamamos de mudanças devidas ao envelhecimento. 2) Alternativamente, poderia estar havendo uma dificuldade do organismo em repor genes danificados por genes saudáveis. Essa hipótese advém do fato de haver genes que se repetem em sequências idênticas nas fitas de DNA. Assim, se um gene fosse irreversivelmente danificado seria substituído por outro idêntico, sem os erros deletérios. Portanto, o que essa hipótese diz é que ao se esgotar o “estoque de genes saudáveis”, os erros se acumulariam gerando mudanças fisiológicas, as quais levariam ao envelhecimento. 3) Finalmente, a hipótese dos “erros catastróficos”, onde deficiências nos processos do reparo de DNA gerariam moléculas defeituosas, que por sua vez levariam a um declínio nas habilidades funcionais das células (HAYFLICK, 1980).

A segunda teoria postulava que, durante o desenvolvimento, os organismos sofrem um constante ataque aos seus sistemas por fatores externos ou internos, que levam ao seu desgaste e conseqüentemente às enfermidades e à morte. Dentro dessa teoria são aceitas como

hipóteses: 1) as mutações no DNA, devidas a erros de replicação ou a agentes mutagênicos; 2) as alterações na eficiência do sistema imune em garantir a homeostase e prevenir e combater doenças e; 3) aquela que atualmente tem tido mais adeptos, a hipótese dos radicais livres, especialmente os derivados do oxigênio (HARMAN, 1981).

O ENVELHECIMENTO NO SISTEMA IMUNE

Os primeiros autores a notar uma senescência ou regressão da capacidade imune foram FREIDBERGER e colaboradores e THOMSEN e KETTEL, em 1929 (apud PRICE e MAKINODAN, 1976). Seus estudos com humanos mostraram a ocorrência de uma diminuição nos níveis de anticorpos naturais contra os antígenos dos grupos sanguíneos A e B e contra os eritrócitos de carneiro, em indivíduos velhos. PERKINS e colaboradores, em 1971 (apud PRICE e MAKINODAN, 1976), demonstraram que essas deficiências não se correlacionavam com os eventos de apresentação de antígenos pelos macrófagos, uma vez que essas células mantinham sua capacidade de retirar do sangue os eritrócitos estranhos. Além disso, os mecanismos da fagocitose eram semelhantes tanto em indivíduos jovens como em idosos. Assim, foi levantada a possibilidade de estar havendo uma redução na eficiência de processamento do antígeno com o envelhecimento (apud PRICE e MAKINODAN, 1976).

Mais recentemente, vários autores (GARDNER et al., 1981; TYAN, 1982; NIELSEN, BLOM e LARSEN, 1984 e RUD e BANERGEE, 1989) chegaram à conclusões semelhantes, em experimentos onde estavam em foco a capacidade dos macrófagos de matar bactérias e de produzir citocinas. Entretanto, outros pesquisadores (BRULEY-ROSSET e VERGNON, 1984; VETRICKA, TLASKALOVA-HOGENOVA e POSPISIL, 1985; INAMIZU, CHANG E MAKINODAN, 1985; BRADLEY, 1989 E DAVILA, 1990) notaram

que havia uma diminuição na eficiência do macrófago como apresentador de antígeno e produtor de citocinas em indivíduos idosos, quando comparados à adultos jovens.

O PAPEL DO TIMO NO ENVELHECIMENTO

Ainda no início dos anos 30, os anatomistas já notavam que determinados órgãos como baço, timo e pulmão sofriam alterações em seu peso em decorrência do avanço da idade, porém foi apenas no início dos anos 60 que a função do timo na resposta imune foi evidenciada.

A massa celular do timo se mantém estável apenas até a puberdade, quando inicia-se uma visível involução do órgão e, por volta dos 45 anos o timo mantém apenas entre 10 a 20% de sua massa celular máxima (WEKSLER, 1980). LEWIS e colaboradores (1978) relataram ainda uma outra característica do timo. Este órgão também funcionaria como uma glândula endócrina, e seus hormônios teriam um papel na diferenciação dos precursores de linfócitos T. Com a involução tímica os hormônios lá produzidos também sofriam uma queda progressiva não sendo mais possível a sua detecção após os 60 anos.

Com o declínio progressivo das funções desempenhadas pelo timo com o avanço da idade, era de se esperar que uma série de alterações fossem verificadas. Poucos linfócitos T imunocompetentes iriam se diferenciar à medida que o órgão involuísse, a resposta proliferativa de linfócitos T à mitógenos ou à antígenos iria diminuir, a hipersensibilidade tardia e a resistência a vírus e fungos estaria comprometida, haveria ainda uma perda nas funções efetoras e supressoras dos linfócitos T, que teriam reflexo em diversas funções dos linfócitos B, tais como a produção de anticorpos dependente das funções T-helper e a regulação da seleção clonal das células B, gerando o aparecimento de imunoglobulinas monoclonais no soro

(WECKSLER, 1980).

A conclusão mais óbvia seria a de que todas essas mudanças fossem devidas à redução do número de linfócitos T imunocompetentes gerados no timo, devido a sua gradativa involução. Porém WECKSLER em 1980, afirmou que apesar do que ocorria no timo com o envelhecimento, na verdade não havia diminuição relativa ou absoluta no número de linfócitos circulantes e que a diminuição na capacidade proliferativa de linfócitos de indivíduos idosos, em resposta à diversos estímulos, estaria mais relacionada a uma redução no número de linfócitos T que podiam ser ativados para proliferar.

Esses dados obtidos no início dos anos 80 corroboram com investigações realizadas mais recentemente por NIJHUIS e colaboradores (1994). Estes autores, verificaram uma redução da habilidade proliferativa e de produção de citocinas em certas subpopulações de células T, sob o estímulo da PHA ou de anti-CD3 imobilizado. Esses e outros autores (BECKMAN et al., 1991 e DE PAOLI, BATTISTIN e SANTINI, 1988) afirmaram que as mudanças no perfil das populações linfocitárias, com uma tendência à diminuição no número de células T com o fenótipo $CD4^+CD45RA^+$ (*naïve*) e um aumento na população $CD4^+CD45RO^+$ (memória), em indivíduos idosos, estaria influenciando a capacidade de resposta do sistema imune desses indivíduos. Outro fato notado por NIJHUIS et al. (1994), foi o aumento na produção de IL-4, citocina que está intimamente relacionada às células T de memória, confirmando-se portanto uma mudança não no número total mas no perfil da população linfocitária com o avanço da idade, de *naïve* para memória, o que também faria com que o sistema imune começasse a responder diferencialmente no indivíduo mais idoso. As alterações na capacidade proliferativa de linfócitos T observadas em indivíduos velhos não representariam portanto um defeito intrínseco das células T, mas sim a sua gradativa

diferenciação em direção à populações de células T CD4⁺ de memória.

Embora o número total de células T não se altere com a idade, a gradual redução no aporte para a periferia de células recém-migradas do timo em involução e o tempo de vida reduzido dessas células parece comprometer a capacidade de células T de memória em responder adequadamente aos estímulos antigênicos específicos, bem como a capacidade de engajamento do sistema imune de indivíduos velhos em novos desafios (SCOLLAY, BUTCHER e WEISSMAN, 1980 e REMARQUE et al., 1993).

A RESPOSTA INFLAMATÓRIA NO ENVELHECIMENTO

Como se sabe, o sistema imune desenvolve o seu papel na defesa dos organismos vivos de duas maneiras distintas mas, complementares: uma inespecífica (ou inata) e outra específica (ou adaptativa). Na primeira delas, a inespecífica, os principais tipos celulares envolvidos são os granulócitos (neutrófilos, basófilos e eosinófilos) e os macrófagos.

O principal mecanismo envolvido na defesa inata é o processo inflamatório. Os granulócitos são considerados células de primeira linha na defesa contra microorganismos invasores. Essas células têm as atividades fagocítica e microbicida, exercida por enzimas contidas nos grânulos citoplasmáticos. Os macrófagos também atuam nesse processo (FERREIRA, 1980), tanto fagocitando os organismos estranhos e liberando componentes citotóxicos, como auxiliando o sistema linfóide de uma maneira mais específica, processando e apresentando antígenos para linfócitos T helper, que auxiliam na produção de anticorpos por linfócitos B. Os anticorpos produzidos vão se ligar à superfície de microorganismos, facilitando a sua fagocitose por células fagocíticas que expressam receptores para Fc de imunoglobulinas (Igs) ou então, ativando a cascata do Sistema Complemento, com liberação

de anafilotoxinas que provocam um exacerbamento dos processos de inflamação (BAUMANN e GAULDIE, 1994).

As subpopulações de células T helper atuam ainda como mediadoras das respostas inflamatórias, produzindo citocinas que promovem o recrutamento de mais células fagocíticas (monócitos), ou que provocam diversas alterações no endotélio capilar, levando tanto a um aumento da resposta imune quanto da inflamação (IMHOF e DUNON, 1995).

O processo inflamatório é constituído de duas fases: a aguda e a tardia. A fase aguda inicia-se com células como os macrófagos, que através do processo de fagocitose englobam o agente infeccioso e são ativados. Os macrófagos ativados liberam uma série de citocinas, como a da família da Interleucina-1 (IL-1) e do Fator de Necrose Tumoral (TNF), que agirão tanto à nível local, sobre os endotélios vasculares e o estroma dos órgãos, como à distância, elicitando novas células, como os neutrófilos, que passam a alcançar mais facilmente o sítio inflamatório. O recrutamento celular, na fase aguda da inflamação, é principalmente decorrente de mudanças na expressão de moléculas de adesão sobre os leucócitos e sobre o endotélio, bem como do aumento de permeabilidade vascular. A permeabilidade vascular aumentada leva a um extravasamento de líquido e de células para o espaço intersticial, ocasionando o aparecimento dos sinais clássicos da inflamação: rubor, edema, calor e dor. A formação do edema, acompanhada de vermelhidão (rubor), devida ao extravasamento de eritrócitos, são os primeiros sintomas clínicos da inflamação. Em última instância, tais modificações ocorrem devido à liberação de potentes mediadores inflamatórios, de baixo peso molecular, tais como as espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e de produtos derivados do ácido aracdônico. Outros eventos podem ser citados, como a liberação de histamina ou de serotonina e do fator de ativação de plaquetas, que também alterarão a permeabilidade vascular e levarão a um

aumento de temperatura local e/ou sistêmica (calor). Finalmente, a última manifestação clínica do processo inflamatório, a dor, é mediada por moléculas como a bradicinina, derivada da cascata da coagulação (BAUMANN e GAULDIE, 1994).

Porém, essas manifestações clínicas são apenas os eventos visíveis da batalha que está sendo travada pelo organismo para debelar a infecção. À nível molecular, linfócitos, macrófagos e outros tipos celulares atuam por vários meios para livrar o organismo dos invasores.

A idéia de que as espécies reativas de oxigênio (ERO) estariam relacionadas à citotoxicidade em sistemas biológicos foi proposta pela primeira vez em 1954, por GERSCHMAN e colaboradores, que se basearam na similaridade existente entre o envenenamento pelo oxigênio e a toxicidade decorrente da exposição à radiação.

A sua alta reatividade e a sua constante produção nos organismos aeróbicos elevaram estes radicais à categoria de “vilões do envelhecimento”.

As reações envolvendo os radicais livres teriam surgido juntamente com o aparecimento dos primeiros seres vivos. À partir do momento em que o oxigênio foi utilizado como a principal fonte geradora da vida, os sistemas biológicos tiveram que passar a lidar com os seus efeitos. Mais ainda, as reações envolvendo os radicais livres teriam sido selecionadas durante a evolução dos organismos como fonte geradora da evolução, na medida em que estes seriam utilizados na produção de mutações e, mais drasticamente, provocando a morte dos indivíduos não adaptados.

Aproximadamente 90% do oxigênio consumido por um mamífero é utilizado nas mitocôndrias, pela cadeia respiratória. É possível que parte das EROs possam estar atuando na própria organela, gerando modificações e danos, porém tal atuação ainda é posta em dúvida.

Em situações fisiológicas, como nos eventos da explosão respiratória e fagocitose, observa-se a produção de espécies reativas derivadas do oxigênio ou de outros radicais livres em níveis considerados normais. Assim, acredita-se que apenas a produção acima de um certo limiar teria efeitos potencialmente deletérios, que levariam a doenças como o câncer (WISEMAN E HALLIWELL, 1996). Além disso, as células seguiriam os princípios da termodinâmica, reorganizando-se em um nível mais baixo de produção e utilização de energia. Assim, a baixa oferta de energia gradualmente resultaria no envelhecimento. As espécies reativas de oxigênio, sob esse ponto de vista teriam um efeito secundário, já que seguiriam a tendência de reorganização do sistema (REMACLE et al., 1993).

Os macrófagos, após fagocitar os microorganismos, são capazes de eliminá-los através da ação de duas vias separadas de oxidação que envolvem a síntese de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio. As espécies reativas de oxigênio são produzidas numa via metabólica denominada “explosão respiratória”. Por sua vez, o óxido nítrico (NO) é produzido na oxidação de um dos guanidino-nitrogênios da L-arginina. A formação tanto do NO* como do ânion superóxido requerem o mesmo agente redutor, o NADPH (NATHAN et al., 1979), como será descrito mais adiante.

A explosão respiratória consiste em uma série de eventos metabólicos coordenados que levam à produção de radicais livres do oxigênio e de peróxido de hidrogênio. O ânion superóxido é o produto inicial da explosão respiratória. Ele é formado pela redução monoelétrica do oxigênio, tendo o NADPH como doador específico. O complexo enzimático ativo que cataliza a geração do radical ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) à partir do O_2 é chamado de NADPH oxidase; e é composto tanto de proteínas citosólicas como de membrana. Esta via tem papel na destruição de células neoplásicas (NATHAN et al., 1979) e de micróbios

intracelulares facultativos (ALEXANDER e VIECKERMAN, 1975).

No entanto, certos microorganismos e protozoários patogênicos são capazes de parasitar intracelularmente os macrófagos, não sendo eliminados pelos produtos da “explosão respiratória” (CHANG e DWYER, 1978; RUSSEL e TALAMAS-ROHANA, 1989 e LIEW, YUN E MILLOT, 1990). Esses patógenos podem ser eliminados quando os macrófagos são ativados por produtos de linfócitos T, como por exemplo o Interferon-gama ($INF\gamma$), que induzem a expressão da enzima sintase do óxido nítrico, a qual leva a geração intracelular desse gás tóxico (GREEN et al., 1990; LIEW et al., 1990; MACKANESS, 1962 e NATHAN e HIBBS, 1991).

O ÓXIDO NÍTRICO (NO)

MITCHELL e colaboradores, em 1916, foram os primeiros a sugerir que mamíferos produziam óxidos de nitrogênio (apud MORRIS e BILLIAR, 1994), mas foi apenas em 1985 que STUEHR e MARLETTA (apud MORRIS e BILLIAR, 1994) demonstraram que macrófagos de camundongos ativados produziam NO_3^- , esses estudos foram complementados por observações de HIBBS e colaboradores (1987) (apud MORRIS e BILLIAR, 1994) relatando que o substrato para a síntese do NO_2^- e NO_3^- nos macrófagos era a L-arginina, e, que a conversão deste aminoácido em compostos nitrogenados era necessária para a citotoxicidade exercida pelos macrófagos em certas linhagens de tumores (MORRIS e BILLIAR, 1994).

O óxido nítrico é um composto intermediário, altamente instável gerado na reação de oxidação da L-arginina, para citrulina. Esse produto biossintético é uma das menores (30Da) e mais simples moléculas dos organismos vivos, porém as enzimas que regulam a sua produção,

as sintases do óxido nítrico (NOS), são uma das maiores (~300 KDa) e mais complexas. Além da L-arginina, a NOS usa como co-substratos o oxigênio molecular e o NADPH e necessita de 5 cofatores ou grupos prostéticos (FAD, FMN, calmodulina, tetrahydrobiopterina e heme) (NATHAN e XIE, 1994).

A NOS se apresenta em diferentes tecidos como diferentes isoformas e quase todos os tecidos do corpo são capazes de produzi-las quando estimulados adequadamente. Existem até hoje, purificadas e clonadas 3 isoformas que variam na sua localização subcelular, sequência de aminoácidos, regulação, tendo assim papéis funcionais diferentes. Duas das isoformas estão continuamente presentes (NOS constitutiva - cNOS) e são denominadas de isoformas I e III podendo ter um peso molecular para o monômero de 150-160 KDa. Ambas são dependentes de cálcio para transferir os elétrons do NADPH para um sítio ativo contendo heme e foram primeiramente identificadas, respectivamente, em neurônios e células endoteliais. O NO produzido servirá como um sinal molecular difusível mediando numerosos processos fisiológicos, como a vasodilatação e a neurotransmissão.

O monômero da isoforma II tem um peso molecular aparente de 130 KDa e não é produzido à menos que a sua síntese seja induzida (a reação ocorrerá no citosol de macrófagos que tenham sido estimulados por LPS bacteriano, células tumorais e citocinas a forma de dímeros), daí a denominação de sintase induzível de óxido nítrico (iNOS) e difere das outras por ser cálcio-independente, tendo sua síntese regulada pela oferta de substratos, cofatores, e inibição de produtos (MORRIS e BILLIAR, 1994).

As reações catalisadas pelas NOS iniciam-se pela oxidação de um dos guanidino-nitrogênios do aminoácido L-arginina; formando-se o radical óxido nítrico centrado no nitrogênio ($^{\bullet}\text{NO}$). Esse por sua vez reagirá com outra molécula similar, com um oxigênio e

com uma molécula de água gerando os endoprodutos acumulantes, nitrito, nitrato e o radical dióxido de nitrogênio ($^*\text{NO}_2$); essa reação termina com a doação de um átomo de oxigênio ao guanidino-nitrogênio oxidado gerando-se, assim, a citrulina (HIBSS et al., 1988, LOWENSTEIN e SNYDER, 1992 e GREEN, NACY e MELTZER, 1991). O NO/ NO_2 são liberados para o meio extracelular, desempenhando a tarefa de dilatar as artérias, como citado anteriormente, de destruir tumores e matar os parasitas intracelulares, dentre outras. A produção de óxido nítrico por essa via está sob grande controle imunológico. Sua produção é positivamente regulada pelo Interferon- γ , que age sinergicamente com o fator de necrose tumoral (TNF) e com o lipopolissacarídeo bacteriano (LPS), e é inibido por citocinas como o Fator desativador de macrófagos (FDM), os Fatores transformadores de crescimento (TGFs) (HIBSS et al., 1988 e AMES e SHIGENAGA, 1992) e pela IL-10 (CUNHA, MONCADA e LIEW, 1992). Uma vez que o NO é altamente mutagênico e tóxico ao DNA, ele vem sendo apontado por vários autores como um dos agentes do processo de envelhecimento (AMES E SHIGENAGA, 1992).

As funções dos macrófagos vêm sendo estudadas por diversos autores, na tentativa de encontrar explicações para a maior incidência e persistência de infecções em neonatos e indivíduos idosos quando comparados à adultos jovens.

Neste sentido, DING e colaboradores (1994) verificaram uma diminuição na liberação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio de macrófagos ativados por Interferon γ em indivíduos idosos, associada a uma maior susceptibilidade em contrair certos agentes infecciosos e desenvolver neoplasias. Resultados semelhantes foram encontrados por MCLACHLAN e colaboradores (1995) quando estudavam a citotoxicidade exercida por monócitos de indivíduos adultos jovens e de idosos contra linhagens celulares tumorais de

humanos (A 735) e de camundongos (L 929), bem como a produção de IL-1 e de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio por macrófagos estimulados com o LPS. Os resultados são conclusivos e demonstram que essas células perdem ou têm sua capacidade citotóxica muito reduzida, em indivíduos com idade mais avançada. Com relação aos macrófagos de neonatos, MARODI e colaboradores (1994) notaram uma baixa capacidade do IFN γ em ativá-los.

No que se refere aos eventos envolvidos nas propriedades de recirculação (linfócitos) e de emigração da corrente sangüínea (granulócitos e monócitos) em resposta às mudanças moleculares na superfície dos vasos sangüíneos (expressão de moléculas de adesão) desencadeadas por agentes quimiotáticos ou por citocinas inflamatórias, BRUCE e colaboradores (1987) verificaram que neutrófilos de crianças recém-nascidas expressavam menos receptor para CR3 (receptor para C3bi), o que pode ter relação com a menor capacidade fagocítica dessas células. ANDERSON e colaboradores (1987), relataram uma redução na expressão de MAC-1 (CD11c/ CD18), em resposta a estímulos, em neutrófilos de neonatos. Em decorrência, neutrófilos desses indivíduos apresentam uma reduzida resposta de aderência e de migração trans-endotelial (ANDERSON et al., 1990).

Diversos autores (SMITH et al., 1992 e BRUEHRER et al. 1994) verificaram ainda que granulócitos de neonatos apresentavam reduzida expressão de outra molécula de adesão importante para a migração celular, a LECAM-1 ou L - selectina. SCHIBLER e colaboradores (1993) notaram uma diminuição na produção de G-CSF em neonatos quando estimulados com LPS ou IL-1, a produção defectiva de G-CSF poderia estar relacionada com suas deficiências em regular a produção e a função de neutrófilos durante infecções bacterianas, tais como a aderência, expressão de C₃bi, quimiotaxia, levando a uma maior susceptibilidade às infecções

quando comparados com adultos.

Além disso, os eventos de produção de citocinas com atividades inflamatórias também mostraram ter influência na maior susceptibilidade de indivíduos idosos e de recém-natos em contrair e combater infecções (WILSON et al., 1980; WILSON e WESTALL, 1984; WILSON e HAAS, 1984 e CHEN, RAMSEY e BRADLEY, 1993).

No que se refere à modulação e integração das funções no sistema imune, as citocinas são um capítulo à parte. Essas moléculas têm especial importância na sinalização celular e nos eventos de diferenciação celular no sistema imune, quer seja inibindo ou estimulando determinadas respostas, pela sua capacidade de se ligar a receptores de alta-afinidade expressados nas células alvo e também por induzir sinais bioquímicos entre essas mesmas células, alterando profundamente o seu comportamento.

As etapas envolvidas na produção das citocinas são altamente controladas, levando a uma produção diferenciada das diversas citocinas, de modo a haver um enquadramento do padrão de liberação das mesmas com as necessidades do sistema, quer seja privilegiando uma resposta celular ou de produção de anticorpos (PAUL e SEDER, 1994).

Por ocorrerem modificações profundas em certos aspectos do funcionamento do sistema imune como um todo com o envelhecimento, é lógico pensarmos que alterações na produção dessas moléculas devam estar ocorrendo. De fato, ao analisarmos um dos eventos iniciais do engajamento do sistema imune nas respostas contra os invasores, a produção pelos macrófagos da interleucina -1 (IL-1), vários autores (INAMIZU, CHANG e MAKINODAN, 1985 e GON et al., 1996) notaram uma diminuição na produção dessa citocina em indivíduos idosos quando comparados à jovens. GON et al. (1996) verificaram ainda baixas concentrações de G-CSF, GM-CSF, TNF- α , IL-8 e MIP-1 no soro de pacientes idosos com

pneumonia bacteriana na fase aguda da doença e um comprometimento na capacidade dos monócitos de indivíduos idosos saudáveis (estimulados pelo LPS) em produzir G-CSF, GM-CSF, IL-1 β , TNF- α , IL-8 e MIP-1. Porém, no que se refere à produção de TNF- α , citocina importante nos eventos de exacerbação da resposta inflamatória, outros autores (CHORINCHATH et al., 1996 e HAN et al., 1995), quando estudavam os níveis dessa citocina no sangue e produzida *in vitro* por macrófagos peritoneais, respectivamente, notaram que os níveis encontrados em animais idosos aumentava significativamente.

Outra citocina que parece ter sua produção diminuída em animais mais idosos é o IFN γ , segundo CHORINCHATH e colaboradores (1996), mesmo diante de altas doses de estímulo (LPS) os animais idosos se mostravam baixos produtores em comparação aos mais jovens.

A fase aguda da inflamação normalmente dura apenas alguns dias. Porém, o processo inflamatório pode, em alguns casos, se estender por períodos mais longos (fase crônica), e pode tanto levar à recuperação dos tecidos (processos de reparo), como desencadear processos patológicos, como nas doenças inflamatórias crônicas, de natureza autoimune (BAUMANN e GAUNDIE, 1994 e STEEL e WHITEHEAD, 1994).

Como exposto acima, a resposta inflamatória não é a única responsável pela resolução de infecções. Ela ocorre conjuntamente com a resposta imune e, muitos desses fenômenos estão interligados. O resultado final, geralmente, é a recuperação do organismo afetado, através da eliminação do agente causal e a subsequente cura.

Contudo, a maior parte do que se conhece sobre os eventos que ocorrem durante uma resposta inflamatória em modelo experimental, e mesmo em humanos, é derivada de estudos realizados com indivíduos na faixa etária chamada de adulto jovem (animais entre 8 e 12

semanas de idade e humanos após a puberdade e antes da maturidade). Alguns estudos experimentais sobre o envelhecimento do sistema imune incluem grupos mais jovens (4 semanas de idade) e também bem mais velhos (48 a 100 semanas de idade). Entretanto, estudos sistemáticos, isto é, realizando um acompanhamento das alterações observadas dentro do sistema imune com o avanço da idade, e mais particularmente da resposta inflamatória, no decorrer de toda a vida dos organismos são inexistentes.

Até a ocasião em que o presente trabalho foi iniciado (1995) nada havia sido relatado na literatura especializada a respeito de alterações na capacidade dos organismos de produzir radicais livres de nitrogênio com o envelhecimento, embora já se soubesse que níveis reduzidos de citocinas liberadas por células do sistema imune, que influenciam positivamente a sua produção, se alterasse no decorrer da vida dos organismos (DAVILA et al., 1990).

Em 1997, KISSIN e colaboradores publicaram pela primeira vez dados mostrando que macrófagos de animais velhos reduzem a sua capacidade de expressar a iNOS, sob estímulo exógeno, e conseqüentemente de produzir o NO. Entretanto, o momento exato em que esse fenômeno toma lugar no organismo não foi claramente definido, visto que nesse estudo foram empregados apenas dois grupos etários, isto é animais de 4 e de 48 semanas de idade definidos, respectivamente, como jovens e velhos.

Assim, no presente trabalho, temos por objetivo realizar um estudo sistemático, empregando modelo experimental, que vise esclarecer aspectos relevantes do desenvolvimento da resposta inflamatória durante o processo do envelhecimento.

OBJETIVOS

No presente trabalho foram estudadas a produção de radicais livres de nitrogênio (produção de NO) e de citocinas inflamatórias por células peritoneais aderentes de camundongos BALB/c, desde os primeiros dias de vida até a sua morte natural, em grupos etários definidos. Para tal serão realizadas as seguintes abordagens:

1- Verificar as possíveis alterações na produção de NO células residentes e elicitadas pelo tioglicolato, estimulados *in vitro* por diferentes doses de LPS e IFN- γ combinadas,

2- Detectar a expressão da sintase de óxido nítrico induzível (iNOS) por macrófagos de camundongos, estimulados *in vitro* por uma dose definida como ótima de LPS e IFN- γ combinadas,

3- Verificar o perfil de produção das citocinas IL-1, IL-10 e TNF α por células residentes e elicitadas pelo tioglicolato, estimulados *in vitro* por uma dose ótima de LPS.

MATERIAL E MÉTODOS

1. ANIMAIS

Foram utilizados camundongos da linhagem BALB/c, machos e fêmeas, com 1-15 dias, 4, 8; 16, 24, 32, 40, 48, 72 e 96 semanas e, camundongos da linhagem nude de até 8 semanas de idade. Os animais foram obtidos do Centro Multiinstitucional de Bioterismo (CEMIB/UNICAMP) com até 8 semanas de idade e, mantidos no biotério do Departamento de Microbiologia e Imunologia (DMI), em ambiente com temperatura controlada, com água e ração em livre demanda até sua utilização nos experimentos.

2. DOSAGEM DE NO₂⁻ EM CÉLULAS PERITONEAIS ADERENTES

2.1- Coleta e cultura de células peritoneais

Células residentes ou elicitadas pela administração de tioglicolato a 3% (3,0 ml/cavidade, 4 dias antes do uso), das cavidades peritoneais de camundongos da linhagem BALB/c, com as idades acima referidas, foram coletadas assepticamente com 0,5 a 3,0 ml de meio RPMI 1640. Os lavados peritoneais foram depositados, individualmente, em tubos estéreis, que foram mantidos em banho de gelo. Cada grupo de animais era constituído por 3 camundongos.

As células foram sedimentadas por centrifugação a 1200 rpm, 10 min, em centrífuga refrigerada a 4°C (REVAN), e a seguir ressuspensas em meio de cultura RPMI. Após contagem em câmara de Neubauer, a concentração de células foi ajustada de modo a se obter suspensões contendo 1×10^6 céls/ml. Para os camundongos de 1-15 dias, elicitados ou não com o tioglicolato, só foi possível obter esse número de células realizando-se um “pool” dos

lavados peritoneais de todos os animais do grupo. As suspensões padronizadas de células foram então semeadas em placas de 24 poços (CORNING), na densidade de 1×10^6 céls/ml/poço, e incubadas por 2 horas, a 37^0 C, em estufa umidificada com atmosfera de 5% de CO_2 . Após a incubação, as monocamadas foram lavadas com meio de cultura para a remoção das células não aderentes.

2.2.- Estimulação das monocamadas com LPS e $IFN\gamma$ e obtenção de sobrenadantes.

As monocamadas de células aderentes foram estimuladas a secretar óxido nítrico, segundo indicações de DING et al. (1988), adicionando-se a cada cultura 20 ng/ml de LPS e 56 UI/ml de $IFN-\gamma$, diluídos em meio RPMI contendo 10% de SFB e antibióticos.

As placas foram então incubadas a 37^0 C, por período de 72 h em estufa umidificada, com atmosfera de 5% de CO_2 . Aliquotas de 50 μ l dos sobrenadante de cada cultura foram então transferidos, em triplicatas, para uma placa de 96 poços (NUNC, NUNCLON).

2.2.1. Curva Dose- Resposta para LPS e $IFN\gamma$

Nos experimentos para a determinação da curva de dose-resposta da produção de NO, utilizaram-se células de camundongos BALB/c com 2, 4, 8, 32 e 72 semanas, elicitados ou não pelo tioglicolato. Todas as combinações possíveis das seguintes doses dos estímulos foram usadas: 2, 20, 200 ou 2000 ng/ml de LPS e 5,6; 56 ou 560 UI/ml de $IFN-\gamma$, procedendo-se como no item anterior para incubação e coleta de sobrenadantes.

2.2.2. Curva de Tempo de Incubação com os estímulos:

Para a determinação da curva temporal de liberação de NO foram utilizados células provenientes de camundongos BALB/c com 8, 32 ou 72 semanas, previamente elicitados ou não pelo tioglicolato.

A obtenção das monocamadas e a estimulação das mesmas foi feita como descrito no item 2.2.

Após 6, 12, 24, 48 e 72 horas, 50µl dos sobrenadantes de cultura foram transferidos, em triplicata, para placas de cultura de 96 poços (Corning) para as leituras espectrofotométricas.

2.3.- Dosagem de NO₂⁻

As dosagens de nitrito foram realizadas segundo indicações de GREEN et al. (1982). Brevemente: 50µl do reagente de Griess (1% de sulfanilamida em ácido fosfórico a 5% e 0,1% de dihidroclorido de naftiletlenodiamino em água destilada) foram acrescentados a cada sobrenadante de cultura, distribuídos previamente em placas de 96 poços. Após agitação das placas, realizou-se as leituras espectrofotométricas em leitor de ELISA (Multiskan II, Flow Laboratories Inc., USA), a 540 nm, usando-se como padrão soluções de nitrito de sódio (320, 160, 80, 40, 20, 10 e 5µM). Os resultados foram expressos em µM de nitrito/ 1x10⁶céls, em comparação com a curva padrão de nitrito de sódio.

3. CULTURA DOS HIBRIDOMAS E OBTENÇÃO DOS ASCITES

O hibridoma XT22.11(anti-TNF-α de camundongo) foi descongelado em meio RPMI completo (RPMI 1640 contendo 12,5mM de HEPES; 2µl/l de 2-mercaptoetanol e 10% de

Soro Fetal Bovino) e cultivado em garrafas de cultura (CORNING) até a obtenção de uma monocamada homogênea de células, quando então foram coletadas e transferidas para tubos de centrífuga. Uma alíquota da suspensão foi retirada para contagem em câmara de Neubauer, ajustando-se a concentração celular para 2×10^7 células/ml.

Camundongos da linhagem BALB/c nu/nu (camundongos nudes), que haviam sido injetados com 1,0 ml de solução de Nujol 7 dias antes, receberam uma injeção intraperitoneal contendo 1×10^7 células XT 22.11.

Cerca de 12 a 15 dias após a inoculação do hibridoma, o líquido ascítico produzido por estes camundongos foi retirado de maneira asséptica, centrifugado por 10 min à 1500 rpm e o sobrenadante obtido após centrifugação foi estocado a -20°C até o uso.

4. CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE DOS ASCITES

A purificação do líquido ascítico foi feita em coluna contendo aproximadamente 4,0 ml de gel de Sepharose-Proteína G, seguindo a metodologia indicada por EY et al. (1978) para a purificação de imunoglobulinas pela Proteína A, com algumas modificações. Resumidamente: Após ter seu pH ajustado com tampão fosfato de sódio 0,1M pH 8,5, cerca de 5,0 ml de ascite foram aplicados à coluna, previamente equilibrada com o mesmo tampão. Após 30min de incubação, à temperatura ambiente e com agitação ocasional, procedeu-se a eluição dos componentes do ascites não adsorvidos à matrix, utilizando-se como eluente o tampão fosfato de sódio 0,1M pH 8,5, num fluxo de 30 ml/hora e colhendo-se 5,0ml por tubo. A eluição foi acompanhada através da leitura espectrofotométrica a 280 nm até que se obtivesse uma densidade óptica inferior a 0,05 nas amostras coletadas.

Em seguida, foi aplicado à coluna tampão Glicina-HCl 0,1M pH 2,8, permitindo-se

assim que toda IgG adsorvida à coluna de Sepharose fosse liberada. O líquido foi colhido em tubos contendo um volume de tampão Tris-HCl 1M pH 8,5 suficiente para neutralizar 5,0 ml do tampão de eluição. A eluição das amostras foi feita com a coluna aberta (fluxo máximo) e a densidade óptica das amostras a 280 nm foi verificada. Os tubos que apresentaram as D.O. maiores foram reunidos em “pool” e dialisados contra PBS 0,05M pH 7,2.

5. DOSAGEM DE PROTEÍNAS

A concentração proteica das amostras obtidas na cromatografia de afinidade foram verificadas através do método de LOWRY modificado por HARTREE (1972) utilizando-se como padrão 50µg/ml de BSA previamente dosado.

As leituras das amostras a serem analisadas foram feitas em espectrofotômetro à 650 nm utilizando-se como branco solução de NaCl 0,15M.

6. DOSAGEM DAS CITOCINAS INFLAMATÓRIAS: IL-1, TNF α e IL-10

6.1.a. Preparo dos sobrenadantes de células para dosagem de TNF α e IL-1 α

As células do lavado peritoneal de camundongos de 1, 2, 8, 32, 72 e 96 semanas, coletadas em meio RPMI, foram colocadas à aderir em placas de Petri (Falcon) por 2h a 37^o C, em estufa umidificada contendo 5% de CO₂. As suspensões obtidas de animais com 1 e 2 semanas de idade ou daqueles não estimulados com tioglicolato foram semeadas em placas de Petri de 60 x 15 mm (2-3x10⁶/2,5 ml/placa). As demais suspensões, obtidas de animais previamente estimulados com tioglicolato, foram semeadas em placas de Petri de 100x 20mm (1x10⁷/5,0 ml/placa). Transcorridas 2 h, as placas foram lavadas com salina tamponada, pH 7,2 (PBS) para a retirada das células não aderentes.

Nas placas utilizadas para a produção de IL-1, o meio de incubação foi substituído

por meio RPMI com 10% SFB e antibióticos acrescido de 1µg/ml de LPS, e imediatamente retornadas à estufa para uma segunda incubação de 18hs.

Nas placas utilizadas para a produção do TNF, o meio de incubação foi também substituído por meio RPMI com 10% de SFB e antibióticos, porém contendo 5 µg/ml de LPS. Após 30 minutos de incubação com o LPS, as placas foram lavadas com PBS para a remoção da endotoxina. As monocamadas foram reincubadas com meio contendo 10% de soro fetal bovino por mais 30 minutos, quando os sobrenadantes foram transferidos para placas de ELISA previamente sensibilizadas como será descrito abaixo.

6.1.b. Preparo dos sobrenadantes de células para dosagem de IL-10

As células do lavado peritoneal de camundongos de 2, 8 e 96 semanas, previamente elicitados com o tioglicolato, foram preparadas como descrito nos itens 2.1 e 2.2., porém o estímulo usado para a indução da produção da citocina foi o LPS na concentração de 2µg/ml. Após 72h de incubação os sobrenadantes foram coletados e estocados a – 20 ° C, até a data do uso.

6.2. ELISA para TNF-α

Placas de microtitulação (“enhanced protein binding”, Sigma) foram sensibilizadas com 50µl do anticorpo monoclonal anti-TNFα (XT 22.11) na concentração de 10µg/ml, diluído em tampão carbonato-bicarbonato de sódio, 0,02M, pH 9,2, por uma hora à 37°C e “overnight” a 4°C. O excesso de anticorpo não adsorvido foi removido e a placa lavada três vezes com PBS, contendo 0,05% de Tween 20 (PBS-Tw). Após a secagem das placas, por inversão sobre papel absorvente, os sítios reativos remanescentes foram bloqueados pela

adição a cada poço de 200 µl de uma solução de leite em pó desnatado (Molico, Nestlé) a 5%, em PBS pH 7,2 (PBS-Mo) e incubando-se as placas por uma hora à 37°C.

Na etapa seguinte, as amostras foram adicionadas às placas (50µl/poço) que foram incubadas por 1 hora a 37° C e “overnight” a 4°C. Após a lavagem, foram adicionados a cada poço da placa 50µl de um soro de coelho anti-mrTNFα (produzido em nosso laboratório; CECÍLIO et al., 1997), diluído a 1:200 em PBS-Mo. As placas foram lavadas por 3 vezes e, a seguir, incubadas por 1 hora, a 37° C, com o conjugado (Ig de carneiro anti Ig de coelho conjugada com peroxidase; preparado em nosso laboratório) na diluição de 1:2000. Após a lavagem das placas, acrescentou-se a cada poço 50 µl do substrato (0,03% de H₂O₂ e 0,1 mg de ortofenilenodiamino/ ml de tampão citrato/fosfato de sódio 0,05M, pH 5,0). Após 30min, a reação foi interrompida pela adição de uma solução de H₂SO₄ a 4N (25µl/poço). A leitura colorimétrica foi realizada a 492 nm, em leitor de ELISA (MULTISKAN II, Flow Laboratories, Inc. USA), utilizando-se a 1ª coluna, contendo apenas o substrato neutralizado, como branco. A concentração de TNF nas amostras foi calculada por comparação com os resultados da curva padrão obtida com concentrações conhecidas de mrTNF-α (0-25 ng/ml; Genentech Inc).

6.3. ELISA para IL-1

As dosagens de IL-1α foram feitas utilizando-se um Kit adquirido comercialmente (Intertest1αX™ Mouse IL-1α ELISA Kit, Genzyme; # 1900-01) e seguindo-se o protocolo indicado pelo fabricante.

6.4. ELISA para IL-10

A quantificação de IL-10 foi feita com o kit Endogen (Endogen Inc., EM2-IL-10), seguindo-se o protocolo indicado pelo fabricante para a realização do teste.

7. WESTERN BLOT

A técnica de “immunoblotting” ou “Western blot”, descrita por TOWBIN e colaboradores (1979), foi aplicada para a detecção da produção da Sintase de óxido nítrico por células aderentes de camundongos de diferentes faixas etárias, conforme descrito a seguir.

7.1. Preparo das amostras

As células foram obtidas do lavado peritoneal dos camundongos pré-estimulados, 4 dias antes, com 3,0 ml de meio tioglicolato a 3%.

Para a preparação das monocamadas de células foram empregadas placas de Petri descartáveis de 100x20mm (CORNING), nas quais foram semeadas 1×10^7 células em um volume de 5,0ml de meio RPMI contendo 10% de SFB e 50 ug/ml de Gentamicina. As placas foram incubadas por 2 horas a 37⁰ C, em estufa umidificada contendo 5% de CO₂. Após a remoção das células não aderentes por lavagem com PBS pH 7,2 estéril, as monocamadas foram incubadas com o meio de cultura contendo 20 ng/ml de LPS e 56 UI/ml de IFN γ , por 12 horas, a 37⁰C, em estufa com atmosfera de 5% de CO₂. A seguir, as células foram lavadas 3 vezes com PBS, pH 7,2 para a remoção dos estímulos e do excesso de proteínas contidas no meio de incubação. Um mililitro de tampão de amostra para eletroforese (125 mM de Tris-HCl pH6,8, 2% SDS, 5% de glicerol, 0,003% de azul de bromofenol e 1% de β -mercaptoetanol) foi então adicionado a cada placa de Petri e com o auxílio de “cell scrapers” as células lisadas

foram removidas e, a seguir, transferidas para tubos de centrifuga tipo “eppendorf”. Os lisados foram fervidos por 5 min a 100⁰ C, em banho-maria, e a seguir centrifugados por 5 min, a 10.000 rpm, em microcentrifuga (Centrifuga Eppendorf 5415 C) para a remoção dos debris celulares. Os sobrenadantes foram coletados e utilizados imediatamente após a sua obtenção para a separação eletroforética de proteínas.

7.2. Eletroforese

A separação dos polipeptídeos contidos nas diferentes amostras obtidas foi realizada através de eletroforese em gel de poliacrilamida, contendo Dodecil sulfato de Sódio (SDS-PAGE), de acordo com indicações de LAEMLI (1970). De cada lisado obtido foram aplicados 25 ul por canal da placa de eletroforese, contendo gel de poliacrilamida a 7,0% (gel de separação) e gel de empilhamento a 3%. A eletroforese foi conduzida em equipamento MiniProteanII (BioRad), de acordo com recomendações do fabricante. A corrente foi ajustada para 25mA e a corrida foi realizada em 2 horas.

Após a sua separação, as proteínas foram transferidas, eletroforéticamente, para membrana de nitrocelulose (S&S) em equipamento Mini transblotting (BioRad), por 2 horas, a 180 mA, em Tris-HCl 25mM, glicina 192mM, 1% de SDS e 18,4% de etanol. A eficiência da transferência foi verificada pela coloração dos géis por 30 min em metanol/ácido acético/água (5/1/15, v/v/v) contendo 0,25% de Coomassie Brilliant Blue R (Bio-Rad) e descorado em ácido acético/metanol/água (3/2/35, v/v/v).

7.3. Detecção da iNOS

A detecção da iNOS nos diferentes lisados foi feita através de reação com o anticorpo

monoclonal anti-macNOS do isotipo IgG_{2a} de camundongo, clone 6 (Transduction Laboratories, KY, USA), após ter sido feito o bloqueio da membrana com 5% de leite em pó desnatado (Molico, Nestlé). Na reação, o anticorpo monoclonal foi utilizado na concentração final de 1 ug/ml, em PBS, pH 7,2, e incubado com o material antigênico à temperatura ambiente, por 1 hora e a seguir a 4^o C por 18 horas. Após a lavagem (3 vezes com PBS pH 7,2 contendo 0,005% de Tween 20, PBS-Tw), a fita de nitrocelulose foi incubada por 2 horas a 37^o C com o anticorpo secundário conjugado à peroxidase (preparado em nosso laboratório), diluído a 1:500 em PBS, pH 7,2. A reação foi revelada pela adição da mistura de substrato/cromógeno (0,003% de H₂O₂ e 1mg/ml de diaminobenzidina em tampão citrato-fosfato de sódio 0,1M, pH 5,0) à fita de nitrocelulose, previamente lavada. A reação de revelação foi interrompida, logo após o aparecimento das bandas marcadas, pela lavagem da membrana em água corrente.

RESULTADOS

1. Níveis de NO liberados *in vitro* por células aderentes de camundongos

A liberação de óxido nítrico por células peritoneais de camundongos de 1-15 dias, 4, 8, 16, 24, 32, 40, 48 e 72 semanas de idade foi investigada. Foram empregadas células provenientes de animais naive ou elicitados com tioglicolato, estimuladas *in vitro* com LPS+IFN- γ . Experimentos utilizando células elicitadas só puderam ser realizados em animais com idade igual ou superior a 7 dias. Animais mais jovens não suportaram tal tratamento na ausência das mães. O método descrito por GREEN et al. (1988), utilizando o reativo de Griess, foi empregado para a detecção do nitrito, metabólito estável do NO. Foram realizados até 3 experimentos de cultivo celular, nos quais a maioria dos grupos etários estavam representados. Os resultados obtidos nesses experimentos estão mostrados nas tabelas 1, 2 e 3, e foram expressos como a concentração média em μMol de NO_2^- produzido por 10^6 células aderentes, obtidas de cavidades peritoneais dos animais de cada idade estudada.

A tabela 1 mostra que a produção de NO por células residentes de camundongos naive inicia com valores de $57,30\mu\text{Mol}$ de NO_2^- , e mantém-se com uma média de $59\mu\text{Mol}$ até por volta de 15 dias. Entretanto, as células provenientes da cavidade peritoneal de camundongos com 30 dias até 48 semanas de idade, não apresentaram quantidades detectáveis de NO. As células da cavidade peritoneal desses animais só foram responsivas aos estímulos empregados, produzindo quantidades mensuráveis de NO, quando provenientes de animais previamente estimulados com tioglicolato. Nos animais muito velhos (72 semanas de idade) também foi possível detectar a produção de NO em sobrenadantes de células aderentes não elicitadas, porém os níveis de NO produzidos pelos animais mais velhos foram inferiores à

média produzida pelos animais neonatos.

Tabela 1- Influência da idade sobre e a produção de NO por células aderentes dos lavados peritoneais de camundongos BALB/c .

GRUPO ETÁRIO	IDADE (Dias)	PRODUÇÃO DE NO ($\mu\text{Mol NO}_2^-/1 \times 10^6$ céls \pm EPM)*	
		Células Residentes	Células Elicitadas
NEONATO	01	57,30 \pm 12,85	ND
	02	60,28 \pm 4,7	ND
	03	101,20 \pm 7,66	ND
	04	65,11 \pm 10,48	ND
	05	137,87 \pm 9,79	ND
	06	50,37 \pm 1,88	ND
	07	70,78 \pm 9,07	54,94 \pm 5,81
	08	56,42 \pm 2,74	ND
	09	78,51 \pm 12,74	ND
	10	50,78 \pm 5,61	ND
	11	53,38 \pm 6,28	ND
	12	13,60 \pm 2,63	ND
	13	30,66 \pm 7,20	ND
	14	46,17 \pm 12,24	ND
	15	38,64 \pm 9,33	63,88 \pm 5,34
ADULTO JOVEM	(Semanas)		
	04	<5,0	36,47 \pm 5,42
	08	<5,0	25,59 \pm 4,09
	16	<5,0	26,94 \pm 5,29
ADULTO VELHO	24	<5,0	31,39 \pm 4,46
	32	<5,0	18,79 \pm 1,7
	40	<5,0	31,31 \pm 3,42
	48	<5,0	46,90 \pm 3,55
	72	33,22 \pm 0,29	65,47 \pm 8,3

As células aderentes foram cultivadas na presença de 56UI/ml de IFN- γ e 20ng/ml de LPS por 72hs. O NO liberado foi dosado nos sobrenadantes, utilizando-se o reagente de Griess. Os resultados representam a concentração média de NO₂⁻ obtido de experimentos realizados em triplicata (até três experimentos por grupo etário) ND = não determinado EPM = Erro Padrão da Média.

A análise das concentrações médias de NO₂⁻ detectadas nos sobrenadantes de cultura de células provenientes de diferentes grupos experimentais revela diferenças significativas nos níveis de NO secretados, em relação a idade e tratamentos recebidos. As tabelas 2 e 3

resumem esses resultados, mostrando que as células provenientes de cavidades peritoneais de camundongos naive (células residentes) de 1 a 15 dias (neonatos), estimulados por LPS+IFN- γ , foram capazes de produzir em média $59,08 \pm 3,31 \mu\text{Mol}$ de $\text{NO}_2^- / 10^6$ células, enquanto que as células residentes de camundongos com idade igual ou superior a 4 semanas, exceto os grupos etários muito velhos (72 e 96 semanas de idade), não se mostraram sensíveis aos estímulos empregados, apresentando níveis de $\text{NO}_2^- < 5,0 \mu\text{Mol}/10^6$ células, isto é, abaixo dos níveis de detecção do método utilizado. O mesmo ocorre quando não utilizamos nenhum estímulo(dados não mostrados).

As células residentes de animais com idade entre 4 e 48 semanas de idade só responderam ao LPS+IFN- γ quando provenientes de camundongos previamente elicitados com tioglicolato, liberando em média $29,35 \pm 2,72$ e $61,04 \pm 9,01 \mu\text{Mol}$ de NO_2^- nos animais adultos jovens e velhos, respectivamente.

Tabela 2. Concentração média, por faixa etária, de NO_2^- liberado por células aderentes:

FAIXA ETÁRIA	$\mu\text{Mol}/1 \times 10^6$ céls de NO_2^-	
	Média \pm EPM	
	Células Residentes	Células Elicitadas
Neonato (1-15 dias)	$59,08 \pm 3,31$	ND
07 dias	$70,78 \pm 9,07$	$54,94 \pm 5,81$
15 dias	$38,64 \pm 9,33$	$63,88 \pm 5,34$
Adulto Jovem	$< 5,0$	$29,35 \pm 2,72$
Adulto Velho	$7,50 \pm 2,39$	$61,04 \pm 9,01$

As células aderentes foram cultivadas na presença de 56UI/ml de IFN- γ e 20ng/ml de LPS por 72hs. O NO liberado foi dosado nos sobrenadantes, utilizando-se o reagente de Griess. Os resultados representam a concentração média de $\text{NO}_2^- / 10^6$ células

ND= não determinado EPM= Erro Padrão da Média.

Tabela 3. Comparações dos níveis de NO liberado por células peritoneais de camundongos BALB/c das diferentes faixas etárias, estimulados com tioglicolato.

FAIXA ETÁRIA	$\mu\text{Mol NO}_2^-/10^6$ cels Média \pm EPM						
	Células Elicitadas	Estatística					
Neonato (07 dias)	54,94 \pm 5,81	54,94 \pm 5,81	54,94 \pm 5,81	54,94 \pm 5,81			
Neonato (15 dias)	63,88 \pm 5,34	63,88 \pm 5,34			63,88 \pm 5,34	63,88 \pm 5,34	
Adulto Jovem (4-24 sem)	29,35 \pm 2,72		29,35 \pm 2,72		29,35 \pm 2,72		29,35 \pm 2,72
Adulto Velho (32-72 sem)	61,04 \pm 9,01			61,04 \pm 9,01		61,04 \pm 9,01	61,04 \pm 9,01
p		0,283	0,005	0,573	< 0,001	0,788	0,002
t		1,1341	3,9910	0,5697	5,7675	0,2709	3,3678

As células aderentes foram cultivadas na presença de 56UI/ml de IFN- γ e 20ng/ml de LPS por 72hs. O NO liberado foi dosado nos sobrenadantes, utilizando-se o reagente de Griess. Os resultados representam a concentração média de $\text{NO}_2^- /10^6$ cels. EPM = Erro Padrão da Média

t = coeficiente do teste

p = nível de significância

II. Influência das doses de LPS e IFN γ na produção do óxido nítrico: Curva dose-resposta

Na figura 1 estão representados os dados obtidos quando as células aderentes obtidas de camundongos de diferentes idades, elicitados pelo tioglicolato, foram estimuladas *in vitro* com diferentes combinações de doses de LPS+IFN- γ . Como é possível notar, em todas as idades estudadas (2; 4; 8; 32 e 72 semanas), quanto maiores foram as doses dos estímulos utilizados, maiores foram os níveis de NO presentes nos sobrenadantes da cultura. Pode-se notar também que existe uma relação entre a idade dos animais e a capacidade de produzir o óxido nítrico, sendo que nas doses mais elevadas de estímulos (560 unid de IFN- γ + 2000 ng de LPS) esse resultado fica mais claramente observável, isto é, animais com 2, 4, 8 e 32 semanas de idade produziram quantidades de NO que variaram entre 150 a 200 $\mu\text{M}/10^6$ células,

enquanto que animais velhos (72 semanas) atingiram valores médios de $100\mu\text{M}/10^6$ células. Mas, de qualquer forma, as células provenientes de animais de todas as idade estudadas, elicitados com o tioglicolato, foram capazes de secretar níveis bastante elevados de NO, mesmo quando se empregou as menores quantidades dos estímulos *in vitro*.

Uma capacidade diferenciada de produção de NO, em resposta aos estímulos empregados *in vitro*, também pode ser notada nas células aderentes obtidas de animais *naive*. Conforme relatado acima, e agora confirmado, as células provenientes de camundongos com até duas semanas de idade apresentaram uma resposta bem elevada de produção de NO (acima de $50\mu\text{M}/10^6$ células), nas várias combinações de dose de IFN+LPS usadas nos experimentos. Células coletadas de camundongos *naive* com 4 e 8 semanas de idade, submetidas às mesmas condições experimentais, não apresentaram níveis detectáveis de NO nos sobrenadantes das culturas estimuladas com qualquer das combinações de doses de IFN+LPS empregadas (valores inferiores à $5\mu\text{M}$ NO, dados não mostrados).

Níveis de NO ligeiramente superiores àqueles do limite de detecção do método foram possíveis de ser observados quando se empregou células de camundongos *naive* de 32 semanas, estimuladas com as doses mais elevadas de IFN+LPS (560 unid/ml e 2000ng/ml, respectivamente), isto é, encontrou-se até $10\mu\text{M}$ de NO/ 10^6 células. O mesmo ocorreu quando se usou as células de animais com 72 semanas de idade, com qualquer combinação de doses dos estímulos *in vitro*. Neste caso, encontrou-se quantidades de NO que variaram entre 7,0 e $14\mu\text{M}$ de NO/ 10^6 células.

O estímulo que parece ter influência maior na produção de NO, nas idades estudadas, é o LPS, tanto nos animais previamente elicitados como nos *naive*, pois para uma mesma dose de IFN γ doses crescentes do lipopolissacarídeo produziram um aumento nos níveis de NO.

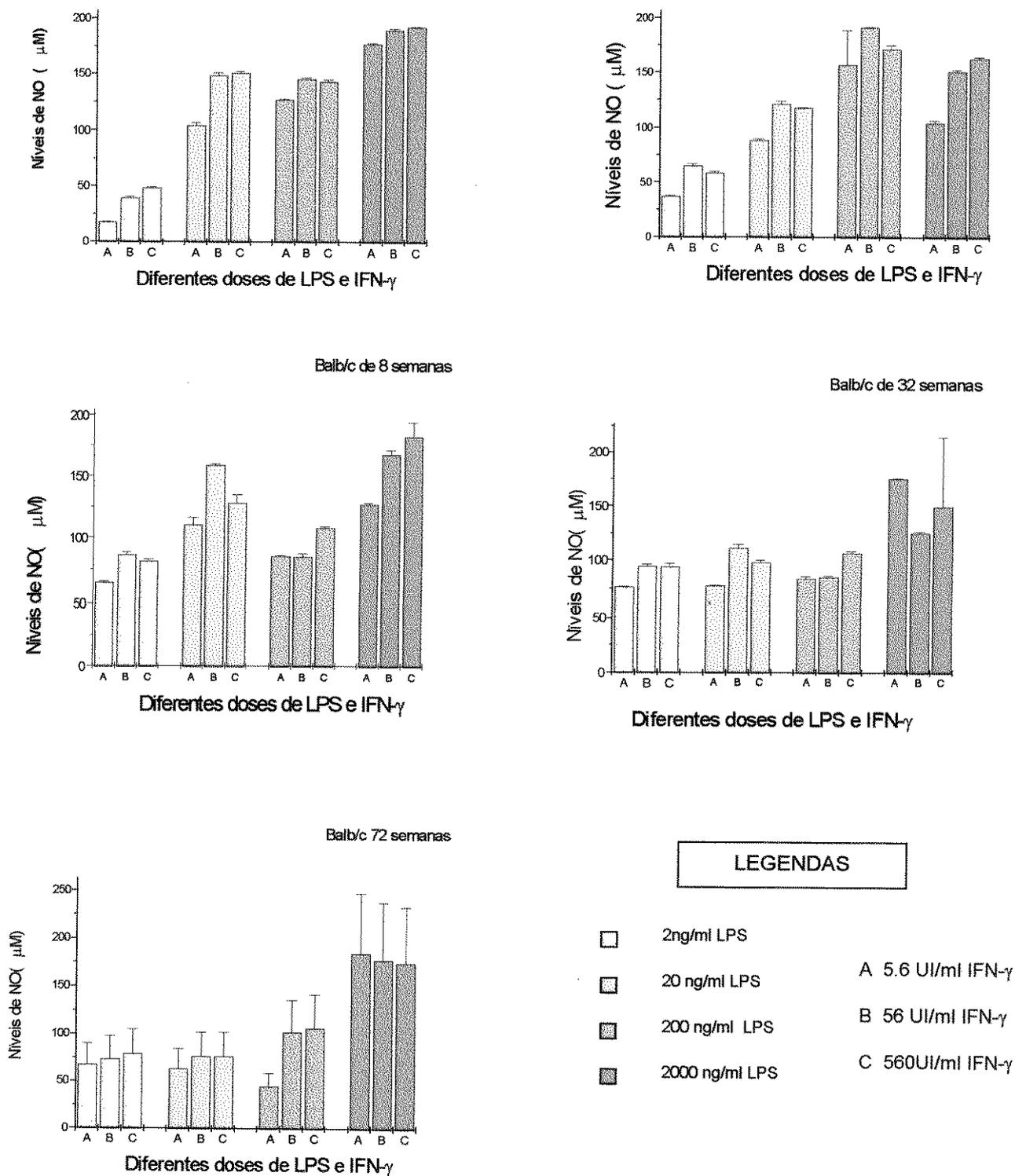
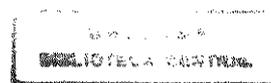


Figura 1: Influência das doses de LPS e IFN γ na produção de óxido nítrico por células aderentes peritoneais de camundongos previamente elicitados pelo tioglicolato das diferentes faixas etárias indicadas na figura. As células aderentes foram cultivadas na presença de doses crescentes de LPS (2, 20, 200 e 2000 ng/ml) e de IFN- γ (5,6, 56 e 560 UI/ml), por 72 horas e o NO liberado foi dosado nos sobrenadantes pelo reagente de Griess. Os resultados foram representados como média \pm E.P.M. de NO produzido por 10^6 células.



III- Influência dos tempos de incubação com os estímulos na produção do óxido nítrico:

Curva temporal

As figuras 2 e 3 representam a influência do tempo de incubação com os estímulos (56 U/ml de IFN- γ e 20ng/ml de LPS) na produção de óxido nítrico por células peritoneais aderentes obtidas respectivamente de camundongos estimulados ou *naive*.

A figura 2 mostra que, apesar de ser possível detectar a produção de óxido nítrico pelas células provenientes de animais previamente elicitados pelo tioglicolato desde 24 horas após da adição dos estímulos, os maiores níveis de produção em todas as faixas etárias estudadas foram encontrados após 72 horas. É possível notar novamente que há um aumento na produção do NO em função do avanço da idade.

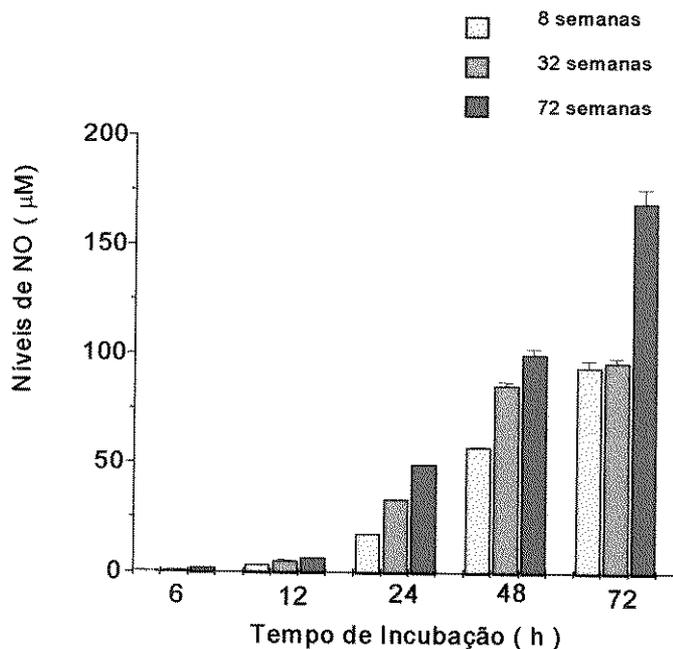


Figura 2: Influência das doses de LPS e IFN γ na produção de óxido nítrico por células aderentes peritoneais de camundongos previamente elicitados pelo tioglicolato das diferentes faixas etárias indicadas na figura. As células aderentes foram cultivadas na presença de 56UI/ml de IFN- γ e 20ng/ml de LPS. O NO liberado foi dosado nos sobrenadantes, coletados nos intervalos de tempo indicados na figura, utilizando-se o reagente de Griess. Os resultados foram representados como média \pm E.P.M. de NO produzido por 10^6 células.

A figura 3 resume os resultados obtidos quando se utilizou células coletadas de camundongos naive. É possível mais uma vez observar que, das idades representadas na figura, apenas os sobrenadantes das células de camundongos com 72 semanas de idade, apresentam níveis de NO dentro do limite do método empregado para a sua detecção.

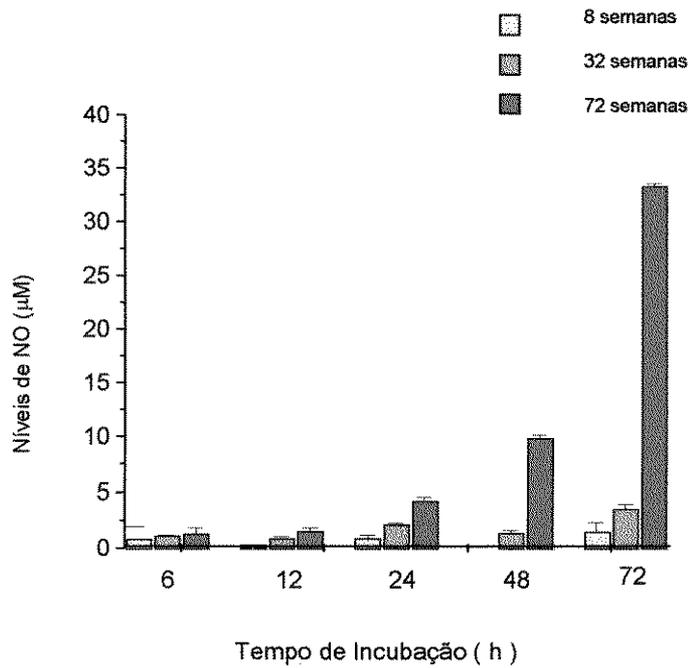


Figura 3: Influência do tempo de incubação na produção de óxido nítrico por células aderentes peritoneais obtidas de camundongos naive, das faixas etárias indicadas na figura. As células foram cultivadas na presença de 56UI/ml de IFN- γ e 20ng/ml de LPS. O NO liberado foi dosado nos sobrenadantes, coletados nos intervalos de tempo indicados na figura, utilizando-se o reagente de Griess. Os resultados foram representados como média \pm E.P.M. de NO produzido por 10^6 células.

IV- Expressão da iNOS por macrófagos peritoneais de camundongos naive e elicitados

A detecção da produção da sintase de óxido nítrico por células peritoneais residentes ou elicitadas pelo tioglicolato, obtidos de camundongos de diferentes faixas etárias, foi investigada através de “immunoblot”.

Os resultados expressos na figura 4 mostram a presença da enzima iNOS nos lisados obtidos de células peritoneais de animais jovens, com até 8 semanas de idade, elicitados ou não com o tioglicolato e estimulados *in vitro* com LPS+IFN- γ (canais 3, 4, 5, e 6). Nos animais mais velhos (32 e 72 semanas) só foi possível detectar a enzima nos lisados provenientes dos animais previamente estimulados com o tioglicolato (canais 7 e 9, respectivamente). Nos lisados obtidos de camundongos naive de 32 e 72 semanas de idade não foram observadas a banda correspondente à iNOS (canais 8 e 10, respectivamente).

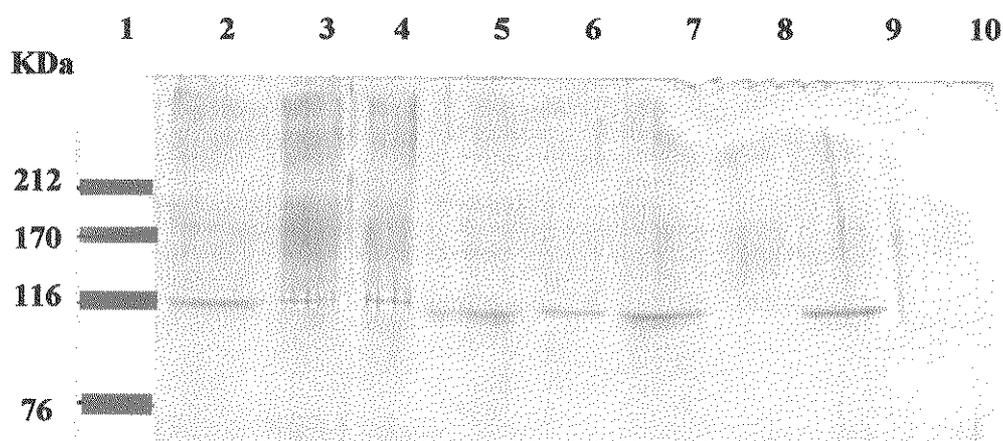


Figura 4- Análise por Western blot da produção de iNOS em células peritoneais aderentes obtidas de camundongos de diversas faixas etárias (2, 8, 32 e 72 semanas de idade), residentes ou elicitadas pelo tioglicolato. Canais 3, 5; 7, 9) lisados obtidos das células elicitadas coletadas de animais de 2, 8, 32 e 72 semanas, respectivamente; Canais 4, 6, 8, 10) lisados obtidos de células residentes coletadas de animais de 2, 4, 32 e 72 semanas, respectivamente. No canal 1 estão mostradas as bandas das proteínas padrão de Peso molecular (kit da Bio-Rad *low molecular weight*) e no canal 2 está a amostra padrão de iNOS fornecida pelo fabricante do anticorpo monoclonal anti-mac iNOS.

V- Níveis das citocinas inflamatórias IL-1 α , TNF- α e IL-10 liberadas *in vitro* por células aderentes de camundongos

Os níveis das citocinas IL-1 α e TNF- α , produzidas por células peritoneais aderentes de camundongos com 1, 2, 8, 32, 72 semanas de idade (TNF e IL-1) e 1, 8 e 96 semanas (IL-10), foram analisados em sobrenadantes de cultura das monocamadas estimuladas com LPS, 1 $\mu\text{g/ml}$ por 18 horas, 5 $\mu\text{g/ml}$ por 30 min e 2 $\mu\text{g/ml}$ por 72 horas, respectivamente, através de ensaios de ELISA. Após a coleta dos sobrenadantes, as monocamadas de células foram lisadas e o teor de proteína de cada cultura foi dosado para controle. Os resultados foram expressos como concentração da citocina por ml de sobrenadante .

A análise da figura 5 nos mostra que o TNF- α tem sua produção em níveis detectáveis apenas nos sobrenadantes de cultura de células provenientes de camundongos previamente elicitados pelo tioglicolato. Neste caso, observa-se que animais neonatos (1 e 2 semanas) são capazes de produzir níveis baixos, mas detectáveis da citocina (433,8 e 143,10 pg/ml , respectivamente). Animais com idade igual ou superior a 8 semanas produzem quantidades elevadas de TNF- α , cerca de 10 a 15 vezes mais elevadas que o observado no grupo anterior. Verificou-se uma queda na produção dessa citocina no grupo de animais com 32 semanas de idade (991,70 pg/ml). Entretanto, tal redução pode ser devida à flutuação no número de células presentes nas culturas desse grupo, uma vez que a dosagem de proteína dos lisados celulares mostrou também quantidades um pouco mais reduzidas no mesmo.

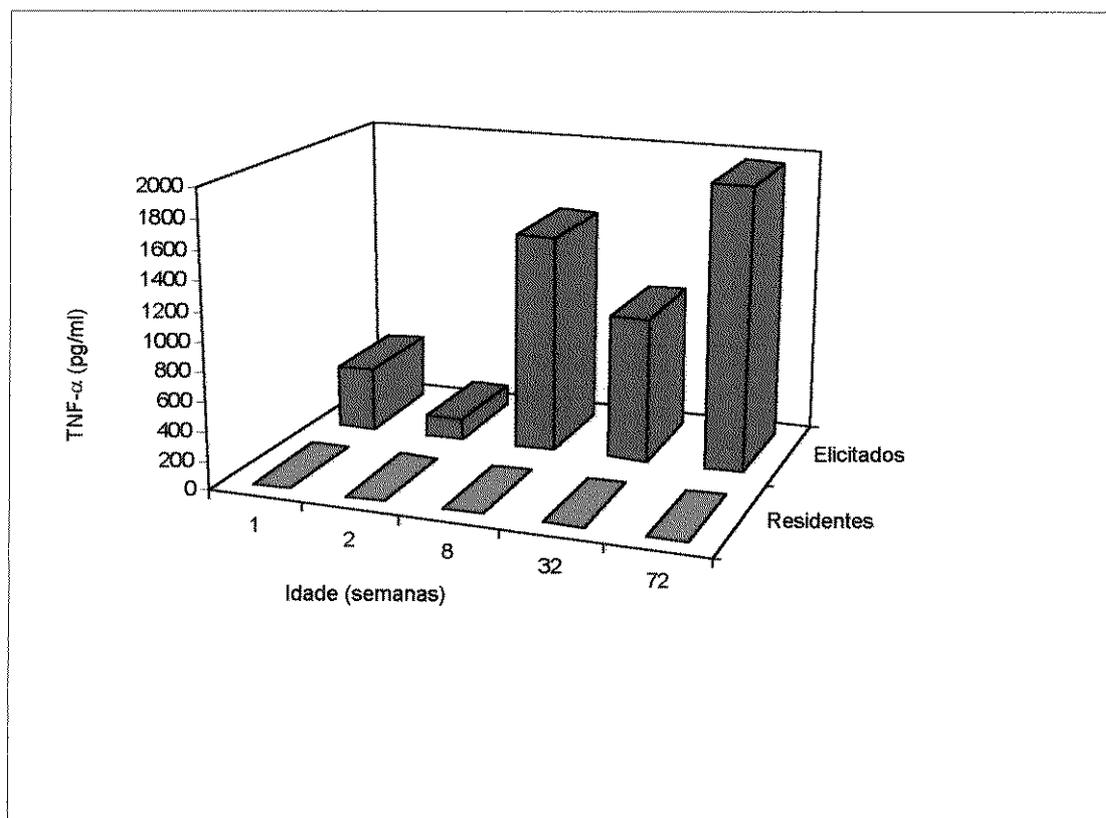


Figura 5: Níveis de TNF- α liberados por células peritoneais aderentes de camundongos (residentes ou elicitadas) das diversas idades indicadas na figura. As monocamadas de células foram cultivadas na presença de LPS (5 μ g/ml) por 1 hora. O TNF- α nos sobrenadantes foi detectado através de ensaios de ELISA, usando como anticorpo de captura o monoclonal XT22.11 e para detecção anticorpos policlonais específicos. Os resultados foram expressos em pg/ml e foram determinados por comparação aos resultados da curva padrão (mrTNF- α , GENENTECH).

Ao analisarmos a figura 6 – Concentração de IL-1 α em sobrenadantes provenientes da cultura de células obtidas de animais de diversas idades, notamos que ao contrário do que ocorre com o TNF- α as células provenientes de animais naive foram capazes de produzir níveis detectáveis (17-143 pg/ml) da citocina. Nota-se ainda que há uma tendência de aumento de produção dessa citocina em animais idosos.

Quanto às células provenientes de animais que receberam um estímulo prévio (tioglicolato) foi possível notar, primeiramente, que foram capazes de secretar níveis mais altos

de IL-1 (195-268 pg/ml), com um pico em 8 semanas e, ao contrário do que ocorreu com os sobrenadantes de cultura de células obtidas de camundongos naive, verificou-se uma tendência de queda de produção da citocina em animais mais velhos.

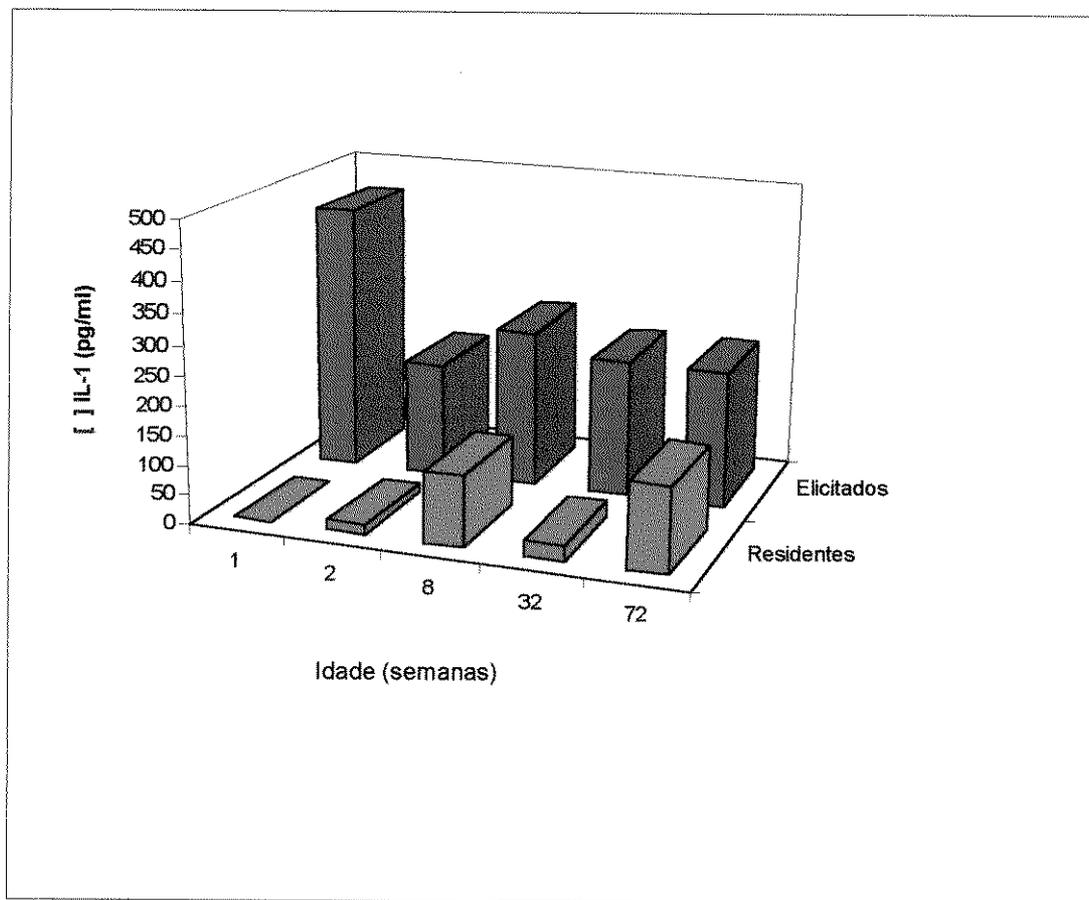


Figura 6: Níveis de IL-1 α liberados por células peritoneais aderentes de camundongos (residentes ou elicitadas) das diversas idades indicadas na figura. As monocamadas de células foram cultivadas na presença de LPS (1 μ g/ml) por 18 horas. A IL-1 α nos sobrenadantes foi detectado através de ensaios de ELISA, usando um Kit comercial (GENZYME). Os resultados foram expressos em pg/ml e foram determinados por comparação aos resultados da curva padrão.

Os resultados das dosagens de IL-10, que estão representados na figura 7, demonstraram que ao contrário do que ocorreu com as citocinas IL-1 e TNF- α , cujos níveis de

produção em animais previamente elicitados com tioglicolato foi maior do que nos camundongos *naïve*, as células residentes após serem estimulados com LPS geraram os níveis mais elevados da referida citocina. A produção máxima da citocina pelas células residentes foi observada em animais com 8 semanas de idade, e alcançou níveis de 2107 pg/ml de IL-10, tendendo a uma ligeira queda nos animais com 72 semanas. Pode-se verificar ainda que nas células obtidas de animais previamente elicitados pelo tioglicolato a produção de IL-10 foi de 2,5 a 4 vezes menor do que nas células provenientes de cavidades não elicitadas.

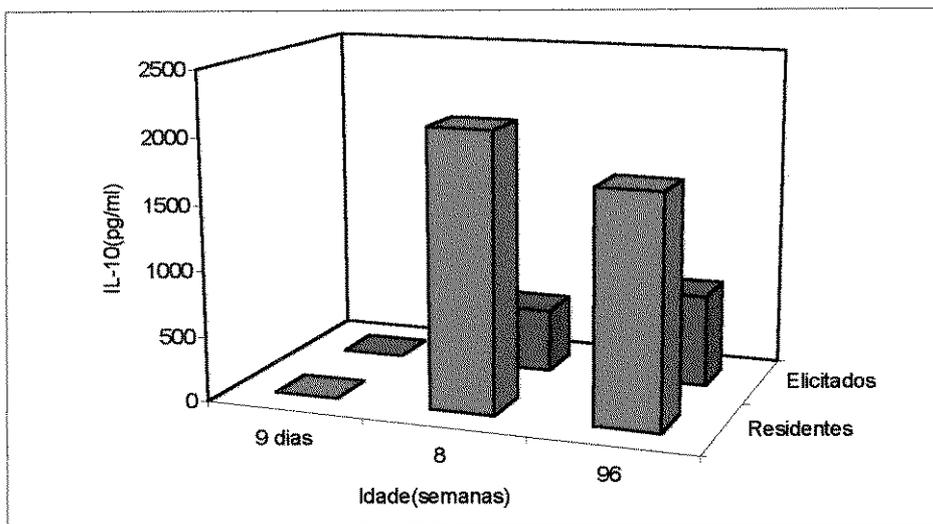


Figura 7: Níveis de IL-10 liberados por células peritoneais aderentes de camundongos (residentes ou elicitadas) das diversas idades indicadas na figura. As monocamadas de células foram cultivadas na presença de LPS (2µg/ml) por 72 horas. A IL-10 nos sobrenadantes foi detectada através de ensaios de ELISA, usando um Kit comercial (ENDOGEN). Os resultados foram expressos em pg/ml e foram determinados por comparação aos resultados da curva padrão.

DISCUSSÃO

Os subprodutos da explosão respiratória (EROS) têm um papel crucial na capacidade do sistema imune em resolver os procesos infecciosos, através da sua ação citotóxica e bactericida (NATHAN e HIBBS, 1991). Porém, no caso de organismos que invadem o interior das células, nem sempre esses produtos serão efetivos. Os radicais livres do nitrogênio (RLN) parecem ser, nesses casos, de grande importância para a eliminação dos patógenos. Além disso, a ação dos EROS e RLN se dá em períodos diferentes da resposta à invasão. Aqueles gerados durante a explosão respiratória, como o ânion superóxido, ocorrem numa fase mais precoce (4 horas) enquanto que o óxido nítrico (NO), gerado através da degradação enzimática da L-arginina, passa a exercer suas funções quando os níveis de ânion superóxido já entram em fase de platô (à partir de 24 horas).

Para que a geração de NO seja iniciada em macrófagos é necessária a presença de LPS (lipopolissacarídeo das paredes celulares das bactérias Gram negativas) e de ativadores mais específicos como as citocinas IFN- γ e TNF- α (BOSE e FÁRNIA, 1995). Estes pesquisadores atribuem às citocinas um papel crucial no aumento da geração de NO e O₂⁻, enquanto que o LPS estaria sendo utilizado apenas como um estímulo não-específico e como um sinal de ativação secundário.

No que se refere a capacidade do LPS em promover a estimulação de macrófagos a produzir o óxido nítrico (NO), ao contrário do que foi verificado por BOSE e FÁRNIA (1995), nossos resultados (figura 1) sugerem que o LPS tem um papel crucial na ativação dos macrófagos e na produção do óxido nítrico, já que para uma mesma dose de Interferon- γ e quantidades crescentes de LPS há um aumento na produção de NO em todos os casos

estudados. Esses resultados vêm de encontro a estudos realizados por KISSIN e colaboradores (1997), que afirmaram que a produção idade-dependente de NO ocorre devido às citocinas bem como a produtos bacterianos. Os experimentos realizados em nosso laboratório, que tiveram como foco principal o estudo da produção do óxido nítrico nos camundongos BALB/c, em diversas etapas de seu desenvolvimento pós-natal, nos mostraram que as células residentes da cavidade peritoneal de animais neonatos (1-15 dias) e de adultos velhos (acima de 72 semanas de idade) são naturalmente responsivas às doses de LPS+IFN- γ empregadas, enquanto que aquelas obtidas de animais das outras faixas etárias testadas não são capazes de responder aos mesmos estímulos. Tais resultados parecem indicar diferenças na expressão da enzima sintase do NO induzível em células residentes de animais dos diferentes grupos etários.

Não existem dados na literatura que nos permitam comparar nossos resultados a outros já obtidos. Até o momento, os estudos realizados sobre a produção de NO em modelo murino, comparando animais jovens e velhos, empregam células obtidas de cavidades peritoneais estimuladas. Assim, nossos resultados parecem ser os primeiros a mostrar que, com relação à produção de óxido nítrico, células naive e primadas apresentam sensibilidades diferentes aos estímulos que induzem a expressão da sintase de NO e que as células naive provenientes de animais neonatos são altamente responsivas aos mesmos.

No que se refere às células primadas com tioglicolato, nossos resultados mostraram que a produção de NO foi significativamente mais elevada em animais velhos quando comparada a de animais adultos jovens.

Neste sentido, os dados da literatura são contraditórios. Enquanto alguns autores têm mostrado que macrófagos provenientes de camundongos adultos jovens (6 a 10 semanas), elicitados *in vivo* com tioglicolato, produzem níveis de NO mais elevados que as células

provenientes de animais velhos (18 a 22 meses), submetidos ao mesmo tratamento (DING, HWANG e SCHWAB, 1994), outros autores mostram o contrário, isto é macrófagos provenientes de animais velhos fazem uma hipersecreção de NO quando comparados aos de animais jovens (PICK e MIZEL, 1981). Nossos resultados, corroboram com esses últimos visto que células provenientes de camundongos adultos velhos (de 32 a 72 semanas) liberaram quantidades significativamente mais elevadas de NO do que adultos jovens (de 4 a 24 semanas). Da mesma forma que CHEN e colaboradores (1996), sugerimos que alterações importantes na expressão da enzima induzível devem ocorrer em macrófagos primados pelo tioglicolato, ou por outros estímulos sofridos no decorrer da vida do animal, que os tornam cada vez mais responsivos à produção de óxido nítrico. Recentemente, KISSIN et al. (1997) publicaram resultados mostrando que macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c e C57Bl/6 de 1 mês e 13 meses (4 a 52 semanas) aumentavam sua sensibilidade de produção de NO frente a estímulos *in vitro* quando coletados de animais previamente estimulados *in vivo* com toxina colérica ou com Con-A. Esses autores verificaram também que a expressão da sintase de NO (medida pela expressão de mRNA) nos macrófagos de camundongos naive era significativamente mais elevada em animais jovens (1 mês de idade).

Segundo KISHIMOTO e colaboradores (1994), originalmente acreditava-se que cada citocina exerceria um efeito específico através de sua ação em receptores altamente especializados nas células alvo. Porém, notou-se que as citocinas apresentam uma ampla margem de efeitos biológicos em uma ampla gama de órgãos e tecidos. Assim, a primeira característica dessas moléculas é o pleiotropismo. A segunda característica importante descrita é a sua redundância, ou seja, citocinas diferentes podem agir no mesmo tipo celular de maneira similar. Uma explicação provável para estas características descritas está à nível molecular e

hoje já se sabe que a maioria dos receptores para citocinas consistem de cadeias múltiplas, ou seja, regiões de ligação específicos nos receptores para cada citocina e transdutores de sinal comuns a várias citocinas, que desencadeariam a ativação de genes específicos nas células alvo. Ainda segundo KISHIMOTO e colaboradores (1994), o efeito único exercido por uma determinada citocina poderia ser explicado pela expressão variável dos receptores de ligação, a presença potencial ou a ativação preferencial de apenas um único “subset” de todas as possíveis moléculas de sinalização nos diferentes tipos celulares, e a regulação ou modulação das moléculas sinalizadoras por outros estímulos seriam as estratégias que tornam possíveis a ação única de uma determinada citocina.

No sistema imune existem dois tipos de subpopulações T CD₄⁺, as células TH₂ que como se sabe são responsáveis pela produção IL-4, IL-5 e IL-10, enquanto que as células TH₁ produzem IL-2 e IFN γ . O balanço dessas duas subpopulações estaria definindo o padrão de resposta do sistema imune, quer seja privilegiando uma resposta inflamatória (TH₁) ou de produção de anticorpos (TH₂). Sabe-se também que uma subpopulação tem efeito antagônico sobre a outra (MOSMANN e COFFMAN, 1989). Esse antagonismo se daria não só à nível de secreção de um determinado padrão de citocinas, mas também como citado por CUNHA, MONCADA e LIEW (1992), estaria modulando a produção de outros agentes envolvidos na resposta do sistema imune à agressão, tais como a do óxido nítrico (NO) e a indução da produção da sintase do óxido nítrico (NOS). Segundo esses autores, a IL-10 inibe a indução da NOS pelo IFN γ na linhagem J774, células de linhagem macrofágica de camundongos que expressam altos níveis da enzima NOS.

Recentemente, FOEY et al.(1998) reafirmaram que a IL-1 produzida endogenamente teria um papel importante na produção de IL-10 em monócitos humanos estimulados pelo

LPS. Esses autores demonstraram ainda o envolvimento do TNF- α na produção de IL-10 por monócitos estimulados pelo LPS e a inibição da produção de IL-1 e TNF- α pela IL-10, sugerindo assim que essas três citocinas estariam num único loop de feedback autoregulatório, e a sua produção por monócitos seria regulada numa cadeia parácrina/ autócrina de citocinas inibitórias e estimulatórias.

Com o envelhecimento ocorrem mudanças na secreção de citocinas inflamatórias (CHORINCHATH et al., 1996; INAMIZU et al., 1985; GON et al., 1996; HAN et al., 1995), o que, segundo HAN e colaboradores (1995), estaria refletindo uma mudança no padrão de resposta das subpopulações de células T; de uma resposta predominantemente TH₂ (anticorpos) em indivíduos jovens para uma TH₁ (inflamatória) em indivíduos idosos.

O conjunto dos dados obtidos em nosso laboratório, nos permitem sugerir que, da mesma forma observada para a produção de NO, células aderentes residentes ou elicitadas diferem na sua capacidade de produzir citocinas inflamatórias, quando estimuladas *in vitro* pelo LPS. Assim, células residentes obtidas de animais muito jovens (até 15 dias de idade) não se mostraram capazes de produzir IL-1 e IL-10, *in vitro*. Essa capacidade só foi encontrada em células obtidas de animais adultos (acima de 8 semanas de idade), não apresentando alterações significativas com o envelhecimento. O TNF- α não foi detectado em sobrenadantes de cultura de células residentes obtidas de animais de qualquer idade examinada. Por outro lado, as células elicitadas respondem ao estímulo *in vitro* produzindo IL-1, TNF- α e IL-10 em níveis elevados. Dentre essas citocinas, apenas para a IL-1 não se observa um aumento de secreção em função do envelhecimento. Ainda, a produção de IL-10 foi cerca de 2,5 a 4 vezes maior em células residentes do que nas elicitadas.

Estudos realizados *in vivo* e relatados recentemente (TATEDA et al., 1996),

mostraram que animais idosos produzem níveis significativamente mais elevados de IL-1, IL-6 e TNF- α , o que explicaria a alta letalidade tóxica exercida pelo LPS nesse grupo etário, encontrada pelos autores, onde os animais velhos foram cerca de 6,5 vezes mais sensíveis à endotoxina que animais jovens. Entretanto, um aspecto a se considerar é o *status* das células utilizadas por esses autores para verificar a produção dos radicais livres. Os dados referentes à produção de NO por macrófagos provenientes seja de animais velhos ou jovens foram nesse caso obtidos apenas com células recrutadas para a cavidade peritoneal (elicitadas) e, portanto, já alteradas de alguma forma pelos estímulos inflamatórios empregados.

Ainda em relação à produção do óxido nítrico, é sabido que os eventos que ocorrem durante as respostas do sistema imune à agressão são amplamente interligados. A produção do óxido nítrico(NO) por macrófagos é influenciado pelo padrão de citocinas que estão presentes no sistema. Diversos autores (DRAPIER, 1995 e MODOLELL et al., 1995) relataram a influência das citocinas na produção de NO pela iNOS, as citocinas secretadas pela subpopulação TH₁ (especialmente o IFN γ , TNF- α , e IL-1) estariam determinando o “estado inflamatório” dos macrófagos e aquelas secretadas pelas células TH₂ (IL-4,IL-5, IL-10, TGF- β e IL-8) suprimiriam este estado dos macrófagos. Além disso, MODOLELL (1995) quando estudou população de macrófagos derivados da medula óssea, sugere a influência da enzima arginase, que competiria com a iNOS pelo mesmo substrato, a L-arginina limitando assim a produção de NO.

Os resultados obtidos em nosso laboratório também sugerem a influência da IL-10 na produção de NO e na presença da iNOS para algumas das faixas etárias estudadas (2 semanas e 72 ou 96 semanas). Nas idades onde a produção do NO estava em níveis detectáveis foi verificada a presença da banda iNOS no Western-blot e ao mesmo tempo uma baixa liberação

de IL-10 e naquelas onde não houve expressão da iNOS e alta liberação de IL-10, os níveis de NO não podiam ser detectados pelo método utilizado para quantificação do radical (Figuras 4 e 7 e tabelas 1, 2 e 3).

Em resumo, os relatos da literatura sobre a produção *in vitro* das diferentes citocinas inflamatórias, bem como das espécies reativas do nitrogênio, por macrófagos de camundongos jovens e velhos são muito conflitantes. Essas discrepâncias podem estar relacionadas às diferenças nas condições da cultura, na procedência das células utilizadas, nos estímulos aos quais as células são previamente submetidas, e ao fato não menos importante de cada grupo de autores definir de modo arbitrário as faixas etárias novo, meia-idade e velho empregadas em seus estudos.

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos nos permitem concluir que:

- A produção de óxido nítrico em células aderentes provenientes de animais em diferentes fases de seu desenvolvimento pós-natal parece ser dependente do status das células empregadas (residentes ou elicitadas) e da idade dos animais utilizados.
- Independentemente da idade empregada a produção do óxido nítrico parece ser tempo e dose dependente nas células elicitadas.
- A sintase do óxido nítrico foi expressa em macrófagos residentes de camundongos jovens e adultos jovens (8 semanas), embora o óxido nítrico não tenha sido detectado nos sobrenadantes de cultura desses últimos.
- A produção das citocinas IL-1, TNF- α e IL-10 também parece ser dependente do status das células utilizadas e da idade dos animais empregados. Os níveis de IL-1 e de TNF- α foram significativamente mais elevados nos sobrenadantes de macrófagos elicitados do que nos obtidos de animais naive, de todas as idades examinadas. Níveis detectáveis de IL-1 também puderam ser observados em sobrenadantes de células residentes de animais com idade igual ou superior a 2 semanas. Por outro lado, a IL-10 foi detectada em níveis mais elevados no sobrenadante das células residentes obtidas de animais com idade igual ou superior a 8 semanas.
- O conjunto dos resultados obtidos permitem concluir que alguns parâmetros da resposta inflamatória, tais como a produção de citocinas e de óxido nítrico, são alterados durante o envelhecimento. Essas alterações podem estar relacionadas com a maior incidência de doenças autoimunes, infecciosas e neoplásicas relatadas em indivíduos velhos.

BIBLIOGRAFIA

ALEXANDER, J. & VIECKERMAN, K. Fusion of host cell secondary lysosomes with the parasitophorous vacuoles of *Leishmania mexicana* infected macrophages. **J. Protozool.** **22**: 502, 1975.

AMES, B.N. & SHIGENAGA, M.K. Oxidants are a major contributor to aging. **Ann. N.Y. Acad. Sci.** **663**: 85, 1992.

ANDERSON, D.C.; FREEMAN, K.L.B.; HEERDT, B. et al. Abnormal stimulated adherence of neonatal granulocytes: impaired induction of surface Mac-1 by chemotactic factor or secretagogues. **Blood** **70**: 740, 1987.

ANDERSON, D.C.; ROTHLEIN, R.; MARLIN, S.D. et al. Impaired transendothelial migration by neonatal neutrophils: abnormalities of Mac-1 (Cd11b/ CD18) -dependent adherence reactions. **Blood** **76**: 2613, 1990.

BAUMANN, H. & GAULDIE, J. The acute phase response. **Immunol. Today** **15**: 74, 1994.

BECKMAN, I. ; DIMOPOLUS, K.; XIAONING, X. et al. Age changes in the activation requirements of human CD4⁺T cell subsets. **Cell Immunol.** **132**: 17, 1991.

BOSE, M. & FÁRNIA, P. Proinflammatory cytokines can significantly induce human

mononuclear phagocytes to produce nitric oxide by a cell maturation-dependent process.

Immunol. Letters 48: 59, 1995

BRADLEY, S.F. et al. Monokine secretion in aging and protein malnutrition. **Leukoc. Biol.** 45: 510, 1989.

BRUCE, M.C.; BAILEY, J.E.; MEDVIK, K.A. et al. Impaired surface membrane expression of C3bi but not C3b receptors on neonatal neutrophils. **Pediatr. Res.** 21: 306, 1987.

BRUEHRER, C.; GRAULICH, J. STIBENZ, D. et al. L- selectin is down regulated in umbilical cord blood granulocytes and monocytes of newborn infants with acute bacterial infection. **Pediatr. Res.** 36: 799, 1994.

BRULEY-ROSSET, M. & VERGNON, I. Interleukin-1 synthesis and activity in aged mice. **Mech. Ageing Dev.** 24: 247, 1984.

CHANG, K.P. & DWYER, D.W. *Leishmania donovani*-hamster macrophage interactions in vitro: cell entry, intracellular survival and multiplication. **J.Exp. Med.** 147: 515, 1978.

CHEN, L. C. et al. Altered regulation of inducible nitric oxide synthase expression in macrophages from senescent mice. **Inf. Immun.** 64: 4288, 1996.

CHEN, Y.; RAMSEY, M.A. & BRADLEY, S.F. Differential monokine production by

macrophages from aged mice stimulated with various microorganisms. **Aging Immunol. and Infect. Dis.** 4: 55, 1993.

CHORINCHATH, B. B.; KONG, L. Y.; MAO, L. E MCCALLUM, R. E. Age associated differences in TNF- α and nitric oxide production in endotoxic mice. **J. Immunol.** 156: 1525, 1996.

CECÍLIO, 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. The neutrophil migration induced by tumor necrosis factor alpha in mice is unaffected by glucocorticoids. **Mediators of Inflammation** 6: 46-52, 1997.

CUNHA, F.Q.; MONCADA, S. E LIEW, F.Y. Interleukin-10 (IL-10) inhibits the induction of nitric oxide synthase in murine macrophages. **Biochem.Biophy. Res. Commun.** 182: 1155, 1992.

DAVILA, D.R. et al. Interferon γ induced priming for secretin of superoxide anion and tumor necrosis factor- α declines in macrophages from aged rats. **FASEB J.** 4: 2906, 1990.

DE PAOLI, P.; BATTISTIN, S.; SANTIN, G.F.. Age related changes changes in human lymphocyte subsets: progressive reduction of the CD4 CD 45R (suppressor inducer) population. **Clin. Immunol. Immunopathol.** 48: 290, 1988.

DING, A.; HWANG, S. & SCHWAB, R. Effect of aging on murine macrophages: Diminished response to INF- γ for enhanced oxidative metabolism. **J. Immunol.** 153: 2146, 1994.

DING, H.A.; NATHAN, C.F. & STUEHR, D.J. Release of reactive nitrogen intermediates from mouse peritoneal macrophages: comparison of activating cytokines and evidence for independent production. **J Immunol.** 141: 2407, 1988.

DRAPIER, J.C. NO, effecteur ambivalent de l'immunité non spécifique et de l'inflammation. **C.R.Soc.Biol.** 189: 1081, 1995.

EY, P.L., PROWSE, S.J. & JENKIN, C.R. Isolation of pure IgG, IgG_{2a} and IgG_{2b} immunoglobulins from mouse serum using Protein-A Sepharose. **Immunochemistry** 15: 429, 1978.

FERREIRA, S.H. Are macrophages the body's alarm cells? **Agents and Actions** 10: 229, 1980.

FOEY, A. D. ; PARRY, S. L.; WILLIAMS, L. M. Regulation of monocyte IL-10 synthesis by endogenous IL-1 and TNF- α : Role of the p38 and p42/44 mitogen-activated protein kinases. **J. Immunol.** 160: 920, 1998.

GARDNER, I.D. ; LIM, S.T. & LAWTON, J. W. M. Monocyte function in ageing humans. **Mech.Aging Dev.** 16: 233, 1981.

GERSCHMAN, R.; GILBERT, D. L. ; NYE, S. W. et al. Oxygen poisoning and x-radiation: a mechanism in common. **Science**, 119: 623, 1954.

GON, S.; HASHIMOTO, S. HAYASHI, S. et al. Lower serum concentrations of cytokines in the elderly and the impaired production of cytokines by peripheral blood monocytes in the elderly. **Clin.Exp.Immunol.** 106: 120, 1996.

GREEN, S.J. et al. *Leishmania major* amastigotes initiate the L-arginine dependent killing mechanism in INF γ -stimulated macrophages by induction of TNF- α . **J. Immunol.** 145: 4290, 1990.

GREEN, S.J.; MELTZER, M.S.; HIBBS, JR J.B. & NACY, C.A. Activated macrophages destroy intracellular *Leishmania major* amastigotes by an L- arginine-dependent killing mechanism. **J. Immunol.** 144: 278, 1990.

GREEN, S.W.; NACY, C.A. & MELTZER, M.S. Cytokine-induced synthesis of nitrogen oxides in macrophages: a protective host response to *Leishmania* and other intracellular pathogens. **J. Leukoc. Biol.** 50: 93, 1991.

GREEN, L. C., WAGNER, J., GLOGOWSKI, J. SKIPPER, P.L. et. al. Analysis of nitrate, nitrite, and [^{15}N] nitrate in biological fluids. **Anal. Biochem.**: 126: 131, 1982.

HAN, D. ; HOSOKAWA, T.; AOIKE, A.; KAWAI, K. Age related enhancement of tumor

- necrosis factor (TNF) production in mice. **Mech. Ag. Dev.** 84: 39, 1995.
- HARMAN, D. The aging process. **Proc.Natl.Acad.Sci.USA.** 78(11): 7124, 1981.
- HARTREE, E.F. Determination of protein: A modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. **Anal. Biochem.** 48: 422, 1972.
- HAYFLICK, L. The cell biology of human aging. **Scientific American**, 242(1): 42, 1980.
- HIBBS, JR. J. B. et al. Nitric oxide: A cytotoxic activated macrophage effector molecule. **Biochem. Biophys. Res. Comm.** 157: 87, 1988.
- IMHOF, B.A. & DUNON, D. Leukocyte migration and adhesion. **Adv.Immunol.** 58: 345, 1995.
- INAMUZU, T.; CHANG, M.P. & MAKINODAN, T. Influence of age on the production and regulation of interleukin-1 in mice. **Immunol.** 55: 447, 1985.
- KISHIMOTO, T.; TAGA, T. E AKIRA, S. Cytokine signal transduction. **Cell** 76: 253, 1994.
- KISSIN, E. ; TOMASI, M. ; MCCARTNEY-FRANCIS, N.; GIBBS, C. L. E SMITH, P. D. Age-related decline in murine macrophage production of nitric oxide. **J. Infec. Dis.** 175: 1004, 1997.

- LAEMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage. **Nature** 227: 680, 1970.
- LEWIS, V.M.; TWOMEY, J.J.; BEALMEAR, P.; GOLDSTEIN, G. E GOOD, R.A. **J. Clin. Endocrinol. Metabol.** 47: 145, 1978.
- LIEW, F.Y. et al. Macrophage killing of *Leishmania* parasite *in vivo* is mediated by nitric oxide from L-arginine. **J. Immunol.** 144: 4793, 1990.
- LIEW, F.Y.; YUN, L. & MILLOT, S. TNF- γ synergizes with INF- γ in mediating killing of *Leishmania major* through the induction of nitric oxide. **J. Immunol.** 145: 4306, 1990.
- LOWENSTEIN, C.J. & SNYDER, S. Nitric oxide, a novel biologic messenger. **Cell** 70: 705, 1992.
- MACKANESS, G.B. Cellular immunity to infection. **J. Exp. Med.** 116: 381, 1962.
- MACLACHLAN, J. A.; SERKIN, C.D.; MORREY, K.M. & BAKOUCHE, O. Antitumoral properties of aged monocytes. **J. Immunol.** 154: 832, 1995.
- MARODI, L. et al. Candidacidal mechanisms in the human neonate: Impaired IFN-gamma activation of macrophages in newborn infants. **J. Immunol.** 153: 5643, 1994.

MODELELL, M.; CORRALIZA, I.M.; LINK, F. et al. Reciprocal regulation of the nitric oxide synthase/arginase balance in mouse bone marrow-derived macrophages by TH1 and TH2 cytokines. **Eur. J. Immunol.** 25: 1101, 1995.

MORRIS, S.M.JR. & BILLIAR, T.R. New insights into the regulation of inducible nitric oxide synthesis. **Am. J. Physiol.** 266: E829, 1994.

MOSMANN, T. R. & COFFMAN, R. L. Heterogeneity of cytokine secretion patterns and functions of helper T cells. **Advances in Immunology.** 46: 111-147, 1989.

NATHAN, C.F. et al. Extracellular cytotoxicity by activated macrophages and granulocytes. I. Pharmacologic triggering of effector cells and the release of hydrogen peroxide. **J. Exp. Med.** 149: 84, 1979.

NATHAN, C.F. et al. Extracellular cytotoxicity by activated macrophages and granulocytes. II. Hydrogen peroxide as a mediator of cytotoxicity. **J. Exp. Med.** 149: 100, 1979.

NATHAN, C.F. & HIBBS, JR J.B. Role of nitric oxide in macrophage antimicrobial activity. **Curr. Op. Immunol.** 3: 65, 1991.

NATHAN, C. & XIE, QIAO-WEN. Nitric oxide synthases: roles, tolls and controls. **Cell** 78: 915, 1994.

NIELSEN, H.; BLOM, J. & LARSEN, S.O. Human blood monocyte function in relation to age. *Acta. Path. Microbiol. Immunol. Scand. Sect. C Immunol.* 92: 5, 1984.

NIJHUIS, E.W.P.; REMARQUE, E.J. ; HINLOOPEN, B. et al. Age related increase in the fraction of CD27⁻CD4⁺T cells and IL-4 production as a feature of CD4⁺T cell differentiation *in vivo*. *Clin.Exp. Immunol.* 96: 528, 1994.

PAUL, W.E. & SEDER, R.A. . Lymphocyte responses and cytokines. *Cell* 76: 241, 1994.

PAWELEC, G. & SOLANA, R. Immunosenescence. *Immunol. Today* 18: 514, 1997.

PICK, E. & MIZEL, D. Rapid microassays for the measurement of superoxide and hydrogen peroxide production by macrophages in culture using an automatic enzyme immunoassay reader. *J. Immunol. Meths.* 46: 211, 1981.

PRICE, G.B. & MAKINODAN, T. Immunologic deficiencies in senescence. I. Characterization of intrinsic deficiencies. *J. Immunol.* 108 : 403, 1976.

REMACLE, J. ; RAES, M.; TOUSSAINT, O. et al. Low levels of reactive oxygen species as modulators of cell function. *Radiation Research*, 316: 103, 1995.

REMARQUE, E. J.; VAN BEEK, W.C.A.; LIGTHART, G.J. et al. Improvement of the immunoglobulin subclass response to influenza vaccine in elderly nursing home residents by

- the use of high dose vaccines. **Vaccine** 11: 649, 1993.
- RUDD, A.G. & BANERGEE, D.K. Interleukin-1 production by human monocytes in ageing and disease. **Age Ageing** 18: 43, 1989.
- RUSSELL, D.G. & TALAMAS-ROHANA, P. Leishmania and the macrophage: a marriage of inconvenience. **Immunol. Today** 10: 328, 1989.
- SCHIBLER, K.R.; LIECHTY, K.W.; WHITE, W.L.; CHRISTENSEN, R.D. Production of granulocyte colony-stimulating factor in vitro by monocytes from preterm and term neonates. **Blood**: 82: 2478, 1993.
- SCOLLAY, R.G.; BUTCHER, E.C. & WEISSMAN, I. L. Thymus cell migration: quantitative aspects of cellular traffic from the thymus to the periphery in mice. **Eur. J. Immunol.** 10: 210, 1980.
- SMITH, J.B.; KUNJUMEN, R.D.; KISHIMOTO, T.K. & ANDERSON, D.C. Expression and regulation of L- selectin on eosinophils from human adults and neonates. **Pediatr. Res.** 32: 465, 1992.
- SPRINGER, T.A. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: The multistep paradigm. **Cell** 76: 301, 1994.

STEEL, D.M. & WHITEHEAD, A. S. The major acute phase reactants: C-reactive protein, serum amyloid P component and serum amyloid A protein. **Immunol. Today.** 15: 81, 1994.

TATEDA, K., MATSUMOTO, T. MIYAZAKI, S. & YAMAGUCHI, K. Lipopolysaccharide-induced lethality and cytokine production in aged mice). **Infection and Immunity.** 64(3): 769-774, 1996.

TOWBIN, H., STAEBELIN, T. & GORDON, J. Electrophoretic transfer of protein from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. **Proc.Natl. Acad. Sci.** 76 (9): 4350-4354., 1979.

TYAN, M.L. Effect of age on the intrinsic regulation of murine hematopoiesis. **Mech. Ageing Dev.** 19: 15, 1982.

VETRICKA, V.; TLASKALOVA-HOGENOVA, H. & POSPISIL, M. Impaired antigen presenting function of macrophages from aged mice. **Immunol. Invest.** 14: 105,1985.

WEKSLER, M. The immune system and the aging process in man(40958). **Proc.Soc. Exp. Biol. Med.** 165: 200, 1980.

WILSON, C.B.; DESMONTS, G.; COUVRIEUR, J. & REMINGTON, J.S. Lymphocyte

transformation in the diagnosis of congenital *Toxoplasma* infection. **N. Engl.J. Med.** 302: 785, 1980.

WILSON, C.B. & HAAS, J.E. Cellular defense against *Toxoplasma gondii* in newborns. **J.Clin. Invest.** 73: 1606, 1984.

WILSON, C.B. & WESTALL, J. Interleukin-2 (IL-2) and macrophage activation factor by newborn lymphocytes. **Pediatr. Res.** 18: 267, 1984.

WISEMAN, H. E HALLIWELL, B. Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. **Biochem. J.**, 313: 17-19, 1996.