

FLÁVIA RUBIA PALLIS

**AVALIAÇÃO FUNCIONAL DOS EOSINÓFILOS NA
ANEMIA FALCIFORME E O EFEITO DO
TRATAMENTO COM HIDROXIUREIA**



**UNICAMP
CAMPINAS
2011**



UNICAMP

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Ciências Médicas

**AVALIAÇÃO FUNCIONAL DOS EOSINÓFILOS NA
ANEMIA FALCIFORME E O EFEITO DO
TRATAMENTO COM HIDROXIUREIA**

Flávia Rubia Pallis

Dissertação de Mestrado apresentada
à Pós-Graduação da Faculdade de
Ciências Médicas da Universidade
de Campinas - UNICAMP para
obtenção de título de Mestre em
Ciências Médicas, área de
concentração em Ciências Básicas.
Sob orientação da Dra. Carla
Fernanda Franco Penteado

Campinas, 2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
**ROSANA EVANGELISTA PODEROSO – CRB8/6652 - BIBLIOTECA DA
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP**

F179a	Pallis, Flávia Rubia, 1986- Avaliação funcional dos eosinófilos na anemia falciforme e o efeito do tratamento com hidroxiureia. / Flávia Rubia Pallis. -- Campinas, SP: [s.n.], 2011. Orientador: Carla Fernanda Franco Penteado Coorientador: Fernando Ferreira Costa Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas. 1. Eosinófilos. 2. Anemia falciforme. 3. Inflamação. 4. Quimiocinas. I. Penteado, Carla Fernanda Franco. II. Costa, Fernando Ferreira. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.
-------	--

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Altered functional properties of eosinophils in sickle cell anemia and effects of hydroxyurea therapy.

Palavras-chave em inglês:

Eosinophils
Sickle cell anemia
Inflammation
Chemokines

Área de concentração: Ciências Básicas

Titulação: Mestre em Ciências Médicas

Banca examinadora:

Carla Fernanda Franco Penteado [Orientador]
Fernando Ferreira Costa [Coorientador]
Monique Morgado Loureiro
Dulcinéia Martins de Albuquerque

Data da defesa: 13-05-2011

Programa de Pós-Graduação: Faculdade de Ciências Médicas

Banca examinadora da Dissertação de Mestrado

Flávia Rubia Pallis

Orientador: Prof^a. Dr^a. Carla Fernanda Franco Penteado

Membros:

1. Prof.^a Dr.^a. Carla Fernanda Franco Penteado

Carla Penteado

2. Prof.^a. Dr.^a. Dulcinéia Martins de Albuquerque

Dulcinéia Martins de Albuquerque

3. Prof.^a. Dr.^a. Monique Morgado Loureiro

Monique Morgado Loureiro

Curso de Pós-Graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 13/05/2011

DEDICATÓRIA

À minha avó Maria Izabel Biettencourt que sempre esteve ao meu lado!

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, meu protetor nos momentos que exigiram mais força e dedicação.

Aos meus pais, Rute e Flávio, pelo incentivo sempre presente em todos os momentos de minha vida. Ao apoio gigantesco de minha mãe e à educação sempre firme de meu pai, pessoas que batalharam muito para me ajudar a abrir todas as portas e por não pouparem esforços para a concretização deste sonho. Muito obrigada por serem pais maravilhosos!

Agradeço muito à minha orientadora, Dra. Carla Fernanda Franco Penteado, pela oportunidade de orientação, sem a qual este trabalho não teria sido realizado. Pela paciência, apoio, incentivo, acolhimento, amizade e força. Por todas as oportunidades que tive nesses anos de convivência. Pela vontade de me ver crescer e conquistar o meu espaço e, principalmente, pelos ensinamentos profissionais e pessoais que me acompanharão até o fim de minha vida.

Ao Dr. Fernando F. Costa também responsável pelo desenvolvimento deste trabalho. Agradeço pela oportunidade em fazer parte desse grupo de pesquisa. Por ter se tornado mais uma referência de carreira em minha formação.

Agradeço à Dra. Nicola Conran que colaborou de forma essencial em toda a minha pós-graduação.

Agradeço aos participantes de minha banca, Dra. Dulcinéia Martins de Albuquerque, Dra. Monique Morgado Loureiro, Dra. Maria Heloisa Blotta e Dra. Heloisa Helena A.Ferreira, pela disposição em colaborar de forma significativa para a conclusão deste trabalho. Pelas sugestões e dedicação dispensada.

Agradeço àqueles que desde o início deste trabalho tem me acompanhado, que se preocuparam comigo e me apoiaram quando precisei, pela confiança amizade sincera e animação. À Tatiana, Venina e Lediana minhas quase irmãs, e ao Márcio que sempre me apoiaram, me escutaram nos momentos de desabafo, que gargalhavam com vontade e que curtiam me ver feliz. Por terem sido grandes companheiros.

Ao meus companheiros Carol Lanaro e Kléber, que tiveram papel fundamental durante esses anos. Agradeço pela amizade, paciência, apoio, sugestões e pelos novos ensinamentos. Pela oportunidade de crescer um pouco mais, conhecendo a outra face da pesquisa.

Agradeço aos colegas de laboratório Ana Flávia, Andréia, Vanessa, Flávia Boca, Regiane, Angélica, Flávia Lopes, Renata, Cíntia, Diana, Emília, Fernanda, Camila, Sheley, Andrey, Mario, Rashmi, Dani, Lena, Simone, Ucha, Dri, Ana Leda e Irene pela força, confiança e pelos momentos de descontração.

Aos enfermeiros do ambulatório, obrigada pelo apoio durante este tempo de estudo que me permitiu a continuar buscando meus objetivos.

Enfim, agradeço a todos por terem adquirido um significado em minha vida durante este período, me ajudando com o conhecimento e a consistência da amizade. Obrigada!

RESUMO

O estado homozigoto para hemoglobina S é denominado anemia falciforme. A inflamação tem papel importante no processo de vaso-oclusivo nesta doença; leucócitos, citocinas pró-inflamatórias e moléculas de adesão estão aumentados no sangue periférico dos pacientes com anemia falciforme. A leucocitose está associada com a morbidade e mortalidade nestes pacientes. Além disso, os neutrófilos de pacientes com anemia falciforme apresentam aumento nas propriedades adesivas e quimiotáticas. No entanto, há poucas evidências sobre as possíveis alterações funcionais dos eosinófilos e na produção de mediadores derivados destas células. Os eosinófilos participam intensamente de processos inflamatórios das vias aéreas, são numericamente maiores e apresentam propriedades adesivas aumentadas na anemia falciforme. Os pulmões são particularmente vulneráveis aos eventos vaso-oclusivos na anemia falciforme e as complicações pulmonares são as principais causas de morte e a segunda causa mais comum de hospitalização em pacientes com esta doença. Atualmente a hidroxiureia é o único medicamento utilizado no tratamento das manifestações clínicas da anemia falciforme, por aumentar os níveis de Hb fetal, reduzindo a polimerização da hemoglobina S, a neutrofilia e algumas complicações associadas ao fenômeno vaso-oclusivo. Considerando a escassez de estudos que avaliaram a participação dos eosinófilos na fisiopatologia da anemia falciforme, este projeto visou comparar as propriedades adesivas, a capacidade quimiotática, a desgranulação e a produção de mediadores em eosinófilos de pacientes com anemia falciforme. Além disso, foi investigado se o tratamento com hidroxiureia interfere nas funções dos eosinófilos. Amostras de sangue periférico de pacientes com anemia falciforme foram analisadas e demonstraram maior número absoluto de eosinófilos comparados aos pacientes sem o tratamento com hidroxiureia e aos indivíduos controle. A adesão basal dos eosinófilos de pacientes tratados com hidroxiureia confirmamos que estas células são mais aderentes a fibronectina que os eosinófilos de pacientes com anemia falciforme sem o mesmo tratamento e de indivíduos controle. Além disso, não foi observada nenhuma alteração na adesão destas células quando estimulada com quimiocinas (RANTES, Eotaxina, IL-5). A citometria de fluxo foi utilizada para comparar a expressão e ativação das principais moléculas de adesão nestes eosinófilos, e identificou-se um aumento de expressão da subunidade α da integrina MAC-1 de

pacientes com anemia falciforme sem tratamento com hidroxiureia. Os eosinófilos de pacientes com anemia falciforme em tratamento ou não com hidroxiureia apresentaram maior capacidade de migração espontânea e em resposta aos agentes quimiotáticos (RANTES, Eotaxina, IL-5). Além disso, estes pacientes apresentaram níveis séricos e plasmáticos de RANTES e de Eotaxina-1 elevados. Os eosinófilos de pacientes com anemia falciforme apresentaram maior desgranulação, consequentemente liberou maior quantidade de peroxidase eosinofílica e de neurotoxina derivada dos eosinófilos que os pacientes que foram tratados com hidroxiureia e aos indivíduos controle, mas a co-incubação com RANTES, Eotaxina e IL-5 não alterou esta resposta. Por fim foi observado aumento na produção de espécies reativas de oxigênio nestes pacientes. No conjunto, nossos resultados sugerem que os eosinófilos contribuem significativamente para o processo de vaso-occlusão observado na anemia falciforme.

ABSTRACT

Sickle cell anemia is the homozygous state for hemoglobin S. Inflammation plays an important role in the vaso-occlusive process of the disease, where leukocytes, proinflammatory cytokines and adhesion molecules are increased in the peripheral blood of patients with sickle cell anemia. Leukocytosis is associated with morbidity and mortality in these patients. Moreover, neutrophils from sickle cell patients show increased chemotactic and adhesive properties. However, there is little evidence about the possible functional changes in eosinophils and production of mediators derived from these cells. The eosinophils are involved in airway inflammatory processes and are numerically larger and have increased adhesive properties in sickle cell anemia. The lungs are particularly vulnerable to vaso-occlusive events in sickle cell anemia and pulmonary complications are the leading causes of death and second most common cause of hospitalization in these patients. Hydroxyurea is currently the only drug used to treat the clinical manifestations of sickle cell anemia by increasing the levels of fetal hemoglobin, reducing the hemoglobin S polymerization, neutrophils and some complications associated with vaso-occlusive phenomenon. Considering the scarcity of studies that have evaluated the role of eosinophils in the pathophysiology of sickle cell anemia, this project aimed to compare the adhesive properties, chemotaxis capacity, degranulation and production of mediators in eosinophils of patients with sickle cell anemia. Furthermore, we investigated whether treatment with hydroxyurea interferes with the function of eosinophils. Blood samples from patients with sickle cell anemia were analyzed and showed higher absolute number of eosinophils compared with patients without treatment with hydroxyurea and control subjects. The basal adhesion of eosinophils from patients treated with hydroxyurea confirmed that these cells are more adhesive to fibronectin than eosinophils of patients with sickle cell disease without the same treatment and control subjects. Moreover, there was no change in the adhesion of these cells when stimulated with chemokines (RANTES, Eotaxin, IL-5). Flow cytometry was used to compare the expression and activation of major adhesion molecules in these eosinophils, and we identified an increased expression of α subunit of integrin Mac-1 in patients with sickle cell disease without treatment with hydroxyurea. Eosinophils from patients with sickle cell disease, treated or not with hydroxyurea, had a higher

capacity for spontaneous migration and chemotaxis in response to chemotactic agents (RANTES, Eotaxin, IL-5). Moreover, these patients had higher serum and plasma RANTES and Eotaxin-1. Eosinophils from patients with sickle cell anemia had increased degranulation and a consequently higher amount of released eosinophil peroxidase and eosinophil-derived neurotoxin than patients who were treated with hydroxyurea and control subjects, but the co-incubation with RANTES, Eotaxin and IL-5 did not alter this response. Finally, there was an increased production of reactive oxygen species in these patients. Overall, our results suggest that eosinophils contribute significantly to the process of vaso-occlusion observed in sickle cell anemia.

LISTA DE ABREVIATURAS

A23187 - Ionóforo de cálcio

AA - Indivíduos controle

ACD - Adenosina Citrato Dextrose

BSA - Albumina sérica bovina

EDTA - Ácido etilenodiaminotetraacético

ECP - Proteína catiônica do eosinófilo

EDN - Neurotoxina derivada do eosinófilo

EPO - Peroxidase eosinofílica

FITC- Isotiocianato de fluoresceína

FN - Fibronectina

GM-CSF - fator estimulador de colônia macrófago-granulócito

Hb - Hemoglobina

Hb F - Hemoglobina fetal

Hb S - Hemoglobina S

Hb A - Hemoglobina adulta

HU - Hidroxiureia

ICAM - Molécula de adesão intercelular

IL - Interleucina

LFA-1 - Antígeno funcional linfocitário-1

Mac-1 - Antígeno macrofágico 1

MACs - Moléculas de adesão celular

Mad Cam-1 - Molécula de adesão à mucosa-1

MBP - Proteína básica principal

MEC - Matriz extracelular

MPO - Mieloperoxidase

PAF - Fator de ativação plaquetária

PBS - Salina tamponada fosfatada

PE - Ficoeritrina

RANTES -Regulada por ativação de células T normais expressas e secretadas

RPMI-1640 - Meio de cultura para células

SS - Pacientes com anemia falciforme sem tratamento com hidroxiureia

SS+HU - Pacientes com anemia falciforme em tratamento com hidroxiureia

TH2 - T helper 2

TNF- α - Fator de necrose tumoral- α

VCAM-1 - Molécula de adesão celular vascular

VLA-4 - Antígeno muito tardio-4

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Fisiopatologia da Anemia Falciforme. A síntese de hemoglobina S é resultado de uma mutação de ponto, que quando desoxigenada forma polímeros no interior das hemácias, deformando-a e tornando-a rígida as (formato de foice). As hemácias, neutrófilos e reticulócitos participam do processo de vaso-oclusão, além da hemólise intravascular de hemácias, são eventos que caracterizam a anemia falciforme. (Adaptado do: Steinberg; Trends Pharm Sci, 2006)..... 23
- Figura 2: Representação esquemática do tráfego dos eosinófilos. Os eosinófilos são células originadas na medula óssea, a partir de uma célula pluripotente que sofre diferenciação sob controle de fatores de transcrição, tais como: GATA-1, PU.1 e c/ EBP. Além dos fatores de transcrição, a diferenciação dos eosinófilos sofrem influências de citocinas como: IL-3, IL-5 e GM-CSF. A migração dos eosinófilos é regulada principalmente pela IL-5. Posteriormente, os eosinófilos interagem com o endotélio, um processo que ocorre em várias etapas; adesão, rolamento e diapedese. O extravasamento dos eosinófilos do endotélio para os órgãos alvos é coordenado pelas quimiocinas, moléculas de adesão dos eosinófilos e receptores de moléculas de adesão presente no endotélio. (Adaptado de Rothenberg & Hogan, 2006) 31
- Figura 3: Número absoluto de eosinófilos no sangue periférico. Indivíduos controles (AA) (n=21), pacientes com anemia falciforme (SS) (n=28) e pacientes com anemia falciforme em terapia com hidroxiureia (SS+HU) (n=24). Os dados estão expressos como média $\pm$ EPM. * $p < 0,05$ comparado com o controle; # $p < 0,05$ comparado com SS. 44
- Figura 4: Adesão basal de eosinófilos à fibronectina em indivíduos controles e de pacientes com anemia falciforme. Eosinófilos (7×10^4 células/ml – 50 μ l/poço) de indivíduos controles (AA) (n=22), pacientes com anemia falciforme (SS) (n=12) e pacientes com anemia falciforme em terapia com hidroxiureia (SS+HU) (n=18). Os resultados são expressos como média das porcentagens de células aderidas $\pm$ EPM. * $p < 0,05$ quando comparado com o controle; # $p < 0,05$ quando

comparado com SS.	46
Figura 5: Adesão estimulada de eosinófilos à fibronectina. Eosinófilos (7×10^4 células/ml - 50 µl/poço) de indivíduos controles (AA), pacientes com anemia falciforme (SS) e pacientes com anemia falciforme em terapia com hidroxiureia (SS+HU). Os resultados são expressos como média das porcentagens de células aderidas $\pm$ EPM.	47
Figura 6: Expressão das moléculas de adesão (Mac-1 e VLA-4). Expressão das proteínas de superfície CD66b (AA=11; SS=12; SS+HU=15), CD49d (AA=12; SS=13; SS+HU=16), CD11b (AA=10; SS=13; SS+HU=14), CD18 (AA=11; SS=12; SS+HU=14) em eosinófilos de indivíduos controle (AA), pacientes com anemia falciforme (SS) e pacientes com anemia falciforme em terapia com hidroxiureia (SS+HU), determinada por citometria de fluxo. Os resultados são expressos em MIF $\pm$ erro da média. * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle.	49
Figura 7: Quimiotaxia espontânea de eosinófilos. Eosinófilos (3×10^6 células/ml - 29 µl/poço) de indivíduos controles (n=19), pacientes com anemia falciforme (SS) (n=14) e pacientes com anemia falciforme em terapia com hidroxiureia (SS+HU) (n=15). Os resultados são expressos como média das porcentagens de células aderidas $\pm$ EPM. * $p < 0,05$ quando comparado com o controle; # $p < 0,05$ quando comparado com SS.	51
Figura 8: Migração de eosinófilos em resposta a agentes quimiotáticos. Eosinófilos (3×10^6 células/ml - 29 µl/poço) de indivíduos controles (AA), pacientes com anemia falciforme (SS) e pacientes com anemia falciforme em terapia com hidroxiureia (SS+HU). Os resultados são expressos como média das porcentagens de células aderidas $\pm$ EPM. # $p < 0,05$ quando comparado com o controle.	52
Figura 9: Níveis plasmáticos das Eotaxinas. A concentração de Eotaxina-1, Eotaxina-2 e Eotaxina-3 foi determinada em amostras de plasma de indivíduos controle (AA) (n=20), pacientes com anemia falciforme (SS) (n=30) e pacientes com anemia falciforme em terapia com hidroxiureia (SS+HU) (n=30) segundo a indicação do fabricante. Os resultados estão expressos como média $\pm$ EPM. * $p < 0,05$ quando comparado com o controle.	54

Figura 10: Níveis séricos de RANTES. A concentração de RANTES foi determinada em amostras de soro, de indivíduos controle (n=20), pacientes com anemia falciforme (SS) (n=30) e pacientes com anemia falciforme em terapia com hidroxiureia (SS+HU) (n=30) segundo a indicação do fabricante. Os resultados estão expressos como média ± EPM. * p<0,05 quando comparado com o controle.	55
Figura 11: Desgranulação basal de eosinófilos. Eosinófilos (5×10^5 células/ml - 50µl/poço) de indivíduos controles (AA) (n=31), pacientes com anemia falciforme (SS) (n=13) e pacientes com anemia falciforme em terapia com hidroxiureia (SS+HU) (n=23). A EPO contida nos sobrenadantes após as incubações foi medida e expressa como média ± EPM das densidades óticas. * p<0,05 quando comparado com o controle; #p<0,05 quando comparado com SS.	57
Figura 12: Desgranulação estimulada de eosinófilos. Eosinófilos (5×10^5 células/ml - 50µl/poço) de indivíduos controles (AA), pacientes com anemia falciforme (SS) e pacientes com anemia falciforme em terapia com hidroxiureia (SS+HU). A EPO contida nos sobrenadantes após as incubações foi medida e expressa como média ± EPM das densidades óticas.	58
Figura 13: Dosagem de EDN. A concentração de EDN foi determinada em amostras de plasma de indivíduos controles (AA), pacientes com anemia falciforme (SS) e pacientes com anemia falciforme em terapia com hidroxiureia (SS+HU). Os resultados estão expressos como média ± EPM. * p<0,05 quando comparado com o controle; #p<0,05 quando comparado com SS.	59
Figura 14: Produção de espécie reativa de oxigênio. Indivíduos controle (AA) (n=7) pacientes com anemia falciforme (SS) (n=9) e pacientes com anemia falciforme em terapia com hidroxiureia (SS+HU) (n=7). Os resultados estão expressos como média ± EPM. * p<0.05 quando comparado com o controle.	61

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	vi
AGRADECIMENTOS	vii
RESUMO	ix
ABSTRACT	xi
LISTA DE ABREVIATURAS	xiii
LISTA DE FIGURAS	xv
SUMÁRIO	xviii
1. INTRODUÇÃO	21
1.1 Anemia Falciforme	21
1.1.1. Fisiopatologia da Anemia Falciforme	21
1.1.2. Vaso-oclusão	24
1.2. Eosinófilos	26
1.3. Hidroxiureia e óxido nítrico	32
2. OBJETIVOS	35
2.1. Objetivo Geral	35
2.2. Objetivos específicos	35
3. CASUÍSTICA E MÉTODOS	37
3.1. Pacientes e controles	37
3.2. Isolamento de eosinófilos	37
3.2.1. Separação imunomagnética de eosinófilos	38
3.3. Adesão de eosinófilos à fibronectina	38
3.4. Citometria de Fluxo	39
3.5. Quimiotaxia de eosinófilos	40
3.6. Quantificação de citocinas e quimiocinas	41
3.7. Desgranulação de eosinófilos	41
3.8. Espécie reativa de oxigênio (ROS)	42
3.9. Análise Estatística	42
4. RESULTADOS	44
4.1 Número absoluto de eosinófilos no sangue periférico	44

4.2. Adesão de eosinófilos à fibronectina.....	45
4.3. Expressão protéica das moléculas de adesão nos eosinófilos de pacientes com anemia falciforme e indivíduos controle	48
4.4. Quimiotaxia dos eosinófilos	50
4.5. Determinação dos níveis de citocinas e quimiocinas plasmáticas e séricas	53
4.6. Desgranulação basal e estimulada de eosinófilos.....	56
4.7. Produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) nos eosinófilos de pacientes com anemia falciforme	60
5. DISCUSSÃO	63
6. CONCLUSÕES	72
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74

1. Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1 Anemia Falciforme

A doença falciforme foi descrita pela primeira vez em 1910, por Herrick, em um estudante de odontologia que apresentava sintomas pulmonares. Herrick designou o termo de eritrócitos “peculiarmente alongados e em forma de foice” para descrever o sangue periférico de um indivíduo anêmico da raça negra. As manifestações clínicas da doença; icterícia, complicações pulmonares e úlceras de membros inferiores, já eram conhecidas séculos antes na África Ocidental (Herrick, 1924).

A anemia falciforme originou-se na África, devido a imigração forçada dos escravos foi trazida às Américas. Atualmente é encontrada em toda a Europa, e em grandes regiões da Ásia. No Brasil a distribuição da anemia falciforme é heterogênea, sendo mais frequente na Região Nordeste onde a proporção de antepassados negros na população é maior (Cardoso & Guerreiro, 2006).

1.1.1. Fisiopatologia da Anemia Falciforme

A anemia falciforme ocorre devido uma mutação de ponto no códon 6 do gene da globina beta, onde uma adenina (A) é substituída por uma timina (T), levando conseqüentemente à substituição do aminoácido ácido glutâmico pela valina, resultando na produção de uma hemoglobina anômala, conhecida como hemoglobina S (HbS) (Shiu, 2000; Serjeant & Serjeant, 2001; Steinberg et al., 2001).

A HbS, quando desoxigenada, tem a capacidade de formar polímeros e causar deformação, enrijecimento e fragilidade das células vermelhas, ocasionando diminuição da vida média das hemácias, fenômenos vaso-oclusivos, episódios de dor e lesão de órgãos-alvo (Steinberg, 1999). A concentração de oxigênio, a concentração de HbS, a desidratação celular, a presença de Hb normais, o tempo de circulação dos glóbulos vermelhos na microcirculação, a pressão, a força iônica, o pH e a concentração intracelular de hemoglobina fetal (HbF) podem ser considerados fatores importantes para a polimerização dessa hemoglobina (De Franceschi & Corroche, 2004; Stuart & Nagel, 2004).

A polimerização da HbS é o evento fundamental na fisiopatologia da anemia falciforme (Steinberg et al., 1999). A agregação de polímeros de hemoglobina muitas vezes leva a deformação eritrocitária, acredita-se que esta deformação seja a causa de muitas das

manifestações clínicas da anemia falciforme, como anemia, episódios dolorosos recorrentes devido as crises vaso-oclusivas, infecções, síndrome torácica aguda, hipertensão pulmonar, priapismo, acidente vascular cerebral, osteonecrose, insuficiência renal, úlceras de perna, retinopatias e doenças cardíacas (Frenette & Atweh, 2007; Steinberg, 2008). Atualmente é reconhecido que a hemólise desempenha um papel significativo na patogênese da doença, possivelmente através de redução biodisponibilidade do óxido nítrico (NO) (Madeira et al., 2008).

A hemoglobina fetal (HbF) interage com outros elementos da hemácia, confere a essa hemoglobina maior afinidade pelo oxigênio do que a hemoglobina adulta ou hemoglobina A (HbA) (Ramalho, 1986). Em adultos com perfil eletroforético normal, a produção de HbF corresponde menos de 1% do total de hemoglobina. No entanto, os mecanismos que determinam os níveis de HbF em adultos não são totalmente conhecidos (Stoeckert et al., 1994).

Estudos clínicos e epidemiológicos indicam que a concentração de HbF é um fator modulador da gravidade clínica na anemia falciforme. Indivíduos com baixos níveis de HbF possuem uma apresentação clínica mais grave, resultando em crises de dor frequentes, episódios de síndrome torácica aguda e maiores índices de mortalidade, do que os pacientes com altos níveis de HbF (De Franceschi & Corrocher, 2004).

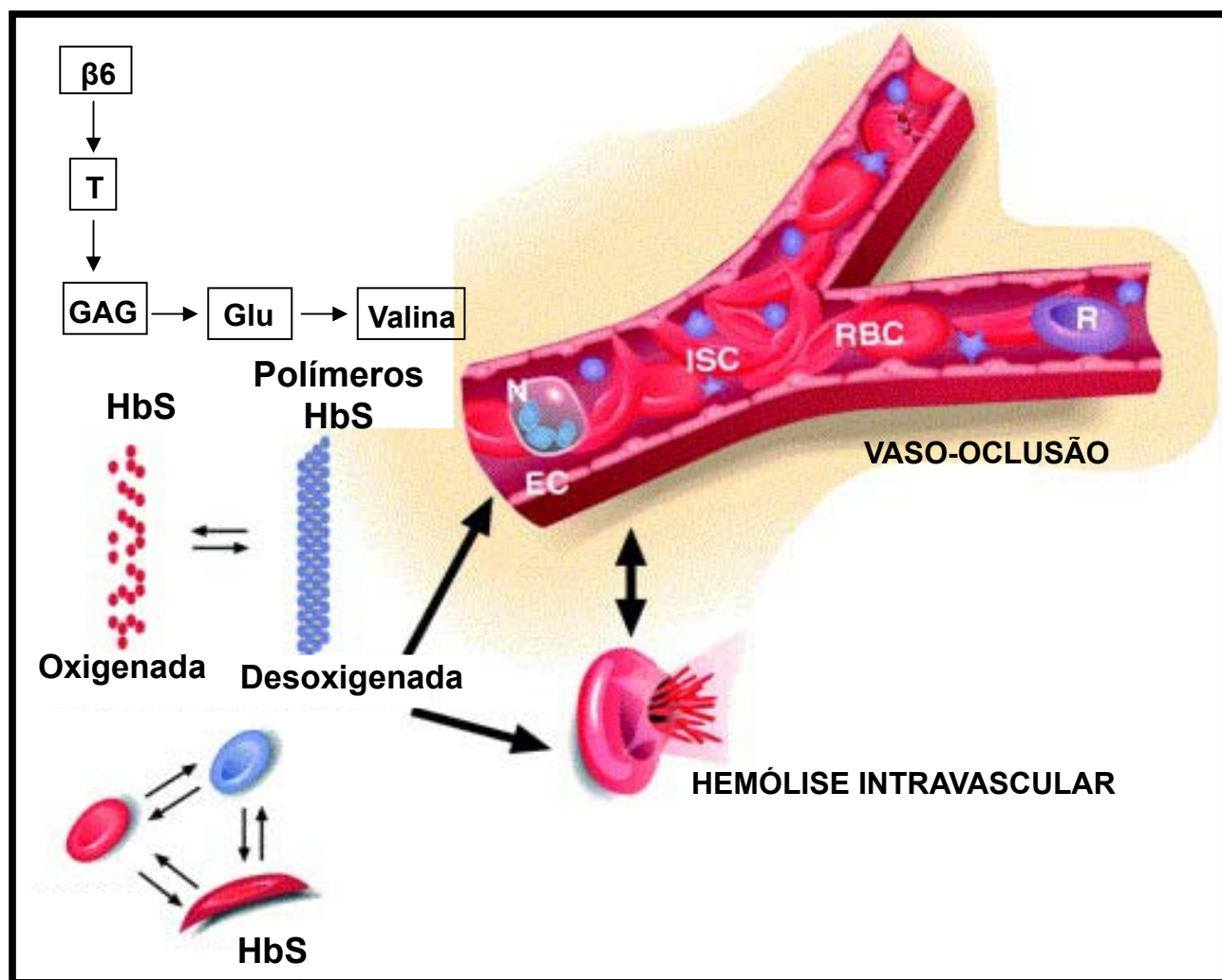


Figura 1: Fisiopatologia da Anemia Falciforme. A síntese de hemoglobina S é resultado de uma mutação de ponto, que quando desoxigenada forma polímeros no interior das hemácias, deformando-a e tornando-a rígida as (formato de foice). As hemácias, neutrófilos e reticulócitos participam do processo de vaso-oclusão, além da hemólise intravascular de hemácias, são eventos que caracterizam a anemia falciforme. (Adaptado do: Steinberg; Trends Pharm Sci, 2006)

1.1.2. Vaso-oclusão

A vaso-oclusão é a maior causa de morbidade nos pacientes com anemia falciforme e acontece principalmente em órgãos com circulação sinuosa, onde o fluxo de sangue é lento, a tensão de oxigênio é baixa, ou ainda, naqueles órgãos onde há um suprimento sanguíneo arterial terminal limitado. A hipóxia decorrente da obstrução vascular leva a infartos teciduais e proporciona crises de dor ou danos teciduais crônicos (Labie & Elion, 1999).

Embora alguns pesquisadores concordem que o aumento da ligação entre os eritrócitos falcizados ao endotélio vascular seja um importante fator no processo de vaso-oclusão, os mecanismos responsáveis por este processo na anemia falciforme são complexos e ainda não foram totalmente elucidados (Hebbel, 1997).

Os pacientes com anemia falciforme apresentam aumento na contagem de leucócitos, das citocinas e das moléculas de adesão (Stuart & Setty, 1999). Além disso, células endoteliais circulantes, leucócitos e plaquetas encontram-se ativados no sangue periférico (Belcher et al., 2003).

Acredita-se que o processo vaso-oclusivo resulte de um complexo cenário envolvendo interações de diferentes tipos celulares, incluindo células falcizadas densas e desidratadas, reticulócitos, leucócitos ativados, células endoteliais anormalmente ativadas (Solovey et al., 1997), plaquetas e proteínas plasmáticas (Chiang & Frenette, 2005; Franceschi & Corrocher, 2004; Kasschau et al., 1996). Eventos vaso-oclusivos recorrentes, processos de isquemia-reperfusão e consequente ativação do endotélio vascular e injúria, induzem a contínuas respostas inflamatórias na doença falciforme, que se propagam por níveis elevados de citocinas inflamatórias, diminuição da biodisponibilidade do óxido nítrico e estresse oxidativo (Conran et al., 2009).

O papel do processo inflamatório na anemia falciforme pode ser mais amplamente investigado com o desenvolvimento de camundongos transgênicos portadores de HbS. Utilizando a técnica de microscopia intravital em vênulas do cremaster de camundongos que expressam genes humanos da globina β (Trudel et al., 1994; Paszty et al., 1997). Sabe-se que após um estímulo inflamatório os leucócitos aderem ao endotélio de vênulas pós-capilares e aos glóbulos vermelhos circulantes e que a ativação do endotélio e a resposta inflamatória são necessárias para aderência dos leucócitos e consequentemente para a vaso-

oclusão. Assim, tanto a adesão dos leucócitos ao endotélio como a adesão dos leucócitos aos eritrócitos falcizados desempenham um papel direto no processo vaso-oclusivo. (Frenette, 2002; Turhan et al., 2002). Dessa forma, sugerindo que os leucócitos tem um papel importante na vaso-oclusão e que estas células são as iniciadoras desse processo.

Acredita-se que além dos leucócitos, a ativação do endotélio vascular por espécies reativas de oxigênio, adesão de células irreversivelmente falcizadas e infecções que levam a secreção de citocinas inflamatórias, contribuem para o processo de vaso-oclusão. Estes fatores de ativação podem induzir a expressão de moléculas de adesão endotelial e promover o recrutamento de leucócitos, principalmente dos neutrófilos. Os neutrófilos tendem a se aderir ao endotélio e os eritrócitos falciformes a eles, devido a presença de proteínas inflamatórias como: TNF- α , IL-1 e endotelina 1, que contribuem para a ativação do endotélio e possibilitam a oclusão vascular (Frenette, 2002). Pacientes com anemia falciforme apresentam níveis plasmáticos elevados de TNF- α , IL-8, IL-6 e GM-CSF em relação a indivíduos normais (Lanaro et al., 2009; Conran et al., 2007), favorecendo a adesão celular com consequente vaso-oclusão. Outras proteínas plasmáticas como a fibronectina, o fibrinogênio, fator de von Willebrand e trombospondina estão relacionadas a indução da adesão das células falcizadas ao endotélio vascular (Kasschau et al., 1996).

Os neutrófilos de pacientes com anemia falciforme apresentam adesão aumentada para fibronectina e endotelina (Kasschau et al. 1996; Fadlon et al., 1998; Assis et al., 2005). Além disso, sua capacidade quimiotática está aumentada nestes pacientes (Canalli et al., 2007). A contagem de neutrófilos no sangue periférico tem relação direta com a gravidade da doença e a leucocitose está associada com alto relato de mortalidade (Platt et al., 1994; Anyaegbu et al., 1998; Manadori et al., 2000; Okpala et al., 2002).

Os neutrófilos parecem ser as células mais importantes que participam do processo de vaso-oclusão. Embora os eosinófilos e outros tipos celulares como hemácias e plaquetas também contribuem para esse evento. Canalli et al. (2004) demonstraram que os eosinófilos de pacientes com anemia falciforme são numericamente maiores e apresentam propriedades adesivas aumentadas. No entanto, a participação dos eosinófilos nesse processo ainda não está bem elucidada. Sabe-se que estas células participam de vários processos inflamatórios crônicos, principalmente relacionados às vias aéreas, como por exemplo a asma, e que os pulmões são particularmente vulneráveis aos eventos vaso-oclusivos devido à sua

anatomia. A inflamação desempenha papel fundamental na asma, no qual citocinas como eotaxina (CCL11) e seu receptor, CCR3, contribuem no recrutamento dos eosinófilos para o pulmão (Flier et al. 2001).

Alguns pesquisadores tem sugerido que a asma é comum entre os pacientes com anemia falciforme, particularmente em crianças, além disso, tem sido associada a múltiplas complicações, incluindo síndrome torácica aguda. As complicações pulmonares são as principais causas de morbidade e mortalidade na anemia falciforme e incluem síndrome torácica aguda (STA), infecções e hipertensão pulmonar. A STA é caracterizada por dor torácica, febre, hipóxia, dispnéia, infiltrado nos raios X de tórax e queda no nível de hemoglobina (Platt et al., 1994; Castro et al., 1994).

Crianças com anemia falciforme concomitante com o diagnóstico de asma tem o primeiro episódio de síndrome torácica aguda mais cedo, e apresentam quase o dobro de episódios de síndrome torácica aguda que os pacientes sem asma (Vij & Machado, 2010).

Há evidências de que a associação de vários mecanismos, como incompatibilidade de ventilação e de perfusão levando à hipoxemia, falcização e inflamação, causam aumento da adesão de hemácias ao endotélio vascular, dessa forma, estes pacientes requerem mais transfusões e os episódios de dores são mais frequentes (Boyd et al., 2007).

Deste modo, a asma é um fator de risco independente para mortalidade em crianças com anemia falciforme, conferindo duas vezes maior risco de morte (Vij & Machado, 2010).

1.2. Eosinófilos

Os eosinófilos foram descritos pela primeira vez por Paul Ehrlich em 1879, e a partir desta data tem sido extensivamente estudados (Barthel et al., 2008). Os eosinófilos são leucócitos multifuncionais envolvidos na patogênese de inúmeros processos inflamatórios, incluindo infecções por helmintos, bactérias e vírus, lesão tecidual, imunidade contra células tumorais, e doenças alérgicas (Gleich & Loegering, 1984; Weller, 1994; Rothenberg, 1998).

Os eosinófilos são granulócitos derivados da medula óssea a partir de células-tronco pluripotentes, que a princípio se diferenciam em um precursor híbrido com propriedades comuns de basófilos e eosinófilos e, em seguida, em uma linhagem separada de eosinófilos

(Kroegel et al., 1994; Abbas et al., 2000). A especificação da linhagem de eosinófilos deve-se pela interação de três fatores de transcrição, incluindo GATA-1, PU.1, e membros da C/EBPs (Nerlov & Graf, 1998; Nerlov et al 1998; McNagny & Graf, 2002). Embora estes fatores de transcrição estejam expressos em uma variedade de linhagens hematopoéticas, o modo pelo qual atuam sobre os eosinófilos é único (DeKoter & Singh, 2000; Walsh et al, 2002; Du et al., 2002). Ao contrário do que acontece com a maioria das células, GATA-1 e PU.1 agem como antagonistas, no caso dos eosinófilos exercendo atividade sinérgica na regulação e especificação da linhagem eosinofílica.

O desenvolvimento e a diferenciação dos eosinófilos acontecem no interior da medula óssea e são promovidos particularmente por 3 citocinas derivadas de células T: IL-3, IL-5 e GM-CSF, (Rosenberg et al., 2007). Estas citocinas fornecem sinais permissivos para proliferação e diferenciação, seguidos dos sinais instrutivos especificados pelos fatores de transcrição GATA-1, PU.1 e C/EBPs. Destas três citocinas, acredita-se que a IL-5 seja a mais específica para a linhagem eosinofílica pois é responsável pela diferenciação seletiva destas células, além de estimular a liberação de eosinófilos maduros da medula óssea para a circulação periférica (Weller, 1997; Lampinem et al., 2004; Weller et al., 2005).

Os eosinófilos, cujos grânulos contêm proteínas básicas ricas em argininas apresentam afinidade a corantes ácidos, como a eosina, resultando na coloração alaranjada característica dos grânulos citoplasmáticos presentes nestas células, além disso, na espécie humana os eosinófilos maduros têm, geralmente, o núcleo bilobado (Abbas et al., 2000; Janeway et al. 2007; Roitt et al. 2004).

As proteínas do grânulo presentes nesta célula são secretadas através de exocitose regulada e desgranulação, e as quatro diferentes populações de organelas secretoras são: grânulos cristalóides, grânulos primários, pequenos grânulos e vesículas secretoras. A maioria das organelas secretoras são os grânulos cristalóides (0,5-0,8 µm de diâmetro), cuja função é armazenar a maioria das proteínas dos grânulos dos eosinófilos, as quais são compostas de quatro proteínas altamente básicas, são elas: proteína básica principal (MBP), proteína catiônica eosinofílica (ECP), neurotoxina derivada dos eosinófilos (EDN) e peroxidase eosinofílica (EPO), (Gleich & Adolphson 1986; Walsh 2001). A proteína básica principal (MBP) é uma proteína altamente catiônica sintetizada e é expressa como dois homólogos diferentes (MBP1 e MBP2), além de ser a mais abundante no eosinófilo (Ackerman et al.

1983).

Os eosinófilos maduros perdem a habilidade de transcrever o RNA mensageiro (mRNA) e consequentemente de codificar a MBP, o que significa que todas as MBP armazenadas nos grânulos cristalóides são sintetizadas no início do desenvolvimento dos eosinófilos, antes da maturação (Popken-Harris et al., 1998). A MBP2 é expressa exclusivamente por eosinófilos, e pode ser um marcador mais específico para eosinófilos elevados em pacientes com eosinofilia de MBP1 (Plager et al., 2006). A MBP tem se mostrado citotóxica para as vias aéreas e pode ser, pelo menos parcialmente, responsável pelo dano tecidual associado com a infiltração de eosinófilos na mucosa brônquica durante a asma (Frigas et al., 1980; Hisamatsu et al. 1990; Furuta et al. , 2005).

Outra proteína básica encontrada nos grânulos cristalóides é a proteína catiônica eosinofílica (ECP). Ela é um membro da subfamília de ribonuclease (Rnase) e apresenta duas isoformas; ECP-1 e ECP-2 (Gleich et al. 1986). ECP é bactericida e promove a desgranulação dos mastócitos, e é tóxico para parasitas do tipo helmintos (Gleich et al 1986.; Lehrer et al. , 1989).

Um segundo membro da subfamília de ribonuclease e terceira proteína encontrada nos grânulos cristalóides é a neurotoxina derivada dos eosinófilos (EDN). A expressão de EDN não se restringe aos eosinófilos, devido ao fato de ser detectada em células mononucleares e, possivelmente nos neutrófilos. ECP e EDN apresentam 70% de homologia, sugerindo que estas proteínas sejam derivadas do mesmo gene durante o desenvolvimento (Hamann et al. 1990). Esta proteína está relacionada com a atividade antiviral nas infecções respiratórias (Rosenberg & Domachowske 2001).

A quarta proteína encontrada nos grânulos dos eosinófilos é a peroxidase eosinofílica (EPO). A EPO tem 68% de sua sequência idêntica a mieloperoxidase de neutrófilos, sugerindo que uma família multigênica pode ter desenvolvido através de duplicação de genes (Ten et al 1989; Hamann et al., 1991). O papel funcional da EPO está associado com a morte bacteriana. A EPO catalisa a peroxidação lipídica e a oxidação de haletos (tais como o cloreto, brometo e iodeto) e pseudohalides (tiocianato) presentes no plasma, juntamente com peróxido de hidrogênio gerado pela dismutação do superóxido produzido durante a respiração (Weiss et al, 1986; Mayeno et al 1989; Thomas et al., 1995).

Os eosinófilos são capazes de produzir ânion de superóxido, devido à presença do

complexo enzimático se localiza na superfície da célula e essa proteína é responsável pela geração de estresse oxidativo (Someya et al. 1997).

Em resposta a diversos estímulos, os eosinófilos são recrutados da circulação para o local de inflamação, onde modulam a resposta imune por uma série de mecanismos. A migração de eosinófilos para o tecido inflamado é um processo complexo, regulado por numerosos fatores, incluindo citocinas (em particular, aquelas provenientes das células Th2 e células endoteliais, tais como: IL-4, IL-5 e IL-13), quimiocinas (RANTES/CCL5 e eotaxinas/CCL11), óxido nítrico (NO) e interações de moléculas de adesão. As interações ocorrem não só entre células, mas também entre células e elementos da matriz extracelular que podem levar à ativação de receptores, por citocinas, imunoglobulinas e complemento, acarretando a secreção de citocinas pró-inflamatórias, como a interleucina (IL) IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-12, IL-13, IL-16, IL-18, e fator transformador de crescimento (TGF)- α/β , quimiocinas como RANTES e eotaxina-1, e mediadores lipídicos, como o fator de ativação plaquetária (PAF) e leucotrienos (LT) C4 (Kita, 1996; Conran et al, 2001; Gonlugur & Efeoglu, 2004).

Essas moléculas têm efeitos pró-inflamatórios que incluem a alta regulação de mecanismo de adesão, a modulação do tráfico de células, ativação e regulação da permeabilidade vascular, secreção de muco e constrição do músculo liso. Além disso, os eosinófilos podem desencadear o antígeno específico nas respostas imunes, agindo como células apresentadoras de antígenos, e servir como células efetoras importantes, induzindo lesão e disfunção tecidual causadas pela liberação de proteínas tóxicas dos grânulos e mediadores lipídicos (Gleich & Adolphson 1986).

A transmigração dos eosinófilos através do endotélio vascular envolve várias etapas: rolamento, adesão reversível, adesão firme e migração transendotelial (Wardlaw et al. 1994; Wardlaw 2000). A etapa inicial do rolamento é regulada pelas selectinas e seus coligantes expressos no endotélio (Ebnet et al. 1996; Wardlaw 1999). Os eosinófilos expressam constitutivamente a L-selectina, molécula de adesão responsável pelo rolamento das células no endotélio *in vivo* (Georas et al. 1992; Sriramaraio et al. 1994). Os ligantes para a L-selectina incluem CD34 e MadCAM-1 expressos no endotélio (Berg et al. 1993). Os eosinófilos também expressam CD-162 (*P-selectin glycoprotein ligand-1* ou PSGL-1) e sialyl-Lewis (CD15s) que interagem com E-selectina e P-selectina e regulam a adesão dos

eosinófilos ao endotélio (Symon et al. 1996).

Quando as células endoteliais são expostas as citocinas inflamatórias como IL-1, TNF- α e IL-4, a expressão de ICAM-1 e VCAM-1 são aumentadas. A adesão firme dos eosinófilos e a transmigração através do epitélio vascular nos tecidos é regulada pela interação de quimiocinas, citocinas, moléculas de adesão (selectinas e integrinas) e receptores de integrinas (VCAM-1; MAdCAM-1 e ICAM-1) expressas nas células endoteliais (Kunkel & Butcher 2002; Hogan et al. 2004).

As integrinas são proteínas de superfície celular heterodímeras, constituídas por 2 cadeias polipeptídicas α e β e os eosinófilos expressam membros das famílias $\beta 1$ ($\alpha 4 \beta 1$ e $\alpha 6 \beta 1$), $\beta 2$ ($\alpha L \beta 2$, $\alpha M \beta 2$, e $\alpha D \beta 2$) e $\alpha 7$ ($\alpha 4 \beta 7$) (Georas et al. 1993; Grayson et al. 1998; Tachimoto & Bochner 2000; Bochner & Schleimer 2001; Tachimoto et al. 2002). A interação específica das integrinas com os receptores da adesão (VCAM-1, MAdCAM-1, ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3 e fibrinogênio) facilita a migração dos eosinófilos para os tecidos durante a inflamação, por exemplo, no recrutamento dos eosinófilos ao sítio de inflamação alérgica na pele e no pulmão é regulado pela VLA-4 ($\alpha 4 \beta 1$)/VCAM-1 (Weg et al. 1993; Abraham et al. 1994; Nakajima et al. 1994; Pretolani et al. 1994; Gonzalo et al. 1996).

O processo de migração dos eosinófilos para o local da injúria tecidual envolve a liberação de citocinas (IL-4, IL-5 e IL-13), moléculas de adesão (integrinas $\beta 1$, $\beta 2$ e $\beta 7$) e quimiocinas (RANTES e as eotaxinas). Desde a última década as substâncias quimiotáticas para os eosinófilos eram o PAF e C5a, que também ativam neutrófilos. Em 1992, foi identificada a RANTES (CCL5), membro da família de peptídeos quimiotáticos denominados quimiocinas, sendo um efetivo quimioatraente para os eosinófilos e não para os neutrófilos. Após a descoberta da RANTES outras substâncias quimiotáticas seletivas para os eosinófilos foram identificadas e incluem a eotaxina 1 (CCL11), 2 (CCL24) e 3 (CCL26) e as proteínas quimioatraentes 2, 3 e 4 (Teran, 2000; Wardlam, 2000).

Essas quimiocinas também promovem a ativação e designam a função dos eosinófilos, por exemplo RANTES e eotaxina-1 promovem a ativação celular e modulam *burst* respiratório (Elsner et al. 1997, 1999). Essas quimiocinas interagem com os receptores CCR3 presentes nos eosinófilos, e em menor grau, com os receptores CCR5 (Elsner et al. 1997, 1999).

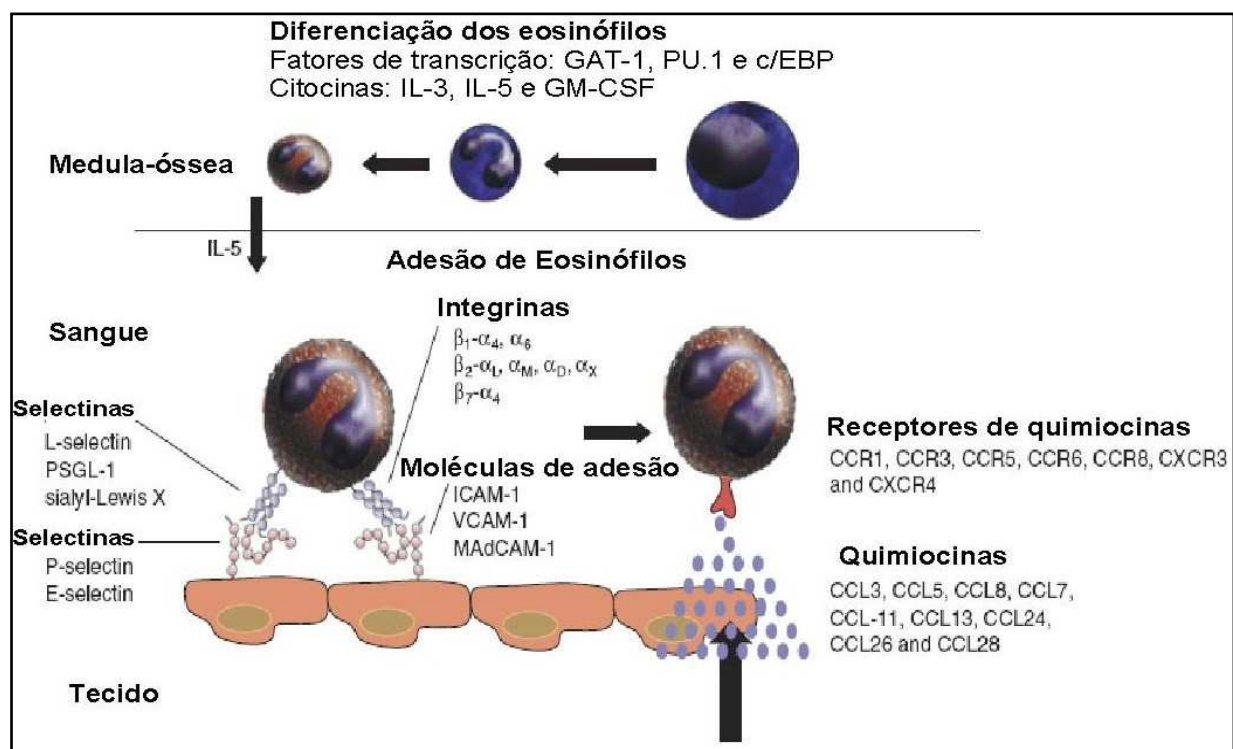


Figura 2: Representação esquemática do tráfego dos eosinófilos. Os eosinófilos são células originadas na medula óssea, a partir de uma célula pluripotente que sofre diferenciação sob controle de fatores de transcrição, tais como: GATA-1, PU.1 e c/EBP. Além dos fatores de transcrição, a diferenciação dos eosinófilos sofre influências de citocinas como: IL-3, IL-5 e GM-CSF. A migração dos eosinófilos é regulada principalmente pela IL-5. Posteriormente, os eosinófilos interagem com o endotélio, um processo que ocorre em várias etapas; adesão, rolamento e diapedese. O extravasamento dos eosinófilos do endotélio para os órgãos alvos é coordenado pelas quimiocinas, moléculas de adesão dos eosinófilos e receptores de moléculas de adesão presente no endotélio. (Adaptado de Rothenberg & Hogan, 2006)

1.3. Hidroxiureia e óxido nítrico

O uso da hidroxiureia foi aprovado pela U.S. Food and Drug Administration para utilização em adultos com anemia falciforme e é atualmente o único medicamento utilizado para tratamento das manifestações clínicas da doença, melhorando as variáveis hematológicas e diminuindo as internações (Brawley et al., 2007; Conran & Costa, 2009). Esse agente quimioterápico é capaz de diminuir a frequência de crises vaso-oclusivas, síndrome torácica aguda, necessidade de transfusões e a mortalidade (Charache et al., 1995; Nahavandi et al., 2002).

A hidroxiureia tem despertando interesses científicos e clínicos há mais de 100 anos. Este fármaco é usado no tratamento de inúmeras doenças como doenças reumáticas, neoplásicas, HIV e hematológicas. É um medicamento de fácil administração, baixa toxicidade, baixo custo, tendo sua multiplicidade de efeitos que asseguram um lugar para a terapia com hidroxiureia por muitos anos. Somente nos últimos 25 anos a hidroxiureia tem sido utilizada no tratamento de pacientes com anemia falciforme (Navarra & Preziosi, 1999; Stevens, 1999; Ware & Aygun, 2009).

Há evidências de que o mecanismo pelo qual a hidroxiureia induz o aumento de HbF e reduz a contagem de células brancas, é mediado pela inativação de um radical tirosil em ribonuclease reductase (Lassmann et al., 1992; Yarbrow et al., 1992), um efeito que poderia ser mediado pelo óxido nítrico (NO) (Kwon et al., 1991; Lepoivre et al., 1994) e nitrovasodilatadores (Bundy et al., 1999). O aumento da concentração de HbF diminui a polimerização da HbS que consequentemente diminui a falcização e a hemólise intravascular, que por sua vez, diminui a ativação endotelial e o consumo de NO nos vasos sanguíneos. O tratamento crônico com hidroxiureia leva a uma diminuição global da expressão de proteínas de superfície dos neutrófilos, monócitos e linfócitos (Okpala, 2006), reduzindo também a contagem de neutrófilos, uma vez que altos níveis de células brancas são um indicativo dos eventos adversos em pacientes com anemia falciforme (Castro et al., 1994).

A farmacodinâmica da hidroxiureia possibilita que ela seja uma doadora de NO e também uma estimuladora da produção de NO devido ao tempo de meia vida de 6 horas (Rodriguez et al., 1998).

Gladwin et al. (2002) relataram que a terapia com hidroxiureia promove a formação

intravascular e intraeritrocitária de NO e esse aumento é responsável por aumentar os níveis de HbF. Em estudo recente foi demonstrado que a adesão de neutrófilos a fibronectina e ao ICAM-1 é significativamente diminuída apresentando níveis de adesão semelhantes à adesão de neutrófilos de indivíduos saudáveis (Canalli et al., 2008). Além disso, os níveis plasmáticos e a expressão gênica de citocinas e mediadores inflamatórios é menor nos leucócitos de pacientes tratados com hidroxiureia quando comparados com os indivíduos sem tratamentos (Lanaro et al., 2009). No entanto, pouco se sabe sobre as possíveis alterações na função dos eosinófilos e produção de mediadores derivados dessas células na anemia falciforme. Desse modo, é de fundamental importância avaliar as alterações envolvidas na ativação dos eosinófilos em pacientes com anemia falciforme, uma vez que esta célula participa da maioria dos processos inflamatórios, principalmente associados a doenças pulmonares, sendo as complicações pulmonares que consistem em uma importante causa de morbidade e mortalidade nesta doença.

2. Objetivos

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Este trabalho teve por objetivo comparar as propriedades adesivas, a capacidade quimiotática e a desgranulação dos eosinófilos de pacientes com anemia falciforme tratados com hidroxiureia e não tratados com hidroxiureia e em indivíduos controle.

2.2 Objetivos específicos

- I. Comparar o número absoluto de eosinófilos no sangue periférico em amostras de indivíduos controle, pacientes tratados ou não com hidroxiureia;
- II. Comparar a adesão *in vitro* basal e estimulada com RANTES, Eotaxina e IL-5 de eosinófilos à fibronectina utilizando a técnica de adesão estática;
- III. Determinar a expressão das moléculas de adesão Mac-1 e VLA-4 na superfície dos eosinófilos;
- IV. Avaliar a capacidade quimiotática basal e estimulada com RANTES, Eotaxina e IL-5 dos eosinófilos;
- V. Determinar a concentração plasmática de IL-5, eotaxina-1, eotaxina-2, eotaxina-3 e sérica de RANTES.
- VI. Avaliar o processo de desgranulação dos eosinófilos;
- VII. Determinar a produção de espécie reativa de oxigênio pelos eosinófilos.

3. Casuística e Métodos

3. CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1. Pacientes e controles

Este trabalho de pesquisa foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Ciências Médicas (FCM) da UNICAMP e aprovado sob o nº 907/2008. Todos os participantes desse estudo assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), desse estudo, que também foi aprovado pelo conselho citado.

Para o estudo foram selecionados pacientes homozigotos para HbS atendidos no Hemocentro da UNICAMP. O diagnóstico foi comprovado através de eletroforese de hemoglobina e cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Estes pacientes, com anemia falciforme de ambos os sexos, apresentaram idade entre 18-50 anos, em fase estável, na ausência de infecção ou processos inflamatórios, sem transfusão sanguínea por pelo menos três meses e sem crises de dor por este mesmo período e sem ou com terapia com hidroxiureia. O tratamento com hidroxiureia consistiu a administração de uma dosagem de 20-30 mg/kg/dia por pelo menos 3 meses.

As amostras de sangue de indivíduos controles consistiram de voluntários sadios, composto por alunos/funcionários da UNICAMP, com idade de 18-50 anos que tiveram a amostra submetida a HPLC para confirmação da normalidade do padrão eletroforético.

As amostras de sangue de pacientes com anemia falciforme (40ml) e indivíduos controles (40ml) foram coletadas em tubo de heparina lítica e processadas imediatamente após a coleta.

Para cada ensaio foi utilizada número diferente de amostras de indivíduos controle (AA), pacientes com anemia falciforme (SS) e pacientes com anemia falciforme em terapia com hidrxureia (SS+HU).

3.2. Isolamento de eosinófilos

O sangue (40 ml) foi diluído (1:2; v/v) com PBS/BSA/ACD (pH 7,2-7,4). Aliquotas de 35 ml de sangue diluído foram colocadas sobre 15 ml de solução isotônica de Percoll (9,5 ml de Percoll, 4,0 ml de água e 1,5 ml de solução salina de HANKS concentrado 10x; densidade 1,082 — 0,005 g/ml; pH 7,4; 340 mOs/kg H g; 4°C), a camada de células

mononucleares foi descartada, e o *pellet* contendo eritrócitos, neutrófilos e eosinófilos foi aspirado e transferido para um tubo limpo. Os eritrócitos foram lisados (15 minutos; 0°C) por adição de 5 volumes de solução isotônica gelada de cloridrato de amônia (NH₄Cl 155 mM, KHCO₃ 10 mM e EDTA 0,1 mM) para 1 volume do *pellet*.

Após a lise, a suspensão celular foi centrifugada (10 minutos; 500 x g; 4°C) e o *pellet* resultante foi lavado 1x (10 minutos; 500 x g; 4°C) em PBS. Em seguida, foi feita a contagem de células (corante Turk) em câmara de Neubauer.

3.2.1. Separação imunomagnética de eosinófilos

Para a separação dos eosinófilos foi utilizado o sistema magnético de separação celular (MACS; Miltenyi Biotec, Alemanha; e Becton-Dickinson, Reino Unido) para separar eosinófilos, conforme descrito por Hansel e colaboradores (1991). A coluna magnética presa ao ímã foi lavada 4x com PBS/BSA/ACD em seguida, a mistura de neutrófilos/eosinófilos foi incubada com *microbeads* revestidos com anticorpo anti-CD16, por 30 minutos (6- 12°C; 32 µl *microbeads* / 5x10⁷ células). PBS/BSA/ACD (q.s.p. 1ml) foi adicionado a suspensão de células, a qual foi transferida para o alto da coluna, sob campo magnético. Após a passagem da suspensão celular na coluna, mais 3 volumes (1ml) de tampão PBS/BSA/ACD foram adicionados. As células CD16⁺ (neutrófilos) permaneceram presas a coluna, ao passo que as células CD16⁻ (eosinófilos) foram coletadas (volume de eluição de 8ml). As células CD16⁻ foram centrifugadas (10 minutos; 500 x g; 4°C) e ressuspendidas para contagem.

A determinação total de células foi realizada usando-se a câmara de Neubauer, obtendo o número de células x 10⁶/ml. A confirmação da separação dos eosinófilos foi feita através de lâminas preparadas em citocentrífuga (10 minutos; 2x10⁶ cels/ml; 100 µl; 1800 x g), e coradas com Panótipo para determinação do diferencial das células em microscópio óptico comum. As células foram ajustadas na concentração desejada para cada ensaio.

3.3. Adesão de eosinófilos à fibronectina

Placas de 96 poços foram revestidas com 60 µl de uma solução de fibronectina (20 µg/ml em PBS) e incubadas *overnight* a 4°C. Em seguida, as placas foram lavadas 2 vezes com 200 µl de PBS e foram tratadas por 1 hora (37°C) com uma solução de BSA 0.5% em

PBS (100 µl/poço) para bloqueio das ligações inespecíficas. Após a incubação, as placas foram novamente lavadas com PBS e deixadas em estufa (37°C) para secagem dos poços. A cada poço foi adicionado 50 µl da suspensão de eosinófilos (7×10^4 células/ml), e a placa foi incubada por 60 minutos em estufa (37°C, 5% CO₂) para permitir a adesão das células. As células não aderidas foram removidas e a placa foi lavada delicadamente 2 vezes com PBS. A cada poço previamente recoberto com fibronectina foi adicionado 50 µl de RPMI e, aos poços não recobertos, foram adicionadas concentrações variadas da suspensão celular original (em RPMI) para a formação de uma curva padrão de células. A adesão dos eosinófilos foi calculada através da medida da atividade da peroxidase eosinofílica (EPO) das células aderidas (Nagata *et al.*, 1995). Para isso, 50 µl do substrato da EPO (1mM H₂O₂, 1mM OPD e 0.1% Triton X-100 em tampão Tris, pH 8) foi adicionado a cada poço. Após 30 minutos de incubação a reação foi interrompida com a adição de 25 µl de H₂SO₄ 4M. A absorbância foi medida a 490 nm no leitor de microplaca (Multiscan MS, Labsystems, USA). A adesão foi calculada através da comparação das absorbâncias das amostras (desconhecidas), com a da curva padrão das células.

3.4. Citometria de Fluxo

A expressão das moléculas de adesão (Mac-1 e VLA-4) na superfície dos eosinófilos foi detectada através da citometria de fluxo. Os experimentos de citometria de fluxo foram efetuados com eosinófilos isolados de pacientes com anemia falciforme que estavam ou não em uso de hidroxiureia e em indivíduos controle. A técnica de citometria de fluxo consiste no reconhecimento de proteínas *in situ*, utilizando um anticorpo marcado com um fluorocromo (molécula que emite fluorescência quando excitada com o comprimento de onda apropriado), comumente ficoeritrina (PE) ou Isotiocianato de fluoresceína (FITC). Este fluorocromo ao ser estimulado por um feixe de laser emite um fóton que é captado por sensores no aparelho (Owens et al., 1995).

Foram utilizados os seguintes anticorpos anti-humanos:

- ➔ anti-CD11b conjugado ao fluorocromo (Alexa Fluor 488);
- ➔ anti-CD18 conjugado ao fluorocromo (PE);
- ➔ anti-CD49d conjugado ao fluorocromo (PE);

→ anti-CD66b conjugado ao fluorocromo (FITC).

A concentração de células utilizada foi de 2×10^6 células por tubo num volume final de 100 μ L de PBS, para todos os anticorpos de superfície celular citados acima. Os eosinófilos foram incubados com 3-5 μ L dos anticorpos por 30 minutos a 4°C, na ausência de luz. Em seguida, estas células foram lavadas com 500 μ L de PBS, fixadas em 500 μ L de paraformaldeído 1% e conservadas a 4°C, ao abrigo de luz, até a aquisição pelo citômetro no dia seguinte.

As células foram adquiridas e analisadas no aparelho FACScalibur Becton-Dickinson SSC/FSC (*side scatter/forward scatter*) em comprimento de onda igual a 488nm. Para identificar a população de eosinófilos foram utilizados “*Dot plots*”. Os resultados foram expressos como média de intensidade de fluorescência (MIF) que demonstra a média da quantidade, em unidades de fluorescência, da subunidade de integrina e da selectina expressa na superfície de cada célula.

3.5. Quimiotaxia de eosinófilos

Os ensaios de quimiotaxia *in vitro* foram realizados usando-se câmaras de quimiotaxia de 96 poços (ChemoTx 101-5). Na parte inferior da placa foram adicionados 29 μ L do agente quimiotático (eotaxina 100 ng/ml e/ou RANTES 100 ng/ml e/ou IL-5 100 ng/ml) e, em seguida, o filtro de polycarbonato (poro 5 μ m) foi posicionado na placa sobre os poços.

Foi adicionado 25 μ L da suspensão de eosinófilos (3×10^6 células/ml) sobre o filtro. A quimiotaxia espontânea foi verificada substituindo-se o agente quimiotático pelo RPMI 1640. A câmara foi incubada por 2 horas em estufa (5% de CO₂, 37°C). Após a incubação, a suspensão celular restante na parte superior do filtro foi removida com o auxílio de uma gaze, e a placa foi centrifugada a 200 x g por 5 minutos a 20 °C. O filtro foi cuidadosamente removido e o volume restante dos poços foi reajustado para 29 μ L. Este volume foi diluído 1:5 e alíquotas de 50 μ L foram transferidas para placas de 96 poços. O número de células que migraram para a parte inferior da placa foi determinado através da medida da EPO residual. Para isto, 50 μ L do substrato da EPO (1mM H₂O₂, 1mM OPD e 0.1% Triton X-100 em tampão Tris, pH 8) foi adicionado a cada poço. Após 30 minutos de incubação, a temperatura ambiente, adicionamos a cada poço 25 μ L de H₂SO₄ 4M para

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

3.6. Quantificação de citocinas e quimiocinas

Sangue de indivíduos controle e de pacientes com anemia falciforme foram coletados em tubos com EDTA, para obtenção de plasma, e tubos secos, para obtenção de soro. As amostras de plasma e de soro foram centrifugadas à 1000g por 15 minutos. Essas amostras permaneceram congeladas à -20°C até o momento de uso. A concentração plasmática de citocinas e quimiocinas (IL-5, eotaxina-1, eotaxina-2, eotaxina-3 e EDN) e séricas de quimiocina (RANTES) foi determinada por meio da técnica de ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) de acordo com as instruções do fabricante.

3.7. Desgranulação de eosinófilos

Os tubos foram tratados com 1 ml de albumina sérica bovina (BSA) 2.5% por 2 horas a 37°C para bloquear a ativação não-específica. Em seguida, os tubos foram lavados com 1 ml de PBS antes de receberem as alíquotas de eosinófilos. A suspensão de eosinófilos (em meio de cultura RPMI) foi ajustada para 5×10^5 células/ml (100µl/tubo) da suspensão (cada ponto experimental foi feito em triplicata). Posteriormente, os tubos com eosinófilos, na presença ou ausência das quimiocinas eotaxina (100 ng/ml) ou RANTES (100 ng/ml) ou IL-5 (100 ng/ml) foram incubados em estufa (37°C, 5% CO₂) por 4 horas. O ionóforo de cálcio (A23187) e H₂O foram usados como controles positivo (5 µM, 30 minutos). Após a incubação, os tubos foram centrifugados por 15 minutos (250 x g) e alíquotas de 50 µl do sobrenadante de cada tubo foram transferidas para poços de placas de 96 poços. Foram adicionados 50 µl do substrato da EPO (1mM H₂O₂, 1mM OPD e 0.1% Triton X-100 em tampão Tris, pH 8) a cada poço. Após 30 minutos de incubação a temperatura ambiente, foi adicionado 25 µl de H₂SO₄ 4M para interromper a reação. A absorbância foi medida a 490 nm no leitor de microplaca (Multiscan MS, Labsystems, USA).

3.8. Espécie reativa de oxigênio (ROS)

A produção de ânion superóxido medida a partir de espécie reativa de oxigênio (ROS) intracelular, foi determinada por citometria de fluxo. Os eosinófilos (1×10^6 célula/ml) foram incubadas por 15 minutos à 37° C com 0,5µL de 2,7-Diclorodihidrofluoresceína-diacetato (DCFH-DA) (Invitrogen, Life Technologies). O DCFH-DA difunde-se para dentro das células, e no citosol é deacetilado por estresse intracelulares, produzindo um composto não fluorescente DCFH. A oxidação do DCFH pelas ROS produz um composto altamente fluorescente, 2,7 diclorofluoresceína (DCF). Por quantificação da fluorescência, a produção de ROS pode ser determinada (Amer et al., 2003; Amer et al., 2004).

Posteriormente, as células foram centrifugadas a 400g por 5 minutos, o sobrenadante foi descartado e as células ressuspendidas em 500µL de PBS, em seguida analisadas por citometria de fluxo e a intensidade de fluorescência foi avaliada (excitação comprimentos de onda, 488 nm, comprimento de onda de emissão, 520 nm).

3.9. Análise Estatística

Os resultados foram representados pelas médias $\pm$ erro da média (EPM) para cada grupo. Os dados obtidos foram comparados utilizando-se o teste não-paramétrico de *Mann-Whitney*, comparação entre 2 grupos, ou pelo teste não-paramétrico *ANOVA* (pareado e não-pareado), comparação entre mais de 2 grupos, seguido pelo teste de *Dunn's Multiple Comparisons*. Os cálculos foram efetuados no programa *GRAPHPAD PRISM*, e valor de p menor ou igual a 0,05 foi considerado estatisticamente significativo.

4. Resultados

4. RESULTADOS

4.1 Número absoluto de eosinófilos no sangue periférico

O número absoluto de eosinófilos presentes no sangue periférico de indivíduos controles e pacientes com anemia falciforme está representado na figura 3. O número de eosinófilos de pacientes com anemia falciforme foi significativamente maior quando comparado com indivíduos controles. Pacientes em terapia com hidroxiureia apresentaram menor número de eosinófilos em relação aos pacientes sem terapia de hidroxiureia, este número foi semelhante ao encontrado nos indivíduos controles. (Figura 3)

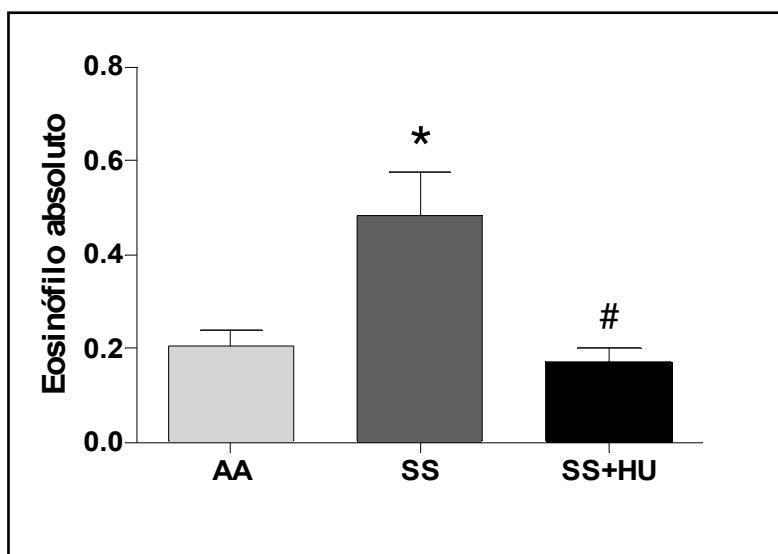


Figura 3: Número absoluto de eosinófilos no sangue periférico. Indivíduos controles (AA) (n=21), pacientes com anemia falciforme (SS) (n=28) e pacientes com anemia falciforme em terapia com hidroxiureia (SS+HU) (n=24). Os dados estão expressos como média ± EPM. *p<0,05 comparado com o controle; #p<0,05 comparado com SS.

4.2. Adesão de eosinófilos à fibronectina

A adesão de eosinófilos à fibronectina foi determinada em indivíduos controle, pacientes com anemia falciforme e pacientes com anemia falciforme tratados com hidroxiureia.

Os resultados mostraram que a adesão basal de eosinófilos de pacientes com anemia falciforme à fibronectina estava aumentada estatisticamente quando comparado à adesão de eosinófilos de indivíduos controles. Por outro lado, eosinófilos de pacientes em terapia com hidroxiureia apresentaram adesão significativamente reduzida quando comparado aos eosinófilos de pacientes sem terapia. (Figura 4)

No mesmo ensaio, foi avaliada a adesão de eosinófilos estimulados com IL-5 e quimiocinas (RANTES e Eotaxina). Na figura 5, mostramos que a adesão de eosinófilos à fibronectina após incubação com IL-5, RANTES e Eotaxina não foi significativamente diferente da adesão basal em todos os grupos avaliados.

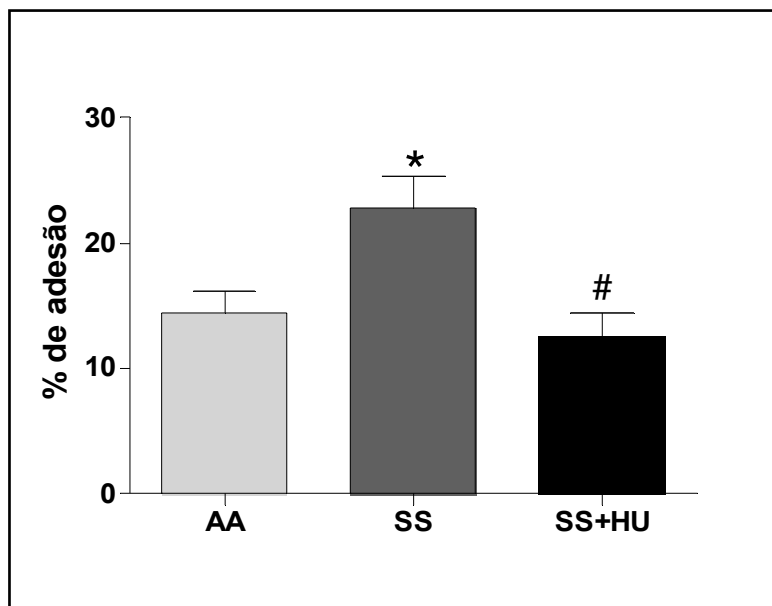


Figura 4: Adesão basal de eosinófilos à fibronectina em indivíduos controles e de pacientes com anemia falciforme. Eosinófilos (7×10^4 células/ml – 50 µl/poço) de indivíduos controles (AA) (n=22), pacientes com anemia falciforme (SS) (n=12) e pacientes com anemia falciforme em terapia com hidroxureia (SS+HU) (n=18). Os resultados são expressos como média das porcentagens de células aderidas $\pm$ EPM. * $p < 0,05$ quando comparado com o controle; # $p < 0,05$ quando comparado com SS.

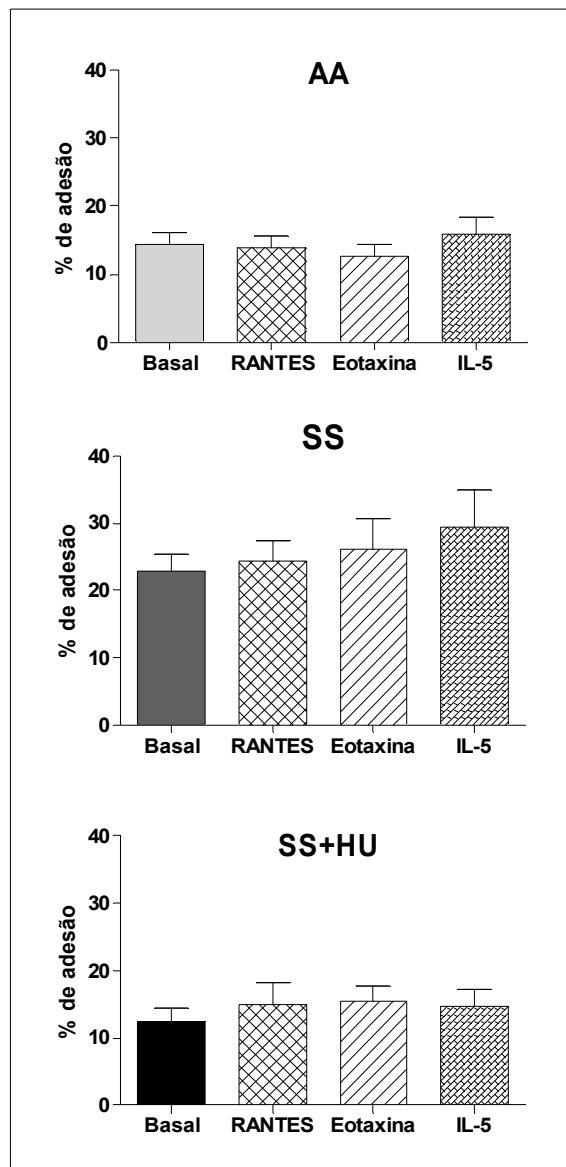


Figura 5: Adesão estimulada de eosinófilos à fibronectina. Eosinófilos (7×10^4 células/ml - 50 μ l/poço) de indivíduos controles (AA), pacientes com anemia falciforme (SS) e pacientes com anemia falciforme em terapia com hidroxiureia (SS+HU). Os resultados são expressos como média das porcentagens de células aderidas $\pm$ EPM.

4.3. Expressão protéica das moléculas de adesão nos eosinófilos de pacientes com anemia falciforme e indivíduos controle

A expressão das integrinas MAC-1 (CD11b:CD18) e VLA-4 (CD49d) e CD66b na superfície dos eosinófilos foi avaliada por citometria de fluxo.

Os eosinófilos de pacientes com anemia falciforme em terapia ou não com hidroxiureia não apresentaram diferença significativa quanto à expressão da subunidade CD49d da integrina VLA-4 e de CD66b quando comparados aos eosinófilos de indivíduos controle. Entretanto, os eosinófilos de pacientes com anemia falciforme expressaram maior quantidade da subunidade α (CD11b) comparados aos eosinófilos de pacientes com anemia falciforme em terapia com hidroxiureia e aos indivíduos controle. Não houve diferença significativa quanto a expressão da subunidade β (CD18) de MAC-1 na superfície dos eosinófilos de pacientes com anemia falciforme em terapia ou não com hidroxiureia comparado aos eosinófilos de indivíduos controle.(Figura 6)

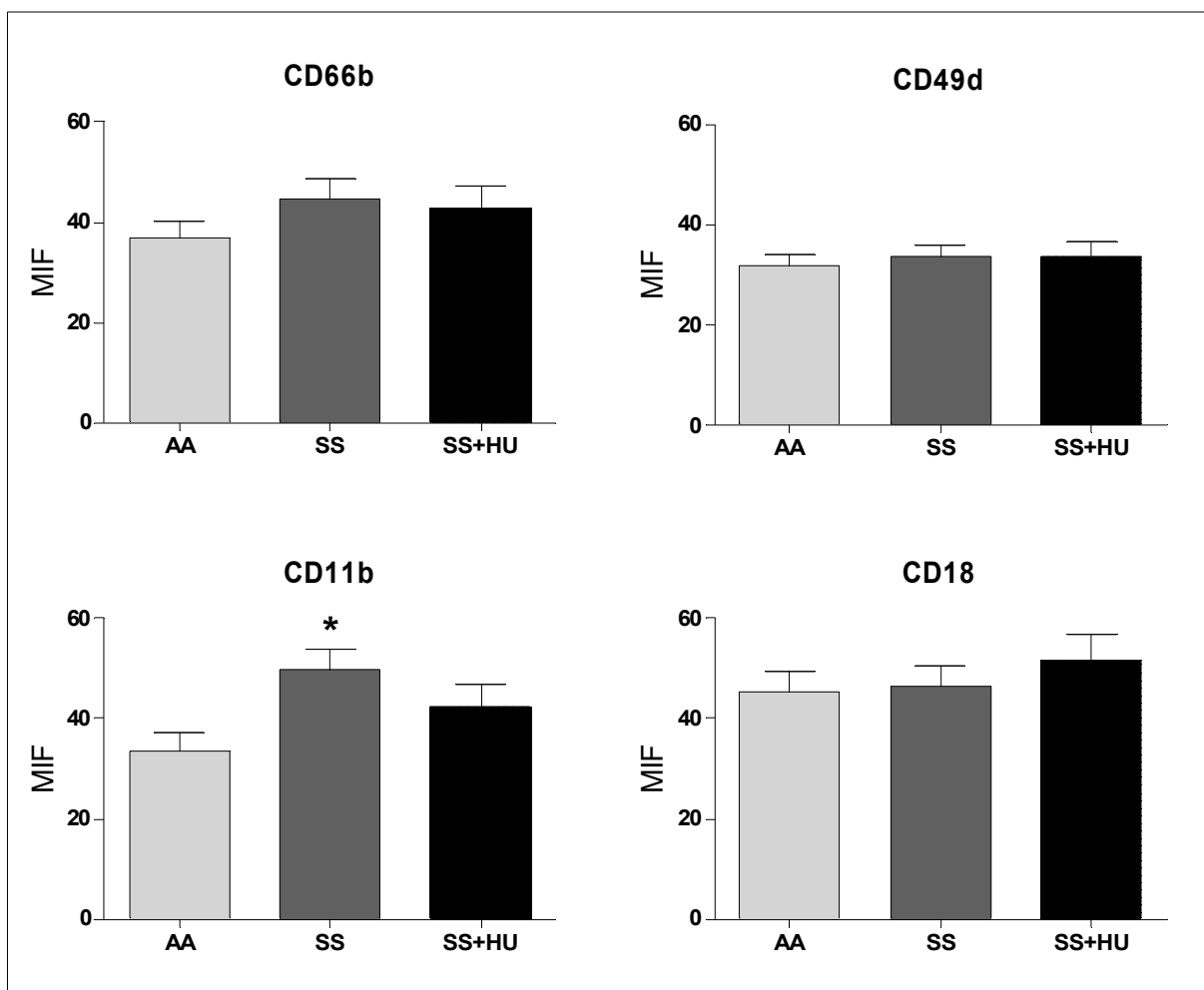


Figura 6: Expressão das moléculas de adesão (Mac-1 e VLA-4). Expressão das proteínas de superfície CD66b (AA=11; SS=12; SS+HU=15), CD49d (AA=12; SS=13; SS+HU=16), CD11b (AA=10; SS=13; SS+HU=14), CD18 (AA=11; SS=12; SS+HU=14) em eosinófilos de indivíduos controle (AA), pacientes com anemia falciforme (SS) e pacientes com anemia falciforme em terapia com hidroxiureia (SS+HU), determinada por citometria de fluxo. Os resultados são expressos em MIF $\pm$ erro da média. * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle.

4.4. Quimiotaxia dos eosinófilos

Ensaio de quimiotaxia *in vitro* foram realizados para avaliar a capacidade quimiotática dos eosinófilos de pacientes com anemia falciforme.

A quimiotaxia espontânea dos eosinófilos de pacientes com anemia falciforme está significativamente aumentada em relação ao controle. Resultado semelhante foi encontrado nos pacientes com anemia falciforme em terapia com hidroxiureia (Figura 7).

Nos ensaios de quimiotaxia em resposta a citocinas e quimiocinas foi observado um aumento significativo da capacidade de migração dos eosinófilos em resposta aos agentes quimiotáticos em todos os grupos avaliados (AA, SS e SS+HU), em relação a basal. No entanto, a magnitude da migração dos eosinófilos é maior nas células de pacientes com anemia falciforme (Figura 8).

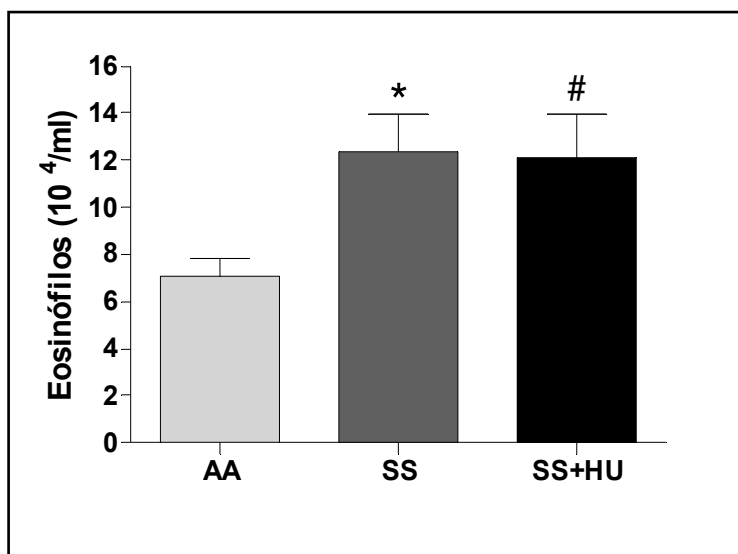


Figura 7: Quimiotaxia espontânea de eosinófilos. Eosinófilos (3×10^6 células/ml - 29 μl /poço) de indivíduos controles (n=19), pacientes com anemia falciforme (SS) (n=14) e pacientes com anemia falciforme em terapia com hidroxiureia (SS+HU) (n=15). Os resultados são expressos como média das porcentagens de células aderidas $\pm$ EPM. * $p < 0,05$ quando comparado com o controle; # $p < 0,05$ quando comparado com SS.

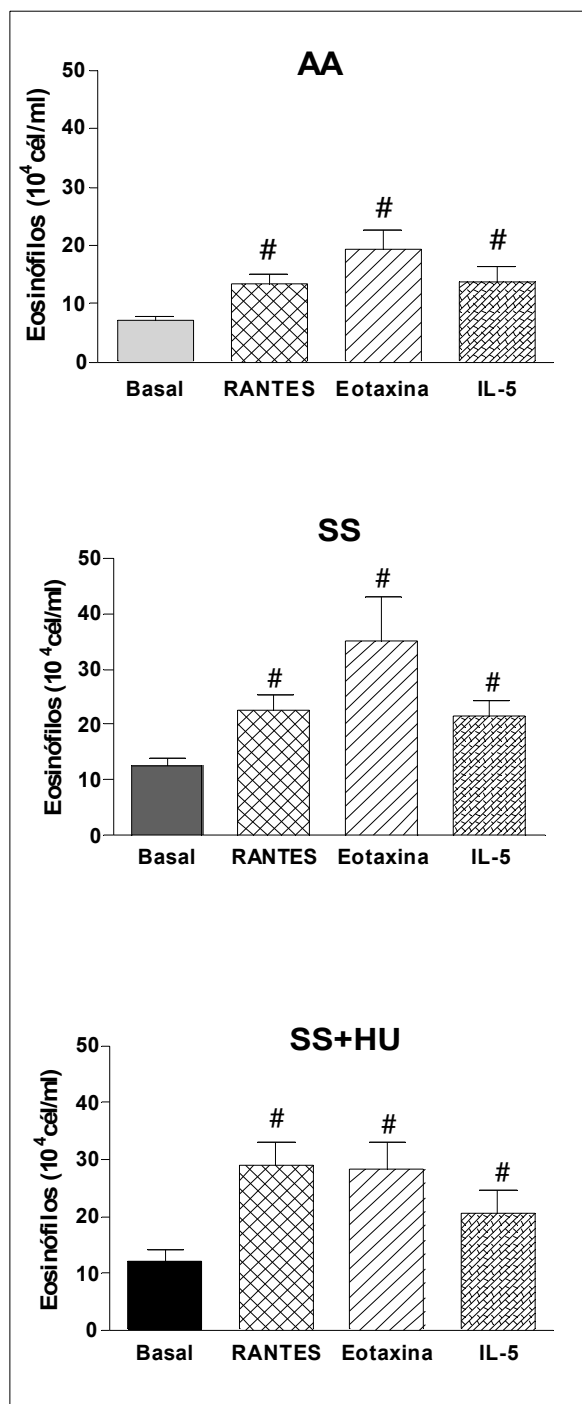


Figura 8: Migração de eosinófilos em resposta a agentes quimiotáticos. Eosinófilos (3×10^6 células/ml - 29 μ l/poço) de indivíduos controles (AA), pacientes com anemia falciforme (SS) e pacientes com anemia falciforme em terapia com hidroxiureia (SS+HU). Os resultados são expressos como média das porcentagens de células aderidas $\pm$ EPM. # $p < 0,05$ quando comparado com o controle.

4.5. Determinação dos níveis de citocinas e quimiocinas plasmáticas e séricas

A concentração plasmática e séricas da citocina (IL-5) e quimiocinas (eotaxina-1, eotaxina-2, eotaxina-3 e RANTES) foi quantificada por ELISA.

Para a quantificação dos níveis plasmáticos de IL-5 foi utilizado kit de ELISA de alta sensibilidade, porém, em 95% das amostras avaliadas não foi possível detectar os níveis desta citocina.

Os níveis plasmáticos de eotaxina-1 encontram-se aumentados significativamente nas amostras de pacientes com anemia falciforme em terapia ou não com hidroxiureia, quando comparado às amostras de indivíduos controle. No entanto, não foi observada nenhuma alteração nos níveis plasmáticos de eotaxina-2 entre os três grupos avaliados. Ao determinar a concentração plasmática de eotaxina-3 não foi encontrada nenhuma diferença significativa entre os níveis desta quimiocina em pacientes com anemia falciforme comparado com os de indivíduos controle. No entanto, os pacientes com anemia falciforme tratados com hidroxiureia apresentaram níveis elevados de eotaxina-3 comparado aos pacientes sem o tratamento com hidroxiureia e com os indivíduos controle. (Figura 9)

A concentração sérica de RANTES foi significativamente é maior nos pacientes com anemia falciforme com e sem tratamento com hidroxiureia. (Figura 10)

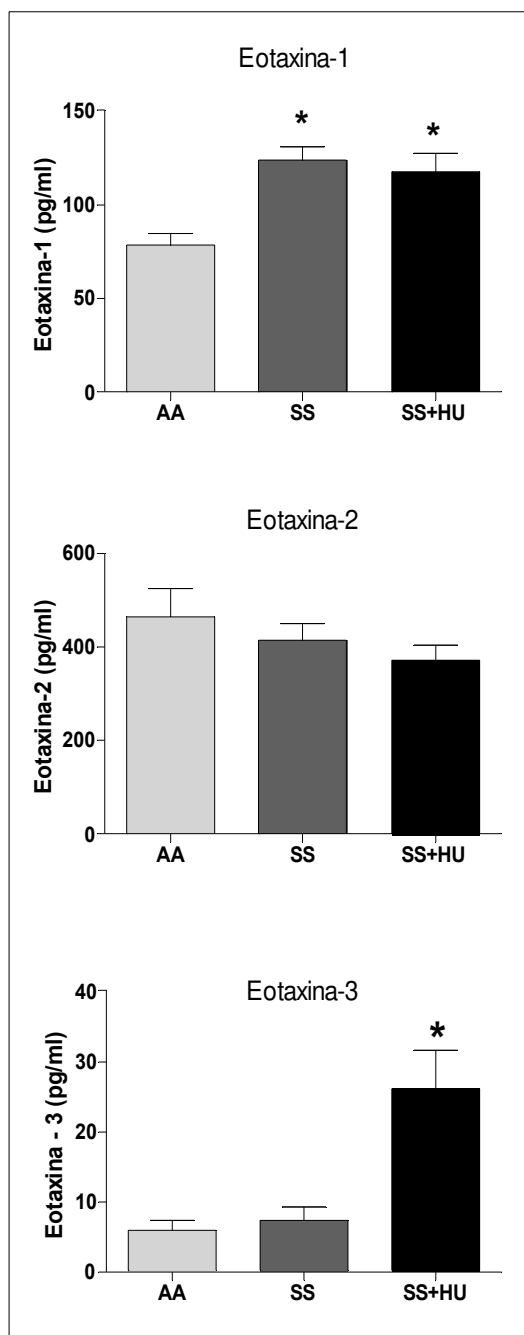


Figura 9: Níveis plasmáticos das Eotaxinas. A concentração de Eotaxina-1, Eotaxina-2 e Eotaxina-3 foi determinada em amostras de plasma de indivíduos controle (AA) (n=20), pacientes com anemia falciforme (SS) (n=30) e pacientes com anemia falciforme em terapia com hidroxiureia (SS+HU) (n=30) segundo a indicação do fabricante. Os resultados estão expressos como média $\pm$ EPM. * $p < 0,05$ quando comparado com o controle.

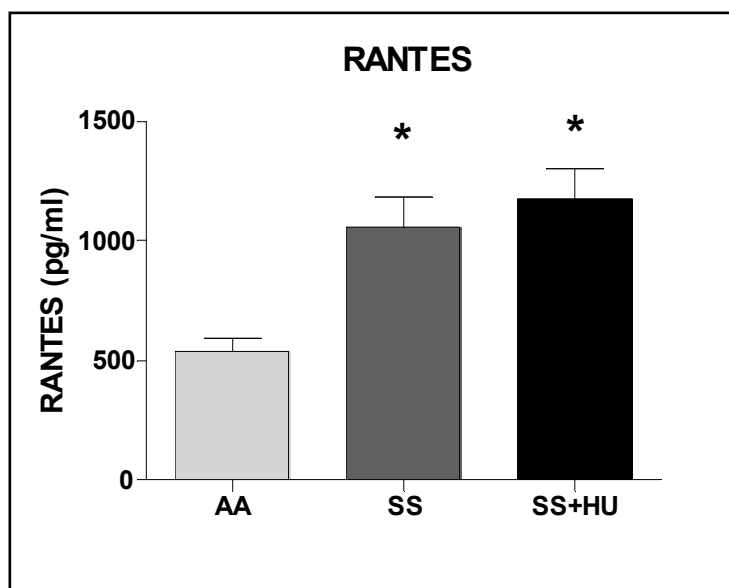


Figura 10: Níveis séricos de RANTES. A concentração de RANTES foi determinada em amostras de soro, de indivíduos controle (n=20), pacientes com anemia falciforme (SS) (n=30) e pacientes com anemia falciforme em terapia com hidroxiureia (SS+HU) (n=30) segundo a indicação do fabricante. Os resultados estão expressos como média $\pm$ EPM. * $p < 0,05$ quando comparado com o controle.

4.6. Desgranulação basal e estimulada de eosinófilos

A desgranulação dos eosinófilos basal e estimulada foi avaliada pela detecção da atividade da Peroxidase Eosinofílica (EPO) nos sobrenadantes coletados após as incubações.

Houve aumento significativo da desgranulação dos eosinófilos de pacientes com anemia falciforme em relação a desgranulação dessas células de indivíduos controle. Além disso, a terapia com hidroxiureia diminuiu de forma significativa a desgranulação dos eosinófilos quando comparado a desgranulação dos eosinófilos de pacientes sem terapia com hidroxiureia. (figura 11)

A co-incubação com IL-5, RANTES e Eotaxina não foi capaz de alterar a liberação de EPO em todos os grupos avaliados (AA, SS e SS+HU). (figura 12)

Para determinar a desgranulação dos eosinófilos determinando os níveis plasmáticos de neurotoxina derivada dos eosinófilos (EDN) foi utilizada a técnica de ELISA, de acordo com as instruções do fabricante.

Nossos dados mostram que houve aumento significativo nos níveis plasmáticos de EDN em pacientes com anemia falciforme quando comparados com indivíduos controle. Além disso, foi possível observar que os níveis de EDN no plasma de pacientes com anemia falciforme em terapia com hidroxureia é menor que os níveis plasmáticos de EDN de pacientes sem o mesmo tratamento, e que esses níveis se assemelham aos níveis de EDN no plasma de indivíduos controles.(figura 13)

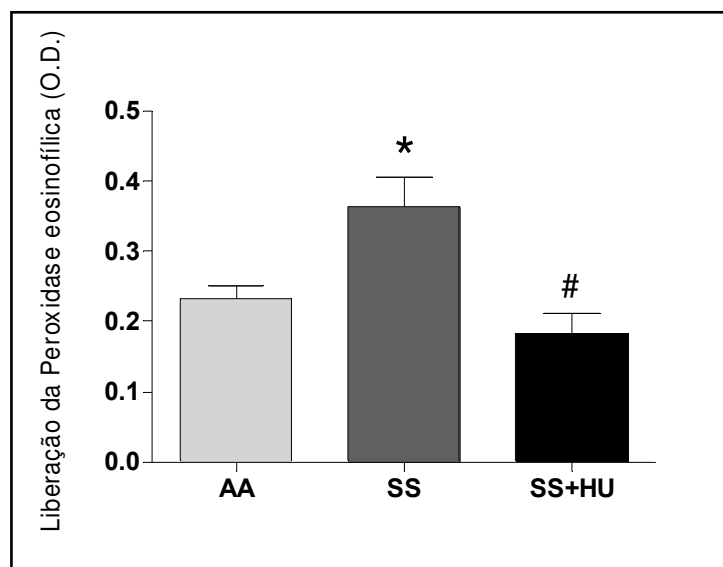


Figura 11: Desgranulação basal de eosinófilos. Eosinófilos (5×10^5 células/ml - 50 μ l/poço) de indivíduos controles (AA) (n=31), pacientes com anemia falciforme (SS) (n=13) e pacientes com anemia falciforme em terapia com hidroxiureia (SS+HU) (n=23). A EPO contida nos sobrenadantes após as incubações foi medida e expressa como média $\pm$ EPM das densidades óticas. * $p < 0,05$ quando comparado com o controle; # $p < 0,05$ quando comparado com SS.

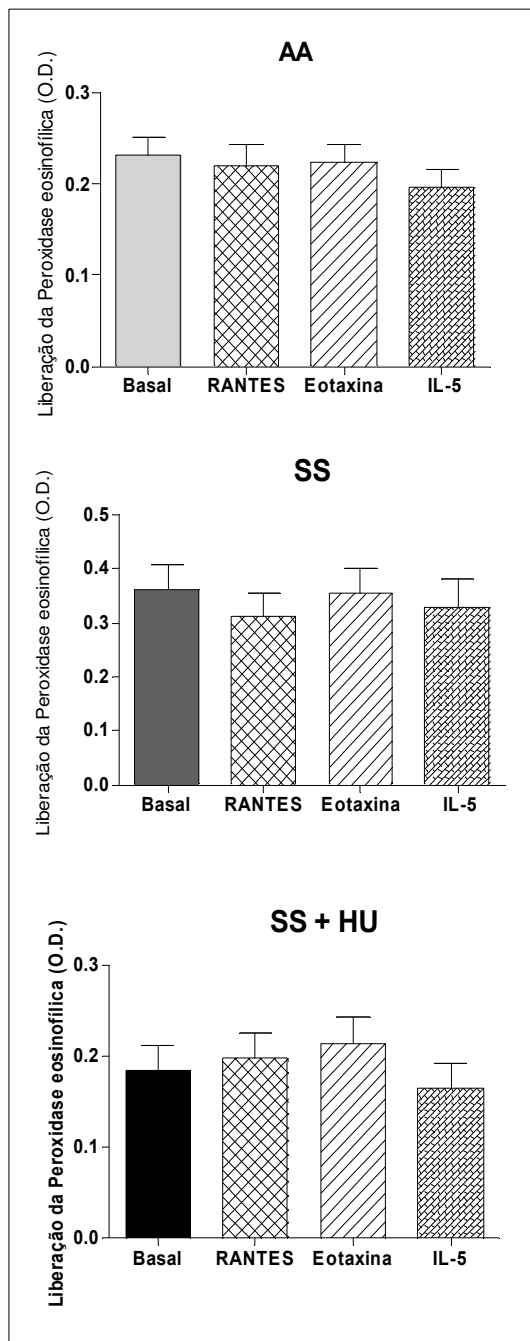


Figura 12: Desgranulação estimulada de eosinófilos. Eosinófilos (5×10^5 células/ml - 50 μ l/poço) de indivíduos controles (AA), pacientes com anemia falciforme (SS) e pacientes com anemia falciforme em terapia com hidroxiureia (SS+HU). A EPO contida nos sobrenadantes após as incubações foi medida e expressa como média $\pm$ EPM das densidades óticas.

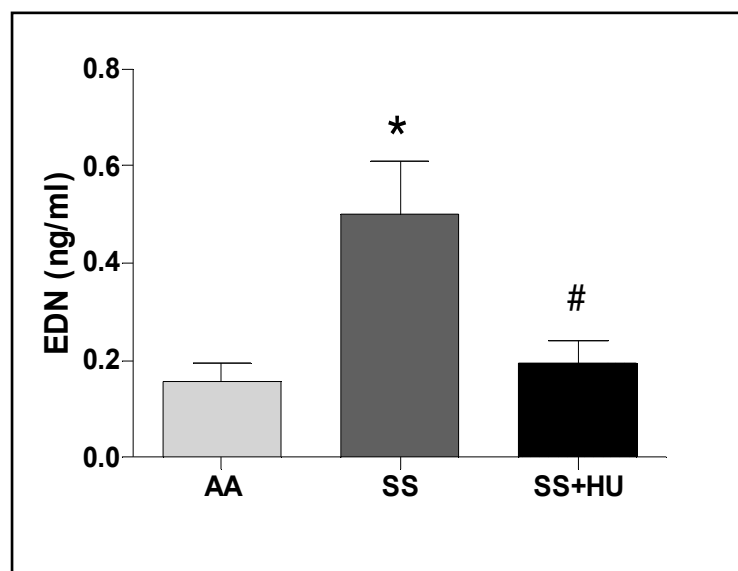


Figura 13: Dosagem de EDN. A concentração de EDN foi determinada em amostras de plasma de indivíduos controles (AA), pacientes com anemia falciforme (SS) e pacientes com anemia falciforme em terapia com hidroxureia (SS+HU). Os resultados estão expressos como média $\pm$ EPM. * $p < 0,05$ quando comparado com o controle; # $p < 0,05$ quando comparado com SS.

4.7. Produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) nos eosinófilos de pacientes com anemia falciforme

Foi avaliado os níveis de ROS nos pacientes com anemia falciforme em terapia ou não com hidroxiureia e em indivíduos controle.

Na figura 14, podemos observar que os eosinófilos de pacientes com anemia falciforme são capazes de produzir maior quantidade de ROS quando comparado aos eosinófilos de indivíduos controle. Entretanto, os eosinófilos de pacientes com anemia falciforme em terapia com hidroxiureia apresentaram menor produção de ROS comparados aos eosinófilos de pacientes com anemia falciforme sem o mesmo tratamento, porém nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada.

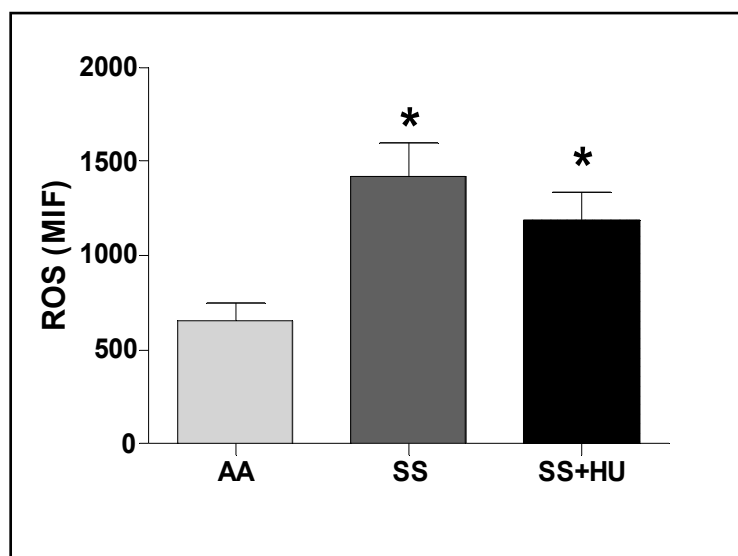


Figura 14: Produção de espécie reativa de oxigênio. Indivíduos controle (AA) (n=7) pacientes com anemia falciforme (SS) (n=9) e pacientes com anemia falciforme em terapia com hidroxiureia (SS+HU) (n=7). Os resultados estão expressos como média $\pm$ EPM. * $p < 0.05$ quando comparado com o controle.

5. Discussão

5. DISCUSSÃO

A anemia falciforme é reconhecida como um estado inflamatório crônico, que é caracterizada pelo elevado número de leucócitos, alterações nos níveis de citocinas inflamatórias, lesões vasculares das células endoteliais e aumento da adesividade de células vermelhas, brancas e plaquetas (Platt, 2000; Chies & Nardi, 2001; Ferreira, 2008). O aumento da contagem de leucócitos está associado ao aumento da mortalidade, incidência de síndrome torácica aguda e infartos cerebrais (Castro et al, 1994; Kinney et al, 1999; Miller et al, 2000; Vichinsky et al, 2000). Além disso, os leucócitos são encontrados no estado ativado na circulação de pacientes com anemia falciforme (Benkerrou et al, 2002; Assis et al, 2005).

Ensaio de adesão *in vitro* de neutrófilos de pacientes com anemia falciforme mostraram que essas células apresentam maior capacidade em aderir aos componentes da matriz extracelular, como a fibronectina (Canalli et al., 2004; 2007). Em 2004, Canalli e colaboradores, evidenciaram que, além dos neutrófilos, os eosinófilos de pacientes com anemia falciforme apresentam maior adesão a fibronectina, em ensaio estático de adesão (Canalli et al., 2004).

Este trabalho buscou uma melhor compreensão sobre o papel dos eosinófilos na fisiopatologia da anemia falciforme, uma vez que os dados da literatura em relação a possíveis alterações nas funções dessas células nesta doença são escassos. Para isso diferenças nas atividades funcionais dos eosinófilos como desgranulação e quimiotaxia foram avaliadas *in vitro*.

Nossos dados mostraram que a migração espontânea dos eosinófilos de pacientes com anemia falciforme está aumentada quando comparada com eosinófilos de indivíduos controle. Esses resultados sugerem que os eosinófilos de pacientes com anemia falciforme encontram-se ativados na circulação. Resultado semelhante foi observado na quimiotaxia espontânea de neutrófilos de pacientes com anemia falciforme demonstrando maior migração comparada ao controle (Canalli et al., 2007). Sabe-se que em doenças alérgicas os eosinófilos apresentam maior atividade quimiotática quando comparado com indivíduos sadios, sugerindo que essas células estejam ativadas na circulação desses pacientes (Warringa et al., 1992; Sehmi et al., 1992; Bruijnzeel et al., 1993; Ferreira et al., 2002).

A migração dos eosinófilos envolve a interação de três componentes: citocinas que aumentam a expressão de quimiocinas, quimiocinas que ativam eosinófilos e moléculas de adesão e outras moléculas, como leucotrienos e prostaglandinas (Blanchard & Rothenberg, 2009). Em condições inflamatórias, algumas citocinas estão envolvidas no tráfego dos eosinófilos, principalmente as produzidas pela Th2: IL-4, IL-5, e IL-13 (Horie et al., 1997; Moser et al., 1992; Sher et al., 1990). Dentre as quimiocinas responsáveis pelo recrutamento dos eosinófilos para os sítios inflamatórios podemos citar: RANTES, eotaxinas e a proteína quimiotática do monócito (MCP) (Jose et al., 1994; Rankin et al., 2000; Rothenberg et al., 1995; Zimmermann et al., 2003).

Diante disso, foram realizados experimentos de quimiotaxia em resposta a IL-5, eotaxina e RANTES. Nossos resultados mostraram que os eosinófilos de pacientes com anemia falciforme e indivíduos controle são capazes de migrar em resposta aos agentes quimiotáticos (RANTES, eotaxina e IL-5), porém, a magnitude da capacidade quimiotática dos eosinófilos dos pacientes com anemia falciforme é maior em relação aos eosinófilos de indivíduos controle. Esses dados sugerem que a presença das citocinas/quimiocinas pode contribuir para a migração dessas células no processo inflamatório crônico observado na anemia falciforme.

O papel da citocina IL-5 tem sido associado a eosinofilia encontrada em algumas doenças, enquanto quimiocinas como eotaxinas e RANTES tem mostrado ser um quimioatraente seletivo para eosinófilos durante a reação alérgica e respostas inflamatórias.

Os níveis plasmáticos de IL-5 foram avaliados pela técnica de ELISA através de kit de alta sensibilidade; no entanto não foi possível detectar esta citocina nas amostras utilizadas, o que não descarta a possibilidade da IL-5 estar envolvida no aumento da capacidade quimiotática dos eosinófilos. Novos experimentos serão necessários para investigar a participação desta citocina neste mecanismo. Do mesmo modo, a concentração plasmática das eotaxinas foi avaliada. Os níveis de eotaxina-1 encontram-se elevados no plasma de pacientes com anemia falciforme. Resultado semelhante foi encontrado ao comparar os níveis séricos de RANTES com amostras de indivíduos controle. Assim como a eotaxina-1, a eotaxina-2 contribui para a eosinofilia nas reações alérgicas, parasitárias e inflamatórias. A eotaxina-2 também foi avaliada, porém, nenhuma alteração significativa foi observada nos níveis plasmáticos desta quimiocina entre o grupo de pacientes com

anemia falciforme comparado aos indivíduos controle. Da mesma forma que as outras eotaxinas, a eotaxina-3 é considerada quimiotraente dos eosinófilos ativados. Os resultados obtidos denotam que os níveis plasmáticos de eotaxina-3 em indivíduos controle e pacientes com anemia falciforme não apresentaram diferença significativa. Alterações na concentração da eotaxina-3 tem sido associadas ao acúmulo dos eosinófilos em doenças atópicas, e os níveis séricos estão correlacionados a intensidade da doença, uma vez que o mRNA desta quimiocina está super regulado em pacientes asmáticos após o contato com o alérgeno (Kagami S et al., 2003). Na anemia falciforme nossos dados sugerem que as quimiocinas RANTES e a eotaxina-1 podem contribuir para a ativação dos eosinófilos promovendo aumento das propriedades adesivas e da capacidade quimiotática dessas células favorecendo o processo de vaso-oclusão da doença.

Os eosinófilos de pacientes com anemia falciforme apresentaram maior adesão a fibronectina, em ensaio estático de adesão (Canalli et al., 2004). Alterações na expressão de moléculas adesão presentes nos eosinófilos estão relacionadas com o aumento da adesão em diferentes doenças como, por exemplo, a asma (Sung et al., 1997). Corroborando com os achados de Canalli et al., 2004, não observamos diferença significativa na expressão das subunidades da integrina VLA-4 (CD49d), CD66b e da subunidade β da integrina Mac-1 (CD18) na superfície dos eosinófilos de pacientes com anemia falciforme em relação aos eosinófilos de indivíduos controle. No entanto nossos resultados foram divergentes quando identificamos aumento significativo na expressão da subunidade α da integrina Mac-1 (CD11b) em eosinófilos de pacientes com anemia falciforme comparado aos eosinófilos de indivíduos controle.

Em relação à molécula de adesão CD49d, nenhuma alteração significativa foi encontrada nos eosinófilos de pacientes com anemia falciforme quando comparados aos eosinófilos de indivíduos controle. Esses resultados vão de encontro com os apresentados por Canalli et al. (2008) ao avaliar a expressão desta integrina em neutrófilos de pacientes com anemia falciforme.

Os eosinófilos são capazes de sintetizar e liberar substâncias pró-inflamatórias como proteínas catiônicas, espécies reativas de oxigênio e citocinas pró-inflamatórias e pró-fibróticas (Lampinen et al., 2004). Quando recrutados para os tecidos, essas células recebem sinais para desgranular, o que resulta na liberação de suas proteínas granulares

como a MBP, EDN, EPO e ECP, e estas estão associadas à indução de dano epitelial, edema e hiperresponsividade das vias aéreas, onde desempenham papel importante na patogênese de doenças alérgicas (Rothenberg & Hogan, 2006).

Os resultados aqui apresentados evidenciaram maior desgranulação espontânea dos eosinófilos de pacientes com anemia falciforme quando comparada com a desgranulação de eosinófilos de indivíduos controle. Esses dados sugerem que os eosinófilos de pacientes com anemia falciforme são capazes de liberar maior quantidade de mediadores inflamatórios favorecendo o estado inflamatório crônico na anemia falciforme.

Outro objetivo deste trabalho foi investigar a possível interação das CC-quimiocinas e IL-5 com a liberação de peroxidase eosinofílica (EPO). As quimiocinas estão presentes em altas quantidades nos sítios inflamatórios alérgicos, o que sugere que elas possam contribuir significativamente para a desgranulação eosinofílica local. Nenhuma diferença significativa foi encontrada entre a desgranulação basal e a estimulada com as quimiocinas e IL-5 tanto eosinófilos de indivíduos controle quanto nos eosinófilos de pacientes com anemia falciforme. Em 2008, Lintomem et al., demonstraram que tanto a eotaxina quanto RANTES foram capazes de induzir um aumento na desgranulação dos eosinófilos de indivíduos controle, no entanto é possível que diferenças metodológicas possam explicar as divergências nos resultados obtidos.

Os eosinófilos também são conhecidos por exercerem papel fundamental na fisiopatologia de doenças alérgicas, como por exemplo, a asma. Infiltrados de eosinófilos nos pulmões ativam a liberação de proteínas tóxicas dos grânulos que podem causar danos celulares. Além disso, essas células são capazes de liberar uma grande variedade de outros mediadores, tais como espécies reativas de oxigênio (ROS), leucotrienos e citocinas, que contribuem para inflamação brônquica, hiperreatividade das vias aéreas e remodelação que coletivamente constituem a marca registrada da asma (Sprague & Khalil, 2009). Do mesmo modo, as citocinas podem causar muitos efeitos nas células vasculares, além de estarem envolvidas no aumento de ROS, que ocorre geralmente nos sítios inflamatórios e de injúria. Os eosinófilos e outros tipos celulares quando adequadamente estimulados por citocinas inflamatórias, tal como TNF α , liberam uma grande quantidade de ROS gerada pela ação da enzima NADPH oxidase. Essa enzima catalisa a transferência de elétrons do NADPH para molécula O₂, reduzindo-a especialmente a superóxido (O₂⁻) e peróxido de

hidrogênio (H₂O₂) (Ezeamuzie & Taslim, 2007; Sprague & Khalil, 2009).

Dentre os estímulos que ativam ROS em eosinófilos podemos destacar: fator de ativação plaquetária (PAF), a interleucina-5 (IL-5), macrófagos e fator estimulador de colônia de granulócitos e monócitos (GM-CSF), bem como de forbol miristato 13 e 12 acetato (PMA) - um ativador conhecidos da proteína quinase C (Giembycz & Lindsay, 1999; Elsner & Kapp, 2000); eles podem atuar como intermediários de sinalização em uma variedade de respostas celulares, como transcrição de genes (Hsu & Wen, 2002), a ativação de quinases de sinalização (Greene et al., 2000; Yu et al., 2004) e antígeno-IgE induzindo a desgranulação de mastócitos e liberação de leucotrienos. Sabe-se que na anemia falciforme os níveis desses mediadores está elevado, levando, conseqüentemente, ao aumento da produção de ROS o que favorece a adesão de células vermelhas. Esse mecanismo sugere que um fenótipo pró-adesivo das hemácias falciformes pode estar relacionado com o estresse oxidativo (Sultana et al., 1998), caracterizado pela aderência anormal das células vermelhas, leucócitos e plaquetas ao endotélio vascular, em áreas nas quais há isquemia/reperfusão (Wood e Granger, 2007). Estudos anteriores, que avaliaram pacientes com doença falciforme, evidenciaram aumento de aproximadamente 30 vezes na produção de ROS em neutrófilos, células vermelhas e plaquetas quando comparados ao grupo controle (Amer et al., 2005). Outra etapa deste trabalho foi avaliar a produção de ROS dos eosinófilos de pacientes com anemia falciforme. Os resultados denotam que a produção de ROS nas células destes pacientes é maior que a produção de ROS nos eosinófilos de indivíduos controle. Esses dados corroboram com a idéia de que o estresse oxidativo tem participação importante no processo vaso-oclusivo da anemia falciforme.

Em indivíduos saudáveis, a contagem de eosinófilos no sangue periférico é relativamente baixa, representando de 0 a 3% dos leucócitos circulantes (Trivedi & Lloyd, 2007). Entretanto, em determinadas doenças, os eosinófilos podem ser seletivamente acumulados no sangue periférico ou em qualquer tecido do corpo. Assim, em resposta a diversos estímulos, os eosinófilos são recrutados da circulação para o foco inflamatório, onde são capazes de modular uma determinada resposta imunológica através de vários mecanismos (Rothenberg, 1998; Rothenberg & Hogan, 2006). Na anemia falciforme, o número absoluto de eosinófilos circulantes encontra-se elevado quando comparado com o número de eosinófilos de indivíduos controle (Canalli et al., 2004).

Sabe-se que a hidroxiureia além de aumentar a produção de hemoglobina fetal, reduz o número de leucócitos, necessidades transfusionais, e a interação dos leucócitos com o endotélio vascular de pacientes em tratamento (Conran & Costa, 2009). Fez parte do nosso trabalho avaliar o efeito da terapia com hidroxiureia nas funções dos eosinófilos.

A terapia com hidroxiureia foi capaz de diminuir o número absoluto de eosinófilos presentes no sangue periférico destes pacientes. Portanto este trabalho é o primeiro que demonstra diminuição significativa no número de eosinófilos em pacientes com anemia falciforme em terapia com hidroxiureia.

Como mencionado anteriormente, os eosinófilos de pacientes com anemia falciforme apresentaram adesão aumentada ao ligante da matriz extracelular, fibronectina, em ensaio de adesão estática. Assim decidimos avaliar o efeito do tratamento com hidroxiureia na adesão dessas células. Complementando os dados anteriores (Canalli et al, 2004), os resultados aqui obtidos mostraram uma inibição estatisticamente significativa da adesão dos eosinófilos sob a influência do tratamento com hidroxiureia em pacientes com anemia falciforme.

Sabe-se que a farmacodinâmica da hidroxiureia possibilita que ela seja uma doadora de NO e também uma estimuladora da produção de NO devido à meia vida de 6 horas (Rodriguez et al., 1998). O NO tem papel importante na inibição da interação leucócito-endotélio e leucócito-matriz extracelular interferindo na expressão e atividade funcional de moléculas de adesão expressas pelo leucócito e pelas células endoteliais (Conran, 2001). Conran e colaboradores (2001) demonstraram que a adesão dos eosinófilos de indivíduos sadios a proteínas da matriz extracelular é inibida por doadores de NO. Estudos recentes evidenciaram que a adesão de neutrófilos a fibronectina e ao ICAM-1 é significativamente diminuída em pacientes com anemia falciforme em terapia de hidroxiureia quando comparada a pacientes sem tratamento (Canalli et al., 2008). Portanto, é possível que a inibição da adesão observada nos pacientes com anemia falciforme em tratamento com hidroxiureia se deva ao aumento da biodisponibilidade de NO pela hidroxiureia, entretanto estudos adicionais são necessários para elucidar o mecanismo pelo qual a hidroxiureia é capaz de influenciar na adesão dessas células.

Dados na literatura mostraram que a adesão à fibronectina dos eosinófilos tanto de

controle quanto de pacientes com anemia falciforme quando co-incubados com IL-8 ou RANTES não apresentaram nenhuma alteração significativa em relação ao estado basal. Por outro lado, a co-incubação dos eosinófilos de pacientes com anemia falciforme com GM-CSF apresentou aumento significativo na adesão dessas células quando comparado ao estado basal (Canalli et al, 2004). Uma vez que estas citocinas/quimiocinas estão aumentadas nos processos inflamatórios o que favorece o aumento da adesão celular, os eosinófilos foram co-incubados com IL-5, RANTES e Eotaxina a fim de se verificar o comportamento dessas células na adesão à fibronectina, no entanto, não foi observada nenhuma alteração significativa na adesão dessas células quando comparada a basal.

A capacidade de migração dos eosinófilos de pacientes com anemia falciforme em terapia com hidroxiureia foi avaliada nesse trabalho. Nossos resultados mostram que não houve diferença significativa na capacidade de migração dos eosinófilos (basal e em resposta as quimiocinas/citocina) de pacientes com anemia falciforme com e sem o tratamento de hidroxiureia. Em condições inflamatórias, grande número de citocinas está envolvido no tráfego dos eosinófilos como, por exemplo, IL-5 (Blanchard & Rothenberg., 2009; Horie et al., 1997; Moser et al., 1992., Sher et al., 1990). Uma hipótese para explicar esse resultado seria que os níveis circulantes de IL-5 estejam aumentados na anemia falciforme e que o tratamento com hidroxiureia não interfira na produção desta citocina. Um trabalho anterior do nosso grupo demonstrou que a hidroxiureia foi capaz de diminuir a produção plasmática dos níveis de TNF- α , porém a produção de IL-8 não foi afetada (Lanaro et al., 2009).

Os níveis plasmáticos de eotaxina-1, eotaxina-2, eotaxina-3 e séricos de RANTES não apresentaram nenhuma diferença significativa nos pacientes com anemia falciforme em terapia com hidroxiureia quando comparados ao grupo de pacientes com anemia falciforme sem o mesmo tratamento, todavia, o tratamento com hidroxiureia sugere uma possível redução dos níveis plasmáticos e séricos destas quimiocinas neste grupo de pacientes.

Alterações na expressão de integrinas nos eosinófilos de pacientes com anemia falciforme podem influenciar as propriedades adesivas dessas células. Essas variações são causadas por mobilização dessas moléculas de adesão na superfície celular, pela mudança de afinidade e avidéz da integrina (Canalli et al., 2008).

Alguns trabalhos tem relatado aumento na expressão de CD11b:CD18 de neutrófilos

não estimulados, entretanto, não há nenhuma diferença significativa na expressão de LFA-1 (CD11a:CD18) (Lum et al., 2004). Em 2005, Assis e colaboradores observaram que após a estimulação celular ocorreu aumento significativo da expressão de Mac-1 (Assis et al., 2005).

Em relação aos pacientes com anemia falciforme em terapia com hidroxiureia não foi possível observar nenhuma alteração significativa na expressão das subunidades estudadas. Desse modo, acredita-se que a participação das integrinas no processo de adesão celular não implica na expressão e sim na mudança de afinidade e avidéz como anteriormente relatado por Canalli et al., 2008 ao avaliar essas moléculas de adesão em neutrófilos.

Por outro lado, a terapia com hidroxiureia foi capaz de inibir o aumento da desgranulação observada nos eosinófilos provenientes de pacientes com anemia falciforme quando observado a atividade da EPO e também os níveis de concentração plasmática de EDN. Esse resultado sugere que o tratamento com hidroxiureia pode influenciar na produção de citocinas, quimiocinas e outros mediadores inflamatórios pelos eosinófilos, como as proteínas tóxicas dos grânulos. De fato, há evidências de que a terapia com hidroxiureia diminui a expressão gênica e a produção dessas substâncias em neutrófilos e células mononucleares (Jison et al, 2004; Lanaro et al, 2009).

Os resultados obtidos neste trabalho contribuem para o melhor esclarecimento da fisiopatologia da anemia falciforme e sugerem uma participação importante dos eosinófilos no processo vaso-oclusivo.

6. Conclusões

6. CONCLUSÕES

- Eosinófilos de pacientes com anemia falciforme, apresentam maior expressão da subunidade α da integrina Mac-1 (CD11b);
- Os eosinófilos de pacientes com anemia falciforme apresentam maior capacidade de migração espontânea. Além disso, os eosinófilos de pacientes com anemia falciforme são capazes de migrar em resposta aos agentes quimiotáticos (RANTES, EOTAXINA e IL-5);
- Os níveis de eotaxina-1 e de Rantes encontram-se elevados no plasma e soro de pacientes com anemia falciforme. No entanto, nenhuma alteração significativa foi observada nos níveis de eotaxina-2 e eotaxina-3;
- Os eosinófilos de pacientes com anemia falciforme apresentaram maior desgranulação espontânea. Não foi observada nenhuma diferença entre a desgranulação basal e a estimulada com as quimiocinas (Eotaxina, Rantes e Il-5);
- A produção de espécies reativas de oxigênio está aumentada nos eosinófilos de pacientes com anemia falciforme;
- A terapia com hidroxiureia foi capaz de diminuir o número absoluto de eosinófilos presente no sangue periférico destes pacientes;
- Os eosinófilos de pacientes com anemia falciforme em tratamento com hidroxiureia apresentam menor adesão, menor desgranulação e liberação de ROS;
- O tratamento com hidroxiureia não alterou a capacidade quimiotática dos eosinófilos de pacientes com anemia falciforme;
- Em conclusão esses dados sugerem que, além dos neutrófilos, os eosinófilos também podem ter papel importante na fisiopatologia da doença.

Tomando em conjunto, nossos resultados sugerem a participação dos eosinófilos na fisiopatologia da anemia falciforme e corroboram com o conceito da existência de um estado inflamatório crônico da doença. O tratamento com hidroxiureia, além de aumentar os níveis de HbF, é capaz de modificar a adesão dos eosinófilos e possivelmente afetar a liberação de mediadores inflamatórios por essas células.

7. Referências Bibliográficas

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbas AK et al. *Imunologia celular e molecular*. 2000; 4^a ed. Rio de Janeiro: Revinter.

Abraham WM, Sielczak MW, Ahamed A. et al. Alpha 4-integrins mediate antigen-induced late bronchial responses and prolonged airway hyperresponsiveness in sheep. *J Clin Invest*. 1994; 93:776–87.

Ackerman SJ, Kephart GM, Habermann TM, Greipp PR, Gleich G.J. Localization of eosinophil granule major basic protein in human basophils. *J Exp Med*. 1983; 158:946–61.

Ayaegbu CC, Okpala IE, Akenova AY, Salimonu LS. Peripheral blood neutrophil count and candidacidal activity correlate with the clinical severity of sickle cell anemia. *Eur J Haematol*. 1998; 60: 267-8.

Assis A, Conran N, Canalli SS, Lorand-Metze I, Saad STO, Costa FF. Effect of cytokines and chemokines on sickle neutrophil adhesion to fibronectina. *Acta Haematol*. 2005; 113:130-6.

Ballas SK, Smith ED. Red blood cell changes during the evolution of sickle cell painful crisis. *Blood*. 1992; 79: 2154-63.

Barthel et al. Roles of integrin activation in eosinophil function and the eosinophilic inflammation of asthma. *Journal of Leukocyte Biology*. 2008; V. 83.

Belcher JD et al. Transgenic sickle mice have vascular inflammation. *Blood*. 2003;15;101(10):3953-9.

Benkrrou M. et al. Hydroxyurea corrects the dysregulated L-selectin expression and increased H₂O₂ production of polymorphonuclear neutrophils from patients with sickle cell anemia. *Blood*. 2002; 99, 2297–2303.

Blanchard C, Rothenberg ME. Biology of the Eosinophil. *Advances in Immunology*. 2009; 101, 81-121,.

Bocher BS, Schleimer RP. Mast cells, basophils and eosinophils: distinct but overlapping pathways for recruitment. *Immunol Rev*. 2001; 179:5–15.

Boyd JH et al. Asthma is associated with increased mortality in individuals with sickle cell anemia. *Haematologica*. 2007; 92:1115-18.

Brawley OW et al. National Institutes of health consensus development conference statement: hydroxyurea treatment for sickle cell disease. *Ann Intern Med*. 2008; 148:932-8.

Bundy R, Marczin N, Chester AH, Yacoub M. Differential regulation of DNA synthesis by nitric oxide and hydroxyurea in vascular smooth muscle cells. *Am J Phys*. 1999; 277:1799-807.

Canalli AA et al. Incrriased adhesive properties of eosinophils in sickle cell disease. *Experimental Hematology*. 2004; 32:728-34.

Canalli AA et al. Role for cAMP-protein kinase A signaling in augmented neutrophil adhesion and chemotaxis in sickle cell disease. *Eur J Haematol*. 2007; 79:330-7.

Canalli AA, Franco-Penteado, CF, Saad STO, Conran N, Costa FF. Increased adhesive properties of neutrophils im sickle cell disease may be reversed by pharmacological nitric oxide donation. *Haematologica/the hematology journal*. 2008; 93:4.

Cardoso GL, Guerreiro JF. African gene flow to north Brazil as revealed by HBB*Sgene haplotype analysis. *Am J Hum Biol*. 2006 18(1):93-8.

Castro O, Branbilla D J, Thorington B. Reindof CA, Scott RB, Gilette P et al. The acute syndrome in sickle cell disease: incidence and risk factors. The cooperative study of sickle cell disease. *Blood*. 1994; 643-9.

Conran N et al. Nitric oxide regulates human eosinophil adhesion mechanisms in vitro by changing integrin expression and activity on the eosinophil cell surface. *British Journal of Pharmacology*. 2001; 134, 632 ± 638.

Conran N, Saad ST, Costa FF, Ikuta, T. Leukocyte numbers correlate with plasma levels of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor sickle cell disease. *Ann Hematol*. 2007; 86:255-61.

Conran N. et al.; Newer aspects of the pathophysiology of sickle cell disease vaso-occlusion. *Hemoglobin*. 2009; 33 (1): 1-16.

Conran N, Costa FF. Hemoglobin disorders and endothelial cell interactions. *Clinical Biochemistry*, 2009.

Charache S, Terrin ML, Moore MD, Dover GJ, Barton FB, Ecker, S.V. et al. Effect of hydroxyurea on frequency of painful crises in sickle cell anemia. *N Engl J Med*. 332: 1317-22, 1995.

Chiang EY, Frenette PS. Sickle cell vaso-occlusion. *Hematol-Oncol Clin North Am*. 2005;19(5): 771-784

De Franceschi L, Corrocher R. Established and experimental treatments for sickle cell disease. *Haematologica*. 2004; 89: 348-56.

DeKoter RP, Singh H. Regulation of B lymphocyte and macrophage development by graded expression of PU.1. *Science*. 2000; 288:1439-41.

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

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

Du J, et al. Novel combinatorial interactions of GATA-1, PU.1, and C/EBP isoforms regulate transcription of the gene encoding eosinophil granule major basic protein. *J. Biol. Chem.* 2002; 277:43481–94.

Ebnet K, Kaldjian EP, Anderson AO, Shaw S. Orchestrated information transfer underlying leukocyte endothelial interactions. *Annu Rev Immunol.* 1996; 14:155–77.

Elsner J et al. The CC chemokine antagonist Met-RANTES inhibits eosinophil effector functions through the chemokine receptors CCR1 and CCR3. *Eur J Immunol.* 1997; 27:2892–8.

Elsner J, et al. ETERING, H., KIMMIG, D., Wells T.N., PROUDFOOT, A.E., & KAPP, A. The CC chemokine receptor antagonist met-RANTES inhibits eosinophil effector functions. *Int Arch Allergy Immunol* 118:462–5, 1999.

Elsner J. Kapp A. Activation of human eosinophils by chemokines. *Chem Immunol.* 2000; 76: 177–207.

Fadlon E. et al. Blood polymorphonuclear leukocytes from the majority of sickle cell patients in the crisis phase of the disease show enhanced adhesion on vascular endothelium and increased expression of CD34. *Blood.* 1998; 91:266-74.

Ferreira HHA et al. Expression of nitric oxide synthases and in vitro migration of eosinophils from allergic rhinitis subjects. *Eur. J. Pharmacol.* 2002; 442:155-62.

Ferreira RP, et al. Platelets from sickle cell disease individuals demonstrate increased adhesive properties that are reversed by hydroxyurea therapy in association with alterations in intraplatelet cAMP and GPIIb/IIIa integrin activation. *Blood*. 2008; 112:2472.

Flier J, Boorsma DM, van Beek PJ, et al. Differential expression of CXCR3 targeting chemokines CXCL10, CXCL9, and CXCL11 in different types of skin inflammation. *J Pathol*. 2001;194:398-405.

Frigas E, Loegering DA, Gleich GJ. Cytotoxic effects of the guinea pig eosinophil major basic protein on tracheal epithelium. 1980; *Lab Invest* 42:35–43.

Frenette PS. Sickle cell vaso-occlusion: multistep and multicellular paradigm. *Current Opinion in Hematol*. 2002; 9:101-6.

Frenette PS, Atweh GF. Sickle cell disease: old discoveries, new concepts, and future promise, *The Journal of Clinical Investigation*. 2007.

Furuta GT, Nieuwenhuis EE, Karhausen J et al. Eosinophils alter colonic epithelial barrier function: role for major basic protein. *Am J Physiol*. 2005; 289:G890–G897.

Georas SN et al. Altered adhesion molecule expression and endothelial cell activation accompany the recruitment of human granulocytes to the lung after segmental antigen challenge. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1992; 7:261–9.

Georas SN, McIntyre BW, Ebisawa M. et al. Expression of a functional laminin receptor (alpha 6 beta 1, very late activation antigen-6) on human eosinophils. *Blood*. 1993; 82:2872–9.

Gladwin MT et al. Nitric oxide donor properties of hydroxyurea in patients with sickle cell disease. *Br J Haematol*. 2002;116: 436-44.

Gleich GJ, Loegering DA. Immunobiology of eosinophils. *Annu Rev Immunol.* 1984; 984;2:429-59.

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

Giembycz MA, Lindsay MA. Pharmacology of eosinophils. *Pharmacol Rev* 1999; 51: 213–340.

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

Gonzalo JA, Lloyd CM, Kremer L et al. Eosinophil recruitment to the lung in a murine model of allergic inflammation. The role of T cells, chemokines, and adhesion receptors. *J Clin Invest.* 1996; 98:2332–45.

Grayson MH, Van Der Vieren M, Sterbinsky SA et al. alphadbeta2 integrin is expressed on human eosinophils and functions as an alternative ligand for vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1). *J Exp Med.* 1998; 188:2187–91.

Greene E.L. et al. 5-HT_{2A} receptors stimulate mitogen-activated protein kinase via H₂O₂ generation in rat renal mesangial cells. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2000; 278:F650–F658.

Hamann KJ, Ten RM, Loegering DA. et al. Structure and chromosome localization of the human eosinophilderived neurotoxin and eosinophil cationic protein genes: evidence for intronless coding sequences in the ribonuclease gene superfamily. *Genomics.* 1990; 7:535–46.

Hamann KJ, Barker RL, Ten RM, Gleich GJ. The molecular biology of eosinophil granule proteins. *Int Arch Allergy Appl Immunol.* 1991; 94:202–9.

Hansel TTO, De Vries IJ. An improved immunomagnetic procedure for the isolation of highly purified human blood eosinophils. *J Immunol Methods*. 1991;145:105-110.

Hebbel RP. J. Review Adesive interaction sickle erythrocytes with endotheliun. *Clin Invest*. 1997; 1;100 (11 suppl) S83-6.

Herrick JB. Abstract of discussion. *JAMA*. 1924; 83:16.

Hisamatsu K, Ganbo T, Nakazawa T et al. Cytotoxicity of human eosinophil granule major basic protein to human nasal sinus mucosa in vitro. *J Allergy Clin Immunol*. 1990; 86:52–63.

Hogan SP, Rothenberg ME, Fores E, Smart VE, Mattae KI, Foster PS. Chemokines in eosinophilassociated gastrointestinal disorders. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2004; 4:74–82.

Horie S. et al. Interleukin-13 but not interleukin-4 prolongs eosinophil survival and induces eosinophil chemotaxis. *Intern. Med*. 1997;36, 179–185.

Hsu HY, Wen MH. Lipopolysaccharidemediated reactive oxygen species and signal transduction in the regulation of interleukin- 1 gene expression. *J Biol Chem* 2002; 277: 22131–22139.

Janeway CA et al. *Imunologia: o sistema imune na saude e na doença*. 2007; 6^a ed. Porto Alegre: Artmed.

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

Jose PJ. Et al. Eotaxin: A potent eosinophil chemoattractant cytokine detected in a guinea pig model of allergic airways inflammation. *J. Exp. Med*. 1994; 179, 881–887.

Jison ML et al. Blood mononuclear cell gene expression profiles characterize the oxidant, hemolytic, and inflammatory stress of sickle cell disease. *Blood*. 2004; 104, 270–280.

Kagami S, Kakinuma T, Saeki H, Tsunemi Y, Fujita H, Nakamura K, et al. Significant elevation of serum levels of eotaxin-3/CCL26, but not of eotaxin-2/ CCL24, in patients with atopic dermatitis: serum eotaxin-3/CCL26 levels reflect the disease activity of atopic dermatitis. *Clin Exp Immunol*. 2003; 134:309–13.

Kasschau MR et al. Adhesion of sickle neutrophils and erythrocytes to fibronectina. *Blood*. 1996; 87:771-80.

Kelly M et al. Modulating leukocyte recruitment in inflammation. Review. *J. Allergy Clin. Immunol*. 2007.

Kinney TR et al. Silent cerebral infarcts in sickle cell anemia: a risk factor analysis. The Cooperative Study of Sickle Cell Disease. *Pediatrics*. 1999; 103, 640–645.

Kita H. The eosinophil: a cytokineproducing cell? *Allergy Clin Immunol*. 1996; 97: 889-92.

Knorr NS, Stuehr DJ, Nathan CF. Inhibition of tumor cell ribonucleotide reductase by macrophage-derived nitric oxide. *J Exp Med*. 1991; 174: 761-7.

Kroegel C et al. Pulmonary immune cells in health and disease: the eosinophil leucocyte (Part I). *Eur. Respir. J.* 1994; 7: 519-543.

Kunkel EJ, Butcher EC. Chemokines and the tissuespecific migration of lymphocytes. *Immunity*. 2002; 16:1–4.

Labie D, Elion J. Molecular and cellular pathophysiology of sickle cell anemia. *Pathol Biol*. 1999 ;47: 7-12.

Lanaro C. et al. Altered levels of cytokines and inflammatory mediators in plasma and leukocytes of sickle cell anaemia patients and effects of hydroxyurea therapy. *J Leuk Biol*. 2009.

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

Lassmann G, Thelander L, Graslund A. EPR stopped-flow studies of reaction of the tyrosyl radical of protein R2 from ribonucleotide reductase with hydroxyurea. *Biochem Biophys Res Commun*. 1992; 188(2): 879-87.

Lehrer RI, Szklarek D, Barton A, Ganz T, Hamann KJ, Gleich GJ. Antibacterial properties of eosinophil major basic protein and eosinophil cationic protein. *J Immunol*. 1989; 142:4428–34.

Lepoivre M et al. Quenching of tyrosyl free radical of ribonucleotide reductase by nitric oxide. Relationship to cytostasis induced in tumor cells by cytotoxic macrophages. *J Biol Chem*. 1994; 269: 21891-7.

Manodori AB, Barabino GA, Lubin BH, Kuypers FA. Adherence of phosphatidylserine-exposing erythrocytes to endothelial matrix thrombospondin. *Blood*. 2000; 15;95(4):1293-300.

Mayeno AN, Curran AJ, Roberts RL, Foote CS. Eosinophils preferentially use bromide to generate halogenating agents. *J Biol Chem*. 1989; 264:5660–8.

McNagny K, Graf T. Making eosinophils through subtle shifts in transcription factor expression. *J. Exp. Med*. 2002; 195:F43–47.

Miller ST. Prediction of adverse outcomes in children with sickle cell disease. *New England Journal of Medicine*. 2000; 342, 83–89.

Moser R et al. IL-4 controls the selective endothelium-driven transmigration of eosinophils from allergic individuals. *J. Immunol.* 1992; 149, 1432–1438.

Nahavandi M et al. Nitric oxide and cyclic GMP levels in sickle cell patients receiving hydroxyurea. *Br j Haematol.* 2002; 119: 855-7.

Nakajima H, Sano H., Nishimura T, Yoshida S, Iwamoto I. Role of vascular cell adhesion molecule 1/very late activation antigen 4 and intercellular adhesion molecule 1/lymphocyte function associated antigen 1 interactions in antigen-induced eosinophil and T cell recruitment into the tissue. *J Exp Med.* 1994; 179:1145–54.

Navarra P, Preziosi P. Hydroxyurea: new insights on an old drug. *Crit Rev. Oncol Hematol.* 1999; 29:249–55.

Nerlov C, Graf T. PU.1 induces myeloid lineage commitment in multipotent hematopoietic progenitors. *Genes Dev.* 1998; 12:2403–12, 1998.

Nerlov C, et al. Distinct C/EBP functions are required for eosinophil lineage commitment and maturation. *Genes Dev.* 1998 ; 12:2413–23.

Okpala I. et al., Relationship between the clinical manifestations of sickle cell disease and the expression of adhesion molecules on white blood cell. *Eur J Haematol.* 2002; 69:135-44.

Okpala I. Leukocyte adhesion and the pathophysiology of sickle cell disease. *Curr Opin Hematol.* 2006;13(1):40-4.

Pasty C et al. Transgenic knockout mice with exclusively human sickle hemoglobin and sickle cell disease. *Science.* 1997; 31: 278(5339):876-8.

Plager DA, Loegering DA, Checkel JL et al. Major basic protein homolog (MBP2): a specific human eosinophil marker. *J Immunol.* 2006; 177:7340–5.

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

Platt OS et al., Mortality in sickle cell disease: Life expectancy and risk factors for early death. *N. Engl. J. Med.* 1994; 330:1639-44.

Platt OS. Sickle cell anemia as an inflammatory disease. *Journal of Clinical Investigation.* 2000; 106, 337–338.

Popken-Harris P, Checkel J, Loegering D et al. Regulation and processing of a precursor form of eosinophil granule major basic protein (ProMBP) in differentiating eosinophils. *Blood.* 1998; 92:623–31.

Preyolani M, et al. Antibody to very late activation antigen 4 prevents antigen-induced bronchial hyperreactivity and cellular infiltration in the guinea pig airways. *J Exp Med.* 1994; 180:795–805.

Ramalho, AS. As hemoglobinopatias hereditárias: um problema de saúde pública no Brasil. Ribeirão Preto. Sociedade Brasileira de Genética. 1986; 1, 160.

Rankin SM. Et al. Eotaxin and eosinophil recruitment: Implications for human disease. *Mol. Med.* 2000; 6, 20–27.

Ravensberg AJ, et al. Eotaxin-2 and eotaxin-3 expression is associated with persistent eosinophilic bronchial inflammation in patients with asthma after allergen challenge. *J Allergy Clin Immunol.* 2005; 115:779–85.

Rodrigues GI, Kuhn JG, Weiss GR, Hilsenbeck SG, Eckardt JR, Thurman A et al. A bioavailability and pharmacokinetic study of oral and intravenous hydroxyurea. *Blood*. 1998; 91(5): 1533-41.

Roitt I, Rostoff J, Mele D. *Imunologia*. 1997; 4^a ed. São Paulo: Manole.

Rosenberg HF, Domachowske JB. Eosinophils, eosinophil ribonucleases, and their role in host defense against respiratory virus pathogens. *J Leukoc Biol*. 2001; 70:691–8.

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

Rothenberg ME, Pomerantz JL, Owen, WF et al. Characterization of a human eosinophil proteoglycan, and augmentation of its biosynthesis and size by interleukin 3, interleukin 5, and granulocyte/macrophage colony stimulating factor. *J Biol Chem*. 1988; 263:13901-8.

Rothenberg ME, Hogan SP. The Eosinophil. *Annu. Rev. Immunol*. 2005; 24, 147–174.

Sehmi R et al. Interleukin-5 Selectively Enhances the Chemotactic Response of Eosinophils Obtained From Normal but not Eosinophilic Subjects. *Blood*. 1992; 79, 2952-2959.

Serjeante GR, Serjeant BE. *Sickle cell disease*. Oxford University Press. 2001; New York. 3rd edition.

Sher A., et al. Interleukin-5 is required for the blood and tissue eosinophilia but not granuloma formation induced by infection with schistosoma mansoni. *Proc. Natl. Acad*. 1990; *Sci*. 87, 61–65.

Shiu Y, Udden MM, McIntire LV. Perfusion with sickle erythrocytes up-regulates ICAM-1 and VCAM-1 gene expression in cultured human endothelial cells. *Blood*. 2000; 95(10): 3232-41.

Solovey A. et al.; Circulating activated endothelial cells in sickle cell anemia. *The New England Journal of Medicine*. 1997; 27.

Somey A, Nishijima K, Nunoi H, Irie S, Nagaoka I. Study on the superoxide-producing enzyme of eosinophils and neutrophils: comparison of the NADPH oxidase components. *Arch Biochem Biophys*. 1997; 345:207–13.

Sriramarao, P, Von Andrian UH, Butcher EC, Bourdon MA, Broide DH. L-selectin and very late antigen-4 integrin promote eosinophil rolling at physiological shear rates in vivo. *J Immunol*. 1994; 153:4238–46.

Steinberg M.H.; Management of sickle cell disease. *N Engl J Med*. 1999; 340: 1021-30.

Steinberg M.H.; Forget BG, Higgs DR, Nagel RL. Disorders of Hemoglobin. Cambridge University Press. 2001.

Stevens M. Hydroxyurea: an overview. *J Biol Regul Homeost Agents*. 1999;13:172–5.

Stoeckert CJ. Green, M.B. Erythropoietin and hydroxyurea can act on early erythroid progenitors from adult human peripheral blood to modulate fetal globin mRNA levels. *Experimental Hematology*. 1994 ; 22: 278-282.

Stuard MJ, Nagel RL. Sickle-cell disease. *Lancet*. 2004 364: 1343-1360.

Stuard MJ., Setty BN., Sickle Cell Acute Chest Syndrome: Pathogenesis and Rationale for Treatment. Clinical observations, interventions, and therapeutic trials. *Blood*. 1999; 94: 1555-1560.

Sung PG et al., Granulocytes-macrophage colony-stimulating factor regulates the functional adhesive state of VLA-4 expressed by eosinophils. *J Immunol.* 1997; 158:919-927.

Suzuki Y. et al. Fc RI signaling in mast cells activates intracellular production of hydrogen peroxide: role in the regulation of calcium signals. *J Immunol.* 2003; 171: 6119–6127.

Vichinsky EP, et al. Causes and outcomes of the acute chest syndrome in sickle cell disease. National Acute Chest Syndrome Study Group. *New England Journal of Medicine.* 2000; 342,1855–1865.

Yarbro JW. Mechanism of action of hydroxyurea. *Seminars on Oncology.* 1992; 19: 1-10.

Yu C, Rahmani M, Dent P, Grant S. The hierarchical relationship between MAPK signaling and ROS generation in human leukemia cells undergoing apoptosis in response to the proteasome inhibitor bortezomib. *Exp Clin Res.* 2004; 295: 555–566.

Tachimoto H, Bochner BS. The surface phenotype of human eosinophils. *Chem Immunol.* 2000; 76:45–62.

Tachimoto H, Ebisawa M, Bochner BS. Cross-talk between integrins and chemokines that influences eosinophil adhesion and migration. *Int Arch Allergy Immunol.* 2002; 128 (suppl. 1):18–20.

Tbeuzard Y. Sickle cell disease of transgenic SAD mice. *Blood.* 1994; 84(9): 3189-97.

Ten RM, Pease LR, McKean DJ, Bell M.P, Gleich GJ. Molecular cloning of the human eosinophil peroxidase. Evidence for the existence of a peroxidase multigene family. *J Exp Med.* 1989; 169:1757–69.

Teran L.M. CCL chemokines and asthma. Review. *Immunol Today.* 2000; 21:238-42.

Thomas EL, Bozeman PM, Jefferson MM, King CC. Oxidation of bromide by the human leukocyte enzymes myeloperoxidase and eosinophil peroxidase. Formation of bromamines. J Biol Chem. 1995; 270:2906–13.

Trivedi SG, Lloyd CM. Eosinophils in the pathogenesis of allergic airways disease. Biomedicine & Diseases. 2007;64:1269 – 1289.

Trudel M et al. Sick Cell Disease of Transgenic SAD Mice. Blood. 1994; 84: 3189-3197.

Turhan A. et al. Primary role for adherent leucocytes in sickle cell vascular occlusion: A new paradigm. PNAS. 2002; 99 (5):3047-3051.

Vij R, Machado RF. Pulmonary complications of hemoglobinopathies. Chest. 2010; 138(4):973-83.

Walsh JC et al. Cooperative and antagonistic interplay between PU.1 and GATA-2 in the specification of myeloid cell fates. Immunity. 2002; 17:665–76.

Wardlaw AJ, Walsh GM, Symon FA. Mechanisms of eosinophil and basophil migration. Allergy. 1994; 49:797–807.

Wardlaw AJ. Functional and structural characterization of the eosinophil P-selectin ligand. J Immunol. 1996; 157:1711–19.

Wardlaw AJ. Molecular basis for selective eosinophil trafficking in asthma: a multistep paradigm. J Allergy Clin Immunol. 1999; 104:917–26.

Wardlaw AJ. The role of adhesion in eosinophil function. Chem Immunol. 2000; 78:93–111.

Ware RE, Aygun B. Advances in the use of hydroxyurea. Hematology Am Soc Hematol

Educ Program. 2009; 62–9.

Warringa RA, et al. Modulation of eosinophils chemotaxis by interleukin-5. Am J. Respir Cell Mol Bio. 1992; 7 (6) 631-6.

Weg VB, Williams TJ, Lobb RR, Nourshargh S. A monoclonal antibody recognizing very late activation antigen-4 inhibits eosinophil accumulation in vivo. J Exp Med. 1993; 177:561–6.

Weiss SJ, Test ST, Eckmann CM, Roos D, Regiani S. Brominating oxidants generated by human eosinophils. Science. 1986; 234:200–3.

Weller PF. Eosinophils: structure and functions. Curr Opin Immunol. 1994; 6:85–90.

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

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

Zimmermann N et al. Chemokines in asthma: Cooperative interaction between chemokines and IL-13. J. Allergy Clin. Immunol. 2003; 111, 227–242, 243.