

LETÍCIA LINTOMEN

**ESTUDO DA INIBIÇÃO DO ÓXIDO NÍTRICO SOBRE
FUNÇÕES DE EOSINÓFILOS HUMANOS ESTIMULADOS
COM EOTAXINA E RANTES *IN VITRO***

CAMPINAS

2008

LETÍCIA LINTOMEN

**ESTUDO DA INIBIÇÃO DO ÓXIDO NÍTRICO SOBRE
FUNÇÕES DE EOSINÓFILOS HUMANOS ESTIMULADOS
COM EOTAXINA E RANTES *IN VITRO***

*Tese de Doutorado apresentada ao Programa de
Pós-Graduação da Faculdade de Ciências
Médicas da Universidade Estadual de
Campinas para obtenção do título de
Doutor em Farmacologia.*

ORIENTADOR: Prof. Dr. Edson Antunes

CAMPINAS

2008

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

L658e Lintomen, Letícia
Estudo da inibição do óxido nítrico sobre funções de eosinófilos humanos estimulados com eotaxina e Rantes *in vitro* / Letícia Lintomen. Campinas, SP : [s.n.], 2008.

Orientador : Edson Arantes
Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. Eosinófilos. 2. Óxido Nítrico. 3. Eotaxina. 4. Rantes. 5. Moléculas de adesão. 6. Asma. I. Antunes, Edson. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Título em inglês : Study of nitric oxide inhibition in human eosinophil functions stimulated in vitro with eotaxin and RANTES

Keywords: • Eosinophils
• Nitric oxide
• Chemokine CCL11
• RANTES
• Adhesion molecules
• Asthma

Titulação: Doutor em Farmacologia

Banca examinadora:

Prof. Dr. Edson Arantes
Prof. Dr. José Dirceu Ribeiro
Profa. Dra. Glória Emília Petto de Souza
Profa. Dra. Nicola Amanda Conran Zorzetto
Profa. Dra. Suzana Beatriz Verissimo de Mello

Data da defesa: 01 - 08 - 2008



UNICAMP

Banca Examinadora da Tese de Doutorado

Orientador:

Prof. Dr. Edson Antunes

Membros:

Prof. Dr. Edson Antunes

Prof. Dr. José Dirceu Ribeiro

Profa. Dra. Gloria Emilia Petto de Souza

Profa. Dra. Nicola Amanda Conran Zorzetto

Profa. Dra. Suzana Beatriz Veríssimo de Mello

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

Data: 01/08/2008

DEDICATÓRIA

*A Deus,
por ter me guiado a vida inteira.*

*Aos meus pais amados **Regina e Elio**,
que nunca mediram esforços para que eu pudesse chegar até aqui.
Sou eternamente grata por **tudo**.
Tenho orgulho de ser filha de vocês !!*

*À minha irmã **Luciana**,
que sempre esteve ao meu lado apoiando minhas escolhas e
ajudando a concretizá-las.
Te amo "Rimã" !!*

*À minha sobrinha e afilhada **Clara**,
que trouxe alegria incomensurável para a família e me tornou uma
pessoa melhor e muito mais feliz.
A Dinda ama muito você !!*

AGRADECIMENTO ESPECIAL

*Ao Prof. Dr. **Edson Antunes**, pela acolhida em seu laboratório, por acreditar na minha capacidade e aceitar me orientar. Um orientador maravilhoso, compreensivo, tolerante, amigo e também “psicólogo” (muitas vezes !!). Seu vasto conhecimento científico aliado à sua paciência “quase infinita” o tornam um “**orientador especial**”. Creio que me tornei uma profissional e uma pessoa muito melhor após a convivência com você. Obrigada por me ensinar tantas coisas e por ser tão amigo !!!*

AGRADECIMENTOS

Às Prof.s. Dras. **Sisi Marcondes** e **Ivani de Souza**, pela amizade e pelos muitos momentos que passamos juntas na bancada. Aprendi muito com vocês !!

À Prof. Dra. **Angelina ZanESCO**, pela amizade, incentivo e ensinamentos constantes.

À Dra. **Elen Landucci**, pela amizade, convivência diária e por estar sempre disposta a ajudar.

À Prof. Dra. **Sara Thomazzi**, pela disponibilidade e paciência ao ensinar algumas técnicas utilizadas neste trabalho.

À **Luciane Coppi**, por me ensinar pacientemente a isolar eosinófilos.

Ao Prof. Dr. **Alexandre Nowill** por colaborar permitindo o uso de seu laboratório e do Citômetro de Fluxo, e ao **Gilberto Franchi**, técnico responsável pela manipulação do aparelho.

Ao Prof. Dr. **Stephen Hyslop**, por permitir que seu laboratório e seus aparelhos fossem usados inúmeras vezes.

Ao Prof. Dr. **Antônio Condino Neto**, que colaborou com este trabalho através da seleção e coleta do sangue dos pacientes asmáticos.

À amiga **Mônica Bim**, pela amizade preciosa e incondicional, e por **tudo** que fez e continua fazendo por mim. Sei que tudo que faz “**é de coração**”, você é muito generosa. Tenho orgulho de ser sua amiga. Sinto sua falta **Lesmona** !!

Ao amigo **Cleber Teixeira** (*in memoriam*), pela amizade intensa e sincera. **Amigo** inesquecível, **Cientista** nato e recém-**Professor**. Só uma **pessoa tão especial** consegue em pouco tempo de vida realizar tantas conquistas. **Mafioso**,

me sinto privilegiada por ter sido sua amiga. A vida segue, e sei que mesmo ausente fisicamente, você continua presente em minha vida.

À amiga **Juliana Baracat**, pela amizade e presença constante em minha vida. Sinto sua falta no laboratório, mas sei que você está feliz. É um prazer poder conviver com uma pessoa tão boa e generosa !!

À amiga **Carla Penteadó**, pela amizade e apoio diário na vida e na bancada. Seu otimismo e disposição me contagiam.

À amiga **Fernanda Priviero**, pela amizade e ajuda diária. Você tem um jeito único de conseguir rir e fazer rir, mesmo nas situações mais difíceis. Uma guerreira que “segue em frente” sem desanimar.

Ao amigo **Enilton Camargo**, a primeira pessoa que se aproximou de mim quando cheguei na Unicamp, e que sempre me ajudou, na bancada e fora dela também. **Eni**, você faz muita falta !!!

Às **famílias Bim, Baracat e Penteadó**, pelo carinho com que me acolheram, pela generosidade e amizade. Muito obrigada por tudo !!!

Aos **amigos do laboratório**: Lineu, Rafael Morganti, Priscila, Marina, Fernando Bau, Rafael Annovazzi, Mário, Fabíola, Haroldo, Tatiane, Nádia, Gláucia, Fábio, Adriana, Luiz Gustavo e Geovana.

Aos **funcionários do departamento de Farmacologia** pela colaboração: Miguel, Marcos, José Ilton, Elaine, Fran, Adilson (doador de sangue também !!), Toninho, Gildo, Wanderlei e Guina.

Aos **doadores de sangue**, pelo gesto generoso que tiveram e que possibilitou a realização deste trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)
pelo apoio financeiro que permitiu minha dedicação exclusiva a este trabalho.

*"A diferença entre o possível e o impossível está na
vontade humana."
Louis Pasteur*

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas	xix
Lista de materiais	xxi
Lista de figuras e tabelas	xxiii
Resumo	xxv
Abstract	xxvii
1. INTRODUÇÃO	29
1.1 O eosinófilo	29
1.2 Asma	31
1.3 Eosinófilos e Asma	32
1.4 O papel das integrinas na migração de eosinófilos	33
1.5 Quimiocinas	36
1.6 Desgranulação de eosinófilos	37
1.7 Nitração de tirosina em eosinófilos	39
1.8 O papel da eotaxina e do RANTES na asma	40
1.9 Óxido Nítrico e Asma	43
1.9.1 Biossíntese de óxido nítrico	43
1.9.2 O papel do óxido nítrico na asma	44
1.10 Quimiocinas e Óxido Nítrico	46
2. OBJETIVOS	47
2.1 Objetivos específicos	47
3. MATERIAIS E MÉTODOS	49
3.1 Amostras de sangue	49
3.2 Isolamento de eosinófilos	49
3.3 Separação imunomagnética de eosinófilos	49
3.4 Ensaio de atividade celular pelo MTT	50
3.5 Citometria de fluxo	51
3.6 Adesão de eosinófilos à fibronectina	51
3.7 Desgranulação de eosinófilos	52
3.8 Quimiotaxia de eosinófilos	53
3.9 Extração e dosagens de GMP cíclico	53

3.9.1	Extração de GMP cíclico	53
3.9.2	Dosagens de GMP cíclico	54
3.10	Nitração da albumina de soro bovino (BSA) com peroxinitrito	54
3.10.1	Preparação do peroxinitrito	54
3.10.2	Nitração da BSA	55
3.11	<i>Western blotting</i> para 3-nitrotirosina	55
3.12	Análise dos resultados	56
4.	RESULTADOS	57
4.1	Ensaio de atividade celular pelo MTT	57
4.2	Adesão de eosinófilos à fibronectina	58
4.3	Detecção da expressão das integrinas VLA-4 e Mac-1	62
4.3.1	Após 2 horas de incubação	62
4.3.2	Após 3 horas de incubação	62
4.3.3	Após 4 horas de incubação	62
4.3.4	Após 4 horas de incubação (co-incubação com L-NAME)	62
4.4.	Desgranulação de eosinófilos	67
4.5.	Quimiotaxia de eosinófilos	68
4.6.	Dosagem de GMP cíclico	69
4.7.	Análise de nitração de tirosina em eosinófilos	70
5.	DISCUSSÃO	75
6.	SUMÁRIO E CONCLUSÕES	87
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	89
	ANEXO	113

LISTA DE ABREVIATURAS

A23187	ionóforo de cálcio
APC	célula apresentadora de antígeno
BSA	albumina bovina sérica
C3bi	<i>complement receptor type 3</i>
CS-1	segmento de ligação-1
ECP	proteína catiônica do eosinófilo
EDN	neurotoxina derivada do eosinófilo
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
EPO	peroxidase do eosinófilo
GM-CSF	fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos
GMPC	guanosina monofosfato cíclico
IBMX	3-isobutil-1-metilxantina
ICAM-1	<i>intercellular adhesion molecule-1</i>
Ig	imunoglobulina
IL	interleucina
IP10	interferon- γ -inducible protein-10
LBA	lavado broncoalveolar
L-NAME	N ω -nitro-L-arginina metil éster
LPS	lipopolissacarídeo
LTC ₄	leucotrieno C ₄
Mac-1	<i>macrophage adhesion molecule-1</i>
MadCAM -1	<i>mucosal vascular addressin cell adhesion molecule-1</i>
MBP	proteína básica principal
MCP	<i>monocyte chemotactic protein</i>
Mig	<i>monokine induced by γ-interferon</i>
MIP	<i>macrophage inflammatory protein</i>
MPO	mieloperoxidase
MTT	[brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólico]
NO	óxido nítrico
NOS	óxido nítrico sintase

iNOS	óxido nítrico sintase induzível
eNOS	óxido nítrico sintase endotelial
nNOS	óxido nítrico sintase neuronal
3NT	3-nitrotirosina
ONOO ⁻	peroxinitrito
OPD	<i>o-phenylenediamine</i>
PAF	fator de ativação plaquetária
PBS	tampão fosfato
PVDF	<i>polyvinylidene difluoride</i>
RANTES	<i>regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted</i>
mRNA	RNA mensageiro
RPMI-1640	meio de cultura para células
SDS	dodecilsulfato de sódio
SNP	nitroprussiato de sódio
TH2	<i>T helper 2</i>
TNF- α	fator de necrose tumoral- α
VCAM-1	<i>vascular cell adhesion molecule-1</i>
VLA-4	<i>very late antigen -4</i>

LISTA DE MATERIAIS

SUBSTÂNCIA

A23187
Acrilamida
Bisacrilamida
Anticorpo para CD11b
Anticorpo para CD49d
Anticorpo para nitrotirosina
Anticorpo secundário
Azida sódica
BSA
Citômetro de fluxo FACScalibur

Citrato de sódio
ChemoTx 101-5
Cloreto de amônio
Coquetel de inibidores de proteases
Corante *Diff-Quick*
ECL plus
EDTA
Etanol
Eotaxina
Fibronectina
HCl
H₂O₂
HSA
H₂SO₄
IBMX
IgG1
KHCO₃
Kit para cGMP

PROCEDÊNCIA

Sigma (EUA)
Sigma (EUA)
Sigma (EUA)
BDBiosciences/Pharmingen (EUA)
BDBiosciences/Pharmingen (EUA)
Upstate Biotechnology (EUA)
Amersham Biosciences Corp. (EUA)
Sigma (EUA)
Sigma (EUA)
Becton-Dickinson (USA).

Synth (São Paulo, Brasil)
Neuro Probe (EUA)
Synth (São Paulo, Brasil)
Sigma (EUA)
Baxter Healthcare Corp. (EUA)
Amersham Biosciences Corp. (EUA)
Sigma (EUA)
Merck (Rio de Janeiro, Brasil)
R&D Systems (EUA)
Sigma (EUA)
Merck (Rio de Janeiro, Brasil)
Merck (Rio de Janeiro, Brasil)
Sigma (EUA)
Merck (Rio de Janeiro, Brasil)
Sigma (EUA)
BD Biosciences/Pharmingen (EUA)
Merck (São Paulo, Brasil)
Cayman Chemical Co (EUA)

L-NAME	Sigma (EUA)
Leitor de microplacas Multiscan	Labsystems (USA)
Membranas de PVDF	Bio-Rad Laboratories (EUA)
<i>Microbeads</i> e sistema VarioMACS	Miltenyi Biotec (EUA)
MTT	Sigma (EUA)
NaCl	Merck (Rio de Janeiro, Brasil)
NaNO ₂	Sigma (EUA)
NaOH	Synth (São Paulo, Brasil)
NP-40	USB (EUA)
OPD	Sigma (EUA)
Padrão de peso molecular	Amersham Biosciences Corp. (EUA)
Paraformaldeído	Sigma (EUA)
PAF	Sigma (EUA)
Percoll	Sigma (EUA)
RANTES	R&D Systems (EUA)
RPMI 1640	Sigma (EUA)
SDS	Sigma (EUA)
SNP	Sigma (EUA)
Sistema magnético	Becton-Dickinson (Reino Unido)
Triton X-100	Sigma (EUA)
Trizma-base	Sigma (EUA)

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1: Efeito das quimiocinas sobre a adesão de eosinófilos à fibronectina	60
Figura 2: Efeito do L-NAME sobre a adesão de eosinófilos à fibronectina	61
Figura 3: Detecção da expressão de VLA-4 e Mac-1 após 2 horas de incubação	63
Figura 4: Detecção da expressão de VLA-4 e Mac-1 após 3 horas de incubação	64
Figura 5: Detecção da expressão de VLA-4 e Mac-1 após 4 horas de incubação	65
Figura 6: Efeito do L-NAME sobre a expressão de VLA-4 e Mac-1 em eosinófilos	66
Figura 7: Efeito do L-NAME sobre a quimiotaxia de eosinófilos	68
Figura 8: <i>Western blotting</i> para 3-NT (sobrenadante)	71
Figura 9: <i>Western blotting</i> para 3-NT (<i>pellet</i>).....	73
Tabela 1: Ensaio de atividade celular pelo MTT	57
Tabela 2: Efeito do L-NAME sobre a desgranulação de eosinófilos	67
Tabela 3: Dosagem de GMPc em eosinófilos	69

RESUMO

Os eosinófilos participam da patogênese de várias doenças inflamatórias, incluindo infecções parasíticas e doenças alérgicas. Dentre as doenças alérgicas, a eosinofilia tem presença marcante na asma. Atualmente, a asma afeta 300 milhões de indivíduos no mundo, sendo considerada um problema de saúde pública mundial. A asma é uma doença inflamatória crônica que envolve interações entre fatores externos e genéticos, e tem como características principais a inflamação pulmonar e a hiperresponsividade brônquica. O recrutamento de eosinófilos para as vias aeríferas contribui para o caráter crônico da asma. A migração de eosinófilos para o tecido inflamado é um processo complexo, que é regulado por numerosos fatores, incluindo citocinas, quimiocinas, óxido nítrico (NO) e interações de moléculas de adesão. Estudos prévios investigaram as interações funcionais entre NO e CC-quimiocinas. Young e colaboradores (1999) mostraram que o número de eosinófilos no lavado broncoalveolar (LBA) de macacos desafiados está marcadamente aumentado 24 horas após o desafio, e que este aumento é acompanhado de altos níveis de NO no ar exalado e de eotaxina no LBA. Em pacientes com rinite, a eotaxina aumentou o número de eosinófilos no fluido do lavado nasal e também os níveis de NO nasal (Hanazawa *et al.*, 1999). Em contraste, em modelos murinos de asma a inibição seletiva da NOS induzível resultou na redução da migração eosinofílica para os pulmões (Feder *et al.*, 1997; Iijima *et al.*, 2001), que estava associada com o aumento da expressão da CC-quimiocina proteína quimiotática para monócito-1 (MCP-1) no tecido pulmonar (Trifilieff *et al.*, 2000). Além disso, NO (ou doadores de NO) também são capazes de inibir a produção de RANTES (Frank *et al.*, 2000). O NO via formação de peroxinitrito (ONOO⁻) também pode reduzir a migração de eosinófilos induzida por eotaxina (Sato *et al.*, 2000). Entretanto, o papel modulatório do NO nas funções do eosinófilo mediadas por CC-quimiocinas ainda permanece contraditório. Portanto, o presente trabalho investigou o efeito modulatório do NO na adesão aumentada, quimiotaxia e desgranulação do eosinófilo induzidas pelas CC-quimiocinas eotaxina e RANTES *in vitro*, e a expressão de VLA-4 e Mac-1 na superfície do eosinófilo.

Nós realizamos ensaios funcionais (adesão e desgranulação), análise da expressão de moléculas de adesão por citometria de fluxo (VLA-4 e Mac-1) e a investigação de resíduos de tirosina nitrada para avaliar interações do NO com CC-quimiocinas em eosinófilos humanos. Os ensaios de MTT mostraram que as incubações de eosinófilos por 2, 3, ou 4 horas com eotaxina (10, 100 e 1000 ng/ml) ou RANTES (10, 100 e 1000 ng/ml) não afetam a viabilidade celular e, em determinadas condições, até promovem a ativação das células. Os resultados de adesão à fibronectina mostraram que a eotaxina (10, 100 e 1000 ng/ml) ou RANTES (10, 100 e 1000 ng/ml) não aumentam a adesão de eosinófilos em períodos de incubação de 2 e 3 horas. Entretanto, a incubação de eosinófilos por 4 horas com eotaxina ou RANTES aumentou significativamente a adesão à fibronectina. O L-NAME (0.1 mM), individualmente, aumentou significativamente a adesão de eosinófilos à fibronectina; porém a co-incubação de L-NAME com eotaxina (ou RANTES) não afetou a adesão observada com cada agente isoladamente. Além disso, a expressão de VLA-4 e de Mac-1 não foi modificada em nenhuma das condições experimentais testadas. Eotaxina e RANTES também não foram capazes de aumentar os níveis de GMPc nos eosinófilos, em condições onde o SNP (0.1 mM), usado como controle positivo, aumentou significativamente os níveis desse segundo mensageiro. Além disso, eosinófilos tratados com L-NAME, eotaxina e RANTES, individualmente, foram capazes de desgranular estas células, mas a co-incubação de L-NAME com eotaxina (ou RANTES), não alterou esta resposta. Os resultados de quimiotaxia mostraram migração significativa de eosinófilos (tratados ou não com L-NAME) em resposta à eotaxina ou RANTES. Os resultados obtidos de *Western blotting* para 3-nitrotirosina mostraram ausência de proteínas nitradas nos eosinófilos de indivíduos saudáveis ou asmáticos. No conjunto, nossos resultados mostram que, nas condições experimentais estabelecidas, o NO não modula adesão, migração e desgranulação em eosinófilos estimulados com eotaxina ou RANTES.

ABSTRACT

Eosinophils participate in the pathogenesis of many inflammatory diseases, including parasitic infections and allergic diseases. Of the allergic diseases, asthma is characterized by eosinophilia. Currently, asthma affects 300 million people in world, and is an important public health problem. Asthma is an inflammatory chronic disease that involves interactions between external and genetic factors, and has lung inflammation and bronchial hyperresponsiveness as major features. The recruitment of eosinophils into airways contributes to the asthma chronic character. The eosinophil migration to inflamed tissue is a complex process regulated by several factors, including cytokines, chemokines, nitric oxide (NO) and adhesion molecule interactions. Previous studies have investigated the functional interactions between NO and CC-chemokines. Young et al. (1999) showed that the number of eosinophils in the bronchoalveolar lavage (BAL) fluid of challenged monkeys is markedly increased at 24 h post-challenge, accompanied by higher levels of both exhaled NO and eotaxin in BAL fluid. In rhinitis patients, eotaxin increased the number of eosinophils in the nasal lavage fluid, and that was also accompanied by elevated nasal NO levels (Hanazawa et al., 1999). In contrast, in murine models of asthma, selective inhibition of inducible NOS resulted in a reduction in pulmonary eosinophil migration (Feder et al., 1997; Iijima et al., 2001), with an increased expression of the CC-chemokine monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in the lung tissue (Trifilieff et al., 2000). Moreover, NO (or NO donors) have also been shown to inhibit the production of RANTES (Frank et al., 2000). Nitric oxide via peroxynitrite (ONOO⁻) formation is reported to reduce eotaxin-induced eosinophil migration (Sato et al., 2000). However, the modulatory role of NO in the CC-chemokines-mediated eosinophil functions is still not well understood. Therefore, the present study was designed to investigate the modulatory effect of NO in the enhanced eosinophil adhesion, chemotaxis and degranulation induced by the CC-chemokines eotaxin and RANTES in vitro, and the expression of VLA-4 and Mac-1 on the eosinophil surface.

We therefore carried out functional assays (adhesion and degranulation), flow cytometry analysis of adhesion molecules (VLA-4 and Mac-1 expression) and investigation of tyrosine nitration to evaluate the interactions between NO and CC-chemokines in human eosinophils. MTT assays showed that incubation of eosinophils for 2, 3 or 4 hours with eotaxin (10, 100 and 1000 ng/ml) or RANTES (10, 100 and 1000 ng/ml) did not affect cellular viability and, in some conditions, even caused cellular activation. The results of adhesion to fibronectin showed that eotaxin (10, 100 and 1000 ng/ml) or RANTES (10, 100 and 1000 ng/ml) did not increase eosinophil adhesion at 2 or 3 hours of incubation. Nevertheless, the incubation of eosinophils for 4 hours with eotaxin or RANTES significantly increased adhesion to fibronectin. L-NAME (0.1 mM), alone, significantly increased eosinophil adhesion to fibronectin; however the co-incubation of L-NAME with eotaxin (or RANTES) did not affect the adhesion of each agent. Moreover, expression of VLA-4 and Mac-1 were not modified by any of the experimental conditions. Eotaxin and RANTES did not increase eosinophil cGMP levels under the same conditions in which SNP (0.1mM), used as a positive control, significantly increased the levels of this second messenger. Furthermore, eosinophils treated with L-NAME, eotaxin and RANTES, alone, demonstrated degranulation, however the co-incubation of eosinophils with L-NAME and eotaxin (or RANTES) did not alter this response. Chemotaxis assays showed a significant eosinophil (treated or not with L-NAME) migration in response to eotaxin or RANTES. Western blotting for 3-nitrotyrosine-3 showed a lack of nitrated proteins in eosinophils from healthy or asthmatic donors. Taken together, results show that, under the experimental conditions established, NO does not modulate adhesion, migration and degranulation in eotaxin or RANTES-stimulated eosinophils.

1. INTRODUÇÃO

1.1 O eosinófilo

O eosinófilo é um leucócito polimorfonuclear e sua primeira descrição é, provavelmente, a de T. W. Jones (Jones, 1993) que em 1846 identificou no sangue uma chamada “célula granular grosseira”, cujas características correspondem ao eosinófilo. O termo eosinófilo foi primeiramente usado em 1879 por Paul Ehrlich, que demonstrou a grande afinidade tintorial desta célula por corantes ácidos, como a eosina (Jones, 1993; Giembycz & Lindsay, 1999; Adamko *et al.*, 2005).

O desenvolvimento e a diferenciação dos eosinófilos acontecem no interior da medula óssea e são promovidos por 3 citocinas, o fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF), a interleucina-3 (IL-3) e a IL-5 (Rosenberg *et al.*, 2007). O GM-CSF e a IL-3 atuam em progenitores na fase inicial da diferenciação, e a IL-5 parece ser ativa na fase tardia da diferenciação, ou seja, na diferenciação terminal, atuando em precursores já comprometidos com a linhagem eosinofílica (Denburg, 1998; Rosenberg *et al.*, 2007). Acredita-se que a IL-5 seja a responsável pela liberação dos eosinófilos maduros da medula óssea para o sangue (Weller, 1997; Lampinem *et al.*, 2004; Weller *et al.*, 2005).

Na espécie humana, os eosinófilos maduros têm, geralmente, o núcleo bilobado. Porém, uma característica morfológica marcante deste tipo celular é a existência de numerosos grânulos citoplasmáticos. Os grânulos podem ser identificados como: grânulos específicos (ou secundários), grânulos pequenos, grânulos primários e corpúsculos lipídicos. Os grânulos específicos humanos são de grande importância por conterem 4 proteínas catiônicas: proteína básica principal (MBP), proteína catiônica do eosinófilo (ECP), peroxidase do eosinófilo (EPO) e a neurotoxina derivada do eosinófilo (EDN). Esses grânulos têm um núcleo, ou cristalóide, que é evidenciado por microscopia eletrônica, composto basicamente por MBP, que corresponde a mais de 50% do total de proteína isolada dos grânulos eosinofílicos (Giembycz & Lindsay, 1999; Rothenberg & Hogan, 2006). Os eosinófilos podem secretar suas proteínas catiônicas granulares, que podem se fixar à superfície de vários tipos celulares e também a componentes de matriz extracelular (Gleich & Adolphson, 1986; Jones, 1993; Rothenberg & Hogan, 2006), resultando em dano e disfunção tecidual (Pease & Williams, 2001).

Os grânulos pequenos foram identificados em eosinófilos tissulares humanos e contém fosfatase ácida e arilsulfatase, porém não estão presentes nas células circulantes e nem nas da medula óssea (Giembycz & Lindsay, 1999).

Os grânulos primários representam 5% dos grânulos eosinofílicos. Nesses grânulos encontra-se a proteína que forma os cristais de Charcot-Leyden e que tem atividade de lisofosfolipase. Traços de cristais de Charcot-Leyden dentro do núcleo e do citoplasma de células ativadas indicam que a proteína pode ser liberada intracelularmente (Giembycz & Lindsay, 1999). Outras enzimas como colagenase, histaminase, beta-glucoronidase, catepsina-D e catalase também são encontradas nos grânulos dos eosinófilos (Jones, 1993; Giembycz & Lindsay, 1999).

Os corpúsculos lipídicos correspondem a estruturas não ligadas à membrana. São organelas citoplasmáticas esféricas (0.5-2 µm de diâmetro), elétron-densas e que funcionam como estoque de ácido araquidônico, que é esterificado em glicerofosfolípidios, para a formação de eicosanóides. Os eosinófilos apresentam baixos números de corpúsculos lipídicos; entretanto, em desordens inflamatórias como asma, doença de Chron e síndromes associadas à hipereosinofilia, a frequência e o tamanho dos corpúsculos lipídicos estão aumentados (Giembycz & Lindsay, 1999; Bandeira-Melo & Bozza, 2002).

Além das proteínas catiônicas, em determinadas situações, os eosinófilos também são capazes de secretar várias citocinas (IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-12, IL-13, IL-16, IL-18), quimiocinas (RANTES e eotaxina) e mediadores lipídicos como o fator de ativação plaquetária (PAF) e o leucotrienos B4 e C4 (Kita, 1996; Rothenberg & Hogan, 2006).

Em indivíduos saudáveis, a contagem de eosinófilos no sangue periférico é relativamente baixa, representando de 0 a 3% dos leucócitos circulantes (Trivedi & Lloyd, 2007). Entretanto, em determinadas doenças, o eosinófilo pode ser seletivamente acumulado no sangue periférico ou em qualquer tecido do corpo. Assim, em resposta a diversos estímulos, os eosinófilos são recrutados da circulação para o foco inflamatório, onde são capazes de modular uma determinada resposta imunológica através de vários mecanismos.

Os eosinófilos estão implicados na patogênese de numerosos processos inflamatórios, incluindo infecções parasíticas por helmintos e doenças alérgicas (Rothenberg, 1998; Rothenberg & Hogan, 2006). Dentre as doenças alérgicas, a eosinofilia

tem presença marcante em determinadas condições dermatológicas (como urticária, edema cutâneo, dermatite atópica e outras), reações a drogas e na asma brônquica (Desreumaux & Capron, 1996).

1.2 Asma

Atualmente, a asma afeta 300 milhões de indivíduos no mundo, sendo considerada uma preocupação mundial (Global Initiative for Asthma, 2003; Loughheed, 2007). A incidência de asma e doenças alérgicas tem aumentado nos últimos 30 anos. Evidências apontam para diferenças na prevalência de doenças alérgicas entre as áreas urbana e rural na Europa e em países não-industrializados, com alta prevalência de doenças alérgicas nas áreas urbanas. Os países da América Latina, incluindo o Brasil, vêm sofrendo com o rápido processo de mudanças na população, que inclui urbanização, migração, desenvolvimento econômico e a adoção do “moderno estilo de vida”. Neste contexto, a asma e as doenças alérgicas estão entre os principais problemas de saúde pública em ascensão, principalmente na população infantil (Cooper *et al.*, 2006; Pearce & Douwes, 2006b).

A asma é considerada uma doença inflamatória crônica que envolve interações entre fatores externos e genéticos (Vargaftig, 1999; Pearce & Douwes, 2006a; Cooper *et al.*, 2006), e tem como características principais a inflamação pulmonar e a hiperresponsividade brônquica (O’Byrne *et al.*, 1999; Cockcroft & Davis, 2006). Evidências científicas associam a existência de hiperresponsividade, com a inflamação das vias aeríferas. Entretanto, os mecanismos exatos que relacionam a inflamação com a hiperresponsividade do músculo liso das vias aeríferas não estão esclarecidos (Cockcroft & Davis, 2006). Além disso, a literatura mostra que a hiperresponsividade brônquica também pode ocorrer em indivíduos sem asma, podendo ser encontrada em 10-15% da população não asmática (Lilly, 2005).

Clinicamente, a asma se caracteriza por crises de dispnéia, tosse e sibilos. É uma doença episódica, alternando crises agudas com períodos assintomáticos. Embora seja rara, uma crise aguda de asma pode levar à morte (Kroegel *et al.*, 1993; McFadden, 1994).

A asma é tradicionalmente dividida em 2 tipos básicos: asma intrínseca e extrínseca (Corrigan & Kay, 1992; Robbins *et al.* 1994; Wardlaw *et al.*, 2002; Holgate, 2007). A asma intrínseca se caracteriza por história negativa para alergia, testes cutâneos e níveis séricos de imunoglobulina E (IgE) normais. Os pacientes desenvolvem os sintomas típicos de asma após

contato com certos estímulos como infecção (viral ou bacteriana) das vias aeríferas superiores (Corrigan & Kay, 1992; Kroegel *et al.*, 1993; McFadden, 1994), ar frio, inalantes irritantes (ex: dióxido de enxofre), drogas (ex: aspirina), estresse emocional e exercício físico (Robbins *et al.*, 1994; Busse & Lemanske, 2001).

A asma extrínseca é caracterizada por uma reação de hipersensibilidade do tipo I, induzida por um antígeno extrínseco. Este tipo inclui a asma alérgica (atópica), ocupacional e aspergilose broncopulmonar alérgica (Robbins *et al.* 1994). A asma alérgica é a mais comum, e é freqüentemente associada a um histórico familiar de atopia. É desencadeada por antígenos ambientais presentes na poeira, pólen, pêlos de animais, alguns alimentos, dentre outros. As crises agudas podem ser precedidas por manifestações de doenças alérgicas, como rinite, urticária ou eczema, reações cutâneas positivas à injeção intradérmica de extratos de antígenos inalados, níveis elevados de IgE no soro, e/ou respostas positivas a testes de provocação os quais envolvem a inalação de antígeno específico (Kroegel *et al.*, 1993; McFadden, 1994; Robbins *et al.* 1994).

Independentemente da natureza dos agentes provocadores, estudos mostram semelhanças histopatológicas entre brônquios de pacientes asmáticos, sugerindo que a patogênese da doença não está necessariamente relacionada à coexistência de atopia. Deste modo, a asma é frequentemente, mas não invariavelmente, associada à atopia (Corrigan & Kay, 1992; Holgate, 2007).

1.3 Eosinófilos e Asma

Indivíduos asmáticos apresentam número elevado de eosinófilos no sangue e no lavado broncoalveolar (LBA) (Sato *et al.*, 1999; Prussin & Metcalfe, 2006), e infiltrado inflamatório pulmonar rico em células ativadas, como mastócitos, monócitos, linfócitos e, principalmente, eosinófilos (Corrigan & Kay, 1992; Holgate, 2007). A importância dos eosinófilos na asma foi enfatizada pelos achados que correlacionavam o grau de eosinofilia no sangue e no LBA com o grau de hiperresponsividade brônquica e gravidade da doença (Gonzalo *et al.*, 1998; Sato *et al.*, 1999; Mould *et al.*, 2000; Weller *et al.*, 2005). Entretanto, atualmente tem se admitido que o papel dos eosinófilos na indução da hiperresponsividade das vias aeríferas é controverso, já que tem se demonstrado que a hiperresponsividade pode ocorrer na ausência de inflamação eosinofílica (Giembycz, 2001; Smit & Lukacs, 2006).

Os eosinófilos ativados liberam substâncias citotóxicas, como espécies reativas de oxigênio e as proteínas tóxicas MBP, ECP e EPO, além de produzirem e liberarem vários mediadores pró-inflamatórios, incluindo citocinas, quimiocinas e mediadores lipídicos que podem intensificar a resposta inflamatória (Giembycz & Lindsay, 1999; Foster, 1999; Powell *et al.*, 2001; Rothenberg & Hogan, 2006). Estudos mais recentes mostram que os eosinófilos participam da patogênese da asma não somente através da liberação de proteínas granulares, mediadores lipídicos, espécies reativas de oxigênio, citocinas e fatores de crescimento, mas também participam de complexas interações célula-célula, levando a uma inflamação crônica pulmonar de perfil T *helper* 2 (TH2) (Holgate, 2007; Jacobsen *et al.*, 2007).

Os achados obtidos de pacientes asmáticos e de modelos de asma experimental mostram que os eosinófilos têm um papel importante nesta doença; seu acúmulo seletivo e ativação na mucosa brônquica são considerados eventos centrais na patogênese da asma (Welller, 1991; Shahabuddin *et al.*, 2000; Kay, 2005).

1.4 O papel das integrinas na migração de eosinófilos

Acredita-se que o recrutamento de eosinófilos para as vias aeríferas exacerbe a asma e contribua para o caráter crônico desta doença (Pawankar *et al.*, 2003). A migração de eosinófilos para o tecido inflamado é um processo complexo, que é regulado por numerosos fatores, incluindo citocinas, quimiocinas, óxido nítrico (NO) e interações de moléculas de adesão; interações estas não só entre células, mas também de células e elementos da matriz extracelular (Gonlugur & Efeoglu, 2004).

A passagem dos eosinófilos do lúmen do vaso para os tecidos ocorre através de etapas, que são o *priming*, rolamento pelo endotélio, adesão firme ao endotélio, diapedese transendotelial e quimiotaxia para o sítio inflamado. As moléculas de adesão participam de todas as etapas da migração, cada uma de alguma forma. As moléculas são divididas em 3 sub-famílias: selectinas, integrinas e a superfamília das imunoglobulinas (Lampinen *et al.*, 2004; Gonlugur & Efeoglu, 2004).

As integrinas estão entre os receptores celulares mais versáteis que existem, e têm sido alvo de muito interesse no estudo da patogênese da asma por serem moléculas de adesão importantes no extravasamento dos eosinófilos do sangue para as vias aeríferas.

Entretanto, entender as funções das integrinas num determinado tipo celular é complicado, e isso se deve ao fato de cada integrina poder estar presente em diferentes estados conformacionais, variados níveis de expressão, e poder formar *cluster* na membrana plasmática (Xiao *et al.*, 2004; Humphries, 2004). As integrinas são heterodímeros e, cada heterodímero, interage com seu ligante (contra-receptor), que pode estar presente na matriz extracelular ou na superfície de outras células. Eosinófilos periféricos humanos expressam 7 integrinas: $\alpha_4\beta_1$ (CD49d/CD29), $\alpha_6\beta_1$ (CD49f/CD29), $\alpha_M\beta_2$ (CD11b/CD18), $\alpha_L\beta_2$ (CD11a/CD18), $\alpha_X\beta_2$ (CD11c/CD18), $\alpha_D\beta_2$ (CD11d/CD18) e $\alpha_4\beta_7$ (CD49d/ β_7) (Barthel *et al.*, 2008).

O processo de migração ocorre através da ligação de receptores de adesão presentes na superfície dos eosinófilos, aos seus respectivos contra-receptores expressos no endotélio vascular. Assim, os eosinófilos migram dos vasos sanguíneos para o sítio inflamado, entram na matriz extracelular e se ligam a proteínas de matriz, como a fibronectina. A adesão firme dos eosinófilos à fibronectina é mediada pela ligação do VLA-4 (CD49d/CD29; $\alpha_4\beta_1$) à região CS-1 da proteína (Broide & Sriramarao, 2001). Já que os eosinófilos normalmente residem nos tecidos, acredita-se que a interação com proteínas de matriz extracelular possa influenciar em suas funções. De fato, a fibronectina é uma proteína abundante da matriz extracelular, e é conhecida por mediar inúmeras interações biológicas importantes entre células e matriz extracelular, incluindo adesão, mobilidade celular e aumento da afinidade das moléculas de adesão (BurrIDGE *et al.*, 1992; Meng & Lowell, 1998; Fernvik *et al.*, 2000).

Os eosinófilos de pacientes alérgicos e asmáticos têm respostas migratórias, adesivas e de desgranulação aumentadas em relação a eosinófilos de indivíduos saudáveis. Isto provavelmente se deve à presença das IL-3, IL-5 e do GM-CSF no sangue destes pacientes, situação que pode ser mimetizada *in vitro* com o uso de citocinas recombinantes. Assim, a exposição dos eosinófilos a algumas citocinas modifica o fenótipo destas células tornando-as “primadas” (ativadas), caracterizando assim a etapa de *priming* (Lampinen *et al.*, 2004).

Posteriormente ocorre o rolamento, que é o contato inicial dos eosinófilos com a parede do vaso sanguíneo, antes do extravasamento. Esta etapa é mediada pelas selectinas (E, L e P-selectinas), e a adesão reversível entre elas e seus ligantes faz com que os eosinófilos se movam devagar ao longo do endotélio. A expressão de L- e P-selectinas nas

células endoteliais pode ser aumentada na presença de citocinas como IL-1 e fator de necrose tumoral- α (TNF- α), enquanto a L-selectina é constitutivamente expressa nos eosinófilos e se liga ao MadCAM -1 endotelial e CD34 (Gonlugur & Efeoglu, 2004).

O movimento lento auxilia os eosinófilos a aderirem firmemente através da ligação das integrinas a seus contra-receptores. As integrinas mais importantes na adesão firme de eosinófilos ao endotélio são Mac-1 (CD11b/CD18; $\alpha_x\beta_2$) e VLA-4 (CD49d/CD29; $\alpha_4\beta_1$), que se ligam a ICAM-1 e VCAM-1, respectivamente. ICAM-1 e VCAM-1 são membros da superfamília das imunoglobulinas; estão presentes na superfície das células endoteliais, e são responsáveis pela interação célula-célula (Lampinen *et al*, 2004; Gonlugur & Efeoglu, 2004). As integrinas Mac-1 e VLA-4, além da fibronectina, também podem se ligar a outros componentes da matriz extracelular, como fibrinogênio e ao receptor C3bi (Mac-1) (Zhang & Plow, 1996).

Após a adesão firme, os eosinófilos são capazes de migrar para os tecidos em resposta a fatores quimiotáticos produzidos no local da inflamação. Esta migração é um movimento direcionado pelo gradiente de concentração, e é caracterizado por adesão e desadesão a proteínas da matriz extracelular (Lampinen *et al*, 2004).

A expressão baixa ou ausente de $\alpha_4\beta_1$ em neutrófilos humanos purificados sugere que o reconhecimento do VCAM-1 pelo eosinófilo via $\alpha_4\beta_1$ seja um importante mecanismo pelo qual a infiltração seletiva de eosinófilos acontece na asma (Bochner *et al.*, 1991; Weller *et al.*, 1991; Taooka *et al.*, 1999; Kirveskari *et al.*, 2000). Além disso, a ligação de $\alpha_4\beta_1$ ao VCAM-1 resulta na modulação de outras funções além do rolamento, adesão e migração do eosinófilo, como a potencialização da geração de ânion superóxido (Nagata *et al.*, 1995).

Em resumo, uma variedade de mediadores inflamatórios em contato com a superfície das células endoteliais são reconhecidos pelos leucócitos após o contato inicial. Isto leva à ativação das integrinas presentes nos leucócitos, que resulta numa adesão estável (firme) e possibilitando a migração da célula. Finalmente, os leucócitos transmigram por entre as membranas das células endoteliais e entram no tecido inflamado (Vestweber & Blanks, 1999).

1.5 Quimiocinas

As quimiocinas representam uma grande família de proteínas quimiotáticas de baixo peso molecular (8-15 KDa), que são produzidas por numerosos tipos celulares e têm papel essencial nas reações inflamatórias (Palmqvist *et al.*, 2007).

As quimiocinas humanas contêm 2 resíduos de cisteína conservados na porção N terminal de sua estrutura de aminoácidos, e é com base na posição destes resíduos que foi feita a classificação das quimiocinas em 4 sub-famílias: CC, CXC, C e CX3C quimiocinas (Bandeira-Melo *et al.*, 2001; Palmqvist *et al.*, 2007). As CC (ou β) quimiocinas têm seus resíduos de cisteína adjacentes; as CXC (ou α) quimiocinas têm seus resíduos de cisteína separados por um aminoácido; as C (ou γ) quimiocinas têm somente um resíduo de cisteína; e as CX3C quimiocinas (ou δ) quimiocinas têm 3 aminoácidos separando seus resíduos de cisteína (Giembycz & Lindsay, 1999; Palmqvist *et al.*, 2007).

Os efeitos biológicos das quimiocinas são mediados pela interação destas proteínas com receptores específicos, que pertencem à superfamília de receptores acoplados à proteína G (Blease *et al.*, 2000a; Palmqvist *et al.*, 2007). Até o momento, quase 50 quimiocinas e 20 receptores já foram identificados. A maioria dos receptores de quimiocinas exibem múltipla especificidade de ligação, ou seja, várias quimiocinas podem se ligar ao mesmo receptor. Além disso, uma mesma quimiocina pode se ligar a diferentes receptores, como é o caso do RANTES, que pode se ligar aos receptores CCR1, CCR3 e CCR5 (Palmqvist *et al.*, 2007). Entretanto, a eotaxina se liga somente ao CCR3 (Giembycz & Lindsay, 1999). As CC quimiocinas eotaxina e RANTES, que foram as utilizadas neste trabalho, têm como alvo numerosos tipos celulares, incluindo monócitos, eosinófilos e basófilos (Blease *et al.*, 2000a).

Embora inicialmente tenham sido descritas como citocinas quimiotáticas, atualmente sabe-se que as quimiocinas têm múltiplos papéis num processo inflamatório, incluindo a regulação do tráfego de leucócitos, a imunomodulação da ativação do leucócito, fibrose, angiogênese, hematopoese e o estabelecimento e manutenção da hiperresponsividade (Taub & Oppenheim, 1994; Boulet *et al.*, 1997; Boulet *et al.*, 1998). Contudo, a expressão de receptores de quimiocinas não está limitada às células inflamatórias. Sabe-se que células estruturais como epiteliais, endoteliais, do músculo liso e fibroblastos também expressam receptores e são capazes de produzir quimiocinas, podendo

assim contribuir com uma enorme variedade de funções biológicas (Strieter et al., 1989; Standiford et al., 1990).

1.6 Desgranulação de eosinófilos

É bem estabelecido pela literatura que eosinófilos ativados produzem e liberam muitas substâncias pró-inflamatórias, como as proteínas catiônicas e espécies reativas de oxigênio. Estudos mostraram que a MBP e a EPO têm capacidade de danificar tecidos (Giembycz & Lindsay, 1999; Rothenberg & Hogan, 2006). Evidências de estudos *in vitro* e *in vivo* mostraram que a ECP e a MBP, quando liberadas, danificam o epitélio do trato respiratório (Motojima *et al.*, 1989).

Uma vez recrutados para os tecidos, os eosinófilos recebem sinais que promovem a desgranulação e a secreção de citocinas. Estudos *in vitro* indicam que várias citocinas, quimiocinas, mediadores lipídicos e imunoglobulinas são capazes de induzir a desgranulação de eosinófilos. A IL-5 e a eotaxina estão entre os mediadores que contribuem para a regulação do tráfego de eosinófilos e desgranulação (Mould *et al.*, 2000; Fujisawa *et al.*, 2000).

A desgranulação dos eosinófilos pode acontecer, dependendo do padrão e da natureza do estímulo (Giembycz & Lindsay, 1999), de 3 modos distintos: exocitose clássica, exocitose composta e desgranulação *piecemeal*; assim como também através da citólise (Logan *et al.*, 2003; Moqbel & Coughlin, 2006). A exocitose clássica envolve a extrusão dos grânulos secretórios, ou seja, a liberação dos conteúdos dos grânulos é feita através da fusão com a membrana plasmática, mas este mecanismo ainda não foi demonstrado *in vivo* nos tecidos das vias aeríferas (Erjefalt & Persson, 2000; Moqbel & Coughlin, 2006). A exocitose composta implica na fusão de múltiplos grânulos intracelulares, antes da liberação (Hafez *at al.*, 2003).

A secreção do eosinófilo geralmente envolve um processo chamado desgranulação *piecemeal* (ou seja, em etapas), onde pequenas vesículas secretórias medeiam a depleção dos conteúdos dos grânulos (Crivellato *et al.*, 2003; Logan *et al.*, 2003). A desgranulação *piecemeal* nos eosinófilos resulta na secreção seletiva de determinados conteúdos dos grânulos, dependendo do estímulo utilizado. Após a transferência do conteúdo dos grânulos para as pequenas vesículas, estas serão subsequentemente liberadas através de exocitose. (Dvorak & Dvorak, 1975; Capron *et al.*, 1989; Dvorak *et al.*, 1991; Bandeira-Melo & Weller, 2005; Trivedi & Lloyd, 2007). A desgranulação através da citólise envolve a deposição

extracelular dos grânulos intactos na lise da célula e perda da integridade da membrana (Moqbel & Coughlin, 2006).

Estudo realizado com biópsias nasais após desafio com alérgeno revelaram que 67% dos eosinófilos encontrados estavam em processo de desgranulação *piecemeal* (Erjefalt *et al.*, 1999). De fato, a desgranulação *piecemeal* parece ser o mecanismo predominante de liberação de grânulos na inflamação alérgica (Dvorak *et al.*, 1980; Ahlstrom-Emanuelsson *et al.*, 2004).

Embora os efeitos quimiotáticos das quimiocinas sejam bastante estudados, pouco se sabe sobre a precisa contribuição das quimiocinas seletivas para eosinófilos sobre as funções efetoras dos mesmos. Fujisawa e colaboradores (2000) demonstraram que, quando comparada com outros estímulos como IgG imobilizada e IgA (que induzem a desgranulação liberando aproximadamente 25 % do total da EDN), as CC-quimiocinas são fracas (aproximadamente 12 %). Horie e colaboradores (1996) mostraram que RANTES induz liberação de EDN por eosinófilos humanos, embora esta liberação seja menor quando comparada com eosinófilos estimulados por GM-CSF, IL-3 e IL-5. Um outro estudo mostrou que eosinófilos humanos estimulados com eotaxina ou RANTES liberam quantidades de EDN equivalentes e comparáveis às quantidades liberadas por eosinófilos estimulados com PAF, potente ativador de eosinófilos (El-Shazly *et al.*, 1998).

Outro estudo usou um modelo de transgene em camundongos *naïve* para analisar o efeito seletivo da inalação do antígeno sobre a desgranulação do eosinófilo e a hiperresponsividade, na presença de eotaxina e IL-5. Os resultados mostraram que a expressão de eotaxina e IL-5 nas vias aeríferas não é capaz de induzir a desgranulação do eosinófilo e nem induzir hiperresponsividade, embora induza significativa eosinofilia no LBA e nas vias aeríferas. A desgranulação dos eosinófilos e a hiperresponsividade se mostraram fenômenos dependentes de células TCD4⁺. Resultados prévios dos mesmos autores confirmam estes resultados pois mostram que a inalação do antígeno ovalbumina não predispõe à desgranulação ou à hiperresponsividade em camundongos deficientes para MHC II após a transferência dos genes para IL-5 e eotaxina. Os resultados destes estudos sugerem que a captação e o processamento do antígeno por células apresentadoras de antígeno (APC) profissionais no pulmão resulta na expansão de células TCD4⁺, que subsequentemente levam à desgranulação dos eosinófilos das vias aeríferas (Mould *et al.*, 2000).

Enfim, embora não seja clara, a contribuição das quimiocinas na desgranulação de eosinófilos parece ter grande significância devido à presença delas no sítio inflamatório, em resposta ao estímulo imunológico.

1.7 Nitração de tirosina em eosinófilos

O NO pode reagir com o ânion superóxido (ou com o oxigênio) levando à formação de espécies reativas de óxido de nitrogênio. Estes efeitos indiretos do NO costumam ocorrer na presença de altas concentrações deste mediador, sendo subdivididos em três tipos: nitrosação, oxidação e nitração. O NO pode levar à formação de intermediários altamente reativos, como o peroxinitrito (ONOO⁻), o qual possui a capacidade de oxidar lipídios e nitrar proteínas (Beckman & Koppenol, 1996). O ONOO⁻ ou um de seus intermediários reativos, pode reagir com compostos fenólicos como a tirosina para formar produtos da nitração (3-nitrotirosina; 3NT) (Ischiropoulos *et al.*, 1992; Van Der Vliet *et al.*, 1995). Vários estudos mostram a presença de 3NT em doenças humanas e em modelos animais como aterosclerose (Beckman *et al.*, 1994; Buttery *et al.*, 1996), doença de Alzheimer (Good *et al.*, 1996; Smith *et al.*, 1997), deficiência renal crônica, choque séptico (Fukuyama *et al.*, 1997), artrite (Kaur & Halliwell, 1994) e asma (Saleh *et al.*, 1998; Andreadis *et al.*, 2003).

Estudos têm identificado vias alternativas para a formação de reativos oxidantes derivados de NO, incluindo as peroxidases de leucócitos. Van Der Vliet e colaboradores (1997) demonstraram que a mieloperoxidase (MPO) pode usar nitrito (NO₂⁻), principal produto final do metabolismo do NO, como substrato para nitrar resíduos de tirosina. Estudos subsequentes com neutrófilos e monócitos demonstraram que espécies reativas de nitrogênio geradas a partir de MPO podem desempenhar papéis significativos na modificação oxidativa de biomoléculas (Eiserich *et al.*, 1998; Schmitt *et al.*, 1999; Hazen *et al.*, 1999; Podrez *et al.*, 1999; Podrez *et al.*, 2000).

Estudo prévio sugeriu a existência de nitração na asma, a qual seria mediada pelo ONOO⁻ (Saleh *et al.*, 1998). De fato, além de o ONOO⁻ modular a migração de eosinófilos induzida pela eotaxina (Sato *et al.*, 2000), há relato da formação de 3NT e aumento na expressão de iNOS em eosinófilos de LBA de camundongos (Iijima *et al.*, 2001). Estudos de imunolocalização revelaram que o epitélio das vias aeríferas e os eosinófilos são a maior

fonte celular para a formação de nitrotirosina em vias aeríferas de indivíduos asmáticos (Dweik *et al.*, 2001).

Um estudo demonstrou que a EPO é significativamente mais eficaz que a MPO em promover a nitração de proteínas em concentrações fisiologicamente relevantes de NO_2^- (Wu *et al.*, 1999). Trabalho realizado com eosinófilos humanos mostrou que os eosinófilos são a principal fonte de oxidantes durante a asma e que eles usam mecanismos distintos para a geração de oxidantes de NO, identificando a EPO como uma fonte enzimática de intermediários nitrados nos eosinófilos (MacPherson *et al.*, 2001). De fato, outros trabalhos também sugerem que as peroxidases, inclusive a peroxidase do eosinófilo, possam ser responsáveis pela nitração de proteínas nestas células (Duguet *et al.*, 2001; Brennan *et al.*, 2002; Van Dalen *et al.*, 2006).

1.8. O papel da eotaxina e do RANTES na asma

O mecanismo que promove o recrutamento de eosinófilos para o sítio inflamatório ainda não está completamente elucidado, porém evidências apontam para o envolvimento de citocinas (ex: IL-3, GM-CSF e IL-5) e quimiocinas nesse processo (Giembycz & Lindsay, 1999; Shahabuddin *et al.*, 2000; Murray *et al.*, 2006; Pease & Williams, 2006). As quimiocinas são consideradas moléculas potentes na regulação do recrutamento seletivo de leucócitos para sítios inflamados (Kaburagi *et al.*, 2001). Várias quimiocinas têm sido descritas como quimiotáticas para eosinófilos, e assim supostamente importantes na patogênese da asma (Shahabuddin *et al.*, 2000). Estas incluem a sub-família das CC-quimiocinas, como as eotaxinas (1, 2 e 3), RANTES, MCP-3 e MCP-4 (Shahabuddin *et al.*, 2000; Teran, 2000; Kaplan, 2001).

A eotaxina foi a primeira quimiocina eosinófilo-específica a ser descoberta. Ela foi primeiramente identificada no LBA de cobaias sensibilizadas após o desafio com ovalbumina (Jose *et al.*, 1994). Posteriormente, a eotaxina também foi identificada em camundongo (Rothenberg *et al.*, 1995), rato (Williams *et al.*, 1998) e humanos (Garcia-Zepeda *et al.*, 1996).

A eotaxina é o fator quimiotático para eosinófilos mais importante; e isso se deve à sua potência e sua seletividade para o receptor CCR3, que está presente principalmente em eosinófilos e basófilos (Powell *et al.*, 2001; Kaburagi *et al.*, 2001). Estudos feitos com

modelos de asma experimental mostraram que a deleção do gene para CCR3 prejudica o recrutamento de eosinófilos (Humbles *et al.*, 2002; Pope *et al.*, 2005; Fulkerson *et al.*, 2006). Acredita-se que esta quimiocina se liga ao CCR3 presente na superfície dos eosinófilos, levando ao aumento da expressão de integrinas, como $\alpha_4\beta_1$. As integrinas ligam-se aos seus receptores complementares presentes no endotélio, resultando na migração da célula através da parede do vaso (Pease & Williams, 2006).

Estudos feitos em pacientes asmáticos mostraram que os níveis de eotaxina se encontram significativamente aumentados na mucosa brônquica, no LBA e no escarro, quando os mesmos parâmetros foram analisados em indivíduos saudáveis (Brown *et al.*, 1998; Yamada *et al.*, 2000).

Evidências experimentais mostraram que a expressão de RNA mensageiro (RNAm) para eotaxina está aumentada no tecido pulmonar de cobaias após o desafio com o antígeno, e que a administração nasal de eotaxina induz influxo de eosinófilos para as vias aéreas. Camundongos *knockout* para o gene da eotaxina têm o recrutamento de eosinófilos suprimido, na fase inicial, após o desafio (Teran, 2000).

Os efeitos da eotaxina humana *in vitro* sobre eosinófilos incluem quimiotaxia, migração transendotelial (Shahabuddin *et al.*, 2000), indução da mobilização de cálcio e polimerização de actina, aumento de CD11b (Powell *et al.*, 2001) e indução e liberação de metabólitos reativos de oxigênio (Honda & Chiara, 1999; Teran, 2000). A eotaxina *in vivo* parece agir conjuntamente com a IL-5, induzindo recrutamento de eosinófilos. A IL-5 promove a mobilização dos eosinófilos da medula óssea, enquanto a eotaxina os recruta para os tecidos.

Em humanos também se observou aumento da expressão de RNAm para eotaxina em biópsias de pacientes asmáticos e no LBA após o desafio com o alérgeno. A presença e a concentração de eotaxina solúvel no soro destes pacientes asmáticos parece estar relacionada com a gravidade da doença, particularmente em casos agudos de asma (Kaplan, 2001). Além disso, foi demonstrada uma associação direta entre os níveis aumentados de eotaxina, o diagnóstico da asma e o comprometimento da função pulmonar (Nakamura *et al.*, 1999). De fato, pacientes com asma aguda apresentam níveis de eotaxina significativamente maiores dos que os que têm asma estável (Lilly *et al.*, 1999).

Outros estudos com humanos revelaram que a eotaxina (eotaxina-1) parece ser detectada imediatamente após o desafio alergênico, enquanto a eotaxina-2 e, possivelmente, a eotaxina-3, aparecem mais tardiamente, contribuindo para a persistência da eosinofilia (Ravensberg et al., 2005).

O RANTES se liga ao CCR3, porém também se liga a outros receptores, sendo assim menos seletivo que a eotaxina (Powell *et al.*, 2001; Pease & Williams, 2006). Deste modo, além de quimiotático para eosinófilos, atrai também monócitos, basófilos, células T e mastócitos (Kaburagi *et al.*, 2001).

Trabalho realizado *in vivo* mostrou que a injeção intradérmica de RANTES é capaz de induzir a formação de exsudato rico em eosinófilos (Meurer et al., 1993). Um estudo *in vitro* mostrou que o RANTES representa um importante ativador do metabolismo oxidativo do eosinófilo (Kapp *et al.*, 1994). Estes trabalhos caracterizam a importância do RANTES para o recrutamento e a ativação de eosinófilos.

Entretanto, as evidências para um papel *in vivo* do RANTES como fator quimiotático na inflamação alérgica surgiram posteriormente, a partir de evidências que a neutralização desta quimiocina por um antagonista do receptor (Met-RANTES) inibe o recrutamento de linfócitos e eosinófilos (Gonzalo *et al.*, 1998; Teran, 2000). Teran e colaboradores (2000) identificaram RANTES como quimiotático para eosinófilos no LBA de asmáticos após o desafio com o alérgeno. Este estudo mostrou que baixas concentrações de RANTES são capazes de induzir quimiotaxia de eosinófilos, e que os níveis desta quimiocina estão correlacionados com o número de eosinófilos presentes no LBA, sugerindo que o RANTES está envolvido diretamente no recrutamento eosinofílico durante a fase tardia da asma (Teran, 2000). De fato, o uso de anticorpo anti-RANTES durante a resposta alérgica das vias aeríferas causa redução significativa do recrutamento de eosinófilos para a região peribrônquica (Lukacs *et al.*, 1996; Lukacs *et al.*, 1997; Gonzalo et al., 1998).

Estudo em humanos mostrou que o desenvolvimento do estado asmático está relacionado com os níveis elevados de MCP-1, MIP-1 α e RANTES no LBA (Tillie-Leblond *et al.*, 2000).

Outros achados apóiam as observações anteriores, pois revelaram o aumento da expressão de RNAm para RANTES em biópsias brônquicas de indivíduos asmáticos

(Teran, 2000; Kaburagi *et al.*, 2001), e também o aumento dos níveis plasmáticos de RANTES em pacientes com ataques agudos de asma (Kaburagi *et al.*, 2001).

As informações da literatura aqui relatadas caracterizam a importância da eotaxina e do RANTES principalmente na inflamação alérgica. Embora RANTES seja menos seletivo que a eotaxina, também é uma quimiocina importante quando se discute recrutamento eosinofílico. Enfim, as quimiocinas em geral não só asseguram a presença de leucócitos específicos no foco inflamatório agindo diretamente nos mesmos, mas também regulam a expressão de outras quimiocinas e a ativação de vários mediadores inflamatórios produzidos por diferentes tipos celulares (Gonzalo *et al.*, 1998).

1.9 Óxido Nítrico e Asma

1.9.1 Biossíntese de óxido nítrico

O NO é um gás produzido por vários tipos celulares (Nathan, 1992) e tem papel-chave na regulação de múltiplas funções biológicas (Moncada *et al.*, 1991; Tulic *et al.*, 2000). Muitas de suas ações são mediadas pela ativação da guanilato ciclase solúvel e conseqüente aumento da concentração de guanosina monofosfato cíclico (GMPC) nas células-alvo (Moncada & Higgs, 1993; Giembycz & Lindsay, 1999).

O NO é formado a partir do aminoácido L-arginina, por uma família de enzimas coletivamente conhecidas como NO sintases. Atualmente são conhecidas 3 NO sintases. Duas delas, a eNOS (óxido nítrico sintase endotelial ou NOS III) e a nNOS (óxido nítrico sintase neuronal ou NOS I) são expressas constitutivamente e são assim chamadas porque expressam o nome dos tecidos onde foram primeiramente identificadas. Ambas são reguladas pelo complexo Ca^{+2} /Calmodulina, produzem pequenas quantidades de NO por curtíssimos períodos de tempo (de segundos a alguns minutos) e desempenham funções regulatórias na neurotransmissão e no sistema cardiovascular. A terceira isoenzima é a iNOS (óxido nítrico sintase induzível ou NOS II) e é assim chamada por poder ser induzida por LPS (lipopolissacarídeo) e certas citocinas. Esta isoforma é independente de Ca^{+2} e pode produzir maiores quantidade de NO por períodos de tempo mais longos (Ignarro & Murad, 1995; Giembycz & Lindsay, 1999).

As NOS são ativas na forma de homodímeros de pesos moleculares entre 250-300 kDa (Knowles & Moncada, 1994; Förstermann *et al.*, 1998). A ligação da calmodulina

aumenta a transferência de elétrons no domínio redutase e permite a redução do grupamento heme com conseqüente atividade da NOS (Matsuoka *et al.*, 1994; Abu-Soud *et al.*, 1994). Todas as isoformas da NOS podem ser inibidas, em graus variáveis, por análogos da L-arginina substituídos no grupamento guanidino (N⁰; Mayer & Andrew, 1998; Boucher *et al.*, 1999), como o N⁰-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME) (Mayer & Andrew, 1998; Boucher *et al.*, 1999).

1.9.2 O papel do NO na asma

O NO tem sido apontado como potencial mediador na inflamação asmática (Moncada & Higgs, 1993). Animais submetidos a modelos de asma experimental e pacientes asmáticos apresentam níveis aumentados de NO no ar exalado (Thomassen *et al.*, 1999; Eynott *et al.*, 2002; Donnelly & Barnes, 2002) e, embora a fonte exata deste NO não esteja esclarecida, altos níveis de iNOS foram observados nas vias aeríferas de indivíduos asmáticos (Donnelly & Barnes, 2002). Xiong e colaboradores (1999) mostraram em um modelo de inflamação alérgica das vias aeríferas que camundongos *knockout* para iNOS têm as manifestações da doença bastante reduzidas, incluindo a infiltração de leucócitos, principalmente eosinófilos.

Eynott e colaboradores (2002) mostraram que ratos têm os níveis de NO exalado, após a provocação alérgica, suprimidos pelo SC-51 (inibidor seletivo da iNOS), indicando que o aumento do NO exalado deve ser derivado da iNOS. Por outro lado, apesar da hiperresponsividade brônquica induzida pelo alérgeno ter sido suprimida, estes ratos não apresentaram a inflamação eosinofílica pulmonar diminuída.

Outro trabalho com ratos mostrou que L-NMMA e aminoguanidina (ambos inibidores de NOS) inibiram o influxo de células inflamatórias induzido pelo alérgeno. A L-arginina (substrato da NOS) reverteu o fenômeno e aumentou o influxo celular, enquanto a D-arginina não causou efeito. Esse trabalho apóia o conceito de que a produção de NO, através da iNOS, tem um papel importante na migração das células inflamatórias (Tulic *et al.*, 2000).

Um estudo com pacientes asmáticos mostrou que o desafio com alérgeno nas vias aeríferas eleva os níveis de NO local, e que o LBA tem níveis aumentados de eosinófilos e

citocinas (GM-CSF e MIP-1), apoiando a correlação entre a presença de NO nas vias aeríferas e o estabelecimento de parâmetros inflamatórios (Thomassen *et al.*, 1999).

O uso de inibidores de NOS em eosinófilos de ratos (Zanardo *et al.*, 1997) e humanos (Thomazzi *et al.*, 2001) mostraram que essas drogas inibem a quimiotaxia de eosinófilos *in vitro*. O tratamento crônico de ratos com L-NAME (inibidor não seletivo de NOS) reduz a migração de eosinófilos *in vivo* no modelo de pleurisia (inflamação não-alérgica) (Ferreira *et al.*, 1996). Em ratos sensibilizados com ovalbumina, o L-NAME foi também capaz de inibir a infiltração de eosinófilos nas vias aeríferas (Ferreira *et al.*, 1998). Outro trabalho realizado com inibidores de NOS, doadores de NO, inibidor da guanilato ciclase solúvel e dibutilil GMPc mostrou que os mecanismos que controlam a quimiotaxia *in vitro* de eosinófilos humanos, através da via NO-cGMP, são parecidos em indivíduos com rinite alérgica e indivíduos saudáveis (Ferreira *et al.*, 2002).

Landgraf e colaboradores (2005) investigaram a infiltração de linfócitos e outros parâmetros da inflamação alérgica pulmonar em camundongos tratados agudamente com inibidores da síntese de NO (L-NAME e aminoguanidina), e em camundongos *knockout* para iNOS. Surpreendentemente, os parâmetros analisados (incluindo número de eosinófilos no LBA) em camundongos iNOS^{-/-} não foram significativamente diferentes dos animais controle; além disso, o tratamento de camundongos iNOS *knockout* com L-NAME ou aminoguanidina não afetou estes parâmetros.

Resultados de um estudo recente feito com camundongos sensibilizados mostraram que o NO gerado pela super-expressão de eNOS (através do uso de camundongos transgênicos) protege da inflamação alérgica através da redução da produção de eotaxina pelas células epiteliais das vias aeríferas e/ou da expressão de moléculas de adesão (ICAM-1 e VCAM-1) no endotélio pulmonar. Este estudo mostra que, embora a maior parte da literatura indique a iNOS como muito importante na inflamação pulmonar alérgica, o papel da eNOS na resposta alérgica não deve ser negligenciado (Kobayashi *et al.*, 2006).

Enfim, é indiscutível que, apesar de controverso, o NO tem um papel importante na migração de eosinófilos durante o processo inflamatório, principalmente na patogênese da asma.

1.10 Quimiocinas e Óxido Nítrico

Alguns trabalhos têm abordado a relação e/ou interação entre quimiocinas e NO. Young e colaboradores (1999) mostraram aumento do NO no ar exalado de macacos alérgicos 24 horas após o desafio com antígeno. Nestes animais, os níveis de eosinófilos presentes no LBA persistem elevados por muitas semanas após 3 desafios com o antígeno. Paralelamente, foi mostrado que estes animais produzem uma eotaxina que apresenta reação cruzada com anticorpos anti-eotaxina humana. Os níveis desta eotaxina se apresentaram consideravelmente aumentados após o desafio. Deste modo, a produção de eotaxina e de NO podem ser considerados marcadores da inflamação alérgica neste modelo experimental.

Um estudo feito com pacientes com rinite alérgica mostrou que a eotaxina induz aumento do número de eosinófilos no lavado nasal, acompanhado de aumento nos níveis de NO nasal (Hanazawa *et al.*, 1999). Este estudo apóia o de Xiong e colaboradores (1999), pois sugere que o NO nasal possa ser útil na avaliação do *status* patofisiológico da resposta inflamatória na mucosa nasal.

Em um modelo murino de asma alérgica foi mostrado que a inibição da iNOS (com o inibidor AMT), durante o desafio com ovalbumina, reduziu a expressão das quimiocinas MIP-2 (quimiotática para neutrófilos) e MCP-1 (envolvida no recrutamento de células mononucleares) no tecido pulmonar. Isto sugere que a inibição da iNOS reduz o desenvolvimento do processo inflamatório através da modulação negativa da expressão de quimiocinas (Trifilieff *et al.*, 2000). Outros trabalhos mostraram que o NO e doadores de NO podem inibir a produção das quimiocinas como IP-10, Mig e RANTES (Wetzler *et al.*, 2000; Frank *et al.*, 2000; Romagnani *et al.*, 2002).

Existem evidências que demonstram que o NO é capaz de suprimir as CC-quimiocinas em vários tipos celulares durante inflamações das via aéreas (Zeiber *et al.*, 1995; Thomassen *et al.*, 1997). Bleese e colaboradores (2000b) demonstraram que a inibição aguda do NO com o uso do L-NAME exacerba a hiperresponsividade, a eosinofilia e a produção das CC-quimiocinas eotaxina e MCP-1.

Deste modo, as evidências indicam que o NO pode atuar como mensageiro intracelular nas vias de sinalização de quimiocinas (Cherla & Ganju, 2001).

2. OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho foi investigar a interação das CC-quimiocinas eosinofilotáticas eotaxina e RANTES e da via de sinalização NO-cGMP em eosinófilos periféricos de humanos.

2.1 Objetivos específicos

- I. Avaliar o efeito da eotaxina ou RANTES sobre a viabilidade de eosinófilos;
- II. Avaliar em eosinófilos deficientes de NO o efeito da eotaxina ou RANTES na adesão à fibronectina;
- III. Avaliar em eosinófilos deficientes de NO o efeito da eotaxina ou RANTES na expressão das integrinas VLA-4 e Mac-1;
- IV. Avaliar em eosinófilos deficientes de NO o efeito da eotaxina ou RANTES na desgranulação;
- V. Avaliar em eosinófilos deficientes de NO o efeito da eotaxina ou RANTES na quimiotaxia;
- VI. Avaliar em eosinófilos deficientes de NO o efeito da eotaxina ou RANTES sobre os níveis de cGMP;
- VII. Investigar em eosinófilos de indivíduos sadios e asmáticos deficientes de NO o efeito da eotaxina ou RANTES sobre a presença de proteínas contendo resíduos de tirosina nitrada.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Amostras de sangue

Sangue venoso foi coletado de voluntários sadios ou asmáticos, entre 21 e 45 anos, de ambos os gêneros, através de consentimento escrito aprovado pelo comitê de ética local (nº. 048/2004). O sangue foi colhido na presença de citrato de sódio (3,13%; 1:10). Foram utilizados indivíduos sadios, sem história prévia de asma ou outras doenças alérgicas e que não fizeram uso de medicamentos (corticóide sistêmico, antiinflamatórios não hormonais) nas duas últimas semanas. A seleção dos pacientes quanto ao grau do estado asmático, bem como o controle dos mesmos quanto à abstenção de drogas antiinflamatórias porventura em uso corrente (glicocorticóides, p.ex.) foi feita pelo Dr. Antonio Condino Neto (Faculdade de Ciências Médicas / UNICAMP).

3.2 Isolamento de eosinófilos

O sangue não coagulado (60-120 ml) foi inicialmente diluído (1:1; v/v) com PBS (pH 7,2-7,4). Alíquotas de 35 ml de sangue diluído foram colocadas sobre 15 ml de solução isotônica de Percoll (9,5 ml de Percoll, 4,0 ml de água e 1,5 ml de solução salina de HANKS concentrado 10x; densidade $1,082 \pm 0,005$ g/ml; pH 7,4; 340 mOs/kg H₂O de osmolaridade; Sigma Chem. Co., EUA) em tubos plásticos de 50 ml. Após centrifugação (20 minutos; 1000 x g; 4°C), a camada de células mononucleares foi descartada, e o *pellet* contendo eritrócitos, neutrófilos e eosinófilos foi aspirado e transferido para um tubo limpo. Os eritrócitos foram lisados (13 minutos; 0°C) por adição de 5 volumes de solução isotônica gelada de cloridrato de amônia (NH₄Cl 155 mM, KHCO₃ 10 mM e EDTA 0,1 mM) para 1 volume do *pellet*. Após a lise, a suspensão celular foi centrifugada (10 minutos; 500 x g; 4°C) e o *pellet* resultante foi lavado 1x (10 minutos; 500 x g; 4°C) em PBS. Em seguida, foi feita a contagem de células (corante Turk) em câmara de Neubauer.

3.3 Separação imunomagnética de eosinófilos

Utilizamos o sistema magnético de separação celular (MACS; Miltenyi Biotec, Alemanha; e Becton-Dickinson, Reino Unido) para separar eosinófilos, conforme descrito por Hansel e colaboradores (1991). Inicialmente a coluna foi lavada 4x com PBS/BSA 0.5% e, posteriormente, incubada com PBS/BSA 0.5% à temperatura ambiente por 1 hora.

Imediatamente antes do uso, a coluna foi resfriada por meio de 4 lavagens com PBS/BSA 0.5% gelado. A mistura de neutrófilos/eosinófilos foi incubada com *microbeads* revestidos com anticorpo anti-CD16, por 30 minutos (6-12°C; 32 μ l *microbeads* / 5×10^7 células). PBS/BSA gelado (q.s.p. 1ml) foi então adicionado à suspensão de células, a qual foi transferida para o alto da coluna, sob campo magnético. Após aplicarmos a suspensão celular na coluna, mais 3 volumes (1ml) de tampão PBS/BSA foram passados pela mesma. As células CD16⁺ (neutrófilos) permaneceram presas à coluna, ao passo que as células CD16⁻ (eosinófilos) foram coletadas (volume de eluição de 30 ml). As células CD16⁻ foram centrifugadas (10 minutos; 500 x *g*; 4°C) e utilizadas nos ensaios.

A determinação total de células foi realizada usando-se a câmara de Neubauer, obtendo o n° de células x 10⁶/ml. As lâminas foram preparadas na citocentrífuga (10 minutos; 2×10^6 céls/ml; 100 μ l; 1800 x *g*), e coradas com Diff-Quick para determinação diferencial em microscópio óptico. As células foram ajustadas na concentração desejada para cada ensaio.

3.4 Ensaio de atividade celular pelo MTT

Adaptamos o ensaio de MTT [brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólico] descrito por Ribeiro-Dias e colaboradores (2000). Sendo assim, utilizamos uma suspensão celular na concentração final de 2×10^6 eosinófilos/ml em meio de cultura RPMI 1640 (sem vermelho de fenol). As células foram estimuladas ou não com eotaxina ou RANTES (10, 100 e 1000 ng/ml) e incubadas em estufa (37°C, 5% CO₂, ar úmido) por 2, 3 e 4 horas. Após os diferentes períodos de incubação, adicionamos 100 μ l das amostras/ poço, a uma placa de 96 poços (cada amostra foi feita em triplicata) e acrescentamos 10 μ l de MTT (5 mg/ml em PBS). Incubamos por 3 horas em estufa (37°C, 5% CO₂, ar úmido) e, após este período, adicionamos 100 μ l de SDS 10% em HCl 0,01 M e incubamos por 18 horas em estufa (37°C, 5% CO₂, ar úmido). Por fim, realizamos a leitura da absorbância no comprimento de onda de 540 nm.

3.5 Citometria de fluxo

A expressão das integrinas VLA-4 e Mac-1 na superfície de eosinófilos foi detectada através de citometria de fluxo. Para isto, após os períodos de incubação (2, 3 ou 4 horas), os eosinófilos na concentração final de 3×10^6 células/ml (100 μ l suspensão celular/tubo) tratados ou não com eotaxina ou RANTES (10, 100 e 1000 ng/ml), foram submetidos à técnica de marcação celular. Todos os anticorpos usados eram conjugados à ficoeritrina: CD49d (anti-VLA-4), CD11b (anti-Mac-1) e o IgG1(isotipo controle).

Antes da marcação, cada tubo contendo as células foi centrifugado (500g - 4°C) com 500 μ l de PBS / BSA 0.5% /azida 0.2% por 10 minutos. Posteriormente, os sobrenadantes foram descartados e a cada tubo foi adicionado 10 μ l de soro humano inativado (para bloqueio de ligações inespecíficas). Os tubos foram incubados em geladeira (4°C) por 20 minutos. Após isso, os tubos foram novamente centrifugados (500g - 4°C) com 500 μ l de PBS / BSA 0.5% /azida 0.2% por 10 minutos e os sobrenadantes foram descartados. Em seguida, foi adicionado a cada tubo 5 μ l de anticorpo e os tubos foram incubados em geladeira (4°C) por 20 minutos. Após esta incubação, os tubos foram centrifugados por 10 minutos (500g - 4°C) com 500 μ l de PBS / BSA 0.5% /azida 0.2% e os sobrenadantes foram descartados. Por fim, a cada tubo foi adicionado 300 μ l de paraformaldeído 0.5% em PBS e os tubos foram mantidos em geladeira (4°C) até o dia seguinte, quando foi feita a análise. As células foram analisadas a 488 nm no FACS (Becton-Dickinson FACScalibur). A intensidade de fluorescência foi comparada a do grupo controle.

3.6 Adesão de eosinófilos à fibronectina

Poços de placas de 96 poços foram revestidos com 60 μ l de uma solução de fibronectina (20 μ g/ml em PBS) e incubados *overnight* a 4°C. No dia seguinte os poços foram lavados 2 vezes com 200 μ l de PBS e, em seguida, foram tratados por 1 hora (37°C) com uma solução de BSA 0.1% em PBS (100 μ l/poço) para bloqueio das ligações inespecíficas. Após a incubação, os poços foram novamente lavados com PBS e as placas foram deixadas em estufa (37°C) para secagem dos poços. Em quanto isso, foram feitas as incubações dos eosinófilos em meio de cultura RPMI 1640 (sem vermelho de fenol) por 2, 3 e 4 horas, na presença ou ausência das quimiocinas e/ou outras drogas (L-NAME e PAF).

Posteriormente às incubações, a cada poço foi adicionado 50 µl da suspensão de eosinófilos (7×10^4 células/ml). Em seguida, a placa foi incubada por 30 minutos em estufa (37°C, 5% CO₂) para permitir a adesão das células. As células não aderidas foram removidas e os poços foram lavados delicadamente 2 vezes com PBS. 50 µl de RPMI foi adicionado a cada poço previamente recoberto com fibronectina e, aos poços não recobertos, foram adicionadas concentrações variadas da suspensão celular original (em RPMI) para a formação de uma curva padrão de células. A adesão dos eosinófilos foi calculada através da medida da atividade da EPO das células aderidas (Nagata *et al.*, 1995). 50 µl do substrato da EPO (1mM H₂O₂, 1mM OPD e 0.1% Triton X-100 em tampão Tris, pH 8) foi adicionado a cada poço. Após 30 minutos de incubação a temperatura ambiente, adicionamos a cada poço 25 µl de H₂SO₄ 4M para interromper a reação. A absorbância foi medida a 490 nm no leitor de microplaca (Multiscan MS, Labsystems, USA). A adesão foi calculada através da comparação das absorbâncias das amostras (desconhecidas), com as da curva padrão de células.

3.7 Desgranulação de eosinófilos

Primeiramente, os tubos que receberam as células foram tratados com 1 ml de albumina de soro humano (HSA) 2.5 % por 2 horas a 37°C para bloquear a ativação não-específica dos eosinófilos. Em seguida, os tubos foram lavados com 1 ml de PBS antes de receberem as alíquotas de eosinófilos. A suspensão de eosinófilos (em meio de cultura RPMI 1640 sem vermelho de fenol) foi ajustada para $5,5 \times 10^6$ células/ml (100 µl/tubo) da suspensão (cada ponto experimental foi feito em triplicata). Posteriormente, os tubos com eosinófilos, na presença ou ausência das quimiocinas eotaxina ou RANTES (100 ng/ml) e/ou 0.1 mM de L-NAME, foram incubados em estufa (37°C, 5% CO₂) por 4 horas. O ionóforo de cálcio (A23187) foi usado como controle positivo (5 µM, 30 minutos) (Adamko *et al.*, 2004). Após a incubação, os tubos foram centrifugados por 15 minutos (250 x g) e alíquotas de 50 µl do sobrenadante de cada tubo foram transferidas para poços de placas de 96 poços. 50 µl do substrato da EPO (1mM H₂O₂, 1mM OPD e 0.1% Triton X-100 em tampão Tris, pH 8) foi adicionado a cada poço. Após 30 minutos de incubação a temperatura ambiente, adicionamos a cada poço 25 µl de H₂SO₄ 4M para interromper a

reação. A absorvância foi medida a 490 nm no leitor de microplaca (Multiscan MS, Labsystems, USA).

3.8 Quimiotaxia de eosinófilos

Os ensaios de quimiotaxia *in vitro* foram realizados usando-se câmaras de quimiotaxia de 96 poços (ChemoTx 101-5). Aos poços da câmara foram adicionados 29 µl do agente quimiotático (eotaxina 100 ng/ml e/ou RANTES 100 ng/ml) e, em seguida, o filtro de policarbonato (poro 5 µm) foi posicionado na placa sobre os poços. Adicionou-se 25 µl da suspensão de eosinófilos (4×10^6 células/ml) na presença ou ausência de L-NAME (0.1 mM), sobre o filtro nos locais delimitados em forma de anel (sobre cada poço). A quimiotaxia espontânea foi verificada substituindo-se o agente quimiotático pelo RPMI 1640. A câmara foi incubada por 2 horas em estufa (5% de CO₂, 37°C). Após a incubação, a suspensão celular restante na parte superior do filtro foi removida com o auxílio de uma gaze, e a placa foi centrifugada a 200 x *g* por 5 minutos a 20 °C. O filtro foi cuidadosamente removido e o volume restante dos poços foi reajustado para 29 µl. Este volume foi diluído 1:10 e alíquotas de 50 µl foram transferidas para placas de 96 poços. 50 µl do substrato da EPO (1mM H₂O₂, 1mM OPD e 0.1% Triton X-100 em tampão Tris, pH 8) foi adicionado a cada poço. Após 30 minutos de incubação a temperatura ambiente, adicionamos a cada poço 25 µl de H₂SO₄ 4M para interromper a reação. A absorvância foi medida a 490 nm no leitor de microplaca (Multiscan MS, Labsystems, USA). O número de células que migraram para a parte inferior da placa foi determinado através da medida da EPO residual.

3.9 Extração e dosagens de cGMP

3.9.1 Extração de GMP cíclico

Os eosinófilos foram ressuspensos em PBS numa concentração final de 1×10^7 células/ml e, em seguida a suspensão celular foi incubada com 2 mM de IBMX por 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, os eosinófilos tratados ou não com as quimiocinas e/ou L-NAME foram incubados por 4 horas em estufa (37°C, 5% CO₂). O

doador de NO nitroprussiato de sódio (SNP) foi utilizado como controle positivo nos ensaios de dosagem de GMPc. A incubação foi interrompida adicionando-se etanol absoluto acidificado gelado (concentração final de 67%). As amostras foram agitadas vigorosamente por 30 segundos, incubadas em gelo por 30 min, e centrifugadas à 4000xg por 30 minutos (4°C). Os sobrenadantes das amostras foram recolhidos e guardados. Os *pellets* foram lavados com 0,5 ml de etanol acidificado gelado (67%), centrifugados a 14000xg por 5 minutos e, estes sobrenadantes foram adicionados aos primeiros. As amostras foram secas a 55-60°C em banho-maria, sob fluxo de nitrogênio, e estocadas (-20°C) até a dosagem do nucleotídeo.

3.9.2 Dosagens de GMP cíclico

As dosagens foram realizadas com kits comerciais específicos para o nucleotídeo GMPc (Cayman Chemical Co., USA). As amostras foram previamente acetiladas de acordo com as recomendações do fabricante. Cada poço recebeu material proveniente de $1,5 \times 10^6$ células (50 μ l), e cada amostra foi feita em triplicata. A leitura foi realizada a 405 nm (Pradelles *et al.*, 1989; Maxey *et al.*, 1992).

3.10 Nitração da albumina de soro bovino (BSA) com peroxinitrito

3.10.1 Preparação do peroxinitrito

A BSA nitrada foi usada como controle positivo para a detecção de proteínas nitradas. Inicialmente preparamos 3 soluções: NaNO₂ 0.6 M, H₂O₂ 0.6 M em 50 ml de HCl 0.7 M e NaOH 1.2 M. A preparação da reação foi feita com 10 ml de cada solução. As foram colocadas em 3 béqueres separadamente, sendo que o becker que continha a solução de NaOH foi colocado sob o agitador magnético. Em seguida, sobre a solução de NaOH foram acrescentadas as soluções de NaNO₂ e H₂O₂, simultânea e rapidamente. A solução resultante da mistura das 3 soluções iniciais obteve uma coloração amarela. Em seguida, a solução final foi colocada em tubos de 50 ml e estocada a -20°C *overnight*. No dia seguinte, os tubos foram retirados do freezer, coletando-se rapidamente a parte mais amarelada, presente na parte superior da solução congelada, que é o peroxinitrito. As diluições do peroxinitrito foram feitas em NaOH 1.2 M. A determinação da concentração do

peroxinitrito foi feita através do espectrofotômetro a 302 nm, e com o auxílio da seguinte equação: $Abs = b \times c \times e$

$$C = \frac{Abs \times dil}{1670}$$

C = concentração final de peroxinitrito

Abs = absorvância

b (dil) = fator de diluição

e (coeficiente de extinção do peroxinitrito) = $1620 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

3.10.2 Nitração da BSA

O peroxinitrito (concentração final de 1mM) foi adicionado à uma solução de BSA 1mg/ml e incubado a temperatura ambiente por 5 minutos. Em seguida foi feita a neutralização com ½ volume de HCl 0.4 M.

3.11 Western blotting para 3-nitrotirosina

Os eosinófilos foram isolados, ajustados para a concentração de 1×10^7 células/ml em RPMI 1640 (sem vermelho de fenol) e incubados em estufa (37°C , 5% CO_2) por 4 horas, na presença ou ausência das quimiocinas eotaxina ou RANTES (100 ng/ml) e/ou 0.1 mM de L-NAME. Após a incubação, a cada tubo contendo eosinófilos foi adicionado 5 μl do coquetel de inibidores de proteases (AEBSF 2 mM, aprotinina 1.6 μM , leupeptina 42 μM , bestatina 72 μM , pepstatina A 30 μM e E-64 28 μM) e os mesmos foram estocados a -80°C . Para o ensaio, as amostras de eosinófilos foram descongeladas, sonicadas (5 minutos) e centrifugadas ($10000 \times g$, 4°C) por 15 minutos. O sobrenadante e o precipitado foram separados. O sobrenadante foi aliquoteado e congelado. O precipitado foi resuspenso em tampão (1% NP-40, 20 mM Tris-HCl pH 7.5, 400 mM NaCl, 1mM EDTA), sonificado (5 minutos) e centrifugado ($10000 \times g$, 4°C) por 15 minutos. O *pellet* desta segunda centrifugação foi descartado e o sobrenadante foi congelado. Foram feitas dosagens de proteína nas amostras (sobrenadantes da primeira e segunda centrifugação), usando o kit Bio-Rad DC protein assay (BioRad). Quantidades equivalentes de proteína (40 μg) foram adicionadas ao gel de poliacrilamida (SDS-PAGE, 7.5 %). As proteínas foram transferidas

eletroforeticamente para membranas de PVDF, que foram bloqueadas com por 30 minutos à temperatura ambiente com leite desnatado 5% em TBS (Tris 200 mM, NaCl 1.5 M, pH 7.6) contendo 0.1% de Tween (TBS-T). As membranas foram incubadas *overnight* (4°C) com o anticorpo monoclonal anti-nitrotirosina (1:2000). No dia seguinte, as membranas foram lavadas 6 vezes (10 minutos / vez) com TBS-T, e posteriormente incubadas com o anticorpo secundário conjugado com peroxidase (1:8000) diluído em uma solução 5% de leite desnatado em TBS-T por 1 hora. As membranas foram lavadas por mais 6 vezes com TBS-T. A detecção de proteína nitrada foi feita através do aumento de quimioluminescência (*ECL plus Western blotting detection system*).

3.12 Análise dos resultados

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão das médias (EPM) de *n* experimentos, quando apropriado. Diferenças estatisticamente significativas foram determinadas utilizando-se análise de variância (ANOVA) para múltiplas comparações seguido pelo teste de Tukey, ou teste *t* de *student* não pareado quando apropriado. Valores de $P < 0,05$ foram considerados significativos.

4. RESULTADOS

4.1 Efeitos das quimiocinas eotaxina e RANTES sobre a viabilidade dos eosinófilos

Inicialmente, realizamos ensaios de atividade celular pelo MTT com o objetivo de verificar a viabilidade dos eosinófilos após os 3 períodos de incubação. Diante disso, realizamos experimentos com eosinófilos purificados, estimulados ou não (controle) com eotaxina (10, 100 e 1000 ng/ml) ou RANTES (10, 100 e 1000 ng/ml) após 2, 3 e 4 horas de incubação.

A tabela 1 mostra que os eosinófilos permanecem viáveis após 2, 3 e 4 horas de incubação em estufa a 37°C. Além disso, podemos notar que alguns pontos experimentais com células estimuladas com quimiocinas apresentaram valores de porcentagem significativamente aumentados em relação ao controle. No tempo de 2 horas, este aumento pode ser observado com ambas as quimiocinas nas concentrações de 100 e 1000 ng/ml. Em 3 horas, o aumento ocorre com eotaxina nas concentrações de 100 e 1000 ng/ml e em todas as concentrações de RANTES testadas. Em 4 horas, o aumento ocorre com eotaxina nas concentrações de 100 e 1000 ng/ml na presença de eotaxina ou RANTES.

Estes resultados nos permitem concluir que as células permanecem vivas em todos os tempos de incubação estudados, além de estarem ativadas na maioria dos pontos experimentais testados.

Tabela 1. Efeito das quimiocinas eotaxina e RANTES sobre eosinófilos

Tratamento	Redução do MTT (% controle)		
	2h	3h	4h
Eotaxina (10 ng/ml)	84.6 ± 6.6	113.0 ± 6.1	91.0 ± 2.7
(100 ng/ml)	113.8 ± 5.0*	130.7 ± 2.3*	127.3 ± 3.6*
(1000 ng/ml)	124.7 ± 5.0*	138.4 ± 2.0*	146.0 ± 11.8*
RANTES (10 ng/ml)	104.8 ± 1.6	128.8 ± 8.0*	105.8 ± 1.0
(100 ng/ml)	118.9 ± 2.8*	133.4 ± 3.6*	138.4 ± 6.0*
(1000 ng/ml)	117.4 ± 3.8*	118.0 ± 1.0*	147.0 ± 6.9*

A suspensão de eosinófilos (2×10^6 células/ml) foi incubada por 2, 3 ou 4 h com eotaxina (10-1000 ng/ml) ou RANTES (10-1000 ng/ml). Cada experimento foi realizado em triplicata ($n = 3$). Os resultados são expressos como % de redução do MTT em relação ao controle. * $p < 0.05$ quando comparado com células não tratadas.

4.2. Adesão de eosinófilos à fibronectina

Após 2, 3 e 4 horas de incubação, os eosinófilos purificados, estimulados ou não com eotaxina ou RANTES, foram adicionados a poços previamente revestidos com fibronectina e incubados em estufa úmida (37°C, 5% CO₂) para aderir por 30 minutos.

A figura 1 (painel A) mostrou que a pré-incubação por 2 horas das células com eotaxina ou RANTES não modificou a porcentagem de células aderidas à fibronectina em relação ao controle não estimulado (CTRL), em nenhuma das concentrações testadas (10, 100 e 1000 ng/ml). O tratamento com PAF (10⁻⁶ M) também não modificou a porcentagem de células aderidas à fibronectina em relação ao controle não estimulado (CTRL).

Após 3 horas (painel B) de incubação com eotaxina ou RANTES, houve um discreto aumento da adesão dos eosinófilos estimulados com eotaxina (7.9±1.7%; 10.9±3.0%; 11.6±3.39%, para 10, 100 e 1000 ng/ml, respectivamente) ou RANTES (9.2±2.0%, 11.4±3.4%, 12.5±2.9%, para 10, 100 e 1000 ng/ml, respectivamente), quando comparamos com as células não estimuladas (CTRL) (5.8±1.7%). Entretanto, este aumento não alcançou diferença estatística usando-se ANOVA.

O painel C ilustra os resultados obtidos após 4 horas de incubação na presença ou ausência das quimiocinas. Com este tempo de incubação, podemos observar um aumento estatisticamente significativo da adesão dos eosinófilos estimulados com o controle positivo PAF (10⁻⁶ M; 12.8±1.9%), eotaxina (14.1±2.2% e 11±2.0%, para 100 e 1000 ng/mL) e RANTES (13.8±2.1%, para 100 ng/ml), em relação às células não estimuladas (CTRL) (6.6±1.0%).

É importante lembrar que os eosinófilos permanecem viáveis (ensaio de MTT) em todas as condições experimentais, quer na ausência, quer na presença de quimiocinas. Diante disso, estabelecemos 4 horas e 100 ng/ml de eotaxina ou RANTES, como o tempo e concentração-ótimos para os experimentos posteriores.

Com o objetivo de investigar uma possível interação da via de sinalização das quimiocinas com a do NO, resolvemos verificar, em experimentos separados, o efeito do L-NAME (inibidor não seletivo de NOS) sobre o aumento da adesão induzido pela eotaxina e RANTES nas placas recobertas com fibronectina.

Analisando a figura 2 podemos notar que o controle positivo PAF (10⁻⁶ M; 15.3±1.8%) e o L-NAME 0.1 mM (10.3±1.5%) foram capazes de aumentar

significativamente a adesão dos eosinófilos à fibronectina, quando comparados aos eosinófilos não estimulados (CTRL) ($6.1 \pm 1.1\%$). Entretanto, a co-incubação de L-NAME com eotaxina ($14.9 \pm 2.1\%$) ou com RANTES ($14.7 \pm 2\%$) não modificou a adesão vista isoladamente com a eotaxina ($15.7 \pm 2\%$) ou RANTES ($15.7 \pm 2\%$).

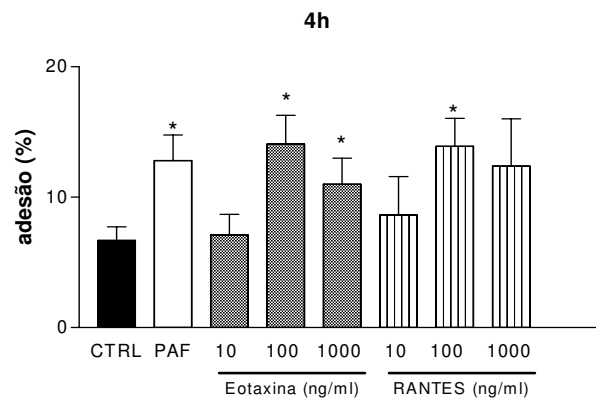
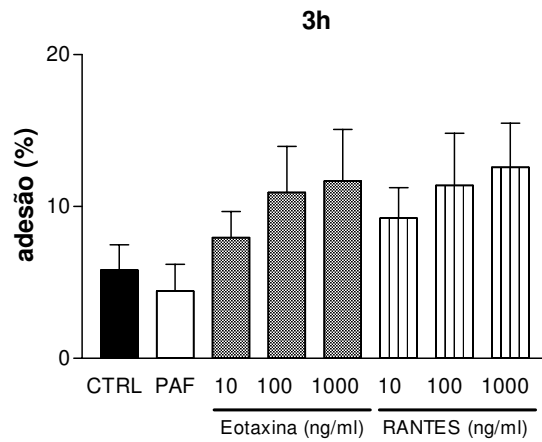
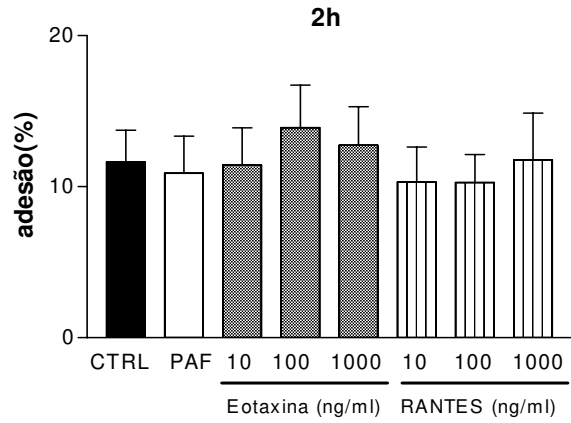


Fig 1. Efeito das quimiocinas sobre a adesão de eosinófilos à fibronectina. Eosinófilos (7×10^4 células/ml - $50 \mu\text{l}$ /poço) foram incubados por 2, 3 e 4 h com (CTRL) ou sem PAF (10^{-6}M), eotaxina (10-1000 ng/ml) ou RANTES (10-1000 ng/ml). Em seguida, as células foram incubadas por 30 minutos em poços recobertos com fibronectina. Os resultados são expressos como média das porcentagens de células aderidas \pm EPM ($n=6$). * $P < 0.05$ quando comparado com CTRL.

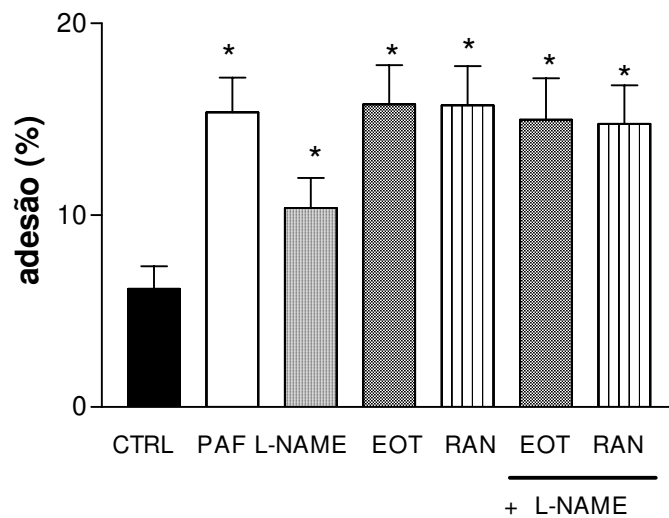


Fig 2. Efeito do L-NAME sobre a adesão de eosinófilos à fibronectina. Eosinófilos (7×10^4 células/ml - 50 μ l/poço) foram incubados por 4 h com (CTRL) ou sem PAF (10^{-6} M), L-NAME (0.1 mM), eotaxina (100 ng/ml) ou RANTES (100 ng/ml). Em seguida, as células foram incubadas por 30 minutos em poços recobertos com fibronectina para permitir a adesão. Os resultados são expressos como média das porcentagens de células aderidas \pm EPM (n=6). *P<0.05 quando comparado com CTRL.

4.3 Detecção da expressão das integrinas VLA-4 e Mac-1

As integrinas VLA-4 e Mac-1 são consideradas as moléculas de adesão mais importantes na adesão firme do eosinófilo ao endotélio, e por isso têm papel importante no recrutamento destas células para o tecido inflamado. Diante disso, decidimos avaliar através da técnica de citometria fluxo a expressão destas moléculas de adesão em eosinófilos purificados, estimulados ou não com eotaxina e RANTES, após 2, 3 e 4 horas de incubação.

4.3.1 Após 2 horas de incubação

A figura 3 mostra que eosinófilos tratados ou não com quimiocinas apresentaram um perfil de resposta semelhante tanto para VLA-4 (painel A) como para Mac-1 (painel B), ou seja, nenhuma das concentrações de eotaxina ou RANTES utilizadas foi capaz de aumentar a intensidade de fluorescência em relação ao controle (CTRL).

4.3.2 Após 3 horas de incubação

Analisando a figura 4 podemos observar que o período de 3 horas de incubação com eotaxina ou RANTES também não foi capaz de alterar a expressão das integrinas. Assim, não houve diferença significativa entre a expressão de VLA-4 (painel A) e Mac-1 (painel B) entre células estimuladas e não estimuladas com quimiocinas.

4.3.3 Após 4 horas de incubação

A incubação de 4 horas (figura 5) com eotaxina ou RANTES, novamente, não foi capaz de modificar a expressão de VLA-4 e Mac-1, mostrando padrão de resposta semelhante ao observado após 2 e 3 horas de incubação.

4.3.4 Após 4 horas de incubação (co-incubação com L-NAME)

Neste tempo de 4 horas de incubação decidimos verificar o efeito da co-incubação do L-NAME (0.1 mM) com eotaxina ou com RANTES (100 ng/ml) sobre a expressão de VLA-4 e Mac-1. A análise da figura 6 nos mostra que a co-incubação do L-NAME com a eotaxina ou com RANTES não alterou significativamente a expressão de VLA-4 (painel A) ou Mac-1 (painel B).

Após 2 horas de incubação

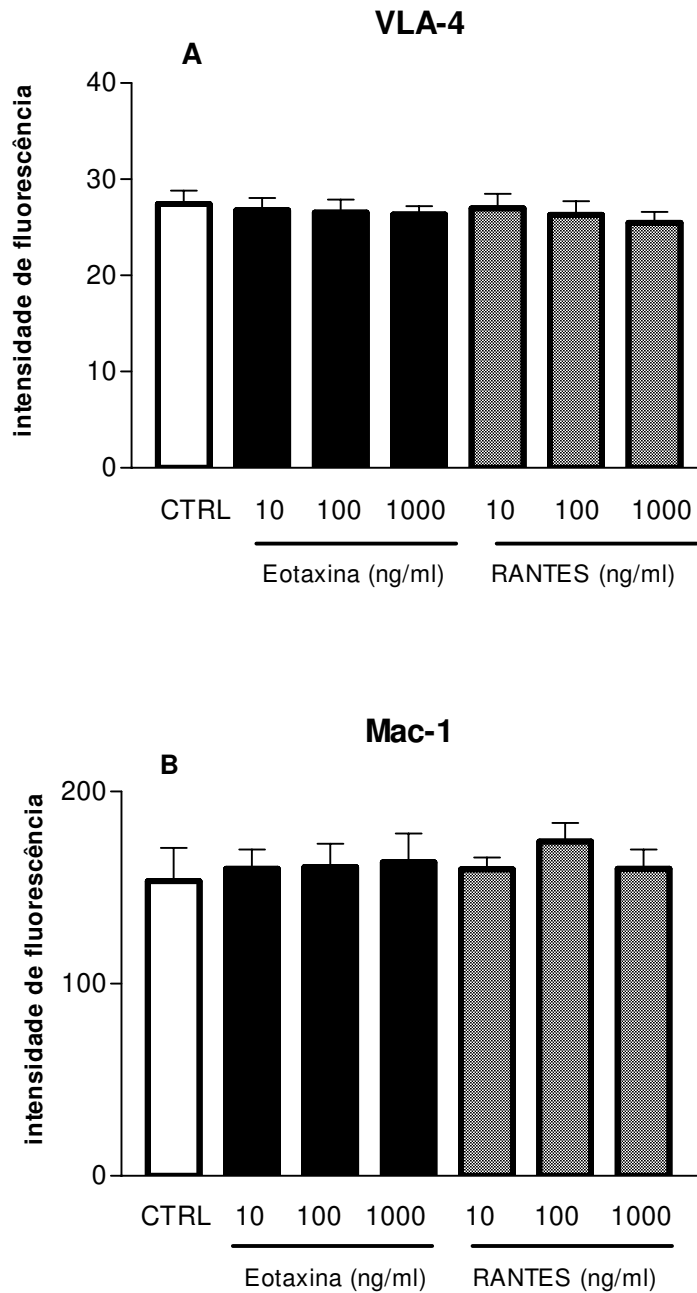


Fig 3. Detecção da expressão de VLA-4 e Mac-1 após 2 horas de incubação. Eosinófilos (3×10^6 células/ml- 100 μ l/tubo) foram incubados por 2 h; sem (CTRL) ou com eotaxina (10-1000 ng/ml) ou RANTES (10-1000 ng/ml). Em seguida, as células foram marcadas com anticorpo anti-VLA-4 (painel A) e anti-Mac-1 (painel B). Os resultados estão expressos como média \pm EPM (n=3-4).

Após 3 horas de incubação

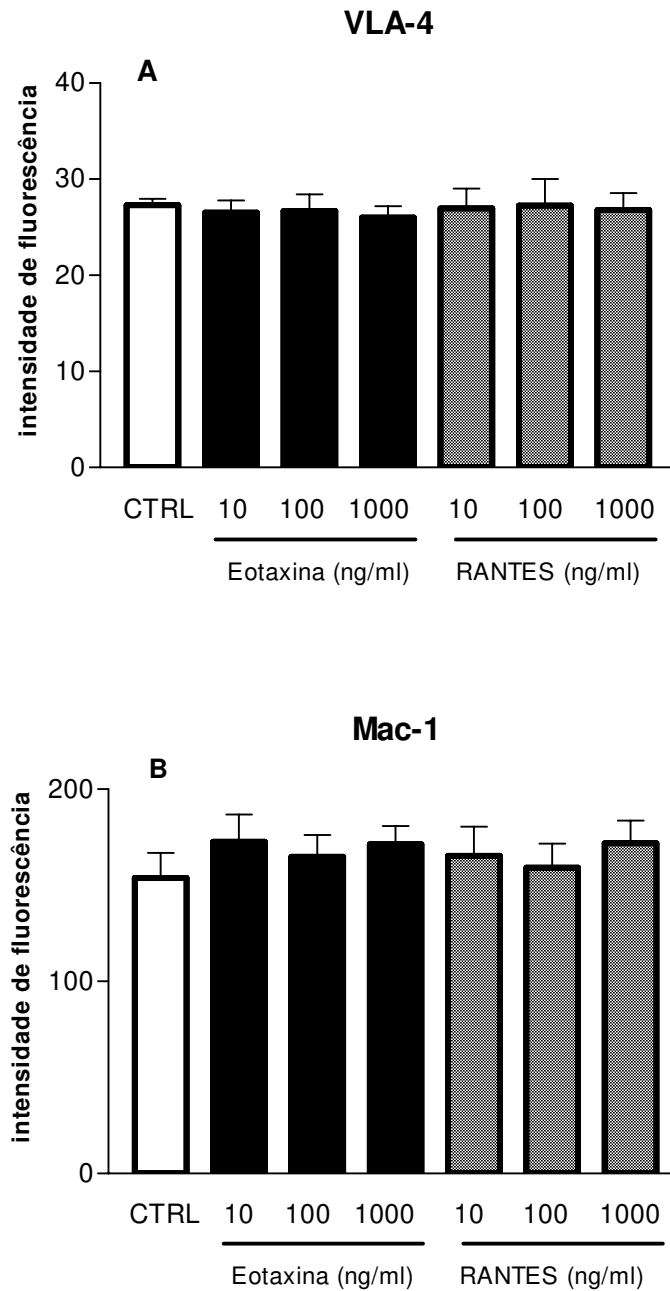


Fig 4. Detecção da expressão de VLA-4 e Mac-1 após 3 horas de incubação. Eosinófilos (3×10^6 células/ml - 100 μ l/tubo) foram incubados por 3 horas; sem (CTRL) ou com eotaxina (10-1000 ng/ml) ou RANTES (10-1000 ng/ml). Em seguida, as células foram marcadas com anticorpo anti-VLA-4 (painel A) e anti-Mac-1 (painel B). Os resultados estão expressos como média \pm EPM (n=4).

Após 4 horas de incubação

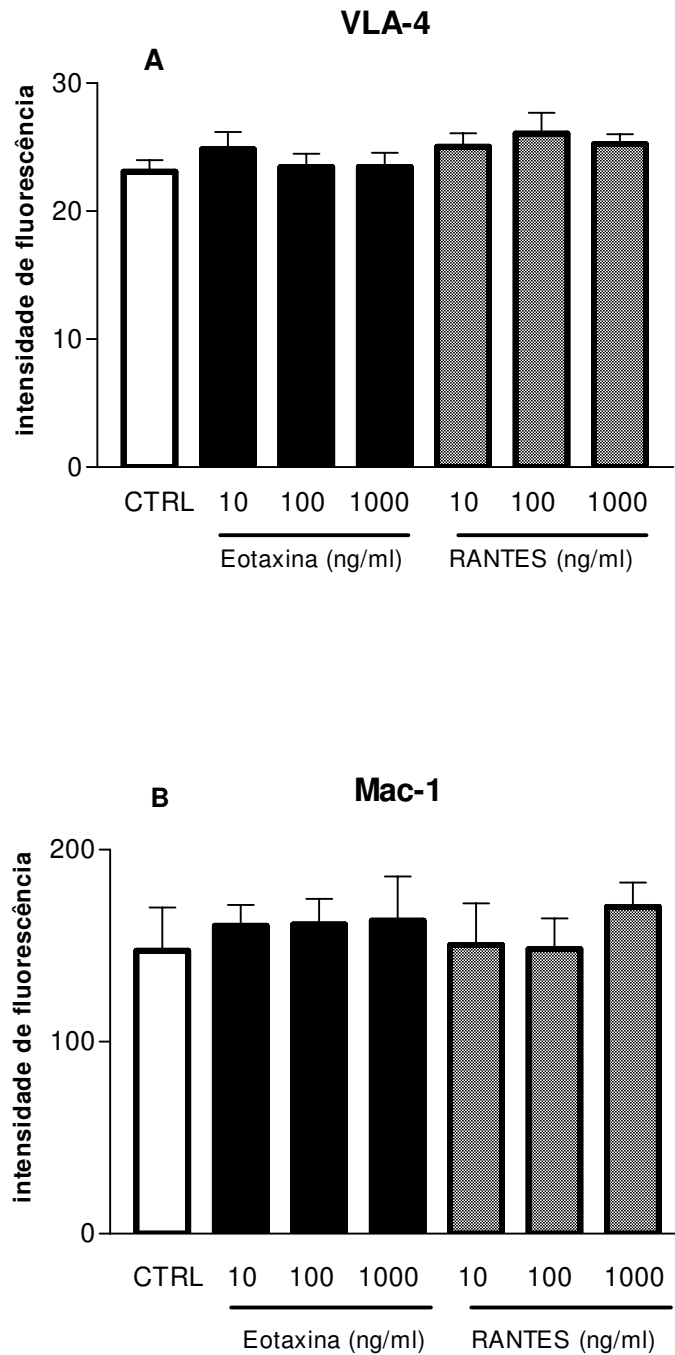


Fig 5. Detecção da expressão de VLA-4 e Mac-1 após 4 horas de incubação. Eosinófilos (3×10^6 células/ml - 100 μ l/tubo) foram incubados por 4 horas; sem (CTRL) ou com eotaxina (10-1000 ng/ml) ou RANTES (10-1000 ng/ml). Em seguida, as células foram marcadas com anticorpo anti-VLA-4 (painel A) e anti-Mac-1 (painel B). Os resultados estão expressos como média \pm EPM (n=4).

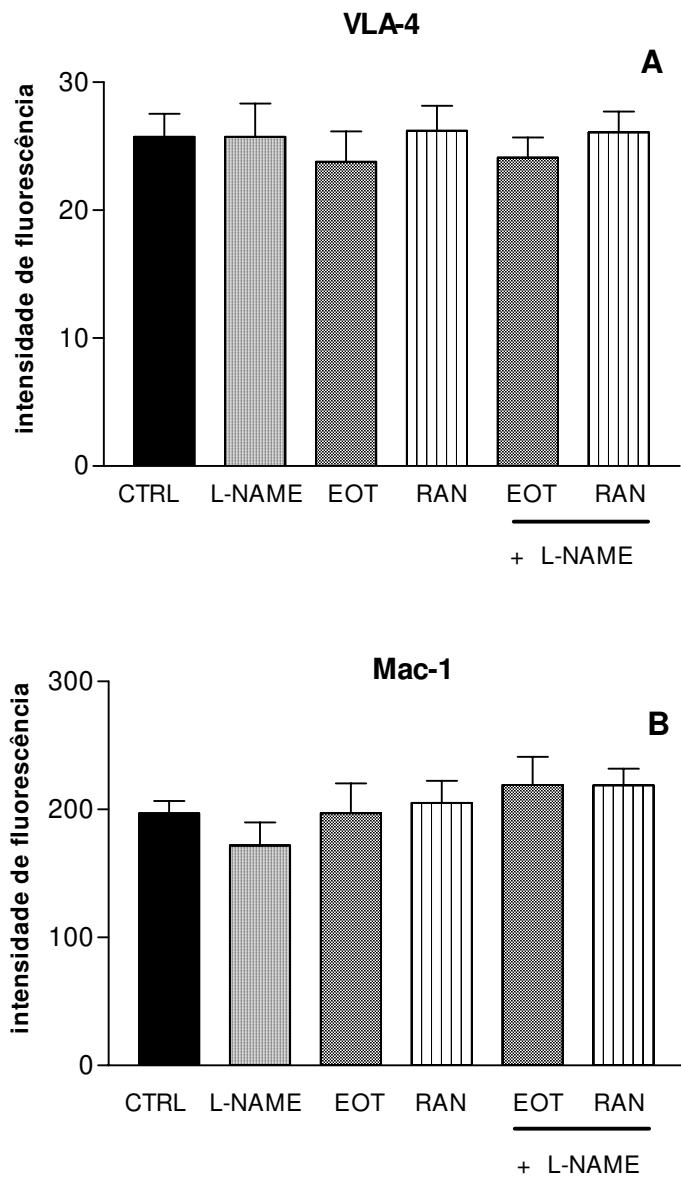


Fig 6. Efeito do L-NAME sobre a expressão de VLA-4 e Mac-1 em eosinófilos. Eosinófilos (3×10^6 células/ml -100 μ l/tubo) foram incubadas por 4 horas na ausência (CTRL) ou presença de L-NAME (0.1 mM), eotaxina (100 ng/ml) ou RANTES (100 ng/ml). As células foram marcadas com anticorpo anti-VLA-4 (Painel A) ou anti-Mac-1 (Painel B). Os resultados são expressos como média da intensidade de fluorescência \pm SEM (n= 4).

4.4. Desgranulação de eosinófilos

Eosinófilos purificados de sangue periférico de indivíduos sadios foram tratados ou não por 4 horas com eotaxina (100 ng/ml), RANTES (100 ng/ml) e/ou L-NAME (0.1 mM).

De acordo com Adamko *et al.* (2004), utilizamos o A23187 (ionóforo de cálcio – 5 μ M, 30 minutos) como controle positivo dos ensaios. D-NAME (0.1 mM) foi usado como controle negativo. A desgranulação foi avaliada através da detecção da atividade da EPO nos sobrenadantes coletados após as incubações.

Analisando a tabela 2 notamos que os eosinófilos tratados com o L-NAME, eotaxina e RANTES, individualmente, mostraram valores de densidade ótica elevados e estatisticamente maiores do que o valor das células-controle (RPMI). A co-incubação de L-NAME com eotaxina ou RANTES, não alterou os valores de densidade ótica para EPO. Eosinófilos estimulados por 30 minutos com o A23187 (controle positivo) apresentam marcante liberação de EPO (135 % do basal) comparado com as células não estimuladas (dado não mostrado).

Tabela 2. Efeito das quimiocinas eotaxina e RANTES e do L-NAME sobre a desgranulação de eosinófilos

Tratamento	Densidade ótica
CTRL	0.39 \pm 0.02
A23187	0.87 \pm 0.04*
D-NAME (0.1mM)	0.27 \pm 0.01
L-NAME (0.1mM)	0.70 \pm 0.04*
Eotaxina (100 ng/ml)	0.70 \pm 0.03*
RANTES (100 ng/ml)	0.71 \pm 0.05*
L-NAME + Eotaxina	0.77 \pm 0.02*
L-NAME + RANTES	0.69 \pm 0.04*

Eosinófilos purificados de indivíduos sadios foram tratados ou não com eotaxina (100 ng/ml), RANTES (100 ng/ml) e/ou L-NAME (0.1 mM) por 4 horas. D-NAME (0.1 mM) foi usado como controle negativo. Os eosinófilos foram incubados com A23187 (5 μ M) por 30 minutos. A EPO contida nos sobrenadantes após as incubações foi medida e expressa como média \pm EPM das densidades óticas (n=6). *P<0.05 quando comparado com o controle (CTRL).

4.5. Quimiotaxia de eosinófilos

Com o objetivo de investigar o papel do NO sobre a quimiotaxia de eosinófilos em resposta aos conhecidos agentes quimiotáticos eotaxina e RANTES, realizamos ensaios de quimiotaxia *in vitro* com eosinófilos na presença de L-NAME.

Eosinófilos purificados foram incubados por 2 horas em câmaras de quimiotaxia de 96 poços (ver Materiais e Métodos), na presença ou não (CTRL) de L-NAME (0.1 mM), e a migração das células foi analisada em resposta à eotaxina (100 ng/ml), RANTES (100 ng/ml) ou RPMI (migração espontânea). Analisando a figura 7, podemos notar que houve migração significativa de eosinófilos (tratados ou não com L-NAME) em resposta à eotaxina ou RANTES. Analisando separadamente a migração espontânea (grupos RPMI), podemos perceber uma pequena, porém significativa redução da migração dos eosinófilos tratados com L-NAME quando comparados com os não tratados (CTRL).

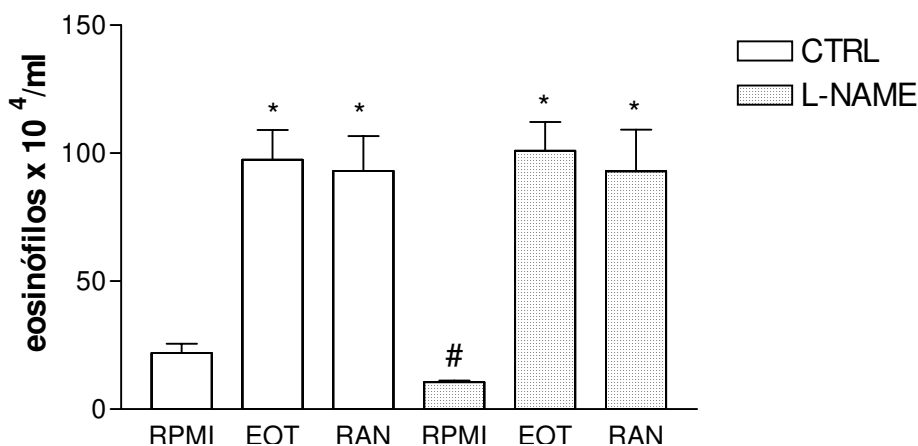


Fig 7. Efeito do L-NAME sobre a quimiotaxia de eosinófilos. Eosinófilos (4×10^6 células/ml - $25 \mu\text{l}/\text{poço}$) foram incubados por 2 h na presença ou ausência (CTRL) de L-NAME (0.1 mM) e o número de células que migraram em resposta à eotaxina (100 ng/ml) ou RANTES (100 ng/ml) foi analisado através da medida da EPO residual. Os resultados são expressos como média do número de células que migraram \pm EPM (n=3). * $P < 0.05$ quando comparado com RPMI, # quando comparamos RPMI CTRL com RPMI L-NAME.

4.6. Dosagem de GMP cíclico

A maioria das ações do NO é mediada pela ativação da guanilato ciclase solúvel, levando ao aumento da concentração de GMPc dentro das células. Por isso, resolvemos dosar os níveis de GMPc intracelular em eosinófilos estimulados com eotaxina ou RANTES (100 ng/ml), na ausência e na presença do L-NAME.

A tabela 3 mostra que a incubação de eosinófilos por 4 horas com SNP 0.1 mM (doador de NO), usado como controle positivo, foi capaz de aumentar significativamente os níveis de GMPc. Entretanto, as quimiocinas testadas isoladamente (eotaxina e RANTES) ou co-incubadas com L-NAME não foram capazes de aumentar os níveis de GMPc em relação ao controle não estimulado (CTRL).

Tabela 3. Efeito das quimiocinas eotaxina e RANTES e do L-NAME sobre os níveis de GMPc.

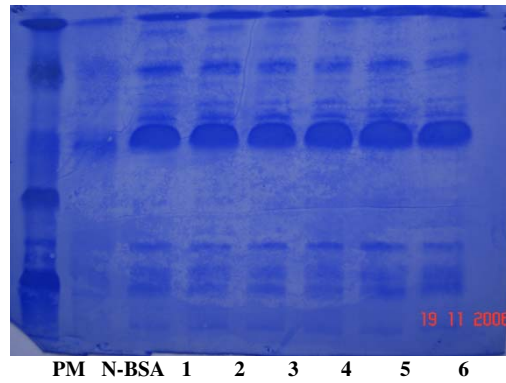
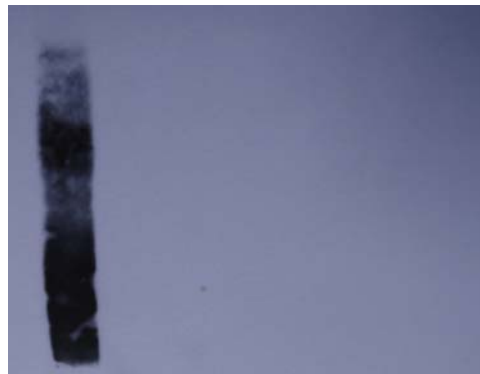
Tratamento	[cGMP] (pmol/ml)
CTRL	4.45 ± 0.54
SNP (0.1mM)	6.23 ± 0.50*
L-NAME (0.1mM)	4.31 ± 0.62
Eotaxina (100 ng/ml)	4.63 ± 0.51
RANTES (100 ng/ml)	4.47 ± 0.59
L-NAME + Eotaxina	4.31 ± 0.45
L-NAME + RANTES	4.19 ± 0.42

A suspensão de eosinófilos (1.5×10^6 células / poço) foi incubada por 4 h com L-NAME e/ou eotaxina, RANTES e SNP. As células não tratadas são representadas por CTRL. Cada experimento foi realizado em triplicata ($n = 4-6$). Os resultados são expressos como média ± EPM. * $P < 0.05$ quando comparado com CTRL.

4.7. Análise de nitração de tirosina em eosinófilos

Inicialmente nitramos BSA para ser nosso controle positivo. Para constatarmos a eficácia do processo de nitração, fizemos um gel de poliacrilamida com diferentes concentrações da BSA nitrada (1, 3, 5 e 10 μg), que posteriormente foram transferidas eletroforeticamente para uma membrana de PVDF, e finalmente reveladas (ver Materiais e Métodos). O procedimento de nitração da BSA foi eficaz, já que a revelação no filme de autoradiografia mostrou positividade para 3-nitrotirosina. Então, a concentração de BSA nitrada escolhida por nós como controle positivo de nossos experimentos foi a de 10 μg .

A figura 8 é representativa de 3 experimentos feitos com eosinófilos de indivíduos sadios estimulados ou não por 4 horas com L-NAME (0.1 mM), eotaxina (100 ng/ml), RANTES (100 ng/ml), L-NAME + eotaxina e L-NAME + RANTES (6). Entretanto, nenhum dos sobrenadantes testados apresentou positividade, exceto a BSA nitrada usada como controle positivo (figura 8 painel B). Para confirmarmos que todo o conteúdo protéico do gel havia sido realmente transferido para a membrana, coramos ambos (o gel e a membrana) com o corante Comassie Blue. O gel não apresentou nenhuma banda protéica, indicando que a transferência das amostras foi total e eficiente para a membrana (figura 8). Em resumo, a transferência das proteínas para a membrana foi realmente eficaz, porém nos sobrenadantes testados não observou-se nenhuma proteína nitrada, mesmo quando deixamos o filme de autoradiografia exposto *overnight*.

A**B**

N-BSA

Fig 8. Membrana de PVDF corada com Comassie Blue (painel A). PM (peso molecular), N-BSA (BSA- nitrada, controle positivo), linha 1: Sobrenadante de eosinófilos não-estimulados; linha 2: Sobrenadante de eosinófilos tratados com L-NAME; linha 3: Sobrenadante de eosinófilos tratados com eotaxina; linha 4: Sobrenadante de eosinófilos tratados com RANTES; linha 5: Sobrenadante de eosinófilos tratados com L-NAME + eotaxina e linha 6: Sobrenadante de eosinófilos tratados com L-NAME + RANTES. **Western blotting para 3-NT (painel B)** (Positividade somente no controle positivo N-BSA).

Além de testarmos os sobrenadantes, verificamos também se haveria a presença de proteínas nitradas no *pellet*. Aos precipitados formados foi adicionado tampão contendo o detergente NP-40, para a lise das células. Posteriormente foi feita uma nova centrifugação e estes novos sobrenadantes (formados a partir da lise das células contidas nos *pellets*) também foram testados para a presença de proteínas nitradas.

Analisando a figura 9 podemos ver um padrão de resposta muito semelhante ao da figura 8. Podemos notar que a membrana possui uma coloração mais fraca das bandas em relação às bandas da figura 8. Porém é necessário esclarecer que quantidades equivalentes

de proteína foram adicionadas aos poços de ambos os géis, aquele feito com amostras de sobrenadante (figura 8), e aquele feito com amostras de *pellet* (figura 9).

Ao corarmos o gel (figura 9) com Comassie Blue confirmamos que a transferência para a membrana ocorreu com sucesso, já que no gel não apresentava mais nenhuma banda protéica. Porém, exceto o controle positivo (figura 9 painel B), não houve reatividade para nitrotirosina.

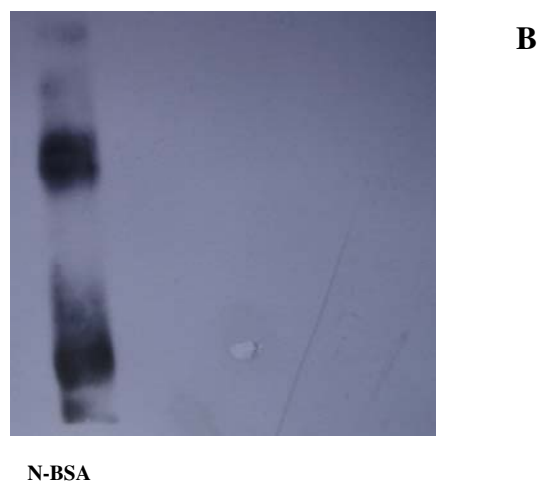
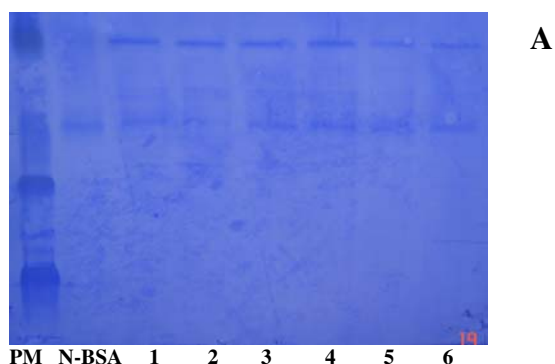


Fig 9. Membrana de PVDF corada com Comassie Blue (painel A). PM (peso molecular), N-BSA (BSA- nitrada, controle positivo), linha 1: *Pellet* de eosinófilos não-estimulados; linha 2: *Pellet* de eosinófilos tratados com L-NAME; linha 3: *Pellet* de eosinófilos tratados com eotaxina; linha 4: *Pellet* de eosinófilos tratados com RANTES; linha 5: *Pellet* de eosinófilos tratados com L-NAME + eotaxina e linha 6: *Pellet* de eosinófilos tratados com L-NAME + RANTES. **Western blotting para 3-NT (painel B)** (Positividade somente no controle positivo N-BSA).

Resolvemos investigar a presença de proteínas nitradas também em eosinófilos de indivíduos asmáticos, em crise de asma e sem tratamento. O mesmo procedimento que realizamos nos eosinófilos de indivíduos sadios foi feito com eosinófilos de indivíduos asmáticos.

Enfim, à semelhança do observado com eosinófilos de indivíduos saudáveis, apesar da transferência de proteínas para a membrana ter sido completa, nenhum dos sobrenadantes ou *pellets* testados foi reativo para 3-nitrotirosina (figuras não mostradas).

É importante mencionar que em todos os experimentos realizados nos certificamos da qualidade da transferência das proteínas para a membrana, e sempre deixamos um filme de autoradiografia exposto *overnight*, pois deste modo garantimos que se tivéssemos uma positividade, mesmo que fosse fraca, seria detectada. Em resumo, em nosso sistema experimental, nenhum dos estímulos testados em eosinófilos humanos, de indivíduos saudáveis ou asmáticos, foi capaz de nitrar proteínas.

5. DISCUSSÃO

A migração de eosinófilos para o tecido inflamado é um processo complexo, que é regulado por numerosos fatores, incluindo citocinas, quimiocinas, NO e interações de moléculas de adesão; interações estas não só entre células, mas também de células e elementos da matriz extracelular. Os papéis das quimiocinas e do NO sobre as funções dos eosinófilos nos processos alérgicos têm sido extensamente estudados; entretanto, estudos que investiguem a interação de CC-quimiocinas (particularmente eotaxina e RANTES) e a via NO-GMPc não têm sido explorados. Este trabalho, através do uso de eosinófilos humanos *in vitro*, sugere claramente que o NO não modula a adesão, quimiotaxia e desgranulação de eosinófilos estimulados com eotaxina ou RANTES à fibronectina, nem a expressão de Mac-1 e VLA-4 na superfície dos eosinófilos.

A literatura tem acumulado informações sobre o papel das quimiocinas e do NO na migração de eosinófilos durante processos alérgicos. Alguns estudos têm mostrado que o NO é capaz de alterar a expressão de algumas quimiocinas (ver item Quimiocinas e Óxido Nítrico). Dos fatores quimiotáticos para eosinófilos descritos até o momento, as CC-quimiocinas, particularmente eotaxina, eotaxina-2, RANTES, MCP-3 e MCP-4 têm sido apontadas como importantes para o desenvolvimento da eosinofilia brônquica presente em pacientes asmáticos (Ying *et al.*, 1999). De maneira geral, quimiocinas podem induzir a expressão de integrinas na superfície de leucócitos, permitindo a adesão firme do leucócito à parede da célula endotelial próxima ao sítio inflamado (Ono *et al.*, 2003), e posteriormente estimular a migração transendotelial (Gale & McColl, 1999). As integrinas VLA-4 e Mac-1 têm um importante papel na função do eosinófilo (Conran *et al.*, 2001) e por isso foram escolhidas para serem estudadas em nossas condições experimentais.

A revisão da literatura especializada nos mostrou que numerosos estudos realizados, principalmente com as quimiocinas eotaxina e RANTES, utilizavam tempos de incubação muito variados, de minutos a horas. Deste modo, escolhemos estudar tempos de incubação intermediários (2 horas) e/ou longos (3 e 4 horas), que no nosso conhecimento não têm sido explorados na literatura.

Inicialmente, precisávamos garantir que as nossas condições experimentais não afetariam a viabilidade dos eosinófilos, ou seja, que eles continuariam viáveis após as incubações. Para tal, utilizamos o método de MTT, que foi originalmente descrito por

Mosmann (1983) e pode ser utilizado para medir citotoxicidade, proliferação e ativação celular. É um ensaio colorimétrico que se baseia na redução do MTT pelas desidrogenases mitocondriais de células vivas. Esta reação produz o sal formazan que é insolúvel em água, porém solúvel em solventes orgânicos. Através de ensaios utilizando este método, pudemos comprovar que em todos os tempos de incubação testados as células continuavam vivas, e em determinadas condições, até ativadas.

Jia e colaboradores (1999) demonstraram em eosinófilos murinos, através de citometria de fluxo, que a eotaxina aumenta a expressão de CD11b, e que este aumento é máximo após 1 hora de incubação. Já a expressão de VLA-4, alcança o pico após 2 horas de incubação. Então, os autores sugerem que Mac-1 seja mais importante na transmigração (estágio inicial) induzida por eotaxina, enquanto VLA-4 participa mais ativamente em estágios tardios da resposta induzida por eotaxina. Por outro lado, um estudo realizado com eosinófilos de pacientes com rinite alérgica mostrou que a incubação dos mesmos com eotaxina por 30 minutos não foi capaz de alterar a expressão de integrina α_4 (Sung *et al.*, 2000). Ebisawa e colaboradores (1994) mostraram que RANTES, apesar de induzir migração transendotelial, não foi capaz de aumentar a expressão de CD11b.

Entretanto, um estudo demonstrou que a citocina GM-CSF é capaz de aumentar a ligação de eosinófilos à VCAM-1 (ou ao CS-1) através do aumento da afinidade de ligação do VLA-4 ao VCAM-1 ou CS-1. Este aumento da afinidade de ligação induzido pela citocina não está associado a alterações no número de receptores expressos ou à redistribuição de receptores para VLA-4, sugerindo que uma mudança conformacional no receptor de VLA-4 pode ser responsável por esta mudança na afinidade de ligação (Sung *et al.*, 1997).

Evidências têm indicado que o NO tem papel importante na inibição da interação leucócito-endotélio e leucócito-matriz extracelular interferindo na expressão e atividade funcional de moléculas de adesão expressas pelo leucócito e pelas células endoteliais. O trabalho de Conran e colaboradores (2001) foi realizado com eosinófilos de voluntários saudáveis e os resultados obtidos estão de acordo com as evidências. Os autores demonstraram que o L-NAME aumenta a adesão destas células à matriz extracelular em 30 minutos, e aumenta também a expressão e função de moléculas de adesão, em particular, a expressão da integrina Mac-1 e a função da integrina VLA-4 (Conran *et al.*, 2001).

Com base nestas informações, decidimos investigar a existência de interação das vias de sinalização das CC-quimiocinas eotaxina e RANTES com NO-GMPc em eosinófilos. Deste modo, o uso do inibidor de NOS L-NAME foi a ferramenta escolhida por nós para este estudo. Porém, é importante lembrar que nenhum dos trabalhos da literatura, até o momento, utilizou os mesmos períodos de incubação utilizados por nós.

Assim como fizemos nos experimentos de MTT, os experimentos de citometria de fluxo também foram feitos após 2, 3 e 4 horas de incubação. Não observamos diferenças significativas entre os controles e os tratados com eotaxina, RANTES ou L-NAME, nem para a expressão de Mac-1, e nem para a expressão de VLA-4. A co-incubação com L-NAME com cada quimiocina isoladamente também não afetou a expressão das integrinas testadas.

Pelas informações da literatura relatadas anteriormente, notamos que há controvérsias, e que a estimulação de eosinófilos com quimiocinas pode resultar em diferentes respostas na expressão de moléculas de adesão, podendo resultar em aumento ou não da expressão das mesmas. No caso de haver um aumento de alguma resposta funcional (ex: adesão), este aumento pode não estar necessariamente relacionado com aumento da expressão de moléculas de adesão na superfície das células, assim como foi demonstrado por Sung e colaboradores (1997). Deste modo, devemos ter em mente que, embora não tenhamos observado aumento da expressão das integrinas Mac-1 e VLA-4, existe a possibilidade de que as quimiocinas testadas tenham modificado a função destas integrinas.

O estudo do recrutamento de eosinófilos se faz principalmente através de modelos *in vitro* como quimiotaxia, adesão e migração transendotelial. Neste trabalho, a técnica escolhida foi a adesão de eosinófilos à fibronectina. Já que os eosinófilos aderem especificamente à fibronectina via VLA-4 ($\alpha_4\beta_1$, CD49d/CD29), e como o Mac-1 ($\alpha_M\beta_2$, CD11b/CD18) também pode se ligar a esta proteína, esta técnica nos permitiu investigar, mesmo que indiretamente, se a função e/ou afinidade destas moléculas de adesão estariam alteradas após o tratamento com alguns fatores.

O acúmulo seletivo de eosinófilos nas vias aeríferas de asmáticos é um evento central da fisiopatologia desta doença, porém os mecanismos exatos responsáveis por este fenômeno ainda não estão completamente esclarecidos. Alguns estudos clínicos e experimentais têm mostrado associação positiva entre o aumento do número de eosinófilos

(no sangue e LBA) e a gravidade da asma (Gonzalo *et al.*, 1998; Sato *et al.*, 1999). Como se sabe, os eosinófilos são importantes células efetoras envolvidas na lesão da mucosa brônquica, uma vez que são capazes de sintetizar e liberar substâncias pró-inflamatórias como proteínas catiônicas, espécies reativas de oxigênio e citocinas pró-inflamatórias e pró-fibróticas (Lampinen *et al.*, 2004).

A capacidade dos eosinófilos de migrar para o sítio de inflamação é dependente da expressão e ativação de suas integrinas de superfície, e da ligação das mesmas a seus contra-receptores correspondentes presentes no endotélio vascular pulmonar (Sedgwick *et al.*, 2005). Como já relatado, quimiocinas podem induzir a expressão de integrinas na superfície de leucócitos, permitindo a adesão firme ao endotélio próximo ao sítio inflamado (Ono *et al.*, 2003), e estimulando posteriormente a migração transendotelial (Gale & McColl, 1999). A integrina α_4 é constitutivamente expressa nos eosinófilos, e por isso a interação dos mesmos com células endoteliais via integrina α_4 /V-CAM é considerada um mecanismo de recrutamento seletivo de eosinófilos para as vias aeríferas (Broide *et al.*, 2001). Por outro lado, é provável que um ou mais fatores adicionais sejam necessários para a adesão firme dos eosinófilos a VCAM-1 presente no endotélio, para que posteriormente ocorra uma transmigração eficiente (Yamamoto *et al.*, 2005).

Os eosinófilos podem aderir especificamente à fibronectina utilizando VLA-4 como receptor para a mesma. Dessa forma, usamos o ensaio de adesão à fibronectina afim de investigar os possíveis mecanismos de adesão de eosinófilos em nossas condições experimentais. Nossos resultados mostraram que somente no período mais longo de incubação (4 horas) há aumento significativo da adesão dos eosinófilos estimulados com eotaxina ou RANTES. Além disso, vimos também que eosinófilos estimulados somente com L-NAME também têm adesão aumentada à fibronectina. De fato, L-NAME já tinha sido descrito como capaz de aumentar a adesão de leucócitos de gato *in vivo* (Giembycz & Lindsay, 1999) e também de eosinófilos à fibronectina (Conran *et al.*, 2001).

O aspecto original deste trabalho foi a investigação de uma possível interação entre quimiocinas e NO e, por isso, analisamos a adesão de eosinófilos etimulados com L-NAME e eotaxina ou RANTES, simultaneamente. Os dados destas co-incubações mostraram que a adição de L-NAME não interfere no aumento da adesão que já era observado com cada quimiocina isoladamente.

As CC-quimiocinas têm se mostrado capazes de aumentar a adesão de leucócitos em diversos sistemas *in vitro* (Weber *et al.*, 1996), inclusive no sistema por nós utilizado, porém também são capazes de reduzir a adesão de eosinófilos (Weber *et al.* 1996; Vaddi & Newton, 1994; Tanaka *et al.*, 1998; Bochner *et al.*, 1999). Parece que a desativação de integrinas induzida por quimiocinas é importante no movimento dos leucócitos em direção aos tecidos (Bochner *et al.*, 1999; Carr *et al.*, 1996). Deste modo, parece que a ação de quimiocinas sobre as integrinas presentes nos eosinófilos têm uma cinética complexa (ativação e desativação).

Nossos resultados estão em contraste com os de Jia e colaboradores (1999), mencionado anteriormente, que demonstraram em eosinófilos murinos que a eotaxina pode aumentar a expressão de CD11b e VLA-4, porém com picos de expressão em tempos diferentes. Tal contraste pode ser devido a diferenças experimentais ou na espécie e fonte dos eosinófilos, sendo plausível especular que eosinófilos peritoneais de camundongos transgênicos (Jia *et al.*, 1999) respondam de maneira diferente à eotaxina, quando comparados com eosinófilos periféricos humanos. Esta linha de raciocínio faz sentido, uma vez que a literatura mostra que um mesmo modelo experimental de asma, quando empregado em camundongos de linhagens diferentes, pode resultar em diferenças nas respostas inflamatórias das vias aeríferas, particularmente na inflamação eosinofílica (Ichinose *et al.*, 2004). Isto indica também que o *background* genético não pode ser negligenciado. Além disso, também não podemos esquecer que, assim como nós, Sung e colaboradores (2000), já tinham demonstrado em eosinófilos de pacientes com rinite que a expressão da integrina α_4 não é afetada pela eotaxina. Entretanto, devemos prestar atenção no *status* imune dos indivíduos (alérgico ou *naïve*), o tempo de exposição à quimiocina, ou ambos os fatores, sejam importantes para a resposta da célula à quimiocina, e devem ser levados em consideração durante a comparação de resultados descritos na literatura.

Ebisawa e colaboradores (1994) mostraram que RANTES induz migração transendotelial, porém não é capaz de aumentar a expressão de CD11b. Do mesmo modo, Jia *et al.* (1999) também não observaram modulação positiva de CD11/CD18 na presença de RANTES, sugerindo que o mecanismo de migração de eosinófilos induzido por RANTES é diferente da migração induzida por eotaxina. Nossos dados de eosinófilos

estimulados com RANTES concordam com os de Ebisawa (1994) e Jia (1999), uma vez que também não observamos aumento da expressão de Mac-1.

Em nossos experimentos, o L-NAME foi capaz de aumentar a adesão de eosinófilos à fibronectina em 4 horas, porém as expressões de VLA-4 e Mac-1 permaneceram inalteradas. Sung e colaboradores (1997) demonstraram que integrinas α_4 expressas por eosinófilos podem existir em diferentes estágios de ativação, caracterizados por baixa ou alta afinidade de ligação aos seus contra-receptores, como o VCAM-1.

Analisando nossos resultados de citometria de fluxo e adesão à fibronectina podemos sugerir que talvez esteja acontecendo um mecanismo semelhante ao proposto por Sung e colaboradores (2000). Sugerimos que talvez a afinidade das integrinas testadas por nós tenha sido aumentada nos eosinófilos estimulados com L-NAME ou com as quimiocinas. Desta maneira, podemos supor que a função (avidéz ou afinidade), possa ser modificada por estes estímulos. Esta seria uma explicação razoável para a adesão aumentada à fibronectina, sem ter havido aumento da expressão das integrinas.

É importante deixar claro que uma pequena quantidade de células estimuladas é capaz de aderir à placa recoberta com fibronectina, porém isso parece ser uma característica comum aos modelos que estudam adesão celular *in vitro*. A adesão basal (células não estimuladas) observada em modelos que usam placas recobertas com soro, fibrinogênio, fibronectina ou VCAM- 1 recombinante varia normalmente de 5 a 30%, dependendo do tipo de célula usada (eosinófilos, neutrófilos, plaquetas) e das condições experimentais (Conran *et al.*, 2001; Sano *et al.*, 2001; Marcondes *et al.*, 2006). Assim, a estimulação celular com diferentes fatores costuma aumentar a adesão cerca de 20 a 100% acima do basal.

Em nossas condições experimentais, a adesão do eosinófilo à fibronectina mediada pela eotaxina ou RANTES não parece ser dependente de NO endógeno. Assim, nossos dados apóiam a idéia de que, embora quimiocinas e NO participem do processo de migração de eosinófilos *in vivo* e *in vitro*, até agora não parece existir *in vitro* uma interação entre ambos. Nessa área, a literatura mostra resultados muito variados e até contrastantes, que pode ser resultado diferenças metodológicas, de espécie animal, de fonte da célula, ou como dito antes, do tempo de exposição à quimiocina. Devemos ter em mente também que o fato de não observarmos aumentos de adesão superiores aos já determinados

pela eotaxina (ou RANTES) e L-NAME isoladamente seja resultado de uma limitação metodológica; ou seja, a resposta máxima já teria sido atingida por cada agente individualmente.

Embora inúmeras evidências mostrem que os eosinófilos têm participação importante na patogênese de doenças alérgicas, os mecanismos que regulam o tráfego e a desgranulação destas células nas vias aeríferas ainda não estão completamente elucidados. Eotaxina e RANTES são importantes fatores quimiotáticos para eosinófilos, portanto contribuem para o movimento dos mesmos do sangue para os sítios inflamatórios. Uma vez recrutados para os tecidos, os eosinófilos recebem sinais para desgranularem, resultando na liberação de suas proteínas granulares como a MBP, EPO e ECP, que têm sido associadas à indução de dano epitelial, edema e hiperresponsividade das vias aeríferas, desempenhando papel importante na patogênese de doenças alérgicas (Rothenberg & Hogan, 2006).

Noss objetivo a seguir foi investigar uma possível interação destas CC-quimiocinas e da via de sinalização NO-cGMP na desgranulação de eosinófilos. Assim, investigamos o efeito das quimiocinas eotaxina e RANTES, e do L-NAME (inibidor de NOS), individualmente ou em associação (L-NAME + quimiocina), sobre a desgranulação de eosinófilos de indivíduos sadios. Para tal, medimos a quantidade de EPO liberada nos sobrenadantes de eosinófilos estimulados ou não, durante a incubação de 4 horas. Escolhemos o tempo de incubação de 4 horas e 100 ng/ml das CC-quimiocinas tendo em vista que foi neste período e nesta concentração que observamos aumento de adesão significativo. Além disso, escolhemos a dose de L-NAME (0.1 mM) com base em trabalhos anteriores de nosso grupo (Conran et al., 2001) e nossa experiência nesta área.

El-Shazly e colaboradores (1998) demonstraram que a eotaxina induz liberação significativa de EDN quando comparada com o controle negativo. Este efeito é concentração-dependente, alcançando a resposta máxima na concentração de 100 ng/ml. Mostraram também que a quantidade de EDN liberada por eosinófilos estimulados com eotaxina foi equivalente à observada com RANTES e comparável com o PAF. Já que as quimiocinas estão presentes em altas quantidades nos sítios inflamatórios alérgicos, acredita-se que elas contribuam significativamente para a desgranulação eosinofílica local. Outro estudo mostrou que a desgranulação de eosinófilos é mediada por CCR3, que é o

principal receptor de quimiocinas responsável pela quimiotaxia de eosinófilos (Fujisawa *et al.*, 2000).

Trabalho realizado com uma linhagem de eosinófilos (clone 15 HL-60) analisou o efeito das eotaxinas 1, 2 e 3 sobre a desgranulação. Os resultados mostraram que o aumento da porcentagem de liberação de EPO foi concentração-dependente para as 3 eotaxinas. Além disso, foi investigada também a liberação de EPO em eosinófilos estimulados primeiramente com as eotaxinas, e posteriormente estimulados com A23187. Estes resultados mostraram uma potenciação significativa da desgranulação (com as 3 eotaxinas) na presença do A23187 (Badewa *et al.*, 2002).

Nossos resultados de desgranulação reproduzem o que a literatura mostra, ou seja, mostram através do aumento da densidade ótica em relação ao controle negativo, que eotaxina (100 ng/ml) e RANTES (100 ng/ml) induzem a desgranulação através da liberação de EPO. Os resultados originais que obtivemos mostram que o L-NAME *per se* também é capaz de induzir a desgranulação. Porém, a co-incubação com as quimiocinas não alterou o efeito que já era observado com cada uma individualmente. Assim, o fato de o L-NAME não modificar a desgranulação induzida por eotaxina e RANTES indica que o NO não modula a desgranulação nos eosinófilos ativados pelas CC-quimiocinas testadas. É interessante o fato do L-NAME *per se* ser capaz de aumentar significativamente a quantidade de EPO liberada, e em quantidade equivalente às obtidas com as CC-quimiocinas. De fato, em outros tipos celulares, como o mastócito, inibidores da síntese de NO também se mostraram capazes de causar desgranulação celular (Salvemini *et al.*, 1991; Kimura *et al.*, 1999). Entretanto, até o presente momento, este estudo é o primeiro a mostrar que a inibição *in vitro* do NO em eosinófilos humanos leva à desgranulação celular. Sabe-se que a liberação das proteínas granulares estocadas nos eosinófilos pode acontecer através da exocitose clássica, desgranulação *piecemeal* (em etapas) ou através da citólise (Clark *et al.*, 2004); entretanto, estudos adicionais são necessários para elucidação do mecanismo (s) pelo qual o NO é capaz de influenciar a desgranulação do eosinófilo.

O NO é produzido por vários tipos celulares (Nathan, 1992) e regula inúmeras funções biológicas (Moncada *et al.*, 1991; Tulic *et al.*, 2000). Muitas de suas ações, incluindo regulação do rolamento, adesão e extravasamento de leucócitos são mediadas pela ativação da guanilato ciclase solúvel, com o conseqüente aumento da concentração de

GMPC nas células-alvo (Kubes *et al.*, 1991; Giembycz & Linday, 1999). Estudos feitos com inibidores de NOS em eosinófilos de ratos (Zanardo *et al.*, 1997) e humanos (Thomazzi *et al.*, 2001) mostraram que essas drogas inibem a quimiotaxia *in vitro* dos eosinófilos, sugerindo um papel fundamental para o NO na quimiotaxia de eosinófilos. Por isso, resolvemos analisar a quimiotaxia de eosinófilos tratados ou não com L-NAME em resposta à eotaxina e RANTES.

Nossos resultados mostraram que houve significativo aumento do número de células que migraram em resposta à eotaxina ou RANTES em eosinófilos tratados ou não com L-NAME. Entretanto, o tratamento com L-NAME não alterou o número de células migradas quando comparado com as células não tratadas. Um fato curioso e que vai ao encontro à literatura, foi a observação de que células tratadas com L-NAME tiveram a migração espontânea (em resposta ao meio de cultura somente) significativamente reduzida, quando comparado com células não tratadas. Assim, a inibição da NOS nestas condições experimentais, parece prejudicar a migração dos eosinófilos.

Resolvemos investigar o efeito da estimulação de eosinófilos com eotaxina ou RANTES, e também da co-incubação com o L-NAME, sobre os níveis de GMPC. A existência da via de sinalização NO-GMPC funcional foi claramente demonstrada em eosinófilos, mas existem poucos estudos na literatura que tenham medido níveis de GMPC nestas células. A exceção dos nossos dados, nenhum outro estudo avaliou os níveis de GMPC em eosinófilos tratados com inibidores de NO (como o L-NAME) em condições basais ou estimuladas. Nossos resultados confirmam que as dosagens funcionaram, já que o nitroprussiato de sódio (SNP) (controle positivo) foi capaz de aumentar significativamente os níveis de GMPC, quando comparado aos níveis de GMPC de células não estimuladas. Entretanto, os níveis de GMPC de eosinófilos estimulados com cada quimiocina isoladamente, ou em co-incubação com L-NAME, foram semelhantes aos dos eosinófilos não estimulados, indicando que a estimulação com as quimiocinas não interfere nos níveis de GMPC dos eosinófilos. Esperávamos que a incubação com L-NAME baixasse os níveis basais de GMPC nas células controle (CTRL). Não achamos na literatura nenhum outro trabalho que tenha dosado GMPC em eosinófilos na presença de L-NAME. Em plaquetas, o L-NAME também se mostrou incapaz de reduzir os níveis de GMPC (De La Cruz *et al.*, 2000), mas os autores não discutem este aspecto. Embora nós não tenhamos uma

explicação para o L-NAME não reduzir os níveis basais de GMPc, nós achamos que talvez isso seja reflexo de uma limitação metodológica. Neste trabalho, as condições experimentais envolveram o uso do meio de cultura RPMI 1640 (meio de cultura suplementado) para resuspensão dos eosinófilos, além de um tempo prolongado de incubação (4 horas). Sob estas condições, os níveis basais de GMPc foram aproximadamente 3,5 vezes maiores que os níveis observados em eosinófilos resuspenso em MEM (meio mínimo essencial) por 30 minutos (Conran *et al.*, 2001; Thomazzi *et al.*, 2005). Assim, é metodologicamente difícil mostrar diferenças nas concentrações de GMPc entre amostras quando os níveis basais são relativamente altos.

A resposta inflamatória eosinofílica na asma está associada com a nitração de proteína, detectada por imunohistoquímica para 3-nitrotirosina (3NT), possivelmente sendo resultado da ação do peroxinitrito. Aliado a isto, foi constatado que a 3-NT estava associada ao aumento da expressão de iNOS, e que o tratamento com glicocorticóides foi capaz de reduzir ambos, expressão de 3NT e iNOS (Saleh *et al.*, 1998). Neste caso, o NO parece exercer um efeito tóxico, oxidativo na asma, já que a nitração de tirosina altera a função de ambas, proteínas regulatórias e estruturais (Van Der Vliet *et al.*, 1999).

Um trabalho feito em camundongos mostrou que a produção de NO e a inflamação eosinofílica estão intimamente relacionadas. Embora a inflamação eosinofílica seja, em parte, modulada pelo NO, os eosinófilos *per se* são fontes de NO, sugerindo assim que eles sejam importantes fontes de nitração de tirosina (Iijima *et al.*, 2001). Com base nestas informações, decidimos investigar a presença de proteínas nitradas em nosso modelo experimental. Apesar das informações da literatura, nossos resultados obtidos de eosinófilos de indivíduos asmáticos e sadios mostraram ausência de proteínas nitradas em todos os pontos experimentais testados. Deste modo, parece que nas condições experimentais estabelecidas por nós não há nitração de proteínas, nem mesmo nos eosinófilos obtidos de indivíduos asmáticos.

Sato e colaboradores (2000) demonstraram que o peroxinitrito é capaz de diminuir a atividade quimiotática de eosinófilos estimulados com eotaxina, sugerindo que a nitração do resíduo de tirosina é responsável por este efeito. Embora fosse nossa intenção verificar também o efeito direto do peroxinitrito (adicionando-o aos eosinófilos e incubando por 4 horas) sobre ensaios funcionais (adesão à fibronectina e desgranulação) com eosinófilos de

indivíduos sadios e asmáticos, o tempo e a dificuldade de obtenção de sangue de asmáticos não nos permitiu realizar estes experimentos.

Todos os resultados mostraram que nas condições estabelecidas por nós não existe interação entre as vias destas CC-quimiocinas e a via de sinalização NO-cGMP. Em resumo, nosso estudo mostrou que as CC-quimiocinas eotaxina e RANTES aumentam a adesão e desgranulação *in vitro* através de mecanismos independentes de NO. A incapacidade das quimiocinas em alterarem a expressão de VLA-4 e Mac-1 na superfície do eosinófilo sugere que mudanças na função da integrina (avidéz ou afinidade) estão envolvidas no aumento da adesão observado nos eosinófilos estimulados com as quimiocinas.

6. SUMÁRIO E CONCLUSÕES

Nossos resultados nos permitem concluir que:

- I. O ensaio de MTT mostrou que os eosinófilos permanecem viáveis na presença de eotaxina ou RANTES, em todos os tempos de incubação;
- II. A adesão foi significativamente aumentada na presença de L-NAME, eotaxina ou RANTES; porém, a co-incubação do L-NAME com eotaxina ou RANTES não afetou a adesão observada na presença de cada uma das quimiocinas individualmente;
- III. A expressão de VLA-4 e Mac-1 não foi alterada em nenhuma das condições testadas;
- IV. A desgranulação de eosinófilos foi significativamente aumentada na presença de L-NAME, eotaxina ou RANTES; porém, a co-incubação do L-NAME com eotaxina ou RANTES não afetou a desgranulação observada na presença somente de cada uma das quimiocinas;
- V. A quimiotaxia de eosinófilos foi significativamente aumentada em resposta à eotaxina ou RANTES; porém, o pré-tratamento dos eosinófilos com L-NAME não afetou a migração em repostas às quimiocinas;
- VI. Não detectamos resíduos de proteínas nitradas nos eosinófilos sadios ou asmáticos, estimulados ou não com L-NAME e/ou quimiocinas;
- VII. Os níveis de GMPc não se mostraram alterados em eosinófilos estimulados ou não com L-NAME e/ou quimiocinas.

Podemos concluir que em nossas condições experimentais o tratamento *in vitro* com as quimiocinas eotaxina e RANTES aumenta a adesão, desgranulação e quimiotaxia de eosinófilos por mecanismos independentes de NO.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abu-Soud HM, Yoho LL, Stuehr DJ. Calmodulin controls neuronal nitric-oxide synthase by a dual mechanism. Activation of intra- and interdomain electron transfer. *J Biol Chem* 1994; 269:32047-32050.

Adamko DJ, Wu Y, Gleich GJ, Lacy P, Moqbel R. The induction of eosinophil peroxidase release: improved methods of measurement and stimulation. *J Immunol Methods* 2004; 291:101-108.

Adamko DJ, Odemuyiwa SO, Vethanayagam D, Moqbel R. The rise of the phoenix: the expanding role of the eosinophil in health and disease. *Allergy* 2005; 60(1):13-22.

Ahlstrom-Emanuelsson CA, Greiff L, Andersson M, Persson CG, Erjefalt JS. Eosinophil degranulation status in allergic rhinitis: observations before and during seasonal allergen exposure. *Eur Respir J* 2004; 24:750-757.

Andreadis AA, Hazen SL, Comhair SAA, Erzurum SC. Oxidative and nitrosative events in asthma. *Free Rad Biol Med* 2003; 35:213-225.

Bandeira-Melo C, Herbst A, Weller PF. Eotaxins: contributing to the diversity of eosinophil recruitment and activation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2001; 24:653-657.

Bandeira-Melo C, Bozza PT. The cellular biology of eosinophil eicosanoid formation and function. *J Allergy Clin Immunol* 2002;109:393-400.

Bandeira-Melo C, Weller PF. Mechanisms of eosinophil cytokine release. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2005; 100:73-81.

Barthel SR, Johansson MW, McNamee DM, Mosher DF. Roles of integrin activation in eosinophil function and the eosinophilic inflammation of asthma. *J Leukoc Biol* 2008; 83: 1–12.

Beckman JS, Ye Y-Z, Anderson PG, Chen J, Accavitti MA, Tarpey MM, et al. Extensive nitration of protein tyrosines in human atherosclerosis detected by immunohistochemistry. *Biol Chem Hoppe-Seyler* 1994; 375:81-88.

Beckman JS, Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and the ugly. *Am J Physiol* 1996; 271:C1424-1437.

Blease K, Lukacs NW, Hogaboam CM, Kunkel SL. Chemokines and their role in airway hyper-reactivity. *Respir Res* 2000a; 1:54-61.

Blease K, Kunkel SL, Hogaboam CM. Acute inhibition of nitric oxide exacerbates airway hyperresponsiveness, eosinophilia and C-C chemokine generation in a murine model of fungal asthma. *Inflamm Res* 2000b; 49:297-304.

Bochner BS, Luscinskas FW, Gimbrone Jr. MA, Newman W, Sterbinsky SA, Derse-Anthony CP, et al. Adhesion of human basophils, eosinophils, and neutrophils to interleukin 1-activated human vascular endothelial cells: contributions of endothelial cell adhesion molecules. *J Exp Med* 1991; 173:1553–1557.

Bochner BS, Sterbinsky SA, Tachimoto H. CCR3-active chemokines rapidly inhibit human eosinophil adhesion to VCAM-1 in vitro. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 103:S114.

Boucher JL, Moali C, Tenu JP. Nitric oxide biosynthesis, nitric oxide synthase inhibitors and arginase competition for L-arginine utilization. *Cell Mol Life Sci* 1999; 55:1015-1028.

Boulet LP, Laviolette M, Turcotte H, Cartier A, Dugas M, Malo JL, et al. Bronchial subepithelial fibrosis correlates with airway responsiveness to methacholine. *Chest* 1997; 112:45-52.

Boulet LP, Chakir J, Dube J, Laprise C, Boutet M, Laviolette M. Airway inflammation and structural changes in airway hyper-responsiveness and asthma: an overview. *Can Respir J* 1998; 5:16-21.

Brennan M, Wu W, Fu X, Shen Z, Song W, Frost H, et al. A tale of two controversies: defining both the role of peroxidases in nitrotyrosine formation in vivo using eosinophil peroxidase and myeloperoxidase-deficient mice, and the nature of peroxidase-generated reactive nitrogen species. *J Biol Chem* 2002; 277:17415-17427.

Broide D, Sriramarao P. Eosinophil trafficking to sites of allergic inflammation. *Immunol Rev* 2001; 179:163-172.

Brown JR, Kleimberg J, Marini M, Sun G, Bellini A, Mattoli S. Kinetics of eotaxin expression and its relationship to eosinophil accumulation and activation in bronchial biopsies and bronchoalveolar lavage (BAL) of asthmatic patients after allergen inhalation. *Clin Exp Immunol* 1998;114:137-146.

Burridge K, Petch LA, Romer LH Signals from focal adhesions. *Curr Biol* 1992; 2:537-539.

Busse WW, Lemanske RF. Asthma. *N Engl J Med* 2001; 344:350-362.

Buttery LD, Springall DR, Chester AH, Evans TJ, Standfield E N, Parums DV, et al. Inducible nitric oxide synthase is present within human atherosclerotic lesions and promotes the formation and activity of peroxynitrite. *Lab Invest* 1996; 75:77-85.

Capron M, Tomassini M, Torpier G, Kusnierz JP, MacDonald S, Capron A. Selectivity of mediators released by eosinophils. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1989; 88:54-58.

Carr MW, Alon R, Springer TA. The C-C chemokine MCP-1 differentially modulates the avidity of β 1 and β 2 integrins on T lymphocytes. *Immunity* 1996; 4:179-187.

Cherla RP, Ganju RK. Stromal cell-derived factor 1 α -induced chemotaxis in T cells is mediated by nitric oxide signaling pathways. *J Immunol* 2001; 166:3067-3074.

Cockcroft DW, Davis BE. Mechanisms of airway hyperresponsiveness. *J Allergy Clin Immunol* 2006;118:551-559.

Conran N, Ferreira HH, Lorand-Metze I, Thomazzi SM, Antunes E, De Nucci G. Nitric oxide regulates human eosinophil adhesion mechanisms in vitro by changing integrin expression and activity on the eosinophil cell surface. *Br J Pharmacol* 2001; 134:632-638.

Cooper PJ, Chico ME, Vaca MG, Rodriguez A, Alcântara-Neves NM, Genser B, et al. Risk factors for asthma and allergy associated with urban migration: background and methodology of a cross-sectional study in Afro-Ecuadorian school children in Northeastern Ecuador (Esmeraldas-SCAALA Study). *BMC Pulm Med* 2006; 6:24

Corrigan CJ, Kay AB. T cells and eosinophils in the pathogenesis of asthma. *Immunol Today* 1992; 13:501-506.

Crivellato E, Nico B, Mallardi F, Beltrami CA, Ribatti D. Piecemeal degranulation as a general secretory mechanism? *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* 2003; 274:778-784.

De La Cruz JP, Blanco E, Sánchez de la Cuesta F. Effect of dipyridamole and aspirin on the platelet-neutrophil interaction via the nitric oxide pathway. *Eur J Pharmacol* 2000; 397(1):35-41.

Denburg JA. The origins of basophils and eosinophils in allergic inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 1998;102:S74–76.

Desreumaux P, Capron M. Eosinophils in allergic reactions. *Curr Opin Immunol* 1996; 8: 790-795.

Donnelly LE, Barnes PJ. Expression and regulation of inducible nitric oxide synthase from human primary airway epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2002; 26:144-151.

Duguet A, Iijima H, Eum SY, Hamid Q, Eidelman DH. Eosinophil peroxidase mediates protein nitration in allergic airway inflammation in mice. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164:1119-1126.

Dvorak HF, Dvorak AM. Basophilic leucocytes: Structure, function and role in disease. *Clin Haematol* 1975; 4:651-683.

Dvorak AM, Monahan RA, Osage JE, Dickersin GR. Crohn's disease: transmission electron microscopic studies. II. Immunologic inflammatory response. Alterations of mast cells, basophils, eosinophils, and the microvasculature. *Hum Pathol* 1980; 11:606-619.

Dvorak AM, Furitsu T, Letourneau L, Ishizaka T, Ackerman SJ. Mature eosinophils stimulated to develop in human cord blood mononuclear cell cultures supplemented with recombinant human interleukin-5. Part I. Piecemeal degranulation of specific granules and distribution of Charcot-Leyden crystal protein. *Am J Pathol* 1991; 138:69-82.

Dweik RA, Comhair SA, Gaston B, Thunnissen FB, Farver C, Thomassen MJ, et al. NO chemical events in the human airway during the immediate and late antigen-induced asthmatic response. *Proc Natl Acad Sci* 2001; 98:2622-2627.

Ebisawa M, Yamada T, Bickel C, Klunk D, Schleimer RP. Eosinophil transendothelial migration induced by cytokines. Effect of the chemokine RANTES. *J Immunol* 1994; 153: 2153

Eiserich JP, Hristova M, Cross CE, Jones AD, Freeman BA, Halliwell B. Formation of nitric oxide-derived inflammatory oxidants by myeloperoxidase in neutrophils. *Nature* 1998; 391:393.

El-Shazly A, Masuyama K, Nakano K, Eura M, Samejima Y, Ishikawa T. Human eotaxin induces eosinophil-derived neurotoxin release from normal human eosinophils. *Int Arch Allergy Immunol* 1998; 117:55-58.

Erjefalt JS, Persson CG. New aspects of degranulation and fates of airway mucosal eosinophils. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161:2074-2085.

Erjefalt JS, Greiff L, Andersson M, Matsson E, Petersen H, Linden M, et al. Allergen-induced eosinophil cytolysis is a primary mechanism for granule protein release in human upper airways. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160:304-312.

Eynott PR, Groneberg DA, Caramori G, Adcock IM, Donnelly LE, Kharitonov S, et al. Role of nitric oxide in allergic inflammation and bronchial hyperresponsiveness. *Eur J Pharmacol* 2002; 452:123-133.

Fernvik E, Lundahl J, Hallden G. The impact of eotaxin- and IL-5-induced adhesion and transmigration on eosinophil activity markers. *Inflammation* 2000; 24:73-87.

Ferreira HHA, Medeiros MV, Lima CSP, Flores CA, Sannomiya P, Antunes E, et al. Inhibition of eosinophil chemotaxis by chronic blockade of nitric oxide biosynthesis. *Eur J Pharmacol* 1996; 310:201-207.

Ferreira HHA, Bevilacqua E, Gaglioti SM, De Luca IM, Zanardo RC, Teixeira CE, et al. Nitric oxide modulates eosinophil infiltration in antigen-induced airway inflammation in rats. *Eur J Pharmacol* 1998; 358:253-259.

Ferreira HHA, Lodo MLS, Martins AR, Kandravicius L, Salaroli AF, Conran N, et al. Expression of nitric oxide synthases and *in vitro* migration of eosinophils from allergic rhinitis subjects. *Eur J Pharmacol* 2002; 442:155-162.

Förstermann U, Boissel JP, Kleinert H. Expressional control of the 'constitutive' isoforms of nitric oxide synthase (NOS I and NOS III). *FASEB J* 1998; 12:773-790.

Foster PS STAT6: an intracellular target for the inhibition of allergic disease. *Clin Exp Allergy* 1999; 29:12-16.

Frank S, Kampfer H, Wetzler C, Satlmeyer B, Pfeilschifter J. Large induction of the chemotactic cytokine RANTES during cutaneous wound repair: a regulatory role for nitric oxide in keratinocyte-derived RANTES expression. *Biochem J* 2000; 347:265-273.

Fujisawa T, Kato Y, Nagase H, Atsuta J, Terada A, Iguchi K, et al. Chemokines induce eosinophil degranulation through CCR3. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 106:507-513.

Fukuyama N, Takebayashi Y, Hida M, Ishida H, Ichimori K, Nagazawa H. Clinical evidence of peroxynitrite formation in chronic renal failure patients with septic shock. *Free Radic Biol Med* 1997; 22:771-774.

Fulkerson PC, Fischetti CA, McBride ML, Hassman LM, Hogan SP, Rothenberg ME. A central regulatory role for eosinophils and the eotaxin/CCR3 axis in chronic experimental allergic airway inflammation. *Proc Natl Acad Sci* 2006; 103(44): 16418-16423.

Gale LM, McColl SR. Chemokines: extracellular messengers for all occasions? *Bioessays* 1999; 21:17-28.

Garcia-Zepeda EA, Rothenberg ME, Ownbey RT, Celestin J, Leder P, Luster AD. Human eotaxin is a specific chemoattractant for eosinophil cells and provides a new mechanism to explain tissue eosinophilia. *Nat Med* 1996; 2:449-456.

Giembycz MA, Lindsay MA. Pharmacology of the Eosinophil. *Pharm Rev* 1999; 51:213-339.

Giembycz M. Are eosinophils out of asthma? *Trends Pharmacol Sci* 2001; 22:61-62.

Gleich GJ, Adolphson CR. The eosinophilic leukocyte: structure and function. *Adv Immunol* 1986; 39:177-253.

Global Initiative for Asthma Global Strategy for Asthma. Management and Prevention National Heart, Lung, and Blood Institute, National Institutes of Health. Bethesda, Maryland 2003 No. 02-3659.

Gonglur U, Efeoglu T. Vascular adhesion and transendothelial migration of eosinophil leukocytes. *Cell Tissue Res* 2004; 318:473-482.

Gonzalo J-A, Lloyd CM, Wen D, Albar JP, Wells TNC, Proudfoot A, et al. The coordinated action of CC chemokines in the lung orchestrates allergic inflammation and airway hyperresponsiveness. *J Exp Med* 1998; 188:157-167.

Good PF, Werner P, Hsu A, Olanow CW, Perl DP. Evidence of neuronal oxidative damage in Alzheimer's disease. *Am J Pathol* 1996; 149:21-28.

Hafez I, Stolpe A, Lindau M. Compound exocytosis and cumulative fusion in eosinophils. *J Biol Chem* 2003; 278: 44921-44928.

Hanazawa T., Antuni JD, Kharitonov AA, Barnes PJ. Intranasal administration of eotaxin increases nasal eosinophils and nitric oxide in patients with allergic rhinitis. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 105:58-64.

Hansel TT, De Vries JM, Iff T, Rihs S, Wandzilak SB, Blaser K, et al. An improved immunomagnetic procedure for the isolation of highly purified human blood eosinophils. *J Immunol Methods* 1991; 145:105-110.

Hazen SL, Zhang R, Shen Z, Wu W, Podrez EA, MacPherson JC, et al. Formation of nitric oxide-derived oxidants by myeloperoxidase in monocytes: pathways for monocyte-mediated protein nitration and lipid peroxidation in vivo. *Circ Res* 1999; 85:950.

Holgate ST. Epithelium dysfunction in asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2007;120:1233-1244.

Honda K, Chiara J. Eosinophil activation by eotaxin – eotaxin primes the production of reactive oxygen species from eosinophils. *Allergy* 1999; 54:1262-1269.

Horie S, Gleich GJ, Kita H. Cytokines directly induce degranulation and superoxide production from human eosinophils. *J Allergy Clin Immunol* 1996; 98:371-381.

Humbles AA, Lu B, Friend DS, Okinaga S, Lora J, Al Garawi A, et al. The murine CCR3 receptor regulates both the role of eosinophils and mast cells in allergen-induced airway inflammation and hyperresponsiveness. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:1479-1484.

Humphries MJ. Monoclonal antibodies as probes of integrin priming and activation. *Biochem Soc Tran* 2004; 32:407–411.

Ichinose T, Takano H, Sadakane K, Yanagisawa R, Yoshikawa T, Sagai M, et al. Mouse strain differences in eosinophilic airway inflammation caused by intratracheal instillation of mite allergen and diesel exhaust particles. *J Appl Toxicol* 2004; 24: 69-76.

Ignarro LJ, Murad F (eds), Nitric Oxide: Biochemistry, Molecular Biology, and Therapeutic Implications. *Advances in Pharmacology* 1995; 34:516.

Iijima H, Duguet A, Eum SY, Hamid Q, Eidelman DH. Nitric oxide and protein nitration are eosinophil dependent in allergen-challenged mice. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 163:1233-1240.

Ischiropoulos H, Zhu L, Chen J, Tsai M, Martin JC, Smith CD, et al. Peroxynitrite-mediated tyrosine nitration catalyzed by superoxide dismutase. *Arch Biochem Biophys* 1992; 298:431-437.

Jacobsen EA, Ochkur SI, Lee NA, Lee JJ. Eosinophils and asthma. *Curr Allergy Asthma Rep* 2007; 1:18-26.

Jia G-Q, Gonzalo J-A, Hidalgo A, Wagner D, Cybulsky M, Gutierrez-Ramos JC. Selective eosinophil transendothelial migration triggered by eotaxin via modulation of Mac-1/ICAM-1 and VLA-4/VCAM-1 interactions. *Int Immunol* 1999; 11:1-10.

Jones DG. The eosinophil. *J Comp Path* 1993; 108:317-335.

Jose, PJ, Griffiths-Johnson, DA, Collins PD, Walsh, DT, Moqbel R, Totty, NF, et al. Eotaxin: a potent eosinophil chemoattractant cytokine detected in a guinea pig model of allergic airways inflammation. *J Exp Med* 1994; 179:881-887.

Kaburagi Y, Shimada Y, Nagaoka T, Hasegawa M, Takehara K, Sato S. Enhanced production of CC-chemokines (RANTES, MCP-1, MIP-1 alpha, MIP-1 beta, and eotaxin) in patients with atopic dermatitis. *Arch Dermatol Res* 2001; 293:350-355.

Kaplan AP. Chemokines, chemokines receptors and allergy. *Int Arch Allergy Immunol* 2001; 124:423-431.

Kapp A, Zeck-Kapp G, Czech W, Schopf E. The chemokine RANTES is more than a chemoattractant: characterization of its effect on human eosinophil oxidative metabolism

and morphology in comparison with IL-5 and GM-CSF. *J Invest Dermatol* 1994; 102:906-914.

Kaur H, Halliwell B. Evidence for nitric oxide-mediated oxidative damage in chronic inflammation. Nitrotyrosine in serum and synovial fluid from rheumatoid patients. *FEBS Lett* 1994; 350:9-12.

Kay AB. The role of eosinophils in the pathogenesis of asthma. *Trends Mol Med* 2005; 11:148-152.

Kimura M, Mitani H, Bandoh T, Totsuka T, Hayashi S. Mast cell degranulation in rat mesenteric venule: effects of L-NAME, methylene blue and ketotifen. *Pharmacol Res* 1999; 39:397-402.

Kirveskari J, Bono P, Granfors K, Leirisalo-Repo M, Jalkanen S, Salmi M. Expression of $\alpha 4$ -integrins on human neutrophils. *J Leukoc Biol* 2000; 68:243-250.

Kita H. The eosinophil: a cytokine-producing cell? *J Allergy Clin Immunol* 1996; 97(4): 889-892.

Knowles RG, Moncada S. Nitric oxide synthase in mammals. *Biochem J* 1994; 298:249-258.

Kubes P, Suzuki M, Granger DN. Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc Natl Acad Sci* 1991; 88:4651-4655.

Kobayashi K, Nishimura Y, Yamashita T, Nishiuma T, Satouchi M, Yokoyama M. The effect of overexpression of endothelial nitric oxide synthase on eosinophilic lung inflammation in a murine model. *Int Immunopharmacol* 2006; 6:1040-1052.

Kroegel C, Virchow JC, Walker C. Asthma. *New Engl J Med* 1993; 328:1639-1640.

Lampinen M, Carlson M, Hakansson L D, Venge P. Cytokine-regulated accumulation of eosinophils in inflammatory disease. *Allergy* 2004; 59:793-805.

Landgraf RG, Russo M, Jancar S. Acute inhibition of inducible nitric oxide synthase but not its absence suppresses asthma-like responses. *Eur J Pharmacol* 2005; 518:212-220.

Lilly CM, Woodruff PG, Camargo CAJ, Nakamura H, Drazen JM, Nadel ES, et al. Elevated plasma eotaxin levels in patients with acute asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 104:786-790.

Lilly CM. Diversity of asthma: Evolving concepts of pathophysiology and lessons from genetics. *J Allergy Clin Immunol* 2005;115:S526-531.

Logan MR, Odemuyiwa SO, Moqbel R. Understanding exocytosis in immune and inflammatory cells: The molecular basis of mediator secretion. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 111:923-932.

Lougheed MD. Variability in asthma: symptom perception, care, and outcomes. *Can J Physiol Pharmacol* 2007; 85:149-154.

Lukacs NW, Standiford TJ, Chensue SW, Kunkel RG, Strieter RM, Kunkel SL. C-C chemokine-induced eosinophil chemotaxis during allergic airway inflammation. *J Leukoc Biol* 1996; 60:573-578.

Lukacs NW, Strieter RM, Warmington K, Lincoln P, Chensue SW, Kunkel SL. Differential recruitment of leukocyte populations and alteration of airway hyperreactivity by C-C family chemokines in allergic airway inflammation. *J Immunol* 1997;158:4398-4404.

McFadden ER. Asthma. In: Isselbacher KJ, Braunwald E, Wilson JD, Martin JB, Fauci AS, Kasper DL Harrison's Principles of Internal Medicine. 13th. Ed., New York, McGraw-Hill; 1994. p. 1167-1172.

MacPherson JC, Comhair SAA, Erzurum SC, Klein DF, Lipscomb MF, Kavuru MS. Eosinophils are a major source of nitric oxide-derived oxidants in severe asthma: characterization of pathways available to eosinophils for generating reactive nitrogen species. *J Immunol* 2001; 166:5763-5772.

Marcondes S, Cardoso MH, Morganti RP, Thomazzi SM, Lilla S, Murad F, et al. Cyclic GMP-independent mechanisms contribute to the inhibition of platelet adhesion by nitric oxide donor: a role for alpha-actinin nitration. *Proc Natl Acad Sci* 2006; 103:3434-3439.

Matsuoka A, Stuehr DJ, Olson JS, Clark P, Ikeda-Saito M. L-arginine and calmodulin regulation of the heme iron reactivity in neuronal nitric oxide synthase. *J Biol Chem* 1994; 269:20335-20339.

Maxey KM, Maddipati KR, Birkmeier J. Interference in immunoassay. *J Clin Immunoassay* 1992; 15:116-20

Mayer B, Andrew P. Nitric oxide synthases: catalytic function and progress towards selective inhibition. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1998; 358:127-133.

Meng F, Lowell CA. A beta 1 integrin signaling pathway involving Src-family kinases, Cbl and PI-3 kinase is required for macrophage spreading and migration. *EMBO J* 1998; 17:4391-4403.

Meurer R, Van Riper G, Feeney W, Cunningham P, Hora D Jr, Springer MS, et al. Formation of eosinophilic and monocytic intradermal inflammatory sites in the dog by injection of human RANTES but not human monocyte chemoattractant protein 1, human

macrophage inflammatory protein 1 α , or human interleukin 8. *J Exp Med* 1993; 178:1913-1921.

Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991; 43:109-142.

Moncada S, Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med* 1993; 329: 2002-20012.

Moqbel R, Coughlin JJ. Differential secretion of cytokines. *Sci STKE* 2006; 338:26-29.

Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983; 65:55-63.

Motojima S, Frigas E, Loegering DA, Gleich GJ. Toxicity of eosinophil cationic proteins for quine pig tracheal epithelium *in vitro*. *Am Rev Respir Dis* 1989; 139:801-805.

Mould AW, Ramsay AJ, Matthaei KI, Young IG, Rothenberg M E, Foster PS. The effect of IL-5 and eotaxin expression in the lung on eosinophil trafficking and degranulation and the induction of bronchial hyperreactivity. *J Immunol* 2000; 164:2142-2150.

Murray LA, Syed F, Li L, Griswold DE, Das AM. Role of chemokines in severe asthma. *Curr Drug Targets* 2006; 7:579-588.

Nagata M, Sedgwick JB, Bates ME, Kita H, Busse WW. Eosinophil adhesion to vascular cell adhesion molecule-1 activates superoxide anion generation. *J Immunol* 1995; 155: 2194-2202.

Nakamura H, Weiss ST, Israel E, Luster AD, Drazen JM, Lilly CM. Eotaxin and impaired lung function in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160:1952-1956.

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

O'Byrne PM, Gauvreau GM, Wood LJ. Interaction between haemopoietic regulation and airway inflammation. *Clin Exp Allergy* 1999; 29:27-32, supplement 2.

Ono SJ, Nakamura T, Ohbayashi M, Dawson M, Toda M. Chemokines: Role in leukocyte development, trafficking, and effector function. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 111:1185-1199.

Palmqvist C, Wadlaw AJ, Bradding P. Chemokines and their receptors as potential targets for the treatment of asthma. *Br J Pharmacol* 2007; 151:725-736.

Pawankar R, Yamagishi S, Takizawa R, Yagi T. Mast cell- IgE-and mast cell-structural cell interactions in allergic airway disease. *Curr. Drug Targets Inflamm. Allergy* 2003; 303-312.

Pearce N, Douwes J. The global epidemiology of asthma in children. *Int J Tuberc Lung Dis* 2006a; 10:125-132.

Pearce N, Douwes J. The Latin American exception: why is childhood asthma so prevalent in Brazil? *J Pediatr* 2006b; 82:319-321.

Pease JE, Williams TJ. Chemokines and their receptors in allergic disease. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 118:305-318.

Pease JE, Williams TJ. Eotaxin and asthma. *Curr Opin Pharmacol* 2001; 1:248-253.

Podrez EA, Schmitt D, Hoff H, Hazen SL. Myeloperoxidase-generated reactive nitrogen species convert LDL into an atherogenic form in vitro. *J Clin Invest* 1999; 103:1547.

Podrez EA, Febbraio M, Sheibani N, Schmitt D, Silverstein RL, Hajjar DP, et al. Macrophage scavenger receptor CD36 is the major receptor for LDL modified by monocyte-generated reactive nitrogen species. *J Clin Invest* 2000; 105:1095.

Pope SM, Zimmermann N, Stringer KF, Karow ML, Rothenberg ME. The eotaxin chemokines and CCR3 are fundamental regulators of allergen-induced pulmonary eosinophilia. *J Immunol* 2005; 175:5341-5350.

Pradelles P, Grassi J. Enzyme immunoassays of adenoine cyclic 3', 5'-monophosphate and guanosine cyclic 3',5'-monophosphate using acetylcholinesterase. *Anal Chem* 1989, 61: 447-453.

Prussin C, Metcalfe DD. IgE, mast cells, basophils, and eosinophils. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 117(2 Suppl Mini-Primer):S450-456.

Powell WS, Ahmed S, Gravel S, Rokach J. Eotaxin and RANTES enhance 5-oxo-6,8,11,14-eicosatetraenoic acid-induced eosinophil chemotaxis. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 107:272-278.

Ravensberg AJ, Ricciardolo FL, van Schadewijk A, Rabe KF, Sterk PJ, Hiemstra PS, et al. Eotaxin-2 and eotaxin-3 expression is associated with persistent eosinophilic bronchial inflammation in patients with asthma after allergen challenge. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 115:779-785.

Ribeiro-Dias F, Barbuto JAM, Tsujita M, Jancar S. Discrimination between NK and LAK cytotoxic activities of murine spleen cells by MTT assay: differential inhibition by PGE₂ and EDTA. *J Immunol Methods* 2000; 241:121-129.

Robbins S L, Kumar V, Cotran R. Pathologic Basis of Disease. 5th Ed. Philadelphia, Pennsylvania, W. B. Saunders Company; 1994. p. 583-584.

Romagnani P, Lazzeri E, Lasagni L, Mavilia C, Beltrame C, Francalanci M, et al. IP-10 and Mig production by glomerular cells in human proliferative glomerulonephritis and regulation by nitric oxide. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13:53-64.

Rosenberg HF, Phipps S, Foster PS. Eosinophil trafficking in allergy and asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2007;119:1303-1310.

Rothenberg ME, Luster AD, Leder P. Murine eotaxin: an eosinophil chemoattractant inducible in endothelial cells and in interleukin 4-induced tumor suppression. *Proc Natl Acad Sci* 1995; 92:8960-8964.

Rothenberg ME. Eosinophilia. *N Engl J Med* 1998; 338(22):1592-1600.

Rothenberg ME, Hogan SP. The eosinophil. *Annu Rev Immunol* 2006; 24:147-174.

Saleh D, Ernst P, Lim S, Barnes PJ, Giaid A. Increased formation of the potent oxidant peroxynitrite in the airways of asthmatic patients is associated with induction of nitric oxide synthase: effect of inhaled glucocorticoid. *FASEB J* 1998; 12:929-937.

Salvemini D, Masini E, Pistelli A, Mannaioni PF, Vane JR. Nitric oxide: a regulatory mediator of mast cell reactivity. *J Cardiovasc Pharmacol* 1991; 17:S258.

Sano H, Zhu X, Sano A, Boetticher EE, Shioya T, Jacobs B, et al. Extracellular signal-regulated kinase 1/2-mediated phosphorylation of cytosolic phospholipase A₂ is essential for human eosinophil adhesion to fibronectin. *J Immunol* 2001; 166:3515-3521.

Sato E, Simpson KL, Grisham MB, Koyama S, Robbins RA. Effects of reactive oxygen and nitrogen metabolites on RANTES- and IL-5-induced eosinophil chemotactic activity *in vitro*. *Am J Pathol* 1999; 155:591-598.

Sato E, Simpson K L, Grisham MB, Koyama S, Robbins RA. Reactive nitrogen and oxygen species attenuate interleukin-8- induced neutrophil chemotactic activity in vitro. *J Biol Chem* 2000; 275:10826-10830.

Schmitt D, Shen Z, Zhang R, Colles SM, Wu SW, Salomon RG, et al. Leukocytes utilize myeloperoxidase-generated nitrating intermediates as physiological catalysts for the generation of biologically active oxidized lipids and sterols in serum. *Biochemistry* 1999; 38:16904.

Sedgwick JB, Jansen KJ, Kennedy JD, Kita H, Busse WW. Effects of the very late adhesion molecule 4 antagonist WAY103 on human peripheral blood eosinophil vascular cell adhesion molecule 1-dependent functions. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 116:812-819.

Shahabuddin S, Ponath P, Schleimer RP. Migration of eosinophils across endothelial cell monolayers: interactions among IL-5, endothelial-activating cytokines, and C-C chemokines. *J Immunol* 2000; 164:3847-3854.

Smit JJ, Lukacs NW. A closer look at chemokines and their role in asthmatic responses. *Eur J Pharmacol* 2006; 533:277-288.

Smith MA, Richey-Harris PL, Sayre LM, Beckman JS, Perry G. Widespread peroxynitrite-mediated damage in Alzheimer's disease. *J Neurosci* 1997; 17:2653-2657.

Standiford TJ, Kunkel SL, Basha MA, Chensue SW, Lynch JP, Toews GB, et al. Interleukin-8 gene expression by a pulmonary epithelial cell line. A model for cytokine networks in the lung. *J Clin Invest* 1990; 86:1945-1953.

Strieter RM, Kunkel SL, Showell HJ, Remick DG, Phan SH, Ward PA, et al. Endothelial cell gene expression of a neutrophil chemotactic factor by TNF-alpha, LPS, and IL-1 beta. *Science* 1989; 243:1467-1469.

Sung KP, Yang L, Elices M, Jin G, Sriramarao P, Broide DH. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor regulates the functional adhesive state of very late antigen-4 expressed by eosinophils. *J Immunol* 1997; 158:919-927.

Sung KP, Yang L, Kim J, Ko D, Stachnick G, Castaneda D, et al. Eotaxin induces a sustained reduction in the functional adhesive state of very late antigen 4 for the connecting segment 1 region of fibronectin. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 106:933-940.

Tanaka Y, Mine S, Figdor CG, Wake A, Hirano H, Tsukada J, et al. Constitutive chemokine production results in activation of leukocyte function-associated antigen-1 on adult T-cell leukemia cells. *Blood* 1998; 91:3909-3919.

Taooka, Y., Chen, J., Yednock, T., Sheppard, D. (1999) The integrin $\alpha 9\beta 1$ mediates adhesion to activated endothelial cells and transendothelial neutrophil migration through interaction with vascular cell adhesion molecule-1. *J Cell Biol* 1999; 145:413–420.

Taub DD, Oppenheim JJ. Chemokines, inflammation and the immune system. *Ther Immunol* 1994;1:229-246.

Teran LM. CCL Chemokines and asthma. *Immunol Today* 2000; 21:235-241

Thomassen MJ, Buhrow LT, Connors MJ, Kaneko FT, Erzurum SC, Kavuru MS. Nitric oxide inhibits inflammatory cytokine production by human alveolar macrophages. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1997; 17:279-283.

Thomassen MJ, Raychaudhuri B, Dweik RA, Farver C, Buhrow L, Malur A, et al. Nitric oxide regulation of asthmatic airway inflammation with segmental allergen challenge. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 104:1174-1182.

Thomazzi S, Ferreira HHA, Conran N, De Nucci G, Antunes E. Role of nitric oxide on *in vitro* human eosinophil migration. *Biochem Pharmacol* 2001; 62:1417-1421.

Tillie-Leblond I, Hammad H, Desurmont S, Pugin J, Wallaert B, Tonnel AB, et al. CC chemokines and interleukin-5 in bronchial lavage fluid from patients with status asthmaticus. Potential implication in eosinophil recruitment. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162:586-592.

Trifilieff A, Fujitani Y, Mentz F, Dugas B, Fuentes M, Bertrand C. Inducible nitric oxide synthase inhibitors suppress airway inflammation in mice through down-regulation of chemokine expression. *J Immunol* 2000; 165:1526-1533.

Trivedi, SG, Lloyd CM. Eosinophils in the pathogenesis of allergic airways disease. *Cell Mol Life Sci* 2007; 64:1269-1289.

Tulic MK, Wale JL, Holt PG, Sly PD. Differential effects of nitric oxide synthase inhibitors in an *in vivo* allergic rat model. *Eur Respir J* 2000; 15:870-877.

Vaddi K, Newton RC. Regulation of monocyte integrin expression by β -family chemokines. *J Immunol* 1994; 153:4721-4732.

Van Dalen CJ, Winterbourn CC, Kettle AJ. Mechanism of nitrite oxidation by eosinophil peroxidase: implications for oxidant production and nitration by eosinophils. *Biochem J* 2006; 394:707-713.

Van Der Vliet A, Eiserich JP, O'Neill CA, Halliwell B, Cross CE. Tyrosine modification by reactive nitrogen species: a closer look. *Arch Biochem Biophys* 1995; 319:341-349.

Van Der Vliet A, Eiserich J P, Halliwell B, Cross CE. Formation of reactive nitrogen species during peroxidase-catalyzed oxidation of nitrite: a potential additional mechanism of nitric oxide-dependent toxicity. *J Biol Chem* 1997; 272:7617.

Van Der Vliet A, Eiserich JP, Shinegaga MK, Cross CE. Reactive nitrogen species and tyrosine nitration in the respiratory tract: epiphenomena or a pathobiologic mechanism of disease? *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160(1):1-9.

Vargaftig BB. What can we learn from murine models of asthma? *Clin Exp Allergy* 1999 29:9-13, supplement 1.

Vestweber D, Blanks JE. Mechanisms that regulate the function of the selectins and their ligands. *Physiol Rev* 1999; 79:181-213.

Wardlaw AJ, Brightling CE, Green R, Woltmann G, Bradding P, Pavord ID. New insights into the relationship between airway inflammation and asthma. *Clin Sci (Lond)* 2002; 103:201-11.

Weber C, Kitayama J, Springer TA. Differential regulation of beta 1 and beta 2 integrin avidity by chemoattractants in eosinophils. *Proc Natl Acad Sci* 1996; 93:10939-10944.

Weller PF. Immunobiology of eosinophils. *N Engl J Med* 1991; 324:1110.

Weller PF, Rand TH, Goelz SE, Chi-Rosso G, Lobb RR. Human eosinophil adherence to vascular endothelium mediated by binding to vascular cell adhesion molecule 1 and endothelial leukocyte adhesion molecule 1. *Proc Natl Acad Sci* 1991; 88:7430-7433.

Weller PF. Human eosinophils. *J Allergy Clin Immunol* 1997; 100:283-287.

Weller, CF, Jose PJ, Williams TJ. Selective suppression of leukocyte recruitment in allergic inflammation. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2005; 100 (Suppl. I):153-160.

Wetzler C, Kampfer H, Pfeilschifter J, Frank S. Keratinocyte-derived chemotactic cytokines: expressional modulation by nitric oxide in vitro and during cutaneous wound repair *in vivo*. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 274:689-696.

Williams CM, Newton DJ, Wilson SA, Williams TJ, Coleman JW, Flanagan BF. Conserved structure and tissue expression of rat eotaxin. *Immunogenetics* 1998; 47:178-180.

Wu W, Chen Y, Hazen SL. Eosinophil peroxidase nitrates protein tyrosyl residues: implications for oxidative damage by nitrating intermediates in eosinophilic inflammatory disorders. *J Biol Chem* 1999; 274:25933.

Xiao T, Takagi J, Collier BS, Wang JH, Springer, TA. Structural basis for allostery in integrins and binding to fibrinogen-mimetic therapeutics. *Nature* 2004; 432:59–67.

Xiong Y, Karupiah G, Hogan SP, Foster PS, Ramsay AJ. Inhibition of allergic inflammation in mice lacking nitric oxide synthase 2. *J Immunol* 1999; 162:445-452.

Yamada H, Yamaguchi M, Yamamoto K, Nakajima T, Hirai K, Morita Y, et al. Eotaxin in induced sputum of asthmatics: relationship with eosinophils and eosinophil cationic protein in sputum. *Allergy* 2000;55:392-397.

Yamamoto H, Nagata M, Sakamoto Y. CC chemokines and transmigration of eosinophil in the presence of vascular cell adhesion molecule 1. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2005; 94(2):292-300.

Ying S, Meng Q, Zeibecoglou K, Robinson DS, Macfarlane A, Humbert M, et al. Eosinophil chemotactic chemokines (eotaxin, eotaxin-2, RANTES, monocyte chemoattractant protein-3 (MCP-3), and MCP-4), and C-C chemokine receptor 3 expression in bronchial biopsies from atopic and nonatopic (intrinsic) asthmatics. *J Immunol* 1999; 163(11):6321-6329.

Young SS, Ritacco G, Skeans S, Chapman RW. Eotaxin and nitric oxide production as markers of inflammation in allergic cynomolgus monkey. *Int Arch Allergy Immunol* 1999; 120(3):209-217.

Zanardo RC, Costa E, Ferreira HHA, Antunes E, Martins AR, Murad F, et al. Pharmacological and immunohistochemical evidence for a functional nitric oxide synthase system in rat peritoneal eosinophils. *Proc Natl Acad Sci* 1997; 94:14111-14114.

Zeicher AM, Fisslthaler B, Schray-Utz B, Busse R. Nitric oxide modulates the expression of monocyte chemoattractant protein 1 in cultured human endothelial cells. *Circ Res* 1995; 76:980-986.

Zhang L, Plow EF. Overlapping, but not identical, sites are involved in the recognition of C3bi, neutrophil inhibitory factor, and adhesive ligands by the alphaM beta2 integrin. *J Biol Chem* 1996; 271:18211-18216.

ANEXO



**FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**

Caixa Postal 6111, 13083-970 Campinas, SP

☎ (0_19) 3788-8936

FAX (0_19) 3788-8925

🌐 www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html

✉ cep@fcm.unicamp.br

2ª VIA

CEP, 25/07/07.

(Grupo III)

PA RECER PROJETO: N° 048/2004

I-IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: "EFEITO DO ÓXIDO NÍTRICO E CC-QUIMIOCINAS SOBRE EOSINÓFILOS DE PACIENTES ASMÁTICOS"

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Leticia Lintomen

INSTITUIÇÃO: Departamento de Farmacologia/FCM/UNICAMP

APRESENTAÇÃO AO CEP: 29/01/2004

APRESENTAR RELATÓRIO EM: 15/06/05

II - OBJETIVOS

Investigar a interação de algumas CC-quimiocinas em eosinofilotáticas e da via de sinalização NO-cGMP em eosinófilos periféricos de pacientes asmáticos, comparando-os com EOS de sujeitos sadio.

III - SUMÁRIO

Os métodos para este estudo compreendem várias etapas laboratoriais para análise; resumidamente, o sangue será diluído, centrifugado para remoção das células mononucleares, continuando apenas os eritrócitos, neutrófilos e eosinófilos. Após a lise dos eritrócitos, a suspensão celular será novamente centrifugada, lavada (em PBS) e realizada separação imunomagnética de células para a separação dos eosinófilos, que serão coletados e preparados em lâminas para determinação diferencial em microscópio óptico. A expressão de CC-quimiocinas, iNOS e a produção de NO serão investigadas pelo método de Western Blotting, de mRNA por RT-PCR e de dosagem dos níveis de nitrito/nitrato.

Os resultados serão expressos como média e erro padrão de n experimentos, e analisados pela análise de variância (ANOVA) para múltiplas comparações; também pelo teste de Tukey. Será considerado $P < 0,05$ como significativo.

O item "Aspectos Éticos da Pesquisa" deste trabalho apenas descreve tecnicamente a coleta de sangue periférico, considerando exclusivamente a coleta como o aspecto ético.

A descrição dos sujeitos refere-se novamente ao procedimento de coleta; a incluir sujeitos asmáticos e saudáveis, de ambos os sexos, após aprovação do CEP e através de consentimento escrito. Quanto à seleção, esclarece que esta e os controle dos sujeitos, será feita pelo Dr. Antonio Candido Neto, especialista em doenças alérgicas, que será um colaborador deste projeto.

O TCLE apresentado consta de uma página, com oito sentenças (16 linhas) que

descrevem resumidamente o objetivo; o sigilo; a retirada de 60 ml de sangue; ausência de benefício terapêutico; confirmação de que obteve todas as informações necessárias; que em caso de intercorrência o atendimento será no OS/HC e o valor de ressarcimento de 10 reais pela participação.

A bibliografia é extensa e pertinente ao assunto de estudo.

IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES

É um projeto que tem por finalidade investigar a interação de CC-quimiocinas eosinofilotáticas e da via de sinalização NO-cGMP em eosinófilos periféricos de pacientes asmáticos, comparando-os com eosinófilos de sujeitos sadios. Esses "marcadores" serão analisados em laboratório após a retirada de 60ml de sangue dos pacientes asmáticos e do grupo controle.

Apresenta um desenho metodológico bem estruturado com todas as fases que compõem um projeto. O termo de consentimento é bastante simples, mas claro e objetivo.

Por se tratar de um projeto desenvolvido basicamente através de pesquisa laboratorial da amostra sanguínea, não há qualquer fator de risco envolvendo os pacientes e o grupo controle. Em relação aos sujeitos da pesquisa não há nenhuma referência ao número, a origem dos mesmos (ambulatório, enfermaria, etc.) e faixa etária.

V - PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e complementares, bem como ter aprovado o Termo do Consentimento Livre e Esclarecido, assim como todos os anexos incluídos na Pesquisa, resolve aprovar sem restrições o Protocolo de Pesquisa supracitado.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 – Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).

Pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.1.z), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3.).

O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4.). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas.

Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, Item III.2.e)

Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 196/96.

VII - DATA DA REUNIÃO

Homologado na VI Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 15 de junho de 2004.


Prof. Dra. Carmen Silvia Bertuzzo
PRESIDENTE DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP