Renata Cristina Onishi Zanardo

EVIDÊNCIA FARMACOLÓGICA E IMUNOHISTOQUÍMICA DE UM SISTEMA FUNCIONAL DE ÓXIDO NÍTRICO SINTASE EM EOSINÓFILOS PERITONEAIS DE RATO

Dissertação de mestrado apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre em Ciências na área de Farmacologia.

Orientador: Pr
Car

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado, apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas - UNICAMP, para obtenção do título de Mestre em Ciências, na Área de Farmacologia da Farmacêutica Renata Cristina Onishi Zanardo.

Campinas, 14 de novembro de 1997

Prof. Dr. Edson Antunes
- Orientador -

Z15e
33141/BC

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

UNIDADE BC
N.º CHAMADA:
Z15e
V Ex.
TOMBO BC/ 33541
PROC. 395/98
C D X
PREÇO R$ 11,00
DATA 26/03/98
N.º CPD

CM-00107432-4

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS UNICAMP

Zanardo, Renata Cristina Onishi

Z15e Evidência farmacológica e imunohistoquímica de um sistema funcional de óxido nítrico sintase em eosinófilos peritoneais de rato / Renata Cristina Onishi Zanardo . Campinas, SP : [s.n.], 1997.

Orientador : Edson Antunes

Tese (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. Quimiotaxia. 2. Eosinófilos. 3. Óxido nítrico. I. Edson Antunes. III. Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

UNICAMP

Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador:

Prof. Dr. Edson Antunes

Membros:

1. Dr. Edson Antunes

2. Dra. Paulina Sannomiya

3. Dra. Sara Terezinha Olalla Saad

Curso de Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 14/11/97

Aos meus pais, pelo constante apoio e carinho; pelas vezes que abdicaram de seus sonhos para que os sonhos de seus filhos se tornassem realidade.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Edson Antunes, pela oportunidade, pelos ensinamentos, pela orientação e amizade.

Ao Prof. Dr. Gilberto de Nucci, pela oportunidade concedida e pelo exemplo de dedicação à pesquisa.

À Heloísa Helena de Araújo Ferreira, pelo apoio técnico, pela amizade, alegria e companheirismo em todos os momentos.

Ao Prof. Dr. Antonio R. Martins e ao Edmar Costa, pela imprescindível colaboração na realização dos experimentos de imunohistoquímica.

A todos os amigos do laboratório e do Departamento de Farmacologia, e àqueles que direta ou indiretamente colaboraram para que este trabalho fosse realizado.

A todos os funcionários do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, em especial Dora, Gislaine e Miguel.

À CNPq pelo apoio financeiro concedido

LISTA DE MATERIAIS

SUBSTÂNCIA	PROCEDÊNCIA
1-(2-trifluorometilfenil) imidazol	Tocris Cookson Inc. (St. Louis, EUA)
1H-[1,2,4,]oxadiazolo[4,3,-a]quinoxalina-1-um	Tocris Cookson Inc. (St. Louis, EUA)
2-amino-5,6-dihidro-6-metil-4H-1,3-tiazina	Tocris Cookson Inc. (St. Louis, EUA)
5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato	Promega (WI, EUA)
Anticorpo monoclonal (NOS)	Transduction Laboratories (KY, EUA)
Anticorpo policlonal (NOS)	Transduction Laboratories (KY, EUA)
Azul de nitro tetrazólio	Promega (WI, EUA)
Cromotropo-2R	Sigma Chem. Co. (St. Louis, EUA)
Eosina	Merck (Darmstadt, Alemanha)
Fosfatase alcalina-estreptoavidina	Gibco BRL
IgG de cabra anti-camundongo biotinilada	Dako Corporation (CA, EUA)
IgG de cabra anti-coelho conjugada à fosfatase alcalina	Promega (WI, EUA)
Leucotrieno B_4	Sigma Chem. Co. (St. Louis, EUA)
Levamisole	Sigma Chem. Co. (St. Louis, EUA)
Metrizamide	Sigma Chem. Co. (St. Louis, EUA)
N^{ω}-nitro-D-arginina-metil-éster	Sigma Chem. Co. (St. Louis, EUA)
N^{ω}-nitro-L-arginina-metil-éster	Sigma Chem. Co. (St. Louis, EUA)
N^2,2'-O-dibutirilguanosina 3':5'-monofosfato cíclico	Sigma Chem. Co. (St. Louis, EUA)
N-formil-metionil-leucil-fenilalanina	Sigma Chem. Co. (St. Louis, EUA)

Nitroprussiato de sódio	Sigma Chem. Co. (St. Louis, EUA)
Permount	Fisher (EUA)

LISTA DE ABREVIATURAS

AMPc	Monofosfato cíclico de adenosina
AMT	2-amino-5,6-dihidro-6-metil-4H-1,3-tiazina
BCIP	5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato
CGRP	Peptídeo relacionado ao gene calcitonina
cNOS	Óxido nítrico sintase constitutiva
dGMPc	dibutiril GMP cíclico
D-NAME	N^{ω}-nitro-D-arginina-metil-éster
ECP	Proteína catiônica do eosinófilo
EDN/EPX	Proteína X derivada do eosinófilo
EIT	S-etilisouréia
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
EO(s)	Eosinófilo (s)
EPO	Peroxidase do eosinófilo
fMLP	N-formil-metionil-leucil-fenilalanina
GM-CSF	Fator estimulador de colônia de monócitos e granulócitos
GMPc	Monofosfato cíclico de guanosina
IFN	Interferon
IL	Interleucina
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
LCF	Fator quimiotáxico de linfócitos
L-NAME	N^{ω}-nitro-L-arginina-metil-éster
L-NIO	N-iminoetil-L-ornitina
L-NMMA	N^{G}-nitro-L-arginina-metil-éster
LPS	Lipopolissacáride
LT	Leucotrieno
MBP	Proteína básica principal
MIP	Proteína inflamatória de macrófagos

NAF/IL-8	Fator ativador de neutrófilos
NBT	Azul de nitro tetrazólio
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
nNOS	Óxido nítrico sintase neuronal
ODQ	1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3,-a]quinoxalina-1-um
PAF	Fator ativador de plaquetas
PG	Prostaglandina
RANTES	Regulated upon activation in normal T cells expressed and secreted
SNP	Nitroprussiato de sódio
TNF	Fator de necrose tumoral
TRIM	1-(2-trifluorometilfenil) imidazol
TX	Tromboxano

SUMÁRIO

RESUMO i

1. INTRODUÇÃO 1

OBJETIVOS 10

2. MATERIAIS E MÉTODOS 11

2.1 Animais 11

2.2 Procedimento experimental 11

2.2.1 Obtenção de eosinófilos 11

2.2.2 Ensaio de quimiotaxia *in vitro* 12

2.3 Avaliação da participação do óxido nítrico na migração de eosinófilos *in vitro* 13

2.4 Imunohistoquímica 13

2.4.1 Fixação dos eosinófilos 13

2.4.2 Estudo da expressão da NOS 14

2.4.3 Ensaio imunohistoquímico 14

2.5 Análise estatística 15

3. RESULTADOS 16

3.1 Quimiotaxia *in vitro* de eosinófilos induzida por fMLP 16

3.1.1 Efeito do tratamento com L-NAME e D-NAME sobre a quimiotaxia *in vitro* de eosinófilos 16

3.1.2 Inibição da quimiotaxia pelo L-NAME: efeito do nitroprussiato de sódio (SNP) e do dibutiril GMP cíclico (dGMPc) 18

3.1.3 Efeito do tratamento com o inibidor específico da guanilato ciclase solúvel, ODQ, sobre a quimiotaxia *in vitro* de eosinófilos 20

3.1.4 Efeito do tratamento com AMT e TRIM sobre a quimiotaxia *in vitro* de eosinófilos 23

3.2 Quimiotaxia de eosinófilos induzida pelo LTB_4 25

3.2.1 Efeito do tratamento com L-NAME, AMT e TRIM sobre a

quimiotaxia de eosinófilos induzida pelo LTB_4 25

3.3 Imunoreatividade das isoformas da óxido nítrico sintase I, II e III expressas em eosinófilos peritoneais de rato 27

4. DISCUSSÃO 29

5. CONCLUSÕES 34

6. SUMMARY 35

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 36

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Efeito da incubação da suspensão de eosinófilos com L-NAME e D-NAME sobre a quimiotaxia *in vitro* 17

Figura 2. Inibição da quimiotaxia de eosinófilos pelo L-NAME: efeito do nitroprussiato de sódio (SNP) e dibutiril GMP cíclico (dGMPc) 19

Figura 3. Efeito do inibidor seletivo da guanilato ciclase solúvel, ODQ, sobre a quimiotaxia *in vitro* de eosinófilos 21

Figura 4. Efeito inibitório do ODQ sobre a quimiotaxia de eosinófilos: reversão pelo dGMPc 22

Figura 5. Efeito do AMT e TRIM sobre a quimiotaxia *in vitro* de eosinófilos 24

Figura 6. Efeito do tratamento com L-NAME, AMT e TRIM sobre a quimiotaxia de eosinófilos 26

Tabela 1. Imunoreatividade da NOS expressa em eosinófilos de rato 27

Figura 7. Imunolocalização das NOS II e III 28

RESUMO

Nossos resultados demonstram que, utilizando anticorpo monoclonal de camundongo através de imunohistoquímica, eosinófilos peritoneais de rato expressam a NOS II (30.2 ± 11.6%) e III (24.7 ± 7.41%). A migração de eosinófilos *in vitro* foi avaliada usando-se uma microcâmara de quimiotaxia de 48 poços, e os agentes quimiotáxicos empregados foram N-formil-metionil-leucil-fenilalanina (fMLP, 5 x 10^{-8} M) e leucotrieno B_4 (LTB_4, 10^{-8} M). O L-NAME (mas não o D-NAME) inibiu significativamente a migração de eosinófilos induzida pelo fMLP (54% de redução para a concentração de 1.0 mM; $P<0.05$) e LTB_4 (61% de redução para a concentração de 1.0 mM; $P<0.05$). Os inibidores da NOS II, AMT e TRIM, também atenuaram marcadamente ($P<0.05$) a migração induzida pelo fMLP (52% e 38% de redução para a concentração de 1.0 mM, respectivamente) e LTB_4 (52% e 51% de redução para a concentração de 1.0 mM, respectivamente). O ODQ (inibidor da guanilato ciclase solúvel), nas concentrações de 0.01 e 0.1 mM, também inibiu significativamente a migração de eosinófilos induzida pelo fMLP. A inibição da migração de eosinófilos pelo L-NAME foi revertida pelo nitroprussiato de sódio (0.1 mM) ou pelo dibutiril GMP cíclico (1 mM). Concluímos que os eosinófilos peritoneais de rato expressam NO sintase(s), e que este mediador desenvolve um papel essencial na locomoção destas células, agindo através de um mecanismo de transdução de GMP cíclico.

1. INTRODUÇÃO

1.1 INFLAMAÇÃO E QUIMIOTAXIA

Inflamação é a reação do organismo à invasão por agentes infecciosos, danos físicos, químicos ou traumáticos. As principais características da resposta inflamatória incluem: (1) vasodilatação, com aumento do calibre dos vasos sanguíneos e consequente aumento do fluxo sanguíneo no foco da inflamação; (2) aumento de permeabilidade vascular, permitindo assim, que as proteínas plasmáticas atinjam o sítio inflamatório e (3) infiltração celular por quimiotaxia ou movimento direcionado das células inflamatórias através das paredes dos vasos sanguíneos até o local do dano tecidual. O grau pelo qual estes eventos se desenvolvem, é normalmente proporcional à gravidade da lesão ou à extensão da infecção (revisto por FERENCÍK & STVRTINOVÁ, 1996).

Quimiotaxia é a reação na qual substâncias químicas determinam a direção e a locomoção das células (revisto por WILKINSON, 1994). A resposta morfológica inicial dos leucócitos expostos a fatores quimiotáxicos resulta na polimerização da célula, com o desenvolvimento do lamelipódio na porção anterior, enquanto que a porção posterior se alonga formando o uropódio (SNYDERMAN & GOETZL, 1981). A motilidade celular representa a integração de muitos processos incluindo adesão (dependente de integrina), protusão lamelar (dependente de actina), desadesão (dependente de integrina) e sua contração (dependente de actina e, possivelmente, miosina; DOWNEY, 1994).

A maioria dos agentes quimiotáxicos age através de receptores expressos nas membranas plasmáticas. Esta interação conduz à uma série de sinais intracelulares e eventos bioquímicos como, por exemplo, alterações no metabolismo do ácido araquidônico e fosfoinositídeos, elevações transitórias nas concentrações intracelulares de cálcio e nucleotídeos cíclicos (DEVREOTES & ZIGMOND, 1988). Os nucleotídeos cíclicos agem como segundo mensageiros levando a mudanças no citoesqueleto requeridas para o

movimento celular. A adenina monofosfato cíclico (AMPc) e a guanosina monofosfato cíclico (GMPc) possuem um papel modulatório na migração de neutrófilos, e agem na transdução de sinal como agentes estimulatórios ou inibitórios, dependendo da concentração destes nucleotídeos nas células (ELFERINK & VANUFFELEN, 1996).

1.2 EOSINÓFILOS

Os eosinófilos originam-se das células precursoras da medula óssea e diferenciam-se sob o controle de vários fatores de crescimento e fatores estimulantes de colônias derivados dos linfócitos T e das células mesenquimais (KROEGEL et al., 1994). Três citocinas são responsáveis em promover a eosinofilopoese: o fator estimulador de colônia de monócitos e granulócitos (GM-CSF), a interleucina-3 (IL-3) e a interleucina-5 (IL-5) (CLUTTERBUCK et al., 1989). Após um período de maturação e diferenciação de aproximadamente 5 dias, os eosinófilos deixam a medula óssea e passam a circular no sangue periférico. No sangue, apresentam uma meia-vida de 13-18 horas antes de migrarem para os tecidos. Os eosinófilos estão distribuídos em vários órgãos, mas possuem maior afinidade por tecidos que apresentem uma interface com o meio externo como o trato respiratório, gastrointestinal e geniturinário, onde persistem por aproximadamente 6 dias (KROEGEL et al., 1994). No entanto, a vida dos eosinófilos teciduais pode aumentar pelo efeito de citocinas liberadas local ou sistemicamente, tais como a IL-3 e GM-CSF (OWEN et al., 1987; ROTHENBERG et al., 1988).

Os eosinófilos possuem núcleo bilobulado e seu aspecto mais característico são os grânulos citoplasmáticos específicos ou secundários, os quais se coram em alaranjado na presença de corantes ácidos como a eosina (MILLER et al., 1966). Os grânulos secundários contém proteínas básicas, como a proteína básica principal (MBP), protéina catiônica do eosinófilo (ECP), neurotoxina derivada do eosinófilo (EDN) ou proteína X do eosinófilo (EPX) e a

peroxidase do eosinófilo (EPO; revisto por WARDLAW et al., 1994). Além destes grânulos, os eosinófilos apresentam grânulos primários que aparecem no estágio promielócito e os pequenos grânulos que contém fosfatase ácida e arilsulfatase (revisto por GLEICH et al., 1992). Outra estrutura citoplamática dos eosinófilos são os corpos lipídicos, os quais servem como sítios intracelulares de estocagem e armazenamento do ácido araquidônico (WELLER, 1991).

Há mais de cem anos, o eosinófilo vem sendo associado a doenças alérgicas. É reconhecido como célula pró-inflamatória envolvida na proteção do organismo contra infecções parasitárias, reações alérgicas e doenças inflamatórias crônicas (revisto por MARTIN et al., 1996). Como célula pró-inflamatória, o eosinófilo pode elaborar mediadores lipídicos, tais como vários derivados do ácido araquidônico incluindo o leucotrieno C_4 (LTC_4; BRUYNZEEL et al., 1987), as prostaglandinas PGD_2, PGE, PGF_1, $PGF_{2\alpha}$ (GIEMBYCZ, 1990; KROEGEL et al., 1994), o tromboxano A_2 (TXA_2; GIEMBYCZ, 1990) e grandes quantidades de fator ativador de plaquetas (PAF; BURKE et al., 1990). O eosinófilo também pode modular a resposta imunológica e a inflamação alérgica através da liberação de fatores de crescimento, citocinas e fatores quimiotáxicos. Entre as citocinas sintetizadas pelos eosinófilos podemos citar a IL-1α (WELLER et al., 1993), IL-6 (HAMID et al., 1992; MELANI et al., 1993), IL-8 (BRAUN et al., 1993), GM-CSF, IL-3, IL-5 (KITA et al., 1991; MOQBEL et al., 1991; DESREUMAUZ et al., 1992), TNF-α (COSTA et al., 1993), IFN-γ e IL-10 (LAMKHIOUED et al., 1995; 1996). Recentemente, foi demonstrado que eosinófilos provenientes de indivíduos sadios possuem informação genética para o fator quimiotáxico de linfócitos (LCF) e para o RANTES (LIM et al., 1995), enquanto que pacientes portadores da síndrome hipereosinofílica possuem RNA mensageiro para a proteína inflamatória de macrófagos 1α (MIP-1α; COSTA et al., 1993).

O eosinófilo responde a certos fatores quimiotáxicos, e isto representa um importante mecanismo fisiopatológico o qual conduz ao acúmulo específico destas células em doenças atópicas como a asma (BARNES, 1996). A asma é

caracterizada por inflamação das vias aéreas e hiperreatividade brônquica (BUSSE & SEDGWICK, 1992), na qual diferentes células inflamatórias estão envolvidas como os mastócitos, macrófagos, linfócitos e eosinófilos. Entretanto, é a infiltração eosinofílica que a diferencia de outras condições inflamatórias das vias aéreas (BARNES, 1996).

Um grande número de agentes quimiotáxicos vem sendo descritos na literatura, mas poucos são efetivos ou seletivos para eosinófilos (MOQBEL, 1994). Nesse sentido, entre os efetivos podemos citar o PAF (TAMURA et al., 1987), e os fragmentos produzidos pelo sistema complemento C3a (DAFFERN et al., 1995) e C5a (MORITA et al., 1989). Recentemente, ERGER & CASALE (1996) demonstraram que três espécies moleculares de PAF (C16:0, C18:0 e C18:1) são quimiotáxicas equipotentes para eosinófilos *in vitro*. Alguns eicosanóides como o ácido 5-oxo-6,8,11,14-eicosatetraenóico (POWELL et al., 1995), LTD_4 e LTB_4 são quimiotáxicos para os eosinófilos, embora o último seja mais eficaz para neutrófilos (SPADA et al., 1994). As citocinas GM-CSF e IL-3, quando incubadas com eosinófilos (provenientes de indivíduos sadios) antes do ensaio de quimiotaxia *in vitro*, potencializam a migração induzida pelo LTB_4, fator ativador de neutrófilos (NAF/IL-8) e fMLP, ao passo que a quimiotaxia induzida pelo PAF é potencializada apenas pela IL-3 (WARRINGA et al., 1991). Por outro lado, a IL-8 *per se* é capaz de induzir migração de eosinófilos através de células endoteliais e epiteliais pulmonares *in vitro* bem como através de filtros de quimiotaxia (ERGER & CASALE, 1995). Outra citocina que apresenta efeito quimiotáxico para eosinófilos é a IL-5 (WANG et al., 1989). Recentemente, foi demonstrado que o RANTES é quimiotáxico para eosinófilos (ALAM et al., 1993) e sua ação é altamente potente (SCHRÖDER et al., 1994). Outro agente quimiotáxico potente e seletivo recentemente identificado é a eotaxina (GRIFFTHS-JOHNSON et al., 1993; JOSE et al., 1994).

Alguns neuropeptídeos como a substância P, neurocinina A, CGRP e a colecistocinina *per se* não induzem quimiotaxia de eosinófilos provenientes de indivíduos sadios, mas quando estes neuropeptídeos são incubados com

eosinófilos obtidos de indivíduos alérgicos, nota-se aumento significativo da resposta quimiotáxica frente a diferentes agentes quimiotáxicos, tais como PAF e LTB_4 (NUMAO & AGRAVAL, 1992). Em contraste, WINDERMAN et al. (1993) demonstraram que a substância P *per se* é quimiotáxica para eosinófilos.

Diante do exposto, fica claro que o fenômeno da migração celular é consequente à interação de vários eventos onde, a quimiotaxia constitui relevante componente (TEIXEIRA et al., 1995).

1.3 ÓXIDO NÍTRICO E REAÇÃO INFLAMATÓRIA

O óxido nítrico (NO) é uma das menores moléculas mensageiras biologicamente ativas que exerce uma variedade de ações fisiológicas e patológicas (SZABÓ & THIEMERMANN, 1995).

O NO é sintetizado a partir de um dos átomos de nitrogênio do grupo guanidino terminal da L-arginina (PALMER,1988), reação catalisada pela enzima óxido nítrico sintase (NOS; MONCADA, 1991).

As NOS são uma família de enzimas que possuem grande homologia com o citocromo P-450 redutase (BREDT et al., 1991) e apresentam-se em três isoformas: neuronal (nNOS ou NOS I; BREDT et al., 1991; NAKANE et al., 1993), induzível (iNOS ou NOS II; XIE et al., 1992; LYONS et al., 1992; LOWENSTEIN et al., 1992; WOOD et al., 1993; GELLER et al., 1993) e endotelial (eNOS ou NOS III; LAMAS et al., 1992; MARSDEN et al., 1992; SESSA et al., 1992; JANSSENS et al., 1992). Suas massas moleculares aparentes são 160, 130 e 135 kDa, respectivamente (WANG & MARSDEN, 1995). A NOS I e a NOS III são constitutivas e dependentes de cálcio/calmodulina para sua ativação, enquanto que a NOS II é induzível e independente de cálcio; ambas as isoformas requerem como cofatores flavina adenina nucleotídeo (FAD), flavina mononucleotídeo (FMN), dinucleotídeo de nicotinamida e fosfato de adenina (NADPH) e tetrahidrobiopterina (MARLETTA, 1993).

A isoforma I está presente no sistema nervoso central e periférico (BREDT & SNYDER, 1990; 1991), participando de funções como memória (BOHME et al., 1991), aprendizado (CHAPMAN et al., 1992) e visão (VENTURINI et al., 1991), sendo também encontrada abundantemente em músculo esquelético humano (NAKANE, 1993). A NOS II é amplamente distribuída, sendo encontrada em macrófagos, hepatócitos, células musculares lisas, fibroblastos, neutrófilos, células endoteliais, condrócitos, fígado, pulmão, músculo esquelético e diafragma (XIE et al., 1992; MONCADA, 1992; THOMPSON et al., 1996), enquanto a NOS III é encontrada em células endoteliais aórticas bovinas e humanas (LAMAS et al., 1992; JANSSENS et al., 1992). O NO produzido pela NOS III está envolvido no controle da pressão sanguínea, distribuição do fluxo sanguíneo aos órgãos e inibição da adesão e ativação das plaquetas e granulócitos polimorfonucleares (VANE, 1994).

A NOS constitutiva (cNOS) libera o NO por curtos períodos em resposta à estimulação do receptor, o qual age como um mecanismo de transdução em muitos eventos fisiológicos (MONCADA, 1991). A síntese do NO pela iNOS é induzida por IL-1, TNF, IFN-γ e lipopolissacáride (LPS; DOMINICZAK & BOHR, 1995), e uma vez expressa produz NO por longos períodos (MONCADA, 1991). A modulação da síntese de NO pode ser obtida com o uso de seus inibidores. Nesse sentido, os glicocorticóides inibem a indução da iNOS mas não a atividade da mesma na maioria dos tipos celulares (MONCADA, 1991; 1992). Outro grupo importante de moduladores da síntese de NO, é composta pelos análogos da L-arginina. Os compostos estruturalmente análogos à L-arginina são inibidores competitivos das isoformas constitutiva e induzível da NOS. Muitos destes compostos já foram sintetizados e dentre eles podemos citar a N^G-monometil-L-arginina (L-NMMA), N^G-nitro-L-arginina-metil-éster (L-NAME) e N-iminoetil-L-ornitina (L-NIO; MONCADA et al., 1991). Sabe-se portanto, que os isômeros L são inibidores efetivos das NOS e que os correspondentes isômeros D são ineficazes na maioria dos fenômenos biológicos estudados.

Uma variedade de compostos que não são derivados de aminoácidos também inibem a atividade da NOS, como, por exemplo imidazóis, 7-nitroindazóis, guanidinas, iminobiotina, ácido α-guanidinoglutárico, 3-amino-1,2,4-triazol, fenciclidina e azul de metileno. Entretanto, apenas poucos compostos apresentam seletividade quanto à isoforma como as aminoguanidinas, isotiouréias, certos imidazóis e indazóis (SOUTHAN & SZABÓ, 1996) e a guanidinoetildissulfito (SZABÓ et al., 1996).

Nos últimos anos têm havido grande interesse na síntese de inibidores da NOS, principalmente aqueles que apresentem seletividade para cada isoforma.

NAKANE et al. (1995) identificaram dois inibidores seletivos reversíveis da NOS induzível: S-etilisotiouréia (EIT) e 2-amino-5,6-dihidro-6-metil-4H-1,3-tiazina (AMT) e ambos mostraram ser mais potentes que o L-NMMA, L-NNA, L-NIO e L-aminoguanidina em inibir a atividade da NOS em macrófagos J774 de camundongos.

HANDY et al. (1995) foram os primeiros a caracterizar um inibidor da NOS derivado de imidazol: 1-(2-trifluorometilfenil) imidazol (TRIM). Este composto mostrou ser inibidor da NOS neuronal e induzível em homogenatos de cerebelo de camundongo e pulmão de ratos, respectivamente. Posteriormente, foi demonstrado que o TRIM exibe uma atividade antinociceptiva potente em camundongos, evidenciado pela inibição das constrições abdominais induzidas por ácido acético (HANDY et al., 1996).

Muitas das ações biológicas do NO são mediadas através do GMPc (SZABÓ & THIEMERMANN, 1995). Sabe-se que o NO ativa a guanilato ciclase solúvel promovendo o aumento dos níveis de GMPc (ARNOLD et al., 1977) nas células-alvo, e que o GMPc age como um mensageiro intracelular no sentido de gerar a resposta característica (IGNARRO, 1991). O acúmulo de GMPc é responsável por alguns dos efeitos do NO, incluindo o relaxamento do músculo liso vascular e não-vascular, inibição da adesão e agregação plaquetária bem

como as vias de transdução de sinal no sistema nervoso central e periférico (SZABÓ & THIEMERMANN, 1995).

Por outro lado, o NO também promove ações independentes do GMPc, como o efeito citotóxico sobre células tumorais (STUEHR & NATHAN, 1989; NATHAN, 1992) e a ativação direta de canais de potássio dependentes de cálcio (BOLOTINA, 1994).

Recentemente identificou-se um composto derivado da quinoxalina, ODQ, reconhecido como inibidor altamente seletivo e potente da guanilato ciclase solúvel (GARTHWAITE et al., 1995). SCHRAMMEL et al. (1996) investigaram o mecanismo de ação do ODQ em guanilato ciclase solúvel purificada de pulmão de bovinos. A incubação da guanilato ciclase solúvel de pulmão de bovinos com doadores de NO, na presença do ODQ, resultou em diminuição dos níveis de GMPc. É interessante notar que, a atividade desta enzima medida na ausência de NO ou doadores de NO, também foi inibida pelo ODQ. Portanto, os autores sugeriram que a inibição da guanilato ciclase solúvel se faz de modo competitivo com o NO, resultando na oxidação do grupamento heme ferroso à forma férrica, que apresenta baixa afinidade ao NO, contribuindo deste modo, para a inativação da enzima.

O ODQ abole o aumento nos níveis de GMPc dependente de NO em plaquetas e em tecido vascular (MORO et al., 1996), e também inibe o relaxamento nitrérgico em músculo anococcígeo de coelho induzido por estimulação de campo elétrico e nitroprussiato de sódio (SNP; CELLEK et al., 1996). BRUNNER et al. (1996) mostraram que o ODQ bloqueia o aumento de GMPc em células endoteliais e tecido aórtico induzido por nitrovasodilatadores e também inibe o relaxamento de artéria pulmonar bovina induzida por agonistas tais como A23187 e bradicinina.

A síntese do NO em sítios inflamatórios depende principalmente da isoforma induzível da NOS, a qual é sintetizada nos leucócitos, vasculatura e possivelmente células parenquimais nos sítios da lesão, em resposta a citocinas e produtos bacterianos.

Os múltiplos efeitos do NO indicam que este autacóide exerce atividade pró e anti-inflamatória (CATTEL & JANSEN, 1995). Nesse sentido, dados da literatura demonstram ações contraditórias deste gás. Assim, a inibição da síntese de NO aumenta a adesão de neutrófilos em vênulas mesentéricas através de um mecanismo relacionado ao CD18 (KUBES et al.,1991). Dessa forma o NO poderia estar exercendo sua ação anti-inflamatória. Contrariamente, a inibição da sua síntese atenua a quimiotaxia de neutrófilos (KAPLAN et al., 1989; BELENKY et al., 1993). Esses resultados sugerem efeitos pró-inflamatórios. Além do mencionado, recentes estudos têm de fato, sugerido ação inibitória e / ou estimulante do extravasamento vascular de proteínas plasmáticas, síntese de mediadores e ainda na migração (EVANS, 1995).

Dados recentes da literatura demonstraram que, na pleurisia induzida por bradicinina, LPS, PAF e carragenina, o bloqueio crônico da síntese de NO pelo L-NAME inibe a migração de eosinófilos. Esses resultados foram confirmados posteriormente, e indicaram que eosinófilos obtidos de ratos tratados cronicamente com L-NAME, não apresentam atividade quimiotáxica *in vitro*, quando estimulados com fMLP, PAF e soro ativado com zimosan (FERREIRA et al., 1996). Esses dados sugerem, portanto, importante efeito do NO na modulação da migração de eosinófilos, seja *in vitro* ou *in vivo*.

OBJETIVOS

1) Caracterizar o envolvimento do óxido nítrico na atividade quimiotáxica de eosinófilos.

2) Determinar a isoforma da óxido nitrico sintase envolvida na regulação da atividade quimiotáxica de eosinófilos.

3) Avaliar a participação da guanilato ciclase solúvel nesse processo.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Animais

Foram utilizados ratos machos Wistar, pesando 200-230 g, provenientes do Centro Multiinstitucional de Bioterismo da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Os animais foram mantidos em gaiolas coletivas, em número máximo de 10 por unidade, no Biotério do Departamento de Farmacologia (Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP), com 12 h de período diurno (das 7:00 h às 19:00 h) e com 12 h de período noturno (das 19:00 h às 7:00 h), mantidos artificialmente. Os animais serviam-se *ad libtum* de água e ração.

2.2 Procedimento Experimental

2.2.1 Obtenção de eosinófilos

Os ratos foram sacrificados sob anestesia com éter. A cavidade peritoneal foi lavada com 20 ml de Hanks (HBSS; pH 7.2) contendo heparina (20 UI/ml). Os lavados peritoneais de 10 a 15 ratos foram misturados e centrifugados a 1000 g, por 18 minutos à 20°C.

Os eosinófilos obtidos da cavidade abdominal foram purificados em gradiente descontínuo de metrizamide de acordo com VADAS et al. (1979), com algumas modificações. O metrizamide foi dissolvido em meio mínimo essencial de Eagle (MEM; pH 7.2) contendo 1 mg/ml de gelatina, de modo a produzir concentrações decrescentes de solução de metrizamide (23.5, 20 e 18%). O botão celular, obtido após centrifugação das amostras, foi ressuspenso em metrizamide 18%. Em tubo cônico de polipropipleno, o metrizamide 20% foi cuidadosamente colocado sobre o de 23.5% e, sobre este, o metrizamide de

18% contendo as células. O tubo com gradiente foi então centrifugado a 90 g, por 11 minutos, e a 1000 g por 14 minutos, à 20°C. Após a centrifugação, os eosinófilos foram coletados na interface do metrizamide 23,5% e 20%. Os eosinófilos foram então lavados duas vezes com MEM e ressuspendidos para concentração final de 5 x 10^6 células/ml.

2.2.2 Ensaio de quimiotaxia *in vitro*

Os ensaios de quimiotaxia foram realizados usando-se câmara de microquimiotaxia com 48 poços (RICHARDS & MCCULLOUGH, 1984). Alíquotas de 50 μl da suspensão de eosinófilos (5 x 10^6 células/ml) foram colocadas no compartimento superior da câmara e 27 μl do agente quimiotáxico colocados no compartimento inferior. Os dois compartimentos foram separados com filtro de policarbonato com poro de 3 μm (Nucleopore Pleasanton, CA). A migração espontânea foi verificada substituindo-se o agente quimiotáxico por 27μl de MEM. Após incubação por 2 h em atmosfera de 5% de CO_2, os filtros foram fixados em metanol 70%, corados (Diff-Quik ®; Baxter Healthcare Corporation, USA) e montados sob uma lâmina de microscopia. A migração dos eosinófilos foi determinada quantificando-se o número de células que migraram através do filtro em 5 campos aleatórios por poço, usando-se microscópio óptico com objetiva de imersão. Em cada experimento, os ensaios foram feitos em duplicata ou triplicata.

Os agentes quimiotáxicos usados foram N-formil-metionil-leucil-fenilalanina (fMLP 5 x 10^{-8} M, dissolvido em MEM) e LTB_4 (10^{-8} M, dissolvido em MEM).

2.3 Avaliação da participação do óxido nítrico na migração de eosinófilos *in vitro*

O envolvimento do óxido nítrico na migração de eosinófilos foi investigado incubando-se a suspensão (5 x 10^6 eosinófilos/ml) com L-NAME (inibidor não seletivo da óxido nítrico sintase), AMT (inibidor seletivo para a isoforma II) ou TRIM (inibidor seletivo para as isoformas I e II), nas concentrações de 0.1, 0.5 e 1.0 mM, por 30 minutos, à 37°C, antes de iniciar o ensaio de quimiotaxia . As células do grupo controle foram pré-incubadas apenas com o MEM. Outro grupo controle foi realizado incubando-se as células, nas mesmas condições, com o enantiômero inativo D-NAME, nas concentrações de 0.1, 0.5 e 1.0 mM.

Em outra série de experimentos, investigamos o envolvimento do GMPc na migração dos eosinófilos. Para tanto, a suspensão de eosinófilos foi incubada com o inibidor seletivo da guanilato ciclase solúvel, o ODQ (0.01 e 0.1 mM), nitroprussiato de sódio (SNP,doador de NO; 0.1 mM) ou com o dibutiril GMPc (1.0 mM), 30 minutos à 37°C antes de desencadear o ensaio de quimiotaxia.

Em alguns experimentos, visando à analise da reversão da inibição da quimiotaxia induzida pelo L-NAME (0.5 mM) e pelo ODQ (0.1 mM), os eosinófilos foram incubados concomitantemente com SNP (0.1 mM) ou dibutiril GMP cíclico (1.0 mM) por 30 minutos à 37°C, antes de desencadear o ensaio de quimiotaxia.

2.4 Imunohistoquímica

2.4.1 Fixação dos eosinófilos

Os eosinófilos (2 x 10^5 células/lâmina) foram coletados em lâminas gelatinizadas usando-se uma citocentrífuga. As células foram fixadas com

paraformaldeído 4% em tampão fosfato de sódio 0.1 M, pH 7.4 por 15 minutos. A seguir, as células foram lavadas com tampão Tris-HCl 0.05 M, pH 7.4, contendo 0.15 M de cloreto de sódio. Todas as operações foram realizadas em temperatura ambiente.

2.4.2 Estudo da expressão da óxido nítrico sintase

A expressão da NOS foi detectada usando-se anticorpo monoclonal purificado de camundongo anti-NOS II (clone 3) e III (clone 6), diluídos 1:10 (v/v) e 1:100 (v/v) em tampão bloqueador [tampão fosfato de sódio 0.02 M, pH 7.4 contendo cloreto de sódio 0.45 M, Triton X-100 0.2% (p/v), 5% de leite desidratado (p/v) e 15% de soro normal de cabra (v/v)]. A NOS tipo I foi detectada usando-se um anticorpo policlonal purificado de coelho diluído 1:10 (v/v) em tampão bloqueador.

2.4.3 Ensaio imunohistoquímico

Os eosinófilos foram hidratados com tampão citrato de sódio 10 mM, pH 6.0 por 30 minutos. A imunoreatividade da NOS foi recuperada aquecendo-se as células hidratadas em tampão citrato de sódio, pH 6.0 em forno de microondas (Sharp, modelo RB4A33) por 15 minutos. A temperatura do forno de microondas foi ajustada a fim de se obter poder máximo. As lâminas foram resfriadas por 20 minutos à temperatura ambiente, e incubadas sequencialmente por 30 minutos em Tris- Glicina 0.1 M, pH 7.4 e em tampão bloqueador.

Os eosinófilos foram incubados com os anticorpos anti-NOS diluídos como descrito anteriormente (item 2.4.2). Nos grupos controle, os anticorpos primários foram substituídos por tampão bloqueador. Após a incubação, as células foram lavadas com tampão fosfato de sódio 0.02 M, pH 7.4 contendo cloreto de sódio 0.45 M, Triton X-100 0.2% (tampão A). A revelação do

anticorpo anti-NOS I foi realizado usando-se uma IgG de cabra anti coelho conjugada à fosfatase alcalina diluída 1:500 (v/v), em tampão bloqueador. A revelação dos anticorpos anti-NOS II e III foi realizada usando-se uma IgG de cabra anti camundongo biotinilada, seguida pela incubação com fosfatase alcalina-estreptoavidina. Após cada passo da incubação imunohistoquímica, os eosinófilos foram lavados com tampão A.

A reação da fosfatase alcalina foi desenvolvida com azul de nitro tetrazólio e 5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato na presença de 2 mM de levamisole por 30 minutos (HARROW et al., 1988). A reação foi interrompida com água destilada. As células foram coradas com eosina e cromotropo 2R (KAY,1970), desidratadas, diafanizadas com xileno e cobertas com Permount. Todas as operações foram realizadas à temperatura ambiente.

2.5 Análise Estatística

Os resultados foram expressos como média ± erro padrão das médias (E.P.M.) de *n* experimentos. Diferenças estatisticamente significativas foram determinadas utilizando-se análise de variância (ANOVA) para múltiplas comparações seguido pelo teste de Duncan. Valores de $p < 0.05$ foram considerados significativos.

3. RESULTADOS

3.1 QUIMIOTAXIA *IN VITRO* DE EOSINÓFILOS INDUZIDA POR fMLP

A concentração de fMLP utilizada em nossos experimentos foi de 5×10^{-8} M uma vez que resultados anteriores obtidos em nosso laboratório, demonstraram que esta é a menor concentração capaz de causar migração máxima de eosinófilos. Assim, nessa concentração, observamos migração significativa (8.7 ± 0.7 eosinófilos/campo, n=3) quando comparada à migração espontânea (2.1 ± 0.3 eosinófilos/campo, $p<0.05$).

3.1.1 EFEITO DO TRATAMENTO COM L-NAME E D-NAME SOBRE A QUIMIOTAXIA *IN VITRO* DE EOSINÓFILOS

A incubação dos eosinófilos (37°C, 30 minutos) com L-NAME nas concentrações de 0.1, 0.5 e 1.0 mM resultou em inibição significativa e dependente da dose da quimiotaxia induzida pelo fMLP. A inibição máxima (53.7%) foi observada com 1 mM de L-NAME. A incubação das células com o enantiômero inativo D-NAME (mesmas concentrações) não resultou em alteração da resposta quimiotáxica quando comparada ao controle (MEM) (Figura 1A). A incubação das células com L-NAME, mas não com D-NAME, nas mesmas concentrações, também resultou em redução significativa da migração espontânea (Figura 1B).

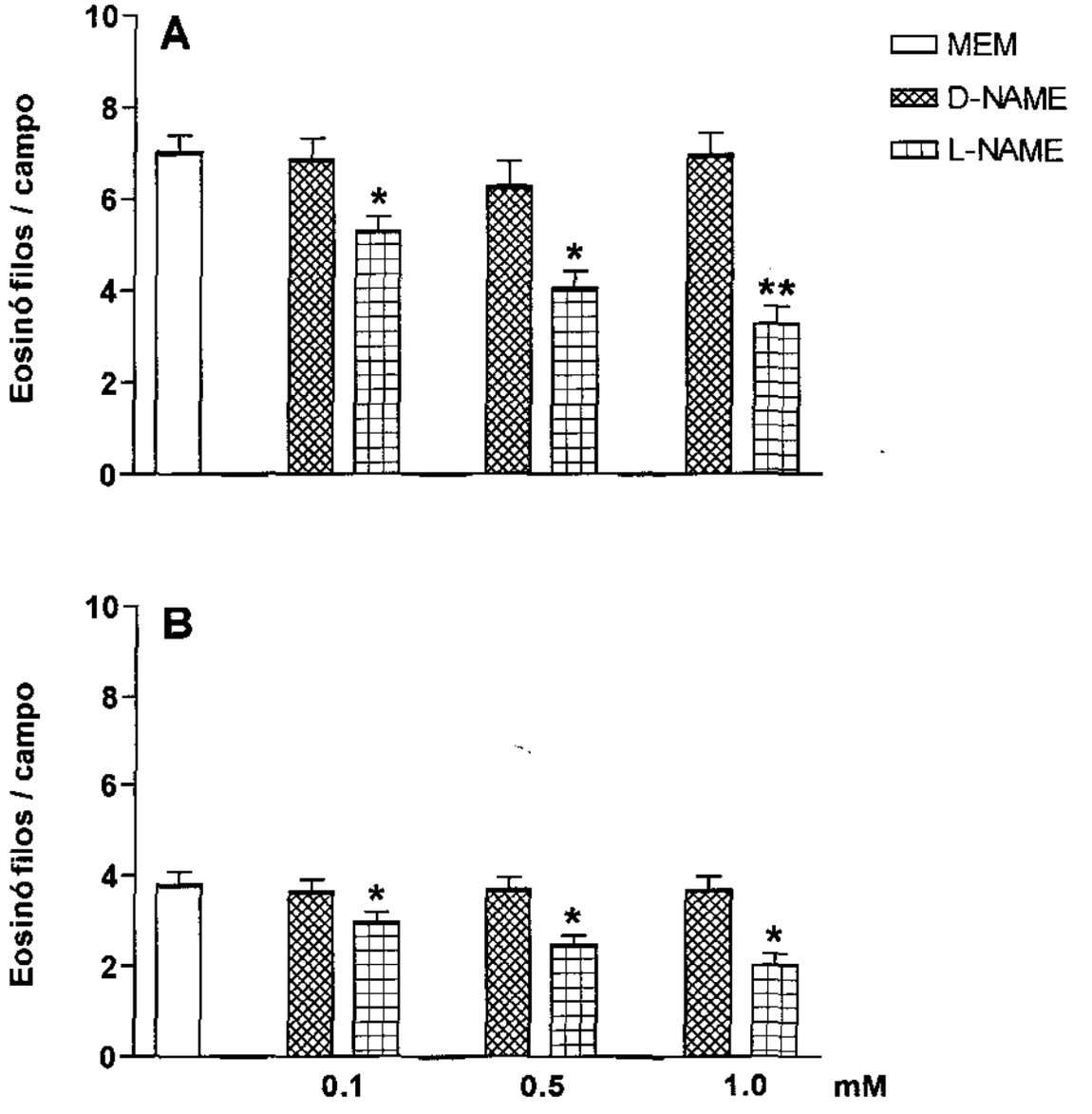

Figura 1. Efeito da incubação da suspensão de eosinófilos com L-NAME e D-NAME sobre a quimiotaxia *in vitro*. Os gráficos A e B representam a quimiotaxia de eosinófilos induzida pelo fMLP (5×10^{-8} M) e a migração espontânea, respectivamente. Cada experimento foi feito em triplicata. A quimiotaxia está expressa como média do número de células que migraram em 5 campos aleatórios. Os resultados estão expressos como média ± E.P.M. (n=3). * $P<0.05$, comparado à migração na ausência de L-NAME. ** $P<0.05$, comparado à concentração de 0.1 mM de L-NAME.

3.1.2 INIBIÇÃO DA QUIMIOTAXIA PELO L-NAME: EFEITO DO NITROPRUSSIATO DE SÓDIO (SNP) E DIBUTIRIL GMP CÍCLICO (dGMPc)

Conforme demonstrado na Figura 1, a incubação dos eosinófilos com L-NAME resultou em inibição significativa da migração espontânea e a da estimulada pelo fMLP. Dessa forma, investigamos se a inibição causada pelo L-NAME era revertida pelo SNP e dibutiril GMP cíclico. A Figura 2A mostra que a adição de SNP ou dGMPc à suspensão de eosinófilos concomitantemente ao L-NAME reverteu o efeito inibitório sobre a migração causada pelo L-NAME. Além disso, o SNP *per se*, mas não o dGMPc, aumentou em 28% a migração induzida pelo fMLP ($p<0.05$). Com relação à migração espontânea, observamos resultados semelhantes, ou seja, o SNP *per se*, mas não o dGMPc, aumentou significativamente ($p<0.05$) este efeito. O tratamento concomitante do SNP ou dGMPc com o L-NAME, também reverteu de maneira significativa a inibição da migração espontânea (Figura 2B).

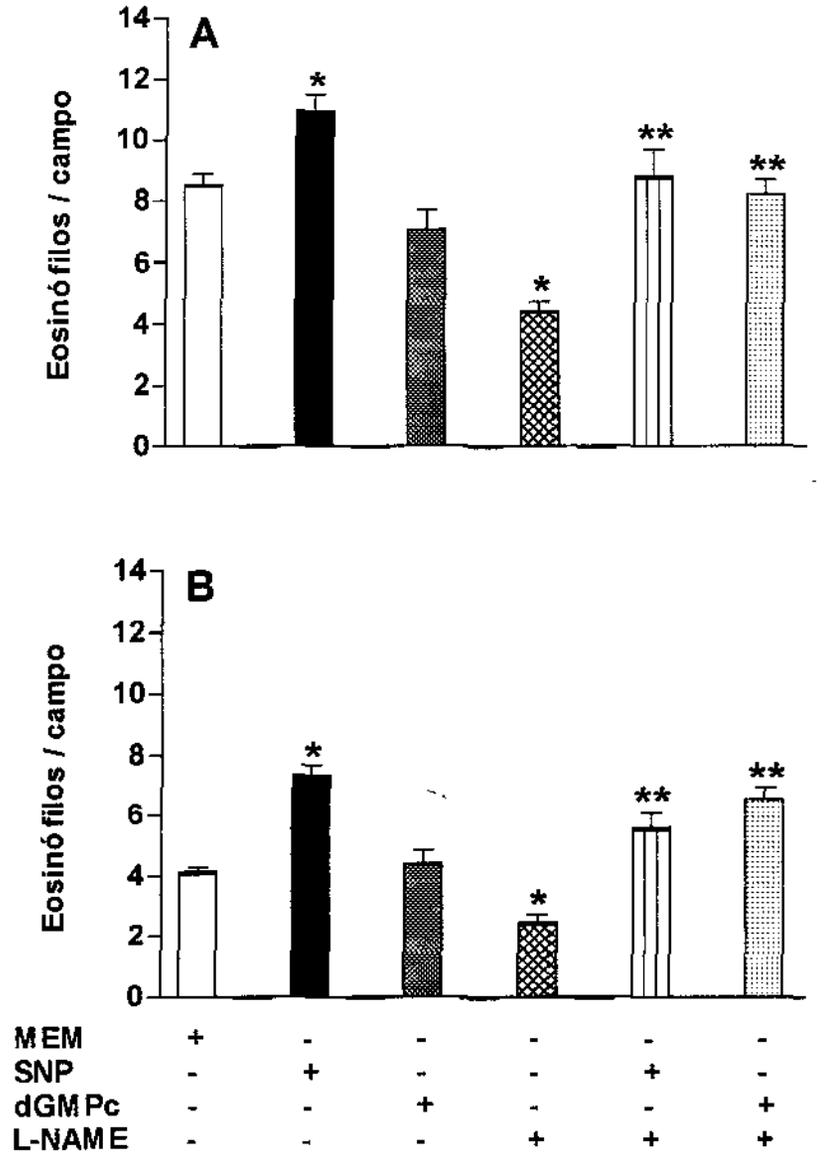

Figura 2. Inibição da quimiotaxia de eosinófilos pelo L-NAME: efeito do nitroprussiato de sódio (SNP) e dibutiril GMP cíclico (dGMPc). Os gráficos A e B representam a quimiotaxia de eosinófilos induzida pelo fMLP (5×10^{-8} M) e a migração espontânea, respectivamente. As concentrações utilizadas de L-NAME, SNP e dGMPc foram, respectivamente de 0.5, 0.1 e 1.0 mM. Os eosinófilos foram incubados com SNP (ou dGMPc), na ausência ou presença de L-NAME, conforme legenda abaixo dos gráficos. Cada experimento foi feito em triplicata. A quimiotaxia está expressa como média do número de células migradas em 5 campos aleatórios. Os resultados estão expressos como média ± E.P.M. (n=4). * $P<0.05$ comparada com a migração controle (estimulada ou espontânea). ** $P<0.05$, quando comparado à migração na presença de L-NAME.

3.1.3 EFEITO DO TRATAMENTO COM O INIBIDOR ESPECÍFICO DA GUANILATO CICLASE SOLÚVEL, ODQ, SOBRE A QUIMIOTAXIA *IN VITRO* DE EOSINÓFILOS

A incubação dos eosinófilos com ODQ (37°C, 30 minutos) nas concentrações de 0.01 e 0.1 mM resultou em inibição significativa e dependente da dose da quimiotaxia induzida pelo fMLP (Figura 3A). Com a incubação de 0.1 mM de ODQ, observamos níveis de migração estimulada semelhantes aos observados para a migração espontânea (5.44 ± 0.35 x 4.73 ± 0.23). Além disso, o ODQ (0.1 mM), também inibiu significativamente a migração espontânea (Figura 3B).

Numa segunda etapa, investigamos se o efeito inibitório do ODQ (0.1 mM) sobre a migração celular poderia ser revertido quando as células fossem incubadas, concomitantemente, com o dGMPc (1.0 mM). De fato, observamos que, na presença do dGMPc, a inibição da migração evocada pelo ODQ foi significativamente reduzida (Figura 4A). Com relação à migração espontânea, a incubação concomitante do ODQ e dGMPc resultou em aumento significativo da migração espontânea a qual atingiu valores semelhantes aos da migração estimulada com fMLP (Figura 4B).

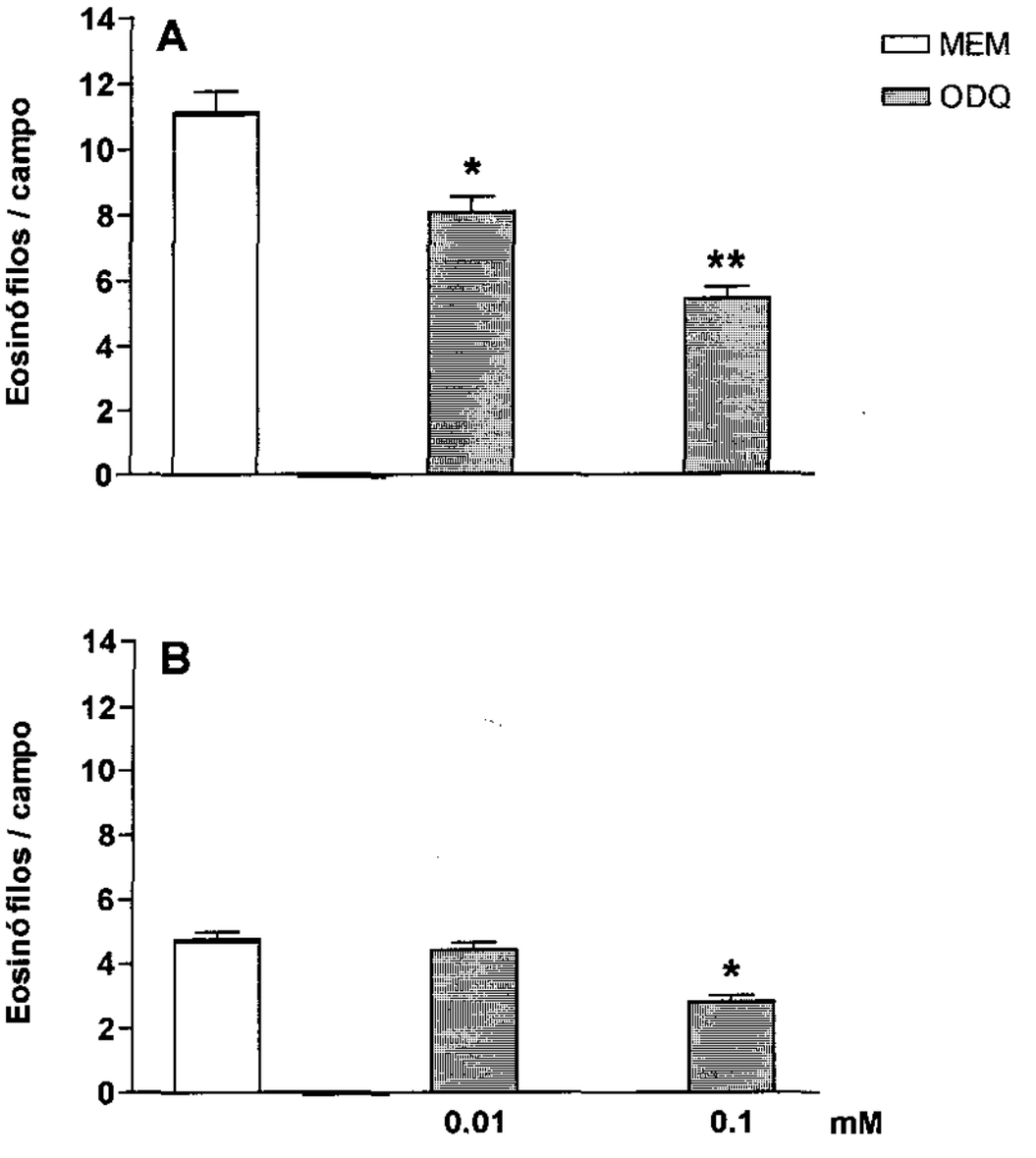

Figura 3. Efeito do inibidor seletivo da guanilato ciclase solúvel, ODQ, sobre a quimiotaxia *in vitro* de eosinófilos. Os gráficos A e B representam a quimiotaxia de eosinófilos induzida pelo fMLP (5×10^{-8} M) e a migração espontânea respectivamente. Cada experimento foi feito em triplicata. A quimiotaxia está expressa como média do número de células migradas em 5 campos aleatórios. Os resultados estão expressos como média ± E.P.M. (n=4). * $P<0.05$, quando comparado à migração na ausência de ODQ. ** $P<0.05$, quando comparado à concentração de 0.01 mM de ODQ.

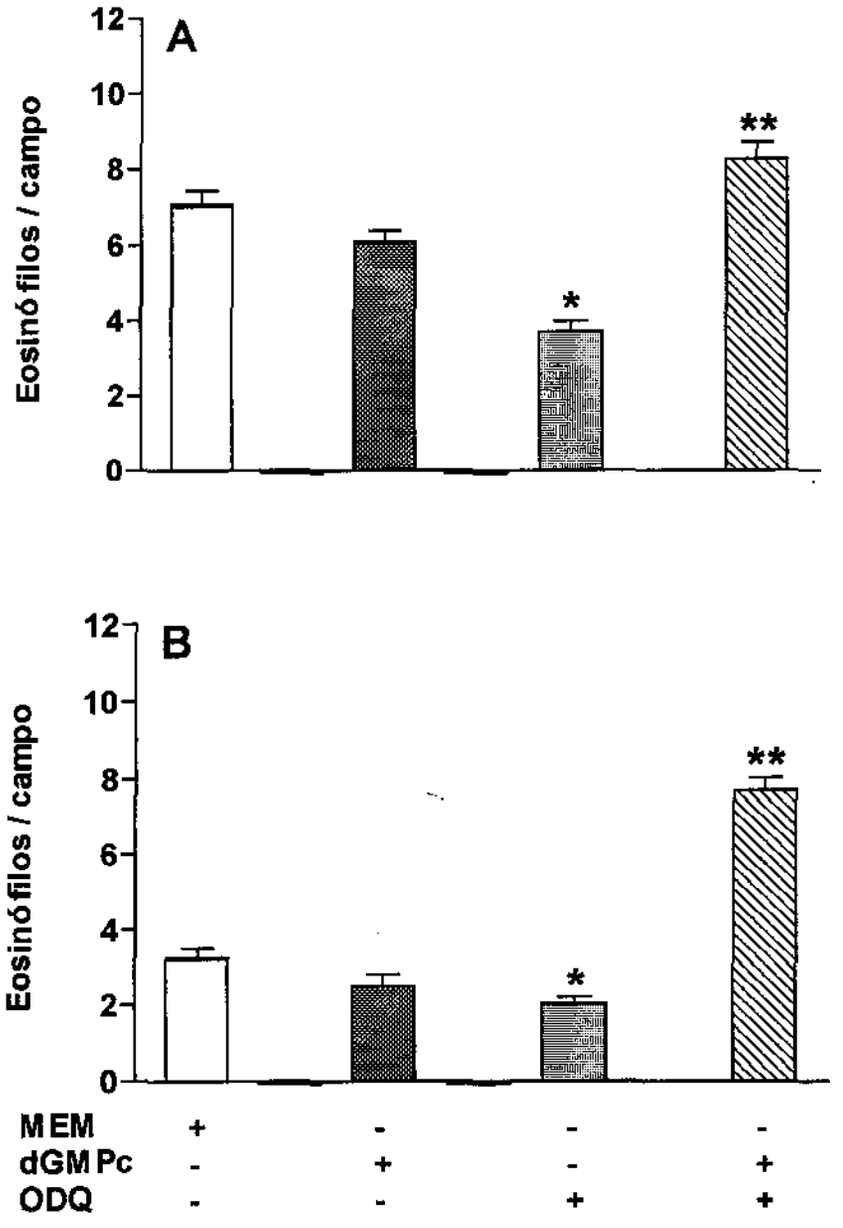

Figura 4. Efeito inibitório do ODQ sobre a quimiotaxia de eosinófilos: reversão pelo dGMPc. Os gráficos A e B representam a quimiotaxia de eosinófilos induzida pelo fMLP (5×10^{-8} M) e a migração espontânea, respectivamente. O ODQ e dGMPc foram utilizados nas concentrações de 0.1 e 1.0 mM, respectivamente. Cada experimento foi feito em triplicata. A quimiotaxia está expressa como média do número de células migradas em 5 campos aleatórios. Os resultados estão expressos como média ± E.P.M. (n=3). * $P<0.05$, quando comparado à migração na ausência de ODQ. ** $P<0.05$, quando comparado à migração na presença de ODQ.

3.1.4 EFEITO DO TRATAMENTO COM AMT E TRIM SOBRE A QUIMIOTAXIA *IN VITRO* DE EOSINÓFILOS

A incubação dos eosinófilos com AMT e TRIM nas concentrações de 0.1, 0.5 e 1.0 mM resultou em inibição significativa da migração pelo fMLP (Figura 5A). Na concentração de 1.0 mM, a inibição causada pelo AMT e pelo TRIM foi, respectivamente de 55% e 41.1%. A migração espontânea também foi significativamente reduzida pelo AMT e pelo TRIM (Figura 5B).

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

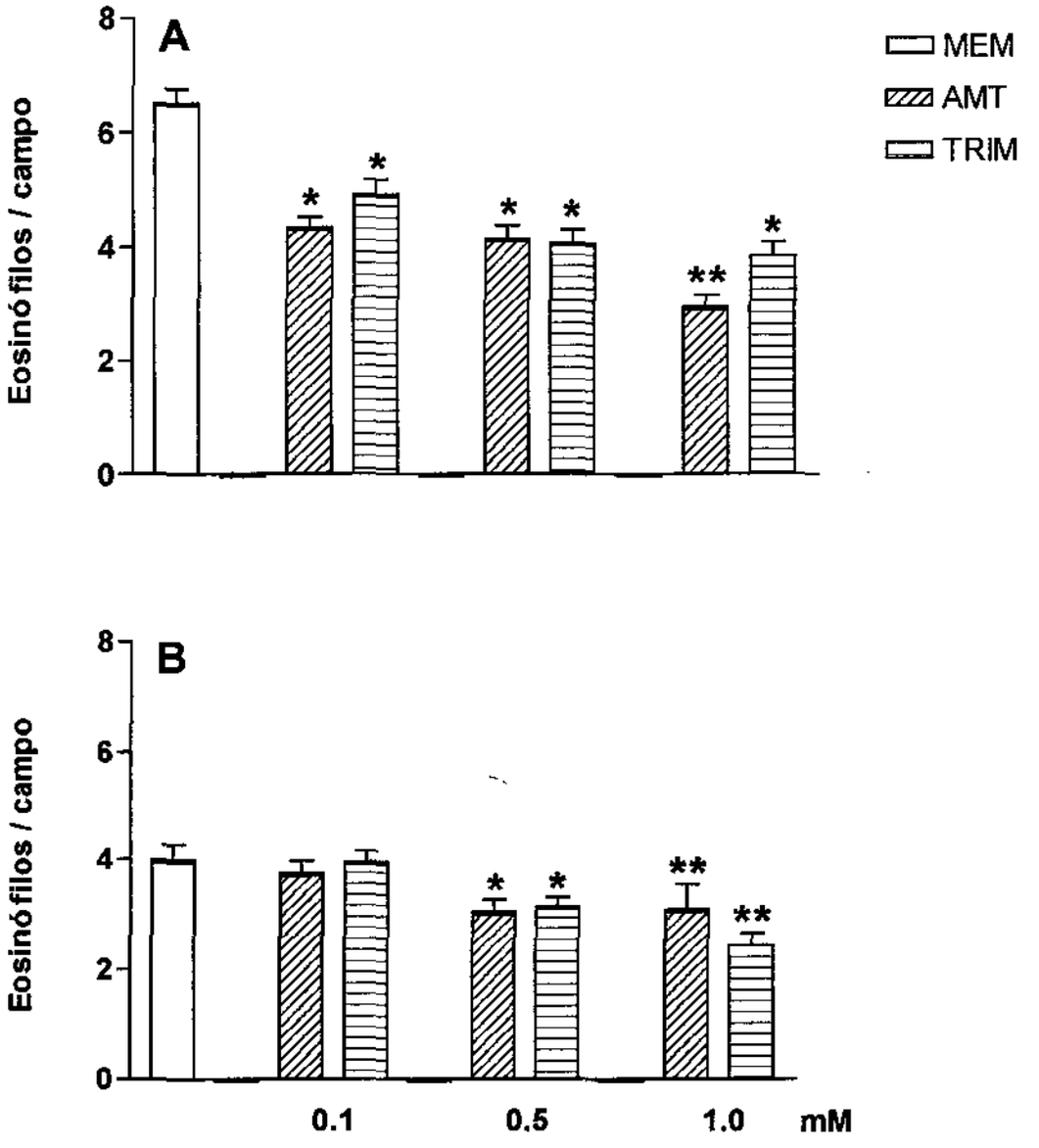

Figura 5. Efeito do AMT e TRIM sobre a quimiotaxia *in vitro* de eosinófilos. Os gráficos A e B representam a quimiotaxia induzida pelo fMLP (5×10^{-8} M) e a migração espontânea, respectivamente. Cada experimento foi feito em triplicata. A quimiotaxia está expressa como média do número de células migradas em 5 campos aleatórios. Os resultados estão expressos como média ± E.P.M. (n=3). * $P<0.05$, quando comparado à migração na ausência de AMT ou TRIM. ** $P<0.05$, quando comparado à concentração de 0.1 mM de AMT.

3.2 QUIMIOTAXIA DE EOSINÓFILOS INDUZIDA PELO LTB_4

Para verificarmos a resposta quimiotáxica frente à outro agente quimiotáxico utilizamos o LTB_4.

Os eosinófilos obtidos das cavidades peritoneais migraram significativamente em resposta ao LTB_4 na concentração de 10^{-8} M (10.53 ± 0.84, n=3) quando comparada à migração espontânea (2.11 ± 0.31, $P < 0.05$).

3.2.1 EFEITO DO TRATAMENTO COM L-NAME, AMT E TRIM SOBRE A QUIMIOTAXIA DE EOSINÓFILOS INDUZIDA PELO LTB_4

A Figura 6A mostra que a incubação dos eosinófilos com L-NAME, AMT e TRIM, nas concentrações de 0.1 e 1.0 mM, resultaram em inibição significativa da quimiotaxia estimulada. Com relação à migração espontânea verificou-se que o AMT e TRIM causaram inibição significativa apenas na dose de 1.0 mM, enquanto o L-NAME reduziu significativamente em ambas as concentrações utilizadas (Figura 6B).

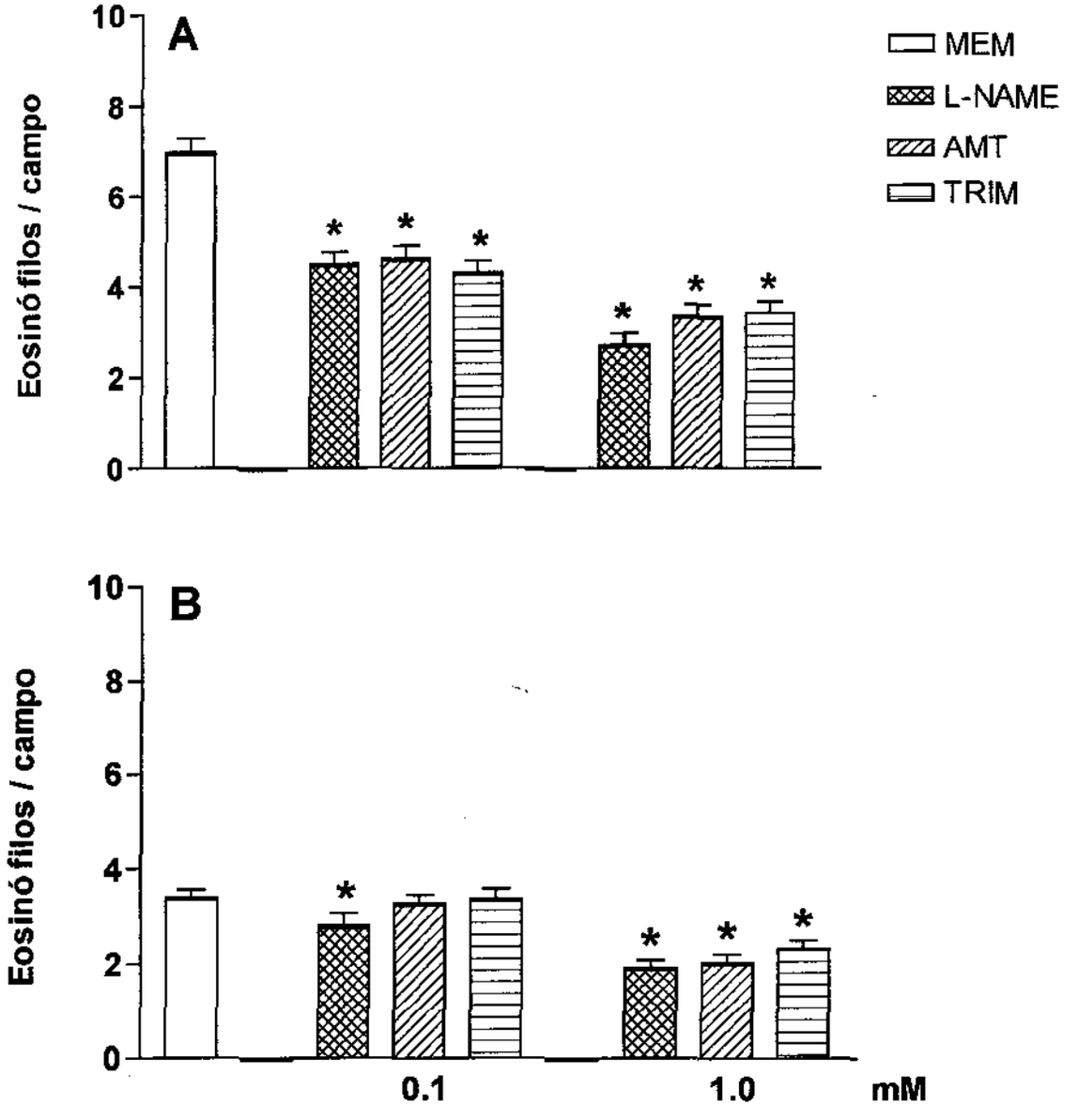

Figura 6. Efeito do tratamento com L-NAME, AMT e TRIM sobre a quimiotaxia *in vitro* de eosinófilos. Os gráficos A e B representam a quimiotaxia induzida pelo LTB_4 (10^{-8} M) e a migração espontânea, respectivamente. Cada experimento foi feito em triplicata. A quimiotaxia está expressa como média do número de células migradas em 5 campos aleatórios. Os resultados estão expressos como média ± E.P.M. (n=3). * $P<0.05$, quando comparado à migração na ausência do L-NAME, AMT e TRIM.

3.3 IMUNOREATIVIDADE DAS ISOFORMAS DA ÓXIDO NÍTRICO SINTASE I, II E III EXPRESSAS EM EOSINÓFILOS PERITONEAIS DE RATO

Os resultados obtidos com a técnica de imunohistoquímica demonstraram isoformas localizadas nos grânulos citoplasmáticos dos eosinófilos (Figura 7). Eosinófilos peritoneais de rato expressam imunoreatividade para as isoformas II e III da NOS. Além disso, a imunoreatividade para a isoforma I foi detectada em menos de 0.5% do total de células contadas (Tabela 1).

Tabela 1. Imunoreatividade da NOS expressa em eosinófilos peritoneais de rato.

NOS	% (1700 células contadas)
Tipo I	< 0.5
Tipo II	30.2 ± 11.6
Tipo III	24.7 ± 7.41

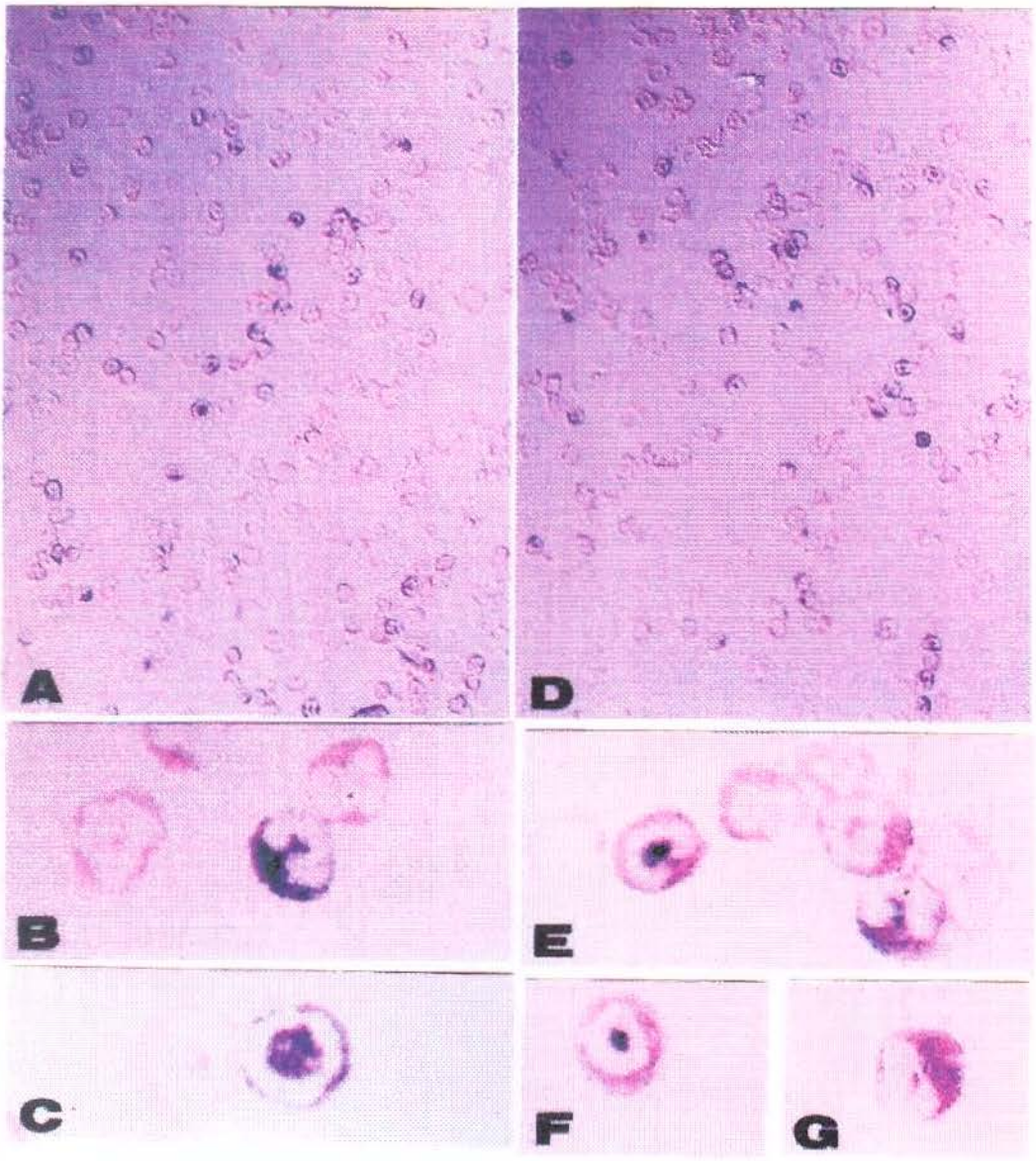

Figura 7. Imunolocalização da NOS II (painéis A, B e C) e III (painéis D, E, F e G) nos grânulos citoplasmáticos de eosinófilos peritoneais purificados de rato. A NOS foi detectada usando-se NBT/BCIP (produto de reação azul) e contracoradas com eosina.

4. DISCUSSÃO

Nossos resultados demonstram que a migração de eosinófilos induzida pelo fMLP e LTB_4 foi significativamente inibida quando as células foram pré-incubadas com o L-NAME (mas não com o D-NAME). A migração foi completamente restabelecida pela administração exógena de doador de NO, o nitroprussiato de sódio (SNP), e pelo análogo do GMP cíclico, o dibutiril GMP cíclico (dGMPc). Além disso, observamos que o ODQ (inibidor da guanilato ciclase solúvel) causou redução significativa na quimiotaxia induzida pelo fMLP, sendo esta redução completamente revertida pelo dGMPc. Em conjunto, estes resultados sugerem que pelo menos *in vitro* a migração de eosinófilos de rato é modulada pelo sistema funcional NOS-GMPc.

O mecanismo regulador da quimiotaxia de neutrófilos ainda não está totalmente bem caracterizado (DEVREOTES & ZIGMOND, 1988). Sabe-se que essas células orientam sua locomoção ao longo de um gradiente quimiotáxico por extender seu lamelipódio em direção à região de alta concentração do agente quimiotáxico (DEVREOTES & ZIGMOND, 1988). Este processo é regulado por diversos segundos mensageiros. A formação do lamelipódio e o aumento da polimerização da actina ocorrem concomitantemente em resposta ao estímulo quimiotáxico. Neste processo, as proteínas G são requeridas para a rápida polimerização da actina (DOWNEY, 1990). Entretanto, a polimerização e a despolimerização da actina é regulada por proteínas que se ligam à actina, tais como a profilina e a gelsolina, as quais são controladas por fosfoinositídeos e pela concentração de cálcio intracelular (STOSSEL, 1989; HOWARD et al., 1990). Os níveis dos nucleotídeos, principalmente de AMPc e GMPc, podem regular a quimiotaxia de monócitos e PMNs (STEPHENS & SNYDERMAN, 1982). Estudos realizados por ELFERINK & KOSTER (1993) indicaram que a modulação da migração de neutrófilos pelo AMPc pode depender de sua concentração intracelular. Nesse sentido, o AMPc pode tanto causar inibição como ativação da migração espontânea em células eletropermeabilizadas. A

ativação da migração ocorreu em uma faixa estreita da concentração desse nucleotídeo (0.5 - 2 μM).

No que diz respeito ao GMPc, esses autores mostraram que baixas concentrações desse nucleotídeo (até 5 μM) é capaz de aumentar a migração de neutrófilos, enquanto altas concentrações (maior que 5 μM) associa-se à inibição da quimiotaxia.

Nossos resultados onde a quimiotaxia de eosinófilos foi inibida significativamente pelo L-NAME e restaurada pelo SNP e dGMPc, são semelhantes àqueles obtidos por KAPLAN et al. (1989) e BELENKY et al. (1993a; 1993b). Os primeiros, utilizando PMNs e, os segundos avaliando a quimiotaxia *in vitro* de neutrófilos (1993a) e monócitos (1993b), demonstraram que inibidores da síntese de NO inibem a migração dessas células estimulada por fMLP , e a inibição foi revertida pela adição de análogos do GMPc (KAPLAN et al.,1989; BELENKY et al. 1993a; 1993b) e doador de NO, nitroprussiato de sódio (BELENKY et al. 1993a; 1993b).

BEAUVAIS et al. (1995b), utilizando doadores de NO como a S-nitroso-N-acetilpenicilamina (SNAP), SIN-1 e S-nitroso-cisteína como agentes quimiotáxicos, demonstraram que estes compostos induzem migração direcionada de neutrófilos em gel de agarose. No que tange à quimiotaxia induzida pelo SNAP, esses autores sugerem o envolvimento do GMPc, visto a migração ter sido inibida pela oxihemoglobina e pelo inibidor da guanilato ciclase solúvel, LY 83583. Contrariamente, MOILANEN et al. (1993) demonstraram que doadores de NO, derivados do oxatriazol, aumentam os níveis celulares de GMPc, sendo este efeito acompanhado de inibição da atividade funcional de PMNs, incluindo a quimiotaxia. Em recente estudo, VANUFFELEN et al. (1996), estudaram o efeito do NO exógeno na migração espontânea de neutrófilos peritoneais de coelho, e verificaram que o NO aumenta a migração dessas células, sendo esse efeito mediado pelo GMPc, visto que inibidores da guanilato ciclase solúvel, LY 83583 e azul de metileno, inibiram tanto a migração induzida pelo NO quanto em sua ausência.

Nossos dados de imunohistoquímica mostraram que os eosinófilos expressam imunoreatividade para a NOS tipo II (iNOS) e III (eNOS) reforçando o conceito de que os eosinófilos apresentam um sistema funcional de NOS. De fato, o inibidor da NOS I e II (TRIM) e o inibidor da NOS II (AMT) diminuiram significativamente a migração de eosinófilos.

A expressão da NOS II é induzida por citocinas e LPS (DOMINICZAK & BOHR, 1995). BANDALETOVA et al. (1993) mostraram que ratos tratados com *Propionibacterium acnes* e LPS apresentam imunoreatividade para a NOS II em eosinófilos de baço e cólon. Por outro lado, nossos resultados mostram a existência da NOS II em eosinófilos peritoneais de rato, sugerindo que pelo menos parte destas células poderiam estar ativadas na cavidade peritoneal. Recentemente e ao final da realização deste trabalho, DEL POZO et al. (1997), verificaram a expressão da NOS tipo II em eosinófilos humanos e eosinófilos de linhagem (Eol-3). No entanto, esses autores não concluiram se a preseça da NOS II se deve à ativação *in vivo* durante seu processo de diferenciação ou se a presença da NOS II é uma característica constitutiva de algumas células. Os autores também descartam a possibilidade da ativação celular durante o processo de separação, pois eosinófilos da linhagem Eol-3 mantidos em cultura também expressam NOS II. Em um outro estudo WALLERATH et al.(1997), utilizando células de doadores sadios, demonstraram além da NOS III, a presença da NOS II em megacariócitos de esfregaço de medula e plaquetas. É sugerido, nesse trabalho, que a expressão da NOS II poderia ser induzida por citocinas produzidas por outras células hematógenas presentes na medula ou então ser expressa constitutivamente. Neste mesmo trabalho, foi verificada a presença da NOS I em neutrófilos isolados do sangue periférico, enquanto que a imunoreatividade para a NOS II foi detectada nos eosinófilos contaminantes. Entretanto, não ficou esclarecido por que os eosinófilos provenientes de doadores sadios expressam a NOS II. Park et al. (1996), demonstraram que tecidos humanos, como retina, músculo esquelético e cerebelo expressam a NOS II constitutivamente.

Embora o NO possua outras ações independentes da formação de GMPc (BRUNE & LAPETINA, 1989; BOLOTINA et al., 1994; NAKANE et al., 1995), os achados de que a inibição da migração de eosinófilos foi mimetizada pelo inibidor da guanilato ciclase solúvel ODQ e revertida pelo dibutiril GMPc, indicam papel relevante desse mensageiro na migração de eosinófilos. Estudos prévios indicam que, doadores de NO não convencionais tais como azida e hidroxilamina inibem a apoptose em eosinófilos isolados do sangue de indivíduos sadios, sendo este efeito mimetizado por análogos permeáveis do GMPc, sugerindo que a ativação do sistema NO-GMPc parece ser um importante mecanismo para a sobrevivência do eosinófilo (BEAUVAIS et al., 1995a).

A asma é caracterizada por hiperreatividade brônquica e um aumento na migração de eosinófilos. O uso de corticosteróides inalados têm sido associado com a melhora do quadro clínico e diminuição de ambos os parâmetros (BOUSQUET et al., 1990; SCHLEIMER, 1990; BARNES, 1995). A medida em que os glicocorticóides são conhecidos por inibir a indução da NOS II (RADOMSKI et al., 1990; KNOWLES et al., 1990), e a indicação pelos nossos dados, da sua expressão em eosinófilos, podemos inferir que a melhora do quadro clínico dos pacientes em tratamento crônico com glicocorticóides, possa ser devida, pelo menos em parte, à inibição da expressão da NOS II nessas células.

Recentemente, KANAZAWA et al. (1997) mostraram alta concentração de nitrato e nitrito em escarro de pacientes asmáticos, bem como maior número de eosinófilos e altos níveis de ECP, quando comparado aos pacientes normais. Pacientes que receberam corticóide por via inalatória, apresentaram níveis menores de derivados do NO comparados aos pacientes não submetidos ao tratamento. Portanto, níveis aumentados de NO podem ser devidos à indução da NOS II tanto nas células epiteliais pulmonares, quanto nas células inflamatórias.

Finalmente, os resultados apresentados neste estudo podem sugerir que, a inibição seletiva da atividade da NOS II nos eosinófilos pode contribuir para a modulação da inflamação mediada por essas células, tais como a asma.

5. CONCLUSÕES

1) Os resultados *in vitro* demonstraram que:

- o L-NAME inibe a migração de EOs, e que esta inibição é revertida pelo SNP e dGMPc.

- o ODQ inibe a migração de EOs, provavelmente baixando os níveis de GMPc na célula, e portanto diminuindo a migração. Tal efeito foi revertido pelo dGMPc.

- o AMT e o TRIM inibiram a migração de EOs, sugerindo o envolvimento da NOS II.

2) Os resultados de imunohistoquímica demonstraram que os EOs de rato expressam reatividade para as isoforma II e III da NOS, e este fato é confirmado pelos resultados *in vitro*, onde o AMT e o TRIM mostraram inibir significantemente a migração, reforçando a presença da NOS II.

3) Sugerimos a presença de um sistema funcional de NOS em EOs de ratos, que provavelmente age através de um mecanismo de transdução de GMPc.

6. SUMMARY

Our results demonstrate that rat peritoneal eosinophil strongly expresses both type II (30.2 ± 11.6%) and type III (24.7 ± 7.41%), as detected by immunohistochemistry using affinity purified mouse monoclonal antibodies. Eosinophil migration *in vitro* was evaluated using a 48-well microchemotaxis chamber and the chemotactic agents employed were N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (fMLP, 5 x 10^{-8} M) and leukotriene B_4 (LTB_4, 10^{-8} M). L-NAME (but not D-NAME) significantly inhibited the eosinophil migration induced by both fMLP (54% reduction for 1.0 mM; $P<0.05$) and LTB_4 (61% reduction for 1.0 mM; $P<0.05$). The type II NOS inhibitors AMT and TRIM also markedly ($P<0.05$) attenuated fMLP- (52% and 38% reduction for 1.0 mM, respectively) and LTB_4 (52% and 51% reduction for 1.0 mM, respectively). The inhibition of eosinophil migration by L-NAME was mimicked by the soluble guanylate cyclase inhibitor ODQ (0.01 and 0.1 mM) and reversed by either sodium nitroprusside (0.1 mM) or dibutyryl cyclic GMP (1 mM). In conclusion, the eosinophil does express NO synthase(s) and this mediator plays an essential role for eosinophil locomotion, by acting through a cyclic-GMP transduction mechanism.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALAM, R.; STAFFORD, S.; FORSYTHE, P.; HARRISON, R.; FAUBION, D.; LETT-BROWN, M.A. & GRANT, J.A. - RANTES is a chemotactic and activating factor for human eosinophils. **J. Immunol. 150**: 3442-3447, 1993.

ARNOLD, W.P.; MITTAL, C.K.; KATSUKI, S. & MURAD, F. - Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3':5'-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 74**: 3203-3207, 1977.

BANDALETOVA, T.; BROUET, I.; BARTSCH, H.; SUGIMURA, T.; ESUMI, H. & OHSHIMA, H. - Immunohistochemical localization of an inducible form of nitric oxide synthase in various organs of rats treated with *Propionibacterium acnes* and lipopolysaccharide. **APMIS 101:** 330-336, 1993.

BARNES, P.J. - Inhaled glucocorticoids for asthma. **N. Engl. J. Med. 332**: 868-875, 1995.

BARNES, P.J. - Pathophysiology of asthma. **Br. J. Clin. Pharmacol. 42**: 3-10, 1996.

BEAUVAIS, F.; MICHEL, L. & DUBERTRET, L. - The nitric oxide, azide and hydroxylamine, inhibit the programmed cell death of cytokine-deprived human eosinophils. **FEBS Lett. 361**: 229-232, 1995a.

BEAUVAIS, F; MICHEL, L. & DUBERTRET, L. - Exogenous nitric oxide elicits chemotaxis of neutrophils *in vitro*. **J. Cell. Physiol. 165:** 610-614, 1995b.

BELENKY, S.N.; ROBBINS, R.A.; RENNARD, S.I.; GOSSMAN, G.L.; NELSON, K.J. & RUBINSTEIN, I. - Inhibition of nitric oxide synthase attenuate human neutrophil chemotaxis *in vitro*. **J. Lab. Clin. Med. 122**: 388-394, 1993a.

BELENKY, S.N.; ROBBINS, R.A. & RUBINSTEIN, I. - Nitric oxide inhibitors attenuate human monocyte chemotaxis *in vitro*. **J. Leukoc. Biol. 53**: 498-503, 1993b.

BOHME, G.A.; BON, C.; STUTZMANN, J.M.; DOBLE, A. & BLANCHRADT, J.C.; - Possible involvement of nitric oxide in long-term potentiation. **Eur. J. Pharmacol. 199**: 379-381, 1991.

BOLOTINA, V.M.; NAJIBI, S.; PALACINO, J.J.; PAGANO. P.J. & COHEN,, R.A. - Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. **Nature (London) 368**: 850-853, 1994.

BOUSQUET, J.; CHANEZ, P.; LACOSTE, J.Y.; BARNEON, G.; CHAVANIAN, N.; ENANDER, I.; VENGE, P.; AHISTEDT, S.; SIMONY-LAFONTAINE, J.; GODARD, P. & MICHEL, F.B. - Eosiniphilic inflammation in asthma. **N. Engl. J. Med. 323**: 1033-1039, 1990.

BRAUN, R.K.; FRANCHINI, M.; ERARD, F.; RIHS, S.; DE VRIES, I.J.M.; BLASER, K.; HANSEL, T.T. & WLKER, C. - Human peripheral blood eosinophils produce and release interleukin-8 on stimulation with calcium ionophore. **Eur. J. Immunol. 23**: 956-960, 1993.

BREDT, D.S. & SNYDER, S.H. - Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87**: 682-685, 1990.

BREDT, D.S. & SNYDER, S.H. - Nitric oxide mediates glutamate-linked enhancement of cGMP levels in the cerebellum. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86**: 9030-9033, 1991.

BREDT, D.S.; HWANG, P.M.; GLATT, C.E.; LOWENSTEIN, C.; REED,R.R. & SNYDER, S.H. - Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase. **Nature (London) 351**: 714-718, 1991.

BRUNE, B. & LAPETINA, E.G. - Activation of a cytosolic ADP-ribosyltransferase by nitric oxide-generating agents. **J. Biochem. Chem. 264**: 8455-8458, 1989.

BRUNNER, F.; SCHMIDT, K.; NIELSEN, E.B. & MAYER, B. - Novel guanylyl cyclse inhibitor potently inhibits cyclis GMP accumulation in endothelial cells and relaxation of bovine pulmonary artery. **J. Pharmacol. Exp. Ther. 277**: 48-53, 1996.

BRUYNZEEL, P.L.B.; KOK, P.T.M.; HAMELINK, M.L.; KIJNE, A.M.; VERHAGEN, J. - Platelet-activating factor induces leukotriene C_4 synthesis by purified human eosinophils. **Prostaglandins 34:**205-214, 1987.

BURKE, L.A.; CREA, A.E.G.; WIKINSON, J.R.W.; ARM, J.P.; SPUR, B.W. & LEE, T.H. Comparison of the generation of platelet activating factor and leukotriene C_4 in human eosinophils stimulated by unopsonized zymosan and by calcium ionophore A23187: the effect of nedocromil sodium. **J. Allergy Clin. Immunol., 85**: 26-35, 1990.

BUSSE, W.W. & SEDGWICK, J.B. - Eosinophils in asthma. **Ann. Allergy 68:** 286-290, 1992.

CATTELL,V. & JANSEN, A. - Inducible nitric oxide synthase in inflammation. **Histochem. J. 27:** 777-784, 1995.

CELLEK, S.; KASAKOV, L. & MONCADA, S. - Inhibition of nitrergic relaxations by a selective inhibitor of the soluble guanylate cyclase. **Br. J. Pharmacol. 118**: 137-140, 1996.

CHAPMAN, P.F.; ATKINS, C.M.; ALLEN, M.T.; HALEY, J.E. & STEINNMETZ, J.E. - Inhibition of nitric oxide synthesis impairs two different forms of learning. **Neuroreport. 3**: 567-570, 1992.

CLUTTERBUCK, E.J.; HIRST, E.M.A. & SANDERSON, C.J. - Human interleukin-5 (IL-5) regulates the production of eosinophils in human bone marrow cultures: comparison and interaction with IL-1, IL-3, IL-6 and GM-CSF. **Blood 73**: 1504-1512, 1989.

COSTA, J.J.; MATOSSIAN, K.; BEIL, W.J.; WONG, D.T.W.; GORDON, J.R.; DVORAK, A.M.; WELLER, P.F. & GALLI, S.J. - Human eosinophils can express the cytokines TNF-α and MIP-1α. **J. Clin. Invest. 91**: 2673-2684, 1993.

DAFFERN, P.J.; PFEIFER, P.H.; EMBER, J.A. & HUGLI, T.E. - C3a is a chemotaxin for human eosinophils but not for neutrophils. I. C3a stimulation of neutrophils is secondary to eosinophil activation. **J. Exp. Med. 181**: 2119-2127, 1995.

DEL POZO, V.; ARRUDA-CHAVES, E.; ANDRÉS, B.; CÁRDABA, B.; LÓPEZ-FARRÉ, A.; GALLARDO, S.; CORTEGANO, I.; VIDARTE, L.; JURADO, A.; SASTRE, J.; PALOMINO, P. & LAHOZ, C. - Eosinophils transcribe and translate messenger RNA for inducible nitric oxide synthase. **J. Immunol. 158:** 859-864, 1997.

DESREUMAUZ, P.; JANIN, A.; COLOMBEL, J.F.; PRIN, L.; PLUMAS, J.; EMILIEE, D.; TORPIER, G.; CAPRON, A. & CAPRON, M. - Interleukin-5 messenger RNA expression by eosinophils in the intestinal mucosa of patients with coeliac disease. **J. Exp. Med. 175**: 293-296, 1992.

DEVREOTES, P.N. & ZIGMOND, S.H. - Chemotaxis in eukaryotic cells: a focus on leukocytes and Dictyostelium. **Ann. Rev. Cell. Biol. 4:**649-686, 1988.

DOMINICZAK, A. & BOHR, D.F. - Nitric oxide and its putative role in hypertension. **Hypertension 25**: 1202-1211, 1995.

DOWNEY, G.P. - Mechanisms of leucocyte motility and chemotaxis. **Curr. Opin. Immunol. 6**: 113-124, 1994.

ELFERINK, J.G.R. & KOSTER, B.M. - The effect of cyclic GMP and cyclic AMP on migration by electroporated neutrophils. **Eur. J. Pharmacol. 246**: 157-161, 1993.

ELFERINK. J.G.R. & VANUFFELEN, B.E. - The role of cyclic nucleotides in neutrophil migration. **Gen. Pharmacol. 27**: 387-393, 1996.

ERGER, R.A. & CASALE, T.B. - Interleukin-8 is a potent mediator of eosinophil chemotaxis through endothelium and epithelium. **Am. J. Physiol. 268**: L117-L122, 1995.

ERGER, R.A. & CASALE, T.B. - Eosinophil migration in response to three molecular species of platelet activating factor. **Inflamm. Res. 45**: 265-267, 1996.

EVANS, C.H. - Nitric oxide: what role does it play in inflammation and tissue destruction? **Agents-Actions-Suppl. 47:** 107-116, 1995.

FERREIRA, H.H.A.; MEDEIROS, M.V.; LIMA, C.S.P.; FLORES, C.A.; SANNOMIYA, P.; ANTUNES, E. & DE NUCCI, G. - Inhibition of eosinophil chemotaxis by chronic blockade of nitric oxide biosynthesis. **Eur. J. Pharmacol. 310:** 201-2017, 1996.

FERENCÍK, M. & STVRTINOVÁ, V. - Endogenous control and modulation of inflammation. **Folia Biol. Praha 42**: 47-55, 1996.

GARTHWAITE, J.; SOUTHAM, E.; BOULTON, C.L.; NIELSEN, E.B.; SCHIMIDT, K. & MAYER, B. - Potent inhibition of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase by 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one. **Mol. Pharmacol. 48**: 184-188, 1995.

GELLER, D.A.; LOWENSTEIN, C.J.; SHAPIRO, R.A.; NUSSLER, A.K.; DI, S.M.; WANG. S.C.; NAKAYAMA, D.K.; SIMMONS, R.L.; SNYDER, S.H. & BILLIAR, T.R. - Molecular cloning and expression of inducible nitric oxide synthase from human hepatocytes. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90**: 3491-3495, 1993.

GIEMBYCZ, M.A.; KROEGEL, C. & BARNES, P.J. Stimulation of the cyclo-oxygenase pathway in eosinophils by platelet-activating factor. Release of

thromboxane-A_2 and prostaglandine E and their effects on eosinophil function. **J. Immunol., 144**: 3489-3497, 1990.

GLEICH, G.J.; ADOLPHSON, C.R. & LEIFERMAN, K.M. - Eosinophils. In: **Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates,** Second Edition, ed. by J.I. Gallin, I.M. Goldstein and R. Snyderman p 663-700, Raven Press, New York, 1992.

GRIFFTHS-JOHNSON, D.A.; COLLINS, P.D.; ROSSI, A.G.; JOSE, P.J. & WILLIAMS, T.J. - The chemokine, Eotaxin, activates guinea-pig eosinophils *in vitro*, and causes their accumulation into the lung *in vivo*. **Biochem. Biophys. Res. Commun. 197**: 1167-1172, 1993.

HAMID, Q.; BARKANS, J.; MENG, Q.; YING, S.; ABRAMS, J.S.; KAY, A.B. & MOQBEL, R. - Human eosinophils synthesize and secrete interleukin-6 *in vitro*. **Blood 80**: 1496-1501, 1992.

HANDY, R.L.C.; WALLACE, P.; GAFFEN, Z.A.; WHITEHEAD, K.J. & MOORE, P.K. - The antinociceptive effect of 1-(2-trifluoromethylphenyl) imidazole (TRIM), a potent inhibitor of neuronal nitric oxide synthase *in vitro*, in the mouse. **Br. J. Pharmacol. 116**: 2349-2350, 1995.

HANDY, R.L.C.; HARB, H.L.; WALLACE, P.; GAFFEN, Z.; WHITEHEAD, K.J. & MOORE, P.K. - Inhibition of nitric oxide synthase by 1-(2-trifluoromethylphenyl) imidazole (TRIM) *in vitro*: antinociceptive and cardiovascular effects. **Br. J. Pharmacol. 119**: 423-431, 1996.

HARROW, E. & LANE, D.- Antibodies: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1988.

HOWARD, T.; CHAPONNIER, C.; YIN, H. & STOSSEL, T.P. - Gelsolin-actin interaction and actin polymerization in human neutrophils. **J. Cell. Biol. 110:** 1983-1991, 1990.

IGNARRO, L.J. - Signal transduction mechanisms involving nitric oxide. **Biochem. Pharmacol. 41**: 485-490, 1991.

JANSSENS, S.P.; SHIMOUCHI, A.; QUERTERMOUS, T.; BLOCH, D.B. & BLOCH, K.D. - Cloning and expresion of a cDNA encoding human endothelium-derived relaxing factor/nitric oxide synthase. **J. Biol. Chem. 267**: 14519- 14522, 1992.

JOSE, P.J.; GRIFFTHS-JOHNSON, D.A.; COLLINS, P.D.; WALSH, D.T.; MOQBEL, R.; TOTTY, N.F.; TRUONG, O.; HSUAN, J.J. & WILLIAMS, T.J. -

Eotaxin: A potent eosinophil chemoattractant cytokine detected in guinea-pig model of allergic airways inflammation. **J. Exp. Med. 179**: 881-887, 1994.

KAPLAN, S.S.; BILIAR, T.; CURRAN, R.D.; ZDZIARSKI, U.E.; SIMMONS, R.L. & BASFORD, R.E. - Inhibition of chemotaxis with N^G-monomethyl-L-arginine: a role for cyclic GMP. **Blood 74**: 1885-1887, 1989.

KANAZAWA, H.; SHOJI, S.; YAMADA, M.; FUJII, T.; KAWAGUCHI, T.; KUDOH, S.; HIRATA, K. & YOSHIKAWA, J. - Increased levels of nitric oxide derivatives in induced sputum in patients with asthma. **J. Allergy Clin. Immunol 99:** 624-629, 1997.

KITA, H.; OHNISHI, T.; OKUBO, Y.; WEILER, D.; ABRAMS, J.S. & GLEICH, J.G. - Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor and interleukin 3 release from human peripheral blood eosinophils and neutrophils. **J. Exp. Med. 174**: 745-748, 1991.

KNOWLES, R.G.; SALTER, M.; BROOKS, S.L. & MONCADA, S. - Anti-inflammatory glucocorticoids inhibit the induction by endotoxin of NO sunthase in the lung, liver and aorta of the rat. **Biochem. Biophys. Res. Commun. 172**: 1042-1048, 1990.

KROEGEL, C.; VIRCHOW, JR.; LUTTMAN, W.; WALKER, C. & WARNER, J.A. - Pulmonary immune cells in health and disease: the eosinophil leucocyte (Part I). **Eur. Respir. J. 7:** 519-543, 1994.

KUBES, P.; SUZUKI, M.& GRANGER, D.N. - Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:** 4651-4655, 1991.

LAMAS, S.; MARSDEN, P.A.; LI, G.K.; TEMPST, P. & MICHEL, T. - Endothelial nitric oxide synthase: Molecular cloning and characterization of a distinct constitutive enzyme isoform. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89**: 6348-6352, 1992.

LAMKHIOUED, B.; ADELBERT, D.; GOUNNI, A.S.; DELAPORTE, E.; GOLDMAN, M.; CAPRON, A. & CAPRON, M. - Synthesis of cytokines by eosinophils and their regulation. **Int. Arch. Allergy Immunol. 107**: 122-123, 1995.

LAMKHIOUED, B.; GOUNNI, A.S.; ALDEBERT, D.; DELAPORTE, D.; PRIN, L.; CAPRON, A. & CAPRON, M. - Synthesis of type 1 (IFN-γ) and type 2 (IL-4, IL-5, and IL-10) cytokines by human eosinophils. **Ann. N.Y. Acad. Sci. 796:** 203-208, 1996.

LIM, K.G.; WAN, H.C.; RENICK, M.; WONG, D.T.W.; CRUISKSHANK, W.W.; KORNFELD, H.; CENTER, D.M. & WELLER, P.F. - Human eosinophils release the lymphocyte and eosinophil active cytokines. RANTES and lymphocyte chemoattractant factor. **Int. Arch. Allergy Immunol. 107**: 342-?, 1995.

LOWENSTEIN, C.J.; GLATT, C.S.; BREDT, D.S. & SNYDER, S.H. - Cloned and expressed macrophage nitric oxide synthase contrasts with the brain enzyme. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89**: 6711-6715, 1992.

LYONS, C.R.; ORLOFF, G.J. & CUNNINGHAM, J.M. - Molecular cloning and functional expression of an inducible nitric oxide synthasefrom a murine macrophage cell line. **J. Biol. Chem. 267**: 6370-6374, 1992.

MARLETTA, M.A. - Nitric oxide synthase structure and mechanism. **J. Biol. Chem. 268**: 12231-12234, 1993.

MARSDEN, P.A.; SCHAPPERT, K.T.; CHEM, H.S.; FLOWERS, M.; SUNDELL, C.L.; WILCOX, J.N.; LAMAS, S. & MICHEL, T. - Molecular cloning and characterization of human endothelial nitric oxide synthase. **FEBS Lett. 307**: 287-293, 1992.

MARTIN, L.B.; KITA, H.; LEIFERMAN, K.M. & GLEICH, J.G. - Eosiniphils in allergy: role in disease, degranulation, and cytokines. **Int. Arch. Allergy Immunol. 109**: 207-215, 1996.

MELANI, C.; MATTIA, G.F.; SILVANI, A.; CARE, A.; RIVOLTINI, L.; PARMIANI, G. & COLOMBO, M.P. - Interleukin-6 expression in human neutrophil and eosinophil peripheral blood granulocytes. **Blood 81**: 2744-2749, 1993.

MILLER, F.; DEHARVEN, E. & PALADE, E. - The structure of eosinophil leukocyte granules in rodents and in man. **J. Cell. Biol. 31**: 349-362, 1966.

MOILANEN, E.; VUORINEN, P.; KANKAANRANTA, H.; METSÄ-KETELÄ, T. & VAPAATALO - Inhibition by nitric oxide-donors of human polymorphonuclear leucocyte functions. **Br. J. Pharmacol. 109**: 852-858, 1993.

MONCADA, S. - The L-arginine: nitric oxide pathway. **Acta Physiol. Scand. 145**: 201-227, 1992.

MONCADA, S.; PALMER, M.J. & HIGGS, E.A. - Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. **Pharmacol. Rev. 43**: 109-142, 1991.

MOQBEL, R.; HAMID, Q.; YING, S.; BARKANS, J.; HARTNELL, A.; TSICOPOULOS, A.; WARDLAW, A.J. & KAY, A.B. - Expression of mRNA and

immunoreactivity for the granulocyte/macrophage colony-stimulating factor in activated human eosinophils. **J. Exp. Med. 174**: 749-752, 1991.

MOQBEL, R. Eosinophils, cytokines, and allergic inflammation. **Ann. N. Y.Acad. Sci. 725:** 223-233, 1994.

MORITA, E.; SCHRÖDER, J.-M. & CHRISTOPHERS, E. - Differential sensitivities of purified human eosinophils and neutrophils to defined chemotaxins. **Scand. J. Immunol. 29**: 709-716, 1989.

MORO, M.A.; RUSSEL, R.J.; CELLEK, S.; LIZASOAIN, I.; SU, Y.; DARLEY-USMAR, V.M.; RADOMSKI, M.W. & MONCADA, S. - cGMP mediates the vascular and platelet actions of nitric oxide: Confirmation using an inhibitor of the soluble guanylyl cyclase. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93**: 1480-1485, 1996.

NAKANE, M.; KLINGHOFER, V.; KUK, J.E.; DONNELLY, J.L.; BUDZIK, G.P.; POLLOCK, J.S.; BASHA, F. & CARTER, G.W. - Novel potent and selective inhibitors of inducible nitric oxide synthase. **Mol. Pharmacol. 47**: 831-834, 1995.

NAKANE, M.; SCHMIDT, H.H.H.W.; POLLOCK, J.S.; FÖRSTERMANN, U. & MURAD, F. - Cloned human brain nitric oxide synthase is highly expressed in skeletal muscle. **FEBS Lett. 316**: 175-180, 1993.

NATHAN, C. - Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. **FASEB J. 6**: 3051-3064, 1992.

NUMAO, T. & AGRAWAL, D.K. - Neuropeptides modulate human eosinophil chemotaxis. **J. Immunol. 149**: 3309-3315, 1992.

OWEN, W.F.; ROTHENBERG, M.E.; SILBERSTEIN, D.S.; GASSON, J.C.; STEVENS, R.L.; AUSTEN, K.F. & SOBERMAN, R.J. - Regulation of human eosinophil viability, density, and function by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor in the presence of 3T3 fibroblasts. **J. Exp. Med. 166**: 129-141, 1987.

PALMER, R.M.J.; REES, D.D.; ASHTON, D.S. & MONCADA, S. - L-arginine is the physiological precursor for the formation of nitric oxide in endothelium-dependent relaxation. **Biochem. Biophys. Res. Comm. 153**: 1251-1256, 1988.

PARK, C.S.; PARK, R. & KRISHNA, G. – Constitutive expression and structural diversity of inducible isoform of nitric oxide synthase in human tissues. **Life Sciences 59:** 219-255, 1996.

POWELL, W.S.; CHUNG, D. & GRAVEL, S. - 5-oxo-6,8,11,14-eicosatetraenoic acid is a potent stimulator of human eosinophil migration. **J. Immunol. 154**: 4123-4132, 1995.

RADOMSKI, M.W.; PALMER, R.M.J. & MONCADA, S. - Glucocorticoids inhibit the expression of an inducible but not the constitutive NO synthase in vascular endothelial cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87**: 10043-10047, 1990.

RICHARDS, K.L. & MCCULLOUGH, J.M. - A modified microchamber method for chemotaxis and chemokinesis. **Immunol. Commun. 13**: 49-62, 1984.

ROTHENBERG, M.E.; OWEN, W.F.; SILBERSTEIN, D.S.; WOODS, J.; SOBERMAN, R.J.; AUSTEN, K.F. & STEVENS, R.L. - Human eosinophils have prolonged survival, enhanced functional properties, and become hypodense when exposed to human interleukin-3. **J. Clin. Invest. 81**: 1986-1993, 1988.

SCHLEIMER, R.P. - Effects of glucocorticoids on inflammatory cells relevant to their therapeutic applications in asthma. **Ann. Rev. Respir. Dis. 141**: S59-S69, 1990.

SCHRAMMEL, A.; BEHRENDS, S.; SCHMIDT, K.; KOESLING, D. & MAYER, B. - Characterization of 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one as a heme-site inhibitor of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclse. **Mol. Pharmacol. 50**: 1-5, 1996.

SCHRÖDER, J.M.; KAMEYOSHI, Y & CHRISTOPHERS, E. RANTES, a novel eosinophil-chemotatic cytokine. **Ann. . N. Y. Acad. Sci., 725**: 91-103, 1994.

SESSA, W.C.; HARRISON, J.K.; BARBER, C.M.; ZENG, D.; DURIEUX, M.E.; D'ANGELO, D.D.; LYNCH, K.R. & PEACH, M.J. - Molecular cloning and expression of a cDNA encoding endothelial cell nitric oxide synthase. **J. Biol. Chem. 267**: 15274-15276, 1992.

SOUTHAN, G.J. & SZABÓ, C. - Selective pharmacological inhibition of distinct nitric oxide synthase isoforms. **Biochem. Pharmacol. 51**: 383-394, 1996.

SPADA, C.S.; NIEVES, A.L.; KRAUSS, A.H-P. & WOODWARD, D.F. - Comparison of leukotriene B_4 and D_4 on human eosinophil motility *in vitro*. **J. Leukoc. Biol. 55**: 183-191, 1994.

STEPHENS, C. & SNYDERMAN, R. - Cyclic nucleotides regulates the morphologic alterations required for chemotaxis in monocytes. **J. Immunol. 128**: 1192-1197, 1982.

STOSSEL, T.P. - From signal to pseudopod. How cells control cytoplasmatic actin assembly. **J. Biol. Chem. 264:** 18261-18264, 1989.

STUEHR, D.J. & NATHAN, C.F. - Nitric oxide: A macrophage product responsible for cytostasis and respiratory inhibition in tumor target cells. **J. Exp. Med. 174**: 1009-1021, 1989.

SZABÓ, C. & THIEMERMANN,C. - Regulation of the expression of the inducible isoform of nitric oxide synthase. **Adv. Pharmacol. 34**: 113-153, 1995.

SZABÓ, C.; BRYK, R.; ZINGARELLI, B.; SOUTHAN, G.J.; GAHMAN, C.; BHAT, V.; SALZMAN, A.L. & WOLFF, D.J. - Pharmacological characterization of guanidinoethyldisulphide (GED), a novel inhibitor of nitric oxide synthase with selectivity towards the inducible isoform. **Br. J. Pharmacol. 118**: 1659-1668, 1996.

TAMURA, N.; AGRAWAL, D.K.; SULIAMAN, F.A. & TOWNLEY, R. - Effects of platelet activating factor on the chemotaxis of normodense eosinophils from normal subjects. **Biochem. Biophys. Res. Commun. 142**: 638-644, 1987.

TEIXEIRA, M.M.; WILLIAMS, T.J. & HELLEWELL, P.G. - Mechanisms and pharmacologcal manipulation of eosinophil accumulation *in vivo*. **Trends Pharmacol. Sci. 16**: 418-423, 1995.

THOMPSON, M.; BECKER, L.; BRYANT, D.; WILLIAMS, G.; LEVIN, D.; MARGRAF, L. & GIROIR, B.P. - Expression of the inducible nitric oxide gene in diaphragm and skeletal muscle. **J. Appl. Physiol. 81**: 2415-2420, 1996.

VADAS, M.A.; DAVID, J.R.; BUTTERWORTH, A.; PISANI, N.T. & SIONGOK, T.A. - A new method for the purification of human eosinophils and neutrophils, and a comparison of the ability of these cells to damage schistosomula of *Schistosoma mansoni*. **J. Immunol. 122**: 1228-1236, 1979.

VANE, J.R. - The Croonian lecture, 1993: The endothelium: Maestro of the blood circulation. **Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. 343**: 225-246, 1994.

VANUFFELEN, B.E.; KOSTER, B.M.; VAN DEN BROEK, P.J.A.; VANSTEVENINCK, J. & ELFERINK, J.G.R. - Modulation of neutrophil migration by exogenous gaseous nitric oxide. **J. Leuk. Biol. 60:** 94-100, 1996.

VENTURINI, C.M.; KNOWLES, R.G.; PALMER, R.M.J. & MONCADA, S. - Synthesis of nitric oxide in bovine retina. **Biochem. Biophys. Res. Commun. 180**: 920-925, 1991.

WALLERATH, T.; GATH, I.; AULITZKY, W.E.; POLLOCK, J.S.; KLEINERT, H. & FÖRSTERMANN, U. - Identification of the NO synthase expressed in human neutrophil granulocytes, megakaryocytes and platelets. **Thromb. Haemost. 77:** 163-167, 1997.

WANG, J.M.; RAMBALDI, A.; BIONDI, A.; CHEN, Z.G.; SANDERSON, C.J. & MANTOVANI, A. - Recombinant human interleukin 5 is a selective eosinophil chemoattractant. **Eur. J. Immunol. 19**: 701-705, 1989.

WANG, Y. & MARSDEN, P.A. - Nitric oxide synthases: gene structure and regulation. **Adv. Pharmacol. 34**: 71-90, 1995.

WARDLAW, A.J.; MOQBEL, R. & KAY, A.B. - The eosinophil leucocyte. In: **Textbook of Immunopharmacology**, Third Edition, ed. by M.M. Dale, J.C. Foreman & T-P.D. Fan, p 55-63, Blackwell Scientific Publications, London, 1994.

WARRINGA, R.A.J.; KOENDERMAN, L.; KOK, P.T.M.; KREUKNIET, J. & BRUIJNZEEL, P.L.B. - Modulation and induction of eosinophil chemotaxis by granulocyte macrophage colony-stimulating factor and interleukin-3. **Blood 77**: 2694-2700, 1991.

WELLER, P.F. - The immunobiology of eosinophils. **N. Engl. J. Med. 324**: 1110-1118, 1991.

WELLER, P.F.; RAND, T.H.; BARRET, T.; ELOVIC, A.; WONG, D.T. & FINBERG, R.W. - Acessory cell function of human eosinophils: HLA-DR-dependent, MHC-restricted antigen presentation and interleukin-1α formation. **J. Immunol. 150:** 2554-2562, 1993.

WELLER, P.F. - Eosinophils: structure and functions. **Curr. Opin. Immunol. 6**: 85-90, 1994.

WIEDERMAN, F.J.; KÄHLER, C.M.; REINISH, N. & WIEDERMAN, C.J. - Induction of normal human eosinophil migration *in vitro* by substance P. **Acta Haematol. 89**: 213-215, 1993.

WILKINSON, P.C. - Cellular accumulation and inflammation. In: **Textbook of Immunopharmacology**, ed. by M.M. Dale, J.C. Foreman & T.-P.D. Fan, pp 218-231, Blackwell Scientific Publications, London, 1994.

WOOD, E.R.; BERGER, H.J.; SHERMAN, P.A. & LAPETINA, E.G. - Hepatocytes and macrophages express an identical cytokine inducible nitric oxide synthase gene. **Biochem. Biophys. Res. Commun. 191**: 767-774, 1993.

XIE, Q.W.; CHO, H.J.; CALAYCAY, J.; MUMFORD, R.A.; SWIDEREK, K.M.; LEE, T.D.; DING, A.; TROSO, T. & NATHAN, C. - Cloning and characterizationof inducible nitric oxide synthase from mouse macrophages. **Science 256**: 225-228, 1992.