

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO**

LARISSA FÁVARO MARCHI

**O papel do interferon-gama na fagocitose
imunológica e na produção de espécies
reativas de oxigênio por neutrófilos
polimorfonucleares de camundongo**

Ribeirão Preto – SP

2010

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

LARISSA FÁVARO MARCHI

**O papel do interferon-gama na fagocitose
imunológica e na produção de espécies
reativas de oxigênio por neutrófilos
polimorfonucleares de camundongo**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina
de Ribeirão Preto da Universidade de São
Paulo para a obtenção do título de Doutora
em Ciências

Área de concentração: Bioquímica

Orientador: Prof. Dr. Bernardo Mantovani

Órgãos Financiadores:
CNPq, FAPESP e FAEPA

Ribeirão Preto - SP
2010

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo ou pesquisa, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Marchi, Fávaro Larissa.

O papel do interferon-gama na fagocitose imunológica e na produção de espécies reativas de oxigênio por neutrófilos polimorfonucleares de camundongo.

147p.:il.; 30cm.

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências. Área de concentração: Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Bernardo Mantovani

1. Neutrófilos, 2. Fagocitose, 3. Interferon-gama

FOLHA DE APROVAÇÃO

Larissa Fávaro Marchi

O papel do interferon-gama na fagocitose imunológica e na produção de espécies reativas de oxigênio por neutrófilos polimorfonucleares de camundongo

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.
Área de concentração: Bioquímica.

Aprovada em 13 de agosto de 2010

Banca Examinadora

Prof. Dr. Bernardo Mantovani

Instituição: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

Assinatura: _____

Prof. Dr. Sérgio Akira Uyemura

Instituição: Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto

Assinatura: _____

Prof. Dr. Carlos Curti

Instituição: Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto

Assinatura: _____

Profa. Dra. Gyselle Chrystina Baccan

Instituição: Universidade Federal da Bahia, Instituto de Ciências da Saúde.

Assinatura: _____

Prof. Dr. Marcelo Dias Baruffi

Instituição: Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto

Assinatura: _____

Dedico este trabalho:

A minha mãe Maria Inês, obrigada por sua amizade, respeito, compreensão e companheirismo, que vão além dos limites do relacionamento mãe-filha. Muito obrigada por não perder de vista os meus sonhos e por me fazer acreditar que vale a pena transpor obstáculos para conquistá-los.

Ao meu pai, Antonio, que sempre foi e será um modelo para mim. Obrigada por me incentivar, apoiar, orientar, por acreditar em mim e não medir esforços para a realização dos meus sonhos.

Ao meu irmão Guilherme, pelo apoio, ajuda e cumplicidade em vários momentos, muito obrigada.

Ao meu namorado Leonardo, obrigada por estar sempre presente, mesmo nas horas mais difíceis, pela amizade especial, pelo carinho e por compartilhar momentos alegres e tristes.

AGRADECIMENTOS

Devo confessar que os agradecimentos são de alguma forma sempre cruéis, ou porque faltam palavras para expressar a gratidão que sinto, ou faltam alguns nomes, que talvez pelo cansaço, deixei de recordar. Enfim, o espaço parece pequeno, o tempo escasso e o desejo do término da redação inevitável. Espero que em meus agradecimentos consiga representar com carinho e amizade à honra em finalizar essa etapa do longo trabalho que se segue. Os meus sinceros agradecimentos:

Primeiramente agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Bernardo Mantovani, meu muito obrigada por sua confiança em minha capacidade de desenvolver este trabalho, por sua consideração as minha idéias e por seu respeito aos meus limites. A nossa convivência durante este período foi bastante profícua e agradável. Teus ensinamentos ultrapassaram a área da ciência e ao final deste período de convivência, saio um ser humano melhor do que entrei.

Aos professores Dr. Sérgio Akira Uyemura, Dr. Marcelo Dias Baruffi e Dr. Carlos Curti, pela disposição em avaliar este trabalho, bem como por seus questionamentos e contribuições.

À Profa. Dra. Gyselle Chrystina Baccan, agradeço pela disposição em discutir este trabalho, em especial pelo convívio e amizade desde o meu primeiro dia em Ribeirão Preto.

Aos professores da Pós-Graduação do Departamento de Bioquímica e Imunologia da Faculdade de Medicina da USP - Ribeirão Preto, responsáveis pela minha formação acadêmico-científica.

Aos amigos da secretaria, principalmente à Maria Thereza Rodrigues, Ronaldo Sordi Campanini, Yaico Konno Shimada e Victor Dias Galban. Meu agradecimento especial à amiga Maria Ivone Campos Fonseca por tornar simples os momentos mais difíceis.

Aos funcionários do Departamento de Bioquímica e Imunologia pela amizade e serviços prestados. Em especial, os do biotério central e do biotério do Departamento de Bioquímica e Imunologia.

A todos que me auxiliaram na realização de alguns experimentos: Cacilda, Zuléica, Beto, Lúcia, Silvinha, Zé e Odete. Em especial a Dorley pela eficiente ajuda na esterilização do material.

Ao Prof. Dr. Fernando Luiz de Lucca por ceder a estrutura de seu laboratório para a realização dos experimentos de biologia molecular e as suas alunas Viviane Aline Oliveira Silva e Thaís Amaral de Souza pela amizade, atenção, disponibilidade e pela grande ajuda durante a realização das PCRs em tempo real.

À Fabiana Rosseto de Moraes, pelas longas conversas e pela constante disponibilidade e imenso auxílio na aquisição e análise de citometria de fluxo.

Aos funcionários da Biblioteca Central do Campus de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, pela simpatia, pela atenção e pela prontidão em ajudar.

À Renata Sesti Costa, pela amizade, pelo carinho, pela solidariedade e pelos inúmeros momentos de aprendizado e crescimento compartilhados.

À Mariana Drummond Costa Ignacchitti, pela amizade, pelo companheirismo nas frentes de trabalho e pela alegria constante que aliviou nossas dificuldades.

Às saudosas amigas e companheiras de laboratório, Andréia Akemi Suzukawa e Mirian Ribeiro Moreira, pela amizade preciosa, pelas longas conversas e pelo apoio constante.

Ao técnico José Antonio da Silva, pela amizade, pela paciência e pelo carinho e proteção com todas nós e pela imprescindível assistência durante o desenvolvimento deste trabalho.

À bióloga Silvana Chedraoui Silva pela amizade, atenção e apoio incondicional sempre presente todos estes anos. Agradeço imensamente a competência e a dedicação que ela me ofereceu todos estes anos.

Ao amigo e mais novo aluno, Iuri Nascimento Duarte, nosso aluno de iniciação científica, agradeço pela amizade, pelas conversas e questionamentos durante o período que nós trabalhamos juntos.

A todos os meus amigos da pós-graduação e em especial àqueles com os quais passei por várias etapas difíceis.

Aos meus familiares que sempre me apoiaram e em especial aos meus pais Maria Inês Antonio, razões da minha vida, pelo amor, respeito, apoio e confiança em mim depositada, que permitiram tornar possível a minha formação. Sei que vocês se orgulham por mais esta conquista. Este orgulho que sentem por mim converto numa obrigação de a cada dia ser mais digna de representá-los.

Ao meu namorado Leonardo Michetti Buglio, por ter me incentivado e confiado em mim nestes 10 anos de união, pela grande paciência, pelo intenso aprendizado durante todos os anos da nossa convivência, sempre me motivando, não me deixando desistir dos meus objetivos.

Aos meus avós, tios e tias que, mesmo à distância, estão sempre na torcida.

Às fundações de apoio CNPq, FAPESP e FAEPA, pelo auxílio concedido durante a execução deste trabalho.

A todos aqueles, que mesmo não mencionados, contribuíram para a realização deste trabalho, muito obrigada.

*Há duas formas de enfrentar dificuldades:
alterá-las ou alterar sua maneira de enfrentá-las.
(Phyllis Bottome)*

*Ninguém é tão grande que não possa aprender,
nem tão pequeno que não possa ensinar.
(Píndaro-poeta romano)*

RESUMO

Marchi, LF. **Papel do interferon-gama na fagocitose imunológica e na produção de espécies reativas de oxigênio por neutrófilos polimorfonucleares de camundongo.** 2010, 147f. Tese de Doutorado – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

Os neutrófilos desempenham um papel essencial na defesa do hospedeiro contra agentes microbianos e na reação inflamatória. Eles são capazes de ingerir microrganismos ou partículas estranhas. Ao fagocitá-las, forma-se o fagossomo onde os microrganismos são mortos pela liberação de enzimas hidrolíticas e de espécies reativas de oxigênio. Este consumo de oxigênio é chamado de explosão ou “burst” respiratório. O burst respiratório envolve a ativação da enzima NADPH-oxidase, que produz grandes quantidades de superóxido. O superóxido gera o peróxido de hidrogênio que é convertido em ácido hipocloroso pela enzima mieloperoxidase. Estas espécies reativas juntas têm propriedades suficientes para matar o microrganismo fagocitado. Algumas das funções dos neutrófilos podem ser reguladas em contato com certas citocinas, como o IFN- γ . A interação do IFN- γ com neutrófilos é essencial na resposta imune, na defesa e em processos inflamatórios. Neste estudo examinamos o efeito do IFN- γ sobre a fagocitose e produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio pelos neutrófilos isolados do sangue de camundongos. Nós observamos que a fagocitose realizada por neutrófilos ativados com IFN- γ foi maior que no grupo controle com quase todos os estímulos testados (imunocomplexo, zimosan, zimosan opsonizado com complemento, F(ab')₂ de IgG anti Ova). A curva dose-resposta de IFN- γ mostrou uma forma de U invertido, com uma resposta inicial em 10U/ml e a máxima em 150U/ml. Com altas concentrações o efeito diminui progressivamente e a leitura em 500U/ml voltou ao nível controle. O efeito do IFN- γ na produção de ânion superóxido, foi medida estimulando os neutrófilos com imunocomplexo precipitado de IgG e ovalbumina. A cinética de liberação extracelular mostrou uma estimulação pelo IFN- γ com um pico após 2h e 2 vezes maior quando comparado a liberação sem IFN- γ . Resultados similares foram observados para a produção de peróxido de hidrogênio, ácido hipocloroso e óxido nítrico. Observamos que o IFN- γ ocasionou a liberação da fosfatase alcalina e β -glucuronidase nos sobrenadantes de cultura de neutrófilos ativados com IFN- γ e estimulados com os diferentes estímulos. O IFN- γ provocou um aumento significativo na expressão de dectina-1, Fc γ RII/III e CD11b. Isto sugere que o aumento da fagocitose e da produção de espécies reativas observada em neutrófilos ativados com IFN- γ por 2 horas pode ser consequência do aumento da expressão dos receptores nesta célula ativada. Os neutrófilos estimulados com IFN- γ também liberaram citocinas pró-inflamatórias como IL-6 e TNF- α . Observamos que na

população de neutrófilos ativados com IFN- γ ocorreu um aumento na expressão de mRNA das subunidades gp91^{phox} e p47^{phox}. Isto sugere que o aumento na liberação das espécies reativas observado em neutrófilos ativados com IFN- γ pode ser uma consequência do aumento na expressão de mRNA das subunidades gp91^{phox} e p47^{phox} que pode resultar numa maior expressão protéica destes componentes. Foram apresentadas evidências de que o efeito do IFN- γ sobre as funções avaliadas neste estudo é dependente de um mecanismo genômico envolvendo a síntese de proteínas, uma vez que poderiam ser evitadas pelo pré-tratamento das células com cicloheximida e actinomomicina D. Esses resultados obtidos podem ser importantes fatores para modulação do processo fagocítico com implicações no mecanismo de defesa e processos fisiológicos.

ABSTRACT

Marchi, LF. **Role of interferon-gamma on immune phagocytosis and production of reactive oxygen species by mouse polymorphonuclear neutrophils.** 2010, 147f. Thesis – Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo.

Neutrophils play an essential role in host defense against microbial agents and the inflammatory reaction. They are able to ingest foreign particles or microorganisms. In the process of phagocytosis a phagosome is formed, where the microorganisms are killed by the release of hydrolytic enzymes and reactive oxygen species. This oxygen consumption is called burst respiratory. The burst respiratory involves the activation of NADPH oxidase, which produces large amounts of superoxide. The superoxide generates hydrogen peroxide which is converted to hypochlorous acid by myeloperoxidase. These reactive species together have properties sufficient to kill phagocytosed microorganisms. Some of the functions of neutrophils can be regulated in contact with certain cytokines such as IFN- γ . The interaction of neutrophils with IFN- γ is essential in the immune response, defense and in inflammatory processes. This study examined the effect of IFN- γ on phagocytosis and production of reactive oxygen and nitrogen production by neutrophils isolated from mice. We observed that phagocytosis performed by activated neutrophils with IFN- γ was higher than the control group in almost all tested stimuli. The dose-response curve of IFN- γ showed an inverted U form, with an initial response at 10U/ml and maximum at 150U/ml. With higher concentrations the effect decreased progressively and with 500U/ml it returned to the control level. The effect of IFN- γ production of superoxide anion was measured by stimulating the neutrophils with complex immune precipitate of IgG and Ova. The kinetics of extracellular release of O₂⁻ in the presence of IFN- γ showed a peak at 2h and was 2 times higher than control. Similar results were observed for the production of hydrogen peroxide, hypochlorous acid and nitric oxide. We observed that IFN- γ induced the release of alkaline phosphatase and β -glucuronidase in culture supernatants of neutrophils activated with IFN- γ and stimulated with different stimuli. IFN- γ caused a significant increase in the expression of receptor dectin-1, Fc γ RII / III and CD11. This suggest that the increased phagocytosis and production of reactive species observed in activated neutrophils with IFN- γ for 2 hours may be a consequence of increased receptor expression in these cells. Neutrophils stimulated with IFN- γ produced also the release of proinflammatory cytokines such as IL-6 and TNF- α . We observed that the population of activated neutrophils with IFN- γ increased mRNA expression of gp91^{phox} and p47^{phox} subunits. This suggests that the increase release of reactive species observed in neutrophils activated with IFN- γ may be a consequence of increased mRNA expression of gp91^{phox} and p47^{phox} subunits which can result in increased

protein expression of these components. Evidence was presented that the effects of IFN- γ on the functions evaluated in this study are dependent on a genomic mechanism involving protein synthesis, since they could be prevented by pretreatment of cells with cycloheximide and actinomycin D. These results may be important factors for modulating the phagocytic process with implications for the defense mechanism and physiological processes.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1.1.	Sinalização mediada por Fc γ R via domínios ITAM	25
Figura 1.2.	Ativação do complemento (via alternativa) e fagocitose.....	27
Figura 1.3.	O complexo NADPH oxidase.....	31
Figura 1.4.	Representação esquemática das principais reações de geração das espécies reativas de oxigênio.....	36
Figura 1.5.	Uma representação esquemática do receptor de Interferon-gama (IFN-GR) e sua via de sinalização.....	40
Figura 3.2.	Cromatografia de filtração em gel para purificação de IgM de coelho anti-estroma de hemácia de carneiro.....	49
Figura 3.3.	Frações de cromatografia de filtração para purificação de IgM	49
Figura 3.4.	Eletroforese em gel de acrilamida demonstrando a clivagem do anticorpo IgG em F(ab') ₂ pela ação da protease tripsina	51
Figura 4.1.	Curva de concentração e tempo de incubação com IFN- γ	65
Figura 4.2.	Análise da marcação de neutrófilos de camundongos, tratados ou não com IFN- γ , para Anexina-FITC e Iodeto de Propídio.....	67
Figura 4.3.	Efeito do IFN- γ sobre a fagocitose de neutrófilo.....	69
Figura 4.4.	Efeito do IFN- γ sobre a liberação de superóxido por neutrófilos	71
Figura 4.5.	Efeito do IFN- γ sobre a liberação de peróxido de hidrogênio por neutrófilos.....	73
Figura 4.6.	Efeito do IFN- γ sobre a liberação de ácido hipocloroso por neutrófilos.....	75
Figura 4.7.	Efeito do IFN- γ sobre a liberação de óxido nítrico por neutrófilos	77

Figura 4.8.	Porcentagem de liberação total da enzima LDH	79
Figura 4.8.1.	Porcentagem de liberação total das enzimas fosfatase alcalina e β -glucuronidase	79
Figura 4.9.	Efeito do IFN- γ na expressão dos receptores fagocíticos de neutrófilos.....	81
Figura 4.10.	Efeito do IFN- γ na liberação de IL-6 e TNF- α por neutrófilos	83
Figura 4.11.	Efeito da actinomicina D e cicloheximida sobre a liberação de superóxido.....	85
Figura 4.12:	Efeito do IFN- γ sobre a expressão das subunidades do complexo enzimático NADPH oxidase.	87

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- APC:** célula apresentadora de antígeno
- AVP:** arginine vasopressin
- cDNA:** DNA complementar
- CR:** receptores para complemento
- CT:** Ciclo *threshold*
- DEPC :** dietil-pirocarbonato
- EPM:** Erro padrão das médias
- FACS:** Citometria de fluxo
- FcyR:** receptores para a porção Fc da IgG ligada a partícula
- FSC-H:** *Forward-Scattered light* – difusão frontal da luz
- GABA:** ácido γ -aminobutírico
- GH:** hormônio de crescimento
- H₂O₂:** Peróxido de hidrogênio
- HO₂:** Radical perhidroxil
- HOCl:** ácido hipocloroso
- HRPO:** Peroxidase horseradish type II
- IC:** Imunocomplexo
- IFN- γ :** interferon gama
- IgG:** Imunoglobulina G
- IL:** interleucina
- iNOS:** óxido nítrico sintase induzida
- IP3:** inositol trifosfato
- ITAM:** motivo de ativação baseado em tirosina
- ITIM:** motivo de inibição baseado em tirosina
- LDH:** Lactato desidrogenase
- LPS:** Lipopolissacarídeo
- MAP-quinases:** quinases ativadas por mitógenos
- MBL:** manan-binding lectin
- MPO:** Mieloperoxidase
- MR:** receptor de mineralocorticóide
- mRNA:** RNA mensageiro
- NADPH:** Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato.

NF κ B: nuclear factor kappa B

NK: Natural *Killer*

NO: óxido nítrico

O₂⁻: ânion superóxido

O₂: Oxigênio molecular

OH: Radical hidroxil

ONOO⁻: Peroxinitrito

PEST: sequências ricas em prolina (P), ácido glutâmico (E), serina (S) e treonina (T),

PI-3 quinases: fosfoinosítídeo 3-quinases

PIP2: fosfatidilinositol 4,5-bifosfato

PIP3: fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato

PI-PLC γ : fosfolipase C fosfoinosítídeo específica

PKA: proteíno-quinase A

PKC: proteíno-quinase C

PKH26: *Red Fluorescent cell linker 26*

PMN: leucócitos polimorfonucleares

RNA: ácido ribonucléico

ROS: Espécies reativas de oxigênio

RPMI 1640: Meio *Roswell Park Memorial Institute 1640*

RT: Transcriptase reversa

SFB: Soro fetal bovino

SFV: Solução fenol-vermelho

SOD: Superóxido dismutase

SR-A: scavenger receptor A

TNF- α : Fator de necrose tumoral-alfa

β -Glu: β -glucuronidase

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	20
1.1 Neutrófilo	20
1.1.1 Reconhecimento do antígeno e fagocitose.....	21
1.1.2 Liberação dos componentes tóxicos e morte do microrganismo ingerido	28
1.1.3 O <i>burst</i> respiratório	29
1.2 Ativação do neutrófilo	36
2. OBJETIVOS	43
3. MATERIAIS E MÉTODOS	45
3.1 Animais	45
3.2 Isolamento dos neutrófilos de camundongo	45
3.3 Preparação dos estímulos fagocíticos	46
3.3.1 Imunocomplexos.....	46
3.3.2 Zimosan	47
3.3.3 IgM de coelho anti-estroma de hemácia de carneiro	48
3.3.4 F(ab') ₂ de coelho anti-Ova	50
3.4 Incubação do neutrófilo com IFN- γ	51
3.5 Ensaio de fagocitose	51
3.6 Avaliação da morte celular	52
3.6.1 Análise da marcação de neutrófilos de camundongos, tratados ou não com IFN- γ , para Anexina-FITC e Iodeto de Propídio	52
3.7 Medida da liberação de ânion superóxido	53
3.8 Medida da liberação de peróxido de hidrogênio.....	54
3.9 Medida da liberação de ácido hipocloroso	54
3.10 Dosagem de nitrito como medida de NO.....	55
3.11 Liberação de enzimas lisossomais	56
3.11.1 β -Glucuronidase	56
3.11.2 Fosfatase alcalina.....	57
3.11.3 Lactato desidrogenase	57
3.12 Expressão dos receptores CD32/CD16 (FC γ RII/III), CD11b (CR3) e Dectina-1	58
3.13 Dosagem de citocinas	59
3.14 Análise da expressão do RNAm de subunidades da NADPH oxidase por RT-PCR Real-Time Syber® Green	59
3.14.1 Extração de RNA	59
3.14.2 Desenho do Oligonucleotídeo	60
3.14.3. RT - PCR Real-Time Syber® Green.....	61

3.15 Efeito dos inibidores de transcrição e tradução na ação do interferon- γ sobre a fagocitose	62
3.16 Análise estatística	62
4. RESULTADOS	64
4.1 Determinação da concentração e do tempo de incubação do IFN- γ	64
4.2 Avaliação da morte celular	66
4.3 Efeito do IFN- γ sobre a ingestão de partículas estranhas	68
4.4 Efeito do IFN- γ na liberação de ânion superóxido	70
4.5 Efeito do IFN- γ na liberação de peróxido de hidrogênio.....	72
4.6 Efeito do IFN- γ na liberação de ácido hipocloroso	74
4.7 Efeito do IFN- γ na liberação de óxido nítrico	76
4.8 Efeito do IFN- γ no processo de desgranulação enzimática de neutrófilos	78
4.9 Efeito do IFN- γ sobre a expressão dos receptores fagocíticos CD32/CD16 (FC γ RII/III), CD11b (CR3) e Dectina-1	80
4.10 Efeito do IFN- γ na liberação de citocinas por neutrófilos	82
4.11 Efeito dos inibidores de transcrição e tradução na ação do IFN- γ sobre a produção de superóxido	84
4.12 Efeito do IFN- γ na expressão de RNAm de subunidades da NADPH oxidase	86
5. DISCUSSÃO	89
6. CONCLUSÕES	102
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	105
ANEXOS.....	114

1- Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1 Neutrófilo

Os neutrófilos juntamente com macrófagos são considerados fagócitos profissionais, componentes da primeira linha de defesa da imunidade inata em humanos (Kantari *et al.*, 2008; Segal, 2005). Neutrófilos representam a célula mais abundante na circulação sanguínea periférica, constituindo 50 a 70 % dos leucócitos totais (Davis e Gallin, 1981). Este tipo celular foi primeiramente descrito pelo bacteriologista alemão Paul Ehrlich (1879). Quando visualizado no sangue periférico através de um esfregaço sanguíneo, os neutrófilos apresentam-se como uma célula de diâmetro entre 12-15 μm com um núcleo polimórfico, que em geral apresenta três lóbulos ligados por filamentos finos de cromatina, seu citoplasma é abundante e altamente granuloso, característica que justifica a denominação de granulócito (Cline *et al.*, 1975).

Os neutrófilos são formados na medula óssea a partir de uma célula progenitora, progenitor mielóide. Estudos realizados por Cline e cols. (1975) mostraram que este tipo celular é derivado da mesma célula pluripotente que origina os monócitos. (Kantari *et al.*, 2008). A célula precursora dos neutrófilos é o mieloblasto. Esta célula passa por um processo de maturação que compreende diferentes estágios: promielócito, mielócito, metamielócito, célula com núcleo segmentado e finalmente o neutrófilo segmentado (Ehrlich citado em Borregaard, 1997). Durante a transição de mieloblasto para promielócito ocorre a formação dos grânulos azurofílicos e específicos. Após a maturação, a medula óssea serve como um reservatório de neutrófilo (Borregaard, 1997). Neutrófilos maduros apresentam uma membrana plasmática lábil que permite a formação de pseudópodes frente a um gradiente quimiotático; seu citoplasma contém numerosas partículas de glicogênio que possivelmente atuam como fonte de energia para a célula. Sob um estímulo apropriado os neutrófilos são recrutados da medula óssea para a circulação sanguínea. A meia vida do neutrófilo na circulação é relativamente pequena, apenas 6 horas. No ambiente

intravascular, os neutrófilos, sob influência de substâncias quimiotáticas (quimiocinas, citocinas, componentes do sistema complemento, produtos derivados do patógeno, dentre outros) que estimulam sua agregação e aderência na superfície endotelial, podem emigrar da circulação. Esta migração do endotélio para sítios de infecção é denominada de diapedese. A integridade vascular é um fator crítico para este processo e conseqüentemente para a liberação dos neutrófilos para o tecido (Davis e Gallin, 1981).

Uma vez que o neutrófilo alcança o tecido afetado, uma complexa série de eventos se inicia e culmina na eliminação da partícula invasora. Partículas opsonizadas com anticorpos e componentes do complemento interagem com os receptores presentes na membrana dos neutrófilos. Esta interação pode desencadear o processo de fagocitose (Kobayashi *et al.*, 2003). A fagocitose é associada com um aumento do consumo de oxigênio e com a estimulação da via Pentose-Fosfato. Estas alterações no metabolismo do neutrófilo são referidas como surto respiratório ou explosão metabólica. Outro evento associado à fagocitose é a desgranulação dos fagócitos. Juntos, estes processos promovem a destruição da partícula fagocitada com o desenvolvimento de uma resposta inflamatória (Nauseef, 2007).

1.1.1 Reconhecimento do antígeno e fagocitose

Os neutrófilos, assim como as outras células do sistema imune inato, não possuem a especificidade apurada da imunidade adaptativa no reconhecimento de antígenos, eles são capazes de distinguir o próprio do não próprio, já que os microrganismos possuem padrões tipicamente repetidos de estrutura molecular na sua superfície. A parede celular das bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, por exemplo, são compostas de uma matriz de proteínas, carboidratos e lipídeos em um arranjo repetitivo. O ácido lipoteicóico da parede celular das bactérias gram-negativas são importantes para o reconhecimento da bactéria pelo sistema imune. Outros componentes microbianos também possuem estrutura repetitiva. Os flagelos bacterianos são feitos de subunidades protéicas repetitivas e o DNA bacteriano contém repetições não metiladas de dinucleotídeo CpG. Estas estruturas repetitivas são

conhecidas geralmente como padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs: do inglês, pathogen associated molecular patterns) e os receptores que os reconhecem como receptores de reconhecimento padrão (PRRs: do inglês, pattern recognition receptors). (Aderem, 1999, Janeway 1992).

Muitos destes receptores de reconhecimento padrão são receptores fagocíticos que estimulam a ingestão dos patógenos reconhecidos. Outros induzem a produção de moléculas efetoras que levam a resposta imune inata e que também podem influenciar a indução e a natureza da resposta imune adaptativa. Entre os receptores fagocíticos mais conhecidos estão:

- Receptores “scavenger”: Reconhecem vários polímeros e lipoproteínas acetiladas de baixa densidade. Esses receptores pertencem a um conjunto estruturalmente heterogêneo de moléculas que possuem um ou mais domínios ricos em cisteínas. Os receptores mais conhecidos são: receptores scavenger AI e AII, MARCO, CD163, CD36. São importantes no reconhecimento de algumas bactérias e no reconhecimento de células apoptóticas. (Taylor, 2005).

- Dectina-1: Possui um domínio extracelular de ligação ao carboidrato semelhante aos receptores lectina do tipo C, entretanto, este domínio não possui os resíduos envolvidos com a ligação do cálcio, ao quais são requeridos para a ligação aos carboidratos nas lectinas do tipo C clássicas. Este receptor foi identificado como receptor para polissacarídeos β -glucanos e é capaz de reconhecer estas estruturas presentes em bactérias e principalmente fungos. A dectina-1 possui um domínio intracelular semelhante ao ITAM (motivo de ativação baseado em tirosina) que em conjunto com o receptor do tipo Toll TLR2, está envolvido na produção de citocinas pró-inflamatórias. (Herre *et al*, 2004).

- Receptor de manose: Possui vários domínios lectina do tipo C que reconhecem manose, fucose e N-acetilglucosamina. A ligação cooperativa de vários desses domínios proporciona a alta avidéz da interação com seus ligantes na superfície da bactéria, fungos e protozoários. Esta ligação ao ligante acontece de uma maneira dependente de cálcio, ao contrário da dectina. (Taylor, 2005).

Alguns patógenos freqüentemente possuem cápsula de polissacarídeos que não permitem seu reconhecimento direto pelos neutrófilos. Tais microrganismos se tornam visíveis quando são revestidos (ou opsonizados) por anticorpos e complemento, os quais se ligam respectivamente aos receptores Fc (FcR) e CR na superfície dos neutrófilos.

- Receptores Fc γ : Atualmente estão descritas na literatura três classes de Fc γ R: Fc γ RI (CD64), Fc γ RII (CD32) e Fc γ RIII (CD16) (Hass *et al.*, 1995). Estas três classes de receptores partilham uma estrutura molecular semelhante. Os motivos protéicos extracelulares (regiões que contem os sítios de ligação para a porção Fc de IgG) são comuns. No entanto, os domínios transmembrana e citoplasmático destes receptores (domínios relacionados com as vias de transdução de sinais) são altamente divergentes, apresentando baixa homologia entre eles (Hogarth *et al.*, 1992). Quanto à atividade biológica dos Fc γ R, esta depende do tipo do receptor e do tipo celular onde estes receptores estão expressos. Os Fc γ R podem interagir com a molécula de IgG em duas condições: em sua forma monomérica ou quando esta se encontra complexada a antígenos multivalentes, na forma de imunocomplexos.

Fc γ RI é uma glicoproteína de 72 kDa constitutivamente expresso em monócitos e macrófagos, podendo ser induzido em neutrófilos. Representa um receptor de alta afinidade para IgG1 e IgG3 monomérica ou agregada, no entanto, sua interação com IgG2 e IgG4 é particularmente fraca (Flesch e Neppert, 2000). Este receptor é expresso em neutrófilo ativado por INF- γ (interferon gama) ou G-CSF (fator estimulador de crescimento de colônia de granulócitos) (Hass *et al.*, 1995).

O Fc γ RII (CD32) é uma glicoproteína de 40 kDa e é o receptor para IgG mais amplamente distribuído entre as células. Esta classe de receptor compreende duas subclasses: Fc γ RIIa e Fc γ RIIb. O Fc γ RII liga a IC de IgG1 e IgG3, mas interage muito fracamente com IgG4. As diferenças funcionais entre as subclasses do Fc γ RII estão na presença de motivos de sinalização especializados. Isto é, o Fc γ RIIa apresenta um motivo ITAM (*Immunoreceptor Tyrosine-based activatory Motif*), enquanto que no Fc γ RIIb é encontrado um motivo de inibição de imunorreceptor baseado em tirosina- ITIM

(*Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motif*). Os resíduos de tirosina em ambos os motivos de sinalização intracelular são críticos para a ativação e a inibição celular, respectivamente (Revisado por Marzocchi-Machado e Lucisano-Valim, 2005).

Os receptores FcγRIII (CD16) são proteínas altamente glicosiladas e com pesos moleculares que variam entre 50 a 80 kDa. Estes receptores ligam IgG na forma de IC, com especificidade para IgG1 e IgG3 e mínima ligação para IgG4 e IgG2. Este receptor pode ser codificado por dois genes: FcγRIIIA e FcγRIIIB. O produto do gene FcγRIIIA é o FcγRIIIa, um receptor transmembrana em células *NK* e macrófagos; enquanto que o gene FcγRIIIB codifica o FcγRIIIb, um receptor ligado por âncora de glicosil fosfatidil inositol (GPI) em neutrófilos, sendo o único FcγR sem domínio transmembrana (Selvaraj *et al.*, 1988). Embora o FcγRIIIb não possua seqüência de sinalização no citoplasma, a sua interação com outros receptores na superfície celular é importante para uma resposta efetora completa, visto que a cooperação do FcγRIIIb com o FcγRIIIa e o receptor para complemento tipo 3 (CR3) é necessária para a fagocitose e desgranulação eficientes (Zhou *et al.*, 1994).

Quanto ao aspecto funcional, os FcγR podem ser divididos em dois grupos: os que possuem o domínio ITAM (FcγRIIIa, FcγRI e FcγRIIIa) e os sem ITAM. Este último grupo inclui os FcγR que não estimulam a ativação celular e podem ser divididos em: a) receptores de cadeia única (FcγRIIIb), apresentando ITIM no seu domínio citoplasmático, estes receptores inibem a ativação celular mediada pelos receptores com ITAM, b) FcγRIIIb, que não possui domínio citoplasmático e por si só não é capaz de ativar a célula, mas contribui para a sinalização graças à co-expressão com outros receptores (Revisado por Marzocchi-Machado e Lucisano-Valim, 2005).

Os FcγR são membros da classe de imunorreceptores do tipo tirosina quinases. Esses receptores possuem em sua extremidade citoplasmática o motivo ativador composto por tirosina (ITAM). A interação do FcγR com partículas opsonizadas por IgG induz a fosforilação de tirosinas dentro dos motivos ITAM e inicia a formação de um complexo de proteínas ao redor do FcγR. As tirosinas quinases Lyn e Hck fosforilam os motivos ITAM após sua estimulação. Uma vez fosforiladas, os ITAMs recrutam a Syk quinase que sofre

autofosforilação e se torna ativada (Swanson e Hoppe, 2004) (Figura 1.1). A ativação da Syk quinase promove a ativação de muitas vias, levando a ativação transcricional, rearranjo do citoesqueleto, liberação de mediadores inflamatórios (Park, 2003).

Recentemente, um novo receptor para IgG, chamado de FcγRIV foi descoberto em camundongos e enquanto os receptores FcγRI/III se ligam preferencialmente a IgG, o FcγRIV possui maior afinidade de ligação à IgG2 (Nimmerjahn *et al*, 2005). Embora ainda não se saiba em maiores detalhes as funções fisiológicas deste novo receptor, Jakus e colaboradores, (2008) mostraram que as respostas de neutrófilos induzidas por imunocomplexos requerem tanto o FcγRIII quanto o FcγRIV, possuindo assim, funções sobrepostas na ativação desta célula.

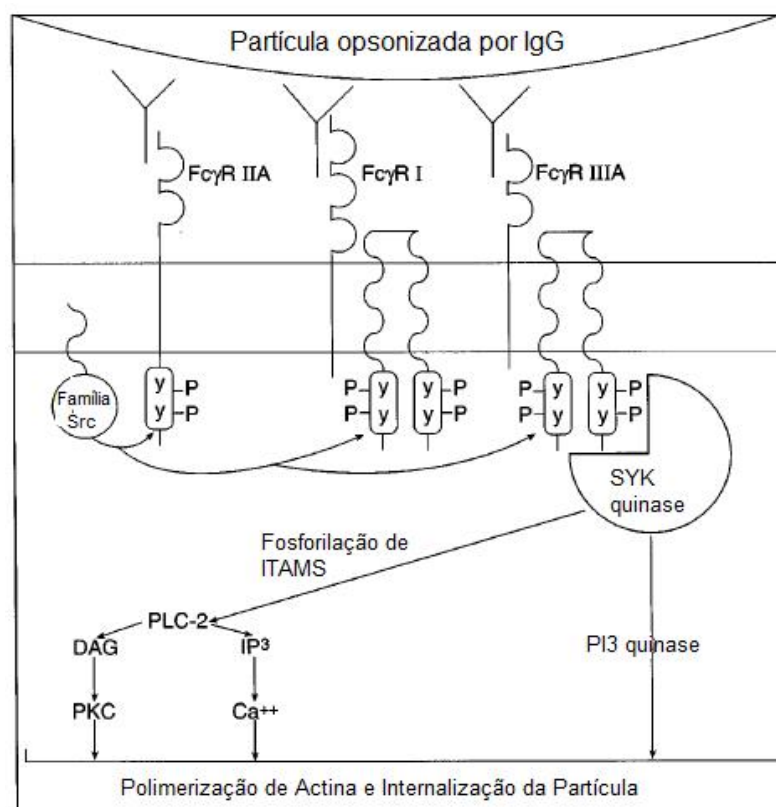


Figura 1.1: Sinalização mediada por FcγR via domínios ITAM. A ligação cruzada dos receptores estimula as Src quinases a fosforilarem resíduos de tirosina (Y) dentro do domínio ITAM da FcγRIIA ou dentro das subunidades γ da FcγRI ou FcγRIIIA dimerizadas. A tirosina quinase Syk é recrutada para o domínio ITAM fosforilado e torna-se ativada. Assim, vias de sinalização dependentes da ativação da PI3 quinase e fosfolipase-C (PLC-2) são ativadas e culminam na ativação de diversos eventos celulares. Reproduzido de Aderem e Underhill, 1999.

Pelo fato de o reconhecimento de partículas estranhas iniciar uma resposta inflamatória e causar dano tecidual, é essencial que os receptores Fcγ sejam capazes de distinguir entre as moléculas de anticorpo ligadas aos patógenos e as numerosas moléculas de anticorpos livres presentes na circulação. Esta distinção é possível pela agregação dos anticorpos que ocorre quando eles se ligam a antígenos multiméricos ou a partículas de antígenos multivalentes tais como vírus e bactérias e também depende da afinidade e da expressão constitutiva ou induzida do receptor. O processo de internalização e destruição de microorganismos são aumentados em muitas vezes pela interação entre as moléculas opsonizadas e seus receptores na superfície dos neutrófilos (Nimmerjahn, 2006).

- Receptores de complemento: Proteínas do complemento presentes no soro também são capazes de opsonizar microorganismos e estimular a fagocitose através dos receptores para C3b e C3bi (fragmento inativado do C3b), os quais incluem principalmente CR1 e CR3 (Figura 1.2). O CR1 é o receptor responsável pela interação de alta afinidade com C3b e C4b, e de baixa afinidade com C3bi. A ligação de partículas revestidas com C3b ou com C4b à CR1 promove a transdução de sinais que ativam os mecanismos fagocíticos dos leucócitos e estimulam a inflamação. Já o CR3 é um receptor para o fragmento C3bi gerado pela proteólise do C3b. Este receptor é membro da família das integrinas. Nos fagócitos o CR3 liga-se também à molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1) nas células endoteliais e promove uma interação estável dos leucócitos ao endotélio, mesmo sem ativação do complemento. O CR4 também se liga ao C3bi, sendo sua função similar àquela do CR3. Similar ao CR3, o CR4 também é membro da família das integrinas (Abbas, 2003, Tohyama & Yamamura, 2006).

Em geral os receptores para componentes do sistema complemento e para Fc de imunoglobulina G cooperam para mediar a ligação de imunocomplexos e partículas opsonizadas nos neutrófilos. No entanto, o papel de CR1 e CR3 no reconhecimento de imunocomplexos e partículas opsonizadas pelo complemento é controverso no sentido de desencadear a fagocitose e o surto respiratório. Ohkuro *et al.* (1995) demonstraram que os receptores CR3 e CR1 atuam em sinergismos com os receptores FcγR, aumentando a

eficiência da fagocitose. Porém, enquanto a estimulação do Fc γ R induz a fagocitose, a estimulação unicamente do CRs em neutrófilos sanguíneos normais é capaz de induzir a ligação mas não a internalização das partículas na ausência de um estímulo adicional. Este segundo estímulo pode ser conseguido pelo reconhecimento da partícula estranha via outro receptor fagocítico (Mantovani, 1972).

O reconhecimento de partículas estranhas pelo neutrófilo conduz à fagocitose, um processo que consiste na ingestão de partículas grande (> 0,5 μ m) de uma maneira dependente da polimerização da actina. O primeiro cientista a relatar sobre o mecanismo da fagocitose foi Eli Metchnikov que propôs que as células presentes nos tecidos fagocitavam partículas estranhas que apresentassem potencial patogênico.

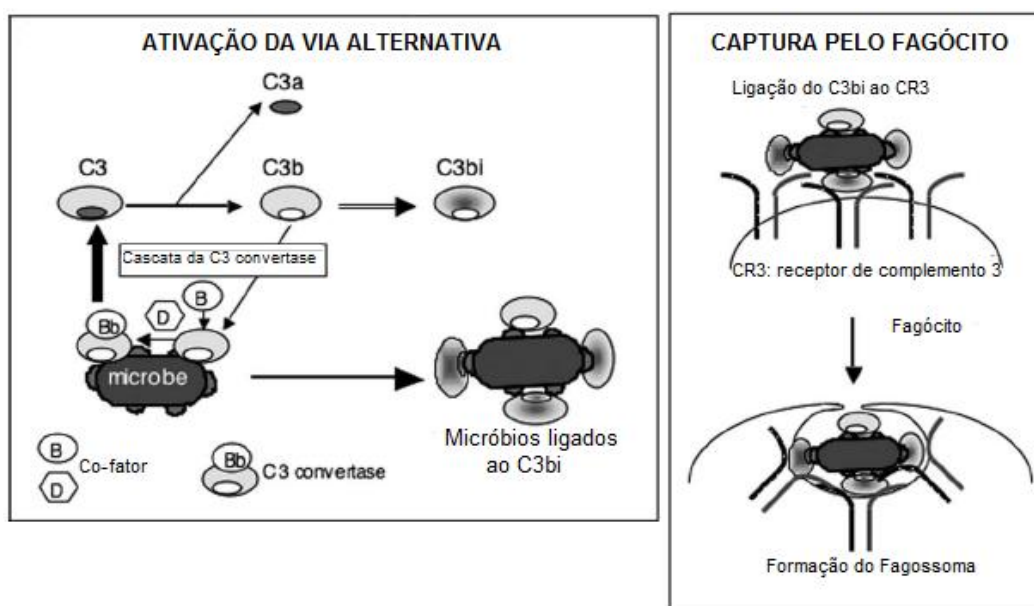


Figura 1.2: Ativação do complemento (via alternativa) e fagocitose (reproduzido de Tohyama e Yamamura, 2006). O CR1 é uma proteína transmembrana de cadeia única, expressa em eritrócitos, fagócitos e linfócitos. Já o CR3 (também chamada de $\alpha_M\beta_2$ integrina, CD11b/CD18 ou Mac-1) e CR4 ($\alpha_X\beta_2$ integrina, CD11c/CD18 ou gp150/95) são integrinas da família β_2 e agem como receptores do fragmento C3bi. Assim como outras integrinas, estes dois receptores de C3bi requerem a ativação para que ocorra uma ligação de alta afinidade (JONES *et al.*, 1999).

Várias células são capazes de realizar a fagocitose, entretanto algumas delas são mais especializadas nesse processo e por isso chamadas de "fagócitos profissionais" Os

neutrófilos, monócitos e macrófagos são os principais tipos de fagócitos. (Rabinovitch, 1995). A principal diferença quanto à capacidade fagocítica e eficiência entre fagócitos profissionais e não profissionais pode, provavelmente, ser atribuída à presença de receptores fagocíticos que facilitam o alcance à partícula e aumentam a velocidade da fagocitose.

Uma vez que o agente invasor se ligue à membrana das células fagocíticas, a qual é mediada por diversos tipos de receptores como foi descrito anteriormente, ocorre à ativação celular que reorganiza o citoesqueleto e projeta os pseudópodes para englobar a partícula.

Os neutrófilos são células extremamente dinâmicas, com intenso tráfego, fusão e fissão de membranas associados com a fagocitose. Em uma série de experimentos elegantes, Silverstein e colaboradores descreveram o modelo de “ziper” da fagocitose mediada pelo receptor Fc, no qual interações sequenciais entre receptores e os ligantes guiam extensões de pseudópodes pelo neutrófilo ao redor da partícula a ser fagocitada. Este mecanismo é distinto do mecanismo descrito para receptores de complemento, no qual a partícula opsonizada submerge no neutrófilo sem esse envolvimento progressivo pela membrana.

1.1.2 Liberação dos componentes tóxicos e morte do microrganismo ingerido

Assim que o fagossomo contendo a partícula ingerida é formado, ele se funde com lisossomos e estes liberam seu conteúdo enzimático. Uma consequência da desgranulação dos lisossomos é a acidificação do fagossomo, o que facilita a morte do microrganismo ingerido. Nos neutrófilos existem três tipos predominantes de grânulos citoplasmáticos, que diferem pela morfogênese, citoquímica e pelo conteúdo de enzimas e proteínas. Estes grânulos são classificados em: primário, secundário e terciário; sendo os primeiros, conhecidos como grânulos peroxidase-positivo e os demais peroxidase-negativo. A fusão destes grânulos citoplasmáticos com o vacúolo fagocítico resulta na liberação de uma variedade de enzimas, que são importantes para o processo de morte e digestão do organismo invasor, bem como para a reposição de componentes e proteínas de membrana

consumidos durante a formação do vacúolo fagocítico (Kobayashi *et al.*, 2003, Faurschou e Borregaard, 2003).

Os **grânulos primários ou azurofílicos** representam o verdadeiro lisossomo dos neutrófilos; contém proteínas e peptídeos relacionados à morte e digestão microbiana. Dentre as enzimas contidas nestes grânulos estão a mieloperoxidase; proteinases neutras (catepsina G, elastase e proteinase; hidrolases ácidas (β -glucuronidase e catepsina B e D), 5'-nuclease, lisozima, dentre outras proteínas. Estes grânulos apresentam uma rica matrix carregada negativamente de proteoglicanas sulfatadas. Estas proteoglicanas se ligam a proteínas e peptídeos catiônicos mantendo-os em estado inativo (Segal, 2005).

Os **grânulos secundários ou específicos** são formados durante a diferenciação dos neutrófilos na medula óssea; eles armazenam: colagenase, fosfatase ácida e alcalina, lactoferrina, lisozima, fosfolipase A, proteínas básicas e numerosas proteínas componentes da membrana, incluindo flavocitocromo b558 e componentes do complexo NADPH oxidase. Outros grânulos denominados de **terciários ou grânulos de gelatinase** apresentam gelatinase como componente principal. Há também os grânulos denominados de **vesículas secretórias**. Estes últimos atuam como reservatório de receptores e componentes protéicos associados à membrana plasmática consumidos durante a formação do vacúolo fagocítico. Seu conteúdo é rico em β -integrina CD11b/CD18, CR3 e CR1 (receptores de componentes do complemento), receptor para FMLP, CD14 (receptor para LPS), Fc γ RIII (CD16), metaloprotease, bem como soro albumina (Segal, 2005; Faurschou e Borregaard, 2003).

Vários estudos demonstram que para uma eficiente eliminação de um organismo invasor por neutrófilos é necessária uma associação das enzimas liberadas no processo de desgranulação e a liberação das espécies reativas de oxigênio derivadas do surto respiratório (revisado por Segal, 2005).

1.1.3 O *burst* respiratório

O *burst* respiratório ou surto respiratório é assim chamado por ser um processo acompanhado de um aumento súbito de consumo de oxigênio pelos fagócitos (aumento de

50 a 100 vezes do consumo em repouso) e pela estimulação da via Pentose-Fosfato. Neste processo, o oxigênio consumido não é utilizado para a produção de energia, e sim para a produção de radicais de oxigênio, compostos com atividade antimicrobiana. O mecanismo enzimático responsável por este surto respiratório realiza-se pela atividade do complexo NADPH oxidase, o qual permite que elétrons sejam transferidos do NADPH citoplasmático para o oxigênio molecular (Kobayashi *et al.*, 2003). O complexo NADPH oxidase está localizado na membrana plasmática dos fagócitos e pode ser incorporado ao vacúolo fagocítico no momento de sua formação. Este complexo é constituído por componentes membranares e citoplasmáticos (Segal, 2005) (Figura 1.3).

Os componentes ligados à membrana são representados pelas subunidades: gp91^{phox}, componente central deste complexo, responsável pela formação da maquinaria de transporte de elétrons, e p22^{phox}, proteína que atua como sítio de ligação de alta afinidade para o NADPH citosólico e também participa da estabilidade da subunidade gp91^{phox}. Juntas estas subunidades formam o heterodímero de flavocitocromo b558. Este flavocitocromo apresenta baixo potencial de oxi-redução, o que permite a ele participar eficientemente na redução de oxigênio molecular (O₂) a ânion superóxido (O₂⁻). Já as subunidades p47^{phox}, p67^{phox}, p40^{phox} representam os componentes citoplasmáticos que participam da composição deste complexo. Outra proteína citoplasmática relacionada a este complexo é a p22 Rac (rac 2), proteína de ligação ao nucleotídeo GTP. Para que este complexo NADPH oxidase se torne ativo e ocorra o transporte de elétrons através deste complexo, as subunidades membranares devem interagir com as subunidades citoplasmáticas, que são translocadas para a membrana no momento da estimulação da membrana do neutrófilo (Segal, 2005). Em geral, este complexo está dormente em neutrófilos não estimulados, mas pode ser rapidamente ativado quando as células são expostas a partículas opsonizadas, mediadores inflamatórios, componentes do sistema complemento, imunocomplexos e estímulos quimiotáticos (Robinson, 2008).

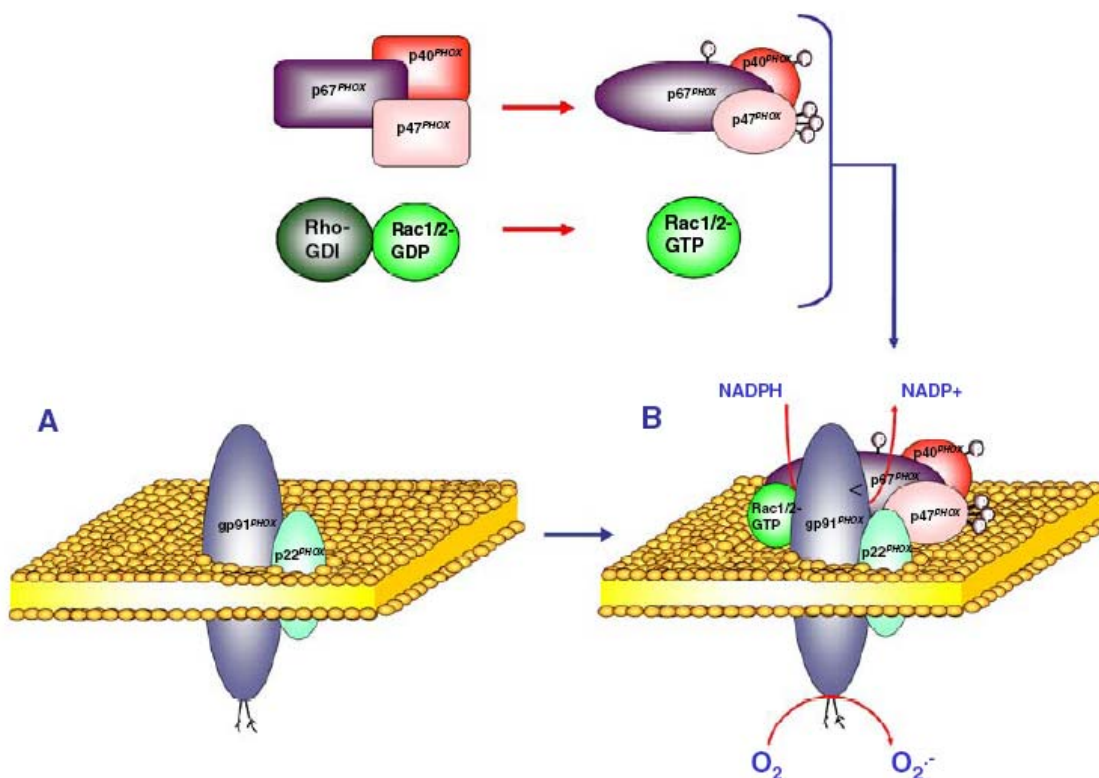
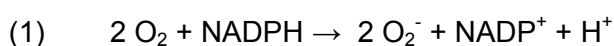


Figura 1.3: O complexo NADPH oxidase. Nas células em repouso (A), os componentes da NADPH oxidase são distribuídos entre o citosol (p67phox, p47phox, p40phox, Rac2) e a membrana plasmática (citocromo b558; gp91phox/NOX2 e p22phox). Após a ativação da célula, os componentes citosólicos são fosforilados e migram até a membrana plasmática onde se associam com os componentes membranares - gp91phox e p22phox. Ao mesmo tempo, Rac2 troca o GDP por GTP e dissocia-se de seu inibidor Rho-GDI e também migra para a membrana. O Citocromo b558, que contém grupos heme ou flavina é ativado por p67phox através de seu domínio de ativação Rsc2. Agora, o complexo NADPH oxidase ativado (B) usa o NADPH citosólico para redução do oxigênio produzindo ânion superóxido (Segal, 2005).

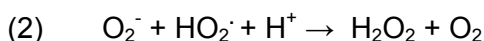
Os produtos derivados do burst respiratório são coletivamente referidos como EROS e incluem:

- **Ânion superóxido (O₂⁻):** Nos fagócitos profissionais a formação de superóxido se deve a redução parcial do oxigênio a partir da transferência de elétrons do NADPH citoplasmático para o O₂. (reação 1). Esta reação pode ocorrer na membrana do fagócito ou em invaginações da membrana durante a formação do vacúolo fagocítico (Dahlgren e Karlsson, 1999).

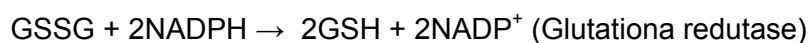
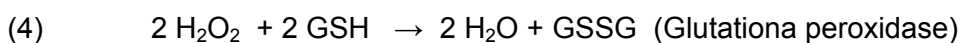
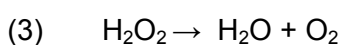


A conversão do NADPH em NADP⁺ aumenta a concentração de NADP⁺ no citoplasma. O acúmulo de NADP⁺ citoplasmático estimula a via das pentoses e o influxo de glicose por esta via, sinal característico do surto respiratório. A maioria do oxigênio consumido no surto respiratório é direcionado para a formação de ânion superóxido e subsequentemente revertido para a formação de peróxido de hidrogênio pelo processo de dismutação, que pode ser espontânea, em pH neutro, ou enzimático, através da ação da superóxido dismutase (SOD) (Robinson, 2008). Ânions superóxidos que não sofreram dismutação podem reagir com outras moléculas e se transformarem em substâncias nocivas para a célula do hospedeiro. O ânion superóxido também pode participar do processo de liberação de Fe²⁺ a partir da ferritina (proteína de estocagem de ferro) e de proteínas ferro-enzimas tais como a aconitase. Desta forma, o ferro liberado pode contribuir para a ocorrência da reação de Fenton (Babior, 1999). Estudos realizados por Hampton e cols. (1998) e posteriormente por Reeves e cols. (2002) demonstraram que os neutrófilos são capazes de produzir grandes quantidades de O₂⁻, variando entre 1 a 4 M/L (revisado por Segal, 2005).

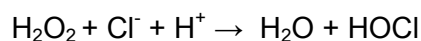
• **Peróxido de hidrogênio (H₂O₂):** Conforme referido anteriormente, este intermediário reativo de oxigênio é produzido a partir da dismutação espontânea do ânion superóxido ou através da ação da superóxido dismutase (SOD) (reação 2).



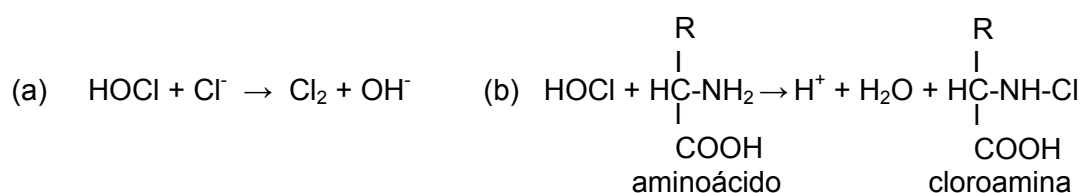
O peróxido de hidrogênio produzido pelos fagócitos é considerado um fraco oxidante devido ao fato de que a maioria dos organismos são providos de catalase, enzima que faz a transformação do peróxido de hidrogênio em oxigênio e água (reação 3) e do sistema glutatona peroxidase-glutatona redutase, que reduz o peróxido de hidrogênio a água com o gasto de NADPH (reação 4) (Beaman e Beaman, 1984; Babior, 1999). Este último sistema é o mais importante na proteção da célula contra a lesão causada por H₂O₂.



Apesar do peróxido de hidrogênio ser um fraco agente microbicida, ele pode ser o precursor de oxidantes altamente potentes, como os halogênios oxidados. Estes últimos são produzidos quando um ânion de halogênio reage com o peróxido de hidrogênio numa reação catalisada pela mieloperoxidase (MPO) (Dallegrì e Ottonello, 1997).

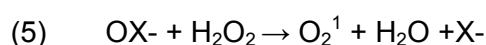


Em geral, a MPO catalisa a oxidação de halogênios (Cl^- , Br^-) dos quais o produto HOCl (ácido hipocloroso) é o mais potente oxidante produzido (Hampton *et al.*, 1998). No plasma, em pH fisiológico, a proporção de H_2O_2 consumida para gerar HOCl e HOBr é aproximadamente 45% e 50%, respectivamente (Naussef, 2007). O HOCl pode reagir com cloreto para formar cloro (a) e também reage com aminoácidos dos microrganismos ingeridos formando cloroaminas (b).

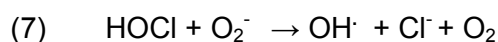
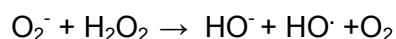
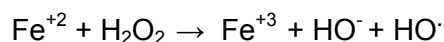
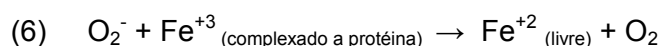


- **Oxigênio singleto (O_2^1):** Normalmente o oxigênio molecular existe como um diradical possuindo dois elétrons desemparelhados com spins paralelos e em orbitais separados; este estado é denominado de tripleto. Sob condições adequadas ocorre um pareamento dos elétrons em um simples orbital, caracterizando um estado altamente reativo conhecido como singleto. No entanto, esta condição é transitória podendo o oxigênio retornar rapidamente para o estado de tripleto (Babior, 1999).

O oxigênio singleto pode ser produzido por neutrófilo a partir de uma reação do peróxido de hidrogênio com um halogênio oxidado (reação 5), bem como pela dismutação não-enzimática do ânion superóxido (Robinson, 2008).

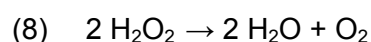
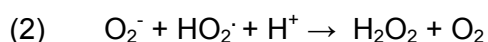


• **Radical hidroxil (HO \cdot):** Radicais hidroxil são extremamente reativos atacando geralmente a molécula mais próxima. Sua ação pode ser amplificada através de um mecanismo conhecido como reação em cadeia de radical livre. Existem dois mecanismos para a produção de radicais hidroxil por neutrófilos: a reação de Fenton, que ocorre entre o peróxido de hidrogênio e um metal de transição (reação 6) e o sistema mieloperoxidase-dependente, que abrange a reação do ácido hipocloroso com o ânion superóxido (reação 7) (Hampton *et al.*, 1998). Em geral, neutrófilos geram quantidades insignificantes de radical hidroxil por meio do sistema mieloperoxidase-dependente (Britigan *et al.*, 1990).



Nos sistemas biológicos, o metal de transição que catalisa a reação de Fenton é o Fe $^{2+}$ e/ou Cu $^{2+}$. Normalmente nestes sistemas os metais estão seqüestrados em proteínas como, por exemplo, a lactoferrina (proteína carreadora de Ferro), inviabilizando sua participação como metal catalítico (Rose *et al.*, 1995). Sob certas condições estes metais podem ser liberados das proteínas carreadoras; o ânion superóxido permite a liberação do íon ferro presente na ferritina e nas proteínas de ferro-enxofre, disponibilizando este metal para a produção de radicais hidroxil através da reação de Fenton (Babior, 1999).

Devido o radical hidroxil ser tóxico, as células utilizam mecanismos para controlar sua formação eliminando os ânions superóxidos e os peróxidos de hidrogênio (principais intermediários) através das reações enzimáticas que envolvem a SOD (reação 2) e a catalase (reação 8).



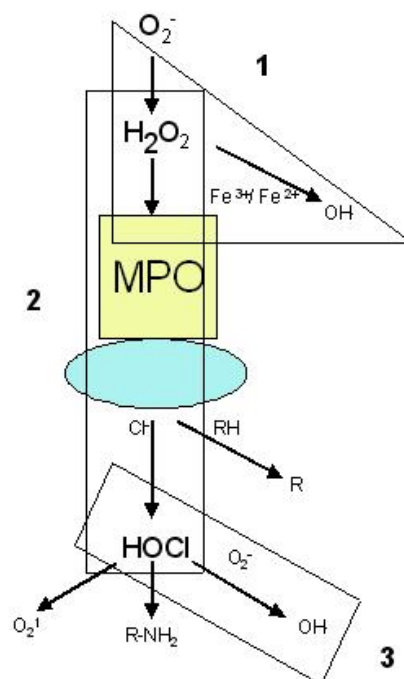
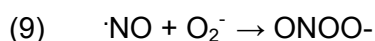


Figura 1.4: Representação esquemática das principais reações de geração das espécies reativas de oxigênio. (1) Reação de Fenton. (2) Reação de formação de halogênios oxidados. (3) Formação de radical hidroxil pelo mecanismo mieloperoxidase-dependente. MPO – mieloperoxidase, HOCl - ácido hipocloroso, $O_2^{\cdot-}$ - oxigênio superóxido, O_2^{-1} - oxigênio singlete, OH^{\cdot} -radical hidroxil, H_2O_2 – peróxido de hidrogênio, O_2^- - ânion superóxido.

- **Óxido nítrico (NO) e peroxinitrito (ONOO-):** O oxido nítrico é produzido por fagócitos a partir de L-arginina, oxigênio e NADPH pela ação da enzima óxido nítrico sintase induzida. A forma induzida desta enzima é estimulada por uma variedade de endotoxinas e citocinas (Moncada e Higgs, 1993). Nos vasos sanguíneos o NO atua como vasodilatador, no sistema nervoso como um neurotransmissor e nos fagócitos pode atuar como precursor para o peroxinitrito (ONOO-) (Babior, 1999).

O peroxinitrito é produzido através da reação do NO e do ânion superóxido (reação 9). Este composto é altamente reativo, podendo causar danos em macromoléculas biológicas e reagir com outras pequenas moléculas para produzir oxidantes altamente reativos.



Estas espécies reativas de oxigênio, geradas durante o burst respiratório, atuam como agentes oxidantes de vários compostos nos sistemas biológicos. O mecanismo exato do efeito citotóxico varia para cada tipo de ERO. Em geral, estes agentes oxidantes atuam sobre a molécula de DNA, lipídeos e proteínas de membrana.

Pacientes com a doença chamada granulomatose crônica possuem uma deficiência genética na NADPH oxidase, o que significa que seus fagócitos não produzem os derivados reativos do oxigênio característicos do surto respiratório e por isso são menos capazes de matar os microorganismos e eliminar uma infecção. Por isso, as pessoas com essa deficiência são susceptíveis a infecções fúngicas e bacterianas, especialmente na infância (Rosen, 1995).

1.2 Ativação do neutrófilo

A resposta inata de defesa em seres humanos é complexa e de múltiplos níveis, envolvendo muitos tipos de células distintas e com papéis sobrepostos. Durante essa resposta, leucócitos polimorfonucleares e outras células fagocíticas são mobilizadas para locais de lesão ou infecção, onde eles irão destruir os patógenos invasores. Para realizar esta ação, os neutrófilos possuem um impressionante arsenal de armas microbicidas. Embora, normalmente encontrado circulando pelo sangue, os neutrófilos rapidamente percebem os sinais de agressão microbiana e movem-se através das camadas do endotélio para o local de infecção. Como seu modo inicial de ataque é a fagocitose do patógeno, os neutrófilos são conhecidos como fagócitos profissionais. Uma vez ingerida a partícula estranha, esta pode ser destruída por enzimas proteolíticas armazenadas em grânulos especiais, e pela produção de espécies reativas de oxigênio (EROS). Em certos casos, as enzimas e EROS também podem ser liberados para o ambiente extracelular, onde eles atacam patógenos adjacentes, bem como células e tecidos. Recentemente, tornou-se claro que a resposta de defesa dos neutrófilos é muito finamente modulada para fornecer uma resposta adequada ao organismo. Um fator modulador dessa resposta é conhecido como agente de condicionamento. Assim, a capacidade de ativação do agente pode modular a

resposta permitindo que o neutrófilo responda proporcionalmente a severidade de um estímulo.

Apresentado a estímulos adequados, o neutrófilo que estava calmamente circulando pela corrente sanguínea ficaria ativado e atraído para um local de infecção. Este processo envolve polarização morfológica da célula e posterior quimiotaxia, fagocitose, produção de ERO e talvez o lançamento de enzimas de grânulos no ambiente extracelular. Uma enorme quantidade de pesquisas tem-se centrado na compreensão deste processo, incluindo não só o tipo de estímulos que causa a ativação, mas também os mecanismos moleculares envolvidos no processo de ativação. Estes tipos de estudos levaram ao conceito de um processo de duas fases de ativação.

O primeiro encontro seria um estímulo que não ativaria as células imediatamente, mas deixaria as células em um "estado primado". Quando primado, os neutrófilos encontram um segundo estímulo e passariam para um estado totalmente ativado. Portanto, uma definição consensual de ativação tem sido geralmente aceita: estado ativado é quando a resposta funcional de neutrófilos para um estímulo é amplificada pela exposição prévia da célula a um agente de condicionamento.

Nos últimos 10 anos, tem havido grande interesse no conceito de ativação de neutrófilos e o número de agentes que têm demonstrado ter efeitos ativadores. Embora essas respostas dos neutrófilos podem parecer excessivamente complexas, mas entendendo-as podemos permitir o desenvolvimento de novas abordagens experimentais para investigar a função dos neutrófilos. Isso, por sua vez, pode resultar na elucidação dos mecanismos pelos quais determinadas funções dos neutrófilos são ligadas e desligadas, e o desenvolvimento de terapias específicas contra efeitos prejudiciais de uma resposta excessiva de neutrófilos.

As células respondem a uma variedade de estímulos solúveis e partículas que resultam na sua modulação e melhor capacidade de resposta ao agente agressor (Yate-Pearl, 2007). Um desses mediadores é um produto de células T ativadas conhecido como interferon-gama (IFN- γ).

Os interferons do tipo I, consistem de interferon α e β e possuem atividade antiviral como função primária. Os interferons tipo II, constituem exclusivamente por interferon- γ , os quais possuem uma afinidade de funções imunológicas além de seu efeito antiviral.

O IFN- γ é uma proteína homodimérica produzida pelas células NK, pelas células CD4 e pelas células CD8. As células NK secretam IFN- γ em resposta ao reconhecimento de componentes desconhecidos de microrganismos ou em resposta a IL-12, nesse campo, o IFN- γ funciona como um mediador da imunidade inata. Na imunidade adquirida, as células T produzem IFN- γ em resposta ao reconhecimento de antígenos, e isso é acentuado pela IL-12.

Recentemente, no entanto, os efeitos do IFN- γ sob as funções de PMN são apreciados. Esses estudos têm demonstrado que o IFN- γ estimula a transdução de sinal em neutrófilos, regula a expressão de genes e de expressão de citocinas e quimiocinas, a secreção de H_2O_2 , em resposta a diversos estímulos (Kowanko, 1987, Newburger, 1988), indução do receptor Fc de alta afinidade entre outros efeitos. É interessante notar também que o tratamento de PMN com IFN- γ baixou a produção de IL-8 (Cassatela, 1993). O IL-8 é um potente quimiocina envolvida na quimiotaxia de neutrófilo e sua diminuição pode indicar um sinal de parada no recrutamento e infiltração da célula para sítios inflamatórios. No entanto, esta baixa de IL-8 foi correlacionada com um aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α e IL-1 β .

Este grande repertório de respostas é presumivelmente iniciado pela ligação do IFN- γ em seu receptor na superfície do PMN. O receptor de IFN- γ é composto de dois polipeptídeos estruturalmente homólogos pertencentes à família de receptores de citocinas tipo II; um desses liga a citocina e o outro participa da sinalização. Esse mecanismo é sinalizado pela elucidação do caminho JAK-STAT. A seqüência de eventos da via de sinalização JAK-STAT esta ilustrada na Figura 1.5.

As enzimas JAK inativas estão fracamente ligadas aos domínios citoplasmáticos dos receptores de citocinas do tipo II. Quando duas moléculas receptoras são postas em conjunto por ligação de uma molécula de citocina, os receptores JAKs associados tornam-se

ativos através de transfosforilação e fosforilam os resíduos de tirosina nas porções citoplasmáticas dos receptores agregados. Algumas dessas metades fosfotirosina dos receptores são reconhecidas pelos domínios Src de proteínas STAT monoméricas que ficam inseridas nos receptores. As proteínas STAT são então fosforiladas pelas quinases JAK associadas ao receptor. Como resultado, duas proteínas STAT ligam-se mutuamente e se dissociam do receptor. Os dímeros STAT migram para o núcleo, onde se ligam as seqüências de DNA nas regiões promotoras de genes responsivos as citocinas e ativam a transcrição do gene. Depois de cada turno, novas proteínas STAT podem se ligar ao receptor de citocina tornam-se fosforiladas, dimerizam e novamente migram para o núcleo (Bach e Schreiber, 1997).

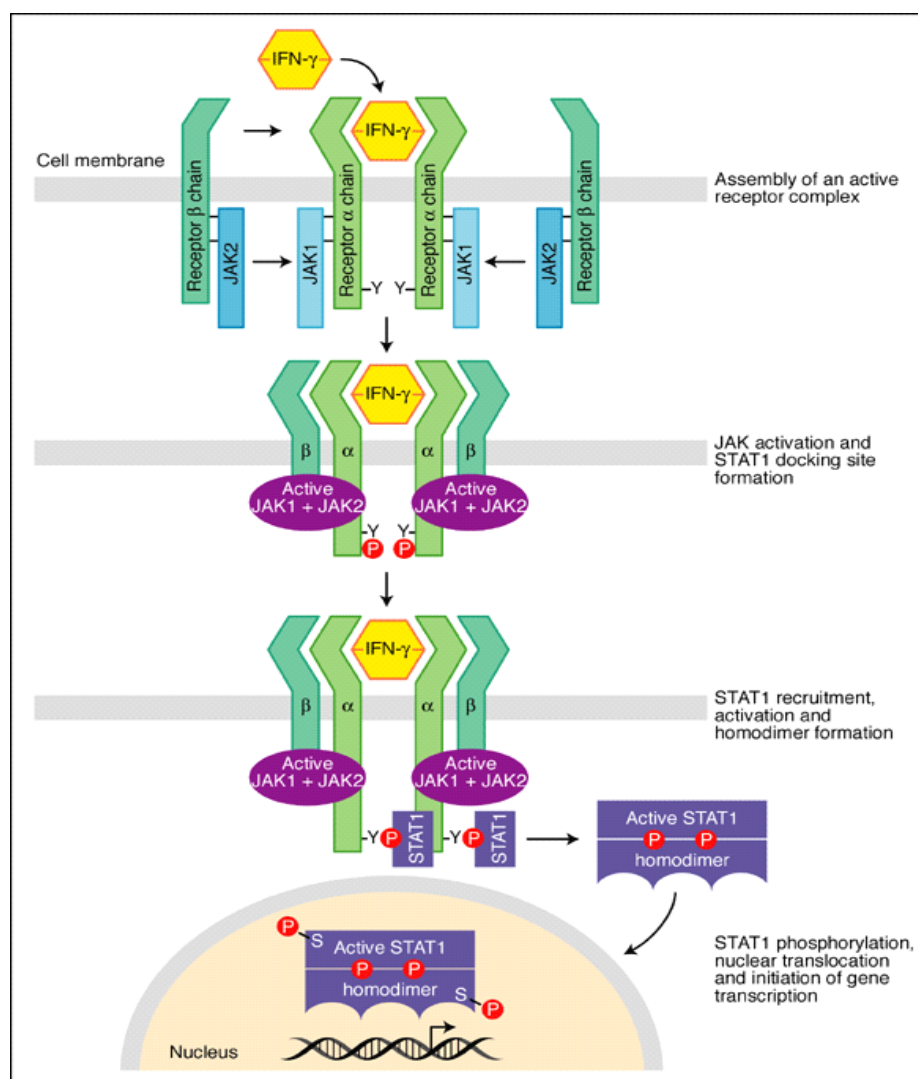


Figura 1.5: Uma representação esquemática do receptor de Interferon-gama (IFN-GR) e sua via de sinalização. O receptor de IFN- γ tem duas subunidades: IFN-GR1, o ligante de IFN- γ , também conhecido como cadeia α e IFN-GR2, a cadeia de transdução de sinal, também conhecida como a cadeia β ou fator acessório 1. Estas proteínas são codificadas por genes distintos que estão localizados em cromossomos diferentes. Com a ligação da citocina na cadeia α , o receptor se ativa formando dímeros e se associa a cadeia B. A montagem do receptor leva a ativação da quinase JAK1 e JAK2 e a fosforilação de um resíduo de tirosina no domínio intracelular de IFN-GR1. Isto leva ao recrutamento e fosforilação de STAT1 (por transdutores de sinal e ativadores de transcrição), formando assim homodímeros que são translocados para o núcleo onde irão ativar vários genes de IFN- γ . Após todo o processo de sinalização, o ligante se dissocia das cadeias α e estas são recicladas na superfície da célula. (Bach and Schreiber, 1997).

As funções do IFN- γ são importantes, principalmente na imunidade mediada por células contra microrganismos intracelulares. O IFN- γ exerce a ação microbicida dos neutrófilos e macrófagos, estimulando a síntese de intermediários reativos de oxigênio e do óxido nítrico. O IFN- γ medeia esses efeitos por ativar a transcrição e ou a reunião das enzimas necessárias para gerar os intermediários reativos do oxigênio e do nitrogênio. As moléculas reativas são produzidas no lisossomas e destroem os microrganismos que estão dentro dos fagolisossomas.

Estimula também a produção de muitas proteínas envolvidas no processamento do antígeno, incluindo os componentes LMP-2 LMP-7 do proteassomo e também estimula a expressão das moléculas de classe I e de classe II do MHC e dos co-estimuladores sobre as APCs. O IFN- γ é também um ativador das células endoteliais vasculares e potencializa muitas das ações do TNF sobre as células.

O IFN- γ atua sobre as células B para promover a troca de certas subclasses de IgG e essas, induzidas pelo IFN- γ ligam-se aos receptores Fc γ nos fagócitos e ativam o complemento promovendo a fagocitose de microrganismos.

2- Objetivos

2. OBJETIVOS

Diante da literatura apresentada evidenciando que as células fagocíticas, como neutrófilos e macrófagos respondem a uma variedade de estímulos que resultam na modulação e em uma maior capacidade de resposta ao agente agressor, a proposição deste trabalho foi realizar um estudo bioquímico e funcional dos neutrófilos de camundongos submetidos ao IFN- γ .

Para tanto, os objetivos específicos deste trabalho foram:

- (1) Caracterização do efeito da cinética do IFN- γ nas respostas funcionais dos neutrófilos.
- (2) Avaliar o efeito do IFN- γ sobre a fagocitose dos neutrófilos mediados por diferentes receptores: receptor de imunoglobulina do isotipo IgG (Fc γ R), receptor de complemento (CR1 e CR3), receptor delectina-1;
- (3) Quantificar a produção de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio em neutrófilos ativados com IFN- γ e estimulados via receptores Fc γ R, CR1 e CR3 e delectina-1;
- (4) Analisar a atividade da enzima NADPH oxidase através da expressão do mRNA de seus componentes, em neutrófilos ativados com IFN- γ comparando com aquela expressa em células não estimuladas.
- (5) Correlacionar os efeitos do IFN- γ com a expressão dos principais receptores fagocíticos: receptor Fc γ R, receptor delectina-1 e receptor CR1 e CR3.

3- Materiais e Métodos

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Para todos os experimentos, foram utilizados camundongos machos BALB/C pesando aproximadamente 25 g obtidos do biotério da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto e mantidos no biotério do Departamento de Bioquímica em temperatura (25°C) e período de luz controladas (ciclo claro/escuro de 12 horas) e com água e alimento a vontade. O trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal n°053/2009.

3.2 Isolamento dos neutrófilos de camundongo

Os camundongos foram sacrificados e o sangue total foi colhido em tubos com heparina. O procedimento para isolamento dos neutrófilos de camundongos foi descrito em Boxio *et al.* (2004). Após a coleta o sangue foi centrifugado (400 g, 10 min, 4°C) em solução de Hanks contendo cálcio, magnésio, fenol vermelho, bicarbonato de sódio, 15mM EDTA e soro albumina bovino (BSA) 1g/ml, pH 7,2. Depois da lavagem, cerca de 800 µl do sangue foi adicionado a 1ml da mesma solução de Hanks. O sangue foi então colocado em um gradiente de três camadas de Percoll (78%, 69% e 52%), respectivamente, diluídos em Hanks (100% Percoll = nove partes de Percoll e uma parte de Hanks) e centrifugados a 1500 x g, 30 minutos a temperatura ambiente. Os neutrófilos encontravam-se entre as interfaces de 78% e 69%, estes foram colhidos e ressuspensos em Hanks com EDTA e BSA (1g/ml). Depois da centrifugação, as hemácias restantes foram lisadas com cloreto de amônio durante 5 min. Após a última lavagem com Hanks os neutrófilos foram suspensos em RPMI e utilizados dentro de 4 horas. Aproximadamente 98% das células na suspensão celular eram neutrófilos. O teste de viabilidade celular foi realizado por exclusão do Azul de Tripán indicando que em torno de 3% de células não viáveis estavam presentes na

suspensão celular (Henson, 1971a). A concentração celular foi ajustada para 2×10^6 células/mL.

3.3 Preparação dos estímulos fagocíticos

3.3.1 Imunocomplexos

Foram preparados dois tipos de imunocomplexos (IC) utilizados para fagocitose mediada pelo receptor FcγR, e para os receptores de complemento CR1 e CR3 foram utilizados o IC opsonizado com soro de camundongo (IC-C).

Como imunocomplexo, entende-se o produto da ligação de um antígeno com o anticorpo específico contra ele. De modo geral, pode também se referir a imunocomplexos, não apenas como antígenos e anticorpos específicos, mas também incluindo se for o caso, componentes do sistema complemento.

(1) Imunocomplexo de eritrócito de carneiro (EA-eritrócito ligado ao anticorpo) foi utilizado para a realização dos ensaios de fagocitose. Nesses ensaios, o eritrócito foi marcado fluorescentemente para análise em citometria de fluxo como descrito por Healey e cols (2007). Assim, uma suspensão de 4×10^8 de eritrócito de carneiro foi ressuspendida em 1 ml de Diluente C (Sigma, St Louis MO-USA) e incubada com 1 ml de PKH26 (*Red Fluorescent cell linker* - Sigma Louis MO-USA) a 4×10^{-6} M diluída em diluente C por 4 minutos sob agitação esporádica. O volume foi dobrado com soro fetal bovino para interromper a marcação e os eritrócitos foram lavados a 600 x g por 10 minutos a 4°C e ressuspensos em solução de Hanks a 0,4% (40 µl da papa inicial de eritrócitos em 10 ml de Hanks).

Para a formação dos imunocomplexos, a solução de 0,4% de hemácias marcadas foi incubada com IgG de camundongo anti-hemácia de carneiro (título: 1:1024, diluição: 1:300) produzida no laboratório e incubada por 30 minutos a 37°C. O imunocomplexo foi lavado 3x e ressuspenso novamente em Hanks obtendo-se uma solução final de 0,4% de hemácia.

Para a opsonização com complemento, o soro de camundongo recém colhido foi adicionado à solução de EA numa diluição de 1:100 e esta solução, agora chamada de EAC, foi incubada à 37°C por 10 min. O imunocomplexo opsonizado (IC-C) foi lavado 3x em Hanks e imediatamente utilizados nos experimentos.

(2) Imunocomplexo de Ovoalbumina (Ova ligada ao anticorpo) foi utilizado nos experimentos de medida das espécies reativas, já que a hemácia não pode ser utilizada nestes ensaios por conter grande quantidade de enzimas conversoras das espécies reativas de oxigênio.

Para isso, 100 µl (810 µg de proteína) de IgG de coelho anti-Ova produzida no laboratório foi incubada com 100 µl de ovalbumina (1 mg/ml) (Sigma, St Louis MO-USA) por 1 hora a 37°C. O imunocomplexo foi lavado a 10.500 x g por 10 minutos a 4°C e ressuspenso em Hanks com 0,1% de gelatina (Difco-Detroit-USA). Para a opsonização, foi utilizado soro de camundongo recém colhido adicionado à solução de Ova numa diluição de 1:100. O IC-C foi lavado 3 vezes em Hanks 10.500 x g por 10 minutos a 4°C e ressuspenso em Hanks.

3.3.2 Zimosan

O zimosan foi utilizado para fagocitose mediada pelo receptor dectina-1, enquanto o zimosan opsonizado com soro de camundongo foi utilizado para estimular também os receptores de complemento CR1 e CR3. Desta forma, 20 mg de zimosan A de *Saccharomyces cerevisiae* foi diluído em 40 ml de PBS (tampão salina fosfato) e aquecido em banho maria por 30 minutos. Esta solução foi centrifugada a 600 x g por 10 minutos a 4°C e o sedimento ressuspenso em Hanks a 20 mg/ml, aliqotado e estocado a -20°C.

Nos ensaios de fagocitose, o zimosan foi marcado por fluorescência para análise em citometria de fluxo como descrito por Nuutila e Lilius (2005). Assim, o zimosan foi incubado com 10 ml de uma solução de 25 µg/ml de isoticianato de fluoresceína (FITC-Sigma) em tampão carbonato pH 9,5 por 30 minutos a 37°C. O zimosan foi lavado 2 vezes no tampão

carbonato para a retirada do FITC não ligado e lavado mais 2 vezes e ressuspenso em Hanks a 20 mg/ml. Para opsonização com complemento, 10 mg do zimosan marcado foi incubado com 1 ml de soro de camundongo recém colhido a 37°C por 3 minutos, lavado e ressuspenso em Hanks com gelatina (0,1 g/ml) para os ensaios de medida de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio.

3.3.3 IgM de coelho anti-estroma de hemácia de carneiro

Para avaliação da fagocitose mediada somente pelo receptor de complemento, foi utilizado o imunocomplexo “EAC” – eritrócito-anticorpo-complemento. O anticorpo utilizado para o preparo deste imunocomplexo foi a IgM de coelho, evitando-se, desta maneira, interferência de outros receptores (como, por exemplo, Fc γ , da IgG) na análise dos resultados.

A IgM de coelho anti-estroma de hemácia de carneiro foi obtida pela imunização de coelhos (linhagem Nova Zelândia), que consistiu de injeções endovenosas sucessivas de uma suspensão de estroma de hemácias de carneiro em solução salina (6 mg/mL) - 11 injeções durante um período de 20 dias. O estroma de carneiro foi preparado segundo Kabat e Mayer (1971). A purificação da IgM foi realizada de forma semelhante à IgG de coelho diferindo no tipo de cromatografia utilizada, de filtração em gel. Foram realizadas 2 passagens em uma coluna de Sephacryl S300, equilibrada com tampão borato 0,1M e NaCl 0,15M pH 8. Na primeira passagem, observamos 2 picos: o primeiro, referente à fração 19S (α_2 -macroglobulinas e IgM) e o segundo, à fração 7S (IgG), como ilustrado a seguir:

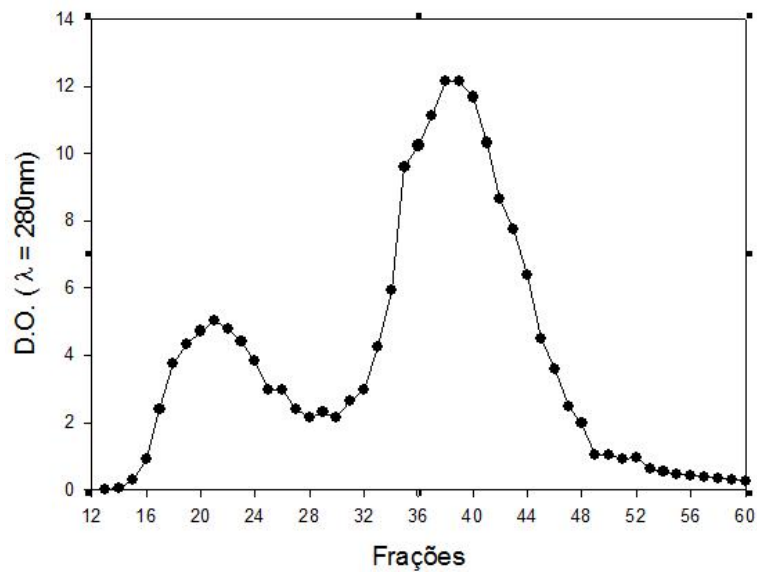


Figura 3.2: Cromatografia de filtração em gel para purificação de IgM de coelho anti-estroma de hemácia de carneiro. No primeiro pico encontra-se o anticorpo de interesse; já no segundo, podemos observar uma grande quantidade de IgG. As frações contendo maior concentração de IgM foram reunidas, concentradas e novamente passadas pela coluna de Sephacryl S300.

As frações referentes à IgM foram reunidas e concentradas em sistema Amicon (modelo YM10, que retém proteínas com massa molecular maior que 10.000 Da). Evitou-se utilizar as frações referentes à parte descendente do pico da IgM, prevenindo contaminações com a IgG do pico seguinte. Em seguida, foi realizada uma nova passagem, para obter-se maior pureza da amostra.

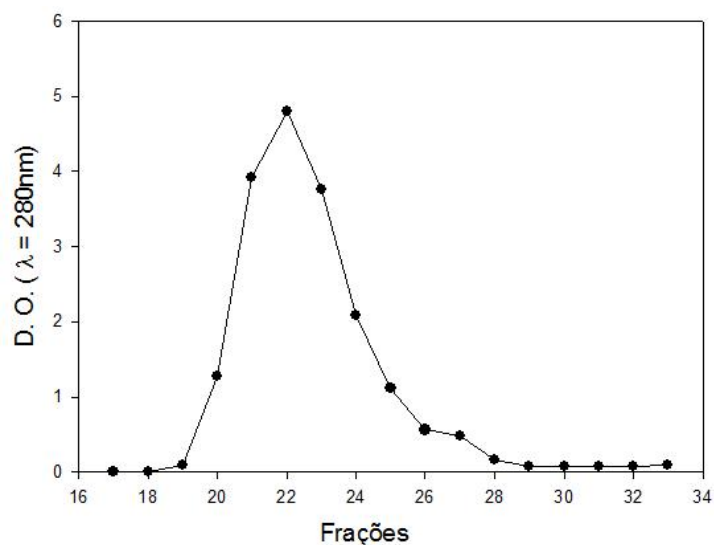


Figura 3.3: Frações de cromatografia de filtração para purificação de IgM anti-estroma de hemácia de carneiro. O pico corresponde à IgM.

As frações foram reunidas e concentradas novamente com o sistema Amicon. Foi também determinado o título do anticorpo, através do ensaio de hemaglutinação. O título obtido foi 1:1024. Para a formação do imunocomplexo de IgM, foi seguido o mesmo protocolo da IgG descrito anteriormente.

3.3.4 F(ab')₂ de coelho anti-Ova

Na avaliação da liberação de ânions superóxido pela interação com receptores de complemento, foi utilizado o imunocomplexo OVA-F(ab')₂-complemento.

O fragmento F(ab')₂ foi obtido através da clivagem da IgG de coelho anti-OVA conforme Weir (1986). A IgG de coelho anti-OVA foi clivada com a protease pepsina, uma enzima que tem sua atividade otimizada em pH ácido. Portanto, a solução de IgG foi levada ao pH 3,2 e, em seguida, adicionou-se a solução de pepsina em tampão glicina 0,2M (2 mg de pepsina para cada 100 mg de IgG). Incubou-se por 2h a 37°C e, em seguida, a ação da protease foi inibida pelo elevamento do pH a 7 - 8, pela adição de NaOH 1N.

Para purificar os fragmentos de F(ab')₂, foi realizada precipitação da amostra com sulfato de amônio (50%) e o precipitado foi dialisado contra solução de PBS.

Para avaliar se a clivagem foi bem sucedida, realizou-se uma eletroforese em gel de acrilamida, na ausência de agente desnaturante (exceto para os padrões), conforme descrito por Gardin (1990). Como padrão de massa molecular, foi utilizado o SDS-PAGE Molecular Weight Standards – broad range (BIORAD). O gel foi corado com *Coomassie Brilliant Blue* e descorado com solução de ácido acético. Como demonstrado na figura abaixo, não observamos remanescentes de IgG nas amostras contendo o fragmento F(ab')₂.

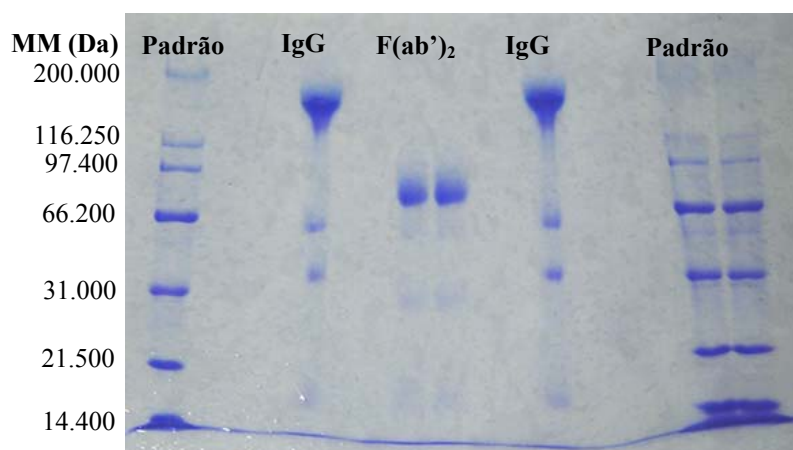


Figura 3.4: Eletroforese em gel de acrilamida demonstrando a clivagem do anticorpo IgG em F(ab')₂ pela ação da protease pepsina. O gel foi corado com o corante *Coomassie Brilliant Blue*. Na eletroforese verificou-se a separação das cadeias leve e pesada do anticorpo IgG, com aproximadamente 25.000 Da e 65.000 Da, respectivamente, que coincidiram com o padrão de tamanho molecular utilizado. Não foram observados anticorpos IgG íntegros nas amostras contendo F(ab')₂. MM: massa molecular, em Daltons.

3.4 Incubação do neutrófilo com IFN- γ

Os neutrófilos foram ativados com Interferon-gama (IFN- γ), (Sigma, ST Louis MO-USA), 150 U/ml durante 2 horas antes da realização de todos os experimentos.

3.5 Ensaio de fagocitose

Os neutrófilos (2×10^6 PMN/ml) foram aderidos em placas de cultura de 24 poços incubados por 45 minutos a 37°C em uma atmosfera de 5% de CO₂ com 500 μ l dos diferentes estímulos fagocíticos: EA/EAC-PKH26, zimosan-FITC, zimosan-FITC opsonizado.

Após a incubação, os poços foram lavados para remoção dos estímulos não fagocitados. As hemácias dos imunocomplexos ligados aos neutrófilos foram lisadas com um choque hipotônico com uma solução de PBS diluído 5 vezes por 45 segundos e a osmolaridade foi restabelecida por lavagem com PBS, como descrito em Mantovani (1987).

As células foram mecanicamente removidas do poço com bastão de látex, centrifugadas, ressuspensas em 150 μ l de paraformoldeído 1% e adquiridas no citometro de fluxo (FACSCanto, BD Biosciences). Para completa distinção entre as partículas

fluorescentes internalizadas e as ligadas à superfície do neutrófilo, o azul de Tripán foi usado para a eliminação rápida (*quenching*) da fluorescência ligada a membrana. Assim, imediatamente antes da aquisição das células pelo citometro, foi adicionado 150 µl de azul de tripan (4 mg/ml aos neutrófilos que fagocitaram EA, EAC, zimosan e zimosan opsonizado. Desta forma, a fluorescência detectada pelo citometro era apenas a dos estímulos interiorizados (Nuutila, 2005).

Para garantir a eficiência do “*quenching*” e da lavagem, um controle negativo da fagocitose foi realizado em todos os experimentos. Para isso, os neutrófilos foram incubados com os estímulos fagocíticos por 45 minutos a 4°C, temperatura em que a interiorização dos estímulos é inibida, ocorrendo apenas a ligação destes a superfície dos neutrófilos. Assim, após a lavagem, o choque hipotônico e o “*quenching*”, a medida de fluorescência destas células era nula. Os resultados foram analisados com o software FACSDiva® (BD Biosciences) e representados como porcentagem de fagocitose e média de intensidade de fluorescência (MIF) por neutrófilo.

3.6 Avaliação da morte celular

3.6.1 Análise da marcação de neutrófilos de camundongos, tratados ou não com IFN- γ , para Anexina-FITC e Iodeto de Propídio

Durante o processo apoptótico, as células modificam a estrutura de suas membranas plasmáticas para sinalizar o processo de morte celular. Células em apoptose tardia ou necrose perdem a integridade da membrana plasmática e tornam-se permeáveis ao iodeto de propídio que penetra na célula e cora os ácidos nucleicos, emitindo fluorescência vermelha. As células em apoptose inicial externalizam a fosfatidilserina, um fosfolípido do lado citosólico na superfície celular. Na presença de íons de cálcio, a anexina V conjugada a FITC possui alta afinidade para ligação seletiva a fosfatidilserina, revelando fluorescência verde.

O ensaio foi realizado em placas de 24 poços onde os neutrófilos purificados foram aderidos em lamínulas de vidro e incubados por 2 horas com diferentes concentrações de IFN- γ (10,150,300,500 U/ml). Após o período de incubação as células foram lavadas com PBS e adicionado o tampão de ligação (TACS Annexin V-FITC, Trevigen). Foram adicionados também a anexina V-FITC e 2 $\mu\text{g/mL}$ de iodeto de propídio. As células foram incubadas a temperatura ambiente por 15 minutos e em seguida observadas em microscópio de fluorescência. (LEICA DMI 4000B).

3.7 Medida da liberação de ânion superóxido

A liberação extracelular de O_2^- foi medida pelo método de redução do ferricitocromo C, levando-se em conta apenas à redução inibível pela superóxido dismutase (SOD) conforme descrito por Johnston e Lehmeyer (1976) e Pick e Mizel (1981).

A suspensão de células (2×10^6 PMN/mL) foi ressuspensa em Hanks contendo gelatina (0,1 g/ml) para evitar a aderência dos neutrófilos aos tubos foi incubada por 5 minutos a 37°C com ferrocitocromo C (15 mg/ml) dissolvido em meio Hank's e gelatina (0,1 g/ml). Em seguida, 200 μl de imunocomplexo de Ova, zimosan, zimosan opsonizado e imunocomplexo Fab'2 de IgG foram adicionados em uma concentração final de 200 $\mu\text{g/ml}$. O volume final da reação foi de 1100 μL . A mistura de reação foi incubada por 60 minutos a 37°C , em uma atmosfera saturada de vapor de água, sem agitação. Nos controles do experimento foram acrescentados 10 μL de SOD (1500 $\mu\text{g/mL}$) para inibir a produção de ânion superóxido e garantir a especificidade do experimento. Transcorrido o tempo de incubação, os tubos foram transferidos para um banho de gelo e o sobrenadante foi coletado e centrifugado a 730 g por 10 minutos a 4°C para remoção das células. A suspensão final foi lida em espectrofotômetro no comprimento de onda de 550 nm e a D.O. resultante foi convertida para nanomoles de ferrocitocromo C reduzido, utilizando-se o coeficiente de extinção $\Delta E_{550\text{nm}} = 21 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (Massey, 1959).

3.8 Medida da liberação de peróxido de hidrogênio

A liberação de H_2O_2 foi determinada pelo método de oxidação do fenol-vermelho pelo H_2O_2 mediada pela HRPO (peroxidase horseradish type II) como descrito por Pick e Keisari (1980). Este método é baseado na oxidação do fenol-vermelho dependente de peroxidase, que resulta na formação de um composto que apresenta um aumento de absorbância a 600-620nm.

A suspensão de células (2×10^6 PMN/mL) foi colocada em Hanks contendo gelatina (0,1 g/ml) e depois incubadas com 500 μ L da solução fenol-vermelho (SFV). A solução SFV contém meio Hank's Hepes e gelatina (0,1 g/ml) em pH 7,2, fenol vermelho (0,28 mM) e HRPO (8,5 U/mL) dissolvido em meio Hank's Hepes e gelatina (0,1 g/ml) por 5 minutos a 37°C. O volume final da reação foi de 1100 μ L. Em seguida, 200 μ l de imunocomplexo de Ova, zimosan, zimosan opsonizado e imunocomplexo F(ab')₂ de IgG foram adicionados em uma concentração final de 200 μ g/ml. A mistura de reação foi incubada por 60 minutos a 37°C, em uma atmosfera saturada de vapor de água. Transcorrido o tempo de incubação os tubos foram transferidos para o gelo e imediatamente centrifugados a 730 x g por 10 minutos a 4°C para remover as células.

À suspensão final foram adicionados 10 μ l de NaOH 1N e a absorbância lida em espectrofotômetro no comprimento de onda 620 nm. O resultado foi expresso em nmol H_2O_2 / 2×10^6 célula, de acordo com a curva padrão de H_2O_2 (5 – 60 μ M) estabelecida para cada experimento.

3.9 Medida da liberação de ácido hipocloroso

A produção de HOCl foi determinada pela oxidação da taurina por HOCl. Esta reação tem como produto a taurina cloramina (TauCl). Na presença de iodeto, a TauCl oxida o TMB (3, 3', 5, 5'-tetrametilbenzidina) formando um composto azul que é lido em espectrofotômetro no comprimento de onda de 630 nm (Dypbukt *et al.*, 2005). Para isso, neutrófilos (2×10^6 PMN/ml) ressuspensos em Hanks contendo gelatina (0,1 g/ml) foram

incubados com os diferentes estímulos fagocíticos, imunocomplexo de Ova, zimosan, zimosan opsonizado e imunocomplexo F(ab')₂ de IgG anti-Ova em meio Hanks Hepes gelatina (0,1 g/ml), pH 7,2 suplementado com taurina (5 mM) por 60 min a 37°C. O volume final da reação foi 1mL. Após o período de incubação os tubos foram transferidos para o banho de gelo e a reação foi interrompida pela adição de catalase 20 µL (2 mg/mL). O sobrenadante foi recolhido e centrifugado a 730 g por 10 min a 4°C.

O acúmulo de TauCl foi dosado em microplaca de 96 poços pela adição de 200 µL do sobrenadante da cultura dos neutrófilos a 50 µL de TMB (2 mM), dissolvido em DMF (10g/ml) (dimetilformamida), NaI (100 µM) e ácido acético (400 mM). O resultado foi expresso em µM HOCl/2 x 10⁶ célula de acordo com a curva padrão de TauCl (5-120 µM) estabelecida para cada experimento. Esta curva padrão foi produzida a partir da adição de concentrações conhecidas de HOCl a uma solução de taurina 5 mM.

3.10 Dosagem de nitrito como medida de NO

Muitos estudos quantitativos têm usado medidas de nitrito e nitrato, pois são produtos estáveis da oxidação do NO (óxido nítrico ou monóxido de nitrogênio) em sistemas biológicos e culturas celulares. São usados como índices da produção de NO pois, uma vez que a determinação direta do NO é difícil por ele ser um radical livre liberado pelas células em concentrações na ordem de pmol/L e nmol/L e tem um curto tempo de vida. O acúmulo de nitrito no sobrenadante de cultura foi medido pela reação de Griess, conforme descrito por Green *et al.*, (1982), Li *et al.*, (2000).

Para isso, os neutrófilos (2x10⁶ PMN/ml) em meio RPMI 1640 sem fenol vermelho, suplementado com 10% de SFB, penicilina (0,1 g/L), estreptomicina (0,1 g/L), piruvato de sódio (0,11 g/L) e bicarbonato de sódio (2,2 g/L) foram incubados com os imunocomplexos (Ova, zimosan e zimosan opsonizado e imunocomplexo F(ab')₂ de IgG anti-iOva) por 180 minutos a 37°C em uma atmosfera de 5% de CO₂ saturada de vapor de água. O volume final desta reação foi 500 µL. Após o período de incubação o sobrenadante foi coletado, centrifugado a 730 g por 10 min a 4°C e congelado a -80°C para posterior dosagem.

A dosagem de NO_2^- foi realizada em microplaca de 96 poços. A reação foi iniciada pela adição de 100 μl do sobrenadante de cultura a igual volume do reagente de Griess modificado. Esta reação foi incubada à temperatura ambiente por 10 minutos e a absorbância foi determinada a 540 nm em leitor de microplaca. A concentração de NO_2^- foi determinada a partir de uma curva padrão de nitrito de sódio (NaNO_2) (0,4-100 μM) estabelecida para cada experimento.

3.11 Liberação de enzimas lisossomais

A liberação das enzimas dos grânulos citoplasmáticos de neutrófilos foi baseada na metodologia descrita por Henson *et al.* (1972). Para isso, neutrófilos (2×10^6 PMN/ml) cultivados em meio Hank's Hepes gelatina (0,1 g/ml), pH 7,2 acrescido ou não com 500 μM de citocalasina B foram incubados com as diferentes superfícies biológicas por 60 minutos a 37°C em uma atmosfera saturada de vapor de água. O volume final desta reação foi 500 μL . Após a incubação o sobrenadante foi coletado, centrifugado a 730 g por 10 min a 4°C para remover as células e mantido em banho de gelo para posteriores dosagens enzimáticas. As enzimas avaliadas foram: β -glucuronidase, fosfatase alcalina e lactato desidrogenase.

A presença das enzimas no sobrenadante de cultura foi expressa como porcentagem da liberação total de enzimas obtida quando igual número de células foi completamente lisado com 0,2 % de Triton X-100.

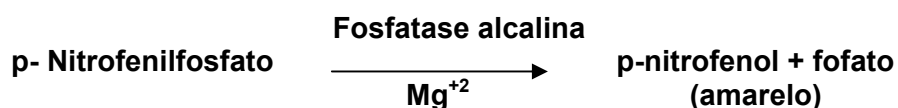
3.11.1 β -Glucuronidase

O ensaio da β -glucuronidase foi realizado conforme metodologia descrita em Fishman (1965), com modificações. Neste ensaio a hidrólise do glucuronato de fenoftaleína, pela atividade da enzima β -glucuronidase, libera fenoftaleína que em pH alcalino originando um produto de coloração avermelhada. Neste ensaio 200 μL do sobrenadante de cultura (obtido com descrito no item 3.11) foram incubados com igual volume de tampão acetato de sódio 0,12 M (pH 4,5) e 100 μL de glucuronato de fenoftaleína (714 μM). A mistura de

reação foi incubada a 39°C em banho-maria por 17 horas, sem agitação. Ao final foram adicionados 500 µL de tampão glicina 0,48 M (pH 10,4). Esta reação produz um composto de cor avermelhada cuja quantificação colorimétrica foi realizada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 540 nm.

3.11.2 Fosfatase alcalina

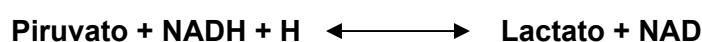
O ensaio da fosfatase alcalina foi realizado conforme metodologia descrita por Linhardt e Walter (1965), com modificações. Neste ensaio o p-Nitrofenilfosfato serve como substrato para a fosfatase alcalina. A taxa de aparecimento de p-nitrofenol é diretamente proporcional à atividade da fosfatase alcalina.



Para este ensaio 200 µL do sobrenadante de cultura (obtido com descrito no item 3.11) foram incubados com igual volume de uma solução de AMPOL 0,25 M (2-amino-2-metil-1-propanol), p-Nitrofenilfosfato 100 mM e cloreto de magnésio 1M, pH 10. Esta mistura de reação foi incubada a 37°C em banho-maria por 30 minutos, com agitação. A reação foi parada pela adição de 600 µL de NaOH 0,8 N. Esta reação produz um composto de cor amarelada que foi quantificado em espectrofotômetro no comprimento de onda de 410 nm.

3.11.3 Lactato desidrogenase

A atividade da lactato desidrogenase (LDH) é determinada de acordo com a reação abaixo. A LDH catalisa a conversão de piruvato a lactato na presença de NADH. O decréscimo da absorbância em 340 nm devido à oxidação do NADH é proporcional a atividade de LDH na amostra.



A dosagem de LDH foi realizada em microplaca de 96 poços utilizando-se o Kit LDH Liquiform (Labtest Diagnostica S.A). A reação foi iniciada pela adição de 20 µL do sobrenadante de cultura (obtido conforme item 3.11) a 200 µL do reagente de trabalho. Esta reação foi incubada a 37°C por 3 minutos. A leitura foi realizada em leitora de microplaca no comprimento de onda de 340 nm nos tempos 1 e 3 minutos.

Os valores de absorbância obtidos foram tratados da seguinte forma:

$$\Delta\text{Abs} = \frac{\text{Abs}_{1\text{min}} - \text{Abs}_{3\text{min}}}{2}$$

A atividade de LDH (U/L) é dada pela equação: $\Delta\text{Abs} \times 249,43$

3.12 Expressão dos receptores CD32/CD16 (FCγRII/III), CD11b (CR3) e Dectina-1

Para avaliar a expressão do receptor de Dectina-1, as células foram incubadas por 40 minutos com o anticorpo primário (diluído em 2% de soro bovino fetal): anti-dectina-1 de rato (diluuição 1:67, Serotec). As células foram lavadas e incubadas com o anticorpo secundário, também diluído em 2% de soro bovino fetal: anti-IgG de rato-Alexa Fluor 488 (diluuição 1:200, Molecular Probes, Invitrogen, Eugene OR-USA). Como controle negativo, alguns poços foram incubados apenas com os anticorpos secundários.

A expressão dos receptores CD32/16, CD11b foi avaliada por citometria de fluxo utilizando-se o anticorpo monoclonal anti-CD32/CD16 conjugado com FITC, anti-CD11b conjugado com PE (ambos, 2 µg/ml, BD Biosciences).

A marcação foi realizada conforme instruções do fabricante. Após a marcação, os neutrófilos foram lavados com PBS, centrifugados a 500 x g por 10 minutos a 4°C em tubos para citometria e ressuspensos em 200 µl de paraformoldeído 1%. A aquisição das células foi realizada no FACS Canto e analisadas pelo software BD FACSDiva® (BD Biosciences).

3.13 Dosagem de citocinas

A dosagem das citocinas, TNF- α e IL-6, foi realizada pelo método de ELISA (“Enzyme linked Immuno Sorbent Assay”), utilizando-se o Kit DuoSet® IL-6 e TNF- α (R&D Systems) conforme instruções do fabricante. Para avaliar a produção da quimiocina no sobrenadante de cultura, neutrófilos (1×10^6) ressuspensos em meio RPMI, foram aderidos em placas de cultura e estimulados com EA, EAC, zimosan e zimosan opsonizado por 14 horas a 37°C em uma atmosfera de 5% de CO₂ saturada com vapor de água. Após esse tempo, o sobrenadante foi colhido e armazenado a -70°C. A absorbância foi medida a 540 nm em um espectrofotometro de placa e as concentrações das amostras foram inferidas a partir de uma curva padrão.

3.14 Análise da expressão do RNAm de subunidades da NADPH oxidase por RT-PCR Real-Time Syber® Green

3.14.1 Extração de RNA

A extração de RNA foi realizada utilizando Trizol (Invitrogen), conforme instruções do fabricante. Para a extração de RNA, 5×10^6 neutrófilos foram sedimentados por centrifugação a 730 g. A este sedimento foi adicionado 1 mL de Trizol. A suspensão celular foi homogeneizada em vortex até completa solubilização e em seguida foram adicionados 200 μ L de clorofórmio. As amostras foram agitadas vigorosamente em vortex durante 1 minuto e incubadas à temperatura ambiente por 5 minutos. Esta mistura foi centrifugada 15300 g por 5 minutos a 4°C. Foi observada a separação de 3 fases. O DNA apresenta-se na fase orgânica (de coloração azul) e as proteínas na interfase, enquanto, o RNA permanece na fase aquosa. A fase aquosa foi recolhida e os RNAs foram precipitados pela adição de 500 μ L de isopropanol e incubados à temperatura ambiente por 10 minutos. A mistura contendo RNA e isopropanol foi centrifugada a 15300 g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi desprezado e o RNA precipitado foi lavado com 1000 μ L de etanol 75% (v/v) em água DEPC

0,1% (dietil-pirocarbonato). Os RNAs foram armazenados em etanol 100% e estocados a -80°C. No momento do uso as amostras foram secas em corrente de nitrogênio gasoso para retirar o excesso de etanol. O precipitado foi solubilizado em 10 µl de água tratada com DEPC. O RNA foi quantificado por absorvância a 260 nm em cubeta de 1 cm de comprimento óptico, considerando-se que uma unidade de absorvância a 260 nm equivale a 40 µg de RNA/mL. Foram realizadas leituras espectrofométricas nos comprimentos de onda de 230 e 280 nm. Nos experimentos foram utilizadas as preparações de RNA que apresentaram relações de absorvância $230/260=$ entre 0,65 e 0,80, e $260/280=$ entre 1,9 e 2,0 (amostras consideradas livres de contaminação com fenol e proteínas, respectivamente) (White *et al.*, 1997). A integridade das preparações foi avaliada por eletroforese em gel de agarose 1%.

As amostras de RNA foram tratadas com DNase para a descontaminação de possíveis quantidades de DNA presentes. Assim, 1 µg de RNA em 8 µl de água com DEPC foi incubado com 1 µl de DNase (1U/µl, Invitrogen-USA) e 1 µl de Tampão de reação por exatamente 15 minutos a temperatura ambiente, como descrito pelo fabricante. Após este tempo, a inativação da enzima foi realizada pela adição de 1 µl de EDTA 25 mM e incubação a 65°C por 10 minutos. Todas as amostras foram tratadas em duplicatas.

3.14.2 Desenho do Oligonucleotídeo

Os oligonucleotídeos específicos para o gene que codificam as subunidades gp91phox e p47phox do complexo NADPH oxidase de neutrófilos foram obtidos a partir do programa IDT (Integrado DNA Technologies) disponível em www.idtdna.com.br a partir das seqüências disponíveis no banco de dados do Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia (www.ncbi.nlm.nih.gov)

Alvo	Primer sense	Primer anti-sense
gp91 ^{phox}	5'-TTAGTGGGAGCAGGGATTGG-3'	5'-CCGGCATTGTTCTTTTCCT-3'
p47 ^{phox}	5'-CGTACCCAGCCAGCACTATGT-3'	5'-GCTGCCCGTCAAACCACTT-3'
B-actina	5'-AGGGAAATCGTGCGTGACA-3'	5'-GAACCGCTCATTGCCGATA-3'

Amplicon da região do gene da p47^{phox}

CGTACCCAGCCAGCACTATGTGTACATGTTCTGGTCAAATGGCAGGACCTGTCGGAGAAGGTG
GTCTACCGGCGCTTCACCGAGATCTACGAGTTCCATAAAACCTTAAAAGAAATGTTCCCTATTGAG
GCAGGGGCGATCAATCCAGAGAACAGGATCATCCCCACCTCCCAGCTCCC**AAGTGGTTTGACC**
GGCAGC

Amplicon da região do gene da gp91^{phox}

TTAGTGGGAGCAGGGATTGGGGTCAACCCCTTCGCATCCATTCTCAAGTCAGTCTGGTACAAATA
TTGCAATAACGCCACCAATCTGAAGCTCAAAAAGATCTACTTCTACTGGCTGTGCCGGGACACAC
ATGCCTTTGAGTGGTTTGCAGATCTGCTGCAACTGCTGGAGAGCCAGATGC**AGGAAAGGAACAA**
TGCCGG

Para ambos os genes, o comprimento do fragmento foi de 200 pb e Tm 59 e para o controle interno foram usados os oligonucleotídeos iniciadores do gene que codificam a proteína β -actina.

3.14.3. RT - PCR Real-Time Syber[®] Green

Para obtenção do cDNA as reações de transcrição reversa foram conduzidas em um volume total de 25 μ L, contendo 1,2 μ g de RNA total, 5 μ L de tampão RT, 1,25 mM de cada deoxinucleotídeo trifosfato (dATP, dTTP, dGTP e dCTP), 500 ng de oligonucleotídeo iniciador Oligo d(T)₁₂₋₁₈, 20 U de inibidor da ribonuclease RNAsin[®] e 10 U da transcriptase reversa Avian Myeloblastosis Virus (Promega). A reação foi submetida a 42°C por 75 minutos no termociclador PCR-Thermo Hybaid. Após a síntese de cDNA, foram realizadas as reações de amplificações por PCR em tempo real utilizando a metodologia SYBR[®] Green no sistema Real Time PCR 7500 (Applied Biosystems) conforme o protocolo do fabricante. A eficiência dos oligonucleotídeo para os genes codificadores da gp91^{phox} ep47^{phox} foi verificada por RT-PCR quantitativa, utilizando-se diluições seriadas cDNA 1:10 para cada par de oligonucleotídeo. Em cada reação foram utilizados 8 μ L de SYBR[®] Green, 0,5 μ L de cada oligonucleotídeo (10 pmol/ μ L), 5 μ L H₂O livre de nuclease e 2 μ L da solução de cDNA diluída (diluições seriadas

1:10). O volume final da reação foi de 16 μ L. A temperatura de anelamento foi de 60°C para todos os oligonucleotídeo. Para confecção dos gráficos com os resultados da quantificação relativa entre os genes alvos e o normalizador β -actina foram calculados os valores da taxa = $2^{-\Delta\Delta CT}$. O Ct (*cycle threshold*) foi definido como o número fracionado de ciclos em que a fluorescência detectada passa pelo limiar fixado dentro da fase exponencial da curva de amplificação (*threshold*). Inicialmente, foram calculadas as médias e o desvio padrão dos valores de Ct obtidos nas triplicatas de cada amostra. O Ct médio de cada amostra foi normalizado através da subtração do Ct médio do controle endógeno correspondente ($\Delta Ct = Ct$ amostra - Ct endógeno). Para cada gene o valor de ΔCt foi normalizado novamente em relação à amostra calibradora ($\Delta\Delta Ct = \Delta Ct$ amostra - ΔCt amostra calibradora). Esse valor é usado na expressão de $2^{-\Delta\Delta CT}$. De acordo com Livak e Schmittgen (2001), o valor obtido reflete a proporção da expressão do gene estudado em cada amostra, em relação à amostra calibradora.

3.15 Efeito dos inibidores de transcrição e tradução na ação do interferon- γ sobre a fagocitose

Para investigar se a ação do IFN- γ sobre a fagocitose e na produção de espécies reativas poderia ser devido a um efeito genômico, nós realizamos experimentos *in vitro* com inibidores de transcrição e tradução, actinomicina D e cicloheximida, respectivamente.

Essas drogas foram adicionadas em uma cultura, na concentração de 0,2 μ g/ml de actinomicina D e de 20 μ g/ml de cicloheximida (Huber-Lang *et al.* 2003), 30 minutos antes da adição do interferon- γ .

3.16 Análise estatística

A comparação entre as médias dos resultados de dois grupos foi feita pelo teste *t de Students* (quando os dados passaram pelo teste de normalidade e igual variância) ou pelo teste não paramétrico de *Mann-Whitney*, com a utilização do programa Sigma Stat. Já para comparar mais de dois grupos foi utilizado a análise de variância ANOVA.

4- Resultados

4. RESULTADOS

4.1 Determinação da concentração e do tempo de incubação do IFN- γ

Muitos trabalhos utilizam o IFN- γ como agente ativador de neutrófilos e macrófagos. Alguns autores relatam um aumento de algumas das funções dos neutrófilos (Leanza, 2007; Perussia, 1987; Varesio, 1984) e outros relatam uma diminuição induzida pelo IFN- γ . Essa divergência de resultado é devido a uma série de diferenças entre os trabalhos quanto ao tempo de exposição da célula ao IFN- γ , ao tipo de célula fagocítica, a concentração ideal para ativar a célula, os receptores envolvidos na fagocitose, já que os diferentes trabalhos utilizam diferentes tipos de estímulos fagocíticos. Desta forma, é difícil chegar a uma conclusão geral sobre qual concentração e tempo suficientes para ativar o neutrófilo de camundongo.

Portanto, nosso objetivo inicial foi a realização de uma curva de tempo e de concentração ideais para ativação do neutrófilo de camundongo.

Na Figura 4.1A é possível observar que 150 U/ml de IFN- γ foi capaz de aumentar a fagocitose de imunocomplexo mediada por neutrófilos. Um efeito dose-resposta começou a ser notado entre um limiar de 10 U/ml (concentração mais baixa testada) e 300 U/ml. Não observamos alteração na capacidade fagocítica dos neutrófilos quando incubamos com a concentração mais alta testada, 500 U/ml, possivelmente porque esses neutrófilos entraram em processo de apoptose. Na Figura 4.1B mostramos uma curva de tempo para incubação com IFN- γ e é possível observar que a resposta fagocítica foi aumentada brevemente com 30 minutos de incubação e atingiu um máximo em 2 horas. Adotamos para todos os experimentos a concentração de 150 U/ml de IFN- γ com 2 horas de incubação.

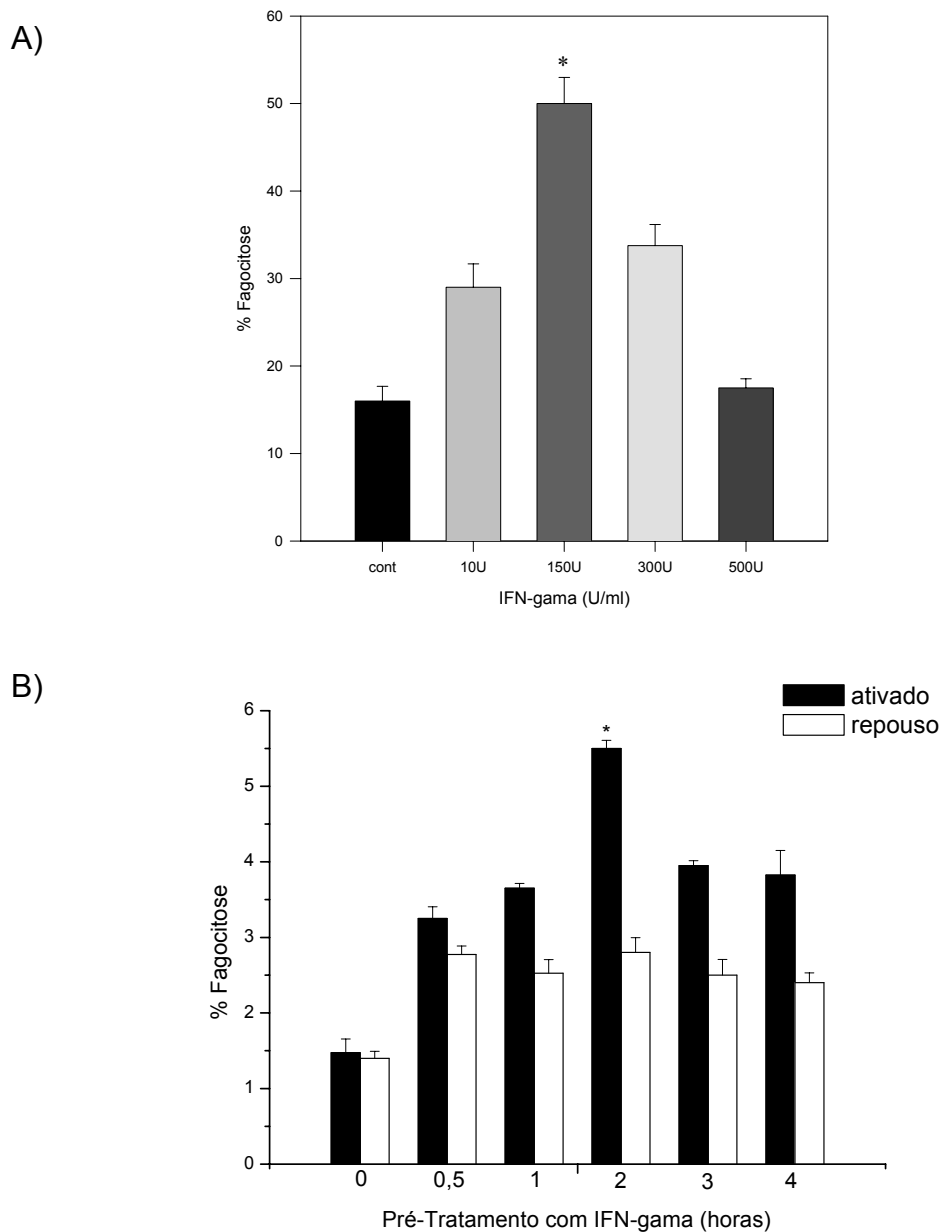


Figura 4.1: Curva de concentração (A) e tempo de incubação (B) com IFN- γ . PMNs foram purificados segundo Boxio, 2004. Os neutrófilos em repouso (barras brancas) e os neutrófilos ativados com IFN- γ (barras pretas) foram incubados com imunocomplexo de IgG ligado ao eritrócito-PKH26 por 45 minutos a 37°C. Os estímulos apenas ligados ao neutrófilos foram eliminados pelo “quenching” da fluorescência pela adição de azul de Tripán. A fluorescência presente nos neutrófilos foi avaliada por citometria de fluxo e os dados foram expressos como % de fagocitose, que reflete o número de neutrófilos que estão fagocitando. Os gráficos representam a média + erro padrão das médias (n= 4 - 5), * p<0,05 (teste One Way ANOVA).

4.2 Avaliação da morte celular

Como observado no experimento anterior, nós não encontramos diferença significativa no processo fagocítico de neutrófilos ativados com concentrações mais altas de IFN- γ (acima de 300U/ml). Partimos primeiramente para avaliação da morte celular, já que a reposta voltava a níveis do controle.

Geralmente a exposição da fosfatidilserina na superfície celular pode ser utilizada como um indicador do processo apoptótico. As células em apoptose inicial externalizam a fosfatidilserina, um lipídeo do lado citosólico na superfície celular e na presença de íons de cálcio, a anexina V-FITC possui alta afinidade para ligação seletiva a fosfatidilserina, revelando fluorescência verde depois de excitada.

Células em apoptose tardia ou necrose perdem a integridade da membrana plasmática e tornam-se permeáveis ao iodeto de propídio que penetra na célula e marca os ácidos nucleicos, emitindo fluorescência vermelha depois de excitada.

A Figura 4.2 mostra que a incubação dos neutrófilos de camundongo com 300 e 500 U/ml de IFN- γ promoveu a exposição da fosfatidilserina na superfície dessas células, porém, as células que permaneceram viáveis nessas concentrações (35 % e 25 %, respectivamente) foram capazes de fagocitar. Evidentemente que a porcentagem de fagocitose realizada por aqueles neutrófilos que conseguiram resistir a esta incubação foi bem diminuída.

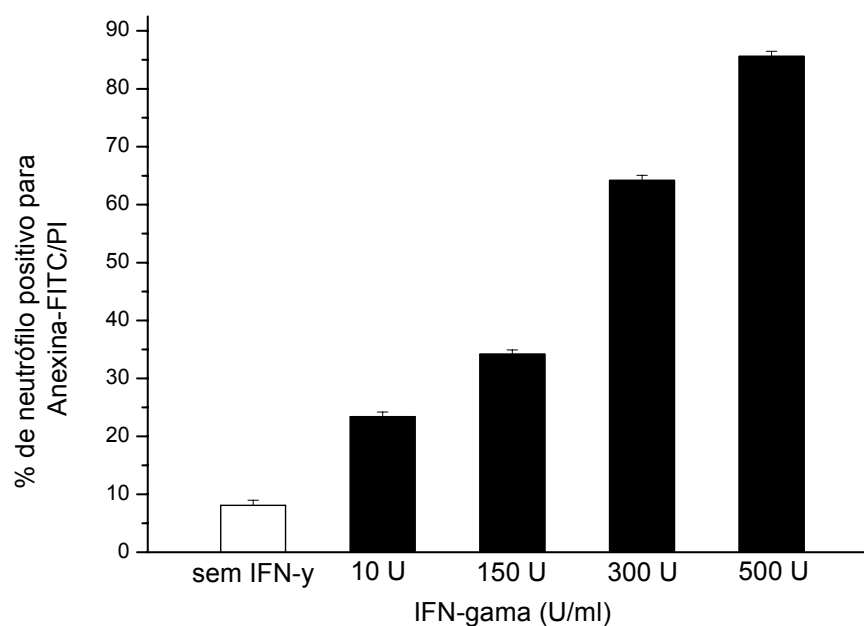


Figura 4.2: Análise da marcação de neutrófilos de camundongos, tratados ou não com IFN- γ , para Anexina-FITC e Iodeto de Propídio. Os neutrófilos foram aderidos em lamínulas e submetidos ao tratamento com IFN- γ nas concentrações acima. Após, as células foram incubadas com anexina V-FITC e iodeto de propídio. Foi realizada a contagem celular das células que apresentaram marcações duplas, verdes para Anexina-FITC e/ou vermelha para iodeto de propídio.

4.3 Efeito do IFN- γ sobre a ingestão de partículas estranhas

Uma das principais funções dos neutrófilos é a fagocitose de partículas estranhas e essa função pode ser potencializada por alguns ativadores. Para investigar o efeito do IFN- γ sobre a fagocitose de neutrófilos de camundongos, realizamos experimentos *in vitro*, incubando neutrófilos (2×10^6 célula/ml) com 150U/ml de IFN- γ por 2 horas a 37°C, antes da realização dos experimentos de fagocitose.

Nosso objetivo inicial foi o de observar o efeito do IFN- γ sobre a fagocitose de vários estímulos fagocíticos diferentes (IC de IgG, IC de IgG opsonizado com complemento, zimosan, zimosan opsonizado com complemento, IC de IgM e IC de IgM opsonizado com complemento) por neutrófilos purificados do sangue de camundongos e comparar com os trabalhos anteriores sobre o efeito do IFN- γ nas células do sistema imune.

Na Figura 4.3 é possível observar que a incubação com IFN- γ foi capaz de aumentar a fagocitose mediada por neutrófilos em quase todos os estímulos utilizados. Isso é mostrado pelo aumento na média de intensidade de fluorescência que reflete a quantidade de partículas ingeridas por neutrófilo, e a porcentagem de fagocitose, que reflete a quantidade de neutrófilos fagocíticos na população, aumentou também. Na fagocitose do imunocomplexo de IgM não observamos diferenças entre neutrófilos ativados ou não, porém, quando opsonizamos este imunocomplexo com soro que continha componentes do complemento, a porcentagem de fagocitose e a intensidade de fluorescência foram aumentadas somente no grupo incubado com IFN- γ .

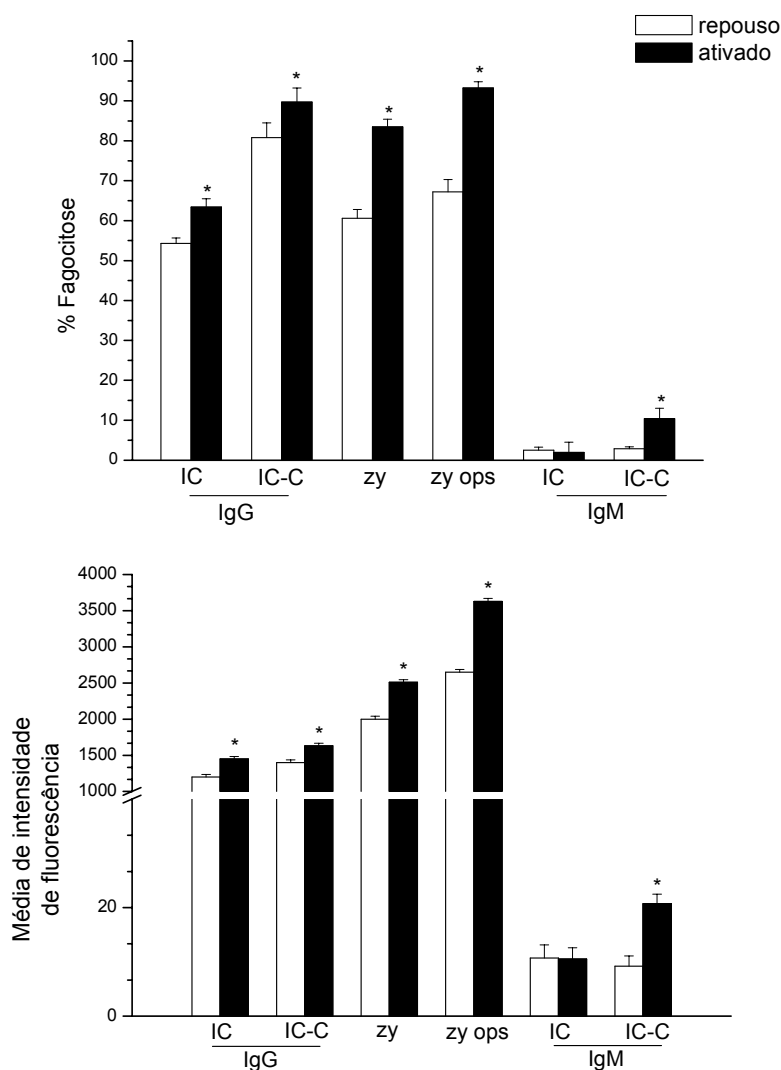


Figura 4.3: Efeito do IFN- γ sobre a fagocitose de neutrófilo. PMNs foram purificados segundo Boxio, 2004 e depois foram incubados com 150U/ml de IFN- γ por 2 horas antes da realização dos testes de fagocitose. A seguir, os neutrófilos ativados ou não foram incubados com os estímulos imunocomplexo de IgG e IgM ligado ao eritrócito-PKH26 (IC), imunocomplexo de IgG e IgM ligado ao eritrócito-PKH26 e opsonizado com complemento (IC-C), zimosan-FITC (zy) ou zimosan-FITC opsonizado com complemento (zy ops) por 45 minutos a 37°C. As partículas apenas ligadas aos neutrófilos foram eliminadas por lise das hemácias e *quenching* da fluorescência pela adição de azul de Tripán. A fluorescência presente nos neutrófilos foi avaliada por citometria de fluxo e os dados foram plotados com % de fagocitose, que reflete o número de neutrófilos que estão fagocitando e como média da intensidade de fluorescência, que reflete a quantidade de estímulo ingerido por neutrófilo. Os gráficos representam a média + erro padrão da média (n= 4-5), * p<0,05 (teste One Way ANOVA).

4.4 Efeito do IFN- γ na liberação de ânion superóxido

Além da fagocitose, o reconhecimento de uma partícula estranha pelo neutrófilo também é capaz de estimular a fosforilação e a reunião de componentes citosólicos e de membrana que resultam na formação do complexo NADPH oxidase. Este complexo ativo inicia o surto respiratório que é caracterizado pela produção de espécies reativas de oxigênio. A geração destas espécies atua na oxidação de componentes da partícula fagocitada, alterando sua função. (Rosen GM, 1995).

Desta forma, nós avaliamos o efeito do IFN- γ na produção de anion superóxido por neutrófilos em repouso ou ativados, estimulados com IC de IgG, IC de IgG opsonizado com complemento, zimosan, zimosan opsonizado com complemento, IC de Fab'2 de IgG anti Ova ou IC de Fab'2 de IgG anti Ova opsonizado com complemento.

A produção de superóxido foi observada depois de 60 minutos de incubação com os diferentes estímulos pelo método do Citocromo C. Podemos observar na Figura 4.4 que as populações de neutrófilos ativados com IFN- γ foram capazes de aumentar a produção de superóxido depois de estimulados pelos diferentes estímulos. A liberação de superóxido por neutrófilos em contato com o meio RPMI corresponde à liberação basal desta espécie, ou seja, liberação na ausência de estímulo.

Não observamos diferença somente na produção de superóxido quando o neutrófilo foi estimulado com imunocomplexo Fab'2 de IgG antiOva mas quando opsonizamos este imunocomplexo a produção de superóxido aumentou significativamente. Essa produção de superóxido deu-se somente pelo receptor de complemento já que a porção Fc da imunoglobulina não estava presente.

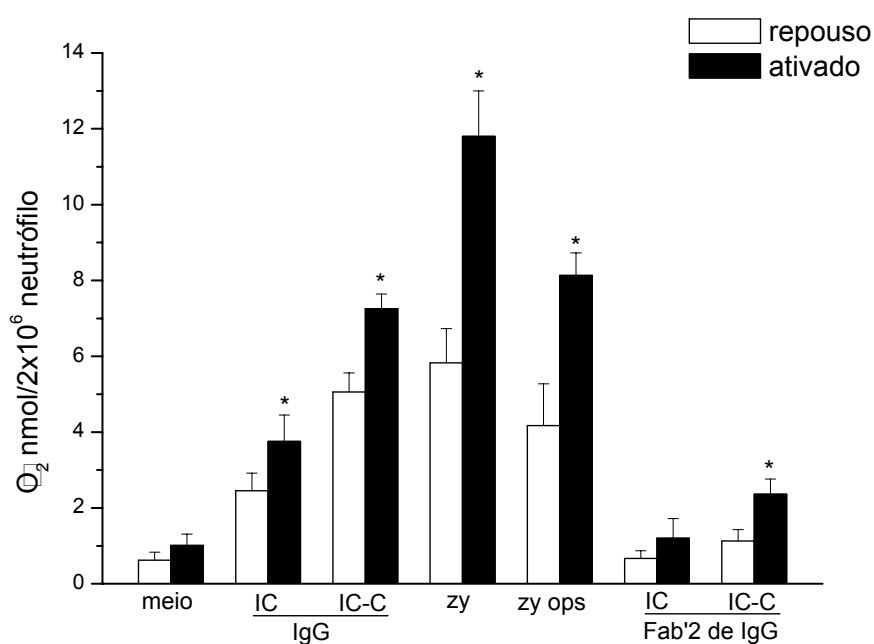


Figura 4.4: Efeito do IFN- γ sobre a liberação de superóxido por neutrófilos. Os PMN foram incubados com 150U/ml de IFN- γ por 2 horas antes da realização do ensaio. Depois, os neutrófilos ativados ou não foram incubados com os estímulos imunocomplexo de IgG ligado a Ova (IC), imunocomplexo de IgG ligado a Ova opsonizado com complemento (IC-C), zimosan (zy), zimosan opsonizado com complemento (zy ops), imunocomplexo de Fab'2 de IgG ligado a Ova (IC) ou imunocomplexo de Fab'2 ligado a Ova opsonizado com complemento por 60 minutos a 37°C. Os dados foram plotados como nmol de superóxido produzido por 2×10^6 neutrófilos. Os gráficos representam a média + erro padrão da média. * $p < 0,05$. (teste One Way ANOVA).

4.5 Efeito do IFN- γ na liberação de peróxido de hidrogênio

Nas células imunes, após a formação do anion superóxido, a próxima espécie reativa de oxigênio a ser formada é o peróxido de hidrogênio. Este intermediário reativo é formado a partir da redução do anion superóxido através do processo de dismutação. Dessa forma, avaliamos se o aumento na liberação de superóxido causada pela incubação com o IFN- γ produziria alguma alteração na liberação de peróxido de hidrogênio.

Após a purificação dos neutrófilos, estes foram incubados com 150U/ml de IFN- γ por 2 horas e após isso foram estimulados pelos diferentes estímulos: IC de IgG ligado a Ova, IC de IgG ligado a Ova e opsonizado com complemento, zimosan, zimosan opsonizado com complemento, IC de Fab'2 de IgG anti Ova ou IC de Fab'2 de IgG anti Ova opsonizado com complemento.

Assim como o observado para a liberação de superóxido, o contato do neutrófilo com o IFN- γ gerou um aumento significativo na liberação de peróxido de hidrogênio em quase todos os estímulos usados (Figura 4.5). Em contato com o imunocomplexo Fab'2 de IgG antiOva não ocorreu a produção de peróxido de hidrogênio mas quando este imunocomplexo foi opsonizado com soro a produção do peróxido apresentou um aumento significativo. Fica evidente que o receptor de complemento, somente em neutrófilos ativados com IFN- γ , foi capaz de produzir espécies reativas em menor escala que imunocomplexos que usam uma associação de receptores, como Fc e CR juntos.

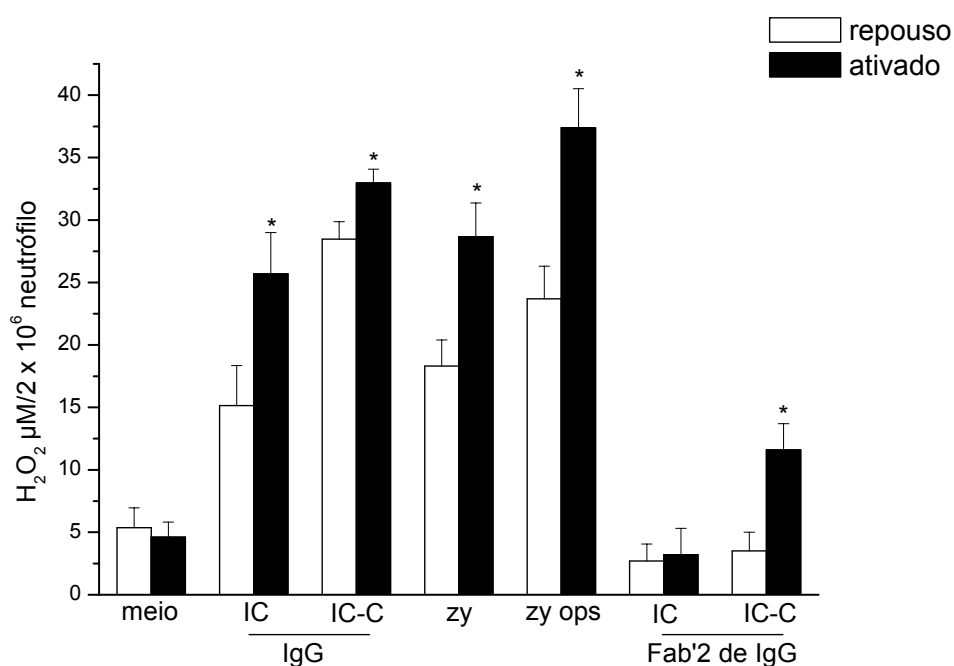


Figura 4.5: Efeito do IFN- γ sobre a liberação de peróxido de hidrogênio por neutrófilos. Os PMN foram incubados com 150 U/ml de IFN- γ por 2 horas antes da realização do ensaio. Após, os neutrófilos ativados ou não foram incubados com os estímulos imunocomplexo de IgG ligado a Ova (IC), imunocomplexo de IgG ligado a Ova opsonizado com complemento (IC-C), zimosan (zy), zimosan opsonizado com complemento (zy ops), imunocomplexo de Fab'2 de IgG ligado a Ova (IC) ou imunocomplexo de Fab'2 ligado a Ova opsonizado com complemento (IC-C) por 60 minutos a 37°C. Os dados foram plotados como μmol de peróxido de hidrogênio produzido. Os gráficos representam a média + erro padrão da média. * $p < 0,05$. (teste One Way ANOVA).

4.6 Efeito do IFN- γ na liberação de ácido hipocloroso

O ácido hipocloroso (HOCl) é um potente oxidante formado a partir da oxidação de íons cloreto catalisada pela enzima mieloperoxidase na presença de peróxido de hidrogênio. Portanto, a produção de HOCl pode ser considerada um reflexo da atividade do sistema enzimático mieloperoxidase/H₂O₂. A presença deste oxidante e de produtos secundários da degranulação dos grânulos primários estão envolvidos em processos de ativação celular principalmente por IFN- γ . (Jarstrandt, 1983).

Para prosseguir o estudo e avaliar o efeito do IFN- γ sobre a liberação de ácido hipocloroso, os neutrófilos foram incubados com 150 U/ml de IFN- γ por 2 horas e depois estimulados pelos diferentes estímulos fagocíticos: IC de IgG, IC de IgG opsonizado com complemento, zimosan, zimosan opsonizado com complemento, IC de Fab'2 de IgG anti Ova ou IC de Fab'2 de IgG anti Ova opsonizado com complemento. Foi também de nosso interesse avaliar se o IFN- γ ativaria o neutrófilo na ausência de estímulo, ou seja, a liberação basal.

Podemos observar na Figura 4.6 que as populações de neutrófilos ativados com IFN- γ foram capazes de aumentar a produção de HOCl depois de estimulados pelos diferentes estímulos.

Não observamos diferença somente na produção de HOCl quando o neutrófilo foi estimulado com imunocomplexo Fab'2 de IgG antiOva mas quando opsonizamos este imunocomplexo a produção desta espécie aumentou significativamente. Essa produção de ácido hipocloroso deu-se somente pelo receptor de complemento já que a porção Fc da imunoglobulina não estava presente. A liberação de HOCl por neutrófilos em contato com o meio RPMI corresponde à liberação basal desta espécie, ou seja, liberação na ausência de estímulo e esta não apresentou diferença.

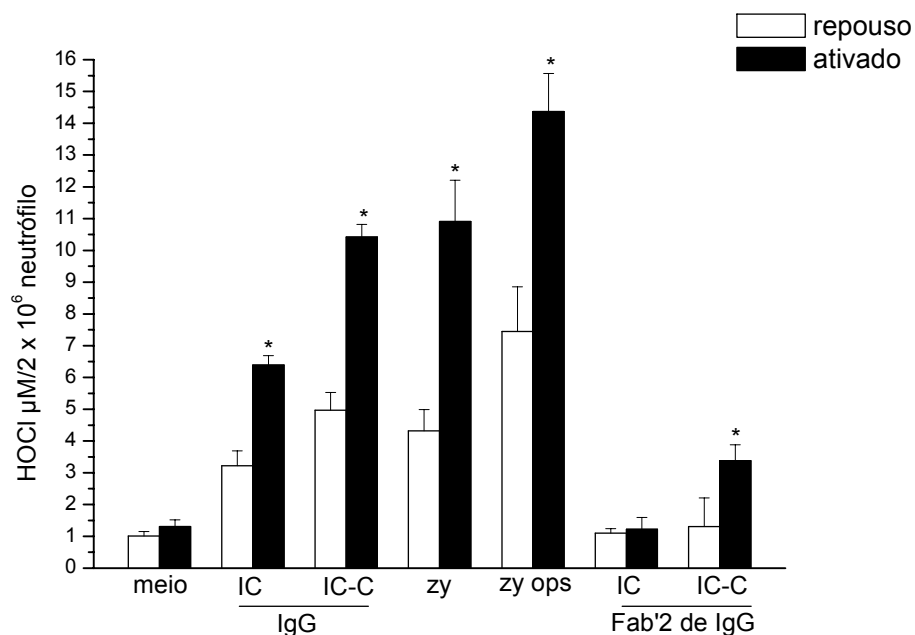


Figura 4.6: Efeito do IFN- γ sobre a liberação de ácido hipocloroso por neutrófilos. Os PMN foram incubados com 150 U/ml de IFN- γ por 2 horas antes da realização do ensaio. Após, os neutrófilos ativados ou não foram incubados com os estímulos imunocomplexo de IgG ligado a Ova (IC), imunocomplexo de IgG ligado a Ova opsonizado com complemento (IC-C), zimosan (zy), zimosan opsonizado com complemento (zy ops), imunocomplexo de Fab'2 de IgG ligado a Ova (IC) ou imunocomplexo de Fab'2 ligado a Ova opsonizado com complemento (IC-C) por 60 minutos a 37°C. Os dados foram plotados como $\mu\text{M}/2 \times 10^6$ neutrófilo de ácido hipocloroso produzido. Os gráficos representam a média + erro padrão da média. * $p < 0,05$. (teste One Way ANOVA).

4.7 Efeito do IFN- γ na liberação de óxido nítrico

A produção de óxido nítrico foi determinada pelo acúmulo de nitrito (NO_2^-), produto final estável da reação de NO com O_2 em solução aquosa. O acúmulo de nitrito no sobrenadante de cultura foi medido pela reação de Griess, conforme descrito por Green *et al.* (1982). Considerando-se que o NO juntamente com o superóxido é um importante intermediário para a produção de peroxinitrito e visto que a incubação com IFN- γ causou modificações na liberação de superóxido pelos neutrófilos, investigamos se a liberação de óxido nítrico também seria afetada pelo IFN- γ .

Para prosseguir nosso experimento, incubamos o neutrófilo com 150 U/ml por 2 horas e depois foram estimulados pelos diferentes estímulos fagocíticos: IC de IgG, IC de IgG opsonizado com complemento, zimosan, zimosan opsonizado com complemento, IC de Fab'2 de IgG anti Ova ou IC de Fab'2 de IgG anti Ova opsonizado com complemento.

Utilizamos o neutrófilo incubado apenas com o meio para avaliar a produção basal de óxido nítrico e o Fab'2 de IgG ligado a Ova opsonizado com soro para avaliar se a produção de óxido nítrico poderia ocorrer apenas pelo receptor CR em neutrófilos ativado com IFN- γ .

O contato dos neutrófilos com IFN- γ promoveu um aumento significativo na liberação de óxido nítrico em contato com quase todos os estímulos. Somente em contato com o imunocomplexo Fab'2 de IgG ligada a Ova não ocorreu tal produção em nenhuma das populações de neutrófilos. Podemos pensar que a produção de espécies reativas de nitrogênio, assim como a de oxigênio visto anteriormente em neutrófilos, se dá pela estimulação do receptor Fc, o qual não estava presente neste imunocomplexo. Mas quando ativamos o neutrófilo com IFN- γ e estimulamos com o imunocomplexo Fab'2 de IgG antiOva opsonizado com complemento, a produção do óxido nítrico apresentou um leve aumento significativo e isso deu-se somente pelo receptor de complemento.

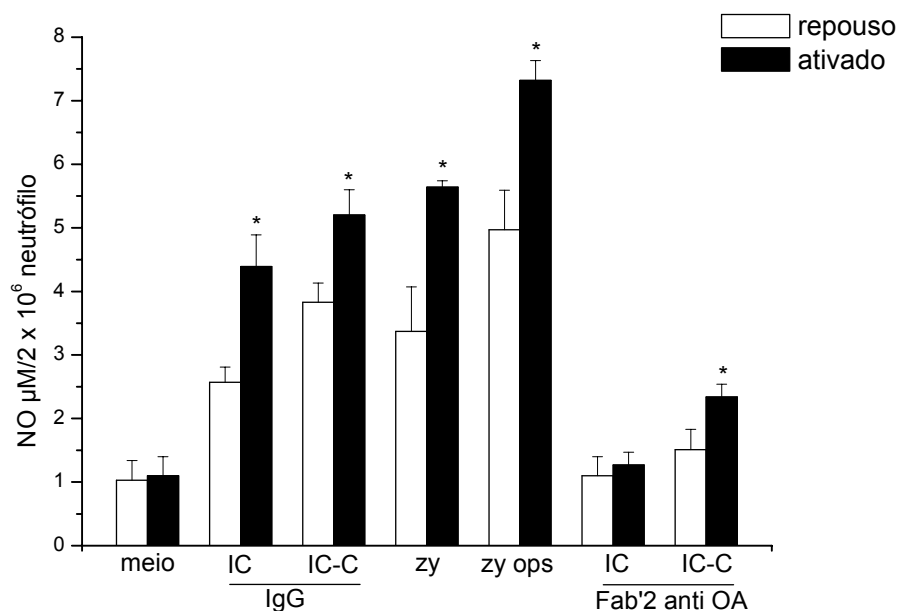


Figura 4.7: Efeito do IFN- γ sobre a liberação de óxido nítrico por neutrófilos. Os PMN foram incubados com 150U/ml de IFN- γ por 2 horas antes da realização do ensaio. Após, os neutrófilos ativados ou não foram incubados com os estímulos imunocomplexo de IgG ligado a Ova (IC), imunocomplexo de IgG ligado a Ova opsonizado com complemento (IC-C), zimosan (zy), zimosan opsonizado com complemento (zy ops), imunocomplexo de Fab'2 de IgG ligado a Ova (IC) ou imunocomplexo de Fab'2 ligado a Ova opsonizado com complemento (IC-C) por 60 minutos a 37°C. Os dados foram plotados como μM de óxido nítrico produzido por 2×10^6 neutrófilo. Os gráficos representam a média + erro padrão das médias. * $p < 0,05$. (teste One Way ANOVA).

4.8 Efeito do IFN- γ no processo de desgranulação enzimática de neutrófilos

Vários estudos demonstraram que a liberação extracelular do conteúdo enzimático dos grânulos citoplasmáticos, junto à liberação de espécies reativas de oxigênio são elementos importantes na defesa do organismo contra patógenos invasores.

A fagocitose e a produção de espécies reativas foram aumentadas com a incubação do neutrófilo com IFN- γ , um objetivo deste estudo foi avaliar se a ativação com IFN- γ alteraria também a liberação extracelular do conteúdo enzimático dos grânulos citoplasmáticos em neutrófilos ativados ou não.

Para isso, caracterizamos a liberação extracelular das enzimas: fosfatase alcalina (componente dos grânulos secundários ou específico), β -glucuronidase (componente do grânulos primários ou azurofílicos) e lactato desidrogenase (LDH) (controle de lise celular) em resposta a ativação de neutrófilos com IFN- γ .

A dosagem da enzima citoplasmática lactato desidrogenase foi realizada em poucos experimentos, para comprovar que os estímulos fagocíticos e a incubação com o IFN- γ não provocariam lise nas células e a liberação das enzimas granulares ocorre sem esta (Figura 4.8).

De acordo com os resultados na Figura 4.8 pode-se observar que o IFN- γ e os diferentes estímulos fagocíticos não ocasionaram lise nas duas populações de neutrófilos, pois a enzima LDH foi detectada em baixas concentrações no sobrenadantes das culturas e sua liberação para o meio extracelular foi similar em todas as populações testadas, indicando assim a integridade celular. A fosfatase alcalina e β -glucuronidase foram liberadas em alta concentração nos sobrenadantes de cultura de neutrófilos ativados com IFN- γ e submetidos a com os diferentes estímulos (Figura 4.8.1).

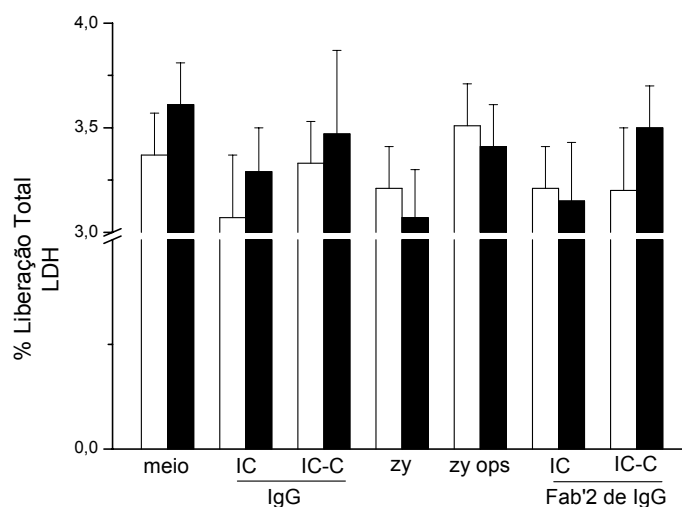


Figura 4.8: Porcentagem de liberação total da enzima LDH. Os Neutrófilos foram incubados com IFN- γ por 2 horas e depois estimulados com os diferentes imunocomplexos. Os sobrenadantes das culturas foram colhidos e analisados para liberação de lactato desidrogenase. O resultado foi expresso por porcentagem de liberação total de LDH. Os dados representam a média + erro padrão das médias. (n= 3 por grupo em duplicata – ANOVA).

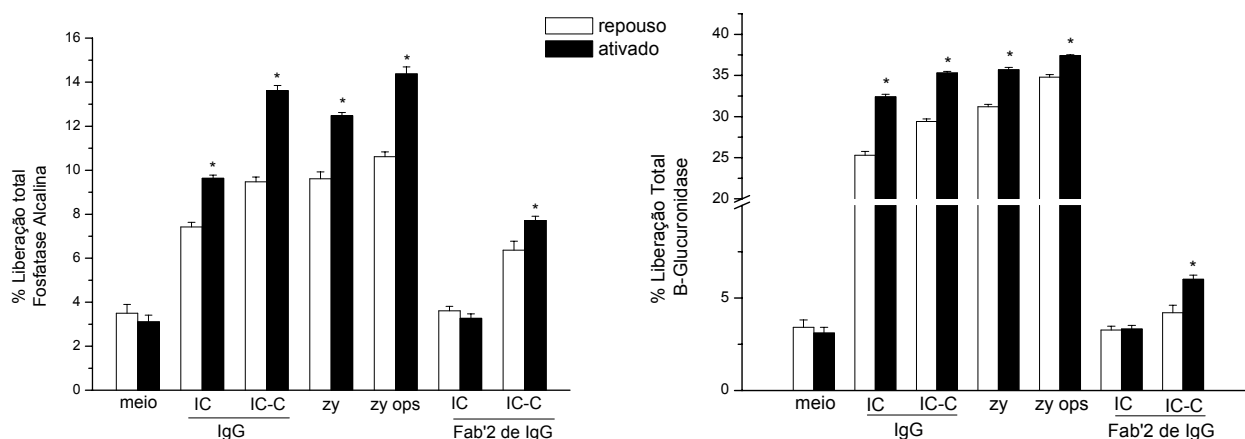


Figura 4.8.1: Porcentagem de liberação total das enzimas Fosfatase Alcalina e β -glucuronidase para o meio extracelular. Os neutrófilos foram incubados com IFN- γ por 2 horas e depois estimulados com os diferentes imunocomplexos. Os sobrenadantes das culturas foram colhidos e analisados para liberação das enzimas. Os dados representam a média + erro padrão das médias. (n= 4-5 por grupo em duplicata – ANOVA).

4.9 Efeito do IFN- γ sobre a expressão dos receptores fagocíticos CD32/CD16 (FC γ RII/III), CD11b (CR3) e Dectina-1

Sabe-se que para o imunocomplexo desencadear uma resposta imune em neutrófilos é necessário que este seja reconhecido por receptores presentes na membrana destas células. Tal interação resulta na estimulação de respostas biológicas específicas, diretamente relacionadas com a eliminação do antígeno, tais como: fagocitose, geração de espécies reativas de oxigênio, liberação de enzimas lisossomais (Taylor, 2005).

A fim de desvendar o mecanismo pelo qual a fagocitose possa ter sido aumentada pela incubação com IFN- γ , nós avaliamos o efeito do IFN- γ sobre a expressão dos receptores fagocíticos importantes no reconhecimento dos estímulos utilizados.

Receptor dectina-1 é importante no reconhecimento de β -glucanos presentes no zimosan; os receptores Fc γ RII/III (CD32/CD16) são fundamentais na ligação a porção Fc γ da IgG nos imunocomplexos, e CD11b é a subunidade α do receptor de complemento CR3, importante na internalização de partículas opsonizadas com C3bi.

Ao analisar a figura 4.9 C, observamos que o IFN- γ provocou um aumento significativo na expressão de dectina-1, Fc γ RII/III e CD11b. Isto sugere que o aumento da fagocitose e da produção de espécies reativas observada em neutrófilos ativados com IFN- γ por 2 horas pode ser consequência do aumento da expressão dos receptores nesta célula ativada.

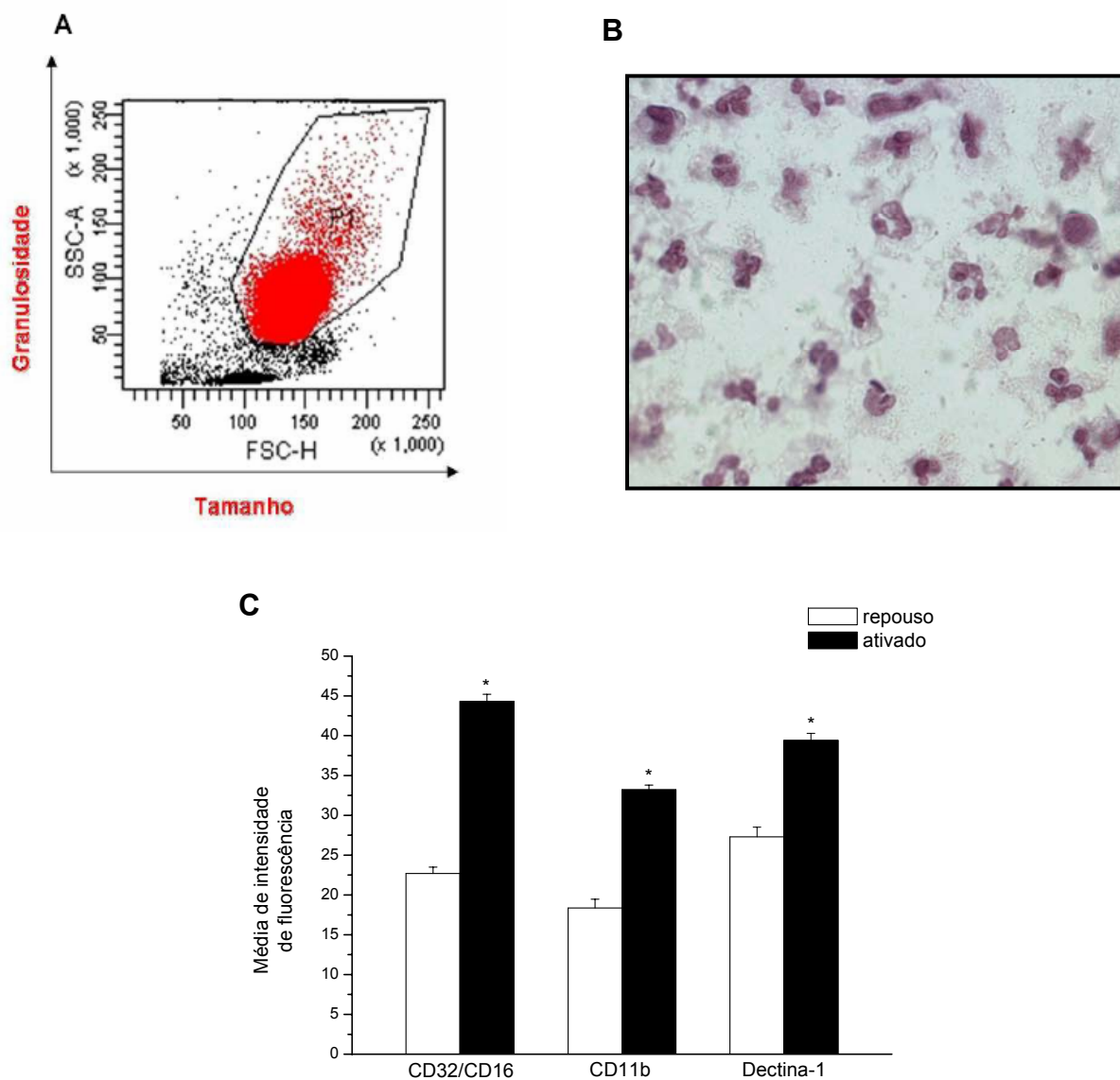


Figura 4.9: Efeito do IFN- γ na expressão de receptores fagocíticos de neutrófilos de camundongos. A) gráfico representativo SSC-A (Side-SCattered light difusão lateral da luz) vs FSC-H (Forward-SCattered light difusão frontal da luz) da *gate* escolhida para selecionar a população de granulócitos. B) Foto ilustrativa da suspensão de neutrófilos purificados pelo Percoll observados em microscopia óptica, aumento 100 x. C) Os neutrófilos ativados ou não foram incubados com o anticorpo primário anti-dectian-1 seguido da incubação com o anticorpo secundário conjugado ou com os anticorpos conjugados CD32/CD16-FITC para marcação dos Fc γ RII/III e CD11b-PE para marcação do receptor de complemento CR3. Os resultados foram expressos como mediana da intensidade de fluorescência (MIF) e analisados com auxílio do software BD FACSDiva (BD Biosciences). O gráfico representa a média + erro padrão das médias (n= 4 - 6 por grupo em duplicata). *p<0,05 - ANOVA.

4.10 Efeito do IFN- γ na liberação de citocinas por neutrófilos

Como citado anteriormente, neutrófilos são células do sistema imune muito importantes na defesa do organismo contra agentes invasores. E neste processo de defesa eles lançam mão de um arsenal complexo de eventos que culmina na eliminação da partícula invasora. Então, a liberação de citocinas no sobrenadante de cultura dos neutrófilos ativado com IFN- γ e estimulado com os diferentes estímulos fagocíticos foi avaliada.

Os neutrófilos estimulados com IFN- γ liberaram citocinas pró-inflamatórias, IL-6 e TNF- α que atuam na ativação autócrina e parácrina dos neutrófilos na resposta inflamatória local que ajuda a conter infecções e na indução de respostas pelos linfócitos T. A estimulação das duas populações de neutrófilos com Fab'2 anti Ova e Fab'2 anti Ova opsonizado, ao contrário, não produziu citocinas em valores significativos. Possivelmente só o receptor de complemento não foi suficiente para desencadear uma produção de citocinas nesta célula.

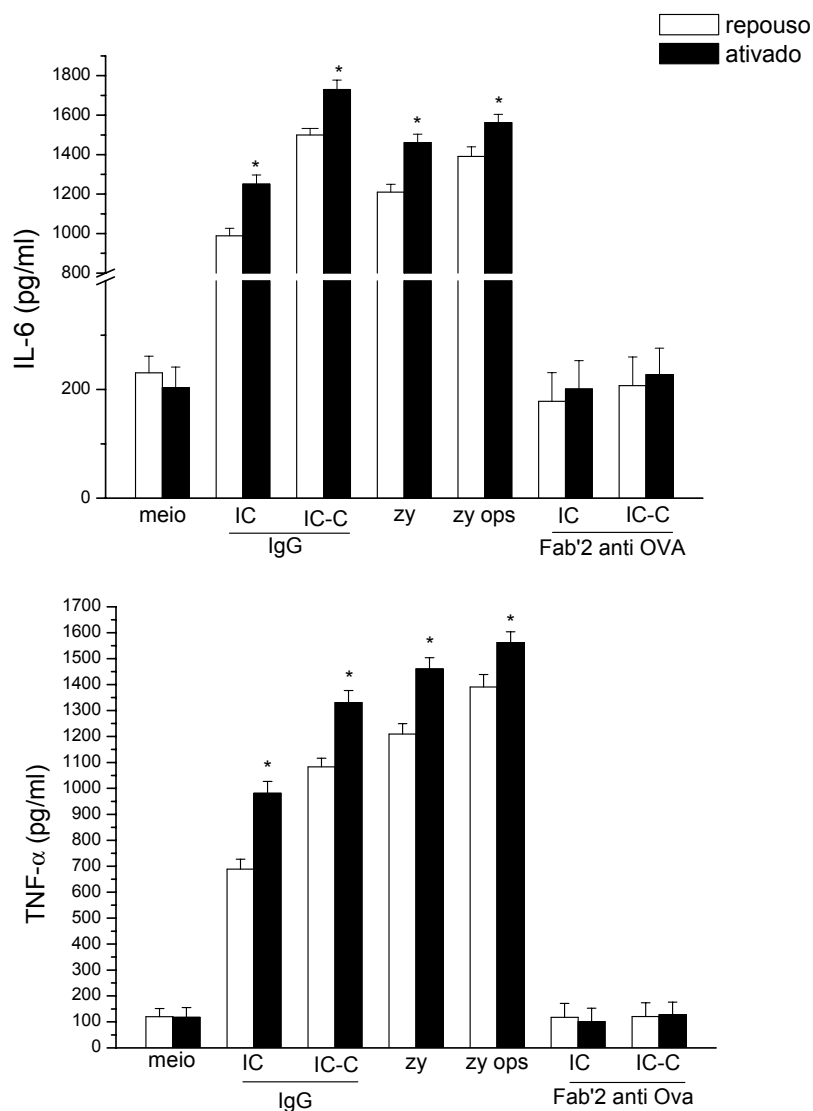


Figura 4.10: Efeito do IFN- γ sobre a liberação de IL-6 e TNF- α por neutrófilos ativado.

Os neutrófilos foram purificados segundo Boxio, 2004. Neutrófilos foram ativado ou não por 2 horas com 150 U/ml de IFN- γ antes do ensaio. Após, os neutrófilos foram incubado com estímulo imunocomplexo de IgG ligado a OVA (IC), imunocomplexo de IgG ligado a OVA opsonizado com complemento (IC-C), zimossan (zy), zimossan opsonizado com complemento (zy ops), imunocomplexo de Fab'2 de IgG ligado a OVA (IC) ou imunocomplexo de Fab'2 ligado a OVA opsonizado com complemento por 24 horas a 37°C. Após a cultura, o sobrenadante foi colhido e a presença de IL-6 e TNF- α foi testado por ELISA. Os gráficos representam a média + erro padrão das médias (n=6 - 8 por grupo em duplicata). * p<0,05 - ANOVA.

4.11 Efeito dos inibidores de transcrição e tradução na ação do IFN- γ sobre a produção de superóxido

Para tentar esclarecer se os efeitos de ativação do IFN- γ sobre as funções do neutrófilo poderiam ser devido a uma ação genômica ou não, testou-se se havia necessidade de síntese de novas proteínas para que o efeito ativador ocorresse.

O pré-tratamento *in vitro* dos neutrófilos com inibidores de transcrição e tradução, actinomicina D e cicloheximida, respectivamente, bloqueou o efeito do IFN- γ sobre a produção de superóxido. Estas drogas, isoladamente, não produziram efeitos sobre a produção de superóxido (Figura 4.11).

A actinomicina D (derivada de *Streptomyces*) inibe a transcrição por ligar-se fortemente e especificamente ao DNA dúplice e, assim, impedir que ele seja molde para a transcrição. Essa ligação pode ser bastante reforçada pela presença de guaninas. A cicloheximida também derivada de *Streptomyces* inibe a síntese de proteínas, embora seu efeito seja bem conhecido, o seu preciso mecanismo de ação ainda não é completamente entendido.

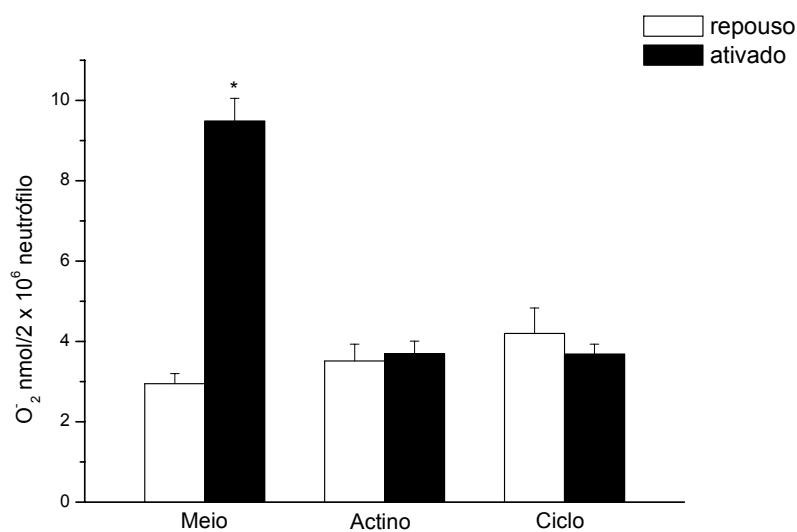


Figura 4.11: Efeito da actinomicina D e da Cicloheximida sobre a liberação de superóxido por neutrófilos ativados com IFN- γ . Antes da ativação com IFN- γ , os neutrófilos foram pré incubados 30 minutos em meio RPMI (repouso e ativado), Actinomicina D (Actino, 0,2 g/ml) e Cicloheximida (Ciclo, 20 g/ml). Após esse tempo, foi adicionado 150 U/ml de IFN- γ aos tubos e incubados por um período adicional de 2 h. Os neutrófilos foram estimulados com imunocomplexo de OVA e a produção de superóxido foi avaliada pelo método de citocromo. O gráfico representa a média + erro padrão das médias (n = 6-8 em duplicata) *p < 0.05, ANOVA.

4.12 Efeito do IFN- γ na expressão de RNAm de subunidades da NADPH oxidase

A NADPH oxidase é um complexo enzimático responsável pela produção de ânion superóxido. Este complexo é formado pelas proteínas gp91^{phox} e p22^{phox} (heterodímero do citocromo *b558*), ancoradas na membrana plasmática, e por três proteínas citoplasmáticas - p47^{phox}, p67^{phox} e 21^{rac}. Para que este complexo seja funcional, é necessária a translocação dos componentes citoplasmáticos para membrana. Segundo Johnson e cols. (1998), a montagem deste complexo é regulada pela fosforilação do componente p47^{phox}.

Tendo em vista que a incubação com IFN- γ promoveu um aumento na liberação de ânion superóxido, peróxido de hidrogênio, ácido hipocloroso e óxido nítrico, avaliamos se a incubação com IFN- γ foi capaz de alterar a expressão dos componentes da NADPH oxidase em neutrófilos ativados.

Para isso, examinamos a expressão de mRNA de duas subunidades da NADPH oxidase - gp91^{phox}, p47^{phox}. Ambas as subunidades foram demonstradas serem essenciais para a atividade do complexo NADPH (Johnson *et al.*, 1998; Sheppard *et al.*, 2005, Raad *et al.*, 2009).

Pela Figura 4.12, observamos que na população de neutrófilos ativados com IFN- γ ocorreu um aumento na expressão das subunidades gp91^{phox} e p47^{phox}. Isto sugere que o aumento na liberação das espécies reativas observado em neutrófilos ativados com IFN- γ pode ser uma consequência do aumento na expressão de RNAm das subunidades gp91^{phox} e p47^{phox} que pode resultar numa maior expressão protéica destes componentes, que por consequência causa um aumento na montagem do complexo enzimático NADPH oxidase funcional.

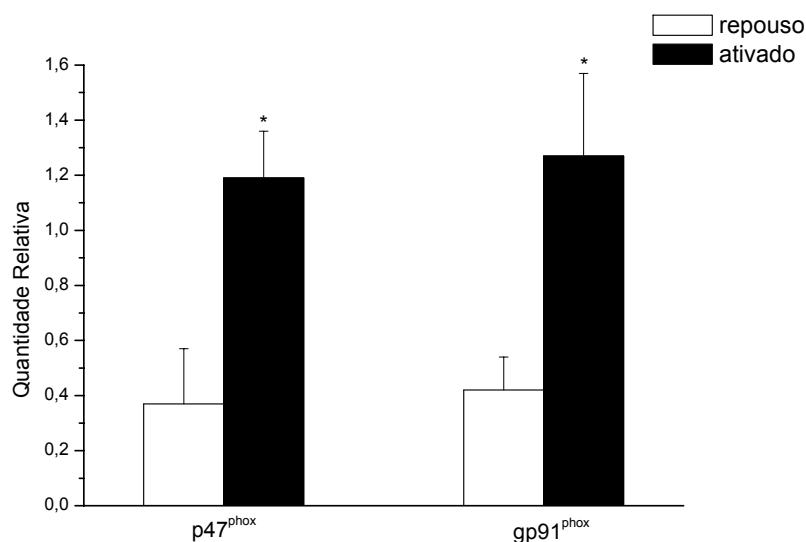


Figura 4.12: Efeito do IFN- γ sobre a expressão das subunidades do complexo enzimático NADPH oxidase. Os neutrófilos em repouso e ativados com IFN- γ tiveram seus RNAs extraídos por Trizol, e o mRNA codificador das subunidades do complexo NADPH oxidase foram amplificados por PCR em tempo real. As quantidades de mRNA da gp91^{phox} e p47^{phox} foram normalizadas pelas quantidades de mRNA do controle endógeno β actina, o qual é expresso constitutivamente pelas células. O gráfico representa a média + erro padrão das médias (n= 6-12 em triplicata) *p<0,05 (ANOVA).

5- Discussão

5. DISCUSSÃO

Diversos estudos demonstram que o IFN- γ tem um potencial de ativação sobre algumas das funções de neutrófilos. Alguns autores relatam um aumento de algumas funções (Leanza, 2007; Perussia, 1987; Varesio, 1984) e outros relatam uma diminuição induzida pelo IFN- γ . Essa divergência de resultado é devido a uma série de diferenças entre os trabalhos quanto ao tempo de exposição da célula ao IFN- γ , ao tipo de célula fagocítica, à concentração ideal para ativar a célula, aos receptores envolvidos na fagocitose, já que os diferentes trabalhos utilizam diferentes tipos de estímulos fagocíticos. Desta forma, é difícil chegar a uma conclusão geral sobre qual concentração e tempo suficientes para ativar o neutrófilo de camundongo.

Interferon- γ é uma glicoproteína produzida por vários tipos celulares, incluindo células natural killer e macrófagos, e tem sido demonstrado em vários estudos exercer grande influência sobre as atividades funcionais de várias células efetoras imunes, incluindo macrófagos e neutrófilos (revisto em Ellis TN 2004). Só recentemente, no entanto, o efeito do IFN- γ sobre as funções de PMN começou a ser apreciado. Com a disponibilidade do recombinante de IFN- γ (rIFN- γ), nos últimos anos, os estudos evoluíram há um quadro mais claro dos efeitos do IFN- γ sobre as funções de PMN. Tem sido investigado o seu papel pró-inflamatório, o que parece ser mediado através da interação com duas células fagocíticas, os macrófagos e PMN. (Vilcek, 1985; Murray, 1988).

Esses estudos têm demonstrado que o IFN- γ estimula a transdução de sinal em neutrófilos, regula a expressão de genes e expressão de citocinas e quimiocinas, a secreção de H₂O₂, em resposta a diversos estímulos (Kowanko, 1987, Newburger, 1988), altera a indução de receptores Fc de alta afinidade, a atividade de células fagocíticas em contato com vários estímulos secundários. Pode aumentar a aderência, melhorar a atividade fagocítica e microbicida, e aumentar a citotoxicidade celular dependente de anticorpo (Perussia, 1987; Shalaby, 1985; Bazzoni, 2009).

Nosso objetivo neste estudo foi avaliar o efeito do IFN- γ sobre as principais funções de PMNs de camundongos e para avaliar quais as funções do neutrófilo que estariam ou não aumentadas em contato com IFN- γ , primeiramente procuramos saber qual a concentração ideal de IFN- γ e quanto tempo de incubação seriam necessários para ativar o neutrófilo purificado do sangue de camundongo.

Testamos diversas concentrações de IFN- γ : 10U, 150U, 300U, 500U e vários tempos de incubação, como por exemplo: 30 minuto, 1h, 2h, 3h e 4h. A curva dose-resposta de IFN- γ mostrou uma forma de U invertido, com uma resposta inicial em 10U/ml e a máxima em 150U/ml. Observamos que com altas concentrações de IFN- γ , o efeito diminui progressivamente e a porcentagem de fagocitose em 500U/ml voltou ao nível do controle. Padronizamos para todos os experimentos seguintes o tempo de 2 horas e a concentração de 150U de IFN- γ (Figura 4.1 A/B). Com a determinação desses dois parâmetros demonstramos que o IFN- γ foi capaz de aumentar as funções dos PMNs de camundongos estudadas neste trabalho. Estas concentrações escolhidas, descritas acima, são fisiologicamente relevantes, porque elas são semelhantes às medidas no soro e no líquido sinovial de pacientes com artrite reumatóide (Cesario *et al*, 1983; Vervliet & Shandene, 1985). A ativação foi ótima depois de 2 horas de incubação, porém, este tempo é consideravelmente maior do que o tradicional para alguns mediadores inflamatórios como LPS, C5a e TNF. (Guthrie *et al*, 1984; Tennenberg, 1990).

Além disso, curiosamente observamos que as concentrações acima daquela escolhida (300 e 500 U/ml de IFN- γ) ocasionava a exposição da fosfatidilserina na superfície celular e isso pode ser um indicador de processo apoptótico (Figura 4.2).

Poucos autores descrevem esse fenômeno, mas Albieri e colaboradores (2005) demonstraram que trofoblastos de camundongos submetidos a concentrações elevadas de IFN- γ apresentavam apoptose seguida de necrose.

O IFN- γ tem profundo efeito nas funções imunes e a influência deste sobre os neutrófilos é de fundamental importância, já que eles são responsáveis pela fagocitose cuja função principal consiste em eliminar partículas estranhas principalmente através da sua

captura, seguida da sua destruição no interior dos fagócitos. (Underhill & Ozinsky, 2002, Berry *et al.* 2008).

Sobre a fagocitose, tem-se alguns relatos a respeito do efeito do IFN- γ . Pearl-Yafe (2007) demonstrou que a fagocitose de partículas de látex por neutrófilos ativados com LPS ou LPS mais IFN- γ era aumentada e que este aumento era mediado pelo receptor TLR4 e quando bloqueado por anti-TLR4 o efeito era revertido. Bosisio *et al.*, (2009) mostrou que macrófagos se tornam ativados em contato com IFN- γ e expressam em maiores quantidades, receptores TLR4.

Levando-se em conta alguns trabalhos anteriores, tivemos por objetivo esclarecer melhor quais os efeitos do IFN- γ sobre a fagocitose imunológica mediada por receptores Fc γ , CR e dectina-1 (que são importantes no mecanismo de defesa).

Os receptores fagocíticos estimulados nos estudos realizados pelo nosso laboratório estão envolvidos no mecanismo de defesa contra microorganismos e na homeostase tecidual. Os receptores Fc γ são capazes de reconhecer microorganismos recobertos com IgG após a imunidade adaptativa ter se desenvolvido; os receptores de manose e dectina-1 participam no reconhecimento imediato do microorganismo (antes do estabelecimento de uma resposta imune) através da interação com polissacarídeos na sua superfície, os quais estão presentes no zimosan; e os receptores dos componentes do complemento C3b/C3bi podem estar envolvidos no reconhecimento inato dos microorganismos que ativam a via alternativa e de lectinas do complemento, ou após a síntese de anticorpos pela ativação da via clássica. Assim, estes receptores abrangem uma gama ampla de situações fisiológicas que requerem a fagocitose. Obviamente, mais de um tipo de receptor deve estar simultaneamente envolvido em situações fisiológicas *in vivo*.

No presente trabalho, nós observamos que o IFN- γ foi capaz de aumentar a fagocitose mediada por neutrófilos com quase todos os estímulos utilizados, indicando uma ativação generalizada e dependente do receptor na função fagocítica dos neutrófilos ativados com IFN- γ por 2 horas (Figura 4.3). Porém, na fagocitose do imunocomplexo de IgM não observamos diferenças entre neutrófilos ativados ou não, mas quando

opsonizamos este imunocomplexo com soro que continha componentes do complemento, a porcentagem de fagocitose e a intensidade de fluorescência foram aumentadas somente no grupo incubado com IFN- γ .

Tem sido descrito receptores para IgG, IgM e para componentes do sistema complemento em vários tipos de células. (Henson, 1969; Nussenzweig 1969, Rabinovitch, 1970). Foi demonstrado também que somente o receptor de IgG é o responsável pela indução da interiorização da partícula, sendo que o receptor de complemento apenas produz a aderência, em macrófagos ativados e neutrófilos em repouso (Mantovani 1975, Mantovani *et al.*, 1972) mas nada está bem elucidado em relação a fagocitose pelo receptor IgM.

Observamos em nosso estudo que o IFN- γ deixou o neutrófilo ativado em um certo estado que o receptor de complemento, por si só, foi capaz de realizar a fagocitose, porém, num grau bem menor que aquela realizada pelo receptor Fc γ . Não há trabalhos que expliquem esse fenômeno, mas não podemos ter como definitiva a não existência do receptor de IgM nos neutrófilos, já que em outros tipos de células existe uma enorme controvérsia nas investigações a respeito de sua existência. (Henson, 1969; Bianco *et al.* 1975; Ralph *et al.*, 1975; Gergely *et al.*, 1982).

Sabe-se que para o IC desencadear uma resposta imune em neutrófilos é necessário que este seja “reconhecido” por receptores Fc presentes na membrana destas células. Tal interação resulta na estimulação de respostas biológicas específicas diretamente relacionadas com a eliminação do IC. Tendo em vista que a interação de receptores Fc γ com a porção Fc de IgG, quando esta se encontra complexada com antígeno na forma de IC, culmina no processo fagocítico e na montagem do complexo enzimático NADPH oxidase, decidimos investigar se o aumento na porcentagem de fagocitose em neutrófilos ativados com IFN- γ teria relação com a expressão dos receptores Fc γ RII/III (CD 32/16), CD11b (CR3) e dectina-1. O receptor Fc γ RIIIb é predominante nos neutrófilos com 3×10^6 moléculas/célula, comparada ao Fc γ RIIIa com 2×10^4 moléculas/célula (Marzocchi-Machado e Lucisano-Valim, 2005).

Os resultados obtidos neste trabalho mostram que os mecanismos pelos quais o IFN- γ atua no aumento da fagocitose pelos neutrófilos ativados parecem ser através do aumento na expressão de dectina-1, CD11b e Fc γ RII/III (Figuras 4.9C).

Alguns estudos sobre alterações nos receptores fagocíticos tem se focalizado no efeito do IFN- γ . Nossos resultados corroboram com os dados presentes na literatura; Jayaram, Buckle and Hogg (1989) mostraram um aumento na expressão de Fc γ RII/III e também de Fc γ RI (CD64) somente depois de 12 horas de cultura em células HL60. Já a expressão de CD11b (CR3) e CR1 não foram alteradas depois do contato com o IFN- γ , porém, foram rapidamente induzidos com o contato de GM-CSF (fator estimulador de colônias granulocíticas e monocíticas); um potente regulador de hematopoiese. King M. e colaboradores (1992) mostraram também que o IFN- γ aumentou a expressão de Fc γ RI em neutrófilos humanos depois de 24 de incubação.

Além da fagocitose, a liberação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio possui um importante papel no mecanismo de defesa do organismo contra agentes invasores. Com base nisso, decidimos investigar, no nosso modelo, o efeito do IFN- γ no surto respiratório, avaliando a liberação das seguintes espécies reativas de oxigênio: ânion superóxido, peróxido de hidrogênio, ácido hipocloroso e óxido nítrico.

Os efeitos do IFN- γ sobre a produção de superóxido por neutrófilos foram avaliados nos ensaios com ferrocitocromo C, como descrito por Johnston e Lehmyer em 1976. Nossos resultados mostraram que a adição de IFN- γ antes do ensaio resultou em um aumento da geração de ânion superóxido por estimulação com IC de IgG anti-eritrócito de carneiro, zimosan e zimosan opsonizado (Figura 4.4).

Steinbeck e colaboradores (1986), foram incapazes de demonstrar um efeito do recombinante de IFN- γ bovino sobre o surto respiratório de neutrófilos de bovinos. Em seus estudos as células foram previamente incubada com IFN- γ por 3,5 horas. É possível que os neutrófilos bovinos tenham entrado em apoptose, porque nesse experimento não foi apresentado uma curva de tempo de ativação. Reeves e seus colegas (2002) demonstraram que os neutrófilos são capazes de produzir grandes quantidades de O₂⁻. (Avaliado por Segal,

2005). King (2009) mostrou que o surto respiratório está associado com morte microbiana ou fagocitose e que ela pode ser aumentada em contato da células com determinadas concentrações de IFN- γ . O efeito do IFN- γ na liberação de superóxido também tem sido estudado em humanos e, de forma similar aos estudos com modelos animais, apresentam resultados conflitantes.

Estes resultados conflitantes podem ser devido a diferenças quanto ao tempo de exposição da célula ao IFN- γ , ao tipo de célula fagocítica analisada, à concentração ideal para ativar a célula, aos receptores envolvidos na fagocitose, que podem ativar diferentes vias regulatórias; e a diferenças no tipo de estímulos utilizados, os quais se ligam e ativam diferentes receptores, que, por sua vez, podem responder de forma distinta ao IFN- γ .

Após a formação do ânion superóxido pelas células imunes, a próxima espécie reativa de oxigênio a se desenvolver a partir de um processo de dismutação é o peróxido de hidrogênio. Apesar desta espécie reativa não atuar diretamente como um potente oxidante, o peróxido é o precursor de oxidantes altamente potentes, como os halogênios oxidados. Poucos estudos dedicaram-se a investigar os efeitos do IFN- γ na liberação de H₂O₂ por fagócitos. Stanojević e cols. (2008) demonstraram que incubações de 3 horas com IFN- γ não alteraram a liberação de H₂O₂ por macrófagos estimulados com PMA. Outros trabalhos mostram que os neutrófilos incubados por 4 h na presença de IFN- γ 50U/mL aumentaram a produção de H₂O₂, em resposta a diferentes estímulos, tais como Con A (acima de 200 μ g/ml) FMLP e PMA (Berton *et al* , 1986; Cassatela *et al*, 1995; Marcinkiewicz *et al*, 2000). Já os resultados que nós obtivemos mostram que 150U/ml de IFN- γ causa um aumento na liberação de peróxido de hidrogênio por neutrófilos ativados e estimulados com IC de IgG anti Ova, zimosan e zimosan opsonizado; no entanto, nenhuma alteração foi observada na liberação de H₂O₂ na ausência de estímulo (liberação basal) (Figura 4.5). O imunocomplexo Fab'2 de IgG antiOva não induziu a produção de peróxido de hidrogênio mas quando este imunocomplexo foi opsonizado com soro a produção do peróxido apresentou um aumento significativo. Fica evidente que o receptor de complemento, somente em neutrófilos ativados com IFN- γ , foi capaz de produzir espécies reativas, porém

em menor escala do que imunocomplexos que usam uma associação de receptores, como Fc e CR juntos.

De acordo com Lapenna e Cuccurullo (1996) o ácido hipocloroso pode ser considerado como o mais abundante oxidante gerado por leucócitos do sangue. Ele representa uma das espécies reativas de oxigênio com maior poder oxidante. Os efeitos citotóxicos atribuídos a este oxidante incluem: oxidação e descarboxilação de proteínas de membrana, oxidação de componentes da cadeia respiratória, peroxidação de lipídeos de membrana, dentre outros. Além de atacar biomoléculas de importância fisiológica, este oxidante também é capaz de gerar outras ROS, tais como: oxigênio singlete e radical hidroxil a partir de sua reação com peróxido de hidrogênio e ânion superóxido, respectivamente (Weiss, 1989; Lapenna e Cuccurullo, 1996). Recentes estudos têm demonstrado que além de seus efeitos citotóxicos, o HOCl e seus produtos de reação têm um importante papel na patofisiologia de doenças inflamatórias (revisado por Malle *et al.*, 2007).

Como observado para o peróxido de hidrogênio, o IFN- γ aumentou significativamente a liberação de HOCl em neutrófilos ativados e estimulados com IC de IgG anti-Ova, zimosan, zimosan opsonizado; no entanto em contato somente com a porção Fab'2 de IgG não ocorreu tal produção. Esta só foi observada quando opsonizamos este IC com soro, o que resulta na incorporação de componentes do complemento (Figura 4.6). Diamond e colaboradores (1991) mostraram que o IFN- γ induziu aumento da produção de HOCl e H₂O₂ em contato com *Candida albicans*.

Outra espécie reativa avaliada neste estudo foi o óxido nítrico ou monóxido de nitrogênio. Esta espécie reativa é um importante sinalizador intracelular e extracelular. Sua liberação foi demonstrada ser alterada em condições inflamatórias, através de modificações na expressão da iNOS (óxido nítrico sintase induzida) (revisado por Rettori *et al.*, 2009 e Alves-Filho, *et al.*, 2008). A forma induzida da enzima é estimulada por uma variedade de endotoxinas e citocinas como IFN- γ (Leanza *et al.*, 2007; Moncada e Higgs, 1993). Nos vasos sanguíneos, o óxido nítrico atua como um vasodilatador e no sistema nervoso como

um neurotransmissor podendo agir como um precursor do peroxinitrito (ONOO-) (Babior, 1999). Considerando que o superóxido, juntamente com o NO é um importante intermediário para a produção de peroxinitrito e o IFN- γ provocou um aumento na liberação de O_2^- por neutrófilos, nós investigamos se a liberação de NO foi também afetada por IFN- γ . Como o que foi observado para outras espécies reativas analisadas, a liberação de NO foi aumentada pela ação de IFN- γ (Figura 4.7).

Bevilacqua (2007) mostrou que trofoblastos podem gerar óxido nítrico porque passam a expressar a enzima óxido nítrico sintase (iNOS) depois de serem incubados na presença de IFN- γ . Persoons e cols. (1997) e Broug-Holub e cols. (1998) demonstraram que o contato com IFN- α e IFN- β causam uma redução na liberação de NO por macrófagos alveolares. Sabe-se que o NO liberado pelas células fagocíticas pode reagir com o ânion superóxido formando o peroxinitrito (Babior, 1999).

É válido lembrar que diferentes respostas podem ser encontradas nos estudos referentes ao efeito do IFN- γ sobre as funções de células fagocíticas, uma vez que vários fatores podem influenciar na resposta fisiológica ao IFN- γ .

Em associação ao surto respiratório ocorre o processo de desgranulação. Este é caracterizado pela imediata liberação do conteúdo dos grânulos citoplasmáticos dos fagócitos durante a ingestão da partícula. Inicialmente, para caracterizar a liberação do conteúdo enzimático dos grânulos de neutrófilos optamos pela dosagem da fosfatase alcalina, como marcadora dos grânulos específicos, e da β -glucuronidase, enzima abundante nos grânulos azurofílicos. A liberação destas enzimas pelos neutrófilos de camundongos, quando estimulados pelos diferentes tipos de imunocomplexos pode ser aumentada em contato com citocinas como o IFN- γ . Foi demonstrado claramente em vários trabalhos que a liberação das enzimas pelos grânulos não é um processo citolítico, fato que nós evidenciamos pelos testes de viabilidade com *Trypan Blue* e pela dosagem da enzima citoplasmática lactato desidrogenase, como foi mostrado na Figura 4.8. Estes resultados confirmam os de muitos pesquisadores que, através de microscopia eletrônica e outras

técnicas, demonstraram a integridade dos PMN estimulados por diferentes imunocomplexos ou mesmo IFN- γ .

Em nosso estudo, observamos alterações no padrão de liberação da β -glucuronidase e da fosfatase alcalina. Elas foram liberadas em alta concentração nos sobrenadantes de cultura de neutrófilos ativados com IFN- γ e estimulados com os diferentes estímulos (Figura 4.8.1). Tem sido sugerido por vários pesquisadores que a secreção destes dois tipos de grânulos ocorre seqüencialmente, sob um controle diferencial. Bainton (1970), durante a fagocitose de bactérias, demonstrou a fusão dos grânulos específicos com o fagossomo antes daquela dos grânulos azurofilicos. Henson (1971), estudando neutrófilos de coelho estimulados com γ -globulina agregada ligada a uma superfície, observou que o conteúdo dos grânulos específicos é liberado primeiro. A extensão da liberação das enzimas é claramente dependente do estímulo imunológico e do estado de ativação da célula. Observamos em nossos resultados que o IC Fab'2 de IgG anti-Ova não ocasionou liberação dos grânulos mas quando opsonizamos este imunocomplexo com soro, a liberação das enzimas foi aumentada na população de neutrófilos ativados com IFN- γ .

Embora não tenhamos detectado níveis apreciáveis da fosfatase alcalina no sobrenadante de cultura de neutrófilos ativados com os diferentes imunocomplexos (Figura 4.8.1), isto não significa que em nosso modelo os grânulos específicos não estejam sofrendo a exocitose. Henson (1971) demonstrou que a fosfatase alcalina é prontamente liberada dos grânulos específicos em resposta a um estímulo de IC opsonizado com IgG, mas esta enzima fica retida no sítio de excreção, aderida à membrana externa dos neutrófilos, não sendo possível sua correta determinação no sobrenadante da cultura.

O complexo da NADPH oxidase é considerado o mais importante complexo enzimático envolvido na geração de espécies reativas de oxigênio presente nos fagócitos (Forman *et al.*, 2001). Este complexo é formado por subunidades citoplasmáticas e por componentes ancorados à membrana plasmática. Após a estimulação dos fagócitos por um estímulo apropriado, as subunidades citoplasmáticas são translocadas para a membrana e este complexo enzimático torna-se ativado e passa a sintetizar ânion superóxido. Como

neste trabalho demonstramos que o IFN- γ foi capaz de aumentar a fagocitose e a produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio em neutrófilos ativados, e tendo em vista que a produção dessas espécies é um reflexo da atividade do complexo enzimático da NADPH oxidase, decidimos investigar se a incubação com IFN- γ altera a expressão gênica de subunidades formadoras deste complexo. Para isso, examinamos a expressão de mRNA de duas subunidades da NADPH oxidase - gp91^{phox}, p47^{phox}. Ambas as subunidades foram demonstradas serem essenciais para a atividade do complexo NADPH (Johnson *et al.*, 1998; Sheppard *et al.*, 2005, Raad *et al.*, 2009).

Pela Figura 4.12, observamos que na população de neutrófilos ativados com IFN- γ ocorreu um aumento na expressão de mRNA das subunidades gp91^{phox} e p47^{phox}. Isto sugere que o aumento na liberação das espécies reativas observado em neutrófilos ativados com IFN- γ pode ser uma consequência do aumento na expressão de RNAm das subunidades gp91^{phox} e p47^{phox} que pode resultar numa maior expressão protéica destes componentes, que por consequência causa um aumento na montagem do complexo enzimático NADPH oxidase funcional.

De acordo com Johnson e cols. (1998) a subunidade p47^{phox} apresenta um papel fundamental para a translocação das demais subunidades citoplasmáticas e para a montagem do complexo NADPH oxidase. No entanto, como não se conhece as taxas de *turnover* para ambos, mRNA e proteína desta subunidade, torna-se complicado estimar se o aumento na expressão de mRNA resultaria em uma igual aumento nos níveis de proteína. Também deve-se considerar que a funcionalidade do complexo enzimático NADPH oxidase está sob um “fino” controle e envolve várias vias de sinalização, incluindo estimulação de receptores acoplados a proteína G, fosfolipase C, liberação de diacilglicerol e cálcio, proteína quinase C, fosforilação da subunidade p47^{phox} em pelo menos 3 resíduos de serina – Ser³⁷⁹, Ser³⁵⁹ ou Ser³⁷⁰, Ser³⁰³ (Thelen *et al.*, 1993, Johnson *et al.*, 1998).

Segundo Ellis e Beaman (2004), o tratamento com IFN- γ causou um aumento da expressão do mRNA da subunidade gp91^{phox}; contudo não houve diferença na expressão da subunidade p47^{phox}. Cassatella e cols. (1990, 1991) mostraram que depois de 4 horas de

tratamento com IFN- γ , neutrófilos humanos apresentaram um aumento na expressão da subunidade gp91^{phox} mas não na p47^{phox}; porém esta se mostrou aumentada depois da incubação com IFN- γ e LPS juntos. Embora a regulação destas subunidades seja um complexo processo que ainda não está bem entendido, é certo que o tratamento com IFN- γ é capaz de ativar a resposta oxidativa em neutrófilos e macrófagos.

Como citado anteriormente, neutrófilos são células do sistema imune muito importantes na defesa do organismo contra agentes invasores. E neste processo de defesa eles lançam mão de um arsenal complexo de eventos que culmina na eliminação da partícula invasora. Também produzem citocinas em resposta a microrganismo ou a outros antígenos, que medeiam e regulam reações imunes e inflamatórias. Avaliamos, então, a liberação de citocinas no sobrenadante de cultura dos neutrófilos ativados com IFN- γ e estimulados com os diferentes estímulos fagocíticos.

Os neutrófilos estimulados com IFN- γ liberaram citocinas pró-inflamatórias, IL-6 e TNF- α , que atuam na ativação autócrina e parácrina dos neutrófilos na resposta inflamatória local que ajuda a conter infecções e na indução de respostas pelos linfócitos T. Já a estimulação das duas populações de neutrófilos com Fab'2 de IgG anti Ova e Fab'2 de IgG anti-Ova opsonizado, não produziram citocinas em valores significativos (Figura 4.10). Possivelmente só o receptor de complemento não foi suficiente para desencadear uma produção de citocinas nesta célula. Estas alterações mostram que o IFN- γ possivelmente induz um fenótipo regulatório no neutrófilo, o qual apresenta capacidade fagocítica aumentada, maior liberação de citocinas anti-inflamatórias.

Finalmente, em nosso trabalho observamos que o efeito de ativação promovido pelo IFN- γ foi melhor observado depois de 2 horas de incubação; avaliamos então se este tempo seria suficiente para promover a síntese de proteínas. Realizamos o pré-tratamento *in vitro* dos neutrófilos com inibidores de transcrição e tradução, actinomicina D e cicloheximida, respectivamente, e observamos o bloqueio do efeito do IFN- γ sobre a produção de superóxido quando os neutrófilos foram estimulados com IC de ovalbumina. Estas drogas, isoladamente, não produziram efeitos sobre a produção de superóxido. (Figura 4.11). Esses

experimentos indicaram que ambos os processos, transcrição e tradução, são necessários para o efeito IFN- γ . Guthrie, 1984; Berkow, 1987 mostraram que os inibidores destes processos bloquearam completamente o efeito do IFN- γ . Isso indica que o mecanismo para o efeito do IFN- γ é dependente do mRNA e síntese protéica.

O IFN- γ é uma citocina que possui um importante papel na resistência de organismos a patógenos e também a infecções virais. Com este trabalho, contribuimos para o esclarecimento dos mecanismos bioquímicos e funcionais de neutrófilos estimulados por esta citocina. Verificamos que neutrófilos ativados *in vitro* com IFN- γ apresentaram um aumento no processo de interiorização de partícula, na liberação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, que desempenham um papel relevante na morte do agente patogênico. Podemos observar também que o efeito da cinética sobre o neutrófilo mostra uma dependência do tempo de exposição às células ao IFN- γ , obtendo-se o máximo de atividade após 2 horas com relação ao processo fagocítico.

No entanto, mais estudos são requeridos para estabelecer de que forma estas descobertas podem ser extrapoladas para as condições inflamatórias *in vivo*, as quais são evidentemente mais complexas, pois definição de mecanismos regulatórios *in vivo* é crucial para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas futuras.

6- Conclusão

6. CONCLUSÕES

1. Observamos que 2 horas de incubação com 150U/ml de IFN- γ foi capaz de aumentar a fagocitose de imunocomplexo mediada por neutrófilos;
2. A incubação de 2 horas com concentrações elevadas (300 e 500 U/ml) de IFN- γ ocasionou a exposição da fosfatidilserina na superfície celular, processo que pode indicar a apoptose dos neutrófilos;
3. A incubação com IFN- γ foi capaz de aumentar a fagocitose mediada por neutrófilos em quase todos os estímulos utilizados; mas na fagocitose do imunocomplexo de IgM não observamos diferenças entre neutrófilos ativados ou não, porém, quando opsonizamos este imunocomplexo com soro que continha componentes do complemento, a porcentagem de fagocitose e a intensidade de fluorescência foram aumentadas somente no grupo incubado com IFN- γ ;
4. A população de neutrófilos ativados com IFN- γ foi capaz de aumentar a produção de superóxido depois de estimulado pelos diferentes estímulos;
5. O contato do neutrófilo com o IFN- γ gerou um aumento significativo na liberação de peróxido de hidrogênio em quase todos os estímulos usados;
6. As populações de neutrófilos ativados com IFN- γ foram capazes de aumentar a produção de HOCl depois de estimulados pelos diferentes estímulos;
7. O contato dos neutrófilos com IFN- γ promoveu um aumento significativo na liberação de óxido nítrico em contato com quase todos os estímulos;
8. IFN- γ e os diferentes estímulos fagocíticos não ocasionaram lise nas duas populações de neutrófilos, pois a enzima LDH foi detectada em baixas concentrações nos sobrenadantes das culturas e sua liberação para o meio extracelular foi similar em todas as populações testadas, indicando assim a integridade celular;
9. A fosfatase alcalina e β -glucuronidase foram liberadas em alta concentração nos sobrenadantes de cultura de neutrófilos ativados com IFN- γ e estimulados com os diferentes estímulos;

10. IFN- γ provocou um aumento significativo na expressão de dectina-1, Fc γ RII/III e CD11b. Isto sugere que o aumento da fagocitose e da produção de espécies reativas observada em neutrófilos ativados com IFN- γ pode ser consequência do aumento da expressão dos receptores nesta célula ativada;
11. Os neutrófilos estimulados com IFN- γ liberaram citocinas pró-inflamatórias, IL-6 e TNF- α ;
12. O pré-tratamento *in vitro* dos neutrófilos com inibidores de transcrição e tradução, actinomicina D e cicloheximida, respectivamente, bloqueou o efeito do IFN- γ sobre a produção de superóxido. Estas drogas, isoladamente, não produziram efeitos sobre a produção de superóxido. Esses experimentos indicam que ambos os processos, transcrição e tradução, são necessários para o efeito IFN- γ .
13. Na população de neutrófilos ativados com IFN- γ ocorreu um aumento na expressão das subunidades gp91^{phox} e p47^{phox}. Isto sugere que o aumento na liberação das espécies reativas observado em neutrófilos ativados com IFN- γ pode ser uma consequência do aumento na expressão de RNAm das subunidades gp91^{phox} e p47^{phox}.

*Referências Bibliográficas**

* Conforme o "International Committee of Medical Journal Editors" (Vancouver Style)

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS AK, LICHTMAN AH, POBER JP. Mecanismos efetores da imunidade Humoral. In: *Imunologia celular e molecular*. 2003; Rio de Janeiro: Revinter, p. 309-334.

ADEREM A, UNDREHILL DM. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu Rev Immunol*. 1999; 17: 593-623.

ALBIERI A, HOSHIDA MS, GAGIOTI SM, LEANZA EC, ABRAHAMSOHN I, CROY A, ASHKAR AA, BEVILACQUA E. Interferon-gama alters the phagocytic activity of the mouse trophoblast. *Reprod. Biol. Endocri*. 2005, 3: 34.

ALVES-FILHO JC, FREITAS A, SPILLER F, SOUTO FO, CUNHA FQ. The role of neutrophils in severe sepsis shock. *Shock*, 2008, 1: 3-9.

BABIOR BM. The production and use of reactive oxidants by phagocytes. In: *Reactive oxygen species in biological systems*, Ed(s) Gilbert; Colton. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 1999, 503-517.

BACH EA, AGUET M, SCHREIBER RD, The IFN- γ receptor: a paradigm for cytokine receptor signaling. *Annu Rev Immunol*, 1997, 15: 563-91.

BAINTO DF, NICHOLS BA, FARQUHAR MG. Primary lysosomes of blood leukocytes. In: *Lysosomes in biology and pathology*. Edited by Dingle J.T. Elsevier/North Holland, New York, 1976, 5: 3.

BAZZONI F, ROSSATO M, FABBRI M, GAUDIOSI D, MIROLO M, MORI L, TAMASSIA N, MANTOVANI A, CASSATELLA MA, LOCATI M. Induction and regulatory function of miR-9 in human monocytes and neutrophils exposed to proinflammatory signals. *PNAS*. 2009, 106: 5282-5287.

BEAMAN L, BEAMAN BL. The role of oxygen and its derivatives in microbial pathogenesis and host defence. *Annu Rev Microbiol*. 1984; 38: 27-48.

BERTON G, ZENI L, CASSATELLA MA, ROSSI F. Gamma interferon is able to enhance the oxidative metabolism of human neutrophils. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 1986, 138: 1276.

BERRY KA, HENSON PM, MURPHY RC. Effects of acrolein on leukotriene biosynthesis in human neutrophils. *Chem Res Toxicol*. 2008, 21(12):2424-32.

BIANCO C, GRIFFIN FMJR, SILVERSTEIN SC. Studies of the macrophage complement receptor. Alteration of receptor function upon macrophage activation. *J. Exp. Med*. 1975, 141: 1278.

BORREGAARD N, COWLAND JB. Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leucocyte. *Blood*; 1997, 89:10, 3503-3521.

BOXIO, R.; BOSSENMEYER-POURIÉ, C. STEINCKWICH. N.; DOURNON, C.; NUBE, O. Mouse bone marrow contains large numbers of functionally competent neutrophils. *J. Leuk. Biol.* 75, 2004.

BRITIGAN BE, COFFMAN TJ, BUETTNER GR. Spin trapping evidence for the lack of significant hydroxyl radical production during the respiration burst of human phagocytes using a spin adduct resistant to superoxide-mediated destruction. *J Biol Chem.*, 1990, 265, n. 5: 2650-6.

BROUG-HOLUB E, PERSOONS JH, SCHORNAGEL K, MASTBERGEN SC, KRAAL G. Effects of stress on alveolar macrophages: a role for the sympathetic nervous system. *Am J Respir Cell Mol Biol.*, 1998, 19 (5): 842-8.

CASSATELLA MA, GUASPARRI I, CESKA M, BAZZONI F, ROSSI F. Interferon-gamma inhibits interleukin-8 production by human polymorphonuclear leukocytes. *Immunology.* 1993, 78: 177.

CASSATELLA MA. The production of cytokines by polymorphonuclear neutrophils. *Immunol Today.* 1995, 16: 21-26.

CESARIO TC, ANDREWS BS, MARTIN DA, JASON M, TREADWELL T, FRIOU B, TILLES JG. Interferon in synovial fluid and serum of patients with rheumatic disease. *J. Rheumatol.* 1983, 10: 6470.

CHEUNG, K. et al. The origin of chemiluminescence produced by neutrophils stimulated by opsonized zymosan. *J. Immunol.*, 1983, 130: 2324-29.

CLINE MJ. *The White cell.* Cambridge, MA: Harvard University Press, 1975.

DAHLGREN C, KARLSSON A. Respiratory burst in human neutrophils. *J. Immunol Meth*, 1999, 232: 3-14.

DALLEGRI F, OTTONELLO L. Tissue injury in neutrophilic inflammation. *Inflamm. Res.*, 1997, 46: 382-391.

DAVIS JM, GALLIN JI, OPPENHEIM JJ, ROSENSTREICH D L, POTTER M. The neutrophil. *Cellular Functions in Immunity and Inflammation.* North Holland: Elysevier, 1981, 77-102.

DYPBUKT, J. M.; BISHOP, C.; BROOKS, W. M.; THONG, B.; ERIKSSON, H.; KETTLE, A. J. A sensitive and selective assay for chloramines production by myeloperoxidase. *Free Radic Biol Med.*, 2005, 39: 1468-1477.

ELLIS TN, BEAMAN BL. Interferon- γ activation of polymorphonuclear neutrophils function. *Immunology*. 2004, 112: 2-12.

FAURSCHOU M, BORREGAARD N. Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. *Microbes and Infection*, 2003, 5: 1317–1327.

FLESCH BK, NEPPERT J. Functions of the Fc receptors for immunoglobulin G. *J Clin Lab Anal*, 2000, 14: 141-56.

FORMAN HJ, TORRES M. Redox signaling in macrophages. *Mol Aspects Med*, 2001, 22, n. 4-5: 189-216.

GARDIN DE. One dimensional gel electrophoresis. *Meth Enzym*, 1990, 182: 425-41.

GERGELY J, ERDEI A, SÁNDOR M, SÁRMAY G, UHER F. The Fc receptor model of membrane cytoplasmic signalling. *Mol Immunol*. 1982, 19 (10):1223-8.

GREEN, L. C.; WAGNER, D. A.; GLOGOWSKI, J.; SKIPPER, P. L.; WISHNOK, J. S.; TANNENBAUM, S. R. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. *Anal Biochem.*, 1982, 126 (1):131-8.

GUTHRIE LA, McPHAIL L, HENSON PH, JOHNSTON RB. Priming of neutrophils for enhanced release of oxygen metabolites by bacterial lipopolysaccharide: evidence for increased activity of the superoxide producing enzyme. *J. Exp. Med*. 1984, 160: 1656-1671.

GREEN, L. C.; WAGNER, D. A.; GLOGOWSKI, J.; SKIPPER, P. L.; WISHNOK, J. S.; TANNENBAUM, S. R. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. *Anal Biochem.*, 1982, 126 (1): 131-8.

HAAS M, VOSSEBELD PJM, Von DEM BORNE AEGK, ROOS D. Fc γ receptors for phagocytes. *J. Lab. Clin. Med*, 1995, 126: 330 - 41.

HAMPTON MB, KETTLE AJ, WINTERBOURN CC. Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. *Blood*, 1998, 92, 9: 3007-17.

HEALEY, G.; VEALE, M.F.; SPARROW, R.L. A fluorometric quantitative erythrophagocytosis assay using human THP-1 monocytic cells and PKH26 labelled red blood cells. *J Immunol Methods*. v. 322, p. 50-56, 2007.

HENSON PM. The immunologic release of constituents from neutrophil leukocytes. The role of antibody and complement on nonphagocytosable surfaces or phagocytosable particles. *J. Immunol*, 1971a, 107, 6: 1535-1546.

HENSON PM; JOHNSON HB, SPIEGELBERG HL. The release of granule enzymes from human neutrophils stimulated by aggregated immunoglobulins of different classes and subclasses. *J. Immunol.*, 1972, 109 (6):1182-92.

HERRE J, GORDON S, BROWN GD. Dectina-1 and its role in the recognition of beta-glucans by macrophages. *Mol Immunol*, 2004, 40(12): 869-76.

HOGARTH PM, HULETT MD, OSMAN N. Fc gamma receptors: gene structure and receptor function. *Immunol Res.*, 1992, 11: 217-25.

JAKUS Z, NEMETH T, VERBEEK JS, MOCSAI A. Critical but overlapping role of FcgammaRIII and FcgammaRIV in activation of murine neutrophils by immobilized immune complexes. *J.Immunoll*, 2008, 180 (1): 618-29.

JANEWAY CA. The immune system evolved to discriminate infections nonself from noninfectious self. *Immunol Today*, 1992, 13(1):11-16.

JARSTRANDT C, EINHORN S. Effect of interferon on human neutrophilic granules. *Cancer Immunol. Immunother.* 1983, 16: 123.

JAYARAM Y, BUCKLE AM, HOGG N. The Fc receptor, FcRI, and other activation molecules on human mononuclear phagocytes after treatment with interferon-gamma. *Clin Exp Immunol.* 1989, 75(3):414-20.

JOHNSON JL, PARK JW, BENNA JE, FAUST LP, INANAMI O, BABIOR BM. Activation of p47(PHOX), a cytosolic subunit of the leukocyte NADPH oxidase. Phosphorylation of ser-359 or ser-370 precedes phosphorylation at other sites and is required for activity. *J Biol Chem.*, 1998, 273, n. 52: 35147-52.

JOHNSTON RBJR, LEHMEYER JE. Elaboration of toxic oxygen by-products by neutrophils on a model of immune complex disease. *J. Clin. Invest.*, 1976, 57: 836:841.

KANTARI C, PEDERZOLI-RIBEIL M, WITKO-SARSAT V, EGESTEN A, SCHMIDT A, HERWALD H. The Role of Neutrophils and Monocytes in Innate Immunity. (eds): Trends in Innate Immunity. *Contrib Microbiol. Basel, Karger*, 2008, 15:118-146.

KING P, WOOD VB, HUTCHINSON P, BROWNE R, HOLMES P, FREEZER N, HOLDSWORTH S. Bactericidal activity of neutrophils with reduced oxidative burst from adults with bronchiectasis. *APMIS.* 2009, 139: 117-133.

KING M, COMBER PG, CHIEN P, RUIZ P, SCHREIBER AD. Characterization of Fc gamma receptors on a human erythroleukemia cell line (HEL). *Exp Hematol.* 1992, 20(5):576-81.

KOBAYASHI S D, VOYICH J M, DE LEO FR. Regulation of the neutrophil-mediated inflammatory response to infection. *Microbes Infect.*, 2003, 5:14,1337-44.

KOWANKO IC, FERRANTE A. Stimulation of neutrophil respiratory burst and lysosomal enzyme release by human interferon- γ . *Immunology*, 1987, 62:149.

LAPENNA D, CUCCURULLO F. Hypochlorous acid and its pharmacological antagonism: an update picture. *Gen Pharmacol.*, 1996, 27(7): 1145-7.

LEANZA EC, HOSHIDA MS, COSTA AF, FERNANDES CM, TEIXEIRA CFP, BEVILACQUA E. Signaling molecules involved in IFN- γ inducible nitric oxide synthase expression in the mouse trophoblast. *Amer. J. Rep. Immuno.* 2007,58: 537-546.

MALLE E, FURTMÜLLER PG, SATTLER W, OBINGER C. Myeloperoxidase: a target for new drug development? *Br J Pharmacol.*, 2007, 152 (6): 838-54.

MANTOVANI B, RABINOVITCH M, NUSSENZWEIG V. Phagocytosis of immune complexes by macrophages. Different roles of the macrophage receptor sites for complement (C3) and for immunoglobulin (IgG). *J. Exp. Med.*, 1972, 135, n. 9: 780-92.

MANTOVANI B. Different roles of IgG and complement receptors in phagocytosis by polymorphonuclear leukocytes. *J. Immunol*, 1975, 115: 15-17.

MARZOCCHI-MACHADO CM, LUCISANO-VALIM YM. Receptores para Imunoglobulina G (Fc γ R). *Medicina (Ribeirão Preto)*, 2005, 38: 82-95.

MASSEY V. The microestimation of succinate and the extinction coefficient of cytochrome c. *Biochim Biophys Acta.* 1959, 34:255-6.

MONCADA, S.; HIGGS, A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N. engl. J. med.*, 1993, 329: 2002-2012.

MURRAY HW, NATHAN CF. In vivo killing of intracellular visceral *Leishmania donovani* by a macrophage-targeted hydrogen peroxide-generating system. *J Infect Dis.* 1988, 158(6):1372-5.

NAUSEEF WM. How human neutrophils kill and degrade microbes: an integrated view. *Immunological Reviews*, 2007, 219: 88–102.

NEWBURGER PE, EZEKOWITZ RA, WHITNEY C, WRIGH J, ORKIN SH. Induction of phagocyte cytochrome b heavy chain gene expression by interferon- γ . *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 1988, 85: 5215.

NIMMERJAHN F, BRUHNS P, HORIUCHI K, RAVETCH JV. Fc γ RIV: a novel FcR with distinct IgG subclass specificity. *Immunity*, 2005, 23: 41-51.

NIMMERJAHN F, RAVETCH JV. Fc γ receptors: old friends and new family members. *Immunity.* 2006, 24: 19-28.

NUSSEWZWEIG V, LAY WH, Ca dependent binding of antigen 19S antibody complex to macrophages. *J. Immunol.* 1969, 102: 1172.

NUUTILA J, LILIUS EM, Flow cytometric quantitative determinatin of ingestion by phagocytosis needs the distinguishing of overlapping populations of binding and ingesting cells. *Cytometry A. v. 65, p. 93-102, 2005.*

PARK J. Phagocytosis induces superoxide formation and apoptosis in macrophages. *Experimental and mol. med.*, 2003, 35: 325-35.

PERUSSIA B, KOBAYASHI M, ROSSI ME, ANEGON I, TRINCHIERI G. Immune interferon enhanced functional properties of human granulocytes: role of Fc receptors of ltmphotoxin, tumor necrosis factor and granulocyte macrophages colony-stimulant factor. *J. Immunol.* 1987, 138: 765-774.

PERSOONS JH, MOES NM, BROUG-HOLUB E, SCHORNAGEL K, TILDERS FJ, KRAAL G. Acute and long-term effects of stressors on pulmonary immune functions. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 1997, 17: 203–208.

PICK, E.; KEISARI, Y. A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produxide by cells in culture. *J. Immunol. Meth*, 1980, 38: 161-170.

RAAD H, PACLET MH, BOUSSETTA T, KROVIARSKI Y, MOREL F, QUINN MT, GOUGEROT-POCIDALO MA, DANG PM, EL-BENNA J. Regulation of the phagocyte NADPH oxidase activity: phosphorylation of p91phox/NOX2 by protein kinase C enhances its diaphorase activity and binding to Rac2, p67phox, and p47phox. *The FASEB Journal*, 2009, 23: 1011-1022.

RABINOVITCH M. Professional and non-professional phagocytes: an introduction. *Trends Cell Biol.* 1995, 5: 85-88.

RABINOVITCH M. Phagocytic recognition. In mononuclear phagocytes. Ed. Van Furth R., Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1970: 299.

RALPH P, NAKOINZ I. Phagocytosis and cytolysis by a macrophage tumour and its cloned cell line. *Nature.* 1975, 2;257(5525):393-4.

RETTORI V, FERNANDEZ-SOLARI J, MOHN C, ZUBILETE MAZ, PRESTIFILIPPO JP, LAURENTIIS A. Nitric Oxide at the Crossroad of Immunoneuroendocrine Interactions. Neuroimmunomodulation: *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 2009, 1153: 35–47.

ROBINSON JM. Reactive oxygen species in phagocytic leukocytes. *Histochem Cell Biol.*, 2008, 130: 281–297.

ROSEN GM, POU S, RAMOS CL, COHEN MS, BRITIGAN BE. Free radicals and phagocytic cells. *FASEB J.*, 1995, 9: 200-9.

- SEGAL AW. How neutrophils kill microbes. *Annu Rev Immunol.*, 2005, 23:197-223.
- SELVARAJ P, ROSSE WF, SILBER R, SPRINGER TA. The major Fc receptor in blood has a phosphatidylinositol anchor and is deficient in paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Nature*, 1988, 333: 565-7.
- SHALABY MR, AGGARWAL BB, RINDERKNECHT E, SVEDERSKY LP, PALLADINO MA. Activation of human polymorphonuclear neutrophils functions by interferon-gamma and tumor necrosis factors. *J. Immunol.* 1985, 135: 2069.
- SHEPPARD FR, KELHER MR, MOORE EE, MCLAUGHLIN NJ, BANERJEE A, SILLIMAN CC. Structural organization of the neutrophil NADPH oxidase: phosphorylation and translocation during priming and activation. *J Leukoc Biol.*, 2005, 78, n. 5:1025-42.
- STEINBECK MJ, ROTH JA, KAEBERLE ML. Activation of bovine neutrophils by recombinant gamma interferon. *Cellular Immunol.* 1986, 98: 137-144.
- SWANSON JA, HOPPE AD. The coordination of signaling during Fc receptor-mediated phagocytosis. *J. Leukocyte Biol.*, 2004, 76:1093.
- TAYLOR PR, MARTINEZ-POMARES L, STACEY M, LIN HH, BROWN GD, GORDON S. Macrophage receptors and immune recognition. *Annu Rev Immunol.* 2005, 23:901-44.
- THELEN M, DEWALD B, BAGGIOLINI M. Neutrophil signal transduction and activation of the respiratory burst. *Physiol Rev.* 1993, 73 (4): 797-821.
- TENNENBERG S D, FEY DE, LIESER MJ. Oxidative priming of neutrophils by interferon- γ . *J. Leuk. Biol.* 1993, 53: 301-308.
- VARESIO L, BIASI E, THURMAN GB, TAIMADGE JE, WILTROUT RH, HERBERMAN RB. Potent activation of mouse macrophages by recombinant interferon- γ . *Cancer Research.* 1984, 44: 4465-4469.
- VERVLIET G, SCHANDENÉ L. In vitro correction of the interleukin-2 and interferon-gamma defect in multiple sclerosis. *Clin Exp Immunol.* 1985, 61(3): 556-61.
- VILCEK J, HENRIKSEN-DESTEFANO D, SIEGEL D, KLION A, ROBB RJ, LE J. Regulation of IFN-gamma induction in human peripheral blood cells by exogenous and endogenously produced interleukin 2. *J Immunol.* 1985, 135(3):1851-6.
- VOICE, J. K.; LACHMANN, P. J. Neutrophil Fc gamma and complement receptors involved in binding soluble IgG immune complexes and in specific granule release induced by soluble IgG immune complexes. *Eur J Immunol.*, v. 27, n. 10, p. 2514-23, 1997.

YATE-PEARL M, FABIAN I, HALPERIN D, FLATAU E, WERBER S, SHALIT I, Interferon- γ and bacterial lipopolysaccharide act synergistically on human neutrophils enhancing interleukin-8, interleukin-1 β , tumor necrosis factor- α and interleukin-12 P70 secretion and phagocytosis via upregulation of toll-like receptor4. *Shock*, 2007, 27: 226-231.

WAGNER, A. H.; SCHROETER, M. R.; HECKER, M. 17 beta-estradiol inhibition of NADPH oxidase expression in human endothelial cells. *The FASEB Journal*, 2001, 15 (12): 2121-30.

WEISS SJ. Tissue destruction by neutrophils. *N Engl J Med.*, 1989, 320(6): 365-76.

Anexos

ANEXOS

Aprovação do comitê de ética em experimentação animal



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
— Comissão de Ética em Experimentação Animal —

**CERTIFICADO**

Certificamos que o Protocolo para Uso de Animais em Experimentação n° **053/2009**, sobre o projeto intitulado “*Papel do interferon-gama na fagocitose imunológica e na produção de espécies reativas de oxigênio por leucócitos polimorfonucleares de camundongos*”, sob a responsabilidade do **Professor Doutor Bernardo Mantovani** está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi **APROVADO** em reunião de **27 de abril de 2009**.

(We certify that the protocol n° 053/2009, about “*Role of interferon-gamma in process phagocitic and production of reactive species of oxygen in polymorphonucleares leukocytes of mice*”, agrees with the ETHICAL PRINCIPLES IN ANIMAL RESEARCH adopted by Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and was approved in **04/27/2009** meeting.

Ribeirão Preto, 27 de abril de 2009.

Prof. Dr. Márcio Dantas
Vice-Presidente da Comissão de Ética em
Experimentação Animal

*Manuscrito do artigo a ser
submetido para a publicação*

**ROLE OF INTERFERON-GAMMA ON IMMUNE PHAGOCYTOSIS AND
PRODUCTION OF REACTIVE OXYGEN SPECIES BY MOUSE
POLYMORPHONUCLEAR NEUTROPHILS**

Marchi, L.F¹; Costa, R.S¹; Ignacchiti, M.D.C¹; Moreira, M.R¹; Chedaroui-Silva, S¹; Mantovani, B¹.

1- Department of Biochemistry and Immunology, Medical School of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP., Brazil.

* Correspondence: Larissa Fávaro Marchi

Department of Biochemistry and Immunology

Ribeirão Preto Medical School - University of São Paulo

14049-900 Ribeirão Preto-SP, Brazil.

Tel: (55) (16) 3602-3107 Fax: (55) (16) 3633-6840

E-mail: larissamarchi@yahoo.com.br

Abstract

Neutrophils play an essential role in host defense against microbial agents and the inflammatory reaction. They are able to ingest foreign particles or microorganisms. In the process of phagocytosis a phagosome is formed, where the microorganisms are killed by the release of hydrolytic enzymes and reactive oxygen species. This oxygen consumption is called burst respiratory. The burst respiratory involves the activation of NADPH oxidase, which produces large amounts of superoxide. The superoxide generates hydrogen peroxide which is converted to hypochlorous acid by myeloperoxidase. These reactive species together have properties sufficient to kill phagocytosed microorganisms. Some of the functions of neutrophils can be regulated in contact with certain cytokines such as IFN- γ . The interaction of neutrophils with IFN- γ is essential in the immune response, defense and in inflammatory processes. This study examined the effect of IFN- γ on phagocytosis and production of reactive oxygen and nitrogen production by neutrophils isolated from mice. We observed that phagocytosis performed by activated neutrophils with IFN- γ was higher than the control group in almost all tested stimuli. The dose-response curve of IFN- γ showed an inverted U form, with an initial response at 10U/ml and maximum at 150U/ml. With higher concentrations the effect decreased progressively and with 500U/ml it returned to the control level. The effect of IFN- γ production of superoxide anion was measured by stimulating the neutrophils with complex immune precipitate of IgG and Ova. The kinetics of extracellular release of O₂⁻ in the presence of IFN- γ showed a peak at 2h and was 2 times higher than control. Similar results were observed for the production of hydrogen peroxide, hypochlorous acid and nitric oxide. We observed that IFN- γ induced the release of alkaline phosphatase and β -glucuronidase in culture supernatants of neutrophils activated with IFN- γ and stimulated with different stimuli. IFN- γ caused a significant increase in the expression of receptor dectin-1, Fc γ RII / III and CD11. This suggest that the increased phagocytosis and production of reactive species observed in activated neutrophils with IFN- γ for 2 hours may be a consequence of increased receptor expression in these cells. Neutrophils stimulated with IFN- γ produced also the release of proinflammatory cytokines such as IL-6 and TNF- α . We observed that the population of activated neutrophils with IFN- γ increased mRNA expression of gp91^{phox} and p47^{phox} subunits. This suggests that the increase release of reactive species observed in neutrophils activated with IFN- γ may be a consequence of increased mRNA expression of gp91^{phox} and p47^{phox} subunits which can result in increased protein expression of these components. Evidence was presented that the effects of IFN- γ on the functions

evaluated in this study are dependent on a genomic mechanism involving protein synthesis, since they could be prevented by pretreatment of cells with cycloheximide and actinomycin D. These results may be important factors for modulating the phagocytic process with implications for the defense mechanism and physiological processes.

Key Words – polymorphonuclear leukocyte; phagocytosis; interferon-gamma; NADPH oxidase; oxidative metabolism,

Introduction

Phagocytic cells, such as polymorphonuclear leukocytes (PMN) and macrophages, enable the host to protect itself against a variety of foreign antigens and pathogens. Neutrophils are the most numerous leukocyte in peripheral blood, constituting 50 to 70% of all cells. Although present in blood, the neutrophils pass by many tissues and its high mobility characteristic. The phenomenon of migration of PMN, called chemotaxis, can be induced by a number of chemical agents, among them components of the immune system of complement and then translocate to various tissues where they accumulate at sites of acute and chronic inflammation. The cells respond to a wide variety of particulate and soluble stimuli which result in their modulation and improved responsiveness to the offending agent (Yate-Pearl, 2007). One of these mediators is an activated T cells product known as interferon- γ (IFN- γ). Type I interferons, consisting of interferon α and β , have antiviral activity as a primary function. Type II interferon, consisting solely of interferon- γ , has a multitude of immunoregulatory functions in addition to its antiviral effect.

Interferon- γ is a glycoprotein produced by various cell types, including natural killer and macrophages, and has been shown to exert broad effects on the functional activities of various immune effector cells, including neutrophils (reviewed in Ellis 2004). However, the effects of IFN- γ on PMN function are becoming appreciated. Over recent years, with the availability of recombinant IFN- γ (rIFN- γ), there is evolving a clearer picture of the effects of IFN- γ on PMN function. These studies have shown that IFN- γ stimulates signal transduction in neutrophils, regulates gene expression and cytokine and chemokine expressions, enhances secretion of H_2O_2 in response to various stimuli (Kowanko, 1987, Newburger, 1988), induction of high-affinity Fc receptors, increases phagocytic activity and primes cells for various secondary stimuli.

Oxidative responses are integral to the role of the neutrophil in host defense and inflammation. Professional phagocytes (monocytes, macrophages, eosinophils and

neutrophils) produce an extraordinary variety of highly reactive oxidizing agents known as reactive oxygen species (ROS). Generation of ROS is mediated by NADPH oxidase, a membrane-associated multi-component protein enzyme complex (Hampton *et al.*, 1998; Babior, 1999b), which is inactive in unstimulated phagocytes and is only assembled upon cell activation. NADPH oxidase assembly and activation is elicited in response to both receptor-dependent and independent events. Examples of ROS are superoxide anion, hydrogen peroxide, oxidized halogens, hydroxyl radical, singlet oxygen (Babior, 1999b). Of these, the superoxide anion (O_2^-) is the first to be produced by one electron reduction of molecular oxygen. Superoxide anion serves as the precursor for the formation of other ROS. These oxygen metabolites are highly reactive and act as oxidizing agents, an essential property for the defense of the host against invading microorganisms and the development of malignancies (Klein, 1990; Salganik, 2001).

This large repertoire of responses is presumably initiated by binding of IFN- γ to a cell-surface receptor on PMN. More recently, basic studies on the IFN- γ gene and its receptor have been reviewed (Farrar *et al.*, 1993) as has the major contribution of the interferons to elucidation of the JAK-STAT pathway of cytokine-mediated signal transduction and transcriptional regulation. JAK-STAT pathway is used by over 50 cytokine, growth factors, and hormones to affect gene regulation. JAK-STAT signaling involves sequential receptor recruitment and activation of members of the Janus family of kinases (Jaks:Jaks 1-3 and Tyk2) and Stats (Stats 1-6, including Stat5a and Stat5b) to control transcription of targeted genes via specific response elements. As this signaling mechanism is a recurring theme amongst members of the cytokine receptor superfamily, IFN- γ induced Jak-Stat signaling has emerged as the global paradigm for class II cytokine receptor signal transduction (Schroder *et al.*, 2004). This study examined the effect of IFN- γ on phagocytosis and production of reactive oxygen and nitrogen production by neutrophils isolated from blood of mice.

Methods

Animals

Male BALB/C mice, aging about 8 weeks were used for all experiments as a source of blood neutrophils. They were obtained from the University animal center and kept in light/dark cycle with food and water *ad libitum*. Sheep red cells were obtained from a local animal center and stored in Alsever's medium.

Reagents and media

Superoxide dismutase (SOD), interferon-gamma (IFN- γ), ferricytochrome C, sodium pyruvate, penicillin, streptomycin sulfate, RPMI-1640 tissue culture medium, RPMI-1640 free phenol red tissue culture medium were obtained from Sigma Chemical Co (St Louis, MO, USA); Percoll, pH 8,5-9,5; fetal bovine serum from Life technologies (New York, NY, USA); sodium bicarbonate, isopropyl alcohol, hydrochloric acid and ethanol from Merck (Darmstadt, Germany); Phosphate buffered saline (PBS) containing 0.9% NaCl and 0.007 M phosphate buffer, pH 7.2 was used. Hank's 15mM HEPES medium was prepared as described in Paul (1970).

Preparation of mouse neutrophils from peripheral blood

Neutrophil isolation was performed as described in Boxio (2004). Mouse blood was collected by decapitation and put in HBSS-EDTA (without calcium, with magnesium, phenol red and sodium bicarbonate, pH 7.2, 15 mM EDTA, 1% bovine serum albumin (BSA)). After centrifugation (400 g, 10 min, 4°C) cells were resuspended in 1 ml HBSS-EDTA. The cells were layered onto a three-layer Percoll gradient of 78%, 69% and 52% Percoll, respectively diluted in HBSS (100% Percoll = nine parts Percoll and one part 10x HBSS) and centrifuged (1500 g, 30 min, at room temperature) without braking. The density of each Percoll layer was determined according to the manufacturer's instructions (52%, $\delta = 1.083$ g/ml; 69%, $\delta = 1.090$ g/ml; 78%, $\delta = 1.110$ g/ml). The neutrophils from the 69/78% interface and the upper part of the 78% layer were harvested into BSA 1%-coated tubes, after the cells from the upper phases were carefully removed. After one wash with 2ml HBSS-EDTA+1%BSA, the remaining red cells were eliminated by lysis with 0.83% NH_4Cl at pH 7.2 for 5 min. After a final wash with 2 ml HEPES buffer, the cells were suspended in 1 ml of HBSS and used within 4 hours.

Phagocytosis assay

Neutrophils (2×10^6) were adhered to the culture plates of 24 wells and incubated in an atmosphere of CO_2 at 37°C for 45 min with 500 μl of different phagocytic stimuli: immunocomplex of IgG bound to red blood cell-PKH26 (4×10^6), zymosan-FITC (50 μg), zymosan-FITC opsonized with complement (50 μg).

After incubation, the wells were washed to remove non-phagocytic stimuli. Red blood cells of the immune complexes bound to neutrophils were lysed with a hypotonic shock with a solution of PBS diluted 5x for 45 minutes and the osmolarity was restored by washing with

PBS, as described in Mantovani (1987). The cells were removed with bat latex, centrifuged, resuspended in 150µl of 1% formaldehyde and acquired on a flow cytometer (FACSCanto, BD Biosciences). For complete distinction between the fluorescent particles internalized and connected to the surface of neutrophils, the Trypan blue was used to eliminate fast (*quenching*) of fluorescence bound to the membrane. To ensure efficiency of the quenching and washing, a negative control of phagocytosis was performed in all experiments. To this end, neutrophils were incubated with phagocytic stimuli for 45 minutes at 4° C, where internalization of stimuli is inhibited, the binding of these occurring only the surface of neutrophils. The fluorescence of internalized particles by neutrophils was captured by flow cytometry (FACSCanto, BD Biosciences), after fluorescence quenching of particles bound to the neutrophils' surface with trypan blue. The results were analyzed with the software FACSDiva ® (BD Biosciences) and represented as mean fluorescence intensity (MIF) by neutrophils.

Superoxide anion production assay

Professional phagocytes (monocytes, macrophages, eosinophils and neutrophils) produce an extraordinary variety of highly reactive oxidizing agents known as reactive oxygen species (ROS). Neutrophils increase their oxidative metabolism during phagocytosis. Neutrophil O_2^- production was measured by the superoxide dismutase (SOD) inhibitable reduction of ferricytochrome *c* in a spectrophotometric assay as previously described by Johnston and Lehmeier (1986). Ferricytochrome *c* (800 µM) and SOD (15 µg/mL) were added to 2×10^5 PMNs in HBSS with calcium and magnesium, pH 7.4, and prewarmed in a water bath to 37°C for 5 min. Stimulants, opZy (0,5mg/ml) and PMA (3×10^{-4} M), were added in a volume of 100 µl and the suspension was incubated for 60 min at 37°C. The final assay volume was 1.0 ml. The reaction was stopped by placing the tubes in an ice bath, and the cells were immediately centrifugation. The absorbance of the supernatants was measured at 550 nm wavelength in a spectrophotometer and the nanomoles of O_2^- produced per 2×10^5 PMNs was calculated using the extinction coefficient $2.1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Hydrogen peroxide assay

Production of H_2O_2 was determined by the oxidation of phenol red by H_2O_2 -mediated HRPO (horseradish peroxidase type II) as described by Pick and Keisari (2008). This method is based on the oxidation of phenol red-dependent peroxidase, which results in the formation of a compound that increases in absorbance at 600-620 nm. Briefly, neutrophils (2×10^5 cell/ml)

were resuspended in assay solution containing 0.56mM of phenol red and 20 U/ml HRPO in HBSS with phenol red and seeded in tissue culture plates at a final volume of 100 μ l per well. The neutrophils were stimulated with opsonized particles of Zymosan (opZy) (0.5 mg/ml) or PMA (3×10^{-4} M) directly in the well. After incubation for 2 h, the reaction was stopped by addition of 10 μ L of 1 N NaOH per well and absorbance was read at 620 nm. Wells with NaOH added at the beginning of testing were used as blanks. The result were expressed as nmol $H_2O_2/2 \times 10^5$ cells, according to the standard curve of H_2O_2 (5 - 60 μ M) established for each experiment.

Release of hypochlorous acid

The production of HOCl was determined by the oxidation of taurine for HOCl. This reaction has the product taurine chloramine (TauCl). In the presence of iodide, the TauCl oxidizes the TMB (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine) to form a blue compost which is read spectrophotometer at a wavelength of 630nm (Dyrbukt *et al.*, 2005). For this, neutrophils (2×10^6) were incubated incubated for 2 hours at 37°C with IFN- γ 150U/mL in RPMI medium and after added the imunecomplex IgG antiOVA rabbit and 5 mM taurine for 60 minutes 37 ° C in an atmosphere saturated with water vapor. The final volume of the reaction was 1 mL. After the incubation period the plate was transferred to an ice bath and the reaction was terminated by addition of catalase 20 μ L (2mg/ml). The supernatant was collected and centrifuged at 730g for 10 min at 4° C. Accumulation TauCl was measured in 96-well microplate by adding 200 μ L of culture supernatant of neutrophils to 50 μ L of TMB 2mM [dissolved in 10% DMF (dimethylformamide), 100 μ M NaI and 400 mm acetic acid]. The result was expressed mM HOCl/ 2×10^6 célula according to the standard curve TauCl (5-120 μ M) established to each experiment. This standard curve was generated from the addition of concentrations known HOCl to a solution of 5 mM taurine.

Nitrite(NO₂⁻) determination as a measure of nitric oxide production

The production of nitric oxide was determined by the accumulation of nitrite as a stable end product of reaction of NO[•] with O₂ in aqueous solution. The accumulation of nitrite in culture supernatant was measured by Griess reaction, as described by Green (1984), with modifications. Briefly, neutrophils (2×10^5 cell) in RPMI 1640 medium without phenol red, supplemented with 10% FCS, penicillin (0.1 g/L), streptomycin (0.1 g/L), sodium pyruvate (0.11 g/L) and sodium bicarbonate (2.2 g/L) were transferred to culture plates and stimulated with opZy (0.5mg/ml) or PMA (3×10^{-4} M) for 180 minutes at 37°C, 5% CO₂ saturated with

water vapor. The final volume of this reaction was 500 μ L. Samples were removed from supernatant and incubated with an equal volume of Griess reagent (1% sulfanilamide/0.1%, N-1-naphthalenediamine dihydrochloride/2.5% H_3PO_4) at room temperature for 10 min. The absorbance at 550 nm was measured with a microplate reader. The concentration of NO_2^- was calculated from a sodium nitrite standard curve. The limit of detection was 0.4 μ M.

Immunophenotyping of neutrophils

The CD32/16 receptor expression, CD11 and dectin-1 was assessed by flow cytometry using the monoclonal antibody anti-CD32/CD16 FITC conjugated, anti-CD11b conjugated with PE (both 2 μ g/ml, BD Biosciences) and anti-dectin-1-rat Alexa Fluor 488 (1:200 dilution, Molecular Probes, Invitrogen, Eugene OR, USA). Briefly, neutrophils (1×10^6) in Hanks HEPES were centrifuged at 730 g for 5 min at 4°C and then fixed with 200 μ L of 2% paraformaldehyde. After 20 minutes incubation at room temperature, cells were washed with cold PBS containing 10% goat serum for 1 hour at room temperature. The staining was performed according to manufacturer's instructions. The reading was done on the device using FACSCanto and analysis by FACSDiva software (BD Biosciences). The results were expressed as the mean of fluorescence intensity (MIF).

Cytokine determination

The presence of cytokines on the supernatant was determined by a high-sensitivity sandwich ELISA using R&D Systems kit and the procedure was carried out according to the manufacturer's instructions; Tetramethylbenzidine TMB substrate reagent set (BD Biosciences; San Diego, CA) was used as chromogen and plates were read at 450 nm.

Analysis of mRNA - Expression by RT-PCR

Neutrophils were adhered to 12 wells plates at 2.5×10^6 /ml, washed with PBS to remove non-adhered cells had their RNAs isolated by Trizol, according to the manufacturer's instructions (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

Standard SYBR Green qRT-PCR was carried out to detect transcript levels in total cellular RNA from neutrophils. After RNA isolation, 1.2 μ g RNA of the individual samples was reverse transcribed using the Superscript III Reverse Transcriptase kit to the first strand cDNA and these cDNA were amplified by PCR performed with SYBR Green PCR Master Mix using the following primers: gp91^{phox} sense primer 5'-TTAGTGGGAGCAGGGATTGG-3' and gp91^{phox} anti-sense 5'-CCGGCATTGTTCTTCT-3'; and p47^{phox} sense primer 5'-

CGTACCCAGCCAGCACTATGT-3' and p47^{phox} anti-sense 5'-GCTGCCCGTCAAACCACTT-3'. These primers were specific for the published gp91^{phox} and p47^{phox} sequences (GenBank accession no. NM-000397 and NM-000265, respectively) designed using Primer Express version 2 software (Applied Biosystems) and optimized for use at a final concentration of 2.5 μ M. PCR assays were performed using an Applied Biosystems 7500 Sequence Detection system. The thermal cycling conditions of PCRs were as follows: 95°C for 3 min and 40 cycles of amplification comprising 95°C for 12 sec, 60°C for 30 sec, and 72°C for 30 sec. The real-time PCR was performed in triplicates. Internal control for equal cDNA loading in each reaction was assessed using the following primers: β -actin sense primer 5'-AGGGA AATCGTGCGTGACA-3' and β -actin anti-sense primer 5'-GAACCGCTCATTGCCGATA-3'. Linear standard curve analysis for each primer pair at a maximum 10⁻⁶ dilution of control pooled cDNA and primer amplification efficiency (*E*) greater than 0.96 was obtained for all PCR experiments. Several negative controls (amplification cycles with all primer sets with total RNA and without cDNA) were included in each experiment. Heat dissociation of the amplified DNA detected a single peak in all cases, indicating that a single, specific PCR product had been synthesized. This was confirmed by electrophoresis of PCR products, in which a single band of the expected molecular weight was observed. $\Delta\Delta$ Ct values were calculated, and the data were normalized to housekeeping gene mRNA (β -actin)

Actinomycin D and Cycloheximide pretreatment

Since the oxidative priming effect of IFN- γ required 2 h to be maximal, we hypothesized that protein synthesis may underlie the effect. Then we performed in vitro experiments with inhibitors of transcription and translation, actinomycin D and cycloheximide, respectively. These drugs were added in culture at a concentration of 0.2 g / ml of actinomycin D and 20 g / ml of cycloheximide, 30 minutes before the addition of IFN- γ . 150U/ml IFN- γ was then added to the tubes and all tubes were incubated for an additional 1 h. O₂⁻ production toward the stimulant Immune-complex IgG antiOVA rabbit was then measured.

Statistical Analysis

All values were expressed as means \pm SEM. Statistical significance was determined by Student's t-test or analysis of variance (ANOVA) followed by Student's t test, Mann-Whitney Rank Sum Test using Sigma stat software. Differences were considered significant at $p < 0.05$.

Results

Dose response curve

The experiment of Figure 1/A show a dose-response curve of neutrophils activated for 2 h with 150U/ml of IFN- γ on phagocytosis of EA (sheep red cells covered with IgG antibodies). A clear dose-response effect was noted with a threshold response at 10U/ml (the lowest concentration tested) and maximal at ≤ 300 U/ml.

Time course

Time course experiments utilizing a IFN- γ pretreatment concentration of 150U/ml and the stimulant IC-IgGantiOVA rabbit revealed that IFN- γ induced priming was significantly increased at all time points above the spontaneous priming that occurs as a result of 37°C pretreatment alone. (Fig 1/B). IFN- γ induced activation (priming) was detectable after an incubation period of as brief as 30 min and peaked at 2 h. A 2 h incubation period was therefore adopted for all subsequent experimentation.

IFN- γ enhance neutrophil phagocytosis

One of the functions of neutrophils is phagocytosis of foreign particles and this functions can be increased by several activators. Our initial goal was to observe the effect of IFN- γ on the phagocytosis of several different phagocytic stimuli (IC IgG, IC IgG opsonized with complement, zymosan, zymosan opsonized with complement, IC IgM and IC IgM opsonized with complement) by neutrophils purified from blood of mice and compared with the previous studies on the effect of IFN- γ in immune cells. In Figure 2 is possible to observe that incubation with IFN- γ was able to enhance phagocytosis mediated by neutrophils in almost all stimuli. This is shown by the increase in mean fluorescence intensity that reflects the amount of particles ingested by neutrophils, and percentage of phagocytosis, which reflects the amount of neutrophil phagocytic population, also increased. The phagocytosis of immune complex of IgM did not observe differences between activated neutrophils or not, but when this immune complex was opsonized with serum containing complement components, the percentage of phagocytosis and fluorescence intensity was increased only in the group incubated with IFN- γ .

Enhancement of PMN on superoxide release by IFN- γ .

The superoxide production was observed after 60 minutes of incubation with different stimuli using the method of Cytochrome *c*. We can see in Figure 3 that the populations of neutrophils activated with IFN- γ were able to increase production of superoxide after stimulated by different stimuli. No difference was observed in the production of superoxide when neutrophils were stimulated with IgG immune complex Fab'2 antiOva but when this immune complex was opsonized, the superoxide production increased significantly. This superoxide production is given only by the complement receptor as the Fc portion of immunoglobulin was not present.

IFN- γ enhanced the producyion of H₂O₂

IFN- γ is a general stimulant of the immune response and is capable of enhancing neutrophils oxidative burst and killing. Most of the oxygen consumed in the burst respiratory is directed to the formation of superoxide anion and subsequently reverted to the formation of hydrogen peroxide (H₂O₂) by dismutation process, which can be spontaneous, in neutral pH, or enzyme, through the action of superoxide dismutase (SOD) (Robinson, 2008). As observed for the release of superoxide, the contact of neutrophils with IFN- γ caused a significant increase in the release of hydrogen peroxide in almost all stimuli used (Figure 4). Contact with immune complex Fab'2 antiOva not occurred production of hydrogen peroxide but when this immune complex was opsonized with serum, production of peroxide increased significantly. Clearly, the complement receptor, only in neutrophils activated with IFN- γ was capable of producing reactive species on a smaller scale that immune complexes using a combination of receptors such as Fc and CR together.

Effect of IFN- γ in the release of hypochlorous acid

HOCl is a potent oxidant bactericidal produced of neutrophils formed from the oxidation of chloride ions catalyzed by myeloperoxidase in the presence of hydrogen peroxide. Therefore, HOCl production can be considered a reflection of the activity of the enzyme system mieloperoxidase/H₂O₂ (MPO/H₂O₂). We can see in Figure 5 that the populations of neutrophils activated with IFN- γ were able to increase production of HOCl after stimulated by different stimuli. No difference was observed in the production of HOCl when the neutrophils were stimulated with immune complex Fab'2 antiOva but when this opsonized immune complex production of this species increased significantly.

Effect of IFN- γ on the measure of nitric oxide

The production of nitric oxide was determined by the accumulation of nitrite (NO₂⁻), stable end product of the reaction of NO with O₂ in aqueous solution. The accumulation of nitrite in culture supernatants was measured by Griess reaction as described by Green *et al.* (1982). The contact of neutrophils with IFN- γ caused a significant increase in the release of nitric oxide in contact with almost all stimuli. Only in contact with the immune complex Fab'2 IgG linked to Ova was not such production in any population of neutrophils. We think that the production of reactive nitrogen species, as well as oxygen previously seen in neutrophils, is given by Fc receptor stimulation, which was not present in this immunocomplex. But when we activated the neutrophils with IFN- γ and stimulate the immune complex with IgG Fab'2 antiOva opsonized with complement, the production of nitric oxide showed a slight increase significantly and this has given only by a complement receptor (Figure 6).

Effect of IFN- γ on the expression of phagocytic receptors CD32/CD16 (Fc γ RII / III), CD11b (CR3) and dectin-1

In order to unravel the mechanism by which phagocytosis may have been increased by incubation with IFN- γ , we evaluated the effect of IFN- γ on the expression of phagocytic receptors important in the recognition of the stimuli used. Dectin-1 receptor is important in the recognition of β -glucans present in zymosan; receptors Fc γ RII / III (CD32/CD16) are critical in Fc γ binding portion of IgG in immune complexes, and CD11b is the α subunit of complement receptor CR3, important in the internalization of particles opsonized with C3bi. In examining figure 7, we observed that IFN- γ caused a significant increase in the expression of dectin-1, Fc γ RII / III and CD11. This suggests that the increased phagocytosis and production of reactive species observed in neutrophils activated with IFN- γ for 2 hours may be a consequence of increased receptor expression in this cell activated.

Effect of IFN- γ on cytokine release by neutrophils

Neutrophils stimulated with IFN- γ released pro-inflammatory cytokines, IL-6 and TNF- α , which act in autocrine and paracrine activation of neutrophils in the local inflammatory response that helps to contain infection and induction of T cell responses by Already the stimulation of two populations of neutrophils with anti Fab'2 Ova and Ova Fab'2 anti opsonized, by contrast, did not produce cytokines in significant values. Possibly only the complement receptor was not sufficient to trigger cytokine production in this cell (Figure 8).

Effect of IFN- γ on mRNA expression of NADPH oxidase subunits

Given that the incubation with IFN- γ promoted an increase in the release of superoxide anion, hydrogen peroxide, hypochlorous acid and nitric oxide, we evaluated whether incubation with IFN- γ was able to alter the expression of components of NADPH oxidase in neutrophils activated. For this, we examined the mRNA expression of two subunits of the NADPH oxidase - gp91^{phox}, p47^{phox}. Both subunits were demonstrated to be essential for the activity of the NADPH complex (Johnson et al., 1998, Sheppard et al., 2005, Raad et al., 2009). From Figure 9, we observed that the population of activated neutrophils with IFN- γ was an increase in the expression of gp91^{phox} and p47^{phox} subunits. This suggests that the increased release of reactive species observed in neutrophils activated with IFN- γ may be a consequence of increased mRNA expression of gp91^{phox} and p47^{phox} subunits which can result in increased protein expression of these components, which consequently causes an increase in assembly of functional NADPH oxidase enzyme complex.

Effect of inhibitors of transcription and translation into action of IFN- γ on release of superoxide

Since the priming effect of IFN- γ required 2 h to be maximal, we hypothesized that protein synthesis may underline the effect. Therefore, experiments utilizing a 30 min preincubation with actinomycin D (0,2 g/ml, Sigma), a specific inhibitor of mRNA synthesis, and cycloheximide (20g/ml, Sigma), a specific inhibitor of protein synthesis, were performed. These experiments indicated that both of these processes are required for the priming effect of IFN- γ (Figure 10).

Discussion

Interferon- γ is a 17-kd glycoprotein produced by activated T lymphocytes and initially characterized for its antiviral and T lymphocyte proliferation activity. Recent investigation has focused on its proinflammatory role, which appears to be mediated via interaction with two target phagocytic cells, macrophages and PMNs. (Vilcek, 1985; Murray, 1988). Although T lymphocytes have traditionally been associated with aspects of chronic, and not acute, inflammation, the effects of IFN- γ on PMNs may exemplify T lymphocyte involvement in the acute inflammatory process. Interferon- γ has been shown to modulate many aspects of *in vitro* and *in vivo* PMN function. It can increase adherence, enhance phagocytic and microbicidal activity, and augment antibody-dependent cellular cytotoxicity (Perussia, 1987; Shalaby, 1985; Bazzoni, 2009). Since the latter two PMN functions share a dependence on generation of

oxidants, the finding of several investigators that IFN- γ increased PMN oxidant generation may provide one mechanism for these effects. (Berton et al, 1986; Lappegard et al, 1988; Yoshimura et al, 2007, Yin, 2009). Our goal in this study was evaluate the ability of IFN- γ to primer the PMN functions of oxidative burst and phagocytosis.

In this study, we have confirmed that IFN- γ primes the oxidative (O_2^-) responses and the phagocytic of normal PMNs. Activation was characterized by a dose-response effect that peaked at 150U/ml for 2×10^6 cells/ml utilized. These concentrations are physiologically relevant because they are similar to those measured in serum and synovial fluid of rheumatoid arthritis patients (Cesario et al, 1983; Vervliet & Shandene, 1985). Priming was optimal after a 2 h incubation, considerably longer than that for traditional inflammatory mediators including LPS, C5a and TNF. (Guthrie et al, 1984; Tennenberg, 1990).

To investigate the effect of IFN- γ on the phagocytic activity of PMNs, we have performed *in vitro* experiments, incubating neutrophils with 150U/ml of IFN- γ for 2 h at 37°C, before doing the phagocytosis assays. The IFN- γ alone increased capacity these PMNs to phagocytize red cells opsonized by IgG and complement. The cells interact with this immune complex through its *Fc γ* not inhibitory membrane receptors specific for the Fc region of IgG antibodies, triggering the activation of the NADPH oxidase enzymatic complex. One of functions of phagocytosis is to eliminate foreign particles primarily through his capture, followed by their destruction within the phagocytes. (Underhill, 2002). The effects of IFN- γ on neutrophil respiratory burst were confirmed with the use of SOD inhibitable reduction of ferricytochrome C assay, as previously described by Johnston and Lehmeier in 1976. King et al, 2008 showed that the respiratory oxygen burst is associated with microbial killing or phagocytosis. Our results showed that the preincubation with IFN- γ before the assay, resulted in a increased superoxide anion generation by stimulation with immune complex of IgG and ovalbumine. Coontrary to our results, Steinbeck *et al* in 1986 were unable to show an effect of recombinant bovine IFN- γ on the respiratory burst of bovine neutrophils. In their studies the cells were preincubated with IFN- γ for 3,5 h. It is possible that the bovine neutrophils have entered in apoptosis because in this experiment a time dependent effect was not studied. Reeves and colleagues (2002) demonstrated that neutrophils are capable of producing large quantities of O_2^- , ranging from 1 to 4 M/L. (Reviewed by Segal, 2005).

Most of the oxygen consumed in the respiratory burst is directed to the formation of superoxide anion and subsequently reverted to the formation of hydrogen peroxide (H_2O_2) by dismutation process, which can be spontaneous, in neutral pH, or enzymatic, through the action of superoxide dismutase (SOD) (Robinson, 2008). We showed that mice neutrophils

incubated with 150U/ml IFN- γ for 2 h showed an enhanced production of H₂O₂ when these cells were stimulated by immune complex of IgG and ovalbumine. Similar results were obtained by Kowanko *et al.*, (1987) show that neutrophils activated with IFN- γ in contact with PMA increased H₂O₂ production. Other reports showed that neutrophils incubated for 4 h in presence of 50U/ml IFN- γ enhanced produce H₂O₂ in response to different stimuli such as Con A (up to 200 μ g/ml) FMLP and PMA (Cassatela *et al.*, 1995; Berton *et al.*, 1986).

Although hydrogen peroxide is a weak microbicidal agent, it may be the precursor of highly potent oxidants, such as oxidized halogen (Cl, Br-and SCN⁻). The latter are produced when a halogen anion reacts with H₂O₂ in a reaction catalyzed by myeloperoxidase (MPO) (Ottonello *et al.*, 1997). In general, the peroxidase in the presence of H₂O₂ catalyzes the oxidation of halogens, being HOCl the most powerful oxidant produced (Hampton *et al.*, 1998). Therefore, HOCl production can be considered a reflection of the activity of the enzymatic system myeloperoxidase/H₂O₂ (MPO/H₂O₂). The presence of this oxidant and secondary products have been demonstrated in tissue damage in inflammatory diseases (Malle *et al.*, 2007). Our results showed a significant increase in the release of HOCl, correlated with that of O₂⁻, upon stimulation of the cells with immune complex of IgG and ovalbumine. Diamond *et al.*, (1991) showed that IFN- γ induced increased HOCl production and H₂O₂ in contact with *Candida albicans*.

Another reactive species evaluated in this study was nitric oxide. The nitric oxide is produced by phagocytes from L-arginine, oxygen and NADPH by the action of the enzyme nitric oxide synthase. A induced form of this enzyme is stimulated by a variety of endotoxins and cytokines as IFN- γ (Leanza *et al.*, 2007; Moncada and Higgs, 1993). In the blood vessels, NO acts as a vasodilator; in the nervous system as a neurotransmitter; in phagocytes and it can act as a precursor to peroxynitrite (ONOO⁻) (Babior, 1999). Considering that O₂⁻ together with NO is an important intermediate for the production of peroxynitrite, and since IFN- γ causes increased in the release of O₂⁻ by neutrophils, we also investigated whether NO release was also affected by IFN- γ . As observed for others reactive species analyzed, the release of NO was increased by action of IFN- γ . Albieri (2005) showed that trophoblast can generate nitric oxide and express inducible isoform of nitric synthase (iNOS) and this production was changed by the presence of IFN- γ .

The complex of NADPH oxidase is considered the most important enzyme complex involved in the generation of reactive oxygen species present in phagocytes (Forman *et al.*, 2001). This complex is composed of subunits cytoplasmic and components anchored to plasma membrane. After stimulation of phagocytes by an appropriate stimulus, the cytoplasmic

subunits are translocated to the membrane and this enzyme complex becomes activated and begins to synthesize superoxide anion. As this study demonstrated that IFN- γ was able to increase phagocytosis and production of reactive oxygen and nitrogen in activated neutrophils, and considering that the production of these species is a reflection of the activity of the enzyme complex NADPH oxidase, we decided to investigate whether the incubation with IFN- γ alters gene expression of subunits of this complex. For this, we examined the mRNA expression of two subunits of the NADPH oxidase - gp91^{phox}, p47^{phox}. Both subunits were demonstrated to be essential for the activity of the NADPH complex (Johnson et al., 1998, Sheppard et al., 2005, Raad et al., 2009). From Figure 9, we observed that the population of activated neutrophils with IFN- γ was an increase in mRNA expression of gp91^{phox} and p47^{phox} subunits. This suggests that the increased release of reactive species observed in neutrophils activated with IFN- γ may be a consequence of increased mRNA expression of gp91^{phox} and p47^{phox} subunits which can result in increased protein expression of these components, which consequently causes an increase in assembly of functional NADPH oxidase enzyme complex. According to Johnson et al. (1998), the p47^{phox} subunit has a key role for the cytoplasmic translocation of the other subunits and the assembly of the NADPH oxidase complex. However, as we do not know the rates of turnover for both mRNA and protein subunit of this, it becomes difficult to estimate whether the increase in mRNA expression results in an equal increase in protein levels. Also one must consider that the functionality of the enzyme complex NADPH oxidase is under a fine control and involves several signaling pathways, including stimulation of G protein-coupled receptors, phospholipase C, release of diacylglycerol and calcium, protein kinase C phosphorylation subunit p47^{phox} in at least three serine residues - Ser379, Ser359 or Ser370, Ser303 (Thelen et al., 1993, Johnson et al., 1998). Considering that the interaction of Fc γ receptors with the Fc portion of IgG, when it is complexed with antigen in the form of IC, culminating in the phagocytic process and the assembly of the enzyme complex NADPH oxidase, we decided to investigate whether the increase in the percentage of phagocytosis in neutrophils activated with IFN- γ to be correlated with the expression of receptors Fc γ RII / III (CD 32/16), CD11b (CR3) and dectin-1. The receptor Fc γ RIIb predominates in neutrophils with 3x10⁶ molecules / cell, compared with the Fc γ RIIa 2x10⁴ molecules / cell (Marzocchi-Machado and Lucisano-Valim, 2005). The results of this study show that the mechanisms by which IFN- γ acts in increased phagocytosis by neutrophils appear to be activated by increasing the expression of dectin-1, CD11 and Fc γ RII / III (Fig. 7). Some studies on changes in phagocytic receptors have focused on the effect of IFN- γ . Our results confirm data in the literature; Jayaram, Buckle and Hogg (1989) showed an

increased expression of Fc γ RII / III, also of Fc γ RI (CD64) only after 12 hours of culture in HL60 cells. The expression of CD11b (CR3) and CR1 were not altered after contact with IFN- γ , however, were quickly induced by the contact of GM-CSF (granulocyte colony stimulating factor and monocytic), a potent regulator of hematopoiesis.

This study evaluated the release of cytokines in the supernatants of cultivates of neutrophils activated with IFN- γ and stimulated with different phagocytic stimuli. Neutrophils stimulated with IFN- γ released pro-inflammatory cytokines, IL-6 and TNF- α , which act in autocrine and paracrine activation of neutrophils in the local inflammatory response that helps to contain infection and of the induction of T cell responses. The two populations of neutrophils estimated with IC Fab'2 IgG opsonized, did not produce cytokines in significant values (Figure 8). Possibly only the complement receptor was not sufficient to trigger cytokine production in this cell. These changes show that IFN- γ possibly induces a regulatory phenotype in neutrophils, which has increased phagocytic capacity, greater release of anti-inflammatory cytokines.

Finally, as the priming effect of IFN- γ required 2 h to reach the maximum effect, we hypothesized that protein synthesis may be involved in this effect. Therefore, experiments utilizing a 30 min preincubation with actinomycin D and cycloheximide, were performed. Each of these agents completely blocked the effect of IFN- γ when neutrophil were stimulated by immune complex of IgG and ovalbumine. These experiments indicated that both of these processes are required for the priming effect of IFN- γ . Guthrie (1984) and Berkow (1987) also showed that inhibitors of these processes completely blocked the effect of IFN- γ . This indicates that the mechanism for the effect of IFN- γ is dependent on de novo mRNA and protein synthesis. Currently, several studies have correlated this effect of IFN- γ . (Yate-Pearl, 2007; Bazzoni, 2009).

Finally, neutrophils are the first cells to respond to an infection. It is logical to think that the cells respond to environmental conditions and to other immune cells, such as T cells, B cells and macrophages. Interferon-gamma is mainly secreted by T cells and macrophages upon their stimulation. We showed in the present study that this cytokine can enhance the oxidative burst and phagocytosis by mice neutrophils mediated by Fc γ receptors.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) and Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Assistência do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de

Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FAEPA) for support. We are grateful to José A. da Silva and Victor Dias Galban for technical assistance.

Declaration of interest: The authors report no conflicts of interest.

This work agrees with the Ethical Principles in Animal Research adopted by Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA). It was approved in 04/27/2009, protocol number 053/2009.

REFERENCES

ALBIERI A, HOSHIDA MS, GAGIOTI SM, LEANZA EC, ABRAHAMSOHN I, CROY A, ASHKAR AA, BEVILACQUA E. Interferon-gama alters the phagocytic activity of the mouse trophoblast. *Reprod. Biol. Endocri.* 2005, 3: 34.

BABIOR BM. NADPH Oxidase: An Update. *Blood.* 1999b, 93(5): 1464-1476.

BABIOR BM. The production and use of reactive oxidants by phagocytes. In *Reactive oxygen species in biological systems*, edited by Gilbert and Colton. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, 1999.

BAZZONI F, ROSSATO M, FABBRI M, GAUDIOSI D, MIROLO M, MORI L, TAMASSIA N, MANTOVANI A, CASSATELLA MA, LOCATI M. Induction and regulatory function of miR-9 in human monocytes and neutrophils exposed to proinflammatory signals. *PNAS.* 2009, 106: 5282-5287.

BERKOW RL. Enhancement of neutrophil superoxide production by preincubation with recombinant human tumor necrosis factor. *J Immunol.* 1987.

BERTON G, ZENI L, CASSATELLA MA, ROSSI F. Gamma interferon is able to enhance the oxidative metabolism of human neutrophils. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 1986, 138: 1276.

BOXIO R, BOSSENMEYER-POURIÉ C, STEINCKWICH N, DOURNON C, NUBE O. Mouse bone marrow contains large numbers of functionally competent neutrophils. *J Leuk Biol.* 2004, 75:

CASSATELLA MA. The production of cytokines by polymorphonuclear neutrophils. *Immunol Today.* 1995, 16: 21-26.

CESARIO TC, ANDREWS BS, MARTIN DA, JASON M, TREADWELL T, FRIOU B, TILLES JG. Interferon in synovial fluid and serum of patients with rheumatic disease. *J. Rheumatol.* 1983, 10: 6470.

DIAMOND RD, LYAMAN CA, WYSONG DR. Disparate effects of interferon- γ and tumor necrosis factor- α on early neutrophil respiratory burst and fungicidal responses to *Candida albicans* hyphae in vitro. *J. Clin. Invest.* 1991, 87: 711-720.

DYPBUKT JM, BISHOP C, BROOKS WM, THONG B, ERIKSSON H, KETTLE AJ. A sensitive and selective assay for chloramines production by myeloperoxidase. *Free Radical Biology and Medicine*, 2005, 39: 1468-1477.

ELLIS TN, BEAMAN BL. Interferon- γ activation of polymorphonuclear neutrophils function. *Immunology* 2004, 112: 2-12.

FARRAR MA, SCHREIBER RD. The molecular cell biology of interferon- γ and its receptor. *Annu. Rev. Immunol.* 1993, 11:571-611.

FORMAN HJ, TORRES M. Redox signaling in macrophages. *Mol Aspects Med.*, 2001, 22, n. 4-5: 189-216.

GREEN LC, WAGNER DA, GLOGOWSKI J, SKIPPER PL, WISHNOK JS, GUTHRIE LA, McPHAIL L, HENSON PH, JOHNSTON RB. Priming of neutrophils for enhanced release of oxygen metabolites by bacterial lipopolysaccharide: evidence for increased activity of the superoxide producing enzyme. *J. Exp. Med.* 1984, 160: 1656-1671.

GUTHRIE LA, McPHAIL L, HENSON PH, JOHNSTON RB. Priming of neutrophils for enhanced release of oxygen metabolites by bacterial lipopolysaccharide: evidence for increased activity of the superoxide producing enzyme. *J. Exp. Med.* 1984, 160: 1656-1671.

HAMPTON MB, KETTLE AJE, WINTERBOUM CC. Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. *Blood*, 1998, 92(9): 3007-3017.

HANSEN BD, FINBLOOM DS. Characterization of interaction between recombinant human interferon- γ and its receptor on human polymorphonuclear leukocytes. *J. Leukoc Biol*, 1990, 47:64-69.

HARTNELL A, KAY AB, WARDLAW AJ. IFN- γ induces expression of Fc γ RIII (CD16) on human eosinophils. *J. Immunol.* 1992, 148: 1471-1478.

HUBER-LANG M, YOUNKIN EM, SARMA JV, RIEDEMANN N, McGUIRE SR, LU KT, KUNKEL R, YOUNGER JG, ZETOUNE FS, WARD PA. Generation of C5a by phagocytic cells. *Am. J. Pathol.* 2002, 161: 1849-59.

ITZHARI R F, GILL DM. A micro-biuret method for estimating proteins. *Anal Biochem*, 1964, 9: 401-10.

JOHNSON JL, PARK JW, BENNA JE, FAUST LP, INANAMI O, BABIOR BM. Activation of p47(PHOX), a cytosolic subunit of the leukocyte NADPH oxidase. Phosphorylation of ser-359 or ser-370 precedes phosphorylation at other sites and is required for activity. *J Biol Chem.*, 1998, 273, n. 52: 35147-52.

JOHNSTON R BJR; LEHMEYER JE. Elaboration of toxic oxygen by-products by neutrophils on a model of immune complex disease. *J Clin Invest*, 1976, 57: 836:841.

KAIM U, MORITZ A, FAILING K, BAUMGARTNER W. The regression of a canine langerhans cell tumours is associated with increased expression of IL-2, TNF- α , IFN- γ and iNOS mRNA. *Immunol.* 2006, 118: 472-482.

KING P, WOOD VB, HUTCHINSON P, BROWNE R, HOLMES P, FREEZER N, HOLDSWORTH S. Bactericidal activity of neutrophils with reduced oxidative burst from adults with bronchiectasis. *APMIS*. 2009, 139: 117-133.

KLEIN J. Defence reactions mediated by phagocytes. In: *Immunology*, 1st edition, Blackwell Scientific, 1990.

KOWANKO IC, FERRANTE A. Stimulation of neutrophil respiratory burst and lysosomal enzyme release by human interferon- γ . *Immunol*, 1987, 62:149.

LAPPEGÅRD KT, BENESTAD HB, ROLLAG H. Interferons affect oxygen metabolism in human neutrophil granulocyte. *J Interferon Res*. 1988, 5: 665-77.

LEANZA EC, HOSHIDA MS, COSTA AF, FERNANDES CM, TEIXEIRA CFP, BEVILACQUA E. Signaling molecules involved in IFN- γ inducible nitric oxide synthase expression in the mouse trophoblast. *Amer. J. Rep. Immuno*, 2007, 58: 537-546.

MALLE E, FURTMULLER PG, SATTLER W, OBINGER C. Myeloperoxidase: a target for new drug development. *Br J Pharmacol.*, 2007, 152(6):838-854.

MANTOVANI B. Different roles of IgG and complement receptors in phagocytosis by polymorphonuclear leukocytes. *J. Immunol*. 1975, 115: 15-17.

MANTOVANI B. Phagocytosis of immune complex mediated by IgM and C3 receptors by macrophages from mice treated with glycogen. *J. Immunol*. 1981, 126:127-130.

MARZOCCHI-MACHADO CM, LUCISANO-VALIM YM. Receptores para Imunoglobulina G (Fc γ R). *Medicina (Ribeirão Preto)*, 2005, 38: 82-95.

MASSEY V. The microestimation of succinate and the extinction coefficient of cytochrome c. *Biochimica et biophysica acta*, 1959, 34: 255-256.

MONCADA S, HIGGS A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med*. 1993, 329(27):2002-12.

MURRAY HW, NATHAN CF. In vivo killing of intracellular visceral *Leishmania donovani* by a macrophage-targeted hydrogen peroxide-generating system. *J Infect Dis*. 1988, 158(6):1372-5.

NEWBURGER PE, EZEKOWITZ RA, WHITNEY C, WRIGH J, ORKIN SH. Induction of phagocyte cytochrome b heavy chain gene expression by interferon- γ . *Proc. Natl. Acad. Sci USA*. 1988, 85: 5215.

OTTONELLO L, BARBERA P, DAPINO P, SACCHETTI C, DALLEGRI F. Chemoattractant-induced release of elastase by lipopolysaccharide (LPS)-primed neutrophils; inhibitory effect of the anti-inflammatory drug nimesulide. *Clin Exp Immunol*, 1997, 110(1):139-43.

PAUL, J. Media for culturing cells and tissues. *Cell and tissue culture*. E & S Livingstone, Edinburgh and London, 1970.

PERUSSIA B, KOBAYASHI M, ROSSI ME, ANEGON I, TRINCHIERI G. Immune interferon enhanced functional properties of human granulocytes: role of Fc receptors of ltmphotoxin, tumor necrosis factor and granulocyte macrophages colony-stimulant factor. *The J. Immunol.* 1987, 138: 765-774.

PICK E, KEISARI Y. A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen
ROBINSON JM. Reactive oxygen species in phagocytic leukocytes. *Histochem Cell Biol.*, 2008, 130: 281–297.

RAAD H, PACLET MH, BOUSSETTA T, KROVIARSKI Y, MOREL F, QUINN MT, GOUGEROT-POCIDALO MA, DANG PM, EL-BENNA J. Regulation of the phagocyte NADPH oxidase activity: phosphorylation of p91phox/NOX2 by protein kinase C enhances its diaphorase activity and binding to Rac2, p67phox, and p47phox. *The FASEB Journal*, 2009, 23: 1011-1022.

ROBINSON JM. Reactive oxygen species in phagocytic leukocytes. *Histochem Cell Biol.*, 2008, 130: 281–297.

RYU SY, JEONG KS, KANG BN, PARK S J, YOON WK, KIN SH. Modulation of transferrin synthesis, transferrin receptor expression, iNOS expression and NO production in mouse macrophages by cytokines, either alone or in combination. *Anticancer Res*, 2000, 20: 3331-3338.

SALGANIK RI. The benefits and hazards of antioxidants: controlling apoptosis and other protective mechanisms in cancer patients and the human population. *J Amer Col Nutri.* 2001, 20: 464-475.

SCHRODER K, HERTZOG PJ, RAVASI T, HUME DA. Interferon- γ : an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leuk Biol*, 2004, 75.

SEGAL AW. How neutrophils kill microbes. *Annu Rev Immunol.*, 2005, 23:197-223.

SHEPPARD FR, KELHER MR, MOORE EE, MCLAUGHLIN NJ, BANERJEE A, SILLIMAN CC. Structural organization of the neutrophil NADPH oxidase: phosphorylation and translocation during priming and activation. *J Leukoc Biol.*, 2005, 78, n. 5:1025-42.

SHALABY MR, AGGARWAL BB, RINDERKNECHT E, SVEDERSKY LP, PALLADINO MA. Activation of human polymorphonuclear neutrophils functions by interferon-gamma and tumor necrosis factors. *J. Immunol*, 1985, 135: 2069.

STEINBECK MJ, ROTH JA, KAEBERLE ML. Activation of bovine neutrophils by recombinant gamma interferon. *Cellular Immunol.* 1986, 98: 137-144.

TANNENBAUM SR. Analysis of nitrate, nitrite, and [^{15}N]nitrate in biological fluids. *Anal Biochem.*, 1982, 126(1):131-8.

THELEN M, DEWALD B, BAGGIOLINI M. Neutrophil signal transduction and activation of the respiratory burst. *Physiol Rev.* 1993, 73 (4): 797-821.

TENNENBERG SD, FEY DE, LIESER MJ. Oxidative priming of neutrophils by interferon- γ . *J. Leuk. Biol.* 1993, 53:

UNDERHILL DM, OZINSKY A. Phagocytosis of microbes: complexity in action. *Annu Rev Immun.* 2002, 20: 825-52.

VERVLIET G, SCHANDENÉ L. In vitro correction of the interleukin-2 and interferon-gamma defect in multiple sclerosis. *Clin Exp Immunol.* 1985, 61(3): 556-61.

VILCEK J, HENRIKSEN-DESTEFANO D, SIEGEL D, KLION A, ROBB RJ, LE J. Regulation of IFN-gamma induction in human peripheral blood cells by exogenous and endogenously produced interleukin 2. *J Immunol.* 1985, 135(3):1851-6.

YAFE-PEARL M, FABIAN I, HALPERIN D, FLATAU E, WERBER S, SHALIT I. Interferon- γ and bacterial lipopolysaccharide act synergistically on human neutrophils enhancing interleukin-8, interleukin-1 β , tumor necrosis factor- α and interleukin-12 P70 secretion and phagocytosis via upregulation of toll-like receptor4. *Shock*, 2007, 27: 226:231.

YIN J, FERGUSON TA. Identification of IFN- γ producing neutrophil early in the response to *Listeria monocytogenes*. *J. Immunol.* 2009, 182: 7069-7073.

YOSHIMURA T, TAKAHASHI M. IFN- γ mediated survival enables human neutrophils to produce MCP-1/CCL2 in response to activation by TLR ligands. *J. Immunol.* 2007, 179: 1942-1949.

Legends

Figure 1A/B. Curve of concentration and incubation time with IFN- γ . PMNs were purified second Boxi, 2004. Neutrophils at rest (white bars) and neutrophils activated with IFN- γ (black bars) were incubated with IgG immune complex to erythrocyte-bound PKH26 for 45 minutes at 37 ° C. Stimuli linked to neutrophils were only eliminated by quenching of fluorescence by the addition of Trypan blue. The fluorescence present in neutrophils was evaluated by flow cytometry and data were plotted as% of phagocytosis, which reflects the number of neutrophils that are phagocytosing. The graphs represent the mean + standard error of mean (n = 4-5), * p <0.05 (One Way ANOVA test).

Figure 2. Effect of IFN- γ on neutrophil phagocytosis. PMNs were purified second Boxi, 2004 and were then incubated with 150U/ml IFN- γ for 2 hours prior to testing of phagocytosis. Then, the activated neutrophils were incubated or not with immune complex stimulation of IgG and IgM bound to erythrocyte-PKH26 (CI), immune complex of IgG and IgM bound to erythrocyte-PKH26 and opsonized with complement (IC-C), zymosan-FITC (zy) or FITC-zymosan opsonized with complement (op zy) for 45 minutes at 37 ° C. The particles only bound to neutrophils were eliminated by lysis of erythrocytes and fluorescence quenching by the addition of Trypan blue. The fluorescence present in neutrophils was evaluated by flow cytometry and data were plotted as% of phagocytosis, which reflects the number of neutrophils that are phagocytosing and as mean fluorescence intensity, which reflects the amount of stimulus ingested by neutrophils. The graphs represent the mean + standard error of mean (n = 4-5), * p <0.05 (One Way ANOVA test).

Figure 3. Effect of IFN- γ on the release of superoxide by neutrophils. The PMN were incubated with 150U/ml IFN- γ for 2 hours prior to testing. Then, the activated neutrophils were incubated or not with the stimuli of IgG immune complex bound to Ova (CI), immune complex of IgG bound to Ova opsonized with complement (IC-C), zymosan (zy), zymosan opsonized with complement (op zy) , immune complex of IgG bound to Fab'2 Ova (IC) or immune complex bound to the Fab'2 Ova opsonized with complement for 60 minutes at 37 ° C. Data were plotted as nmol of superoxide produced by neutrophils 2×10^6 . The graphs represent the mean + standard error of mean. * P <0.05. (One Way ANOVA test).

Figure 4. Effect of IFN- γ on the release of hydrogen peroxide by neutrophils. The PMN were incubated with 150U/ml IFN- γ for 2 hours prior to testing. Afterwards, the activated neutrophils were incubated or not with the stimuli of IgG immune complex bound to Ova (CI), immune complex of IgG bound to Ova opsonized with complement (IC-C), zymosan (zy), zymosan opsonized with complement (op zy), immune complex of IgG bound to Fab'2 Ova (IC) or immune complex bound to the Fab'2 Ova opsonized with complement (IC-C) for 60 minutes at 37 ° C. Data were plotted as mol of hydrogen peroxide produced. The graphs represent the mean + standard error of mean. * P <0.05. (One Way ANOVA test).

Figure 5. Effect of IFN- γ on the release of hypochlorous acid by neutrophils. The PMN were incubated with 150U/ml IFN- γ for 2 hours prior to testing. Afterwards, the activated neutrophils were incubated or not with the stimuli of IgG immune complex bound to Ova (CI), immune complex of IgG bound to Ova opsonized with complement (IC-C), zymosan (zy), zymosan opsonized with complement (op zy), immune complex of IgG bound to Fab'2 Ova (IC) or immune complex bound to the Fab'2 Ova opsonized with complement (IC-C) for 60 minutes at 37 ° C. Data were plotted as $\mu\text{M}/2 \times 10^6$ neutrophils hypochlorous acid produced. The graphs represent the mean + standard error of mean. * P <0.05. (One Way ANOVA test).

Figure 6. Effect of IFN- γ on nitric oxide release by neutrophils. The PMN were incubated with 150U/ml IFN- γ for 2 hours prior to testing. Afterwards, the activated neutrophils were incubated or not with the stimuli of IgG immune complex bound to Ova (CI), immune complex of IgG bound to Ova opsonized with complement (IC-C), zymosan (zy), zymosan opsonized with complement (op zy), immune complex of IgG bound to Fab'2 Ova (IC) or immune complex bound to the Fab'2 Ova opsonized with complement (IC-C) for 60 minutes at 37 ° C. Data were plotted as mM of nitric oxide produced by neutrophils 2×10^6 . The graphs represent the mean + standard error of means. * P <0.05. (One Way ANOVA test).

Figure 7. Effect of IFN- γ receptor expression in phagocytic neutrophils from mice. A, B) graph representative SSC-A (Side-scattered light lateral diffusion of light)-H vs FSC (Forward-scattered light diffusion front of the light) from the gate set to select the population of granulocytes. C) or not activated neutrophils were incubated with primary anti-dectan-1 followed by incubation with secondary antibody conjugated with antibodies or conjugated CD32/CD16-FITC for the marking of Fc γ RII / III and CD11-PE to mark the receptor CR3

complement. Data are plotted as median fluorescence intensity (MFI) observed by flow cytometry. The graph represents the mean + standard error of means (n = 4-6 per group in duplicate). * P <0.05, ANOVA.

Figure 8. Effect of IFN- γ on the release of IL-6 and TNF- α by activated neutrophils. Neutrophils were purified second Boxi, 2004. Neutrophils were activated or not for 2 hours with 150U/ml IFN- γ before the test. After the neutrophils were incubated with IgG immune complex stimuli on OA (IC), immune complex of IgG bound to OA opsonized with complement (IC-C), zymosan (zy), zymosan opsonized with complement (op zy), immune complex of Fab '2 IgG bound to OA (IC) or immune complex bound to Fab'2 OA opsonized with complement for 24 hours at 37 ° C. After the culture supernatant was harvested and the presence of IL-6 and TNF- α was tested by ELISA. The graphs represent the mean + standard error of means (n = 6-8 per group in duplicate). * P <0.05 - ANOVA.

Figure 9. Effect of IFN- γ on the expression of the subunits of the enzyme complex NADPH oxidase. Neutrophils resting and activated with IFN- γ had their RNAs extracted by Trizol ®, and mRNA encoding subunits of NADPH oxidase complex were amplified by real time PCR. The amounts of mRNA of gp91phox and p47phox were normalized for the amounts of mRNA endogenous control β actin, which is constitutively expressed by cells. The graph represents the mean \pm standard error of means (n = 6-12 in triplicate) * p <0.05 (ANOVA).

Figure 10. Effect of actinomycin D and cycloheximide on the release of superoxide by activated neutrophils with IFN- γ . Before activation with IFN- γ , neutrophils were pre-incubated 30 minutes in RPMI medium (resting and activated), Actinomycin D (actin, 0.2 g / ml) and cycloheximide (Cycle, 20g/ml). After that time, was added 150U/ml IFN- γ to the tubes and incubated for an additional period of 2 h. Neutrophils were stimulated with OVA immune complex and production of superoxide was evaluated by the cytochrome. The graph represents the mean \pm standard error of means (n = 6-8 in duplicate) * p <0.05, ANOVA.

FIGURES

Figure 1. A/B

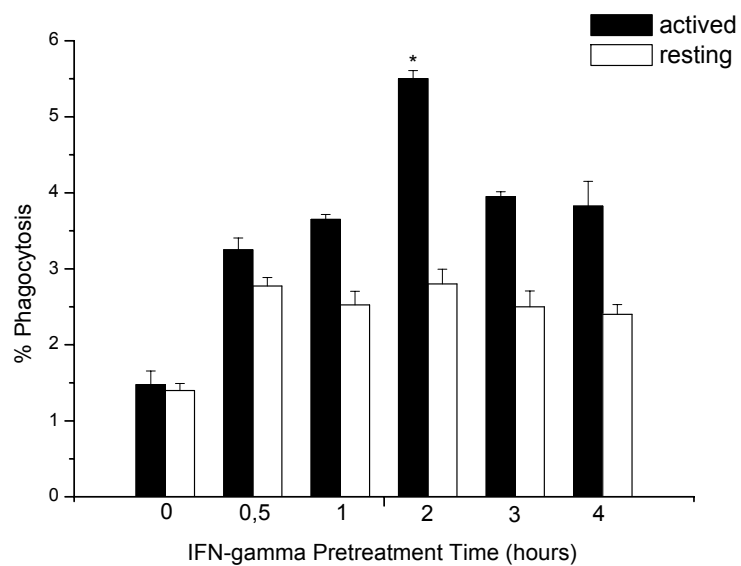
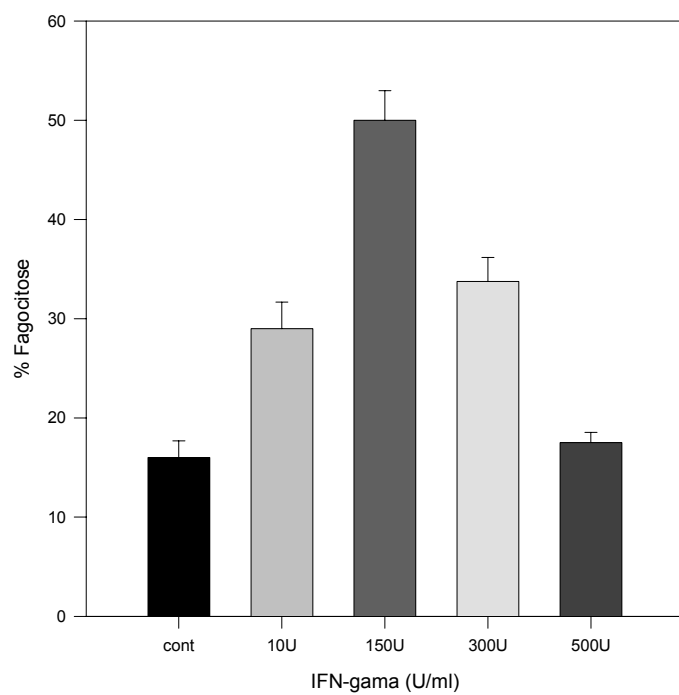


Figure 2.

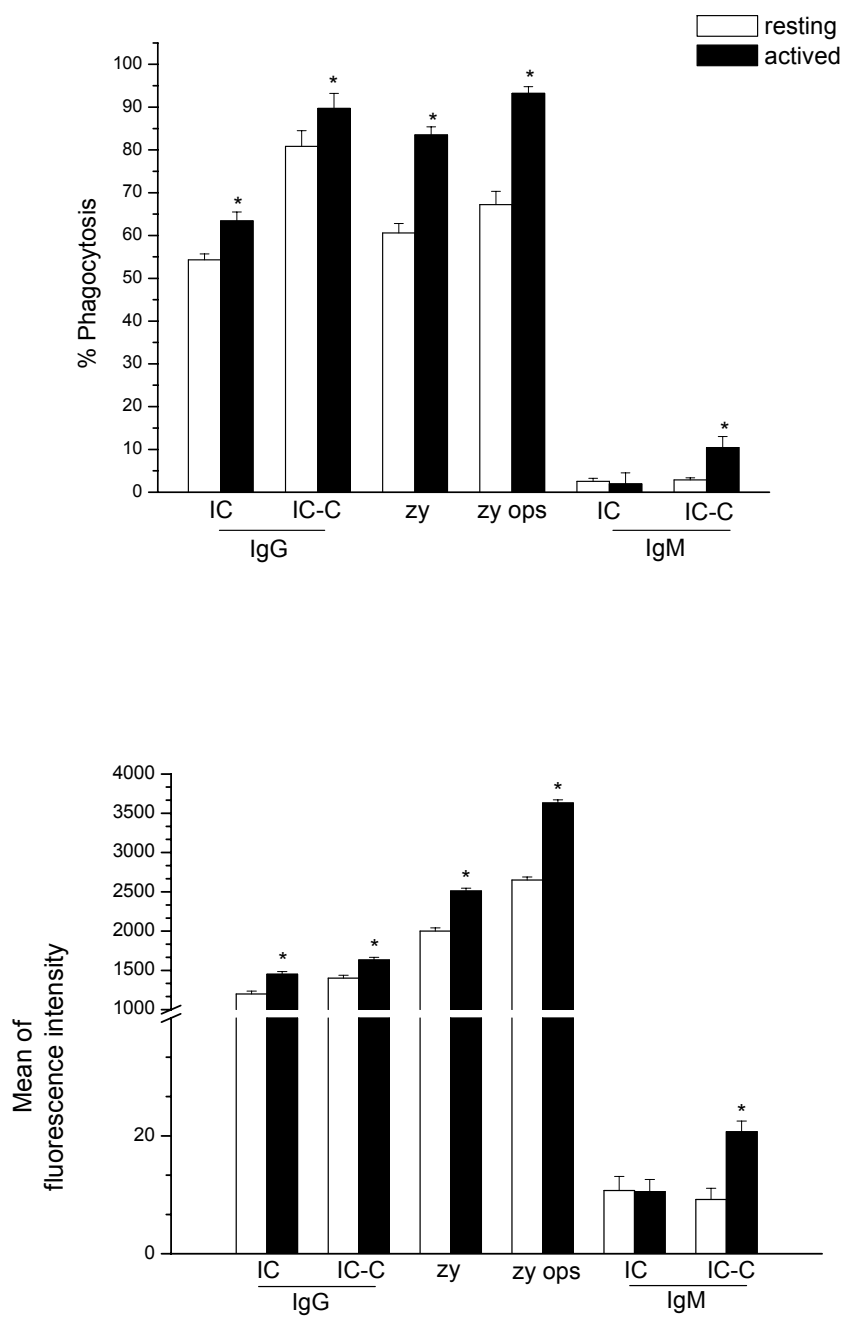


Figure 3.

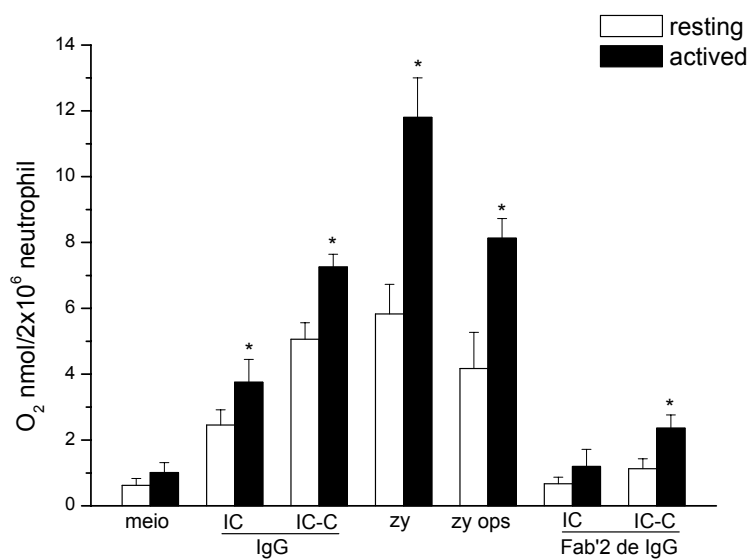


Figure 4.

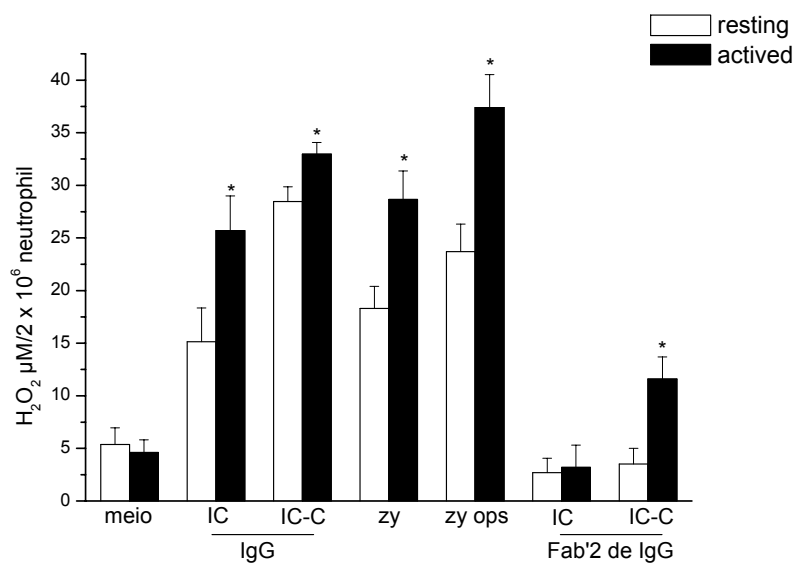


Figure 5.

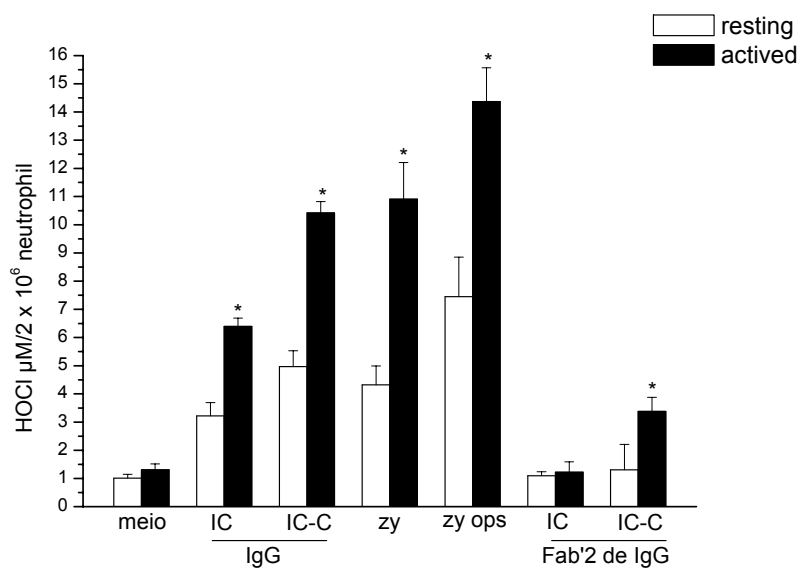


Figure 6.

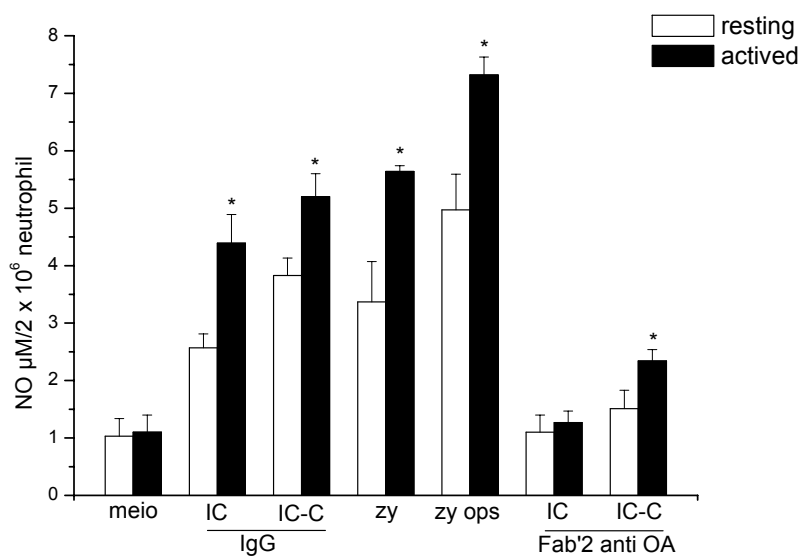


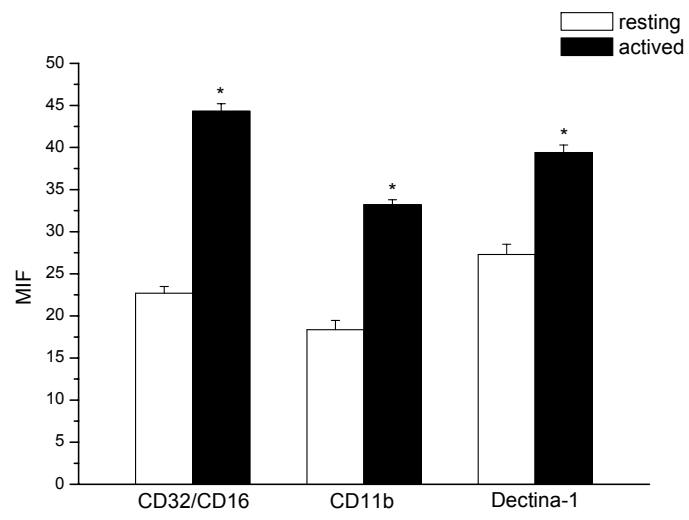
Figure 7.

Figure 8.

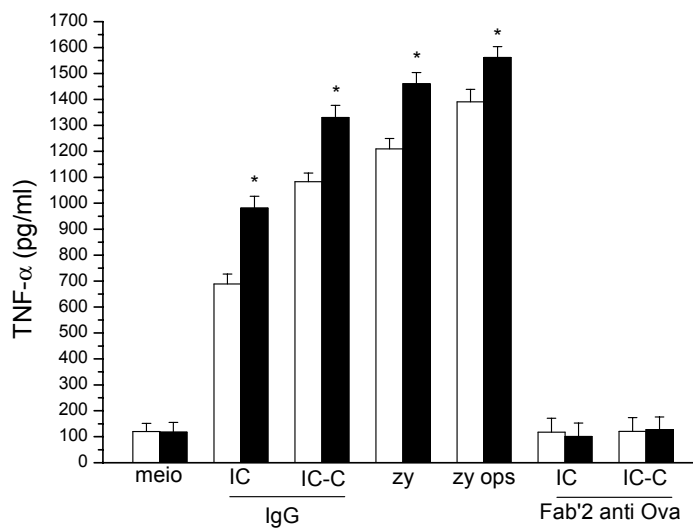
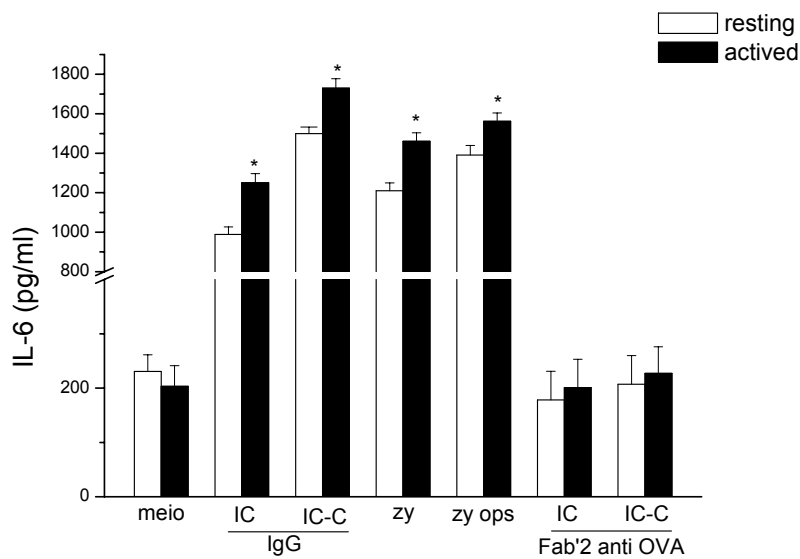


Figure 9.

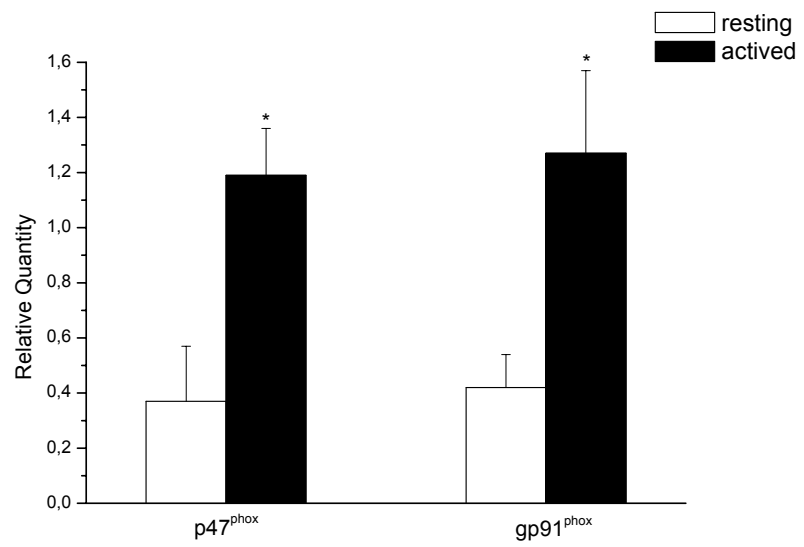
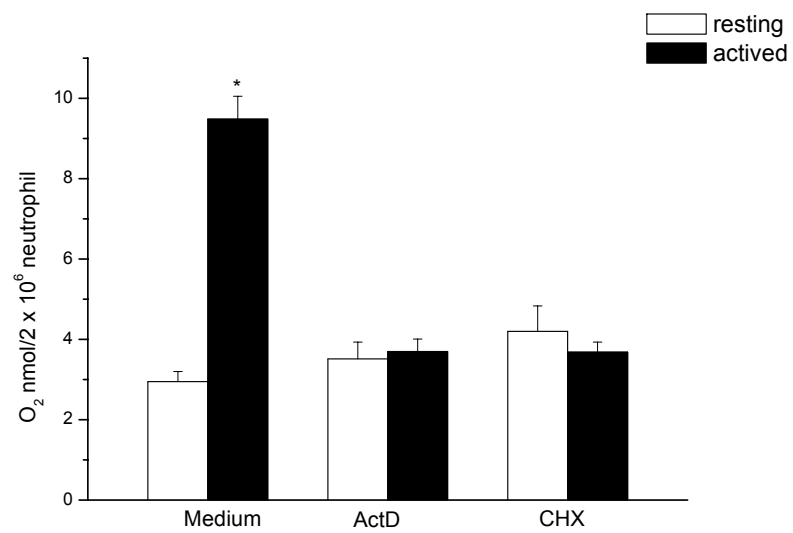


Figure 10.



Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)