

MÔNICA CRISTINA TOFFOLI

**"MODULAÇÃO ESPÉCIE-ESPECÍFICA DO INTERFERON-GAMA
SOBRE AS ATIVIDADES MIGRATÓRIA E GERADORA DE
ESPÉCIES ATIVAS DE NITROGÊNIO E OXIGÊNIO EM
NEUTRÓFILOS E CÉLULAS MONONUCLEARES".**

Tese apresentada ao Departamento de Farmacologia da Faculdade de Ciências
Médicas da UNICAMP para obtenção do Título de Mestre em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. CARLOS ALBERTO FLORES

Campinas, Outubro 1994

T571m

23181/BC

UNICAMP
SERVIÇO CENTRAL

Este exemplar corresponde à versão final da tese de Mestrado, apresentada a Faculdade de Ciências Médicas - UNICAMP, para obtenção do título de Mestre em Farmacologia da Farmacêutica Mônica Cristina Toffoli.

Campinas, 27 de outubro de 1994

Prof. Dr. Carlos Alberto Flores
- Orientador -

*Dedico este trabalho ao meu pai,
lembrança constante em todos os momentos.*

*Ao Chico,
pelo apoio inicial, estímulo constante,
paciência e amor, acima de tudo.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos aqueles que de forma direta ou indireta, contribuíram para a realização deste trabalho. De modo especial:

-Ao **Prof. Dr. Carlos Alberto Flores**, pela valiosa orientação, oportunidade e confiança em mim depositada, pelo entusiasmo e vibração com que se dedica à ciência e, acima de tudo, por ter se tornado um grande amigo.

-Ao **Prof. Dr. Sérgio Henrique Ferreira**, pela doação de grande parte dos materiais utilizados em nosso laboratório.

- Aos **Profs. Drs. Jamil Assreuy Filho e Fernando Q. Cunha**, pelas críticas e sugestões, além da doação do IFN- γ recombinante murino, sem o qual, não haveria tese.

-À **Prof^a. Dr^a. Wirla M. C. S. Tamashiro**, pelo apoio, críticas, sugestões e paciência e também pela doação do TNF- α recombinante murino utilizado neste trabalho.

- Ao **Prof. Dr. Gilberto De Nucci**, pela doação do IFN- γ recombinante humano e por manter seu laboratório sempre à disposição.

- À **Prof^a. Dr^a. Júlia Prado-Franceschi**, pela ajuda inicial na implantação do nosso laboratório.

- À **Prof^a. Dr^a. Mary Lucy S. Queiroz**, pela utilização do fluxo laminar.

- Ao **Prof. Dr. Stephen Hyslop**, pelo empenho e boa vontade na tradução dos textos, além da valiosa amizade.

-À minha família, em particular à minha **mãe** e à minha **avó**, pelo apoio moral (e muitas vezes, financeiro) e por acreditarem no meu trabalho.

- Ao **Marcelo Nicolas Muscará**, pelo auxílio técnico na determinação dos ânions superóxido, pelas críticas e sugestões, principalmente na fase final deste trabalho, além do apoio e companheirismo no dia-a-dia.

-À amiga **Ana Sílvia Miguel** (Maria), pela amizade fraterna, apoio, companhia em todos os momentos e ajuda em diversas fases da realização deste trabalho.

-À **Myleide**, pelos serviços de computação, pela paciência e ainda pela forma amiga com que sempre me acolheu.

-À **Silvinha**, pelo apoio técnico, amizade e pela forma amável no convívio diário.

- À turma da Farmaco: **Cristina, Fátima, Stella, Susana, Moacir e Luciana** (Salu Maria), pela amizade, interesse, cooperação e incentivo constantes

- Aos funcionários, professores e colegas do Dept°. de Farmacologia, por terem tornado a permanência neste departamento mais agradável.

- .Ao **CNPq** e **FAPESP**, pelo auxílio financeiro.

ÍNDICE

I. INTRODUÇÃO

1. Fenômenos vasculares da reação inflamatória	3
2. Fenômenos celulares da reação inflamatória	6
3. Ativação de macrófagos	7
4. Interferon - γ	8
5. Espécies reativas de nitrogênio	11
6. Espécies reativas de oxigênio	13

II. OBJETIVOS 15

III. MATERIAIS E MÉTODOS

1. Animais	16
2. Citocinas	16
3. Drogas	16
4. Migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal	17
5. Migração de células mononucleares para a cavidade peritoneal	18
6. Determinação da produção de óxido nítrico por macrófagos	19
7. Determinação da produção de ânions superóxido por células mononucleares e neutrófilos humanos	20
8. Liberação de fatores quimiotáticos para neutrófilos por macrófagos peritoneais murinos, estimulados <i>in vitro</i>	21
9. Reagentes e Soluções	23
10. Análise Estatística	25

IV. RESULTADOS

1. Efeito da administração de LPS sobre a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de camundongos	26
2. Efeito da administração do IFN- γ murino e humano sobre a migração de neutrófilos e monócitos para a cavidade peritoneal de camundongos	26
3. Efeito do IFN- γ murino e humano sobre a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de ratos	27
4. Efeito do IFN- γ murino, LPS ou IFN- γ + LPS sobre a liberação de óxido nítrico por macrófagos murinos	27
5. Efeito do IFN- γ humano ou IFN- γ humano + LPS sobre a liberação de óxido nítrico por macrófagos murinos	27
6. Efeito do IFN- γ humano sobre a produção de ânions superóxido por células mononucleares e neutrófilos humanos	28
7. Efeito do IFN- γ murino sobre a produção de ânions superóxido por células mononucleares e neutrófilos humanos	28
8. Efeito da estimulação <i>in vitro</i> de macrófagos murinos por LPS, IFN- γ murino ou IFN- γ + LPS sobre a produção de fatores quimiotáticos para neutrófilos	29
9. Determinação da atividade TNF- α em sobrenadante de macrófagos murinos em cultura	29
10. Efeito da injeção concomitante de LPS + IFN- γ murino sobre a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de camundongos normais e pré-tratados com Tioglicolato 3%	29
11. Efeito da injeção de TNF- α e TNF- α + IFN- γ murinos sobre a migração de neutrófilos para a cavidade de camundongos	30
V. DISCUSSÃO	43
VI. SUMMARY	53
VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55

RESUMO

Este trabalho descreve os efeitos do IFN- γ sobre a atividade migratória de neutrófilos e monócitos para a cavidade peritoneal de camundongos; descreve também a relação espécie-específica entre os IFNs- γ recombinantes humano e murino, *in vitro*, bem como seu efeito modulador sobre a atividade quimiotática para neutrófilos induzida por LPS, *in vivo*, e sobre a liberação de fatores quimiotáticos para essas células, por macrófagos peritoneais estimulados, *in vitro*, pela endotoxina.

Tanto o rmuIFN- γ (150-1350 UI/animal) quanto o rhIFN- γ (150 UI/animal) não foram capazes de induzir migração de neutrófilos ou de monócitos para a cavidade de camundongos, avaliada 12 e 96 horas após a injeção dos estímulos e comparadas ao controle LPS (200 ng/animal) e tioglicolato 3% (1,5 ml/animal), respectivamente. Observou-se também, que em ratos, nenhum dos rIFN- γ (humano ou murino) foi capaz de induzir migração de neutrófilos ou monócitos para a cavidade peritoneal desses animais.

Os macrófagos peritoneais murinos, *in vitro*, quando estimulados simultaneamente com rmuIFN- γ e LPS liberaram em torno de 30 μ M de NO₂⁻ e esta liberação foi quase totalmente inibida com nitroarginina (NARG, 500 μ M). Por outro lado, a estimulação desses macrófagos com rhIFN- γ e LPS não causou liberação significativa de NO, mesmo em doses de até 500 ui/ml.

A estimulação de células mononucleares humanas com rhIFN- γ (20-500 UI/ml) causou uma liberação dose-dependente de ânions superóxido, entretanto tal efeito não foi observado quando a célula estudada foi o neutrófilo. O rhIFN- γ potencializou a liberação desses ânions tanto em células mononucleares como em neutrófilos estimulados por PMA (3 nM), porém, quando o estímulo foi o zimosam, o efeito da potenciação não foi observado.

Quando os estudos foram realizados utilizando-se rmuIFN- γ , esta citocina por si só, não causou liberação de ânions superóxido e não foi capaz de potencializar a liberação induzida por PMA ou zimosam, nos dois tipos celulares analisados.

Macrófagos em cultura foram capazes de liberar no sobrenadante, após estimulação com LPS (5 μ g/ml), um fator que induziu migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de camundongos. A injeção do sobrenadante de macrófagos estimulados por rmuIFN- γ e LPS causou uma migração de neutrófilos

para a cavidade peritoneal de camundongos cerca de 50% menor do que a induzida pelo sobrenadante obtido de macrófagos apenas estimulados com LPS.

A dosagem de TNF- α no sobrenadante de cultura de macrófagos murinos estimulados com LPS (5 μ g/ml) ou rmlFN- γ (20 UI/ml), apresentaram valores semelhantes: 3,67 e 3,61 ng TNF/ml, respectivamente. O nível de TNF- α presente no sobrenadante de cultura de macrófagos estimulados com LPS e rmlFN- γ foi cerca de 3,5 vezes maior (12 ng TNF/ml).

A administração simultânea de rmlFN- γ (150 UI/animal) foi capaz de, dependendo da dose de LPS ou TNF- α utilizada, potencializar (1 ng de LPS ou 0,5 ng de TNF- α /animal) ou inibir (10,100 ng de LPS ou 100 ng de TNF- α /animal) a migração de neutrófilos induzida por esses estímulos, para a cavidade peritoneal de camundongos.

Estes resultados mostram que IFN- γ não é quimiotático para neutrófilos ou monócitos e seus efeitos são espécie-específicos. O IFN- γ possui uma importante função moduladora sobre as atividades citotóxica e liberadora de citocinas e/ou fatores quimiotáticos por macrófagos e não deve estar participando das etapas iniciais do processo inflamatório e sim na manutenção do mesmo.

I. INTRODUÇÃO

1. Fenômenos vasculares da reação inflamatória

Inflamação é a resposta do organismo, ou mais especificamente, dos tecidos vascularizados, aos estímulos lesivos, cuja característica fundamental é manifestar-se de maneira estereotipada, isto é, a resposta obedece a um padrão semelhante, independente da natureza do estímulo. Apesar disso, podem ocorrer pequenas variações dependendo do agente lesivo, das características do tecido ou do órgão afetado e da coexistência de estados patológicos (ROCHA & SILVA, 1978; SEDGWICK & WILLOUGHBY, 1985).

Após o desencadeamento da reação, observa-se uma primeira fase, denominada de fase aguda. A seguir, a reação pode cronificar-se, dependendo do estímulo ser ou não persistente, ou, então, ocorrer a resolução do processo devido a eliminação dos agentes causadores (SEDGWICK & WILLOUGHBY, 1985).

Durante o desenvolvimento da fase aguda ocorrem fenômenos vasculares e celulares que levam ao surgimento dos 4 sinais cardinais da inflamação, calor, rubor, tumor e dor, descritos por Cornelius Celsus, no início da era cristã. A perda de função do tecido, ou órgão lesado, foi introduzida, como o quinto sinal cardeal, posteriormente por Virchow (vide ROCHA & SILVA, 1978; SEDGWICK & WILLOUGHBY, 1985).

A resposta inflamatória está intimamente ligada ao processo de reparo. Na inflamação ocorre destruição ou isolamento do agente lesivo e na reparação, tanto quanto possível, há o restabelecimento da normalidade. Neste processo ocorre substituição do tecido lesado por células da mesma linhagem daquelas injuriadas ou por células do tecido conjuntivo (tecido cicatricial), ou ainda, uma combinação destes fenômenos. No entanto, a substituição do tecido original pelo cicatricial pode comprometer a função do órgão, e, dependendo da extensão da substituição, pode inclusive ocasionar a perda de sua função (GLYNN, 1978).

O aumento do fluxo sanguíneo na área lesada, devido à dilatação e engurgitamento dos capilares e arteríolas, bem como o recrutamento de uma nova parcela desses vasos, que normalmente estão hipofuncionantes, causam aumento de fluxo sanguíneo (eritema ou rubor), com elevação da temperatura local (calor).

A vasodilatação se deve à ação de mediadores, preferencialmente, a

nível arteriolar. Entre estes mediadores citam-se, entre outros, a bradicinina, a histamina, as prostaglandinas da série E (PGE) e a prostaciclina (PGI₂), sendo estes metabólitos do ácido araquidônico os principais mediadores responsáveis por este fenômeno (HURLEY, 1978; WILLIAMS, 1984). O aumento de permeabilidade a nível venular ocasiona o extravasamento de proteínas para o tecido, o qual, somado ao aumento da pressão de filtração, devido à vasodilatação, leva à formação de edema (tumor). O aumento de permeabilidade se deve à ação de mediadores inflamatórios sobre as células endoteliais venulares, induzindo contrações das mesmas, com surgimento de solução de continuidade entre elas. Isto permite a passagem para o interstício de substâncias de alto peso molecular (por exemplo, proteínas), as quais não são filtradas em condições fisiológicas. Atualmente, a lista de mediadores que são liberados na reação inflamatória e que induzem aumento de permeabilidade é muito extensa (WILLIAMS, 1984; MAJNO, 1985). Entre estes mediadores citam-se: cininas, histamina, serotonina, leucotrienos, PAF-aceter (fator ativador de plaquetas), C5a (quinto componente do sistema complemento ativado) e substâncias liberadas localmente das terminações nervosas (taquicininas e o peptídeo relacionado ao gene que libera calcitonina, CGRP; WILLIAMS, 1984; HUA, 1986). O exsudato formado contém grande quantidade de mediadores de origem plasmática, como a bradicinina, fatores de coagulação e componentes do complemento, o que amplifica o processo. Além disso, formam-se fatores que opsonizam os agentes injuriantes e fatores que induzem migração das células de defesa. A rede de fibrina que se forma no local inflamado impede a disseminação dos agentes lesivos (bactérias principalmente) e serve de suporte para a migração celular (WILLIAMS, 1984).

Durante a reação inflamatória, além dos fenômenos locais, ocorrem também várias alterações sistêmicas conhecidas como alterações da fase aguda da reação inflamatória. Dentre estas, duas respostas fisiológicas em particular tem sido associadas a esta fase. A primeira envolve a alteração no centro hipotalâmico regulador da temperatura corporal gerando uma resposta febril (DINARELLO *et alii*, 1988; DINARELLO *et alii*, 1991). A segunda envolve alterações no metabolismo e regulação gênica no fígado. O fígado é o alvo principal dos mediadores inflamatórios à nível sistêmico, pois suas células respondem a muitos fatores que são liberados na fase aguda, através de receptores de superfície. Esta resposta é caracterizada por mudanças no transporte de íons e metabólitos, nas atividades de várias vias metabólicas e na

síntese/liberação de proteínas plasmáticas de fase aguda. O aumento da concentração sérica destas proteínas deve-se a uma maior atividade de síntese hepática. Além disso, o fígado supre a necessidade de componentes para a defesa imediata no sítio da reação inflamatória, bem como limita a lesão tecidual, eliminando agentes prejudiciais e estimulando o tecido de reposição.

Dentre as citocinas liberadas no sítio inflamatório, três delas (IL-1, TNF, e IL-6) estão envolvidas na regulação da resposta febril, possivelmente como um mecanismo de proteção. Estas citocinas medeiam a febre através da indução da síntese de prostaglandinas da série E_2 (DINARELLO *et alii*, 1988; DINARELLO *et alii*, 1991). Ao mesmo tempo, a IL-1 e IL-6 podem agir diretamente induzindo a liberação de ACTH, com subsequente produção de cortisol. Isto promove um "feedback" negativo, uma vez que os corticosteróides inibem a expressão gênica das citocinas (BAUMANN & GAULDIE, 1994).

O grupo de mediadores que alteram a expressão gênica de proteínas de fase aguda, em hepatócitos, pertencem a 4 grandes categorias: 1) tipo IL-1 (IL- 1α , IL- 1β , TNF- α e TNF- β); 2) tipo IL-6 (IL-6; oncostatina M); 3) glicocorticóides; 4) fatores de crescimento (insulina, fator de crescimento de hepatócitos, TGF- β). As citocinas agem como primeiros estimuladores da expressão gênica das proteínas de fase aguda, enquanto os glicocorticóides e fatores de crescimento atuam como moduladores das ações das citocinas (para revisão: BAUMANN & GAULDIE, 1994).

A dor que também se apresenta durante o processo inflamatório deve-se à estimulação dos nociceptores por mediadores químicos, tais como, bradicinina e histamina. Normalmente, esses mediadores nas concentrações em que são liberados no foco, somente despolarizam estes receptores quando seus limiares de excitabilidade encontram-se diminuídos. Esta redução do limiar de excitação denominada hiperalgesia é ocasionada por derivados do ácido araquidônico (PGE_2 , PGI_2 , PGD_2) e por aminas simpatomiméticas (principalmente, dopamina). Drogas que bloqueiam a liberação e/ou ações destes mediadores inibem a dor inflamatória (FERREIRA, 1985; LORENZETTI & FERREIRA, 1985; NAKAMURA & FERREIRA, 1987).

2. Fenômenos celulares da reação inflamatória

Nos estágios iniciais da maioria dos processos inflamatórios, a célula leucocitária predominante no foco é o neutrófilo. Com o passar do tempo surgem, progressivamente, outros tipos celulares. Atualmente, acredita-se que o retardo no aparecimento dos macrófagos se deve ao fato dos monócitos necessitarem de um tempo maior para migrarem do que os neutrófilos (ISSEKUTZ & LOPES, 1993).

A resposta mais precoce dos neutrófilos circulantes, na vigência de um processo inflamatório localizado, é a sua adesão à parede do endotélio venular. Vários mediadores inflamatórios, entre os quais, a interleucina-1 (IL-1), fator de necrose tumoral (TNF), leucotrieno B₄, (LTB₄) fator de ativação plaquetária (PAF-aceter) e C5a aumentam a adesividade entre os neutrófilos e as células endoteliais dos vasos.

Uma vez aderidos, os neutrófilos migram através da parede das vênulas (diapedese) e se dirigem ao foco de lesão. A liberação de substâncias quimiotáticas é fundamental para que o processo ocorra (HARKNESS, 1981).

A participação de fragmentos do sistema complemento estimulando a migração de neutrófilos para o foco inflamatório é bem conhecida. Existem extensas revisões demonstrando que na vigência de certas reações inflamatórias ocorre ativação do sistema complemento, com liberação do fragmento C5a que é quimiotático para neutrófilos (WILKINSON, 1984; MACMILLAN & FOSTER, 1988; YANCEY, 1988).

Leucotrieno B₄ (LTB₄) é um derivado do ácido araquidônico formado por ação da enzima lipooxigenase, e apresenta também potente atividade quimiotática para neutrófilos. Além desta, outras substâncias são descritas como quimiotáticas para estas células, entre as quais, o PAF-acéter, a calicreína, fibrino-peptídeos, fragmentos da parede de bactéria, peptídeos sintéticos (FMLP), citocinas (IL-1 e TNF; ALTMAN, 1978; SMITH *et alii*, 1980; WILKINSON, 1984; FANTONE, 1985; BEUTLER & CERAMI, 1987). Estes dados demonstram claramente que a migração de neutrófilos é multimedida, ou seja, vários mediadores liberados no foco inflamatório são quimioatraentes para estas células.

Tem sido descrito na literatura que o acúmulo de neutrófilos em exsudatos inflamatórios, induzidos por lipopolissacarídeos bacterianos (LPS), depende da ativação do sistema complemento, levando ao surgimento de

fragmentos quimiotáticos (FRANK & FRIES, 1991). Por outro lado, RUSSO (1980) descreveu que esta migração independia de fragmentos do sistema complemento e sugeriu que este fenômeno era controlado por células peritoneais residentes. Esses fenômenos (vasculares e celulares) da reação inflamatória envolvem um número considerável de citocinas, entre elas, TNF- α , IL-1, IL-8, IFN- γ , etc. (AKIRA *et alii*, 1990; SHERRY & CERAMI, 1991; DINARELLO, 1993), tendo os macrófagos como a principal fonte de liberação das mesmas.

3. Ativação de macrófagos

Estudos prévios mostraram que em resposta aos estímulos inflamatórios, os monócitos migram do sangue para o tecido, onde proliferam. Estes monócitos/macrófagos são mais responsivos a vários estímulos, quando comparados com macrófagos teciduais residentes. Além disso, sob influência de alguns sinais, podem desenvolver uma variedade de funções, resultando em um estado funcional denominado "ativado" (WHING & ADAMS, 1989).

A ativação de macrófagos compreende uma série de etapas envolvendo a transição do estado normal para o estado ativado, culminando no fato de tornarem-se competentes para causar lise/destruição de células tumorais e de alguns agentes patogênicos. Durante esse processo de ativação, os macrófagos produzem uma série de moléculas biologicamente ativas, como o ânion superóxido, H₂O₂, TNF, IL-1, óxido nítrico (NO), que possuem um papel considerável nas funções citotóxicas dos macrófagos ativados (STUEHR & MARLETTA, 1987; BILLIAU & VANDEKERCKHOVE, 1990; ASSREUY *et alii*, 1994).

Os macrófagos exibem diferentes níveis de ativação e portanto diferem em sua capacidade funcional. Assim, macrófagos residentes de animais normais são geralmente considerados inativados, tornando-se elicitados após exposição ao IFN- γ e completamente ativados para funções tumoricidas, após subsequente exposição ao LPS (HAMILTON & ADAMS, 1987).

PACE *et alii* (1983) mostraram que IFN- γ murino recombinante possui a capacidade de induzir o primeiro passo de ativação para destruição de células tumorais.

Há dados na literatura mostrando que a ativação policlonal de linfócitos humanos T e B, por mitógenos ou antígenos, resultam em liberação de citocinas

que estimulam a capacidade de macrófagos humanos em destruir microorganismos e células tumorais e também desencadeiam as vias bioquímicas que estão envolvidas nesse processo, por exemplo, o "burst" respiratório (FERRANTE *et alii*, 1987). Alguns estudos conduzem a idéia de que a citocina envolvida nessa ativação seria o IFN- γ .

Além do papel regulador sobre os mecanismos de citotoxicidade, tem sido descrito que o IFN- γ pode aumentar a liberação de IL-1 e TNF- α por macrófagos estimulados com LPS (COLLART *et alii*, 1986). Por outro lado, o IFN- γ isoladamente não foi capaz de induzir macrófagos a secretarem TNF e IL-1, e estas células por ele estimuladas, apresentaram baixa toxicidade para células tumorais. No entanto, essas atividades foram acentuadas quando os macrófagos foram primeiramente expostos ao IFN- γ , e subsequentemente à IL-1, TNF ou LPS (SODHI *et alii*, 1992; HEREMANS *et alii*, 1990).

Estudos prévios mostraram que macrófagos murinos quando estimulados com IFN- γ e LPS sintetizam NO (MONCADA *et alii*, 1991; OHSHIMA *et alii*, 1991). Este processo é catalisado pela enzima NO sintase, que é induzida em macrófagos por vários estímulos, incluindo IFN- γ e LPS (LORSBACH & RUSSEL, 1992). A indução para a síntese desta enzima é inibida por corticóides (PALMER *et alii*, 1992).

4. Interferon-gama (IFN- γ)

Em 1957, ISAACS e LINDENMANN descobriram uma proteína que conferia resistência à algumas células contra uma variedade de vírus. Além de sua atividade antiviral, essa proteína era capaz de inibir o crescimento celular e influenciar muitas atividades das células pertencentes ao sistema imune. Devido a interferência nessas atividades, essa proteína foi denominada interferon. Entre os interferons produzidos estão: IFN- α , IFN- β e o IFN- γ (para revisão vide IJZERMANS & MARQUET, 1989.)

Baseado na sua origem genética, produção e efeitos pleiotrópicos, o IFN- γ pôde ser diferenciado dos outros IFNs.

IFN α e β são estruturalmente relacionados e seus genes estão localizados no cromossomo 9, no homem, indicando uma origem genética comum (WEISSMANN & WEBER, 1986; STEWART *et alii*, 1980). O IFN- γ é estruturalmente diferente dos IFN- α e β , sendo que seu código genético está

localizado, no homem, no cromossomo 12.

Há evidências de um único gene para IFN- γ , sendo que este codifica uma proteína que possui uma sequência de 146 aminoácidos no homem, 137 no rato e 136 no camundongo. No homem, o IFN- γ possui um peso molecular de 17.147 daltons (GRAY & GOEDDEL, 1982; EPSTEIN, 1982).

A molécula de IFN- γ , nas três espécies, contém dois sítios potenciais de glicosilação e dependendo do grupo carboidrato ligado a esses sítios, o IFN- γ pode ser secretado como uma glicoproteína com diferentes pesos moleculares (YIP *et alii*, 1982).

Também pode-se diferenciar o IFN- γ dos outros interferons por suas propriedades físico-químicas, tais como: diferenças de peso molecular, sensibilidade ao pH, estabilidade térmica.

O IFN- γ é produzido por células T ativadas e provavelmente por células NK ("natural killer"). Sua produção pode ser induzida por muitas e diferentes substâncias, por exemplo: mitógenos, antígenos, moléculas alogênicas codificadas pela região do complexo MHC e anticorpos dirigidos contra antígenos de superfície de linfócitos (STREET & MOSMANN, 1991). As diferentes subpopulações de células T, fenotipicamente definidas como células "T-helper" e células supressoras/citotóxicas, podem produzir IFN- γ , dependendo do tipo do estímulo (CHANG *et alii*, 1982; MORRIS, *et alii*, 1982).

A produção de IFN- γ também pode ser mediada por outras citocinas liberadas por células do sistema imune: IL-2, principalmente secretada por células "T-helper" e IL-1, secretada por células apresentadoras de antígenos, podem aumentar a liberação de IFN- γ direta ou indiretamente. A IL-1 induz a expressão de receptores para IL-2 (IL-2R) nas células T, que reconhecem o antígeno apresentado. Em sequência, a IL-2 promove a proliferação de células IL-2R(+) e então ocorre o aumento da secreção de IFN- γ (FARRAR *et alii*, 1982).

A produção de IFN- γ induzida por IL-2 envolve mecanismos intracelulares independentes daqueles ativados para proliferação celular. Embora a IL-2 esteja envolvida na produção do IFN- γ , ela não é um requisito básico (BENJAMIN *et alii*, 1982).

A indução do RNAm para IFN- γ por alguns estímulos é muito rápida, com níveis citoplasmáticos sendo detectados 30-60 minutos após adição do agente indutor (estímulo). O pico citoplasmático de RNAm ocorre geralmente entre 6 e 18 horas após a indução, decaindo após 24 horas (YOUNG & HARDY, 1990).

A produção basal "in vivo" de IFN- γ é extremamente baixa, sendo que RNAm para esta citocina quase não é detectável. Com métodos sensíveis, células produzindo IFN- γ podem ser detectadas no sangue e tecidos de indivíduos e animais normais. Estas pequenas quantidades de IFN- γ , se reais, podem estar associadas a um número basal de macrófagos ativados, em estado de alerta, para produzirem citocinas e outros mediadores, devido a um primeiro contato com endotoxina ou outro produto bacteriano (MARTINEZ *et alii*, 1984).

O IFN- γ exerce sua ação, ou melhor, seus efeitos biológicos através de um receptor de membrana diferente daqueles usados pelos outros interferons. A ligação do IFN- γ ao seu receptor é caracterizada pela sua alta especificidade e afinidade entre ambos. Está claro que apenas a presença de receptores de alta afinidade, não é suficiente para tornar a célula sensível ao IFN- γ , pois células de camundongos transfectados com gene para receptor responderam à ligação, porém não foram capazes de desencadear uma resposta (excitação-transdução de sinal; para revisão: BILLIAU & DIJKMANS, 1990).

Foram identificados duas formas moleculares de receptores para IFN- γ humano, e essas diferem no peso molecular, estabilidade em meio ácido e regulação na expressão do receptor. É sugerido que essa variabilidade de receptor possa estar contribuindo para as diferentes atividades do IFN- γ sobre diferentes tipos celulares (FISCHER *et alii*, 1988).

A ligação receptor-IFN- γ inicia uma série de modificações metabólicas, levando à expressão de múltiplos genes, novas sínteses de RNA e polipeptídeos. O IFN- γ também pode regular, negativamente, a síntese de algumas proteínas, sugerindo um efeito sobre a expressão de oncogenes, podendo ser uma via importante pela qual o IFN exerça a atividade antitumoral (CLEMENS, 1985).

Em contraste aos outros interferons, o IFN- γ não é primariamente um agente antiviral, pois em condições fisiológicas, sua produção é tardia em relação ao curso da infecção viral, quando comparado com IFN- α ou β . Porém sua atividade antiviral tem sido demonstrada *in vivo* e *in vitro*. O IFN- γ também potencia a atividade antiviral dos outros interferons (RUBIN & GRIPTA, 1980; SHALABY *et alii*, 1985).

Embora muitos tipos celulares possuam receptores e respondam ao IFN- γ , as células que tem atraído interesse como células alvos para essa citocina são os macrófagos e as células "macrófago-símiles" (células endoteliais, células dendríticas, células de Langerhans, etc.). Sobre essas células, o IFN- γ

exerce uma série de efeitos, levando-as ao estado denominado de "ativação" (HAMILTON & ADAMS, 1987).

De uma maneira geral, as atividades biológicas do IFN- γ podem ser relacionadas da seguinte forma: antiviral, antitumoral, microbicida, diferenciação celular, expressão de antígenos do MHC, inibição do crescimento celular, aumento das atividades das células "natural-killer", inibição das células T supressoras, aumento da citotoxicidade das células T, e quanto à ativação de macrófagos, podemos citar: indução da liberação de citocinas, como IL-1 e TNF; produção de H₂O₂, PAF e proteases; promove aderência de macrófagos à glicoproteínas de membranas; reduz a produção de PGE₂ por macrófagos (um fator que age como um regulador no processo inflamatório).

Por sua vez, a inflamação é um fenômeno complexo e neste contexto, o macrófago possui um papel de destaque. Assim, o principal ativador de macrófagos, IFN- γ , pode ser considerado uma molécula "chave" para a inflamação (BILLIAU & DIJKMANS, 1990).

5. Espécies reativas de Nitrogênio

FURCHGOTT & ZAWADZKI (1980) demonstraram que o relaxamento do músculo liso vascular induzido pela acetilcolina, era dependente do endotélio e mediado por um fator lábil, posteriormente denominado "fator de relaxamento derivado do endotélio" (EDRF). Depois verificou-se que este fenômeno ocorria em outros tecidos vasculares, como artérias, veias, arteríolas, vênulas e corpo cavernoso, em resposta a vários estímulos como trombina, substância P, nucleotídeos de adenina, ionóforo de cálcio (A23187), bradicinina. Outros estímulos como: hipóxia, aumento no fluxo e estimulação elétrica, também causam relaxamento endotélio-dependente no tecido vascular, *in vitro*.

Em 1987, FURCHGOTT e IGNARRO, independentemente, sugeriram que o EDRF era o NO, ou uma molécula relacionada. No entanto, a demonstração inequívoca de que o NO era o EDRF foi feita por MONCADA e colaboradores, em 1988. Desde então, a liberação de NO tem sido demonstrada em muitos tecidos (PALMER *et alii*, 1988).

STUEHR & MARLETTA (1985) haviam demonstrado que macrófagos murinos produziam nitrito (NO₂⁻) e nitrato (NO₃⁻) em resposta ao LPS e que esta produção era derivada da oxidação de um nitrogênio terminal guanidino da L-

arginina, o que resultava em quantias estequiométricas de L-citrulina e NO.

A síntese de NO é catalisada pela enzima NO sintase, que existe sob duas formas: a) constitutiva: presente, predominantemente nas células endoteliais e neuronais, é dependente de cálcio/calmodulina; e b) induzível: presente nos macrófagos, hepatócitos, células endoteliais, músculo liso, é independente de cálcio; ativada por determinadas citocinas e LPS (MARLETTA *et alii*, 1988). Ambas enzimas são dependentes de NADPH e possuem sua atividade incrementada pela tetrahidrobiopterina (BH₄), atuando como cofator, porém esse fato não foi confirmado em macrófagos humanos (TAYEH & MARLETTA, 1989).

O início da oxidação do nitrogênio, para a síntese de NO e atividades citotóxicas em macrófagos, requer múltiplos sinais liberados em sequência definida. Esse processo pode ser observado tanto *in vivo* como por exemplo, durante reações imunes ou infecção por BCG, onde os macrófagos infectados desenvolvem atividade citotóxica (STOKVIS *et alii*, 1992), quanto *in vitro*, onde macrófagos murinos peritoneais pré-tratados com IFN- γ e então expostos a um segundo sinal, como LPS, produzem quantidades de NO consideráveis (LORSBACH & RUSSEL, 1992). O fato mais marcante na expressão da NO sintase em macrófagos (induzível) é que ela só é observada após estimulação com agentes tais como LPS, citocinas, como IFN- γ e TNF- α que induzem a síntese de grandes quantidades de NO por estas células (STUEHR & MARLETTA, 1985; DING *et alii*, 1988). O LPS e o IFN- γ aumentam a expressão de RNA mensageiro que codifica a NO sintase induzível (LORSBACH *et alii*, 1993).

A IL-2 e o IFN- γ tem efeito sinérgico na indução da NO sintase. Por outro lado, a IL-10 inibe a indução dessa enzima em macrófagos murinos (CUNHA *et alii*, 1992) e a IL-4, o TGF- β 1, β 2 e β 3 também inibem a indução da síntese de NO em macrófagos (DING *et alii*, 1990).

Em algumas células o NO é citostático, em outras, é citotóxico, sugerindo que a sensibilidade varia de uma célula para outra. As atividades citotóxicas mediadas pelo NO, incluem inibição de enzimas intracelulares que contêm ferro, da respiração mitocondrial e da síntese de DNA nas células alvo (HIBBS *et alii*, 1987). Portanto, o NO pode ser identificado como um mediador intracelular potente e com efeitos pleiotrópicos sobre a defesa do organismo contra células tumorais e microorganismos intracelulares (LIEW & COX, 1991).

6. Espécies reativas de Oxigênio

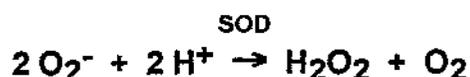
As células fagocíticas (neutrófilos, eosinófilos, monócitos e os macrófagos) possuem um papel crucial na defesa do organismo e para este propósito possuem um arsenal molecular capaz, sob ativação, de gerar espécies reativas de oxigênio. Este arsenal é constituído de um complexo enzimático, o NADPH oxidase, que é capaz de catalisar a redução de um eletrón do oxigênio molecular (O_2) a ânion superóxido (O_2^-) (para revisão: MOREL *et alii*, 1991).

Em células ativadas, a atividade catalítica da NADPH oxidase está localizada na membrana plasmática, sendo que nas células em repouso seus componentes estão distribuídos entre a membrana e o citosol, sendo sua ativação acompanhada do transporte dos componentes que estão no citosol para a membrana plasmática (para revisão: CONDINO-NETO, 1993).

Este sistema após exposição a determinados estímulos, como, LPS, FMLP, C5a e algumas citocinas, como TNF- α , IL-1, GM-CSF e IFN- γ (KOWANKO & FERRANTE, 1987; KOWNATZKI *et alii*, 1988) desencadeia uma série de reações bioquímicas conhecida com "burst" oxidativo ou explosão respiratória, onde ocorre um aumento no consumo de oxigênio pelas células fagocíticas (ROSSI & ZATTI, 1964)

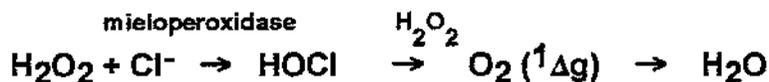


O ânion superóxido é subseqüentemente convertido a peróxido de hidrogênio (H_2O_2) por dismutação espontânea ou enzimática, através da superóxido dismutase (SOD).

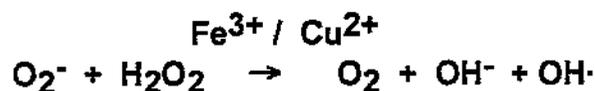


O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) por sua vez, pode ser substrato para

a mieloperoxidase, que gera produtos com maior poder oxidativo, como o ácido hipocloroso (HOCl) e o oxigênio singular ("singlet oxygen", $^1\Delta g$). O peróxido de hidrogênio também pode sofrer ação da catalase, passando a H_2O .



A redução de 3 elétrons do O_2 resulta em radical hidroxila ($OH\cdot$), que pode ser gerado a partir do ânion superóxido (O_2^-) e H_2O_2 na presença de íons ferro e cobre, conforme proposto por HABER & WEISS (1934).



O radical hidroxila ($OH\cdot$) é o oxidante mais instável que se conhece, devido a sua alta reatividade pode provocar uma reação em cadeia, atacando e danificando quase todas as moléculas das células vivas (DORFMAN & ADAMS, 1973)

O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em altas concentrações, danifica o DNA, rompe membranas e libera cálcio, ativando enzimas proteolíticas intracelulares cálcio-dependentes, o que é lesivo para as células (PRYOR, 1978).

II. OBJETIVOS

Os objetivos do presente trabalho foram:

1. Estudar o efeito quimiotático do IFN- γ recombinante murino para neutrófilos e monócitos, quando injetados na cavidade peritoneal de camundongos.

2. Verificar se há uma relação espécie-específica entre os IFN- γ recombinantes murino e humano, estudando-se suas capacidades em estimular células, *in vitro*

3. Estudar o efeito modulador do IFN- γ sobre a atividade quimiotática para neutrófilos induzida por LPS, *in vivo*, bem como sobre a liberação de fatores quimiotáticos para essas células, por macrófagos peritoneais estimulados, *in vitro*, pela endotoxina.

III. MATERIAIS E MÉTODOS

1. ANIMAIS

Foram utilizados camundongos isogênicos, de ambos os sexos, da cepa C57BL/6, pesando entre 20-30g, fornecidos pelo Biotério Central da UNICAMP. Os animais foram mantidos em gaiolas de plástico, em sala com ciclo claro/escuro de 12/12hs, e tiveram livre acesso a água e alimentos.

2. CITOCINAS

O IFN- γ murino utilizado (rmuIFN- γ ; 1×10^7 UI/mg de proteína) foi obtido através de tecnologia recombinante em *E.coli*, produzido pela firma Genzyme (U.S.A.), doado pelos Profs. Drs. Jamil Assreuy Filho (UFRJ) e Fernando Q. Cunha (FMRP-USP). A solução estoque estava diluída em PBS, contendo 1mg/ml de Albumina Bovina-fração V, livre de protease (SIGMA), numa concentração de 50.000 UI de IFN- γ /ml.

O IFN- γ recombinante humano utilizado (rhuIFN- γ ; 1×10^7 UI/mg proteína) foi produzido por Boehringer Ingelheim (Alemanha), estocado em uma concentração de 0,1mg/0,5ml e doado pelo Prof. Dr. Gilberto de Nucci (FCM-UNICAMP).

O TNF- α recombinante murino utilizado (rmuTNF- α ; 0,98 mg proteína/ml) foi produzido pela firma Genentech Inc. (South San Francisco, Califórnia - USA) e doado pela Profa. Dra. Wirla M.S.C. Tamashiro (IB-UNICAMP).

3. DROGAS

Foram utilizadas as seguintes drogas:

Forbol miristato acetato (PMA, SIGMA;USA); Zimosam (SIGMA; USA); Superóxido dismutase (SOD, SIGMA;USA); Citocromo C (SIGMA;USA); Nitroarginina (NARG, SIGMA;USA) e Lipopolissacarídeo de *E.coli* (LPS, SIGMA;USA).

4. MIGRAÇÃO DE NEUTRÓFILOS PARA A CAVIDADE PERITONEAL

4.1. Efeito da injeção de lipopolissacarídeo de *E. coli* (LPS) ou IFN- γ

O rmuIFN- γ foi injetado em doses que variaram de 150-1350 IU/0,5 ml, por animal. Este efeito foi comparado com a migração induzida pela injeção, i.p., de 0,5ml de LPS (200 ng/cav). Após vários intervalos de tempo (4, 8, 12, 24 e 48 hs) a cavidade peritoneal foi lavada com 3 ml de PBS-Heparina-SAB (soro albumina bovina a 3%, p/v) e, após leve massagem da cavidade, foi coletado o maior volume possível do lavado peritoneal. Em seguida, foram feitas as contagens total e diferencial dos leucócitos. Para contagem total foram diluídos 20 μ l do lavado peritoneal em 400 μ l de solução de Turk, e a contagem das células foi feita em câmara de Neubauer. Feito isso, o lavado peritoneal foi, então, centrifugado (1500 rpm/5 min, a temperatura ambiente) e o sobrenadante, descartado. O precipitado leucocitário foi ressuspensionado com 300 μ l de SAB 3% (p/v). A partir desta suspensão celular foram realizados esfregaços, corados com corante de Rosenfeld e, em seguida, foi procedida a contagem diferencial, em microscópio óptico (objetiva de imersão). Os resultados foram expressos em número de neutrófilos /ml.

O rhulFN- γ foi injetado na dose de 150 UI/0,5 ml, por animal. A partir daí, os controles e a metodologia foram idênticas à aplicada ao IFN- γ murino. Da mesma forma, o ensaio foi feito em ratos, utilizando-se IFN- γ recombinantes murino e humano, na dose de 150 UI/cav., variando-se o volume injetado (1 ml/cav) do estímulo, o volume do lavado peritoneal (10 ml) e o tempo de avaliação da migração após a injeção do estímulo (4 horas).

4.2. Efeito do rmuIFN- γ sobre a migração de neutrófilos induzida por LPS e rmuTNF- α

O LPS (1, 10 e 100 ng/cav) e o TNF- α (0,5 e 100 ng/cav) foram injetados, isolados ou simultaneamente com rmuIFN- γ (150 UI/cav), na cavidade peritoneal de camundongos, num volume final de 0,5 ml/animal.

A migração de neutrófilos foi avaliada 12 horas após a injeção dos

estímulos. O procedimento de lavagem da cavidade peritoneal e a determinação do número de células/ml foram feitos conforme a técnica descrita no item 4.1..

4.3. Efeito do aumento do número de macrófagos peritoneais sobre a migração neutrófilos induzida por LPS ou rmlFN- γ

O número de macrófagos peritoneais residentes foi aumentado pelo pré-tratamento com Tioglicolato (1,5 ml de uma solução 3%, p/v, em H₂O), como descrito por RIBEIRO *et alii.*, (1990). Após 4 dias, IFN- γ (150 UI/0,5 ml) ou LPS (1, 10, 100 ng/0,5 ml) foram injetados na cavidade peritoneal de camundongos. A resposta migratória de neutrófilos foi avaliada 12 horas após a injeção desses estímulos, como descrito acima. A efetividade do pré-tratamento com tioglicolato 3% em aumentar o número de macrófagos foi comparada com a injeção de solução salina 0,9% estéril. A migração de células mononucleares foi avaliada 96 horas após a injeção dos estímulos.

Como ao final do 4^o. dia, um número residual de neutrófilos ainda estava presente na cavidade de animais pré-tratados com tioglicolato, os resultados foram expressos em Δ , onde o valor encontrado foi subtraído do valor residual. O mesmo procedimento foi feito com salina 0,9%. Assim, os resultados foram expressos em Δ neutrófilos/ml.

5. MIGRAÇÃO DE CÉLULAS MONONUCLEARES PARA A CAVIDADE PERITONEAL

A migração de células mononucleares foi avaliada 4 dias após a injeção, i.p., de IFN- γ em doses variando de 150-1350 IU/1.5ml, por animal. Este efeito foi comparado com a migração induzida pela injeção, i.p., 1.5ml de Tioglicolato 3% (p/v).

Após esse período, o procedimento para contagem total e diferencial de leucócitos foi como o descrito acima. Os resultados foram expressos em número de células mononucleares/ml.

6. DETERMINAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO (NO) POR MACRÓFAGOS

6.1. Obtenção de macrófagos peritoneais de camundongos

As células foram obtidas por lavagem, por 2 vezes com 5 ml de solução salina 0.9% estéril, da cavidade peritoneal de animais pré-tratados 4 dias antes com Tioglicolato 3% (p/v). O lavado peritoneal foi centrifugado (1500 rpm/5 min.) e o sobrenadante decartado. As células foram, então, lavadas por 3 vezes com solução salina, e ressuspendidas em RPMI 1640 (sem bicarbonato de sódio; INTERLAB), num volume fixo. A seguir foi feita a contagem total, determinando-se o número de células por ml. A partir desse dado foram feitas diluições para obtenção de 10^7 células/ml.

6.2. Dosagem de nitrito (NO_2^-)

A partir da suspensão celular, 1×10^6 células foram dispensadas em placas de cultura de plástico de 96 poços (LINBRO, FLOW), colocadas para aderir por 2 horas, a 37°C , em câmara de cultura com ambiente umidificado. Após esse período, as células foram lavadas por 3 vezes com salina 0,9% estéril para remoção das células não aderentes. Os estímulos utilizados (IFN- γ 20 UI/ml e LPS 20 ng/ml) foram diluídos em meio de cultura RPMI 1640, contendo 10% de soro fetal bovino, 10 mM de HEPES (SIGMA), 100 UI/ml de penicilina (SIGMA) e 100 $\mu\text{g/ml}$ de streptomina (SIGMA), e adicionados à placa. Em seguida, as células foram incubadas por 20-48 hs.

Após este período de incubação, os sobrenadantes das células foram transferidos para a placa de leitura, onde foi adicionado o Reagente de Griess na proporção 1:1 (v/v) com o sobrenadante. Em seguida, a placa foi lida em leitor de ELISA a 546 nm. Os valores de leitura foram comparados com uma curva padrão de NaNO_2 (5-80 μM) e os resultados expressos em μM de nitrito liberado por 1×10^6 macrófagos.

7. DETERMINAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ÂNION SUPERÓXIDO (O_2^-) POR MONÓCITOS OU NEUTRÓFILOS HUMANOS.

7.1. Obtenção de monócitos e neutrófilos humanos

As células sangüíneas de voluntários normais foram coletadas por venopunção e dispostas em tubo plástico contendo 3,8% de citrato de sódio. Os monócitos e os neutrófilos foram obtidos por centrifugação em gradiente de densidade com Ficoll:Hipaque (1.077:1.119 g/ml; Histopaque, SIGMA). As células assim obtidas foram lavadas por 3 vezes com solução de Hanks (sem Ca^{+2}). Os eritrócitos foram lisados por choque hipotônico. O número de cada tipo de leucócito foi determinado automaticamente por um contador Coulter (modelo T 890, Hialeah, Fla., U.S.A.) e ajustado para 2×10^6 células/ml com solução de Hanks balanceada (pH 7.4) suplementada com 10 mM HEPES.

7.2. Dosagem de ânion superóxido (O_2^-)

A produção do ânion superóxido (O_2^-) por neutrófilos ou monócitos foi determinada segundo a técnica descrita por McCORD & FRIDOVICH (1969). Essas células (350 μ l de uma suspensão de 2×10^6 /ml monócitos ou neutrófilos), foram incubadas com 50 μ l dos seguintes estímulos: PMA 3 nM, Zimosam (100 partículas/célula), $\text{rhuIFN-}\gamma$ ou $\text{rmuIFN-}\gamma$ (20,100 e 500 UI/ml) ou nas concentrações anteriormente descritas com $\text{IFN-}\gamma$ + PMA e $\text{IFN-}\gamma$ + Zimosam. A reação foi feita em tubos Eppendorf de 1,5 ml, considerando um volume final de 500 μ l.

Essa incubação foi feita com a adição de Citocromo C tipo III (80 μ M, SIGMA) por 1 hora à 37° . A liberação espontânea de superóxido foi determinada usando solução de Hanks no lugar do estímulo. O controle negativo, que detecta uma redução inespecífica do Citocromo C, foi feito com a adição da superóxido dismutase de eritrócito bovino (SOD, 130 UI/ml), no início da reação, em tubos paralelos aos do teste. Após o período de incubação, a reação foi bloqueada pela imersão dos tubos de reação em banho de gelo e com a adição da superóxido dismutase (SOD 130 UI/ml) aos tubos que não a continham.

Feito isso, esses tubos foram centrifugados a 10.000 rpm

(microcentrifuga para tubos Eppendorf) por 2 minutos, os sobrenadantes coletados e dispostos em placa de 96 poços (LINBRO, FLOW) que foi lida em leitor ELISA, em uma absorvância de 550 nm. A produção de superóxido foi calculada usando-se um coeficiente de extinção de $21.100 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. O experimento foi feito em duplicata. Os resultados representam a média das determinações e foram expressos em nmoles de superóxido/ 1.4×10^6 células.

8. LIBERAÇÃO DE FATORES QUIMIOTÁTICOS PARA NEUTRÓFILOS, POR MACRÓFAGOS PERITONEAIS MURINOS ESTIMULADOS *IN VITRO*

8.1. Estimulação *in vitro* dos macrófagos de camundongos com LPS, IFN- γ ou LPS + IFN- γ

As células foram obtidas de camundongos por lavagem, com 3 ml de uma solução salina 0.9% estéril, da cavidade peritoneal de animais tratados previamente com tioglicolato 3% (p/v).

Cerca de 5 ml dos lavados peritoneais foram distribuídos em placas de Petri de plástico estéreis, as quais foram incubadas a 37°C durante 2 horas, em ambiente umidificado e contendo 5% de CO_2 , a fim de que os macrófagos pudessem aderir ao fundo das mesmas. Os sobrenadantes foram desprezados e as células aderidas, lavadas três vezes com solução salina 0,9%, estéril. Esse procedimento eliminou a maioria das células não aderentes. O número de células aderidas foi determinado ao final do período de incubação, diluindo-se 20 μl da suspensão celular obtida por raspagem do fundo das placas em 400 μl de líquido de Turck. Em média, o número de células foi equivalente à 4×10^6 células/placa. Essas células apresentaram uma viabilidade maior que 90%, determinada por exclusão de Azul de Tripán 0,1%.

Após a aderência, os macrófagos foram estimulados, por 30 min, com LPS (5 $\mu\text{g/ml}$), IFN- γ (20 UI/ml) ou IFN- γ + LPS. O grupo controle foi incubado apenas com RPMI. As placas foram, então, lavadas 3 vezes com salina 0,9% estéril e seguiu-se um período final de incubação com 3 ml de RPMI, por 2 horas. Após, os sobrenadantes foram recolhidos, centrifugados, concentrados 10 vezes por ultrafiltração em aparelho Amicon equipado com membrana YM 10 (retem substâncias com peso molecular acima de 10.000 Daltons) e, após esterilização em filtros 0,22 μm , testadas suas capacidades em induzir migração

de neutrófilos para o peritônio de camundongos. Aliquotas de 200-400 μ l foram também estocadas a -20°C para posterior detecção de TNF.

8.1.1. Detecção de TNF em sobrenadantes de macrófagos

A presença de TNF nas amostras de sobrenadantes de cultura de macrófagos estimulados com LPS, IFN- γ , LPS+IFN- γ ou somente com RPMI foi detectada através de reações imunoenzimáticas (ELISA, "Enzyme Linked Immunosorbent Assay") de captura. Os ensaios foram realizados em placa de fundo chato de poliestireno, de 96 poços (Flow Laboratories Inc., McLean, VG, USA). A placa foi sensibilizada com anticorpo monoclonal anti-TNF α (XT 22.11) purificado, diluído em solução-tampão de carbonato de sódio 0,1 M (pH 9,0) na concentração de 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Após, 50 μ l da solução do anticorpo recém-diluída foi adicionada a cada poço. A placa foi agitada para permitir a formação de áreas uniformes de cobertura e a seguir incubada a 4°C , durante 18 h. Antes do ensaio, a placa foi trazida à temperatura ambiente, lavada por 3 vezes com PBS pH 7,2 contendo 0,05% de Tween 20 (PBS-Tw). O PBS-Tw foi então removido completamente por inversão da placa. A seguir, 200 μ l de uma solução de PBS-Tw contendo 3% de SAB foram adicionados a cada poço para bloquear os sítios ligantes remanescentes, e a placa foi incubada por 30 min, a 37°C . Em seguida, foi feita nova lavagem com PBS-Tw, como descrito acima, e então, 50 μ l dos sobrenadantes das culturas não diluídos ou diluídos seriadamente (em PBS-Tw contendo 3% de SAB) foram adicionados a cada poço. A placa foi incubada por 2 h, a temperatura ambiente. Os sobrenadantes das culturas foram removidos e a placa lavada como já descrito. Após, 50 μ l de um segundo anticorpo anti-TNF (IgG de coelho anti-TNF α) purificado, na concentração de 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (em PBS-Tw), foi adicionado a cada poço e a placa incubada por 2 h, a temperatura ambiente. Após 3 lavagens para remover o segundo anticorpo, adicionou-se 75 μ l do conjugado anti-IgG de coelho/Fosfatase alcalina, diluído a 1:1000 em PBS-Tw e novamente incubada por 1 h, à temperatura ambiente. A placa foi lavada 5 vezes em PBS-Tw e a seguir adicionou-se a cada poço 100 μ l do substrato (1 mg/ml de para-nitro-fenil-fosfato em solução 1 M de TRIS pH 9,8, contendo 3 mM de cloreto de magnésio). Após 30 min de incubação à temperatura ambiente, foi feita a leitura a 405 nm em leitor de ELISA (Multiskan MCC/340 MKII).

A curva padrão foi feita utilizando-se rmuTNF- α (Genentech Inc.) e o conteúdo de TNF nos sobrenadantes das culturas foi calculado por comparação com as quantidades padrões. Os resultados correspondem a média de triplicatas de um único experimento.

9. REAGENTES E SOLUÇÕES

Todos os reagentes e soluções utilizados foram de grau analítico obtidos, principalmente, da MERCK, REAGEN ou RIEDEL.

9.1. Corante de Rosenfeld modificado

Giemsa azul-eosina.....0,97 g
 May-Greenwald-eosina.....0,53 g
 Metanol p.a.....1,00 L

9.2. Líquido de Turk

Ácido acético..... 2,00 ml
 Água destilada q.s.p 100 ml
 Após, foram adicionados alguns cristais de azul de metileno, cuja função foi a de aumentar o contraste para a contagem de leucócitos na câmara de Neubauer.

9.3. Solução de Albumina a 3%

Albumina bovina (SIGMA, USA)..... 3,00 g
 Água destilada q.s.p..... 100 ml
 Colocar a albumina sobre a água destilada e deixar em repouso até completa dissolução.

9.4. Solução Salina Tamponada (PBS): solução concentrada 10x

NaCl..... 80,0 g
 KCl..... 2,00 g
 Na₂HPO₄.12H₂O.....28,9 g

KH₂PO₄..... 2,00 g

Água destilada q.s.p..... 1,00 L

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

9.5. Solução Hanks Balanceada

NaCl..... 8,00 g

KCl..... 0,40 g

MgSO₄.2H₂O..... 0,10 g

Na₂HPO₄.2H₂O..... 0,06 g

KH₂PO₄..... 0,06 g

MgCl₂.6H₂O..... 0,10 g

Glicose..... 1,00 g

NaHCO₃..... 0,35 g

H₂O destilada qsp..... 1,00 L

Ajustar o pH para 7.2-7.4, com solução de NaHCO₃ 5.6%.

9.6. Reagente de Griess

a) H₃PO₄ p.a..... 5,00 ml

Água destilada q.s.p..... 100 ml

b) Sulfanilamida..... 1,00 g

Sol. H₃PO₄ (5%)..... 100 ml

c) α-Naftiletilenodiamina..... 0,10 g

Água destilada..... 100 ml

Misturar (sol.b)+(sol.c), na proporção 1:1 (v/v), no momento do uso.

9.7. Solução de Tioglicolato a 3%

Tioglicolato (DIFCO)..... 3 g

Água destilada..... 100 ml

10. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Aos resultados obtidos foram efetuados cálculos para determinação das médias e dos erros-padrões das médias (EPM). Diferenças estatisticamente significantes ($p < 0.05$) entre grupos foram determinadas utilizando-se um ou combinações dos seguintes testes: "t" de Student ; ANOVA e teste de Duncan para comparações múltiplas (SNEDECOR, 1963; DUNCAN, 1955; KRAMER, 1956).

IV. RESULTADOS

1. Efeito da administração de LPS sobre a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de camundongos

A Figura 1 mostra o curso temporal da migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de camundongos (Painel A), induzida pela injeção, i.p., de LPS (200 ng/camundongo), utilizado neste trabalho como referência para o fenômeno (controle positivo). Observou-se uma significativa e progressiva migração de neutrófilos a partir da 4^a hora, que foi máxima na 12^a hora (cerca de 5 vezes maior do que o número de neutrófilos do grupo controle). Na 24^a hora o número de neutrófilos ainda se mostrava elevado e estatisticamente diferente em relação ao controle. Entretanto, 48 horas após não foi mais observada diferença estatística no número de neutrófilos entre o grupo controle e injetado com a endotoxina.

A migração de neutrófilos induzida por LPS (8-1000 ng/camundongo) foi dose-dependente, sendo máxima com a dose de 200 ng (Painel B). A partir dessa dose, o efeito foi menor, caracterizando uma curva dose-resposta em forma de "sino" ou de auto-inibição.

2. Efeito do rmulFN- γ e rhulFN- γ sobre a migração de neutrófilos e monócitos para a cavidade peritoneal de camundongos

Tanto o rmulFN- γ (150-1350 UI/animal) quanto o rhulFN- γ (150 UI/animal) não foram capazes de induzir migração de neutrófilos ou de monócitos para a cavidade peritoneal de camundongos. A injeção de LPS (200 ng/animal) causou, 12 horas após, significativa migração de neutrófilos. Por outro lado, a injeção de Tioglicolato 3% (1,5 ml, i.p., 4 dias antes) induziu intensa migração de células mononucleares, fundamentalmente, monócitos/macrófagos (Tabela 1).

3. Efeito de *rmuIFN- γ* e *rhIFN- γ* sobre a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de ratos.

Observou-se que, também nessa espécie animal, nenhum dos IFNs- γ recombinantes (murino ou humano), foi capaz de induzir migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de ratos. A injeção de LPS (200 ng/animal) causou significativa migração de neutrófilos para esta cavidade, avaliada 4 horas após a injeção do estímulo (Tabela 2).

4. Efeito da estimulação de macrófagos murinos por *rmuIFN- γ* , LPS ou *rmuIFN- γ* + LPS sobre a liberação de óxido nítrico (NO).

A estimulação de macrófagos peritoneais, *in vitro*, com LPS ou IFN- γ murino, isoladamente, não foram capazes de causar uma liberação significativa de NO. Por outro lado, quando adicionados simultaneamente, verificou-se uma liberação em torno de 30 μM de NO_2^- , quantidade esta muito superior ao do grupo controle (cerca de 10 vezes). Essa liberação de NO foi quantificada em termos de nitrito (μM) formado e foi quase que totalmente inibida pelo tratamento das monocamadas de macrófagos com Nitro-arginina (NARG; 400 μM), um antagonista seletivo da formação de NO (Figura 2).

5. Efeito do *rhIFN- γ* ou *rhIFN- γ* + LPS sobre a liberação de óxido nítrico (NO) por macrófagos murinos.

A Tabela 3 mostra a liberação de óxido nítrico (NO) por macrófagos, em termos de quantidade de nitrito ($\mu\text{M}/1 \times 10^6$ células), induzida por *rmuIFN- γ* (20 UI/ml), *rhIFN- γ* (20 UI/ml), LPS (20 ng/ml) e IFN- γ murino + LPS ou IFN- γ humano + LPS.

Observou-se que o *rmuIFN- γ* ou LPS, isoladamente, não causaram liberação de NO, porém esta citocina, quando incubada simultaneamente com LPS, potencializou a liberação causada pela endotoxina (10 vezes). Essa liberação foi também bloqueada pela NARG (400 μM).

Por outro lado, a estimulação de macrófagos murinos com rhulFN- γ não causou, por si próprio, uma liberação significativa de NO ou alterou aquela induzida por LPS (20 ng/ml), mesmo em doses de até 500 UI/ml.

6. Efeito do rhulFN- γ sobre a produção de ânions superóxido (O_2^-) por neutrófilos e células mononucleares humanas.

Como pode ser observado na Figura 3, a estimulação de leucócitos mononucleares humanos com rhulFN- γ (20-500 UI/ml) causou uma liberação, dose-dependente, de ânions superóxido (O_2^-), chegando na dose de 500 UI/ml, a valores comparáveis àqueles obtidos com a estimulação dessas células com 3nM PMA. Entretanto, tal efeito não foi observado quando a célula estudada foi o neutrófilo (Figura 4).

O rhulFN- γ potenciou a produção de ânions superóxido (O_2^-) tanto em células mononucleares (Figura 3-A) como em neutrófilos (Figura 4-A) estimulados por PMA (3 nM). Entretanto, a dose de rhulFN- γ necessária para se observar esse efeito de potenciação em células mononucleares foi cinco vezes menor que aquela utilizada para estimulação de neutrófilos. Além disso, esse efeito potenciador da liberação de superóxido mostrou um padrão de auto-inibição para células mononucleares (Figura 3-A).

Quando os estudos foram realizados utilizando-se Zimosam, o rhulFN- γ não foi capaz de potenciar a liberação de superóxido induzida por esse estímulo, tanto em células mononucleares (Figura 3-B) como em neutrófilos (Figura 4-B). Ao contrário, na menor dose (20 UI/ml) o rhulFN- γ reduziu, significativamente, a produção de superóxido por células mononucleares incubadas com o estímulo particulado (Figura 3-B).

7. Efeito do rmulFN- γ sobre a produção de ânions superóxido (O_2^-) por neutrófilos e células mononucleares humanas

A estimulação de células mononucleares e neutrófilos humanos com rmulFN- γ (100 e 500 UI/ml, respectivamente) não causou, por si só, liberação de ânions superóxido por essas células. Esta citocina também não foi capaz de potenciar a liberação desses ânions, induzida por PMA 3 nM ou Zimosam (100 part/cel), tanto em células mononucleares quanto em neutrófilos (Tabela 4).

8 Efeito da estimulação *in vitro* de macrófagos murinos por LPS, rmulFN- γ ou IFN- γ + LPS sobre a produção de fatores quimiotáticos para neutrófilos

Macrófagos em cultura foram capazes de liberar no sobrenadante, após estimulação por LPS (5 μ g/ml), um fator que induziu migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de camundongos. A estimulação das monocamadas de macrófagos com rmulFN- γ , isoladamente, não foi capaz de induzir uma liberação significativa de substância com atividade quimiotática *in vivo*. A injeção do sobrenadante de macrófagos estimulados por rmulFN- γ + LPS causou uma migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de camundongos, cerca de 50% menor do que a induzida pelo sobrenadante obtido de macrófagos apenas estimulados com LPS (Figura 5).

9. Determinação da atividade TNF- α em sobrenadante de macrófagos murinos em cultura

A dosagem de TNF- α no sobrenadante de cultura de macrófagos murinos estimulados por LPS (5 μ g/ml) ou rmulFN- γ (20 UI/ml) apresentou valores semelhantes: 3,67 e 3,61 ng TNF- α /ml, respectivamente. Já o nível de TNF- α presente no sobrenadante de cultura de macrófagos estimulados com LPS + IFN- γ foi cerca de 3,5 vezes maior que a observada com os mesmos estímulos administrados isoladamente. Os valores de dosagem quantificados em cada um desses sobrenadantes foram significativamente diferentes do valor encontrado no grupo controle (salina), que apresentou níveis não detectáveis pelo método utilizado (Tabela 4).

10. Efeito da injeção concomitante de LPS + rmulFN- γ , sobre a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de camundongos normais e pré-tratados com Tioglicolato 3%.

O efeito observado após a injeção de rmulFN- γ (150 UI/animal) e LPS (1, 10 e 100 ng/animal) em animais normais (Figura 6-A) ou com a população de macrófagos peritoneais residentes aumentada pelo pré-tratamento com

Tioglicolato 3% (i.p., 4 dias antes; Figura 6-B) foi qualitativamente semelhante. O $rmuIFN-\gamma$ potenciou a migração induzida pela menor dose de LPS (1 ng/animal) e inibiu a migração induzida por 10 e 100 ng/animal.

Verificou-se, também, que $rmuIFN-\gamma$, isoladamente, não induziu migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal, mesmo em animais pré-tratados com Tioglicolato 3% (Figura 6).

11. Efeito da injeção de $TNF-\alpha$ e $TNF-\alpha + muIFN-\gamma$ sobre a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de camundongos

A Figura 7 mostra o efeito da injeção, i.p., de $TNF-\alpha$ e $TNF-\alpha + IFN-\gamma$, ambas citocinas recombinantes murinas, sobre a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de camundongos.

Quantidades de $TNF-\alpha$ equivalentes àquelas produzidas por 4×10^6 macrófagos em cultura (cerca de 0,5 ng/cavidade) não foram capazes de induzir migração de neutrófilos. No entanto, a co-injeção desta dose de TNF com 150 UI/cavidade de $IFN-\gamma$ causou um aumento significativo dessas células, cerca de 10 vezes maior que o número observado em cavidades de animais controles. A injeção de 100 ng/cavidade de $TNF-\alpha$, i.p., causou intensa migração de neutrófilos. Por outro lado, a administração concomitante das duas citocinas, nas doses indicadas, mostrou um efeito significativamente menor (cerca de 5 vezes) que aquele observado com a administração isolada de $TNF-\alpha$, indicando que o $IFN-\gamma$ reduz drasticamente o fenômeno.

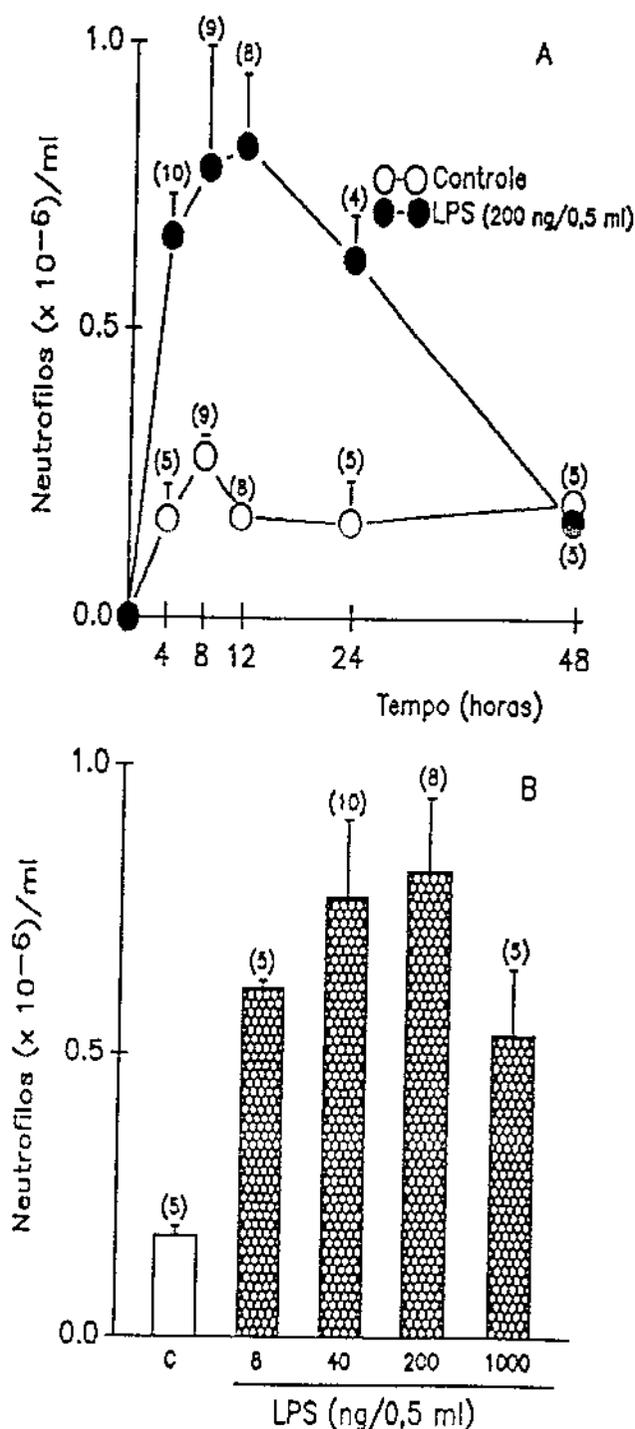


FIGURA 1 - LPS induz migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de camundongos C57/BL6. Painel A: curso temporal da migração de neutrófilos induzida pela injeção de LPS (200 ng/animal). Painel B: curva dose-resposta de LPS, avaliada 12 horas após a injeção do estímulo. Animais controles receberam salina 0,9% estéril. Resultados como média \pm EPM. O número entre parenteses representa o número de animais utilizados. A análise dos resultados da curva dose-resposta mostraram em todas as doses que o efeito foi diferente do grupo controle ($p < 0,01$; ANOVA, teste de Duncan).

TABELA 1

IFN- γ RECOMBINANTES MURINO E HUMANO NÃO INDUZEM MIGRAÇÃO DE NEUTRÓFILOS OU DE MONÓCITOS PARA A CAVIDADE PERITONEAL DE CAMUNDONGOS

Tratamento	Número de células ($\times 10^{-6}/\text{ml}$) _(a)		
	Neutrófilos _(b)	Monócitos _(c)	n
Controle	0,11 \pm 0,08	1,79 \pm 0,42	5
LPS (200ng)	0,77 \pm 0,07*	NR	8
Tioglicolato (45mg)	NR	15,17 \pm 1,16*	5
rmuIFN- γ 150 UI	0,26 \pm 0,06	1,61 \pm 0,15	10
rmuIFN- γ 450 UI	0,22 \pm 0,05	1,21 \pm 0,13	5
rmuIFN- γ 1350 UI	0,21 \pm 0,06	1,29 \pm 0,09	5
rhulIFN- γ 150 UI	0,18 \pm 0,04	1,27 \pm 0,08	5

NR: não realizado; (a): resultados como média \pm EPM; (b): a migração de neutrófilos foi avaliada 12 horas após injeção do estímulo; (c): migração de monócitos foi avaliada 96 horas após injeção do estímulo. n=número de animais utilizados.* p < 0,01; ANOVA e Teste de Duncan, em relação ao controle.

TABELA 2

MIGRAÇÃO DE NEUTRÓFILOS PARA A CAVIDADE PERITONEAL DE RATOS
INDUZIDA POR IFN- γ RECOMBINANTES MURINO E HUMANO

Tratamento	Número de células ($\times 10^{-6}/\text{ml}$) _(a)	
	Neutrófilos _(b)	n
Controle	0,16 \pm 0,04	5
LPS (200ng)	0,67 \pm 0,20*	5
rmuIFN- γ 150 UI	0,18 \pm 0,04	5
rhulIFN- γ 150 UI	0,17 \pm 0,05	5

(a): resultados como média \pm EPM; (b): a migração de neutrófilos foi avaliada 4 horas após injeção do estímulo. n = número de animais. * p < 0,01; ANOVA e Teste de Duncan, em relação ao controle

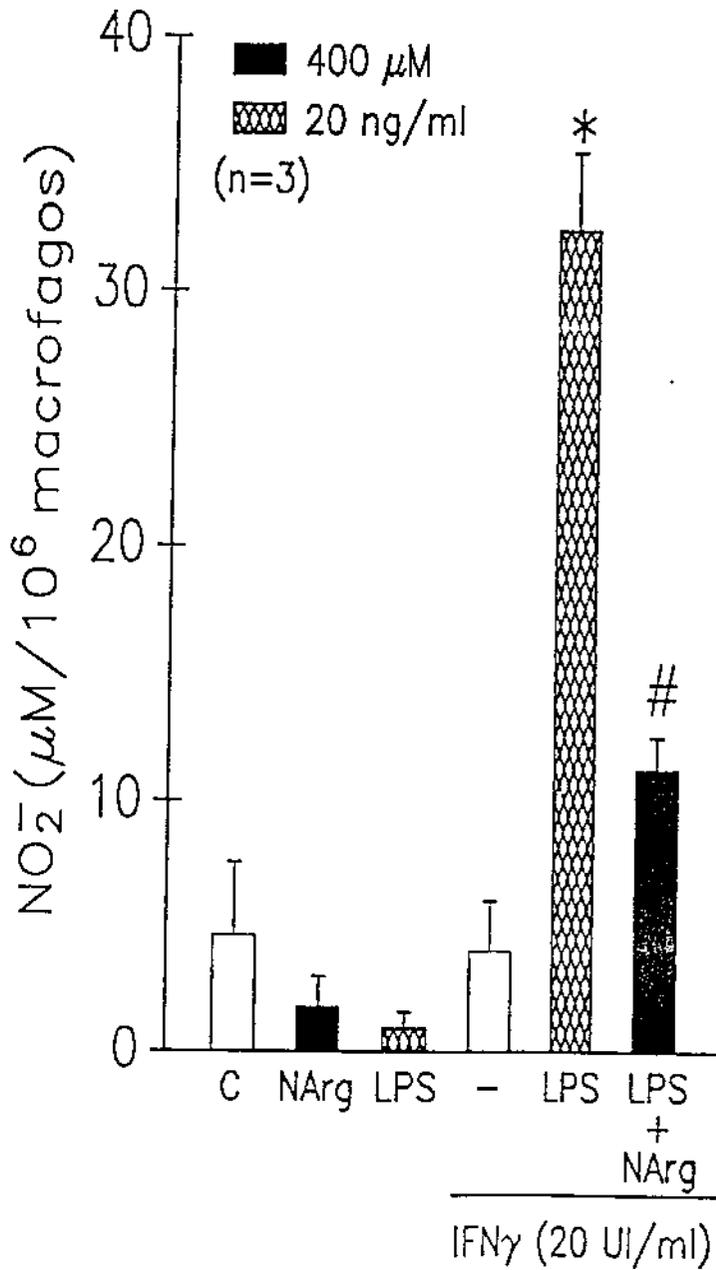


FIGURA 2 - O IFN γ (20 UI/ml) recombinante murino potencia a liberação de NO (μM de $\text{NO}_2^-/1 \times 10^6$ macrófagos), induzida por LPS (20 ng/ml): inibição pelo tratamento das culturas com Nitro-arginina (NArg; 400 μM).

Experimento realizado em triplicata (n=3). Resultados expressos como média \pm EPM. * p < 0,01 em relação ao grupo controle; # p < 0.01 em relação ao grupo LPS + IFN- γ (ANOVA, teste de Duncan).

TABELA 3

IFN- γ RECOMBINANTE HUMANO NÃO POTENCIA A LIBERAÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO POR MACRÓFAGOS MURINOS INDUZIDA POR LPS

Tratamento	Liberação de NO
	($\mu\text{M NO}_2^- / 10^6$ células)
RPMI	1,14 \pm 1,14
LPS (20 ng/ml)	0,93 \pm 0,63
rmuIFN- γ (20 UI/ml)	2,13 \pm 1,40
NArg (400 μM)	1,77 \pm 1,21
rmuIFN- γ (20 UI/ml) + LPS (20 ng/ml)	32,36 \pm 3,05(*)
rmuIFN- γ (20 UI/ml) + LPS (20 ng/ml) + NArg	11,21 \pm 1,28(#)
rhuIFN- γ (20 UI/ml)	1,56 \pm 1,19
rhuIFN- γ (100 UI/ml)	0,16 \pm 0,16
rhuIFN- γ (500 UI/ml)	0,89 \pm 0,44
rhuIFN- γ (20 UI/ml) + LPS (20 ng/ml)	3,73 \pm 1,79
rhuIFN- γ (100 UI/ml) +LPS (20 ng/ml)	1,69 \pm 1,69
rhuIFN- γ (500 UI/ml) +LPS (20 ng/ml)	3,44 \pm 3,44

Os experimentos foram realizados em triplicata (n=3) e os resultados expressos como média \pm EPM. * p < 0,01; em relação ao grupo controle (RPMI); # p < 0,01, em relação ao grupo IFN- γ + LPS (ANOVA e Teste de Duncan)

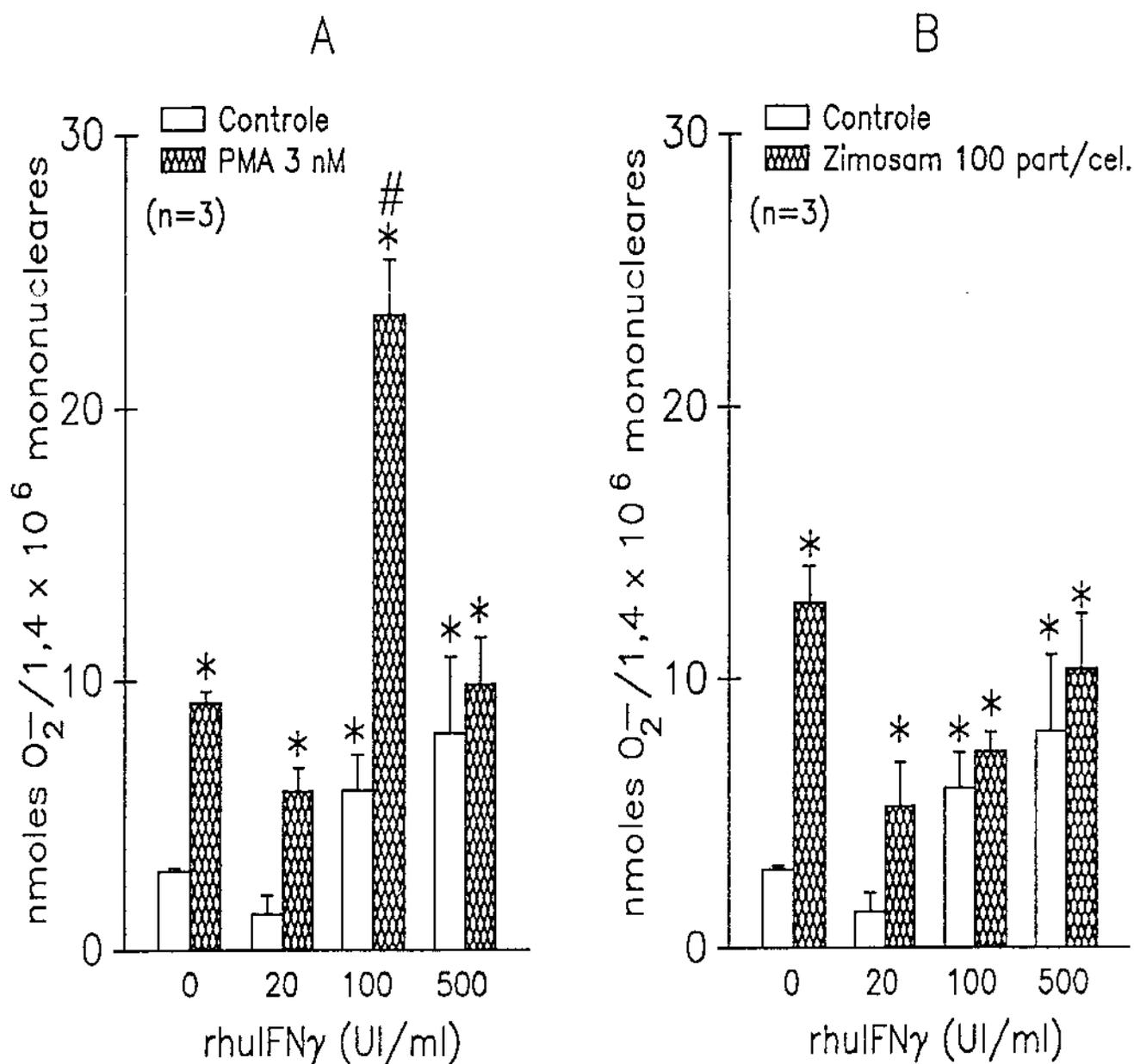


FIGURA 3 - O IFN- γ recombinante humano potencia a liberação de super oxido (nmols $O_2^- / 1,4 \times 10^6$ células mononucleares) induzida por PMA 3 nM (Painel A) mas não aquela induzida por Zimosam (100 partículas/célula) (Painel B). Experimento realizado em duplicata. Resultados como média \pm EPM. n=3; significa células doadas por 3 indivíduos normais. * p < 0,05 em rela o ao grupo incubado apenas com Hank's; # p < 0,01 em rela o ao grupo incubado apenas com PMA (ANOVA e teste de Duncan).

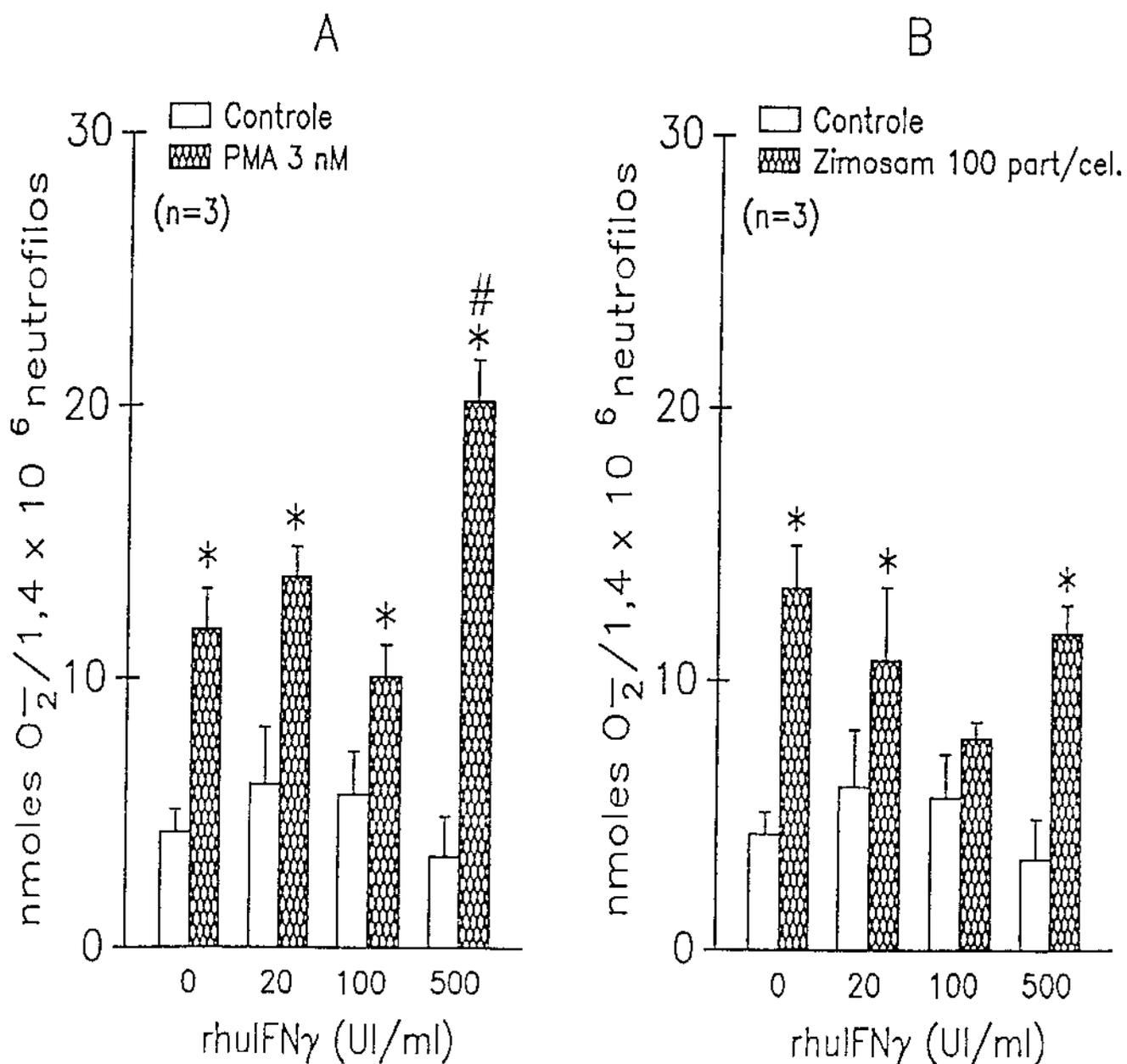


FIGURA 4 - O IFN- γ recombinante humano potencia a liberação de super oxido (nmol $O_2^-/1,4 \times 10^6$ neutr ofilos, induzida por PMA 3 nM (Painel A) mas não aquela induzida por Zimosam (100 partículas/célula) (Painel B). Experimento realizado em duplicata. Resultados como média \pm EPM. n=3; significa células doadas por 3 indivíduos normais. * p < 0,05 em rela o ao grupo incubado apenas com Hank's; # p < 0,05 em rela o ao grupo incubado apenas com PMA (ANOVA e teste de Duncan).

TABELA 4

IFN- γ RECOMBINANTE MURINO NÃO POTENCIA A PRODUÇÃO DE ÂNIONS SUPERÓXIDO (O₂⁻) POR CÉLULAS MONONUCLEARES E NEUTRÓFILOS HUMANOS

Tratamento	Liberação de O ₂ ⁻ (nmoles O ₂ ⁻ / 1.4x10 ⁶ cel.)
Neutrófilos (Hanks)	1,29
Neutrófilos (PMA 3 nM)	5,98
Neutrófilos (Zimosan 100 part./cél.)	9,52
Neutrófilos + rmuIFN γ 500 UI/ml	0,95
Neutrófilos + rmuIFN γ 500 UI/ml + PMA 3 nM	2,86
Neutrófilos + rmuIFN- γ 500 UI/ml + Zimosan 100 part./cél.	10,20
Monócitos (Hanks)	2,45
Monócitos (PMA 3 nM)	4,08
Monócitos (Zimosan 100 part./cél.)	6,12
Monócitos + rmuIFN γ 100 UI/ml	2,58
Monócitos + rmuIFN γ 100 UI/ml + PMA 3 nM	3,13
Monócitos + rmuIFN- γ 100 UI/ml + Zimosan 100 part./cél.	7,34

Experimento único realizado em duplicata. Resultados como média.

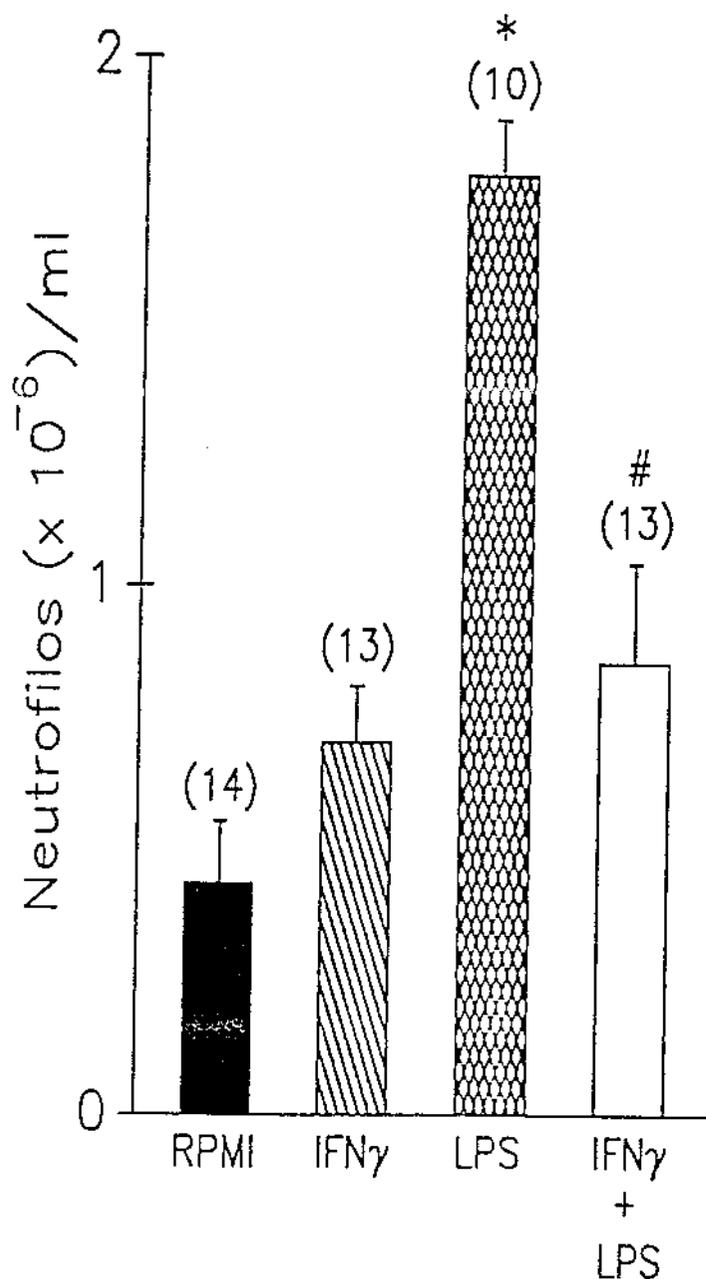


FIGURA 5 - O sobrenadante de macrófagos (4×10^6 células) murinos em cultura, estimulados com LPS ($5 \mu\text{g}/\text{ml}$), mas não com LPS + IFN- γ ($20 \text{ UI}/\text{ml}$) induz migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de camundongos. RPMI, IFN- γ , LPS e IFN- γ + LPS representam os grupos experimentais que receberam $0,5 \text{ ml}/\text{cavidade}$ do respectivo sobrenadante da cultura. Resultados expressos como média \pm EPM. O valor acima das barras representa o número de animais utilizados. * $p < 0,01$, em relação ao grupo RPMI; # $p < 0,01$, em relação ao grupo LPS (ANOVA, teste de Duncan).

TABELA 5

DETECÇÃO DE TNF EM SOBRENADANTES DE CULTURA DE MACRÓFAGOS ESTIMULADOS COM IFN- γ RECOMBINANTE MURINO, LPS ou LPS + IFN- γ

Tratamento	Concentração TNF (ng/ml) _a
RPMI	ND
rmuIFN- γ (20 UI/ml)	3,61
LPS (5 μ g/ml)	3,67
LPS + rmuIFN- γ	12,0

ND: quantidade não detectada; (a): Resultados expressos como média de uma determinação feita em triplicata

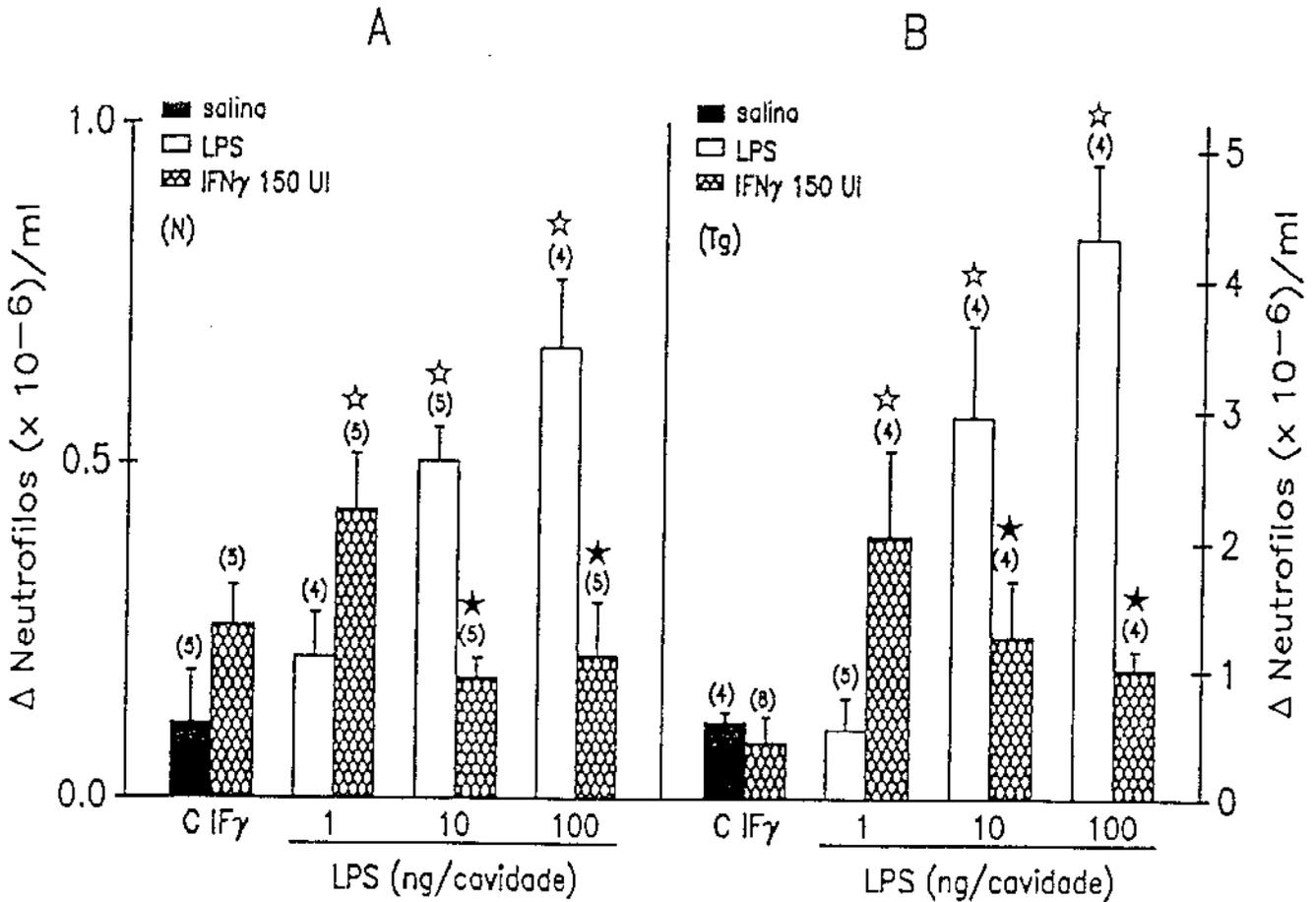


FIGURA 6 - IFN- γ (150 UI/animal) potencia a migração de neutrófilos induzida por 1 ng de LPS mas inibe aquela induzida por doses a partir de 10 ng LPS/cavidade; tanto em animais normais (Painel A) com em animais pré-tratados com tioglicolato 3% (Painel B). A migração foi avaliada 12 horas após a injeção dos estímulos. Os grupos controles receberam 0,5 ml de solução salina 0,9%, estéril. Os valores entre parenteses representam o número de animais utilizados. Resultados expressos como média \pm EPM. $\star p < 0,01$, em relação ao grupo controle (C); $\star p < 0,05$, em relação ao grupo tratado com apenas LPS (ANOVA, teste de Duncan).

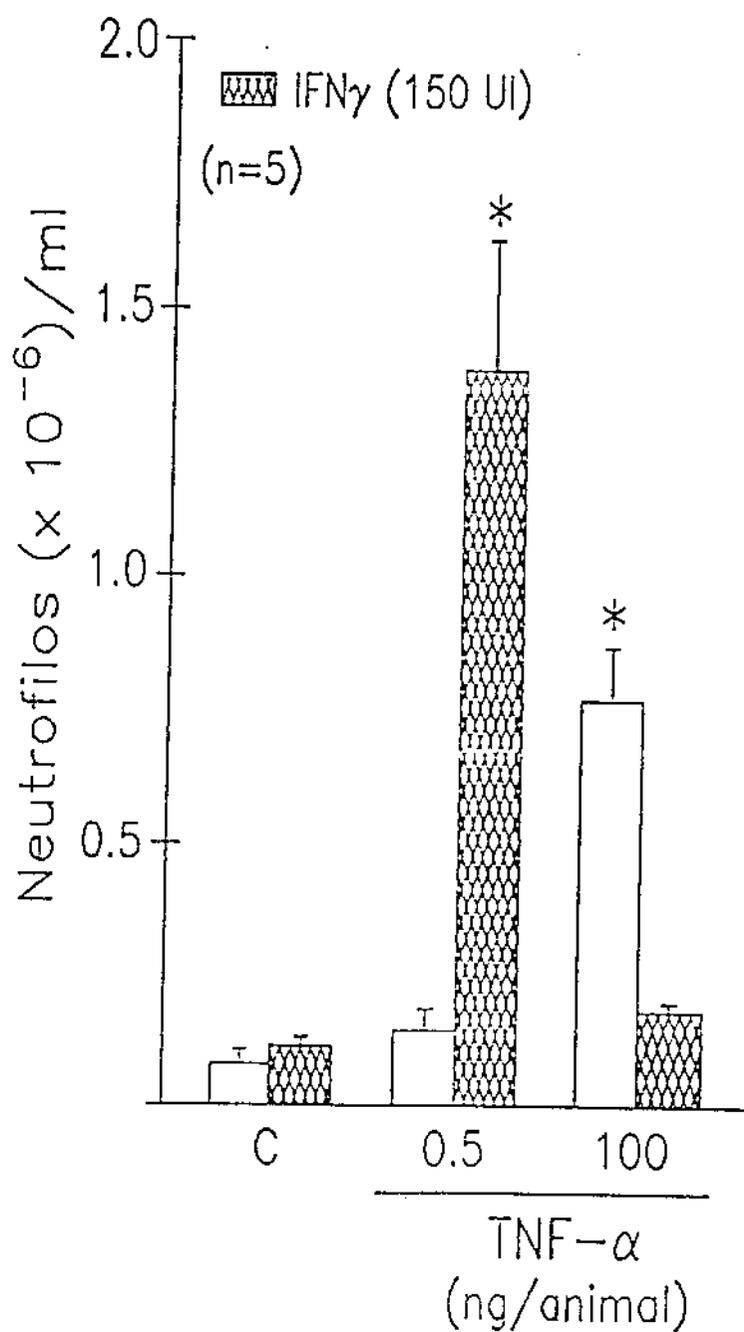


FIGURA 7 - Efeito do muTNF- α e TNF- α + muIFN- γ (150 UI/animal) sobre a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de camundongos.

A migração induzida por TNF- α (0,5 e 100 ng/animal) foi avaliada 12 horas após a injeção do estímulo. Animais controles receberam 0,5 ml de solução salina 0,9%, estéril. Resultados expressos como média \pm EPM.(n=5): número de animais utilizados por grupo. * $p < 0,01$, em relação ao grupo controle (salina); ANOVA e teste de Duncan.

V. DISCUSSÃO

Para que o estudo da migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de camundongos induzida por IFN- γ fosse feito, primeiramente, estabelecemos o modelo experimental utilizando com padrão, o LPS (endotoxina de *E. coli*), reconhecido agente que induz migração de neutrófilos em modelos animais. Inicialmente, foi feito o estudo do curso temporal da migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de camundongos induzida por 200 ng de LPS. O curso temporal mostrou um pico máximo de migração entre 8 e 12 horas. Na 24a. hora ainda se observava a presença de neutrófilos nos exsudatos e 48 horas após a injeção do estímulo, o número dessas células não foi diferente do grupo controle. Este padrão de resposta à endotoxina se mostrou diferente daquele observado em ratos, onde o pico máximo de migração de neutrófilos se define entre 4 e 6 horas e, 24 horas após o número de neutrófilos na cavidade peritoneal não foi diferente daquele presente em animais controle. Diferenças entre estas espécies animais, em relação ao curso temporal de respostas inflamatórias induzidas por estímulos inespecíficos são descritas na literatura (HENRIQUES *et alii*, 1988).

Além do curso temporal, estudamos também, a relação entre a dose de LPS e a resposta migratória de neutrófilos para a cavidade peritoneal. Obtivemos uma curva dose-resposta "em sino", isto é, aumento do efeito com aumento da dose num determinado intervalo (no caso, entre 8 e 200 ng), seguida de redução com doses acima daquela que causou efeito máximo. Este padrão de curva dose-resposta é característico para LPS e é demonstrativo de um fenômeno de auto-inibição (ROCHA & FERREIRA, 1986; CUNHA *et alii*, 1989)

Este efeito pode ser explicado pelo fato de que o LPS, em altas doses, pode tanto causar efeitos locais, induzindo células residentes a secretarem fatores (CUNHA *et alii*, 1989) ou citocinas com atividade inibitória sobre a migração de neutrófilos (CUNHA & TAMASHIRO, 1992), como também pode causar efeitos sistêmicos, incluindo ações diretas sobre neutrófilos circulantes, alterando sua locomoção e/ou interação com células endoteliais (SMITH *et alii*, 1977; ROSENBAUM *et alii*, 1983). O modelo de auto-inibição por injeção de altas doses de LPS tem sido comparado ao que ocorre no choque endotoxêmico (ROCHA & FERREIRA, 1986; CUNHA *et alii*, 1989), pois em casos clínicos de severa bacteremia por bactérias Gram (-), ou endotoxemia, também ocorre

inibição da migração de neutrófilos para o foco inflamatório (TERRITO *et alii*, 1976).

Desta forma, baseando-se nos resultados obtidos com LPS (controle positivo), os experimentos para avaliação do efeito quimiotático para neutrófilos dos IFNs- γ recombinantes foram realizados na 12a. hora após a injeção do estímulo, tempo coincidente com o efeito máximo induzido por LPS na dose de 200 ng/animal.

Os resultados obtidos com o rmuIFN- γ (150-1350 UI/animal) foram negativos, pois esta citocina foi incapaz de induzir migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de camundongos, quando comparada àquela induzida pelo LPS. Estes mesmos resultados também foram observados quando injetamos rhuIFN- γ (150 UI/animal) neste modelo animal, sob as mesmas condições.

Além do estudo sobre a migração de neutrófilos, foi feita, também, a avaliação da migração de monócitos para a cavidade peritoneal de camundongos, após injeção de rmuIFN- γ (150-1350 UI/animal) ou rhuIFN- γ (150 UI/animal). A migração foi avaliada 4 dias após a injeção dos estímulos e comparada àquela induzida por Tioglicolato 3% (controle positivo), um estímulo que induz intensa migração de células mononucleares, fundamentalmente monócitos/macrófagos. Os resultados foram igualmente negativos. Por si só, os resultados revelam que não houve contaminação por endotoxina nos lotes de IFNs- γ , possibilidade que deve sempre ser lembrada quando se trata de obtenção de citocinas por tecnologia recombinante.

A argumentação de que a ausência de efeito sobre a migração de leucócitos, *in vivo*, fosse devida ao fato de que estas citocinas, por alguma razão estariam sem atividade, não encontra respaldo nos resultados aqui apresentados.

Quatro demonstrações dão suporte ao à idéia de que os lotes de IFNs- γ estavam ativos e manipulados de forma correta: 1) o rhuIFN- γ , por si só, induziu uma liberação dose-dependente de ânions superóxido por células mononucleares humanas, em cultura. Além disso, potenciou a liberação dessa espécie reativa de oxigênio por células mononucleares e neutrófilos humanos estimulados com PMA, mas não alterou aquela induzida por Zimosam; 2) essa citocina foi capaz de potencializar a liberação de TNF- α por macrófagos murinos em cultura estimulados por LPS; 3) o rmuIFN- γ foi capaz de, *in vitro*, potencializar a liberação de óxido nítrico (NO) induzida por LPS, em macrófagos murinos provenientes de cavidades peritoneais pré-estimuladas com Tioglicolato 3%. O fenômeno foi inibido pela Nitro-arginina, um inibidor da óxido-nítrico sintase (NO-sintase; MONCADA *et alii*,

1991) e 4) o $\text{rmuIFN-}\gamma$ foi ativo também, *in vivo*, pois sua administração, i.p., conjunta com LPS ou $\text{TNF-}\alpha$ foi capaz de potencializar ou inibir a migração de neutrófilos induzida por esses estímulos.

Os nossos resultados mostraram que o $\text{IFN-}\gamma$ (tanto de origem murina quanto humana) não causou migração de neutrófilos ou monócitos, *in vivo*. Estes resultados confirmaram as observações de CANONO *et alii* (1989), que demonstraram que o $\text{IFN-}\gamma$ murino em doses que variaram de 50-5000 UI/ml não foi capaz de induzir migração de neutrófilos ou monócitos para a cavidade peritoneal de camundongos. Por outro lado, contrastaram com os de RIBEIRO *et alii* (1990). Esses autores mostraram que o $\text{IFN-}\gamma$ humano purificado ou recombinante era capaz de induzir migração de neutrófilos, em ratos. Esta contradição não é facilmente compreendida. Uma explicação possível seria o uso de diferentes modelos animais em um trabalho e no outro. Entretanto, utilizando-se $\text{rmuIFN-}\gamma$ e $\text{rhIFN-}\gamma$ como estímulos inflamatórios, em ratos, não fomos capazes de reproduzir os resultados obtidos por aqueles autores, ainda que, utilizando o mesmo lote de $\text{IFN-}\gamma$ humano. Uma outra hipótese que pode ser considerada para explicar os resultados positivos encontrados por Ribeiro e colaboradores, seria a possibilidade de contaminação das amostras de $\text{IFN-}\gamma$ por eles utilizadas, não detectada pelos ensaios de controle.

BARKER *et alii* (1991) demonstraram que o $\text{IFN-}\gamma$ foi capaz de ativar queratinócitos a sintetizarem e liberarem um fator quimiotático para monócitos, (MCAF), *in vitro*. Essa demonstração é de particular interesse por duas razões: 1) amplia a evidência de que queratinócitos não possuem apenas uma função estrutural, de barreira contra agentes lesivos, mas que são capazes de secretar citocinas e, portanto, desempenhar um papel destacado em processos inflamatórios da pele, atuando como células de alarme; e principalmente 2) mostra que o $\text{IFN-}\gamma$ pode atuar no fenômeno de migração de leucócitos indiretamente, como um modulador da atividade migratória dessas células para o foco inflamatório, possivelmente alterando o padrão de secreção de mediadores quimiotáticos em termos qualitativos, quantitativos ou de sequência temporal.

Até onde verificamos, a hipótese de que o $\text{IFN-}\gamma$ tem um papel modulador sobre a migração de leucócitos, em reações inflamatórias agudas de caráter não imune, está baseada em experimentos realizados *in vitro*. Nessa linha, recentemente ISSEKUTZ & LOPES (1993) demonstraram que a migração de neutrófilos através de uma monocamada de células endoteliais derivadas de veia umbilical humana, em resposta à estimulação por LPS ou $\text{TNF-}\alpha$, só era possível

umbilical humana, em resposta à estimulação por LPS ou TNF- α , só era possível de ser sustentada na presença de IFN- γ . Isoladamente, os estímulos causavam uma migração de neutrófilos inicial, mas que, algumas poucas horas após, desaparecia. Dessa forma, foi proposto que os estímulos quimiotáticos eram capazes de desencadear uma resposta migratória inicial mas a manutenção dessa atividade dependia da presença de IFN- γ , que aumentaria nas células endoteliais a expressão de moléculas de adesão, tais como E-selectina e ICAM-1.

O nosso trabalho constitui-se em uma das poucas evidências desse papel modulador do IFN- γ sobre a migração de neutrófilos, *in vivo*.

Como ressaltado acima, a administração simultânea de rmuIFN- γ foi capaz de, dependendo da dose de LPS ou TNF- α utilizada, potenciar ou inibir a migração de neutrófilos induzida por esses estímulos, para a cavidade peritoneal de camundongos. Assim, o TNF- α ou LPS, em doses (0,5 e 1 ng/animal, respectivamente) que não causavam qualquer efeito ou induziam uma migração de neutrófilos muito discreta, tiveram suas atividades aumentadas quando administrados conjuntamente com rmuIFN- γ . Por outro lado, doses de moderadas a elevadas de TNF- α (100 ng/animal) ou LPS (10 e 100 ng/animal) apresentaram um efeito bastante reduzido pela administração simultânea com 150 UI de rmuIFN- γ .

A amplificação da resposta migratória de neutrófilos induzida por LPS ou TNF- α pode ser explicada assumindo-se que esses estímulos, em baixas doses, apresentaram um efeito sinérgico com IFN- γ e, dessa forma, a indução da liberação de mediadores quimiotáticos para neutrófilos, por células peritoneais residentes estaria potenciada. Esta hipótese foi reforçada por duas observações: 1) o efeito potenciador da associação IFN- γ e LPS foi maior em animais pré-tratados com Tioglicolato 3%, situação na qual não há somente um aumento no número mas também, uma eliciação/ativação dos macrófagos residentes (RIBEIRO *et alii*, 1991) e 2) em macrófagos em cultura, o IFN- γ potenciou (cerca de 3,5 vezes) a liberação de TNF- α induzida por LPS, quando comparada com aquela causada pela estimulação com a endotoxina isoladamente.

Vários trabalhos tem demonstrado que o TNF- α é capaz de induzir migração de neutrófilos (BEUTLER & CERAMI, 1988; FACCIOLI *et alii*, 1990; CUNHA & TAMASHIRO, 1992). Outras citocinas, tais como IL-1 (FACCIOLI *et alii*, 1990) e IL-8 (RIBEIRO *et alii*, 1991) ou mediadores lipídicos, como LTB₄ (RANKIM *et alii*, 1990) e o PAF (KUIJPERS *et alii*, 1992), liberados por macrófagos estimulados são também capazes de induzir migração de neutrófilos,

células de alarme e são capazes de secretar vários mediadores quimiotáticos para neutrófilos, reforçando a hipótese de que o recrutamento de células para o foco da lesão é um fenômeno multimediado (FERREIRA, 1980).

Entretanto, tem sido demonstrado que o TNF- α em altas doses ou quando administrado endovenosamente inibe a migração de neutrófilos, sendo essa uma das possibilidades levantadas para explicar a incapacidade de migração dessas células para o foco inflamatório, nos casos de choque endotoxêmico (CUNHA & TAMASHIRO, 1992), situação na qual os níveis plasmáticos de TNF- α estão bastante elevados (BEUTLER & CERAMI, 1988). Além do TNF- α , tem sido demonstrado que a IL-8 inibe, *in vitro*, a adesão de neutrófilos a células endoteliais (GIMBRONE *et alii*, 1989) e a migração de neutrófilos induzida por FMLP e, *in vivo*, quando injetada endovenosamente em ratos (CUNHA & TAMASHIRO, 1992) ou coelhos (HECHTMAN *et alii*, 1991), reduz a migração de neutrófilos para o foco inflamatório. O TNF- α também foi capaz de inibir *in vivo* e *in vitro* a migração de neutrófilos (CUNHA & TAMASHIRO, 1992).

Dessa forma, a redução da migração de neutrófilos observada com a administração conjunta de rmuIFN- γ com doses mais elevadas de LPS ou TNF- α pode ser explicada admitindo-se que uma maior concentração de mediadores inflamatórios são formados no peritônio. Assim, seriam atingidos níveis sistêmicos suficientes para inibir o processo. Essa hipótese é corroborada pela demonstração no presente trabalho de que o rmuIFN- γ , *in vitro*, potenciou a liberação de TNF- α por macrófagos murinos estimulados por LPS. Por outro lado, os mecanismos envolvidos nessa inibição por TNF- α e IL-8 não estão bem elucidados.

A passagem dos neutrófilos através do endotélio, em direção ao foco da lesão, envolve uma série de etapas complexas e a alteração de qualquer uma dessas pode, potencialmente, afetar o processo como um todo. Assim, altas doses dos fatores quimiotáticos poderiam afetar uma das seguintes etapas essenciais para a migração de neutrófilos, descritas por KARTORI *et alii* (1990): 1) o deslizamento ("rolling") dos neutrófilos sobre as células endoteliais, 2) a adesão ao endotélio, 3) a passagem pelas junções inter-endoteliais, 4) a permanência entre as células endoteliais e os pericitos e 5) a digestão proteolítica da membrana basal, por enzimas lisossomais.

Uma outra possibilidade a ser considerada é que a associação rmuIFN- γ e LPS ou TNF- α , dependendo da dose do estímulo inflamatório, pode potencializar

a produção de fatores inibitórios do recrutamento de neutrófilos, por macrófagos residentes. Recentemente, alguns autores demonstraram que macrófagos peritoneais de ratos estimulados com LPS secretam, no meio de cultura, um fator (denominado NRIF) capaz de bloquear a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de ratos induzida por vários estímulos inflamatórios, quando administrados endovenosamente (CUNHA *et alii*, 1989; TAVARES *et alii*, 1989; TAMASHIRO *et alii*, 1992). O NRIF foi parcialmente caracterizado como uma proteína de alto peso molecular, eluída numa fração, por cromatografia em gel Sephacryl 300, correspondente a pesos moleculares entre 240 e 550 kDaltons (TAMASHIRO *et alii*, 1992).

Concordando com esta hipótese, demonstramos que o sobrenadante de macrófagos estimulados com $\text{rmulFN-}\gamma$ + LPS e injetado na cavidade peritoneal de camundongos, induziu uma migração de neutrófilos cerca de 50% menor que aquela causada pela injeção do sobrenadante de macrófagos estimulados apenas com LPS, sugerindo a possibilidade da presença de um(s) fator(es) inibitório(s). Assim, a inibição da migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de camundongos, observada após a administração conjunta de doses elevadas de LPS ou $\text{TNF-}\alpha$ e $\text{rmulFN-}\gamma$, possivelmente envolve a potenciação da produção de mediadores quimiotáticos que atuam de maneira sinérgica com os fatores inibitórios liberados por macrófagos residentes. No entanto, é plausível supor que apenas o aumento da concentração de uma mesma citocina (por exemplo, $\text{TNF-}\alpha$) possa explicar adequadamente a inibição, sem a sugestão da existência de um fator inibitório. Não são raros os achados na literatura, onde uma mesma citocina apresenta efeitos opostos dependendo da concentração e do local de ação (BILLIAU & VANDEKERCKHOVE, 1990).

Com base nos resultados aqui apresentados e em vários dados de literatura, podemos sugerir que o $\text{IFN-}\gamma$ não deve estar participando das fases iniciais do processo de migração de neutrófilos para o foco inflamatório. Acreditamos que, antes de ser caracterizado como um mediador de alarme, o $\text{IFN-}\gamma$ atuaria em fases mais tardias, modulando a intensidade da migração de neutrófilos induzida por substâncias quimiotáticas. Essa hipótese se baseia nos seguintes princípios: 1) a análise do curso temporal da liberação de citocinas quimiotáticas para neutrófilos, tais como $\text{TNF-}\alpha$, IL-1 ou IL-8, mostra que são, em geral, liberadas mais precocemente, atingindo para a maioria delas, um pico de concentração nas primeiras oito horas. A maioria destas citocinas são de origem macrófagica (BAUMANN & GAULDIE, 1994), a célula mononuclear residente

predominante na cavidade peritoneal, o IFN- γ é, fundamentalmente de origem linfocitária (STREET & MOSMANN, 1991); 2) embora já aos 30 minutos sejam detectáveis níveis de mRNA para IFN- γ em linfócitos T, níveis máximos são obtidos entre 18-20 horas após o estímulo (YOUNG & HARDY, 1990). No entanto, essa produção é dependente do estímulo utilizado. Estímulos inflamatórios inespecíficos, como o LPS, por si só, não causam liberação de IFN- γ (ANDERSSON *et alii*, 1992); 3) a maioria das citocinas da resposta de alarme são importantes para o desencadeamento do processo e, dependendo da natureza e persistência do estímulo, propiciam os macrófagos passarem do estado elicitado para ativado que agora expressam antígenos MHC classe II, podendo então estimular linfócitos T a produzir IFN- γ ; 4) a expressão de antígenos MHC classe II é, entre os processos de ativação de macrófagos dependente de IFN- γ , o de maior latência para o seu aparecimento (STEIMLE *et alii*, 1994). Assim, o IFN- γ estaria participando do processo de ativação de macrófagos numa fase mais tardia e dependendo da extensão desta ativação e da estimulação de linfócitos T, a reação deixaria de ser de caráter não-imune.

Em resumo, poderia se propor que em casos de estímulos leves ou moderados ocorreria uma liberação de fatores quimiotáticos de origem macrófágica, que se manteria elevada por poucas horas,. Por outro lado, se o estímulo inflamatório inicial fosse de intensidade e natureza tal para promover uma liberação mais acentuada de mediadores/citocinas quimiotáticas por macrófagos, o resultado seria o desencadeamento de uma migração de neutrófilos mais intensa e duradoura. Se os níveis de quimioatraentes estiverem reduzidos, em fase mais tardias, na presença de IFN- γ , ocorreria potenciação da atividade migratória de neutrófilos, mantendo a reação inflamatória aguda por um período mais longo. Se nesse momento, houvesse uma considerável intersecção entre as curvas temporais de citocinas quimiotáticas para neutrófilos e IFN- γ , a associação resultaria em uma inibição do processo de migração celular, prevenindo um colapso do sistema. Pode-se especular ainda que a cronificação/agudização de um processo inflamatório de natureza imune, poderia ser entendida como ciclos de inibição/potenciação da migração de neutrófilos dependente da liberação de IFN- γ .

CELADA *et alii* (1984) demonstraram que IFN- γ murino era capaz de se ligar a receptores específicos e induzir *in vitro* a ativação de macrófagos murinos e monócitos humanos, porém com células humanas houve a necessidade de um tempo maior (cerca de 12 vezes) de exposição à citocina, para obtenção do

mesmo efeito. No entanto, IFN- γ murino não foi capaz de se ligar aos receptores de macrófagos de hamster, cobaias e ratos e assim ativar essas células. Este fato, juntamente com a opinião de outros autores (PANEM, 1984), sugeria que o IFN- γ seria uma citocina com baixo grau de espécie-especificidade. Entretanto, hoje parece não restar dúvidas de que o IFN- γ é espécie-específico (GROSSBERG *et alii*, 1989). Recentemente, STEIMLE *et alii* (1994) demonstraram que a indução de genes do sistema MHC Classe II era caracterizada por um período longo de tempo para sua expressão, totalmente dependente da síntese *de novo* de proteínas e que necessitava de um transativador gênico (CIITA), cuja expressão era totalmente controlada e induzida por IFN- γ , de maneira espécie-específica. Os autores demonstraram que o CIITA atua como um regulador, também sobre aqueles genes MHC Classe II, expressos constitutivamente numa minoria de tipos celulares. Os nossos resultados concordam com esta última idéia.

Como um dos objetivos do presente trabalho foi a verificação da espécie-especificidade em relação aos efeitos do IFN- γ , testamos *in vitro*, a capacidade desta citocina tanto de origem humana quanto murina em ativar dois sistemas biológicos para atividade citotóxica: produção de ânions superóxido por células mononucleares e neutrófilos humanos e liberação de NO por macrófagos murinos.

Observamos que rmIFN- γ potenciou a liberação de NO por macrófagos murinos estimulados com LPS. Porém, o rhIFN- γ não foi capaz de apresentar tal efeito. Já o rhIFN- γ potenciou a liberação de ânions superóxido por células mononucleares e neutrófilos humanos induzida por PMA, sendo que nesse sistema o rmIFN- γ foi incapaz de produzir resposta semelhante.

Tanto a liberação de NO quanto a ativação do "burst" respiratório com consequente liberação de ânions superóxido fazem parte dos mecanismos de defesa do organismo pelos quais as células fagocíticas desempenham suas atividades citotóxicas (KOWANKO & FERRANTE, 1987; GREEN *et alii*, 1991; CONDINO-NETO *et alii*, 1993).

Nesse sentido inúmeros trabalhos descritos na literatura mostram que IFN- γ é um potente ativador de macrófagos para estes efeitos. Porém, quanto à liberação de NO, já é conhecida a necessidade de uma sequência definida de estimulação dessas células para que ocorra a síntese de NO; e que esta sequência requer a presença de IFN- γ como um primeiro sinal, seguido da estimulação por um segundo sinal, LPS por exemplo (LORSBACH & RUSSEL,

1992).

No presente trabalho, demonstramos um papel importante do IFN- γ sobre a produção de ânions superóxido por células humanas, onde esta citocina, isoladamente foi capaz de induzir liberação desses ânions de maneira dose-dependente (20-500 UI/ml) por células mononucleares e ainda potencializar a liberação desses ânions tanto por essas células quanto por neutrófilos, quando estimulados por PMA.

Estes resultados reforçam os encontrados por KOWANKO & FERRANTE (1987), onde esses autores demonstraram que IFN- γ humano potencializou a liberação de H₂O₂ por neutrófilos humanos estimulados com PMA, de maneira dose-dependente.

CASSATELA *et alii* (1985) observaram um aumento na produção de ânions superóxido por macrófagos humanos em resposta ao IFN- γ recombinante humano, na ausência de outros estímulos. Em contraste, STEINBECK *et alii* (1986) não reproduziram esses efeitos do IFN- γ sobre o "burst" respiratório em neutrófilos bovinos.

O mecanismo pelo qual a produção de ânions superóxido pelo PMA na presença do IFN- γ é potencializada, ser devido à ação desta citocina sobre a proteína quinase C, já que induz diretamente a ativação desta enzima (ADAMS & HAMILTON, 1984). Sabendo-se que o PMA também exerce seu efeito através da proteína quinase C (KOWANKO & FERRANTE, 1987) sugere-se a existência de uma ação sinérgica com esta associação.

Quando o estímulo utilizado foi o Zimosam (100 part/célula), o IFN- γ não foi capaz de potencializar a produção de ânions superóxido. Esses resultados indicavam a possibilidade do efeito não ter sido observado devido ao número elevado de partículas de Zimosam/célula empregado no ensaio e dessa forma, permitindo o colapso das células que se auto destruíam, na tentativa de fagocitar tantas partículas. No entanto, ao trabalharmos com quantidades variáveis de partículas/célula (5-100 part/célula) os mesmos resultados foram obtidos, indicando que o efeito da não potenciação não deve estar relacionado ao número de partículas/célula (dados não mostrados). Como não fizemos o controle de partículas ingeridas e o Zimosam por nós utilizado não estava opsonizado, não podemos afirmar que este estímulo não seja eficiente na ativação dos leucócitos humanos.

Quanto ao fato do IFN- γ não induzir respostas semelhantes em espécies distintas, talvez possa ser explicado pela falta de ligação desta citocina

com seus receptores específicos ou então essa ligação poderia até estar ocorrendo, porém; não desencadeariam uma resposta (BILLIAU & DIJKMANS, 1990). Contudo, os experimentos realizados por CELADA *et alii* (1984) mostraram que $rmuIFN-\gamma$ foi capaz de inibir a ligação do $rhulIFN-\gamma$ aos receptores das células mononucleares humanas. Esses dados suportam a idéia de que entre essas espécies possa haver a ligação do $IFN-\gamma$ aos receptores, porém essa ligação não implica em desencadeamento de uma resposta (atividade intrínseca), sendo assim, o $IFN-\gamma$ agiria como um antagonista em espécies distintas.

Surpreendentemente, resultados preliminares por nós obtidos mostraram que, ao contrário, a associação $rhulIFN-\gamma$ potenciou, de forma dependente da dose de $IFN\gamma$ humano utilizada, a liberação de NO por macrófagos murinos estimulados por $rmuIFN-\gamma$ (dados não mostrados). Duas possibilidades devem ser consideradas: 1) embora o $rhulIFN-\gamma$ não desencadeie plenamente (efetivamente) uma resposta, a ocupação do receptor ou sítios ligantes envolvidos com o mecanismo acoplamento-excitação-transdução pode "sensibilizar" a célula a desencadear uma resposta mais efetiva quando da estimulação do receptor pelo ligante específico, no caso o $rmuIFN-\gamma$; ou 2) o que nos parece mais razoável, o $rhulIFN-\gamma$ estaria se ligando a sítios de ligação inespecíficos, aumentando a probabilidade de ligação do $rmuIFN-\gamma$ ao receptor (aumentando o "binding" específico do $rmuIFN-\gamma$).

Em conclusão, nossos resultados mostram que $IFN-\gamma$ não é quimiotático para neutrófilos ou monócitos, e que seus efeitos espécie-específicos.

O $IFN-\gamma$ possui uma importante função moduladora sobre as atividades citotóxica e liberadora de citocinas e/ou fatores quimiotáticos por macrófagos e não deve estar participando das etapas iniciais do processo inflamatório e sim da manutenção do mesmo.

SUMMARY

This thesis describes the effects of IFN- γ on the migration of monocytes and neutrophils into the peritoneal cavity of mice and also examines the species specificity of the *in vitro* actions of human and murine recombinant IFN- γ (rhulFN- γ and rmulFN- γ , respectively). In addition, the effects of IFN- γ on the chemotactic activity of *E. coli* lipopolysaccharide (LPS)-induced neutrophils *in vivo* and on the release of chemotactic factors for these cells by peritoneal macrophages stimulated with LPS *in vitro* are also examined.

Neither rmulFN- γ (150-1350 IU/animal) or rhulFN- γ (150 IU/animal) were able to induce monocyte or neutrophil migration into the peritoneal cavity of mice when compared with the response caused by LPS (200 ng/animal) and 3% thioglycollate (1,5 ml/animal) 12 and 96 h after injection, respectively. Both recombinant IFN- γ were also unable to stimulate cell migration in rats.

The simultaneous stimulation of murine peritoneal macrophages *in vitro* with rmulFN- γ and LPS caused the release of NO₂⁻ (30 μ M) which could be almost totally inhibited by nitroargininr (NARG, 500 μ M). When rhulFN- γ was replaced with rmulFN- γ in the above experiments, no formation of NO₂⁻ was detected even at interferon doses of up to 500 IU/ml.

The exposure of human monocytes, but not neutrophils, to rhulFN- γ (20-500 IU/ml) resulted in a dose-dependent release of superoxide anions. Furthermore, in both monocytes and neutrophils, the formation of superoxide anions in the presence of phorbol myristic acid (PMA, 3nM), but not zymosan, was potentiated by rhulFN- γ . In contrast to these results, rmulFN- γ was unable to stimulate superoxide anion formation in these cells and was also unable to potentiate the release in the presence of PMA or zymosam.

Upon stimulation with LPS (5 μ g/ml), macrophages in culture released a factor which induced the migration of neutrophils when injected into the peritoneal cavity of mice. This migration was inhibited by approximately 50% when the macrophages were co-stimulated with rmulFN- γ and LPS.

The levels of TNF- α in the culture medium of murine macrophages stimulated with either LPS (5 μ g/ml) or rmulFN- γ (20 IU/ml) were very similar (3,67 vs 3,61 ng TNF/ml, respectively) but were about 3,5 fold lower than the levels observed in macrophages stimulated with LPS and IFN- γ (12 ng TNF/ml).

Depending on the dose of LPS or TNF, the simultaneous administration

of $\text{rmlIFN-}\gamma$ (150 IU/animal) either potentiated or inhibited the migration of neutrophils into the mouse peritoneal cavity induced by these agents; potentiation occurred at LPS and TNF doses of 1 ng and 0,5 ng/animal, respectively, while inhibition was observed at LPS and TNF doses of 10-100 ng and 100 ng/animal, respectively.

These results demonstrate that $\text{IFN-}\gamma$ is not chemotactic for monocytes and neutrophils and that its effects are species-specific. Furthermore, $\text{IFN-}\gamma$ has an important modulatory influence on the cytotoxic and mediator-releasing activities of cytokines and/or of the chemotactic factors liberated by macrophages. $\text{IFN-}\gamma$ therefore seems to have a minimal role in the initial stages of the inflammatory reaction but is important in maintaining this process.

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, D.O. & HAMILTON, T.A. The cell biology of macrophage activation. **Annu.Rev. Immunol.**, **2**: 282-289, 1984.
- AKIRA, S.; HIRANO, T.; TAGA, T.; KISHIMOTO, T.. Biology of multifunctional cytokines: IL-6 and related molecules (IL-1 and TNF). **FASEB J.**, **4**: 2860-2867, 1990.
- ALTMAN, L.C.. Chemotactic lymphokines: A review. In: *Leukocyte Chemotaxis*, pp. 267-287 (Galli, J.C. and Quie, P.G., Eds.) New York Raven Press, 1978.
- ANDERSSON, J.; NAGGY, S.; BJORK, L.; ABRAMS, J.; HOLM, S. & ANDERSSON, U. Bacterial toxin-induced cytokine production studied at the single-cell level. **Immunol. Rev.**, **127**: 69-96, 1992.
- ASSREUY, J.; CUNHA, F.Q.; EPPERLEIN, M.; NORONHA-DUTRA, A.; O'DONNELL, C.; LIEW, F.Y. & MONCADA, S.. Production of nitric oxide and superoxide by activated macrophages and killing of *Leishmania major*. **Eur. J. Immunol.**, **24**: 672-676, 1994.
- BARKER, J.N.W.N.; JONES, M.L.; SWENSON, C.L.; SARMA, V.; MITRA, R.S.; WARD, P.A.; JOHNSON, K.J.; FANTONE, J.C.; DIXIT, V.M. & NICKOLOFF, B.J. Monocyte chemotaxis and activating factor production by keratinocytes in response to IFN- γ . **J. Immunol.**, **146**: 1192-1197, 1991.
- BAUMANN, H. & GAULDIE, J.. The acute phase response. **Immunol. Today**, **15**(2): 74-80, 1994.
- BENJAMIN, W.R.; STEEG, P.S. & FARRAR, J.J.. Production of immune interferon by an interleukin-2 independent murine T cell line. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **79**: 5379, 1982.
- BEUTLER, B. & CERAMI, A.. Cachectin: more than a tumor necrosis factor. **N. Engl. J. Med.**, **316**(7): 379-381, 1987.
- BEUTLER, B. & CERAMI, A.. Tumor necrosis factor, cachexia, shock and inflammation: a common mediator. **Annu. Rev. Biochem.**, **57**: 505-508, 1988.
- BILLIAU, A & DIJKMANS, R.. IFN- γ : Mechanism of action and therapeutic potential. **Biochem. Pharmacol.**, **40**(7): 1433-1439, 1990.

- BILLIAU, A. & VANDEKERCKHOVE, F.. Cytokines and their interactions with other inflammatory mediators in the pathogenesis of sepsis and septic shock. **Eur. J. Clin. Invest.**, 21: 559-573, 1990.
- CANONO, B.; MIDDLETON, M.H. & CAMPBELL, P. Recombinant mouse IFN gamma is not chemotactic for macrophages or neutrophils. **J. Interferon Res.**, 9(1): 79-86, 1989.
- CASSATELLA, M.A.; DELLA BIANCA, V.; BERTON, G. & ROSSI, F. Activation by gamma-interferon of human macrophage capability to produce toxic oxygen molecules is accompanied by decreased Km of the superoxide-generating NADPH oxidase. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 132: 908-914, 1985.
- CELADA, A.; GRAY, P.W.; RINDERKNECHT, E. & SCHREIBER, R.. Evidence for a gamma-interferon receptors that regulates macrophage tumoricidal activity. **J. Exp. Med.**, 168: 55-74, 1984.
- CHANG, T.W.; TESTE, D.; KUNG, P.C.; PERRY, L.; DRESKIN, H.J. & GOLDSTEIN, G.. Cellular origin and interactions involved in gamma interferon production induced by OKT3 monoclonal antibody. **J. Immunol.**, 128: 585, 1982.
- CLEMENS, M.. Interferons and oncogenes. **Nature**, 313: 581, 1985.
- COLLART, M.A.; BELIN, D.; VASSALI, J.D.; DE-KOSSODO, S. & VASSALI, P. Interferon enhances macrophage transcription of tumor necrosis factor/cachectin, interleukin-1 and urokinase gene which are controlled by short lived repressors. **J. Exp. Med.**, 164: 2113-2118, 1986.
- CONDINO-NETO, A.; MUSCARÁ, M.N.; GRUMACH, A.S.; CARNEIRO-SAMPAIO, M.M.S. & DE NUCCI, G. Neutrophils and mononuclear cells from patients with chronic granulomatous disease release nitric oxide. **Br. J. Clin. Pharmacol.**, 36: 485-490, 1993.
- CONDINO-NETO, A. Radicais livres e o sistema imunológico. **Rev. Bras. Alerg. Immunopatol.**, 16(5): 168-173, 1993.
- CUNHA, F.Q., SOUZA, G.E.P., SOUZA, C.A.M.; CERQUEIRA, B.C.S. & FERREIRA, S.H. *In vivo* blockage of neutrophil migration by LPS is mimicked by a factor released from LPS-stimulated macrophages. **Br. J. Exp. Pathol.**, 70: 1-8, 1989.
- CUNHA, F.Q. & TAMASHIRO, W.M.S.C.. Tumor necrosis factor-alpha and interleukin-8 inhibit neutrophil migration *in vivo* and *in vitro*. **Mediators of Inflammation**, 1: 397-401, 1992.

- CUNHA, F.Q.; MONCADA, S. & LIEW, F.Y.. IL-10 inhibits the induction of nitric oxide synthase by interferon-gamma in murine macrophages. **Biochem. Biophys Res. Commun.**, **182**: 1155-1159, 1992.
- DINARELLO, C.A.; CANNON, J.G. & WOLFF, S. News concepts on the pathogenesis of fever. **Rev. Infect. Dis.**, **10(1)**: 168-189, 1988.
- DINARELLO, C.A.; CANNON, J.G. MANCILLA, J. BISHAI, I. LEES, J. & COCEANI, F. Interleukin-6 as an endogenous pyrogen: induction of prostaglandin E₂ in brain but not in peripheral blood mononuclear cells. **Brain Res.**, **562**: 199-206, 1991.
- DINARELLO, C.A.. Modalities for reducing Interleukin-1 activity in disease. **TIPS**, **14(5)**: 155-159, 1993.
- DING, A.H.; NATHAN C.F. & STUEHR, D.J.. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. **J. Immunol.**, **141**: 2407-2412, 1988.
- DING, A.H.; NATHAN, C.F.; GRAYCAR, J.; DERYNCK, R.; STUEHR, D.J. SRIMAL, S.. Macrophage deactivating factor and transforming growth factors- β 1, β 2 and β 3 inhibit induction of macrophage nitrogen oxide synthesis by IFN- γ . **J. Immunol.**, **145**: 940-944, 1990.
- DORFMAN, L.M. & ADAMS, G.E. Reactivity of hydroxyl radical in aqueous solutions. United States Department of Commerce, National Bureau of Standards, N. **SRDS. NBS.**, **46**, 1973.
- DUNCAN, D.B. Multiple range and multiple F tests. **Biometrics**, **11**:1-42, 1955.
- EPSTEIN, L.B.. IFN-gamma, success, structure and speculation. **Nature**, **295**: 453, 1982.
- FACCIOLI, L.H.; SOUZA, G.E.P.; CUNHA, F.Q.; POOLE, S. & FERREIRA, S.H. Recombinant IL-1 and TNF induce neutrophil migration "in vivo" by indirect mechanism. **Agents Actions**, **30**: 344-349, 1990.
- FANTONE, J.C..Mechanisms of chemotactic factors stimulation of polymorphonuclear leukocytes: modulation by prostaglandins. In: *Inflammatory Mediators*, pp. 127-148(Higgs, G.A. and Williams, T.J., eds.0 MacMillan, 1985.
- FARRAR, J.J.; BENJAMIN, W.R.; HILFIKER, M.L.; HOWARD, M.; FARRAR, W.L. & FULLER-FARRAR, J.. The biochemistry, biology and role of interleukin-2 in the induction of cytotoxic T cell and antibody forming B cell responses. **Immunol. Rev.**, **63**: 129, 1982.

- FERRANTE, A.; NANDOSKAR, M.; BATES, E.J. & GOH, D.H.B.. *Staphylococcus aureus* - stimulated human mononuclear leucocytes conditioned medium augments the basal and stimuli induced neutrophil respiratory burst and degranulation. **Immunology**, **60**: 431, 1987.
- FERREIRA, S.H. Prostaglandin hyperalgesia and the control of inflammatory pain. In: Pharmacology of Inflammation. pp.107-116 (Bonta, I.L.; Bray, M.A. and Parnham, J.M., Eds.) Amsterdam - New York, Oxford, 1985.
- FERREIRA, S.H.. Are macrophages the body's alarm cells? **Agents Actions**, **10(3)**: 229-230, 1980.
- FISCHER, D.G.; NOVICK, D.; ORCHANSKY, P. & RUBINSTEIN, M. Two molecular forms of the human interferon-gamma receptor. Ligand binding, internalization and down-regulation. **J. Biol. Chem.**, **263**: 2632, 1988.
- FRANK, M.M. & FRIES, L.F..The role of complement in inflammation and phagocytosis. **Immunol. Today**, **12(9)**: 322-326, 1991.
- FURCHGOTT, R.F. & ZAWADZKI, J.V.. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**, **288**: 373-376, 1980.
- GIMBRONE, M.A., OSBIN, M.S.; BROCK, A.F.; LUIS, E.A.; HASS, P.E.; HERBERT, C.A.; YIP, Y.K.; LEUNG, D.W.;LOWE, D.G.; KOHR, W.J.; DARBONNE, W.C.; BECHTOL, K.B. & BAKER, J.B.. Endothelial interleukin-8: a novel inhibitor of leukocyte-endothelial interactions. **Science**, **246**: 1601-1603, 1989.
- GLYNN, L.E..Regeneration and repair. In: Handbook of Experimental Pharmacology, vol. 50/1, pp. 206-230 (Vane, J.R. and Ferreira, S.H., Eds) Springer-Verlag, 1978.
- GRAY, P.W. & GOEDDEL, D.V.. Structure of the human interferon gene. **Nature**, **298**: 859, 1982.
- GREEN, S.J.; MELTZER, M.S.; HIBBS, J.R. & NACY, C.A.. Activated macrophages destroy intracellular *Leishmania major* amastigotes by an L-arginine dependent killing mechanism. **J. Immunol.**, **144**:278-283, 1990.
- GROSSBERG, S.E.; TAYLOR, J.L. & KUSHNARYOV, V.M.. Interferon receptors and their role in interferon action. **Experientia**, **45**: 508-512, 1989.
- HABER, F. & WEISS, J. The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts. **Proc. R. Soc. Ser. A.** , **147**: 332-351, 1934.

- HAMILTON, T.A. & ADAMS, D.O. Molecular mechanisms of signal transduction in macrophages. *Immunol.Today*, **8**: 151-154, 1987.
- HARKNESS, R.A.. The characteristic cell of acute inflammation. The polymorphonuclear neutrophil leukocyte and its biochemistry. *Molecular Aspects in Medicine*, **4 (3/4)**: 191-207, 1981.
- HECHTMAN, D.H.; CYBULSKI, M.I.; FUCHS, H.J.; BAKER, J.B. & GIMBRONE, M.A.. Intravascular IL-8. Inhibitor of polymorphonuclear leukocyte accumulation at sites of acute inflammation. *J. Immunol.*, **147**: 883-892, 1991.
- HENRIQUES, M.G.M.O.; SILVA, P.M.R.; MARTINS, M.A.; FLORES, C.A.; CUNHA, F.Q.; FILHO-ASSREUY, J. & CORDEIRO, R.S.B. Mouse paw edema. A new model for inflammation? *Braz. J. Med. Biol. Res.*, **20**: 243-249, 1987.
- HEREMANS, H.; VAN DAMME, J.; DILLEN, C.; DIJKMANS, R.; BILLIAU, A. IFN γ , a mediator of lethal LPS-induced Shwartzman-like shock reactions in mice. *J. Exp. Med.*, **171**: 1853-1859, 1990.
- HIBBS, J.R.; VAVRIN, Z. & TAINTOR, R.R.. L-arginine is required for expression of the activated macrophage effector mechanism causing selective metabolic inhibition in target cells. *J. Immunol.*, **138**: 550-565, 1987a.
- HUA, X.Y. Tachykinins and calcitonin gene related peptide in relation to peripheral functions of capsaicin-sensitive sensory neurons. *Acta Physiol. Scand.*, **551(supl.)**: 1-44, 1986.
- HURLEY, J.V.. The sequence of early events. In: Handbook of Experimental Pharmacology, vol. 50/1, pp 26-67 (Vane, J.R. and Ferreira, S.H., Eds.) Springer-Verlag, 1978.
- IJZERMANS, J.N.M. & MARQUET, R.L.. IFN- γ - A Review. *Immunobiology.*, **179**: 456-473, 1989.
- ISAACS, A. & LINDENMANN, J.. Virus interference. The Interferon. *Proc. R. Soc. B147*, **1**: 258, 1957.
- ISSEKUTZ, A.C. & LOPES, N.. Endotoxin activation of endothelium for polymorphonuclear leucocyte transendothelial migration and modulation by IFN- γ . *Immunology*, **79**: 600-607, 1993.
- KATORI, M.; ODA, T. & NAGAI, K.. A site of action of dexamethasone on leukocyte extravasation in microcirculation. *Agents Actions*, **29**: 24, 1990.

- KOWANKO, I.C. & FERRANTE, A.. Stimulation of neutrophil respiratory burst and lysosomal enzyme release by human interferon-gamma. **Immunology**, **62**: 149-151, 1987.
- KOWNATZKI, E.; KAPP, A.; UHRICH, S.. Modulation of human neutrophilic granulocyte functions by recombinant human tumor necrosis factor and recombinant human lymphotoxin. Promotion of adherence, inhibition of chemotactic migration and superoxide anion release from adherent cells. **Clin. Exp. Immunol.**, **74**: 143-148, 1988.
- KRAMER, C.Y. Extension of multiple range tests to group means with unequal numbers of replications. **Biometrics**, **12**(3): 307-310, 1956.
- KUIJPERS, T.W.; HAKKERT, B.C.; HART, M.H.L. & ROOS, D..Neutrophil migration across monolayers of cytokine-prestimulated endothelial cells: a role for platelet-activating factor and IL-8.J. **Cell. Biol.**, **117**(3): 565-572, 1992.
- LIEW, F.Y. & COX, F.E.G.. Nonspecific defence mechanism: the role of nitric oxide. **Immunoparasitology Today**, A17-21, 1991.
- LORENZETTI, B.B. & FERREIRA, S.H. Mode of analgesic action of dipyrrone: direct antagonism of inflammatory hyperalgesia. **Eur. J. Pharmacol.**, **114**: 375-381, 1985.
- LORSBACH, R.B. & RUSSEL, S.W.. A specific sequence of stimulation is required to induce synthesis of the antimicrobial molecule nitric oxide by mouse macrophages. **Infect. Immun.**, **60**(5): 2133-2135, 1992.
- LORSBACH, R.B.; MURPHY, W.J.; LOWESTEIN, C.J.; SNYDER, S.H. & RUSSEL, S.W.. Expression of the nitric oxide synthase gene in mouse macrophages activated for tumor cell killing. Molecular basis for the synergy between interferon-gamma and lipopolysaccharide. **J. Biol. Chem.**, **268**: 1908-1913, 1993.
- MacMILLAN, R.M. & FOSTER, S. J..Leukotriene B₄ and inflammatory disease. **Agents Actions**, **24** (1/2): 114-119, 1988.
- MAJNO, G. Inflammatory mediators: where are they going? In: Inflammatory mediators, pp.1-6 (Higgs, G.A. and Willians, T.J., Eds.) MacMillan, 1985.
- MARLETTA, M.A.; YOON, P.S.; IYENGAR, R.; LEAF, C.D. & WISHNOK, J.S.. Macrophage oxidation of L-arginine to nitrite and nitrate: nitric oxide is an intermediate. **Biochemistry.**, **27**: 8706-8711, 1988.

- MARTINEZ, O.M.; ANDERSSON, U.; ANDERSSON, J.; BRITTON, S. & DE LEY, M.. Spontaneous production of IFN- γ in adult and newborn humans. **J. Immunol.**, **132**: 251-255, 1984.
- McCORD, J.M. & FRIDOVICH, I.. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). **J. Biol. Chem.**, **244**: 6049-6055, 1969.
- MONCADA, S.; PALMER, R.M.J. & HIGGS, E.A.. Nitric oxide: Physiology, Pathophysiology and Pharmacology. **Pharmacol. Rev.**, **43(2)**: 109-142, 1991.
- MOREL, F.; DOUSSIERE, J. & VIGNAIS, P.V.. The superoxide-generating oxidase of phagocytic cells. Physiological, molecular and pathological aspects. **Eur. J. Biochem.**, **201**: 523-546, 1991.
- MORRIS, A.G.; LIN, Y.L. & ASKONAS, B.A.. Immune interferon release when a cloned cytotoxic T cell line meets its correct influenza- infected target cells. **Nature**, **295**: 150, 1982.
- NAKAMURA, M. & FERREIRA, S.H. Peripheral sympathetic component in inflammatory hyperalgesia. **Eur. J. Pharmacol.**, **135**: 145-153, 1987.
- OHSHIMA, H.; TSUDA, M.; ADACHI, H.; OGURA, T.; SUGIMURA, T. & ESUMI, H. L-arginine-dependent formation of N-nitrosamines by the cytosol of macrophages activated with LPS and IFN- γ . **Carcinogenesis**, **12(7)**: 1217-1220, 1991.
- PACE, J.L.; RUSSEL, S.W.; TORRES, B.A.; JOHNSON, H.M. & GRAY, P.W.. Recombinant mouse IFN- γ induces the priming step in macrophage activation for tumor cell killing. **J. Immunol.**, **130(5)**, 1983.
- PALMER, R.M.J.; ASHTON, D.S. & MONCADA, S.. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. **Nature**, **333**: 664-666, 1988.
- PALMER, R.M.J.; BRIDGE, L.; FOXWELL, N.A. & MONCADA, S.. The role of nitric oxide in endothelial cell damage and its inhibition by glucocorticoids. **Br. J. Pharmacol.**, **105**: 11-14, 1992.
- PANEM, S.. Application of recombinant DNA technology to expression of human interferon genes. In Interferons and their applications. Ed. P.E. Came & W.A. Carter. Handbook of Experimental Pharmacology, 71, pp.137-151, Springer-Verlag, Berlin.

- 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. Methods.**, **46**: 211-226, 1981.
- PRYOR, W.A..The formation of free radicals and the consequences of their reactions "in vivo". **Photochem. Photobiol.**, **28**:787-801, 1978.
- RANKIN, J.A.; SYLVESTER, I. SMITH, S.; YOSHIMURA, T. & LEONARD, E.J..Macrophages cultured *in vitro* release leukotriene B₄ and neutrophil attractant/activation protein (IL-8) sequentially in response to stimulation with lipopolysaccharide and zymosan. **J. Clin. Invest.**, **86**: 1556-1564, 1990.
- RIBEIRO, R.A.; CUNHA, F.Q. & FERREIRA, S.H.. Recombinant gamma interferon causes neutrophil migration mediated by the release of a macrophage neutrophil chemotactic factor. **Int. J. Exp. Pathol.**, **71**: 717-725, 1990.
- RIBEIRO, R.A.; FLORES, C.A.; CUNHA, F.Q. & FERREIRA, S.H.. IL-8 causes *in vivo* neutrophil migration by cell-dependent mechanism. **Immunology**, **73**: 472-477, 1991.
- ROCHA e SILVA, M..Brief history of inflammation In: Handbook of Experimental Pharmacology, 50/1 pp: 6-25 (Vane, J.R. and Ferreira, S.H., Eds). Springer-Verlag, 1978.
- ROCHA, N. & FERREIRA, S.H.. Restoration by levamisole of endotoxin inhibited neutrophil migration, oedema and increased vascular permeability induced by carrageenin. **Eur. J. Pharmacol**, **122**: 87-92, 1986.
- ROSENBAUM, J.T.; HARTIALA, K.T.; WEBSTER, R.O. *et alii.*. Antiinflammatory effects of endotoxin. Inhibition of rabbit polymorphonuclear leukocyte response to complement (C₅) -derived peptides *in vivo* and *in vitro*. **Am. J. Pathol.**, **113**: 291-299, 1983.
- ROSSI, F. & ZATTI, M.. Changes in the metabolic pattern of PMN leukocytes during phagocytosis. **Br. J. Exp. Pathol.**, **45**: 548-559, 1964.
- RUBIN, B.Y. & GRIPTA, S.L.. Differential efficacies of human type I and type II interferons as antiviral and antiproliferative agents. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **77**: 5928, 1980.
- RUSSO, M. The role of macrophages in the chemotactic response of polymorphonuclear leucocytes to bacterial lipopolysaccharides. **Proc. S. Exp. Biol. Med.**, **134**: 326-330, 1980.
- SEDGWICK, A.D. & WILLOUGHBY, D.A. In: Initiation of the inflammatory response and its prevention. In: Handbook of Inflammation, vol.5, pp. 27-47 (Bonta,I.L.; Bray, M.A. and Parnham, M.J., Eds). Elsevier, 1985.

- SHALABY, M.R.; AGGARWAL B.B.; RINDERKNECHT, E.; SVEDERSKY, L.P. & PALLADINO, M.A. Activation of human polymorphonuclear neutrophil functions by interferon-gamma and tumor necrosis factor. **J. Immunol.**, **135**: 2069, 1985.
- SHALABY, M.R.; HAMILTON, E.B.; BENNINGER, A.H. & MARAFINO, B.J.. In vivo antiviral activity of recombinant murine gamma interferon. **J. Interferon Res.**, **5**: 339, 1985.
- SHERRY, B. & CERAMI, A.. Small cytokine superfamily. **Curr. Opin. Immunol.**, **3**: 56-60, 1991.
- SMITH, M.J.H.. Leukotriene : A potential mediators of inflammation. **J. Pharm. Pharmacol.**, **32**: 517-518, 1980.
- SMITH, M.J.H.; FORD-HUTCHINSON, A.W.; WALKER, J.R.. Anti-inflammatory activity of bacterial endotoxin. **J. Pharm. Pharmacol.**, **29**: 702-704, 1977.
- SNEDECOR, G. W.. Statistical methods applied to experiments in agriculture and biology. The Iowa University Press, Iowa, 1963.
- SODHI, A.; SINGH, R.K. & SINGH, S.M.. Effect of IFN- γ priming on the activation of murine peritoneal macrophages to tumoricidal state by cisplatin, IL-1 e TNF: production of IL-1 and TNF. **Clin. Exp. Immunol.**, **88**: 350-355, 1992.
- SOUZA, G.E.P., CUNHA, F.Q., MELLO, R. & FERREIRA, S.H.. Neutrophil migration induced by inflammatory stimuli is reduced by macrophage depletion. **Agents Actions**, **24(3/4)**: 377-380, 1988.
- STEIMLE, V.; SIEGRIST, C.A.; MOTTET, A.; LISOWSKA-GROSPIERRE, B. & MACH, B.. Regulation of MHC Classe II expression by interferon- γ mediated by the transactivator gene CIITA. **Science**, **265**:106-109, 1994.
- STEINBECK, M.J.; ROTH, J.A. & KAERBELE, M.L.. Activation of bovine neutrophils by recombinant interferon- γ . **Cell. Immunol.**, **98**: 137, 1986.
- STEWART, I.I.; BLALOCK, J.E. & BURKE, D..Interferon: nomenclature. **J. Immunol.**, **125**: 2353, 1980.
- STOKVIS, H.; LANGERMANS, J.A.M. *et alii*. Hydrocortisone treatment of BCG-infected mice impairs the activation and enhancement of antimicrobial activity of peritoneal macrophages. **Scand. J. Immunol.**, **36**: 299-305, 1992.
- STREET, N.E. & MOSMANN, T.R.. Functional diversity of T lymphocytes due to secretion of different cytokine patterns. **FASEB J.**, **5**: 171-177, 1991.

- STUEHR, D.J. & MARLETTA, M.A.. Mammalian nitrogen biosynthesis: mouse macrophages produce nitrite and nitrate in response to *Escherichia coli* lipopolysaccharide. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **82**: 7738-7742, 1985.
- STUEHR, D.J. & MARLETTA, M.A.. Induction of nitrite/nitrate synthesis in murine macrophages by BCG infection, lymphokines or interferon- γ . **J. Immunol.**, **139(2)**: 518-525, 1987.
- TAYEH, M.A. & MARLETTA, M.A.. Macrophage oxidation of L-arginine to nitric oxide, nitrite and nitrate. Tetrahydrobiopterin is required as a cofactor. **J. Biol. Chem.**, **264**: 19654-19658, 1989.
- TERRITO, M.C. & DAVID, W.G.. Granulocyte function in experimental human endotoxemia. **Blood**, **47(4)**: 539-544, 1976.
- WHING, R.J. & ADAMS, D. O.. Molecular events in the activation of macrophages murine. **Agents Actions**, **26**: 9-13, 1989.
- WILLIAMS, T.J. Mechanisms of inflammatory oedema formation. In: Blackwell Scientific Publications, Oxford, pp.210-216, 1984.
- WILKINSON, P.C..Textbook of immunopharmacology, pp. 217-231 (Dale, M.M. and Foreman, J.C., Eds.) Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1984.
- YANCEY, K.B..Biological properties of human C5a: Selected *in vitro* and *in vivo* studies. **Clin. Exp. Immunol.**, **71**: 207-210, 1989.
- YIP, Y.K.; BARROCLOUGH, B.S.; URBAN, C. & VILCEK, J.. Purification of two subspecies of human gamma (immune) interferon. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **79**: 1820, 1982.
- YOUNG, A.H. & HARDY, K.J.. IFN- γ : Producers cells, activation stimuli and molecular genetic regulation. **Pharmacol. Ther.**, **45**: 137-151, 1990.