



ANTONIO CONDINO NETO

INSTITUTO DE BIOLOGIA

"MIGRAÇÃO DE FAGÓCITOS EM CRIANÇAS COM ASMA
CRÔNICA SOB USO DE TEOFILINA"

*Este exemplar corresponde à redação
final da tese defendida pelo
candidato Antonio Condino Neto e
aprovada pela comissão julgadora.
2/13/90 - F. D. L.*

Dissertação apresentada ao
Instituto de Biologia da
Universidade Estadual de
Campinas para obtenção do
Título de Mestre.

Orientadora: Prof. Dra. Maria Marluce dos Santos Vilela.

DEDICATÓRIA...

À THEREZA e GABRIELA, com perdão pelo tempo que lhes
roubei...

Aos meus pais Delphino e Áurea, onde tudo começou...

Aos pacientes, razão deste estudo.

AGRADECIMENTOS

À Dra. Marluce Vilela, pela oportunidade, incentivo, apoio e orientação.

À Srta. Elizabeth Cambiucci, pelos ensinamentos práticos e assistência técnica no laboratório.

Ao Dr. José Dirceu Ribeiro, "Viga Mestra" do Ambulatório de Imunologia, Alergia e Pneumologia Infantil.

À Dra. Agnes Guglielmi, pela colaboração na seleção dos pacientes.

Ao Dr. Marcos Garcia Costa, coordenador do Curso de Pós Graduação em Imunologia, pela acolhida em um momento difícil e pelo incentivo e apoio ao longo do curso.

Ao Dr. Gilberto D'Assumpção e sua equipe, por permitir usar seu laboratório e pela rica discussão do projeto.

Ao Dr. Edgar Ferro Collares, pelas sugestões práticas dadas ao longo do desenvolvimento do trabalho.

Ao Dr. Gilberto de Nucci e sua equipe, por permitir usar seu laboratório na fase conclusiva do trabalho e pelo apoio e sugestões dadas ao discutir o projeto.

Ao Dr. Magna, coordenador da Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas, pelos ensinamentos e revisão estatística do trabalho.

À Dra. Tatiana Rozov, pela minuciosa revisão do trabalho.

À Dra. Cristina Roque-Barreira, pela discussão do projeto.

Ao Departamento de Pediatria e sua Secretaria, pelo apoio operacional.

Ao Grupo de Enfermagem do Ambulatório de Pediatria, pela colaboração prática no atendimento aos doentes.

Aos Serviços de Fisioterapia e Assistência Social do Ambulatório de Pediatria, pelo apoio operacional.

Ao Serviço de Coleta do Hospital das Clínicas, que muito facilitou o atendimento aos doentes.

À Srta. Wilma Proide, coordenadora do Serviço de Audio-Visual da Faculdade de Ciências Médicas, pela cuidadosa confecção dos gráficos e slides.

Ao Dr. Humberto Nicola do Instituto de Física, pela confecção das Câmaras de Boyden.

Aos colegas do Núcleo de Medicina Experimental, pela solidariedade oferecida até o presente momento.

ÍNDICE .

1 - INTRODUÇÃO .

2 - MATERIAL E MÉTODOS .

3 - RESULTADOS .

4 - DISCUSSÃO .

5 - RESUMO E CONCLUSÕES .

6 - BIBLIOGRAFIA .

7 - APÊNDICE .

INTRODUÇÃO .

A resposta inflamatória adequada, depende da interação coordenada de fatores humorais e celulares. No caso da atopia, os mecanismos reguladores da resposta imune parecem estar alterados, levando a estados clínicos de hipersensibilidade. Dentre eles, encontramos a asma brônquica, caracterizada por uma resposta alérgica de caráter bifásico: a fase imediata e fase tardia. A fase tardia particularmente, tem importância especial na asma crônica, sendo caracterizada pela inflamação brônquica persistente, com a presença de um rico infiltrado celular, com a presença de linfócitos, neutrófilos, macrófagos e eosinófilos (ELLIS, 1988 - revisão).

A fase tardia da asma, também já foi demonstrada em coelhos sensibilizados a antígenos inalantes, bem como em cães expostos a estímulos inespecíficos como o ozônio (HOLTZMAN e cols., 1983 e MARSH e cols., 1985). Após a provocação brônquica e o desencadeamento da resposta inflamatória, ocorre uma correlação temporal estreita entre o desenvolvimento da hiperreatividade brônquica e a infiltração de polimorfonucleares (PMN) no parênquima pulmonar do cão (HOLTZMAN e cols., 1983), bem como o aparecimento de PMN, monócitos (MON) e eosinófilos no lavado brônquico dos coelhos (MARSH e cols., 1985). Tais fatos, acontecem de maneira similar em humanos (METZGER e cols., 1985). Os mecanismos precisos pelos quais estas células geram inflamação das vias aéreas, bem como se são elas as responsáveis pelas lesões dos brônquios, ainda não foi

esclarecido (AKTINS e ZWEIMAN, 1985). Sabe-se entretanto que em cães neutropênicos expostos ao ozônio, não ocorreu inflamação das vias aéreas, nem hiperreatividade brônquica (O'BYRNE e cols., 1984). CARROLL e cols., (1985), verificaram ainda uma elevação na concentração sérica do fator quimiotático de neutrófilos de alto peso molecular após provocação brônquica, associada a um aumento na expressão dos receptores C3b dos PMN e MON circulantes, levantando a possibilidade que nesta situação, ocorreu um recrutamento de células portadoras do receptor de complemento a partir de um compartimento não periférico.

O eosinófilo, também contribui para os mecs inflamatórios da asma. Eosinofilia sanguínea e tissular se correlacionam estreitamente com o grau de obstrução brônquica, tanto na asma alérgica e não alérgica (HORN e cols., 1975). Os mecanismos pelos quais os eosinófilos podem lesar os brônquios incluem: liberação de leucotrienos, prostaglandinas e tromboxane (JORG e cols., 1982); síntese e liberação da proteína básica dos grânulos ("Major Basic Protein"- MPB), a qual é tóxica para o epitélio pulmonar (GLEICH e cols., 1979), altera o batimento ciliar (FRIGAS e cols., 1980) e contribui para a liberação de histamina de basófilos e mastócitos (O'DONNELL e cols., 1983); além de liberação de metabólitos do oxigênio, reconhecidamente tóxicos para o parênquima pulmonar (PRIN e cols., 1984).

O macrófago alveolar, normalmente executa as tarefas de fagocitose, processamento antigênico e expressão de mediadores, mantendo as vias aéreas estéreis e livres de partículas (FOWLER e SCHWARTZ, 1984). Além de um receptor Fc para IgG, o macrófago alveolar também é portador de receptores de baixa afinidade para IgE, que quando ocupados por imunocomplexos, tornam esta célula ativada (DESSAINT e cols., 1979) e capaz de produzir: substâncias quimiotáticas para neutrófilos e eosinófilos (FORD-HUTCHINSON e cols., 1980); metabólitos do ácido aracdônico, incluindo o potente LTB₄ (BORGEAT e SAMUELSSON, 1979 a, b, c, e d) e (NAGY e cols., 1982); fator ativador de plaquetas ("PAF") (BENVENISTE, 1974), que causa quimiotaxia de neutrófilos, contração do músculo liso, vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular, agregação plaquetária e liberação de enzimas lisossomais com atividade inflamatória (O'FLAHERTY e WYCLE, 1983 e JOSEPH e cols., 1983). Estas propriedades dos macrófagos alveolares, sugerem um importante papel deste grupo de células, na determinação da hiperreatividade brônquica e obstrução de vias aéreas.

A habilidade dos fagócitos ao migrarem direcionalmente em resposta a um sinal quimiotático, é tida como de grande importância para o rápido e preciso acúmulo extravascular destas células (VALERIUS, 1984 - revisão). Estas, ao migrarem da circulação para os locais lesados por

agentes físicos, químicos ou microbianos, fagocitam os invasores e/ou liberam enzimas lisossomais, para a digestão de substâncias estranhas (GAMMON, 1979 - revisão).

O termo quimiotaxia, foi usado indiscriminadamente no passado, para descrever quaisquer eventos de migração celular, quimicamente induzidos. Com o objetivo de uniformizar a terminologia referente ao processo de migração leucocitária e interpretar corretamente o comportamento dos leucócitos "in vitro" e "in vivo", KELLER e cols., (1977); ZIGMOND, (1977) e VALERIUS, (1984), propuseram as seguintes conceituações:

1- MIGRAÇÃO AO ACASO: na qual o eixo da célula não está orientado para nenhum estímulo e não há predomínio de uma direção em particular.

2- QUIMIOKINESIA: na qual a velocidade ou frequência de migração é determinada por substâncias no meio ambiente.

3- POLARIZAÇÃO: na qual a célula adquire a configuração de uma célula que vai migrar.

4- ORIENTAÇÃO: na qual a polarização se dá em função de um gradiente quimiotático.

5- QUIMIOTAXIA: na qual a migração celular é direcionada através de um gradiente de concentração de fatores quimiotáticos. O processo inclui

três fases: (A): SENSITIVA: na qual a célula detecta a presença do quimioatraente e a direção do gradiente de concentração; (B): TRANSDUÇÃO: na qual o sinal é traduzido pelos mensageiros celulares; (C): EFETORA: na qual o aparelho locomotor da célula se torna ativado.

Com o estabelecimento das técnicas que permitiram o aprofundamento no estudo da migração leucocitária, muitas publicações surgiram no decorrer das décadas de 1970 e 1980 analisando aspectos fisiológicos e fisiopatológicos deste fenômeno. HILL e QUIE, (1974) e posteriormente em outros trabalhos (HILL e cols., 1976 (a) e HILL e cols., 1976 (b)), descreveram uma síndrome caracterizada por infecções recorrentes, manifestações alérgicas cutâneas, eosinofilia, hiperimunoglobulinemia E e deficiência na quimiotaxia de PMN. CLARK e cols., (1973), descreveram um caso de uma menina portadora de infecções piogênicas recorrentes na pele, vários episódios de pneumonias estafilocócicas e candidíase mucocutânea crônica entre outras manifestações e que cursavam com eosinofilia e elevação dos níveis de IgE. Esta paciente apresentava uma falta de resposta de seus granulócitos aos agentes quimiotáticos e um defeito na imunidade celular.

A partir desses trabalhos, foram publicados dezenas de casos de pacientes portadores da chamada síndrome da hiperimunoglobulinemia E, dermatite atópica, asma brônquica, rinite alérgica, alergia alimentar

e urticária com graus variáveis de associação entre si, ligados a um defeito na quimiotaxia de PMN e MDN, via de regra sem correlação com níveis séricos de IgE (BLUM e cols., 1977; CHURCH e cols., 1976; DE CREE e cols., 1978; FONTAN e cols., 1976; JACOBS e NORMAN, 1977; ISSEKUTZ e cols., 1979; ORTEGA e cols., 1980; YODA e cols., 1980; BECK e cols., 1980; de SHAZO e cols., 1982; GALLI e cols., 1983; CHICAZAWA e cols., 1984; SOLIGO e cols., 1986; ERLICH e MATTISON, 1984; TERNOWITZ e HERLIN, 1986 e KAPLAN e cols., 1987).

Em particular, na asma brônquica, CAIRO-CUETO e cols., (1981) e ORTEGA e cols., (1979), descreveram um defeito na quimiotaxia de PMN de crianças com infecções recorrentes do trato respiratório, não correlacionado com os níveis séricos de IgE.

Defeitos na migração fagocitária no entanto, não são atributos exclusivos da doença atópica. Várias outras doenças primárias do sistema imune e moléstias sistêmicas com origem em outros órgãos, também demonstram deficiências neste setor. Dentre muitos exemplos temos: (A) Imunodeficiências primárias: deficiências de frações do sistema complemento (C1r, C2, C3, C4 e C5), hipogamaglobulinemias, síndrome de Chédiak-Higashi, síndrome do leucócito preguiçoso, síndrome da disfunção actínica, deficiência de alfa-manosidase, periodontite idiopática juvenil e síndrome de Wiskott-Aldrich; (B) Doenças do

colágeno: lúpus eritematoso sistêmico e artrite reumatóide; (C) Malignidade: doença de Hodgkin, síndrome de Sézary e cancer de maneira geral; (D) Outras patologias: distúrbios da fibrinólise e da geração de cininas, cirrose hepática, sarcoidose, deficiência de alfa-1 antitripsina, uremia, glomerulonefrites, injúria térmica, síndrome de Kartagener, doença enxerto versus hospedeiro, ictiose e síndrome de Down; (E) Infecções agudas ou crônicas: infecções bacterianas ou virais, tuberculose ativa e lepra lepromatosa (GALLIN, 1980).

A literatura médica é controversa quanto ao aspecto da maior susceptibilidade às infecções em atópicos. Segundo BUCKLEY (1988), a evidência clínica mais convincente associando imunodeficiência e atopia, deriva do fato de haver maior incidência de doença atópica e/ou produção excessiva de IgE entre pacientes com certas formas de imunodeficiência primária como na síndrome de Wiskott-Aldrich, deficiência seletiva de IgA, síndrome de Nezelof e síndrome de Di-George.

No caso da dermatite atópica e da hiperimunoglobulinemia E, há grande tendência às infecções recorrentes de pele na forma de abscessos frios, causados por *Staphylococcus aureus* e *Haemophilus influenzae* (CHIKAZAWA e cols., 1984). HILL, (1956), ao revisar o material de necrópsia de 26 casos de eritroderma atópico, encontrou como

causa de óbito de quase todos casos, infecção generalizada por *S. aureus*. Otite média também foi encontrada na maioria dos casos, porém esta poderia ser decorrente da baixa faixa etária dos casos.

Na asma brônquica em particular, MINOR e cols. (1974), mostraram em um estudo longitudinal controlado, uma maior incidência de infecções virais mas não bacterianas, no trato respiratório de crianças asmáticas, quando comparadas às normais. CAIRO-CUETO e cols., (1981), ao estudar um grupo de 25 crianças asmáticas com infecções recorrentes do trato respiratório, demonstrou que na maioria das vezes, a bactéria isolada a partir de exsudatos da faringe foi *S. aureus*.

As bases fisiopatológicas para tais fenômenos também são controversas. Na dermatite atópica e na hiperimmunoglobulinemia E, o defeito na quimiotaxia dos fagócitos é implicado como um fator primário na determinação de infecções recorrentes (CHIKAZAWA e cols., 1984). Discute-se se o problema ocorre primariamente na célula (BLUMM e cols., 1977; CHURCH e cols., 1976; HILL e cols., 1974; PINCUS e cols., 1975; VAN SCOY e cols., 1975; deSHAZO e cols., 1982) ou se fatores inibitórios da migração estão presentes no soro destes doentes (MATSUMOTO e cols., 1981; FRIEDENBERG e cols. 1979; ERLICH e cols., 1984).

Nos pacientes com asma brônquica atópica, observou-se que seus linfócitos tem uma reduzida

capacidade de transformação blástica ao serem estimulados com fitohemaglutinina, bem como um defeito na reação cutânea de hipersensibilidade tardia ao antígeno do toxóide tetânico (GROVE e cols., 1975). Em outros estudos "in vitro" realizados em asmáticos demonstrou-se que a capacidade de formação de rosetas pelos linfócitos T se encontra diminuída (CHISARI e cols., 1974; GAZANSHAFFI e cols., 1976). CAIRO-CUETO e cols., (1981), mostraram que num grupo de 25 crianças asmáticas com infecções recorrentes do trato respiratório, ocorreu uma relação inversa entre os níveis séricos de IgE e a subpopulação de linfócitos T ativos. Tais fatos sugerem que os pacientes atópicos cursam com uma depressão na imunidade celular. ORTEGA e cols., (1980), advogam uma base hereditária para a explicação desses fenômenos.

Durante décadas, a teofilina tem sido empregada como um potente broncodilatador no tratamento da asma aguda. Atualmente entretanto, seu uso clínico mais importante é de um profilático eficaz no controle dos sintomas da asma crônica (HENDELES e cols., 1988). Quimicamente, ela é uma xantina dimetilada similar em estrutura às xantinas cafeína e teobromina, presentes na dieta cotidiana (café, chás e chocolates) (HENDELES e cols., 1988).

Provavelmente, a teofilina relaxa a musculatura lisa bronquial por um mecanismo distinto dos simpatomiméticos. A inibição da fosfodiesterase resultando na inibição do catabolismo de 3",5"-adenosina monofosfato (AMP cíclico) promovendo seu acúmulo intracelular, é um mecanismo proposto. Tal efeito porém, foi observado "in vitro", em concentrações de teofilina que seriam tóxicas, se utilizadas "in vivo" (BERGSTRAND, 1980). Além disso, outros inibidores da fosfodiesterase como dipiridamol e papaverina, não são broncodilatadores. Em alguns experimentos, sugeriu-se que a teofilina antagonizava prostaglandinas (HORROBIN e cols., 1977), porém os efeitos no cálcio intracelular (AUBIEN e cols., 1983) e uma maior ligação do AMP cíclico à sua proteína ligadora também foram descritos (MIECH e cols., 1979). A teofilina demonstrou ser um antagonista da adenosina "in vitro". Entretanto outra metilxantina, a emprofilina, tem maior efeito broncodilatador e não antagoniza adenosina. Este achado sugere que o antagonismo entre adenosina e teofilina está relacionado aos seus efeitos diurético, cardíaco e no sistema nervoso central e não necessariamente à atividade broncodilatadora (HENDELES e cols., 1988). Apesar de a teofilina não inibir o resultado dos testes alérgicos cutâneos, ela reduz a resposta aos testes de provocação brônquica à histamina, metacolina e a alguns antígenos inalantes (McWILLIANS e cols., 1984). Tanto em voluntários normais como em portadores de doença pulmonar obstrutiva crônica, a teofilina em níveis terapêuticos, é

capaz de diminuir a fadiga e aumentar a contratilidade do diafragma, reduzindo significativamente o esforço respiratório (MURCIANO e cols., 1984).

O efeito broncodilatador da teofilina é proporcional ao logaritmo da concentração sérica entre os valores de 5 a 20 mcg/ml (LEVY e cols., 1975). Sua maior eficácia em concentrações séricas acima de 10 mcg/ml foi relatada por TURNER-WARWICK, (1957) e posteriormente por JENNE e cols., (1972), num estudo controlado duplo cego de crianças com asma crônica, onde o controle eficaz dos sintomas ocorreram quando os níveis séricos da droga eram superiores a 10 mcg/ml. Quando a concentração excede 20 mcg/ml, o risco de efeitos adversos aumenta muito e quando próximos de 40 mcg/ml convulsão e morte podem ocorrer (HENDELES e cols., 1977). Desta maneira, a relação risco benefício ideal se encontra entre 10 e 20 mcg/ml no sangue, sendo esta, a faixa terapêutica aceita como ideal (WIENBERGER, 1984).

A teofilina é rápida e completamente absorvida pelo trato gastrointestinal com pico após 2 horas da administração oral da droga, quando associada à etilenodiamina (aminofilina). Uma vez absorvida, ela se distribui rapidamente para o extracelular e em pequena monta para o intracelular. Sua eliminação se dá fundamentalmente por dimetilação e oxidação. As doses orais ou intravenosas preconizadas para a manutenção da faixa terapêutica estão

entre 16 e 20 mg/kg/dia, divididas em 4 doses (aminofilina) (WEINBERGER, 1984).

Na tentativa de esclarecer os vários mecanismos de ação da teofilina nos indivíduos atópicos, muitos estudos foram publicados nos últimos 15 anos, analisando aspectos da interação da droga com células do sistema imune.

SHORE e cols. (1978), separaram duas subpopulações de linfócitos T humanos a partir do sangue periférico, baseado no efeito inibitório da teofilina sobre a formação de rosetas com eritrócitos de carneiro. Estas duas subpopulações, denominadas teofilina resistente (Tr) e teofilina sensível (Ts) na formação de rosetas, mostraram ter funções distintas na imunorregulação da síntese de anticorpos. As células Ts, mostraram atividade supressora, enquanto as células Tr, atividade estimuladora, quando a resposta foi avaliada pela técnica das células formadoras de placa (PFC).

DAMLE e GUPTA (1982), demonstraram que são as células Tr, as que proliferam e potenciam a resposta nas culturas mistas de linfócitos (MLC) de células não fracionadas. As células Ts todavia, respondem pouco tanto na reação autóloga como na alogênica da cultura mista de linfócitos (MLC) e suprimem a resposta das células Tr.

SCORDAMAGLIA e cols., (1988), em um estudo utilizando células mononucleares do sangue periférico de adultos normais, cultivadas na presença de teofilina em concentrações dentro da faixa terapêutica, observaram uma inibição da proliferação das células T, quando estimuladas com fitohemaglutinina e pelo anticorpo monoclonal T3. Também a produção de interleucina 2 encontrou-se diminuída, quando o estímulo foi a fitohemaglutinina. Tais inibições foram dose dependentes e estritamente relacionadas à presença da droga na cultura, sugerindo que esta age nas estruturas relacionadas ao complexo T3/Ti.

Em particular no sistema fagocítico, BRYANT e SUTCLIFFE, (1971) e LACKEE, (1974), obtiveram uma diminuição na aderência de PMN de humanos e de coelhos respectivamente, quando a teofilina foi empregada na cultura. TSE e cols., (1972), observaram uma diminuição na quimiotaxia de PMN humanos com o emprego da droga "in vitro". FISHER e cols., (1980), encontraram uma redução média de 35% na quimiotaxia de MON de um grupo de atópicos, quando a teofilina foi empregada na cultura nas concentrações entre 10 e 20 mcg/ml. COX e KARNOVSKY, (1973), encontraram uma diminuição da ingestão de partículas de zimosan por PMN de cobaias, bem como uma diminuição na oxidação de [1-14C]glicose para CO₂ marcado, normalmente aumentada na fagocitose. BOURNE e cols., (1971), observaram uma diminuição da síntese de grânulos lisossomais bem como da atividade candidida de PMN humanos. KYONG e cols.,

(1982), ao estudarem um grupo de 25 pacientes, asmáticos, demonstraram uma menor capacidade bactericida de PMN sobre a cepa 502 de *S. aureus*, tanto nos pacientes como em voluntários sadios, recebendo teofilina via oral durante 3 dias, sendo tais alterações significativas quando os níveis séricos da droga eram superiores a 8mcg/ml. NIELSON e cols., (1982), utilizando PMN de adultos normais, mostraram uma inibição sobre o "burst" respiratório, bem como uma potenciação dos efeitos catecolamínicos provocados pelo isoproterenol, quando teofilina e emprofilina (não antagonista da adenosina) foram empregadas na cultura. Tais efeitos foram dose dependentes e já notados a partir de concentrações baixas (1,8 mcg/ml). Na faixa terapêutica, a inibição média do "burst" respiratório foi de 35 a 40%. NIELSON e cols., (1988), empregando teofilina em culturas de PMN humanos, na concentração de 9mcg/ml, obtiveram uma diminuição de 50% na geração de leucotrieno B4 (LTB4), de 60% na geração de metabólitos do oxigênio e aumento de 196% na concentração de AMPc intracelular. Polimorfonucleares de 8 voluntários adultos recebendo teofilina oral (nível plasmático médio de 9,4mcg/ml) durante uma semana, mostraram um aumento de 160% na concentração de AMPc intracelular e de 200%, quando o isoproterenol foi adicionado na cultura.

Em 1968, LICHTENSTEIN e MARGOLIS, apresentaram a primeira evidência experimental, que níveis

elevados de AMPc nos leucócitos resultariam na inibição da liberação de histamina de basófilos, quando estimulados por antígenos, num modelo "in vitro" de hipersensibilidade imediata.

Quando basófilos e mastócitos humanos foram expostos a agentes beta-adrenérgicos, prostaglandinas E e à enterotoxina da cólera (que se liga à uma subunidade da adenilato-ciclase), as concentrações de AMPc intracelulares aumentavam rapidamente e se correlacionavam com a redução da liberação de histamina e substância lenta da anafilaxia ("SRS-A") (BROCKLEHURST, 1955; _____, 1960; BOURNE e cols., 1971; BOURNE e cols., 1972; ASSEM e SCHILD, 1969 e ISHIZAKA e cols., 1971).

A resposta imune mediada por células, também são inibidas por agentes que aumentam o "turnover" de AMPc (beta-adrenérgicos e prostaglandina E), influenciando na resposta citotóxica por interferir com a célula T "killer" (LICHTENSTEIN e cols., 1973; HENNEY e cols., 1972 e WOLBERG e cols., 1975). Também a síntese de anticorpos em culturas mistas de linfócitos, se encontra significativamente diminuída em condições experimentais similares (MELMON e cols., 1974).

A interação entre um ligante (hormônio, nucleosídeo ou mediador da inflamação) e o receptor estimulador da adenilato-ciclase (Rs), induz a ativação da ciclase, hidrólise do ATP, e aumento do "turnover" celular

de AMPc (SCHULTZ e cols., 1988). O complexo receptor-adenilatociclase consiste de três componentes: o receptor, as proteínas G e a subunidade catalítica (GILMAN, 1987 - revisão).

As proteínas G são uma família de proteínas de membrana, que ligam guanina nucleotídeo e promovem a transdução dos sinais do receptor à enzima efetora. Estas proteínas, também regulam o "turnover" de AMPc, inibindo ou estimulando a atividade da adenilatociclase (CASEY e cols., 1988 - revisão).

O catabolismo do AMPc é mediado pela fosfodiesterase AMPc-dependente. Os receptores intracelulares de AMPc são duas isoenzimas (proteínaquinase AMPc-dependente) com duas subunidades catalíticas (C) idênticas de 40 kDa, mas que diferem em suas subunidades regulatórias (R). Estas isoenzimas, denominadas proteínas-quinases A são de dois tipos, I e II. São compostas de duas subunidades regulatórias: RI (48 kDa) e RII(54 kDa) respectivamente, com propriedades físicoquímicas distintas. Ambas isoenzimas são ativadas através da ligação do AMPc às subunidades R, resultando na dissociação da holoenzima para um complexo de duas subunidades R e AMPc, e para duas subunidades C ativas (KREBS e BEAVO, 1979; FLOCKHART e CORBIN, 1981 e LOHMAN e WALTER, 1984).

Os dois mecanismos conhecidos, pelos quais o AMPc realiza seus efeitos fisiológicos, são: (A)

fosforilação dos resíduos de hidróxi-aminoácidos pelas subunidades catalíticas livres e (B) transporte do AMPc pelas subunidades RI e RII ao núcleo da célula, onde acredita-se que o complexo R-AMPc ligue-se ao DNA e altere a transcrição gênica, ou ainda no citoplasma onde o complexo possa alterar eventos pós-transcripcionais. As subunidades catalíticas, também foram identificadas no núcleo de algumas células. Postula-se portanto, que estas possam regular a expressão gênica (KREBS e BEAVO, 1979).

Levando em consideração o conjunto dessas informações, sugeriu-se que o AMPc inibiria, ou regularia para menos as fases de amplificação e efetora da resposta imune, servindo para proteger o indivíduo dos efeitos deletérios de uma resposta desregulada. Desta maneira, a via adenilatociclase-AMPc-proteínaquinase A, funcionaria como um sinal de "desligar" na resposta imunológica (KAMMER, 1989 - revisão).

Como vimos, apesar do uso comum da teofilina no tratamento da asma brônquica, nem seus mecanismos bioquímicos, nem os sítios teciduais de ação da droga estão bem compreendidos. Tão pouco, estão compreendidos os aspectos da imunorregulação, que potencialmente levam os atópicos a uma maior susceptibilidade às infecções.

É muito provável que a teofilina e seus efeitos sobre as células do sistema imune, tenha especial importância na reação tardia da asma, visto que é nesta fase que ocorre maior atividade quimiotática sérica dos neutrófilos (NAGY e cols., 1982), maior infiltração pulmonar por PMN (MARSH e cols., 1985) e maior ativação dos fagócitos (NIEJENS e cols., 1985).

Na tentativa de contribuir para a compreensão de tais problemas, nosso trabalho tem como objetivos:

GERAIS: avaliar alguns aspectos da resposta imune em crianças asmáticas crônicas, com destaque para a migração dos fagócitos, mediante uso terapêutico ou não de teofilina e verificar se nesta avaliação, é possível discriminar os fatores de risco que levam à maior susceptibilidade às infecções, bem como se a teofilina em dose terapêutica, influencia nos resultados.

ESPECÍFICOS:

(A) Comparar os valores da migração espontânea e estimulada de PMN E MON do sangue periférico "in vitro" durante e após o uso terapêutico de teofilina.

(B) Correlacionar os valores de migração dos fagócitos com os níveis séricos de teofilina, de AMPc e de IgE.

(C) Verificar se os níveis séricos das imunoglobulinas IgA, IgG, IgM e IgE; das frações C3, C4 e atividade CH50 do complemento; de AMPc; de teofilina; os valores da migração de PMN e MON "in vitro" e a contagem dos leucócitos totais do sangue periférico, possibilitam discriminar dentre as crianças portadoras de asma crônica, aquelas de maior susceptibilidade às infecções.

MATERIAL

E

MÉTODOS .

2.1 PROTOCOLO DE INVESTIGAÇÃO CLÍNICA.

Foram estudadas 30 crianças portadoras de asma crônica, ou asma grau IV segundo critério de KRAEPELIEN e cols., (1958) modificado por RIBEIRO, (1987). Todas frequentaram regularmente o Ambulatório de Imunologia, Alergia e Pneumologia do Departamento de Pediatria da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, acompanhadas de seus pais ou responsáveis, os quais receberam explicações sobre a natureza e os objetivos do estudo em questão, realizado somente com o seu consentimento.

O autor responsabilizou-se pela primeira consulta e acompanhamento clínico dos doentes durante 18 meses, dando ênfase especial na identificação das seguintes variáveis clínicas:

1-Referentes ao Diagnóstico de Asma Brônquica :

-Idade de início e agravo da doença

-Fatores desencadeadores das crises asmáticas: inalantes, "stress" emocional, exercício, variação climática, infecções e outros.

-Concomitância entre asma e: rinite alérgica, urticária, eczema, alergia alimentar, estrófulo e angioedema.

2-Referentes ao Diagnóstico de Infecções Recorrentes do Trato Respiratório:

-Idade de início.

-Localização: seios da face, ouvido médio, faringe, amígdalas, laringe, brônquios e pulmões.

3-Referentes a Alterações Anatômicas Pulmonares como: bronquiectasias, atelectasias e enfizema.

4-Início da Imunoterapia para Antígenos Inalantes.

5-Referentes ao Diagnóstico de Outras Doenças Concomitantes.

2.2 PROTOCOLO DE INVESTIGAÇÃO LABORATORIAL.

A investigação laboratorial foi realizada em duas fases: inicialmente o paciente foi orientado a usar somente teofilina de liberação rápida, via oral, na dose de 5mg por kilo de peso corporal a cada 6 horas, durante 10 dias. Decorrido este prazo, coletou-se sangue por punção de veia periférica, 2 horas após a última dose de teofilina, para a realização dos seguintes exames:

(A): Dosagem dos níveis séricos das frações C3 e C4 e da atividade CH50 do complemento.

(B): Dosagem dos níveis séricos das imunoglobulinas: IgA, IgM, IgG e IgE.

(C): Dosagem dos níveis séricos de teofilina.

(D): Dosagem dos níveis plasmáticos de AMP cíclico.

(E): contagem dos leucócitos totais.

(F): quimiotaxia dos PMN e MON.

Após esta avaliação inicial, o paciente foi acompanhado pelo autor e por uma equipe multidisciplinar, até que apresentasse melhora clínica, que o permitisse permanecer sem usar qualquer droga

broncodilatadora, por um período mínimo de uma semana, quando nova amostra de sangue foi coletada para a determinação da quimiotaxia dos PMN e MDN, dosagem sérica de teofilina, dosagem plasmática de AMP cíclico e contagem dos leucócitos totais.

Para ser incluído no grupo de estudo, o paciente não poderia se encontrar em vigência de processo infeccioso agudo, não estar usando drogas anti-inflamatórias e nem ter recebido transfusão de sangue ou hemoderivados, nos 30 dias precedentes ao início da investigação.

2.2.1 DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS SÉRICOS DO COMPLEMENTO TOTAL (CH50).

Foi empregada a técnica de KABAT e MAYER, (1961).

2.2.1.1 AMOSTRA DE SORO HUMANO.

Foram utilizados tubos Vacutainer simples para coleta individualizada de sangue, por punção asséptica de veia periférica. A seguir, os tubos foram transportados em banho de gelo até o laboratório, onde foram deixados em temperatura ambiente por 30 min para a retração do coágulo. Foram centrifugados a 200 x g durante 10 min., a 2 graus centígrados, sendo coletado o soro sobrenadante, o qual foi imediatamente estocado a menos 70 graus centígrados, até o momento da titulação.

2.2.1.2 PREPARO DE SOLUÇÃO SALINA TAMPONADA COM BARBITAL.

A solução salina tamponada com barbital (SSB) 0,15M pH 7,4 foi preparada no Laboratório de Imunopatologia do Departamento de Patologia Clínica da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, a partir de uma solução 5 x concentrada composta de:

ácido dietil barbitúrico- 1,4375 g

barbital sódico- 0,9375 g

MgCl ₂ -6 H ₂ O-	0,2541 g
CaCl ₂ -	0,0415 g
NaCl-	21,25 g
água destilada- qsp	500 ml

Todos sais empregados, foram fornecidos pela Sigma Chemical CO., Saint Louis, EUA.

2.2.1.3 PADRONIZAÇÃO DO SISTEMA HEMOLÍTICO.

Hemácias de carneiro conservadas em solução de Alsever estéril a 4 graus centígrados, foram lavadas 4 vezes em SSB 0,15 M, pH 7.4 e ressuspendidas para 4% em SSB. A suspensão de hemácias foi padronizada segundo uma densidade óptica de 0,5 +/- 0,02, em um comprimento de onda de 545nm de um espectrofotômetro Spectronic 21 Baush Lomb, usando cubetas cilíndricas medindo 10 x 150 mm.

Hemolisina de coelho anti hemácia de carneiro CECDN, foi diluída em SSB para um título de 1/200 e a partir desta solução mãe, seriadamente de 1/2000 até 1/512000. A uma mistura de 0,3 ml de cada diluição de hemolisina com 0,3 ml de hemácias padronizadas, incubada durante 10 min em temperatura ambiente com agitação ocasional, foi acrescentado 0,9 ml de pool de soros humanos diluído a 1/100 com SSB. A esta última mistura, após incubação durante 30 min a 37 graus centígrados sob

agitação, foi acrescentado 1,5 ml de SSB gelada, centrifugada a 200 x g durante 5 min, e lida a densidade óptica do sobrenadante em um comprimento de onda de 545 nm, contra um tubo branco, constituído de 0,3 ml de hemácias padronizadas e 2,7 ml de SSB e um tubo hemólise total, constituído de 0,3 ml de hemácias padronizadas e 2,7 ml de água destilada. A dose ótima de hemolisina, foi aquela capaz de dar o máximo de hemólise com a menor quantidade.

2.2.1.4 TITULAÇÃO DO COMPLEMENTO.

A titulação do complemento no soro dos pacientes foi feita em triplicata, misturando-se 0,6ml do sistema hemolítico (hemácias padronizadas ligadas à hemolisina em dose ótima), 0,45 ml de SSB gelada e 0,45 ml de cada diluição da amostra em SSB. O tubo branco, consistiu de 0,9 ml de SSB e 0,6 ml do sistema hemolítico e o tubo hemólise total, de 0,9 ml de água destilada e 0,6 ml do sistema hemolítico. Os tubos foram incubados durante 30 min, a 37 graus centígrados, com agitação aos 15 min. A seguir, foram acrescentados 1,5 ml de SSB gelada em todos tubos, sendo submetidos a centrifugação a 200 x g por 5 min e leitura da densidade óptica, em um comprimento de onda de 545 nm, contra o branco, e calculados os valores proporcionais.

Os valores de referência, foram aqueles encontrados por NORMAN e col., (1975), estudando crianças norte-americanas normais, pareadas por sexo, idade e raça.

2.2.2 DETERMINAÇÃO DO NÍVEIS SÉRICOS DAS FRAÇÕES C3c E C4 DO COMPLEMENTO .

Foi utilizada a técnica de imunodifusão radial (MANCINI e cols., 1965) para a determinação dos níveis séricos das frações C3c e C4 do complemento, usando placas de imunodifusão "Nor- Partigen C4" e "Nor-Partigen C3c" (Behringwerk A.G., Marburg, R.F.A.). As amostras de soro foram obtidas e estocadas conforme item 2.2.1.1.

Os valores de referência, foram aqueles encontrados por NORMAN e cols., (1975), estudando crianças norte-americanas sadias, pareadas por sexo, idade e raça.

2.2.3 DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS SÉRICOS DAS IMUNOGLOBULINAS IgA, IgG E IgM.

Foi utilizada a técnica de imunodifusão radial (MANCINI e cols., 1965) para determinação dos níveis séricos de IgA, IgM e IgG; usando placas de imunodifusão "Nor-Partigen" para IgA, IgM e IgG (Behringwerk A.G., Marburg, R.F.A). As amostras de soro dos pacientes foram obtidas e estocadas conforme o item 2.2.1.1 .

Os parâmetros de normalidade foram aqueles encontrados por NASPITZ e cols., (1982), estudando um grupo de crianças e adultos brasileiros saudáveis, pareados por idade e sexo.

2.2.4 DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS SÉRICOS DE IgE.

Foi empregada a técnica de enzimaímunoensaio em fase sólida, utilizando-se um Kit "ABBOTT IgE EIA" (Abbott Laboratories, Chicago, IL., E.U.A.), de acordo com técnica descrita por JOHANSSON, (1978) e YMAN, e cols., (1981).

Foram colocadas em duplicata, 50 microlitros das amostras de soro dos pacientes (obtidos e estocados conforme item 2.2.1.1), padrões e controles nos poços de reação EIA, contendo 200 microlitros de tampão fosfato. Em cada poço, foi colocada uma esfera recoberta com anticorpo de coelho anti IgE humana. As placas foram tampadas e agitadas levemente, de maneira que a mistura fosse adequadamente homogeneizada, recobrisse totalmente as esferas e não contivesse bolhas de ar. Decorrido um período de incubação de 30 min em banho maria a 37 graus centígrados, os poços foram lavados automaticamente em um aparelho "Quickwash". A seguir, em cada poço, foram adicionados 200 microlitros de anticorpo de cabra anti IgE humana, conjugado com peroxidase de rabanete, numa concentração de 0,05 microgramas/ml. As placas foram tampadas, levemente agitadas, incubadas em banho maria a 37 graus centígrados durante 30 min e novamente lavadas em água destilada. Seguiu-se a transferência das esferas para tubos de ensaio EIA, contendo 300 microlitros do substrato DPD (D-

Fenilenodiamina.2 HCl), contendo 200 microlitros de peróxido de hidrogênio. A diluição do substrato DPD em tampão citrato fosfato foi considerada adequada, quando sua absorbância em um comprimento de onda de 492 nm, fosse menor que 0,08. Os tubos EIA brancos não continham esferas. Após incubação durante 30 min em temperatura ambiente, a reação foi paralizada, adicionando-se 1 ml de ácido sulfúrico 1 N em cada tubo, seguido de agitação em vortex.

Os resultados foram lidos e automaticamente expressos em UI/ml (1 UI=2.4 ng), utilizando-se o módulo B do aparelho Quantun 11 (Abbott Laboratories). O espectro de detecção deste Kit varia de 0 a 200 UI/ml. Se os resultados ultrapassassem este valor, as amostras seriam diluídas em até 50 vezes e submetidas a novo ensaio.

Os parâmetros de normalidade foram aqueles encontrados por NYE e cols., (1975) e KJELLMAN e cols., (1976), ao estudar crianças e adolescentes norte-americanos saudáveis, pareados por idade e sexo.

2.2.5 DOSAGEM DOS NÍVEIS SÉRICOS DE TEOFILINA.

As amostras de soro foram obtidas e estocadas conforme descrito no item 2.2.1.1. Para rigor científico, a droga foi quantificada em 20 amostras na segunda fase da pesquisa, ou seja, quando os pacientes não deveriam tomá-la. Inicialmente foi utilizado o método de fluorescência polarizada para as primeiras 30 amostras, em regime de colaboração científica com "Laboratório Fleury"(SÃO PAULO-SP). Posteriormente, com a implantação do Serviço de Monitorização Terapêutica do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, as amostras restantes foram quantificadas pelo método de cromatografia líquida de alta pressão ("HPLC"). Um total de 8 amostras foram ensaiadas pelos 2 métodos, para estudo de correlação.

2.2.5.1 FLUORESCÊNCIA POLARIZADA.

Foi utilizado o método "TDx Theophylline 11" (Abbott Laboratories, Chicago, E.U.A), executado conforme instruções do fabricante . Trata-se de um ensaio competitivo idealizado por JOLLEY e cols., (1981), onde foram empregados um anticorpo monoclonal de camundongo anti teofilina, um marcador consistindo de teofilina covalentemente ligada à fluoresceína e a amostra de soro do paciente. A teofilina presente nas amostras de soro dos pacientes, compete pelos sítios de ligação do anticorpo

deslocando o marcador, o qual exibe fluorescência polarizada muito menor, quando não ligado. O método é direto, dispensando procedimentos de extração e com leitura e cálculo automático dos resultados.

2.2.5.2 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA PRESSÃO.

Foi utilizado o método descrito por WEIDNER, (1980) e OU e cols., (1982).

2.2.5.2.1 CONDIÇÕES DE CROMATOGRAFIA.

Foi empregada uma coluna "Merck Lichrosorb RP 18", 10 U, 250 x 9 mm. A velocidade de fluxo do cromatógrafo foi ajustada para 1,5 ml/min e a leitura do material eluído, feita em um espectrofotômetro automático acoplado à coluna, num comprimento de onda de 273 nm, com sensibilidade de 0,1 a 0,05.

2.2.5.2.2 PREPARO DO FLUIDO ELUENTE (FASE MÓVEL).

Meio ml de ácido acético glacial foi adicionado a 500 ml de água destilada, ajustando-se o pH para 7,8 com uma solução concentrada de hidróxido de sódio. A seguir, foi inserido 0,5 ml de uma solução de tetrabutylamônio (TBA), preparada com acetato de sódio e hidróxido de tetrabutylamônio/CH₃ CN/CH₃ OH=70/15/25. O pH final foi ajustado para 4,7 com ácido acético glacial. À

essa mistura, foram adicionados 25 ml de acetonitrilo e 125 ml de metanol, sendo a seguir sonicada por 10 min, para a remoção de bolhas de ar.

2.2.5.2.3 PREPARO DOS PADRÕES.

Foi misturado a um pool de soro humano, várias diluições de uma solução concentrada, contendo 80 mg de teofilina para cada 100 ml de água destilada, obtendo-se alíquotas de 300 microl de padrões, nas concentrações de 0; 2,5; 5,0; 10; 20 e 40 microg/ml. Os padrões foram estocados a menos 20 graus centígrados, até o momento do uso.

2.2.5.2.4 PREPARO DO PADRÃO INTERNO.

Cem mg de beta-OH-propil-teofilina foram dissolvidos em 100 ml de metanol e estocadas a 4 graus centígrados. No momento da análise, esta mistura foi diluída 10 vezes em água destilada.

2.2.5.2.5 PROCEDIMENTO.

Foram misturados em tubos de vidro: 150 microl da amostra ou padrões, 50 microl do padrão interno diluído e 500 microl de acetonitrilo. Após agitação em vortex, os tubos foram centrifugados a 600 x g por 10 min. Quinhentos microl do sobrenadante foram transferidos para tubos de vidro limpos e secos e submetidos a processo de secagem através de um jato de nitrogênio. O resíduo seco, foi reconstituído com 100 microl do fluido eluente e

injetados num volume de 20 microl no cromatógrafo. Não foi realizado ensaio de recuperação após o procedimento de extração, pois em todas leituras foi utilizado o mesmo padrão interno. Os resultados foram calculados comparando-se o registro gráfico automático das amostras em relação aos dos padrões.

2.2.6 DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS PLASMÁTICOS DE AMP CÍCLICO.

2.2.6.1 OBTENÇÃO DO PLASMA.

As amostras de sangue dos pacientes foram coletadas em tubos Vacutainer contendo 4mM de tetracetato de etileno diamina (EDTA) e transportados em banho de gelo até o laboratório. O plasma sobrenadante foi coletado após centrifugação imediata a 200 x g durante 10 min a 2 graus centígrados e estocado a menos 70 graus centígrados até o momento da dosagem.

2.2.6.2 DOSAGEM DO AMP CÍCLICO.

Foi empregada a técnica de cintilação líquida, utilizando um Kit "Amersham TKR 432", para determinação plasmática direta do AMP cíclico (TOVEY e cols., 1974). Cinquenta microlitros das amostras e dos padrões em duplicata foram inseridos em tubos de vidro, seguidos de 50 microl de AMP cíclico triciado e de 100 microl da proteína ligadora reconstituídos conforme instruções do fabricante. Os controles foram: carvão branco consistindo de 150 microl de tampão tris/EDTA 0,05 M, pH 7,5 e 50 microl de AMP cíclico triciado; e zero dose constituído de 50 microl de tampão tris/EDTA, 50 microl de AMP cíclico triciado e 100 microl de proteína ligadora. Após agitação em vortex, os tubos foram incubados em repouso a 2 graus centígrados por 2 horas.

Decorrido este período, foram adicionados 100 microl de uma suspensão gelada de carvão, reconstituída conforme instruções do fabricante. A mistura foi agitada em vortex e centrifugada a 2000 x g durante 10 min a 2 graus centígrados. Sem perturbar o sedimento de carvão, foram coletadas alíquotas de 200 microl do sobrenadante de cada tubo e adicionados individualmente a 4,5 ml de uma solução cintiladora, padronizada para cada litro com: Tolueno 700 ml, Triton X 100 300ml, PPO 8g e POPOP 100 mg. Esta última mistura foi inserida em frascos fechados apropriados, agitados ligeiramente e colocados em poços individuais de um contador beta , calibrado para um tempo de leitura de 5 min por frasco. Os resultados expressos em picomoles, foram automaticamente calculados, a partir dos valores cpm contados das amostras, frente aos da curva padrão e dos controles, utilizando-se um programa de computador. O sensibilidade do Kit utilizado foi de 4 a 320 pmol/ml.

2.2.7 CONTAGEM DOS LEUCÓCITOS TOTAIS.

Realizado conforme padronização da
Sociedade Brasileira de Hematologia, 1975.

2.2.8 QUIMIOTAXIA.

2.2.8.1 PREPARO DE SOLUÇÃO SALINA BALANCEADA DE HANKS.

Preparada a partir de uma solução estoque 10 vezes concentrada (OLIVEIRA LIMA e DIAS DA SILVA, 1970) de acordo com a fórmula abaixo e esterelizada por filtração em membrana Millipore.

Solução A: NaCl 80g, KCl 4g, CaCl₂ 1,4g, MgSO₄ 7H₂O 2g, água destilada 400 ml.

Solução B: Na₂HPO₄ 12H₂O 1,52g, KH₂PO₄ 0,6g, glicose 10g, vermelho de fenol 1% 16ml, água destilada 400 ml.

As soluções A e B foram misturadas sob agitação e o volume completado para um litro. No momento do uso, esta solução foi diluída 1:10 em água destilada, tamponada pela adição de 1,25 ml de NaHCO₃ a 2,8% e armazenada de modo estéril a 5 graus centígrados. Todos os sais empregados foram fabricados pela Merck SA Indústrias Químicas RJ Brasil.

2.2.8.2 GRADIENTE DE FICOLL-HYPAQUE.

Misturou-se 120ml de Hypaque a 50% com 36,4g de FICOLL, previamente diluídos em 480 ml de água destilada. A densidade específica deste gradiente é de 1076 g/ml. Para esterilização, utilizou-se vapor fluente a 120

graus centígrados durante 30 minutos, sendo a seguir, armazenado de forma estéril em alíquotas de 5ml a 4 graus centígrados, protegido da luz.

2.2.8.3 OBTENÇÃO DE LEUCÓCITOS MONONUCLEARES.

Foi utilizado o método de BOYUM, (1968). O sangue, após coleta asséptica com heparina (aproximadamente 100 U de heparina por ml de sangue), foi deixado sedimentar em temperatura ambiente por 1 hora. O plasma rico em leucócitos, juntamente com a porção superior da coluna de hemácias, foram centrifugados em tubos siliconizados por 10 min a 200 x g e o botão, em seguida, ressuspenso em 2 ml de HBSS. Esta suspensão foi colocada sobre um gradiente de Ficoll-Hypaque com densidade de 1076 em um tubo cônico siliconizado, e centrifugada a 250 x g por 30 min (para separação dos leucócitos mono e polimorfonucleares). Os leucócitos mononucleares foram cuidadosamente removidos da porção superior do gradiente, lavados 3 vezes em HBSS e ressuspenso para uma concentração de 2×10^6 células/ml. Vinte a 40% destas células eram monócitos, tendo-se observado 2 a 3% de contaminação com PMN.

2.2.8.4 OBTENÇÃO DE LEUCÓCITOS POLIMORFONUCLEARES.

Foi utilizado o método de BOYUM, (1968). O sangue, colhido do mesmo modo do item 2.4.3, foi deixado sedimentar em temperatura ambiente por 1 hora. O plasma rico em leucócitos, foi transferido para um tubo de vidro simples, centrifugado a 200 x g por 10 minutos sendo o botão em seguida, lavado 3 vezes em HBSS e ressuspendido para uma concentração de 2×10^6 cel/ml.

2.2.8.5 OBTENÇÃO DO FATOR QUIMIOTÁTICO.

"Pool" de soros de adultos sadios e individualmente os soros dos pacientes, foram incubados isoladamente durante 30 min a 37 graus centígrados, com um lipopolissacáride de E. coli (026:B6) (LPS), preparado por VILELA, (1985), conforme método de WESTPHAL, (1965), em uma concentração de 100 microgr/ml em HBSS sendo utilizados na geração de fatores quimiotáticos para MON e PMN (10% de soro na diluição final).

2.2.8.6 ENSAIO QUIMIOTÁTICO.

O método utilizado, constitui uma adaptação da técnica de BOYDEN, (1962). No compartimento inferior da câmara de quimiotaxia (câmara de BOYDEN modificada), colocou-se 0,2 ml do fator quimiotático (2.2.8.5) e no compartimento superior, 0,5 ml da suspensão celular de MON ou PMN, sendo os dois compartimentos

separados entre si por uma membrana de filtro de ester de celulose Millipore, com poros de 8 micra para MON e de 3 micra para PMN. Como controle, apenas solução de Hanks foi utilizada para migração espontânea.

Após incubação das câmaras durante 120 min a 37 graus centígrados em atmosfera úmida com 5% de CO₂, os filtros foram removidos, fixados em etanol absoluto, corados com hematoxilina de Harris, desidratados pela passagem em concentrações gradativamente crescentes de etanol, diafanizadas em xilol, e finalmente montados entre lâmina e lamínula com bálsamo do Canadá.

Foram feitas, em duplicatas, para MON e PMN, as seguintes combinações:

1-Migração estimulada:

-Fagócitos do paciente + soro normal com LPS;

-Fagócitos do paciente + soro do paciente com LPS;

2-Migração espontânea:

-Fagócitos do paciente + solução de Hanks.

2.2.8.7 CONTAGEM E CÁLCULO DOS RESULTADOS.

Utilizando-se a objetiva 40 x (aumento de 40 vezes) de um microscópio óptico e a variação observada no micrômetro, foi medida a distância entre a camada de células que ficou mais próxima do compartimento superior da câmara de BOYDEN, predominantemente linfocitária, até o campo onde se encontrou a última célula. O resultado expresso em micra, foi dado pela média de 20 leituras realizadas para cada membrana de filtro usada para os MON e PMN.

Os parâmetros de normalidade de quimiotaxia, foram aqueles encontrados por VILELA, (1985), em um grupo controle constituído de 67 crianças brasileiras sadias pareadas por idade, tendo sido empregada a mesma técnica laboratorial.

2.3 MÉTODOS ESTATÍSTICOS.

Foi empregado o teste t`student para dados pareados e não pareados, análise de regressão e cálculo de medianas e quartis.

2.4 MATERIAIS DE LABORATÓRIO.

- Acetato de Sódio (Merck, S.A., Indústrias Químicas, RJ).
- Acetonitrilo (Merck, S.A., Indústrias Químicas, RJ).
- Ácido Acético Glacial (Sigma Chemical CO., SL, EUA).
- Agitador de Tubos (VORTEX) Whirlimixer (Fisons Scientific Apparatus, Leicestershire, Inglaterra).
- Butanol (Merck, S.A., Indústrias Químicas, RJ).
- Câmaras de Quimiotaxia tipo Boyden modificadas.
- Carbonato de Lítio (Sigma Chemical CO., SL, EUA).
- Bomba de Alta Pressão para Cromatografia Líquida (Waters Millipore M 45 Milford, EUA).
- Cubetas Cilíndricas medindo 10 x 150 mm (Baush Lomb, EUA).
- Endotoxina Bacteriana (Lipopolissacarídeo B, E. Coli, 26 B.6).
- Eritrócitos de Carneiro.
- Espectrofotômetro Automático para Cromatografia Líquida de Alta Pressão (Spectro 8800 Dupont, EUA).
- Espectrofotômetro EIA Quantun 11 (Abbott Laboratories, Chicago, EUA).
- Espectrofotômetro Spectronic 21 (Baush Lomb, EUA).

- Etanol Absoluto (Merck, S.A., Indústrias Químicas, RJ).
- Gradiente de Ficoll-Hypaque com densidade 1076 (Ficoll 400-Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Suécia; Hypaque Products Inc., NY., EUA).
- HBSS: Solução Salina Balanceada de Hanks.
- Hematoxilina de Harris (Sigma Chemical CO., SL., EUA).
- Hemolisina de Coelho Anti Hemácias de Carneiro CECON (Centro de Produtos para Diagnósticos LTda- JUL-1990).
- Heparina (Liquemine-500 UI/ml - Roche Produtos Químicos e Farmacêuticos, RJ).
- Hidróxido de Tetrabutilamônio (Merck, S.A., Indústrias Químicas, RJ).
- Kit para determinação plasmática direta de AMP cíclico (Amersham International-cod TKR 432, Inglaterra).
- Kit para determinação sérica de IgE (enzimaimunoensaio em fase sólida) "Abbott IgE EIA" (Abbot Laboratories, Diagnostic Division, Chicago, IL., EUA).
- Lavador de placas automático "Quickwasher" (Abbott Laboratories-Diagnostic Division, Chicago, IL., EUA).
- Membranas de Filtro Millipore - SSWP (poros de 3 micra) e SCWP (poros de 8 micra), SP, Brasil.

- Microscópio óptico (Zeiss modelo ICM 405, RFA).
- Placas de Imunodifusão "Nor-Partigen" para determinação sérica de IgA, IgM, IgG, C3c e C4 (Behringwerk, AG, Marburg, RFA) lotes: 11954, 0285, 3397, 9981, 3396 e 11524 respectivamente.
- POPDP (Sigma Chemical CO, S.L., EUA).
- PPD (New England Nuclear, Boston, EUA).
- Registrador Gráfico (Bryan Southern Instruments, Ingl).
- Siliconização de vidraria: Polidimetilsiloxane 360/350 CS fluido de silicone (Dow Corning do Brasil, Ltda).
- Teofilina Anidra (Sigma Chemical CO, S.L., EUA).
- Tolueno (Merck S.A., Indústrias Químicas, RJ).
- Triton X 100 (Rohm-Haas, RFA).
- Xileno (Merck S.A., Indústrias Químicas, RJ).

RESULTADOS .

3.1 PROTOCOLO DE INVESTIGAÇÃO CLÍNICA.

Foram estudadas 30 crianças portadoras de asma crônica, ou asma grau IV, segundo critério de Kraepelien e cols., (1958), modificado por RIBEIRO, (1987). A idade dos pacientes variou de 5 a 15 anos, sendo 16 do sexo feminino, 14 do sexo masculino, 26 de cor branca, 4 de cor preta, 16 procedentes de Campinas e 14 de cidades circunvizinhas.

A análise das variáveis clínicas referentes ao diagnóstico de asma brônquica, mostrou haver concomitância entre: asma crônica e rinite alérgica em 30 pacientes (100% dos casos); entre asma, rinite alérgica e pelo menos mais uma variável em 18 pacientes (60% dos casos); e, entre asma, rinite alérgica e pelo menos mais duas variáveis em 5 pacientes (16,66% dos casos). Em 4 doentes, as crises ocorreram diariamente, desde o início da enfermidade. O quadro I, resume os resultados.

A frequência dos fatores desencadeantes das crises asmáticas, ocorreu da seguinte maneira: alergia em 30 pacientes (100% dos casos), variação climática em 28 pacientes (93,3% dos casos), infecção em 25 pacientes (83,3% dos casos), exercício em 24 pacientes (80% dos casos) e distúrbio emocional em 19 pacientes (63,3% dos casos). A concomitância destes 5 fatores desencadentes das crises asmáticas, ocorreu em 14 pacientes (46,66% dos casos) e, de

pelo menos 4 deles, em 24 pacientes (80% dos casos). O quadro II, resume os resultados.

Em 24 casos, o estudo foi feito na fase inicial de imunoterapia (primeiros 2 meses); em dois casos (12 e 1), na fase final (entre 30 e 36 meses de tratamento); e em 4 casos (4, 15, 2 e 24), após o término do tratamento (3anos).

A análise das variáveis clínicas referentes ao diagnóstico de infecções recorrentes do trato respiratório, mostrou que 17 pacientes (56,6% dos casos), eram portadores de pneumonias de repetição, cujo início coincidiu com os sintomas da asma brônquica. A concomitância entre asma, pneumonias e pelo menos mais um local de infecção no trato respiratório superior, ocorreu em 12 pacientes (40% dos casos). O quadro III, resume os resultados.

Houve 2 casos de enfizema pulmonar (26 e 5) e um caso de atelectasia e bronquiectasia de lobo médio direito (23).

A concomitância de outros diagnósticos, ocorreu da seguinte maneira: enxaqueca (caso 12), desnutrição de primeiro grau (casos 13 e 26), litíase renal (caso 26), obesidade exógena (caso 19), neurose infantil (casos 20, 10, 15 e 29), encoprese (caso 10), surdez neuro sensorial (caso 14), convulsão parcial simples (caso 2),

anemia ferropriva (casos 7, 13 e 16), deficiência de IgA (caso 18), craniosinostose e retardo mental discreto (caso 27).

QUADRO I

VARIÁVEIS CLÍNICAS REFERENTES AO
DIAGNÓSTICO DE ASMA BRÔNQUICA.

PACIENTES	ASMA	RINITE	CONJUNTIVITE	URTICÁRIA
AABA -1	X	X		X
CMR -2	X	X		
RC -3	X	X		X
VCS -4	X	X		
PES -5	X	X		
ACL -6	X	X		
TML -7	X	X		
SAB -8	X	X	X	
ES -9	X	X		X
ECM -10	X	X	X	
RMS -11	X	X		
POA -12	X	X		
RRL -13	X	X	X	X
ESB -14	X	X		
AHS -15	X	X		
EMO -16	X	X		
ELSM -17	X	X	X	
FHR -18	X	X	X	
MCER -19	X	X	X	X
EAM -20	X	X		
CBA -21	X	X		
MCB -22	X	X		X
MRP -23	X	X		X
PRZ -24	X	X		
RCR -25	X	X		
AMA -26	X	X		
TCG -27	X	X		
ZP -28	X	X	X	
PMV -29	X	X	X	
AM -30	X	X		

QUADRO I

VARIÁVEIS CLÍNICAS REFERENTES AO
DIAGNÓSTICO DE ASMA BRÔNQUICA

PACIENTES	ECZEMA (ALERGIA ALIMENTAR)	ESTRÓFULO	ANGIOEDEMA
1		X	
2			
3			
4			
5			
6			
7			
8			
9	X		
10			
11			
12	X		
13			X
14			
15		X	
16	X		
17			
18			
19	X		
20		X	
21	X		
22			
23			
24			
25			
26			
27			
28			
29			
30			

QUADRO II

FATORES DESENCADEANTES DA CRISE ASMÁTICA

PACIENTES	ALERGIA INAL.	MUDANÇA CLIMÁTICA	INFECÇÃO RESPIR.	EXERCÍCIO FÍSICO	STRESS EMOCIONAL
AABA -1	X	X	X		X
CMR -2	X	X	X	X	X
RC -3	X	X	X	X	
VCS -4	X	X			
PES -5	X		X	X	
ACL -6	X	X	X		X
TML -7	X	X		X	
SAB -8	X	X	X	X	
ES -9	X	X	X	X	X
ECM -10	X	X	X	X	X
RMS -11	X	X	X		X
PDA -12	X	X	X	X	X
RRL -13	X		X	X	X
ESB -14	X	X	X		X
AHS -15	X	X	X		X
EMD -16	X	X		X	
ELSM -17	X	X	X	X	
FHR -18	X	X	X	X	X
MCER -19	X	X	X	X	X
EAM -20	X	X	X	X	X
CBA -21	X	X		X	
MCB -22	X	X	X	X	
MRP -23	X	X	X	X	X
PRZ -24	X	X	X	X	X
RCR -25	X	X		X	
AMA -26	X	X	X		X
TCG -27	X	X	X	X	X
ZP -28	X	X	X	X	X
PMV -29	X	X	X	X	X
AM -30	X	X	X	X	X

QUADRO III

INFECÇÕES RECORRENTES DO TRATO RESPIRATÓRIO

PACIENTES	PNEUMONIA	OTITE MÉDIA	SINUSITE	FARINGOAMIGDALITE
AABA-1				
CMR -2				
RC -3				
VCS -4				
RES -5	X			X
ACL -6	X		X	
TML -7				
SAB -8	X			
ES -9	X		X	
ECM -10				
RMS -11				
POA -12				
RRL -13				
ESB -14	X		X	
AHS -15	X	X	X	
EMO -16				
ELSM-17	X		X	
FHR -18	X		X	
MCER-19	X	X	X	
EAM -20	X		X	
CBA -21	X			
MCB -22	X			
MRP -23				
PRZ -24	X			
RGR -25				
AMA -26	X		X	
TCG -27				
ZP -28	X			
PMV -29	X	X	X	
AM -30	X	X	X	X

3.2 PROTOCOLO DE INVESTIGAÇÃO LABORATORIAL.

3.2.1. NÍVEIS SÉRICOS DO COMPLEMENTO.

Nas figuras 1, 2 e 3; são apresentados respectivamente, os valores de CH50 e das frações C3 e C4 do complemento sérico, bem como as faixas de normalidade para idade e sexo. Houve 2 casos, nos quais os níveis de CH50 estavam abaixo do primeiro desvio padrão de normalidade, sendo a média do grupo de pacientes coincidente com a da população normal. Observou-se 2 casos, nos quais os níveis séricos de C3, estavam abaixo do primeiro desvio padrão de normalidade e um caso no qual os nível de C4, estava acima do primeiro desvio padrão de normalidade. Não houve diferença significativa, ao se comparar os níveis séricos do complemento, entre os pacientes portadores ou não de infecções recorrentes do trato respiratório (CH50= 0,40(p<0,50; C3=0,40(p<0,50 e C4= 0,80(p<0,90).

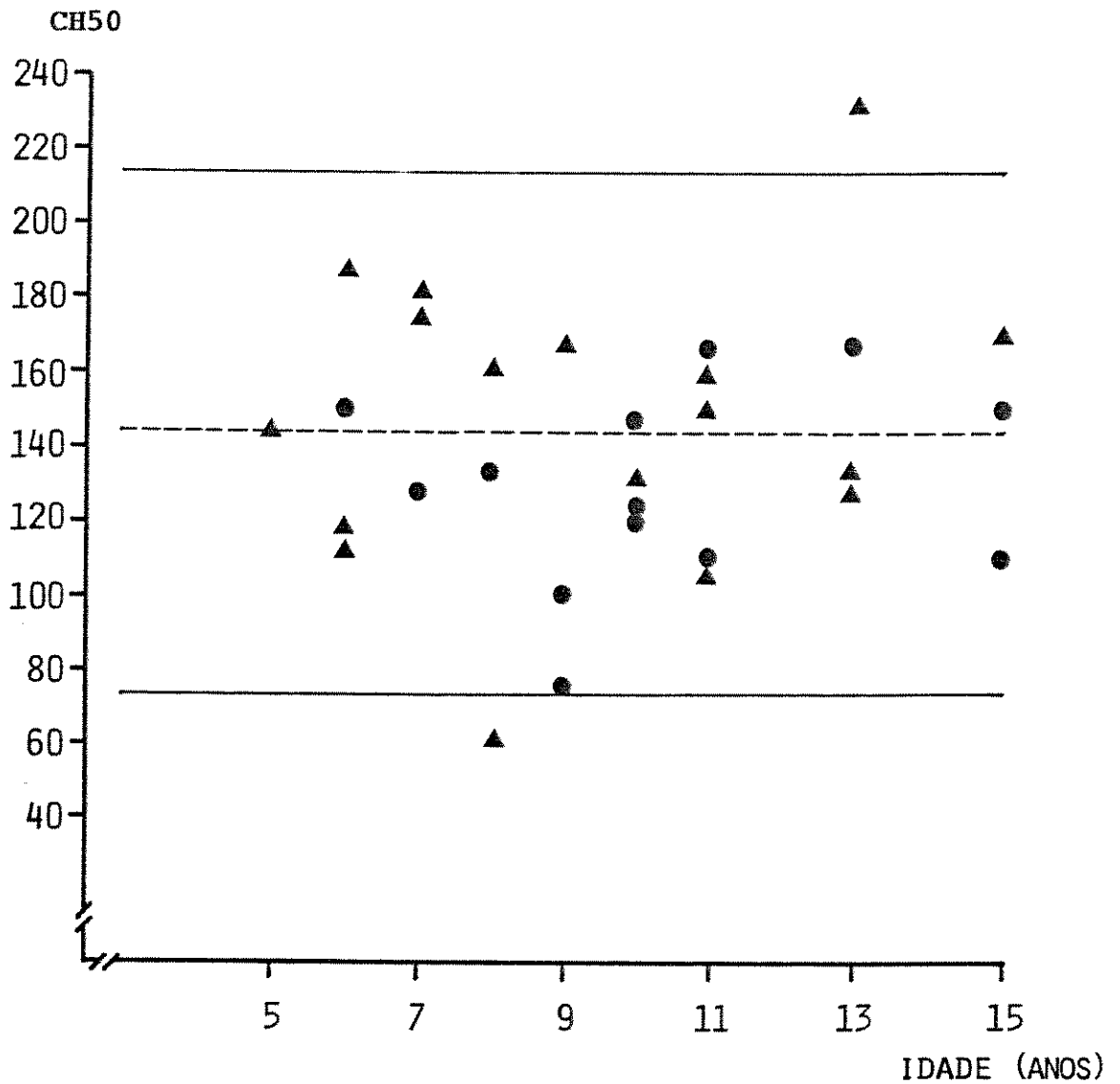


FIGURA 1 - Níveis séricos de complemento (CH50) em crianças com asma crônica em relação aos valores médios (tracejado), mínimo e máximo (linha cheia-P(N) 0,95) de CH50 em crianças normais. ▲-presença e ●-ausência de infecções recorrente do trato respiratório.

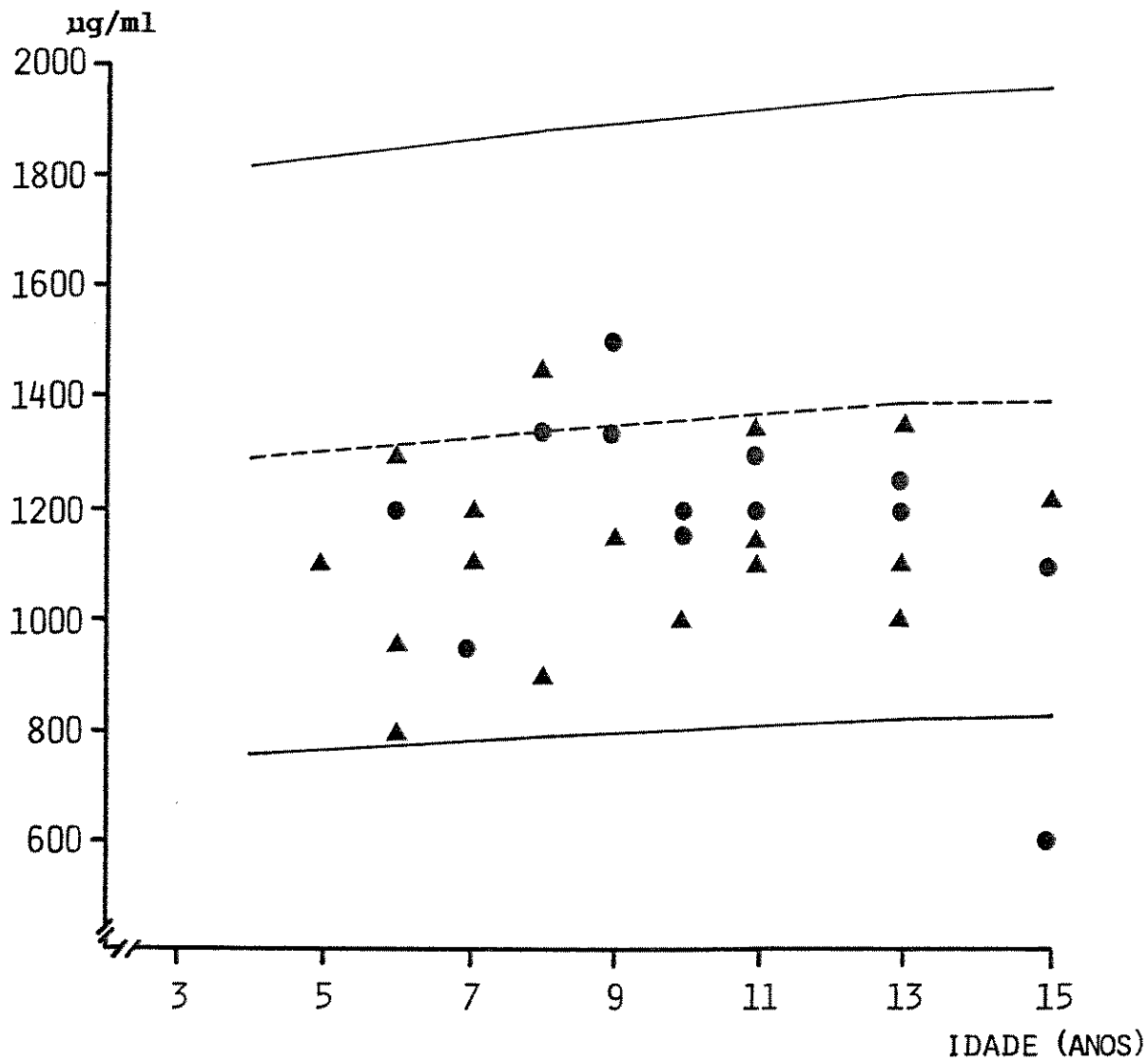


FIGURA 2 - Níveis sêricos de C₃ em crianças com asma crônica em relação aos valores médios (traçado), mínimo e máximo (linha cheia-P(N) 0,95) de C₃ em crianças normais. ▲-presença e ●-ausência de infecções recorrentes do trato respiratório.

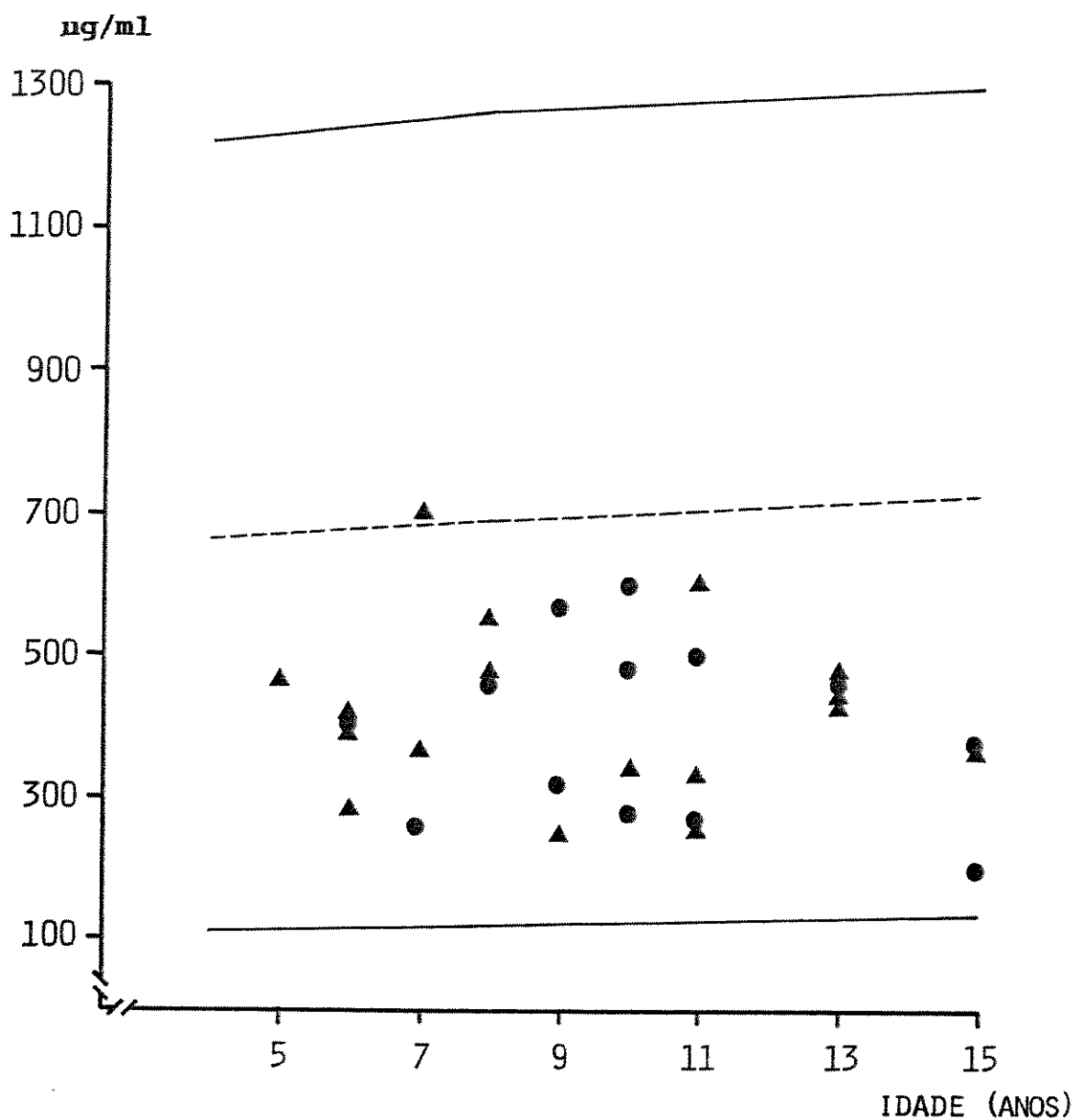


FIGURA 3 - Níveis séricos de C_4 em crianças com asma crônica em relação aos valores médios (traçado), mínimo e máximo (linha cheia - P(N) 0,95) de C_4 em crianças normais. ▲ - presença e ● - ausência de infecções recorrente do trato respiratório.

3.2.2 NÍVEIS SÉRICOS DE IMUNOGLOBULINAS.

Nas figuras 4, 5, 6 e 7 são apresentados respectivamente os valores de IgM, IgG, IgA e IgE dos pacientes, bem como as faixas de normalidade para a idade. Houve 28 casos, nos quais os níveis de IgM estavam acima do primeiro desvio padrão de normalidade, 5 casos nos quais os níveis de IgG estavam acima do primeiro desvio padrão de normalidade, 1 caso de ausência de IgA e 27 casos nos quais os níveis de IgE, estavam acima do primeiro desvio padrão de normalidade.

Não houve diferença significativa, ao se comparar os níveis séricos de imunoglobulinas entre os pacientes portadores ou não de infecções recorrentes do trato respiratório: IgM ($0,10 < p < 0,20$), IgG ($0,70 < p < 0,80$), IgA ($0,80 < p < 0,90$) e IgE ($0,40 < p < 0,50$). Não houve correlação entre os valores da migração de PMN ou MON e os níveis de IgE, em qualquer uma das situações descritas nos itens 3.2.1 e 3.2.2 .

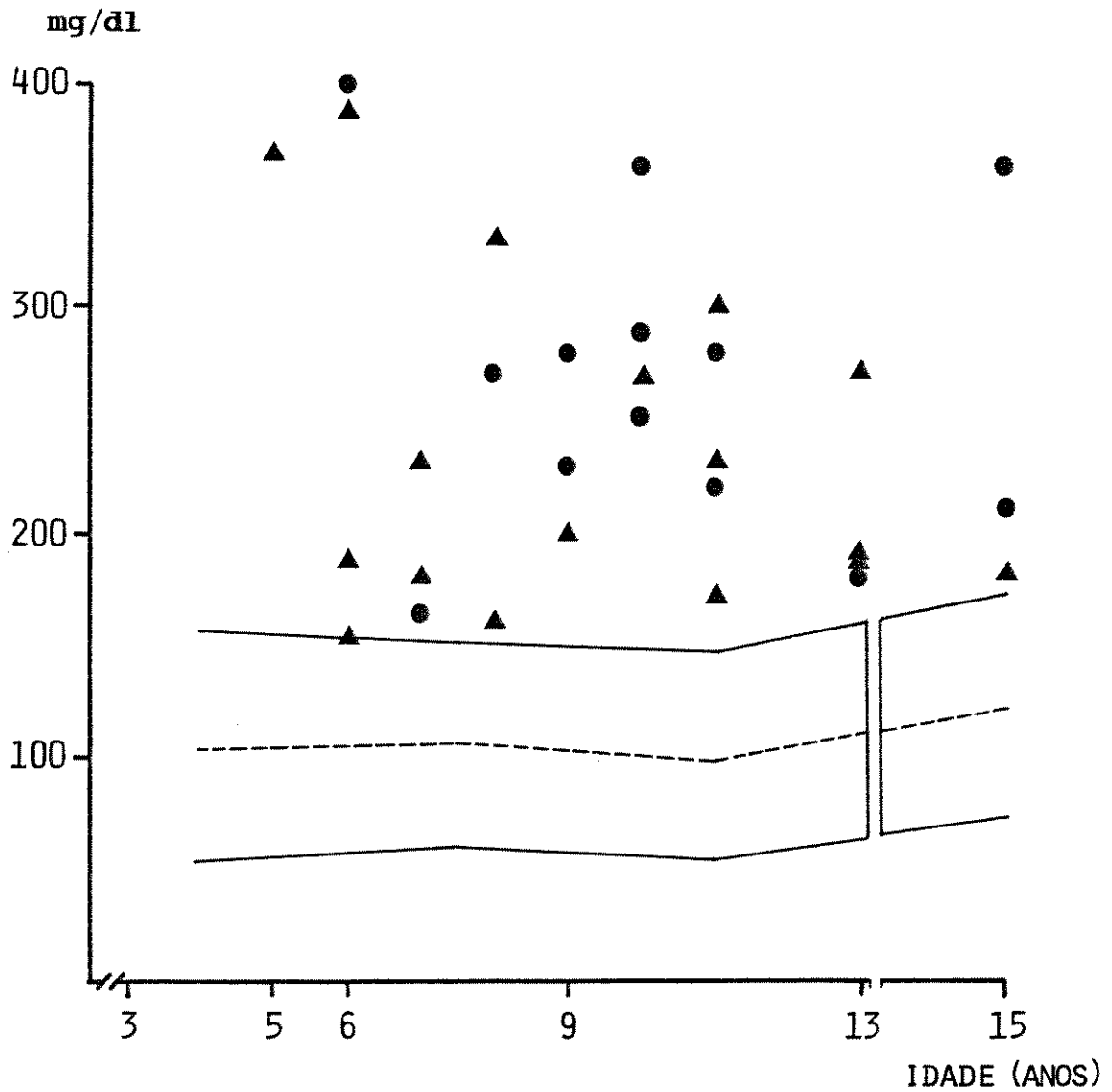


FIGURA 4 - Níveis séricos de IgM em crianças com asma crônica em relação aos valores médios (tracejado) \pm IDP (linha cheia) de crianças normais. ▲ - presença e ● - ausência de infecções recorrentes do trato respiratório.

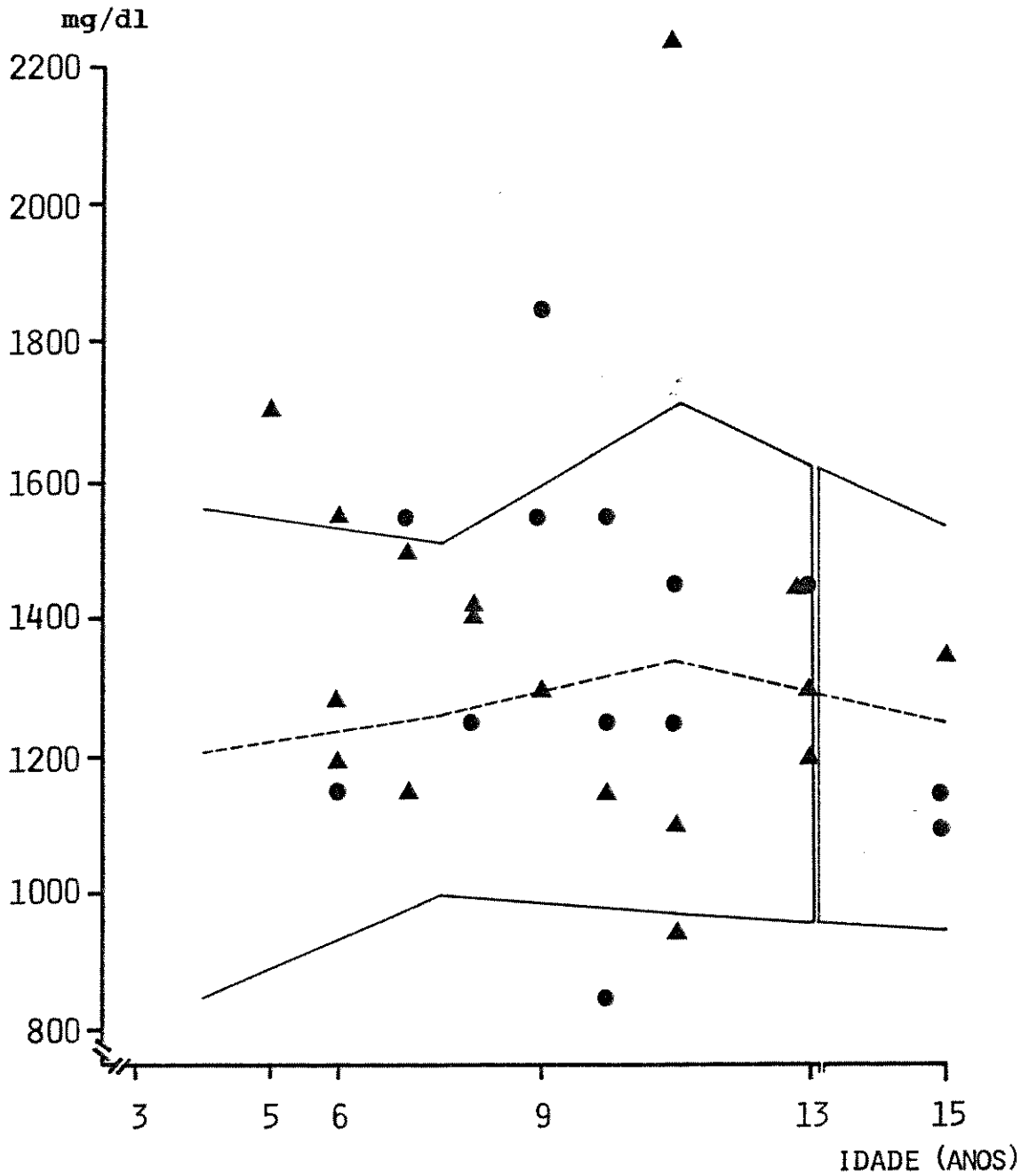


FIGURA 5 - Níveis séricos de IgG em crianças com asma crônica em relação aos valores - médios (tracejado) \pm IDP (linha cheia) de crianças normais. ▲-presença e ●-ausência de infecções recorrentes do trato respiratório.

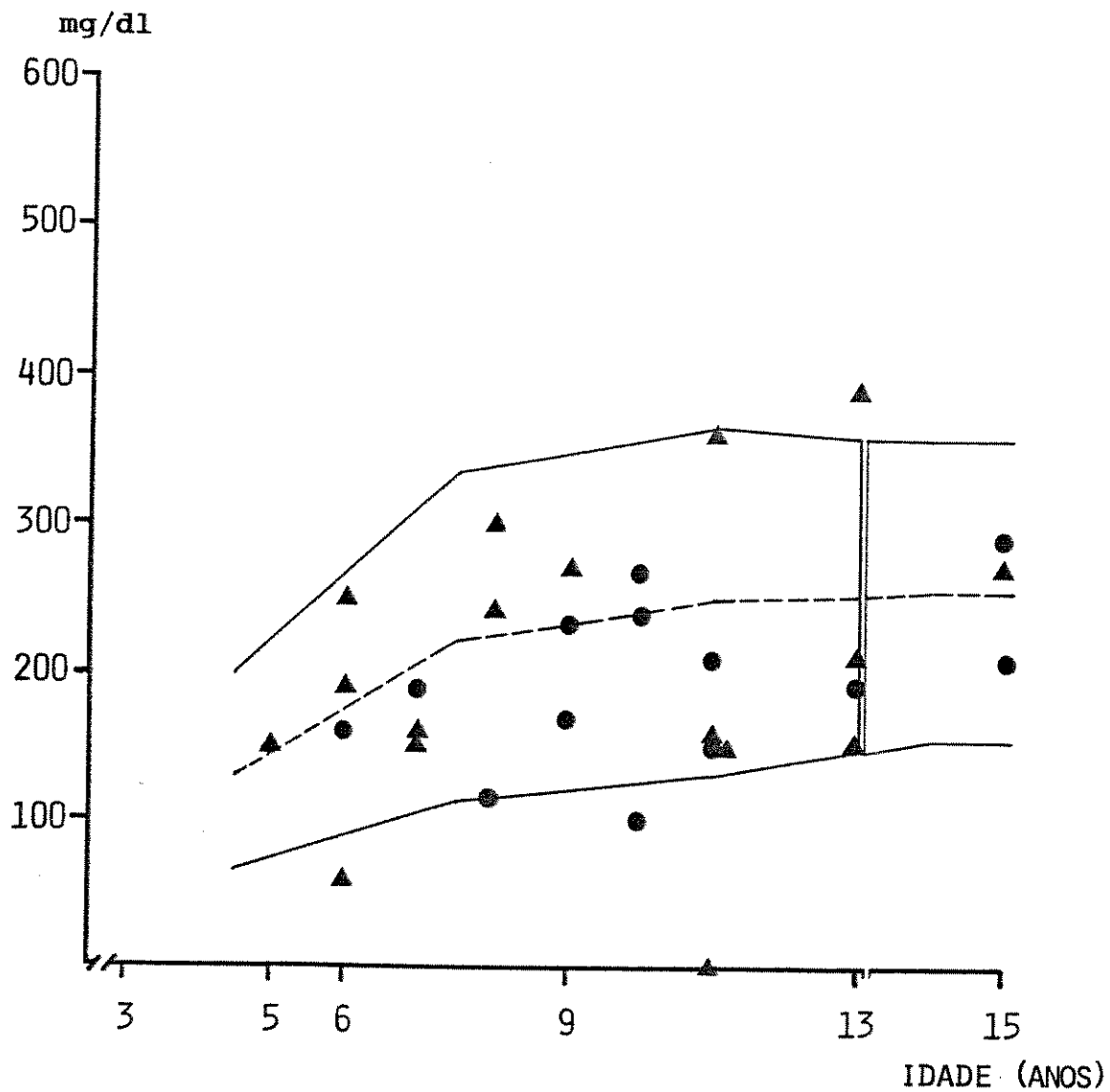


FIGURA 6 - Níveis séricos de IgA em crianças com asma crônica em relação aos valores médios (tracejado) \pm IDP (linha cheia) de crianças normais.

▲-presença e ●-ausência de infecções recorrentes do trato respiratório.

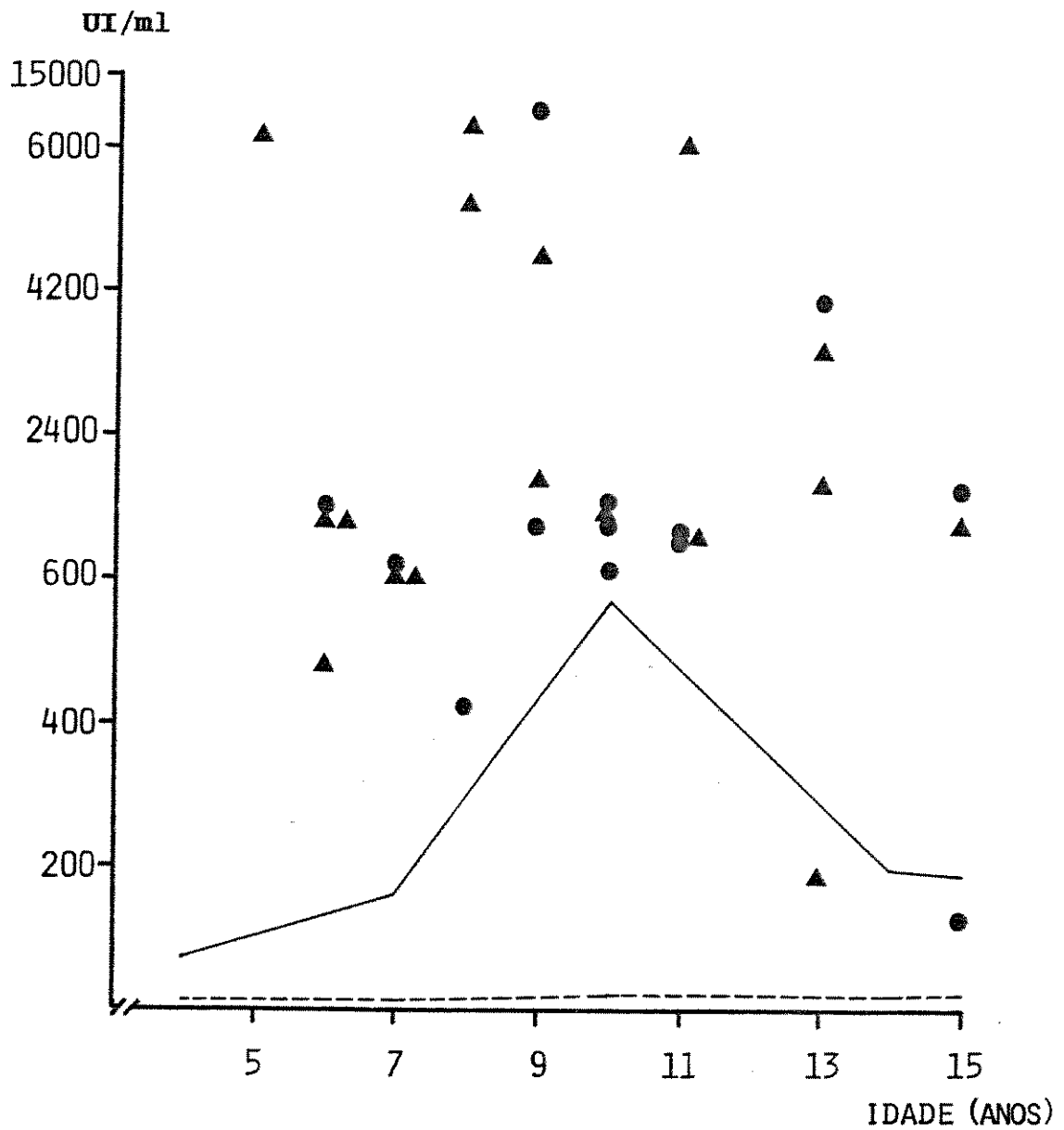


FIGURA 7 - Níveis séricos de IgE em crianças com asma crônica em relação aos valores médios (tracejado) + 2DP (linha cheia) de crianças normais.

▲-presença e ●-ausência de infecções recorrentes no trato respiratório.

3.2.3 NÍVEIS SÉRICOS DE TEOFILINA.

Os valores da concentração sérica de teofilina nos pacientes, 2 horas após a última dose, estão representados na figura 8. Não houve diferença significativa entre os grupos portadores ou não de infecções recorrentes do trato respiratório ($0,20 < p < 0,03$). Não houve correlação significativa entre os valores da migração espontânea e estimulada de PMN e MON dos pacientes sob uso de teofilina, e os níveis séricos da droga. Em 23 casos sorteados na segunda fase da investigação, isto é, quando os pacientes não tomavam teofilina, esta não foi detectada em nenhuma das amostras analisadas.

Na tabela 1, são apresentados os valores dos níveis séricos de teofilina encontrados em 8 amostras, dosadas pelos métodos de fluorescência polarizada e cromatografia líquida de alta pressão. A correlação entre os valores obtidos pelos dois métodos, foi significativa ($r=0,9872$).

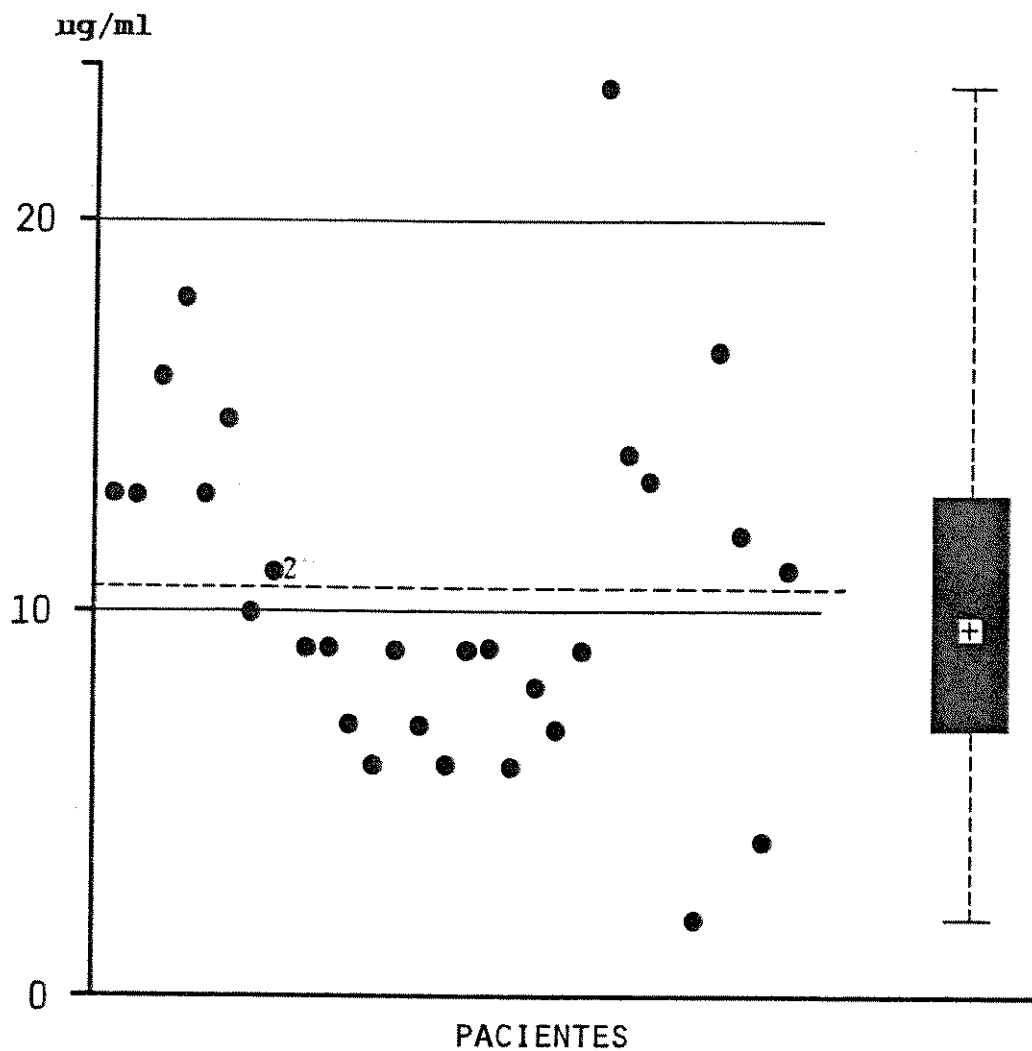


FIGURA 8 - Níveis séricos de teofilina em crianças com asma crônica. Média (tracejada), faixa terapêutica (linha cheia). "Box plot" com os valores mínimo, máximo, mediana e quartis.

TABELA 1

NÍVEIS SÉRICOS DE TEOFILINA EM 8 AMOSTRAS SORTEADAS E DOSADAS POR 2 MÉTODOS DIFERENTES: FLUORESCÊNCIA POLARIZADA (FP) E CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA PRESSÃO (HPLC).

AMOSTRAS	FP mcg/ml	HPLC mcg/ml
1	7,00	7,20
2	4,00	4,60
3	4,00	4,10
4	2,00	3,00
5	1,00	0,80
6	1,00	1,00
7	4,00	4,60
8	0,00	0,20

3.2.4. NÍVEIS PLASMÁTICOS DE AMP CÍCLICO.

Na figura 9, são apresentados os resultados dos níveis plasmáticos de AMP cíclico de 24 pacientes sorteados, sob uso ou não de teofilina. Os valores foram significativamente maiores quando a droga foi empregada ($p < 0,003$), embora a correlação entre ambas situações, não seja significativa ($r = 0,3291$). Não houve correlação entre os níveis plasmáticos de AMP cíclico sob uso de teofilina e a concentração sérica da droga ($r = 0,0733$). Não se encontrou correlação entre os valores da migração de PMN e MON dos pacientes, sob uso ou não de droga, com os níveis de AMP cíclico plasmático em ambas situações. Não houve diferença significativa dos níveis de AMP cíclico plasmático, entre os pacientes portadores ou não de infecções recorrentes do trato respiratório ($p > 0,95$ na presença e $0,30 < p < 0,40$ na ausência de droga).

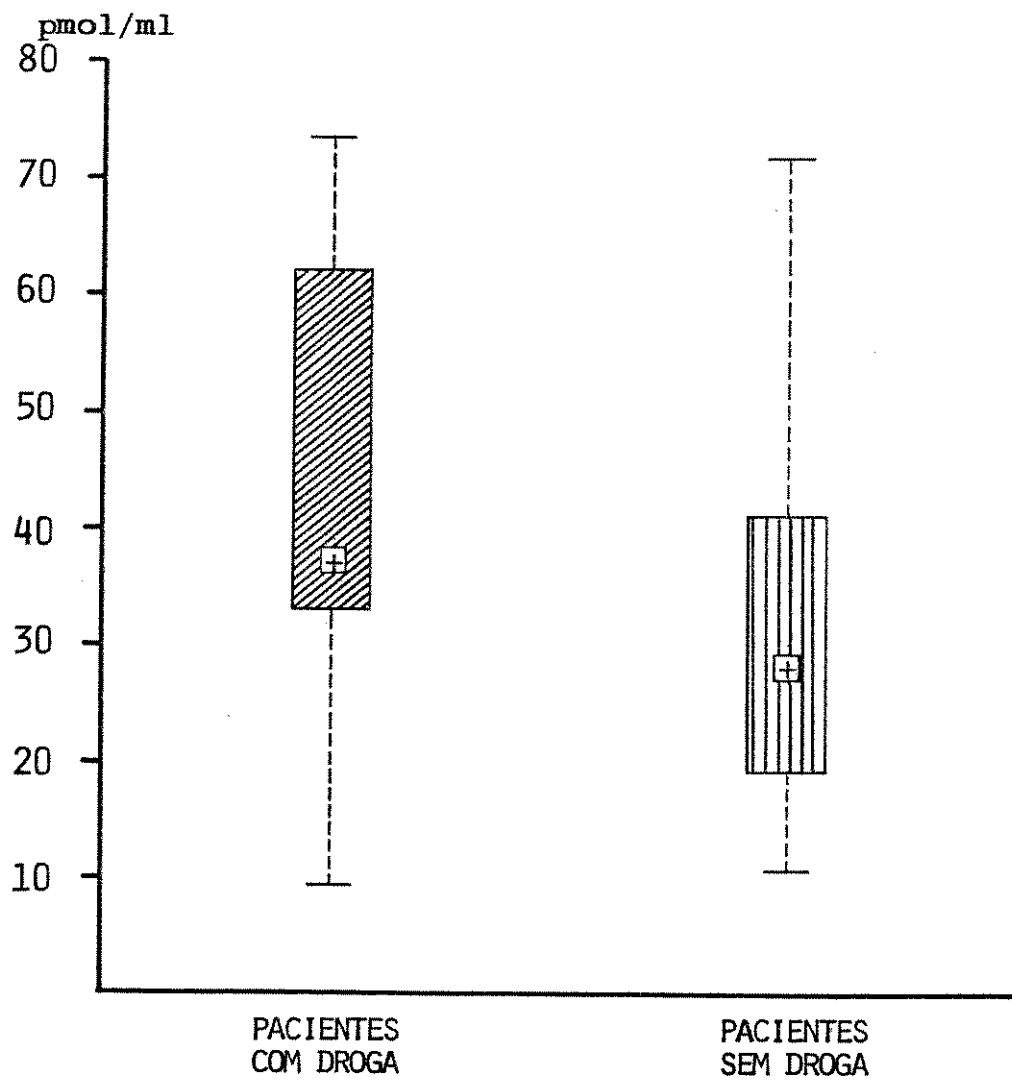


FIGURA 9 - Níveis plasmáticos de AMP cíclico em em 24 pacientes sob uso ou não de teo_ filina.

3.2.5. CONTAGEM DE LEUCÓCITOS PERIFÉRICOS.

Na figura 10, são apresentados os valores da contagem de leucócitos totais dos pacientes, sob uso ou não de teofilina. Comparando-se os resultados entre ambas situações, a contagem foi significativamente maior ($p < 0,02$), quando a droga foi utilizada pelo paciente, havendo correlação significativa ($r = 0,4216$). O número maior de leucócitos entre os indivíduos sob uso de teofilina, não se correlacionou com os níveis séricos da droga ($r = -0,0396$). Não houve diferença significativa ao se comparar a contagem de leucócitos totais dos pacientes portadores ou não de infecções recorrentes do trato respiratório ($0,50 < p < 0,60$ usando droga e $0,70 < p < 0,80$ não usando droga).

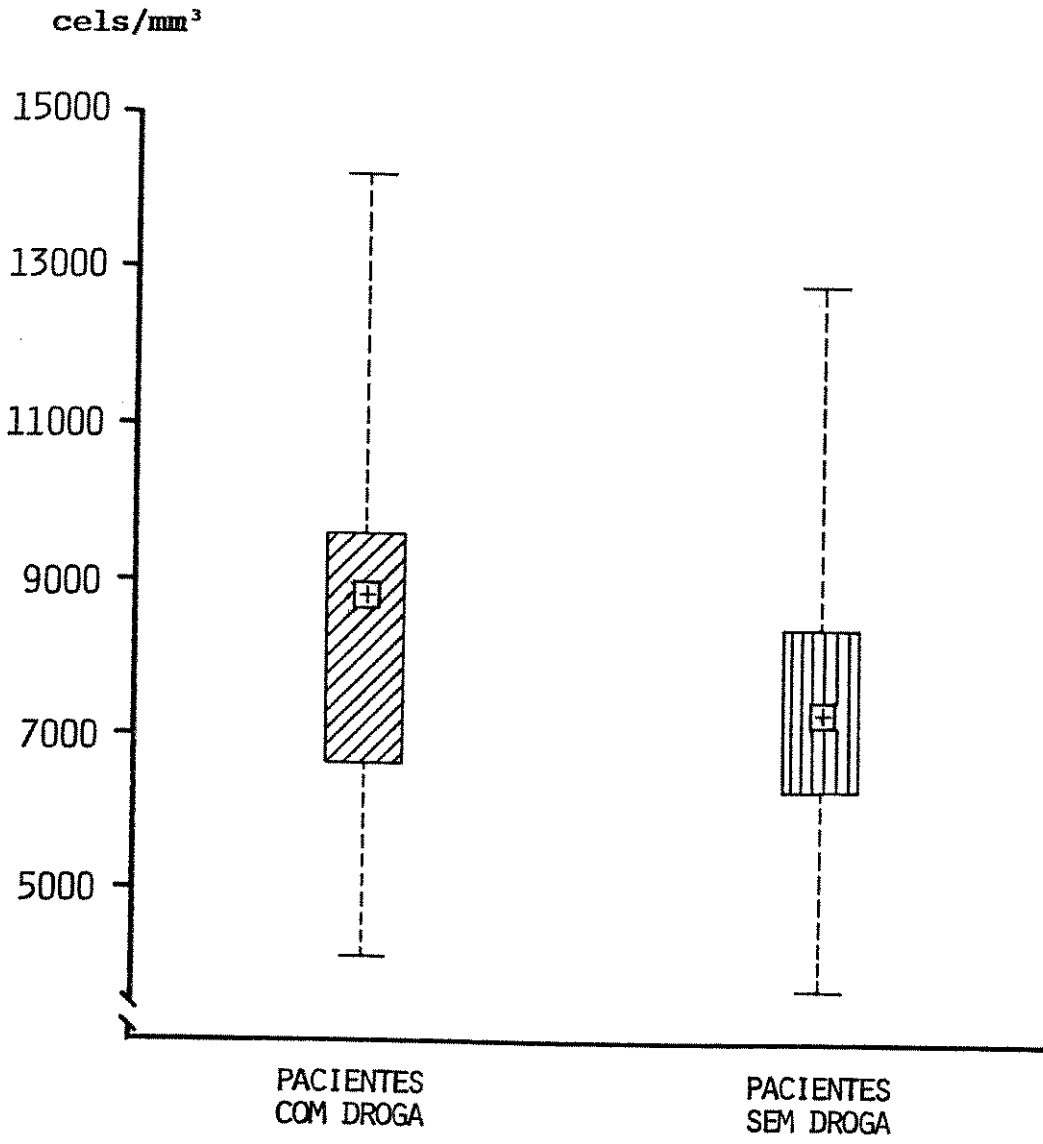


FIGURA 10 - Contagem de leucócitos totais dos pacientes sob uso ou não de teofilina.

3.2.6. MIGRAÇÃO DE POLIMORFONUCLEARES.

Na figura 11, são apresentados os valores da migração espontânea de PMN (determinada em meio de Hanks) dos controles e dos pacientes, sob uso ou não de teofilina. Comparando os resultados de migração obtidos dos pacientes, estes foram significativamente mais baixos quando a droga foi empregada ($p < 0,001$), embora a correlação entre as duas situações não tenha sido significativa ($r = 0,3375$). Em ambas ocasiões, a migração foi significativamente mais baixa em relação aos controles ($p < 0,001$).

Na figura 12, são apresentados os valores da migração estimulada de PMN (determinada em um "pool" de soros humanos normais, ativado com LPS) dos controles e dos pacientes, sob uso ou não de teofilina. Comparando os resultados de migração obtidos dos pacientes, estes foram significativamente mais baixos quando a droga foi empregada ($p < 0,03$), havendo correlação significativa entre as duas situações ($r = 0,5065$). Em ambas ocasiões, a migração foi significativamente mais baixa em relação aos controles ($p < 0,001$ sob uso de teofilina e $p < 0,05$ na ausência de droga).

Na figura 13, são apresentados os valores da migração estimulada de PMN dos pacientes sob uso ou não de teofilina, determinada individualmente em soro do doente, ativado com LPS. Comparando os valores em ambas situações, estes foram significativamente menores na

presença de droga ($p < 0,05$), ocorrendo entre eles, correlação significativa ($r = 0,4490$).

Na figura 14, comparamos os valores da migração estimulada de PMN dos pacientes, determinada em "pool" de soros normais, ou individualmente em soro do doente, ativados com LPS, na presença e na ausência de droga. Sob uso de teofilina, os valores foram significativamente diferentes ($p < 0,03$), o que não foi confirmado na ausência de droga ($0,10 < p < 0,20$).

Não houve diferença significativa, ao comparar ao se comparar os valores da migração de PMN dos pacientes portadores ou não de infecções recorrentes do trato respiratório, em qualquer uma das condições acima relatadas.

A tabela 2, compila os valores da migração dos PMN dos pacientes e dos indivíduos controles.

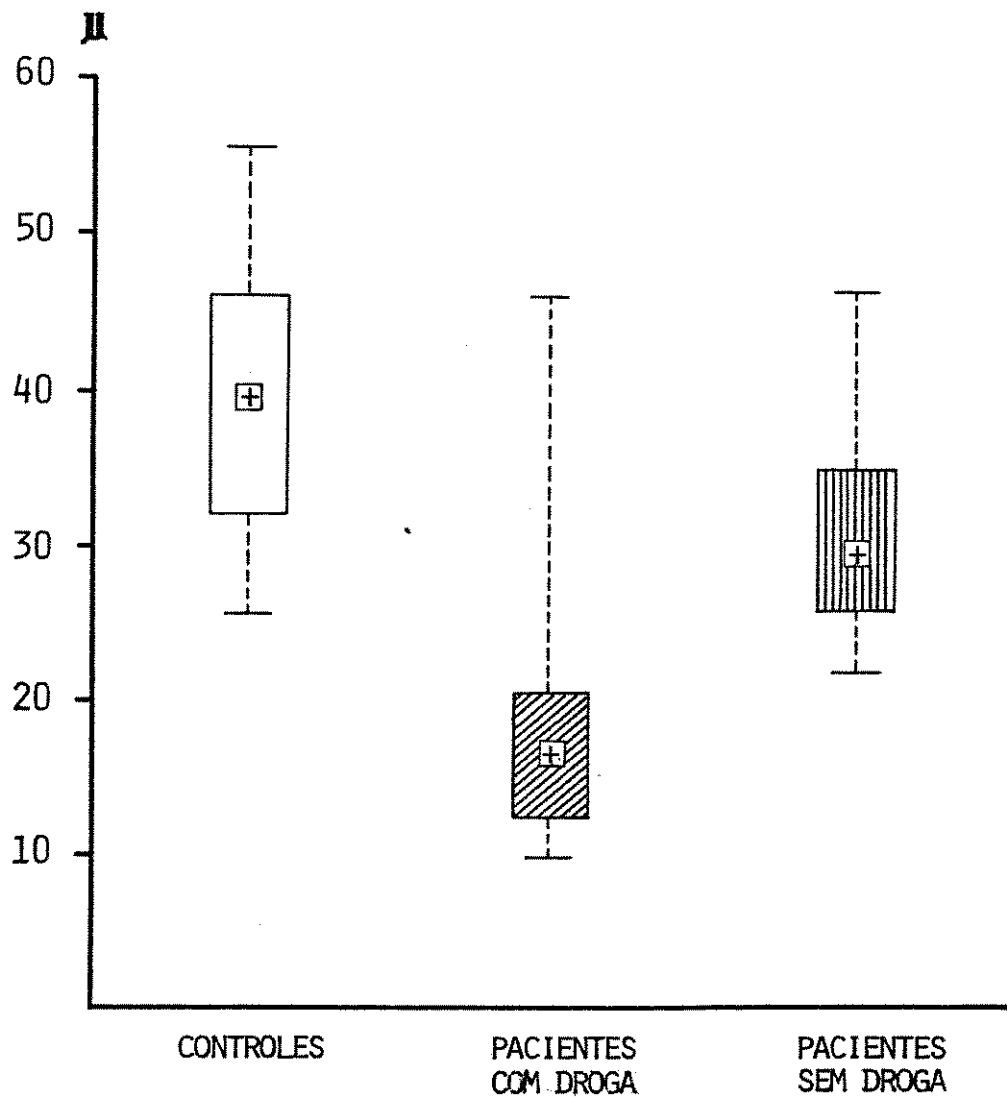


FIGURA 11- Migração espontânea de polimorfonucleares dos controles e dos pacientes so uso ou não de teofilina. Prova realizada em meio de Hanks.

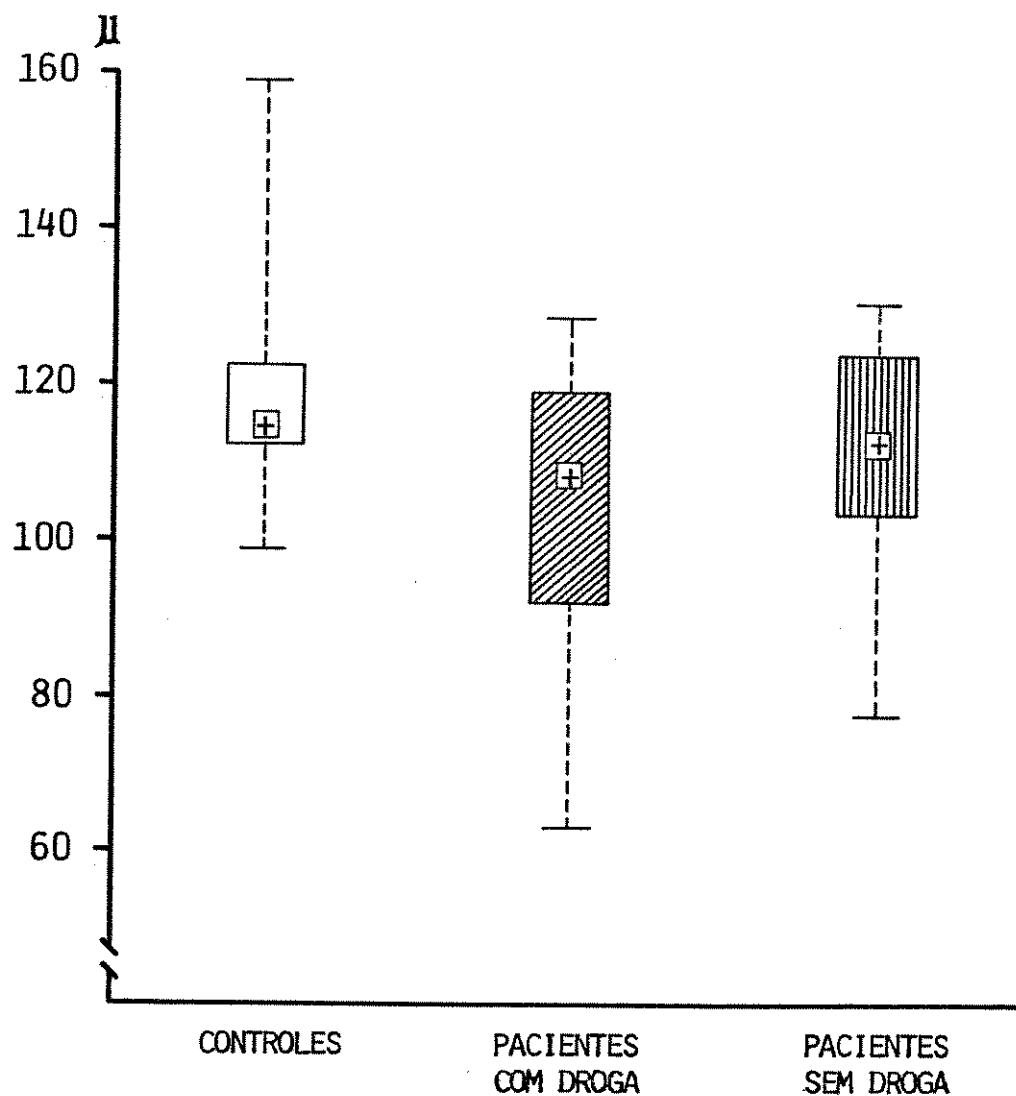


FIGURA 12 - Migração estimulada de polimorfonucleares dos controles e dos pacientes sob uso ou não de teofilina. Prova realizada em "Pool" de soros humanos normais incubados com LPS.

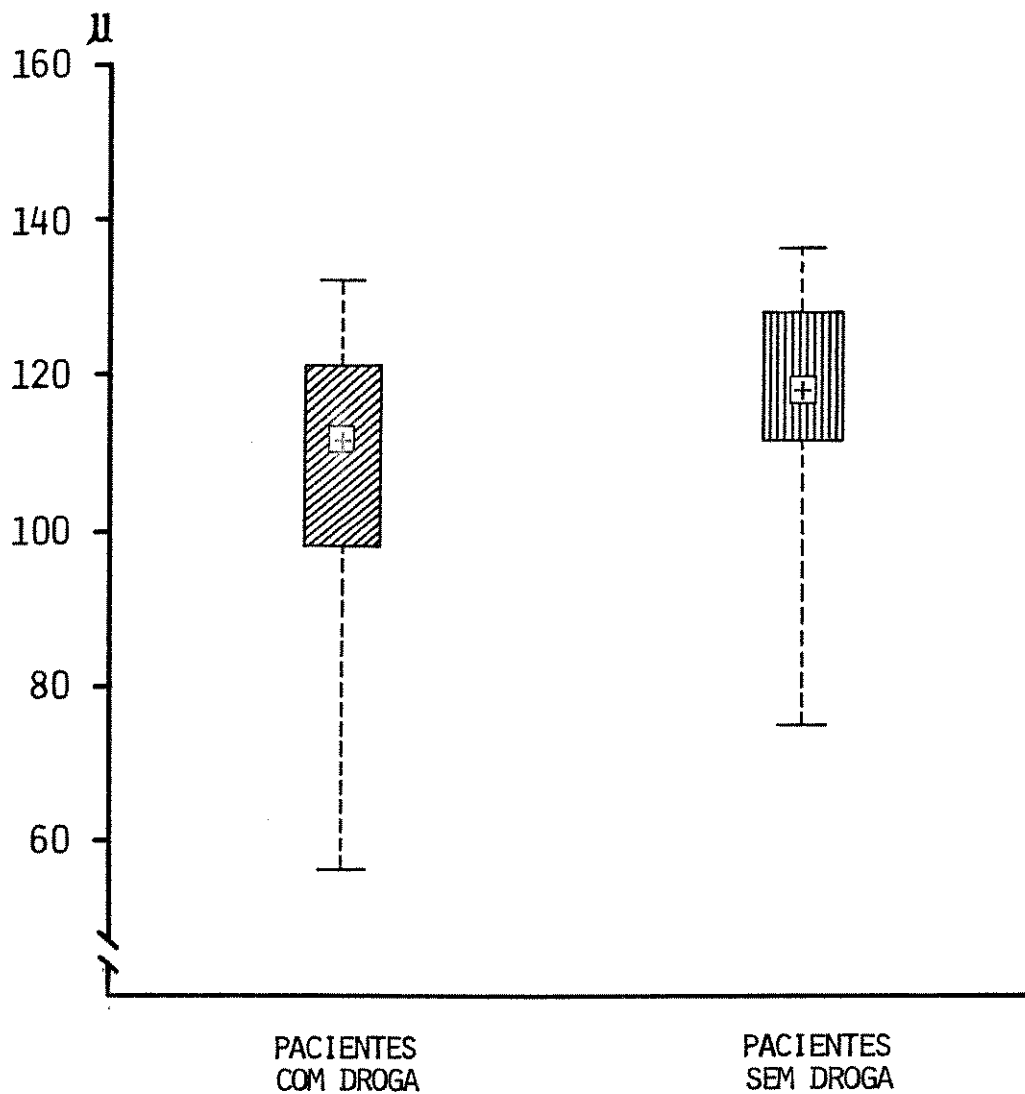


FIGURA 13- Migração estimulada de polimorfonucleares dos pacientes sob uso ou não de teofilina. Prova realizada individualmente em soro do doente incubado com LPS.

TABELA 2

MIGRAÇÃO ESPONTÂNEA (MEIO) E ESTIMULADA (COM SORO NORMAL OU SORO DO PACIENTE, PREVIAMENTE INCUBADOS COM LPS) DE POLIMORFONUCLEARES (PMN) DE CRIANÇAS NORMAIS E DOS PACIENTES (SOB USO OU NÃO DE TEOFILINA) .

	MÉDIA	DESVIO PADRÃO	MEDIANA	MÍNIMO	MÁXIMO
-----*					
PMN PACIENTES					
N=30 **					

MEIO					
COM DROGA	18,36	8,79	16,46	9,92	46,17
SEM DROGA	30,83	6,41	29,38	21,85	46,45
SORO NORMAL					
COM DROGA	103,54	18,14	108,76	63,15	128,62
SEM DROGA	110,87	15,27	112,77	77,75	130,22
SORO PACIENTE					
COM DROGA	107,60	18,71	111,87	55,92	131,75
SEM DROGA	115,14	15,64	118,65	75,20	136,05

PMN NORMAIS					
N=24 **					

MEIO	39,55	9,09	39,40	25,62	55,33
SORO NORMAL	118,76	13,87	115,03	98,74	159,31

* RESULTADOS EXPRESSOS EM MICRÔMETROS.

** N = NÚMERO DE INDIVÍDUOS ESTUDADOS.

3.2.7 MIGRAÇÃO DE MONÓCITOS.

Na figura 15, são apresentados os valores da migração espontânea de MON (determinada em meio de Hanks) dos controles e dos pacientes, sob uso ou não de teofilina. Comparando os resultados obtidos dos pacientes, estes foram significativamente mais baixos quando a droga foi empregada ($p < 0,01$), embora a correlação entre ambas situações, não tenha sido significativa ($r = 0,1950$). Somente os valores obtidos durante o uso de teofilina foram significativamente mais baixos em relação aos controles ($p < 0,01$).

Na figura 16, são apresentados os valores da migração estimulada de MON (determinada em "pool" de soros humanos normais, ativados com LPS) dos controles e dos pacientes, sob uso ou não de teofilina. Comparando os resultados obtidos dos pacientes, estes foram significativamente mais baixos quando a droga foi empregada ($p < 0,01$), embora a correlação entre ambas situações não tenha sido significativa ($r = 0,2728$). Em ambas ocasiões, a quimiotaxia foi significativamente mais baixa em relação aos controles ($p < 0,001$ sob uso de teofilina e $p < 0,05$ na ausência de droga).

Na figura 17, são apresentados os valores da migração estimulada de MON dos pacientes, sob uso ou não de teofilina, determinada individualmente em soro do doente ativado com LPS. Comparando os resultados em ambas

situações, estes foram significativamente menores na presença de droga ($p < 0,001$), embora a correlação entre ambos, não seja significativa ($r = 0,2723$).

Na figura 18, comparamos os valores da migração estimulada de MON dos pacientes, determinada em "pool" de soros normais, ou individualmente no soro do doente, ativados com LPS, sob uso ou não de teofilina. Em ambas ocasiões, não houve diferença significativa entre os valores ($0,10 < p < 0,20$ na presença e $p > 0,90$ na ausência de droga).

Não houve diferença significativa, ao se comparar os resultados dos pacientes portadores ou não de infecções recorrentes do trato respiratório, em qualquer uma das condições acima relatadas.

A tabela 3, compila os valores da migração de MON dos pacientes e dos indivíduos controles.

As figuras A e B concentram respectivamente os valores da migração espontânea e estimulada dos PMN e MON. A tabela 4, resume os resultados da análise estatística.

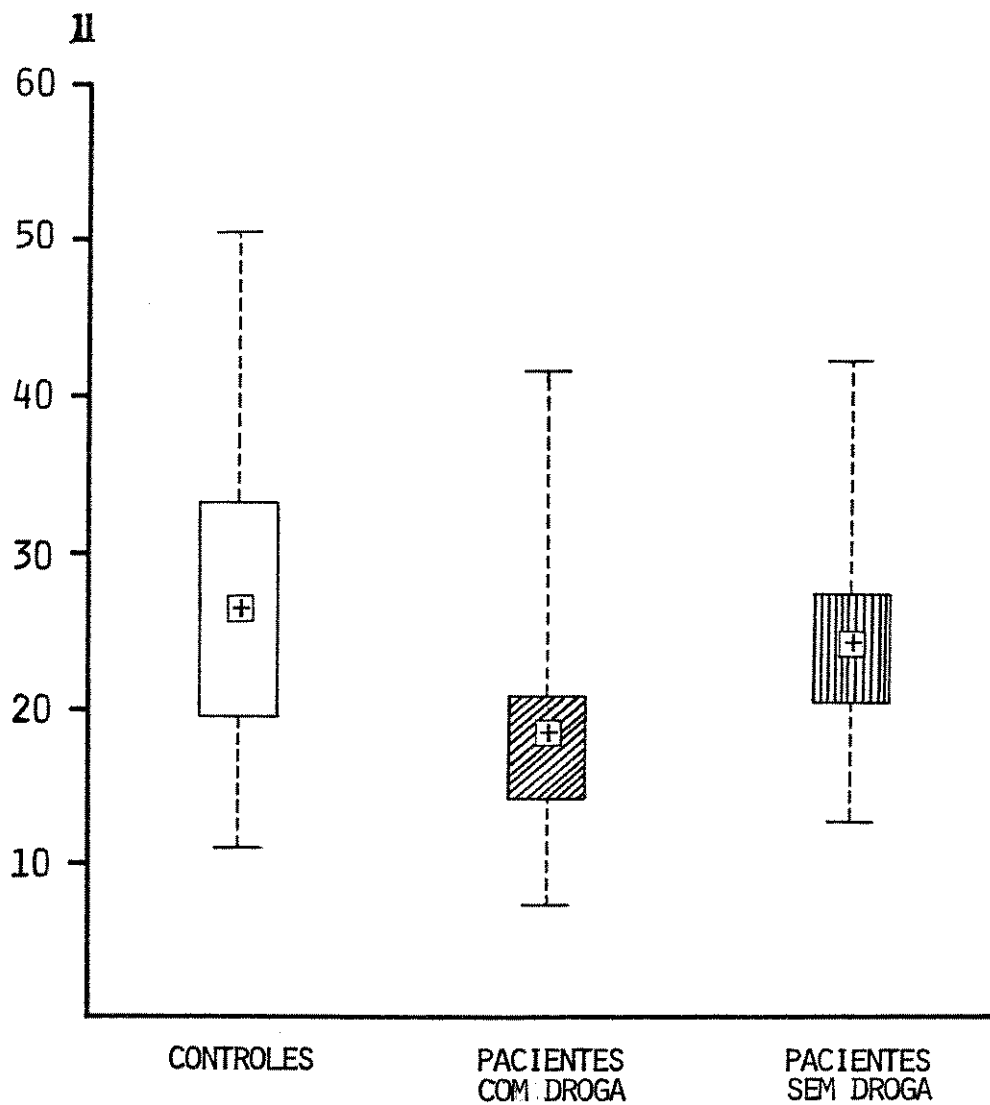


FIGURA 15 - Migração espontânea de monócitos dos controles e dos pacientes sob uso ou não de teofilina. Prova realizada em meio de Hanks.

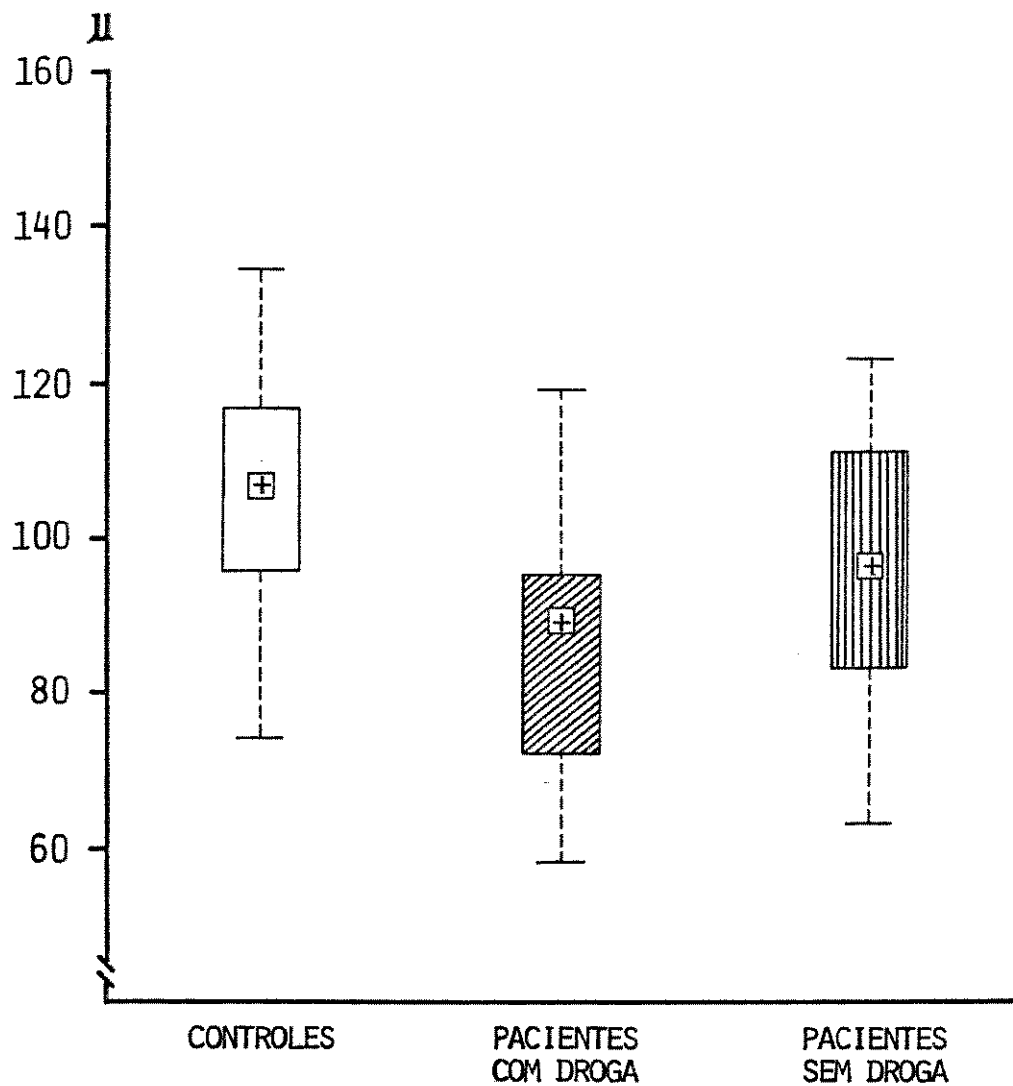


FIGURA 16 - Migração estimulada de monócitos dos controles e dos pacientes sob uso ou não de teofilina. Prova realizada em "Pool" de soros humanos normais incubados com LPS.

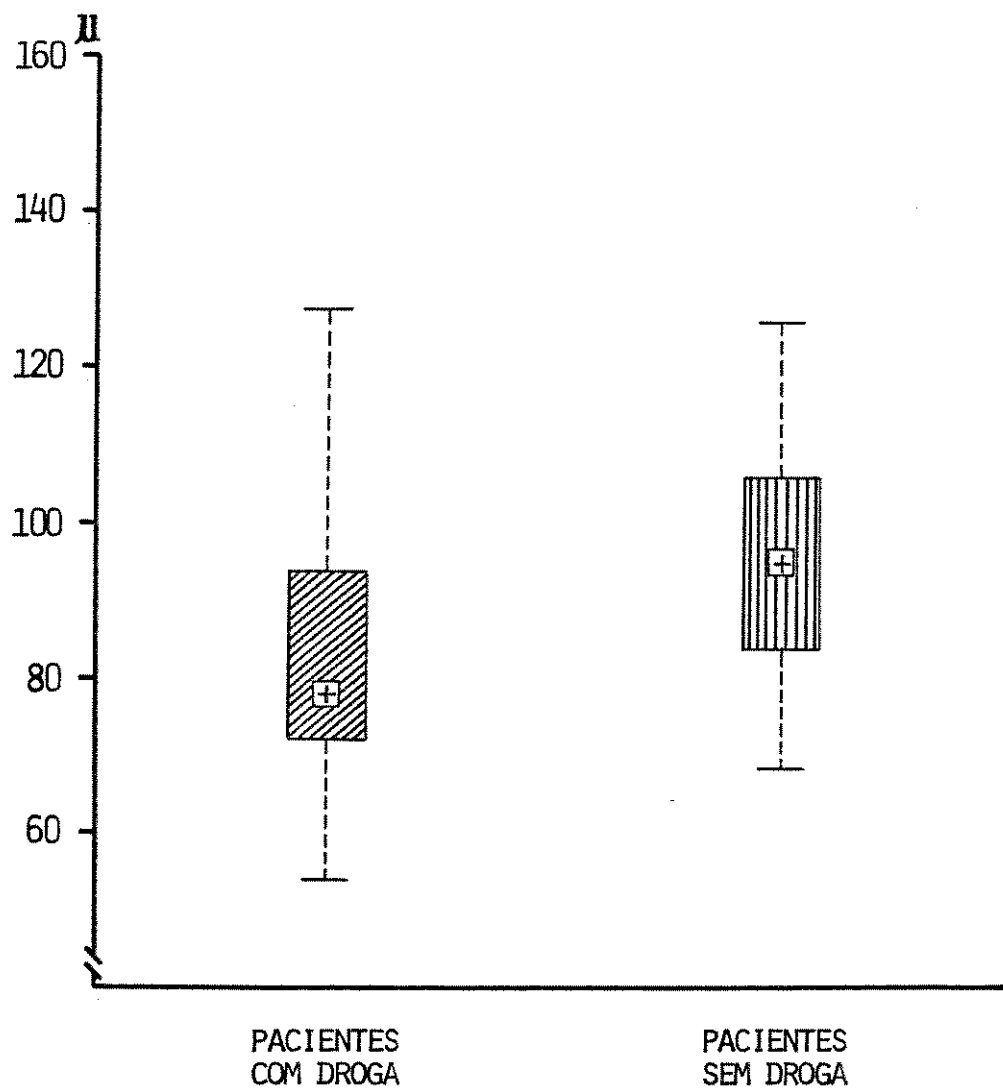


FIGURA 17 - Migração estimulada de monócitos dos pacientes sob uso ou não de teofilina. Prova realizada individualmente em soro do doente incubado com LPS.

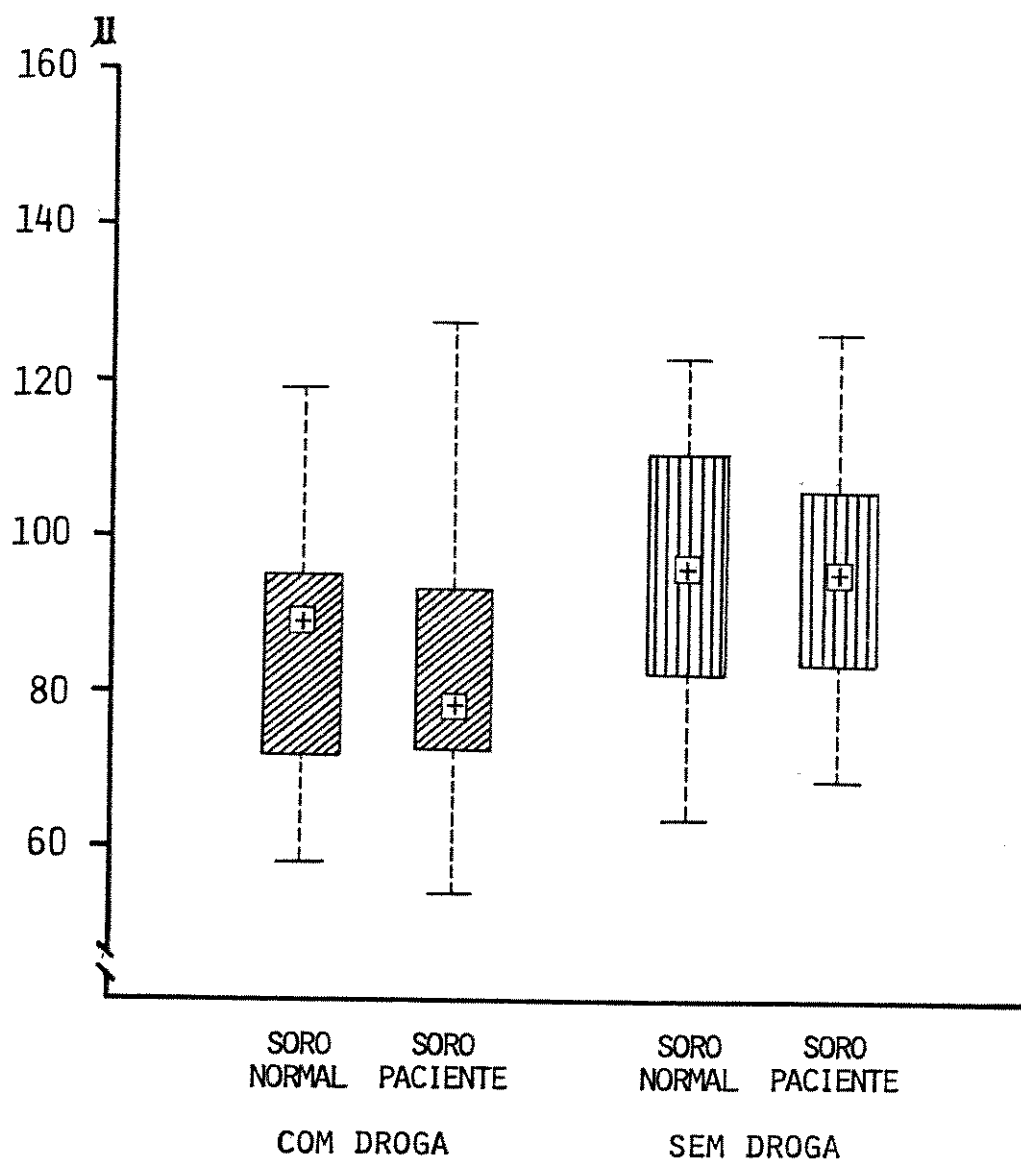


FIGURA 18 - Migração estimulada de monócitos dos pacientes sob uso ou não de teofilina. Prova realizada em "Pool" de soros normais ou individualmente em soro do doente, incubados com LPS.

TABELA 3

MIGRAÇÃO ESPONTÂNEA (MEIO) E ESTIMULADA (COM SORO NORMAL OU SORO DO PACIENTE, PREVIAMENTE INCUBADOS COM LPS) DE MONÓCITOS (MON) DE CRIANÇAS NORMAIS E DOS PACIENTES (SOB USO OU NÃO DE TEFILINA).

	MÉDIA	DESVIO PADRÃO	MEDIANA	MÍNIMO	MÁXIMO
-----*					
MON PACIENTES					
N=30 **					

MEIO					
COM DROGA	19,45	8,23	18,76	7,45	41,67
SEM DROGA	24,32	6,18	24,31	12,65	42,42
SORO NORMAL					
COM DROGA	85,54	15,65	89,02	58,12	119,05
SEM DROGA	96,39	16,43	95,97	63,52	123,37
SORO PACIENTE					
COM DROGA	82,16	17,02	78,18	54,15	127,65
SEM DROGA	96,55	15,95	95,03	68,42	125,70

MON NORMAIS					
N=24 **					

MEIO	26,93	10,03	26,40	11,22	50,62
SORO NORMAL	105,56	15,33	106,78	74,52	134,51

* RESULTADOS EXPRESSOS EM MICRÔMETROS.

** N = NÚMERO DE INDIVÍDUOS ESTUDADOS.

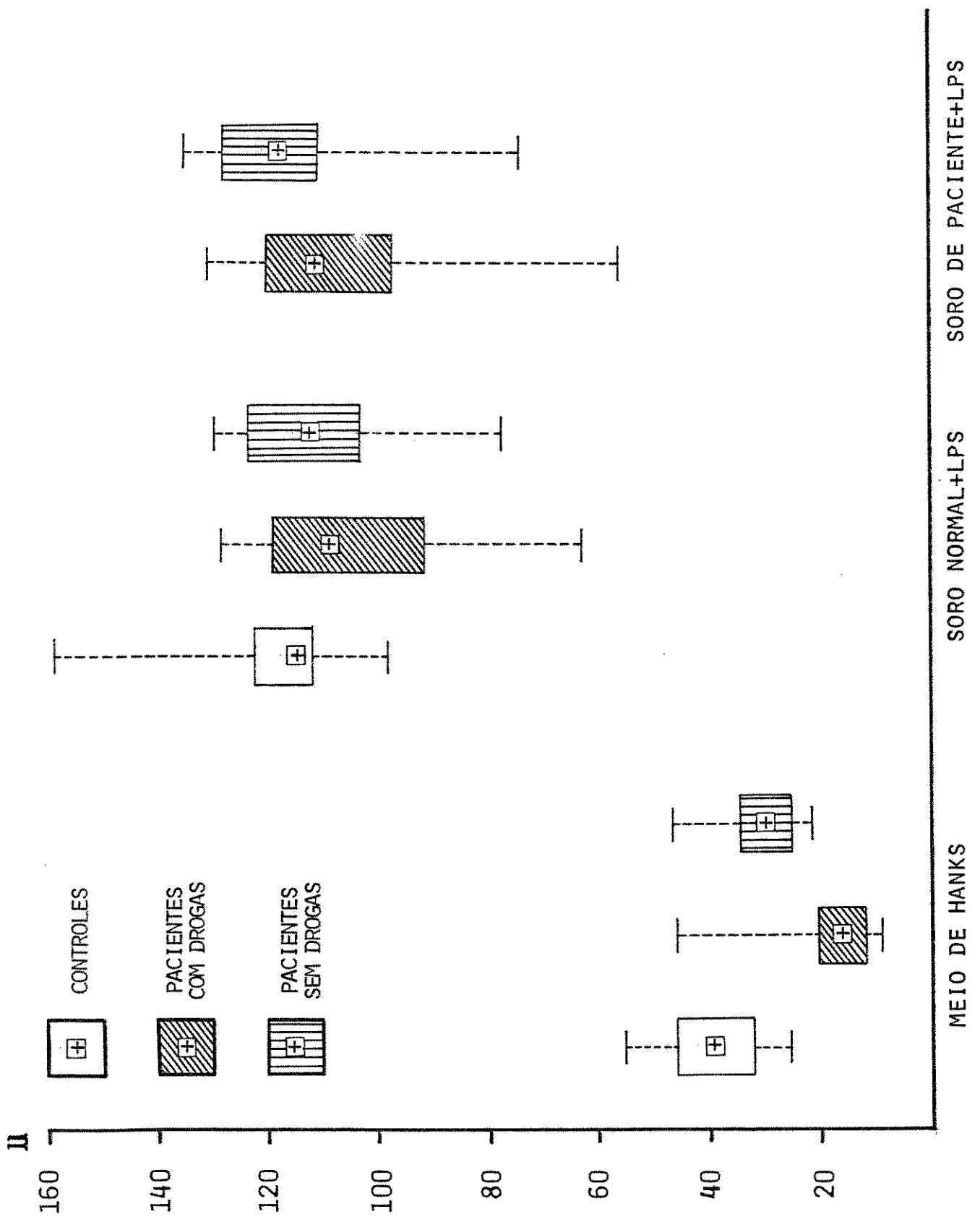
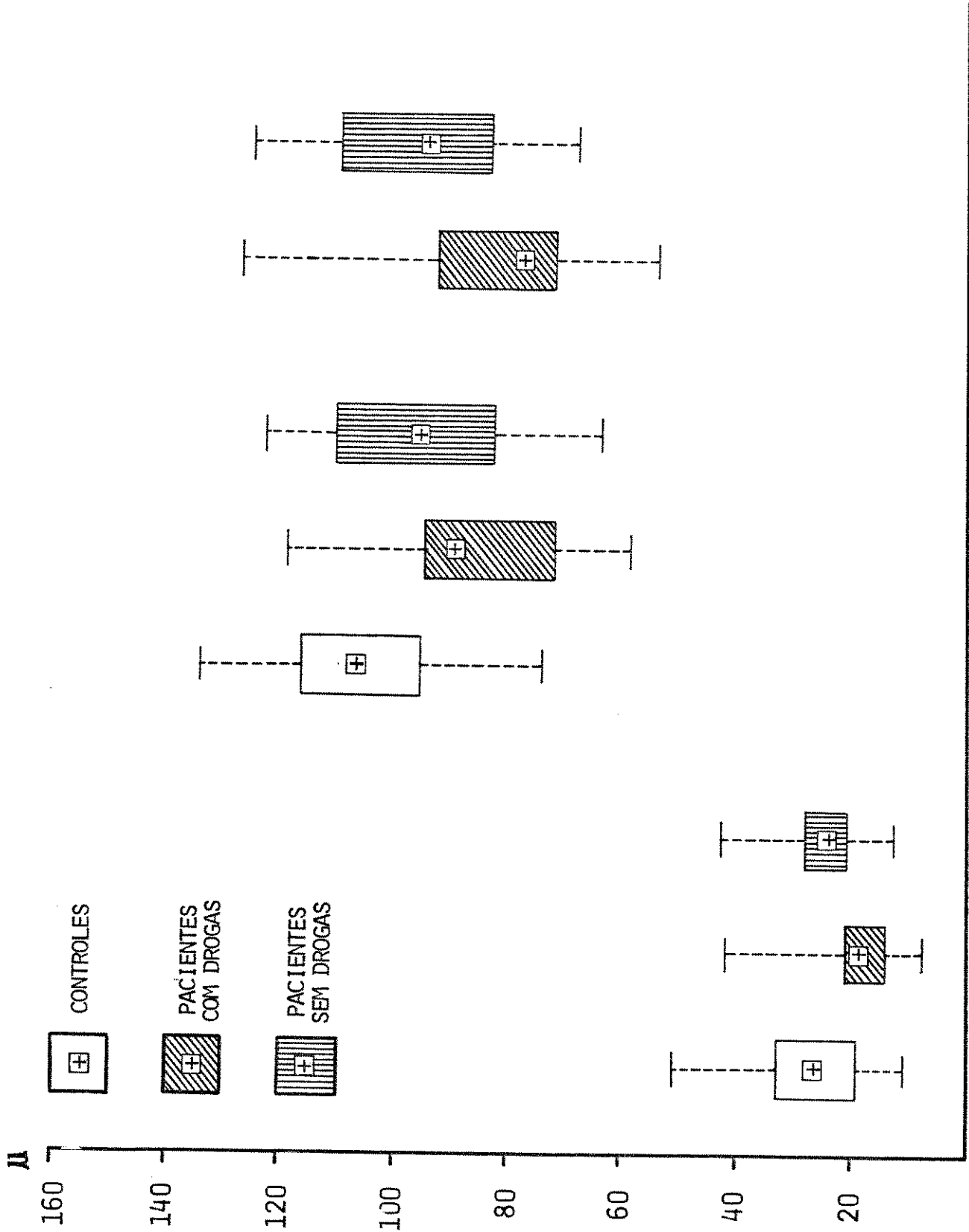


FIGURA A - Migração espontânea e estimulada de polimoifonucleares dos controles e dos pacientes sob uso ou não de teofilina.



MEIO DE HANKS SORO NORMAL+LPS SORO DE PACIENTES+LPS

FIGURA B - Migração espontânea e estimulada de monócitos dos controles e dos pacientes sob uso ou não de teofilina.

TABELA 4

ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS VALORES DA MIGRAÇÃO ESPONTÂNEA (MEIO) E ESTIMULADA EM SORO NORMAL (SNL) OU SORO DO PACIENTE (SP) DOS PMN E MON DOS PACIENTES E DOS INDIVÍDUOS CONTROLES.

ENSAIO	PAC. COM DROGA	PAC. COM DROGA	PAC. SEM DROGA
	X PAC. SEM DROGA *	X CONTROLES **	X CONTROLES **
PMN meio	p<0,001 r=0,3375	p<0,001	p<0,001
PMN snl	p<0,05 r=0,5065	p<0,001	p<0,05
PMN sp	p<0,05 r=0,4490		
MON meio	p<0,01 r=0,1950	p<0,05	p>0,05
MON snl	p<0,01 r=0,2728	p<0,001	p<0,05
MON sp	p<0,001 r=0,2723		

* teste t'student para dados pareados
significativo quando p<0,05
correlação significativa se r) ou =0,3536

** teste t'student para dados não pareados
significativo quando p<0,05

DISCUSSÃO

O perfil clínico do grupo de pacientes estudado neste trabalho, está de acordo com os resultados obtidos por RIBEIRO, (1987), ao estudar o comportamento das diversas variáveis clínicas, em 503 crianças asmáticas, neste mesmo serviço. Ressaltamos a maior frequência de infecções recorrentes de vias respiratórias no grupo de asmáticos crônicos (em torno de 50% dos pacientes), neste e naquele estudo, significativamente maior, quando comparada aos grupos portadores de formas mais leves de asma brônquica.

Na tentativa de identificar os fatores de risco clínico-laboratoriais que determinam uma maior susceptibilidade às infecções em nossos doentes, dosamos os níveis séricos do complemento (onde estão contidos os principais fatores quimiotáticos) e das imunoglobulinas, já que ambos grupos de proteínas constituem os mecanismos humorais de defesa.

Os valores de CH50 e das frações C3 e C4 do complemento sérico no grupo de pacientes por nós estudado, está dentro da faixa de normalidade, quando comparadas a crianças norte-americanas sadias, pareadas por idade e sexo, o que está de acordo com os dados de ELLIS, (1988).

Como a distribuição da idade foi semelhante nos grupos de pacientes portadores ou não de infecções recorrentes do trato respiratório, comparamos os

níveis de C3, C4 e CH50 nos dois grupos, e não encontramos diferença significativa, o que nos permitiu afastar estes dados como fatores de risco na maior susceptibilidade às infecções em nossos doentes.

Os níveis séricos de IgG, IgA, IgM e IgE verificados em nossos pacientes são concordantes com os dados já publicados na literatura (FROUCHTMAN e cols., 1971; LIN e cols., 1977 e STEVENS e cols., 1983). Observamos ausência de IgA em um paciente, níveis normais de IgG e elevados de IgM e IgE, na maioria dos indivíduos estudados.

Achamos relevante o fato de encontrarmos um paciente com ausência de IgA sérica, pois esta, na forma secretora, desempenha importante papel na imunidade das mucosas, e, quando ausente, pode tornar o indivíduo mais susceptível às infecções (BERG, 1987). A literatura relata ainda que a deficiência de IgA pode estar associada a deficiências seletivas de subclasses de IgG, predispondo o indivíduo a infecções de repetição e agravo da asma brônquica. Tal condição clínica, pode ser revertida, com o emprego de gamaglobulinas (BJORKANDER e cols., 1985).

MING e cols., (1977), também observaram níveis elevados de IgM em asmáticos portadores de pneumonias de repetição, quando comparados a outros asmáticos sem infecções recorrentes. Estes autores defendem a idéia que os níveis elevados de IgM são devidos à uma maior frequência de infecções virais no grupo de doentes por eles estudado. Ao

contrário de MING e cols., (1977), não observamos diferença significativa nos níveis séricos de IgM e das outras imunoglobulinas entre os pacientes portadores ou não de infecções recorrentes do trato respiratório. Portanto, é pouco provável que os níveis séricos de anticorpos encontrados, contribuam como fatores de risco na maior susceptibilidade às infecções entre nossos pacientes.

Nossos resultados mostraram haver uma contagem de leucócitos significativamente maior durante o uso de teofilina. ALBERT, (1987) em uma revisão, relatou haver uma associação entre leucocitose e intoxicação pela teofilina. Entretanto, não há nenhuma publicação correlacionando especificamente contagem de leucócitos e níveis séricos de teofilina.

NAGY, (1981), observou que em indivíduos asmáticos submetidos a um teste de provocação brônquica com *Dermatophagoides farinae*, após 20 minutos de observação, ocorria aumento dos fatores quimiotáticos séricos de neutrófilos(FQSN), sem alteração na contagem dos granulócitos periféricos, o que coincidiu com os achados de LINDGREN e cols., (1978). O número de eosinófilos entretanto, teve queda inicial e aumento significativo após 24 horas de observação. VENGE e cols., (1982) ao contrário, observou aumento significativo do número de PMN, 120 minutos após provocação brônquica com *Dermatophagoides pteronyssinus* em asmáticos, sem correlação com FQSN termolábil ou

termoestável, e defende a idéia que tal fenômeno deveu-se à redistribuição do pool marginal de PMN. Este fenômeno, seria análogo à leucocitose produzida pelo stress e corticosteróides e não ao maior tráfego de células, já que não houve aumento da lactoferrina sérica, a qual refletiria maior "turnover" e atividade dos neutrófilos na circulação.

Em nosso caso, o fato de não haver correlação entre o número de leucócitos e os níveis séricos de teofilina, acentua a hipótese que tal elevação na contagem decorra do estado clínico-patológico dos doentes e não da influência da droga.

Não houve diferença significativa ao se comparar a contagem de leucócitos entre os pacientes portadores ou não de infecções recorrentes do trato respiratório, sob uso ou não de teofilina, o que nos permite afastar tais dados como fatores de risco na maior susceptibilidade às infecções em nosso grupo de estudo.

Quando os pacientes não faziam uso da teofilina, obtivemos valores reduzidos nas migrações espontânea de PMN e estimulada em soro normal de PMN e MON, quando comparados aos controles, o que está de acordo com a literatura anteriormente referida. Não comparamos os resultados por faixa etária, pois o grupo controle utilizado, não apresentou variação nos valores da migração espontânea e estimulada de PMNe de MON em relação à idade (VILELA, 1985).

Ao utilizar teofilina na dose de 20 mg/kg/dia, observamos uma diminuição significativa nos valores da migração espontânea e estimulada em soro normal dos PMN e MON, quando comparadas aos controles. Tal tendência foi amplamente confirmada ao compararmos os resultados dos pacientes na presença e ausência de droga, havendo redução significativa nos valores da migração espontânea e estimulada em soro normal, ou individualmente no soro do doente, dos PMN e dos MON, o que está de acordo com as observações "in vitro" de NIELSEN e cols., (1988) e FISCHER e cols., (1980). A análise estatística indica ainda, que os MON parecem ser mais susceptíveis a este efeito inibitório, e que tal fenômeno se dá de maneira mais previsível entre os PMN (tabela 4).

Com o objetivo de discriminar o efeito inibitório da teofilina sobre os fagócitos, comparamos os valores da migração estimulada de PMN e MON em soro normal ou soro do paciente, sob uso ou não de teofilina. Constatamos que durante o uso da droga pelos doentes, somente a migração dos PMN foi diferente. Nas outras situações, foram semelhantes, o que mostra uma influência preponderante sobre a célula, para a explicação deste fenômeno. Tal fato, é confirmado pela redução significativa na migração espontânea de ambos fagócitos durante o uso de teofilina, quando não há qualquer estímulo para a migração da célula.

De acordo com a literatura anteriormente referida, também não encontramos correlação significativa entre os valores da migração espontânea ou estimulada dos fagócitos e os níveis séricos de IgE, independentemente do uso da droga.

Não encontramos diferença significativa nos valores da migração dos PMN ou MON, em quaisquer dos tratamentos dados, entre os grupos de pacientes portadores ou não de infecções recorrentes do trato respiratório. Tal fato, nos faz sugerir que os valores da migração dos fagócitos encontrados, não permitiu distinguir dentre os pacientes, aqueles com maior susceptibilidade às infecções.

Queremos ressaltar ainda, que na maioria dos trabalhos publicados sobre quimiotaxia de fagócitos em pacientes atópicos, especialmente nos asmáticos, os autores tiveram o cuidado de excluir o uso de drogas imunossupressoras, mas não de broncodilatadores. Acreditamos por isto, que dentre os resultados por eles apresentados, possam estar embutidos os efeitos inibitórios da teofilina sobre a migração dos fagócitos.

A análise dos níveis séricos de teofilina, mostrou um nível médio próximo de 10 mcg/ml, o que está de acordo com outras publicações (NIELSON e cols., 1988; NIELSON e cols., 1986; HIGBEE e cols., 1982; NACLERIO e cols., 1986 e KYONG e cols., 1982). Houve um caso, cujo nível sérico de teofilina encontrado foi de 2mcg/ml,

provavelmente devido a falha no horário ou dose da medicação. Consideramos em nossa análise, mesmo aqueles resultados relacionados a este nível tão baixo, pois a literatura mostra que os efeitos inibitórios da teofilina sobre a ativação dos fagócitos, ocorre mesmo em concentrações abaixo da faixa terapêutica, a partir de 1,8 mcg/ml (NIELSON e cols., 1988; NIELSON e cols., 1986 e KYONG e cols., 1982).

O fato de não haver correlação entre os valores da migração espontânea ou estimulada de PMN e MON durante o uso terapêutico de teofilina e os níveis séricos da droga, denota uma susceptibilidade biológica individual ao efeito inibitório da droga.

A ausência de diferença significativa nos níveis séricos de teofilina entre os grupos de pacientes portadores ou não de infecções recorrentes do trato respiratório, a ausência da droga no soro de 23 pacientes na segunda fase da investigação e o alto grau de correlação ($r=0,9872$) entre os dois métodos empregados para a dosagem de teofilina, nos permitiu fazer todas as comparações anteriormente relatadas.

Os mecanismos pelos quais a teofilina pode exercer seus efeitos inibitórios sobre os fagócitos incluem: inibição da fosfodiesterase (BUTCHER e SUTHERLAND, 1962) e (POLSON e cols., 1978), antagonismo aos receptores da adenosina (FREDHOLM, 1980) e alteração da mobilização do

cálcio intracelular (COX e KARNOVSKY, 1973; BRYANT e SUTCLIFFE, 1974 e KYONG e cols., 1982).

NIELSON e cols. (1988), demonstraram que a teofilina inibe a ativação de PMN diminuindo a liberação dos mediadores da inflamação. A inibição da geração de leucotrieno B₄, da liberação de metabólitos do oxigênio, a elevação intracelular do AMP cíclico e a redução na mobilização do cálcio intracelular, foram induzidas pela teofilina "in vitro", em concentrações dentro da faixa terapêutica (9 a 18 mcg/ml), o que foi confirmado "in vivo" utilizando-se doses terapêuticas da droga em voluntários. Os resultados sugeriram que a elevação do AMP cíclico associados a uma redução no cálcio intracelular, causaria inibição das funções celulares mediadas pelo cálcio.

CRONSTEIN e cols. em 1983, demonstraram que a adenosina inibe a ativação dos PMN, através da estimulação de seus receptores A₂, e posteriormente, que esta, aumenta a atividade da adenilatociclase (CRONSTEIN e cols., 1985).

NIELSON e cols., em 1986, verificaram que a teofilina bloqueia os efeitos da adenosina sobre os PMN e discutem que tais efeitos, tendem a aumentar a ativação dos PMN, e são portanto improváveis de contribuir para a inibição observada em seu último estudo (NIELSON e cols., 1988).

ROSE e cols. (1988) em contrapartida, baseando-se no fato de que as metilxantinas são antagonistas competitivos dos receptores A1 e A2 da adenosina, observaram surpreendentemente que a adenosina e seus análogos, estimulam a quimiotaxia de neutrófilos, predominantemente via receptores A2 da adenosina. O efeito paradoxal da adenosina nos receptores A2 inibindo a produção de ânions superóxido, mas estimulando a quimiotaxia, sugere que o acoplamento dos receptores para a quimiotaxia estimula a migração e o burst respiratório por vias intracelulares distintas. Desta maneira, a adenosina estimularia a migração dos neutrófilos para sítios de infecção ou necrose tissular, sem causar dano aos tecidos por onde passa. Partindo desta idéia, podemos admitir que a teofilina poderia exercer "in vivo", nas doses terapêuticas, um antagonismo competitivo com os receptores A2 da adenosina, diminuindo assim a quimiotaxia, também por este mecanismo, já que a regulação do evento de migração e a ativação do "burst" respiratório, parecem ocorrer por diferentes vias intracelulares.

BRODUS, (1970), observou que havia uma estreita correlação entre os níveis de AMP cíclico intra e extracelular ao utilizar drogas simpatomiméticas em voluntários, ou seja, na medida em que ocorria elevação do AMP cíclico intracelular, paralelamente, subiam os níveis plasmáticos de AMP cíclico, apesar de as concentrações

intracelulares serem sempre maiores. WIEMER, (1981), observou o mesmo fenômeno em eritrócitos de ratos.

A partir destes dados, optamos pela dosagem dos níveis plasmáticos do AMP cíclico em nossos doentes, já que tal procedimento foi mais compatível com nossas condições técnicas de trabalho.

Nossos resultados apontam nos doentes, uma elevação significativa dos níveis plasmáticos do AMP cíclico durante o uso terapêutico da teofilina nas doses recomendadas pela literatura ($p < 0,003$), quando comparados ao período sem droga, o que está de acordo com os resultados de WETH e cols. (1985). Apesar da elevação ser significativa, é baixa a correlação ($r = 0,3291$) entre os níveis plasmáticos de AMPc, durante e após o uso terapêutico da teofilina, denotando um caráter individual de resposta à droga. Tal fato, foi confirmado pela ausência de correlação entre os níveis plasmáticos do AMP cíclico e os níveis séricos de teofilina durante seu uso ($r = 0,0733$). Também, não houve diferença significativa nos níveis plasmáticos de AMP cíclico, durante o uso ou não de teofilina, entre os pacientes portadores ou não de infecções recorrentes do trato respiratório, sugerindo para nós, que este fator sérico não distinguiu os pacientes de maior susceptibilidade às infecções.

Concluimos que em nosso estudo, a teofilina em uso terapêutico nas doses recomendadas, foi

capaz de inibir a migração espontânea e estimulada de PMN e MDN, com elevação significativa dos níveis plasmáticos de AMP cíclico, acentuando ainda mais, os baixos valores de migração encontrados na ausência de droga. Não temos elementos para afirmar se este efeito imunossupressor sobre o sistema fagocítico, é benéfico no sentido de controlar melhor os mecanismos inflamatórios relacionados à asma crônica, enfaticamente os da fase tardia, onde os neutrófilos têm participação ativa, ajudando a evitar com isto, a destruição do tecido pulmonar.

Especulamos ainda, que os baixos valores de migração encontrados na ausência de droga neste e em outros trabalhos, possam constituir um mecanismo homeostático adaptativo, onde a baixa migração evitaria um afluxo celular excessivo aos tecidos cronicamente inflamados pelos mecanismos de alergia, evitando assim, dano tissular ainda maior, através da liberação de enzimas lisossomais e dos mediadores da inflamação.

Tão pouco, temos elementos para discriminar os mecanismos que levam à uma maior susceptibilidade às infecções em nossos pacientes, pois o comportamento do grupo de doentes portadores de infecções recorrentes do trato respiratório, foi em todo similar àqueles não portadores desta condição, em todos parâmetros aqui analisados.

Entretanto, cremos que estudos clínico-laboratoriais mais aprofundados nestes pacientes, tais como aspectos da neuroimunomodulação, possa contribuir para a compreensão desta susceptibilidade, visto que tais indivíduos estão expostos cronicamente a um "stress" inescapável, o que pode comprometer o desempenho do sistema imunológico a longo prazo. Também, a busca de fatores de supressão da resposta imunológica, devem ser investigados.

RESUMO

E

CONCLUSÕES .

Estudamos 30 crianças portadoras de asma crônica, sendo 16 do sexo feminino e 14 do sexo masculino, 17 portadoras de infecções recorrentes do trato respiratório, cuja idade variou de 5 a 15 anos.

Com o objetivo de identificar alguns fatores de risco com relevância na determinação da maior susceptibilidade às infecções nestes pacientes, bem como os possíveis efeitos inibitórios da teofilina sobre a migração dos fagócitos PMN e MON, fizemos o acompanhamento clínico destes doentes e instituímos o seguinte protocolo de investigação:

(A): constatado o diagnóstico de asma crônica, os pacientes passaram a usar somente teofilina na dose de 20mg/kg/dia, divididas em 4 doses durante 10 dias. Decorrido este prazo, foram coletados os seguintes exames laboratoriais: hemograma; quimiotaxia de PMN e MON; dosagem sérica de imunoglobulinas, complemento, AMPc e teofilina.

(B): após acompanhamento por uma equipe multidisciplinar, na medida que os pacientes apresentassem melhora clínica, a ponto de permanecer 7 dias sem receber qualquer medicação, colhemos os seguintes exames: hemograma, quimiotaxia de PMN e MON; dosagem sérica de AMPc e teofilina.

A análise dos resultados, nos permitiu tirar as seguintes conclusões:

(A): o perfil clínico dos pacientes aqui estudados, é semelhante ao obtido por RIBEIRO, (1987), em outro trabalho realizado neste mesmo serviço.

(B): os níveis séricos das frações C3 e C4, bem como a atividade CH50 do complemento em nossos doentes, estão dentro da normalidade.

(C): os níveis séricos de IgM e IgE estão significativamente elevados quando comparados aos de crianças normais, os níveis de IgG e IgA estão dentro da normalidade, com exceção de um caso onde a IgA sérica estava H

(D): o nível sérico médio de teofilina em nossos doentes é de 10,63 microgras/ml.

(E): as migrações espontânea de PMN e estimulada de PMN e MDN, na ausência do uso terapêutico de teofilina nas doses recomendadas, encontram-se diminuídas em relação aos controles.

(F): a teofilina, provavelmente, exerce um efeito inibitório sobre a migração espontânea e estimulada dos PMN e MDN, pois os baixos valores de migração encontrados na ausência do uso terapêutico da droga foram acentuados ainda mais, quando esta foi utilizada pelos pacientes. Tal efeito, aparentemente não dose dependente, parece se dar sobre as células.

(G): durante o uso da teofilina, os níveis plasmáticos de AMPc encontram-se significativamente elevados.

(H): não há correlação entre os níveis séricos de teofilina e os de AMPc, mostrando uma tendência biológica individual de resposta à droga.

(I): não há correlação entre os níveis séricos de IgE e os valores da migração espontânea ou estimulada dos PMN e MON .

(J): o comportamento dos parâmetros encontrados entre os grupos de pacientes portadores ou não de infecções recorrentes do trato respiratório, foi em todo semelhante neste trabalho, o que não nos permitiu identificar fatores de risco na maior susceptibilidade às infecções.

REFERÊNCIAS

BIBLIOGRÁFICAS.

AKTINS, P. C. & ZWEIMAN, B. - Bronchial asthma-What are those inflammatory cells doing there anyway ? J. Allergy Clin. Immunol., 73: 239-245, 1985.

ALBERT, S. - Aminophylline toxicity. Pediatr. Clin. North America, 34: 61-73, 1987.

ASSEM, E. S. & SCHILD, H. O. - Inhibition by sympathomimetic amines of histamine release by antigen in passively sensitized human lung. Nature (London), 224: 1028-1029, 1969.

AUBIEN, M.; MURCIANO, D. & VIRES, N. - Diaphragmatic contractility enhanced by aminophylline: role of extracellular calcium. J. Appl. Physiol., 54: 460-469, 1983.

BECK, B.; FRUS, B.; HELMAN, C.; PEDERSEN, T. K. & VALERIUS, N. H. - Severe combined immunodeficiency associated with hyperimmunoglobulinemia E, eosinophilia and impaired neutrophil chemotaxis - Acta Paediatr. Scand., 69: 797-801, 1980.

BENVENISTE, J. - Platelet-activating factor, a new mediator of anaphylaxis and immune complex deposition from rabbit and human basophils. Nature (London), 249: 581-582, 1974.

BERG, M. - Immunoglobulin G subclass determination in diagnosis and management of antibody deficiency syndromes. J. Pediatrics, 110: 325-328, 1987.

BERGSTRAND, H. - Phosphodiesterase inhibition and theophylline. Eur. J. Resp. Dis., 61: (suppl. 109), 37-47, 1980.

BJORKANDER, J.; BECKE, B.; OXELIUS, V-A & HANSON, L. A. - Impaired lung function in patients with IgA deficiency and low levels of IgG2 and IgG3. N. Engl. J. Med., 314: 925-928, 1986.

BLUM, R.; GELLER, G. & FISH, L. A. - Recurrent severe staphylococcal infections, eczematoid rash, extreme elevations of IgE, eosinophilia and divergent chemotactic responses in two generations. J. Pediatr., 90: 607-610, 1977.

BORGEAT, P. & SAMUELSSON, B. - Transformation of AA by rabbit PMN leukocytes. J. Biol. Chem., 254: 2643-2646, 1979 (a).

BORGEAT, P. & SAMUELSSON, B. - Arachidonic acid metabolism in PMN leukocytes: unstable intermediate in formation of dihydroxy acids. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 76: 3213-3217, 1979 (b).

BORGEAT, P. & SAMUELSSON, B. - Arachidonic acid metabolism in PMN leukocytes: effects of ionophore A 23187. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 76: 2148-2152, 1979 (c).

BORGEAT, P. & SAMUELSSON, B. - Metabolism of AA in PMN leukocytes. J. Biol. Chem., 254: 7865-7865, 1979 (d).

BOURNE, H. R.; LEHRER, R. I.; CLINE, M. J. & MELMON, K. L. - Cyclic 3',5'-adenosine monophosphate in the human leukocyte: synthesis, degradation and effects on neutrophil candidacida activity. *J. Clin. Invest.*, 50: 920-927, 1971.

BOURNE, H. R.; LICHTENSTEIN, L. M. & MELMON, K. L. - Pharmacologic control of allergic histamine release in vitro : evidence of a inhibitory role of cAMP in human leukocytes. *J. Immunol.*, 106: 695-705, 1972.

BOURNE, H. R.; MELMON, K. L. & LICHTENSTEIN, L. M. - Histamine augments 3',5'- adenosine monophosphate and blocks antigenic histamine release. *Science*, 173: 743-745, 1971.

BOYDEN Jr., S. V. - The chemotatic effect of mixtures of antibody and anmtigen in polymorphonuclear leukocytes. *J Exp. Med.*, 115: 453-466, 1962.

BOYUM, A. - Separation of leukocytes from human blood and bone marrow. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 21: 1-89, 1968.

BROCKLEHURST, W. E. - Response of cavy ileum to SRS-A from lung of man and lung of cavy. *J. Physiol.*, 128: 1P, 1955.

BROCKELEHURST, W. E. - The release of histamine and formation of slow-reacting substance (SRS-A) during anaphylatic shock. *J. Physiol.*, 151: 416-435, 1960.

BRODUS, A. E.; KAMINSKY, N. I.; NORTHCUTT, R.; HARDMAN, J. G.; SUTHERLAND, E. W. & LIDLE, G. W. - Effects of glucagon

monophosphate in plasma and urine. J. Clin. Invest., 48: 2222-2236, 1970.

BRYANT, R. E. & SUTCLIFFE, M. C. - The effect of cAMP granulocyte adhesion. J. Clin. Invest., 50: 920-929, 1971.

BUCLEY, R. H. - Immunology deficiency and allergic disease. In: MIDDLETON, E. (ed.). Allergy Principles and Practice, The C. V. Mosby Co., St. Louis, 1988, pp. 295-311.

BUTCHER, S. W. & SUTHERLAND, E. W. - Adenosine 3',5'-monophosphate in biological materials. I: Purification and properties of cyclic 3',5'-nucleotide phosphodiesterase and use of enzyme to characterize adenosine 3',5'-phosphate in human urine. J. Biol. Chem., 237: 1244- 1250, 1962.

CAIRO-CUETO, S. M.; ESPINOSA-AYALA, J. E. ; LOPY-ROMAN, M. & LUGO, J. C. - Quimiotaxis defectuosa de las células PMN de pacientes con asma bronquial. Arch. Invest. Med. (Mex.), 12: 505-515, 1981.

CARROL, M. P.; DURHAM, S. R.; WALSH, G. & KAY, A. B. - Activation of neutrophils and monocytes after antigen- and histamine-induced bronchoconstriction. J. Allergy Clin. Immunol., 75: 290-294, 1985.

CASEY, P. J. & GILMAN, A. G. - G protein involvement in receptor-effector coupling. J. Biol. Chem., 263: 2577-2580, 1988.

CHIKAZAWA, S.; NUNOI, H.; ENDO, F.; MATSUDA, I. & HONDA, M.
- Hyperimmunoglobulinemia E associated recurrent infections
syndrome accompanied by chemotactic inhibition of PMN
leucocytes and monocytes. *Pediatr. Research*, 18: 365-369,
1984.

CHISARI, F. V. & EDGUNTON, T. S. - Human T Lymphocyte E
rosette function. A process modulated by intracellular cAMP.
J. Exp. Med., 140:1122-1133, 1974.

CHURCH, J. A.; FRENKEL, L. D.; WRIGHT, D. G. & BELLANTI, J.
A. - T lymphocyte disfunction, hyperimmunoglobulinemia E,
recurrent bacterial infections, and defective neutrophil
chemotaxis in a Negro child. *J. Pediatr.*, 88: 982-990, 1976.

CLARCK, R. A.; ROOT, R. K.; KIMBALL, H. R. & KIRKPATRICK, C.
H. - Defective neutrophil chemotaxis and cellular immunity
in a child with recurrent infections. *Amer. J. Med.*, 78:
515-517, 1974.

COX, J. P. & KARNOVSKY, M. L. - The depression of
phagocytosis by exogenous cyclic nucleotides, prostaglandins
and theophylline. *J. Cell. Biol.*, 231: 131-139, 1971.

CRONSTEIN, B. N.; KRAMER, S. B.; WEISSMAN, G. & HIRSCHHORN,
R. - Adenosine: a physiological modulator of superoxide
anion generation by human neutrophils. *J. Exp. Med.*, 158:
1160-1177, 1983.

CRONSTEIN, B. N.; ROSENSTEIN, E. D.; KRAMER, S. B.; WEISSMAN, G. & HIRSCHHORN, R. - Adenosine: a physiological modulator of superoxide anion generation by human neutrophils. Adenosine acts via A2 receptors on human neutrophils. *J. Immunol.*, 135: 1366-1371, 1985.

DAMLE, N. K. & GUPTA, S. - Autologus Mixed Lymphocyte Reaction in Man. III: Regulation of autologus MLR by theophylline-resistant and -sensitive human T lymphocyte subpopulations. *Scand. J. Immunol.*, 15: 493-499, 1982.

De-CREE, J.; EMMERY, L.; TIMMERMAN, S. J.; EECKELS, R.; De-COCK, W. & VERHAGGEN, H. - Defective neutrophil chemotaxis and raised serum IgE levels in a child with recurrH bacterial infections and eczema. Influence of levamisol. *Arch. Dis. Child.*, 53: 144-146, 1978.

De-SHAZO, R. D.; HOSE, T.; WRIGHT, D. G. & DIEM, J. E. - Evidence for histamine-mediated inhibition of monocyte chemotaxis in atopic dermatitis. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 69: 429-434, 1982.

DESSAINT, J. P.; TORPIER, G. & CAPRON, M. - Cytophylic binding of IgE to the macrophage. *Cell. Immunol.*, 46: 12-16, 1979.

ERLICH, A. & MATTISON, T. D. - A serum inhibitor of neutrophil chemotaxis associated with hyperimmunoglobulinemia E in a patient whith lymphoma and

recurrent skin infection. Brit. J. Dermatol., 110: 709-715, 1984.

ELLIS, E. F. - Asthma in infancy and childhood. In: MIDDLETON, E. (ed.). Allergy Principles and Practice, The C. V. Mosby Co., St. Louis, 1988, pp. 1037-1062.

FISHER, T. J.; SHERRIE, E.; GARD, S. E.; RACHELEFSKY, G. S.; KLEIN, R. B.; BORUT, T. C. & STIEHM, R. - Monocyte chemotaxis under agarose: defects in atopic disease, aspirin therapy, and mucocutaneous candidiasis. *Pediatr. Res.*, 14: 242-246, 1980.

FLOCKHART, D. A. & CORBIN, J. D. - Regulatory mechanisms in the control of protein kinases. *CRC Crit. Rev. Biochem.*, 12: 133-186, 1982.

FONTAN, G.; LORENTE, F.; GARCIA-RODRIGUEZ, M. C. & DJEDO, J. A. - Defective neutrophil chemotaxis and hyperimmunoglobulinemia E. A reversible defect? *Acta paediatr. Scand.*, 65: 509-513, 1976.

FORD-HUTCHINSON, A. W.; BRAY, M. A. & DOIG, M. V. - Leukotriene B₄, a potent chemotactic and aggregating substance release from PMN leukocytes. *Nature*, 286: 264-269, 1980.

FOWLER, A. A., III & SCHWARTZ, L. B. - Macrophage derived chemotactic factors and allergic asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 74: 777-782, 1984.

FREDHOLM, B. B. - Theophylline actions and adenosine receptors. *Eur. J. Resp. Dis.*, 109: 29-36, 1980.

FRIEDENBERG, W. R.; MARX, J. J.; HANSEN, R. L. & HASELBY, R. C. - Hyperimmunoglobulinemia E syndrome. Response to transfer factors and ascorbi to therapy. *Clin. Immunol. Immunopathol.*, 12: 132-140, 1979.

FRIGAS, E.; LOEGERING, D. A. & GLEICH, G. J. - Cytotoxic effects of the guinea pig eosinophil major basic protein on tracheal epithelium. *Lab. Invest.*, 42: 35-40, 1980.

FROCHTMAN, R.; VINAS, J.; RODRIGUEZ, J. L. & GARCIA, R. - Immunoglobulinas en el asma bronquial. *Rev. Clin. Esp.*, 122: 323-326, 1971.

GALLI, E.; ROSSI, P.; FIORE, L.; PERLINI, R.; CELIBONI, F.; BETTI, C.; & BUSINCO, L. - IgE levels and PMN chemotaxis in atopic dermatitis. *Allergol. Immunopathol. (Madrid)*, 11: 189-194, 1983.

GALLIN, J. L. - Disorders of phagocyte chemotaxis. *Ann. Int. Med.*, 11: 520-538, 1980.

GAMMON, W. R. - Phagocyte Chemotaxis. *The J. Inv. Dermatol.*, 73: 515-520, 1979.

GARDETTE, J.; MARGELIN, J. C.; MAZIERE, J. C.; BERTRAND, J. & PICARD, J. - Effect of dibutyryl cAMP and theophylline on lipoprotein lipase secretion by human monocyte-derived macrophages. *FEBS Letters*, 225: 178-182, 1987.

- GAZANSHAH, S.; TOWNEY, R.; CHAPARONE, E. & VILLACORTE, G. - T and B lymphocyte rosettes in bronchial asthma. *Ann. Allergy*, 36: 324-333, 1976.
- GILMAN, A. G. - G proteins: transducers of receptor-generated signals. *Annu. Rev. Biochem.*, 56: 615-649, 1987.
- GLEICH, G. J.; FRIGAS, E. & LOERING, D. A. - Cytotoxic properties of the eosinophils major basic protein. *J. Immunol.*, 123: 2925-2929, 1979.
- GROVE, D. I.; BRUSTON, T. O.; WELLBY, M. L.; MUNROFORD, R. & FORBES, I. J. - Humoral and cellular immunity in asthma. *J. Allergy*, 55: 152-162, 1975.
- HENDELES, L.; BIGHLEY, L.; RICHARDSON, R. H.; HEPLER, C. D. & CARMICHAEL, J. - Frequent toxicity from IV aminophylline infusions in critically ill patients. *Drug Intell. Clin. Pharm.*, 11: 12-19, 1977.
- HENDELES, L.; MASSANARI, M. & WEINBERGER, M. - Theophylline. In: MIDDLETON, E. (ed.). Allergy Principles and Practice, The C. V. Mosby Co., St. Louis, 1988, pp. 673-714.
- HENNEY, C. S.; BOURNE, H. R. & LICHTENSTEIN, L. M. - The role of cAMP in the specific cytotoxic activity of lymphocytes. *J. Immunol.*, 108: 1526-1534, 1972.
- HIGBEE, M. D. H.; KUMAR, M. & GALANT, S. P. - Stimulation of endogenous catecholamine release by theophylline: a proposed

additional mechanism of action for theophylline effects. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 70: 377-382, 1982.

HILL, H. R.; ESTENSON, R. D.; HOJAN, N. A. & QUIE, P. G. - Severe staphylococcal disease associated with allergic manifestations, hyperimmunoglobulinemia E, and defective neutrophil chemotaxis. *J. Lab. Clin. Med.*, 88: 796-802, 1976.

HILL, H. R.; OCHS, H. D.; QUIE, P. G.; CLARCK, M. A.; PABST, I. F. KLEBANOFF, S. J. & WEDGWOOD, R. J. - Defect in neutrophil granulocyte chemotaxis in Jacob's syndrome of recurrent "cold" staphylococcal abscesses. *Lancet*, 2: 617-619, 1974.

HILL, H. R. & QUIE, P. G. - Raised serum IgE levels and defective neutrophil chemotaxis in three children with eczema and recurrent bacterial infections. *Lancet*, I: 183-186, 1974.

HILL, H. R.; WILLIAMS, P. B.; KRUEGER, G. G. & JANIS, B. - Recurrent staphylococcal disease associated with defective neutrophil chemotaxis and allergic rhinitis. *Ann. Intern. Med.*, 85: 39-42, 1976.

HILL, L. W. (ed.). The Treatment of Eczema in Infants and Children, The C. V. Mosby Co., St. Louis, 1956, pp. 69-78.

HOLTZMAN, M. J.; FABRI, L. M. & O'BYRNE, P. M. - Importance of airway inflammation for hyperresponsiveness induced by ozone. *Am. Rev. Resp. Dis.*, 127: 686-690, 1983.

HORN, B. R.; ROBIN, E. D.; THEODORE, J. & Van KESSEL, A. - Total eosinophil counts in the management of bronchial asthma. *N. Engl. J. Med.*, 292: 1152-1154, 1975.

HORROBIN, D. F.; MARKU, M. S. & FRANDS, D. J. - Methylxantine phosphodiesterase inhibitors behave as prostaglandin antagonists in a perfused rat mesenteric artery preparation. *Prostaglandins*, 13: 33-40, 1977.

ISHIZAKA, T.; ISHIZAKA, K.; ORANGE, R. P. & AUSTEN, K. F. - Pharmacologic inhibition of the antigen-induced release of histamine and SRS from monkey lung tissues mediated by human IgE. *J. Immunol.*, 106: 1267-1273, 1971.

ISSEKUTZ, A. C.; LEE, K. Y. & BIGGAR, W. D. - Neutrophil chemotaxis in two patients with recurrent staphylococcal skin infections and hyperimmunoglobulinemia. *E. J. Lab. Clin. Med.*, 92: 640-642, 1979.

JACOBS, J. C. & NORMAN, M. E. - A familial defect of neutrophil chemotaxis with asthma, eczema and recurrent skin infections. *Pediatr. Res.*, 11: 732-734, 1977.

JENNE, J. W., WYZE, A. & ROOD, F. S. - Pharmacokinetics of theophylline application to adjustment of the clinical dose of aminophylline. *Clin. Pharmacol. Ther.*, 13: 349-356, 1972.

- JOHANSON, S. G. O. - In vitro diagnosis of reagin-mediated allergic diseases. *Allergy*, 33: 292-298, 1978.
- JOLLEY, M. E.; STROUPE, S. D.; SCHWENZER, K. S.; WANG, C. J.; LU-STEFER, M.; HILL, M. D.; POPELKA, S. R.; HALEN, J. T. & KELSO, D. M. Fluorescence Polarization Immunoassay. III: An automated system for therapeutic drug determination. *Clin. Chem.* 27: 1575-1579, 1981.
- JORG, A.; HENDERSON, W. R.; MURPHY, R. C. & KLEBANOFF, S. J. - Leukotriene generation by eosinophils. *J. Exp. Med.*, 155: 390-398, 1982.
- JOSEPH, M.; TONNEL, A. B. & TOPIER, G. - Involvement of IgE in the secretory process of alveolar macrophages from asthmatic patients. *J. Clin. Invest.*, 71: 221-227, 1983.
- KABAT, M. & MAYER, M. (ed.). Experimental Immunochimistry. Charles C. Thomas Publisher, Springfield, 1961, pp. 80-88.
- KAMMER, G. M. - The adenylate cyclase-cAMP-protein kinase A pathway and regulation of immune response. *Immunol. Today*, 9: 222-229, 1988.
- KAPLAN, S. S.; CALIGUIRI, L. A.; BEFORD, R. E. & ZDWANSKI, B. S. - Transient chemotactic defect in a child with elevated IgE - *Annals of Allergy*, 59: 213-217, 1987.
- KELLER, H. U.; WILKINSON, P. C.; ABERCROMBIE, M.; BECKER, E. L.; HIRSCH, J. G.; MILLER, M. E.; RAMSEY, W. S. & ZIGMOND, S. H. - A proposal for the definition of terms related to

locomotion of leukocytes and other cells. Clin. Exp. Immunol., 27: 377-380, 1977.

KJELMAN, N. I. M.; JOHANSON, S. G. O. & ROTH, A. - Serum IgE levels in healthy children quantified by a sandwich technique (PRIST). Clin. Allergy, 6: 51-57, 1976.

KRAEPELIN, S.; ENGSTROM, I. & KARLBY, P. - Respiratory studies in children. II: Lung volumes in symptom-free asthmatic children 6-14 years of age. Acta Paediatr., 47: 399-410, 1958.

KREBS, E. G. & BEAVO, J. A. - Phosphorilation-dephosphorilation of enzymes. Ann. Rev. Biochem., 48: 923-959, 1979.

KYONG, C. V.; PONCE, B. E.; FUNDEBERG, H. H.; GLASMAN, A. B. & MOHRMANN, M. E. - Bacterial capacity of polymorphonuclear leukocytes from patients receiving theophylline therapy. J. Allergy Clin. Immunol., 69: 444-447, 1982.

LACKIE, J. M. - The aggregation of rabbit polymorphonuclear leukocytes: effect of antimitotic agents, cyclic nucleotide and methylxantines. J. Cell. Sci., 16: 167-174, 1974.

LEVY, G. & KOYSOOKO, R. - Pharmacokinetic analysis of the effect of theophylline on pulmonary function in asthmatic children. J. Pediatr., 86: 798-797, 1975.

LICHTENSTEIN, L. M.; HENNEY, C. S.; BOURNE, H. R. & GREENOUGH, W. D. - Effects of cholera toxin on "in vitro"

models of mediated and delayed hypersensitivity. Further evidence for the role of cAMP. *J. Clin. Invest.*, 52: 691-697, 1973.

LICHTENSTEIN, L. M. & MARGOLIS, S. - Histamine release "in vitro" inhibition by catecholamines and methylxantines. *Science*, 161: 902-903, 1968.

LIN, M. S.; RABIN, B. S.; LAVENE, R. & FIREMAN, P. - Hyper-IgM-immunoglobulinemia in children with bronchial asthma. *The J. pediatr.*, 91: 222-227, 1977.

LINDGREN, B. R.; ANDERSON, C. G. & BRUNDIN, A. - Changes in histamine and cyclic nucleotide levels after bronchoprovocation in patients with extrinsic asthma. *Scand. J. Resp.*, 59: 333-339, 1979.

LOHMAN, S. M. & WALTER, U. - Regulation of the cellular and subcellular concentrations and distribution of cyclic nucleotide-dependent protein kinases. *Adv. Cyclic Nucleotide Prot. Phosphorylation Res.*, 18: 63-117, 1984.

MANCINI, M.; CARBONARA, J. & HEREMAN, W. - Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion. *Immunochemistry*, 2: 235-255, 1965.

MARSH, W. R.; IRVIN, C. G. & MURPHY, K. R. - Increases in airway reactivity to histamine and inflammatory in bronchoalveolar lavage after the late asthmatic response in an animal model. *Am. Rev. Resp. Dis.*, 131: 875-879, 1985.

MATSUMOTO, T.; GOTOH, Y. NARUKAMI, H.; MIYAMOTO, Y. & HONDA, M. - Case report: a hyperimmunoglobulinemia E syndrome with serum inhibitor against immune functions. *Ann. Allergy*, 46: 86-90, 1981.

McWILLIAMS, B. C.; MENENDEZ, R. & KELLY, H. W. - Effects of theophylline on inhaled methacoline and histamine on asthmatic children. *Am. Rev. Resp. Dis.*, 130: 193-198, 1984.

MELMON, K. L.; BOURNE, H. R. & WEINSTEIN, Y. - Hemolytic plaque formation by leukocytes "in vitro". Control by vasoactive hormones. *J. Clin. Invest.*, 53: 13-21, 1974.

METZGER, W. J.; MOSELEY, P. & NUGENT, K. - Local antigen challenge and bronchoalveolar lavage of allergic asthmatic lungs. *Chest*, 87: 1158-1161, 1985.

MIECH, R. P.; NIEDZWICKE, J. G. & SMITH, T. R. - Effect, of theophylline on the binding of cAMP to soluble protein from tracheal smooth muscle. *Boichem. Pharmacol.*, 28: 3687-3691, 1979.

MING, S. L.; RABIN, B. S.; LANEVE, R. & FIREMAN, P. - Hyperimmunoglobulinemia M in children with bronchial asthma. *J. Pediatr.*, 91: 222-227, 1977.

MINORMINOR, T. E.; BACKER, J. W. & DICK, E. C. - Greater frequency of viral respiratory infections in asthmatic children as compared with their nonasthmatic siblings. *J. Pediatr.*, 85: 472-482, 1974.

MURCIANO, D.; AUBIER, M. & LECOCGRINIC, Y. - Effects of theophylline on diaphragmatic strength and fatigue in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *N. Engl. J. Med.*, 311: 349-356, 1984.

NACLERIO, R. M.; BARTENFELDER, D.; PROUD, D.; TOGIAS, A. G.; MEYERS, D. A.; SOBOTKA, A. K.; NORMAN, P. S. & LICHTENSTEIN, L. M. - Theophylline reduces histamine release during pollen-induced rhinitis. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 78: 874-876, 1986.

NAGY, L. - Serum neutrophil chemotatic activity and leukocyte count after house dust induced bronchospasm. *Eur. J. Resp. Dis.*, 62: 198-203, 1981.

NAGY, L.; LEE, T. H. & GOETZL, E. J. - Complement receptor enhancement and chemotaxis of human neutrophils and eosinophils by leukotrienes and other lipoxygenase products. *Clin. Exp. Immunol.*, 47: 541-547, 1982.

NASPITZ, C. K.; SOLÉ, D.; CARNEIRO-SAMPAIO, M. M. S. & GONZALES, C. H. - Níveis séricos de IgG, IgM e IgA de crianças brasileiras normais. *J. Pediatria*, 62: 121-126, 1982.

NIEJENS, H. J.; RAATGEEP, R. F.; DENHARI, H. S.; DUVERMAN, E. J.; KERREBYN, K. F. - Alters leukocyte response in relation to the basic abnormality in children with asthma and bronchial hyperresponsiveness. *Am. Rev. Resp. Dis.*, 130: 744-747, 1985.

NIELSON, C. P.; CROWLEY, J. L.; CURSACK, B. & VESTAL, R. E. - Therapeutic concentrations of theophylline and emprophylline potentiate cathechoalmine effects and inhibit leukocyte activation. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 78: 660-667, 1986.

NIELSON, C. P.; CROWLEY, J. L.; MORGAN, M. E. & VESTAL, R. E. - Polymorphonuclear leukocyte inhibition by therapeutic concentrations of theophylline is mediated by 3',5'-adenosine monophosphate. *Am. Rev. Resp. Dis.*, 137: 25-30, 1988.

NORMAN, M. E.; GALL, E. P. & TAYLOR, A. - Serum complement profiles in infants and children. *J. Pediatr.*, 87: 912-916, 1975.

NYE, L.; MENETT, T. G.; LANDON, J. & WHITE, R. J. - A detailed investigation of circulating IgE in a normal population. *Clin. Allergy*, 1: 13-21, 1975.

O'BYRNE, P. M.; WALTERS, E. H. & AIZAWA, H. - Indomethacin inhibit the airway hyppresponsiveness but not the neutrophil influx induced by ozone in dogs. *Am. Rev. Resp. Dis.*, 130: 220-225, 1984.

O'DONNELL, M. C.; ACKRMAN, S. J.; GLEICH, G. J. & THOMAS, L. L. - Activation of basophil and mast cell histamine release by eosinophil granule major basic protein. *J. Exp. Med.*, 157: 1981- 1990, 1983.

O'FLAHERTY, J. T. & WYCLE, R. L. - Biology and biochemistry of platelet-activating factor. Clin. Rev. Allergy, 1: 353-363, 1983.

OLIVEIRA-LIMA, A. & DIAS-DA-SILVA, W. - Apêndice. In: -----
----- (eds.). Imunologia, Imunopatologia e
Alergia - Métodos. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro, 1970,
p. 167.

ORTEGA, J. J.; FELIU, E.; ESPANOL, T. & CARDELACH, F. -
Hyperimmunoglobulinemia E y quimiotaxis defectuosa
asociados a infecciones bacterianas recurrentes y asthma.
Sangre (Barc.), 25: 231-239, 1980.

OU, C. N.; FRAWLEY, V. L. & BUFFONE, G. L. - Optimization of
EMIT reagent system using a COBAS-BIO centrifugal analyser.
J. Anal. Toxicol., 5: 249-252, 1981.

PINCUS, S. H.; THOMAS, I. T.; CLARCK, R. A. & OCHS, H. D. -
Defective neutrophil chemotaxis with variant ichthiosis,
hyperimmunoglobulinemia E and recurrent infections. J.
Pediatr., 87: 908-911, 1975.

POLSON, J. B.; KRZANOWSKI, J. J.; GOLDMAN, A. L. &
SZENTIVANY, A. - Inhibition of human pulmonary
phosphodiesterase activity related to cell density. Clin.
Exp. Pharmacol. Physiol., 5: 539-549, 1978.

PRIN, C.; CHARON, J. & CAPRON, M. - Heterogeneity of human
eosinophils. II: Variability of respiratory burst activity

related to cell density. Clin. Exper. Immunol., 57: 735-739, 1984.

RIBEIRO, J. D. - Asma Brônquica an Infância: Associação entre Comprtamento Clínico-Laboratorial e Severidade. Campinas- SP, 1987. (Dissertação de Mestrado - Universidade Estadual de Campinas).

ROSE, F. R.; HIRSCHORN, R.; WEISSMANN, G. & CRONSTEIN, B. N. - Adenosine promotes neutophil chemotaxis. J. Exp. Med., 167: 1186-1194, 1988.

SCHULTZ, L. A.; KAMMER, G. M. & RUDOLPH, S. A. - Characterization of the human T lymphocyte adenosine receptor: comparison of normal and SLE cells. FASEB J., 2: 244-250, 1988.

SCORDAMAGLIA, A.; CIPRANDI, G.; RUFFONI, S.; CARIA, M.; PAOLERI, F.; VENUTI, D. & CANONINA, G. W. - Theophylline and the immune response: "in vitro" and "in vivo" effects. Clin. Immunol. and Immunopathol., 48: 238-246, 1988.

SHORE, A.; DOCH, H. M. & GELFAND, E. W. - Induction and separation of antigen-dependent T helper and supressor cells in man. Nture (London), 274: 586-589, 1978.

SOLIGO, D.; LAMBERTENGI-DELLILERS, G.; CAPSONE, F.; VILLA, M.; NERI, A.; PARACHI, M.; BENAZZI, E.; VALENTI, F. & POLLI, E. - Defective granulocyte chemotaxis and natural killer

activity in a patient with recurrent infections. J. Clin. Lab. Immunol., 21: 49-53, 1986.

STEVENS, W. J.; BACKER, W. & VERMEIRE, P. AP. - Serum IgA, IgG and IgM and IgD in allergic (type I) and non-allergic respiratory diseases. Clin. Allergy, 13: 11-19, 1983.

TERNOWITZ, T. & HERLIN, T. - Defective monocyte and polymorphonuclear leukocyte chemotaxis and clinical characteristics in atopic dermatitis. Arch. Dermatol. Res., 278: 454-459, 1987.

TOVEY, K. C.; OLDHAM, K. G. & WHILAN, J. A. M. - A simple direct assay for cAMP in plasma and other biological samples using an improved competitive binding technique. Clin. Chim. Acta, 56: 221-234, 1974.

TSE, R. L.; PHELPS, P. & URBAN, D. - Polymorphonuclear Leukocyte Mobility "in vitro". VI: Effect of purine and pyrimidine analogues. Possible roles cAMP. J. Lab. Clin. Med., 80: 264-270, 1972.

TURNER-WARWICK, M. - Study of theophylline plasma levels after oral administration of new theophylline compounds. Br. Med. J., 2: 67-77, 1957.

VALERIUS, N. H. - Chemotaxis of neutrophil granulocytes. Danish Medical Bulletin, 31: 458-474, 1984.

VAN SCOY, R. E.; HILL, H. R.; RITTS, R. E. & QUIE, P. G. - Familial neutrophil chemotaxis defect, recurrent bacterial

infections, mucocutaneous candidiasis and hyperimmunoglobulinemia E. *Ann. Intern. Med.*, 82: 766-769, 1975.

VENGE, P.; DAHL, R.; HAKANSON, L. & PETTERSEN, R. - Generation of heat-labile chemotactic activity in blood after inhalation challenge and its relationship to neutrophil and macrophage/monocyte turnover activity. *Allergy*, 37: 55-62, 1982.

VILELA, M. M. S. - Fagocitose em Crianças com Doença Falciforme. Campinas - SP, 1985. (Tese de Doutorado - Universidade Estadual de Campinas).

WEIDNER, N.; DITZLER, D. N.; LANDERSON, J. H.; KESSLER, G.; LARSON, L.; SMITH, C. H.; JAMES, T. & McDONALD, J. M. - A clinically applicable HPLC method for measurement of serum theophylline with detailed evaluation of interferences. *Am. J. Clin. Pathol.*, 73: 79-86, 1980.

WEINBERGER, M. - The pharmacology and therapeutic use of theophylline. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 73: 525-540, 1984.

WEISSMAN, G.; DUKOR, P. & ZURIER, R. B. - Effect of cyclic AMP on release of lysosomal enzymes from phagocytes. *Nature New Biology*, 231: 131-141, 1971.

WESTPHAL, O. - Antigens III immunochemical fractionation of antigens. In: KWAPINSKY, J. B. (ed.). Methods of

Serological Research, John Willey & Sons, Inc. New York, London, Sydney, 1965, pp. 59-65.

WETH, V. G.; KOCH, H. & HAUBITZ, J. - Verhalten des Second Messenger cAMP im Status Asthmaticus vor und nach Gabe von Theophyllin-Ethyllendiamin. *Arzneim. Forsch. / Drug Res.*, 35: 1859-1862, 1985.

WIEMER, G.; KAIZER, G.; DIETZ, J.; REINHART, M.; WELLSTEIN, H. & PALM, D. - Dessensitization of the beta-adrenoceptor-adenylate cyclase system of erythrocytes by "in vivo" treatment of rats with isoprenaline. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, 317: 294-301, 1981.

WOLBERG, G.; ZIMMERMANN, T. P.; HIEMSTRA, K.; WINSTON, M. & CHU, L-C - Adenosine inhibition of lymphocyte-mediated cytolyse: possible role of cAMP. *Science*, 187: 957-959, 1975.

YMAN, L.; ROOSDORP, N.; SCHROEDER, H. & ANDRAE, M.L. - Methods for the determination of IgE and allergen-specific antibodies. 1980 Internatonal Allergy Symposium. *Excerpta Medica*, 43: 74-83, 1981.

YODA, S.; MOROZAWA, H.; KOMJAMA, A. & AKABANE, T. - Transient "lazy-leukocyte" syndrome during infancy. *Am. J. Dis. Child.*, 134: 467-469, 1980.

ZIGMOND, S. H. - Ability of polymorphonuclear leukocytes to orient in gradients of chemotatic factors. J. Cell. Biol., 75: 606-616, 1977.

ZURIER, R. B.; WEISSMAN, G.; HOFFESTEIN, S.; TAI, H. H. & KAMMERMAN, S. - Mechanisms of lysosomal enzyme release from human leukocytes. J. Clin. Invest., 53: 297-309, 1974.

APÊNDICE

IDENTIFICAÇÃO DOS PACIENTES

ORDEM	NOME	SEXO	COR	NASCIMENTO	PROCEDÊNCIA
1	A. A. B. A.	FEM.	BRANCA	30/05/75	CAMPINAS
2	C. M. R.	FEM.	BRANCA	04/03/77	CAMPINAS
3	R. C.	MASC.	BRANCA	24/08/78	C. VERDE-MG
4	V. C. S.	FEM.	PRETA	17/05/73	S. B. D'ESTE
5	P. E. S.	MASC.	BRANCA	03/10/80	CONCHAL
6	A. C. L.	MASC.	BRANCA	21/11/75	CAMPINAS
7	T. M. L.	FEM.	BRANCA	26/07/80	CAMPINAS
8	S. A. B.	FEM.	PRETA	19/11/81	CAPIVARI
9	E. S.	MASC.	BRANCA	17/10/75	CAMPINAS
10	E. C. M.	MASC.	BRANCA	03/04/77	ITU
11	R. M. S.	FEM.	BRANCA	20/06/79	SUMARÉ
12	D. O. A.	MASC.	BRANCA	07/08/81	NOVA ODESSA
13	M. R. L.	MASC.	BRANCA	05/07/78	CAMPINAS
14	E. S. B.	FEM.	BRANCA	11/07/78	CAMPINAS
15	A. H. S.	MASC.	BRANCA	30/08/82	VALINHOS
16	E. M. O.	FEM.	PRETA	28/07/79	CAMPINAS
17	E. L. S. M.	FEM.	BRANCA	29/03/83	CAMPINAS
18	F. H. R.	MASC.	BRANCA	24/05/77	CAMPINAS
19	M. C. E. R.	MASC.	BRANCA	25/05/73	CAMPINAS
20	E. A. M.	FEM.	BRANCA	19/02/77	RIO CLARO
21	C. B. A.	FEM.	BRANCA	24/02/82	CAMPINAS
22	M. C. B.	MASC.	BRANCA	13/04/80	CAMPINAS
23	M. R. P.	FEM.	BRANCA	26/02/82	CAMPINAS
24	P. R. Z.	MASC.	BRANCA	28/02/79	CAMPINAS
25	R. C. R.	MASC.	PRETA	02/12/73	PAULÍNIA
26	A. M. A.	MASC.	BRANCA	23/02/77	INDAIATUBA
27	T. C. G.	FEM.	BRANCA	10/11/78	CAMPINAS
28	Z. P.	FEM.	BRANCA	26/03/75	MOGI GUACU
29	P. M. V.	FEM.	BRANCA	10/11/81	PAULÍNIA
30	A. M.	FEM.	BRANCA	09/04/82	PAULÍNIA

NÍVEIS SÉRICOS DAS FRAÇÕES C3, C4 E ATIVIDADE CH50 DO
 COMPLEMENTO EM CRIANÇAS COM ASMA CRÔNICA.

PACIENTES	CH50 *	C3**	C4**
1	166,00	1,25	0,46
2	111,00	1,30	0,27
3	121,00	1,20	0,60
4	111,00	0,60	0,20
5	61,00	0,90	0,47
6	136,00	1,00	0,48
7	133,00	1,35	0,46
8	175,00	1,10	0,70
9	232,00	1,35	0,44
10	166,00	1,20	0,50
11	200,00	1,35	0,32
12	128,00	0,95	0,26
13	125,00	1,20	0,48
14	133,00	1,00	0,34
15	185,00	0,95	0,28
16	75,00	1,50	0,57
17	144,00	1,10	0,46
18	151,00	1,15	0,60
19	168,00	1,22	0,36
20	158,00	1,34	0,26
21	118,00	0,80	0,38
22	160,00	1,45	0,55
23	149,00	1,20	0,40
24	166,00	1,15	0,24
25	150,00	1,10	0,38
26	108,00	1,10	0,33
27	147,00	1,15	0,28
28	125,00	1,10	0,43
29	181,00	1,20	0,37
30	117,00	1,30	0,42

* VALORES EM UNIDADES DE HEMÓLISE.

** VALORES EM g/dl.

VALORES DOS NÍVEIS SÉRICOS DAS IMUNOGLOBULINAS: IgA, IgM, IgG e IgE EM CRIANÇAS PORTADORAS DE ASMA CRÔNICA.

PACIENTES //	IgA*	IgM*	IgG*	IgE**
1	190,00	180,00	1450,00	4110,00
2	150,00	280,00	1250,00	1243,00
3	270,00	290,00	1550,00	1644,00
4	210,00	365,00	1150,00	137,00
5	240,00	160,00	1400,00	5250,00
6	210,00	190,00	1450,00	3400,00
7	115,00	270,00	1250,00	420,00
8	160,00	180,00	1500,00	660,00
9	390,00	190,00	1300,00	192,00
10	210,00	220,00	1450,00	1160,00
11	170,00	230,00	1550,00	1333,00
12	190,00	165,00	1550,00	730,00
13	240,00	250,00	1250,00	1410,00
14	150,00	265,00	1150,00	1500,00
15	60,00	155,00	1200,00	1492,00
16	230,00	280,00	1850,00	10800,00
17	150,00	370,00	1700,00	7250,00
18	000,00	230,00	2250,00	6250,00
19	270,00	180,00	1350,00	1520,00
20	160,00	170,00	1103,00	1250,00
21	250,00	186,00	1280,00	1380,00
22	300,00	330,00	1400,00	8750,00
23	160,00	400,00	1150,00	1680,00
24	270,00	200,00	1300,00	1937,00
25	290,00	210,00	1100,00	1850,00
26	310,00	300,00	950,00	4550,00
27	105,00	365,00	850,00	730,00
28	150,00	270,00	1200,00	1900,00
29	150,00	230,00	1150,00	620,00
30	190,00	390,00	1550,00	480,00

VALORES EXPRESSOS EM MG/ML.

VALORES EXPRESSOS EM UI/ML.

NÍVEIS SÉRICOS DE TEOFILINA E DE AMP CÍCLICO SOB USO OU NÃO DESTA DROGA, EM CRIANÇAS COM ASMA CRÔNICA.

PACIENTES	AMPc * COM DROGA	AMPc * SEM DROGA	TEOFILINA **
1	63,00	21,20	13,00
2	36,20	34,80	13,00
3	66,80	37,40	16,00
4	30,60	27,80	18,00
5	62,60	44,00	13,00
6	43,40	29,00	15,00
7	35,40	50,40	10,00
8	61,60	21,80	11,00
9	32,80	12,60	9,00
10	16,00	33,60	9,00
11	61,40	24,40	7,00
12	73,40	39,00	6,00
13	37,20	48,40	9,00
14	9,60	15,60	7,00
15	36,00	11,00	6,00
16	41,60	55,60	9,00
17	69,20	72,20	9,00
18	33,40	47,40	6,00
19	70,60	28,80	8,00
20	30,80	11,40	7,00
21	DESCONHECIDO	DESCONHECIDO	9,00
22	47,40	27,60	23,50
23	36,80	20,40	14,00
24	DESCONHECIDO	DESCONHECIDO	13,50
25	36,00	17,60	11,20
26	DESCONHECIDO	DESCONHECIDO	2,00
27	DESCONHECIDO	DESCONHECIDO	16,70
28	31,60	13,00	12,00
29	DESCONHECIDO	DESCONHECIDO	4,00
30	DESCONHECIDO	DESCONHECIDO	12,00

* VALORES EM pmol/ml.

** VALORES EM microg/ml.

CONTAGEM TOTAL DOS LEUCÓCITOS DO SANGUE PERIFÉRICO EM CRIANÇAS COM ASMA CRÔNICA DURANTE O USO OU NÃO DE TEOFILINA.

PACIENTES	LEUCÓCITOS COM DROGA	LEUCÓCITOS SEM DROGA
1	13100	7500
2	6600	8550
3	9000	8100
4	4300	4000
5	9550	5000
6	5800	6900
7	5950	5300
8	7900	6200
9	12700	6300
10	14200	8100
11	6000	8900
12	10500	8700
13	9500	7300
14	5150	4200
15	9400	7000
16	5400	5800
17	7200	6600
18	7700	6400
19	7000	7500
20	10550	7700
21	9300	8850
22	9000	8700
23	9000	7400
24	4100	3700
25	10500	6400
26	7100	8400
27	8600	9000
28	10000	12800
29	7100	7500
30	8900	6900

VALORES DA MIGRAÇÃO ESPONTÂNEA (DETERMINADA EM MEIO DE HANKS) E ESTIMULADA (DETERMINADA EM "POOL" DE SOROS NORMAIS OU INDIVIDUALMENTE NO SORO DO DOENTE, PREVIAMENTE INCUBADOS COM LPS) DE PMN E MON DE CRIANÇAS COM ASMA CRÔNICA, DURANTE O USO DE TEOFILINA. *

PAC. /	PMN MEIO	PMN SNL	PMN SP / /	MON MEIO	MON SNL	MON SP
1	19,20	94,62	105,62	19,17	83,82	78,17
2	26,07	111,20	117,12	19,12	89,10	73,40
3	32,87	125,30	120,52	18,62	89,05	74,97
4	29,82	109,17	101,87	19,07	77,72	79,22
5	12,95	119,20	110,30	21,25	90,72	93,25
6	9,92	88,57	110,77	7,45	81,37	72,85
7	16,30	121,00	119,35	17,45	116,45	97,62
8	18,15	101,00	112,97	32,25	95,27	102,72
9	38,62	124,82	129,27	40,12	71,15	77,30
10	12,35	82,67	88,67	33,90	59,47	61,05
11	18,02	120,85	110,00	18,72	74,90	72,40
12	10,30	63,15	55,92	17,02	100,47	60,27
13	16,62	80,75	72,60	19,40	68,57	74,27
14	12,60	72,40	88,32	25,15	66,17	59,95
15	11,37	92,22	98,12	14,27	58,12	54,15
16	18,15	112,20	117,02	20,72	99,50	96,80
17	16,72	110,15	121,30	18,32	94,25	74,60
18	23,45	127,17	128,77	16,90	92,15	75,55
19	24,80	101,85	114,80	41,67	72,10	64,20
20	46,17	108,92	130,57	30,60	68,47	82,02
21	20,50	128,62	131,75	11,85	81,72	78,20
22	12,12	98,95	105,75	12,37	96,50	87,35
23	13,45	116,40	116,00	14,07	107,20	93,42
24	11,90	104,95	104,15	12,47	89,00	98,45
25	11,80	79,97	75,55	11,60	64,22	64,95
26	12,57	126,87	125,35	20,77	119,05	127,65
27	12,75	111,30	123,47	11,67	92,27	97,20
28	17,27	97,00	84,50	15,22	98,80	117,75
29	11,65	70,35	90,42	19,12	78,05	88,95
30	12,47	108,60	117,37	17,90	90,57	86,22

* valores expressos em micra.

VALORES DA MIGRAÇÃO ESPONTÂNEA (DETERMINADA EM MEIO DE HANKS) E ESTIMULADA (DETERMINADA EM "POOL" DE SOROS NORMAIS OU INDIVIDUALMENTE NO SORO DO DOENTE) DE PMN E MON DE CRIANÇAS COM ASMA CRÔNICA, NA AUSÊNCIA DE TEOFILINA. *

PAC. /	PMN MEIO	PMN SNL	PMN SP / /	MON MEIO	MON SNL	MON SP
1	22,50	101,45	112,62	22,87	92,87	109,47
2	29,62	113,25	118,20	18,10	94,92	91,25
3	34,92	124,32	120,15	21,70	88,47	96,37
4	36,57	116,62	119,10	13,55	79,15	86,30
5	28,27	119,82	128,22	26,82	123,37	113,72
6	29,45	104,35	109,97	17,47	82,82	76,65
7	24,80	110,32	127,77	27,40	89,25	90,17
8	28,77	110,92	115,15	27,22	97,02	95,22
9	40,25	127,92	115,32	34,15	100,40	111,70
10	29,80	84,95	93,72	22,75	83,72	83,97
11	45,02	123,45	114,37	24,15	113,20	105,25
12	21,85	77,75	75,20	20,52	72,80	69,75
13	28,40	87,65	114,07	19,07	99,62	82,62
14	29,75	92,40	85,62	26,07	78,00	88,32
15	22,40	106,97	100,52	33,00	63,52	81,45
16	28,75	115,40	124,80	25,72	121,00	114,25
17	24,80	112,30	127,60	21,87	81,37	85,25
18	46,45	126,07	119,27	33,17	108,82	114,00
19	26,82	106,15	111,87	21,02	89,17	75,22
20	34,65	130,22	136,05	26,97	91,70	93,32
21	23,12	87,15	81,95	12,65	110,92	125,70
22	38,20	124,10	124,42	21,67	112,07	108,62
23	36,95	127,22	129,95	28,17	99,15	94,85
24	29,32	105,37	115,32	29,60	111,60	106,02
25	32,22	130,20	133,45	24,55	114,17	120,90
26	24,30	128,67	120,50	24,47	109,65	114,67
27	36,17	104,60	132,50	20,55	110,52	110,72
28	26,20	86,02	93,15	20,00	81,87	76,90
29	33,75	120,55	125,42	22,20	68,92	68,42
30	30,97	120,30	128,07	42,42	121,70	105,62

* VALORES EXPRESSOS EM MICRA.

VALORES DA MIGRAÇÃO ESPONTÂNEA (DETERMINADA EM MEIO DE HANKS) E ESTIMULADA (DETERMINADA EM "POOL" DE SOROS HUMANOS NORMAIS) DE PMN E MON DOS INDIVÍDUOS CONTROLES.

INDIVÍDUOS/	PMN MEIO	PMN SNL /	MON MEIO	MON SNL
1	55,33	159,31	13,05	108,21
2	25,62	140,16	11,22	74,52
3	54,44	113,74	18,13	81,27
4	38,85	98,74	15,40	112,81
5	33,05	106,88	15,10	105,84
6	28,31	142,80	34,95	122,18
7	36,20	106,11	20,74	107,28
8	38,50	115,63	18,60	104,81
9	47,65	100,00	29,62	130,76
10	39,59	114,37	24,00	106,29
11	43,00	113,75	21,96	93,72
12	44,00	115,79	29,85	96,66
13	36,90	114,43	20,13	95,77
14	52,30	134,02	23,52	93,25
15	31,03	118,22	36,32	134,51
16	41,29	118,33	26,65	119,33
17	25,95	112,82	35,25	98,10
18	25,80	120,00	29,25	108,40
19	27,28	111,83	39,80	115,52
20	48,62	125,34	31,55	118,40
21	46,02	117,16	29,57	107,75
22	39,21	113,42	45,00	118,65
23	44,05	108,94	26,15	75,94
24	46,27	128,45	50,62	103,62