

LUCIANE CRISTINA COPPI

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE EOSINÓFILOS
PERIFÉRICOS EM PACIENTES COM DOENÇAS
INFLAMATÓRIAS INTESTINAIS**

CAMPINAS

2004

LUCIANE CRISTINA COPPI

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE EOSINÓFILOS
PERIFÉRICOS EM PACIENTES COM DOENÇAS
INFLAMATÓRIAS INTESTINAIS**

**Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação da
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual
de Campinas para obtenção do título de Doutor em
Clínica Médica, área de concentração em Ciências
Básicas.**

Orientador: Prof. Dr. José Geraldo Paraíso Ferraz

CAMPINAS

2004

UNIDADE BC
Nº CHAMADA TI UNICAMP
C795a
V EX
TOMBO BC/ 69582
PROC 16123-06
C D X
PREÇO 11,00
DATA 09/08/06
Nº CPD

BIB ID: 384135

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

C795a

Coppi, Luciane Cristina

Avaliação da atividade de eosinófilos periféricos em pacientes com doenças inflamatórias intestinais. / Luciane Cristina Coppi. Campinas, SP : [s.n.], 2004.

Orientador : José Geraldo Paraíso Ferraz

Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. Quimiotoxía. 2. Adesão. 3. Microscopia eletrônica. I. José Geraldo Paraíso Ferraz. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

DEDICO ESTE TRABALHO

*Aos meus queridos pais, Eliseu e Maria ,
pelo apoio incondicional e amor infinito,
os quais sempre me fizeram seguir em frente.*

*Pela oportunidade de estudo e, principalmente,
pelos ensinamentos que contribuíram para a
minha formação como ser humano.*

Com Carinho.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À DEUS, zeloso protetor
pela onipresença em todos os momentos de
minha vida, que ilumina sempre o meu caminho
e norteia os meus passos numa direção eterna.
A minha devoção.

*À Alberto Pierrot, Pedro Eugênio, Luiz Benvenuti,
Benta da Silva, Ruth Shenovisck e Jacó* que há
anos me auxiliam nos momentos de conflitos e
dúvidas, orientando-me e dando forças para trilhar
essa caminhada.

Meu sincero agradecimento.

Aos Prof. (s) Dr. (s) *José Geraldo Paraíso Ferraz* e *Edson Antunes*
pelos valorosos ensinamentos transmitidos. Pela orientação objetiva,
criteriosa e pela severidade com que lutam pelo engrandecimento da
Ciência. Em especial, pela confiança depositada em minha pessoa.

À Dra. *Sara Maria Thomazzi*, pelo apoio e
encorajamento dispensados por todo este trabalho.

Aos *Doadores e Pacientes*, pessoas voluntárias, que colaboraram na realização deste estudo, sem os quais esse trabalho seria impossível, meu sincero agradecimento.

Em especial, à *Maria Célia Pereira* do Gastrocentro que me prestou valiosa ajuda durante os períodos experimentais deste trabalho, fundamental para sua complementação. Pela sua disposição, atenção e eficiência sempre presentes.

À Profa. Dra. *Cecília Amélia Fazzio Escanhoela*; Dra. *Luciana Rodrigues de Meirelles* e Dr. *Randall Luis Adam*. Às técnicas *Ana L. R. Pereira* e *Neuza V. Ambar* da Anatomia Patológica; *Fátima Neder*, *Maria Lucia R. M. Ferreira*, *Geralda D. Pádua* e *Adilson Abílio Piazza* da Microscopia Eletrônica, pelo apoio em momentos tão importantes no desenvolver deste projeto.

Ao Prof. Dr. *Alexandre Eduardo Nowill* e *Giberto C. Franchi Jr.* do Centro Integrado de Pesquisa Oncohematológica da Infância (CIPOI) pela colaboração nos períodos experimentais deste trabalho.

Ao Dr. *Claúdio R. S. Coy* do Gastrocentro que me auxiliou com os prontuários e dados clínicos dos pacientes.

Ao Dr. *José Murilo R. Zeitune* do Gastrocentro e ao Dr. *Sérgio Kignel* que me auxiliaram nas correções da tese, com muita dedicação e paciência.

Aos colegas do Gastrocentro *Paula R. S. Câmara*, *Gerson J. N. Ferraz*, *Cynthia M. P. Villa* e *Helena M. I. Akasaka*, por todos os momentos que passamos juntos e que contribuíram para o meu amadurecimento pessoal e profissional.

Aos colegas da Farmacologia com os quais compartilhei meu dia-a-dia: *Aline M. Maziero*, *Carla F. F. Penteado*, *Cristiane F. Freitas*, *Cristina E. Okuyama*, *Elen C. T. Landucci*, *Enilton A. P. Camargo*, *Fernanda B. M. Priviero*, *Humberto S. Cardoso*, *Ivani A. Souza*, *José L. Donato*, *Juliana Moreira*, *Juliana S. Baracad*, *Lara C. Silva*, *Laura C. M. Esquisatto*, *Leticia Lintomen*, *Leyge T. Couto*, *Márcia H. M. Cardoso*, *Mário A. Claudino*, *Nicola Conran*, *Raquel Lorenzetti*, *Rafael P. Morganti*, *Renata Pennachin*, *Renata Pereira* e *Sisi Marcondes*.

À Professora de Língua Portuguesa, *Vera Quintal*, pelo apoio técnico prestado.

Ao *Departamento de Farmacologia* da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) onde este trabalho foi realizado e à *Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo* (FAPESP – processo 00/13863-7), do Ministério de Educação e Cultura, pelo apoio financeiro durante o Doutorado.

E à todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram e auxiliaram para a realização deste trabalho, meu agradecimento.

Se não houver frutos, valeu a beleza das flores...
Se não houver flores, valeu a sombra das folhas...
Se não houver folhas, valeu a intenção da semente.

Henfil

	<i>PÁG.</i>
RESUMO	<i>xviii</i>
ABSTRACT	<i>xx</i>
1- INTRODUÇÃO	22
2- REVISÃO DA LITERATURA	25
2.1- Doenças Inflamatórias Intestinais	26
2.1.1- Doença de Crohn.....	27
2.1.2- Retocolite Ulcerativa Inespecífica.....	28
2.2 Eosinófilos	30
2.3 Eosinófilos e Doenças Inflamatórias Intestinais	33
3- PROPOSIÇÃO	36
4- CASUÍSTICA E MÉTODOS	38
4.1- Critérios de Levantamento dos Prontuários Clínicos e Casuística	39
4.1.1- Critérios de Inclusão.....	39
4.1.2- Critérios de Exclusão.....	40
4.1.3- Comitê de Ética em Pesquisa.....	40
4.2- Amostras de Sangue	40
4.3- Obtenção de Eosinófilos	42
4.3.1- Isolamento de Neutrófilos e Eosinófilos.....	42
4.3.2- Separação Imunomagnética de Células.....	42
4.3.3- Seleção Imunomagnética Negativa de Eosinófilos.....	43
4.3.4- Contagem de Células.....	44
4.4 Ensaio de Quimiotaxia “in vitro”	44
4.5- Ensaio de Adesão “in vitro”	45
4.6- Dosagem de Peroxidase do Eosinófilo (EPO)	46
4.7- Citometria de Fluxo	47
4.8- Contagem Histológica	48
4.9- Microscopia Eletrônica	48

4.10- Análise Estatística.....	49
5- RESULTADOS.....	50
5.1- Dados dos Pacientes.....	51
5.2- Ensaio de Quimiotaxia.....	51
5.3- Ensaio de Adesão.....	53
5.3.1- Efeito do PAF, PMA e Eotaxina sobre a Adesão de Eosinófilos Periféricos para Fibronectina <i>in vitro</i>	53
5.3.2- Efeito do PAF, PMA e Eotaxina sobre a Adesão de Eosinófilos Periféricos para Soro <i>in vitro</i>	55
5.4- Ensaio de Dosagem de Peroxidase do Eosinófilo (EPO).....	57
5.5- Citometria de Fluxo.....	59
5.6- Contagem Histológica.....	61
5.7- Microscopia Eletrônica.....	62
6- DISCUSSÃO.....	65
6.1- Ensaio de Quimiotaxia.....	67
6.2- Ensaio de Adesão e Citometria de Fluxo.....	68
6.3- Dosagem de EPO e Análise Morfométrica.....	70
6.4- Contagem Histológica.....	72
7- CONCLUSÕES.....	75
8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	77
9- ANEXOS.....	91

ANOVA	Análise de variância
BSA	Albumina de soro bovino
C	Produto(s) do complemento
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CL	Corpo lipídico
DC	Doença de Crohn
DII	Doenças inflamatórias intestinais
DMSO	Dimetil sulfóxido
ECP	Proteína catiônica do eosinófilo
EDN	Neurotoxina derivada do eosinófilo
EDTA	Ácido etileno-diamino-tetraacético
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EPM	Erro padrão da média
EPO	Peroxidase do eosinófilo
EPX	Proteína X do eosinófilo
fMLP	N-formyl-metionyl-leucyl-fenilalanina
GM-CSF	Fator estimulador de colônia de monócitos e granulócitos
GP	Grânulo primário
GS	Grânulo secundário
HANKS	HBSS = <i>Hanks' balanced salts solution</i>
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
ICAM-1	<i>Intercellular adhesion molecule 1</i>
IFN-γ	Interferon gama
Ig	Imunoglobulina(s)
IL	Interleucina(s)
Inc.	Incorporation

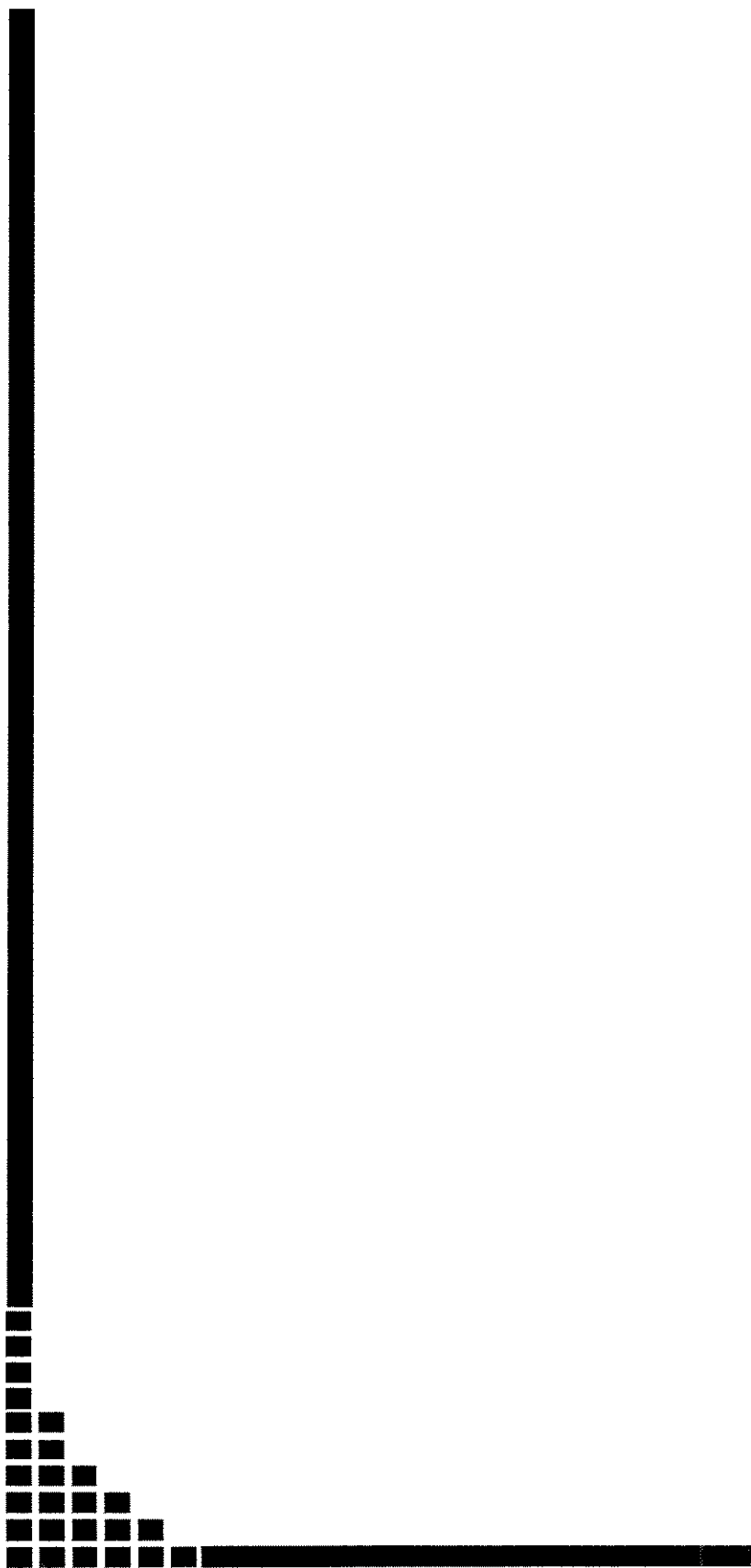
KHC0 ₃	Bicarbonato de potássio
LT	Leucotrieno(s)
Mac-1	<i>Macrophage-1 antigen</i>
MACS	<i>Magnetic cell separation</i>
MAdCAM-1	<i>Mucosal addressin cell adhesion molecule 1</i>
MBP	Proteína básica principal
MCP	Proteína quimiotática de monócito
MEM	Meio mínimo essencial de Eagle
MIP	Proteína inflamatória de macrófagos
NB	Núcleo bilobado
NH ₄ Cl	Cloreto de amônio
OVA	Ovalbumina
PAF	Fator ativador de plaquetas
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PECAM-1	<i>Platelet endothelial cells adhesion molecule 1</i>
Pg	Pequeno(s) grânulo(s)
PG	Prostaglandina(s)
PMA	Forbol-12-miristato-13-acetato
PMN	Polimorfonuclear(es)
RANTES	<i>Regulated on activation, normal T-expressed and secreted</i>
RCUI	Retocolite ulcerativa inespecífica
SAZ	Soro ativado por zimozan
SP	Substância P
TGF	Fator de crescimento e transformação
Th	Linfócito(s) T auxiliador(es)
TNF	Fator de necrose tumoral
TX	Tromboxano(s)
VCAM-1	<i>Vascular cell adhesion molecule 1</i>
VIP	Peptídeo vasoativo intestinal
VLA-4	<i>Very late antigen 4</i>

Acetato de uranila	Ladd (Burlington, Vermont, New Jersey, EUA)
Acetona	Merck (Darmstadt, Alemanha)
Anticorpos monoclonais:	
CD49d – conjugado PE	BD Biosciences (EUA)
CD11b/Mac-1 – conjugado PE	BD Biosciences (EUA)
IgG ₁ , de camundongo κ	BD Biosciences (EUA)
Araldite	Epoxiglass (Diadema, São Paulo, Brasil)
Azida sódica	Synth (São Paulo, Brasil)
Azul de toluidina	Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA)
Azul de trypan	Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA)
BSA	Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA)
Cacodilato de sódio	Polysciences Inc. (Warrington, EUA)
Câmara de microquimiotaxia	Neuroprobe Inc. (Cabin John, MD, EUA)
Diff-Quik®	Baxter Healthcare Corp. (DE, EUA)
Dihidrocitocalasina B	Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA)
DMSO	Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA)
EDTA	Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA)
Eosina	Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA)
Eotaxina	Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA)
Fibronectina	Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA)

Filtro de policarbonato	Nuclepore Pleasanton (CA, EUA)
fMLP	Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA)
Giemsa	Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA)
Hematoxilina	Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA)
May-Grünwald	Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA)
MEM	Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA)
<i>Microbeads</i>	Miltenyi Biotec Inc. (Bergisch-Gladbach, Alemanha)
o-fenilenediamina	Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA)
OVA	Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA)
PAF	Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA)
Paraformaldeído	Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA)
Percoll	Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA)
Placas de 96 poços	Costar - Corning Inc. (NY, EUA)
PMA	Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA)
Sistema VarioMACS	Miltenyi Biotec Inc. (Bergisch-Gladbach, Alemanha) e Becton-Dickinson (Oxford, Reino Unido)
Solução de glutaraldeído	Polysciences Inc. (Warrington, EUA)
Tetróxido de ósmio	Polysciences Inc. (Warrington, EUA)
Triton X-100	Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA)
Zimozan	Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA)

	<i>PÁG.</i>
Ilustração 1- Principais Estruturas do Eosinófilo Humano.....	31
Ilustração 2- Coluna de Separação Imunomagnética MACS.....	43

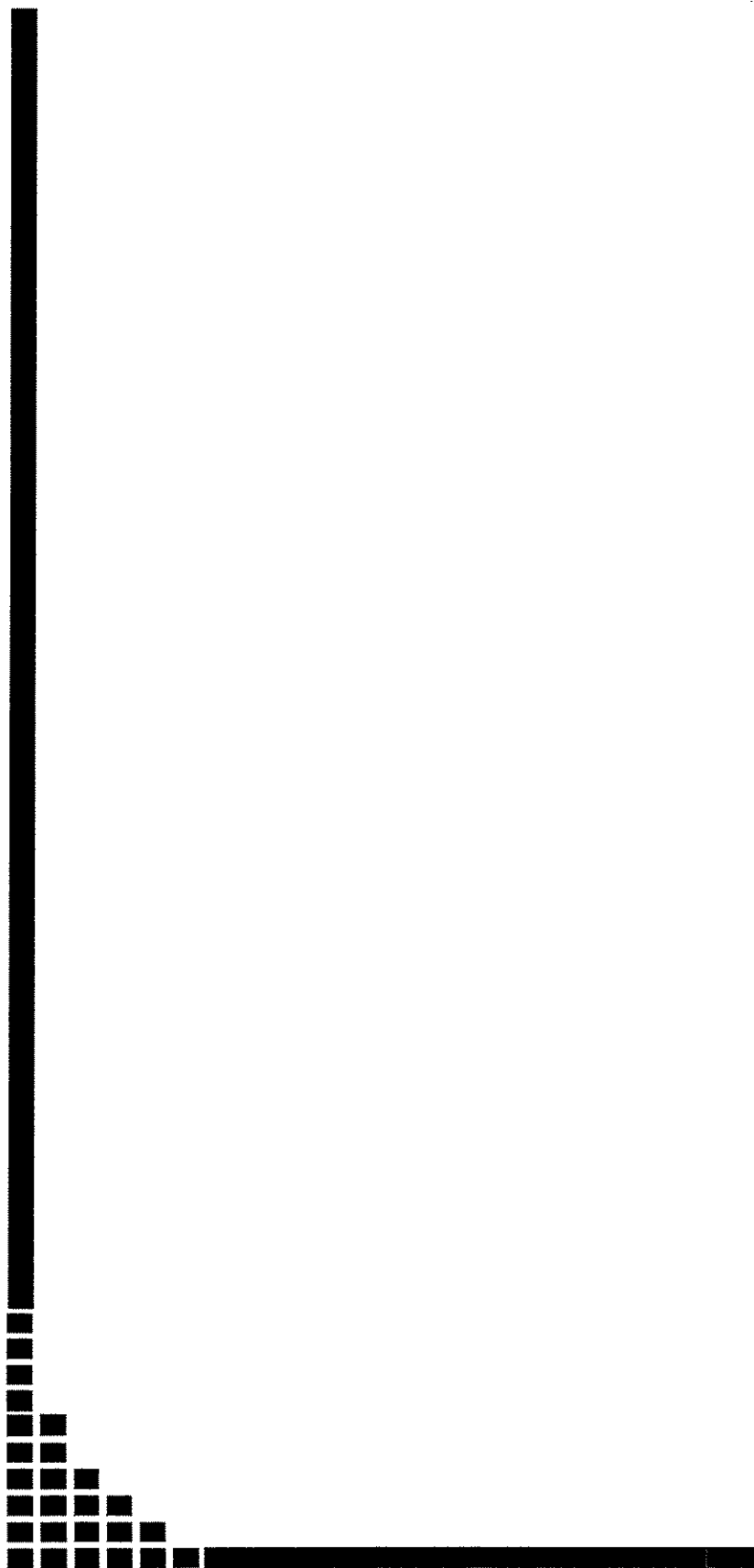
	PÁG.
Figura 1- Efeito Quimiotático do fMLP sobre a Migração de Eosinófilos Periféricos de Voluntários Sadios, Pacientes com DC e com RCUI <i>in vitro</i>	52
Figura 2- Adesão de Eosinófilos Periféricos de Voluntários Sadios, Pacientes com DC e com RCUI para Fibronectina <i>in vitro</i>	54
Figura 3- Adesão de Eosinófilos Periféricos de Voluntários Sadios, Pacientes com DC e com RCUI para Soro Humano <i>in vitro</i>	56
Figura 4- Liberação de EPO em Voluntários Sadios, Pacientes com DC e com RCUI <i>in vitro</i>	58
Figura 5- Expressão das Moléculas de Adesão Mac-1 e VLA-4 em Eosinófilos Periféricos de Voluntários Sadios, Pacientes com DC e com RCUI <i>in vitro</i>	60
Figura 6- Contagem Histológica de Eosinófilos em Tecido Intestinal de Controles, Pacientes com DC e com RCUI.....	61
Figura 7- Quantificação do Número de Grânulos dos Eosinófilos Periféricos Humanos em Voluntários Sadios, Pacientes com DC e com RCUI.....	62
Figura 8- Análise do Perímetro dos Grânulos de Eosinófilos Periféricos Humanos em Voluntários Sadios, Pacientes com DC e com RCUI.....	63
Figura 9- Análise do Diâmetro dos Grânulos de Eosinófilos Periféricos Humanos em Voluntários Sadios, Pacientes com DC e com RCUI.....	64



RESUMO

Os eosinófilos estão envolvidos na patogênese de várias doenças inflamatórias crônicas, incluindo doenças inflamatórias intestinais (DII), como doença de Crohn (DC) e retocolite ulcerativa inespecífica (RCUI). No entanto, ainda é desconhecido como os eosinófilos contribuem para a patogênese das DII. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar a atividade dos eosinófilos isolados de sangue periférico de pacientes com DII comparada aos voluntários sadios. Eosinófilos dos voluntários sadios (n=5), com DC (n=5) e RCUI (n=5) foram purificados usando-se um gradiente de Percoll, seguido de separação imunomagnética. A atividade dos eosinófilos foi avaliada usando-se os ensaios de quimiotaxia, adesão, liberação de peroxidase do eosinófilo (EPO), citometria de fluxo, contagem histológica e análise morfométrica. A quimiotaxia dos eosinófilos induzida pelo N-formyl-metionyl-leucyl-fenilalanina (fMLP) foi significativamente maior para as células isoladas de pacientes com DC e RCUI, quando comparada aos voluntários sadios. A adesão basal dos eosinófilos de pacientes com DC aumentou significativamente para fibronectina ou soro, quando comparada aos voluntários sadios e RCUI. A liberação basal e estimulada de EPO foi reduzida em células de pacientes com DC, quando comparada aos voluntários sadios. Entretanto, em células isoladas de pacientes com RCUI, a liberação de EPO basal foi significativamente maior quando comparada aos voluntários sadios. A expressão das moléculas de adesão *macrophage-1 antigen* (Mac-1) e *very late antigen 4* (VLA-4) não apresentou diferença em relação aos voluntários sadios. A contagem histológica dos eosinófilos em tecido intestinal e morfométrica dos grânulos destas células mostraram, respectivamente, aumento significativo do número de eosinófilos e de seus grânulos em pacientes com DC e RCUI quando comparadas aos voluntários sadios. Nossos resultados sugerem que os eosinófilos periféricos estão pré-ativados em pacientes com DII. A ativação dos eosinófilos periféricos, seguida da migração para o tecido intestinal deve contribuir para a patogênese das DII.

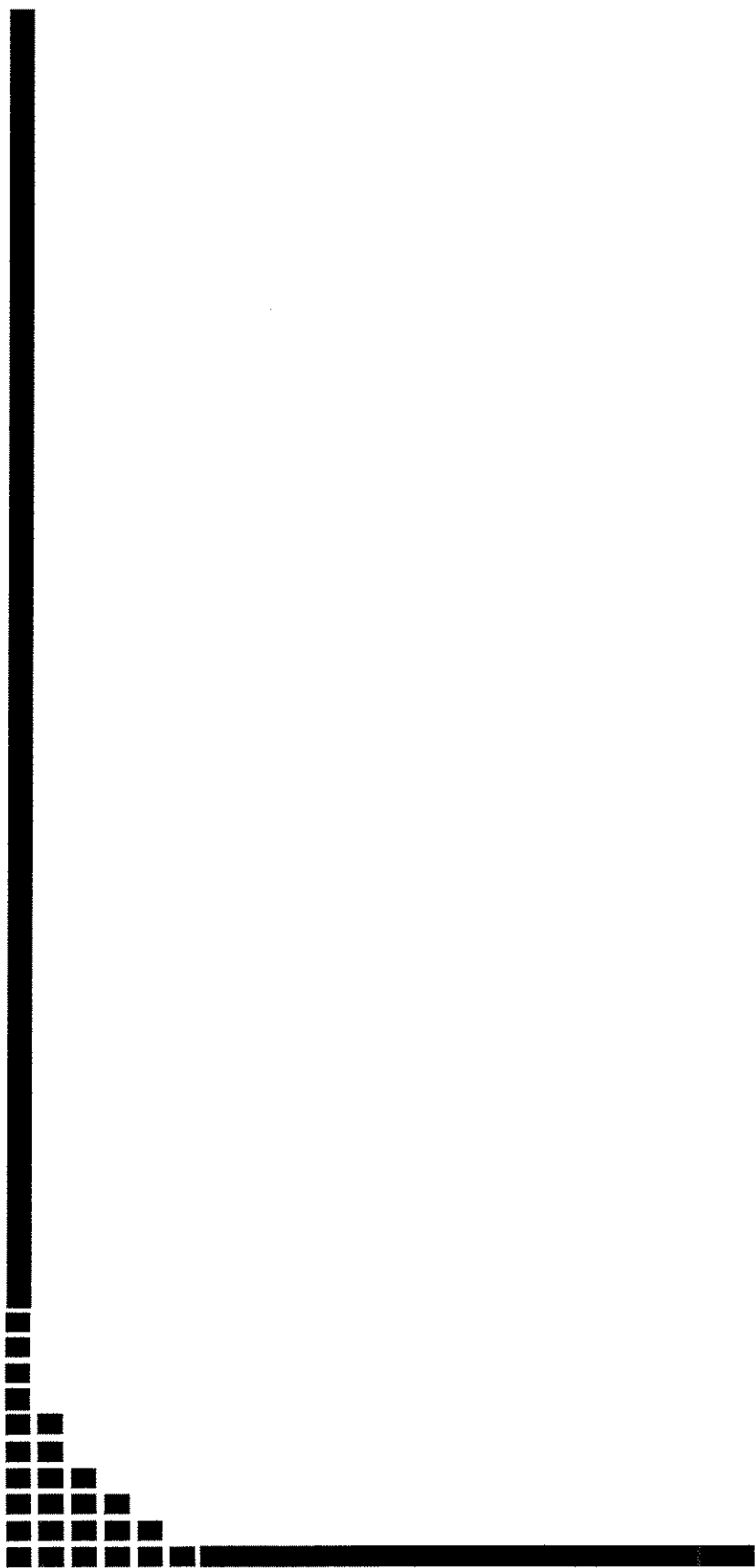
PALAVRAS-CHAVE: Eosinófilos, doenças inflamatórias intestinais, doença de Crohn, retocolite ulcerativa inespecífica.



ABSTRACT

Eosinophils are involved in the pathogenesis of several chronic inflammatory diseases, including inflammatory bowel disease (IBD), as Crohn's disease (CD) and ulcerative colites (UC). However, how activation of intravascular eosinophils contributes to disease activity or IBD pathogenesis is still unknown. The aim of this study was to investigate if eosinophils isolated from peripheral blood from IBD patients are activated compared to healthy volunteers. Eosinophils from healthy volunteers (n=5), CD (n=5) and UC patients (n=5) were purified using a Percoll gradient followed by immunomagnetic cell separator. Eosinophil activity was investigated using chemotaxis, adhesion and mediator release assays (eosinophil peroxidase, EPO), flow cytometric, histologic counting and morphometric analysis. N-formyl-metionyl-leucyl-fenilalanine (fMLP) induced eosinophil chemotaxis was significantly augmented in cells isolated from CD and UC patients compared to healthy volunteers. Eosinophil basal adhesion of CD significantly increased to fibronectin or serum if compared to UC or healthy volunteers. Basal and stimulated EPO release was reduced in cells from CD patients compared to healthy volunteers. However, basal EPO release was significantly enhanced in cells isolated from UC patients when compared to healthy volunteers. The expression of adhesion molecules macrophage-1 antigen (Mac-1) and very late antigen 4 (VLA-4) isn't different in patients with UC and CD compared to healthy volunteers. Histologic counting of eosinophils in intestinal tissue and morphometric analysis of granules of this cells showed, respectively, significant augmentation in the number of eosinophils and its granules in CD and UC patients compared to healthy volunteers. Our results suggest that peripheral eosinophils are pre-activated in IBD patients. Activation of peripheral eosinophils followed by migration to intestinal tissue probably contributes to IBD pathogenesis.

KEY-WORDS: Eosinophils, inflammatory bowel disease, Crohn's disease, ulcerative colite.



1- INTRODUÇÃO

As doenças inflamatórias intestinais (DII) têm caráter etiológico multifatorial, sendo a Doença de Crohn (DC) e a Retocolite Ulcerativa Inespecífica (RCUI) as formas mais representativas destas doenças. Segundo estudos epidemiológicos, tem havido um aumento das incidências da DC e RCUI nas últimas décadas. Os fatores genético, imunoinflamatório, infeccioso, vascular e neurogênico são importantes para a etiologia das DII. Entretanto, fatores sociopsicossomáticos e outros como neuropeptídeos, drogas, fumo, álcool, dieta, imunoglobulina (Ig) A salivar e aleitamento materno podem também contribuir para o desencadeamento das DII (DAMIÃO & HABR-GAMA, 1993; NOVAES DE MAGALHÃES, 1993; ANDUS & GROSS, 2000; SCHÖLMERICH, 2000). Além disso, diversos estudos indicam que estas doenças são mediadas por mecanismos imunológicos, tendo características heterogêneas, com uma variedade clínica de sintomas e graus de severidade (PETERSON *et al.*, 1988; BERSTAD *et al.*, 1993).

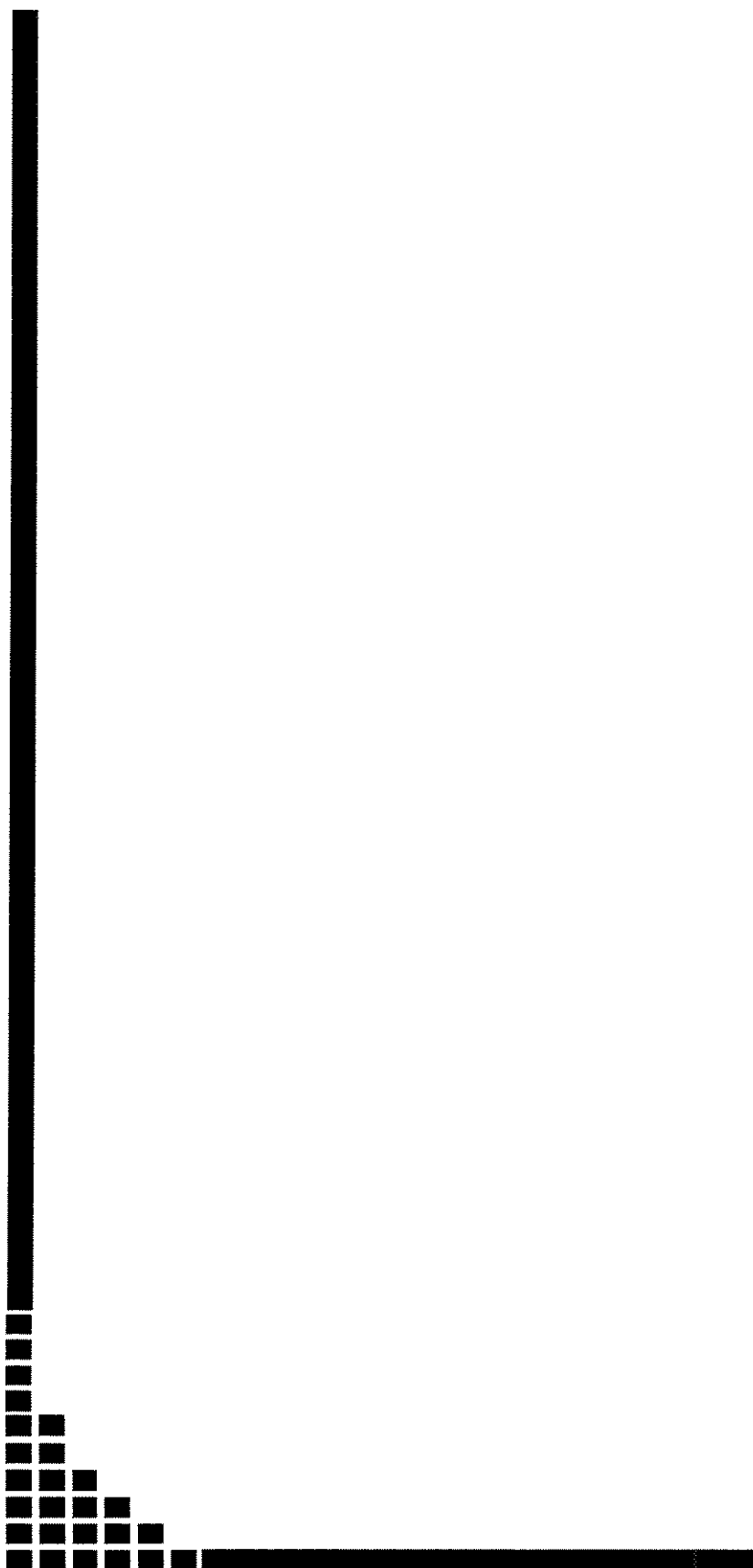
A histologia do tecido intestinal inflamado é caracterizada por dano das células epiteliais e infiltração de linfócitos, monócitos e neutrófilos (LEE *et al.*, 1993; FIOCCHI, 1998; BISCHOFF *et al.*, 1999). A análise histológica da mucosa intestinal de pacientes com DC e RCUI mostra também grande número de eosinófilos (RAAB *et al.*, 1998). Estas células, quando ativadas, promovem liberação de proteínas, presentes em grânulos citoplasmáticos, as quais são citotóxicas para uma variedade de células, inclusive para as células epiteliais intestinais (MOTOJIMA *et al.*, 1989).

O mecanismo que leva ao acúmulo e ativação dos eosinófilos tem sido associado à atividade de linfócitos T e a outros componentes da resposta imune que atuam na amplificação da resposta proliferativa dos eosinófilos humanos (FERGUSON *et al.*, 1995; SAITOH *et al.*, 1999). Recentes estudos mostraram que a síntese de interleucina (IL)-4 e IL-5 está associada à recorrência pós-operatória da DC (DESREUMAUX *et al.*, 1999).

Os eosinófilos produzem muitas classes de mediadores biológicos que participam na patogênese das DII (LEVY & KITA, 1996), incluindo fatores de crescimento, fatores quimiotáticos (IL-3, IL-5 e IL-16), fatores que induzem fibrose (IL-1, IL-6 e IL-8), citocinas envolvidas na regulação da resposta imune (IL-2, IL-4, IL-10

e IL-12), sulfatase B, fosfolipase e histaminase (DESREUMAUX *et al.*, 1999; SCHREIBER *et al.*, 1999).

Apesar de vários estudos histopatológicos mostrarem grande aumento do número de eosinófilos na mucosa intestinal de pacientes com DII (DVORAK, 1980; LEVY *et al.*, 1997), e também um aumento da resposta dos eosinófilos periféricos à vários agentes quimiotáticos (DENIS *et al.*, 2001), ainda não foi definitivamente comprovado que os eosinófilos desempenham papel crucial na patogenia destas doenças; isto, provavelmente, reflete a falta de métodos científicos apropriados para se medir a atividade eosinofílica na mucosa intestinal.



2- REVISÃO DA LITERATURA

2.1- Doenças Inflamatórias Intestinais

As doenças inflamatórias intestinais afetam parte da população mundial e têm sido estudadas intensamente por várias décadas (BRODMERKEL & VADDI, 2003).

A patogênese das DII acomete indivíduos predispostos geneticamente e que apresentam produtos da membrana celular (peptidoglicanos) ou bactérias não patogênicas da flora intestinal servindo como um estímulo antigênico. Este conjunto de fatores desencadeia uma resposta inflamatória exagerada, com uma sequência de eventos imunológicos em células imunocompetentes da submucosa intestinal, que leva à liberação de mediadores químicos os quais, por sua vez, atraem mais células imunes. Isto leva à destruição da mucosa intestinal e de suas estruturas interligadas, prejudicando o tecido e os estágios de reparo (REED *et al.*, 1992; MOUSER & HYAMS, 1999; SCHREIBER, 2000; DIGNASS *et al.*, 2004).

As reações auto-imunes das DII são favorecidas pelo aumento da permeabilidade intestinal e diminuição da tolerância imunológica, particularmente, com defeitos na função das células T e B. Assim, o balanço desfavorável entre citocinas pró- e antiinflamatórias acarreta anormalidades, como alterações da mucosa, da secreção, da motilidade e da função neuronal intestinal (MADSEN, 2000; NEURATH & SCHURMANN, 2000; CHEN *et al.*, 2001; GHANCHI & REMBACKEN, 2003).

A diminuição da função protetora da mucosa e a destruição da barreira epitelial do tecido intestinal favorecem a interação de antígenos bacterianos com macrófagos e células dendríticas, que estimulam células T, resultando em resposta imune exacerbada (DIECKGRAEFE & KORZENIK, 2002; OGAWA *et al.*, 2004). As células T, entre outros componentes da resposta imune, têm importante papel na manutenção da inflamação crônica em pacientes com DC. A apoptose das células T parece ser relevante no controle do processo inflamatório. De fato, os recentes progressos na terapêutica medicamentosa para a DC foram obtidos com o infliximab, um anticorpo anti-TNF- α capaz de induzir apoptose das células T (VAN DULLEMEN *et al.*, 1995; TARGAN *et al.*, 1997; BAERT & RUTGEERTS, 1999; MARINI *et al.*, 2003; VAN DEN BRANDE *et al.*, 2003).

A doença inflamatória intestinal pode ser dividida em dois estágios: um estágio inicial no qual o processo inflamatório é acionado, envolvendo diferentes leucócitos e suas interações com as células endoteliais e mesenquimais, e um segundo, no qual a resposta inflamatória é ampliada e modulada pelos mediadores da inflamação, que produzem as mudanças histológicas e funcionais características dos estágios inflamatórios (LOBOS *et al.*, 1987; RAAB *et al.*, 1995; JEZIORSKA *et al.*, 2001). Em síntese, podemos considerar que os principais mediadores inflamatórios envolvidos na imunopatogênese das DII são as prostaglandinas (PG), tromboxanos (TX), leucotrienos (LT), produtos do complemento (C), fator ativador de plaquetas (PAF), ILs, interferon gama (IFN- γ), fator de necrose tumoral (TNF), fator estimulador de colônia de monócitos e granulócitos (GM-CSF), histamina, serotonina e radicais livres de oxigênio (DAMIÃO & HABR-GAMA, 1993; NOVAES DE MAGALHÃES, 1993).

A produção de IL-8 e proteína quimiotática de monócito (MCP)-1 por células endoteliais, células polimorfonucleares (PMNs) e células epiteliais nas DII pode estabelecer um gradiente quimiotático capaz de influenciar o aumento da migração de monócitos/macrófagos, granulócitos e linfócitos do sangue, através do endotélio para a mucosa e submucosa das DII (MAZZUCHELLI *et al.*, 1996; MACDERMOTT *et al.*, 1998).

HULTEN *et al.* (1977) mostraram que a RCUI e a DC, agudas e severas, apresentam tecido com hiperemia e aumento do fluxo sangüíneo. No entanto, o tecido inflamado cronicamente (ativo e inativo) mostra diminuição da vasodilatação e hipoperfusão tecidual, dificultando a cura da doença, perpetuando a inflamação crônica que, histologicamente, é caracterizada pela persistência da ulceração e da fibrose intestinal (HATOUM *et al.*, 2003).

2.1.1- Doença de Crohn

A DC foi descrita por Crohn, Ginzberg e Oppenheimer em 1932. Esta doença pode envolver qualquer porção do sistema digestivo, desde a boca até o ânus, porém os locais mais comuns incluem o íleo terminal (65%), cólon (20%) ou região perianal (3 a 36%) (NOVAES DE MAGALHÃES, 1993).

Esta doença é caracterizada por inflamação crônica do tipo granulomatosa não caseificante e localizada. A inflamação e os granulomas comprometem todas as camadas da parede intestinal, desde a mucosa até a serosa, com espessamento da parede e estreitamento da luz intestinal, atingindo também o mesentério e os gânglios linfáticos regionais (peritônio e fígado). Uma característica da DC são segmentos afetados do trato gastrointestinal com áreas separadas por mucosa aparentemente normal. O segmento afetado apresenta inflamação transmural com granulomas, vasculite microscópica e ulceração da mucosa (NOVAES DE MAGALHÃES, 1993; ARIHIRO *et al.*, 2002).

Esta inflamação segmental e transmural inclui agregação de linfócitos e células do plasma para a cripta da mucosa, úlceras lineares e infiltrado celular na lâmina própria. Os eosinófilos e mastócitos estão presentes em camadas profundas da parede intestinal, havendo também um aumento no recrutamento de monócitos/macrófagos nas lesões granulomatosas. Portanto, o infiltrado consiste em células imunes heterogêneas, incluindo numerosos eosinófilos (DEUSCH & REICH, 1992; LIU *et al.*, 1996; HANKARD *et al.*, 1997; GHANCHI & REMBACKEN, 2003).

Os sintomas se iniciam na fase adulta jovem e o quadro clínico se caracteriza por manifestações intestinais muito variáveis, com períodos de remissão e exacerbação. As manifestações clínicas da DC são muito variáveis porque dependem da extensão, da localização das lesões e da presença de complicações (NOVAES DE MAGALHÃES, 1993).

2.1.2- Retocolite Ulcerativa Inespecífica

A primeira descrição da RCUI ocorreu há aproximadamente um século (SCHÖLMEICH, 2000). Esta doença é caracterizada por um processo inflamatório crônico localizado, geralmente confinado na mucosa colônica, iniciando no reto e envolvendo a região do cólon proximal. Na maioria dos casos, macroscopicamente, a doença limita-se ao reto e sigmóide (60 a 70% dos casos), mas pode envolver o hemcólon esquerdo (15 a 25%) ou todo o cólon (15%), com períodos intercalados de exacerbação

espontânea e remissão, podendo observar-se úlceras e abscessos, sendo o envolvimento inflamatório restrito à mucosa e às camadas superficiais da submucosa (DAMIÃO & HABR-GAMA, 1993; ARIHIRO *et al.*, 2002).

No processo inflamatório, o epitélio apresenta desordem das colunas celulares e perda do muco celular. A lâmina própria mostra infiltrado com neutrófilos, eosinófilos, mastócitos, linfócitos, células do plasma e macrófagos. Na RCUI ativa, os neutrófilos migram para a cripta do epitélio, resultando em desrupção da arquitetura da cripta e abscesso, inflamação e úlcera, com sua conseqüente destruição (DEUSCH & REICH, 1992; MOUSER & HYAMS, 1999; GHANCHI & REMBACKEN, 2003).

O balanço entre os fenótipos de linfócitos T auxiliares (Th) 1 e 2 parece determinar as características do processo inflamatório crônico na DC e RCUI. Assim, células Th1 secretam citocinas pró-inflamatórias como IL-2, IFN- γ e TNF- α , que supostamente medeiam os danos na mucosa e estão aumentadas em pacientes com DC. Por outro lado, produtos protetores ou regulatórios das células Th2 (IL-4, IL-5 e IL-10) estão pouco ativados, sendo esta resposta envolvida na alteração imunológica humoral, estando em maior evidência em pacientes com RCUI (MIDDEL *et al.*, 2001; CARVALHO *et al.*, 2003). Porém, outros estudos mostram que lesões iniciais de pacientes com DC estão associadas com células Th 2, enquanto em lesões crônicas observa-se maior predominância de células Th 1 (MIR *et al.*, 2002).

O recrutamento de células T periféricas nas DII aumenta a regulação da resposta imune da mucosa e pode intensificar a inflamação crônica, além de secretar uma variedade de linfocinas que destroem a mucosa inflamada e estão implicadas no recrutamento de eosinófilos (DEUSCH & REICH, 1992; MAZZUCHELLI *et al.*, 1996)

As citocinas são peptídeos imunomodulatórios produzidos e secretados pelas células inflamatórias, as quais induzem a expressão das moléculas de adesão e de outros mediadores inflamatórios, estando envolvidas tanto na amplificação quanto na finalização da resposta inflamatória. As IL-1, IL-6, IL-8 e o TNF- α são citocinas pró-inflamatórias produzidas por macrófagos, linfócitos e neutrófilos PMNs. Por outro lado, as IL-4 e IL-10 apresentam atividade antiinflamatória (MOUSER & HYAMS, 1999). As citocinas

apresentam habilidade em induzir quimiotaxia, ativação de leucócitos, exocitose de grânulos, aumento da produção de metaloenzimas e aumento da atividade respiratória, indicando, assim, que pode haver diferentes mecanismos pelos quais induzem a inflamação crônica e destruição do tecido intestinal nas DII.

De maneira geral, a produção das citocinas, como IL-1 β , IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-12, IL-17, TNF α , IFN γ , eotaxina e RANTES, além de neuropeptídeos (substância P) e GM-CSF, está aumentada nas DII, podendo ser responsáveis pela danificação da mucosa intestinal (DEUSCH & REICH, 1992; WIEDERMANN *et al.*, 1993; DUBUCQUOI *et al.*, 1995; OGAWA *et al.*, 2004). Também há um aumento na síntese de metabólitos do ácido araquidônico (PGE₂, TXB₂, LTB₄ e LTE₄) e de imunócitos (IgA, IgM e IgG) (MIDDEL *et al.*, 2001; GHANCHI & REMBACKEN, 2003).

2.2- Eosinófilos

Os eosinófilos foram identificados pela primeira vez por Paul Ehrlich em 1879 (*apud* GIEMBYCZ & LINDSAY, 1999; GLEICH, 2000). São granulócitos que podem ser distinguidos morfológicamente de outros por seu núcleo bilobado e pela presença de grânulos secundários. Originam-se das células precursoras da medula óssea e diferenciam-se sob o controle de vários fatores de crescimento e fatores estimuladores de colônias derivados dos linfócitos T e das células mesenquimais. Em indivíduos saudáveis, normalmente constituem menos que 3% dos leucócitos circulantes (SPRY, 1993; KROEGEL *et al.*, 1994; THOMAZZI, 2002). Após um período de maturação e diferenciação, a migração dos eosinófilos da medula óssea para o sangue leva cerca de três a cinco dias, passando a circular no sangue periférico, onde apresentam meia-vida de 13 a 18 horas em resposta ao estímulo apropriado; posteriormente, migram para o tecido onde exercem sua função (TEIXEIRA *et al.*, 1995; WALSH, 1997; RANKIN *et al.*, 2000).

Há quatro populações distintas de grânulos eosinofílicos, conforme mostra a Ilustração 1: I) grânulos secundários, que apresentam as proteínas catiônicas peroxidase do eosinófilo (EPO), proteína catiônica do eosinófilo (ECP) e proteína X do eosinófilo (EPX),

também denominada como neurotoxina derivada do eosinófilo (EDN). Contêm ainda fosfatase ácida e arilsulfatase B, além da proteína básica principal (MBP), que está localizada no conteúdo central, e estimula a liberação de 5-hidroxitriptamina e outras substâncias bioativas (SLUNGAARD *et al.*, 1993); II) pequenos grânulos, os quais são identificados em eosinófilos de tecido, mas não em células circulantes ou da medula óssea. Estes grânulos contêm fosfatase ácida e arilsulfatase B e podem conter catalase e EPX; III) grânulos primários, os quais são arredondados e uniformemente eletrodensos; IV) corpos lipídicos, os quais não estão envoltos por membrana e onde se encontra o principal armazenamento de ácido araquidônico. Estes são esféricos, eletrodensos e ocorrem em número aproximado de cinco, mas podem aumentar quando as células são ativadas (GLEICH & ADOLPSON, 1986; BOCHNER, 2000; PETERSON *et al.*, 2002; THOMAZZI, 2002; SCHWAB *et al.*, 2003; ROTHENBERG, 2004).

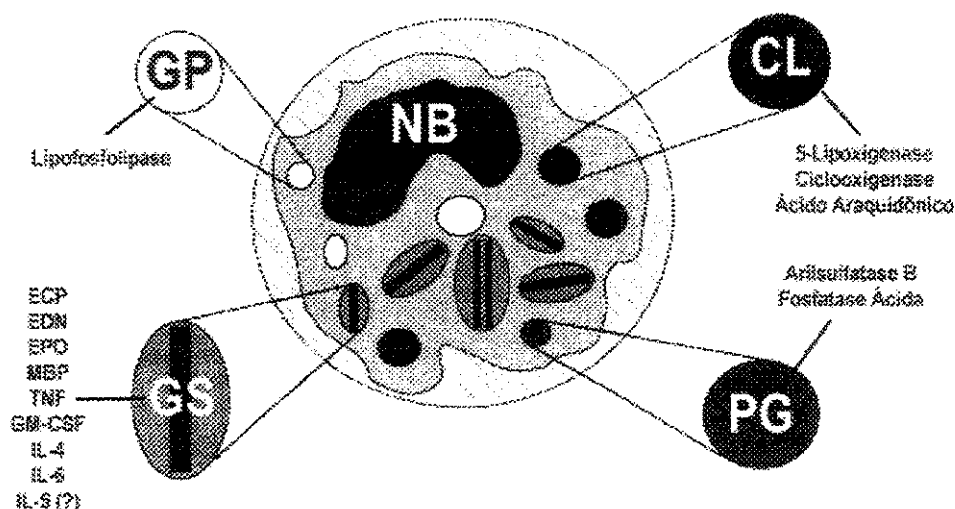


Ilustração 1 – Principais Estruturas do Eosinófilo Humano. CL=corpo lipídico; ECP=proteína catiônica do eosinófilo; EDN=neurotoxina derivada do eosinófilo; EPO=peroxidase do eosinófilo; GM-CSF=fator estimulador de colônia de monócitos e granulócitos; GP=grânulo primário; GS=grânulo secundário; IL=interleucina; MBP=proteína básica principal; NB=núcleo bilobado; Pg=pequeno grânulo; TNF=fator de necrose tumoral. Extraído e adaptado de GIEMBYCZ & LINDSAY (1999).

A migração dos eosinófilos da circulação sistêmica para os tecidos envolve vários eventos responsáveis pela interação dos mesmos com as células endoteliais, sendo que as moléculas de adesão ou receptores e seus respectivos ligantes possuem um papel central nestes processos (RESNICK & WELLER, 1993; COOK-MILLS, 2002; SANDBORN & YEDNOCK, 2003; ULBRICH *et al.*, 2003; VANDERSLICE *et al.*, 2004).

Os eosinófilos estão presentes em abundância na superfície epitelial de certos tecidos, sendo distribuídos predominantemente em áreas da submucosa do trato respiratório e gastrointestinal. O tempo de sobrevivência dos eosinófilos nos tecidos é incerto, mas é influenciado pela presença de IL-3, IL-5, GM-CSF, que atuam também na diferenciação e ativação dos eosinófilos (CARLSON *et al.*, 1999; WARDLAW, 1999; MIR *et al.*, 2002).

Várias doenças têm sido associadas ao aumento do número de eosinófilos circulantes e/ou no tecido, podendo refletir aumento da produção de eosinófilos na medula óssea, geração e ativação de agentes quimiotáticos específicos para eosinófilos, adesão aumentada de eosinófilos e sobrevivência destas células no tecido (COSTA *et al.*, 1993; OLIVEIRA & LUKACS, 2003).

A atividade dos eosinófilos está relacionada à habilidade em produzir e expressar uma variedade de citocinas e fatores de crescimento, como IFN- γ , IL-6, IL-10, fator de crescimento e transformação (TGF)- α , TGF- β_1 , TNF- α , proteína inflamatória de macrófagos (MIP) 1- α , IL-1, IL-3, GM-CSF, peptídeo vasoativo intestinal (VIP), substância P (SP), LTC₄, PAF e radicais livres de oxigênio, os quais induzem e/ou mantêm a eosinofilia *in vivo* (HAMID *et al.*, 1992; MELANI *et al.*, 1993; WIEDERMANN *et al.*, 1993; METWALI *et al.*, 1994). Porém, há poucas informações sobre citocinas que exercem efeito inibitório ou mecanismos de sub-regulação da função dos eosinófilos (HÅKANSSON *et al.*, 1987; LUTTMANN *et al.*, 1998).

Os mecanismos que levam ao acúmulo e ativação dos eosinófilos na lâmina própria têm sido relacionados com células endoteliais, epiteliais, linfócitos T (especialmente Th2) e macrófagos (HÄLLGREN *et al.*, 1989; CHOY *et al.*, 1990). Mediadores lipídicos, proteínas citotóxicas e citocinas (IL-1 β , TNF- α), presentes no espaço extracelular, também participam no recrutamento dos eosinófilos (BALFOUR SARTOR, 1994; LUCK *et al.*, 1997), assim como, C3a, C5a, IgA e IgE (BERSTAD *et al.*, 1993).

2.3- Eosinófilos e Doenças Inflamatórias Intestinais

Os eosinófilos são encontrados regularmente na mucosa intestinal, sendo sua presença importante não só na defesa do organismo, mas também na patogênese das gastroenterites, esofagite eosinofílica e DII (TALLEY *et al.*, 1992; BISCHOFF *et al.*, 1999; DENIS *et al.*, 2001; ARORA & YAMAZAKI, 2004; NOEL *et al.*, 2004).

A participação do eosinófilo pode ocorrer de duas maneiras: efeito citotóxico direto e pró-inflamatório, ou por recrutamento de outras células inflamatórias (LEE *et al.*, 1984; SHAW *et al.*, 1984).

Há evidências que os eosinófilos estão funcionalmente envolvidos na patogênese das DII, especialmente na formação de edema, destruição do tecido, contração do músculo liso, diarreia e exacerbação geral do processo inflamatório (HÄLLGREN *et al.*, 1989; SAITOH *et al.*, 1999).

Conforme relatos de DENIS *et al.* (2001), as citocinas pró-inflamatórias provenientes das células Th1 (TNF- α , IL-1 β , IL-6 ou IFN- γ) estão aumentadas na DC ativa, mas não em indivíduos saudáveis ou na DC inativa. Embora a lesão intestinal crônica é dominada pela resposta imune do tipo Th1, lesões recorrentes presentes na DC clinicamente inativa comportam-se como resposta imune do tipo Th2. Ainda, os eosinófilos periféricos isolados de pacientes com DC clinicamente inativa respondem de forma significativa à vários agentes quimiotáticos.

A ativação dos eosinófilos nas DII, indicada pela presença extracelular de ECP e MBP, sugere que potentes mediadores são liberados concomitantemente, incluindo neurotoxinas, LTs, peroxidase, citocinas e uma variedade de proteinases e enzimas. A ativação dos eosinófilos e a liberação de várias citocinas, como IL-2, IL-4, GM-CSF e RANTES, podem ser observadas na exacerbação da inflamação. Apesar dos estudos não indicarem a seqüência dos eventos que levam ao acúmulo dos eosinófilos nas DII, sabe-se que todas as células vizinhas aos eosinófilos ativados mostram mudança na função celular (JEZIORSKA *et al.*, 2001).

Em estudos *in vitro* realizados por DVORAK (1980) e LEVY *et al.* (1997), mostraram que o aumento das proteínas liberadas pelos eosinófilos periféricos refletem a atividade da RCUI e da DC, podendo ser usado como parâmetro laboratorial para determinação da atividade inflamatória crônica intestinal (LUCK *et al.*, 1997). Concentrações elevadas destas proteínas são observadas nas fezes de pacientes com DII (BERSTAD *et al.*, 1993; RAAB *et al.*, 1995; BISCHOFF *et al.*, 1997; TRONCONE *et al.*, 1999). Neste caso, analisando o conteúdo fecal de pacientes com RCUI, se observou uma alta concentração de ECP, principalmente nos segmentos retal e sigmoidal (VENGE *et al.*, 1983; RAAB *et al.*, 1998).

TRONCONE *et al.* (1999) também realizaram estudos em crianças com DC e com RCUI e observaram, no lavado intestinal, grandes concentrações de ECP, em relação aos indivíduos sadios, sugerindo novamente que esta doença é acompanhada pela ativação dos eosinófilos no trato gastrointestinal.

Segundo YOUNG *et al.* (1986) e RAAB *et al.* (1998), muitos pacientes com RCUI apresentam infiltração pronunciada de eosinófilos na lâmina própria e no exsudado da mucosa intestinal. Proeminentes infiltrados destas células também são observados na mucosa intestinal de pacientes com DC (DEUSCH & REICH, 1992; CHEN *et al.*, 2001).

Alguns estudos demonstraram que os eosinófilos estão presentes nos diferentes estágios de evolução da doença, sugerindo sua participação desde cedo nos danos da mucosa (TALLEY *et al.*, 1992; DUBUCQUOI *et al.*, 1995).

Também foi observado em soro, nas fezes e na mucosa colônica de pacientes com RCUI um aumento significativo das concentrações de PGE₂ proveniente de eosinófilos e/ou macrófagos (LOBOS *et al.*, 1987). A relação entre o aumento das concentrações de EPO e PGE₂ sugere que a primeira tem importante papel no aumento dos níveis desta PG no cólon retal de pacientes com RCUI (BERSTAD *et al.*, 1993).

Os neutrófilos e mastócitos podem também participar do acúmulo de eosinófilos e, portanto, na patogênese das DII. Estas células estão em número elevado nas lesões de pacientes com DC (HÅKANSSON *et al.*, 1987; DENIS *et al.*, 2001; WINTERKAMP *et al.*, 2002).

Em decorrência de dados na literatura sobre a atuação do eosinófilo no processo inflamatório intestinal, justificam-se os objetivos do presente trabalho, em avaliar a atividade desta célula para maior esclarecimento de sua importância nas DII.

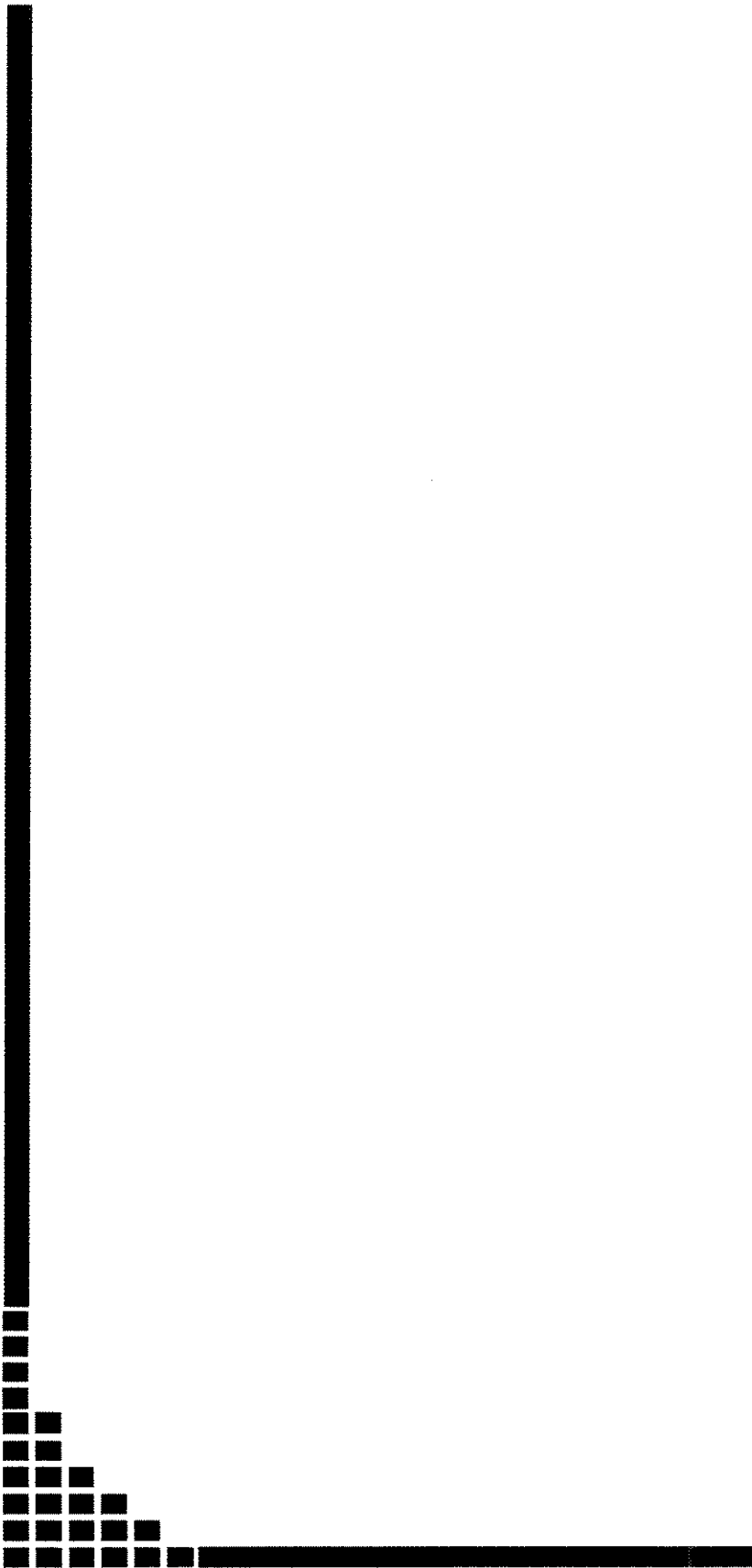


3- PROPOSIÇÃO

O presente trabalho tem como objetivo geral estudar o papel dos eosinófilos na patogênese das DII, usando, para tanto, células isoladas de sangue periférico humano.

Os objetivos específicos foram investigar em pacientes com DC e com RCUI, assim como, em voluntários saudáveis, os seguintes aspectos:

- A atividade quimiotática *in vitro* dos eosinófilos periféricos, usando-se o N-formyl-metionyl-leucyl-fenilalanina (fMLP) como agente quimiotático;
- A adesão *in vitro* dos eosinófilos periféricos em placas recobertas com fibronectina ou soro humano, usando-se o PAF, forbol-12-miristato-13-acetato (PMA) ou eotaxina como estímulos para induzir a adesão celular;
- A liberação de peroxidase do eosinófilo *in vitro*, usando-se o fMLP, PMA ou soro ativado por zimozan (SAZ) como estímulos para induzir desgranulação dos eosinófilos;
- A expressão das moléculas de adesão *macrophage-1 antigen* (Mac-1) e *very late antigen 4* (VLA-4) na superfície dos eosinófilos;
- O número de eosinófilos presentes em tecidos biopsiados do intestino dos três grupos de indivíduos (voluntários saudáveis, DC e RCUI);
- A morfometria dos eosinófilos periféricos e de seus grânulos, por microscopia eletrônica.



4.1- Critérios de Levantamento dos Prontuários Clínicos e Casuística

A história clínica e os devidos exames laboratoriais de todos os pacientes incluídos no estudo foram obtidos através de consulta aos prontuários clínicos solicitados ao Serviço de Arquivo Médico (S.A.M.E.), do Hospital das Clínicas da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp) e revisados sob a orientação do Prof. Dr. José Geraldo Paraíso Ferraz.

Tipo de Estudo: Estudo de três grupos independentes, sem pareamento. Sendo um grupo de voluntários sadios, representando o controle; outro grupo de pacientes com DC e um terceiro grupo de pacientes com RCUI. Os pacientes apresentavam sintomatologia clínica compatível com a doença em atividade moderada, observado também em exames de colonoscopia e laboratoriais.

4.1.1- Critérios de Inclusão

- Pacientes com DC ou RCUI diagnosticados através das análises clínica, radiológica e/ou endoscópica e laboratorial.
- Prontuários clínicos disponíveis para avaliação da evolução clínica até a definição diagnóstica.
- Pacientes com DC submetidos a procedimentos cirúrgicos (enterectomia, plastia de estenoses), mas que possuíam doença residual, como recorrência, em intestino grosso e/ou delgado.
- O uso de aminossalicilatos (mesalazina, sulfassalazina) não foi interrompido para a realização do estudo.

4.1.2- Critérios de Exclusão

- Histórias clínicas inconclusivas quanto ao diagnóstico definitivo.
- Abandono do tratamento pelo paciente ou transferência para outro serviço após os primeiros exames laboratoriais.
- Pacientes que se recusaram a assinar o Termo de Consentimento.
- Pacientes com níveis de hemoglobina ≤ 10 mg/dL.
- Aqueles em uso de imunossupressores (azatioprina, metotrexate, ciclosporina, prednisona).
- Aqueles em uso contínuo por mais de quatro semanas, dos seguintes fármacos: corticosteróides, talidomida, infliximab, antimicrobianos e antiinflamatórios não esteróides; pois estes fármacos podem alterar a produção, maturação e diferenciação dos eosinófilos na medula óssea.
- Presença de neoplasia, infecções por parasitas e manifestações alérgicas.

4.1.3- Comitê de Ética em Pesquisa

Para a realização deste estudo, os pacientes e os voluntários sadios receberam e assinaram um Termo de Consentimento (Anexos 1 e 2, respectivamente). Nosso trabalho foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP e por ele aprovado (parecer nº 318/2000) (Anexo 3).

4.2- Amostras de Sangue

Pacientes com DII em atividade, atualmente em seguimento junto ao Ambulatório de Gastroenterologia Clínica do Hospital das Clínicas da Unicamp, foram convidados a participar do estudo no momento da consulta ambulatorial de rotina (Anexo 4). Foram utilizados para os ensaios de quimiotaxia, adesão e liberação de EPO dez pacientes com DII, sendo cinco com DC e cinco com RCUI, e cinco voluntários sadios, ambos os sexos, idade entre 18 a 60 anos. Para citometria de fluxo e microscopia eletrônica

foram utilizados seis pacientes com DII, sendo três com DC e três com RCUI, e seis voluntários sadios. Para a contagem histológica foram utilizados dez pacientes com DII, sendo cinco com DC e cinco com RCUI. Como controle, utilizamos cinco indivíduos com queixas digestivas baixas, com coloscopia e análise histo-patológica do tecido intestinal normal.

Os dados clínicos foram rotineiramente coletados durante o acompanhamento ambulatorial, fazendo parte de seu tratamento. A participação de cada paciente foi restrita à coleta de sangue para processamento, não trazendo qualquer benefício ou prejuízo terapêutico.

Para a realização dos diferentes ensaios, foram obtidas coletas de sangue de pacientes e voluntários sadios, sendo respeitado o intervalo de pelo menos um mês entre as coletas do mesmo doador. Cada protocolo experimental foi realizado com no mínimo três doadores diferentes. Manteve-se a rotina clínica e laboratorial dos pacientes para o controle da atividade da doença e o tratamento não foi modificado. Neste período, nenhum paciente precisou de medicação adicional.

O sangue venoso (60 a 120 mL) foi colhido na presença de citrato de sódio 3,13% (1:10), sendo coletado pela manhã (08h 00min), em jejum, em dia de consulta de rotina de acompanhamento ambulatorial, por pessoal habilitado do Laboratório Especializado em Gastroenterologia do Centro de Diagnóstico de Doenças do Aparelho Digestivo (Gastrocentro) - Unicamp, através de punção venosa em veia de antebraço direito ou esquerdo com materiais descartáveis e sob rigorosas condições de assepsia. O volume da amostra coletado não trouxe prejuízo na evolução ou tratamento da doença, sendo a quantidade necessária para o isolamento do número mínimo de eosinófilos que permita a realização dos ensaios, em função da pequena porcentagem desse tipo celular no sangue periférico. O tratamento dos pacientes não foi interrompido ou modificado pela sua participação ou não no estudo.

Amostras de sangue dos voluntários sadios, definidos como controles, foram processadas e utilizadas como descrito anteriormente.

4.3- Obtenção de Eosinófilos

4.3.1- Isolamento de Neutrófilos e Eosinófilos

O sangue não coagulado (60 a 120 mL) foi inicialmente diluído (1:1; v/v) com PBS (*phosphate buffered saline*), pH 7,2-7,4. Aliquotas de 35 mL de sangue diluído foram colocadas sobre 15 mL de um gradiente de Percoll (densidade $1,082 \pm 0,005$ g/mL, pH 7,4, 340 mOs/kg H₂O de osmolaridade) contendo 9,5 mL de Percoll (Sigma Chemical CO., St. Louis, MO, EUA), 4,0 mL de água e 1,5 mL de HANKS (HBSS: *Hank's Balanced Salts Solution*) concentrado 10 vezes, em um tubo plástico graduado de 50 mL (Becton Dickinson, NJ, USA). Após centrifugação (20 min; 1000xg, 4°C), a camada de células mononucleares junto à interface foi delicadamente removida e descartada. A seguir, aspirou-se o sedimento contendo eritrócitos, neutrófilos e eosinófilos. Os eritrócitos foram lisados (13 min; 0°C) por adição de cinco volumes de solução isotônica gelada de cloreto de amônio (NH₄Cl 155 mM, KHCO₃ 10 mM e EDTA 0,1 mM) para um volume do sedimento. Após a lise, a suspensão celular foi centrifugada por 10 min a 500xg e 4°C. A mistura resultante de neutrófilos e eosinófilos foi então lavada uma vez (10 min; 500xg; 4°C) em PBS enriquecido com albumina de soro bovino (BSA, 0,5%), sendo posteriormente realizadas as contagens total e diferencial (descritas a seguir).

4.3.2- Separação Imunomagnética de Células

Utilizamos o sistema magnético de separação celular (MACS; Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Alemanha; e Becton-Dickinson, Oxford, Reino Unido) para separar eosinófilos, conforme descrito por HANSEL *et al.*, 1991. O sistema incorpora um adaptador de magneto de ferro (tipo VS⁺) no qual acoplamos uma coluna de separação, contendo uma matriz de fibras de aço (tipo CS; volume da matriz de 6,3 mL) e uma agulha hipodérmica 21 g (Ilustração 2). Antes do uso, a coluna foi lavada quatro vezes com PBS/BSA 0,5% e posteriormente incubada com PBS/BSA à temperatura ambiente por uma hora. Imediatamente antes do uso, foi resfriada por meio de quatro lavagens com PBS/BSA gelado.

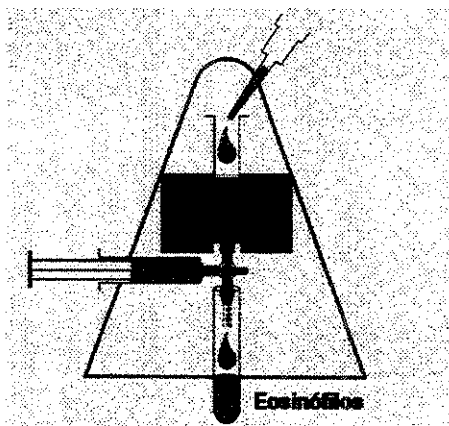


Ilustração 2 – Coluna de Separação Imunomagnética MACS. Extraído e adaptado do manual de instruções do fabricante.

4.3.3- Seleção Imunomagnética Negativa de Eosinófilos

A mistura de neutrófilos/eosinófilos e *microbeads* contendo CD16 aderido foi incubada por 30 min a 6-12°C, sendo utilizados 32 μ L de *microbeads* para cada 5×10^7 células. Foi então adicionado PBS/BSA gelado (q.s.p. 1 mL) à suspensão de células, a qual foi transferida para o alto da coluna de separação, sob campo magnético. Abrindo totalmente a torneira de três vias junto à base da coluna, a suspensão celular entrava na coluna, passando pela mesma mais três volumes (1 mL) de tampão PBS/BSA adicionais. As células CD16⁺ (neutrófilos) ficaram presas à coluna, ao passo que as células CD16⁻ (eosinófilos) foram coletadas em dois tubos de 15 mL (volume de eluição de 30 mL) (Ilustração 2). As CD16⁻ foram centrifugadas (10 min; 500xg; 4°C) antes da realização dos testes funcionais, das contagens total e diferencial e do teste de viabilidade celular (descritos a seguir). A coluna foi então removida do campo magnético e as células identificadas magneticamente foram retiradas, usando-se PBS/BSA e desprezadas.

4.3.4- Contagem de Células

A determinação total de células foi realizada usando-se a câmara de Neubauer, obtendo o número de células $\times 10^6/\text{mL}$. As lâminas foram preparadas na citocentrífuga por 10 min, contendo 2×10^5 células/lâmina (2×10^6 células/mL; 100 μL ; 1800 $\times$ g), e posteriormente coradas com May-Grünwald-Giemsa antes da determinação diferencial de células em microscópio óptico. No mínimo 500 células foram contadas e classificadas em neutrófilos, eosinófilos e mononucleares, baseadas no critério morfológico normal. As células foram então ressuspensas na concentração desejada, dependendo do ensaio a ser realizado posteriormente.

Em todos os experimentos realizados obtivemos um grau de pureza superior a 98%, sendo a rara contaminação ocasionada por neutrófilos (0-2%) e monócitos (0-2%). A viabilidade dos eosinófilos observada no método de exclusão pelo Azul de Trypan sempre foi superior a 95%. Em cada purificação conseguíamos uma suspensão celular entre $5\text{-}30 \times 10^6$ eosinófilos.

Os experimentos para obtenção de eosinófilos, assim como, os ensaios de quimiotaxia, adesão e liberação de EPO foram realizados no Laboratório de Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas – Unicamp.

4.4- Ensaio de Quimiotaxia “*in vitro*”

Os ensaios de quimiotaxia foram realizados, usando-se câmara de microquimiotaxia com 48 poços (RICHARDS & MCCULLOUGH, 1984). Aliquotas de 50 μL da suspensão de eosinófilos (5×10^6 células/mL em MEM/OVA 0,1% [Meio mínimo essencial de Eagle/Ovalbumina]) foram colocadas no compartimento superior da câmara e 28 μL do agente quimiotático (fMLP; 3×10^{-9} - 10^{-6} M) colocados no compartimento inferior. Os dois compartimentos foram separados com filtro de polícarbonato com poro de 5 μm (Nuclepore Pleasanton, CA, EUA). A migração espontânea foi verificada, substituindo-se o agente quimiotático por 28 μL de MEM. Após incubação por duas horas

a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ (ar úmido), os filtros foram fixados por dois minutos em metanol 70%, corados com Diff-Quik® (Baxter Healthcare Corporation, DE, EUA) e montados sobre uma lâmina de microscopia. A migração dos eosinófilos foi determinada, quantificando-se o número de células que migraram através do filtro (que migraram totalmente, chegando ao lado inferior do filtro), em cinco campos aleatórios por poço, usando-se microscópio com objetiva de imersão. Em cada experimento, os ensaios foram realizados em triplicata.

4.5- Ensaio de Adesão “*in vitro*”

O método utilizado consiste em quantificar a EPO nas células aderidas para podermos inferir sobre a quantidade de eosinófilos aderidos em cada amostra. Sendo assim, é uma relação direta da absorbância com o número de eosinófilos aderidos.

O ensaio de adesão foi realizado como descrito previamente por HÅKANSSON *et al.* em 1994, com algumas modificações. Os ensaios foram realizados, usando-se placas de 96 poços de alta ligação, sendo a mesma previamente tratada com 60 µL de fibronectina humana (20 µg/mL em PBS) ou de soro humano (a 10% em PBS; v/v).

As placas foram deixadas *overnight* a 4°C. Os poços foram lavados no dia seguinte, dia do experimento, com 200 µL de PBS por duas vezes, e as ligações não específicas foram bloqueadas com a adição de 100 µL de PBS/BSA 0,1% (p/v) por uma hora a 37°C. Depois disso, as placas foram lavadas mais duas vezes com 200 µL de PBS e deixadas secar a 37°C.

Após ressuspensão dos eosinófilos na concentração final de 7×10^4 células/mL (MEM/OVA), as células foram incubados por 15 min a 37°C com MEM (adesão espontânea), PAF (10^{-7} - 10^{-5} M), PMA (10^{-8} - 10^{-6} M), DMSO [dimetil sulfóxido] (0,0125%, veículo de diluição do PMA na maior concentração utilizada) e eotaxina (100 - 1000 ng/mL). A eotaxina não foi utilizada em células isoladas de pacientes com

RCUI, pois, previamente observou-se que não houve diferença significativa ao estimular os eosinófilos isolados de voluntários sadios e este agente apresentou o mesmo perfil de resposta dos agentes PAF e PMA, anteriormente utilizados.

Depois desse período de incubação, 50 µL das amostras foram adicionados aos poços, em triplicata. A placa foi então incubada por 15 min a 37°C com 5% CO₂ e ar úmido, e posteriormente lavada por duas vezes com 200 µL de PBS, para que as células não aderidas fossem retiradas. Os poços ensaiados receberam 50 µL de MEM/OVA e os poços reservados à curva padrão receberam 50 µL de concentrações variadas da suspensão celular original, em triplicata, ou seja, de 0 a 100% da suspensão celular original (7×10^4 eosinófilos/mL). Foram acrescidos a todos os poços das amostras e da curva padrão, 50 µL do substrato para EPO (1 mM H₂O₂, 1 mM o-fenilenediamina, 0,1% triton X-100 em tampão Tris 0,05 M, pH 8,0). Sob leve agitação, a placa foi incubada à temperatura ambiente por 30 min, e após este período, 25 µL de H₂SO₄ (4 M) foram adicionados a cada poço para interromper a reação. A absorbância foi determinada a 490 nm no leitor de ELISA (Multiscan MS, Labsystems, EUA).

A adesão dos eosinófilos foi calculada pela medida da liberação de EPO das células aderidas das amostras, comparando-as com a curva padrão (NAGATA *et al.*, 1995).

4.6- Dosagem de Peroxidase do Eosinófilo (EPO)

Após o isolamento dos eosinófilos obtidos de sangue periférico, os mesmos foram ressuspensos na concentração final de 5×10^5 células/mL (MEM/OVA).

A suspensão celular foi pré-incubada com 2,5 µg/mL de dihidrocitocalasina B por 10 min em 5% de CO₂ a 37°C. Posteriormente, as células foram estimuladas com fMLP (10^{-7} - 10^{-5} M), PMA (10 - 1000 ng/mL), DMSO (0,02%, veículo de diluição do PMA na maior concentração utilizada) e SAZ (0,25 - 1 mg/mL). Esta mistura foi incubada por uma hora a 37°C com 5% CO₂ e ar úmido. Em experimentos pilotos foi determinado que este tempo seria suficiente para o completo processo de desgranulação dos eosinófilos. O SAZ

foi preparado pela prévia incubação de soro humano por uma hora a 37°C com zimozan, posterior centrifugação a 2000xg por 15 min à temperatura ambiente, com descarte do sedimento. Após este período de incubação, a reação foi bloqueada no gelo por três minutos, e as amostras centrifugadas por 10 min a 600xg (4°C), com exceção da amostra utilizada para controle positivo, onde obtínhamos 100% de EPO (EPO total), ou seja, EPO estocada e EPO liberada por células sem tratamento. Ao término da centrifugação, 50 µL de cada amostra foram dispensadas por poço ($2,5 \times 10^4$ células/poço), em triplicata, em uma placa de 96 poços.

Foi acrescido a todos os poços, ensaiados e controles, 50 µL do substrato para EPO (1 mM H₂O₂, 1 mM o-fenilenediamina e 0,1% Triton X-100 em tampão Tris 0,05 M, pH 8,0). Sob leve agitação, a placa foi incubada à temperatura ambiente por 30 min, e após este período, 25 µL de H₂SO₄ (4 M) foram adicionados a cada poço para interromper a reação. A absorbância foi determinada a 490 nm no leitor de ELISA (Multiscan MS, Labsystems, EUA).

A liberação de EPO foi medida pelo método de o-fenilenediamina (OPD) modificado (KROEGEL *et al.*, 1989).

A EPO foi calculada pela comparação da absorbância dos grupos estimulados com o grupo controle positivo (100%) e os valores foram expressos como porcentagem.

4.7- Citometria de Fluxo

A expressão das moléculas de adesão, VLA-4 e Mac-1, sobre a superfície dos eosinófilos foi detectada usando-se o citômetro de fluxo no Laboratório de Imunologia Celular do Centro Integrado de Pesquisa Oncohematológica da Infância – Unicamp. Os eosinófilos isolados foram centrifugados (300xg, 10 min, 4°C) e ressuspensos em soro humano AB (10 µL/tubo; inativado a 56°C por uma hora) e incubados por 10 min a 4°C, para bloquear as ligações inespecíficas. Posteriormente, as amostras (1×10^6 células/amostra, MEM/OVA) receberam 1 mL de tampão PBS/BSA 0,5% contendo azida a 0,2%,

centrifugadas por 10 min a 300xg (4°C). Após a lavagem, as células foram incubadas com anticorpos monoclonais de camundongo conjugado à ficoeritrina (PE) anti-moléculas de adesão humanas (CD49d, clone 9F10, anti-VLA-4; CD11b, clone ICRF 44, anti-Mac-1; 20 µL/10⁶ células) ou com o anticorpo controle (IgG₁, de camundongo conjugado à ficoeritrina (PE), monoclonal, isotipo κ, obtido da linhagem celular mielóide de camundongo MOPC-21; 20 µL/10⁶ células) por 20 min (4°C; ar úmido). Após a incubação, fez-se lavagem com PBS e azida 0,2% (1 mL/ tubo) a 300xg, por 10 min (4°C) e removeu-se o sobrenadante. A seguir, foi adicionado à suspensão, 500 µL de tampão PBS/BSA 0,5% e azida 0,2%. As células (50.000) foram analisadas a 488 nm no FACS (Becton-Dickinson FACScalibur). As imagens provocadas pelas dispersões lateral e dianteira foram usadas como registro da população de eosinófilos, assegurando-se que somente as populações celulares de interesse fossem analisadas. A intensidade de fluorescência de cada célula foi comparada àquela das células que reagiram com o controle.

4.8- Contagem Histológica

Durante o exame rotineiro de colonoscopia, realizou-se biópsia de locais específicos do intestino, segundo a localização da doença de cada indivíduo.

Com o fragmento do tecido intestinal obtido através da colonoscopia por biópsia foram realizadas lâminas histológicas, com corte de 5 µm e coloração com hematoxilina/eosina, no laboratório de Anatomia Patológica do Gastrocentro. Após o preparo das lâminas procedeu-se a contagem de eosinófilos em cinco campos aleatórios do fragmento, utilizando microscópio óptico biocular (BH-2, Olympus, Japão). Tomou-se o cuidado de obter lâminas histológicas da mesma localização intestinal de todos os pacientes estudados, tais como: sigmóide, cólon descendente, cólon ascendente e íleo terminal.

4.9- Microscopia Eletrônica

A morfometria dos eosinófilos foi detectada, usando-se microscópio eletrônico no Laboratório de Microscopia Eletrônica da Anatomia Patológica - Unicamp. Os eosinófilos isolados (5x10⁶ células/mL em 50 µL) foram centrifugados, e o sedimento

fixado em solução de Karnovsky (pH 7,2); (KARNOVSKY, 1965) durante uma hora. Posteriormente, foram pós-fixados em tetróxido de ósmio a 2% durante duas horas. Em seguida, lavados com tampão cacodilato de sódio (pH 7,2) e *overnight* deixados em solução de acetato de uranila 0,5%. A desidratação foi realizada em uma série crescente de acetona, 30% durante 30 minutos, 50%, 70%, 90% e 100% (duas vezes), durante 15 minutos cada. As amostras foram colocadas em uma mistura de resina Araldite e acetona pura (1:1) e permaneceram por duas horas no processador de microscopia eletrônica de tecido - autotécnico (Leica Inc., Deerfield, Illinois, EUA). Após permanência em resina Araldite, na estufa a 37°C, por uma hora, foram incluídas em resina Araldite pura, em forma de silicone, e conservadas na estufa a 60°C, durante 48 horas para polimerização dos blocos.

Depois de trimados e desbastados os blocos, efetuaram-se os cortes semifinos com navalhas de vidro, numa espessura em torno de 300 nm. Posteriormente, foram corados com azul de toluidina 2% para uma melhor seleção de área com fibras longitudinais.

Os cortes ultrafinos foram realizados com navalha de diamante (Diatome), no ultramicrotomo MT 6000 XL, com uma espessura de aproximadamente 90 nm, e colocados em telas de cobre. Foram examinados diretamente com microscópio eletrônico EM 10 Zeiss.

Para obter-se maior segurança em relação à variação de espessura dos cortes, foram colocados nas telas de cobre somente aqueles que apresentaram a cor amarelo-ouro.

4.10- Análise Estatística

Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM) de n experimentos. Diferenças significativas foram determinadas, utilizando-se análise de variância (ANOVA) para múltiplas comparações, seguido pelo teste de Tukey. Valores de $P < 0,05$ foram considerados significativos.

Não foi realizada análise estatística para citometria de fluxo, devido à pequena amostragem de pacientes apresentada nos grupos testados.



5- RESULTADOS

5.1- Dados dos Pacientes

Os pacientes com DII incluídos neste estudo apresentaram doença ativa e iniciaram recentemente o uso de sulfassalazina e mesalazina para controle terapêutico. Os imunossuppressores, quando necessários, foram empregados após a coleta sanguínea realizada para o estudo. Pacientes com RCUI apresentaram pancolite (n=3) e colite do lado-esquerdo (n=2). Pacientes com DC apresentaram doença ileal (n=2), colônica (n=1) e íleo-colônica (n=2); dois pacientes com DC apresentaram doença perianal concomitante. O número de leucócitos e eosinófilos no sangue periférico, quantificados por exames laboratoriais de rotina, foi similar entre os voluntários sadios e pacientes com DII. As análises de amostras fecais para observação de ovos/parasitas foram negativas em todos os pacientes incluídos neste estudo.

5.2- Ensaio de Quimiotaxia

Os eosinófilos isolados (5×10^6 células/mL) de voluntários sadios não migraram de forma significativa em condições basais (MEM). Porém, a ativação dos eosinófilos pelo fMLP acarretou um aumento significativo da migração ($P < 0,001$) nas concentrações de 10^{-8} a 3×10^{-7} M (Figura 1).

A quimiotaxia espontânea dos eosinófilos de pacientes com DC e RCUI foi maior ($P < 0,001$) do que a quimiotaxia de eosinófilos dos voluntários sadios (Figura 1). Na presença de fMLP, a quimiotaxia dos eosinófilos de pacientes com DC e RCUI foi significativamente maior em relação aos eosinófilos de voluntários sadios. Entretanto, a quimiotaxia dos eosinófilos de pacientes com DC é marcadamente maior que dos pacientes com RCUI (Figura 1).

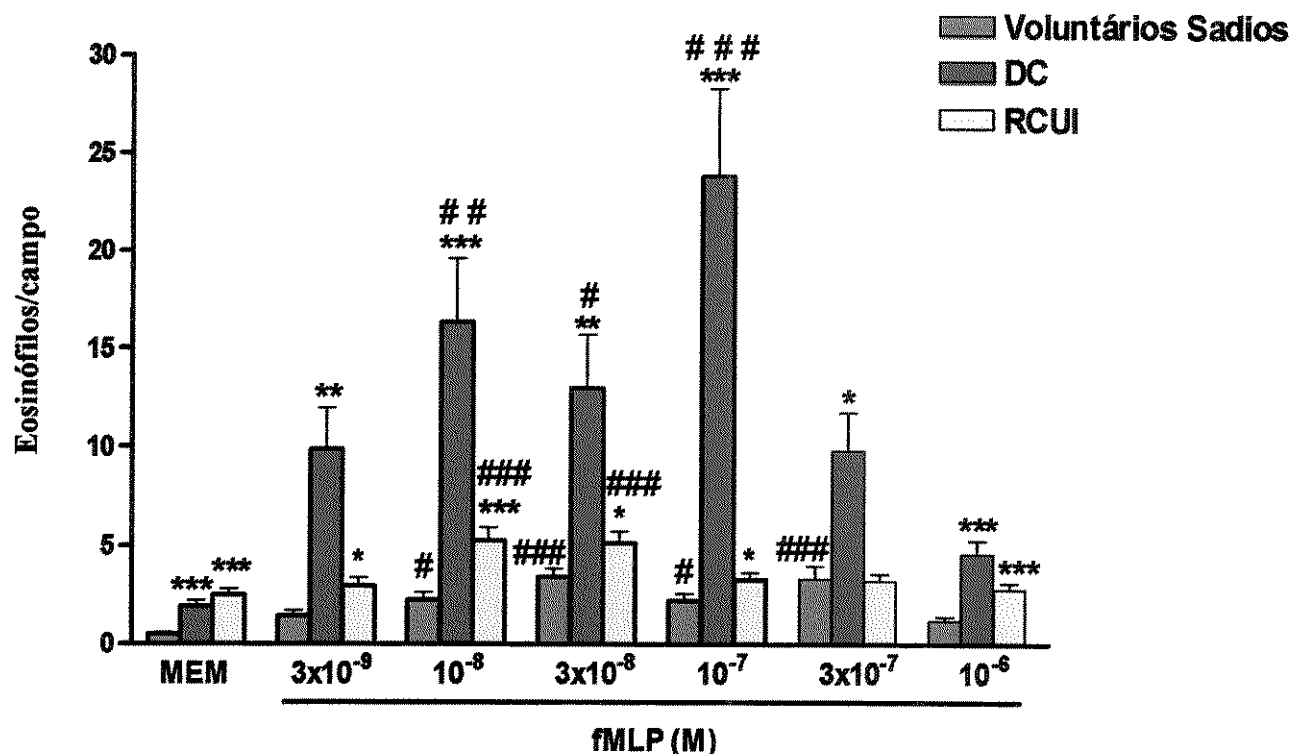


Figura 1- Efeito Quimiotático do fMLP sobre a Migração de Eosinófilos Periféricos de Voluntários Sadios, Pacientes com DC e com RCUI *in vitro*. A migração foi induzida pelo fMLP (3×10^{-9} - 10^{-6} M). MEM representa a migração espontânea (ausência de fMLP). Os resultados estão expressos como média $\pm$ EPM de eosinófilos que migraram por campo, em cinco experimentos independentes, realizados em triplicata cada. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$ comparado ao mesmo estímulo e concentração usados em voluntários sadios; # $P < 0,05$, ## $P < 0,01$ e ### $P < 0,001$ comparado ao respectivo grupo controle (MEM).

5.3- Ensaio de Adesão

5.3.1- Efeito do PAF, PMA e Eotaxina sobre a Adesão de Eosinófilos Periféricos para Fibronectina *in vitro*

A adesão espontânea de eosinófilos (MEM) foi significativamente maior em pacientes com DC ($P < 0,001$), quando comparada à adesão de células dos voluntários sadios ou pacientes com RCUI (Figura 2).

A pré-incubação de eosinófilos isolados de voluntários sadios com PAF 10^{-5} M aumentou de forma significativa, quando comparada à respectiva adesão espontânea (Figura 2).

A pré-incubação de eosinófilos (7×10^4 células/mL) com PAF (10^{-7} - 10^{-5} M), PMA (10^{-8} - 10^{-6} M) ou eotaxina (100-1000 ng/mL), por 15 min (5% CO_2 a 37°C), em placas recobertas com fibronectina humana, não modificou significativamente a adesão dos eosinófilos isolados de pacientes com DC e RCUI, quando comparada com suas respectivas adesões espontâneas (MEM) (Figura 2). Porém, houve um aumento significativo dos eosinófilos isolados de pacientes com DC quando comparado ao mesmo estímulo e concentração usados em voluntários sadios.

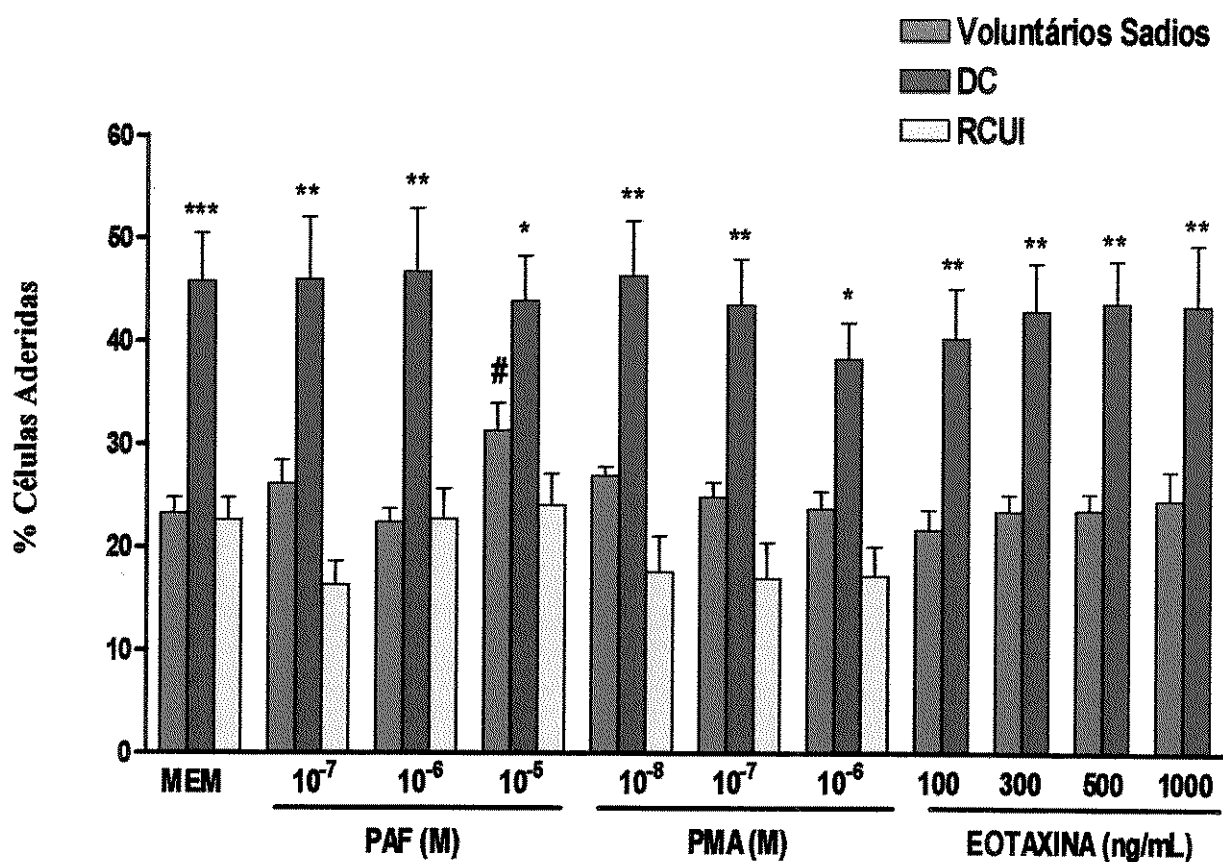


Figura 2- Adesão de Eosinófilos Periféricos de Voluntários Sadios, Pacientes com DC e com RCUI para Fibronectina *in vitro*. A suspensão de eosinófilos humanos (7×10^4 células/mL) foi pré-incubada (5% CO₂ a 37°C por 15 min) com PAF (10^{-7} - 10^{-5} M), PMA (10^{-8} - 10^{-6} M) ou eotaxina (100-1000 ng/mL). Posteriormente, as células foram incubadas em placas recobertas com fibronectina (20 µg/mL), em 5% CO₂ a 37°C por 15 min. As células que não receberam pré-tratamento com droga foram consideradas controle (MEM – adesão espontânea). Os resultados estão expressos como porcentagem de células aderidas $\pm$ EPM, de cinco experimentos independentes feitos em triplicata cada. * P<0,05, ** P<0,01 e *** P<0,001 comparado ao mesmo estímulo e concentração usados em voluntários sadios; # P<0,05 comparado ao respectivo grupo controle (MEM).

5.3.2- Efeito do PAF, PMA e Eotaxina sobre a Adesão de Eosinófilos Periféricos para Soro *in vitro*

Os eosinófilos isolados de pacientes com DC apresentaram, de forma significativa, uma maior adesão espontânea quando comparada à adesão de eosinófilos de voluntários sadios ou de pacientes com RCUI ($P < 0,001$) (Figura 3).

A pré-incubação de eosinófilos (7×10^4 células/mL) com PAF (10^{-7} - 10^{-5} M), PMA (10^{-8} - 10^{-6} M) ou eotaxina (100-1000 ng/mL), por 15 min (5% CO_2 a 37°C), em placas recobertas com soro humano, aumentou de forma significativa a adesão dos eosinófilos isolados de voluntários sadios, quando comparada à respectiva adesão espontânea ($P < 0,001$) (Figura 3). Em eosinófilos de pacientes com DC estimulados com PAF, PMA ou eotaxina, não notamos diferenças significativas em relação ao grupo de voluntários sadios, nem em relação à respectiva adesão espontânea. Entretanto, em células de pacientes com RCUI estimulados com PAF ou PMA, notamos redução significativa em relação ao mesmo estímulo e concentração usados em voluntários sadios (Figura 3).

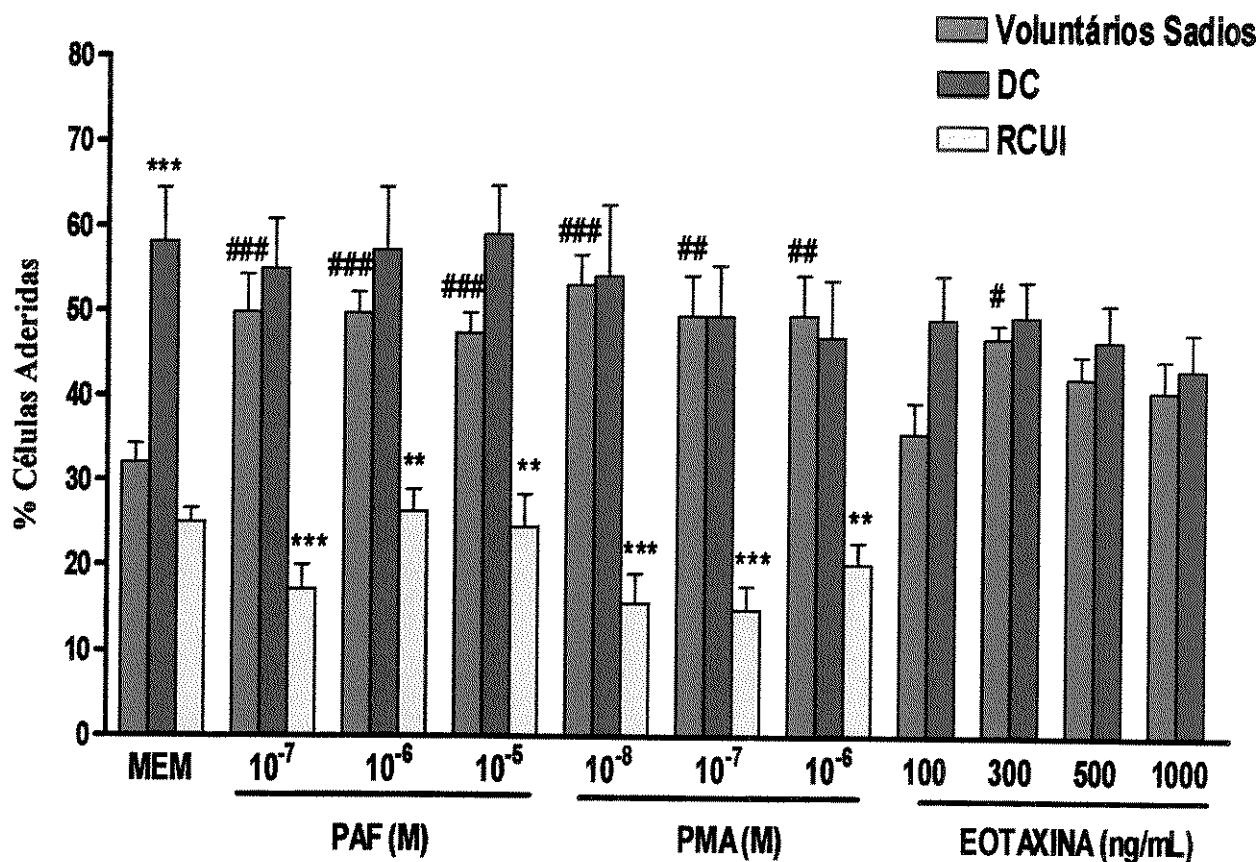


Figura 3- Adesão de Eosinófilos Periféricos de Voluntários Sadios, Pacientes com DC e com RCUI para Soro Humano *in vitro*. A suspensão de eosinófilos humanos (7×10^4 células/mL) foi pré-incubada (5% CO₂ a 37°C por 15 min) com PAF (10^{-7} - 10^{-5} M), PMA (10^{-8} - 10^{-6} M) ou eotaxina (100-1000 ng/mL). Posteriormente, as células foram incubadas em placas recobertas com soro humano (10%), em 5% CO₂ a 37°C por 15 min. As células que não receberam pré-tratamento com droga foram consideradas controle (MEM – adesão espontânea). Os resultados estão expressos como porcentagem de células aderidas $\pm$ EPM, de cinco experimentos independentes feitos em triplicata cada. ** P<0,01 e *** P<0,001 comparado ao mesmo estímulo e concentração usados em voluntários sadios; # P<0,05, ## P<0,01 e ### P<0,001 comparado ao respectivo grupo controle (MEM).

5.4- Ensaio de Dosagem de Peroxidase do Eosinófilo (EPO)

Em eosinófilos isolados de pacientes com DC houve uma redução significativa na liberação espontânea de EPO (MEM) quando comparada aos voluntários sadios ($P < 0,05$). Entretanto, os eosinófilos isolados de pacientes com RCUI mostraram, de forma significativa, uma maior liberação espontânea de EPO, quando comparada aos voluntários sadios ($P < 0,01$) (Figura 4).

A incubação de eosinófilos (5×10^5 células/mL) com fMLP (10^{-7} - 10^{-5} M) ou SAZ (0,25 - 1 mg/mL) por 1 h (5% CO_2 a 37°C), produziu uma redução na liberação de EPO dos eosinófilos de pacientes com DC, quando comparada ao grupo de voluntários sadios ($P < 0,05$) (Figura 4).

Por outro lado, a liberação de EPO mostrou-se aumentada significativamente em eosinófilos de pacientes com RCUI, quando comparada aos voluntários sadios, para os grupos estimulados com fMLP (10^{-7} e 10^{-6} M), PMA (10, 100 e 1000 ng/mL) e SAZ (0,25 e 0,5 mg/mL) (Figura 4).

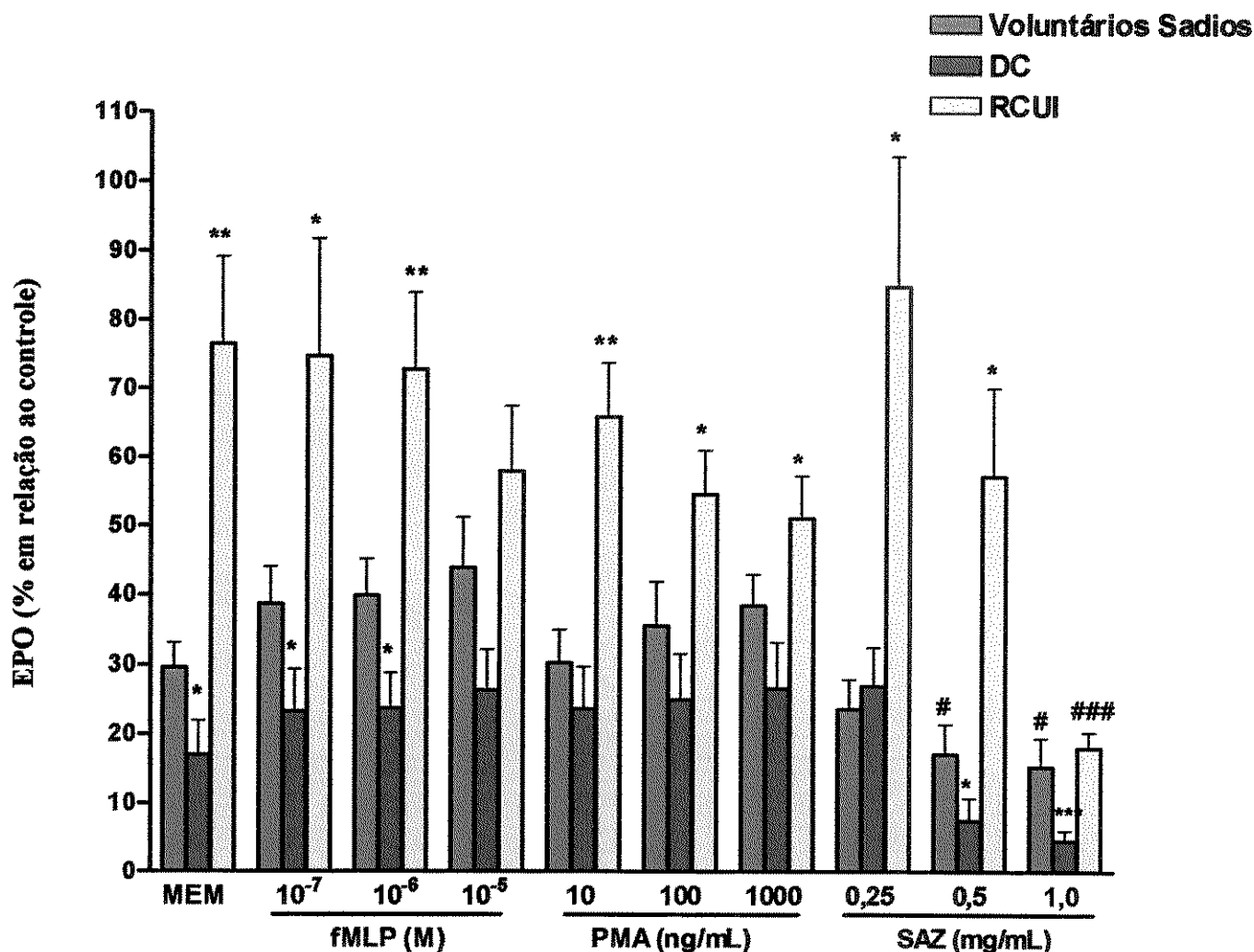


Figura 4- Liberação de EPO em Voluntários Sadios, Pacientes com DC e com RCUI *in vitro*. A suspensão de eosinófilos humanos (5×10^5 células/mL) foi pré-incubada (5% CO₂; 37°C; 10 min) com 2,5 µg/mL de dihidrocitocalasina B e, posteriormente, incubada com fMLP (10^{-7} - 10^{-5} M), PMA (10 - 1000 ng/mL) ou SAZ (0,25 - 1 mg/mL), por 1h (5% CO₂, 37°C). A EPO foi calculada pela comparação da absorbância dos grupos estimulados com o grupo controle positivo (100%) e os valores foram expressos como porcentagem $\pm$ EPM, de cinco experimentos independentes feitos em triplicata cada. * P<0,05, ** P<0,01 e *** P<0,001 comparado ao mesmo estímulo e concentração usados em voluntários sadios; # P<0,05 e ### P<0,001 comparado ao respectivo grupo controle (MEM).

5.5- Citometria de Fluxo

A expressão das moléculas de adesão Mac-1 e VLA-4, tanto sobre a população total de eosinófilos, dada em células marcadas (% do total) como na média de ligações por célula, dada em unidades de fluorescência/célula, não apresentou diferença e/ou aumento significativo entre os eosinófilos de voluntários sadios, pacientes com DC e com RCUI (Figura 5).

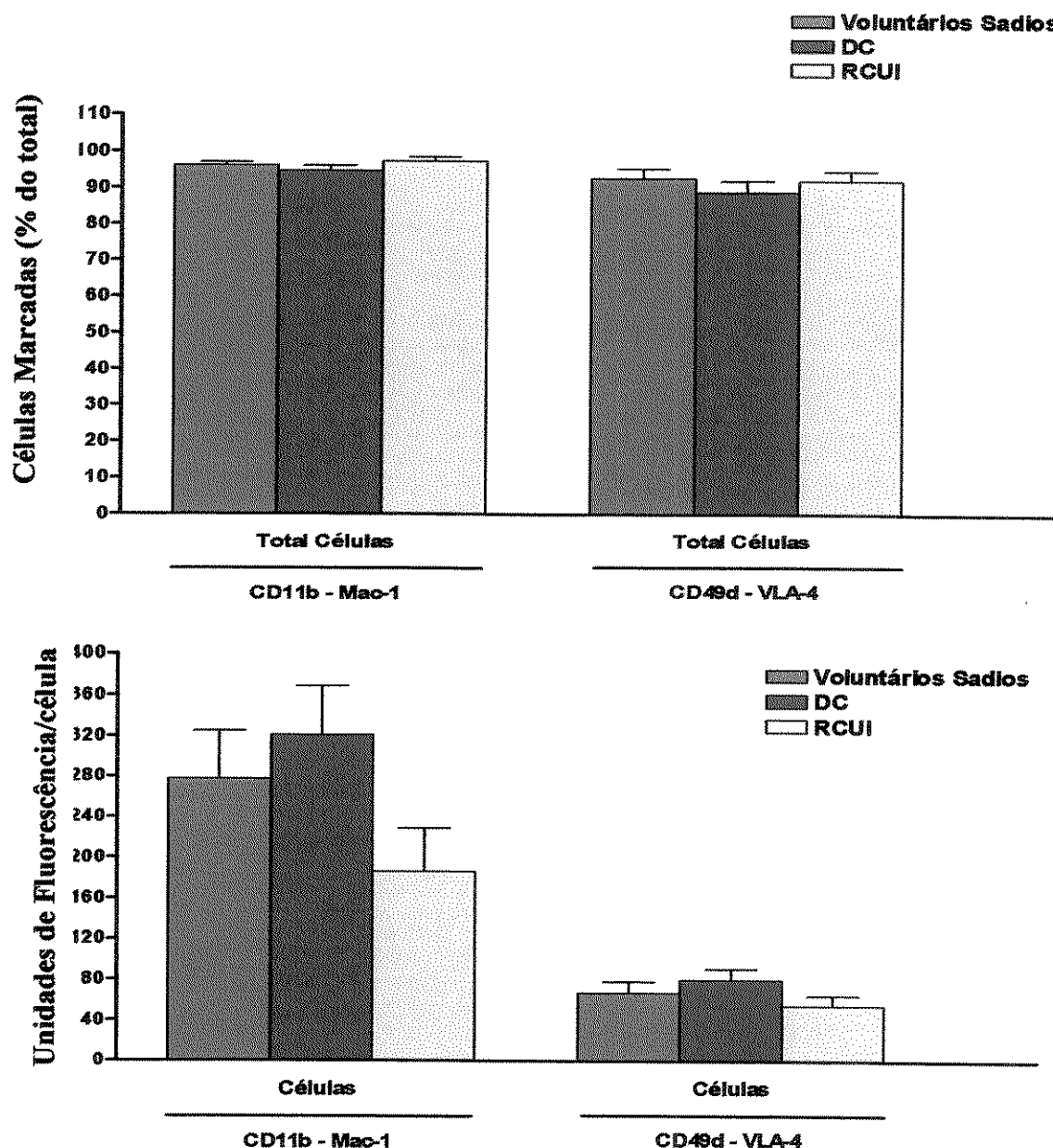


Figura 5- Expressão das Moléculas de Adesão Mac-1 e VLA-4 em Eosinófilos Periféricos de Voluntários Sadios, Pacientes com DC e com RCUI *in vitro*. A suspensão de eosinófilos humanos (1×10^6 células/amostra) foi pré-incubada com soro humano AB, em temperatura ambiente, por 10 min. Posteriormente, as células foram incubadas, a 4°C por 20 min, com anticorpos CD11b (Mac-1), CD49d (VLA-4) e IgG₁ representando o controle negativo. Os resultados estão expressos como média $\pm$ EPM, da expressão das moléculas de adesão nas células marcadas (% do total) e unidades de fluorescência/célula, de três experimentos independentes.

5.6- Contagem Histológica

Ao analisar o tecido intestinal obtido por biópsia, observou-se um aumento significativo do número de eosinófilos na mucosa intestinal, em pacientes com DC e com RCUI quando comparado aos controles ($P<0,05$) (Figura 6).

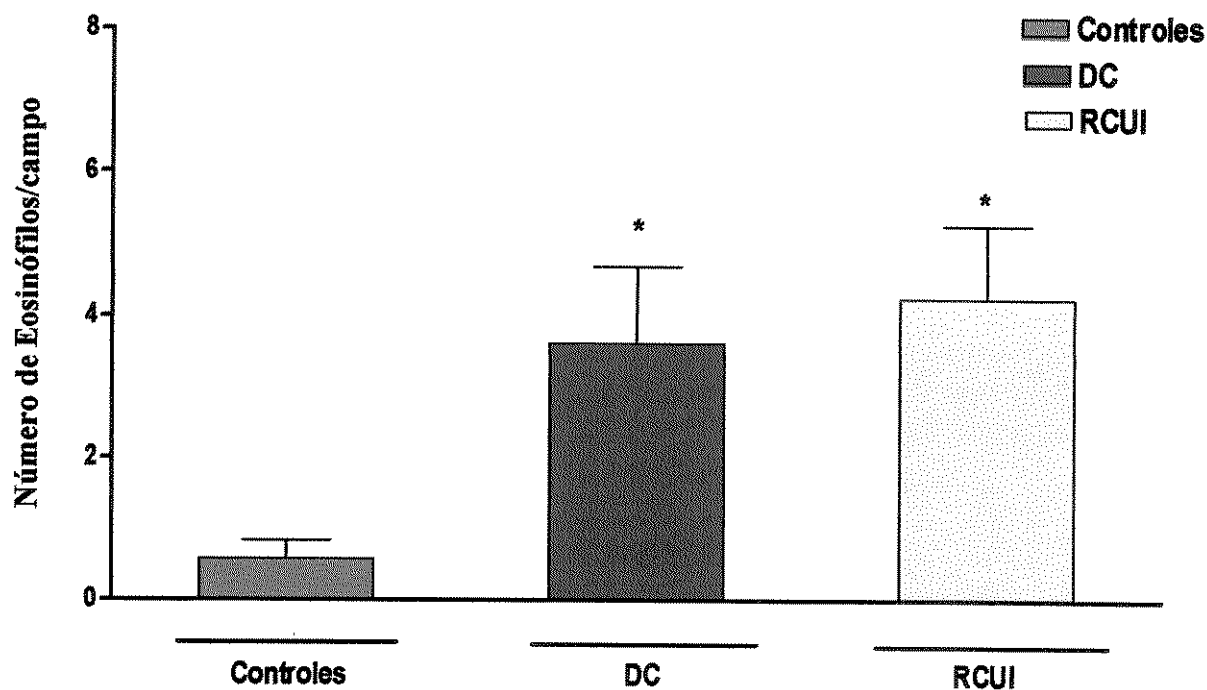


Figura 6- Contagem Histológica de Eosinófilos em Tecido Intestinal de Controles, Pacientes com DC e com RCUI. Foram utilizados controles (n=5), pacientes com doença de Crohn (n=5) e retocolite ulcerativa inespecífica (n=4). * $P<0,05$ em relação aos controles.

5.7- Microscopia Eletrônica

Os eosinófilos isolados de pacientes com DC e com RCUI apresentaram um aumento significativo no número de grânulos intracelulares, quando comparado aos voluntários sadios. Entretanto, o número de grânulos dos eosinófilos de pacientes com RCUI é marcadamente maior do que em eosinófilos de pacientes com DC (Figura 7).

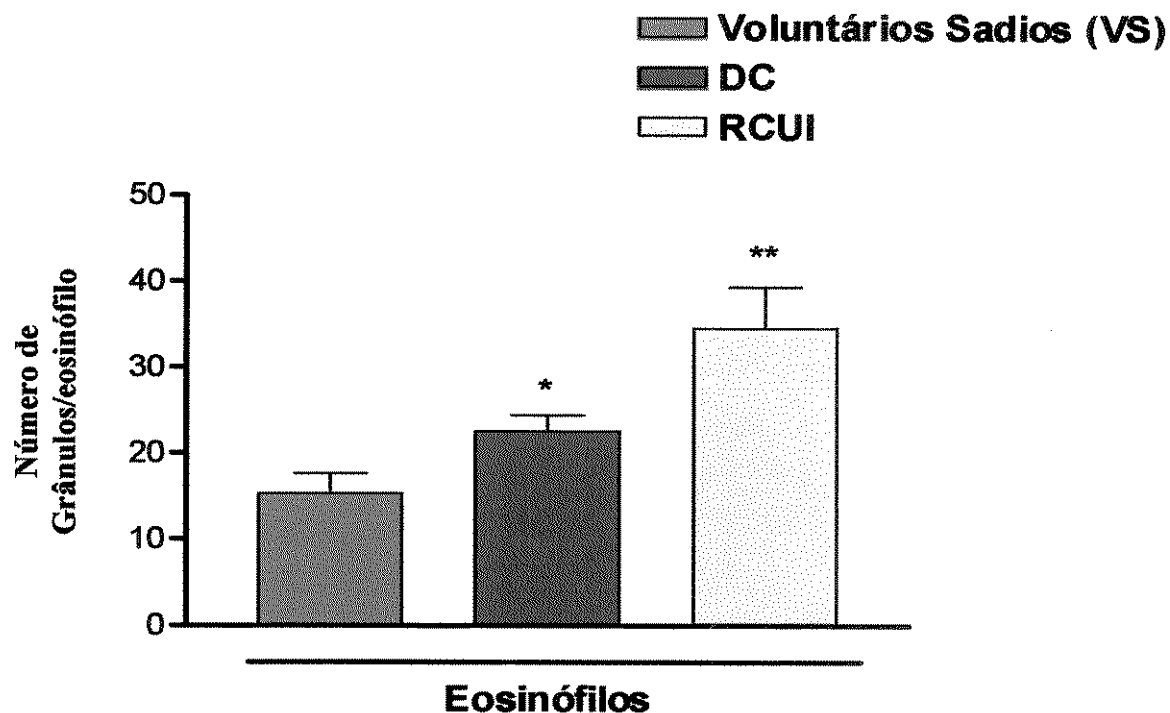


Figura 7- Quantificação do Número de Grânulos dos Eosinófilos Periféricos Humanos em Voluntários Sadios, Pacientes com DC e com RCUI. Foram utilizados voluntários sadios (n=3), pacientes com doença de Crohn (n=3) e retocolite ulcerativa inespecífica (n=3). * $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$ em relação aos voluntários sadios.

Os eosinófilos isolados de pacientes com DC e com RCUI apresentaram um aumento significativo no perímetro e no diâmetro dos seus grânulos, quando comparados aos voluntários sadios ($P<0,001$) (Figuras 8 e 9).

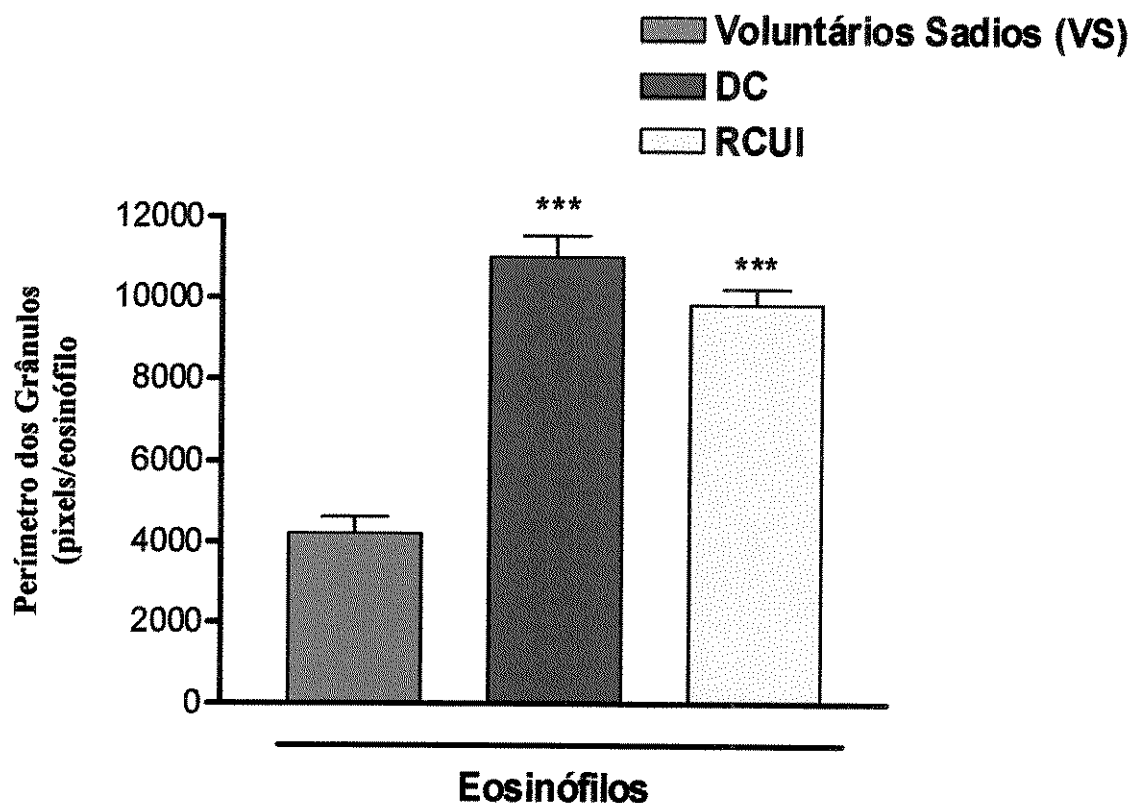


Figura 8- Análise do Perímetro dos Grânulos de Eosinófilos Periféricos Humanos em Voluntários Sadios, Pacientes com DC e com RCUI. Foram utilizados voluntários sadios (n=3), pacientes com doença de Crohn (n=3) e retocolite ulcerativa inespecífica (n=3). *** $P<0,001$ em relação aos voluntários sadios.

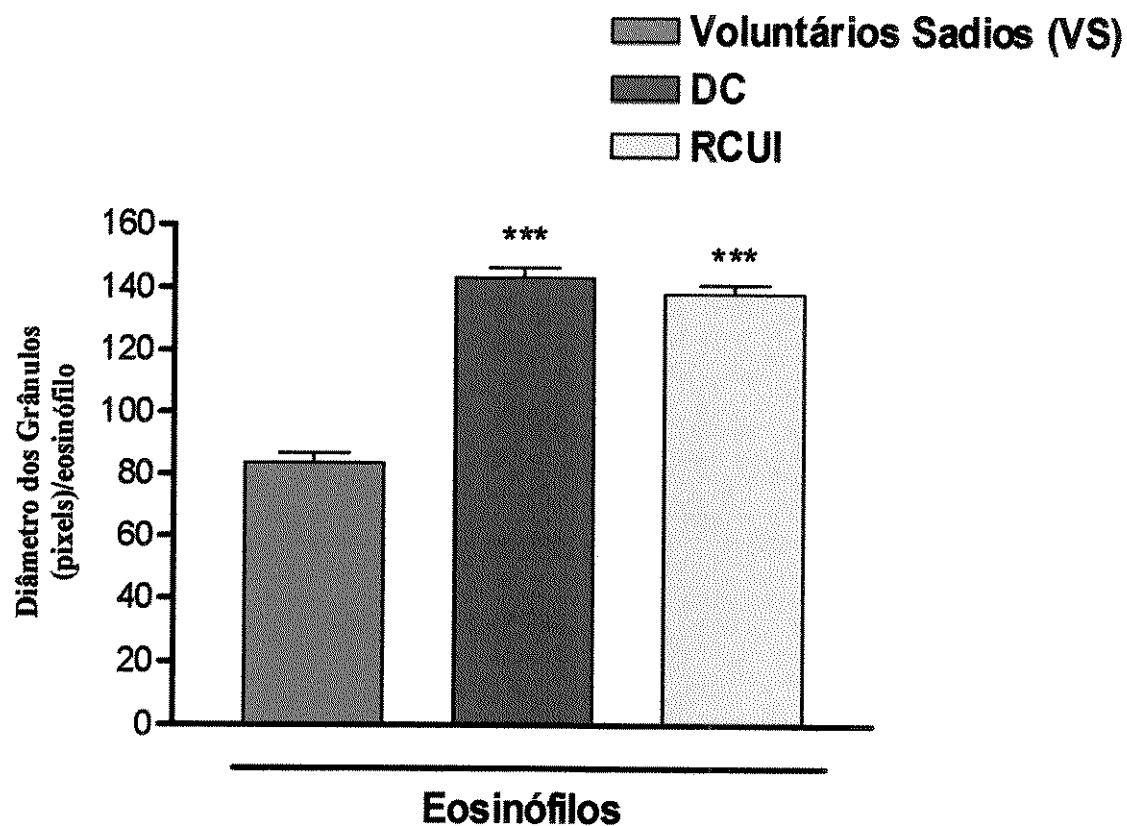
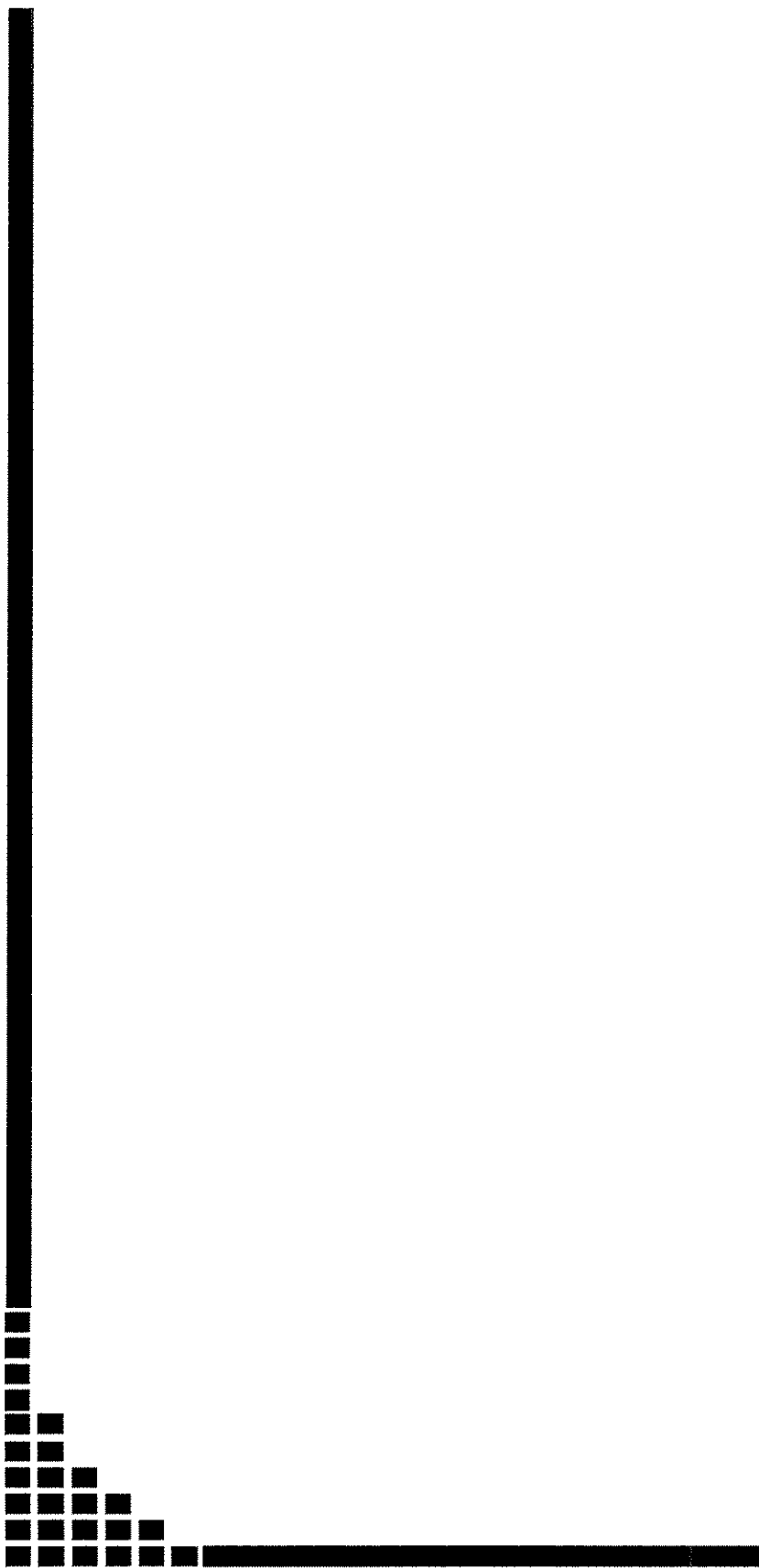


Figura 9- Análise do Diâmetro dos Grânulos de Eosinófilos Periféricos Humanos em Voluntários Sadios, Pacientes com DC e com RCUI. Foram utilizados voluntários sadios (n=3), pacientes com doença de Crohn (n=3) e retocolite ulcerativa inespecífica (n=3). *** $P < 0,001$ em relação aos voluntários sadios.



6- DISCUSSÃO

Neste trabalho, nos preocupamos em avançar os conhecimentos sobre o papel dos eosinófilos humanos nas DII, usando, para tanto, alguns modelos *in vitro* de investigação, como quimiotaxia, adesão, liberação de EPO, expressão de moléculas de adesão, além da contagem histológica de eosinófilos em tecido intestinal e medida dos grânulos citoplasmáticos.

O desenvolvimento deste trabalho só foi possível devido à coluna imunomagnética de separação de eosinófilos, disponível há um pouco mais de uma década (HANSEL *et al.*, 1989; MILTENYI *et al.*, 1990). A coluna imunomagnética permite o isolamento dos eosinófilos do sangue humano em elevado grau de pureza (> 98%), conseguindo então estudar, as propriedades fisiopatológicas do eosinófilo, em grandes detalhes, o que era muito limitado no passado pela falta de metodologia adequada (HANSEL *et al.*, 1990; HANSEL *et al.*, 1991; HÅKANSSON *et al.*, 1994).

Deve-se ressaltar que nossos estudos foram realizados *in vitro* e que a manipulação celular até a realização dos ensaios também pode influenciar na ativação ou inibição celular. E ainda, deve-se salientar que, durante a manipulação para os ensaios, os eosinófilos ficaram eximidos das influências de substâncias e agentes presentes no soro sanguíneo. De fato, KIRK *et al.* (1983) constataram que a pré-incubação com soro alterou a capacidade de migração e adesão de leucócitos PMNs em pacientes com DII. Portanto, deve-se ter cautela na interpretação dos resultados obtidos através de estudos *in vivo* e aqueles obtidos de estudos *in vitro*.

Existem muitos mecanismos responsáveis pela infiltração de eosinófilos, incluindo aumento da vida destas células na mucosa, aumento da produção dos agentes quimiotáticos pela mucosa, modificação das moléculas de adesão expressas nas vênulas sanguíneas da mucosa, ou ainda, modificação dos eosinófilos sanguíneos em resposta aos agentes quimiotáticos (DEUSCH & REICH, 1992; DENIS *et al.*, 2001).

6.1- Ensaio de Quimiotaxia

Considera-se a magnitude da resposta quimiotóxica do eosinófilo periférico como um dos fatores envolvidos nas DII, ao lado do aumento da produção de agentes quimiotáticos pela mucosa e aumento da sobrevivência local dos eosinófilos.

Na quimiotaxia induzida por fMLP observamos um aumento acentuado na migração *in vitro* dos eosinófilos de pacientes com DII, especialmente em pacientes com DC, quando comparada à migração dos eosinófilos de voluntários saudáveis. Estes resultados sugerem que os eosinófilos de pacientes com DII se encontram ativados antes da migração para o tecido intestinal. Além disso, a diferença na magnitude da resposta migratória entre os eosinófilos de pacientes com DC e RCUI pode contribuir na diferenciação imunopatogênica e clínica entre estas doenças.

Apesar do fMLP provocar uma variedade de efeitos em células isoladas, até o momento, não há dados moleculares sobre a natureza do(s) receptor(es) do fMLP expresso(s) em eosinófilos. Em neutrófilos e outras células, o fMLP age através da proteína G, aumentando os níveis intracelulares de nucleotídeos e cálcio, levando à polimerização da actina e ativando a resposta celular migratória (KNOL & ROOS, 1996; MUNOZ *et al.*, 1997; GIEMBYCZ & LINDSAY, 1999).

Segundo DENIS *et al.* (2001), um aumento da expressão dos sítios de ligação de alta afinidade na membrana plasmática dos eosinófilos, principalmente para o PAF, pode estar envolvido na quimiotaxia exacerbada observada em eosinófilos isolados de pacientes com DC inativa. Esta variação da resposta quimiotóxica também pode estar relacionada com a atividade da doença e a cronicidade das lesões, assim como, da terapêutica medicamentosa empregada ao paciente.

DENIS *et al.* (2001) mostraram que a migração espontânea dos eosinófilos foi similar em pacientes com DC inativa e indivíduos saudáveis. Os nossos achados, mostraram que os eosinófilos de pacientes com DC em atividade moderada apresentaram aumento da migração espontânea em relação aos eosinófilos de voluntários saudáveis. Por outro lado,

BELSHEIM *et al.* (1984), observaram uma diminuição da quimiotaxia de granulócitos em pacientes com RCUI.

Devemos levar em consideração que tanto os pacientes com DC como os pacientes com RCUI estão em atividade moderada da doença, podendo ser este o fator que contribui com a resposta migratória espontânea acentuada em eosinófilos de pacientes com DII.

6.2- Ensaio de Adesão e Citometria de Fluxo

À semelhança dos ensaios de quimiotaxia, observamos nos ensaios de adesão que os eosinófilos isolados de pacientes com DC apresentam maior adesão espontânea ao soro e à fibronectina. Ou seja, provavelmente seus sítios de ligação estão em maior número ou mais ativados, respondendo prontamente ao estímulo.

Em nossos resultados, também podemos observar que os eosinófilos de pacientes com DC, ao serem estimulados com PAF, PMA ou eotaxina, não foram capazes de aumentar a capacidade de adesão além do basal, provavelmente por já estarem na máxima ativação celular. Entretanto, através da citometria de fluxo, não observamos aumento da expressão das moléculas de adesão Mac-1 e VLA-4 nos eosinófilos destes pacientes, sugerindo que outras moléculas, como *platelet endothelial cells adhesion molecule 1* (PECAM-1), devem estar contribuindo para este efeito.

Os eosinófilos de pacientes com RCUI não apresentaram uma adesão significativa nas células sem ou com estímulo, para fibronectina e soro, sugerindo um mecanismo intracelular negativo de controle, e, assim, diminuição da reatividade de adesão aos estímulos externos. Quanto à expressão das moléculas de adesão Mac-1 e VLA-4, também não houve diminuição em relação aos voluntários sadios. No entanto, deve-se salientar que há uma variabilidade razoável entre as amostras testadas na citometria de fluxo, possivelmente devido ao pequeno número de pacientes incluídos no estudo. Ressalta-se uma limitação para o ensaio, pois o isolamento de eosinófilos do sangue periférico requer a coleta de um grande volume de sangue do paciente.

Portanto, as células isoladas de pacientes com DC aderem prontamente à fibronectina e ao soro, enquanto os eosinófilos isolados de pacientes com RCUI não aderem. Estes resultados indicam que os eosinófilos do sangue periférico de pacientes com DC estão ativados e são capazes de migrar para o espaço extravascular, e assim, contribuir para a inflamação. Sugere-se que em eosinófilos de pacientes com RCUI, há um mecanismo que previne a adesão celular e diminui a magnitude da resposta migratória.

A inibição das moléculas de adesão é importante para o tratamento de doenças humanas, apresentando potencial para diminuir a infiltração e ativação dos eosinófilos na inflamação. Os agentes antiinflamatórios esteróides e não-esteróides reduzem a adesão dos leucócitos, podendo contribuir nos resultados observados, principalmente, em pacientes com RCUI (SANDBORN *et al.*, 2003; ULBRICH *et al.*, 2003; VANDERSLICE *et al.*, 2004).

Estudos prévios mostraram que as concentrações da molécula de adesão *intercellular adhesion molecule 1* (ICAM-1) aumentaram com a atividade das DII. As diferenças nas concentrações das moléculas de adesão entre a RCUI e DC sustentam a hipótese que são doenças com mecanismos patogênicos distintos (VAINER & NIELSEN, 2000; VAINER *et al.*, 2000; BRAUN *et al.*, 2001). A diferença na expressão de moléculas de adesão deve refletir diferenças nas concentrações de citocinas locais (JONES *et al.*, 1995).

O aumento nas concentrações das moléculas de adesão é compatível com a injúria vascular da patogênese da DC; se as concentrações das moléculas de adesão em células sangüíneas são um reflexo da inflamação vascular, o aumento da concentração de ICAM-1 em pacientes com DC ativa pode ser compatível com a continuidade da inflamação vascular nestes pacientes (JONES *et al.*, 1995). Também observa-se aumento de E-selectina nas células endoteliais microvasculares e de PECAM-1 nos vasos sangüíneos (BINION *et al.*, 1998; VAINER *et al.*, 2000).

Outros estudos *in situ* mostraram uma maior atividade na expressão de moléculas de adesão em DII e indicaram expressão aumentada de *mucosal addressin cell adhesion molecule 1* (MAdCAM-1) em mucosa inflamada da DC e RCUI, e também na

base da úlcera e nos agregados linfóides que são formados nas camadas profundas da parede intestinal, caracterizando a DC, a qual pode contribuir não só para a inflamação em mucosa, mas também para a inflamação transmural da DC (ARIHIRO *et al.*, 2002).

A *vascular cell adhesion molecule 1* (VCAM-1), a qual se liga à integrina VLA-4, não apresentou aumento significativo na distribuição da mucosa em pacientes com DII com processo inflamatório ativo (KOIZUMI *et al.*, 1992).

Porém, em outro estudo observaram-se concentrações significativamente altas de VCAM-1 em pacientes com RCUI ativa comparada com RCUI inativa, DC ativa e inativa, e indivíduo sadio. Também observou-se diminuição significativa da concentração de VCAM-1 com a remissão da RCUI ativa (JONES *et al.*, 1995). Entretanto, a literatura é controversa quanto à expressão de VCAM-1, e seu papel nas DII (COOK-MILLS *et al.*, 2002).

6.3- Dosagem de EPO e Análise Morfométrica

Quanto à liberação de EPO, em nossos resultados, observamos maior liberação espontânea de EPO pelos eosinófilos de pacientes com RCUI e, quando estimulados, não apresentaram aumento significativo em relação à liberação espontânea, sugerindo que estas células estão na sua capacidade máxima de liberação desta proteína. Mesmo sendo estimuladas, não conseguem aumentar, ainda mais, a liberação de EPO.

Entretanto, a liberação de EPO está reduzida nas células de pacientes com DC, tanto na liberação espontânea como estimulada, em comparação aos voluntários sadios, sugerindo um mecanismo de *downregulation* celular, apesar da análise morfométrica mostrar aumento do número de grânulos intracelular quando comparados aos voluntários sadios. Os grânulos dos eosinófilos de pacientes com DC estão em menores quantidades, porém mais volumosos quando comparados aos grânulos dos eosinófilos isolados de pacientes com RCUI, que por sua vez, apresentam maior número de grânulos com menor volume. Estas diferenças na liberação de EPO dos pacientes com DII podem contribuir para a diferenciação clínica e patogênica entre a DC e RCUI. Estes resultados indicam que os

eosinófilos de pacientes com DC apresentam menor estoque de EPO, indicando uma liberação ativa de mediadores, oposto ao das células de pacientes com RCUI, que aparentemente apresentam alto conteúdo de mediadores.

Segundo CARVALHO *et al.* (2003), alterações no número de eosinófilos podem indicar aumento da ativação celular com desgranulação, que está implicada na patogênese das DII.

Em seus estudos LEVY *et al.* (1997), mostraram que a concentração média de eosinófilos e de seus grânulos protéicos (neurotoxinas e proteína catiônica) é significativamente alta em pacientes com DII, tanto nos estágios inicial como tardio da doença. Porém, a secreção de EPO é maior no estágio inicial da lesão, não havendo diferença significativa entre pacientes com RCUI e DC.

A EPO não é encontrada em nenhuma outra célula além do eosinófilo, portanto a EPO pode servir como um marcador específico de eosinófilos ativos, principalmente em RCUI (CARLSON *et al.*, 1999).

Recentemente foi reportada a infiltração de EPO na lâmina própria de pacientes com RCUI. Além disso, não houve relação entre o aumento da liberação pelos grânulos de proteínas eosinofílicas e a estrutura morfológica do intestino ou a atividade clínica dos pacientes. A medicação com glicocorticosteróides e sulfassalazina também pode modificar e reduzir a liberação intestinal dessas proteínas (CARLSON *et al.*, 1999).

Em estudos realizados por CARLSON *et al.* (1999) mostraram que, durante a perfusão intestinal de pacientes com colite, a liberação de EPO na mucosa estava aumentada em dez vezes no sigmóide e quinze vezes no reto, comparado aos controles. Em pacientes com proctite isolada, a liberação de EPO foi nove vezes maior que em controles; entretanto, no segmento sigmoidal foram obtidos níveis normais. A concentração média de EPO no segmento retal não apresentou diferença significativa entre os pacientes com colite e com proctite isolada.

Níveis aumentados de outras proteínas eosinofílicas como ECP e EPX foram observados em fezes e em lavados gastrintestinais de pacientes com DC e RCUI, segundo BERSTAD *et al.* (1993); DESREUMAUX *et al.* (1999); SAITOH *et al.* (1999) e PETERSON *et al.* (2002). A mensuração dos níveis fecais de ECP e EPX podem ajudar no diagnóstico da extensão da ativação eosinofílica e da doença (BISCHOFF *et al.*, 1999).

6.4- Contagem Histológica

Quanto à contagem histológica de eosinófilos em tecidos intestinais, nossos resultados mostram aumento significativo do número de eosinófilos em pacientes com DII comparado aos voluntários saudáveis, principalmente, pacientes com RCUI, que apresentam também maior número de grânulos eosinofílicos em seu interior, avaliados através da microscopia eletrônica.

Condizentes com nossos resultados, outros estudos mostraram aumento nos níveis de eosinófilos ativados na mucosa de pacientes com DII (DEUSCH & REICH, 1992; CARLSON *et al.*, 1999; JEZIORSKA *et al.*, 2001; MIR *et al.*, 2002). Os eosinófilos estão em número aumentado não apenas dentro da mucosa inflamada, mas aparentemente dentro da mucosa sadia dos pacientes com DII.

Biópsias do trato gastrintestinal de pacientes com DII contêm infiltração de eosinófilos na lâmina própria (PETERSON *et al.*, 2002). O número de eosinófilos na lâmina própria intestinal de pacientes com DII é dependente do diagnóstico, atividade clínica da doença e tipo de terapia medicamentosa, visto que os corticóides orais reduzem o número de eosinófilos intestinais na RCUI, além de inibirem a ativação eosinofílica e a liberação de mediadores. Visto que os esteróides são efetivos no tratamento da inflamação desta doença, é plausível que a redução do número de eosinófilos possa contribuir na melhora clínica.

BERSTAD *et al.* (1993) constataram diferença significativa no número de eosinófilos (14 vezes mais) em pacientes com atividade clínica das DII e em pacientes com remissão da doença comparados aos controles.

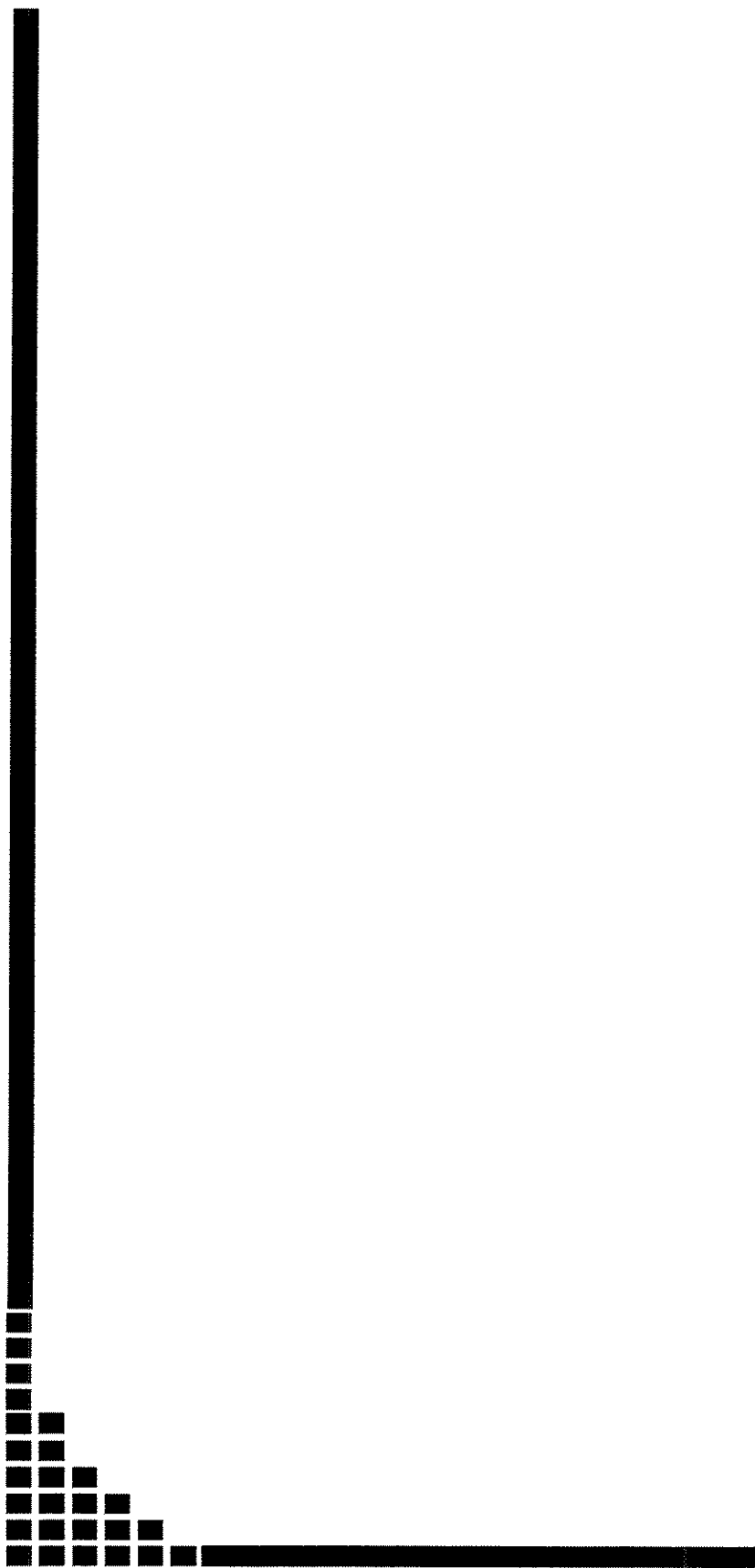
Conforme JEZIORSKA *et al.* (2001), claras evidências foram observadas no aumento do número de eosinófilos em ambas as doenças em comparação ao tecido normal de indivíduos saudáveis. Na DC ativa, houve um aumento do número de eosinófilos através de toda camada do tecido da parede intestinal. Entretanto, estão reduzidos em amostras de pacientes com DC em estado crônico. Em contraste, a mucosa e submucosa da RCUI ativa mostraram elevado número de eosinófilos, similar a DC, mas a RCUI crônica contém números insignificantes de eosinófilos em tecido. O número aumentado de eosinófilos na DC e RCUI mostrou-se diferente em relação à distribuição nas biópsias da mucosa, onde alguns tiveram distribuição uniforme, e outros mostraram acúmulo mais focal.

Estudos realizados por CHOY *et al.* (1990) relataram que em cortes histológicos do cólon transversal, realizados em crianças, a infiltração de eosinófilos e a elevação das concentrações de PGE₂ foram mais pronunciadas na DC do que na RCUI, estando estes resultados de acordo com HÄLLGREN *et al.* (1989) e RAAB *et al.* (1998), discordando, portanto, dos achados de BISCHOFF *et al.* (1996), que não constataram aumento significativo de eosinófilos em pacientes com DC e RCUI.

Sugere-se que as diferenças nas respostas dos eosinófilos isolados de pacientes com DC e com RCUI, observados entre os ensaios realizados, possam estar relacionados às diferenças dos fenótipos de linfócitos T auxiliares entre as doenças. De fato, a ativação de células T apresentam componentes importantes da imunidade adaptativa na patogênese das DII, podendo resultar na falência da imunidade inata em responder aos antígenos expostos, como resultado da complexa interação da flora intestinal, dos antígenos intraluminal, da predisposição genética e dos fatores do meio ambiente desencadeando a destruição da mucosa intestinal (MARTEAU *et al.*, 2004). A ativação da resposta inflamatória secundária se torna necessária, na forma dos mecanismos imunológicos adaptativos, associados ao controle inadequado dos mecanismos que podem inibir o processo inflamatório (GIEMBYCZ & LINDSAY, 1999).

É certo que os eosinófilos participam na defesa do organismo contra parasitas e também na resposta imunoinflamatória intestinal, com a produção de mediadores biológicos, assim como, proteínas citotóxicas e que a redução da atividade dos eosinófilos pode resultar na melhora dos sintomas clínicos e na atividade da doença. Porém, ainda não

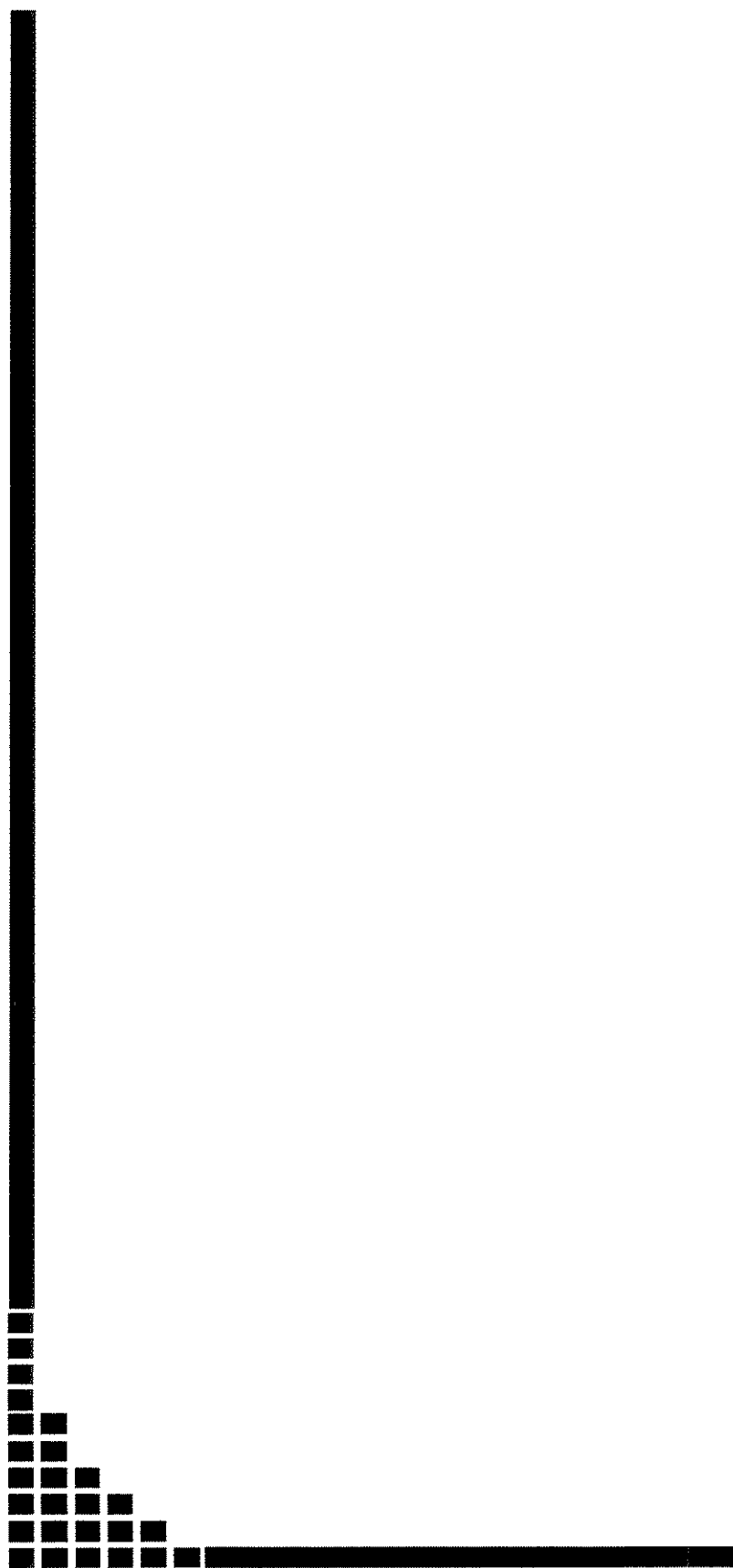
é bem esclarecido em que etapa a função destas células pode ser modulada pelas células epiteliais, neutrófilos, macrófagos, linfócitos ou por outros tipos celulares, resultando na ativação celular, seja na medula óssea ou na circulação periférica.



7- CONCLUSÕES

Nas condições experimentais, avaliando os eosinófilos periféricos de pacientes com DII e voluntários sadios é possível concluir que:

- A quimiotaxia induzida por fMLP está aumentada em eosinófilos de pacientes com DII, especialmente de pacientes com DC;
- A adesão espontânea de eosinófilos em placas recobertas com soro ou fibronectina, é maior para as células obtidas de pacientes com DC. A adesão estimulada pelo PAF, PMA e eotaxina não foi modificada nos pacientes com DII;
- A liberação espontânea de EPO é maior em eosinófilos de pacientes com RCUI. Eosinófilos de pacientes com DC apresentam redução da adesão espontânea e estimulada;
- Para a expressão das moléculas de adesão Mac-1 e VLA-4, não houve diferença entre os eosinófilos isolados de pacientes com DII e voluntários sadios;
- Para os tecidos histológicos intestinais, houve um aumento do número de eosinófilos nos pacientes com DII comparado aos controles;
- Para a análise morfométrica, houve um aumento no número, perímetro e diâmetro dos grânulos de eosinófilos isolados de pacientes com DII quando comparados aos controles.



8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS¹

- ANDUS, T; GROSS, V. Etiology and pathophysiology of inflammatory bowel disease – environmental factors. **Hepato-Gastroenterology**, 47(31):29-43, 2000.
- ARIHIRO, S.; OHTANI, H.; SUZUKI, M.; MURATA, M.; EJIMA, C.; OKI, M.; et al. Differential expression of mucosal addressin cell adhesion molecule-1 (MAdCAM-1) in ulcer colitis and Crohn's disease. **Pathology International**, 52:367-74, 2002.
- ARORA, A. S.; YAMAZAKI, K. Eosinophilic esophagitis: asthma of the esophagus? **Clin Gastroenterol Hepatol.**, 2:523-30, 2004.
- BAERT, F. J.; RUTGEERTS, P. R. Anti-TNF strategies in Crohn's disease: mechanisms, clinical effects, indications. **Int J Colorectal Dis.**, 14(1):47-51, 1999.
- BALFOUR SARTOR, R. Cytokines in intestinal inflammation pathophysiological and clinical considerations. **Gastroenterology**, 106:533-9, 1994.
- BELSHEIM, J.; GNARPE, H.; SWAHN, A. Granulocyte chemotaxis in ulcerative colitis. **Acta Pathol Microbiol Immunol Scand.**, 92(1):75-9, 1984.
- BERSTAD, A.; BØRKJE, B.; RIEDEL, B.; ELSAYED, S.; BERSTAD, A. Increased fecal eosinophil cationic protein in inflammatory bowel disease. **Hepato-Gastroenterology**, 40:276-8, 1993.
- BINION, D. G.; WEST, G. A.; VOLK, E. E.; DRAZBA, J. A.; ZIATS, N. P.; PETRAS, R. E.; FIOCCHI, C. Acquired increase in leucocyte binding by intestinal microvascular endothelium in inflammatory bowel disease. **The Lancet**, 352(28):1742-6, 1998.
- BISCHOFF, S. C.; GRABOWSKY, J.; MANNS, M. P. Quantification of inflammatory mediators in stool samples of patients with inflammatory bowel disorders and controls. **Digestive Diseases and Sciences**, 42:394-403, 1997.

¹ De acordo com as Normas, Procedimentos e Orientações para Publicação de Dissertações e Teses da Faculdade de Ciências Médicas (UNICAMP). Abreviaturas de periódicos de conformidade com a Base de Dados MEDLINE.

- BISCHOFF, S. C.; MAYER, J.; NGUYEN, Q-T.; STOLTE, M.; MANNS, M. P. Immunohistological assessment of intestinal eosinophil activation in patients with eosinophilic gastroenteritis and inflammatory bowel disease. **The American Journal of Gastroenterology**, 94(12):3521-9, 1999.
- BISCHOFF, S. C.; WEDEMEYER, J.; HERRMANN, A.; MEIER, P. N.; TRAUTWEIN, C.; CETIN, Y.; *et al.* Quantitative assessment of intestinal eosinophils and mast cells in inflammatory bowel disease. **Histopathology**, 28:1-13, 1996.
- BOCHNER, B. S. Systemic activation of basophils and eosinophils: markers and consequences. **J Allergy Clin Immunol.**, 106(5):292-302, 2000.
- BRAUN, C.; ZAHN, R.; MARTIN, K.; ALBERT, E.; FOLWACZNY, C. Polymorphisms of the ICAM-1 gene are associated with inflammatory bowel disease, regardless of the p-ANCA status. **Clinical Immunology**, 101(3):357-60, 2001.
- BRODMERKEL, C. M.; VADDI, K. Transgenic animals in inflammatory disease models. **Current Opinion in Biotechnology**, 14:652-8, 2003.
- CARLSON, M.; RAAB, Y.; PETERSON, C.; HÄLLGREN, R.; VENGE, P. Increased intraluminal release of eosinophil granule proteins EPO, ECP, EPX, and cytokines in ulcerative colitis and proctitis in segmental perfusion. **The American Journal of Gastroenterology**, 94(7):1876-83, 1999.
- CARVALHO, A. T. P.; ELIA, C. C. S.; SOUZA, H. S. P.; ELIAS, P. R. P.; PONTES, E. L.; LUKASHOK, H. P.; *et al.* Immunohistochemical study of intestinal eosinophils in inflammatory bowel disease. **J Clin Gastroenterol.**, 36(2):120-5, 2003.
- CHEN, W.; PAULUS, B.; SHU, D.; WILSON, I.; CHADWICK, V. Increased serum levels of eotaxin in patients with inflammatory bowel disease. **Scand J Gastroenterol.**, 36:515-20, 2001.
- CHOY, M. Y.; WALKER-SMITH, J. A.; WILLIAMS, C. B.; MACDONALD, T. T. Activated eosinophils in chronic inflammatory bowel disease. **Lancet**, 336:126-7, 1990 (letter).

- COOK-MILLS, J. M. VCAM-1 signals during lymphocyte migration: role of reactive oxygen species. **Molecular Immunology**, 39:499-508, 2002.
- COSTA, J. J.; MATOSSIAN, K.; RESNICK, M. B.; BEIL, W. J.; WONG, D. T. W.; GORDON, J. R.; *et al.* Human eosinophils can express the cytokines tumor necrosis factor- α and macrophage inflammatory protein-1 α . **J. Clin. Invest.**, 91(6):2673-84, 1993.
- DAMIÃO, A. O. M. C.; HABR-GAMA, A. Retocolite ulcerativa Idiopática. In: DANI, R. & CASTRO, L. P. **Gastroenterologia Clínica**, ed. 3, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1993. p.1037-76.
- DENIS, M. A.; LOUIS, R.; MALAISE, M.; BELAICHE, J, LOUIS, R. Increased response of blood eosinophils to various chemotactic agents in quiescent Crohn disease. **Scand J Gastroenterol.**, 2:190-5, 2001.
- DESREUMAUX, P.; NUTTEN, S.; COLOMBEL, J. F. Activated eosinophils in inflammatory bowel disease: do they matter? **The American Journal of Gastroenterology**, 94:3396-9, 1999.
- DEUSCH, K.; REICH, K. Immunological aspects of inflammatory bowel disease. **Endoscopy**, 24:568-77, 1992.
- DIECKGRAEFE, B. K.; KORZENIK, J. R. Treatment of active Crohn's disease with recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. **Lancet**, 360:1478-80, 2002.
- DIGNASS, A. U.; BAUMGART, D. C.; STURM, A. The aetiopathogenesis of inflammatory bowel disease – immunology and repair mechanisms. **Aliment Pharmacol Ther.**, 209(suppl.4):9-17, 2004.
- DUBUCQUOI, S.; JANIN, A.; KLEIN, O.; DESREUMAUX, P.; QUANDALLE, P.; CORTOT, A.; *et al.* Activated eosinophils and interleukin 5 expression in early recurrence of Crohn's disease. **Gut**, 37:242-6, 1995.
- DVORAK, A. M. Ultrastructural evidence for release of major basic protein-containing crystalline cores of eosinophil granules *in vivo*: cytotoxic potential in Crohn's disease. **J Immunol.**, 125:460-2, 1980.

- FERGUSON, A.; HUMPHREYS, K. A.; CROFT, N. M. Technical report: results of immunological tests on faecal extracts are likely to be extremely misleading. **Clin Exp Immunol.**, 99:70-5, 1995.
- FIOCCHI, C. Inflammatory bowel disease. Etiology and pathogenesis. **Gastroenterology**, 115:182-205, 1998.
- GHANCHI, F. D.; REMBACKEN, B. J. Inflammatory bowel disease and eye. **Survey of Ophthalmology**, 48(6):663-76, 2003.
- GIEMBYCZ, M. A.; LINDSAY, M. A. Pharmacology of the eosinophil. **Pharmacological Reviews**, 51:213-339, 1999.
- GLEICH, G. J. Mechanisms of eosinophil-associated inflammation. **J Allergy Clin Immunol.**, 105(4):651-63, 2000.
- GLEICH, G. J.; ADOLPSON, C. R. The eosinophil leucocyte: structure and function. **Adv Immunol.**, 39:177-253, 1986.
- HÅKANSSON, L.; NIELSEN, L. S.; TEDER, P. Measurement of neutrophil and eosinophil adhesion to E-selectin, VCAM-1, and ICAM-1 by the use of transfected fibroblast cell lines. **Journal of Immunological Methods**, 176:53-66, 1994.
- HÅKANSSON, L.; WESTERLUND, D.; VENGE, P. New method for the measurement of eosinophil migration. **Journal of Leukocyte Biology**, 42:689-96, 1987.
- HÄLLGREN, R.; COLOMBEL, J. F.; DAHL, R.; FREDENS, K.; KRUSE, A.; JACOBSEN, N. O.; *et al.* Neutrophil and eosinophil involvement of the small bowel in patients with celiac disease and Crohn's disease: studies on the secretion rate and immunohistochemical localization of granulocyte granule constituents. **Am J Med.**, 86:56-64, 1989.
- HAMID, Q; BARKANS, J.; MENG, Q.; YING, S.; ABRAMS, J. S.; KAY, A. B.; MOQBEL, R. Human eosinophils synthesize and secrete interleukin-6, *in vitro*. **Blood**, 80(6):1496-501, 1992.

- HANKARD, G. F.; BROUSSE, N.; CÉZARD, J. P.; EMILIE, D.; PEUCHMAUR, M. In situ interleukin 5 gene expression in pediatric Crohn's disease. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, 24:568-72, 1997.
- HANSEL, T. T.; DE VRIES, I. J. M.; IFF, T.; RIHS, S.; WANDZILAK, M.; BETZ, S.; BLASER, K.; WALKER, C. An improved immunomagnetic procedure for the isolation of highly purified human blood eosinophils. **Journal of Immunological Methods**, 145:105-10, 1991.
- HANSEL, T. T.; POUND, J. D.; PILLING, D.; KITAS, G. D.; SALMON, M.; GENTLE, T. A.; *et al.* Purification of human blood eosinophils by negative selection using immunomagnetic beads. **Journal of Immunological Methods**, 122:97-103, 1989.
- HANSEL, T. T.; POUND, J. D.; THOMPSON, R. A. Isolation of eosinophils from human blood. **Journal of Immunological Methods**, 127:153-64, 1990.
- HATOUM, O. A.; BINION, D. G.; OTTERSON, M. F.; GUTTERMAN, D. D. Acquired microvascular dysfunction in inflammatory bowel disease: loss of nitric oxide-mediated vasodilation. **Gastroenterology**, 125:58-69, 2003.
- HULTEN, L.; LINDHAGEN, J.; LUNDGREN, O.; FASTH, S.; AHREN, C. Regional intestinal blood flow in ulcerative colitis and Crohn's disease. **Gastroenterology**, 72:388-96, 1977.
- JEZIORSKA, M.; HABOUBI, N.; SCHOFIELD, P.; WOOLLEY, D. E. Distribution and activation of eosinophils in inflammatory bowel disease using an improved immunohistochemical technique. **Journal of Pathology**, 194:484-92, 2001.
- JONES, S. C.; BANKS, R. E.; HAIDAR, A.; GEARING, A. J. H.; HEMINGWAY, I. K.; IBBOTSON, S. H.; DIXON, M. F.; AXON, A. T. R. Adhesion molecules in inflammatory bowel disease. **Gut**, 36:724-30, 1995.
- KARNOVSKY, M. D. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron-microscopy (abstr.). **J. Cell. Biol.**, 27:137a, 1965.

- KIRK, A. P.; CASON, J.; FORDHAM, J. N.; BROWN, K. A.; GODDARD, D. H.; LENNARD-JONES, J. E.; *et al.* Polymorphonuclear leukocyte function in ulcerative colitis at Crohn's disease. **Digestive Diseases and Sciences**, 28(3):236-48, 1983.
- KNOL, E. F.; ROOS, D. Mechanisms regulating eosinophil extravasation in asthma. **European Respiratory Journal**, 9(22):136-40, 1996.
- KOIZUMI, M.; KING, N.; LOBB, R.; BENJAMIN, C.; PODOLSKY, D. K. Expression of vascular adhesion molecules in inflammatory bowel disease. **Gastroenterology**, 103:840-7, 1992.
- KROEGEL, C.; VIRCHOW, J. R.; LUTTMAN, W.; WALKER, C.; WARNER, J. A. Pulmonary immune cells in health and disease: the eosinophils leucocyte (Part I). **European Respiratory Journal**, 7:519-43, 1994.
- KROEGEL, C.; YUKAWA, T.; DENT, G.; VENGE, P.; CHUNG, K. F.; BARNES, P. J. Stimulation of degranulation from human eosinophils by platelet-activating factor. **J Immunol.**, 142(10):3518-26, 1989.
- LEE, C. M.; CHANGCHIEN, C. S.; CHEN, P. C.; LIN, D. Y.; SHEEN, I. S.; WANG, C. S.; *et al.* Eosinophilic gastroenteritis. 10 years experience. **The American Journal of Gastroenterology**, 88:70-4, 1993.
- LEE, T.; LENIHAN, D. J.; MALONE, B.; RODDY, L. L.; WASSERMAN, S. I. Increased biosynthesis of platelet-activating factor in activated human eosinophils. **J Biol Chem.**, 259:5526-30, 1984.
- LEVY, A. M.; GLEICH, G. J.; SANDBORN, W. J.; TREMAINE, W. J.; STEINER, B. L.; PHILLIPS, S. F. Increased eosinophil granule proteins in gut lavage fluid from patients with inflammatory bowel disease. **Mayo Clin Proc.**, 72:117-23, 1997.
- LEVY, A. M.; KITA, K. The eosinophil in gut inflammation: effector or director? **Gastroenterology**, 110:952-4, 1996.

LIU, Z. X.; NOGUCHI, M.; HIWATASHI, N.; TOYOTA, T. Monocyte aggregation and multinucleated giant-cell formation *in vitro* in Crohn's disease. **Scand J Gastroenterol.**, 31:706-10, 1996.

LOBOS, E. A.; SHARON, P.; STENSON, W. F. Chemotactic activity in inflammatory bowel disease – Role of leukotriene B₄. **Digestive Diseases and Sciences**, 32(12):1380-8, 1987.

LUCK, W.; BECKER, M.; NIGGEMANN, B.; WAHN, U. *In vitro* release of eosinophil cationic protein from peripheal eosinophils reflects disease activity in childhood Crohn's disease and ulcerative colitis. **Eur J Pediatr.**, 156:921-4, 1997.

LUTTMANN, W.; FRANZ, P.; MATTHYS, H.; VIRCHOW JR, J. C. Effects of TGF- β on eosinophil chemotaxis. **Scand J Immunol.**, 47:127-30, 1998.

MACDERMOTT, R. P.; SANDERSON, I. R.; REINECKER, H. C. The central role of chemokines (chemotactic cytokines) in the immunopathogenesis of ulcerative colitis and Crohn's disease. **Inflamm Bowel Dis.**, 4(1):54-67, 1998.

MADSEN, J. R. Chronic inflammatory bowel disease-pathogenic concepts a therapeutic perspectives (abstr.). **Ugeskr Laeger**, 162(10):1361-6, 2000.

MARINI, M.; BARNIAS, G.; RIVERA-NIEVES, J.; MOSKALUK, C. A.; HOANG, S. B.; ROSS, W. G.; *et al.* TNF- α neutralization ameliorates the severity of murine Crohn's-like ileitis by abrogation of intestinal epithelial cell apoptosis. **Proc Natl Acad Sci USA**, 100(14):8366-71, 2003.

MARTEAU, P.; LEPAGE, P.; MANGIN, I.; *et al.* Gut flora and inflammatory bowel disease. **Aliment Pharmacol Ther.**, 20(suppl.4):18-23, 2004.

MAZZUCHELLI, L.; HAUSER, C.; ZGRAGGEN, K.; WAGNER, H. E.; HESS, M. W.; LAISSUE, J. A.; MUELLER, C. Differential *in situ* expression of the genes encoding the chemokines MCP-1 and rantes in human inflammatory bowel disease. **Journal of Pathology**, 178:201-6, 1996.

- MELANI, C.; MATTIA, G. F.; SILVANI, A.; CARÈ, A.; RIVOLTINI, L.; PARMIANI, G.; COLOMBO, M. P. Interleukin-6 expression in human neutrophil and eosinophil peripheral blood granulocytes. **Blood**, 81(10):2744-9, 1993.
- METWALI, A.; BLUM, A. M.; FERRARIS, L.; KLEIN, J. S.; FIOCCHI, C.; WEINSTOCK, J. V. Eosinophils within the healthy or inflamed human intestine produce substance P and vasoactive intestinal peptide. **Journal of Neuroimmunology**, 52(1):69-78, 1994.
- MIDDEL, P.; REICH, K.; POLZIEN, F.; BLASCHKE, V.; HEMMERLEIN, B.; HERMS, J.; *et al.* Interleukin 16 expression and phenotype of interleukin 16 producing cells in Crohn's disease. **Gut**, 49:795-803, 2001.
- MILTENYI, S.; MULLER, W.; WEICHEL, W.; RADBRUCH, A. High gradient magnetic cell separation with MACS-alternative and complementation to fluorescence activated cell sorting. **Cytometry**, 11: 231-8, 1990.
- MIR, A.; MINGUEZ, M.; TATAY, J.; PASCUAL, I.; PENA, A.; SANCHIZ, V.; *et al.* Elevated serum eotaxin levels in patients with inflammatory bowel disease. **The American Journal of Gastroenterology**, 97(6):1452-7, 2002.
- MOTOJIMA, S.; FRIGAS, E.; LOEGERING, D. A.; GLEICH, G. J. Toxicity of eosinophil cationic proteins for guinea pig tracheal epithelium *in vitro*. **Am Rev Respir Dis.**, 139:801-5, 1989.
- MOUSER, J. F.; HYAMS, J. S. Infliximab: A novel chimeric monoclonal antibody for the treatment of Crohn's disease. **Clinical Therapeutics**, 21(6):932-42, 1999.
- MUNOZ, N. M.; DOUGLAS, I.; MAYER, D.; HERRNREITER, A.; ZHU, X. D.; LEFF, A. R. Eosinophil chemotaxis inhibited by 5-lipoxygenase blockade and leukotriene receptor antagonism. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, 155:1398-1403, 1997.
- NAGATA, M.; SEDGWICK, J. B.; BATES, M. E.; KITA, H.; BUSSE, W. W. Eosinophil adhesion to vascular cell adhesion molecule-1 activates superoxide anion generation. **J. Immunol.**, 155:2194-2202, 1995.

NEURATH, M. F.; SCHURMANN, G. Immunopathogenesis of inflammatory bowel disease (abstr.). **Chirurg.**, 71(1):30-40, 2000.

NOEL, R. J.; PUTNAM, P. E.; COLLINS, M. H.; ASSA'AD, A. H.; GUAJARDO, J. R.; JAMENSON, S. C.; ROTHENBERG, M. E. Clinical and immunopathologic effects of swallowed fluticasone for eosinophilic esophagitis. **Clin Gastroenterol Hepatol.**, 2(7):568-75, 2004.

NOVAES DE MAGALHÃES, A. F. Doença de Crohn. In: DANI, R. & CASTRO, L. P. **Gastroenterologia Clínica**, ed. 3, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1993. p.765-77.

OGAWA, A.; ANDOH, A.; ARAKI, Y.; BAMBA, T.; FUJIYAMA, Y. Neutralization of interleukin-17 aggravates dextran sulfate sodium-induced colitis mice. **Clinical Immunology**, 1-8, 2004.

OLIVEIRA, S. H. P.; LUKACS, N. W. The role of chemokines and chemokine receptors in eosinophil activation during inflammatory allergic reactions. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 36:1455-63, 2003.

PETERSON, C. G. B.; EKLUND, E.; TAHA, Y.; RAAB, Y.; CARLSON, M. A new method for the quantification of neutrophil and eosinophil cationic proteins in feces: establishment of normal levels and clinical application in patients with inflammatory bowel disease. **The American Journal of Gastroenterology**, 97(7):1755-62, 2002.

PETERSON, C. G. B.; JORNVALL, H.; VENGE, P. Purification and characterization of eosinophil cationic protein from normal human eosinophils. **Eur. J. Haematol.**, 40:415-23, 1988.

RAAB Y, FREDENS K, GERDIN B, HÄLLGREN, R. Eosinophil activation in ulcerative colitis. Studies on mucosal release and localization of eosinophil granule constituents. **Digestive Diseases and Sciences**, 43:1061-70, 1998.

RAAB, Y.; SUNDBERG, C.; HÄLLGREN, R.; KNUYSON, L.; GERDIN, B. Mucosal synthesis and release of prostaglandin E2 from activated eosinophils and macrophages in ulcerative colitis. **The American Journal of Gastroenterology**, 90(4):614-20, 1995.

- RANKIN, S. M.; CONROY, D. M.; WILLIAMS, T. J. Eotaxin and eosinophil recruitment: implications for human disease. **Molecular Medicine Today**, 6:20-7, 2000.
- REED, J. F.; CALKINS, B. M.; ROSEN, L. Concordance of familial characteristics in Crohn's disease and ulcerative colitis. **Dis Colon Rectum**, 35:405-410, 1992.
- RESNICK, M. B.; WELLER, P. F. Mechanisms of eosinophil recruitment. **Am J. Respir. Cell. Mol. Biol.**, 8:349-55, 1993.
- RICHARDS, K. L.; MCCULLOUGH, J. M. A modified microchamber method for chemotaxis and chemokinesis. **Immunol. Commun.**, 13:49-62, 1984.
- ROTHENBERG, M. E. Eosinophilic gastrointestinal disorders (EGID). **J Allergy Clin Immunol.**, 113(1):11-28, 2004.
- SAITOH, O.; KOJIMA, K.; SUGI, K.; MATSUSE, R.; UCHIDA, K.; TABATA, K.; *et al.* Fecal eosinophil granule-derived proteins reflect disease activity in inflammatory bowel disease. **The American Journal of Gastroenterology**, 94(12):3513-20, 1999.
- SANDBORN, W. J.; YEDNOCK, T. A. Novel approaches to treating inflammatory bowel disease: targeting alpha-4 integrin. **The American Journal of Gastroenterology**, 98(11):2372-82, 2003.
- SCHÖLMEIRICH, J. Inflammatory bowel disease at the end of its first century. **Hepato-Gastroenterology**, 47:2-4, 2000.
- SCHREIBER, S. Inflammatory bowel disease: Immunologic concepts. **Hepato-Gastroenterology**, 47(31):15-28, 2000.
- SCHREIBER, S.; NIKOLAUS, S.; HAMPE, J.; HAMLING, J.; KOOP, I.; GROESSNER, B.; *et al.* Tumour necrosis factor alpha and interleukin 1 beta in relapse of Crohn's disease. **Lancet**, 353:459-61, 1999.
- SCHWAB, D.; MÜLLER, S.; AIGNER, T.; NEUREITER, D.; KIRCHNER, T.; HAHN, E. G.; *et al.* Functional and morphologic characterization of eosinophils in the lower intestinal mucosa of patients with food allergy. **The American Journal of Gastroenterology**, 98(7):1525-34, 2003.

- SHAW, R. J.; CROMWELL, O.; KAY, A. B. Preferential generation of leukotriene C4 by human eosinophils. **Clin Exp Immunol.**, 56:716-22, 1984.
- SLUNGAARD, A.; VERCELLOTTI, C. M.; TRAN, T.; GLEICH, G. J.; KEY, N. S. Eosinophil cationic granule proteins impair thrombomodulin function: a potential mechanism for thromboembolism in hypereosinophilic heart disease. **J Clin Invest.**, 91:1721-1730, 1993.
- SPRY, C. J. F. The natural history of eosinophils, in **Immunopharmacology of Eosinophils** (SMITH, H. & COOK, R. M. eds) p 1-9, Academic Press, London, 1993.
- TALLEY, N. J.; KEPHART, G. M.; MCGOVERN, T. W.; CARPENTER, H. A.; GLEICH, G. J. Deposition of eosinophil granule major basic protein in eosinophilic gastroenteritis and celiac disease. **Gastroenterology**, 103(1):137-45, 1992.
- TARGAN, S.R.; HANAUER, S. B.; VAN DEVENTER, S. J., MAYER, L.; PRESENT, D. H.; BRAAKMAN, T.; *et al.* A short-term study of chimeric monoclonal antibody cA2 to tumor necrosis factor alpha for Crohn's disease. Crohn's disease cA2 Study Group. **N Engl J Med.**, 337(15):1029-35, 1997.
- TEIXEIRA, M. M.; WILLIAMS, T. J.; HELLEWELL, P. G. Mechanisms and pharmacological manipulation of eosinophil accumulation *in vivo*. **TIPS**, 16:418-23, 1995.
- THOMAZZI, S. M. **Papel do óxido nítrico na quimiotaxia e adesão de eosinófilos humano**. São Paulo, 2002. (Tese – Doutorado – Universidade de São Paulo).
- TRONCONE, R.; CAPUTO, N.; ESPOSITO, V.; CAMPANOZZI, A.; CAMPANOZZI, F.; AURICCHIO, R.; *et al.* Increased concentrations of eosinophilic cationic protein in whole-gut lavage fluid from children with inflammatory bowel disease. **J Pediatr Gastroenterol Nutr.**, 28:164-8, 1999.
- ULBRICH, H.; ERIKSSON, E. E.; LINDBOM, L. Leukocyte and endothelial cell adhesion molecules as targets for therapeutic interventions in inflammatory disease. **TRENDS in Pharmacological Sciences**, 24(12):640-7, 2003.

- VAINER, B.; NIELSEN, O. H.; HORN, T. Comparative studies of the colonic *in situ* expression of intercellular adhesion molecules (ICAM-1, -2, and -3), β_2 integrins (LFA-1, Mac-1, and p150,95), and PECAM-1 in ulcerative colitis and Crohn's disease. **The American Journal of Surgical Pathology**, 24(8):1115-24, 2000.
- VAINER, B.; NIELSEN, O. H. Changed colonic profile of P-selectin, platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1), intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), ICAM-2, and ICAM-3 in inflammatory bowel disease. **Clin Exp Immunol.**, 121(2):242-7, 2000.
- VAN DEN BRANDE, J. M.; BRAAT, H.; VAN DEN BRINK, G. R.; VERSTEEG, H. H.; BANER, C. A.; HOEDEMAEKER, I.; *et al.* Infliximab but not etanercept induces apoptosis in lamina propria T-lymphocytes from patients with Crohn's disease. **Gastroenterology**, 124(7):1774-85, 2003.
- VAN DULLEMEN, H. M.; VAN DEVENTER, S. J. H.; HOMMES, D. W., BIJL, H. A.; JASEN, J.; TYTGAT, G. N.; WOODY, J. Treatment of Crohn's disease with anti-tumor necrosis factor chimeric antibody (cA2). **Gastroenterology**, 109(1):129-35, 1995.
- VANDERSLICE, P.; BIEDIGER, R. J.; WOODSIDE, D. G.; BERENS, K. L.; HOLLAND, G. W.; DIXON, R. A. F. Development of cell adhesion molecule antagonists as therapeutics for asthma and CPOD. **Pulmonary Pharmacology & Therapeutics**, 17:1-10, 2004.
- VENGE, P.; DAHL, R.; FREDENS, K.; HÄLLGREN, R. Eosinophil cationic protein (ECP and EPX) in health and disease. *In* Immunology of the Eosinophil. YOSHIDA, T. & TORISU, M. (eds). New York, Elsevier Science Publishing, 163-177, 1983.
- WALSH, G. M. Human eosinophils: their accumulation, activation and fate (Review). **British Journal of Haematology**, 97(4):701-9, 1997.
- WARDLAW, A. J. Molecular basis for selective eosinophil trafficking in asthma: a multistep paradigm. **J. Allergy Clin Immunol.**, 104(5):917-26, 1999.
- WIEDERMANN, F. J.; KÄHLER, C. M.; REINISCH, N.; WIEDERMANN, C. J. Induction of normal human eosinophil migration *in vitro* by substance P. **Acta Haematol.**, 89:213-5, 1993.

WINTERKAMP, S.; WEIDENHILLER, M.; OTTE, P.; STOLPER, J.; SCHWAB, D.; HAHN, E. G.; RAITHEL, M. Urinary excretion of N-methylhistamine as a marker of disease activity in inflammatory bowel disease. **The American Journal of Gastroenterology**, 97(12):3071-7, 2002.

YOUNG, JD-E.; PETERSON, C. G. B.; VENGE, P.; COHN, Z. A. Mechanism of membrane damage mediated by human eosinophil cationic protein. **Nature**, 321:613-8, 1986.



8- ANEXOS

ANEXO 1- Modelo de Termo de Consentimento Informado para Pacientes

Modelo do Consentimento Livre e Esclarecido para Pesquisas com Seres Humanos

“Avaliação da Atividade de Eosinófilos Periféricos em Pacientes com Doenças Inflamatórias Intestinais”

O abaixo assinado, _____, HC _____, declara que é de livre e espontânea vontade que está participando como paciente do projeto de pesquisa supra-citado, de responsabilidade dos pesquisadores *Luciane Cristina Coppi e José Geraldo P. Ferraz*, da Disciplina de Gastroenterologia Clínica, Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp. O abaixo assinado está ciente que:

- O objetivo do estudo é avaliar o papel de eosinófilos periféricos na origem/patogênese das doenças inflamatórias intestinais (DII) – retocolite ulcerativa (RCUI) e doença de Crohn (DC), contribuindo para o entendimento dessas doenças.
- A participação neste estudo não prejudicará o diagnóstico e/ou tratamento da DII, determinado e em andamento pela equipe médica do Ambulatório de Gastroenterologia Clínica – HC/Unicamp.
- O seu acompanhamento através de exames clínicos e de laboratório não será modificado ou prejudicado após inclusão no estudo. O tratamento em andamento não sofrerá prejuízo e as medicações em uso serão mantidas.
- Uma vez incluído no estudo, será submetido a punção venosa em veia de antebraço direito ou esquerdo por pessoal especializado – utilizando material descartável e sob rigorosas condições de assepsia – no Laboratório Especializado em Gastroenterologia, Gastrocentro/Unicamp. Será feita uma única coleta de sangue (volume = 100 ml) no dia da consulta ambulatorial de rotina. O sangue será utilizado para isolamento de eosinófilos em laboratório.
- A coleta da amostra de sangue não resultará em qualquer dano à sua saúde, tampouco afetará o curso ou evolução do tratamento em andamento e não irá trazer qualquer benefício terapêutico.
- Sua participação no estudo estará encerrada após a coleta de sangue. Será contactado pelos responsáveis pela pesquisa caso seja preciso nova coleta, quando será orientado sobre os motivos para o novo procedimento.
- Obteve as informações necessárias para poder decidir conscientemente sobre a participação no referido estudo.
- Os resultados obtidos durante este ensaio serão mantidos em sigilo, e a Disciplina de Gastroenterologia Clínica não identificará o paciente por ocasião da exposição e/ou publicação dos mesmos.
- A Disciplina de Gastroenterologia Clínica o manterá informado em relação ao progresso da pesquisa, caso julgue a informação relevante para o paciente.
- Caso surja alguma intercorrência após a coleta de sangue, deverá procurar o serviço de Pronto-Socorro do Hospital de Clínicas da Unicamp e solicitar que o mesmo contacte os médicos responsáveis pelo ensaio clínico (vide telefones abaixo).
- Poderá contactar a Secretaria da Comissão de Ética (fone 3788-8936) para apresentar recursos ou reclamações relacionadas ao processo de coleta das amostras.

Membros da Equipe	
Luciane C. Coppi Telefone: (19) 3451-3377	Prof. Dr. José Geraldo P. Ferraz Telefone: (19) 3788-7604
Nome do paciente e RG:	
Endereço e telefone de contato:	
Data: / /	Assinatura:
Responsável pesquisa:	
Data: / /	Assinatura:

ANEXO 2 - Modelo de Termo de Consentimento Informado para Voluntários Sadios (controle)

Modelo do Consentimento Livre e Esclarecido para Pesquisas com Seres Humanos

“Avaliação da Atividade de Eosinófilos Periféricos em Pacientes com Doenças Inflamatórias Intestinais”

O abaixo assinado, _____, HC _____, declara que é de livre e espontânea vontade que está participando como paciente do projeto de pesquisa supra-citado, de responsabilidade dos pesquisadores *Luciane Cristina Coppi e José Geraldo P. Ferraz*, da Disciplina de Gastroenterologia Clínica, Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp. O abaixo assinado está ciente que:

- i. O objetivo do estudo é avaliar o papel de eosinófilos periféricos na origem/patogênese das doenças inflamatórias intestinais (DII) – retocolite ulcerativa (RCUI) e doença de Crohn (DC), contribuindo para o entendimento dessas doenças.
- ii. Uma vez incluído no estudo, será submetido a punção venosa em veia de antebraço direito ou esquerdo por pessoal especializado – utilizando material descartável e sob rigorosas condições de assepsia – no Laboratório Especializado em Gastroenterologia, Gastrocentro/Unicamp. Será feita uma única coleta de sangue (volume = 120 mL) no dia da consulta ambulatorial de rotina. O sangue será utilizado para isolamento de eosinófilos em laboratório.
- iii. A coleta da amostra de sangue não resultará em qualquer dano à sua saúde.
- iv. Sua participação no estudo estará encerrada após a coleta de sangue. Será contactado pelos responsáveis pela pesquisa caso seja preciso nova coleta, quando será orientado sobre os motivos para o novo procedimento.
- v. Obteve as informações necessárias para poder decidir conscientemente sobre a participação no referido estudo.
- vi. Os resultados obtidos durante este ensaio serão mantidos em sigilo, e a Disciplina de Gastroenterologia Clínica não identificará o paciente por ocasião da exposição e/ou publicação dos mesmos.
- vii. A Disciplina de Gastroenterologia Clínica o manterá informado em relação ao progresso da pesquisa, caso julgue a informação relevante para o paciente.
- viii. Caso surja alguma intercorrência após a coleta de sangue, deverá procurar o serviço de Pronto-Socorro do Hospital de Clínicas da Unicamp e solicitar que o mesmo contacte os médicos responsáveis pelo ensaio clínico (vide telefones abaixo).
- ix. Poderá contactar a Secretaria da Comissão de Ética (fone 3788-8936) para apresentar recursos ou reclamações relacionadas ao processo de coleta das amostras.

Membros da Equipe

Luciane C. Coppi	Prof. Dr. José Geraldo P. Ferraz
Telefone: (19) 3451-3377	Telefone: (19) 3788-8554

Nome do paciente e RG:	
Endereço e telefone de contato:	
Data: / /	Assinatura:
Responsável pesquisa:	
Data: / /	Assinatura:

ANEXO 3 – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa



FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

☒ Caixa Postal 6111
13063-970 Campinas-S.P.
☎ 0 __ 19 7888936
fax 0 __ 19 7888925
✉ cep@head.fcm.unicamp.br

CEP. 12/12/00
(Grupo III)

PARECER PROJETO: Nº 318/2.000

IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: "EOSINÓFILOS E DOENÇAS INFLAMATÓRIAS INTESTINAIS"
PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Luciane Cristina Coppi
INSTITUIÇÃO: GASTROCENTRO/UNICAMP
APRESENTAÇÃO AO CEP: 31/10/2.000

II - OBJETIVOS

A pesquisa visa investigar o papel de eosinófilos na patogênese das doenças inflamatórias intestinal, inclusive retocolite ulcerativa e doença de Crohn, avaliando sua atividade através do ensaio de quimiotaxia *in vitro* em pacientes portadores da doença em fase ativa.

III - SUMÁRIO

Será realizado um estudo descritivo da contagem, viabilidade e quimiotaxia dos eosinófilos em sangue periférico de pacientes com RCU e doença de Crohn. Será coletada uma única amostra de sangue, no volume de 100ml, de 8 pacientes de cada doença (N=16). O material será colhido em um dia de atendimento normal de pacientes em ambulatório. Os sujeitos deverão ter idade entre 18 e 65 anos, metade de cada sexo. Serão incluídos apenas os casos com hemoglobulina ≥ 10 mg/dl, em fase ativa da doença, independentemente do tratamento específico. Serão excluídos pacientes em uso de imunossupressores, pacientes com neoplasias, patologias alérgicas e infecções parasitárias. Essa amostra será submetida ao isolamento dos eosinófilos e posterior estudo da quimiotaxia. Será utilizado como controle o sangue de doadores de sangue (N=5) do Hemocentro/UNICAMP. O estudo não implicará em modificações no acompanhamento e na conduta terapêutica dos pacientes.

IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES

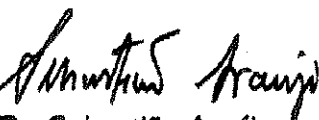
O projeto apresenta-se claro em seus objetivos, com critérios de inclusão e de exclusão bem definidos. O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido está bem redigido e atende às normas da Resolução 196/96 do CNS-MS.

V - PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e 251/97, bem como todos os anexos incluídos na Pesquisa, resolve aprovar sem restrições o Protocolo de Pesquisa supracitado.

VI - DATA DA REUNIÃO

Homologado na XI Reunião Ordinária do CEP, em 12 de dezembro de 2000


Prof. Dr. Sebastião Araújo
PRESIDENTE do COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP

ANEXO 4- Dados dos Pacientes com Doenças Inflamatórias Intestinais

Pacientes com RCUI:

Paciente n. 1

Sexo: Masculino Idade: 29 anos

Acometimento: pancolite

Tratamento: Sulfassalazina, dose de manutenção

Paciente n. 2

Sexo: Masculino Idade: 35 anos

Acometimento: pancolite

Tratamento: Sulfassalazina, dose de manutenção

Paciente n. 3

Sexo: Feminino Idade: 40 anos

Acometimento: colite do lado esquerdo

Tratamento: Mesalazina, dose de manutenção

Paciente n. 4

Sexo: Masculino Idade: 33 anos

Acometimento: pancolite

Tratamento: Sulfassalazina, dose de manutenção

Paciente n. 5

Sexo: Feminino Idade: 60 anos

Acometimento: colite do lado esquerdo

Tratamento: Sulfassalazina, dose de manutenção

Pacientes com DC:

Paciente n. 1

Sexo: Masculino Idade: 48 anos

Acometimento: ileal

Tratamento: Mesalazina, dose de manutenção

Paciente n. 2

Sexo: Feminino Idade: 33 anos

Acometimento: colônica

Tratamento: Mesalazina, dose de manutenção

Paciente n. 3

Sexo: Feminino Idade: 18 anos

Acometimento: ileal

Tratamento: Mesalazina, dose de manutenção

Paciente n. 4

Sexo: Feminino Idade: 24 anos

Acometimento: íleo-colônica

Tratamento: Sulfassalazina, dose de manutenção

Paciente n. 5

Sexo: Masculino Idade: 37 anos

Acometimento: íleo-colônica

Tratamento: Sulfassalazina, dose de manutenção