

Heloisa Helena de Araujo Ferreira



PAPEL DO ÓXIDO NÍTRICO NA MIGRAÇÃO DE EOSINÓFILOS DE RATOS

Este exemplar corresponde à redação final
da tese de doutorado (assinado e)
*Heloisa Helena de Araujo
Ferreira*
e aprovada pela Comissão Julgadora.

28/10/96 *Gilberto de Nucci*

Tese apresentada ao Instituto de
Biologia da UNICAMP para
obtenção do Título de Doutor em
Ciências. Área de Concentração:
Fisiologia.

Orientador: Prof. Dr. Gilberto de Nucci

Campinas

1996



UNIDADE BC
 N.º CHAMADA: UNICAMP
F413 p
 / EL
 CDD BC/ 291.73
 PROCO. 667.196
 C ☐ D ☒
 PRECO R\$ 11,00
 DATA 28/11/96
 I.º CPD

M.00095170-4

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
 BIBLIOTECA CENTRAL DA UNICAMP

F413p

Ferreira, Heloisa Helena de Araujo

Papel do óxido nítrico na migração de eosinófilos
 de ratos / Heloisa Helena de Araujo Ferreira. --
 Campinas, SP : [s.n.], 1996.

Orientador: Gilberto de Nucci.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual de
 Campinas. Instituto de Biologia.

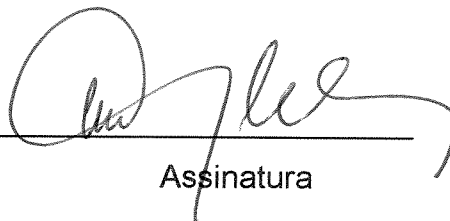
1. Eosinófilos. 2. Quimiotaxia. 3. Alergia respiratória.
 4. Rato. I. Nucci, Gilberto de.. II. Universidade Estadual
 de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

LOCAL E DATA: Campinas, 02 de outubro de 1996

BANCA EXAMINADORA:

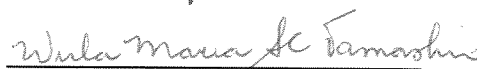
TITULARES:

Profa. Dra. Maria Marluce dos Santos Vilela



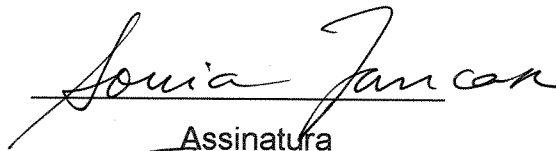
Assinatura

Profa. Dra. Wirla Maria da S. Cunha Tamashiro



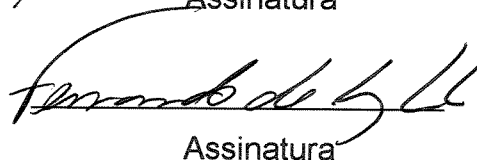
Assinatura

Profa. Dra. Sônia Jancar



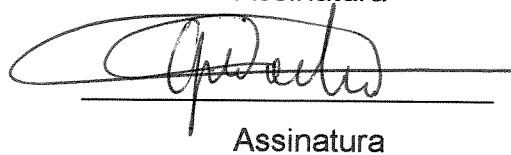
Assinatura

Prof. Dr. Fernando de Queiroz Cunha



Assinatura

Prof. Dr. Gilberto de Nucci



Assinatura

SUPLENTES:

Profa. Dra. Alba Regina S. Brito Monteiro

Assinatura

Prof. Dr. Gilberto D'Assunção Fernandes

Assinatura

Dedico este trabalho:

Aos meus filhos, pelo carinho e apoio aos meus estudos, pela compreensão de minhas ausências e solidariedade em todos os momentos;

À memória de meu pai, pelos firmes princípios que guiaram sua vida e, sobretudo, pelo exemplo de esperança e fé;

À minha mãe, pela imensa paciência e dedicação à família e por ter nos ensinado a importância do desenvolvimento intelectual para se alcançar a liberdade como mulher;

Aos meus irmãos, pela amizade e incentivo.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Gilberto de Nucci, pelo exemplo de dedicação à pesquisa, pela orientação e amizade.

Ao Prof. Dr. Edson Antunes, pela amizade, pela constante disposição em ajudar e pelas contribuições críticas que foram fundamentais para o desenvolvimento desta pesquisa.

À Marta V. Medeiros e Renata Zanardo, pelo imprescindível apoio técnico e pela alegria e companheirismo em todos os momentos.

À Prof. Dra. Carmem S. P. Lima e Mônica de A. Falconi, do Hemocentro-UNICAMP, pela assistência técnica e pela simpatia com a qual me receberam no laboratório.

À Profa. Dra. Estela Bevilacqua, Sônia M. Gaglioti e Andreia Albiere, do Departamento de Histologia e Embriologia do ICB-USP, pela atenção e eficiência na execução e interpretação dos cortes histológicos.

Ao Cleber E. Teixeira, pela colaboração na realização dos experimentos de cascata.

À Prof. Dra. Paulina Sannomiya, do Departamento de Farmacologia do ICB-USP, pelas valiosas críticas e sugestões no decorrer deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Carlos A. Flores, do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade do Ceará, pela colaboração na fase inicial desta pesquisa.

À Dora, pela atenção, dedicação e esforço para resolver os problemas.

Aos amigos do laboratório, Luciana Nathan, Sissi, Donato, Renata Pereira, Elen, Aldete, Soraia, Wellington, Nick, Marcelo, Leonardo, Stephen, Sérgio, Rogério, Ronilson, Moacir, Sócrates, Renato, Luciana Bizeto, Flávio, Andréa, Agnaldo, Evandro, Heidi, Marcos, Heryck, Lúcia, Simone e Pamela, pela amizade e por todo aquele papo fiado que faz a vida mais descontraída.

Ao Miguel Borges da Silva, pelo cuidado com os animais do Biotério do Departamento de Farmacologia-FCM/UNICAMP, fundamental para o sucesso dos experimentos.

Aos professores, funcionários e alunos do Departamento de Farmacologia-FCM/UNICAMP, pela simpatia com que sempre me acolheram.

Aos professores, funcionários e colegas do Curso de Pós-Graduação de Fisiologia-IB/UNICAMP, pelos ensinamentos e amizade.

LISTA DE ABREVIações

BK	Bradicinina
cAMP	Monofosfato cíclico de adenosina
Cg	Carragenina
cGMP	Monofosfato cíclico de guanosina
cNOS	Óxido nítrico sintase constitutiva
D-NAME	N ^ω -nitro-D-arginina metil éster
dnOS	Óxido nítrico sintase neural
ECP	Proteína catiônica eosinofílica
EDN/EPX	Proteína x derivada do eosinófilo
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
EO	Eosinófilo
fMLP	N-formil-metionil-leucil-fenilalanina
GM-CSF	Fator estimulador de colônia de monócitos e granulócitos
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule 1
IFN	Interferon
IL	Interleucina
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
L-NAME	N ^ω -Nitro-L-arginina metil éster
L-NIO	N-iminoetil-L-ornitina
L-NMMA	N ^ω -monometil-L-arginina
L-NNA	N ^ω -nitro-L-arginina
LBA	Lavado broncoalveolar
LPS	Lipopolissacáride
LT	Leucotriene
MN	Células mononucleares
MPB	Proteína básica principal
MT	Mastócito

NE	Neutrófilo
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
OVA	Ovalbumina
PAF	Fator ativador de plaquetas
PECAM	Platelet endothelial cell adhesion molecule
PG	Prostaglandina
PGDF	Fator de crescimento derivado das plaquetas
PMN	Polimorfonucleares
RANTES	<i>Regulated upon activation in normal T cells expressed and secreted</i>
SAZ	Soro ativado com zimozan
TGF	Fator de crescimento e transformação
TNF	Fator de necrose tumoral
TX	Tromboxano
VCAM-1	Vascular cell adhesion molecule 1
VLA-4	Very late antigen 4

SUMÁRIO

Dedicatória	ii
Agradecimentos	iii
Lista de abreviações	v
Resumo	ix
1 - INTRODUÇÃO	1
1.1 Componente Celular da Resposta Inflamatória	1
1.1.1 Eosinófilos	2
1.2 Óxido Nítrico e Reação Inflamatória	8
Objetivos	14
2 - MATERIAIS E MÉTODOS	15
2.1 Animais	15
2.2 Procedimento Experimental	15
2.2.1 Tratamento Crônico com L-NAME ou D-NAME	15
2.2.2 Avaliação do Peso Corporal e da Pressão Arterial	16
2.2.3 Contagem de Leucócitos no Sangue Periférico	17
2.2.4 Pleurisia Induzida por BK, PAF, LPS e Carragenina	17
2.2.5 Sensibilização à Ovalbumina e Desafio Antigênico	18
2.2.5.1 Lavado Broncoalveolar	18
2.2.5.2 Fixação e Processamento dos Pulmões para Microscopia de Luz	19
2.2.5.3 Perfusão de Traquéia em Cascata	19
2.2.6 Obtenção de Eosinófilos de Ratos do Lavado Peritoneal	20
2.2.6.1 Ensaio de Quimiotaxia <i>in vitro</i>	21
2.3 Procedência das Drogas	22
2.4 Análise Estatística	22

3 - RESULTADOS

3.1 Efeito do tratamento Crônico com L-NAME Sobre o Ganho Ponderal, Pressão Arterial e Leucócitos Periférico	23
3.1.1 Ganho Ponderal	23
3.1.2 Pressão Arterial	23
3.1.3 Leucócitos Periféricos	23
3.2 Infiltração Pleural de Leucócitos Induzida por BK, PAF, Carragenina e LPS	26
3.2.1 Animais não Tratados	26
3.2.2 Efeito do Tratamento Crônico com L-NAME sobre a Migração Pleural de Leucócitos	28
3.2.3 Efeito do Tratamento Crônico com L-NAME na Migração Pleural de Eosinófilos Induzida por BK, PAF, Cg e LPS	31
3.3 Inflamação das Vias Respiratórias Induzida por OVA	31
3.3.1 Reatividade da Traquéia à OVA	33
3.3.2 Efeito da Sensibilização com OVA na Pressão Arterial dos Ratos Tratados Cronicamente com L-NAME	33
3.3.3 Número de Leucócitos no LBA de Animais não Tratados	36
3.3.4 Número de Leucócitos no LBA de Ratos Tratados Cronicamente com L-NAME ou D-NAME	40
3.3.5 Histologia dos Pulmões dos Ratos não Sensibilizados	41
3.3.6 Histologia dos Pulmões dos Ratos Sensibilizados	41
3.4 Quimiotaxia de Eosinófilos <i>in vitro</i> induzida por fMLP, PAF, e SAZ	42
3.4.1 Efeito da L-arginina sobre a Inibição da Quimiotaxia de eosinófilos	42
4 - DISCUSSÃO	49
5 - CONCLUSÕES	60
6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61
7 - SUMMARY	85

RESUMO

O efeito do tratamento crônico com N^o-Nitro-L-arginina metil éster (L-NAME) foi investigado em ratos, usando-se o modelo de pleurisia e inflamação alérgica em animais sensibilizados com ovalbumina (OVA). A migração de eosinófilos *in vitro* induzida por fMLP, PAF e soro ativado com zimosan foi também avaliada nestes animais.

A inibição crônica da biossíntese de óxido nítrico (NO) foi realizada pela adição de L-NAME na água que os animais ingeriam *ad libitum*, na concentração aproximada de 75 µmol/rato/dia, por um período de 30 dias. A pleurisia foi induzida pela injeção de bradicinina (50 µg), PAF (1 µg), lipopolissacáride (0.25 µg) e carragenina (125 µg) na cavidade pleural. A sensibilização ativa com OVA foi efetuada pela injeção subcutânea de 200 µg de OVA adsorvida em 8 mg de Al(OH)₃. O desafio com 1 mg de OVA, injetado na luz intratraqueal, foi realizado 14 dias após a sensibilização. Para as análises histológicas, os pulmões foram cortados em fragmentos, fixados em mistura contendo paraformaldeído (4%) e glutaraldeído (0.5%) em tampão fosfato (0.1 M) e incluídos em parafina. Para os estudos da quimiotaxia *in vitro*, os eosinófilos foram coletados da cavidade peritoneal de ratos Wistar e isolados em gradiente descontínuo de metrizamida.

No modelo de pleurisia houve migração significativa de eosinófilos para a cavidade pleural, observada 24 h após a injeção de bradicinina, PAF, lipopolissacáride e carragenina, em ratos não tratados. Esta migração foi marcadamente reduzida nos animais tratados com L-NAME. Nos animais tratados e não tratados, sensibilizados e desafiados com OVA, observou-se, 24 h após desafio, significativa infiltração de leucócitos no lavado broncoalveolar (LBA), principalmente de neutrófilos e células mononucleares. Neste modelo, a migração de eosinófilos ocorreu, de modo mais intenso, 48 h

após o desafio. Em 48 h, o tratamento com L-NAME reduziu significativamente o influxo de leucócitos totais e eosinófilos, sem contudo alterar a infiltração de neutrófilos. Em ratos não tratados, 48 h após o desafio, a histologia dos pulmões revelou uma infiltração rica em eosinófilos, e nos animais tratados com L-NAME, redução dessa infiltração. Com relação à quimiotaxia *in vitro*, os eosinófilos obtidos da cavidade peritoneal de ratos não tratados mostraram uma migração significativa em resposta ao fMLP (5×10^{-8} M), PAF (10^{-8} M) e soro ativado com zimosan (27 μ l). A migração foi marcadamente reduzida quando os eosinófilos foram isoladas de animais tratados cronicamente com L-NAME. A L-arginina (5.5 mM), precursor da síntese de NO, mas não a D-arginina (5.5 mM), enantiômero inativo, restaurou a capacidade dos eosinófilos de ratos tratados em responder ao fator quimiotático fMLP.

Nossos resultados mostram que o tratamento crônico com L-NAME inibe a migração de eosinófilos *in vivo*, sendo esta inibição também demonstrada *ex vivo*. Isto sugere que, provavelmente, o L-NAME exerce seu efeito diretamente sobre os eosinófilos, dificultando, assim, sua locomoção.

1 - INTRODUÇÃO

Inflamação é a reação dos organismos vivos em resposta a lesões teciduais. Normalmente, os organismos produzem diversos agentes pró-inflamatórios e antiinflamatórios que determinam o início e o final do processo controlando, assim, os possíveis efeitos deletérios desta resposta. A resposta inflamatória é gerada a partir de células (neutrófilos, eosinófilos, basófilos, macrófagos, mastócitos e endotélio) e/ou proteínas circulantes (componentes de complemento, da coagulação, da fibrinólise e cininas plasmáticas). A inflamação persistente pode, no entanto, resultar em uma resposta excessiva ou imprópria que leva a condições patológicas, cuja expressão clínica depende do local e da natureza celular da resposta inflamatória (Dale et al., 1994).

1.1 COMPONENTE CELULAR DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA

Algumas das células envolvidas na resposta inflamatória são pré-existent nos tecidos, tais como os mastócitos, fagócitos mononucleares teciduais e células endoteliais vasculares (Galli, 1993; Johnston, 1988; Fajardo, 1989). Outros elementos deslocam-se do sangue periférico para o sítio inflamatório, tais como os leucócitos polimorfonucleares (neutrófilos, eosinófilos e basófilos) e células mononucleares (monócitos e linfócitos; Johnston, 1988; Valent & Bettelheim, 1992; Kroegel et al., 1994). Os fibroblastos e as plaquetas têm importante participação tanto na inflamação como no reparo tecidual (Moncada et al., 1991; Page, 1994).

As células que participam no estágio inicial da reação inflamatória são os leucócitos polimorfonucleares (neutrófilos e eosinófilos). Tais células aderem às células endoteliais das vênulas pós-capilares da área e, ativamente, migram através do vaso para o sítio da invasão do patógeno. Os neutrófilos são as primeiras células a serem recrutadas para o sítio da lesão ou infecção e são

capazes de fagocitar e digerir microorganismos e células tumorais (Schleimer et al., 1989; Smith, 1994). Os eosinófilos são mais importantes na defesa contra helmintos e outros organismos multicelulares e, na última década, têm sido reconhecidos como potentes células pró-inflamatórias envolvidas no desenvolvimento da asma e doenças alérgicas (Kroegel et al., 1994).

1.1.1 EOSINÓFILOS

Os eosinófilos originam-se das células precursoras mielóides, sob o controle das citocinas, tais como o fator estimulador de colônia de monócitos e granulócitos (GM-CSF) e interleucina 3 (IL-3), e se diferenciam sob a influência da IL-5 (Hansel et al., 1989). Após um período de diferenciação e maturação de aproximadamente 5 dias, os eosinófilos maduros deixam a medula e passam a circular no sangue periférico. No sangue, apresentam uma meia-vida estimada de 13-18 h antes de migrarem para os tecidos. Estes tecidos são representados sobretudo por aqueles que fazem interface com meio ambiente, como os tratos respiratório, gastrointestinal e genitourinário, onde persistem por aproximadamente 6 dias (Kroegel et al., 1994). Entretanto, o tempo de vida do eosinófilo tecidual pode aumentar pelo efeito da IL-3, GM-CSF e IL-5, liberados local ou sistemicamente (Owen et al., 1987; Rothenberg et al., 1987).

O núcleo do eosinófilo é bilobulado e o aspecto mais característico dessas células são os grânulos citoplasmáticos específicos ou secundários, os quais contêm material cristalóide eletrodense com forte afinidade para corantes ácidos como a eosina. Isto resulta na coloração alaranjada, característica dos grânulos citoplasmáticos dos eosinófilos (Miller et al., 1966). Os grânulos secundários contêm proteínas básicas, como a proteína básica principal (MBP), a proteína catiônica eosinofílica (ECP), a peroxidase eosinofílica e a neurotoxina ou proteína X derivada do eosinófilo (EDN ou EPX; Gleich & Adolphson, 1986). A mais abundante das proteínas catiônicas encontradas nos grânulos é a MBP que é altamente tóxica para helmintos, protozoários,

bactérias, células tumorais e células do epitélio respiratório (Kroegel et al., 1994). Além destes grânulos, os eosinófilos apresentam, no estágio de pró-mielócito, os grânulos primários. Estes grânulos transformam-se, provavelmente, nos pequenos corpos citoplasmáticos contendo lisofosfatase que se cristalizam para formar os cristais piramidais hexagonais de Charcot-Leyden (Dvorak, 1988). Nos eosinófilos maduros são encontrados um terceiro tipo de grânulos denominados grânulos pequenos (Parmley & Spicer, 1974). Outra organela importante para os eosinófilos são os corpos lipídicos, cujo número aumenta durante a ativação destas células. Estes elementos representam o sítio intracelular de estocagem e metabolismo do ácido araquidônico (Weller et al., 1989).

Além da liberação de proteínas, o eosinófilo é um potente produtor de metabólitos tóxicos derivados do oxigênio, tais como o ânion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxila livre ($OH^\cdot$) e o oxigênio simples (O_2), os quais são tóxicos para microorganismos, células tumorais e outras células dos mamíferos (Declatelet et al., 1977; Klebanoff et al., 1977; Kanofsky et al., 1988).

A estimulação dos eosinófilos por diferentes agentes solúveis e insolúveis leva à formação de vários derivados do ácido araquidônico, incluindo o leucotrieno C_4 (LTC_4 ; Bruynzeel et al., 1987), as prostaglandinas PGD_2 , PGE , PGF_1 e $PGF_{2\alpha}$ (Giembycz, 1990; Kroegel et al., 1994) e o tromboxano A_2 (TXA_2 ; Giembycz, 1990). O eosinófilo pode também sintetizar grandes quantidades do fator ativador de plaquetas (PAF; Burke et al., 1990).

Trabalhos recentes demonstram que os eosinófilos possuem informações genéticas para elaborar e sintetizar importantes citocinas pró-inflamatórias tais como o fator de crescimento e transformação α e β_1 ($TGF\alpha$ e $TGF\beta_1$; Wong et al., 1990, 1991), GM-CSF (Kita et al., 1991), IL-1, IL-3, IL-5, IL-6 e IL-8 (Kita et al., 1991; Desreumaux et al., 1992; Hamid et al., 1992; Braun et al., 1993; Weller et al., 1992). O reconhecimento da capacidade de sintetizar e liberar

estas citocinas abriu um novo panorama sobre o potencial do eosinófilo como célula efetora na inflamação alérgica (Moqbel, 1994).

Os eosinófilos são proeminentes células inflamatórias associadas com doenças alérgicas e com a resposta inflamatória contra parasitas helmínticos (Venge, 1990). Em numerosos estudos envolvendo autópsia e caracterização histológica de tecidos das vias aéreas de indivíduos que morreram de asma, foi verificado grande número de eosinófilos e produtos de seus grânulos (Azzawi et al., 1992). O uso da técnica de broncoscopia rígida (ou com fibra óptica) permitiu estudos em biópsias das vias aéreas de pacientes asmáticos com diferentes graus de severidade (Laitinen et al., 1985; Jeffrey et al., 1989; Ollerenshaw & Woolcock, 1992). Estes estudos confirmaram as observações obtidas em autópsias. Outros estudos examinaram a presença de células residentes e eosinófilos nas vias aéreas de pacientes asmáticos, onde observou-se infiltração eosinofílica e linfocítica intensa no epitélio e na lâmina própria dos pacientes. Os eosinófilos estavam ausentes nas biópsias dos indivíduos sadios controles (Ollerenshaw & Woolcock, 1992; Laitinen et al., 1993). Através de técnicas de microscopia eletrônica e imunohistoquímica, pôde-se ainda observar que, devido à aparência microscópica dos seus grânulos citoplasmáticos, os eosinófilos apresentavam-se ativados (Ollerenshaw e Woolcock, 1992; Laitinen et al., 1993).

Com relação às proteínas catiônicas estocadas nos grânulos citoplasmáticos dos eosinófilos (MBP, ECP e EPO), tem sido sugerido que as mesmas estão envolvidas na destruição do epitélio respiratório e, conseqüentemente, no surgimento da hiperreatividade brônquica. Isto reforça a hipótese da correlação sugerida entre alteração da função das vias aéreas e ativação eosinofílica (Gleich et al., 1979; Motojima et al., 1989). Além disso, na maioria dos estudos realizados em biópsias dos pacientes asmáticos, não foi encontrado infiltração significativa de neutrófilos (Gleich et al., 1979; Motojima et al., 1989).

Com relação ao leucograma de pacientes asmáticos, sabe-se que os mesmos apresentam intensa eosinofilia com alta porcentagem de eosinófilos ativados hipodensos, aparentemente “primados” para estímulos quimiotáticos (Fukuda et al., 1985). Após o desafio antigênico, o número de eosinófilos circulantes em pacientes asmáticos diminui transitoriamente, mas volta a aumentar, em 24 h, para um número superior àqueles observados antes do desafio. Isto é acompanhado por diminuição da densidade destas células (Frick et al., 1989; Gibson et al., 1991). Estes resultados confirmam a existência de eosinófilos ativados na asma que, após desafio alergênico nas vias aéreas, são recrutados do sangue periférico juntamente com os linfócitos T (Gibson et al., 1991).

O exame citológico do lavado broncoalveolar (LBA) de pacientes com asma moderada e severa revela números aumentados de mastócitos, eosinófilos e células epiteliais. Entretanto, nestes pacientes, não se observou número aumentado de linfócitos, macrófagos e neutrófilos (Kirby et al., 1987). A eosinofilia é frequentemente observada entre 24 e 48 horas após o desafio antigênico, com grande porcentagem de eosinófilos ativados hipodensos (Sedgwick et al., 1991). Apesar de não apresentar modificação quanto ao número, tem sido documentado a presença de linfócitos T ativados no LBA de pacientes asmáticos, células estas detectadas pelos marcadores de ativação HLA-DR (antígeno leucocitário humano do complexo principal de histocompatibilidade classe II) e IL-2R (receptor positivo para IL-2). A maioria dos linfócitos parecem ser do fenótipo CD4⁺ (Corrigan et al., 1988; Walker et al., 1992). Este estado de ativação sugere que os linfócitos T liberam fatores (TNF- α , IL-3, IL-4, IL-5, GM-CSF, IL-8, RANTES) que são importantes para a mobilização tecidual dos eosinófilos (Walker et al., 1992; Azzawi et al., 1992). Apesar da estreita associação entre o eosinófilo e a patogênese das doenças alérgicas e asma, a existência de uma correlação causa e efeito continua essencialmente circunstancial (Bruijnzeel, 1994).

O eosinófilo é capaz de responder aos estímulos quimiotáticos pela quimiocinese (movimento não direcional) ou pela quimiotaxia (migração dirigida através de um gradiente de concentração para um estímulo). Na vigência da resposta inflamatória, os fatores quimiotáticos modulam o influxo e acúmulo de eosinófilos nos tecidos possibilitando sua ação como célula efetora. Um grande número de agentes quimotáticos têm sido descritos, mas poucos são totalmente efetivos ou seletivos para eosinófilos (Moqbel, 1994). Dentre os efetivos, os melhores caracterizados são o C5a (fragmento produzido pela ativação do sistema complemento; Fernandez et al., 1978) e PAF (Wardlaw et al., 1986). Alguns eicosanóides como o ácido 5-oxo-6,8,11,14-eicosatetraenóico (5-oxo-ETE) e LTB₄ são quimiotáticos para o eosinófilo, sendo que o último apresenta ação relativamente fraca quando comparada aos seus efeitos sobre os neutrófilos (Powell et al., 1995; Bisgaard et al., 1986). Atualmente, acredita-se que o fator da anafilaxia quimiotático para o eosinófilo (ECF-A), isolado de tecidos pulmonares humano e de cobaias sensibilizadas, seja uma combinação do 15-diHETE e LTB₄ (Schemi et al., 1991). A histamina é um agente quimiotático fraco para eosinófilos não estimulados (Fadel et al., 1987). As citocinas IL-3, IL-5 e GM-CSF têm pouca atividade quimiotática para os eosinófilos purificados de doadores normais e nenhuma para eosinófilos de doadores com eosinofilia (Wang et al., 1989; Warringa et al., 1991). Entretanto, a IL-5 é capaz de potenciar a resposta quimiotática de eosinófilos (obtidos de doadores normais) para mediadores como o PAF, IL-8 ou LTB₄ (Sehmi et al., 1992, 1993). Recentemente, foi identificado uma citocina denominada RANTES, produzida e liberada pelos linfócitos T e plaquetas e, possivelmente, por outras células, que pode desempenhar um papel importante na infiltração seletiva dos eosinófilos no sítio inflamatório (Schröder et al., 1994). A eotaxina, outro agente quimiotático recentemente identificado (Griffiths-Johnson et al., 1993), apresenta um efeito quimiotático potente e seletivo para eosinófilos (Jose et al., 1994). Outra observação importante foi a de que os eosinófilos são capazes de produzir sua própria “quimiotaxina”, quando incubados com ácido araquidônico

exógeno. Este fator foi caracterizado estruturalmente como sendo o ácido 5-oxo-15-hidroxi-eicosatetranóico (5-oxo-15-HETE), e parece ter um efeito quimiotático tão eficaz quanto o próprio PAF (Schwenk et al., 1992).

O acúmulo preferencial dos eosinófilos nos tecidos que fazem interface com o meio ambiente sugere um processo seletivo de migração, cujos mecanismos não estão ainda totalmente esclarecidos (Teixeira et al., 1995). Utilizando várias condições experimentais concluiu-se que os diversos eventos envolvidos na migração dos leucócitos seguem diferentes etapas. Os receptores envolvidos neste processo representam os produtos de várias superfamílias de genes e incluem a superfamília das integrinas, membros da superfamília das imunoglobulinas e as selectinas (Wardlaw, 1990; Springer, 1990).

Após determinados estímulos, são gerados mediadores inflamatórios (IL-1, IL-4 e $\text{TNF}\alpha$) que ativam as células endoteliais. Por outro lado, outros mediadores como o C5a, IL-8, LTB_4 e RANTES ativam os leucócitos (incluindo os eosinófilos) que estão próximos à parede vascular (Bruijnzeel, 1994 ; Dubois e Bruijnzeel, 1994). As células endoteliais e os eosinófilos ativados expressam em sua superfície as selectinas (do tipo E, L ou P) ou os ligantes dos mesmos como o *sialylated Lewis X* (sLe^x), a glicoproteína 1 ligante da P-selectina ou a glicoproteína 1 ligante da E-selectina (Steegmaier et al., 1995). Estes receptores estão envolvidos na ancoragem inicial dos leucócitos ao endotélio venular. Uma vez ancorados, os leucócitos deslizam sobre as células endoteliais até se tornarem ativados por estímulos liberados localmente, estímulos estes que induzem mudanças conformacionais de certas integrinas presentes na superfície dos eosinófilos (principalmente CD11/CD18 e very late antigen 4 - VLA-4). Isto permite a firme adesão dos eosinófilos aos ligantes nas células endoteliais. A principal classe de ligantes inclui o ICAM-1 (intercellular adhesion molecule 1) e o VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule 1; Bevilacqua, 1993; Diamond et al., 1991; Sriramarao et al., 1994). Os leucócitos podem, então, migrar através do endotélio para o tecido conjuntivo adjacente, em direção ao foco inflamatório. O processo de diapedese envolve

principalmente as moléculas de adesão ICAM-1 e PECAM 1 (platelet endothelial cell adhesion molecule 1; Smith et al., 1989).

A adesão seletiva do leucócito ao endotélio vascular, através de receptores que são expressos pelos eosinófilos, pode explicar o acúmulo dos mesmos nas respostas alérgicas. A expressão da integrina VLA-4 ($\beta 1$ integrin VLA 4) pelos eosinófilos, mas não pelos neutrófilos, sugere que a ligação desta ao VCAM-1 determina a migração seletiva dos eosinófilos (Walsh et al., 1991). A expressão dos receptores endoteliais VCAM-1 é também induzida pela IL-4, a qual é importante na inflamação alérgica por estar envolvida na síntese de IgE (Schleimer et al., 1992). Estes achados têm implicações importantes na asma alérgica, onde o acúmulo preferencial de eosinófilo representa um aspecto importante nas reações inflamatórias atópicas, dependentes de IgE (Teixeira et al., 1995).

Portanto, o acúmulo de eosinófilos nos tecidos pode ocorrer como resultados da expressão e interação de diferentes eventos que incluem os fatores quimiotáticos, a adesão celular específica e a sobrevivência dos eosinófilos nos tecidos (Teixeira et al., 1995).

1.2 ÓXIDO NÍTRICO E REAÇÃO INFLAMATÓRIA

O óxido nítrico (NO), um radical gasoso livre, é um poluente atmosférico que, em pequenas concentrações no organismo, age como mediador fisiológico e fisiopatológico (Moncada et al., 1991).

O NO é sintetizado a partir de um dos átomos de nitrogênio do grupo guanidino terminal do aminoácido L-arginina, através da enzima óxido nítrico sintase (NOS). Os co-produtos desta reação é a L-citrulina (Palmer et al., 1988).

As NOS são uma família de enzimas que possuem grande homologia estrutural com o citocromo P-450 redutase (Bredt et al., 1991) e apresentam-se em três diferentes formas: duas são constitutivas (cNOS), dependentes de cálcio-calmodulina e a outra é induzível (iNOS), independente de cálcio. A

cNOS subdivide-se, por sua vez, em duas categorias: a NOS endotelial (eNOS) e neural (bNOS). A bNOS (isoforma I) apresenta peso molecular aproximado de 160 kDa, sendo encontrada no cérebro, medula espinhal, gânglios simpáticos, glândulas adrenais e neurônios nitrérgicos (Bredt et al., 1991; Nakane et al., 1993). A eNOS (isoforma III) é responsável pela manutenção do tônus da célula muscular lisa e pela adesão e agregação plaquetária (Lamas et al. 1992; Janssens et al., 1992). A iNOS (isoforma II) é encontrada em diversos tipos celulares incluindo os macrófagos, neutrófilos, células endoteliais, hepatócitos, condrócitos e células musculares lisas (Xie et al., 1992; Schulz & Triggle, 1994; Dominiczack & Bohr, 1995). Os co-fatores dinucleotídeo de flavina e adenina (FAD), nononucleotídeo de flavina (FMN), dinucleotídeo de nicotinamida e fosfato de adenina (NADPH) e tetrahidrobiopterina são requeridos pelos dois subtipos de NOS (Bredt & Snyder, 1990; Klatt et al., 1992).

Os tecidos que contêm a cNOS produzem pequenas quantidades de NO, de modo rápido e transitório, em resposta a determinados agonistas, tais como a acetilcolina ou bradicinina (endotélio vascular), glutamato (cérebro) ou colágeno (plaquetas). A síntese de NO pela iNOS ocorre lentamente, pois são necessárias várias horas para a síntese da enzima. Mas, uma vez induzida, são produzidos grandes quantidades de NO por períodos prolongados (Knowles & Moncada, 1994). A expressão da iNOS é induzida por endotoxinas e certas citocinas (IL-1, TNF- α e IFN- α), as quais podem agir individualmente ou em conjunto. Por outro lado, outras citocinas tais como IL-4, IL-8, IL-10, IL-13, TGF- β e PDGF (fator de crescimento derivado das plaquetas) inibem a indução da iNOS em certos tipos de células (Nussler & Billiar, 1993; Knowles & Moncada, 1994). Os glicocorticóides também inibem a indução da iNOS, mas não a ação da mesma na maioria dos tipos celulares (Moncada, 1992; Knowles & Moncada, 1994).

Os compostos estruturalmente análogos à L-arginina são inibidores competitivos das duas formas de NOS. Vários destes compostos já foram sintetizados e, dentre eles, destacam-se a N^G-monometil-L-arginina (L-NMMA),

N^G-nitro-L-arginina (L-NNA), N^G-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME) e N-iminoetil-L-ornitina (L-NIO; Moncada et al., 1991).

Em solução aquosa, o NO é espontaneamente oxidado em poucos minutos, gerando produtos estáveis, mas inativos, representados pelos nitritos e nitratos. Na circulação, o NO reage rapidamente com a oxihemoglobina das hemácias, formando nitrato e metahemoglobina (Wennmalm et al., 1992; Ignarro et al., 1993).

O NO tem ação sobre diferentes alvos a nível celular. Em pequenas concentrações, ativa a enzima guanilato ciclase solúvel produzindo, consequentemente, níveis intracelulares elevados de monofosfato cíclico de guanosina (GMPc). O acúmulo de GMPc altera vários processos intracelulares como, por exemplo, a ativação de canais de cálcio via proteína-quinase dependente de GMPc. O aumento dos níveis de GMPc produz o relaxamento da musculatura lisa vascular, inibição da agregação e adesão plaquetária, assim como, representa importante sinal de transdução no sistema nervoso central (Moncada et al., 1991; Ignarro, 1991). Recentemente, foi demonstrado que o NO é capaz de ativar diretamente canais de potássio dependentes de cálcio, por mecanismos independentes de GMPc (Bolotina et al., 1994).

Uma das mais importantes funções do NO (e seus produtos oxidantes) durante a reação inflamatória está relacionada aos mecanismos celulares de defesa contra microorganismos intracelulares, fungos, helmintos e células tumorais. Isto é devido à capacidade do NO de inativar enzimas necessárias para a sobrevivência dos vários microorganismos invasores (Moncada et al., 1991).

Ao lado disso, o NO tem sido também considerado como um novo mediador da reação inflamatória aguda em virtude de sua capacidade de causar vasodilatação de músculo liso vascular. De fato, um dos primeiros eventos do processo inflamatório agudo é a vasodilatação de arteríolas pré-capilares o que resulta em um aporte sanguíneo maior no leito capilar e, consequentemente, aumento do extravasamento de proteínas plasmáticas para o espaço intersticial

(Moilanen & Vapaato, 1995). Além do NO, destacam-se outros mediadores vasodilatadores envolvidos no processo inflamatório, tais como os eicosanóides (prostaciclina, PGE₂; Salmon & Higgs, 1994), o peptídeo relacionado com o gene da calcitonina (CGRP) e o peptídeo intestinal vasoativo (VIP; Barnes, 1994). Entretanto, o mecanismo pelo qual o NO controla o extravasamento de fluidos e proteínas plasmáticas para o compartimento extracelular não está totalmente esclarecido.

Na microcirculação de ratos e coelhos *in vivo*, a administração aguda de L-NMMA ou de L-NAME reduz o fluxo sanguíneo basal e/ou a formação de edema induzidos pela substância P (Hughes et al., 1990), carragenina, dextran (Ialenti et al., 1992), bradicinina, serotonina e composto 48/80 (Antunes et al., 1992; Giraldeho et al., 1994; Mariani-Pedroso et al., 1995). Estes achados sugerem que a ação antiinflamatória destes compostos decorra primariamente da redução do fluxo sanguíneo local. Resultados semelhantes foram observados em experimentos nos quais a síntese de NO em ratos foi inibida cronicamente (Medeiros et al., 1995). Neste estudo, a administração crônica de L-NAME inibiu significativamente o edema de pata induzido pela carragenina. Esta inibição foi revertida através da administração local de um vasodilatador (iloprost, um análogo estável da PGI₂).

Além de modular o fluxo sanguíneo local, acredita-se que o NO controle a permeabilidade endotelial pós-venular. Em preparações de bochecha de hamster *in vivo* observou-se que o L-NAME inibe diretamente a permeabilidade vascular acarretando redução do extravasamento proteico por mecanismos independentes do fluxo sanguíneo local (Mayhan, 1992).

A resposta inflamatória induzida por diversos estímulos é dependente de leucócitos periféricos. Leucócitos polimorfonucleares e células mononucleares sintetizam NO (Rimele et al., 1988; Salvemini et al., 1989) o qual parece ser responsável pela inibição da aderência dos leucócitos à parede das células endoteliais ao nível de vênulas pós-capilares (Kubes et al., 1991). Além disso, na microcirculação cutânea de cobaias *in vivo*, a administração local do L-NAME

inibe o acúmulo de neutrófilos e eosinófilos induzidos pelo PAF, antígenos e zimosan (Teixeira et al., 1993). Esta inibição é revertida por vasodilatadores (PGE_1 e nitroprussiato de sódio) indicando novamente que os efeitos anti-inflamatórios do L-NAME são decorrentes da redução do fluxo sanguíneo local. Por outro lado, em preparações de mesentério de gato (Kubes et al., 1991) e vênulas mesentéricas de ratos (Kurose et al., 1993), a administração aguda dos inibidores de síntese de NO aumenta marcadamente a adesão dos leucócitos ao endotélio. Em conjunto, estes resultados revelam a complexidade da regulação do processo inflamatório agudo pelo NO.

O NO é normalmente detectado no ar exalado de animais e humanos normais. Entretanto, em pacientes asmáticos, a concentração de NO exalado é marcadamente maior (Gustafsson, 1991; Persson, 1994). O NO exalado é marcadamente reduzido pela nebulização com L-NMMA e L-NAME e aumentado pela administração oral de L-arginina (Mulligan et al., 1991). Devido à limitada meia-vida do NO nos fluidos biológicos, é provável que este seja formado no sistema respiratório.

Alguns estudos sugerem que as células das vias respiratórias são capazes de produzir NO, uma vez que a iNOS é detectada em macrófagos e células epiteliais. De fato, ocorre expressão da iNOS nas células epiteliais das vias respiratórias de pacientes asmáticos (mas não naqueles de indivíduos normais; Hamid et al., 1993). Isto decorre, provavelmente, da exposição destas células às citocinas produzidas na inflamação asmática (Hamid et al., 1993). Trabalhos recentes *in vitro* mostram que macrófagos alveolares e pleurais, e fibroblastos de pulmão de ratos são capazes de produzir nitrito após ativação com endotoxina, $IFN-\gamma$ ou zimosan opsonizado (Jorens et al., 1991). Esta produção é inibida pelo L-NMMA, sugerindo novamente a possibilidade da indução da iNOS nas doenças inflamatórias das vias aéreas (Jorens et al., 1991).

As consequências fisiopatológicas da produção aumentada de NO nas vias respiratórias não são ainda conhecidas, assim como não o são seus efeitos na asma. O NO pode agir como broncodilatador endógeno, visto que inalação de altas concentrações de NO resulta em pequena resposta broncodilatadora em pacientes asmáticos (Högman et al., 1993). Isto sugere que o nível aumentado de NO pode ser benéfico na asma, contrapondo à broncoconstrição produzida por mediadores inflamatórios como o LTD₄. Por outro lado, o NO pode aumentar o fluxo sanguíneo brônquico e a exudação plasmática nas vias aéreas, podendo assim ter um efeito indesejável (Kuo et al., 1992). Desta forma, é possível que a produção de NO endógeno resulte em um efeito deletério a longo prazo e que o mesmo possa estar envolvido no acúmulo de eosinófilos, fenômeno este característico da asma e doenças alérgicas (Barnes e Liew, 1995).

OBJETIVOS

Tendo em vista a relevância do eosinófilo nas reações inflamatórias, o objetivo deste trabalho foi estudar a participação do NO na migração dos eosinófilos em reações inflamatórias alérgicas e não alérgicas. Para isto, utilizamos ratos tratados com L-NAME, por 4 semanas. Foram investigados três fenômenos:

- 1) O papel do NO na migração de eosinófilos *in vivo* induzida por carragenina, PAF, bradicinina e lipopolissacáride, utilizando o modelo de pleurisia experimental.
- 2) O papel do NO na migração de eosinófilos *in vivo* induzido por antígenos (ovalbumina) em ratos previamente sensibilizados. Neste caso, foram avaliados tanto o conteúdo celular (total e diferencial), presente no lavado broncoalveolar dos animais, como a histologia pulmonar.
- 3) O papel do NO na quimiotaxia de eosinófilos *in vitro* induzida por fMLP, PAF e soro ativado por zimosan (SAZ) utilizando, para tanto, o modelo descrito por Boyden, modificado.

2 - MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 ANIMAIS

Foram utilizados ratos Wistar machos, pesando 80-100 g no início do tratamento e 180-200 g no final do tratamento, provenientes do Centro Multiinstitucional de Bioterismo da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Os animais foram mantidos em gaiolas coletivas, em número máximo de 10 animais por unidade, no Biotério do Departamento de Farmacologia (FCM da UNICAMP), com 12 h de período diurno (das 7:00 h às 19:00 h) e com 12 h de período noturno (das 19:00 h às 7:00 h), mantidos artificialmente. Os animais serviam-se *ad libitum* de água e de ração.

2.2 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

2.2.1 Tratamento crônico com N^o-Nitro-L-arginina metil éster (L-NAME) ou D-NAME

O tratamento crônico dos ratos com L-NAME ou (D-NAME) foi realizado como descrito previamente (Ribeiro et al., 1992). Os animais receberam L-NAME ou D-NAME por via oral diluídos em água (1.2 mM), por um período de 30 dias, correspondendo a, aproximadamente, 75 $\mu\text{mol/rato/dia}$. Os animais controles receberam o mesmo volume de água, porém sem L-NAME. A ingestão diária e a evolução ponderal dos animais foram avaliados durante o período de tratamento.

Os animais tratados com L-NAME (ou D-NAME) e não tratados (controles) foram submetidos a experimentos de inflamação não alérgica (pleurisia) e alérgica (através da sensibilização com OVA). Ambos os grupos,

submetidos aos dois modelos de inflamação, foram avaliados com relação aos seguintes parâmetros:

- a) peso dos animais
- b) pressão arterial
- c) contagem de leucócitos total e diferencial no sangue periférico
- d) quimiotaxia de leucócitos *in vivo*, através de lavado pleural e lavado broncoalveolar

Os animais submetidos à inflamação alérgica foram ainda avaliados quanto à histologia pulmonar e perfusão da traquéia em cascata.

Os animais tratados e não tratados foram também submetidos a um terceiro protocolo experimental, que compreendeu a realização de quimiotaxia *in vitro* de eosinófilos obtidos da cavidade peritoneal dos ratos.

2.2.2 Avaliação do peso corporal e da pressão arterial

O peso dos animais controles e tratados foi verificado no início e no final do tratamento, utilizando-se balança digital (Metler, Suíça).

A pressão arterial da cauda foi avaliada semanalmente pelo método descrito por Zatz (1990). Para tanto, utilizou-se um manguito colocado em torno da cauda do animal o qual foi conectado a um microfone usado como sensor. O manguito foi inicialmente insuflado a um valor superior à pressão arterial do animal para, em seguida, ser desinsuflado até que as pulsações arteriais detectadas por método pletismográfico fossem visíveis ao osciloscópio. A medida da pressão arterial de cauda foi obtida estando o animal em estado de vigília, após aquecimento em gaiola especial, para que se produzisse vasodilatação da artéria caudal.

2.2.3 Contagem de leucócitos no sangue periférico

A contagem total e diferencial dos leucócitos foi feita no sangue periférico obtido da aorta abdominal dos ratos. Para a contagem dos leucócitos totais utilizou-se o contador automático de células (CELL-DYN, 1600, EUA), enquanto a contagem diferencial dos leucócitos foi determinada em esfregaços de sangue corados com May-Grunwald-Giemsa.

2.2.4 Pleurisia induzida pela bradicinina (BK), fator ativador de plaquetas (PAF), lipopolissacáride (LPS) e carragenina

Os estímulos quimiotáticos usados foram BK (50 µg/cavidade), PAF (1 µg/cavidade), LPS (0.25 µg/cavidade) e carragenina (Cg, 125 µg/cavidade). Os ratos foram anestesiados com éter. Em seguida, foi feita incisão ao nível do sexto espaço intercostal esquerdo e os músculos adjacentes dissecados. Utilizando-se agulha de 3 mm de comprimento, 0.25 ml dos estímulos quimiotáticos (ou PBS estéril) foram injetados na cavidade pleural entre a terceira e a quarta costela. As incisões foram suturadas e os animais recuperados da anestesia. Em períodos de 6, 24 e 48 h após a injeção, os animais foram exsanguinados sob anestesia com éter. O tórax foi cuidadosamente aberto e a cavidade pleural lavada com 2 ml PBS (Salina Tampão Fosfato, heparina 20 UI/ml, soro albumina bovina 0.03%). O tampão injetado foi aspirado juntamente com o exsudato e medido o volume total. Os exsudatos contaminados com sangue foram descartados. Os leucócitos foram contados em contador automático de células (CELL-DYN, 1600, EUA). A análise diferencial dos leucócitos foi determinada em microscópio óptico (lente de imersão) pela contagem de no mínimo 400 células em esfregaço preparado em citocentrífuga (Revan; Instrumentos Científicos, Brasil) e corado com May-Grunwald-Giemsa. Os resultados das contagens total e diferencial dos

leucócitos são mostrados como número de célula por lavado da cavidade pleural.

2.2.5 Sensibilização à ovalbumina e desafio antigênico

Os animais tratados com L-NAME (ou D-NAME) e não tratados (controles) foram sensibilizados através da injeção subcutânea (0.15 ml) de uma solução contendo 200 µg de ovalbumina (OVA - grau III, Sigma) adsorvida em 8 mg de hidróxido de alumínio, preparada em solução fisiológica. Quatorze dias após a sensibilização, estes animais receberam o desafio com OVA. Animais não sensibilizados foram usados como controle. Estes animais receberam apenas injeção de 8 mg de hidróxido de alumínio e, 14 dias após, injeção intratraqueal de OVA. Para o desafio antigênico e injeção intratraqueal de OVA, os ratos foram anestesiados com hidrato de cloral (300 mg/kg, i.p) e submetidos a uma incisão no pescoço para a injeção intratraqueal de 0.4 ml de solução fisiológica contendo OVA (2.5 mg/ml). As incisões foram suturadas imediatamente.

2.2.5.1 Lavado broncoalveolar

Os lavados broncoalveolares (LBA) foram realizados 6, 24 e 48 h após o desafio antigênico com OVA. Os animais foram reanestesiados (hidrato de cloral, 300 mg/kg, i.p) e exsanguinados pela transecção da aorta abdominal. A região do pescoço foi reaberta e a traquéia canulada com auxílio de um tubo de polietileno (1 mm de diâmetro). O LBA foi realizado com 25 ml de tampão PBS heparinizado (20 U/ml) e enriquecido com albumina bovina (0.03%), à temperatura ambiente. O PBS foi injetado e cuidadosamente aspirado em 4 alíquotas, sendo a primeira de 10 ml e as demais de 5 ml. O material recolhido foi centrifugado a 1000 g, por 10 minutos à 20°C em centrífuga Hermle (modelo Z 360 K, Alemanha) e o resíduo celular ressuspenso em PBS. A contagem do

número total de leucócitos foi feita em contador automático de células (CELL-DYN, 1600, EUA). A análise diferencial dos leucócitos foi determinada em microscópio óptico (lente de imersão) pela contagem de no mínimo 400 células em esfregaço preparado em citocentrífuga (Revan - Instrumentos Científicos, Brasil) e corado com May-Grunwald-Giemsa. Os resultados das contagens total e diferencial dos leucócitos são mostrados como número de célula por lavado broncoalveolar.

2.2.5.2 Fixação e processamento dos pulmões para microscopia de luz

pós anestesia com hidrato de cloral (300 mg/kg, i.p), o tórax dos animais foi aberta e os pulmões retirados e fixados em mistura contendo paraformaldeído (4%) e glutaraldeído (0.5%) em tampão fosfato salina 0.1 M pH 7.4. Em um período de no mínimo 24 h após a fixação o material foi recortado em fragmentos de aproximadamente 0.5 x 0.5 x 0.5 cm e a seguir desidratados em concentrações crescentes de etanol de 70 a 100%. Os fragmentos foram, então, diafanizados em xilol e incluídos em parafina. Os cortes de 5 µm de espessura foram corados pela hematoxilina-eosina e examinados em microscópio óptico.

2.2.5.3 Perfusão de traquéia em cascata

Os ratos foram anestesiados com hidrato de cloral (300 mg/kg, i.p). As traquéias foram retiradas e imediatamente colocadas em solução de Krebs. Em seguida, foram cortadas em segmentos de forma espiral de 2-3 cm. Os segmentos foram montados em cascata (Vane, 1964) sob tensão de 1.2 g, perfundidos com solução de Krebs-Ringer aquecida a 37°C e aerados com 95% O₂ e 5% CO₂. Os tecidos foram ligados à alavancas auxotônicas conectadas a transdutores isotônicos (Harvard) para músculo liso. As respostas foram registradas em polígrafo de 6 canais (Watanabe, WR 3101). Após estabilização

dos tecidos (90 min), os mesmos foram continuamente infundidos (0.1 ml/min) com indometacina (6 μ M), com o objetivo de inibir a produção endógena de prostaglandinas. A sensibilidade dos transdutores foi ajustada para produzir contrações de magnitudes similares, usando-se o KCl (10-100 μ mol). A acetilcolina (ACh - 6 e 18 nmol) e a OVA (30 μ g) foram administrados sob a forma de bolus (10-100 μ l).

2.2.6 OBTENÇÃO DE EOSINÓFILOS DO LAVADO PERITONEAL

Os ratos foram sacrificados sob anestesia com éter etílico e exsanguinados por secção dos vasos cervicais. A cavidade peritoneal foi lavada com 20 ml de solução balanceada de Hanks (HBSS; pH 7.2) contendo heparina (20 U/ml). Os lavados peritoneais de 5 a 7 ratos foram misturados e centrifugados a 1000 g, por 18 minutos à 20°C.

Os eosinófilos obtidos da cavidade abdominal foram purificados em gradiente descontínuo de metrizamida de acordo com Vadas e cols. (1979) com algumas modificações. O metrizamida foi dissolvido em meio mínimo essencial de Eagle (MEM; pH 7.2) contendo 1mg/ml de gelatina, de modo a produzir concentrações decrescentes de solução de metrizamida (23.5, 20 e 18%). O resíduo celular, obtido após centrifugação dos lavados peritoneais, foi ressuspenso no metrizamida 18%. Em tubo cônico de polipropileno, o metrizamida 20% foi cuidadosamente colocado sobre o de 23.5% e, sobre este, o metrizamida 18% contendo as células. O tubo com o gradiente foi, então, centrifugado a 90 g, por 11 minutos, e a 1000 g, por 14 minutos, à 20°C. Após centrifugação, os eosinófilos foram coletados na interface do metrizamida 23.5% e 20%. As células foram lavadas duas vezes com MEM e ressuspendidas para a concentração final de 5×10^6 células/ml.

Para comprovar o envolvimento do óxido nítrico na migração de eosinófilos, foi realizada incubação destas células com L-arginina (5.5 mM) e D-arginina (5.5 mM) por 30 minutos, à 37°C, antes de iniciar o experimento de quimiotaxia. As células controles foram pré-incubadas apenas com o MEM.

2.2.6.1 Ensaio de quimiotaxia *in vitro*

Os ensaios de quimiotaxia foram realizados usando-se câmara de microquimiotaxia com 48 poços (Richards e McCullough, 1984). Alíquotas de 50 µl da suspensão de eosinófilos (5×10^6 células/ml) foram colocados no compartimento superior da câmara e 27 µl do agente quimiotático colocados no compartimento inferior. Os dois compartimentos foram separados com filtro de nitrato de celulose com poro de 3 µm (Nucleopore, Pleasanton, CA). A quimiotaxia espontânea foi verificada substituindo-se o agente quimiotático pelo MEM. Após incubação por 2 h em atmosfera de 5% de O₂, os filtros foram fixados em etanol absoluto, corados com hematoxilina e diafanizados pelo método descrito por Richard & McCullough (1984). A migração dos eosinófilos no interior do filtro foi determinada pelo número de células presentes em 5 campos consecutivos a 40 µm da superfície superior do filtro, usando-se microscópio óptico com objetiva de imersão. Em cada experimento, os ensaios foram feitos em triplicata.

Os agentes quimiotáticos usados foram N-formil-metionil-leucil-fenilalanina (fMLP; 5×10^{-8} M, dissolvido em MEM), PAF (10^{-8} M, dissolvido em MEM) e soro ativado com zimosan (SAZ). O SAZ foi preparado incubando-se soro humano com zimosan (1 mg/ml) por 1 h à 37°C. Após centrifugação (2000 g por 15 min, à temperatura ambiente) o sobrenadante, fonte de C_{5a}, foi aliquoteado e estocado à -20°C para uso posterior.

2.3 PROCEDÊNCIA DAS DROGAS

N^o-Nitro-L-arginina metil éster (L-NAME), D-NAME, λ -carragenina, fator ativador de plaquetas (PAF), N-formil-metionil-leucil-fenilalanina (fMLP), zimosan, bradiginina, lipopolissacáride (proveniente de *Escherichia coli*), metrizamide, L-arginina, D-arginina, ovalbumina (OVA; grau III), meio mínimo essencial de Eagle (MEM), acetilcolina e indometacina foram obtidos da Sigma Chem. Co. (St. Louis, MO, EUA).

2.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão das médias (E.P.M.) de n experimentos. Diferenças estatisticamente significantes foram determinadas utilizando-se análise de variância (ANOVA), teste t de Student não pareado ou teste de Duncan para comparações múltiplas. Valores de $p < 0.05$ foram considerados significantes.

3 - RESULTADOS

3.1 EFEITO DO TRATAMENTO CRÔNICO COM L-NAME SOBRE O GANHO PONDERAL, PRESSÃO ARTERIAL E LEUCÓCITOS PERIFÉRICOS

3.1.1 Ganho ponderal

A tabela 1 mostra que o ganho de peso corporal não diferiu significativamente entre os animais tratados com o L-NAME (75 μ mol/rato/dia, 4 semanas), D-NAME (75 μ mol/rato/dia, 4 semanas) ou água (controle).

3.1.2 Pressão arterial

O tratamento crônico dos animais com L-NAME desenvolveu hipertensão significativa quando comparada aos animais controles (não tratados) ou com os que receberam o enantiômero inativo D-NAME por 4 semanas (Tabela 1). Estes resultados confirmaram a eficácia do tratamento com L-NAME.

3.1.3 Leucócitos periféricos

O tratamento crônico dos animais com L-NAME não afetou significativamente as contagens dos leucócitos totais e diferenciais (neutrófilos, eosinófilos, linfócitos e mononucleares) do sangue periférico (Tabela 2).

Tabela 1 Peso corporal e pressão arterial de ratos tratados cronicamente com L-NAME e D-NAME. O L-NAME (n=30) foi administrado por ingestão líquida oral (água de torneira) em uma dose aproximada de 75 $\mu\text{mol/rato/dia}$, durante quatro semanas. Tratamento semelhante foi realizado para o D-NAME (n=6). O grupo controle de animais recebeu somente água de torneira (n=30). Os resultados representam a média $\pm$ E.P.M.

Tratamento	Peso Corporal (g)			Pressão Arterial (mmHg)	
	Antes	Depois	$\Delta\%$	Antes	Depois
Controle	112 $\pm$ 3	224 $\pm$ 4	100	106.5 $\pm$ 2.0	119.0 $\pm$ 1.6
L-NAME	115 $\pm$ 3	215 $\pm$ 3	87	105.0 $\pm$ 2.2	163.0 $\pm$ 4.8*
D-NAME	102 $\pm$ 3	223 $\pm$ 4	119	104.6 $\pm$ 2.0	124.0 $\pm$ 3.2

*p<0.05 comparado com a pressão arterial antes do tratamento.

Tabela 2 Efeito do L-NAME sobre o conteúdo dos leucócitos periféricos. O L-NAME (75 $\mu\text{mol/rato/dia}$) foi administrado na ingesta líquida oral (água de beber) por 4 semanas. Os animais controles receberam somente água de torneira. Os resultados representam a média $\pm$ E.P.M. de 5-6 ratos.

Leucócitos Periféricos ($\times 10^3/\mu\text{l}$)		
Leucócitos	Controle	L-NAME
Total	6.08 ± 1.0	5.6 ± 0.7
Neutrófilos	0.58 ± 0.1	0.62 ± 0.1
Eosinófilos	0.02 ± 0.01	0.09 ± 0.03
Linfócitos	4.99 ± 0.9	4.75 ± 0.6
Monócitos	0.49 ± 0.14	0.14 ± 0.03

3.2 INFILTRAÇÃO PLEURAL DE LEUCÓCITOS INDUZIDA POR BK, PAF, CARRAGENINA E LPS

3.2.1 Animais não tratados

O número de leucócitos totais presentes no lavado pleural de ratos controles (não tratados) injetados apenas com PBS (2 ml) foi de $3.3 \pm 0.8 \times 10^6$ células/lavado da cavidade pleural (n=6), sendo que 97% ($3.2 \pm 0.7 \times 10^6$ células/cavidade), consistiu de células mononucleares.

A tabela 3 mostra que a injeção intrapleural de BK (50 µg), PAF (1 µg) e carragenina (125 µg) induziu migração significativa de leucócitos totais em relação aos animais injetados com PBS. O infiltrado leucocitário máximo em resposta a esses três estímulos ocorreu 6 h após a injeção (Tabela 3). O LPS (0.25 µg) também induziu infiltração leucocitária significativa cujo pico ocorreu em 24 h (Tabela 3). A infiltração leucocitária em 6 h foi composta principalmente de neutrófilos, enquanto que em 24 h consistiu, essencialmente, de células mononucleares/mastócitos. A migração de eosinófilos induzida por BK, carragenina e LPS foi máxima em 24 h. O pico de migração de eosinófilos induzida pelo PAF ocorreu em 24-48 h (Tabela 3). Assim, no sentido de investigar os efeitos do tratamento crônico do L-NAME sobre o influxo pleural de eosinófilos, selecionamos, para os próximos experimentos, o tempo de 24 h após a injeção dos estímulos.

Tabela 3 Migração de leucócitos induzida por injeção intrapleural de bradicinina (BK; 50 µg), fator ativador de plaquetas (PAF; 1 µg), carragenina (Cg; 125 µg) e lipopolissacáride (LPS; 0.25 µg). O número de leucócitos totais, neutrófilos (NE), eosinófilos (EO) e células mononucleares/mastócitos (MN/MT) foram avaliados em 6, 24 and 48 h após cada injeção. Os resultados representam a média ± E.P.M. de seis ratos.

Leucócitos (x10 ⁶ /cavidade)					
Agente	Tempo (h)	Total	NE	EO	MN/MT
BK	6	68.4 ± 13.1	48.4 ± 13.4	0	20.0 ± 3.0
	24	45.6 ± 3.8	8.4 ± 1.4	7.2 ± 1.3	30.0 ± 2.5
	48	14.0 ± 2.4	0	1.6 ± 0.3	12.4 ± 2.0
PAF	6	43.9 ± 4.0	23.8 ± 3.0	1.34 ± 0.5	18.8 ± 2.0
	24	36.0 ± 4.7	12.8 ± 1.2	4.8 ± 0.7	18.4 ± 3.2
	48	20.2 ± 2.8	0.2 ± 0.1	6.0 ± 1.5	14.0 ± 1.9
Cg	6	72.6 ± 6.0	53.4 ± 6.6	0.5 ± 0.3	18.7 ± 2.5
	24	76.0 ± 3.7	32.8 ± 4.8	5.9 ± 0.8	37.3 ± 5.0
	48	21.1 ± 0.5	1.1 ± 0.4	3.1 ± 0.5	16.9 ± 0.5
LPS	6	48.1 ± 12.7	30.7 ± 3.7	0.8 ± 0.38	16.6 ± 2.87
	24	85.8 ± 15.0	15.1 ± 3.4	19.9 ± 3.0	50.8 ± 11.8
	48	22.8 ± 1.5	0	10.2 ± 1.4	12.6 ± 1.3

3.2.2 Efeito do tratamento crônico com L-NAME sobre a migração pleural de leucócitos

A Tabela 4 mostra que a infiltração leucocitária total (24 h) induzida por BK e LPS foi reduzida em aproximadamente 40-50% nos ratos tratados cronicamente com L-NAME (75 μ mol/rato/dia, 4 semanas). Na pleurisia induzida por BK, o tratamento crônico com L-NAME determinou inibição significativa do recrutamento de células mononucleares/mastócitos e neutrófilos (Tabela 4). Resposta semelhante foi observada com o LPS onde o número absoluto de células mononucleares/mastócitos e neutrófilos foi marcadamente reduzido nestes animais (Tabela 4). Ao contrário destes agentes quimiotáticos, o recrutamento de células totais pelo PAF (24 h) não foi significativamente modificado pelo tratamento crônico com o L-NAME. O acúmulo de neutrófilos e de células mononucleares/mastócitos induzido pelo PAF também não foi significativamente diferente entre os grupos de animais controles e tratados com L-NAME (Tabela 4). Do mesmo modo, o tratamento crônico com o L-NAME não modificou a migração leucocitária total e o número absoluto de neutrófilos e células mononucleares/mastócitos quando a carragenina foi usada como agente quimiotático (Tabela 4).

O tratamento crônico com D-NAME (75 μ mol/rato/dia, 4 semanas) não alterou significativamente o influxo de leucócitos induzido por BK (Tabela 5).

Tabela 4 Migração de leucócitos totais, neutrófilos, células mononucleares/mastócitos induzida por injeção intrapleural de bradicinina (BK; 50 μ g), lipopolissacáride (LPS; 0.25 μ g), fator ativador de plaquetas (PAF; 1 μ g) e carragenina (Cg; 125 μ g) em animais controles (não tratados) e tratados com L-NAME (75 μ mol/rato/dia, quatro semanas). O número de leucócitos totais, neutrófilos (NE), células mononucleares/mastócitos (MN/MT) foram avaliados 24 após cada injeção. Os resultados representam a média $\pm$ E.P.M. de seis animais.

Leucócitos ($\times 10^6$ /cavidade)						
Agente	Total		NE		MN/MAST.	
	Controle	L-NAME	Controle	L-NAME	Controle	L-NAME
BK	15.9 $\pm$ 2.6	9.2 $\pm$ 0.7*	0.8 $\pm$ 0.2	0.0*	11.9 $\pm$ 1.6	8.2 $\pm$ 0.7*
LPS	21.9 $\pm$ 3.8	11.8 $\pm$ 0.5*	4.0 $\pm$ 1.3	2.0 $\pm$ 0.3*	15.9 $\pm$ 2.5	8.6 $\pm$ 0.3*
PAF	10.9 $\pm$ 1.5	8.3 $\pm$ 0.8	0.4 $\pm$ 0.04	0.08 $\pm$ 0.04	8.2 $\pm$ 1.5	7.4 $\pm$ 0.6
Cg	75.4 $\pm$ 3.6	78.1 $\pm$ 6.0	32.6 $\pm$ 4.8	42.1 $\pm$ 3.0	37.0 $\pm$ 5.0	34.0 $\pm$ 3.6

*p<0.05 comparado com os valores de seus respectivos controles.

Tabela 5 Ausência de efeito do D-NAME (75 $\mu\text{mol/rato/dia}$, quatro semanas) na pleurisia induzida por bradicinina (BK; 50 μg). A contagem total e diferencial dos leucócitos (neutrófilos, NE; eosinófilos, EO e células mononucleares/mastócitos, MN/MT) foi realizada 24 h após a injeção de BK. Os resultados representam a média $\pm$ E.P.M. de seis ratos.

Leucócitos ($\times 10^6/\text{cavidade}$)				
Tratamento	Total	NE	EO	MN/MT
Controle	15.6 ± 2.5	0.8 ± 0.3	1.8 ± 0.5	13.0 ± 2.0
D-NAME	14.0 ± 2.6	1.6 ± 0.6	1.4 ± 0.4	11.0 ± 2.0

3.2.3 Efeito do tratamento crônico com L-NAME na migração pleural de eosinófilos induzida por BK, PAF, carragenina e LPS

Nos animais tratados cronicamente com L-NAME, observou-se uma inibição significativa ($p < 0.05$) da migração de eosinófilos para a cavidade pleural em resposta a todos os estímulos utilizados (Figura 1).

A migração de eosinófilos induzida por BK nos animais tratados cronicamente com D-NAME não apresentou valores significativamente diferentes em relação àqueles do grupo controle (Tabela 5).

3.3 INFLAMAÇÃO DAS VIAS RESPIRATÓRIAS INDUZIDAS POR OVA

Para verificar se o tratamento crônico com L-NAME influenciava o desenvolvimento de reações alérgicas nas vias respiratórias após o desafio antigênico, foram utilizados ratos controles (não tratados) e ratos tratados cronicamente com L-NAME ($75 \mu\text{mol/rato/dia}$, 4 semanas), sensibilizados com OVA ($200 \mu\text{g}$). A migração leucocitária para a cavidade broncoalveolar foi determinada pela contagem do número de células total e diferencial (neutrófilo, eosinófilo e células mononucleares) no LBA destes animais.

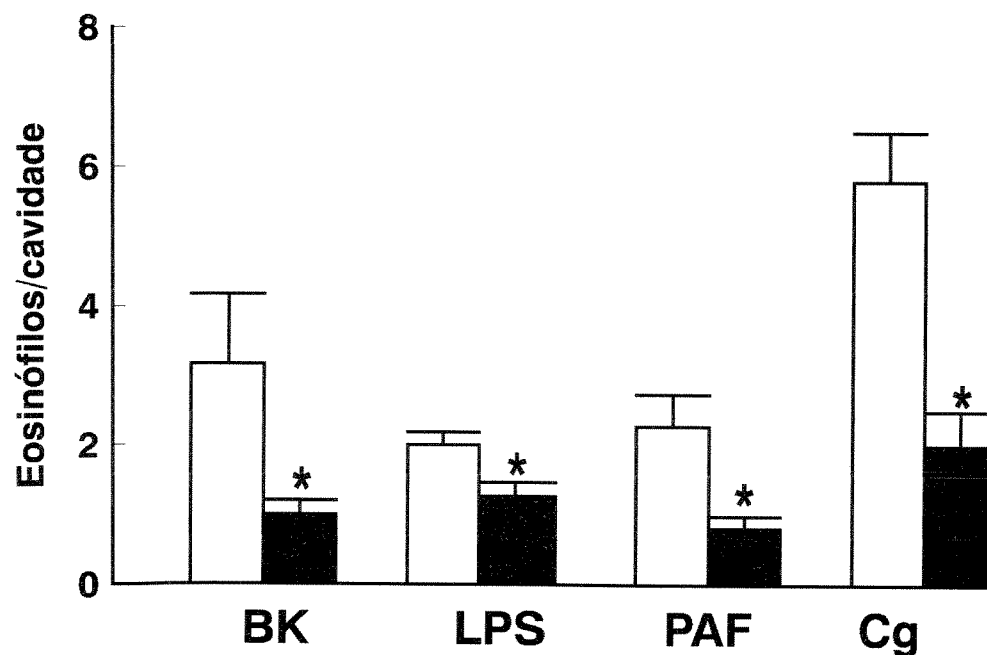


Figura 1. Efeito do tratamento crônico com L-NAME (75 μ mol/rato/dia, quatro semanas) no recrutamento pleural de eosinófilos (24 h) induzido pela bradicinina (BK, 50 μ g), lipoplissacáride (LPS, 0.25 μ g), fator ativador de plaqueta (PAF, 1 μ g) e carragenina (Cg, 125 μ g). As colunas abertas e sólidas representam o número de eosinófilos observados nos animais não tratados e tratados com L-NAME, respectivamente. Cada coluna representa a média $\pm$ E.P.M. de seis ratos. * $P < 0.05$ quando comparado com os valores dos controles.

3.3.1 Reatividade da traquéia à OVA

O experimento de perfusão de segmentos da traquéia em cascata apresentou como objetivo comprovar a eficácia da sensibilização dos animais pela OVA e verificar se o L-NAME afetava a sensibilização *per se*.

A Figura 2 mostra que somente os segmentos de traquéias provenientes de animais sensibilizados foram capazes de contrair em resposta à OVA (10 µg). O L-NAME não modificou a resposta contrátil à OVA, indicando que o mesmo não interfere no processo de sensibilização dos animais (Figura 2).

3.3.2 Efeito da sensibilização com OVA na pressão arterial dos ratos tratados cronicamente com L-NAME

A pressão arterial inicial não apresentou diferença significativa entre os grupos de ratos não tratados (controle) e dos ratos tratados cronicamente com L-NAME (Tabela 6). Ao final do tratamento com L-NAME, foi verificado aumento significativo da pressão arterial nos ratos tratados sendo que o aumento da pressão foi de magnitude similar para o grupo de animais não sensibilizados e sensibilizados. A sensibilização com OVA não modificou a pressão arterial dos ratos não tratados com L-NAME (Tabela 6).

Tabela 6 Pressão arterial de ratos não sensibilizados (NS) ou sensibilizados com OVA (S), não tratados (controle) e tratados cronicamente com L-NAME (75 $\mu\text{mol/rato/dia}$, quatro semanas). A pressão arterial inicial foi avaliada antes do início do tratamento. A pressão final foi verificada 4 semanas depois do início do tratamento, quatorze dias após a sensibilização com OVA (200 μg). Os resultados representam a média $\pm$ E.P.M. de seis animais.

Tratamento	Pressão arterial (mmHg)		
	Inicial	Final	
		NS	S
Controle	111 $\pm$ 3.1	126 $\pm$ 1.3	125 $\pm$ 1.5
L-NAME	105 $\pm$ 1.9	139 $\pm$ 5.6*	148 $\pm$ 3.9*

*p<0.05 comparado com o controle.

3.3.3 Número de leucócitos no LBA de animais não tratados

O número de leucócitos totais no lavado broncoalveolar (LBA) dos animais controle (não tratados) que não foram sensibilizados ou desafiados com OVA foi de $1.2 \pm 0.36 \times 10^6$ leucócitos/LBA (n=8), sendo que as células mononucleares constituíram 99.8% das células totais.

Nos animais não sensibilizados, verificamos que a injeção intratraqueal de OVA (200 µg) evocou discreto infiltrado celular, principalmente no período de 24 h após o desafio com 1 mg de OVA (Tabela 7). Esse infiltrado foi constituído principalmente por neutrófilos e células mononucleares (Tabela 7).

No intervalo de 6 h após o desafio intratraqueal com OVA, em ratos previamente sensibilizados com esta substância, não observamos diferenças significativas no influxo de leucócitos totais, neutrófilos e células mononucleares para a cavidade broncoalveolar em relação aos animais não sensibilizados (Tabela 7, Figura 3). Em 24 h observou-se, no LBA de ratos sensibilizados, aumento significativo no número de leucócitos totais em relação aos animais não sensibilizados (Tabela 7, Figura 3). Este aumento foi causado pelo maior influxo de neutrófilos e pelo início da migração do eosinófilo para o pulmão (Tabela 7, Figura 3). Em 24 h, o número de células mononucleares não foi significativamente diferente dos animais não sensibilizados (Tabela 7, Figura 3).

No período de 48h após o desafio, observou-se no LBA dos ratos sensibilizados que o número de leucócitos totais não se alterou em relação àquele observado em 24 h (Tabela 7). Nesse período de tempo, detectou-se infiltrado eosinofílico marcadamente maior ($p < 0.05$) do que aquele observado em 24 h (Tabela 7). Além disso, verificamos nesse período que o número de neutrófilos diminuiu em aproximadamente 50% ao passo que o número de células mononucleares manteve-se estável (Tabela 7).

Tabela 7. Contagem de leucócitos no LBA de ratos controles (não tratados) e tratados com L-NAME (75 μ mol/rato/dia, quatro semanas), não sensibilizados ou sensibilizados com OVA (200 μ g) Os números de leucócitos totais, neutrófilos (NE), eosinófilos (EO) e células mononucleares foram avaliados 6, 24 e 48 h após injeção intratraqueal com OVA (1 mg). Os resultados representam a média $\pm$ E.P.M. de 5 a 14 animais.

Leucócitos ($\times 10^6$ /BAL)					
Tratamento	Intervalo (h)	TOTAL	NE	EO	MN
CONTROLES					
Não sensibilizados	6	2.07 ± 0.4	0.05 ± 0.0	0	2.02 ± 0.4
	24	3.88 ± 0.3	0.38 ± 0.1	0	3.5 ± 0.3
	48	1.80 ± 0.5	0	0	1.8 ± 0.5
Sensibilizados	6	2.78 ± 0.3	0.07 ± 0.0	0	2.71 ± 0.3
	24	$5.98 \pm 1.6^*$	$1.74 \pm 0.6^*$	$0.58 \pm 0.1^*$	3.66 ± 1.0
	48	$6.9 \pm 1.2^*$	$0.8 \pm 0.3^*$	$2.3 \pm 0.4^{*+}$	3.8 ± 0.8
L-NAME					
Não sensibilizados	6	2.89 ± 0.4	0.06 ± 0.0	0	2.83 ± 0.4
	24	3.22 ± 0.7	0.47 ± 0.1	0.01 ± 0.0	2.74 ± 0.6
	48	2.69 ± 0.6	0.1 ± 0.0	0	2.59 ± 0.6
Sensibilizados	6	2.93 ± 0.2	0.13 ± 0.0	0	2.8 ± 0.2
	24	$6.03 \pm 1.6^*$	$1.53 \pm 0.6^*$	$0.47 \pm 0.1^*$	4.03 ± 1.1
	48	$3.75 \pm 1.0^{\#}$	0.55 ± 0.3	$0.76 \pm 0.3^{* \#}$	2.44 ± 0.3

* $p < 0.05$ comparado com os respectivos valores dos animais não sensibilizados.

$\#p < 0.05$ comparado com os respectivos valores dos animais sensibilizados, controles (não tratados).

$^+p < 0.05$ comparado com o valor de 24 h, animais sensibilizados.

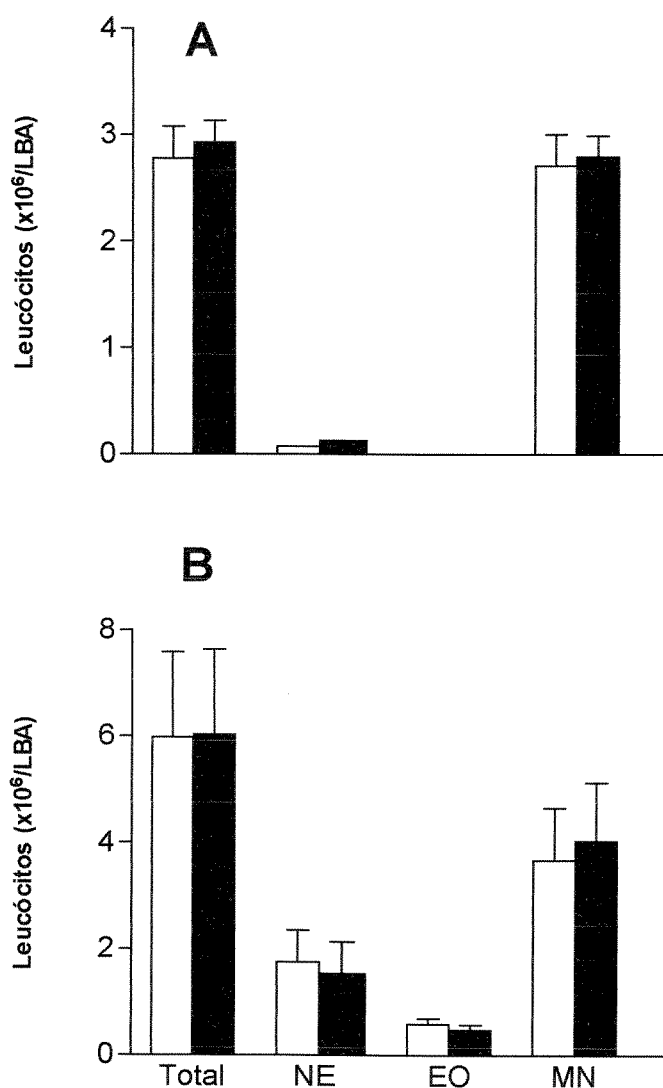


Figura 3. Efeito do tratamento crônico com L-NAME (75 μ mol/rato/dia, quatro semanas) no número de leucócitos no LBA de ratos sensibilizados com OVA (200 μ g). Os números de leucócitos totais, neutrófilos (NE), eosinófilos (EO) e células mononucleares (MN) foram avaliados 6 (A) e 24 h (B) após injeção intratraqueal com OVA (1 mg). As colunas abertas e fechadas representam, respectivamente, os valores observados para os ratos controles (não tratados) e tratados com L-NAME. Os resultados representam a média $\pm$ E.P.M. de 6 a 13 animais.

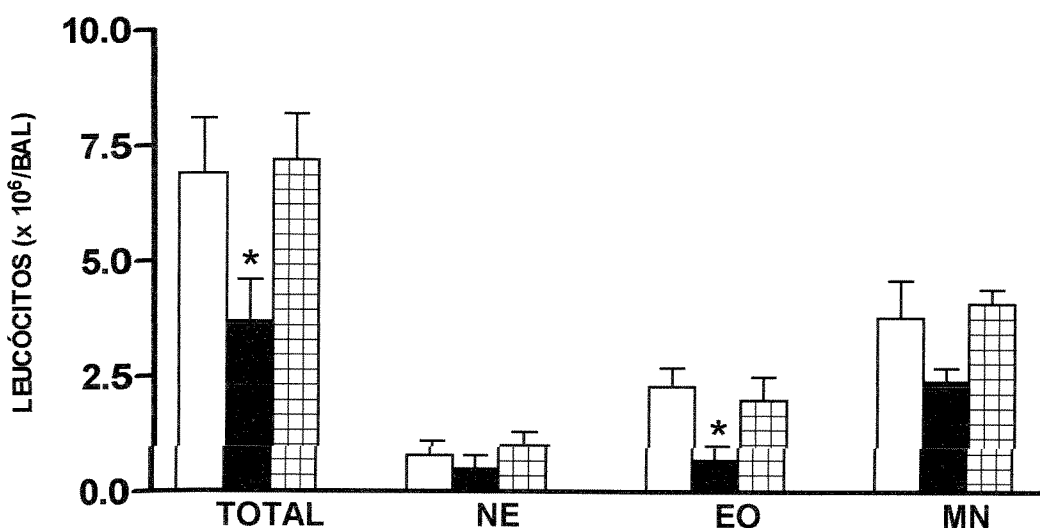


Figura 4. Efeito do tratamento crônico com L-NAME (75 $\mu\text{mol/rato/dia}$, quatro semanas) e D-NAME (75 $\mu\text{mol/rato/dia}$, quatro semanas) no número de leucócitos no LBA de ratos sensibilizados com OVA (200 μg). Os números de leucócitos totais, neutrófilos (NE), eosinófilos (EO) e células mononucleares (MN) foram avaliados 48 h após injeção intratraqueal com OVA (1 mg). As colunas abertas e fechadas representam, respectivamente, os valores observados para os ratos controles (não tratados) e tratados com L-NAME. As colunas listradas representam os valores observados para os ratos tratados com D-NAME. Os resultados representam a média $\pm$ E.P.M. de 6 a 13 animais. * $p < 0.05$ em relação aos respectivos controles.

3.3.4 Número de leucócitos no LBA de ratos tratados cronicamente com L-NAME ou D-NAME

O número de leucócitos totais no LBA dos animais tratados com L-NAME (75 $\mu\text{mol/rato/dia}$, 4 semanas) que não foram sensibilizados ou desafiados com OVA foi de $1.0 \pm 0.39 \times 10^6$ leucócitos/LBA (n=8), sendo que as células mononucleares constituíram 99.7 % das células totais.

O tratamento crônico com L-NAME não causou modificações significativas no número de leucócitos totais, neutrófilos, eosinófilos e células mononucleares, no LBA dos ratos não sensibilizados nos períodos de 6, 24 e 48 h após injeção intratraqueal com OVA (Tabela 7). Com relação aos animais sensibilizados, o tratamento crônico com L-NAME também não modificou significativamente o infiltrado leucocitário total e diferencial (neutrófilos, eosinófilos e células mononucleares) nos períodos de 6 e 24 h após o desafio (Figura 3). Entretanto, em 48 h após o desafio com OVA, o tratamento com L-NAME reduziu significativamente o influxo de leucócitos totais (Figura 4). Esta redução deveu-se sobretudo a uma diminuição significativa do influxo de eosinófilos (67% de inibição; Figura 4). O número de células mononucleares reduziu em aproximadamente 35% no grupo tratado com L-NAME, porém não detectamos diferença estatística (Figura 4). Ao contrário, o número de neutrófilos não foi alterado nos animais sob tratamento crônico com L-NAME (Figura 4).

O tratamento crônico com D-NAME (75 $\mu\text{mol/rato/dia}$, 4 semanas) não modificou significativamente a migração dos leucócitos totais e diferenciais para o LBA dos animais sensibilizados (Figura 4).

3.3.5 Histologia dos pulmões dos ratos não sensibilizados

A análise histológica em nível de microscopia de luz dos grupos controles (não sensibilizados nem desafiados com OVA), mostrou que o parênquima pulmonar dos animais não tratados e tratados cronicamente com L-NAME apresentava um padrão morfológicamente normal, sem infiltração significativa de PMNs (Figura 5).

Nos animais não sensibilizados, porém submetidos à administração intratraqueal de OVA (1 mg), observou-se tanto nos animais controles (não tratados), quanto nos tratados com L-NAME, uma pequena infiltração de PMN localizada no tecido conjuntivo que circunda os brônquios e bronquíolos. Foram observados principalmente neutrófilos nas primeiras 24 h e eosinófilos em 48 h (Figura 6).

3.3.6 Histologia dos pulmões dos ratos sensibilizados

Os animais sensibilizados e desafiados apresentaram intensa infiltração de PMN (neutrófilos e eosinófilos) e mononucleares por todo o parênquima pulmonar.

No período de 24 h após o desafio, observou-se nos pulmões dos animais sensibilizados com OVA (200 µg) uma marcante infiltração de PMN (Figura 7) em relação àquele observado nos grupos não sensibilizados (Figura 6). O infiltrado foi mais evidente nas vias aéreas dos animais controles, do que nos animais tratados com L-NAME (Figura 7). Nesses grupos, via de regra, havia um flagrante predomínio de neutrófilos enquanto que eosinófilos eram pouco observados (Figura 7C e D).

No período de 48 h após o desafio, o infiltrado de células inflamatórias foi mais proeminente nos animais controles (Figura 8A). Os PMN foram observados distribuídos por todo o parênquima pulmonar, no tecido conjuntivo que circunda os brônquios, bronquíolos e vasos sanguíneos (Figura 8A). O número de

eosinófilos também se mostrou aumentado (Figura 8C). Nos animais tratados com L-NAME houve significativa redução na infiltração de leucócitos, principalmente em relação à presença de eosinófilos no parênquima pulmonar, circundando os segmentos respiratórios (Figura 8B e D). Entretanto, os leucócitos foram francamente observados ao redor de vasos sanguíneos.

3.4 QUIMIOTAXIA DE EOSINÓFILOS *IN VITRO* INDUZIDA POR fMLP, PAF E SAZ

Os eosinófilos obtidos dos animais controles (não tratados) migraram significativamente em resposta aos estímulos quimiotáticos fMLP (5×10^{-8} M), PAF (10^{-8} M) e SAZ (27 μ l) quando comparada à migração espontânea (Figura 9). Entretanto, tais agentes quimiotáticos mostraram-se incapazes de induzir a migração dos eosinófilos quando estas células foram obtidas de animais tratados cronicamente com L-NAME (75 μ mol/rato/dia) por 4 semanas (Figura 9).

3.4.1 Efeito da L-arginina sobre a inibição da quimiotaxia de eosinófilos

A inibição da quimiotaxia dos eosinófilos induzida pelo fMLP observada nos animais tratados com L-NAME foi significativamente revertida pela L-arginina (5.5 mM), mas não pela mesma concentração de D-arginina (Figura 10). A L-arginina e a D-arginina não afetaram a quimiotaxia quando os eosinófilos foram obtidos de animais controles (12.7 ± 0.5 , 10.2 ± 0.6 e 10.7 ± 0.6 eosinófilos/campo, para as células incubadas com MEM, L-arginina e D-arginina, respectivamente. n=3).

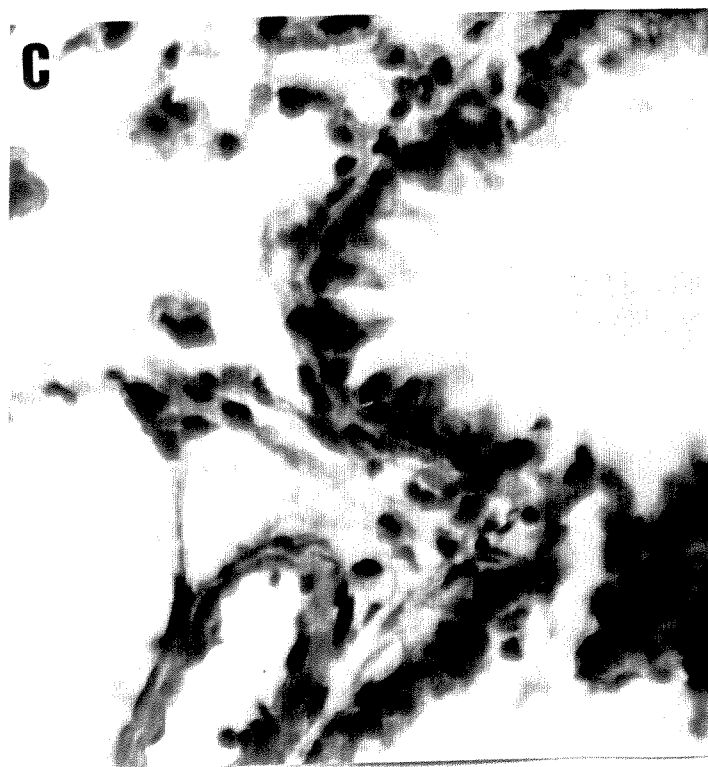
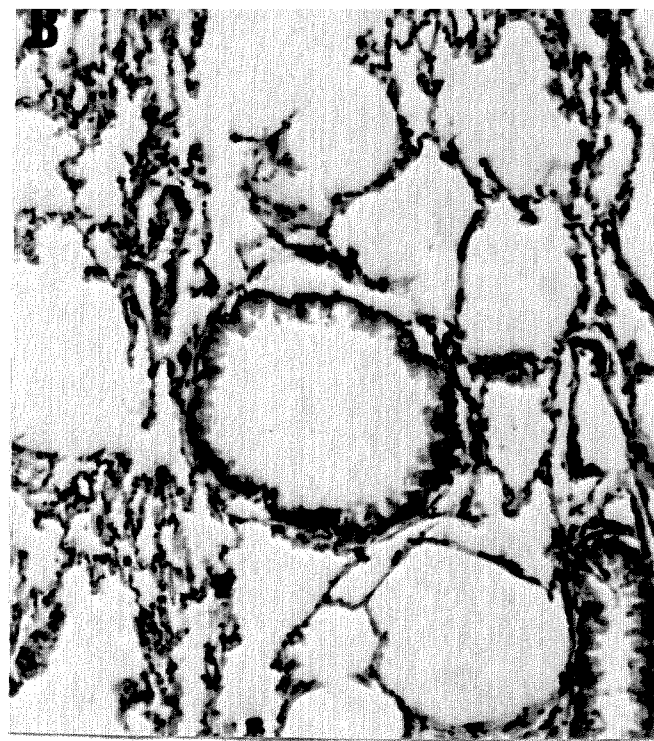
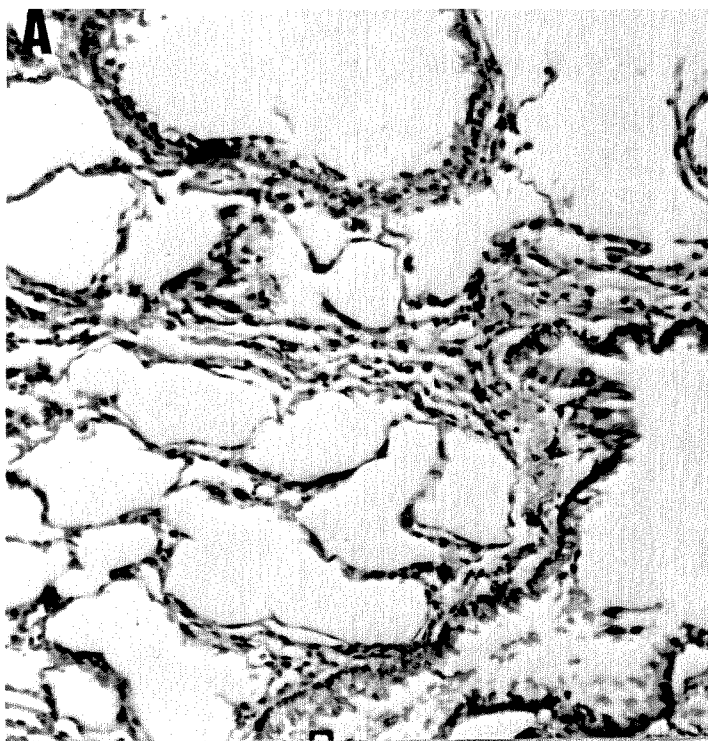


Figura 5. Corte histológico da área pulmonar de ratos não sensibilizados ou desafiados com OVA, do grupo controle (A) e do grupo tratado com L-NAME (B). Coloração HE, 160x. C e D: detalhe do corte histológico mostrado em A e B, respectivamente (640x).

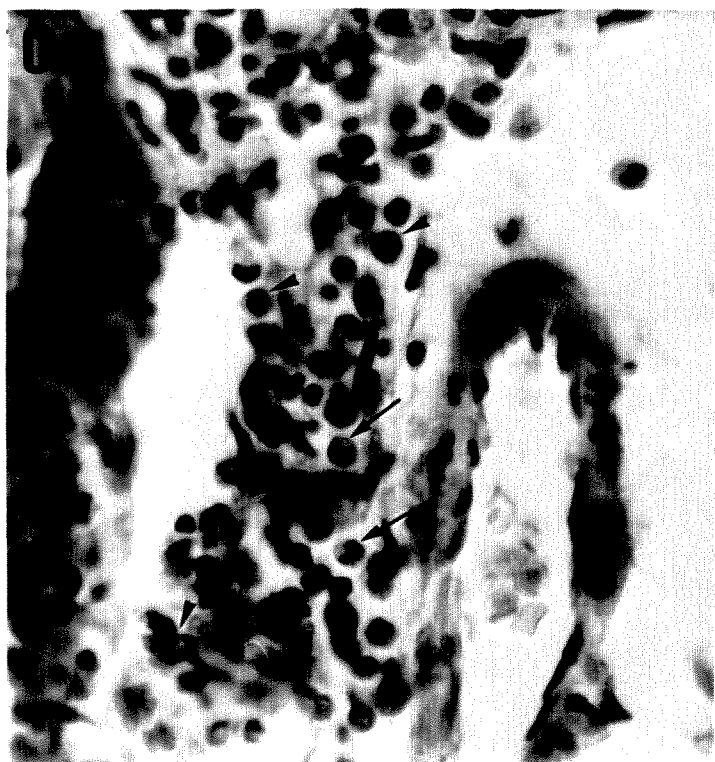
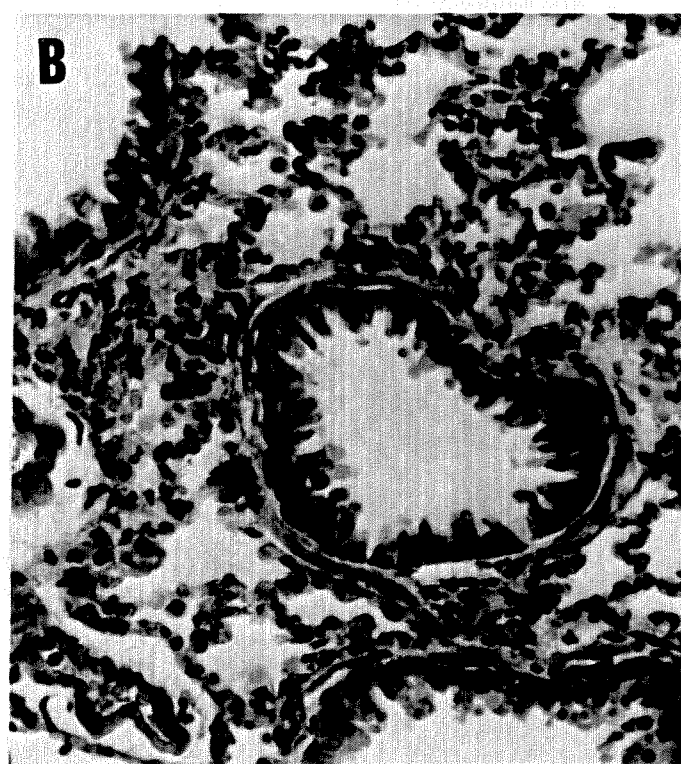


Figura 6. Corte histológico da área pulmonar de ratos não sensibilizados, 48 h após injeção intratraqueal com OVA. A - grupo controle. B - grupo tratado com L-NAME. Coloração HE, 320x. C e D: detalhe do corte histológico mostrado em A e B, respectivamente (640x). Notar a presença de infiltrado de neutrófilos (▲) e eosinófilos (↑) ao redor dos bronquíolos.

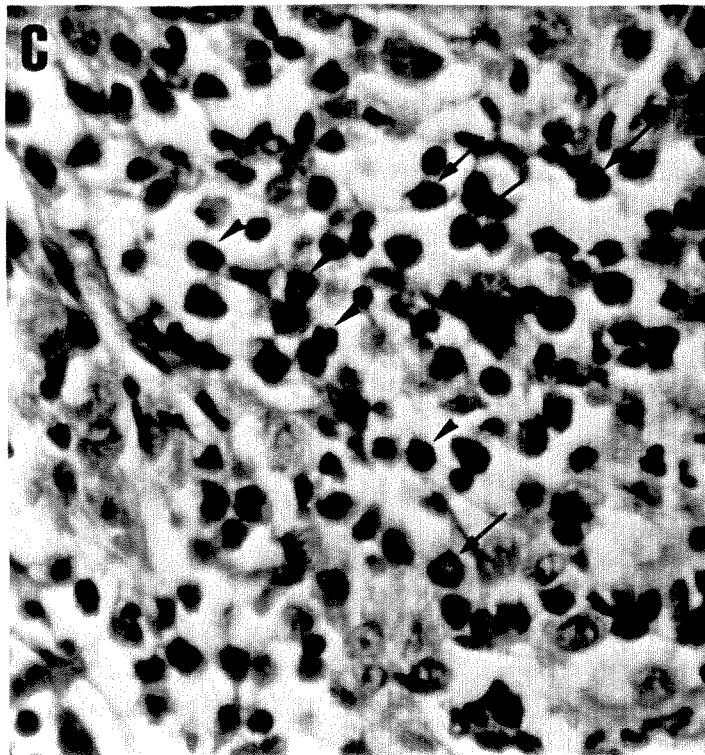
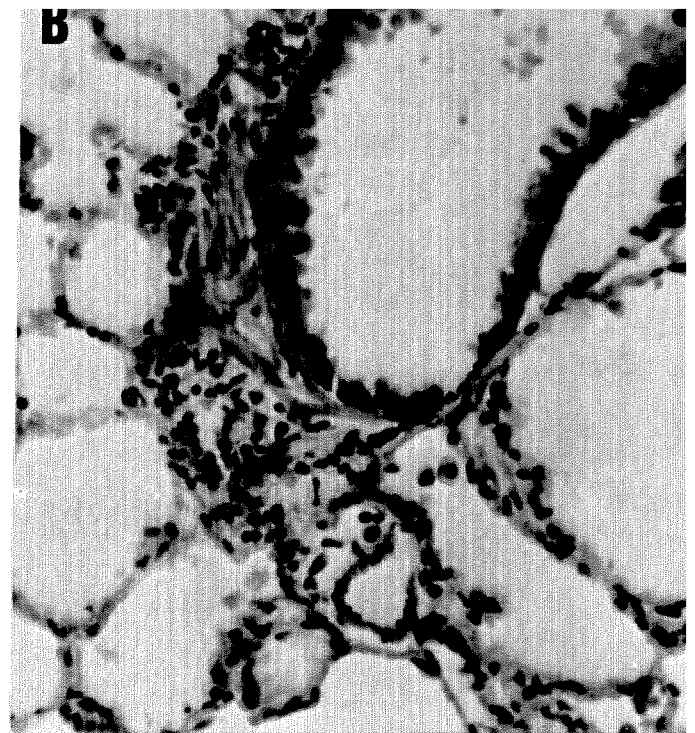
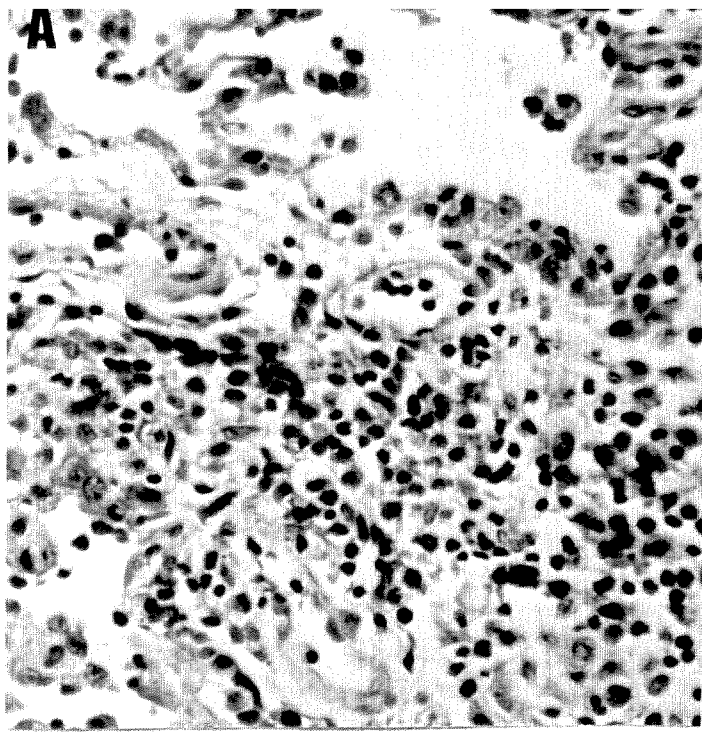


Figura 7. Corte histológico da área pulmonar de ratos sensibilizados 24 h após desafio com OVA. A - grupo controle. B - grupo tratado com L-NAME. Coloração HE, 320x. C e D: detalhe do corte histológico mostrado em A e B, respectivamente (640x). Notar a presença de infiltrado de neutrófilos (▲) e eosinófilos (↑) ao redor dos bronquíolos e a redução da infiltração de PMN nos ratos tratados com L-NAME.

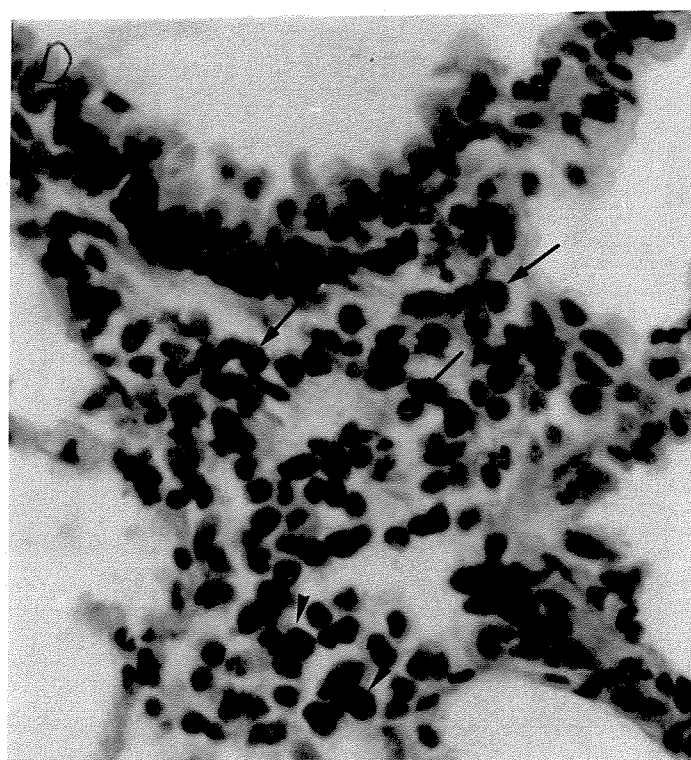
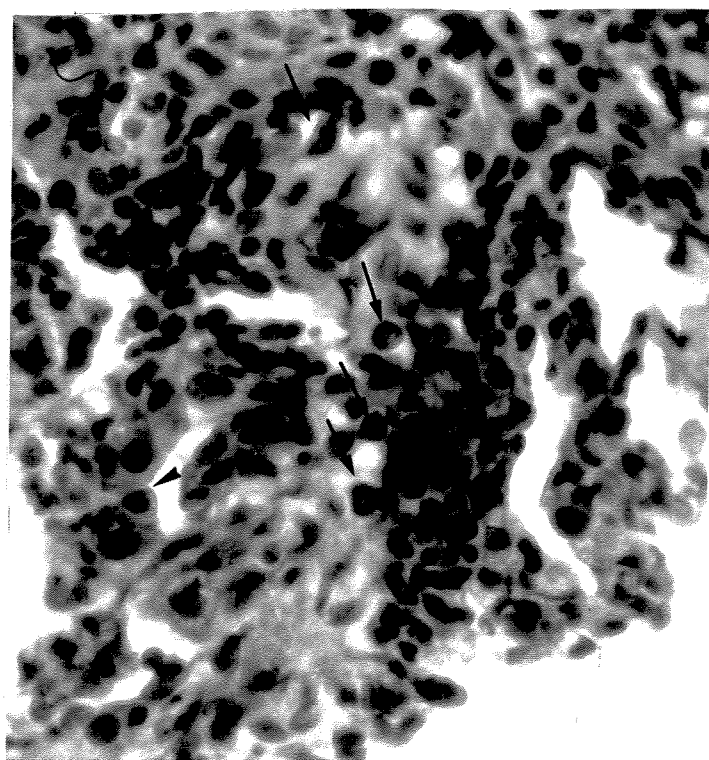
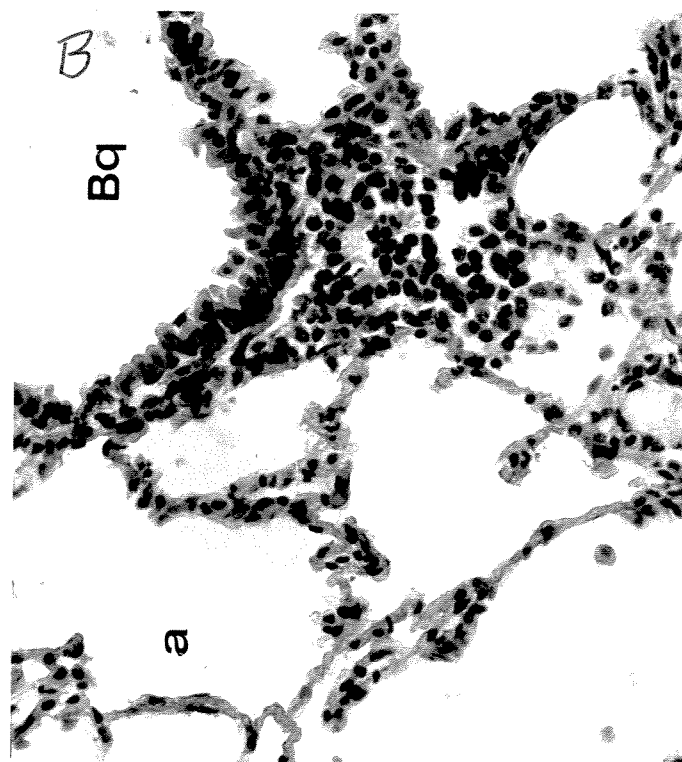
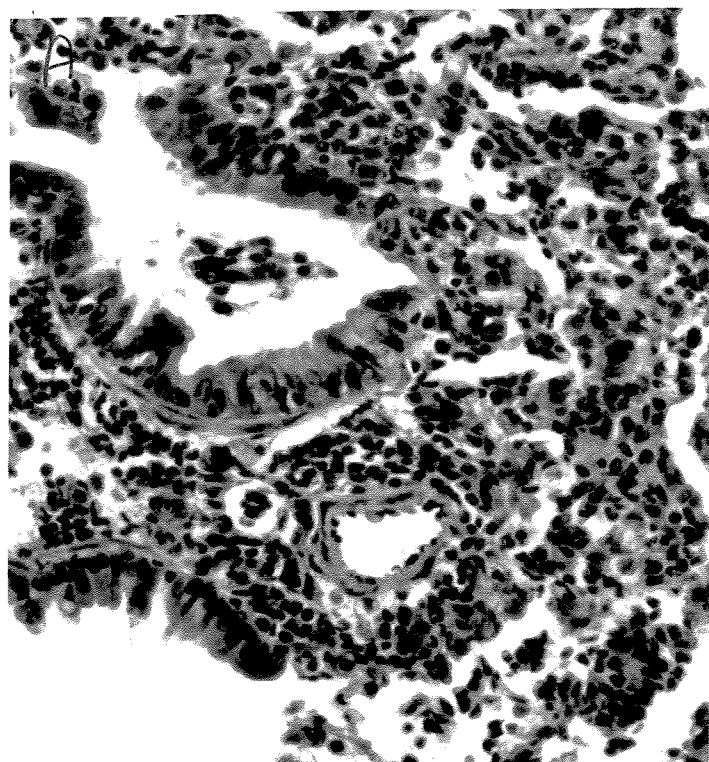


Figura 8. Corte histológico da área pulmonar de ratos sensibilizados 48 h após desafio com OVA. A - grupo controle. B - grupo tratado com L-NAME. Coloração HE, 320x. C e D: detalhe do corte histológico mostrado em A e B, respectivamente (640x). Notar a presença de intenso infiltrado de neutrófilos (▲) e eosinófilos (↑) ao redor dos bronquíolos e a redução da infiltração de PMN nos ratos tratados com L-NAME.

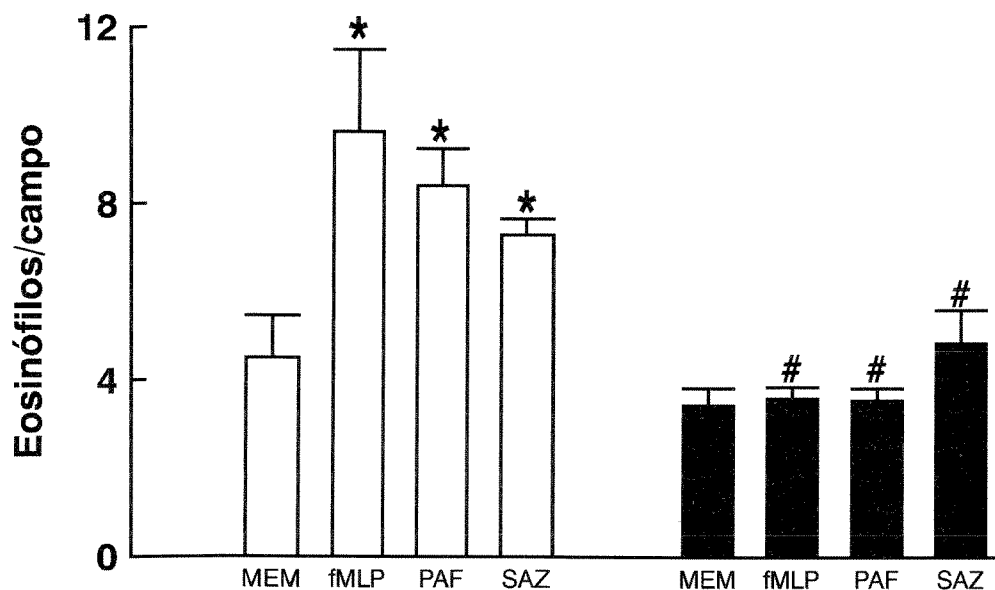


Figura 9. Efeito do tratamento crônico com L-NAME sobre a quimiotaxia de eosinófilos *in vitro* induzida pelo fMLP (5×10^{-8} M), PAF (10^{-8} M) e SAZ ($27 \mu\text{l}$). As colunas abertas representam a quimiotaxia de eosinófilos provenientes de animais controles (não tratados). As colunas sólidas representam a quimiotaxia de eosinófilos provenientes de animais tratados com L-NAME ($75 \mu\text{mol/rato/dia}$), por quatro semanas. Cada experimento foi feito em triplicata. A quimiotaxia está expressa como média do número de células migradas por campo a $40 \mu\text{m}$ da superfície superior do filtro. Os resultados estão expressos como média $\pm$ E.P.M. ($n=3$). * $P < 0.05$ comparada com a migração espontânea (somente MEM). # $P < 0.05$ comparado com a resposta quimiotática dos eosinófilos dos ratos não tratados.

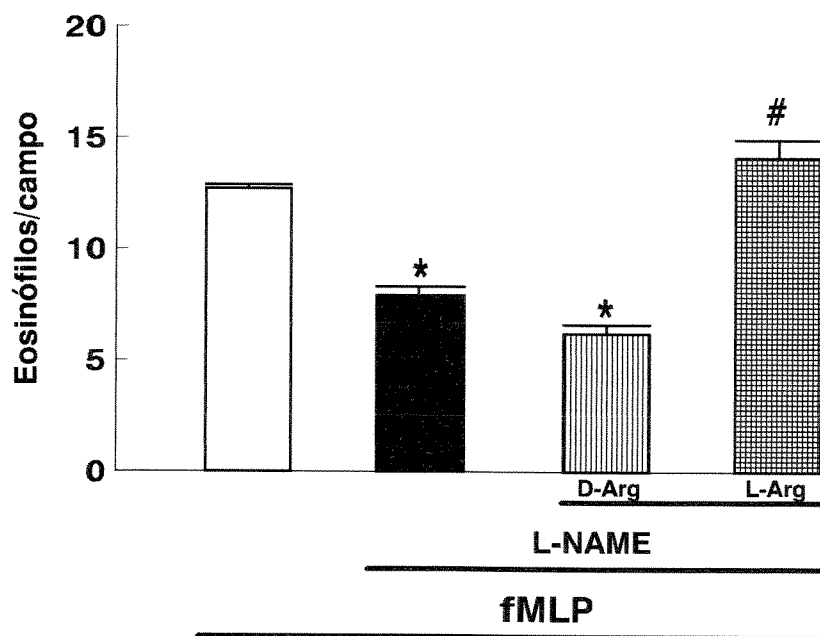


Figura 10. Efeito da L-arginina (e D-arginina) sobre o efeito inibitório do L-NAME na quimiotaxia *in vitro* de eosinófilos induzida pelo fMLP(5×10^{-8} M). As colunas vazias e sólidas representam a quimiotaxia de eosinófilos de ratos controles e tratados com L-NAME (75 μ mol/rato/dia, quatro semanas), respectivamente. As colunas listrada e quadriculada representam os efeitos da D-arginina (5.5 mM) e L-arginina (5.5 mM), respectivamente. Cada experimento foi realizado em triplicata. A quimiotaxia está expressa com a média do número de células que migraram por campo a 40 μ m da superfície do filtro. Os resultados são mostrados como média $\pm$ E.P.M. (n=3). *P<0.05 comparada com a quimiotaxia de eosinófilos dos animais controles (não tratados). #P<0.05 comparado à quimiotaxia de eosinófilos dos animais tratados com L-NAME.

4 - DISCUSSÃO

Os leucócitos desempenham papel importante na defesa do organismo durante a resposta inflamatória, quando migram da microcirculação para os tecidos. Os neutrófilos e eosinófilos estão presentes no estágio inicial da reação inflamatória, enquanto as células mononucleares participam, principalmente, na fase tardia desta reação. Os eosinófilos são importantes células inflamatórias associadas com asma, doenças alérgicas e reação imune contra parasitas helmínticos. A resposta celular à lesão tecidual compreende a aderência dos leucócitos ao endotélio das vênulas pós-capilares (marginação leucocitária), migração das células aderentes para o exterior do vaso através de junções interendoteliais (diapedese), deslocamento no sítio extravascular (quimiotaxia) e subsequente acúmulo no sítio da lesão (Moqbel, 1994). A dinâmica do influxo celular para o local inflamado não está totalmente esclarecida, podendo ser regulada por diferentes fatores de origem celular e pela expressão de moléculas de adesão no endotélio bem como pelas próprias células envolvidas na inflamação (Moqbel, 1994). Portanto, o aparecimento dos diferentes tipos de leucócitos no local da inflamação parece ser devido à modulação gradativa da expressão das moléculas de adesão ao longo do tempo, assim como, à liberação de fatores solúveis que medeiam a quimiotaxia, sendo ambos específicos para cada tipo celular. Os mecanismos envolvidos neste processo têm sido objeto de diferentes estudos utilizando-se modelos de pleurisia, asma, alergia experimental e outros.

Com relação ao modelo de pleurisia, verificou-se no presente trabalho que a migração dos eosinófilos ocorre no período de 24-48 h após o estímulo intrapleural com PAF, LPS, BK e carragenina. Estes resultados, assim como aqueles observados para os neutrófilos e células mononucleares, estão de acordo com a descrição da cinética do influxo dos leucócitos para a cavidade

pleural relatado por outros autores (Silva et al., 1991; Pasquale et al., 1991; Bozza et al., 1993).

Diferentes estudos têm sido realizados na tentativa de identificar os mediadores que modulam o influxo dos leucócitos para a cavidade pleural em resposta a diversos estímulos inflamatórios. A infiltração eosinofílica intrapleural induzida pelo PAF, que ocorre 24 h após o estímulo, parece ser dependente da síntese local de um fator proteico intermediário sintetizado pelos macrófagos (Silva et al., 1991). Com relação ao LPS, Bozza et al. (1993) observou que a injeção intrapleural deste agente em ratos e camundongos induz um acúmulo de eosinófilos entre 24 e 48 h, cujo efeito é relacionado à síntese de uma proteína com peso molecular entre 10 e 50 kDA. Neste caso, os eicosanóides não participam no fenômeno, mas a depleção seletiva de linfócitos T e macrófagos residentes inibe a eosinofilia pleural (Bozza et al., 1994a). Posteriormente, os mesmos autores verificaram que a IL-5 não está envolvida na eosinofilia pleural induzida pelo LPS (Bozza et al., 1994b). Ao contrário, a IL-5, assim como o LTB₄ e a IL-8, liberados pelos mastócitos e macrófagos residentes, parecem estar envolvidos no recrutamento de eosinófilos para cavidade peritoneal de ratos em resposta a injeção de grandes quantidades de salina (Oliveira et al., 1994). Com relação à bradicinina, sabe-se que a eosinofilia induzida por este agente é dependente de formação local de LTB₄ visto que a resposta eosinofílica é suprimida em ratos tratados com inibidores da lipoxigenase (Pasquale et al., 1991). A carragenina é um derivado de alga marinha e vem sendo extensivamente utilizada como agente inflamatório visto que esta substância tem a capacidade de evocar a liberação de diversos mediadores inflamatórios tais como histamina, serotonina, cininas e prostaglandinas (Di Rosa et al., 1971). Em modelo de pleurisia, a carragenina provoca intensa neutrofilia 6 h após injeção do estímulo cujo mecanismo ainda não é conhecido (Capasso et al., 1974). Do mesmo modo, ainda não existem estudos sobre a natureza da eosinofilia tardia provocada pela carragenina na cavidade pleural de ratos.

Portanto, os mediadores envolvidos na migração dos eosinófilos podem ser diversos e nenhum deles está totalmente identificado.

No presente trabalho, observamos que o bloqueio crônico da biossíntese do NO pelo L-NAME inibiu especificamente a migração de eosinófilos para a cavidade pleural, 24 h após a injeção de BK, LPS, PAF e carragenina. Visto que a inibição foi independente do estímulo empregado, estes resultados sugerem que o NO exerce um importante papel nos mecanismos envolvidos na quimiotaxia destas células.

Os mecanismos exatos pelos quais o NO modula a resposta inflamatória não estão ainda completamente elucidados e, dependendo do tipo e da fase da resposta inflamatória, são até controversos. O papel do NO como agente antiinflamatório foi estudado nos processos de interação dos PMNs com o endotélio das vênulas pós-capilares. A inibição da produção de NO pelo L-NMMA ou L-NAME provoca um aumento significativo na adesão leucocitária da circulação mesentérica de gatos (Kubes et al., 1991) e ratos (Kurose et al., 1993) *in vivo*. Esta adesão aumentada de PMNs pelos inibidores de NO pode ser revertida por doses elevadas de L-arginina ou nitroprussiato de sódio, confirmando que tal efeito é resultado da inibição da síntese de NO (Kubes & Granger, 1992). Além disso, o processo de adesão é completamente revertido com o anticorpo monoclonal dirigido contra a molécula de adesão CD11/CD18 (Kubes et al., 1991). Por outro lado, experimentos *in vitro* mostraram que a inibição do NO provoca pouca adesão de PMNs à monocamada de células endoteliais (ou outro substrato) e que o L-NAME não causa regulação do CD11/CD18 em PMNs isolados (Kubes, 1992). Portanto, as controvérsias entre os resultados *in vitro* e *in vivo* precisam ser melhores esclarecidas para elucidar os mecanismos utilizados pelo NO como agente antiinflamatório.

Entretanto, outros estudos apontam para uma ação pró-inflamatória do NO. A administração aguda de L-NAME inibe o fluxo sanguíneo basal e o acúmulo de [^{111}In] eosinófilo induzido pela injeção intradérmica de SAZ e PAF. Este efeito inibitório é revertido pela injeção simultânea de vasodilatadores

(nitroprussiato de sódio e PGE_1), sugerindo que a redução no fluxo sanguíneo local (vasoconstrição) é o mecanismo pelo qual o L-NAME exerce seu efeito antiinflamatório na microcirculação cutânea (Teixeira et al., 1993). Mecanismo de ação semelhante foi proposto para explicar a diminuição do extravasamento de proteínas plasmáticas causada pela administração aguda (Hughes et al., 1990; Ialenti et al., 1992; Teixeira et al., 1993; Paul et al., 1994; Giraldeho et al., 1994; Mariani-Pedroso et al., 1995) ou crônica de L-NAME (Medeiros et al., 1995) em diferentes espécies de animais.

Nossos resultados demonstram claramente que o L-NAME é capaz de inibir a migração de eosinófilos. Este efeito é específico para o L-NAME, visto que o mesmo não foi verificado com o uso do enantiômetro inativo, D-NAME. No entanto, é pouco provável que a redução do infiltrado eosinofílico pleural causado pelo tratamento crônico com L-NAME seja decorrente de vasoconstrição no leito circulatório pleural. Isto é baseado nos resultados mostrando que, ao contrário do BK e LPS (onde o tratamento crônico com o L-NAME causou redução de leucócitos totais e diferenciais), o L-NAME causou uma redução seletiva de eosinófilos em resposta ao PAF e carragenina sem interferir com o número de neutrófilos e células mononucleares. Isto, aparentemente, descarta o fluxo sanguíneo local como fator importante para a inibição do infiltrado eosinofílico provocado pelo L-NAME.

Algumas evidências atuais indicam que o NO desempenha um papel relevante na regulação funcional das vias respiratórias e pode estar relacionado com doenças pulmonares (Jorens et al., 1993). O NO é produzido por uma variedade de células das vias respiratórias e está envolvido na regulação do fluxo sanguíneo brônquico e na broncodilatação (Gustafsson et al., 1991). Existem evidências de que a enzima iNO está expressa nas células epiteliais das vias respiratórias (Hamid et al., 1993). Além disso, um aumento marcante nas concentrações de NO exalado foi descrito em pacientes asmáticos, mas não em indivíduos sadios (Persson et al., 1994). No entanto, não se sabe ainda se este aumento é devido à indução da iNOS nas células epiteliais das vias

respiratórias ou à presença no trato respiratório de células inflamatórias, tais como macrófagos e mastócitos que produzem e liberam NO *in vitro* (Marletta et al., 1988; Salvemini et al., 1990).

Vários estudos clínicos correlacionam a asma com a eosinofilia, sendo que o número elevado de eosinófilos no lavado broncoalveolar e/ou no sangue periférico é indicativo da severidade da doença (Bousquet et al., 1990). Após broncoprovocação alérgica, o acúmulo preferencial desta célula nas vias respiratórias de pacientes asmáticos indica a existência de mecanismos específicos para recrutamento seletivo dos eosinófilos para o pulmão (Hansel & Walker, 1992). Estes mecanismos são complexos e envolvem a combinação de eventos locais, tais como a adesão eosinófilo-célula endotelial, migração transendotelial, quimiotaxia e a sobrevivência prolongada do eosinófilo no tecido pulmonar (Bochner et al., 1994).

Baseado nos nossos resultados que sugerem o envolvimento do NO na migração dos eosinófilos no modelo experimental de inflamação não alérgica (pleurisia), aliados aos dados de literatura que apontam para uma correlação importante entre o NO e doenças pulmonares (principalmente a asma), decidimos investigar se o NO teria alguma influência na migração dos eosinófilos para o pulmão na resposta inflamatória alérgica das vias aéreas, após desafio antigênico em ratos previamente sensibilizados com ovalbumina.

Para esta investigação foram utilizados ratos Wistar tratados cronicamente com L-NAME e sensibilizados com ovalbumina. A linhagem Wistar de ratos produz altos títulos do anticorpo IgE em resposta à imunização ativa e desenvolvem reação inflamatória após o desafio antigênico subsequente. Desta maneira, constitui-se em um bom modelo para o estudo da asma humana e tem trazido importantes colaborações para o entendimento dos mecanismos desta doença (Vianna & Garcia-Leme, 1995). Assim, usando este modelo, foi observado que o número de eosinófilos no LBA dos ratos controles (não tratados) sensibilizados aumentou marcadamente em 24 e 48 horas após o desafio intratraqueal com OVA comprovando, desta forma, a eficiência do

modelo utilizado. No período de 48 h, no qual ocorre o maior influxo de eosinófilos para a cavidade broncoalveolar, o tratamento crônico com o L-NAME (mas não com o D-NAME) provocou uma redução significativa desta migração. Além disto, a análise histológica dos pulmões dos ratos controles (não tratados) mostraram um influxo significativo de PMNs (principalmente de neutrófilos) 24 h após o desafio. No período de 48 h, os pulmões apresentaram um infiltrado mais intenso, rico em eosinófilos. O tratamento com L-NAME reduziu a infiltração de PMNs a partir de 24 h após o desafio, sendo este efeito mais acentuado em 48 h. Estes resultados estão de acordo com inibição da migração celular observada no LBA 48 h após o desafio. Entretanto, pôde-se observar que a redução do infiltrado celular no tecido pulmonar em 24 h precedeu a mesma redução observada no LBA. Isto é decorrente, provalvemente, do tempo requerido para a migração dos leucócitos para o lúmen respiratório. Estes resultados sugerem que o NO modula o desenvolvimento da reação alérgica pulmonar de ratos.

O L-NAME não interfere no processo de sensibilização dos ratos, visto que segmentos de traquéias de animais tratados cronicamente com este inibidor apresentaram resposta contrátil à OVA de mesma magnitude dos animais controles. O L-NAME também não induziu modificações no número de leucócitos totais e diferenciais (neutrófilos, eosinófilos ou mononucleares) do sangue, mostrando que a diminuição do número de eosinófilos no LBA não é consequência de eosinopenia periférica.

Assim, dentre os diferentes mecanismos envolvidos no desenvolvimento da reação alérgica pulmonar de ratos, o NO pode estar então modulando a liberação de fatores solúveis como citocinas, a atividade de células T ou a expressão de moléculas de adesão.

Recentemente, tem sido demonstrado que as citocinas IL-3, IL-5 e o GM-CSF estão presentes na circulação de pacientes asmáticos (Ohnishi et al., 1993). Além disso, um aumento significativo na concentração de IL-5 foi observado no LBA de pacientes asmáticos 48 h após a broncoprovocação

antigênica (Ohnishi et al., 1993). Estas citocinas são eosinofilopoiéticas, quimiotáticas para os eosinófilos e aumentam a sobrevivência destas células (Nakamura et al., 1993; Robinson et al., 1993). Entretanto, a IL-5 tem sido apontada como a principal citocina envolvida na eosinofilia específica pelo fato de ser um agente quimiotático seletivo para eosinófilo e aumentar a adesão destas células ao endotélio (Wang et al., 1989). O anticorpo para IL-5 previne o acúmulo de eosinófilos nas vias respiratórias após infecção por helmintos (Coffman et al., 1989). Outra citocina provavelmente envolvida no processo é o TNF- α , pois a mesma é capaz de regular tanto a infiltração neutrofílica como o recrutamento de eosinófilos para o pulmão (Lukacs, 1995).

O linfócito T tem sido apontado como o primeiro regulador da cascata inflamatória na patogênese da asma. No sangue e lavado brônquico de pacientes asmáticos foi encontrado número aumentado de linfócito T helper CD4⁺ (Th) ativado (Walker et al., 1992). A depleção de células T CD4⁺ provoca diminuição da hiperreatividade e da eosinofilia pulmonar em camundongos, confirmando sua participação no processo (Gavett et al., 1994). Além de sua importância na resposta de defesa dos organismos aos antígenos, os linfócitos T CD4⁺ estão envolvidos nas doenças inflamatórias crônicas. Dois subtipos de células Th são identificadas pelo padrão de síntese de citocinas sob ativação, que determinam sua função efetora. A célula Th1 medeia a reação de hipersensibilidade tardia através da liberação do IFN- γ que ativa o macrófago, aumentando sua capacidade de destruir o patógeno através da produção de fatores tóxicos, entre os quais o NO. Além do IFN- γ , a célula Th1 libera a IL-2. A Th2 produz a IL-4, IL-5 e IL-10 (Mosmann & Coffman, 1989). A IL-4 é importante para a produção de IgE, além de estar envolvida na expressão da molécula de adesão vascular VCAM-1, que é necessária para a adesão seletiva do eosinófilo. O IFN- γ , produzido pelas células Th1, modula a diferenciação da célula Th1 e inibe a proliferação das células Th2, enquanto a IL-4, produzida pela Th2, leva à proliferação da Th2. A IL-10 pode indiretamente inibir a secreção do IFN- γ pelas células Th1 (Fitch et al., 1993).

Recentemente, foi demonstrado que o linfócito Th1 murino pode expressar a iNOS e sintetizar NO. Concentrações elevadas de NO inibe a proliferação da célula Th1 e sua produção de IL-2 e IFN- γ . Ao contrário, a Th2 não produz NO e também não é afetada pelo mesmo. Portanto, baseado em resultados de experimentos *in vivo* e *in vitro* (Florquin et al., 1994; Isobe et al., 1992), o NO pode estar envolvido nos mecanismo de regulação por *feedback* negativo da resposta imune mediada por linfócitos. Isto evitaria uma expansão exagerada da célula Th1 e consequentes imunopatologias (Taylor-Robinson et al., 1994).

Barnes & Liew (1995) sugerem que estes mecanismos estejam envolvidos na patologia da asma na medida em que grandes quantidades de NO, produzidos pelas células epiteliais e macrófagos pulmonares, resultam em supressão das células Th1 e, consequentemente, na redução nos níveis de IFN- γ . Isto leva, então, à proliferação das células Th2, que são normalmente suprimidas pelo IFN- γ . Como resultado haveria um aumento da secreção da IL-4 e IL-5, que levaria à formação de IgE e recrutamento do eosinófilo para as vias respiratórias.

Apesar da necessidade de estudos mais aprofundados, podemos sugerir que a inibição da síntese do NO nos ratos tratados com L-NAME pode provocar diminuição da migração dos eosinófilos por interferir nestes mecanismos governados pelos linfócitos T CD4⁺.

Por outro lado, nossos resultados demonstram que a migração de eosinófilos *in vitro* induzida por fMLP, PAF e SAZ foi marcadamente reduzida quando os eosinófilos foram obtidos de ratos tratados cronicamente com L-NAME. A L-arginina, a D-arginina, restituiu a habilidade dos eosinófilos de ratos tratados com L-NAME de migrar em resposta ao fMLP. O fato da inibição da quimiotaxia dos eosinófilos persistir *in vitro* sugere que o fenômeno observado pode ser devido a um efeito sobre a própria célula, provavelmente, nos mecanismos envolvidos na locomoção dos eosinófilos.

Os eventos bioquímicos necessários para ocorrer a resposta quimiotática não são totalmente conhecidos, mas alguns componentes estão descritos. Estes incluem a ligação dos agentes quimiotáticos a receptores celulares específicos presentes em PMNs e monócitos, que é seguido por mudanças no potencial transmembrana, na permeabilidade do cálcio e nos níveis dos nucleotídeos cíclicos. Alterações na metilação dos fosfolípidos, estimulação da liberação do ácido araquidônico e reorganização dos elementos do citoesqueleto também ocorrem logo após a ligação dos agentes quimiotáticos (Snyderman & Goetzl, 1981).

Os fatores quimiotáticos influenciam a direção de locomoção de leucócitos (quimiotaxia) ou aumentam a sua velocidade de locomoção (quimioquinesa). Quando os leucócitos são expostos a um determinado gradiente quimiotático, os mesmos alteram a forma, tornando-se morfologicamente orientado para o gradiente. Locomovendo-se sobre um substrato, a porção anterior destas células se distende na forma de um véu hialino (lamelipódio) e a porção posterior adquire a conformação de uma cauda (uropódio). A polarização morfológica dos leucócitos estimulados por agentes quimiotáticos é associada com a reorganização topográfica da membrana citoplasmática sob o controle das estruturas do citoesqueleto (Snyderman & Goetzl, 1981).

O citoplasma dos leucócitos contém grandes quantidades de actina que se polimerizam para formar longos filamentos. A actina derivada dos macrófagos polimeriza *in vitro* formando um gel que contrai em presença de miosina, Mg^{2+} e ATP. Acredita-se que a contractilidade do gel de actina é a base para a motilidade celular. Estudos com microscopia eletrônica de leucócitos polarizados revelam uma rede densa de microfilamentos de actina abaixo da membrana plasmática, no sítio de contato entre a célula e o substrato e na extremidade que comanda o movimento celular. É proposto que esta rede é formada pela ligação cruzada da actina com proteínas ligantes de actina especializadas, as quais conferem rigidez à rede de microfilamentos, formando o gel. A ligação cruzada do gel acontece pela interação da miosina com os

filamentos de actina adjacentes. Na presença de concentrações citoplasmáticas elevadas de cálcio, uma outra proteína (gelsolin) quebra a rede de actina, convertendo o gel em solução. Isto proporciona um mecanismo de reversão da contratilidade e permite um movimento controlado (Wilkinson, 1994). Os microtúbulos podem contribuir nesta coordenação. Alguns estudos mostram que agentes desagregantes dos microtúbulos como, por exemplo, colchicina e vinblastina, provocam um movimento errático e pobremente coordenado destas células (Wilkinson, 1994). No entanto, existem poucos conhecimentos sobre os mecanismos que permitem o movimento suave e coordenado necessário para a quimiotaxia, fagocitose e outras funções dos leucócitos.

Os níveis dos nucleotídeos, principalmente do AMPc e do GMPc, apresentam efeitos reguladores na quimiotaxia de monócitos e PMNs. Agentes que elevam os níveis de AMPc, tais como os agonistas β -adrenérgicos, histamina e inibidores da fosfodiesterases, deprimem a quimiotaxia. Ao contrário, a resposta quimiotáxica é aumentada por agonistas muscarínicos, agonistas α -adrenérgicos e serotonina, substâncias conhecidas por aumentar o GMPc intracelular e inibir a adenilato ciclase (Stephens & Snyderman, 1982).

O NO ativa a guanilato ciclase solúvel aumentando, assim, os níveis intracelulares de GMPc (Mellion et al., 1980). A inibição da quimiotaxia de monócitos *in vitro* ao fMLP pelo NO foi acompanhada por aumento na concentração do GMPc (Bath et al., 1991). Resposta semelhante foi observada utilizando-se PMNs e doadores de NO (Moilanen et al., 1993). Entretanto, outros estudos apontam para um papel potencializador do NO na quimiotaxia de leucócitos (Kaplan et al., 1989; Belenky et al., 1993a, b). Nestes estudos observou-se que inibidores da NO sintase, L-NMMA e L-canavanina, diminuem a quimiotaxia de monócitos e neutrófilos, sendo este efeito revertido pelo GMPc exógeno (8-bromo-cGMP). Portanto, o papel do GMPc na locomoção dos leucócitos é controverso visto que o acúmulo deste segundo mensageiro em PMNs e células mononucleares pode tanto estimular (Sandler et al., 1975; Anderson et al., 1986; Kaplan et al., 1989; Belenky et al., 1993a, b) como

atenuar (Schroder et al., 1990; Bath et al., 1991; Moilanen et al., 1993) a quimiotaxia e outras funções destas células *in vitro*. Apesar de Beauvais et al. (1995) terem mostrado que doadores não convencionais de NO (azida e hidroxilamina) inibem a apoptose em eosinófilos isolados e, que este efeito é também observado pelo uso de análogos permeáveis de GMPc, não existem evidências para a existência deste segundo mensageiro nos eosinófilos.

Em resumo, é necessário elucidar se a inibição da quimiotaxia de eosinófilos pelo tratamento crônico com o L-NAME induz modificações nos mecanismos de locomoção celular como, por exemplo, na reorganização dos elementos do citoesqueleto ou nos níveis dos nucleotídeos cíclicos.

Até o presente momento não existem evidências na literatura de que o eosinófilo sintetize NO. Entretanto, nossos resultados indicam a presença de um sistema funcional de NO sintase no eosinófilo. A *leishmania* (Cunha et al., 1993; Stenger et al., 1994) e outros parasitas (Munoz-Fernandez et al., 1992; Petray et al., 1994) estimulam a expressão da iNOS pelos macrófagos *in vitro*. Além disso, Oliveira et al., (1996) sugerem que o NO produzido pelos eosinófilos é responsável pela atividade microbicida contra parasitas intracelulares como a *leishmania*. Esses resultados, aliados ao conhecimento de que as infecções parasitárias são classicamente acompanhadas por eosinofilia, sugerem o envolvimento do NO na quimiotaxia desta célula e na consequente eosinofilia observada nestas infecções.

5 - CONCLUSÕES

1 - A administração intrapleural de BK (50 µg), PAF (1 µg), carragenina (125 µg) e LPS (0.25 µg) em ratos causou infiltrado eosinofílico pleural no período de 24 h após a administração. O tratamento crônico com L-NAME (75 µmol/rato/dia, 4 semanas) promoveu uma redução significativa do infiltrado de eosinófilos.

2 - Em ratos sensibilizados e desafiados com a ovalbumina, observou-se intenso infiltrado eosinofílico no LBA desses animais nos períodos de 24 e 48 h após o desafio intratraqueal. Nos animais tratados cronicamente com L-NAME (75 µmol/rato/dia, 4 semanas), observou-se uma redução significativa do infiltrado eosinofílico presente no LBA. A histologia dos pulmões oriundos dos animais tratados com L-NAME também revelou um número menor de eosinófilos em relação aos pulmões de animais não tratados.

3 - O fMLP (5×10^{-8} M), PAF (10^{-8} M) e SAZ (27 µl) promoveram uma migração significativa de eosinófilos peritoneais de ratos *in vitro*. Contudo, o mesmo não foi observado quando os eosinófilos foram obtidos de ratos tratados cronicamente com L-NAME. A L-arginina (5.5 mM), mas não a D-arginina (5.5 mM), restaurou a habilidade dos eosinófilos de ratos tratados em migrar ao fMLP.

4 - Nossos resultados indicam que o NO modula a migração de eosinófilos *in vitro* e *in vivo*. O fato da inibição da quimiotaxia ter persistido *ex-vivo* sugere que o L-NAME exerce seu efeito inibitório diretamente sobre os eosinófilos, dificultando a locomoção dos mesmos.

6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDERSON, R.; GLOVER, A.; KOORNHOF, H.J. & RABSON, A.R. In vitro stimulation of neutrophil motility by levamisole: maintenance of cGMP levels in chemotactically stimulated levamisole-treated neutrophils. *J. Immunol.*, 117: 428-430, 1986.
- ANTUNES, E.; GIRALDELO, C.M.M.; CIRINO, G. & DE NUCCI, G. Effects of NG-monomethyl-L-arginine and its D-enantiomer on rat hind-paw oedema. In: *Biology of nitric oxide - Physiological and clinical aspects*, ed by S MONCADA, M.A. MARLETTA, J.B. HIBBS & E.A HIGGS, pp.264-266, Portland Press, London, 1992.
- AZZAWI, M; JOHNSTON, P.W.; MAJUMDAR, S.; KAY, A.B. & JEFFERY, P.K. T-lymphocyte and activated eosinophils in airway mucosa in fatal asthma and cystic fibrosis. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 145: 1477-1488, 1992.
- BARNES, P.J. Neural mechanisms in inflammatory airways disease. In: *Textbook of Immunopharmacology*, ed. by M.M Dale, J. C. Foreman, & T.-P.D Fan, pp 252-259,, Blackwell Scientific Publications, London, 1994.
- BARNES, P.J. & LIEW, F.Y. Nitric oxide and asthmatic inflammation. *Immunol. Today* 16: 128-130, 1995.
- BATH, P.M.W.; HASSALL, D.G.; GLADWIN, A.M.; PALMER, R.M.J. & MARTIN, J.F. Nitric oxide and prostacyclin: divergence of inhibitory effects on monocyte chemotaxis and adhesion to endothelium in vitro. *Art. Thromb.*, 11: 254-260, 1991.

- BEAUVAIS, F.; MICHEL, L. & DUBERTRET, L. The nitric oxide, azide and hydroxylamine, inhibit the programmed cell death of cytokine-deprived human eosinophils. *FEBS Lett.*, 361: 229-232, 1995.
- BELENKY, S.N.; ROBBINS, R.A.; RENNARD, S.I.; GOSSMAN, G.L.; NELSON, K.J. & RUBINSTEIN, I. Inhibitors of nitric oxide synthase attenuate human neutrophil chemotaxis in vitro. *J. Lab. Clin. Med.*, 122: 388-394, 1993a.
- BELENKY, S.N., ROBBINS, R.A. & RUBINSTEIN, I. Nitric oxide synthase inhibitors attenuate human monocyte chemotaxis in vitro. *J. Leuk. Biol.*, 53: 498-503, 1993b.
- BEVILACQUA, M.P. Endothelial-leukocyte adhesion molecules. *Annu Rev. Immunol.*, 11: 767-804, 1993.
- BISGAARD, H.; HELQVIST, S.; BOUDET, L.; VENGE, P.; DAHL, R. & SONDERGAARD, J. Chemotatic activity of LTB₄ in man. *Allergy*, 41: 365-372, 1986.
- BOCHENER, B. S.; UNDEM, B. J. & LICHTENSTEIN, L.M. Immunological aspects of allergic asthma. *Annu. Rev. Immunol.*, 12: 295-335, 1994.
- BOLOTINA, V.M.; NAJIBI S.; PALACINO J.J.; PAGANO, P.J. & COHEN R.A. Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. *Nature*, 368: 850-853, 1994.
- BOUSQUET, J.; CHANEZ, P.; LACOSTE, J.Y.; BARNEON, G.; CHAVANIAN, N.; ENANDER, I.; VENGE, P.; AHISTEDT, S.; SIMONY-LAFONTAINE, J.; GODARD, P. & MICHEL, F.B. Eosinophilic inflammation in asthma. *N. Engl. J. Med.*, 323: 1033-1039, 1990.

- BOZZA, P.T.; CASTRO-FARIA-NETO, H.C.; MARTINS, M.A.; LARANGEIRA, A.P.; PERALES, J.E.; SILVA, P.M.R. & CORDEIRO, R.S.B. Pharmacological modulation of lipopolysaccharide-induced pleural eosinophilia in the rat: a role for a newly generated protein. *Eur. J. Pharmacol.*, 248: 41-47, 1993.
- BOZZA, P.T.; CASTRO-FARIA-NETO, H.C.; PENIDO, C.; LARANGEIRA, A.P.; GRAÇAS, M.; HENRIQUES M.O.; SILVA, P.M.R.; MARTINS, M.A.; SANTOS, R.R & CORDEIRO, R.S.B. Requirement for lymphocytes and resident macrophages in LPS-induced pleural eosinophil accumulation. *J. Leuk. Biol.*, 56: 151-158, 1994a.
- BOZZA, P.T.; CASTRO-FARIA-NETO, H.C.; PENIDO, C.; LARANGEIRA, A.P.; SILVA, P.M.R.; MARTINS, M.A. & CORDEIRO, R.S.B. IL-5 accounts for the mouse pleural eosinophil accumulation triggered by antigen but not by LPS. *Immunopharmacology*, 27: 131-136. 1994b.
- BRAUN, R.K.; FRANCHINI, M.; ERARD, F.; RIHS, S.; DE VRIES, I.J.M; BLASER, K.; HANSEL, T.T. & WALKER, C. Human peripheral blood eosinophils produce and release interleukin-8 on stimulation with calcium ionophore. *Eur. J. Immunol.*, 23: 956-960, 1993.
- BREDT, D.S. & SNYDER, S.H. Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87: 682-685, 1990.
- BREDT, D.S.; HWANG, P.M.; GLATT, C.E.; LOWENSTEIN, C.; REED, R.R. & SNYDER, S.H. Cloned and expressed nitric synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase. *Nature (London)* 351, 714-718, 1991.

- BRUIJNZEEL, P.L.B. Eosinophil tissue mobilization in allergic disorders. *Ann. N. Y. Acad. Sc.*, 725: 259-267, 1994.
- BURKE, L.A.; CREA, A.E.G.; WIKINSON, J.R.W.; ARM, J.P.; SPUR, B.W. & LEE, T.H. Comparison of the generation of platelet activating factor and leukotriene C₄ in human eosinophils stimulated by unopsonized zymosan and by calcium ionophore A23187: the effect of nedocromil sodium. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 85: 26-35, 1990.
- CAPASSO, F.; DUNN, C.J.; YAMAMOTO, S.; WILLOUGHBY, D.A. & GIROUD, J.P. Further studies on carrageenan-induced pleurisy in rats. *J. Path.*, 116: 117-123, 1974.
- COFFMAN, R. L.; SEYMOUR, B.W.P.; HUDAK, S.; JACKSONA, J. & RENNICK, D. Antibody to interleukin-5 inhibits helminth-induced eosinophilia in mice. *Science*, 245: 308-310, 1989.
- CORRIGAN, C.J.; HARTNELL, A. & KAY, A.B. T lymphocyte activation in acute severe asthma. *Lancet*, 1: 1129-1132, 1988.
- CUNHA, F.Q.; MOSS, D.W.; LEAL, L.M.C.C; MONCADA, S. & LIEW, F.Y. Induction of macrophage parasitocidal activity by *Staphylococcus aureus* and exotoxins through the nitric oxide synthesis pathway. *Immunology*, 78: 563-567, 1993.
- DALE, M.M.; FOREMAN, J. C. & FAN, T.-P.D. Introduction to the immunology and pathology of host defence mechanisms. In: *Textbook of Immunopharmacology*, ed. by M.M Dale, J. C. Foreman, & T.-P.D Fan, pp 1-7, Blackwell Scientific Publications, London, 1994.

- DECLATELET, L.R.; SHIRLEY, M.R.; MCPHAIL, L.C.; HUNTLEY C.C., MUSS, H.B. & BASS, D.A. Oxidative metabolism of human eosinophils. *Blood*, 50: 525-535, 1977.
- DESREUMAUX, P.; JANIN, A.; COLOMBEL, J.F.; PRIN, L.; PLUMAS, J.; EMILIE, D.; TORPIER, G. & CAPRON, M. Interleukin-5 mRNA expression by eosinophils in the intestinal mucosa of patients with coeliac disease. *J. Exp. Med.*, 175: 293-296, 1992.
- DI ROSA, M.; GIROUD, J.P. & WILLOUGHBY, D.A. Studies of the mediators of the acute inflammatory response induced in rats in different sites by carrageenan and turpentine. *J. Pathol.*, 104: 15-28, 1971.
- DIAMOND, M.S.; STAUNTON, D.E.; MARLIN, S.D. & SPRINGER, T.A. Binding of the integrin Mac-1 (CD11b/CD18) to the third immunoglobulin-like domain of ICAM-1 (CD54) and its regulation by glycosylation. *Cell*, 65: 961-971, 1991.
- DOMINICZACK, A. F. & BOHR, D.F. Nitric oxide and its putative role in hypertension. *Hypertension*, 8: 1202-1211, 1995.
- DUBOIS, G.R. & BRUIJNZEEL, P.L.B. IL-4 induced migration of eosinophils in allergic inflammation. *Ann. N. Y. Acad. Sc.*, 725: 269-273, 1994.
- DVORAK, A.M.; LETOURNEAU, L.; LOGIN, G.R.; WELLER, P.F. & ACKERMAN, S.J. Ultrastructural localization of the Charcot-Leyden crystal protein (lysophosphatase) to distinct crystalloid-free granule population in mature human eosinophils. *Blood*, 72: 150-158, 1988.

- FADEL, R.; HERPIN, R M.; RIHOUX, J P. & HENOCQ, E. Inhibitory effect of cetirizine dihydrochloride on eosinophil migration in vivo. *Clin. Allergy*, 17: 373-380, 1987.
- FAJARDO, L.F. The complexity of endothelial cells. *Am. J. Clin. Pathol.*, 92: 241-250, 1989.
- FERNANDEZ, H.N.; HENSON, P.M.; OTANI, A & HUGLI, T.E. Chemotatic response to human C3a and C5a anaphylatoxins. I. Evaluation of C3a and C5a leukotaxis in vitro and under simulated in vivo conditions. *J Immunol.*, 120: 109-115, 1978.
- FITCH, F.W.; MCKISIC, M.D.; LANCKI, D.W. & GAJEWSKI, T.F. Differential regulation of murine lymphocyte subsets. *Annu. Rev. Immunol.*, 11: 29-48, 1993.
- FLORQUIN, S.; AMRAOUI, Z.; DUBOIS, C.; DECUYPER, J. & GOLDMAN, M. The protective role of endogenously synthesized nitric oxide in staphylococcal enterotoxin B-induced shock in mice. *J. Exp. Med.*, 180: 1153-1158, 1994.
- FRICK, W.W.; SEDGWICK, J.B. & BUSSE, W.W. The appearance of hypodense eosinophils in antigen-dependent late phase asthma. *Am Rev. Respir. Dis.*, 139: 1401-1406, 1989.

- FUKUDA, T.; DUNNETTE, S. L.; REED, C.E.; ACKERMAN, S.J.; PETERS, M.S. & GLEICH, G.J. Increased numbers of hypodense eosinophils in the blood of patients with bronchial asthma. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 132: 981-985, 1985.
- GALLI S.J. New concepts about the mast cells. *N. Engl. J. Med.*, 328: 257-265, 1993.
- GAVETT, S.H.; CHEN, X.; FINKELMAN, F. & WILLS-KARP, M. Depletion of murine CD4⁺ T lymphocytes prevents antigen-induced airway hyperreactivity and pulmonary eosinophilia. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 10: 587-593, 1994.
- GIBSON, P.G.; MANNING, P.J.; O'BYRNE, P.M.; GIRGIS-GABARDO, A.; DOLOVICH, J.; DENBURG, J.A. & HARGREAVE F.E. Allergen-induced asthmatic responses-relationship between increases in airway responsiveness and increases in circulating eosinophils, basophils, and their progenitors. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 143: 331-335. 1991
- GIEMBYCZ, M.A.; KROEGEL, C. & BARNES, P.J. Stimulation of the cyclo-oxygenase pathway in eosinophils by platelet-activating factor. Release of thromboxane-A₂ and prostaglandine E and their effects on eosinophil function. *J. Immunol.*, 144: 3489-3497, 1990.
- GIRALDELO, C.M.M.; ZAPPELLINI, A.; MUSCARÁ, M.N.; DE LUCA, I.M.S; HYSLOP, S.; CIRINO, G. R.; ZATZ, R; DE NUCCI, G. & ANTUNES, E. Effect of arginine analogues on rat hind paw oedema and mast cell activation *in vitro*. *Eur. J. Pharmacol.*, 257: 87-93, 1994.

GLEICH, G.J. AND C.R. ADOLPHSON. The eosinophil leukocyte: structure and function. *Adv. Immunol.* 39: 177-253, 1986.

GLEICH, G.J.E.; FRIGAS, E.; LOEGERING, D.A.; WASSOM, D.L. & STEINMULLER, D. Cytotoxic properties of the eosinophils major basic protein. *J. Immunol.*, 123: 2925-2927, 1979.

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

GUSTAFSSON, L. E.; LEONE, A. M.; PERSSON, M. G.; WISLUND, N. P. & MONCADA, S. Endogenous nitric oxide is present in the exhaled air of rabbits, guinea-pigs and humans. *Bioch. Bioph. Res. Comm.*, 181: 852-857, 1991.

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

HAMID, Q.; SPRINGALL D. R. & RIVEROS-MORENO, V. Induction of nitric oxide synthase in asthma. *Lancet*, 342: 1510-1513, 1993.

HANSEL, T.T.; POUND, J.D.; PILING, D.; KITAS, G.D.; SALMON, M.; GENTLE, T.A.; LEE, S.S. & THOMPSON, R.A. Purification of human blood eosinophils by negative selection using immunomagnetic beads. *J. Immunol. Methods*, 122: 97-103, 1989.

- HANSEL, T. T. & WALKER, C. The migration of eosinophils into the sputum of asthmatics: the role of adhesion molecules. *Clin. Exp. Allergy*, 22: 345-356, 1992.
- HÖGMAN, M.; FROSTELL, C.G.; HEDENSTRÖM, H. & HEDENSTIERNA, G. Inhalation of nitric oxide modulates adult human bronchial tone. *Am. Rev. Respir. Dis.* 148: 1474-1478. 1993.
- HUGHES, S.R.; WILLIAMS T.J. & BRAIN, S.D. Evidence that endogenous nitric oxide modulates oedema formation induced by substance P. *Eur. J. Pharmacol.* 191: 481-484, 1990.
- IALENTI, A.; IGNARRO, A.; MONCADA, S. & DI ROSA, M. Modulation of acute inflammation by endogenous nitric oxide. *Eur. J. Pharmacol.*, 211: 177-182, 1992.
- IGNARRO, L.J. Signal transduction mechanisms involving nitric oxide. *Biochem. Pharmacol.*, 41: 485-490, 1991.
- IGNARRO, L.J.; FUKUTO, J.M.; GRISCAVE, J.M.; ROGERS, N.E. & BYRNS, R.E. Oxidation of nitric oxide in aqueous solution to nitrite but not nitrate; comparison with enzymatically formed nitric oxide from L-arginine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 90: 8103-8107, 1993.
- ISOBE, K. & NAKASKIMA, I. Feedback suppression of staphylococcal enterotoxin-stimulated T-lymphocyte proliferation by macrophages through inductive nitric oxide synthesis. *Infect. Immun.*, 60: 4832-4837, 1992.

- JANSSENS, S.P.; SHIMOUCHI, A.; QUERTERMOUS, T.; BLOCK, D.B. & BLOCK, K.D. Cloning and expression of a cDNA encoding human endothelium-derived relaxing factor/nitric oxide synthase. *J. Biol. Chem.*, 267: 14519-14522, 1992.
- JEFFREY, P.K.; WARDLAW, A.J.; NELSON, F.C.; COLLINS, J.V. & KAY, A.B. An ultrastructural, quantitative study and correlation with hyperreactivity. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 140: 1745-1753, 1989.
- JOHNSTON, R.B.Jr. Current concepts in immunology: monocytes and macrophages. *N. Engl. J. Med.*, 318: 747, 1988.
- JORENS, P.G.; VAN OVERVELD, F.J.; BULT, H.; VERMEIRE, P.A. & HERMAN, A.G. L-arginine dependent production of nitrogen oxides by rat pulmonary macrophages. *Eur. J. Pharmacol.*, 200: 205-209, 1991.
- JORENS, P. G., VERMEIRE, P. A. AND HERMAN, A. F. L-arginine-dependent nitric oxide syntase: a new metabolic pathway in the lung an airways. *Eur. Respir. J.*, 6: 258-266, 1993.
- JOSE, P.J.; GRIFFITHS-JOHNSON, D.A.; COLLINS, P.D.; WALSH, D.T.; MOQBEL, R.; TOTTY, N.F.; TRUONG, O.; HSUAN, J.J. & WILLIAMS, T.J. Eotaxin: A potent eosinophil chemotactant cytokine detected in guinea-oig model of allergic airways inflammation. *J. Exp. Med.*, 179: 881-887, 1994.
- KANOFSKY, J.R., HOOGLAND, H.; WEVER, R.; WEISS, & S.J. Singlet oxygen production by human eosinophils. *J. Biol. Chem.*, 263: 9692-9696, 1988.
- KAPLAN, S.S., BILLIAR, T.; CURRAN, R.D.; ZDZIARSKI, U.E.; SIMMONS, R.L. & BASFORD, R.E. Inhibition of chemotaxis with N^G-Monomethyl-L-arginine: a role for cyclic GMP. *Blood*, 74: 1885-1887, 1989.

- KIRBY, J.G.; HARGREAVE, F.E., GLEICH, G.J. & O'BYRNE, P.M. Bronchoalveolar cells profiles of asthmatic and non-asthmatic subjects. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 136: 379-383, 1987.
- KITA, H.; OHNISHI, T.; OKUBO, Y.; WEILER D.; ABRAMS, J.S. & GLEICH, G.J. Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor and interleukin-3 release from human peripheral blood eosinophils and neutrophils. *J. Exp. Med.*, 174: 745-748, 1991.
- KLATT, P.; SCHMIDT, K. & MAYER, B. Brain nitric oxide synthase is a haemoprotein. *Biochem. J.*, 288: 15-17, 1992.
- KLEBANOFF, S.J.; DURACK, D.T.; ROSEN, H. & CLARK, R.A. Functional studies on human peritoneal eosinophils. *Infect. Immunol.*, 17: 167-173, 1977.
- KNOWLES, R.G. & MONCADA, S. Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J.*, 298: 249-258, 1994.
- KROEGEL, C.; VIRCHOW JR.; LUTTMANS, W.; WALKER, C. & WARNER, J.A. Pulmonary immune cells in health and disease: the eosinophil leucocyte (Part I). *Eur. Respir. J.*, 7: 519-543, 1994.
- KUBES, P.; SUZUKI, M. & GRANGER, D.N. Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 88: 4651-4655, 1991.
- KUBES, P. & GRANGER, D.N. Nitric oxide modulates microvascular permeability. *Am. J. Physiol.*, 262: H611-H615, 1992.

- KUBES, P. Polymorphonuclear leukocyte - endothelium interactions: a role for pro-inflammatory and anti-inflammatory molecules. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 71: 88-97, 1992.
- KUO, H. P.; LIU, S. & BARNES, P. J. The effect of endogenous nitric oxide on neurogenic plasma exudation in guinea pig airways. *Eur. J. Pharmacol.*, 221: 385-388, 1992.
- KUROSE, I.; KUBES, P.; WOLF, R.; ANDERSON, D.D.; PAULSON, J.; MIYASAKA, M. & GRANGER, D.N. Inhibition of nitric oxide production. Mechanism of vascular albumin leakage. *Circ. Res.*, 73: 164-171, 1993.
- LAITINEN, L.A.; HEINO, M.; LAITINEN, A.; KAVA, T & HAAHTELA, T. Damage of the airway epithelium and bronchial reactivity in patients with asthma. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 131: 599-606, 1985.
- LAITINEN, L.A.; LAITINEN, A. & HAAHTELA, T. Airway mucosal inflammation even in patients with newly diagnosed asthma. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 147: 697-704, 1993.
- LAMAS, S.; MARSDEN, P.A.; LI, G.L.; TEMPST, P. & MICHEL, T. Endothelial nitric oxide synthase: Molecular cloning and characterization of a distinct constitutive enzyme isoform. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 6348-6352, 1992.
- LUKACS, N. W.; STRIETER, R. M.; CHENSUE, S. W., WIDMER, M. & KUNKEL, S. L. TNF- α mediates recruitment of neutrophils and eosinophils during airway inflammation. *J. Immunol.*, 154: 5411-5417, 1995.

- MARIANI-PEDROSO, S.; BIZETO, L.; ZATZ, R.; ANTUNES, E. & DE NUCCI, G.
Dissimilarity between prostaglandin E₁ and nitric oxide donors as potentiators of plasma exudation in the rabbit skin *in vivo*. *Prost. Leuk. Essential Fatty Acids*, 52: 399-402, 1995.
- MARLETTA, M.A., P.S. YOON, R. IYENGAR, C.D. LEAF & J.S. WISHNOK.
Macrophage oxidation of L-arginine to nitrite and nitrate. Nitric oxide is an intermediate. *Biochemistry*, 27: 8706-8711, 1988.
- MAYHAN, W.G. Role of nitric oxide in modulating permeability of hamster cheek pouch in response adenosine 5'-diphosphate and bradykinin. *Inflammation*, 16: 295-305, 1992.
- MEDEIROS, M.V., BINHARA, I.M.; MORENO-JR, H.; DE NUCCI, G. & ANTUNES, E. Effect of chronic nitric oxide inhibition on the inflammatory responses induced by carrageenin in rats. *Eur. J. Pharmacol.*, 285: 109-114, 1995.
- MELLION, B.T.; IGNARRO, L.J.; OHLSTEIN, E.M.; PONTECORVO, E.G.; HYMAN, A.L. & KADOWITZ, P.J. Evidence for the inhibitory role of guanosine 3':5'-monophosphate in ADP-induced human platelet aggregation in the presence of nitric oxide and related vasodilators. *Blood*, 57: 946-955, 1980.
- MILLER, F.; DEHARVEN, E & PALADE, G.E. The structure of the eosinophil leucocyte granules in rodents and in man. *J. Cell Biol.*, 31: 349-362, 1966.

- MOILANEN, E.; VUORINEN, P.; KANKAANRANTA, H.; METSÄ-KETELÄ, T. & VAPAATALO, H. Inhibition by nitric oxide-donors of human polymorphonuclear leucocyte functions. *Br. J. Pharmacol.*, 109: 852-853, 1993.
- MOILANEN, E. & VAPAATALO, H. Nitric oxide in inflammation and immune response. *Ann. Med.*, 27: 359-367, 1995.
- MONCADA, S.; PALMER, R.M.J. & RIGGS, E.A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol. Rev.*, 43: 109-142, 1991.
- MONCADA, S. The L-arginine-nitric oxide pathway. *Acta Physiol. Scand.*, 145: 201-227, 1992.
- MOQBEL, R. Eosinophils, cytokines, and allergic inflammation. *Ann. N. Y. Acad. Sc.*, 725: 223-233, 1994.
- MOSMANN, T.R. & COFFMAN, R.L. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu. Rev. Immunol.*, 7: 145-173, 1989.
- MOTOJIMA, S.; FRIGAS, E.; LOEGERING, D.A. & GLEICH, G.J. Toxicity of eosinophil cationic proteins for guinea-pig tracheal epithelium in vitro. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 139: 801-805, 1989.
- MULLIGAN, M.S.; HEVEL, J.M.; MARLETTA, M.A. & WARD, P.A. Tissue injury caused by deposition of immune complexes is L-arginine-dependent. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 6338-6342, 1991.

- MUNOZ-FERNANDEZ, M.A.; FERNANDEZ, M.A & FRESNO, M. Activation of human macrophages for the killing of intracellular *Trypanosoma cruzi* by TNF-alpha and IFN-gamma through a nitric oxide-dependent mechanism. *Immunol. Lett.* 33: 35-40, 1992.
- NAKAMURA, Y.; OZAKI, T.; KAMEI, T.; KAWAJI, K.; BANNO, K.; MIKI, S.; FUJISAWA, K.; SUSUMU, Y. & OGURA, T. Factors that stimulate the proliferation and survival of eosinophils in eosinophilic pleural effusion: relationship to granulocyte/macrophage colony-stimulating factor, interleukin-5, and interleukin-3. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 8: 605-611, 1993.
- NAKANE, M.; SCHMIDT, H.H. & POLLOCK, J.S. Cloned human brain nitric oxide synthase is highly expressed in skeletal muscle. *FEBS Lett.*, 316: 175-180, 1993.
- NUSSLER, A.K. & BILLIAR, T.R. Inflammation, immunoregulation and inducible nitric oxide synthase. *J. Leukoc. Biol.*, 54: 171-178, 1993.
- OHNISHI, T.; KITA, H.; WEILER, D.; SUR, S.; SEDGWICK, J. B.; CALHOUN, W.J.; BUSSE, W.W.; ABRAMS, J.S. & GLEICH, G.J. IL-5 is the predominant eosinophil-active cytokine in the antigen-induced pulmonary late-phase reaction. *Am. Rev. Resp. Dis.*, 147: 901-907, 1993.
- OLIVEIRA, S.H.P.; FACCIOLI, L.H.; CUNHA, F.Q. & FERREIRA, S.H. Role of resident peritoneal cells in eosinophil migration induced by saline. *Int. Arch Allergy Immunol.* 104: 323-331, 1994.

- OLIVEIRA, S.H.P.; FONSECA, S.G.; ROMÃO, P.R.T.; FERREIRA, S.H. & CUNHA, F.Q. Is nitric oxide released by eosinophils involved in their microbicidal activity. *Annals of International Symposium on eosinophils in Allergic Inflammation and Parasitic and Infectious Diseases*, pp83. 1996. (Abstract).
- OLLERENSHAW, S. L. & WOOLCOCK, A.J. Characteristics of the inflammation in biopsies from large airways of subjects with asthma and subjects with chronic airflow limitation. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 145: 922-927, 1992.
- OWEN, W.R.; ROTHENBERG, M.E.; SILBERTEIN, D.S.; GASSON, J.C.; STEVENS, R.L.; AUSTEN, K.F. & SOBERMAN, R.J. Regulation of human eosinophil viability, density, and function by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in the presence of 3T3 fibroblasts. *J. Exp. Med.*, 166: 129-141, 1987
- PAGE, C.P. The platelet. In: *Textbook of Immunopharmacology*, ed. by M.M Dale, J. C. Foreman, & T.-P.D Fan, pp 49-54, Blackwell Scientific Publications, London, 1994.
- PALMER, R.M.J.; REES, D.D.; ASHTON, D.S. & MONCADA, S. L-arginine is the physiological precursor for the formation of nitric oxide in endothelium-dependent relaxation. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 153: 1251-1256, 1988.
- PARMLEY, R.T. & SPICER, S.S. Cytochemical and ultrastructural identification of small type granule in human late eosinophils. *Lab. Invest.*, 30: 557-567, 1974.

- PASQUALE, C.P.; MARTINS, M.A.; BOZZA, P.T.; SILVA, P.M.R.; FARIA-NETO, H.C.; PIRES, A.L.A. & CORDEIRO, R.S.B. Bradykinin induces eosinophil accumulation in the rat pleural cavity. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, 95: 244-247, 1991.
- PAUL, W., DOUGLAS, G.J.; LAWRENCE, L.; KHAWAJA, A.M.; PEREZ, A.C.; SCHACHTER, M.; & PAGE, C.P. Cutaneous permeability responses to bradykinin and histamine in the guinea-pig: possible differences in their mechanism of action, *Br. J. Pharmacol.* 111: 159, 1994.
- PERSSON, M.G.; ZETTERSTROM, O.; AGRENIUS, V.; IHRE, E. & GUSTAFSSON, L.E. Single-breath nitric oxide measurements in asthmatic patients and smokers. *Lancet*, 343: 146-147, 1994.
- PETRAY, P.; ROTTENBERG, M.E.; GRINSTEIN, S. & OM, A. Release of nitric oxide during the experimental infection with *Trypanosoma cruzi* parasite. *Immunol.* 16: 193-198, 1994.
- POWELL, W S.; CHUNG, D. & GRAVEL, S. 5-Oxo-6,8,11,14-eicosatetraenoic acid is a potent stimulator of human eosinophil migration. *J. Immunol.*, 154: 4123-4132m, 1995
- RIBEIRO, M.A.; ANTUNES, E.; DE NUCCI, G.; LOVISOLO, S. M. & ZATZ, R. Chronic inhibition of nitric oxide synthesis: a new model of arterial hypertension. *Hypertension*, 20: 298-303, 1992.
- RICHARDS, K.L. & MCCULLOUGH, J.M. A modified microchamber method for chemotaxis and chemokinesis. *Immunol. Commun.*, 13: 49-62, 1984.

- RIMELE, T.J.; STURM, R.J. & ADAMS, L.M. Interaction of neutrophils with vascular smooth muscle: identification of a neutrophil-derived relaxing factor. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 245: 102-111, 1988.
- ROBINSON, D.S.; DURHAM, S.R. & KAY, A.B. Cytokines in asthma. *Thorax*, 48: 845-853, 1993.
- ROTHENBERG, M.E.; OWEN, W.F.JR.; SILBERSTEIN, D.S.; SOBERMAN, R.J.; AUSTEN, K.F. & STEVENS, R.L. Eosinophils co-cultured with endothelial cells have increased survival and functional properties. *Science*, 237: 645-647, 1987.
- SALMON, J.A. & HIGGS, G.A. The eicosanoids: generation and actions. In: *Textbook of Immunopharmacology*, ed. by M.M Dale, J. C. Foreman, & T.-P.D Fan, pp 131-142, Blackwell Scientific Publications, London, 1994.
- SALVEMINI, D.; DE NUCCI, G.; GRYGLEWSKI, R. & VANE, J.R.. Human neutrophils and mononuclear cells inhibit platelet aggregation by releasing a nitric oxide-like factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86: 6328-6332, 1989.
- SALVEMINI, D.; MASINI, E.; ANGGARD, E.; MANNAIONI, P.F. & VANE, J. Synthesis of a nitric oxide-like factor from L-arginine by rat serosal mast cells: stimulation of guanylate cyclase and inhibition of platelet aggregation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 169: 596:601, 1990.
- SANDLER, J.A.; GALLIN, J.I. & VAUGHN, M. Effects of serotonin, carbamylcholine, and ascorbic acid on leukocyte cyclic GMP and chemotaxis. *J. Cell Biol.* 67: 480-487, 1975.

- SCHEMI, R.; CROMWELL, O.; TAYLOR, G.W. & KAY, A.B. Identification of guinea pig eosinophil chemotactic factor of anaphylaxis as leukotriene B₄ and 8(S), 15(S)-dihydroxy-5,9,11,13(Z,E,Z,E)-eicosatetraenoic acid. *J. Immunol.*, 147: 2276-2283, 1991.
- SCHLEIMER, R.P.; FREELAND, H.S.; PETERS, S.P.; BROWN, K.E. & DERSE, C.P. An assessment of the effects of glucocorticoids on degranulation, chemotaxis, binding to vascular endothelium and formation of leukotriene B₄ by purified human neutrophils. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 250: 598-605, 1989.
- SCHLEIMER, R.P.; STERBINSKY, S.A.; KAISER, J. & BICKEL, C.A. IL-4 induces adherence of human eosinophils and basophils but not neutrophils to the endothelium. Association with expression of VCAM I. *J. Immunol.*, 148: 1086-1092, 1992.
- SCHRODER, H.; NEY, P.; WODITSCH, I.; & SCHROR, K. Cyclic GMP mediates SIN-1-induced inhibition of human polymorphonuclear leukocytes. *Eur. J. Pharmacol.*, 182: 211-218, 1990.
- SCHRÖDER, J.M.; KAMEYOSHI, Y & CHRISTOPHERS, E. RANTES, a novel eosinophil-chemotactic cytokine. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 725: 91-103, 1994.
- SCHULZ, R. & TRIGGLE, C.R. Role of NO in vascular smooth muscle and cardiac muscle function. *Trends Pharmacol. Sci.*, 15: 255-259, 1994.
- SCHWENK, U.; MORITA, E.; ENGEL, R. & SCHRÖDER, J.M. Identification of 5-oxo-15-hydroxy-6,8,11,13-eicosatetraenoic acid as a novel and potente human eosinophil chemotactic eicosanoid. *J. Biol. Chem.*, 267: 12482-12488, 1992.

SEDGWICK, J.B.; CALHOUN, W.J.; GLEICH, G.J.; KITA, H.; ABRAMS, J.S.; SCHWARTZ, L.B.; VOLOVITZ, B.; BEN-YAAKOV, M. & BUSSE, W.W. Immediate and late airway response of allergic rhinitis patients to segmental antigen challenge. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 144: 1274-1281, 1991.

SEHMI, R.; WARDLAW, A.J.; CROMWELL, O.; KURIHARA, K.; WALTMANN, P. & KAY, A.B. Interleukin-5 (IL-5) selectively enhances the chemotactic response of eosinophils obtained from normal, but not eosinophilic subjects. *Blood*, 79: 2952-2959, 1992.

SEHMI, R.; CROMWELL, O.; WARDLAW, A.J.; MOQBEL, R. & KAY, A.F. Interleukin 8 is a chemoattractant for eosinophils purified from subjects with blood eosinophilia but not from normal healthy subjects. *Clin. Exp. Allergy*, 23: 1027-1036, 1993.

SILVA, P.M.R.; MARTINS, M.A.; FARIA NETO, H.C.; CORDEIRO, R.S.B. & VARGAFTIG, B. Generation of an eosinophilotatic activity in the pleural cavity of platelet-activating factor-injected rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 257: 1039-1044, 1991.

SMITH, C W.; MARLIN, S D.; ROTHLEIN, R.; TOMAN, C & ANDERSON, D. C. Cooperative interactions of LFA-1 and MAC-1 with Intercellular Adhesion Molecule-1 of human neutrophils in vitro. *J. Clin. Invest.* , 83: 2008-2917, 1989.

SMITH, J.A. Neutrophils, host defense, and inflammation: a double-edged sword. *J. Leuk. Biol.*, 56: 672-686, 1994.

SNYDERMAN, R. & GOETZL, E. J. Molecular and cellular mechanisms of leukocyte chemotaxis. *Science*, 213: 830-837, 1981.

- SPRINGER, T A. Adhesion receptors of the immune system. *Nature*, 356: 425-434, 1990.
- SRIRAMARAO, P.; VON ADRIAN, U.H.; BUTCHER, E.C.; BOURDON, M.A. & BROIDE, D.H.J. L-selectin and very late antigen-4 integrin promote eosinophil rolling at physiological shear rates in vivo. *Immunol.*, 153: 4238-4246, 1994.
- STEEGMAIER, M.; LEVINOVITZ, A.; ISENMANN, S.; BORGES, E. & VESTWEBER, D. The E-selectin-ligand ESL-1 is a variant of a receptor for fibroblast growth factor. *Nature*, 373: 615-620, 1995.
- STENGER, S., THURING, H.; ROLLINGHOFF, M. & BOGDAN, C. Tissue expression of inducible nitric oxide synthase is closely associated with resistance to *Leishmania major*. *J. Exp. Med.*, 180: 783-793, 1994.
- STEPHENS, C.G. & SNYDERMAN, R. Cyclic nucleotides regulates the morphologic alterations required for chemotaxis in monocytes. *J. Immunol.*, 128: 1192-1197, 1982.
- TAYLOR-ROBINSON, A.W.; LIEW, F.Y.; SEVERN, A.; XU, D.; MCSORLEU, S.J.; GARSIDE, P.; PADRON, J. & PHILIPS, R.S. Regulation of the immune response by nitric oxide differentially produced by T helper type 1 and T helper type 2 cells. *Eur. J. Immunol.*, 24: 980-984, 1994.
- TEIXEIRA, M.M.; WILLIAMS, T.J. & HELLEWELL, P.G. Role of prostaglandins and nitric oxide in acute inflammatory reactions in guinea-pig skin. *Br. J. Pharmacol.*, 110: 1515-1521, 1993.

- TEIXEIRA, M.M., WILLIAMS, T.J. & HELLEWELL, P.G. Mechanisms and pharmacological manipulation of eosinophil accumulation in vivo. *Trends Pharmacol. Sci.*, 16: 418-423, 1995.
- VADAS, M.A.; DAVID, J.R.; BUTTERWORTH, A.; PISANI, N.T. & SIONGOK, T.A. A new method for the purification of human eosinophils and neutrophils, and a comparison of the ability of these cells to damage schistosomes of *Schistosoma mansoni*. *J. Immunol.*, 122: 1228-1236, 1979.
- VALENT, P. & BETTELHEIM, P. Cell surface structures on human basophils and mast cell: biochemical and functional characterization. *Advances in Immunology*, 52: 333-423, 1992.
- VANE, J.R. The use of isolated organs for detecting active substances in the circulating blood. *Br. J. Pharmacol.*, 23: 360-73, 1964.
- VENGE, P. The human eosinophil in inflammation. *Agente Actions*, 29: 123-126, 1990.
- VIANNA, E.O. & GARCIA-LEME, J. Allergen-induced airway inflammation in rats: role of insulin. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 151: 809-814, 1995.
- WALKER, C; BODE, E.; BOER, L.; HANSEL, T.T.; BLASER, K. & VIRCHOW, J-C JR. Allergic and nonallergic asthmatics have distinct patterns of T-cell activation and cytokine production in peripheral blood and bronchoalveolar lavage. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 146: 109-115, 1992.
- WALSH, G.M.; HARTNELL, A.; MERMED, J.J.; KAY, A.B. & WARDLAW, A.J. Human eosinophil, but not neutrophil, adherence to IL-1 stimulated HUVEC is $\alpha 4\beta 1$ (VA-4) dependent. *J. immunol.*, 146: 3419-3423, 1991.

- WANG, J.M.; RAMBALDI, A.; BIONDI, A.; CHEN, Z.G.; SANDERSON, C.J. & MONTOVANI, A. Recombinant human interleukin 5 is a selective eosinophil chemoattractant. *Eur. J. Immunol.*, 19: 701-706, 1989.
- WARDLAW, A.J. Leucocyte adhesion to endothelium. *Clin. Exp. Allergy*, 20: 619-626, 1990.
- WARDLAW, A.J.; MOQBEL, R.; CROMWELL, O. & KAY, A.B. Platelet-activating factor. A potent chemotactic and chemokinetic factor for human eosinophils. *J. Clin. Invest.*, 78: 1701-1706, 1986.
- WARRINGA, R.A.J.; KOENDERMAN, L.; KOK, P.T.M.; KREUKNIET, J. & BRUYNZEEL, P.L.B. Modulation and induction of eosinophil chemotaxis by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-3. *Blood*, 77: 2694-2700, 1991.
- WELLER, P.F.; ACKERMAN, S.J.; NICKOLSON-WELLER, A. & DVORAK, A.M. Cytoplasmic lipid bodies of human neutrophilic leukocytes. *Am. J. Pathol.*, 135: 947-959, 1989.
- WELLER, P.F. Cytokine regulation of eosinophil function. *Clin. Immunol. Immunopathol.*, 62: S55-S59, 1992.
- WENNMAIN, A.; BENTHIN, G. & PETERSON, A-S. Dependence of the metabolism of nitric oxide (NO) in healthy human whole blood on the oxygenation of its red cell haemoglobin. *Br. J. Pharmacol.*, 106: 507-508, 1992.

- WILKINSON, P.C. Cellular accumulation and inflammation. In: *Textbook of Immunopharmacology*, ed. by M.M Dale, J. C. Foreman, & T.-P.D Fan, pp 218-231, Blackwell Scientific Publications, London, 1994.
- WONG, T.W., WELLER, P.F.; GALLI, S.J.; ELOVIC, A.; RAND, T.H.; GALLAGHER, G.T.; CHIANG, T.; CHOU, M.Y.; MATOSSIAN, K.; MCBRIDE, J. & TODD, R. Human eosinophils express transforming growth factor- α . *J. Exp. Med.*, 172: 673-681, 1990.
- WONG, D.T.W.; ELOVIC, A.; MATOSSIAN, K.; NAGURA, N.; MCBRIDE, J.; CHOU, M.Y.; GORDON, J.R.; RAND, T.H.; GALLI, S.J.; & WELLER, P.F. Eosinophils from patients with blood eosinophilia express transforming factor β_1 . *Blood*, 78: 2702-2707, 1991.
- XIE, Q.W.; CHO, H.J. CALAYCAY, J.; MUMFORD, R.A.; SWIDEREK, K.M.; LEE, T.D.; DING, A.; TROSO, T. & NATHAN, C. Cloning and characterization of inducible nitric oxide synthase from mouse macrophages. *Science*, 256: 225-228, 1992.
- ZATZ, R. A low-cost tail-cuff method for the stimulation of mean arterial pressure in conscious rats. *Lab. Anim. Sci.*, 40: 198-201, 1990.

7 - SUMMARY

The effect of chronic N^ω-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) treatment on the *in vivo* eosinophil migration was investigated in the rat using both the pleurisy model and the bronchoalveolar lavage (BAL) in ovalbumin (OVA)-sensitized animals. The *in vitro* (microchemotaxis chamber) eosinophil migration induced by fMLP, PAF and zymosan-activated serum (ZAS) was also evaluated in the rat.

Chronic inhibition of NO biosynthesis was achieved by adding L-NAME to the drinking water to give an intake of approximately 75 $\mu\text{mol}/\text{rat}/\text{day}$ for four weeks. The pleurisy was induced by intrapleural injection of BK (50 μg), PAF (1 μg), LPS (0.25 μg) and carrageenin (125 μg). Active sensitization against OVA was performed by s.c. injection of 200 μg OVA and 8 mg $\text{Al}(\text{OH})_3$. 14 days thereafter OVA (1 mg) was injected into the airways. For histopathological analysis, the lungs were cut into small fragments, fixed in 4% buffered paraformaldehyde-glutaraldehyde solution and embedded in paraffin wax. For the *in vitro* chemotaxis studies, eosinophils were collected from the peritoneal cavity of male Wistar rats and isolated on a discontinuous metrizamide gradient.

The intrapleural injection of BK, PAF, LPS and carrageenin into untreated rats *in vivo* induced a significant eosinophil migration by 24 h post-injection. This migration was markedly reduced in L-NAME-treated rats. The BAL 24 h post-challenge with OVA showed a significant leucocyte infiltration composed mainly of neutrophils and mononuclear cells. The eosinophils migrated mainly at 48 h after challenge. At 48h, L-NAME treatment significantly reduce both total leucocyte and eosinophil infiltration. The neutrophil influx was not affected by L-NAME. Similarly, at 48 post-challenge, the lungs presented an infiltration rich in eosinophils as revealed by histopathological analysis. Again, the eosinophil infiltration was attenuated in the lungs from L-NAME-treated

animals. Regarding the *in vitro* chemotaxis, eosinophil obtained from untreated rats showed a significant migration in response to fMLP (5×10^{-8} M), PAF (10^{-8} M) and zymosan-activated serum (27 μ l). In contrast, the migration induced by these chemotactic agents was markedly reduced in cells isolated from animals treated chronically with L-NAME. L-arginine (5.5 mM), but not D-arginine (5.5 mM), restored the ability of eosinophils from L-NAME-treated animals to migrate in response to fMLP.

The finding that the inhibition of eosinophil chemotaxis persisted *in vitro* suggests that the phenomena observed is due to a direct effect of L-NAME on the eosinophil itself, probably, on cell movement.

Inhibition of eosinophil chemotaxis by chronic blockade of nitric oxide biosynthesis

Heloisa H.A. Ferreira ^a, Marta V. Medeiros ^a, Carmen S.P. Limas ^b, Carlos A. Flores ^c, Paulina Sannomiya ^d, Edson Antunes ^{a,*}, Gilberto de Nucci ^a

^a Department of Pharmacology, Faculty of Medical Sciences, UNICAMP, PO Box 6111, 13081-970, Campinas, SP, Brazil

^b Hematology and Hemotherapy Center, UNICAMP, PO Box 6198, 13081-970, Campinas, SP, Brazil

^c Department of Physiology and Pharmacology, Federal University of Ceará, Fortaleza, CE, Brazil

^d Department of Pharmacology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, 05508, São Paulo, (SP), Brazil

Received 25 January 1996; revised 11 April 1996; accepted 14 May 1996

Abstract

The effect of chronic *N*^ω-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) treatment on the *in vivo* eosinophil migration induced by bradykinin, platelet-activating factor (PAF), lipopolysaccharide and carrageenin has been investigated in the rat using the pleurisy model. The *in vitro* (microchemotaxis chamber) eosinophil migration induced by *N*-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (fMLP), PAF and zymosan-activated serum was also evaluated in the rat. The eosinophils were obtained from the peritoneal cavity of male Wistar rats and isolated on a discontinuous metrizamide gradient. Chronic inhibition of nitric oxide biosynthesis was achieved by adding L-NAME to the drinking water to give an intake of approximately 75 μmol/rat/day for 4 weeks. Rats treated chronically with L-NAME developed a significant level hypertension (163 ± 4.8 mmHg; *P* < 0.01) compared with animals which received either the same dose of the inactive enantiomer D-NAME (124 ± 3.2 mmHg) or tap water alone (119 ± 1.6 mmHg). The intrapleural injection of bradykinin (50 μg), PAF (1 μg), lipopolysaccharide (0.25 μg) and carrageenin (125 μg) into untreated rats *in vivo* induced a significant level of eosinophil migration by 24 h post-injection. This migration was markedly reduced in L-NAME-treated rats. Eosinophils obtained from untreated rats showed a significant level of migration *in vitro* in response to fMLP (5 × 10⁻⁸ M), PAF (10⁻⁸ M) and zymosan-activated serum (27 μl). In contrast, the migration induced by these chemotactic agents was markedly reduced in cells isolated from animals treated chronically with L-NAME. L-Arginine (5.5 mM), but not D-arginine (5.5 mM), restored the ability of eosinophils from L-NAME-treated animals to migrate in response to fMLP. Our results indicate that nitric oxide plays a major role in the *in vivo* and *ex vivo* migration of eosinophils.

Keywords: *N*^ω-Nitro-L-arginine methyl ester; Eosinophil chemotaxis; Nitric oxide (NO); Pleurisy; cGMP

1. Introduction

Eosinophils seem to play a primarily role in inflammation processes accompanying parasitic infections and allergic diseases. They synthesize and release several substances including preformed granule proteins (eosinophil cationic protein, eosinophil peroxidase, major basic protein, eosinophil protein X; Gleich and Adolphson, 1986), oxygen-derived toxic metabolites (O₂⁻, H₂O₂, OH⁻; Dechatelet et al., 1977; Kanofsky et al., 1988), arachidonic acid metabolites (Bruynzeel et al., 1987; Kroegel and Matthya, 1993), platelet-activating factor (PAF; Burke et al., 1990) and cytokines (Moqbel et al., 1991). In addition,

the intrapleural injection of bradykinin (Pasquale et al., 1991), PAF (Martins et al., 1989) and lipopolysaccharide (Bozza et al., 1993, 1994), delays the accumulation of eosinophils which usually takes place after a large neutrophil infiltration.

Nitric oxide (Ignarro et al., 1987; Palmer et al., 1987) is synthesised and released by inflammatory cells including macrophages (Marletta et al., 1988), polymorphonuclear (Rimele et al., 1988; Salvemini et al., 1989; Schmidt et al., 1989) and mononuclear (Salvemini et al., 1989) cells. The role of nitric oxide in leucocyte chemotaxis *in vitro* has been investigated using either neutrophils (Kaplan et al., 1989; Belenky et al., 1993a) or mononuclear cells (Belenky et al., 1993b), although a few *in vivo* studies have been performed with eosinophils (Teixeira et al., 1993). In an attempt to clarify the role of nitric oxide in both *in vitro*

* Corresponding author. Fax: (+55-192) 52 1516.

and in vivo eosinophil migration induced by different chemotactic agents, we carried out experiments in rats treated chronically with L-NAME for 4 weeks. The in vivo leucocyte chemotaxis (assessed using the pleurisy model) induced by bradykinin, PAF, carrageenin and lipopolysaccharide was evaluated 24 h after the intrapleural injection of these inflammatory agents. The ex vivo chemotaxis was undertaken using rat peritoneal eosinophils stimulated with *N*-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (fMLP), PAF and zymosan-activated serum.

2. Materials and methods

2.1. Chronic treatment with L-NAME and D-NAME

Chronic treatment with L-NAME was performed as previously described (Ribeiro et al., 1992). Briefly, male Wistar rats (100 g at the beginning of the study) received L-NAME dissolved in the drinking water at a concentration of 1.2 mM to give a daily intake of approximately 75 $\mu\text{mol}/\text{rat}/\text{day}$. The animals were treated for up to 4 weeks. Another group of animals was treated with the inactive enantiomer D-NAME (75 $\mu\text{mol}/\text{rat}/\text{day}$). Control animals received tap water alone. Systemic arterial pressure was estimated weekly by a tail-cuff method (Zatz, 1990).

2.2. Pleurisy

Male Wistar rats (150–200 g) were lightly anaesthetised with ether and submitted to a skin incision at the level of the left sixth intercostal space. The underlying muscles were dissected and bradykinin (50 μg), PAF (1 μg), lipopolysaccharide (0.25 μg) or carrageenin (125 μg) was injected into the pleural cavity. Control animals were injected with sterile, phosphate-buffered saline (PBS). The total volume injected was always 0.25 ml. The skin incisions were closed with a suture and the animals allowed to recover. At 6, 24 and 48 h thereafter, the animals were again anaesthetised and exsanguinated by cutting the cervical vessels. The chest wall was opened and the pleural cavity washed with 2 ml of heparinised (10 UI/ml) PBS. The exudate and washings were removed by aspiration and the total volume measured. Exudates contaminated with blood were discarded.

2.3. Total and differential leucocyte counts

Total and differential leucocyte counts were performed in both the pleural exudate and peripheral blood obtained from the rat tail. The total leucocyte counts were done using an automated cell counter (CELL-DYN, 1600, USA) while the differential leucocyte counts were carried out on air-dried smears stained with May-Grünwald-Giemsa.

2.4. Eosinophil isolation

Eosinophils were obtained from the peritoneal cavity of 5–7 male Wistar rats (200–230 g) and were purified on a discontinuous metrizamide gradient as previously described (Vadas et al., 1979). Briefly, the animals were exsanguinated under ether anaesthesia by cutting the cervical vessels. The peritoneal cavities were washed with 20 ml of Hank's balanced salt solution (HBSS; pH 7.2) containing heparin (20 IU/ml). The peritoneal washings obtained from the animals were pooled and centrifuged at $1000 \times g$ for 18 min at 20°C in a Hermle model Z 360 K centrifuge (Germany). Metrizamide was dissolved in Eagle's minimum essential medium (MEM; pH 7.2) containing 0.1% gelatin. The discontinuous gradient was prepared by carefully layering 2.5 ml of decreasing concentrations of metrizamide solutions (23.5, 20 and 18%, w/v) into a conical propylene tube. The resulting leucocytic pellet was gently resuspended in 18% metrizamide (2.5 ml) and layered over the top of the metrizamide gradient. The gradient tube was first centrifuged at $90 \times g$ (11 min at 20°C) and centrifuged again at $1000 \times g$ (14 min at 20°C). The gradient zone containing the eosinophils (between the 23.5 and 20% gradients) was removed and washed twice in MEM. The final cell suspension (2.5×10^7 cells/ml) contained 92% eosinophils. Cell viability (> 90%) was assessed by the trypan blue dye exclusion test. Before testing, the eosinophil suspension was resuspended in MEM to give a final concentration of 5×10^6 cells/ml.

2.5. Chemotaxis assay

The eosinophil migration assay was performed using a 48-well microhemotaxis chamber as previously described (Richards and McCullough, 1984). Briefly, 50 μl of the eosinophil suspension (5×10^6 cell/ml) were added to the upper compartment of the microhemotaxis chamber (Neuro Probe, USA) and separated from the chemotactic agents in the lower compartment by a cellulose nitrate filter, (thickness, 130 μm ; average pore size, 3 μm ; Nucleopore, Pleasanton, CA). MEM was substituted for the chemotactic agent to measure random migration. The loaded chambers were incubated for 2 h at 37°C in a 5% CO_2 atmosphere and the filters were removed for fixation and staining of the cells as previously described (Richards and McCullough, 1984). The eosinophil migration into the filter was determined as the number of cells present in 15 consecutive high-power fields at a distance of 40 μm within the filter from the top, using a $\times 100$ immersion objective. Triplicate chambers were always run.

The chemotactic agents employed in this study were *N*-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (fMLP; 5×10^{-8} M, dissolved in MEM), PAF (10^{-8} M, dissolved in MEM) and zymosan-activated serum. Zymosan-activated serum was prepared by incubating human serum with

zymosan (1 mg/ml) for 1 h at 37°C. After centrifugation (2000 × g, 15 min at room temperature), the supernatant was aliquoted and stored at −20°C. Zymosan-activated serum was employed at fixed volumes of 27 µl from the 100% plasma solution.

2.6. Drugs

N^ω-Nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME), D-NAME, λ-carrageenin, platelet-activating factor, *N*-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (fMLP), zymosan, bradykinin, lipopolysaccharide (from *Escherichia coli*) and metrizamide were obtained from Sigma Chem. Co. (St. Louis, MO, USA).

2.7. Statistical analysis

Data are presented as the mean ± S.E.M. and were analysed by analysis of variance (ANOVA) and Student's unpaired *t*-test. A *P*-value of less than 0.05 was considered to indicate significance.

3. Results

The average daily intake of both water and food did not significantly differ between the animals treated chronically with L-NAME for 4 weeks and those receiving tap water alone (data not shown, *n* = 30). There was also no statistical difference in the body weight again between both groups of animals (Table 1). However, the L-NAME-treated animals developed a significant level of hypertension compared with either the untreated rats or those receiving the inactive enantiomer D-NAME (75 µmol/rat/day, *n* = 6) for 4 weeks (Table 1). These results confirmed the inhibition of nitric oxide synthesis.

3.1. Intrapleural injection of bradykinin, PAF, carrageenin and lipopolysaccharide

The washing of pleural activity of control (non-treated) rats with 2 ml PBS contained $3.3 \pm 0.8 \times 10^6$

Table 1

Body weight and tail-cuff pressure in rats before and after chronic treatment with either L-NAME (75 µmol/rat/day, 4 weeks; *n* = 30) or D-NAME (75 µmol/rat/day, 4 weeks; *n* = 6)

Treatment	Body weight (g)			Tail-cuff pressure	
	Before	After	Δ%	Before	After
Control	112 ± 3	224 ± 4	100	106.5 ± 2.0	119.0 ± 1.6
L-NAME	115 ± 3	215 ± 3	87	105.0 ± 2.2	163.0 ± 4.8 ^a
D-NAME	102 ± 3	223 ± 4	119	104.6 ± 2.0	124.0 ± 3.2

The control group of rats received only tap water (*n* = 30).^a*P* < 0.05 compared with tail-cuff pressure before treatment. Values represent the mean ± S.E.M.

Table 2

Leucocyte migration induced by the intrapleural injection of bradykinin (BK; 50 µg), platelet-activating factor (PAF; 1 µg), carrageenin (Cg; 125 µg) and lipopolysaccharide (LPS; 0.25 µg)

Agent	Time (h)	Leucocytes (× 10 ⁶ /cavity)			
		Total	NE	EO	MN
BK	6	68.4 ± 13.1	48.4 ± 13.4	0	20.0 ± 3.0
	24	45.6 ± 3.8	8.4 ± 1.4	7.2 ± 1.3	30.0 ± 2.5
	48	14.0 ± 2.4	0	1.6 ± 0.3	12.4 ± 2.0
PAF	6	43.9 ± 4.0	23.8 ± 3.0	1.34 ± 0.5	18.8 ± 2.0
	24	36.0 ± 4.7	12.8 ± 1.2	4.8 ± 0.7	18.4 ± 3.2
	48	20.2 ± 2.8	0.2 ± 0.1	6.0 ± 1.5	14.0 ± 1.9
Cg	6	72.6 ± 6.0	53.4 ± 6.6	0.5 ± 0.3	18.7 ± 2.5
	24	76.0 ± 3.7	32.8 ± 4.8	5.9 ± 0.8	37.3 ± 5.0
	48	21.1 ± 0.5	1.1 ± 0.4	3.1 ± 0.5	16.9 ± 0.5
LPS	6	48.1 ± 12.7	30.7 ± 3.7	0.8 ± 0.38	16.6 ± 2.87
	24	85.8 ± 15.0	15.1 ± 3.4	19.9 ± 3.0	50.8 ± 11.8
	48	22.8 ± 1.5	0.0 ± 0.0	10.2 ± 1.4	12.6 ± 1.3

The number of total leucocytes, neutrophils (NE), eosinophils (EO) and mononuclear cells (MN) were evaluated at 6, 24 and 48 h after each injection. The results represent the mean ± S.E.M. of 6 rats.

leucocytes/cavity (*n* = 6), virtually all mononuclear cells ($3.2 \pm 0.7 \times 10^6$ /cavity). The intrapleural injection of bradykinin (50 µg), PAF (1 µg) and carrageenin (125 µg) induced a significant level of total leucocyte migration which peaked at 6 h after injection (Table 2). Lipopolysaccharide (0.25 µg) also induced a significant level of leucocyte infiltration which peaked at 24 h after injection (Table 2). At 6 h, leucocyte infiltration was composed mainly of polymorphonuclear neutrophils whereas at 24 h it considered mainly of mononuclear cells (Table 2). The eosinophils migrated mainly at 24 and 48 h after the intrapleural injection of the inflammatory agents. We therefore selected the time of 24 h for further studies in order to investigate the effects of chronic L-NAME treatment on pleural eosinophil influx.

3.2. Effect of chronic treatment with L-NAME on pleural leucocyte migration induced by bradykinin, PAF, carrageenin and lipopolysaccharide

The chronic treatment of rats with L-NAME for 4 weeks reduced by approximately 40–50% the total leucocyte infiltration (24 h) induced by both bradykinin (15.9 ± 2.6 and $9.2 \pm 0.7 \times 10^6$ cells/cavity for untreated and treated animals, respectively, *n* = 6; *P* < 0.05) and lipopolysaccharide (21.9 ± 3.8 and $11.8 \pm 0.5 \times 10^6$ cells/cavity for untreated and treated animals, respectively, *n* = 6; *P* < 0.05). The reduced total number of cells in the bradykinin-induced pleurisy in L-NAME-treated rats was due to a marked inhibition of the recruitment of both mononuclear cells and neutrophils (Table 3) as well as eosinophils (Fig. 1). Similar responses were observed with lipopolysaccharide where the absolute numbers of

Table 3

Neutrophil and mononuclear cell migration induced by the intrapleural injection of bradykinin (BK; 50 μ g), lipopolysaccharide (LPS; 0.25 μ g), platelet-activating factor (PAF; 1 μ g) and carrageenin (Cg; 125 μ g) in control (untreated) and L-NAME-treated (75 μ mol/rat/day, 4 weeks) animals

Agent	Leucocytes ($\times 10^6$ /cavity)			
	NE		MN	
	Control	L-NAME	Control	L-NAME
BK	0.8 $\pm$ 0.2	0.0 ^a	11.9 $\pm$ 1.6	8.2 $\pm$ 0.7 ^a
LPS	4.0 $\pm$ 1.3	2.0 $\pm$ 0.3 ^a	15.9 $\pm$ 2.5	8.6 $\pm$ 0.3 ^a
PAF	0.4 $\pm$ 0.04	0.08 $\pm$ 0.4	8.2 $\pm$ 1.5	7.4 $\pm$ 0.6
Cg	32.6 $\pm$ 4.8	42.1 $\pm$ 3.0	37.0 $\pm$ 5.0	34.0 $\pm$ 3.6

The number of neutrophils (NE) and mononuclear cells (MN) was evaluated 24 after each injection. The results represent the mean $\pm$ S.E.M. of 6 rats.

^a $P < 0.05$ compared with their respective control values.

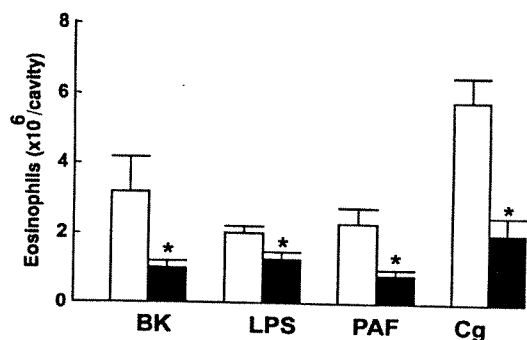


Fig. 1. The effect of chronic treatment with L-NAME (75 μ mol/rat/day, 4 weeks) on the pleural eosinophil recruitment (24 h) induced by bradykinin (BK; 50 μ g), lipopolysaccharide (LPS; 0.25 μ g), PAF (1 μ g) and carrageenin (Cg; 125 μ g). The open and solid columns represent the number of eosinophils observed in untreated and L-NAME-treated animals, respectively. Each column represents the mean $\pm$ S.E.M. of 6 rats. ^a $P < 0.05$ when compared with control values.

mononuclear cells, neutrophils (Table 3) and eosinophils (Fig. 1) were markedly reduced in the L-NAME-treated animals compared with the untreated ones. In contrast to bradykinin and lipopolysaccharide, the total cell recruitment induced by PAF (24 h) was not significantly affected by the chronic L-NAME treatment (10.9 ± 1.5 and $8.3 \pm 0.8 \times 10^6$ cells/activity for untreated and treated animals, respectively, $n = 6$) although a significant reduction in the number of eosinophils was observed ($P < 0.05$; Fig. 1). The PAF-induced accumulation of neutrophils and mononuclear cells observed in the L-NAME-treated animals was not significantly different from that observed in the untreated animals ($n = 6$; Table 3). Similarly to PAF, chronic L-NAME treatment affected neither the total leucocyte emigration (75.4 ± 3.6 and $78.1 \pm 6.0 \times 10^6$ cells/activity for untreated and treated animals, respectively, $n = 6$) nor the number of both neutrophils and mononuclear cells (Table 3) when carrageenin (24 h) was used as the chemotactic agent. However, a significant inhibition of eosinophil migration was observed with the

Table 4

Lack of effect of D-NAME (75 μ mol/rat/day, 4 weeks) on the pleurisy induced by bradykinin (BK; 50 μ g)

Treatment	Leucocytes ($\times 10^6$ /cavity)			
	Total	NE	EO	MN
Control	15.6 $\pm$ 2.5	0.8 $\pm$ 0.3	1.8 $\pm$ 0.5	13.0 $\pm$ 2.0
D-NAME	14.0 $\pm$ 2.6	1.6 $\pm$ 0.6	1.4 $\pm$ 0.4	11.0 $\pm$ 2.0

Total and differential (NE = neutrophils; EO = eosinophils; MN = mononuclear cells) cell counts were obtained 24 after the injection of BK. The results represent the mean $\pm$ S.E.M. of 6 rats.

Table 5

Lack of effect of L-NAME on the peripheral leucocyte counts

Leucocytes	Peripheral leucocytes ($\times 10^3/\mu$ l)	
	Control	L-NAME
Total	6.1 $\pm$ 1.0	5.5 $\pm$ 0.7
Neutrophils	0.58 $\pm$ 0.1	0.62 $\pm$ 0.1
Eosinophils	0.02 $\pm$ 0.01	0.09 $\pm$ 0.03
Lymphocytes	4.99 $\pm$ 0.9	4.75 $\pm$ 0.6
Monocytes	0.49 $\pm$ 0.14	0.14 $\pm$ 0.003

L-NAME (75 μ mol/rat/day) was administered in the drinking water for 4 weeks. Control animals received tap water alone (see Methods). The results represent the mean $\pm$ S.E.M. of 5–6 rats.

latter compound ($P < 0.01$; Fig. 1). Chronic treatment with D-NAME (75 μ mol/rat/day, 4 weeks) had no significant effect on the bradykinin-induced pleurisy ($n = 6$; Table 4).

3.3. Effect of chronic treatment with L-NAME on the peripheral leucocyte counts

Table 5 shows that chronic treatment of the animals with L-NAME (75 μ mol/rat/day, 4 weeks) affected neither the total peripheral leucocyte counts nor the differential (neutrophils, eosinophils, lymphocytes and monocytes) counts.

3.4. Eosinophil chemotaxis *ex vivo* induced by fMLP, PAF and zymosan-activated serum

Fig. 2 shows that eosinophils obtained from control (untreated) animals and suspended in MEM significantly ($P < 0.05$) migrated in response to fMLP (5×10^{-8} M, $n = 9$), PAF M, $n = 9$) and zymosan-activated serum ($n = 9$) compared to the spontaneous migration. However, these chemotactic agents failed to induce eosinophil migration when the cells were obtained from animals treated chronically with L-NAME (75 μ mol/rat/day) for 4 weeks. The reduction in fMLP-induced eosinophil chemotaxis observed in L-NAME-treated animals was significantly reversed ($P < 0.05$) by L-arginine (5.5 mM) but not by the same concentration of D-arginine (Fig. 3). L-Arginine and D-arginine did not affect the fMLP-induced chemotaxis of eosinophils obtained from untreated animals (12.7 ± 0.5 ,

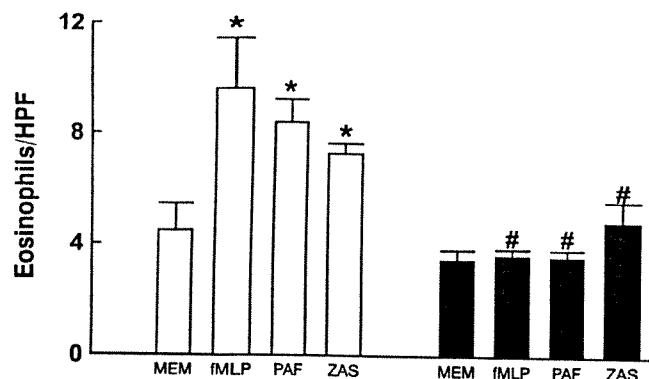


Fig. 2. Inhibition by L-NAME (75 μ mol/rat/day, 4 weeks; solid columns) of rat eosinophil chemotaxis induced by fMLP (5×10^{-8} M), PAF (10^{-8} M) and zymosan-activated serum (ZAS; 27 μ l), compared with untreated animals (open columns). Each experiment was carried out in triplicate. Chemotaxis is expressed as the mean number of migrated cells per high-power field (HPF). The results are shown as the mean $\pm$ S.E.M. ($n = 3$). * $P < 0.05$ compared with spontaneous migration (MEM alone); # $P < 0.05$ compared with chemotactic response of eosinophils from untreated rats.

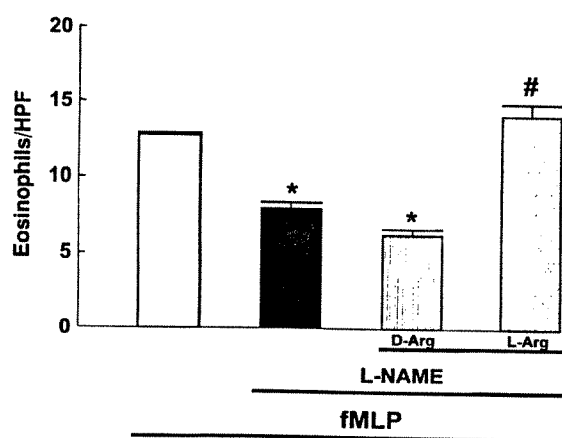


Fig. 3. L-Arginine, but not D-arginine, reverses inhibition by L-NAME of fMLP-induced eosinophil chemotaxis. The solid column represents fMLP (5×10^{-8} M)-induced chemotaxis with eosinophils from L-NAME-treated animals (75 μ mol/rat/day, 4 weeks), compared with that observed with cells from untreated animals (open column). Striped and cross-hatched columns represent the effects of D-arginine (5.5 mM) and L-arginine (5.5 mM), respectively. Each experiment was carried out in triplicate. Chemotaxis is expressed as the mean number of migrated cells per high-power field (HPF). The results are shown as the mean $\pm$ S.E.M. ($n = 3$). * $P < 0.05$ compared with chemotaxis of eosinophils from control (untreated) animals; # $P < 0.05$ compared with chemotaxis of eosinophils from L-NAME-treated animals.

10.2 ± 0.6 and 10.7 ± 0.6 eosinophils/HPF, for control, L-arginine and D-arginine, respectively; $n = 9$).

4. Discussion

Our results clearly demonstrate that the chronic blockade of nitric oxide biosynthesis inhibits eosinophil migration both in vivo and ex vivo. The decrease in eosinophil influx in vivo was due to nitric oxide inhibition since it was observed only with L-NAME and the eosinophil chemotaxis in vitro could be restored with L-arginine. As

the inhibition of the pleural eosinophil influx was independent of the stimulus employed, these results suggest a pivotal role for nitric oxide in eosinophil chemotaxis.

The acute administration of L-NAME inhibits both the basal blood flow and the [111 In]eosinophil accumulation induced by the intradermal injection of zymosan-activated serum and PAF in the guinea-pig cutaneous microcirculation. The co-injection of vasodilators (sodium nitroprusside and prostaglandin E_1) reversed the inhibitory effects of L-NAME, suggesting that the decrease in basal blood flow is the mechanism by which L-NAME exerts its anti-inflammatory effects in the skin (Teixeira et al., 1993). A similar mechanism of action has been proposed for the decrease in plasma protein leakage caused by either acute (Hughes et al., 1990; Ialenti et al., 1992; Teixeira et al., 1993; Giraldeho et al., 1994; Paul et al., 1994; Mariani-Pedroso et al., 1995) or chronic (Medeiros et al., 1995) administration of L-NAME in different animal species. However, the finding that the inhibition of eosinophil chemotaxis persisted ex vivo indicates that the phenomenon observed is due to a direct effect on the eosinophil itself, rather than on the pleural vascular bed. Although the eosinophils were obtained in two different cavities (pleural and peritoneal), these cavities behave very similarly concerning cell migration induced by PAF (Etienne et al., 1989) and zymosan (Damas and Prunescu, 1993).

Several endothelial and leukocyte cell adhesion molecules such as L-selectin, E-selectin, P-selectin, Cd54 and CD102 are thought to modulate eosinophil interaction with endothelial cells (Teixeira et al., 1995). P-Selectin expression in the endothelial cells is attenuated by nitric oxide donors (Gauthier et al., 1994) and increased by L-NAME treatment (Davenpeck et al., 1994). Whether the inhibition of nitric oxide biosynthesis would lead to an increased expression of adhesion molecules by eosinophils and to a subsequent impairment of eosinophil chemotaxis remains to be demonstrated.

Nitric oxide activates soluble guanylate cyclase, thereby increasing intracellular levels of cyclic guanosine monophosphate (cGMP; Mellion et al., 1980). The role of this second messenger in cell locomotion is controversial since the accumulation of cGMP in both neutrophils and mononuclear cells either stimulates (Sandler et al., 1975; Anderson et al., 1986; Kaplan et al., 1989; Belenky et al., 1993a,b) or attenuates (Schroder et al., 1990; Bath et al., 1991; Moilanen et al., 1993) the in vitro chemotaxis. Although Beauvais et al. (1995) have shown that unconventional nitric oxide donors such as azide and hydroxylamine inhibit apoptosis in isolated eosinophils and that this effect is mimicked by permeable cGMP analogues, there is no evidence for the existence of this second messenger in eosinophils.

Nitric oxide has other actions independent of cGMP formation (Brune and Lapetina, 1989; Bolotina et al., 1994). For instance, nitric oxide stimulates the ADP-ribosylation of action in purified membranes of human neu-

trophils (Clancy et al., 1994). Whether the inhibition of eosinophil chemotaxis by chronic L-NAME reflects a decrease in the ADP-ribosylation of actin, and hence an impaired eosinophil locomotion remains to be elucidated.

To date, there is no evidence that eosinophils are able to synthesize nitric oxide. Our results clearly indicate the presence of a functional nitric oxide synthase system. This discrepancy probably reflects the technical difficulties in isolating suitable amounts of eosinophils for enzyme purification.

Leishmania (Cunha et al., 1993; Stenger et al., 1994) and other (Munoz-Fernandez et al., 1992; Petray et al., 1994) parasites stimulate the expression of inducible nitric oxide synthase by macrophages in vitro. Interestingly, parasitic infections in vivo are classically accompanied by eosinophilia. Our concept that nitric oxide synthesis plays a pivotal role in eosinophil chemotaxis may provide an explanation for the eosinophilia observed in these infections. Moreover, the fact that mediators found in inflammatory exudates such as bradykinin do activate nitric oxide synthase (De Nucci et al., 1988) further highlights the potential role of nitric oxide for eosinophil migration.

Acknowledgements

We thank Monica de Almeida Falconi (Hemocentro, UNICAMP, S.P., Brazil) for technical assistance.

References

- Anderson, R., A. Glover, H.J. Koornhof and A.R. Rabson, 1986, In vitro stimulation of neutrophil motility by levamisole: maintenance of cGMP levels in chemotactically stimulated levamisole-treated neutrophils, *J. Immunol.* 117, 428.
- Bath, P.M.W., D.G. Hassall, A.-M. Gladwin, R.M.J. Palmer and J.F. Martin, 1991, Nitric oxide and prostacyclin: divergence of inhibitory effects of monocyte chemotaxis and adhesion to endothelium in vitro, *Arter. Thromb.* 11, 254.
- Beauvais, F., L. Michel and L. Dubertret, 1995, The nitric oxide, oxide and hydroxylamine, inhibit the programmed cell death of cytokine-deprived human eosinophils, *FEBS Lett.* 361, 229.
- Belenky, S.N., R.A. Robbins, S.I. Rennard, G.L. Gossman, K.J. Nelson and I. Rubinstein, 1993a, Inhibitors of nitric oxide synthase attenuate human neutrophil chemotaxis in vitro, *J. Lab. Clin. Med.* 122, 388.
- Belenky, S.N., R.A. Robbins and I. Rubinstein, 1993b, Nitric oxide synthase inhibitors attenuate human monocyte chemotaxis in vitro, *J. Neuk. Biol.* 498, 498.
- Bolotina, V.M., S. Najibi, J.J. Palacino, P.J. Pagano and R.A. Cohen, 1994, Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle, *Nature* 368, 850.
- Bozza, P.T., H.C. Castro-Faria-Neto, M.A. Martins, A.P. Lorangeira, J.E. Perales, P.M.R. Silva and R.S.B. Cordeiro, 1993, Pharmacological modulation of lipopolysaccharide-induced pleural eosinophilia in the rat: a role of newly generated protein, *Eur. J. Pharmacol.* 248, 41.
- Bozza, P.T., H.C. Castro-Faria-Neto, C. Penido, A.P. Lorangeira, M. Graças, M.O. Henriques, P.M.R. Silva, M.A. Martins, R.R. Santos and R.S.B. Cordeiro, 1994, Requirement for lymphocytes and resident macrophages in LPS-induced pleural eosinophil accumulation, *J. Leuk. Biol.* 56, 151.
- Brune, B. and E.G. Lapetina, 1989, Activation of a cytosolic ADP-ribosyltransferase by nitric oxide-generating agents, *J. Biochem. Chem.* 264, 8455.
- Bruynzeel, P.L.B., P.T.M. Kok, M.L. Hamelink, A.M. Kijne and J. Verjagen, 1987, Platelet-activating factor induces leukotriene-C4 synthesis by purified human eosinophils, *Prostaglandins* 34, 205.
- Burke, L.A., A.E.G. Crea, J.R.W. Wikinson, J.P. Arm, B.W. Spur and T.H. Lee, 1990, Comparison of the generation of platelet activating factor and leukotriene C₄ in human eosinophils stimulated by unopsonized zymosan and by calcium ionophore A23187: the effect of nedocromil sodium, *J. Allergy Clin. Immunol.* 85, 26.
- Clancy, R.M., J. Leszczynska-Piziak and S.B. Abramson, 1994, Nitric oxide stimulates the ADP-ribosylation of actin in human neutrophils, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 31, 847.
- Cunha, F.Q., D.W. Moss, L.M.C.C. Leal, S. Moncada and F.Y. Liew, 1993, Induction of macrophage parasitocidal activity by *Staphylococcus aureus* and exotoxins through the nitric oxide synthesis pathway, *Immunology* 78, 563.
- Damas, J. and P. Prunescu, 1993, Presence of immunoreactive platelet-activating factor in peritoneal exudate induced by zymosan in rats, *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* 322, 115.
- Davenpeck, K.L., T.W. Gauthier and A.M. Lefer, 1994, Inhibition of endothelial-derived nitric oxide promotes P-selectin expression and actions in the rat microcirculation, *Gastroenterology* 107, 1050.
- Dechatelet, L.R., M.R. Shirley, L.C. McPhail, C.C. Hunely, H.B. Muss and D.A. Bass, 1977, Oxidative metabolism of human eosinophils, *Blood* 50, 525.
- De Nucci, G.R., Gryglewski, T.D. Warner and J.R. Vane, 1988, The receptor-mediated release of endothelium-derived and PGI₂ from bovine aortic endothelial cells is coupled, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 2334.
- Etienne, A., C. Soulard, F. Thonier and P. Braquet, 1989, Modulation by drugs of eosinophil recruitment induced by immune challenge in the rat. Possible roles of interleukin 5 and platelet-activating factor, *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 88, 216.
- Gauthier, T.W., K.L. Davenpeck and A.M. Lefer, 1994, Nitric oxide attenuates leukocyte-endothelial interaction via P-selectin in splanchnic ischemia-reperfusion, *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 267, 30.
- Giraldeho, C.M.M., A. Zappellini, M.N. Muscará, I.M.S. De Luca, S. Hyslop, G. Cirino, R. Zatz, G. de Nucci and e. Antunes, 1994, Effect of arginine analogues on rat hind paw edema and mast cell activation in vitro, *Eur. J. Pharmacol.* 257, 87.
- Gleich, G.J. and C.R. Adolphson, 1986, The eosinophil leukocyte: structure and function, *Adv. Immunol.* 39, 177.
- Hughes, S.R., T.J. Williams and S.D. Brain, 1990, Evidence that endogenous nitric oxide modulates oedema formation induced by substance P, *Eur. J. Pharmacol.* 191, 481.
- Ialenti, A., A. Lanaro, S. Moncada and M. Di Rosa, 1992, Modulation of acute inflammation by endogenous nitric oxide, *Eur. J. Pharmacol.* 211, 177.
- Ignarro, L.J., G.M. Buga, K.S. Wood, R.E. Byrns and G. Chaudhuri, 1987, Endothelium-derived relaxing factor produce and released from artery and veins is nitric oxide, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 9265.
- Kanofsky, J.R., H. Hoogland, R. Wever and S.J. Weiss, 1988, Singlet oxygen production by human eosinophils, *J. Biol. Chem.* 263, 9692.
- Kaplan, S.S., T. Billar, R.D. Curran, V.E. Dziraski, R.L. Simmons and R.E. Basford, 1989, Inhibition of chemotaxis with N^G-monomethyl-L-arginine: a role for cyclic GMP, *Blood* 74, 1885.
- Kroegel, C. and H. Matthya, 1993, Platelet-activating factor-induced human eosinophil activation. Generation and release of cyclooxygenase metabolites in human blood eosinophils from asthmatics, *Immunology* 78, 279.
- Mariani-Pedroso, S., L. Bizeto, R. Zatz, E. Antunes and G. de Nucci, 1995, Dissimilarity between prostaglandin, E₁ and nitric oxide donors

- as potentiators of plasma exudation in the rabbit skin in viro, *Prost. Leuk. Essential Fatty Acids* 52, 399.
- Marletta, M.A., P.S. Yoon, R. Iyengar, C.D. Leaf and J.S. Wishnok, 1988, Macrophage oxidation of L-arginine to nitrite and nitrate. Nitric oxide is an intermediate, *Biochemistry* 27, 8706.
- Martins, M.A., P.M.R. Silva, H.C. Faria-Neto, P.T. Bozza, P.M.F.L. Dias, M.C.R. Lima, R.S.B. Cordiero and B.B. Vargaftig, B.B., 1989, Pharmacological modulation of Paf-induced pleurisy and its role in inflammation by zymozan, *Br. J. Pharmacol.* 96, 363.
- Medeiros, M.V., I.M. Binhara, H. Moreno Jr, G. de Nucci and E. Artunes, 1995, Effect of chronic nitric oxide inhibition on the inflammatory responses induced by carrageenin in rats, *Eur. J. Pharmacol.* 285, 109.
- Mellion, B.T., L.L. Ignarro, E.M. Ohlstein, E.G. Ponte-corvo, A.L. Hyman and P.J. Kadowitz, 1980, Evidence for the inhibitory role of guanosine 3':5'-monophosphate in ADP-induced human platelet aggregation in the presence of nitric oxide and related vasodilators, *Blood* 57, 946.
- Moilanen, E., P. Vuorinen, H. Kankaanranta, T. Metsa-Ketela and H. Vapaatalo, 1993, Inhibition by nitric oxide-donors of human polymorphonuclear leucocyte functions, *Br. J. Pharmacol.* 109, 852.
- Moqbel, R., Q. Hamid, S. Ying, J. Barkans, A. Hartnell, a. Tscopoulos, A.J. Wardlaw and A. Barry Kay, 1991, Expression of mRNA and immunoreactivity for the granulocyte/macrophage colony-stimulating factor in activated human eosinophils, *J. Exp. Med.* 174, 749.
- Munoz-Fernandez, M.A., M.A. Fernandez and M. Fresno, 1992, Activation of human macrophages for the killing of intracellular *Trypanosoma cruzi* by TN-alpha and IFN-gamma through a nitric oxide-dependent mechanism, *Immunol Lett.* 33, 35.
- Palmer, R.M.J., A.G. Ferrige and S. Moncada, 1987, Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor, *Nature* 327, 524.
- Pasquale, C.P., M.A. Martins, P.T. Bozza, P.M.R. Silva, H.C. Faria-Neto, A.L.A. Pires and R.S.B. Cordiero, 1991, Bradykinin induces eosinophil accumulation in the rat pleural cavity, *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 95, 244.
- Petray, P., M.E. Rottenberg, S. Grinstein and A. Om, 1994, Release of nitric oxide during the experimental infection with *Trypanosoma cruzi*, *Parasite Immunol.* 16, 193.
- Paul, W., G.J. Douglas, L. Lawrence, A.M. Khawaja, A.C. Perez, M. Scachter and C.P. Page, 1994, Cutaneous permeability responses to bradykinin and histamine in the guinea-pig: possible differences in their mechanism of action, *Br. J. Pharmacol.* 111, 159.
- Ribeiro, M.O., E. Antunes, G. de Nucci, S.M. Lovisolo and R. Zatz, 1992, Chronic inhibition of nitric oxide synthesis. A new model of arterial hypertension, *Hypertension* 20, 298.
- Richards, K.I. and J.M. McCullough, 1984, A modified microchamber method for chemotaxis and chemotaxis, *Immunol. Commun.* 13, 49.
- Rimele, T.J., Sturm and L.M. Adams, 1988, Interaction of neutrophils with vascular smooth muscle: identification of a neutrophil-derived relaxing factor, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 245, 102.
- Salvemini, D., G. de Nucci, R. Gryglewski and J.R. Vane, 1989, Human neutrophils and mononuclear cells inhibit platelet aggregation by releasing a nitric oxide-like factor, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 6328.
- Sandler, J.A., J.I. Gallin and M. Vaughn, 1975, Effects of serotonin, carbamyl-choline, and ascorbic acid on leukocyte cyclic GMP and chemotaxis, *J. Cell Biol.* 67, 480.
- Schmidt, H.W., R., Seifert and E. Bohme, 1989, Formation and release of nitric oxide from human neutrophils and HL-60 cells induced by a chemotactic peptide, platelet activating factor and leukotriene B₄, *FEBS Lett.* 244, 357.
- Schroder, H., P. Ney, I. Woditsch and K. Schror, 1990, Cyclic GMP mediates SIN-1-induced inhibition of human polymorphonuclear leukocytes, *Eur. J. Pharmacol.* 182, 211.
- Stenger, S., H. Thuring, M. Rollinghoff and C. Bogdan, 1994, Tissue expression of inducible nitric oxide synthase is closely associated with resistance to *Leishmania major*, *J. Exp. Med.* 180, 783.
- Teixeira, M.M., T.J. Williams and P.G. Hellewell, 1993, Role of prostaglandins and nitric oxide in acute inflammatory reactions in guinea-pig skin, *Br. J. Pharmacol.* 110, 1515.
- Teixeira, M.M., T.J. Williams and P.G. Hellewell, 1995, Mechanisms and pharmacological manipulation of eosinophil accumulation in vivo, *Trends Pharmacol. Sci.* 16, 418.
- Vadas, M.A. J.R. David, A. Butterworth, N.T. Pisani and T.A. Siongok, 1979, A new method for the purification of human eosinophils and neutrophils, and a comparison of the ability of these cells to damage schistosomula of *Schistosoma mansoni*, *J. Immunol.* 122, 1228.
- Zatz, R., 1990, A low-cost tail-cuff method for the estimation of mean arterial pressure in conscious rats, *Lab. Anim. Sci.* 42, 198.