

Andréia Averci Canalli

**Função e Expressão das Integrinas nos Eosinófilos de Pacientes
com Anemia Falciforme.**

Campinas, 2004.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
DESENVOLVIMENTO DE COLEÇÕES

Andreia Averci Canalli

**Função e Expressão das Integrinas nos Eosinófilos de Pacientes
com Anemia Falciforme.**

Dissertação de mestrado apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Clínica Médica, da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp, para obtenção do título de Mestre em Clínica Médica, área de concentração Ciências Básicas.

Orientador: Prof. Dr. Fernando Ferreira Costa.

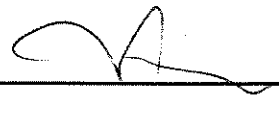
Co-orientadora: Dra. Nicola Conran Zorzetto.

Universidade Estadual de Campinas-UNICAMP

Campinas, 2004.

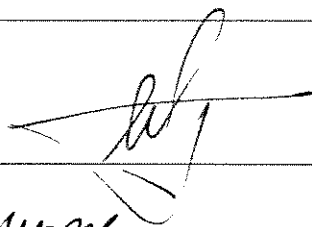
Apoio: Capes e Hemocentro-Unicamp

Orientador(a): *Prof.Dr. Fernando Ferreira Costa*



Membros:

Profa. Dra. Maria de Lourdes L. F. Chauffaille



Profa. Dra. Heloisa Helena de Araújo



**Curso de Pós-Graduação em Clínica Médica, área de concentração Ciências Básicas,
da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.**

Data: 06/05/2004

AGRADECIMENTOS

- * Ao Prof. Dr. Fernando Ferreira Costa, pela receptividade, orientação, confiança e estímulo nas atividades desenvolvidas neste período;
- * À Dra. Nicola Conran, pela orientação, amizade e companherismo em todo tempo;
- * Ao Sérgio, pela dedicação, apoio, amor e carinho, que tornaram estes dois anos mais fáceis;
- * Aos meus pais, Diva e José, as maiores dádivas que Deus me deu;
- * À minha família, pelo apoio, e sem a qual nada disto seria possível;
- * Ao Cláudio, pela contribuição e ajuda no início deste trabalho;
- * Aos meus colegas do Hemocentro que participaram deste importante momento, somando o saber e o crescimento;
- * À Patrícia e Raquel pela colaboração e amizade;
- * À CAPES, pelo apoio financeiro;
- * Ao pessoal da coleta de sangue e todos àqueles que de alguma forma contribuíram com este trabalho;
- * À Dra. Marilú, pela receptividade e sugestões;
- * À Dra. Heloísa, pela sugestões e contribuição com o fornecimento de material para a nossa pesquisa;
- * À Dra. Cláudia Bonini, pela imensa ajuda e amizade quando tudo começou.

Sumário

RESUMO.....	IX
ABSTRACT	XII
INTRODUÇÃO	13
1.1 História da Anemia Falciforme	14
1.1.1 Anemia Falciforme.....	15
1.1.2 Fisiopatologia da doença falciforme	16
1.1.3 Vaso-oclusão	17
1.2 Moléculas de Adesão-Integrinas	18
1.2.1 Mecanismos de Adesão de Leucócitos	20
1.3 Eosinófilos	21
OBJETIVOS	24
2.1 Objetivo Geral.....	25
2.1.1 Objetivos específicos	25
MATERIAL E MÉTODOS.....	27
3.1 Casuística	28
3.1.1 Pacientes e Controles	28
3.2 Contagem de Eosinófilos no Sangue Periférico.....	29
3.3 Isolamento dos Eosinófilos	29
3.3.1 Preparação de lâminas em citocentrífuga.....	30
3.4 Ensaio de Adesão	31
3.4.1 Teste da Adesão Celular dos Eosinófilos.....	31
3.4.2 Tratamento dos Eosinófilos antes da Execução do Teste	32

3.5 Citometria de Fluxo	33
3.6 Análise estatística	34
RESULTADOS.....	35
4.1 Características clínicas dos pacientes	36
4.2 Contagem absoluta dos eosinófilos em pacientes com anemia falciforme e controles.....	36
4.3 Isolamento dos eosinófilos.....	38
4.4 Ensaios de Adesão Celular dos Eosinófilos.....	39
4.4.1 Padronização do método do ensaio de adesão à FN	39
4.4.2 Padronização do tempo de adesão à FN.....	40
4.4.3 Padronização da concentração de fibronectina para o ensaio de adesão	41
4.4.4 Adesão dos eosinófilos controles e pacientes à fibronectina	43
4.4.5 Efeito “in vitro” das citocinas IL-8 e Rantes na adesão dos eosinófilos à fibronectina	44
4.4.6 Efeito do GM-CSF na adesão de eosinófilos de indivíduos controles e SS à FN.....	45
4.4.7 Efeito do bloqueio com anticorpos específicos para as integrinas na adesão de eosinófilos controles/pacientes à FN.	47
4.5 Expressão das integrinas na superfície de eosinófilos controles e eosinófilos de pacientes.	50
DISCUSSÃO	52
CONCLUSÕES	58
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	60

LISTA DE ABREVIATURAS

AF- anemia falciforme

FN- fibronectina

PBS- salina tamponada fosfatada.

BSA- soro albumina bovina

MEM- mínimo essencial Eagles médio.

ICAM- molécula de adesão intercelular.

VCAM- molécula de adesão vascular.

PECAM- molécula de adesão de células endotelial plaquetária.

Mad Cam- molécula de adesão à mucosas.

PAF- fator ativador de plaquetas.

TNF- fator de necrose tumoral.

EPO- grânulo peroxidase eosinófila.

GM-CSF- fator estimulante de crescimento de colônias de macrófago-granulócitos.

FAK- quinase de adesão focal

f.MLP- formil metilonil leucil fenilalanina.

Fc- fração cristalizável

CD-“cluster” de diferenciação

CR- receptor complementar.

LFA- antígeno de linfócito funcional.

Mac-1- célula de ataque à membrana.

VLA- antígeno muito tardio.

HbA- hemoglobina A

HbF- hemoglobina fetal

HbS- hemoglobina S

IL-8- interleucina 8

RESUMO

RESUMO

A hemoglobina S (HbS) é decorrente de uma mutação de ponto que ocasiona a troca do ácido glutâmico pela valina na cadeia polipeptídica da globina beta. Em homozigose, esta alteração genética acarreta a anemia falciforme, que se caracteriza por anemia hemolítica não imune e fenômenos vaso-oclusivos, seguidos de lesões a órgãos alvos, responsáveis pela morbi-mortalidade associada a esta doença. O fenômeno vaso-oclusivo é associado ao processo inflamatório desencadeado pela polimerização da HbS desoxigenada, favorecendo a impactação das hemácias na microcirculação e subsequente obstrução da luz do endotélio. As integrinas, complexos glicoprotéicos localizadas nas superfícies dos leucócitos e células endoteliais, modulam, em parte, as interações moleculares e intercelulares desencadeadas pela reação inflamatória, e são responsáveis pela adesão dos elementos figurados do sangue ao endotélio.

Neste estudo nós investigamos o papel dos eosinófilos na anemia falciforme. Análises de amostras de sangue periférico de pacientes com anemia falciforme (AF) demonstraram que o valor absoluto do número de eosinófilos estava três vezes maior no sangue periférico destes pacientes comparados aos indivíduos normais. Adicionalmente, eosinófilos isolados do sangue periférico de pacientes com AF demonstrou significativamente maior adesão (aproximadamente 70%) para fibronectina (FN) que os eosinófilos de indivíduos normais em ensaios “in vitro” de adesão estática. Co-incubação de eosinófilos com anticorpos monoclonais específicos para bloqueio da adesão mostrou

que as integrinas VLA-4, LFA-1 e Mac-1 estão envolvidas na adesão de eosinófilos normais e de pacientes falciformes pela fibronectina . A expressão destas integrinas, foi inalterada na superfície dos eosinófilos dos pacientes falciformes, sugerindo que o aumento da adesão nos pacientes com AF é preferencialmente consequência de aumento da afinidade ou avidéz das integrinas do que da expressão. A adesão pela fibronectina nos eosinófilos de pacientes com AF foi aumentada pela citocina GM-CSF, indicando que alguma alteração nos níveis de GM-CSF durante o processo de inflamação pode preferivelmente estimular a adesão dos eosinófilos nestes pacientes. Em contraste, o GM-CSF não alterou a adesão dos eosinófilos normais à fibronectina. Em conclusão, nós apresentamos a primeira evidência experimental para demonstrar que os eosinófilos podem participar no processo de vaso-occlusão de pacientes com anemia falciforme. Estudos adicionais poderão ser necessários para determinar a extensa contribuição destas células neste fenômeno.

ABSTRACT

A role for leukocytes in vasoocclusion is becoming increasingly recognized. Here we investigate a possible role for the eosinophil in sickle cell anemia (SCA). Analysis of whole blood samples of 59 steady-state SCA patients demonstrated that absolute eosinophil numbers were significantly elevated in these individuals. Furthermore, eosinophils isolated from a random selection of these SCA patients demonstrated a significantly greater adhesion (~70 % increased) to fibronectin (FN) than normal eosinophils in static adhesion assays. Co-incubation of eosinophils with integrin-blocking monoclonal antibodies in adhesion assays showed that an association of the VLA-4, LFA-1 and Mac-1 integrins mediate the adhesion of SCA eosinophils to FN. Flow cytometry demonstrated that the expression of these integrins, however, was unaltered on the surface of SCA eosinophils, suggesting that the increased SCA eosinophil adhesion is a consequence of increased integrin affinity or avidity. SCA eosinophil adhesion to FN was further increased by the cytokine, GM-CSF, indicating that inflammation processes may further stimulate eosinophil adhesion in these patients. In conclusion, we report that eosinophil numbers may be significantly increased in SCA individuals and that these cells appear to exist in an activated state. Such alterations may indicate a role for the eosinophil in the vasoocclusive process.

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

1.1 História da Anemia Falciforme

Eritrócitos em forma de foice foram vistos pela primeira vez por Herrick em 1910, no sangue de um indivíduo anêmico de raça negra, embora as manifestações clínicas da doença já fossem conhecidas séculos antes na África Ocidental. No Brasil, a primeira referência a um paciente com anemia falciforme se deve a Castro, em 1933. Pauling e cols. demonstraram em 1949, que indivíduos com o diagnóstico de anemia falciforme possuíam alteração na migração eletroforética da hemoglobina que diferia da normal pela ausência de duas cargas negativas e inauguram, assim, um novo capítulo na medicina: o das moléstias moleculares. Ingram em 1956 demonstrou que a mobilidade eletroforética alterada na HbS era devido a uma herança hereditária que ocasionava alteração na sequência da proteína, com troca do aminoácido valina por um ácido glutâmico.

A doença originou-se na África e foi trazida às Américas pela imigração forçada dos escravos. No Brasil, distribui-se heterogeneamente, sendo mais frequente onde a proporção de antepassados negros da população é maior (nordeste). Além da África e Américas, é ainda hoje encontrada em toda a Europa e em grandes regiões da Ásia. No Brasil, a doença é predominante entre negros e pardos, e também ocorre entre os brancos. No sudeste do Brasil, a prevalência média de heterozigotos (portadores) é de 2,0%.

Uma das características desta doença é a sua variabilidade clínica, com espectro clínico brando até formas mais graves, dependente de fatores hereditários, dependendo do

tipo de mutação que origina a doença, e adquiridos, como níveis sócio econômico, com as consequentes variações nas qualidades de alimentação, de prevenção de infecções e de assistência médica.

Três características geneticamente determinadas tem importância na gravidade da evolução clínica: os níveis de HbF (hemoglobina fetal), a concomitância de alfa-talassemia e os haplótipos associados ao gene da HbS (hemoglobina S). Os níveis de HbF estão inversamente associados com a gravidade da doença. Há cinco diferentes haplótipos associados ao gene da HbS (Senegal, Benin, Banto, Camarões e Árabe- Indiano).

A doença falciforme associada aos haplótipos Senegal e Árabe-Indiano é muito mais benigna do que aquelas associadas aos demais haplótipos. No Brasil predomina o haplótipo Banto seguido pelo Benin, com predomínio de formas mais graves da doença.

1.1.1 Anemia Falciforme

A anemia falciforme é a doença hereditária monogênica mais comum no Brasil. A causa da doença é uma mutação de ponto (GAG→GTG) no gene da globina beta, originando uma hemoglobina anormal, denominada hemoglobina S (HbS), ao invés da hemoglobina normal denominada hemoglobina A (HbA). Esta mutação leva à substituição de um ácido glutâmico por uma valina na posição 6 da cadeia beta, com consequente modificação físico-química na molécula da hemoglobina. Estas moléculas podem sofrer polimerização, com falcização das hemácias, ocasionando encurtamento da vida média dos glóbulos vermelhos, fenômenos de vasocclusão, episódios de dor e lesão de órgãos alvo.

Em geral, os pais são portadores assintomáticos de um único gene afetado (heterozigotos), produzindo HbA e HbS (AS), transmitindo cada um deles o gene alterado para a criança, que assim recebe o gene anormal em homozigose. O nome de anemia falciforme é reservado apenas para indivíduos que têm o gene homozigoto SS.

Esta doença tem como característica anemia crônica, complicações que podem afetar órgãos e sistemas, com expressiva morbidade, redução da capacidade de trabalho e da expectativa de vida. Além das manifestações de anemia crônica, o quadro é dominado por dores abdominais, infecções e enfartes pulmonares, retardo do crescimento e maturação sexual, acidente vascular cerebral, episódios de dores osteoarticulares e fenômenos vaso-oclusivos que levam a crises dolorosas agudas e a lesão tecidual orgânica crônica e progressiva com insuficiência de órgãos alvo.

1.1.2 Fisiopatologia da doença falciforme

A alteração na sequência de aminoácidos da hemoglobina S ocasiona a polimerização de suas moléculas quando reduzidas (desoxigenadas).

Dados experimentais indicam que, como consequência da substituição, poderia ocorrer uma perda da estrutura helicoidal desta região. A HbS na conformação oxigenada é isomorfa à hemoglobina normal, sugerindo que a estrutura das duas moléculas (exceto pela substituição do aminoácido) são similares.

A HbS, quando desoxigenada “in vitro” sob condições próximas as fisiológicas, torna-se menos solúvel e agrega-se em longos polímeros. Estes polímeros resultam do alinhamento de moléculas de HbS unidas por ligações não covalentes, que são

denominadas polimerização, agregação ou gelificação. A polimerização da desoxi-hemoglobina S depende de numerosas variáveis, como concentração de oxigênio, pH, concentração de Hb S, temperatura, pressão, força iônica e presença de hemoglobinas normais.

A polimerização da HbS é o evento fundamental na patogenia da anemia falciforme, resultando na alteração da forma do eritrócito e na acentuada redução de sua deformabilidade. As células rígidas, que assumem a forma de foice, são responsáveis pela oclusão vascular e lesão de tecidos que representam os fenômenos principais dessa doença.

1.1.3 Vaso-oclusão

A vaso-oclusão pode ocorrer quando há lentidão no fluxo dos eritrócitos através dos leitos capilares, com maior desoxigenação da HbS, e consequente maior polimerização.

Como a aderência dos eritrócitos no endotélio vascular poderá impedir o fluxo de sangue e aumentar o tempo de trânsito nos capilares, sugere-se que o aumento da aderência celular pode iniciar e propagar o fenômeno de vaso-oclusão. A rigidez destas hemácias deformadas (Hb em forma de foice) contribuem para oclusão vascular que caracteriza a crise aguda da doença e são a maior causa de morbidade (Davis e Brozovic, 1989; Platt et al., 1994). Os mecanismos patogênicos da vaso-oclusão, permanecem controversos, embora alguns pesquisadores concordam que o aumento da ligação entre os eritrócitos falcizados e o endotélio vascular é um importante fator neste complexo

fenômeno. (Hebbel, 1997). É provável que fatores, tais como, proteínas do plasma, citocinas (Dusti et al., 1998; Kasshau et al., 1996), anormalidades endoteliais (Solovey et al., 1997), e aumento da aderência de hemácias falcizadas para o endotélio vascular (Swerlick et al., 1993; Joneckis et al., 1993; Hebbel, 1997) estejam envolvidos na vaso-oclusão. Outras evidências também sugerem que os leucócitos polimorfonucleares (PMNs) têm papel importante nos fenômenos vaso-oclusivos e na patofisiologia da doença falciforme. Crises de falcização na anemia falciforme são frequentemente associadas com infecção, e leucocitose. A leucocitose tem sido correlacionada com o aumento do índice de morte prematura em crianças com anemia falciforme, síndrome torácica aguda e acidente vascular cerebral (AVC). (Platt et al., 1994; Miller et al., 2000).

Os mecanismos conducentes a vaso-oclusão na anemia falciforme são complexos e ainda não completamente conhecidos. As interações moleculares responsáveis pela adesão das hemácias falcizadas ao endotélio e pelos leucócitos são mediadas por moléculas de adesão (particularmente as integrinas) na superfície das células. Nos leucócitos as principais moléculas de adesão são as integrinas capazes de ligarem-se aos componentes da matriz extra celular e para as camadas endoteliais.

1.2 Moléculas de Adesão-Integrinas

As integrinas são proteínas de superfície celular heterodímeras, constituídas por 2 cadeias polipeptídicas α e β , que atuam como mediadores no processo inflamatório, exercendo importante papel nas etapas de adesão leucocitária, quimiotaxia, fagocitose, adesão endotelial e por fim agregação. Existem inúmeras subfamílias de integrinas e

todos os membros de cada família possuem em comum uma cadeia β , mais uma cadeia α singular.

As integrinas têm um importante papel na embriogênese, resposta imune e na sobrevivência de células malignas. São conhecidas até hoje 16 subunidades α e 8 subunidades β , e várias combinações entre estas subunidades. Como resultado dessas combinações são descritas 20 diferentes tipos de integrinas, subclassificadas dentro de 8 famílias estruturalmente distintas. (MaKagiansar et al., 2002).

A β_1 integrina (subfamília VLA) exerce importante função de adesão, sinalização de moléculas e migração de células durante a embriogênese. A subfamília VLA é composta por 6 membros VLA-1 (CD49a/CD29), VLA-2 (CD49b/CD29), VLA-3 (CD49c/CD29), VLA-4 (CD49d/CD29), VLA-5 (CD49e/CD29) e VLA-6 (CD49f/CD29). As moléculas da subfamília VLA são distribuídas em diferentes tecidos e interagem predominantemente com as proteínas da matriz extracelular, tal como a laminina, colágeno e fibronectina.

O VLA-4 é expresso em monócitos, linfócitos T e B, basófilos e eosinófilos, mas não em neutrófilos. O VLA-4 exerce sua função ancorando a célula ao endotélio por se ligar ao VCAM-1 (molécula de adesão vascular). Os leucócitos também expressam a subfamília β_2 integrina, a qual é composta de 3 distintas moléculas LFA-1 (CD11a/CD18; $\alpha_L\beta_2$), Mac-1 (CD11b/CD18; $\alpha_M\beta_2$) e p150;95 (CD11c/CD18; CR3). Os receptores para a integrina β_2 são membros da superfamília de imunoglobulina (Ig SF), incluindo ICAMs (molécula de adesão intercelular), VCAM-1 (molécula de adesão vascular), PECAM

(molécula adesão de célula endotelial-plaquetária) e MadCam (molécula de adesão à mucosas).

1.2.1 Mecanismos de Adesão de Leucócitos

A adesão de leucócitos aos sítios de inflamação no endotélio envolve um processo de múltiplos passos que é desencadeado pela adesão mediada pela selectina. Esta primeira etapa na qual a expressão de selectina no endotélio é induzida pela inflamação é muito instável, e é seguida pela ativação da integrina β_2 nos leucócitos induzidas por mediadores inflamatórios (produzida pelo endotélio ou pela camada de tecido inflamado) culminando uma forte adesão da integrina β_2 aos seus receptores na parede vascular. As integrinas provêm de forte adesão, mas a especificidade vem do envolvimento de múltiplos receptores (Butcher, 1991; Hynes e Lander, 1992).

O mecanismo pelo qual a adesão de neutrófilos de pacientes com AF esta aumentado não está claro, embora tenha sido demonstrado alterações envolvendo o aumento da expressão de integrinas Mac-1 nestas células (Opkala, 2002). Em adição, as plaquetas e as células mononucleares parecem ter papel na patofisiologia da doença falciforme. Por exemplo, nos pacientes com anemia falciforme, ocorre a ativação plaquetária, geração de trombina e fibrinólise, ocasionando um aumento na duração de episódios de dor. Foi verificado também um aumento da expressão das moléculas de adesão nos linfócitos e monócitos de pacientes com anemia falciforme durante episódios de crise dolorosa. Embora cresçam evidências da participação dos neutrófilos e outros

leucócitos no mecanismo de vaso-oclusão, o papel dos eosinófilos na patofisiologia da AF ainda não foi estudado.

1.3 Eosinófilos

Os eosinófilos foram descritos por Ehrlich em 1879. Esta célula tem por volta de 15 µm de diâmetro. A característica proeminente dos eosinófilos é a presença de grânulos esféricos ou ovóides, que ocupam aproximadamente um quinto do citoplasma (Giembycz e Lindsay, 1999). Estes grânulos contêm material cristalóide eletrodenso com forte afinidade para corantes ácidos como a eosina, o que resulta na coloração alaranjada característica dos grânulos citoplasmáticos dos eosinófilos (Miller et al., 1966). Quatro distintas populações de grânulos tem sido consideradas: grânulos secundários, grânulos pequenos, grânulos primários e corpos lipídeos (Giembycz e Lindsay, 1999). Os grânulos secundários, que são os mais importantes, contêm a proteína básica principal (MPB), que é a mais abundante, a proteína catiônica eosinofílica (ECP), a peroxidase eosinofílica (EPO) e a neurotoxina ou proteína X derivada do eosinófilo (EDN ou EPX) (Gleich e Adolphson, 1986). A EPO é um membro da família da haloperoxidase, localizada exclusivamente na matriz dos grânulos secundários (Egesten et al., 1986; Enomoto e Kitani, 1986). Nos eosinófilos humanos a EPO representa cerca de 5% do total de grânulos protéicos (Carlson et al., 1985; Venge, 1993). As propriedades e o nível de expressão da EPO são os mesmos nos eosinófilos purificados de indivíduos normais e indivíduos com eosinofilia (Bos et al., 1981). Mais da metade dos outros grânulos dos

eosinófilos são de proteínas básicas, as quais podem exercer função citotóxica aos parasitas bem como para células de mamíferos normais.

Os eosinófilos sintetizam proteoglicanas e IL-6. O massivo aumento dos eosinófilos nos indivíduos humanos é desencadeado pela associação à infecções parasitárias helmínticas com dependência de células T. Três citocinas derivadas de células T, como a interleucina 3 (IL-3), interleucina 5 (IL-5) e o fator estimulador de colônia de granulócito-monócitos (GM-CSF), têm efeito sobre a proliferação e a maturação dos eosinófilos (Hansel et al.; 1989). Após um período de diferenciação e maturação que dura cerca de 5 dias, os eosinófilos maduros deixam a medula óssea e passam a circular no sangue periférico; sendo que no sangue apresentam uma meia vida de 13-18 horas, e só então migram para os tecidos onde tem vida média de 6 dias (Parwaresh et al., 1976; Kroegel et al., 1994).

Os eosinófilos expressam receptores de membrana como todos os leucócitos. Isto inclui receptores de adesão, receptores Fc e receptores para a ligação de mediadores solúveis. O passo inicial na migração do espaço vascular para o tecido extracelular é a aderência ao endotélio vascular. Esta aderência é mediada por ligação dos receptores de adesão, na superfície dos leucócitos, aos seus ligantes no endotélio.

Os eosinófilos acumulam seletivamente nos sítios de inflamação alérgica e seu recrutamento é dependente tanto da expressão como da atividade funcional das moléculas de adesão na superfície destas células. O mecanismo que regula a expressão e função das moléculas de adesão necessárias à migração transendotelial nos tecidos pelos eosinófilos, contudo, é pobremente entendida na gênese da anemia falciforme.

A integrina VLA-4, expressa na superfície dos eosinófilos, interage com o VCAM-1 no endotélio, formando uma ponte de ligação importante para a fase inicial de adesão dos eosinófilos (Jonson et al., 1995). Enquanto que o LFA-1 e o Mac-1 se ligam a ICAM-1 (moléculas de adesão intercelular) e são importantes para o extravasamento dos eosinófilos nos tecidos (Nakao et al., 1994; Bloemen et al., 1996). Tanto o Mac-1 como o VLA-4 são conhecidos como importantes mediadores da função quimiotática e adesivas dos eosinófilos; o Mac-1, atua na degranulação e superoxidação de ânions, na produção de GM-CSF e de PAF (fator ativador de plaquetas) (Horie e Kita, 1994).

Estas considerações e a importância dos leucócitos nos mecanismos vaso-oclusivos levaram-nos a investigar a atuação do papel dos eosinófilos no fenômeno de vaso-oclusão da AF. Seguindo a observação que a contagem de eosinófilos em pacientes com anemia falciforme foram significativamente mais elevada do que os indivíduos sadios (controles), foram isolados os eosinófilos do sangue periférico de indivíduos sadios (HbAA) e de pacientes portadores de HbSS. Foram testadas a adesão destes eosinófilos para o componente da matriz extracelular, a fibronectina (FN), e comparada a diferença de adesão existente entre os dois grupos controle e paciente, sob as mesmas condições. Os efeitos de citocinas sobre a adesão dos eosinófilos foram testadas e as moléculas de adesão envolvidas neste processo foram investigadas.

OBJETIVOS

2- OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Face ao exposto este projeto tem por objetivo comparar a expressão e função das integrinas em eosinófilos de pacientes com anemia falciforme e em eosinófilos de indivíduos normais.

2.1.1 Objetivos específicos

a) Comparar o número absoluto de eosinófilos no sangue periférico de indivíduos controles e de pacientes com anemia falciforme.

b) Comparar a adesão “in vitro” de eosinófilos de pacientes com anemia falciforme e indivíduos normais à FN utilizando ensaios de adesão estática.

c) utilizar anticorpos específicos para as subunidades α das integrinas VLA-4, Mac-1 e LFA-1 e imediatamente realizar o ensaio de adesão com o intuito de elucidar quais moléculas de adesão estão envolvidas na adesão de eosinófilos à FN tanto na população de controles como na população de pacientes com AF.

d) Estimular as células com as citocinas (agentes sinalizadores) IL-8 (interleucina 8), GM-CSF e RANTES e imediatamente processar o ensaio de adesão para comparar as

diferenças na adesão das moléculas de adesão (*in vitro*) em pacientes com anemia falciforme e indivíduos controle.

e) Mensurar a expressão celular dos antígenos VLA-4, Mac-1 e LFA-1 na membrana de eosinófilos de indivíduos controle e pacientes com anemia falciforme por citometria de fluxo.

MATERIAL E MÉTODOS

3- MATERIAL E MÉTODOS

O sistema MidiMACs junto com as colunas magnéticas e as microbeads foram compradas da Miltenyi Biotec Inc. (California, USA). Os anticorpos IgG controle negativo (W3/25), o anti CD49d (HP2/1), o anti CD11b (ICRF44) conjugado com FITC (fluoresceína isotiocianato) e o RPE (R-ficoeritrina) foram adquiridos da Serotec, Oxford. UK. O anti CD11a (MHM24) e o anti CD29 (K20) foram obtidos da DAKO.

A IL-8 recombinante humana (CXCL8), o GM-CSF e o RANTES (CCL5) foram adquiridos da R&D Systems (Minneapolis, USA). A fibronectina foi comprada da Invitrogen (California USA). Todos os outros produtos foram obtidos da Sigma Co. (St. Louis, USA).

O estudo foi realizado no Hemocentro de Campinas UNICAMP.

3.1 Casuística

3.1.1 Pacientes e Controles

Foram selecionados os pacientes com SS diagnosticados pelo hemocentro da Unicamp utilizando os métodos de eletroforese de hemoglobina e cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) (Variant II- Bio-Rad).

Após a entrevista e a aceitação em participar do protocolo de pesquisa, o indivíduo (pacientes com AF e controles) assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido. Foram coletadas 30 ml de amostras de sangue periférico de 59 pacientes com anemia falciforme do ambulatório de hemoglobinopatias em fase estável, na ausência de infecção ou processos inflamatórios e alérgicos e sem transfusão prévia nos três meses precedentes ao estudo.

Para a observação das características clínicas de todos os pacientes, observar a Tabela I nos resultados.

48 indivíduos saudáveis foram usados como controles (idade entre 20 a 50 anos). Tanto os controles como os pacientes apresentaram teste negativo para pesquisa de parasitas nas fezes e nenhum deles apresentava quadro atópico ou de asma.

3.2 Contagem de Eosinófilos no Sangue Periférico

A contagem de eosinófilos dos pacientes com anemia falciforme e indivíduos controles foi realizada utilizando o sistema de contagem diferencial de células (leucócitos) Advia Hematology System (Bayer Corp. Ireland).

3.3 Isolamento dos Eosinófilos

Os eosinófilos foram isolados de sangue periférico. Resumidamente, 30 ml de sangue foram coletados (em heparina) de indivíduos saudáveis e de indivíduos com o diagnóstico de anemia falciforme. O sangue foi diluído 1:2 com PBS (salina fosfatada

tamponada) e 30 ml deste sangue diluído foi colocado em cima de 15 ml de Percoll (1088g/ml, pH=7,4 340mosmol/Kg H₂O). Gradientes foram obtidos após centrifugação a 700xg durante 20 minutos a 4°C. O anel contendo hemácias e granulócitos foi coletado. Em seguida, o pellet de granulócitos foi obtido após lises das hemácias com tampão de lise (155mM NH₄ Cl, 10 mM KHCO₃). Os granulócitos obtidos contêm basicamente neutrófilos e eosinófilos. Os eosinófilos diferentemente dos neutrófilos não expressam o antígeno CD16 em sua superfície. Baseado nestas características, os granulócitos após 2 lavagens em PBS foram incubados com anti CD16 conjugado a microbeads (Miltenyi Biotec Inc; German) durante 30 minutos a 4°C. Em seguida, os granulócitos foram passados em uma coluna, submetidos a uma força magnética (Miltenyi Biotec Inc; German). Os eosinófilos foram então coletados por seleção negativa no eluente. Os eosinófilos foram ressuspensos em meio Essencial Eagles médio pH= 7,2 (MEM) (pureza > 95% de eosinófilos).

3.3.1 Preparação de lâminas em citocentrífuga

Após a separação dos eosinófilos foi realizado a contagem automática destas células para aferir a concentração de eosinófilos. Adicionalmente, 100µl da suspensão de células de cada amostra (10⁶/ml) controle e paciente foram colocadas no recipiente da citocentrífuga (Shandon Cytospin 3) e submetidas a centrifugação a 400 rpm durante 5 minutos. Em seguida as lâminas foram secas em temperatura ambiente e coradas com solução de Leishman (Sigma Chemical Company, ST Louis, Mo) por 15 minutos e a

pureza da suspensão de eosinófilos confirmadas. As lâminas foram visualizadas em microscopia óptica comum, em imersão (aumento de 1000x).

3.4 Ensaios de Adesão

3.4.1 Teste da Adesão Celular dos Eosinófilos

Placas com 96 poços com fundo plano foram preparadas por “coating” individual com 60µl do ligante desejado (20µg/ml fibronectina em PBS) “overnight” a 4°C. Os poços da placa foram lavados duas vezes com 100µl de PBS. Os sítios inespecíficos da placa foram bloqueados com 100 µl de PBS/BSA a 1% por 90 minutos a 37°C. Novamente foi realizada 2 lavagens com 100µl de PBS. Depois de secas, adicionamos aos poços da placa, um volume de 50µl de meio de cultura (MEM) contendo os eosinófilos na concentração de 5×10^5 células/ml. A partir daí, os eosinófilos entram em contato com a FN, existentes nas placas, iniciando-se o processo de adesão. Foi determinado um período de 60 minutos à 37°C 5% CO₂ para a adesão das células à FN. Depois da incubação, as células que não aderiram à FN, nos poços da placa, foram removidas com 2 lavagens com 100µl de PBS. Por fim, colocamos um volume de 50µl de meio de cultura MEM nestes poços, onde foi realizado o ensaio de adesão. Este mesmo procedimento foi realizado tanto com os eosinófilos de pacientes com AF como para os eosinófilos dos indivíduos controles.

Para mensurar a quantidade de eosinófilos, que adere à FN, realizamos uma curva padrão. Para construir a curva, adicionamos concentrações variando de 0-100% da suspensão original de células (5×10^5 células/ml) em 50µl de MEM.

A solução de revelação utilizada no ensaio de adesão é a solução de substrato de EPO (1mM H_2O_2 , 1 mM o-phelylenediamine e 1% de Triton X-100 em tampão Tris pH= 8,0). Este EPO (peroxidase eosinofílica) é uma enzima que está inserida nos eosinófilos e quando em contato com o substrato o-phelylenediamine e juntamente com a água oxigenada, ocorre uma reação de peroxidase colorimétrica. Nesta reação é possível detectar a quantidade de EPO contido nos eosinófilos, e portanto a quantidade de eosinófilos que estava aderida à placa. Podemos dizer então que a adesão dos eosinófilos foi calculada por medição residual da peroxidase eosinofílica (EPO) atividade da aderência celular (Nagata et al 1995).

Basicamente 50 μ l de substrato de EPO foi adicionado em todos os poços da placa (reação de adesão + poços da curva padrão). Depois de 30 minutos de incubação sob agitação à temperatura ambiente, 25 μ l de H_2SO_4 a 4M foram adicionadas aos poços da placa, a fim de interromper esta reação de revelação colorimétrica. A leitura da placa foi realizada em leitor de Elisa (multiscan MS, Labsystems EUA). Este equipamento de Elisa foi programado para que a leitura fosse realizada na absorvância de 490nm e então as densidades ópticas (D.O.) foram registradas. Aderência celular foi calculada por comparação da absorvância das amostras com a curva padrão.

3.4.2 Tratamento dos Eosinófilos antes da Execução do Teste

As células ressuspensas em MEM foram tratadas com diferentes estímulos (IL-8, RANTES e GM-CSF) e anticorpos bloqueadores, contra as subunidades específicas das

integrinas (VLA-4, Mac-1 e LFA-1) imediatamente antes da execução do teste de adesão ou antes da execução do teste de citometria de fluxo.

3.5 Citometria de Fluxo

A expressão das moléculas de adesão na superfície dos eosinófilos foi detectada através da citometria de fluxo. Eosinófilos isolados ($100\mu\text{l}$ de 5×10^6 células/ml) foram incubados em concentração saturada de anticorpo monoclonal da molécula de adesão ou controle (anticorpo de isotipo semelhante) adequado conjugado com fluoresceína isotiocianato (FITC) ou R-ficoeritrina (RPE) por 20 minutos à temperatura ambiente na ausência de luz.

Os anticorpos monoclonais foram usados nas seguintes diluições: anti CD11a conjugado com FITC 1:20; anti CD49d conjugado com FITC 1:10 e anti CD11b conjugado com R-PE 1:20 e anticorpo IgG controle nas mesmas diluições.

Após centrifugação ($300 \times g/10\text{min}$) e remoção do sobrenadante, as células foram lavadas duas vezes com PBS e fixadas com $500\mu\text{l}$ de paraformaldeído a 1%. Os eventos foram adquiridos no citômetro FACScalibur (Becton-Dickinson San Jose CA). As análises foram realizadas na região de eosinófilos, definidas baseadas nas características de complexidade citoplasmática (SSC) e tamanho celular (FSC). Em seguida, a média de intensidade de fluorescência (MFI) para cada antígeno pesquisado foi aferida e utilizada para comparação da expressão do antígeno em relação aos indivíduos controles e o controle negativo (isotipo controle).

3.6 Análise estatística

Para todas as amostras, as condições de normalidade das distribuições foram testadas, e se as variáveis em todos os grupos não apresentavam distribuição normal, foram exigidas transformações matemáticas prévias. Os resultados foram expressos como média +/- erro padrão da média e os dados de cada grupo foram comparadas utilizando o teste de Mann-Whitney com uma significância estabelecida de ($p < 0.05$). O “Student test” (test t) foi utilizado para comparar grupos específicos. Todos os cálculos foram efetuados utilizando-se o programa GraphPad InStat.

RESULTADOS

4- RESULTADOS

4.1 Características clínicas dos pacientes

Tabela 1. Detalhes Clínicos dos pacientes com anemia falciforme que participaram do estudo.

	Média (mediana, min, max)	Referencial (♂/♀)
Masculino / Feminino	22/37	
Idade (anos)	31.9 (32, 11, 50)	
Hemácias no. ($\times 10^6/\mu\text{l}$)	2.70 (2.67, 1.5, 4.96)	4.4/3.9
Hematócrito (%)	24.6 (24.4, 15.2, 33.2)	41.0/36.5
Hemoglobina (g/dl)	8.08 (7.9, 5.3, 11.2)	14.0/12.0
Volume corpuscular médio (fl)	91.6 (91.0, 69.4, 108.9)	90/80-90
Hemoglobina corpuscular média (μl)	30.4 (30.5, 18.0, 37.2)	31-34
HbF (%)	6.50 (6.27, 0.80, 17.6)	0-2

4.2 Contagem absoluta dos eosinófilos em pacientes com anemia falciforme e controles

Foi realizado o hemograma em todas as amostras de sangue periférico coletadas com heparina. A contagem diferencial foi realizada tanto no sangue de pacientes como no sangue dos controles (indivíduos sadios). Números absolutos de eosinófilos foram significativamente maior na população de pacientes do que na população dos controles. O número médio de eosinófilos foi $0.475 \pm 0.041 \times 10^9$ células/L nos pacientes com anemia falciforme (com variação de 0.070 - 1.330×10^9 células/L; $n=59$) e para a população de controles, o número médio de eosinófilos foi $0.159 \pm 0.018 \times 10^9$ células/L (com variação de 0.010 - 0.720×10^9 células/L; $n=48$) $p < 0.0001$. Por favor , ver figura 1.

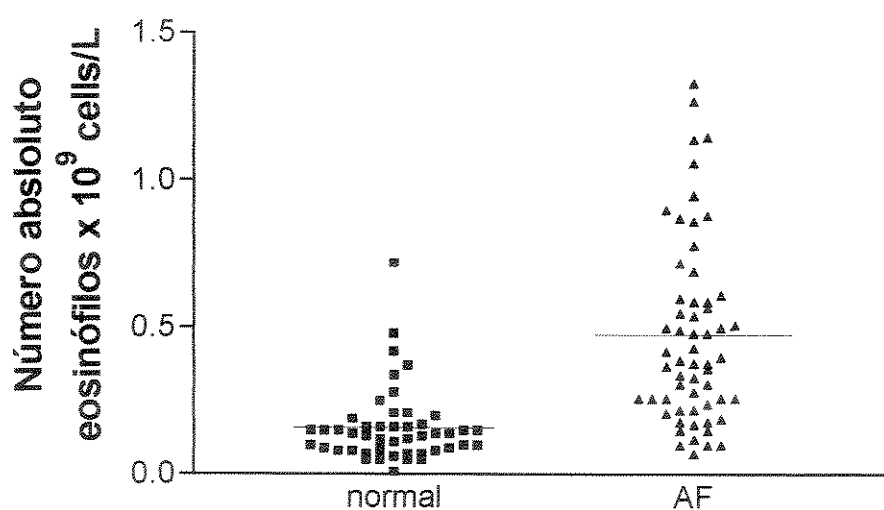
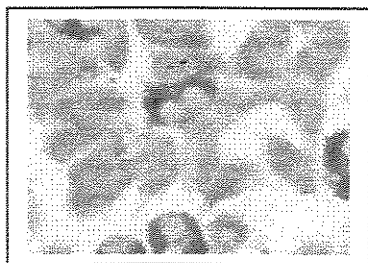


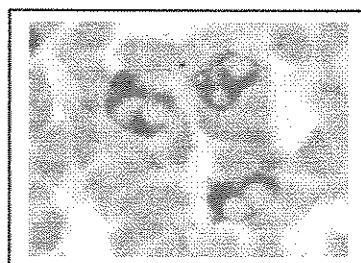
Figura 1. Contagem dos eosinófilos no sangue de indivíduos sadios e pacientes com anemia falciforme $n=48$ e $n=59$, respectivamente. A contagem diferencial das células brancas (leucócitos) foram realizadas usando o Advia Hematology System. $p < 0.001$.

4.3 Isolamento dos eosinófilos

Os eosinófilos foram obtidos a partir de sangue periférico total em 2 etapas: a primeira etapa os granulócitos foram isolados do sangue periférico pelo método de Percoll Gradiente (1088g/ml, pH 7,4; 340 mosmol/Kg H₂O). Figura 2; e na segunda etapa somente os eosinófilos foram separados dos neutrófilos após passar em coluna magnética com auxílio de anticorpo específico CD16. Figura 3.



(A)



(B)

Figura 2: Isolamento dos granulócitos. Fotos ilustrativas das lâminas controle (A) e paciente (B) com presença das células granulocíticas após centrifugação e separação utilizando-se o Percoll Gradiente. Pureza das amostras: 90% de neutrófilos e 10% de eosinófilos

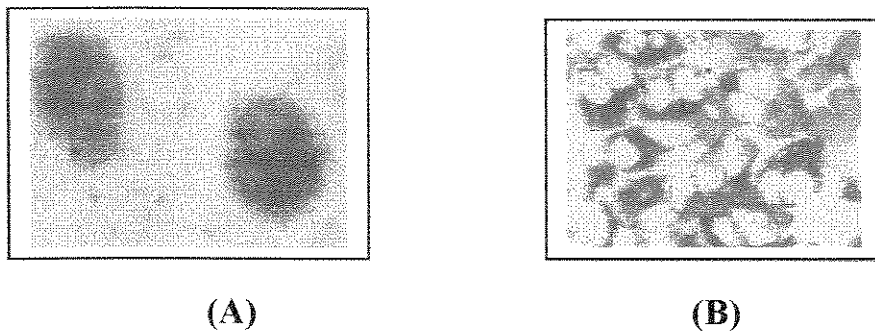


Figura 3: Isolamento dos eosinófilos. Fotos ilustrativas das lâminas controle (A) e paciente com anemia falciforme (B) após separação dos eosinófilos na coluna magnética MidiMACS. Note a presença de eosinófilos purificados (> 95%).

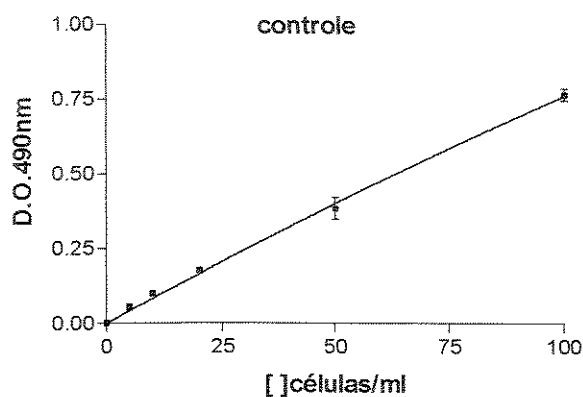
4.4 Ensaios de Adesão Celular dos Eosinófilos

4.4.1 Padronização do método do ensaio de adesão à FN

A curva padrão foi efetuada adicionando variadas concentrações da suspensão original (0.5×10^6 cel/ml) das células do controle e paciente para a placa (0-100%). A adesão dos eosinófilos foi calculada por medição residual da peroxidase eosinofílica. A atividade das células aderentes e adesão foi calculada por comparação de desconhecidos para tal curva padrão. Abaixo está o exemplo de como foi realizada a curva padrão Fig4.

	célula (μ l)	MEN
0%	0	100
5%	8	152
10%	16	144
20%	32	128
50%	60	60
100%	100	0

A)



B)

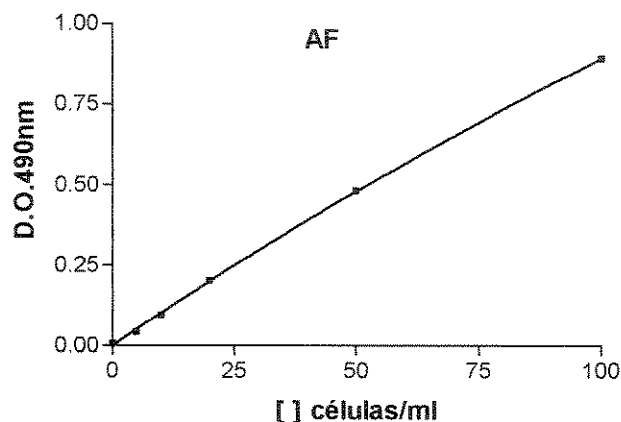


Figure 4. Curvas padrões típicas de células controle(A)/paciente(B). Foi realizada a curva padrão com diferentes concentrações de células em 50µl de MEN. Após efetuar a curva foi realizada a leitura da placa em leitor de Elisa na absorvância de 490nm. Esta curva é a referência de porcentagem de adesão dos eosinófilos aderidos à placa.

4.4.2 Padronização do tempo de adesão à FN

Curvas para estabelecer o tempo ideal de adesão dos eosinófilos à FN. Este experimento foi realizado tanto para as células controles como para as células de pacientes. A adesão dos eosinófilos (37°C 5%CO₂) à FN foi observada nos tempos de 0, 15, 30, 45, 60, 75 e 90 minutos. Para esta padronização foram utilizadas 60 µl de FN em cada poço na concentração de 20µg/ml FN em PBS. 60 minutos foi adotado como o tempo padrão para os ensaios de adesão. Figura 5.

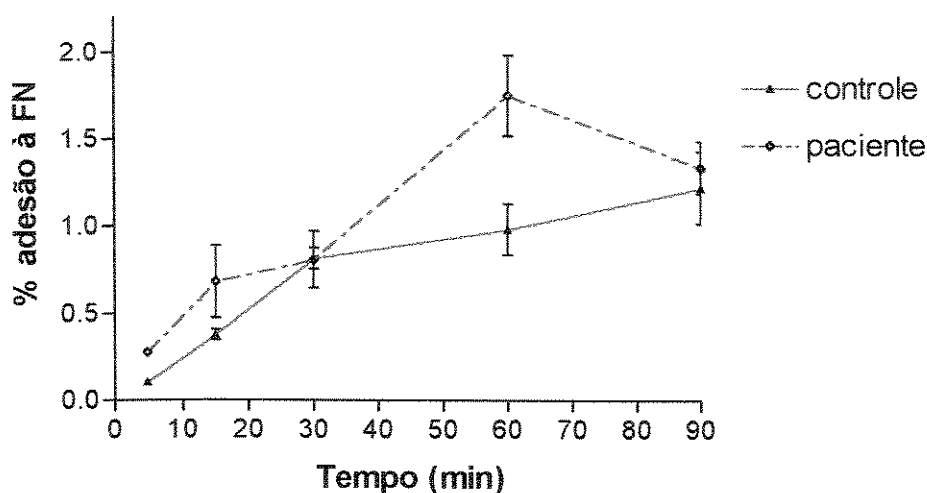


Figura 5. Curva típica realizada para a determinação do tempo (min) adotada para o ensaio de adesão dos eosinófilos à fibronectina (20 μ g/ ml).

50 μ l de células na concentração 5×10^5 foram adicionadas nos poços da placa com FN e incubadas a 37C, 5% CO₂ em diferentes períodos de tempo (0-90 minutos). Depois da incubação, as células que não aderiram foram removidas e a porcentagem de adesão celular foi calculada por comparar a atividade da peroxidase eosinofílica das células aderidas com a curva padrão (figura 4).

4.4.3 Padronização da concentração de fibronectina para o ensaio de adesão

Curvas para estabelecer qual a concentração ideal de FN utilizada para cobrir a placa e promover a adesão dos eosinófilos à FN. Este experimento foi realizado tanto para as células controles como para as células de pacientes. Esta padronização é necessária para identificar a concentração ideal de fibronectina que será usada em todos

os ensaios. A adesão dos eosinófilos foi observada nas concentrações de 0, 20, 40, 60, 80, 100 $\mu\text{g/ml}$ de FN em PBS. A concentração de 20 $\mu\text{g/ml}$ de FN foi adotada para todos os ensaios de adesão. Observar a figura 6.

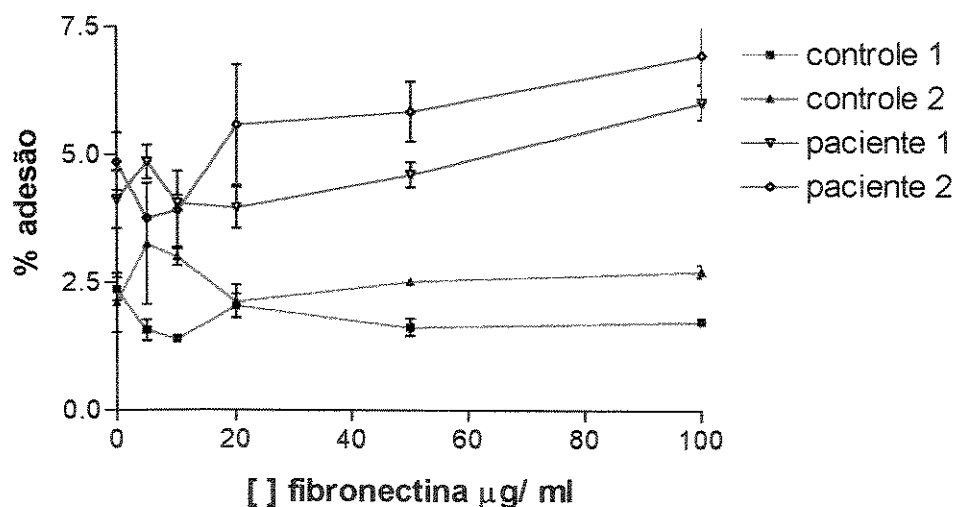


Figura 6. Adesão dos eosinófilos à fibronectina. Células na concentração de $0,5 \times 10^6$ /ml foram adicionadas nos poços da placa contendo variadas concentrações de fibronectina e então incubadas a 37°C, 5% CO_2 . Depois da incubação, as células que não aderiram foram removidas e a porcentagem de adesão celular foi calculada e a atividade da peroxidase eosinofílica das células aderidas foi comparada com a aquela curva padrão (figura 4).

4.4.4 Adesão dos eosinófilos controles e pacientes à fibronectina

Em ensaio estático de adesão, os eosinófilos de pacientes com anemia falciforme demonstraram significativamente maior adesão à fibronectina (20 $\mu\text{g/ml}$). A adesão dos eosinófilos de pacientes com anemia falciforme à FN foi $10.23 \pm 1.45 \%$ ($n= 31$) enquanto que a adesão dos eosinófilos de indivíduos controles à FN foi $6.00 \pm 0.80 \%$ ($n= 25$; $P = 0.02$). Observar a figura 7.

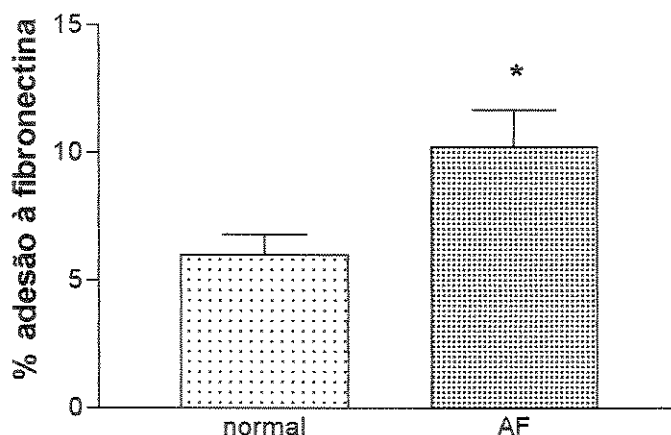


Figura 7. Foram adicionados 50 μl de eosinófilos (5×10^5 células/ml) nos poços da placa contendo FN (20 $\mu\text{g/ml}$). As células foram incubadas durante 1 hora a 37°C, 5% CO_2 . Depois da incubação, as células que não aderiram foram removidas com lavagens com PBS e a porcentagem de adesão celular foi calculada por comparação da atividade da peroxidase eosinofílica das células aderentes dos desconhecidos para aquela curva padrão. Resultados são expressos como a média da porcentagem de células aderidas do

total de números celulares +/- erro padrão da média n=25 e n=31, respectivamente. Os experimentos foram realizados em triplicata. *p<0,05 comparado com a adesão do controle.

4.4.5 Efeito “in vitro” das citocinas IL-8 e Rantes na adesão dos eosinófilos à fibronectina

Eosinófilos isolados de pacientes com AF e indivíduos controles foram estimulados com IL-8 e Rantes e imediatamente adicionados à placa para aderir à fibronectina durante 60 minutos a 37°C 5% CO₂.

As citocinas IL-8 (1, 10 e 100 ng/ml n=7) e RANTES (1, 10 e 100 ng/ml n=7) não tiveram nenhum efeito significativo na adesão dos eosinófilos controles como nos eosinófilos de pacientes à fibronectina.

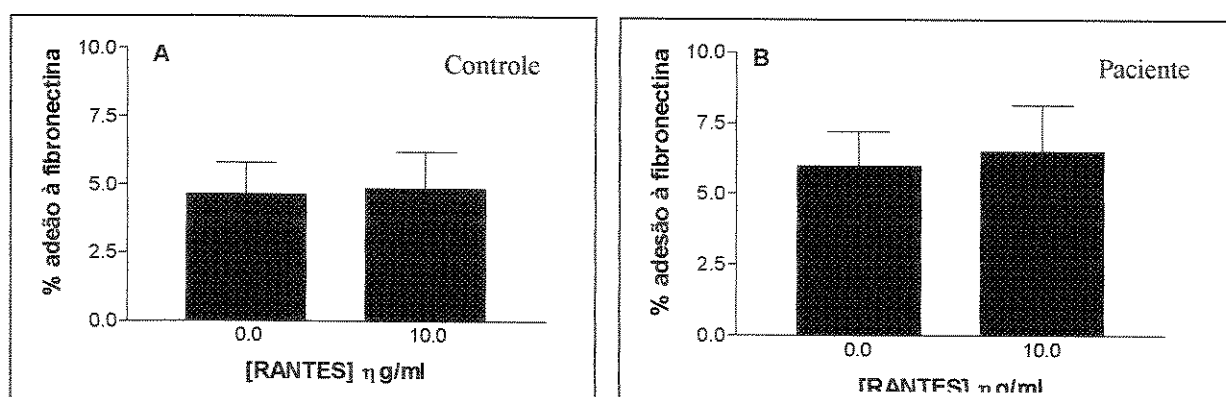


Figura 9. As figuras A (controle) e B (paciente) mostram uma das concentrações de RANTES (10.0ng/ml) utilizadas nos eosinófilos do sangue periférico para o ensaio de adesão à fibronectina no tempo de 1 hora de incubação a 37°C 5%CO₂. Não houve

diferença significativa na adesão de célula tratadas para fibronectina $p < 0,05$ comparado com células não tratadas.

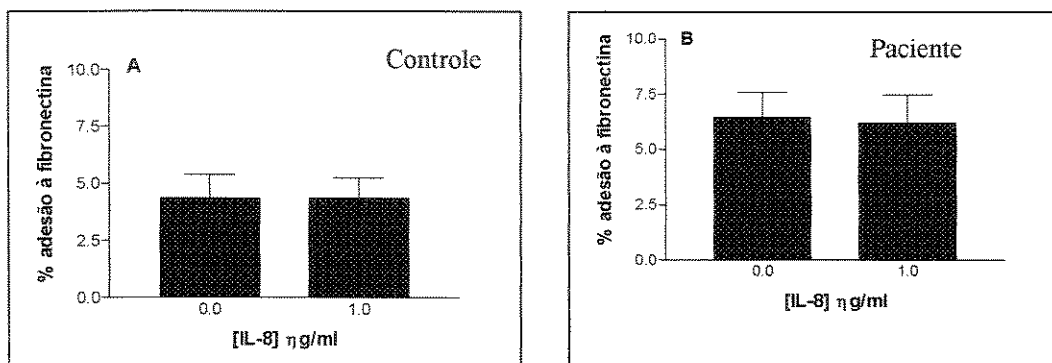


Figura 10. As figuras A (controle) e B (paciente) mostram uma das concentrações utilizadas de IL-8 (1.0 ng/ml) nos eosinófilos de sangue periférico no ensaio de adesão à fibronectina no tempo de 1 hora de incubação a 37°C 5%CO₂.

Não houve diferença significativa na adesão de células para fibronectina $p < 0,05$ comparado com células não tratadas

4.4.6 Efeito do GM-CSF na adesão de eosinófilos de indivíduos controles e SS à FN.

Em contraste ao dados acima, a co-incubação dos eosinófilos de pacientes com GM-CSF (60 min, 37°C 5%CO₂) significativamente aumentou a adesão dos eosinófilos de pacientes à FN na presença 0.1ng/ml de GM-CSF. Inversamente a adesão de eosinófilos controles à FN, não resultaram em nenhum efeito quando incubados com GM-CSF em 3 diferentes concentrações (0.1, 1.0 e 10.0 ng/ml) e sob as mesmas condições. Observar as figuras 11 A / B.

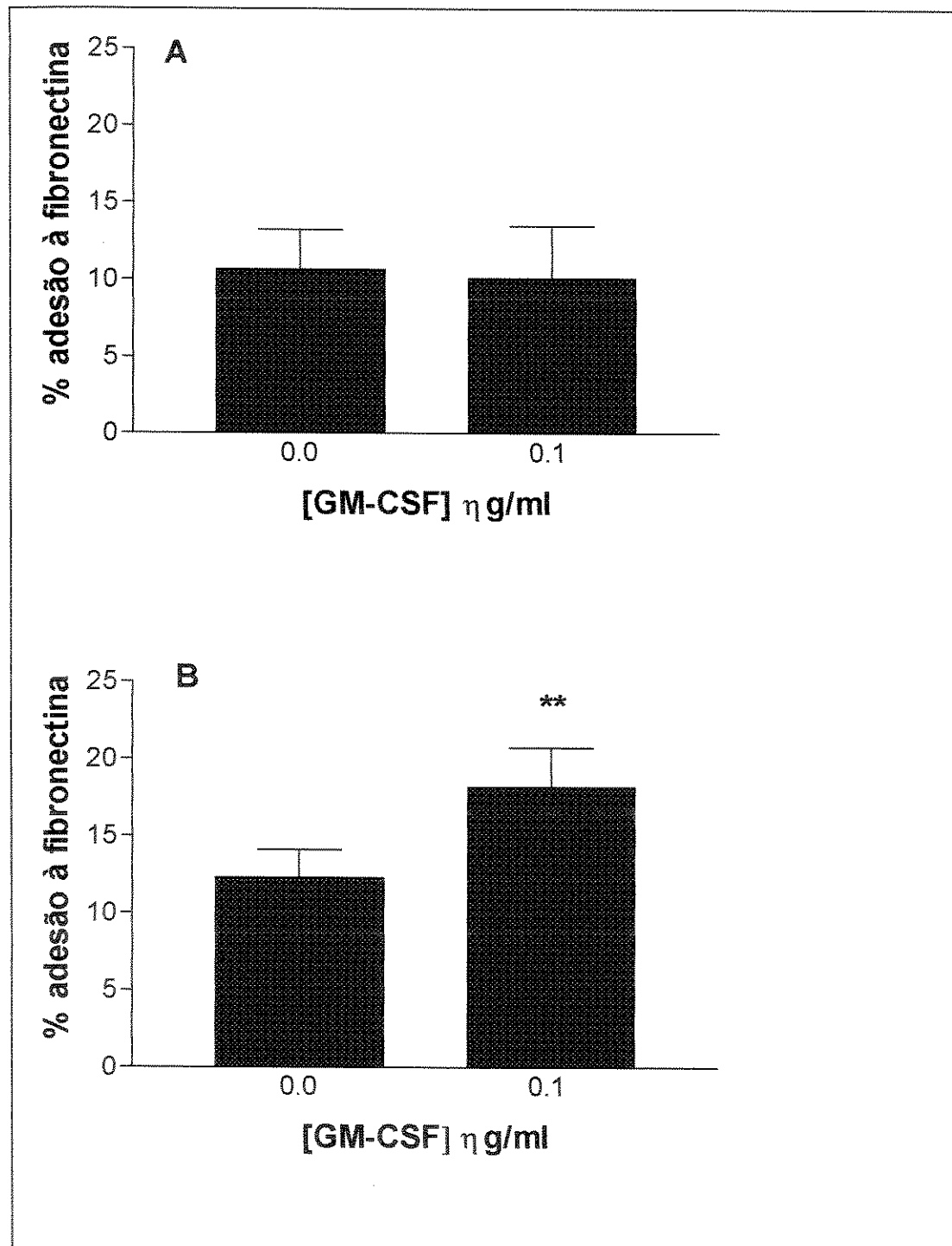


Figura 11. Efeito do GM-CSF (0.1 ng/ml) sob a adesão dos eosinófilos de indivíduos (A) controle e (B) pacientes com AF à fibronectina. Os eosinófilos foram tratados com

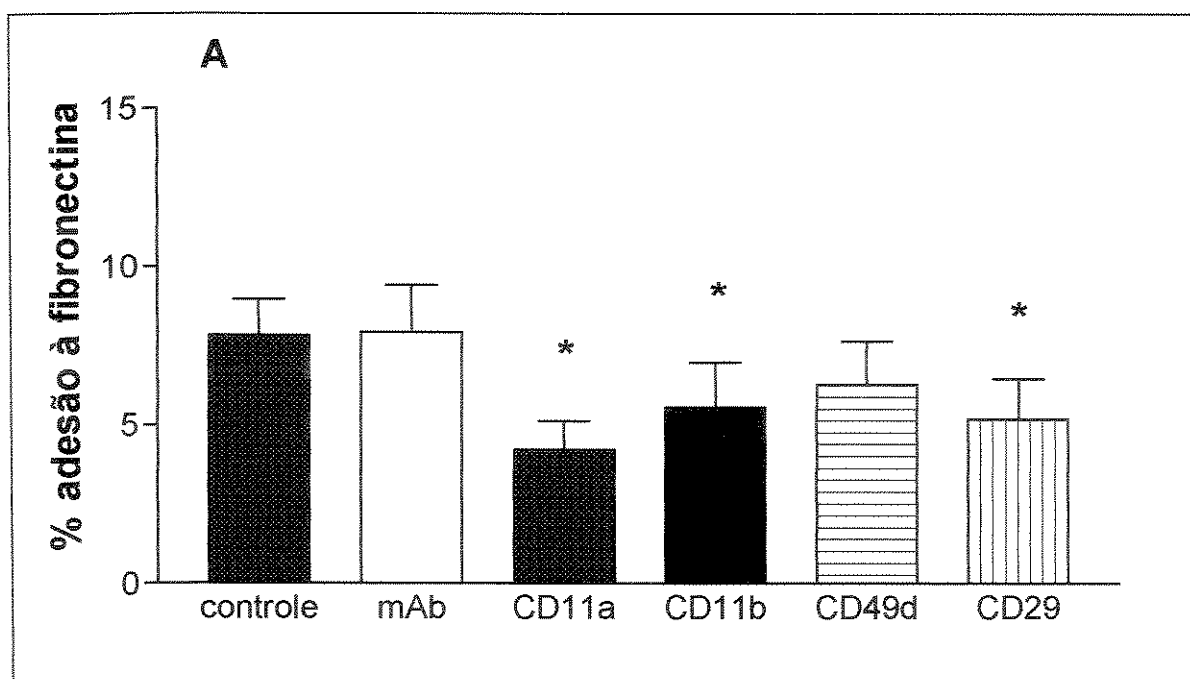
GM-CSF e imediatamente adicionados à placa de 96 poços tratadas (coating individual) com fibronectina (1h, 37°C, 5% CO₂). n=7. **, P<0.01; comparado para adesão basal do controle; pareado t-teste.

4.4.7 Efeito do bloqueio com anticorpos específicos para as integrinas na adesão de eosinófilos controles/pacientes à FN.

Quando as células foram tratadas com anticorpos específicos contra as subunidades α e a subunidade β 1 das integrinas, ocorreu o bloqueio destas moléculas. A inibição da adesão dos eosinófilos à fibronectina por esses anticorpos demonstra a especificidade do ensaio (ex: que as células não estão aderindo por consequência de cargas), e também pode delinear qual ou quais moléculas de adesão estão mediando a adesão dos eosinófilos à FN.

Eosinófilos controles e de pacientes foram co-incubados (60 minutos, a 37°C 5%CO₂) com anticorpo bloqueador monoclonal específico (10µg/ml concentração otimizada) para as subunidades das moléculas de adesão CD11a (MHM24), CD11b (ICRF44) CD49d (HP2/1) e CD29 (K20), ou um anticorpo não específico controle IgG (W3/25) nos ensaios de adesão à FN. A adesão de eosinófilos controles à FN foi significativamente inibida por anti-CD11a (LFA-1, subunidade α) mAb, anti CD11b (Mac-1, subunidade α) e anti CD29 (subunidade β ₁ integrina). O anti-CD11a, o anti-CD11b, o anti-CD29 e o anti-CD49d (VLA-4, subunidade α) significativamente inibiu a adesão basal dos eosinófilos de pacientes com anemia falciforme. Observar as figuras 12 A e B.

Os resultados demonstram que basicamente as integrinas LFA-1 e Mac-1 estão envolvidas na adesão dos eosinófilos controles e de pacientes à FN. O envolvimento da VLA-4 (α e β subunidades) na adesão dos eosinófilos de pacientes à FN é sugerido pelo fato dos anticorpos (HP2/1; K20) inibirem significativamente a adesão das mesmas à FN. Nos eosinófilos controles o anticorpo contra a subunidade α da VLA-4 (CD49d) não chegou a bloquear a adesão das células à FN significativamente. Porém, o fato do anticorpo contra a subunidade β (CD29) da VLA-4 inibir a adesão à FN significativamente, sugere que a integrina VLA-4 também está envolvida na adesão dos eosinófilos controles à FN.



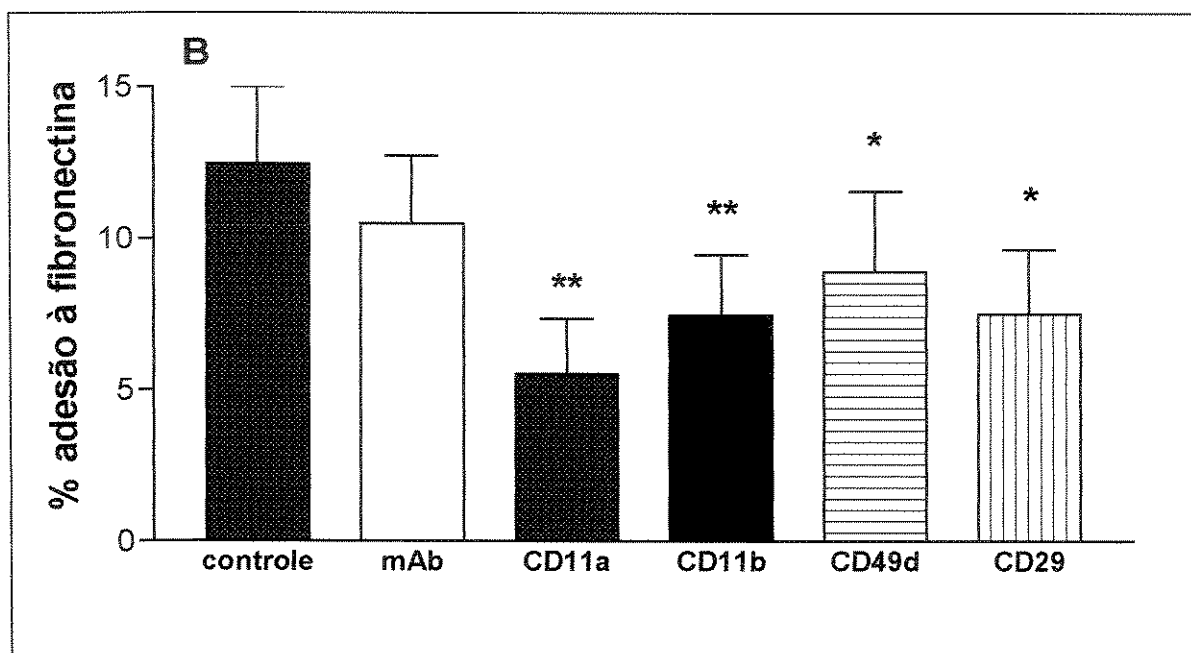


Figura 12. Efeito dos anticorpos bloqueadores sob a adesão de eosinófilos (A) controles e (B) pacientes com AF à fibronectina. Eosinófilos foram co-incubados com anticorpos monoclonais anti-CD11a (MHM24, 10 $\mu\text{g/ml}$); anti-CD11b (ICRF44, 10 $\mu\text{g/ml}$); anti-CD49d (HP2/1, 10 $\mu\text{g/ml}$); anti-CD29 (K20, 10 $\mu\text{g/ml}$) e controle negativo (mAb, 10 $\mu\text{g/ml}$) não específico anticorpo monoclonal não específico controle, durante os ensaios de adesão (1 h, 37°C, 5% CO_2). Resultados são expressos como porcentagem da adesão das células à fibronectina $\pm$ SEM. n=7. *, $P<0.05$; **, $P<0.01$; comparado com a adesão basal das células não tratadas.

4.5 Expressão das integrinas na superfície de eosinófilos controles e eosinófilos de pacientes.

A expressão das integrinas VLA-4, Mac-1, LFA-1 na superfície de eosinófilos em controles e pacientes foi determinada por citometria de fluxo.

Os anticorpos específicos para CD49d (VLA4 subunidade α) e CD11a (LFA-1 subunidade α) foram comprados já conjugados com FITC, enquanto o anticorpo específico para CD11b (Mac-1 subunidade α) foi comprado já conjugado com R- PE. O controle negativo utilizado foi um anticorpo monoclonal de coelho anti camundongo conjugado com FITC e R-PE. Os resultados são expressos como intensidade média de fluorescência (MFI) que demonstra a quantidade em unidades de fluorescência de cada subunidade de integrina expressa na superfície de cada célula relativo às células incubadas com o anticorpo controle negativo.

Não foi observada nenhuma significância estatística nos valores de expressão das subunidades de integrinas entre a população de controle e a população de pacientes.

Tabela II. A expressão de CD11a, CD11b e CD49d na superfície dos eosinófilos de indivíduos sadios (controles) e de pacientes com anemia falciforme, foi determinada por citometria de fluxo. Os eosinófilos foram isolados e incubados com anticorpos conjugados com FITC- ou RPE (anti-CD11a, CD11b ou CD49d) como descrito nos métodos. Valores são expressos como MFI $\pm$ SEM (média de intensidade de fluorescência). Nenhuma significância estatística foi encontrada entre o controle e a população de pacientes para estas moléculas de adesão quantificadas.

Moléculas de adesão	MFI	
	Indivíduos normais (n=11)	Pacientes com AF (n=10)
CD 11a	56.12 $\pm$ 7.88	54.51 $\pm$ 9.16
CD 11b	66.20 $\pm$ 9.05	49.89 $\pm$ 6.72
CD 49d	24.99 $\pm$ 2.76	22.75 $\pm$ 3.59

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

Os resultados apresentados aqui sugerem pela primeira vez na literatura que os eosinófilos podem ter participação nos eventos vaso-oclusivos de pacientes com AF. Números absolutos de eosinófilos circulantes foram encontrados quase triplicados no sangue de indivíduos com anemia falciforme comparados com indivíduos controles. A contagem de eosinófilos em um indivíduo saudável apresenta variação de $0.00-0.45 \times 10^9$ células/L com a média de aproximadamente 0.20×10^9 células/L (Ryan, 2001), embora contagens conduzidas em 765 estudantes de medicina (Krause e Boggs, 1987) mostraram números absolutos de eosinófilos com variação de $0.015-0.650 \times 10^9$. A variação na contagem de eosinófilos observada nos controles estudados aqui foi similar a estes dados previamente descritos. A população controle no nosso estudo, contém número suficiente de descendentes Africanos e nenhuma diferença foi notada entre os grupos étnicos. Em contraste, o número de eosinófilos observado em pacientes com AF difere significativamente daquele observado nos controles, com níveis superiores a 0.40×10^9 células/L que pode ser caracterizado como representando discreta eosinofilia na maioria dos indivíduos deste grupo de pacientes. Nenhum dos controles ou pacientes apresentavam atopia, asma ou infecções parasitológicas que pudesse elevar o número de eosinófilos. Em suporte a estes dados, estudos realizados por Ekeke; e Awodu et al., demonstraram aumento, embora discreto, de eosinófilos em homozigotos SS e também em mulheres grávidas com traço falciforme (AS). Portanto este trabalho é o primeiro que demonstra este aumento significativo no número de eosinófilos em pacientes com anemia falciforme. Seria possível especular que esta discreta eosinofilia observada em nossos

pacientes poderia ocorrer pelos mesmos mecanismos que elevam o número de PMNs em pacientes SS, embora a causa deste fenômeno ainda não seja conhecida.

O aumento no número de neutrófilos no sangue de pacientes com AF tem sido sugerido como consequência de uma mudança das células do compartimento marginal para o de circulação (Boggs et al., 1973). Alternativamente, a diminuição da função esplênica pode levar a um estado inflamatório crônico, com insuficiente eliminação de bactérias (Serjent, 1997). Além disso, ocorre um aumento nos níveis de citocinas no sangue desses indivíduos (Goncalves et al., 2001; Taylor et al., 1997; Malave et al., 1993) como o GM-CSF, uma citocina que também estimula a diferenciação dos eosinófilos (Zangrilli, 2002).

Os dados aqui apresentados mostraram que eosinófilos de pacientes com AF apresentaram maior adesão ao ligante da matriz extracelular, FN, em ensaio estático de adesão. Nossos dados sugerem que o aumento das propriedades adesivas nos eosinófilos de pacientes com AF, poderiam indicar que estas células participariam dos eventos vaso-oclusivos da anemia falciforme. Adicionalmente os resultados mostraram e que estas células provavelmente estão ativadas no sangue periférico dos pacientes. A adesão basal de eosinófilos normais à FN foi parcialmente inibida pela incubação com anticorpos monoclonais específicos para as frações LFA-1 α subunidade (CD11a), Mac-1 α subunidade (CD11b) e a subunidade de integrina β_1 (CD29). Não encontramos inibição nas células do controles da integrina VLA-4 α subunidade (CD49d), por mais que a adesão basal tenha revelado siginificante inibição. Ainda que o anticorpo anti-CD49d não tenha inibido significativamente a adesão de eosinófilos controles à FN, o fato do anticorpo contra a subunidade da β_1 integrina (CD29) inibir significativamente a adesão,

implica que esta adesão à FN é parcialmente mediada pela integrina VLA-4 nas células normais.

Do mesmo modo, a adesão dos eosinófilos de pacientes com AF à FN foi parcialmente inibida por anticorpos monoclonais específicos para as frações de integrinas CD11a, CD11b e CD29 bem como o CD49d. Desta maneira, uma associação de eventos adesivos mediados pelas integrins LFA-1, Mac-1 e VLA-4 parecem ser responsáveis por parte significativa da adesão tanto do controle (eosinófilos normais) como de pacientes (eosinófilos de pacientes SS) à FN. O aumento na adesão de eosinófilos com AF à FN pode ser consequência de um incremento na expressão ou na afinidade destas mesmas integrinas na superfície celular dos eosinófilos de pacientes. Os dados de citometria de fluxo, entretanto, demonstraram que a expressão dessas moléculas de adesão não é significativamente alterada nas superfícies dos eosinófilos SS. Podemos, portanto, sugerir que o aumento das propriedades adesivas dos eosinófilos com AF são mediados por alterações nas afinidades das integrinas expressas nas superfícies dos eosinófilos.

A LFA-1 e o Mac-1 são primariamente ligantes do receptor celular endotelial, ICAM-1, apesar de serem também capazes de ligar a outros ligantes encontrados na matriz extracelular, tal como a FN, iC3b e fibrinogênio (Decleva et al., 2002; Arnaout, 1990). O I-domínio da subunidade α de LFA-1 e de Mac-1 é conhecido por ter duas diferentes opções de conformações envolvidas na regulação de afinidade conformacional destas β_2 integrinas (Hogg et al., 2002; Zhang e Plow, 1996). Adicionalmente, o fenômeno de agrupamento regulados (“regulated clustering”) resultante no aumento de avides destas integrinas é também as vezes, a chave no evento na ativação celular (Hogg et al., 2002; Ronchon et al., 2000).

O VLA-4 é geralmente considerado um marcador de superfície celular dos eosinófilos e liga-se primariamente à FN. (Springer, 1990). Semelhante a função da integrina β_2 , a função da integrina VLA-4 pode ser modulada por mudanças da avidéz ou da afinidade dessas moléculas (Sung et al., 1997). A avidéz pode ser modulada por efeitos quelantes, enquanto a afinidade das integrinas é afetada por mudanças estruturais na conformação das proteínas para revelar os sítios de ligação (Sung et al., 1997).

Deste modo, o aumento da adesão de eosinófilos de pacientes com AF poderia ser mediado por mudanças conformacionais na adesão das moléculas expressas nas superfícies das células bem como por mudanças na avidéz. Mudanças na conformação pode ser induzida por aumento dos níveis de citocinas circulantes no plasma de indivíduos com AF. Níveis normais de fator estimulador de colônia de granulócitos (G-CSF), GM-CSF, interferon γ , fator de necrose tumoral (TNF α), interleucina-1 (IL-1) e IL-6 foram descritos em uma série de pacientes em crises de falcização (Fadlon et al., 1998). De modo inverso, outros estudos demonstraram que há aumento nos níveis de IL-6 e TNF α em plasma de indivíduos com anemia falciforme (Kasschau et al., 1996) e de IL-6 em pacientes em crise falcização (Duits et al., 1996). Deste modo, alterações nos níveis de citocinas poderiam ser responsáveis pelo o aumento das propriedades adesivas de eosinófilos com AF.

Sob as condições usadas, “In vitro” nós não detectamos nenhum efeito da adição de RANTES (quimiocina específica para eosinófilos) (Graziano et al., 1990) ou de IL-8 (descrito como elevado em plasma de pacientes durante a crise vaso-oclusiva) (Goncalves et al., 2001; Ulfaman et al., 2001) sobre a adesão de eosinófilos normais ou de pacientes

SS à FN, em contraste com o efeito observado com uso de GM-CSF. O GM-CSF é uma citocina que tem papel importante na inflamação e nas doenças autoimunes bem como na ativação da função do VLA-4 (Hamilton, 2002; Sung et al., 1997). Esta citocina não alterou a adesão dos eosinófilos controles à FN, mas significativamente aumentou a adesão de eosinófilos de pacientes com AF à FN, sugerindo que alterações dos níveis da citocina GM-CSF podem adicionalmente estimular a adesão dos eosinófilos nos vasos sanguíneos de indivíduos com AF durante o processo inflamatório. Além do papel das citocinas na ativação dos leucócitos falcizados, micropartículas de fator positivo de tecidos derivadas de eritrócitos, plaquetas, células endoteliais e monócitos têm sido encontrada no sangue de indivíduos com AF (Shet et al., 2003) o qual pode possivelmente contribuir para a ativação dos leucócitos.

CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

Em conclusão, demonstramos aqui, pela primeira vez, que o número de eosinófilos em sangue periférico parece ser elevado nos pacientes com AF. Adicionalmente estas células apresentaram aumento das propriedades adesivas, sugerindo que elas poderiam participar no processo vaso-oclusivo dos pacientes com anemia falciforme. Este incremento da função adesiva é mediada, em parte, pelas integrinas β_1 e β_2 (VLA-4, LFA-1 e Mac-1) e parece ser consequência da mudança de afinidade ou de avidéz nas integrinas e não na sua expressão. Estudos adicionais serão necessários para determinar a extensão da contribuição dos eosinófilos nos fenômenos de vaso-oclusão em pacientes com anemia falciforme no estado estável e nos fenômenos agudos da anemia falciforme.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARNAOUT, MA. Structure and function of leukocyte adhesion molecules CD11/CD18. **Blood** 75:1037-1050.1990
- AWODU, OA; ENSOLEASE, ME; UBARU, AG; FAMODU AA. Leukocyte counts in pregnant Nigerian women with sickle cell trait. **Afr J Reprod Health.** 6:112-116.2002
- BLOEMEN, PG; BUCKELEY, TL; VAN DEN TWEEL, MC. LFA-1, and not Mac-1, is crucial for the development of hyperreactivity in a murine model of nonallergic asthma. **Am J Crit Care Med.** 153:521-529.1996
- BOGGS, DR; HYDE, F; SRODES, C. An unusual pattern of neutrophil kinetics in sickle cell anemia. **Blood.** 41:59-65.1973
- BUNN, HF. Pathogenesis and treatment of sickle cell disease. **N Engl J Med.** 337:762-769.1997
- CARLOS,TM; HARLAN,JM. Leukocyte-endothelial adhesion molecules. **Blood.** 84:4021-4028.1994
- CROIZAT, H. Circulating cytokines in sickle cell patients during steady state. **Br J Haematol.** 87:592-597.1994
- DAVIES, SC; BROZOVIC, M. The presentation, management and prophylaxis of sickle cell disease. **Blood Rev.** 3:29-44.1989
- DECLEVA, E; DRI, P; MENEGAZZI, R; Busetto, S; CRAMER, R. Evidence that TNF-induced respiratory burst of adherent PMN is mediated by integrin $\alpha_1\beta_2$. **J Leukoc Biol.** 72:718-26.2002

- DUTTS, AJO; PIETERS, RCO; SALEH, AW. Enhanced levels of soluble VCAM-1 in sickle cell patients and their specific increment during vasoocclusive crisis. **Clin Immunol Immunopathol.** 81:86-98.1996
- EKEKE, GI. Sickle cell disease: some haematological changes in steady state and crisis. **Biomed Biochim Acta.** 46:S197-201.1987
- FADLON, E; VORDERMEIER, S; PEARSON, TC. Blood polymorphonuclear leukocytes from the majority of sickle cell patients in the crisis phase of disease show enhanced adhesion to vascular endothelium and increased expression of CD64. **Blood.** 91:266-274.1998
- GONCALVES, MS; QUEIROZ, IL; CARDOSO, SA. Interleukin 8 as a vaso-occlusive marker in Brazilian patients with sickle cell disease. **Braz J Med Biol Res.** 34:1309-1313.2001
- GRAZIANO, FM; COOK, EB; STAHL, JL. Cytokines, chemokines, RANTES, and eotaxin. **Allergy Asthma Proc.** 20:141-146.1999
- HAMILTON, JA. GM-CSF in inflammation and autoimmunity. **Trends Immunol.** 23:403-408.2002
- HANSEL, TTO; DE VRIES, IJ ; IFF. T. An improved immunomagnetic procedure for the isolation of highly purified human blood eosinophils. **J Immunol Methods.** 145:105-110.1991
- HEBBEL, RP. Perspectives series: cell adhesion in vascular biology. Adhesive interactions of sickle erythrocytes with endothelium. **J Clin Invest.** 99:2561-2564.1997

- HOGG, N; HENDERSON, R; LEITINGER, B; MCDOWALL, A; PORTER, STANLEY P. Mechanisms contributing to the activity of integrins on leukocytes. **Immunol Rev.** 186:164-171.2002
- HORIE, S; KITA, H. CD11/CD18 (Mac-1) is required for degranulation of human eosinophils induced by human recombinant granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and platelet activating factor. **J Immunol.** 152:5457-5467.1994
- JAHNSEN, FL; HARALDSEN, G; AANESEN, JP; HAYE, R; BRANDTZAEG, P. Eosinophil infiltration is related to increased expression of vascular cell adhesion molecule-1 in nasal polyps. **Am J Respir Cell Mol Biol.** 12:624-632.1995
- JONECKIS, CC; ACKLEY, RL; ORRINGER, EP; WAYNER EA, PARISE LV. Integrin- $\alpha_4\beta_1$ and glycoprotein IV (CD36) are expressed on circulating reticulocytes in sickle cell anemia. **Blood.** 82:3548-3555.1993
- KASSCHAU, MR; BARABINO, GA; BRIDGES, KR; GOLAN, DE. Adhesion of sickle neutrophils and erythrocytes to fibronectin. **Blood.** 87:771-780.1996
- KRAUSE, JR; BOGGS, DR. Search for eosinopenia in hospitalized patients with normal blood leukocyte concentration. **Am J Hematol.** 24:55-63.1987
- MAKINO, S; FUKUDA, T. Eosinophils and allergy in asthma. **Allergy Proc.** 16:13-21.1995
- MALAVE, I; PERDOMO, Y; ESCALONA, E. Levels of tumor necrosis factor alpha/cachectin (TNF alpha) in sera from patients with sickle cell disease. **Acta Haematol.** 90:172-176.1993
- MILLER, ST; SLEEPER, LA; PEGELOW, CH. Prediction of adverse outcomes in children with sickle cell disease. **N Engl J Med.** 342:83-89.2000

- NAGATA, M; SEDGWICK, JB; BATES, ME; KITA, H; BUSSE, WW. Eosinophil adhesion to vascular cell adhesion molecule activates superoxide anion generation. **J Immunol.** 155:2194-2202.1995
- NAKAO, A; NAKAJIMA, H; TOMIOKA, H; NISHIMURA, T; IWAMOTO, I. Induction of T- cell tolerance by pretreatment with anti-ICAM-1 and anti-Lymphocyte Function-Associated Antigen-1 antibodies prevent antigen-induced eosinophil recruitment into the mouse airways. **J Immunol.** 153:5819-5825.1994
- OKPALA, I; DANIAL, Y; HAYNES, R; ODOEMENE, D; GOLDMA, J. Relationship between the clinical manifestations of sickle cell disease and the expression of adhesion molecules on white blood cells. **Eur J Haematol.** 69:135-144.2002
- PLATT, OSO; BRAMBILLA, DJO; ROSSE, WF. Mortality in sickle cell disease. Life expectancy and risk factors for early death. **N Engl J Med.** 330:1639-1644.1994
- ROCHON, YP; KAVANAGH, TJ; HARLAN, JM. Analysis of integrin (CD11b/CD18) movement during neutrophil adhesion and migration on endothelial cells. **J Microsc.** 197:15-24.2000
- RYAN, DH. Examination of the blood. In: Beutler E, Lichtman MA, Collier BS, Kipps TJ, Seligsohn U, eds. **Williams Hematology**. Sixth edition, McGraw-Hill; 9-16.2001
- SERJEANT, GR. Sickle-cell disease. **Lancet.** 350:725-30.1997
- SHET, AS; ARAS, O; GUPTA, K. Sickle blood contains tissue factor- positive microparticles derived from endothelial cells and monocytes. **Blood.** 102:2678-2683.2003
- SOLOVEY, A; LIN, Y; BROWNE, P; CHOONG, S; WAYNER, E; HEBBEL, RP. Circulating activated endothelial cells in sickle cell anemia. **N Engl J Med.** 337:1584-1590.1997

- SUNG, PK-L; YANG, L; ELICES, M; JIN, G; SRIRAMARAO, P; BROIDE, DH. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor regulates the functional adhesive state of VLA-4 expressed by eosinophils. **J Immunol.** 158:919-927.1997
- SWERLICK, RA; ECKMAN, JR; KUMAR, A; JEITLER, M; WICK, TM. $\alpha_4\beta_1$ -integrin expression on sickle reticulocytes: Vascular cell adhesion molecule-1-dependent binding to endothelium. **Blood.** 82:1891-1899.1993
- TAYLOR, SC; SHACKS, SJ; QU, Z; WILEY, PJ. Type 2 cytokine serum levels in healthy sickle cell disease patients. **J Natl Med Assoc.** 89:753-757.1997
- TOMER, A; HARKER, LA; KASEY, S; ECKMAN, JR. Thrombogenesis in sickle cell disease. **J Lab Clin Med.** 137:398-407.2001
- ULFMAN, LH; JOOSTEN, DP, VAN DER LINDEN, JA; LAMMERS, JW; ZWAGINGA, JJ; KOENDERMAN, L. IL-8 induces a transient arrest of rolling eosinophils on human endothelial cells. **J Immunol.** 166:588-595.2001
- WARDLAW, AJ; KAY, AB. Eosinopenia and eosinophilia. In: Beutler E, Lichtman MA, Coller BS, Kipps TJ, eds. **Williams Hematology.** Fifth edition, McGraw-Hill; 844-852.1996
- YAMAMOTO, H; SEDGWICK, JB; VIRTIS, RF; BUSSE, WW. The effect of transendothelial migration on eosinophil function. **Am J Respir Cell Mol Biol.** 23:379-388.2000
- ZANGRILLI, JG. Regulation of eosinophil viability by cytokines. **Am J Respir Cell Mol Biol.** 26:388-390.2002

ZHANG, L; PLOW, EF. Overlapping, but not identical, sites are involved in the recognition of C3bi, neutrophil inhibitory factor, and adhesive ligands by the $\alpha_M\beta_2$ integrin. **J Biol Chem.** 271:18211-18216.1996