

GISLAINE GOMES DA COSTA

**Avaliação da habilidade quimiotóxica e da adesão de
eosinófilos de pacientes com rinite alérgica: Efeito da
eotaxina e interleucina-5**

*Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado,
apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas -
UNICAMP, para obtenção do Título de Mestre em Farmacologia da
Bióloga – Gislaïne Gomes da Costa.*

Campinas, 17 de dezembro de 2004.

*Prof. Dr. Edson Antunes
Orientador*

Campinas

2004

GISLAINE GOMES DA COSTA

**Avaliação da habilidade quimiotóxica e da adesão de
eosinófilos de pacientes com rinite alérgica: Efeito da
eotaxina e interleucina-5**

Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação
da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade
Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre
em Farmacologia

ORIENTADOR: Prof. Dr. Edson Antunes

Campinas

2004

UNIDADE	BC
Nº CHAMADA	T/UNICAMP C823a
V	EX
TOMBO BC/	63175
PROC.	16-P-00086-05
C	☐
D	☒
PREÇO	11,00
DATA	15/04/05
Nº CPD	

Bib id 347817

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

C823a Costa, Gislaine Gomes da
Avaliação da habilidade quimiotóxica e da adesão de eosinófilos de pacientes com rinite alérgica: efeito da eotaxina e interleucina-5. / Gislaine Gomes da Costa. Campinas, SP : [s.n.], 2004.

Orientador : Edson Antunes
Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

I. Quimiotaxia. 2. Eosinofilia. 3. Moléculas de adesão celular.
I. Edson Antunes. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador:

Prof. Dr. Edson Antunes

Membros:

Prof. Dr. Edson Antunes

Prof^a. Dr^a. Carmem ^{ru}Silva Passos Lima

Prof^a. Dr^a. Suzana Beatriz Veríssimo de Melo

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

Data: 17/12/2004

DEDICATÓRIA

Aos meus queridos **PA**ltrocinadore**S**, Wilton e Leidy, por todo apoio, carinho e compreensão. Vocês foram decisivos na minha caminhada até aqui.

Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me criar e pelo carinho com que tem cuidado de mim e da minha família.

À Dra. Heloisa Ferreira que participou intensamente da minha formação científica, cedendo seu laboratório, seu conhecimento e sua paciência. Helo, obrigada por tudo. Espero que possamos, um dia, viver em um mundo mais justo.

Ao meu orientador, Dr. Edson Antunes, que foi fundamental em momentos decisivos desta trajetória.

À minha querida vovó Alzira e tios Oswaldo e Loide, que tão carinhosamente me acolheram em suas casas, me dando um suporte logístico, espiritual e emocional, sem o qual não teria conseguido finalizar meu trabalho.

Ao Eric, meu grande amor, pelo seu carinho e compreensão. Desculpe a ausência nestes anos.

Aos meus amigos da USF, Edna, Lucimara, Reginaldo, Cíntia, Flávia, Lucila e Bruna, foi muito bom trabalhar com vocês.

Aos amigos da Farmacologia – UNICAMP, em especial a Carla, Enilton Ivani, Letícia e Tatiane, obrigada pela ajuda e pela amizade.

Aos meus queridos amigos Damaris, Lyandra, Sandrinha, Maria Alice, Alexandre e Marcus, que, mesmo distantes, mantiveram nossa amizade e a Ângela e Mônica, que fizeram com que não me sentisse tão sozinha nesta cidade. Obrigada pelas palavras de incentivo e carinho.

	Pág
RESUMO.....	xii
ABSTRACT.....	xiv
1 – INTRODUÇÃO.....	16
OBJETIVO.....	26
2 – MATERIAL E MÉTODOS.....	28
2.1 – Pacientes	29
2.2 – Separação dos granulócitos	29
2.3 - Separação dos eosinófilos.....	30
2.4 - Ensaio de viabilidade celular.....	31
2.5 - Ensaio de quimiotaxia.....	31
2.6 - Ensaio de adesão.....	34
2.7 - Dosagem da Peroxidase Eosinofílica.....	35
2.8 - Análise estatística.....	36
3 - RESULTADOS.....	37
3.1 - Viabilidade celular dos eosinófilos incubados com Interleucina-5, Eotaxina e Dexametasona	38
3.2- Quimiotaxia <i>in vitro</i> de eosinófilos induzida pelo PAF: Efeito da incubação com eotaxina, IL-5 e dexametasona.....	40

	Pág
3.3 - Quimiotaxia <i>in vitro</i> de eosinófilos induzida pela IL-5: Efeito da incubação com eotaxina.....	43
3.4 - Quimiotaxia <i>in vitro</i> de eosinófilos induzida pela eotaxina: Efeito da incubação com IL-5.....	44
3.5 - Adesão à fibronectina.....	45
4 – DISCUSSÃO.....	48
5 – RESUMO E CONCLUSÃO	56
6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	59
7 – APÊNDICE.....	70
Anexo 1: Parecer do Comitê de Ética e Pesquisa – USF	71
Anexo 2: Termo de consentimento.....	72

LISTA DE FIGURAS

	Pág
Figura 1 - Esquema da placa de quimiotaxia.....	32
Figura 2 - Esquema da placa de adesão.....	34
Figura 3 - Viabilidade de eosinófilos incubados com Interleucina-5, Eotaxina e Dexametasona	39
Figura 4 - Quimiotaxia <i>in vitro</i> de eosinófilos em resposta a diferentes concentrações de PAF	40
Figura 5 - Quimiotaxia <i>in vitro</i> de eosinófilos induzida pelo PAF	42
Figura 6 - Quimiotaxia <i>in vitro</i> de eosinófilos induzida por IL-5	43
Figura 7 - Quimiotaxia <i>in vitro</i> de eosinófilos induzida por eotaxina	44
Figura 8 - Padronização do tempo de adesão dos eosinófilos à fibronectina.....	45
Figura 9 - Adesão a fibronectina dos eosinófilos incubados com eotaxina, IL-5 ou dexametasona	47

LISTA DE ABREVIATURAS

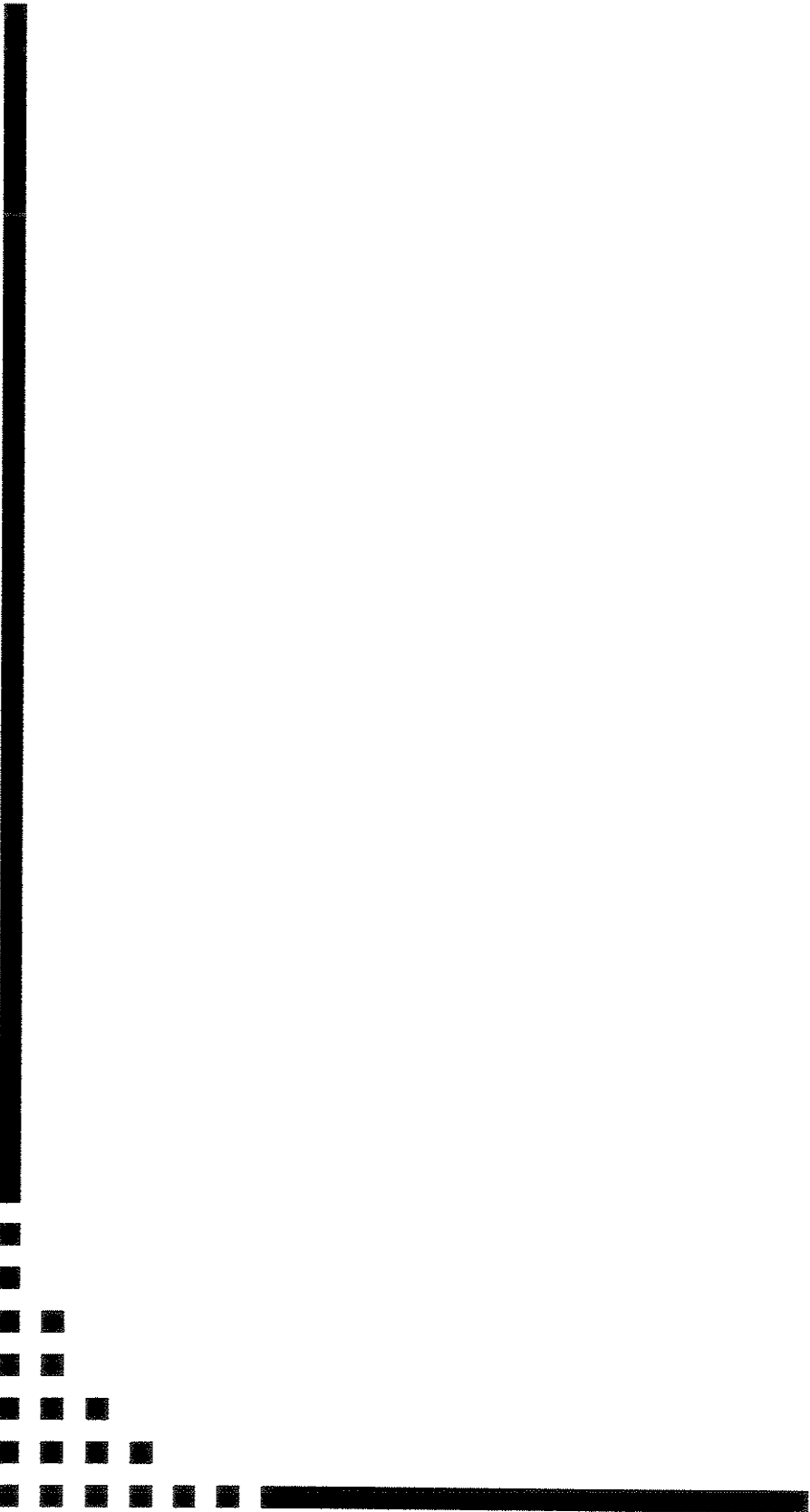
ANOVA	“one-way analysis of variance”
BSA	Albumina de soro bovino
CCR	“CC chemokine receptor
CD	“Cluster of differentiation”
CS-1	“Connecting segment - 1”
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DO	Densidade ótica
ECP	Proteína catiônica eosinofílica
EDN	Neurotoxina derivada do eosinófilo
EDTA	Ácido etileno-diamino-tetracético
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
EPO	Peroxidase eosinofílica
EPX	Proteína X eosinofílica
fMLP	N formyl metionyl leucyl fenilalanina
GM-CSF	Fator estimulador de colônias de macrófagos e granulócitos
ICAM-1	“Intercellular adhesion molecule -1”
IFN	Interferon
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
LT	Leucotrieno

LISTA DE ABREVIATURAS

LT_H 2,	Linfócito T auxiliar 2
MAC-1	“Macrophage – 1 antigen”
MBP	Proteína básica principal
MEM	Meio essencial mínimo (Eagle)
nNOS	Óxido nítrico sintase neuronal
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
PAF	Fator ativador de plaquetas
PBS	Salina fosfatada tamponada
PG	Prostaglandina
RANTES	“Regulated upon activation in normal T cells expressed and secreted”
EPM	Erro padrão da média
TNF	Fator de necrose tumoral
TX	Tromboxano
VCAM-1	“Vascular adhesion molecule - 1”
VLA-4	“Very late antigen - 4”

LISTA DE MATERIAIS

Ácido sulfúrico	Merck (Darmstadt, Alemanha)
Azul de Trypan	Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA)
Bicarbonato de potássio	Merck (Darmstadt, Alemanha)
BSA	Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA)
Cloreto de amônio	Merck (Darmstadt, Alemanha)
Dexametasona	Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA)
EDTA	Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA)
Eotaxina	Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA)
Fibronectina	Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA)
Hanks	Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA)
Interleucina	Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA)
MACS	Miltenyi Biotec Inc. (Bergisch-Gladbach, Alemanha)
May-Grünwald	Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA)
MEM	Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA)
Microbeads	Miltenyi Biotec Inc. (Bergisch-Gladbach, Alemanha)
Multiscan MS	Labsystems (USA)
σ-phenylenediamine	Sigma Chemical CO. (St. Louis, MO, EUA)
Percoll	Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA)
Placa ChemoTx 101-5	Neuroprobe (Gaithersburg, EUA)
Placa de adesão 3369	Costar - Corning Inc. (NY, EUA)
Placa de 96 poços 9017	Costar - Corning Inc. (NY, EUA)



RESUMO

Neste estudo, investigamos se a IL-5, a eotaxina e a dexametasona modulam a migração e adesão de eosinófilos obtidos de indivíduos saudáveis e de pacientes com rinite alérgica.

O ensaio de quimiotaxia e de adesão foi realizado com eosinófilos de sangue periférico usando-se sistema imunomagnético de separação celular. Para os ensaios de quimiotaxia, foram utilizadas placas ChemoTx-5, e para os ensaios de adesão, placas de adesão recobertas com fibronectina. Em ambos os ensaios, a medida da absorbância (490 nm) da peroxidase eosinofílica foi utilizada como índice de eosinófilos migrados ou aderidos.

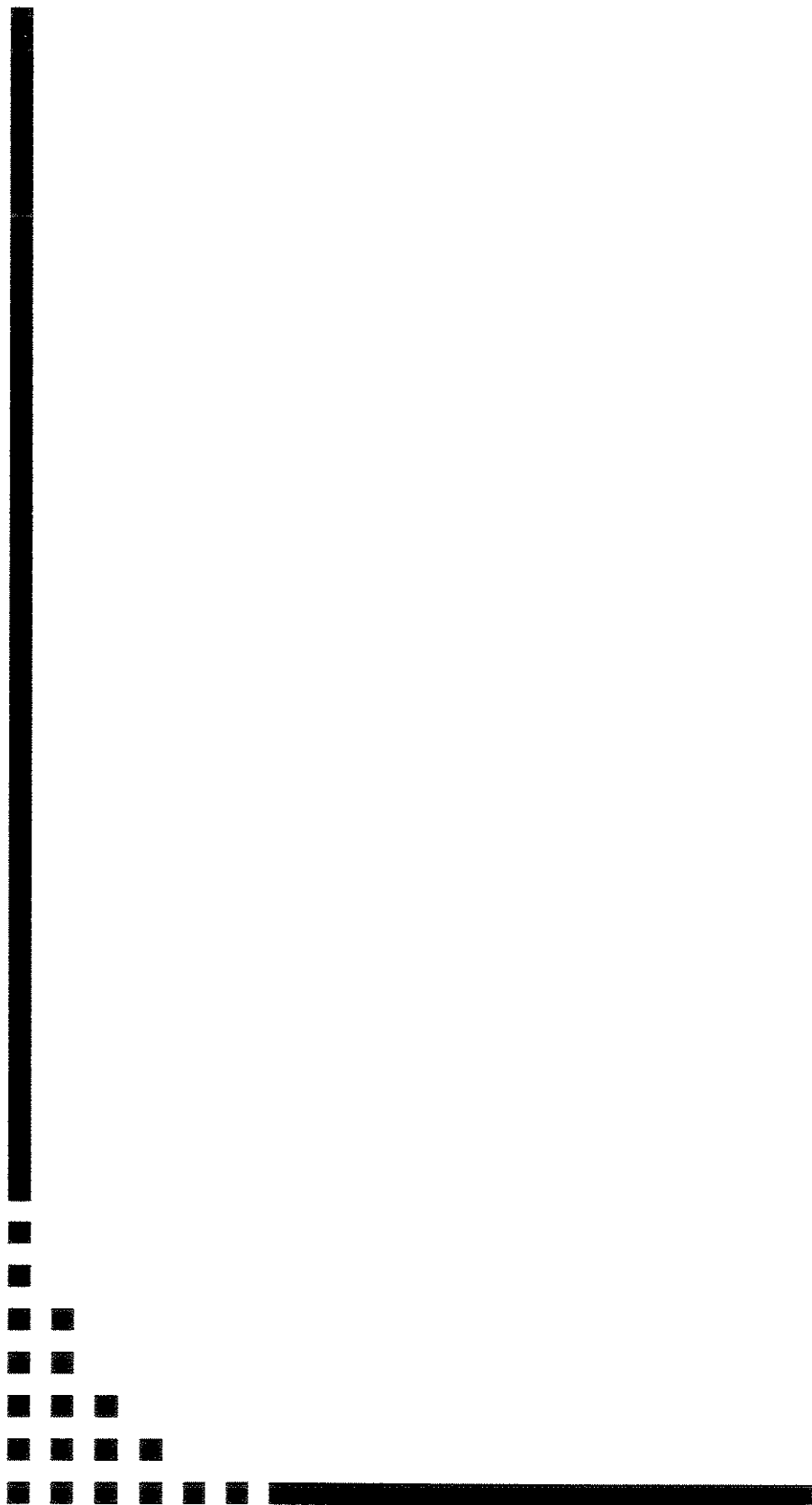
O PAF (10^{-8} M) induziu quimiotaxia de mesma magnitude em eosinófilos de indivíduos saudáveis e de pacientes com rinite. A IL-5 (0,25 ng/ml) aumentou significativamente a quimiotaxia de eosinófilos induzida pelo PAF; porém, o aumento observado em eosinófilos de pacientes com rinite alérgica foi 65% maior ($p < 0,001$) do que de indivíduos saudáveis. A eotaxina (100 ng/ml) não alterou a resposta quimiotática do PAF em nenhum dos grupos estudados. A dexametasona (100 µg/ml) reduziu significativamente a quimiotaxia, tanto no grupo de indivíduos saudáveis, como no de pacientes com rinite alérgica.

A IL-5 (0,25 ng/ml) induziu resposta quimiotática significativamente maior em eosinófilos de pacientes com rinite, em comparação com eosinófilos de indivíduos saudáveis. A resposta quimiotática à IL-5 não foi modificada pela eotaxina (100 ng/ml) em eosinófilos de indivíduos saudáveis, mas foi marcadamente reduzida em eosinófilos de pacientes com rinite alérgica.

A eotaxina (100 ng/ml) induziu resposta quimiotática significativamente maior em eosinófilos de pacientes com rinite, em comparação com eosinófilos de indivíduos saudáveis. A resposta quimiotática à eotaxina foi potencializada pela IL-5 (100 ng/ml) em eosinófilos de indivíduos saudáveis e de pacientes com rinite alérgica. Entretanto, o aumento observado nos eosinófilos de pacientes com rinite alérgica foi significativamente maior do que de indivíduos saudáveis.

Em placas recobertas com fibronectina (10 µg/ml), ligante oposto da molécula de adesão VLA-4, estudamos a adesão dos eosinófilos. A adesão espontânea foi maior com eosinófilos de pacientes com rinite alérgica do que de indivíduos saudáveis. A incubação dos eosinófilos com eotaxina (100 ng/ml) ou IL-5 (0,25 ng/ml) não modificou a adesão dos eosinófilos em nenhum dos grupos estudados. A incubação com dexametasona (100 µg/ml) reduziu significativamente a adesão celular em ambos os grupos experimentais.

Nossos resultados mostram que eosinófilos de pacientes com rinite alérgica estão pré-ativados. Isto pode ser devido à exposição na circulação à IL-5, que leva ao aumento da expressão e/ou função da molécula de adesão VLA-4 e, conseqüentemente, de sua migração.



ABSTRACT

In this study, we tested whether IL-5, eotaxin and dexamethasone modulate the adhesion and migration of eosinophils obtained from allergic rhinitis subjects, in comparison with healthy individuals.

The chemotaxis and adhesion assays were performed with eosinophils isolated from peripheral blood using an immunomagnetic cell separator. ChemoTx-5 plates were used for the chemotaxis assays, whereas fibronectin-coated plates were used for the adhesion assays. For both assays, measurement of eosinophil peroxidase activity was used as marker for migrated or adhered eosinophils.

Platelet-activated factor (PAF; 10^{-8} M) induced a significant eosinophil chemotaxis in both studied groups. Interleukin-5 (IL-5, 0.25 ng/ml) significantly increased the PAF-induced chemotaxis in eosinophils from both healthy individuals and rhinitis subjects. However, the increase in rhinitis subjects eosinophils was 65% higher ($p < 0.001$) compared with healthy individuals eosinophils. Eotaxin (100 ng/ml) did not alter the PAF-induced eosinophil chemotaxis in either groups studied. Dexamethasone (100 μ g/ml) significantly reduced PAF-induced chemotaxis in cells from both groups.

Interleukin-5 (0.25 ng/ml) induced a higher chemotactic response in eosinophils from rhinitis subjects compared with healthy individuals. Eotaxin (100 ng/ml) had no effect on IL-5-induced eosinophil chemotaxis in healthy individuals, but prevented the increase in eosinophil chemotaxis induced by IL-5 in rhinitis subjects.

Eotaxin (100 ng/ml) induced a higher chemotactic response in eosinophils from rhinitis subjects compared with healthy individuals. Eotaxin-induced eosinophil chemotaxis was significantly enhanced by IL-5 (0.25 ng/ml) in both group studied, but this enhancement was higher in eosinophils from rhinitis subjects.

In plated coated with fibronectin (an opposite ligand for VLA-4) we studied the eosinophil adhesion. The basal (spontaneous) cell adhesion was significantly higher ($p < 0.05$) using eosinophils from rhinitis subjects compared with those from healthy individuals. However, the pattern of cell adhesion in both groups was not significantly affected by eotaxin (100 ng/ml) or IL-5 (0.25 ng/ml). Dexamethasone (100 μ g/ml) significantly reduced the eosinophil adhesion in cells from both studied groups.

Ours results indicate that eosinophils from rhinitis subjects are found primed, and that can be due to previous exposition to IL-5 while in peripheral blood. It is likely that IL-5 increases the expression and/or function of adhesion molecule VLA-4 in eosinophils leading consequently to an enhanced cell chemotaxis.



1 - INTRODUÇÃO

A rinite alérgica é uma doença inflamatória das vias aéreas superiores acompanhada por sintomas como espirro, prurido e congestão nasal, podendo também haver envolvimento dos olhos, ouvidos e garganta. Existem diferentes fatores que desencadeiam a rinite em crianças e adultos, mas aproximadamente 50% dos casos de rinite são de natureza alérgica. Na rinite alérgica, os sintomas são resultado de um processo inflamatório mediado pela imunoglobulina (Ig) E específica para o alérgeno, como grãos de pólen, bolor, partículas de poeira doméstica, entre outros (revisto por SKONER, 2001). A resposta alérgica envolve liberação de mediadores inflamatórios e ativação e recrutamento de células para a mucosa nasal (DYKEWICZ et al., 1998).

A resposta alérgica pode ser dividida em duas fases: a fase imediata e a fase tardia. A fase imediata é caracterizada pela ação da IgE em mastócitos. Exposição a alérgenos em indivíduos previamente sensibilizados desencadeia uma cascata de eventos que culmina na desgranulação dos mastócitos, provocando os sintomas característicos da rinite alérgica. Produtos desta desgranulação incluem mediadores pré-formados, como a histamina, e recém-formados, como a prostaglandina (PG) D₂, os leucotrienos (LT) C₄, LTD₄ e LTE₄, o fator ativador de plaquetas (PAF), o fator de necrose tumoral (TNF) α e a interleucina (IL) 5 (para revisão ver WILLIAMS e GALLI, 2000; GELFAND, 2004). As ações conjuntas destes mediadores dilatam os capilares sangüíneos causando o edema sinusoidal, que oclui e congestiona a passagem de ar nasal. Isto caracteriza a obstrução nasal e a rinorréia típica da rinite alérgica. O edema da mucosa nasal pode estimular os nervos sensoriais levando à liberação de

neuropeptídeos responsáveis pelas sensações de prurido e espirro (SKONER, 2001). Mediadores derivados de mastócitos, como a histamina e o LTC₄, atuam também promovendo a expressão de moléculas de adesão envolvidas no recrutamento das células inflamatórias. Agentes quimiotáticos como a IL-5 promovem a infiltração de eosinófilos, neutrófilos, basófilos, linfócitos T e macrófagos na mucosa nasal (NACLERIO et al., 1985).

A resposta inflamatória tardia é caracterizada pelo acúmulo de leucócitos como eosinófilos, neutrófilos, basófilos e os linfócitos T auxiliares (LT_h) 2, sendo os eosinófilos as principais células envolvidas nas reações alérgicas de fase tardia. Mediadores derivados de eosinófilos são descritos como os principais responsáveis pelo dano causado ao epitélio, levando ao quadro clínico e histológico das doenças alérgicas crônicas (revisto por SKONER, 2001). Portanto, a IgE e os eosinófilos são componentes importantes da inflamação alérgica que a distingue das outras formas de doenças inflamatórias (BROIDE, 2001).

Os eosinófilos são granulócitos formados na medula óssea, proliferam e se diferenciam em um microambiente constituído essencialmente de células do estroma e da matriz extracelular, sob o controle de fatores de crescimento. Citocinas como o fator estimulador de colônias de macrófagos e granulócitos (GM-CSF), IL-3 e IL-5 são capazes de promover a eosinofilopoese (CLUTTERBUCK et al., 1989). A IL-5 e a eotaxina exercem um importante papel nos estágios finais de maturação e liberação dos eosinófilos da medula óssea para a corrente sanguínea (PALFRAMAN et al., 1998a). O período de diferenciação e maturação é de aproximadamente cinco dias, após o qual os eosinófilos maduros deixam a medula e vão para o sangue periférico, migrando para os tecidos mediante um

estimulo inflamatório (KROEGEL et al., 1994). Nos tecidos, os eosinófilos persistem por até seis dias, sendo que sua sobrevivência pode ser estendida pelo efeito da liberação sistêmica ou local de IL-5 e GM-CSF (TAI et al., 1991).

O eosinófilo humano maduro típico apresenta um núcleo bilobulado. No citoplasma, além das organelas, encontram-se quatro tipos de grânulos, identificados por microscopia eletrônica, como: (1) grânulos primários; (2) grânulos secundários; (3) grânulos pequenos; e (4) corpúsculos lipídicos (revisto por GIEMBYEZ e LINDSAY, 1999). No interior destes grânulos estão armazenadas algumas enzimas e proteínas básicas pré-formadas. Os grânulos primários contêm as lisofosfatases e nos grânulos secundários estão contidos, principalmente, a proteína básica principal (MBP), a proteína catiônica eosinofílica (ECP), a peroxidase eosinofílica (EPO) e a neurotoxina derivada do eosinófilo (EDN) ou proteína X eosinofílica (EPX). Os grânulos pequenos contêm as arilsulfatases B e as fosfatases ácidas. Os corpúsculos lipídicos contêm 5-lipoxigenase, cicloxigenase e ácido araquidônico. Mediante estimulação, os eosinófilos podem liberar substâncias como metabólitos do oxigênio (ânion superóxido e peróxido de hidrogênio), mediadores lipídicos (PGE_2 , PGD_2 , TXA_2 , LTC_4 e PAF), citocinas (IL-5, $TNF-\alpha$ e GM-CSF) e quimiocinas (RANTES e eotaxina).

Embora estejam amplamente distribuídos no organismo, os eosinófilos são mais abundantes em tecidos que têm interface com o meio externo, como o trato respiratório, gastrointestinal e geniturinário (WELLER, 1991). Uma vez recrutados para o tecido por diferentes agentes quimiotáticos, como o LTB_4 , e o PAF, os

eosinófilos recebem sinais que promovem sua desgranulação e secreção de citocinas. Dos mediadores que contribuem para a migração e desgranulação dos eosinófilos, a IL-5 e a eotaxina são descritas como reguladoras seletivas para os eosinófilos (COLLINS et al., 1995; MOULD et al., 2000).

A observação que nas reações alérgicas ocorre um acúmulo seletivo de eosinófilos levou à estudos visando a identificação de fatores quimiotáticos específicos para eosinófilos. Nas últimas décadas, uma nova família de agentes quimiotáticos, as quimiocinas, atraiu muita atenção pela sua especificidade de atuação sobre eosinófilos (CONROY et al., 1997). As quimiocinas são citocinas quimiotáticas de baixo peso molecular (8-10 KDa) que produzem efeitos pró-inflamatórios nos leucócitos, como a quimiotaxia, desgranulação, síntese de mediadores lipídicos e ativação de integrinas.

A eotaxina é uma quimiocina que atrai especificamente eosinófilos (BROIDE et al., 1999). A seletividade desta quimiocina parece ser devida ao tipo do receptor de quimiocina expresso nestas células. Os eosinófilos expressam predominantemente o receptor CCR3, no qual a eotaxina se liga (PONATH et al., 1996). Estudos em cobaias e em camundongos sugerem que a eotaxina e a IL-5 atuam cooperativamente para promover o recrutamento dos eosinófilos para o tecido (COLLINS et al., 1995; MOULD et al., 1997).

Em resposta a estímulos alérgicos, os eosinófilos da medula óssea são estimulados a se diferenciar e a migrar, aumentando o número dessas células no sangue periférico e no tecido inflamado. A IL-5 é identificada como a citocina chave na regulação dessas funções do eosinófilo, bem como de sua sobrevivência nos tecidos, atuando, portanto, como um marcador das doenças alérgicas

(SANDERSON, 1992). A IL-5 estimula as células progenitoras CD34⁺ da medula óssea, precursoras dos granulócitos, induzindo a diferenciação destas células em linhagem eosinofílica. Ao mesmo tempo, a IL-5 induz a migração dos eosinófilos maduros da medula óssea para o sangue periférico (PALFRAMAN et al., 1998b). Esta citocina também tem a habilidade de aumentar a resposta dos eosinófilos a outros mediadores (como a eotaxina), estimular a desgranulação e inibir a apoptose destas células, sendo encontrada em níveis elevados no plasma de indivíduos após desafio com alérgeno (BEEH et al., 2003). O deslocamento do eosinófilo para o sítio inflamatório é um processo complexo, regulado por diferentes citocinas, quimiocinas, moléculas de adesão e mediadores lipídicos (para revisão ver GIEMBYEZ e LINDSAY, 1999).

As moléculas de adesão são glicoproteínas expressas na superfície celular, e promovem o contato entre duas células ou entre as células e a matriz extracelular. As principais famílias de moléculas de adesão são as selectinas, integrinas e a superfamília das imunoglobulinas.

A família das selectinas é formada por três proteínas: E-selectina, P-selectina e a L-selectina. A E-selectina é sintetizada e expressa exclusivamente no endotélio vascular após estimulação com citocinas e lipopolissacarídeos. Cerca de 4 horas após a exposição às citocinas ocorre a expressão máxima, podendo perdurar por 12 horas. A E-selectina e a P-selectina, encontradas na superfície endotelial, funcionam como sítios de ligação para a L-selectina. A P-selectina é sintetizada constitutivamente pelas plaquetas e por células endoteliais, e armazenada nos corpos de Weibel-Palade. Após exposição das células endoteliais a mediadores inflamatórios, a P-selectina é rapidamente mobilizada

para a superfície celular, onde é transitoriamente expressa por 30 minutos. Sua transcrição é regulada por várias citocinas, incluindo a IL-4. A L-selectina está constitutivamente presente na superfície da maioria dos leucócitos.

As integrinas são glicoproteínas transmembrana específicas para os leucócitos. São compostas por dois heterodímeros não-covalentes, designados subunidades α e β , sendo que cada subunidade contém um grande domínio extracelular e pequena porção citoplasmática. A integrina predominante nos leucócitos pertence à subfamília β_2 .

Os leucócitos circulantes no endotélio vascular, antes de migrar para o sítio da inflamação, aderem ao endotélio, penetram na parede do vaso e o transpõe, sendo este um processo mediado por moléculas de adesão. O processo inflamatório é iniciado pela vasodilatação de vênulas pós-capilares e mudanças no fluxo sangüíneo, resultando na marginação dos leucócitos ao longo do endotélio vascular, processo mediado por selectinas. A medida que o leucócito rola, outro grupo de moléculas de adesão, as integrinas, se tornam ativas. Quando ocorre esta ativação, devido à ação dos agentes quimiotáticos, os leucócitos param de rolar e se aderem firmemente ao endotélio, evento este resultante da ligação de integrinas expressas nos leucócitos com vários membros da superfamília das imunoglobulinas expressas no endotélio. Após a firme adesão, ocorre o achatamento da célula, reduzindo a exposição às forças decorrentes do fluxo sangüíneo vascular, aumentando desta forma a área de contato com a superfície endotelial. Finalmente, o leucócito migra entre as células endoteliais para o

interstício, movendo-se para a fonte dos estímulos (quimiotaxia) (para revisão ver LAMPINEN et al., 2004).

A adesão dos eosinófilos ao endotélio é mediada, principalmente, pela expressão das moléculas de adesão L-selectina, VLA-4 (integrina β_1) e Mac-1 (integrina β_2), as quais interagem com seus ligantes opostos CD34, VCAM-1 e ICAM-1, respectivamente. Na matriz extracelular, a VLA-4 dos eosinófilos se liga ao domínio CS-1 da fibronectina. A adesão mediada pelo VLA-4 é importante para as respostas inflamatórias alérgicas, pois constitui um dos mecanismos que determinam a migração seletiva do eosinófilo para o tecido (SEMINÁRIO e BOCHNER, 1997). A afinidade das moléculas de adesão por seus ligantes muda de acordo com a fase do recrutamento celular, proporcionando a migração dos eosinófilos dos vasos sanguíneos para o tecido inflamado (YOSHIKAWA et al., 2002). Interações de baixa afinidade das selectinas com seus ligantes proporcionam uma adesão temporária, permitindo o rolamento do eosinófilo sobre o endotélio vascular. Na adesão firme, a afinidade das integrinas da família β_1 à VCAM-1 é regulada pela ação de citocinas. As citocinas também regulam as mudanças de afinidade das moléculas de adesão da família β_1 para as da família β_2 , permitindo o início da migração transendotelial. A exposição a mediadores como o PAF, bem como a ligação dos eosinófilos com a fibronectina, promove a quimiotaxia celular, ao mesmo tempo em que diminui a afinidade das integrinas β_2 , permitindo, assim, a migração para o interstício.

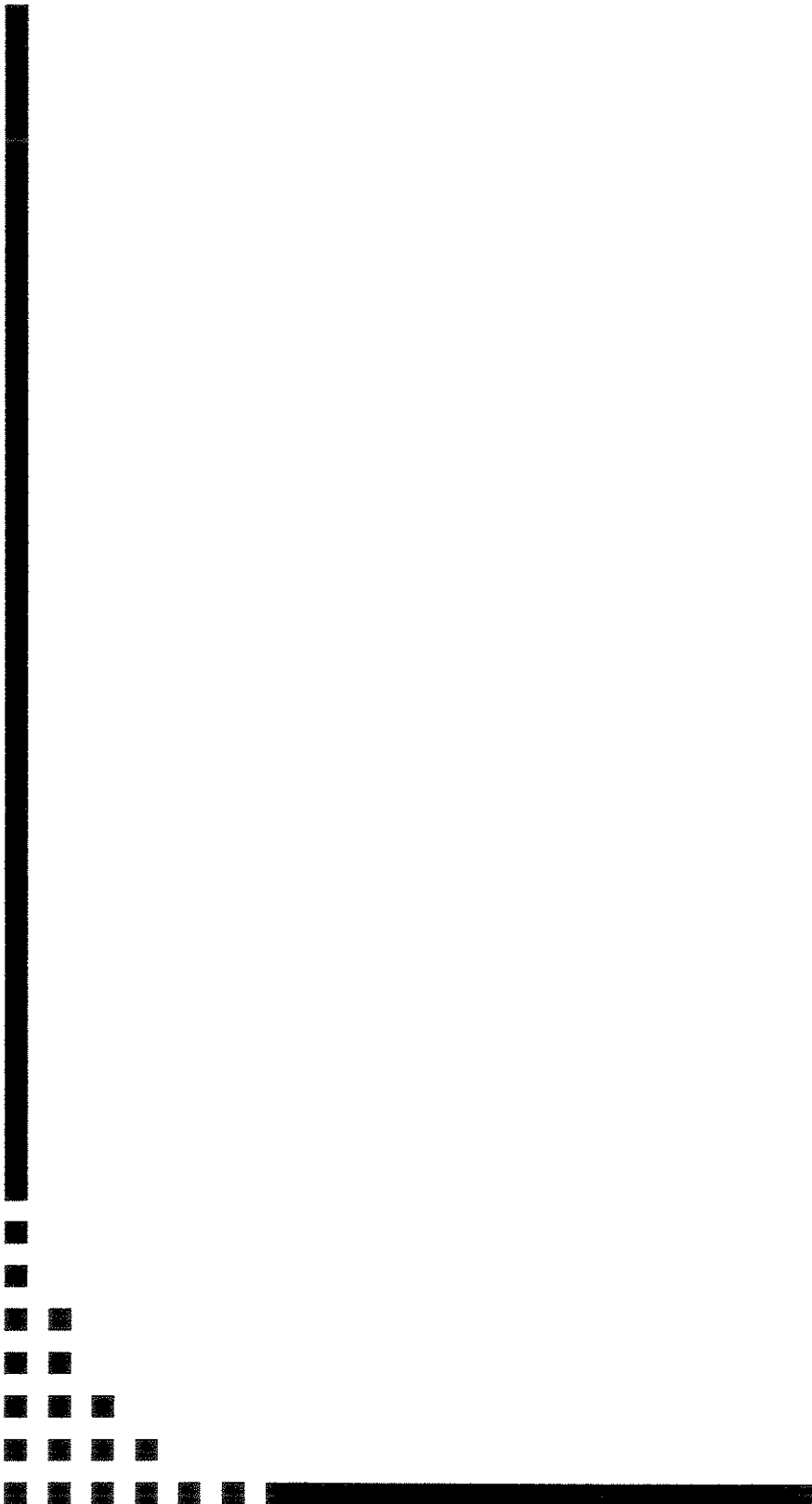
O óxido nítrico (NO) é um mediador inflamatório encontrado em níveis elevados na mucosa nasal de pacientes com rinite não-tratados (KHARITONOV et

al., 1997). O NO é formado a partir da L-arginina e oxigênio, pela ação de uma família de enzimas chamadas NO sintases (NOS). Existem três isoformas de NOS, a neuronal (nNOS), endotelial (eNOS) e a induzível (iNOS). A nNOS e a eNOS são expressas constitutivamente, enquanto a iNOS pode ter sua expressão induzida por lipopolissacarídeos ou algumas citocinas, como o TNF- α e interferon (IFN) γ (para revisão ver MONCADA et al., 1991). Ferreira et al. (2002) verificaram a ausência da expressão da iNOS em eosinófilos de pacientes com rinite alérgica. Esta ausência pode ser decorrente da pré-exposição destes eosinófilos aos glicocorticóides, cujos níveis estão aumentados nestes pacientes devido ao estresse provocado pelos sintomas da rinite alérgica. Os glicocorticóides são potentes inibidores da iNOS (SZABÓ, 1998).

Os efeitos antiinflamatórios dos glicocorticóides são produzidos pela ação em receptores citoplasmáticos (GR) que modulam a expressão de genes envolvidos na inflamação. Os GRs estão localizados predominantemente no citoplasma em um complexo composto pelo GR e duas moléculas protéicas (hsp 90). Esta associação de proteínas é importante para a ligação da molécula ao seu agonista e inibe a migração do receptor desativado para o núcleo. Os glicocorticóides são extremamente lipofílicos, e passam do meio extracelular para o citoplasma através de difusão passiva, onde se ligam aos GRs. Após a ativação, o GR se dissocia das proteínas que o acompanham e se dirige para o núcleo. No núcleo, o GR se liga a seqüências específicas do ácido desoxirribonucléico (DNA), modulando a transcrição do gene selecionado (para revisão ver LEUNG E BLOOM, 2003). O aumento na transcrição de genes antiinflamatórios, como o da

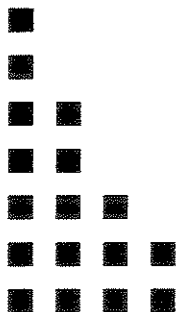
lipocortina, é um dos mecanismos de ação dos CGs. A lipocortina é um inibidor específico da fosfolipase A_2 , que controla a produção das prostaglandinas, leucotrienos e PAF, reduzindo assim, os níveis destes mediadores na rinite alérgica. Outro mecanismo pelo qual os glicocorticóides atuam é através da inibição da expressão de algumas citocinas (GM-CSF e TNF- α), quimiocinas (IL-8, RANTES e eotaxina) e moléculas de adesão (ICAM-1 e VCAM-1) (LEUNG E BLOOM, 2003).

A rinite alérgica é caracterizada pelo acúmulo de eosinófilos na mucosa nasal. Compreender como são as interações dos eosinófilos dos pacientes alérgicos com substâncias circulantes como a IL-5, eotaxina e o cortisol, e o modo pelo qual estas substâncias modulam a quimiotaxia e a adesão dos eosinófilos poderá auxiliar na terapêutica das doenças alérgicas.



OBJETIVO

Investigar, em eosinófilos de pacientes com rinite alérgica, se a exposição destas células à IL-5, eotaxina e dexametasona influencia a atividade quimiotática e a adesão celular *in vitro*.



2 - MATERIAL E MÉTODOS

2.1 – Pacientes

Os pacientes com rinite alérgica, homens ou mulheres com idade variando de 13 a 50 anos, foram encaminhados pelo Ambulatório de Otorrinolaringologia do Hospital da Universidade São Francisco, de Bragança Paulista. Estes pacientes (total de 20) foram selecionados conforme apresentação dos seguintes sintomas e sinais clínicos: obstrução nasal crônica, espirros e prurido nasal. Indivíduos sadios (total de 30), homens ou mulheres com idade variando de 13 a 50 anos, foram utilizados como controle. Nem os pacientes nem os indivíduos sadios estavam recebendo tratamento com antihistamínicos ou antiinflamatórios esteroidais/não esteroidais.

A pesquisa foi submetida e aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade São Francisco, e conduzida de acordo com a Declaração de Helsinki.

2.2 - Separação dos granulócitos (neutrófilos e eosinófilos)

O sangue periférico foi coletado da veia de antebraço de voluntários sadios (120 ml) e de pacientes com rinite alérgica (60 ml). Os diferentes volumes coletados se deve ao fato dos pacientes alérgicos apresentarem um número maior de eosinófilos no sangue periférico do que os indivíduos sadios. Os eosinófilos foram separados do sangue de acordo com Hansel et al. (1991), com algumas modificações. O sangue total heparinizado foi diluído 1:2 em salina tamponada fosfatada (PBS). O gradiente de densidade utilizado na separação dos granulócitos foi preparado em um tubo cônico de 50 ml misturando-se 9,5 ml de

Percoll (densidade 1 130 g/ml) com 1,5 ml de Hanks e 4 ml de água destilada. O pH do gradiente de Percoll (1089 g/ml) foi ajustado para 7,4, e a osmolaridade para 340 mosmol/Kg H₂O. Para cada 15 ml do gradiente de Percoll, foi cuidadosamente adicionado 30 ml do sangue diluído. Os tubos foram centrifugados à 700xg por 20 minutos à 20°C. Após a centrifugação, as camadas que contêm o plasma e os mononucleados foram descartadas, e a mistura de granulócitos e hemácias foi transferida para um outro tubo cônico de 50 ml. As hemácias foram lisadas pela adição de 35 ml de tampão de lise (155 mM de NH₄Cl, 10 mM de KHCO₃ e 0,1 mM de EDTA). Após a incubação em gelo por 15 minutos, as células restantes foram centrifugadas à 300xg por 10 minutos à 20°C e, então, lavadas duas vezes com tampão PBS/EDTA. A contagem total dos granulócitos foi feita em câmara de Neubauer e a análise diferencial realizada em esfregaços preparados na citocentrífuga e corado com May-Grunwald-Giemsa. No sangue dos pacientes alérgicos foi encontrado de 15 à 48% de eosinófilos, enquanto a porcentagem de eosinófilos em indivíduos sadios varia entre 5 à 8% do total de granulócitos. A suspensão celular foi mantida à 4°C, até o momento da separação dos eosinófilos.

2.3 - Separação dos eosinófilos

A suspensão de granulócitos foi incubada com as microesferas magnéticas ligadas ao anticorpo anti-CD16 para a separação dos eosinófilos, usando-se sistema imunomagnético de separação celular (MACS). Para cada 5×10^7 células foi acrescentado 27 μ l de microesferas imunomagnéticas e 27 μ l de tampão

PBS/BSA (0,1%). Após 30 minutos de incubação, à 4°C, o volume da suspensão foi completado para 1 ml usando-se tampão PBS/BSA e então transferida para a coluna CS de separação mantida em campo magnético. A coluna foi lavada com 30 ml de tampão PBS/BSA e todo efluente coletado em um tubo cônico de 50 ml e centrifugado à 300xg durante 10 minutos. A suspensão final continha de 97 a 99% de eosinófilos. Os eosinófilos foram ressuspensos em meio essencial mínimo (MEM), pH 7,2.

2.4 – Ensaio de Viabilidade Celular

A viabilidade dos eosinófilos (2×10^6 células/ml) incubados com o MEM ou com as diferentes concentrações de eotaxina, IL-5 e dexametasona foi analisada usando o corante azul de Trypan 0,25%. A viabilidade celular foi verificada em intervalos de tempos regulares (0, 30, 60, 90 e 120 minutos) após incubação dos eosinófilos em atmosfera úmida com 5% de CO₂, à 37°C, misturando-se 50 µl do azul de Trypan com 50 µl da suspensão de eosinófilos. Em seguida foi feita a leitura na câmara de Neubauer do número de células mortas, coradas de azul, em cada 100 células.

2.5 - Ensaio de Quimiotaxia

Os ensaios de quimiotaxia *in vitro* foram realizados usando-se câmaras de quimiotaxia de 96 poços (ChemoTx 101-5). Aos poços da câmara foram adicionados 29 µl do agente quimiotático e, em seguida, o filtro de polycarbonato

(poro de 5 μm) foi posicionado na placa sobre os poços. Adicionou-se 25 μl da suspensão de eosinófilos (4×10^6 cel/ml) sobre o filtro em locais delimitados por um anel, como apresentado na figura 1. A quimiotaxia espontânea foi verificada substituindo-se o agente quimiotático pelo MEM. A câmara foi incubada durante 120 minutos em atmosfera úmida com 5% de CO_2 , à 37°C.

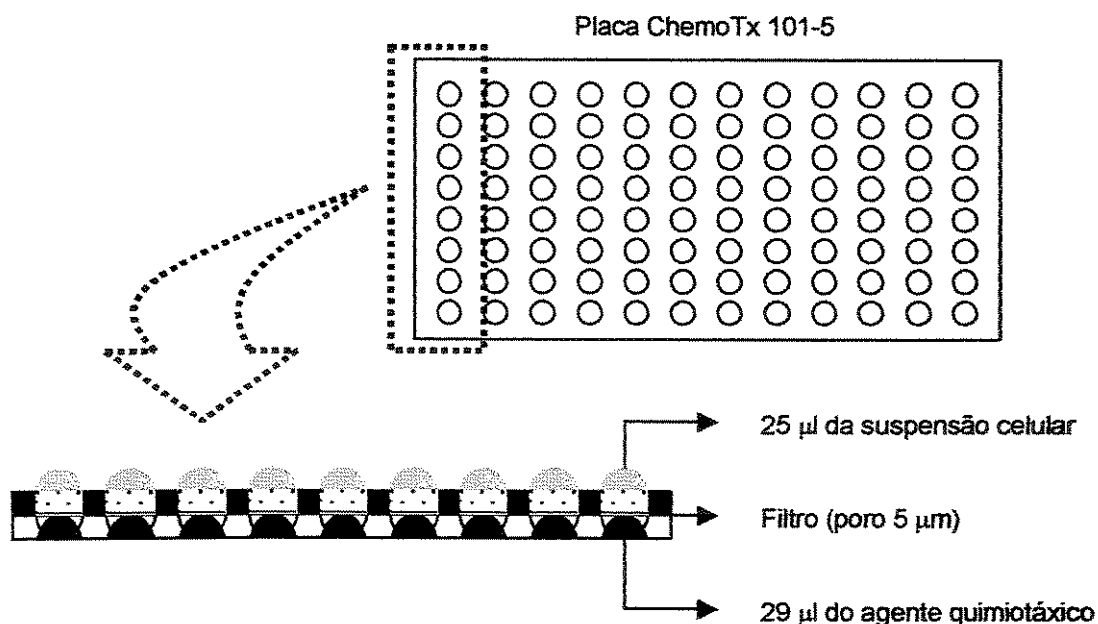


Figura 1: Esquema da placa de quimiotaxia

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 à 200xg por cinco minutos, à 20°C. O filtro foi cuidadosamente removido e o volume restante nos poços foi reajustado para 29 μl , sendo que 15 μl da suspensão celular de cada poço foram transferidos para uma outra placa de 96 poços. Nesta placa foi

realizada a dosagem da EPO, para determinar a quantidade de eosinófilos que migrou para o compartimento inferior da placa de quimiotaxia.

Os seguintes protocolos foram empregados:

Protocolo 1

Agente quimiotático: PAF (10^{-8} , 10^{-7} e 10^{-6} M)

Suspensão celular: eosinófilos de voluntários sadios incubados com MEM

Protocolo 2:

Agente quimiotático: PAF (10^{-8} M)

Suspensão celular: eosinófilos de voluntários sadios e de pacientes com rinite alérgica incubados com MEM, eotaxina (100 ng/ml), IL-5 (0,25 ng/ml) ou dexametasona (100 µg/ml)

Protocolo 3

Agente quimiotático: IL-5 (0,25 ng/ml)

Suspensão celular: eosinófilos de voluntários sadios e de pacientes com rinite alérgica incubados com MEM ou eotaxina (100 ng/ml).

Protocolo 4

Agente quimiotático: eotaxina (100 ng/ml)

Suspensão celular: eosinófilos de voluntários sadios e de pacientes com rinite alérgica incubados com MEM ou IL-5 (0,25 ng/ml).

2.6 - Ensaio de adesão

Os ensaios de adesão foram realizados utilizando-se placas de adesão com 96 poços. A câmara foi incubada previamente por uma noite à 4°C com uma solução de fibronectina 10 µg/ml (60 µl/poço). Após a incubação, as placas foram lavadas três vezes com PBS e colocadas para incubar com PBS/BSA (0,1%) durante 60 minutos em atmosfera úmida com 5% de CO₂, à 37°C, para bloquear os sítios não específicos. As placas foram novamente lavadas com PBS e colocadas para secar.

Adicionou-se em cada poço 50 µl da suspensão de eosinófilos (7×10^4 células/ml), pré-incubadas durante 15 minutos com o MEM, ou com as diferentes concentrações das drogas. As placas foram mantidas por mais 30 minutos em atmosfera úmida com 5% de CO₂, à 37°C, seguindo o esquema apresentado na figura 2. As células não aderidas foram descartadas e a placa lavada mais uma vez com PBS.

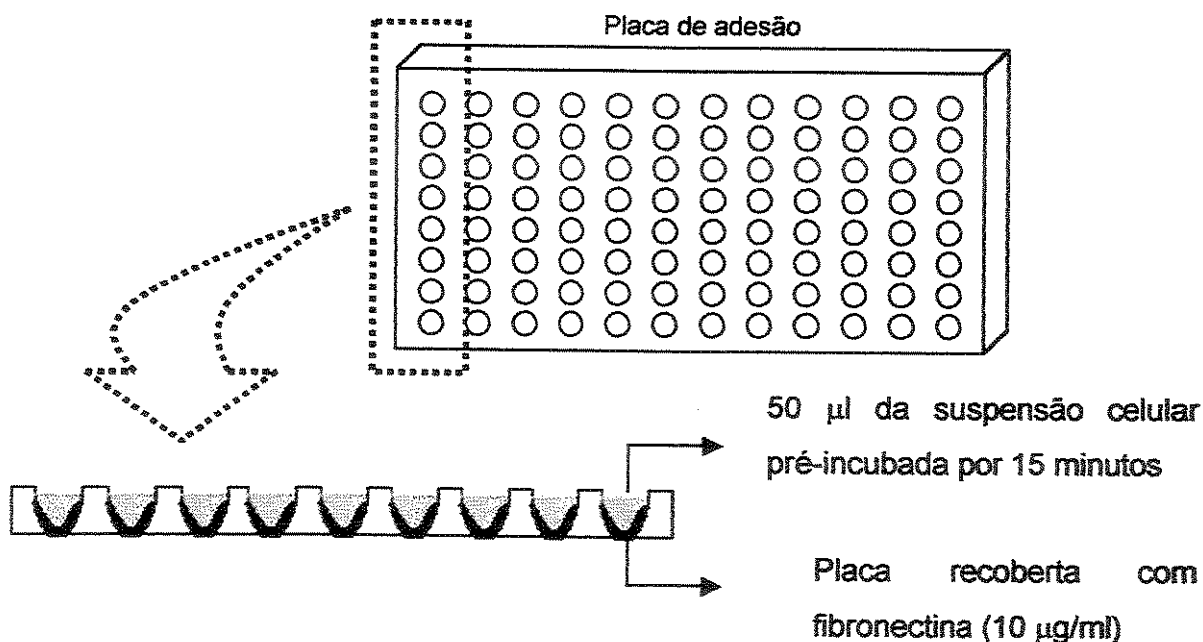


Figura 2: Esquema da placa de adesão

Alíquotas 50 µl da suspensão de eosinófilos (7×10^4 cel/ml), ressuspendidos em MEM, foram utilizadas em diferentes concentrações (0 a 100% de eosinófilos) para formar a curva padrão. O número de eosinófilos aderidos foi calculado em função dos valores de EPO. A porcentagem da adesão dos eosinófilos foi calculada comparando-se a absorbância das amostras com as obtidas na curva padrão (NAGATA et al.,1995). Os seguintes protocolos experimentais foram realizados:

Protocolo 1

Suspensão celular: eosinófilos de voluntários sadios pré-incubados, por 15 minutos, com MEM.

Tempo de adesão: intervalos de 15 minutos até um tempo máximo de 60 minutos

Protocolo 2

Suspensão celular: eosinófilos de voluntários sadios e de pacientes com rinite alérgica, pré-incubados, por 15 minutos, com MEM, eotaxina (100 ng/ml), IL-5 (0,25 ng/ml) ou dexametasona (100 µg/ml)

Tempo de adesão: 30 minutos

2.7 - Dosagem da peroxidase eosinofílica (EPO)

Foram adicionados em cada poço da placa, 50 µl de substrato de EPO (σ -phenylenediamine). Após 30 minutos de incubação em temperatura ambiente, 25

μl de H_2SO_4 foi acrescentado para interromper a reação. A medida da absorbância foi feita em 490 nm em leitor de microplacas (Multiscan MS) (NAGASE et al., 2000; STRATH et al., 1985).

2.8 - Análise estatística

Os dados estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM) e foram analisados pelo teste do Kruskal-Wallis - ANOVA não paramétrica, seguido do teste Mann-Whitney. As diferenças com $p < 0,05$ foram consideradas significantes.

3.1 - Viabilidade celular dos eosinófilos incubados com IL-5, eotaxina e dexametasona

Os resultados apresentados na figura 3 mostram que 98% dos eosinófilos incubados somente com MEM (C), na ausência das drogas, permanecem viáveis até 120 minutos de incubação.

A viabilidade dos eosinófilos incubados com IL-5 (5 ng/ml) durante 120 minutos diminuiu significativamente, alcançando níveis de 50% (Fig. 3A).

Quando os eosinófilos foram incubados com a eotaxina, na concentração de 500 ng/ml, 91% das células estavam viáveis até 120 minutos de incubação (Fig. 3B).

Diminuição significativa na viabilidade dos eosinófilos incubados com a dexametasona (1 mg/ml) foi detectada em 120 minutos de incubação, onde apenas 65% das células encontravam-se viáveis (Fig. 3C).

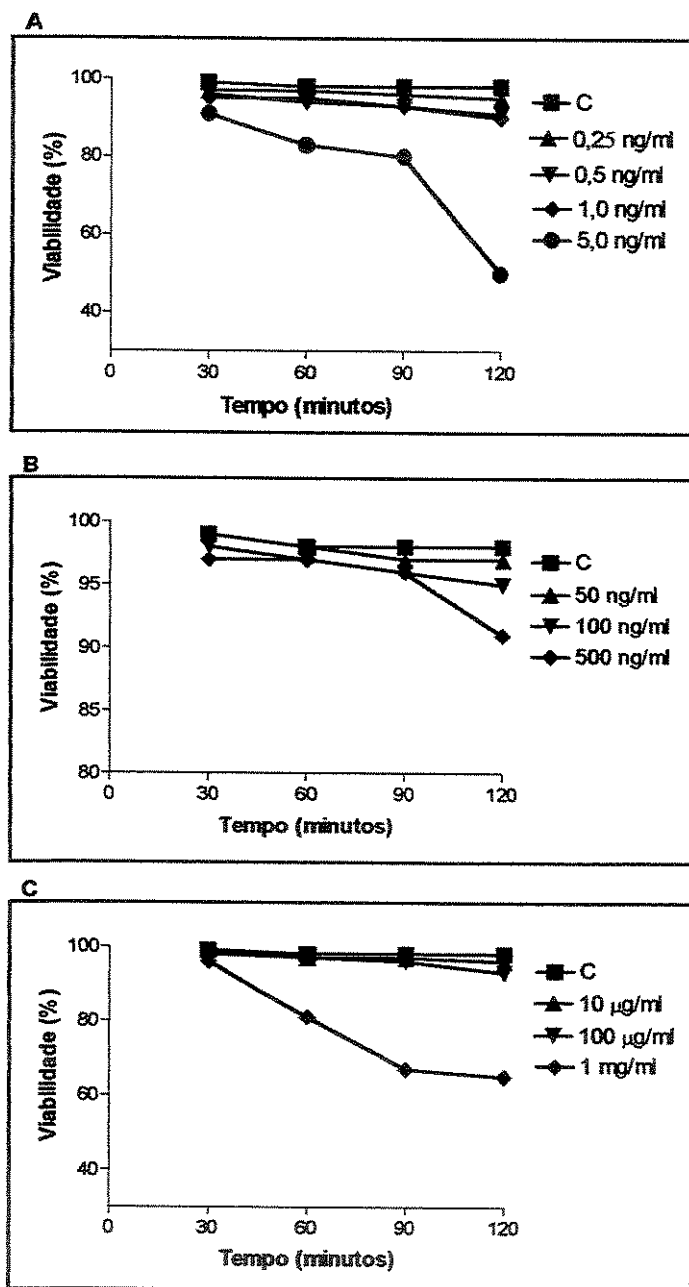


Figura 3. Viabilidade de eosinófilos de voluntários sadios incubados com Interleucina-5 (A), Eotaxina (B) e Dexametasona (C). Os eosinófilos foram incubados com diferentes concentrações das drogas ou somente com MEM (C) e a viabilidade celular foi verificada em intervalos de 30 minutos até 120 minutos de incubação.

3.2 - Quimiotaxia *in vitro* de eosinófilos induzida pelo PAF: Efeito da incubação com eotaxina, IL-5 e dexametasona

A figura 4 mostra que o PAF induziu migração significativa de eosinófilos nas concentrações de 10^{-8} e 10^{-7} M, quando comparada à migração espontânea. Fixamos a concentração do PAF em 10^{-8} M por induzir resposta máxima.

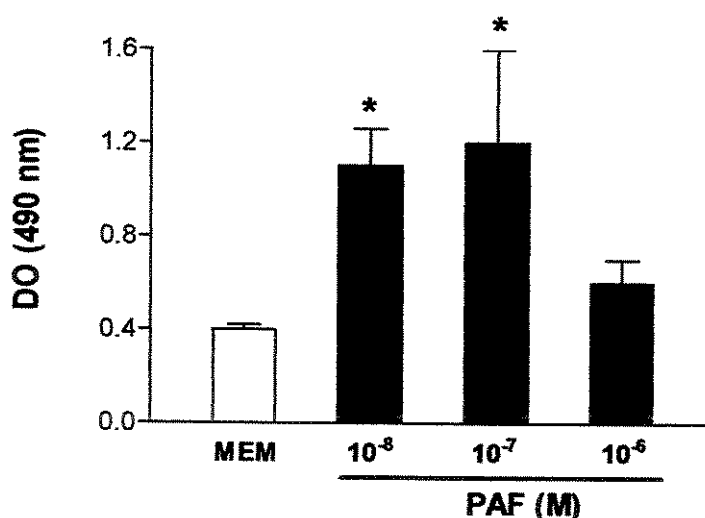


Figura 4. Quimiotaxia *in vitro* de eosinófilos de voluntários sadios em resposta a diferentes concentrações de PAF. Os resultados representam a dosagem da EPO dos eosinófilos que migraram para o compartimento inferior da câmara de quimiotaxia. Os resultados estão expressos como média $\pm$ E.P.M. (n=9). *p<0,05 comparado com a migração espontânea (MEM).

Passamos a investigar a quimiotaxia em eosinófilos de pacientes com rinite alérgica. Para estes experimentos, as concentrações de eotaxina, IL-5 e dexametasona foram fixadas em 100 ng/ml, 0,25 ng/ml e 100 µg/ml, respectivamente.

A incubação dos eosinófilos de voluntários sadios ou de pacientes com rinite alérgica com a eotaxina (100 ng/ml) não alterou de forma significativa a quimiotaxia induzida pelo PAF (Figura 5).

Por outro lado, a incubação das células dos indivíduos sadios e dos pacientes alérgicos com a IL-5 (0,25 ng/ml) aumentou significativamente ($p<0,01$) a resposta quimiotática ao PAF, resposta esta 65% maior ($p<0,001$) no paciente com rinite alérgica.

A dexametasona (100 µg/ml) promoveu uma redução significativa ($p<0,01$) na resposta quimiotática dos eosinófilos, redução esta de mesma magnitude em eosinófilos de ambos os grupos.

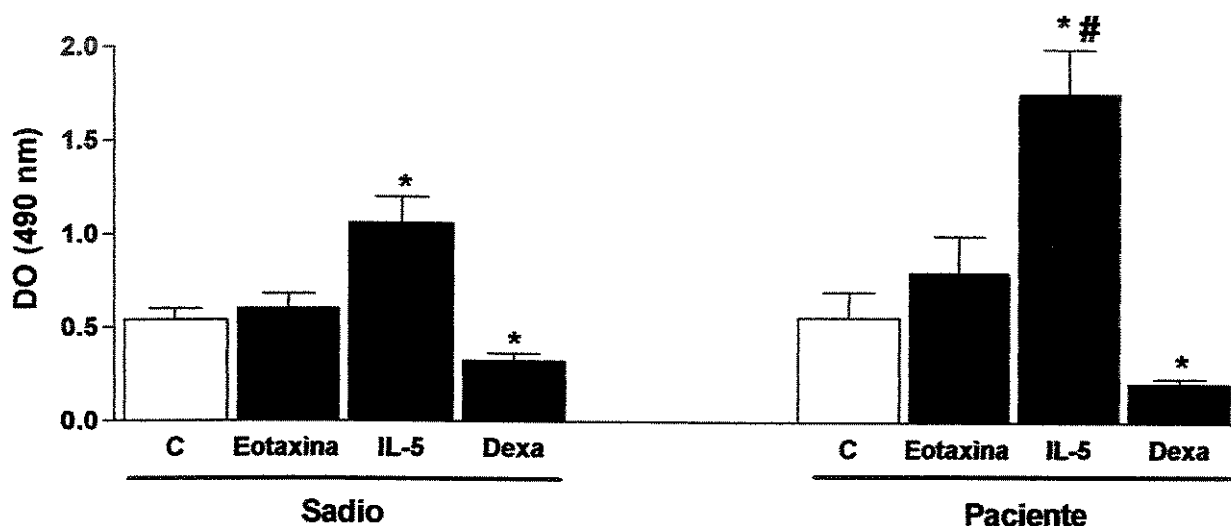


Figura 5: Quimiotaxia *in vitro* de eosinófilos induzida pelo PAF. A quimiotaxia *in vitro* ao PAF (10^{-8} M) de eosinófilos de indivíduos sadios e de pacientes com rinite alérgica (4×10^6 cel/ml) foi conduzida na presença de eotaxina (100 ng/ml), IL-5 (0,25 ng/ml) ou dexametasona (100 µg/ml). Os resultados representam os níveis de peroxidase (DO) dos eosinófilos que migraram para o compartimento inferior da câmara de quimiotaxia, e estão expressos como média $\pm$ E.P.M. (n=9). *p<0,01 comparado com os respectivos controles (C). #p<0,05 comparado com as células do voluntário incubadas com IL-5.

3.3 - Quimiotaxia *in vitro* de eosinófilos induzida pela IL-5: Efeito da incubação com eotaxina

Os resultados apresentados na figura 6 mostram que a migração dos eosinófilos dos pacientes com rinite alérgica frente à IL-5 foi significativamente maior ($p < 0,05$) do que a dos indivíduos sadios. Interessantemente, a incubação dos eosinófilos dos indivíduos sadios com a eotaxina não promoveu qualquer alteração na resposta quimiotóxica. No entanto, os eosinófilos dos pacientes com rinite alérgica incubados com a eotaxina tiveram migração grandemente reduzida, atingindo valores semelhantes a dos indivíduos sadios.

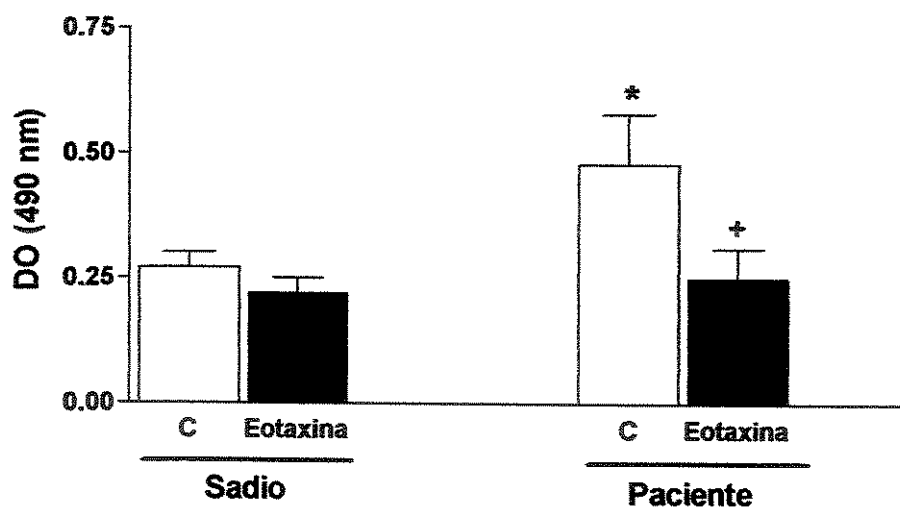


Figura 6. Quimiotaxia *in vitro* de eosinófilos induzida por IL-5 (0,25 ng/ml). A quimiotaxia *in vitro* dos eosinófilos (4×10^6 cel/ml) de indivíduos sadios e de pacientes com rinite alérgica em resposta à IL-5 foi realizada na presença de eotaxina (100 ng/ml) ou somente do MEM (C). Os resultados representam os níveis de peroxidase (DO) dos eosinófilos que migraram para o compartimento inferior da câmara de quimiotaxia e estão expressos como média $\pm$ E.P.M. ($n=9$). * $p < 0,05$ comparado com o controle (C) dos voluntários sadios. + $p < 0,05$ comparado com o respectivo controle (C).

3.4 - Quimiotaxia *in vitro* de eosinófilos induzida pela eotaxina: Efeito da incubação com IL-5

A resposta quimiotática dos eosinófilos frente à eotaxina (100 ng/ml) foi significativamente maior nos eosinófilos de pacientes com rinite alérgica, comparada com as células de voluntários sadios (Fig. 7). A incubação dos eosinófilos com IL-5 (0,25 ng/ml) aumentou a atividade quimiotática da eotaxina, tanto nos eosinófilos dos pacientes alérgicos como dos indivíduos sadios. Entretanto, o aumento proporcionado pela IL-5 em células de pacientes com rinite foi significativamente maior do que as de indivíduos sadios.

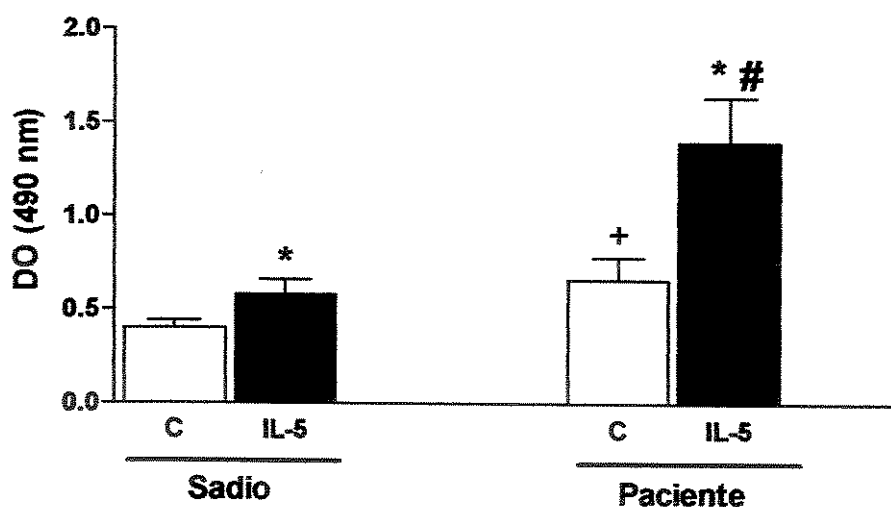


Figura 7. Quimiotaxia *in vitro* de eosinófilos induzida por eotaxina (100 ng/ml). A quimiotaxia *in vitro* de eosinófilos (4×10^6 cel/ml) de indivíduos sadios e de pacientes com rinite alérgica em resposta à eotaxina foi realizada na presença de IL-5 (0,25 ng/ml) ou somente do MEM (C). Os resultados representam os níveis de peroxidase (DO) dos eosinófilos que migraram para o compartimento inferior da câmara de quimiotaxia, e estão expressos como média $\pm$ E.P.M. (n=9). *p<0,01 comparado com os respectivos controles (C). +p<0,05 comparado com o C do voluntário. #p<0,05 comparado com as células do voluntário incubadas com IL-5.

3.5 - Adesão à fibronectina

Inicialmente estabelecemos o melhor tempo para os ensaios de adesão dos eosinófilos à fibronectina ($10\ \mu\text{g/ml}$), com eosinófilos de indivíduos saudáveis. Os resultados apresentados na figura 6 mostram que o tempo de incubação não afeta a adesão de eosinófilos. Ensaios subsequentes foram realizados com 30 minutos de incubação.

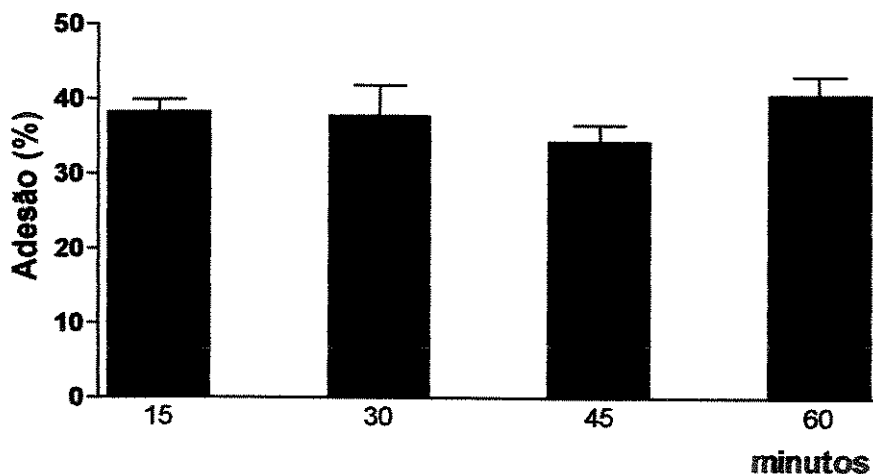


Figura 8. Padronização do tempo de adesão dos eosinófilos à fibronectina. Eosinófilos de voluntários saudáveis (7×10^4 eosinófilos/ml) foram ressuspensos em MEM e colocados para aderir, em intervalos de 15 minutos, na placa de adesão recoberta com fibronectina ($10\ \mu\text{g/ml}$). O número de eosinófilos aderidos foi calculado pela dosagem da EPO. Os resultados representam a porcentagem de células aderidas de um número total de células, e estão expressos como média $\pm$ E.P.M. (n=9).

As células de voluntários sadios e de pacientes com rinite alérgica foram pré-incubadas durante 15 minutos com eotaxina (100 ng/ml), IL-5 (0,25 ng/ml) ou com dexametasona (100 µg/ml), e colocadas para aderir em placas recobertas com fibronectina. As células controle foram incubadas com o MEM.

A capacidade de adesão basal (pré-incubados com o MEM) dos eosinófilos dos pacientes com rinite alérgica foi significativamente maior ($p<0,05$) do que a dos voluntários sadios (Fig. 9). Entretanto, a pré-incubação dos eosinófilos com eotaxina ou IL-5 não provocou qualquer alteração na adesão das células dos voluntários ou dos pacientes alérgicos à fibronectina, quando comparado com seus respectivos controles.

A pré-incubação dos eosinófilos com dexametasona diminuiu em 40% a adesão dos eosinófilos dos voluntários sadios e em 32% a dos eosinófilos dos pacientes com rinite alérgica (Fig. 9).

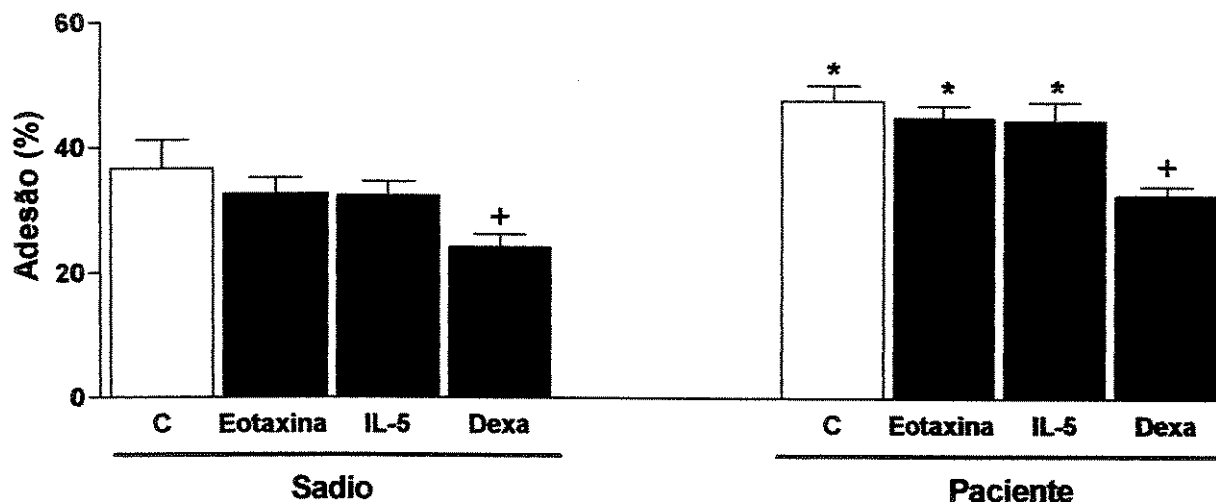
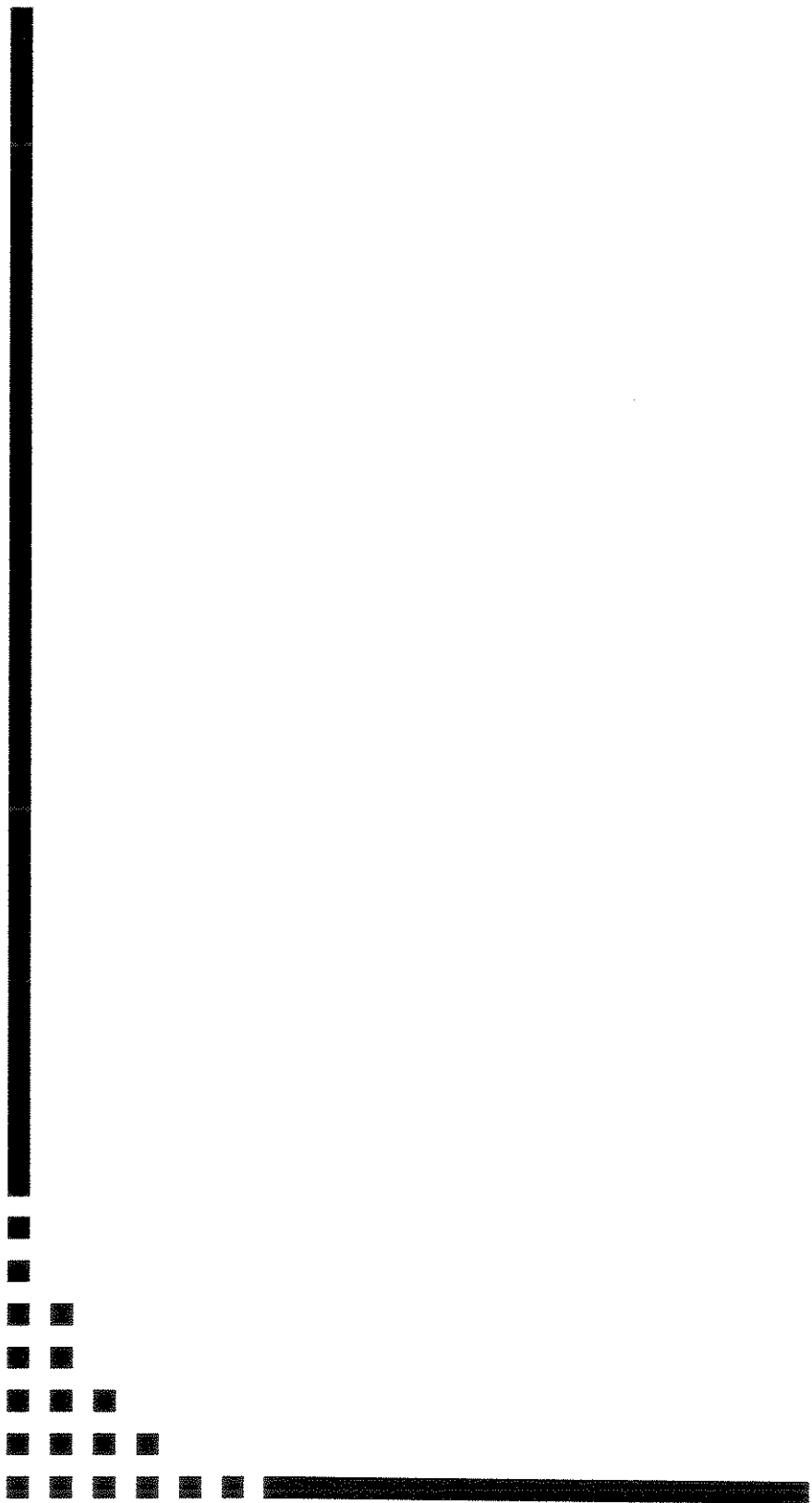


Figura 9. Adesão à fibronectina dos eosinófilos incubados com eotaxina, IL-5 ou dexametasona. Eosinófilos (7×10^4) de indivíduos sadios e de pacientes com rinite alérgica foram pré-incubados com eotaxina (100 ng/ml), IL-5 (0,25 ng/ml) ou dexametasona (100 μ g/ml), durante 15 minutos e colocados para aderir em placa de adesão recoberta com fibronectina (30 min, 37°C, 5% de CO₂). As células controles (C) foram incubadas somente com o MEM. O número de eosinófilos aderidos foi calculado pela dosagem da EPO. Os resultados representam a porcentagem de células aderidas, e estão expressos como média $\pm$ E.P.M. (n=9). *p<0,05 comparado com os eosinófilos dos voluntários sadios incubados com o MEM (C), eotaxina ou IL-5, respectivamente. +p<0,05 comparado com o respectivo MEM (C).



5 - DISCUSSÃO

A eosinofilia periférica e tecidual é característica das doenças alérgicas, como a rinite alérgica (GIEMBYEZ E LINDSAY, 1999). Apesar de não ser totalmente conhecidos, alguns estudos procuraram abordar os mecanismos envolvidos na migração dos eosinófilos. WARRINGA et al. (1992) e BRUIJNZEL et al. (1993), utilizando eosinófilos de pacientes com asma alérgica e com dermatite atópica, respectivamente, verificaram um aumento da quimiotaxia *in vitro* em resposta ao N formyl metionyl leucyl fenilalanina (fMLP) e ao PAF. No entanto, diferindo destes autores, nossos presentes resultados mostram que a quimiotaxia *in vitro* de eosinófilos de pacientes alérgicos não é modificada em resposta ao PAF. Esta discrepância de resultados pode ser decorrente da patologia estudada (asma/dermatite) e do método de quimiotaxia (câmara de Boyden) utilizado por estes autores.

Estudos sugerem que a pré-exposição *in vivo* dos eosinófilos à algumas citocinas, como a IL-5, IL-3, GM-CSF e eotaxina, pode tornar os eosinófilos dos pacientes alérgicos mais sensíveis à ação de fatores quimiotáticos, colaborando para o acúmulo tecidual destas células.

A eotaxina e a IL-5 são as principais substâncias envolvidas no acúmulo seletivo de eosinófilos no local da inflamação alérgica (PALFRAMAN et al., 1998b; FOSTER et al., 2001). Experimentos realizados em cobaias e em camundongos sugerem que estas citocinas atuam cooperativamente na promoção do recrutamento dos eosinófilos para o tecido (COLLINS et al., 1995; MOULD et al., 1997). A IL-5 funciona como uma citocina essencial na diferenciação dos eosinófilos na medula óssea, além de exercer um importante papel na ativação dessas células, favorecendo o recrutamento seletivo para o local inflamado

(COLLINS et al., 1995; MOULD et al., 1997; KUDLACZ et al., 2002). De acordo com PALFRAMAN et al. (1998b), a eotaxina induz a quimiotaxia dos eosinófilos da medula óssea, enquanto a IL-5 induz a quimiocinese, um movimento aleatório dos eosinófilos. A combinação destes efeitos, ou seja, a quimiocinese dos eosinófilos estimulada pela IL-5 e a quimiotaxia estimulada por um gradiente de concentração de eotaxina, seria eficiente em mobilizar os eosinófilos da medula óssea para o sangue periférico e, conseqüentemente, para o local da inflamação (PALFRAMAN et al., 1998b).

Nossos resultados da investigação da ação da eotaxina e IL-5 na migração dos eosinófilos mostram que a eotaxina não foi capaz de induzir qualquer modificação na migração ao PAF dos eosinófilos dos indivíduos sadios ou dos pacientes com rinite alérgica. No entanto, em resposta à IL-5 como agente quimiotático, a eotaxina provocou uma diminuição significativa da quimiotaxia dos eosinófilos dos pacientes com rinite, mas não dos eosinófilos dos voluntários sadios. Ao contrário, quando os eosinófilos foram incubados com a IL-5 e colocados para migrar em resposta à eotaxina ou ao PAF, observou-se um aumento da resposta quimiotática dos eosinófilos dos pacientes alérgicos e dos voluntários sadios. No entanto, a resposta dos pacientes alérgicos está aumentada, 66% na migração ao PAF e 112% na migração à eotaxina, em relação à resposta dos indivíduos sadios. Estes resultados sugerem que exposição à IL-5 induziu um estado de ativação das células dos voluntários sadios, de modo semelhante ao *priming* que ocorre com os eosinófilos dos pacientes alérgicos *in vivo*. Por outro lado, o incremento da resposta quimiotática dos eosinófilos dos pacientes alérgicos sugere que o estado de pré-ativação pode ser potencializado

por uma exposição posterior, *in vitro*, à IL-5. Resultados semelhantes da migração ao PAF foram observados por BRUIJNZEL et al. (1993) quando utilizaram eosinófilos obtidos de pacientes com dermatite atópica. Portanto, de modo semelhante ao observado em modelos experimentais (PALFRAMAN et al., 1998b; FOSTER et al., 2001), estes resultados indicam uma ação coordenada entre a eotaxina e a IL-5 na quimiotaxia dos eosinófilos dos pacientes alérgicos; ou seja, a ativação prévia destas células à IL-5 na circulação potencializou sua resposta quimiotática à eotaxina.

O recrutamento seletivo dos eosinófilos para o local da inflamação é controlado pela regulação exercida por citocinas, quimiocinas e moléculas de adesão. Os eosinófilos expressam a integrina VLA-4 ($\alpha_4\beta_1$), que se liga ao VCAM-1 das células endoteliais no processo de adesão e, posteriormente, à região CS-1 da fibronectina da matriz extracelular (BROIDE e SRIRAMARAO, 2001). Estudos em modelo experimental *in vivo*, utilizando cobaias mostrou que a IL-5 pode agir sinergicamente com a eotaxina no processo de mobilização dos eosinófilos da medula óssea (PALFRAMAN et al., 1998b). A IL-5 estimula seletivamente a liberação dos eosinófilos da medula óssea pelo aumento na expressão da integrina β_2 (Mac-1; $\alpha_M\beta_2$), que pode ser necessária para a migração dos eosinófilos dentro do compartimento hematopoiético e sua transmigração através do endotélio da medula óssea. Foi também observada uma inibição da expressão da α_4 , que pode indicar uma redução da adesão do VLA-4 ($\alpha_4\beta_1$) ao VCAM-1 das células endoteliais (PALFRAMAN et al., 1998a). Os resultados de SUNG et al. (2000) sugerem que a eotaxina pode estar envolvida neste processo, promovendo

o desacoplamento de eosinófilos aderidos à fibronectina, modulando, assim, a interação da integrina VLA-4 com seus ligantes.

Considerando-se estes resultados, podemos inferir que em nossos estudos a incubação dos eosinófilos dos pacientes com rinite alérgica com a eotaxina promoveu um efeito de desacoplamento, diminuindo a resposta quimiotática *in vitro* à IL-5. Por ter ocorrido somente com as células dos pacientes alérgicos, é possível que a incubação *in vitro* com a eotaxina pode ter potencializado a prévia ação exercida por esta citocina *in vivo*, quando os eosinófilos encontravam-se na circulação sanguínea.

Embora os resultados da literatura com relação à expressão das moléculas de adesão nos pacientes alérgicos são controversos, estudos prévios mostram que a adesão basal dos eosinófilos à fibronectina é dependente de VLA-4 e/ou Mac-1 (WALSH et al., 1995; CONRAN et al., 2001). Entretanto, alguns autores descrevem que os eosinófilos de pacientes atópicos apresentam um aumento basal da expressão do LFA-1, mas não do VLA-4 ou do Mac-1 (LANTERO et al., 2002). Outros autores relatam uma diminuição da expressão do VLA-4, acompanhada de um aumento da expressão do Mac-1, em pacientes com eosinofilia (KAYABA et al., 2001). Além da quantidade de moléculas de adesão expressas na superfície celular, o estado funcional das integrinas pode ser modificado, levando a mudanças na afinidade de ligação ao contra-ligante, sem mudar o nível de expressão (DIAMOND e SPRINGER, 1994). Estudos recentes têm mostrado que o estado de ativação das integrinas pode influenciar tanto sua adesão como sua função (CONRAN et al., 2001). A aversez das integrinas e não o número total de moléculas expressas influenciam a adesão e migração celular. Foi

recentemente demonstrado que as integrinas β_1 e β_2 podem permanecer em estado de ativação parcial nos eosinófilos. Além disso, citocinas como a IL-5, podem prevenir a ativação da β_1 enquanto aumenta a função da integrina β_2 (MATSUMOTO et al., 1997).

Em nossos estudos, para verificar a adesividade *in vitro* dos eosinófilos de pacientes e de voluntários sadios, utilizamos placas recobertas com fibronectina. Verificamos que a adesão dos eosinófilos dos pacientes aumentou em relação às células dos voluntários sadios, sugerindo um aumento da expressão e/ou função do VLA-4 nestas células. A pré-incubação com a eotaxina ou IL-5 não provocou qualquer mudança na resposta adesiva dos eosinófilos dos pacientes ou dos voluntários sadios. Portanto, a incubação *in vitro* com a IL-5 e eotaxina dos eosinófilos dos pacientes não potencializou a expressão e/ou função das moléculas de adesão. Isto sugere que a pré-exposição destes eosinófilos às citocinas presentes na circulação foi capaz de causar aumento máximo da expressão e/ou função das moléculas de adesão, impedindo qualquer efeito adicional decorrente da incubação *in vitro* com a IL-5 ou eotaxina.

O estudo de JIA et al. (1999) mostrou que a eotaxina aumenta a adesão *in vitro* de eosinófilos ao ICAM-1 e VCAM-1. Utilizando anticorpos contra as moléculas de adesão, estes autores verificaram que a aderência de eosinófilos induzida pela eotaxina é grandemente atribuída ao Mac-1. Neste mesmo trabalho, resultados *in vivo* indicam que a eotaxina pode exercer influência sobre a interação VLA-4/VCAM-1, mas em estágio tardio do processo de migração. A utilização da fibronectina como base para a adesão, dificulta a verificação da

participação da integrina β_2 em nossos estudos. No entanto, pode-se excluir a participação da VLA-4 na adesão das células incubadas com a eotaxina. Futuros estudos usando placas recobertas com as moléculas de adesão VCAM-1 e ICAM-1, deverão reforçar nossos resultados.

A eficácia clínica atribuída aos glicocorticóides pode ser decorrente de sua ação ao reduzir o número de eosinófilos circulantes (GLEICH et al., 1986) ou induzir a apoptose, inibindo a síntese de citocinas envolvidas em sua sobrevivência, como o GM-CSF e a IL-5 (LAMAS et al., 1992, NITTOH et al., 1998, BLOOM et al., 2004). Vários estudos têm revelado que os glicocorticóides também exercem um efeito imunomodulador (DHABHAR e McEWEN, 1999). Em geral, concentrações farmacológicas de glicocorticóides exercem efeitos imunossupressivos, enquanto concentrações fisiológicas, como verificado no estresse agudo, podem aumentar a resposta imune (DHABHAR e McEWEN, 1999; DHABHAR, 2002). A relação entre a produção do corticosteróide e a migração das células para as vias aéreas foi estudada em cobaias sensibilizadas e desafiadas com ovalbumina (DANAHAY et al., 1997, 1999). Nestes estudos verificou-se um aumento dos níveis de cortisol entre 1 e 3 horas após o desafio, que pode estar relacionado com o estresse envolvido no processo. Nestas condições, o cortisol poderia até exercer um efeito antiinflamatório endógeno, mas não o suficiente para influenciar a migração de eosinófilos e neutrófilos para o lavado broncoalveolar, verificado de 3 a 6 horas, respectivamente, após o desafio antigênico (DANAHAY et al., 1999).

Considerando-se os conhecimentos acima citados, investigamos se o tratamento *in vitro* dos eosinófilos dos pacientes com rinite alérgica e dos

voluntários sadios com a dexametasona pode modular a quimiotaxia *in vitro* e a adesão destas células à fibronectina.

Estudos recentes mostram que a dexametasona pode modular a expressão das moléculas de adesão presentes no endotélio vascular, mas nenhuma citação foi encontrada na literatura com relação ao VLA-4. ITO et al. (2003), utilizando modelo experimental com ratos, demonstraram que o tratamento com dexametasona induz marcante inibição da eosinofilia, a qual é acompanhada por diminuição da expressão das moléculas de adesão VCAM-1 e ICAM-1. Estes dados sugerem que o efeito antiinflamatório da dexametasona é, em parte, devido à modulação destas moléculas de adesão do endotélio vascular prevenindo o aparecimento dos sintomas característicos da alergia ao atenuar a migração dos eosinófilos para os tecidos. Nossos resultados mostraram que a dexametasona provocou uma diminuição significativa da quimiotaxia ao PAF e da adesão à fibronectina, tanto dos eosinófilos dos voluntários sadios como dos pacientes com rinite alérgica. Como o VLA-4 adere ao VCAM-1 do endotélio e à fibronectina (segmento CS-1) da matriz extracelular, podemos sugerir que em nossos resultados o efeito dos glicocorticóides é decorrente, ao menos parcialmente, da inibição da expressão e/ou função da integrina VLA-4.

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

5 – RESUMO E CONCLUSÃO

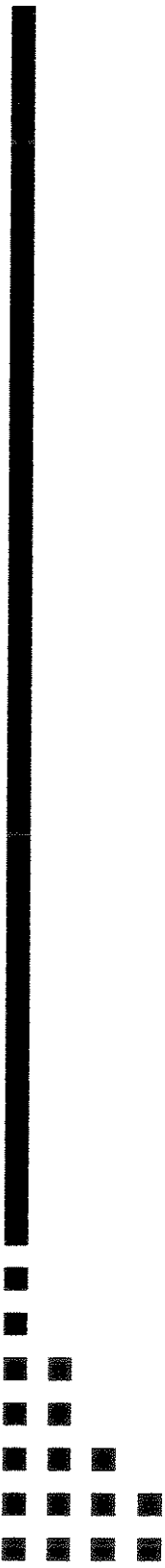
- O PAF, IL-5 e eotaxina induzem quimiotaxia de eosinófilos *in vitro*. Em eosinófilos de pacientes com rinite, a quimiotaxia induzida pela IL-5 e eotaxina (mas não pelo PAF) foi significativamente maior em comparação com a resposta de eosinófilos de indivíduos saudáveis;
- A resposta quimiotática induzida pelo PAF foi potencializada pela IL-5, sendo esta significativamente maior em células de pacientes com rinite. A eotaxina não modificou a resposta quimiotática de eosinófilos induzida pelo PAF em nenhum dos grupos experimentais;
- A resposta quimiotática induzida pela IL-5 não foi modificada pela eotaxina em células de indivíduos saudáveis. Porém, a eotaxina inibiu de modo significativo a resposta quimiotática induzida pela IL-5 em células de pacientes com rinite;
- A resposta quimiotática induzida pela eotaxina foi potencializada pela IL-5, sendo esta significativamente maior em células de pacientes com rinite;
- A adesão basal de eosinófilos em placas recobertas com fibronectina foi significativamente maior em células de pacientes com rinite alérgica do que de indivíduos saudáveis. A incubação dos eosinófilos com eotaxina ou IL-5 não

modificou a adesão em nenhum dos grupos estudados, comparados com os respectivos controles;

- A dexametasona foi eficaz em reduzir a quimiotaxia induzida pelo PAF e a adesão celular em ambos os grupos estudados.

Em conjunto, nossos resultados sugerem que os eosinófilos dos pacientes com rinite alérgica se encontram pré-ativados. Esta pré-ativação pode ser consequência da exposição *in vivo* à IL-5, mas não à eotaxina ou ao glicocorticóide, que aumenta a expressão e/ou função da molécula de adesão VLA-4 resultando em aumento da migração eosinofílica.

Resumo e Conclusão



6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BEEH, K.; BEIER, J.; KORNMANN, O.; MEIER, C.; TAEUMER, T.; BUHI, R. A single nasal allergen challenge increases induced sputum inflammatory markers in non-asthmatic subjects with seasonal allergic rhinitis: correlation with plasma interleukin-5. **Clin Exp Allergy**, 33:475-82, 2003

BLOOM, J. W.; CHACKO, I.C.; LOHMAN, M.; HALONEN, F. D. MARTINEZ, F. D.; MIESFELD, R. L. Differential control of eosinophil survival by glucocorticoids. **Apoptosis**, 9: 97-104, 2004.

BROIDE, D. H. Molecular and cellular mechanisms of allergic disease. **J Allergy Clin Immunol**, 108 (2): S65- 71, 2001.

BROIDE, D. H.; HOFFMAN, H.; SRIRAMARAO, P. Insights from model systems: Genes that regulate eosinophilic inflammation. **Am J Hum Genet**, 65: 302-7, 1999.

BROIDE, D.; SRIRAMARAO, Eosinophil trafficking to sites of allergic inflammation. **Immuno. Rev**, 179: 163-72, 2001.

BRUIJNZEEL, P. L.; KUIJPER, P. H.; RIHS S.; BETZ, S.; WARRINGA, R. A.; KOENDERMAN, L. Eosinophil migration in atopic dermatitis. In Increased migratory responses to N-formyl-methionyl-leucyl-phenyl-alanine, neutrophil-activating factor, platelet-activating factor, and platelet factor 4. **J Inve Dermatol**, 100: 137-41, 1993.

CLUTTERBUCK, E. J.; HIRST, E. M. A.; SANDERSON, C. J. Human interleukin-5 (IL-5) regulates the production of eosinophils in human bone marrow cultures: comparison and interaction with IL-1, IL-3, IL-6 e GM-CSF. **Blood**, 73:1504-12, 1989.

COLLINS, P. D.; MARLEAU, S.; GRIFFITHS-JOHNSON, D. A.; JOSE, P. J.; WILLIAMS, T. J. Cooperation between interleukin-5 and the chemokine eotaxin to induce eosinophil accumulation *in vivo*. **J Exp Med**, 182: 1169-74, 1995.

CONRAN, N.; FERREIRA, H. H. A.; LORAND-METZE, I.; THOMAZZI, S. M.; ANTUNES, E.; DE NUCCI, G. Nitric oxide regulates human eosinophil adhesion mechanisms *in vitro* by changing integrin expression and activity on the eosinophil cell surface. **Br J Pharmacol**, 134:632-8, 2001.

CONROY, D. M.; HUMBLE, A. A.; RANKIN, S. M.; PALFRAMAN, R. T.; COLLINS, P. D.; GRIFFITHS-JOHNSON, D. A. et al. The role of the eosinophil-selective chemokine, eotaxin, in allergic and non-allergic airways inflammation. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 92(Suppl. II): 183-91, 1997.

DANAHAY, H.; BROADLEY, K. J.; MCCABE, P. J.; NIALS, A. T.; SANJAR, S. Temporal relationships between leucocytes, IL-5 and IL-8 in guinea pig lungs, plasma cortisol and airway function after antigen challenge. **Inflamm Res**, 48 41-7, 1999.

DANAHAY, H.; BROADLEY, K. J.; MCCABE, P. J.; NIALS, A. T.; SANJAR, S. The potencial roles of cytokines, IL-5 and IL-8, and plasma cortisol in the anti-inflammatory actions of phosphodiesterase inhibitors in sensitized guinea-pig airways. **Pulm Pharmacol Ther**, 10: 277-85, 1997.

DHABHAR, F. S. Stress-induce augmentation of immune function-The role of stress hormones, leukocyte trafficking, and cytokines. **Brain, Behavior, and Immunity**, 16: 785-98, 2002.

DHABHAR, F. S.; MCEWEN, B. S. Enhancing versus suppressive effects of stress hormones on skin immune function. **PNAS**, 96:1059-1064, 1999.

DIAMOND M.S., SPRINGER T.A. The dynamic regulation of integrin adhesiveness. **Current Biology**, 4:506-17, 1994.

DYKEWICZ, M. S.; FINEMAN, S.; SKONER, D. P.; NICKLAS R.; LEE, R.; BLESSING-MOORE, J. Et al. Diagnosis and management of rhinitis: complete guidelines of the Joint Task Frce on Praticce Parameters in Allergy, Asthma and Immunology. **Ann Allergy Asthma Immunol**, 81:478 – 518, 1998.

FERREIRA, H. H. A.; LODO, M. L. S.; MARTINS, A. R.; KANDRATAVICIUS, L.;SALAROLI, A. F.; CONRAN, N.; et al. Expression of nitric oxide synthases and in vitro migration of eosinophils from allergic rhinitis subjects **Eur J Pharmacol**, 442: 155-62, 2002.

FOSTER, P. S.; MOULD, A.W.; YANG, M.; MACKENZIE, J.; MATTES, J.; HOGAN, S.P.; et al. "Elemental signals regulating eosinophil accumulation in the lung. **Immunol Rev**, 179: 173-81, 2001.

GELFAND, E. W. Inflammatory mediators in allergic rhinitis. **J Allergy Clin Immunol**, 114(5):S135-7, 2004.

GIEMBYEZ, M. A.; LINDSAY, M. A. Pharmacology of the eosinophil. **Pharmacol Rev**, 51: 213-339, 1999.

GLEICH, G. J.; ADOLPHSON, C. R. The eosinophilic leukocyte: structure and function. **Adv Immunol**, 39: 177-253, 1986.

HANSEL, T. T.; DE VRIES, J. M.; IFF, T.; RIHS, S.; WANDZILAK, M.; BETZ, S. et al. An improved immunomagnetic procedure for the isolation of highly purified human blood eosinophils. **J Immunol Methods**, 145: 105-10, 1991.

ITO, A.; MIYAKE, M.; MORISHITA, M.; ITO, K.; TORII, S.; SAKAMOTO, T. Dexamethasone reduces lung eosinophilia, and VCAM-1 and ICAM-1 expression induce by Sephadex beads in rats. **Eur J Pharmacol**, 468: 59-65, 2003.

JIA, G; GONZALO, J.; HIDALGO, A.; WAGNER, D.; CYBULSKY, M.; GUTIERREZ-RAMOS, J. C. Selective eosinophil transendothelial triggered by eotaxin via modulation of Mac-1/ICAM-1 and VLA-4/VCAM-1 interactions. *Inter Immunol*, 11:1-10, 1999.

KAYABA, H; YAMADA, Y; CUI, CH; SAITO, N; HONDA, K; KOBAYASHI, Y; URAYAMA, O; CHIHARA, J. Expression of VLA-4 on eosinophils decreases in patients with eosinophilia. *Int Arch Allergy Immunol*, 125 (S1):33-7, 2001.

KHARITONOV, S. A.; RAJAJULASINGAM, K.; O'CONNOR, B.; DURHAM, S. R.; BARNES, P. J. Nasal nitric oxide increase in patients with asthma and allergic rhinitis and may be modulated by nasal glucocorticoids. *J Allergy Clin Immunol*, 99:58-64, 1997.

KROEGEL, C.; VIRCHOW, J. C.; LUTTMANN, W.; WALKER, C.; WARNER, J. A. Pulmonary immune cells in health and disease: the eosinophil leucocyte (part I). *Eur Respir J*, 7:519-43, 1994.

KUDLACZ, E.; WHITNEY, C.; ANDRESEN, C.; CONKLYN, M. Functional effects of eotaxin are selectively upregulated on IL-5 transgenic mouse eosinophils. *Inflammation*, 26(3): 111-19, 2002.

LAMAS, S.; MARSDEN, P. A.; LI, G. L.; MICHEL, T. Endotelial nitric oxide synthase: Molecular cloning and characterization of a distinct constitutive enzyme isoform. **Proc Natl Acad Sci USA**. 89: 6348-52, 1992.

LANTERO, S; SPALLAROSSA, D; SILVESTRI, M; SABATINI, F; SCARSO, L; CRIMI, E; ROSSI, GA. In allergic asthma experimental exposure to allergens is associated with depletion of blood eosinophils overexpressing LFA-1. **Allergy**, 57(11):1036-43, 2002.

LAMPINEN, M.; CARLSON, M.; HAKANSSON, L. D.; VENGE, P. Cytokine-regulated accumulation of eosinophils in inflammatory disease. **Allergy**, 59:793-805, 2004

LEUNG, D. Y. M.; BLOOM, J. W. Up date on glucocorticoid action and resistance. **J Allergy Clin Immunol**, 111(1):3-22, 2003

MATSUMOTO, K.; STERBINSKY, S. A.; BICKEL, C. A.; ZHOU, D. F.; KOVACH, N. L.; BOCHNER, B. S. Regulation of alpha 4 integrin-mediated adhesion of human eosinophils to fibronectin and vascular cell adhesion molecule-1. **J Allergy Clin Immunol**, 99(5): 648-56, 1997.

MONCADA, S.; PALMER, R. M. J.; RIGGS, E. A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. **Pharmacol Rev**, 43:109-42, 1991.

MOULD, A.W.; MATTHAEI, K. I.; YOUNG, I. G.; FOSTER, P. S. Relationship between interleukin-5 and eotaxin in regulating blood and tissue eosinophilia in mice. *J Clin Invest*, 99: 1064 –1074, 1997.

MOULD, A. W.; RAMSAY, A. J.; MATTHAEI, K. I.; YOUNG, I. G.; ROTHENBERG, M. E.; FOSTER, P. S. The effect of IL-5 and eotaxin expression in the lung on eosinophil trafficking and degranulation and the induction of bronchial hyperreactivity. *J Immunol*, 164:2142-50, 2000.

NACLERIO, R. M.; PROUD D.; TOGIAS, A. G. ADKINSON, N. F. JR.; MEYERS, D. A.; KAGEY-SOBOTKA, A. et al. Inflammatory mediators in late antigen-induced rhinitis. *N Engl J Med*, 313: 65-70, 1985.

NAGATA, M.; SEDGWICK, J. B.; BATES, M. E.; KITA, H.; BUSSE, W. W. Eosinophil adhesion to vascular cell adhesion molecule-1 activates superoxide anion generation. *J Immunol*, 155:2194-202, 1995.

NAGASE, H.; YAMAGUCHI, M.; JIBIKI, S.; YAMADA, H.; OHTA, K.; KAWASAKI, H. et al. A rapid an simple photometric assay for quantification of eosinophil chemotaxis. *Int Arch Allergy Immunol*, 122 (S1):10-4, 2000.

NITTOH, T.; FUJIMORI, H.; KOZUMI, Y.; ISHIHARA, K.; MUE, S.; OHUCHI, K. Effects of glucocorticoids on apoptosis of infiltrated eosinophils and neutrophils in rats. *Eur J Pharmacol*, 354: 73-81, 1998.

PALFRAMAN, R. T.; COLLINS, P. D.; SEVERS, N. J.; ROTHERY, S.; WILLIAMS, T. J.; RANKIN, S. M. Mechanisms of acute eosinophil mobilization from the bone marrow stimulated by interleukin 5: The role of specific adhesion molecules and phosphatidylinositol 3-kinase. **J Exp Med**, 188 (9): 1621-32, 1998a.

PALFRAMAN, R. T.; COLLINS, P. D.; WILLIAMS, T. J.; RANKIN, S. M. Eotaxin induces a rapid release of eosinophils and their progenitors from the bone marrow. **Blood**, 91: 2240-48, 1998b.

PONATH, P. D.; QIN, S.; POST, T. W.; WANG, J.; WU, L.; GERARD, N. P. et al. Molecular cloning and characterization of a human eotaxin receptor expressed selectively on eosinophils. **J Exp Med**, 183: 2437-48, 1996.

SANDERSON, C. J. Interleukin-5, eosinophils, and disease. **Blood**, 79: 3101-9, 1992.

SEMINARIO, M.; BOCHNER, B. Expression and function of β_1 integrins on human eosinophils. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 92(suppl II): 157-64, 1997.

SKONER, D. P. Allergic rhinitis: Definition, epidemiology, pathophysiology, detection, and diagnosis. **J Allergy Clin Immunol**, 108:S2-8, 2001.

STRATH, M.; WARREN, D.J.; SANDERSON, C.J. Detection of eosinophils using an eosinophil peroxidase assay. Its use as an assay for eosinophil differentiation factors. **J Immunol Methods**, 83(2):209-15, 1985.

SUNG, K.-L.; YANG, P. L.; KIM, J.; KO, D.; STACHNICK, G.; CASTANEDA, D.; NAYAR, J.; BROIDE, D. H. Eotaxin induces a sustained reduction in the functional adhesive state of very late antigen 4 for the connecting segment 1 region of fibronectin. **J Allergy Clin Immunol**, 106(5): 933-51, 2000.

SZABÓ, C. Regulation of the expression of the inducible isoform of nitric oxide synthase by glucocorticoids. **Ann N Y Acad Sci**, 30 (851):336-41, 1998.

TAI, P. C.; SUN, L.; SPRY, C. J.; Effects of IL-5, granulocyte/macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and IL-3 on the survival of human blood eosinophils *in vitro*. **Clin Exp Immunol**, 85:312-6, 1991.

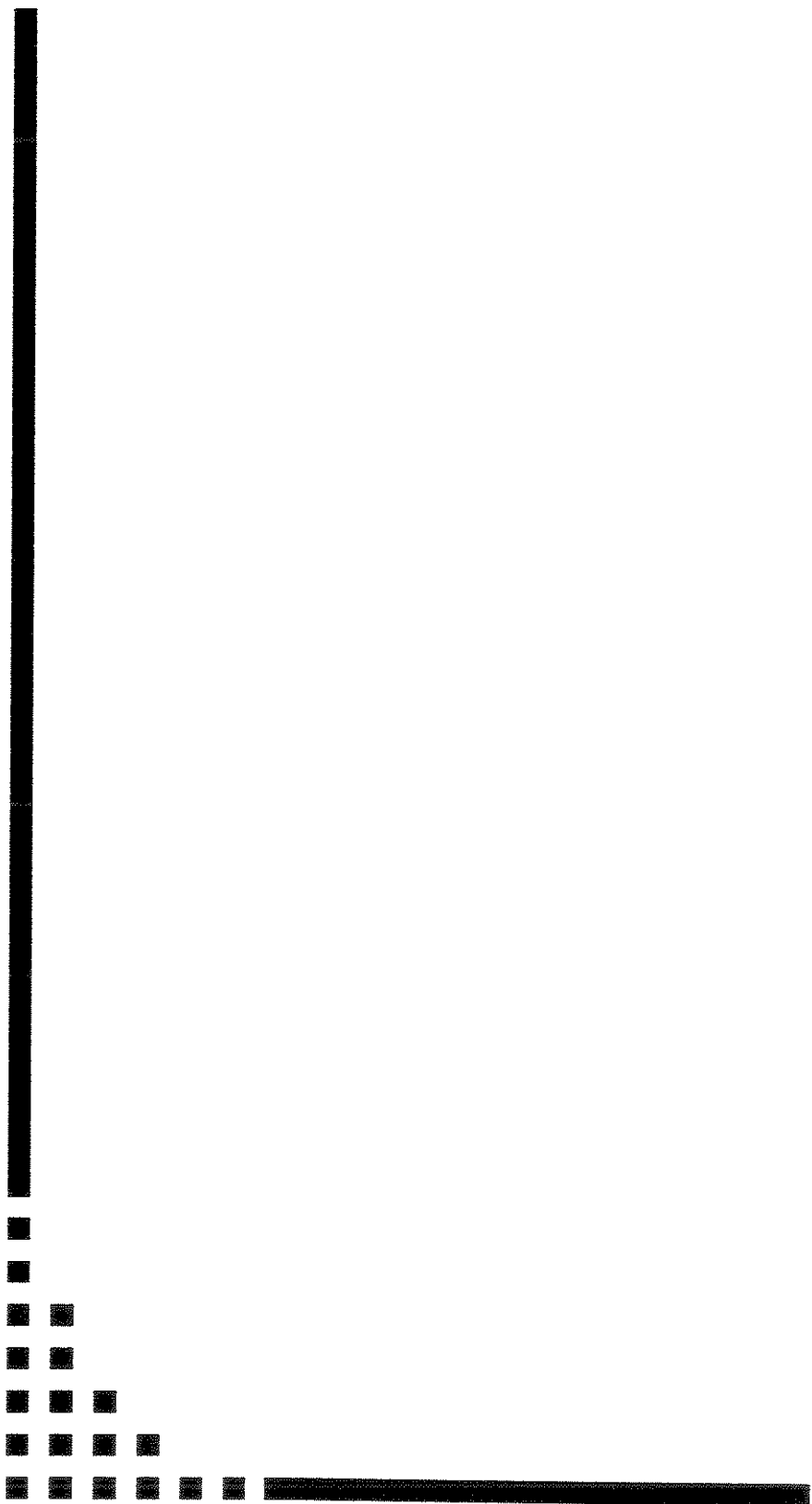
WALSH, G. M.; SYMON, F. A.; WARDLAW, A. J. Human eosinophils preferentially survive on tissue fibronectin compared with plasma fibronectin. **Clin Exp Allergy**, 25(11): 1128-36, 1995.

WARRINGA, R. A. J.; MENGELERS, H. J. J.; KUIJPER, P. H.M.; RAAIJMAKERS, J. A. M.; BRUIJNZEEL, P. L.; KOENDERMAN, L. In vivo priming of platelet-activating factor-induce eosinophil chemotaxis in allergic asthmatic individuals. **Blood**, 79: 1836-41, 1992.

WELLER, P. F. The immunobiology of eosinophils. **N Engl J Med**, 324:1110- 18, 1991.

WILLIAMS, C. M.; GALLI, S. J. The diverse potential effector and immunoregulatory roles of mast cells in allergic disease. **J Allergy Clin Immunol**, 105:847-59, 2000.

YOSHIKAWA, M.; MATSUMOTO, K.; LIDA, M.; AKASAWA, A.; MORIYAMA, H.; SAITO, H. Effect of extracellular matrix proteins on platelet-activating factor-induced eosinophil chemotaxis. **Int Arch Allergy Immunol**, 128(S 1):3-11, 2002.





Bragança Paulista, 19 de Abril de 2001

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - USF

Estudo: Ação da Dexametasona, Interleucina-5 e Eotaxina na Quimiotaxia *In Vitro* e na Expressão das Óxido Nítrico Sintases de Eosinófilos Humanos

Autor (es): Prof. Dr. Heloísa Helena de Araujo Ferreira
Mônia Lícia Silva Lodo

O CEP/CBS-USF analisou as pendências encaminhadas, recomendando a aprovação do projeto..

Parecer: Aprovado.

Prof. Dr. José Pedrazzoli Junior
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa
Ciências Biológicas e da Saúde
Universidade São Francisco

**AÇÃO DA DEXAMETASONA, INTERLEUCINA-5 E EOTAXINA NA
QUIMIOTAXIA *IN VITRO* E NA EXPRESSÃO DAS ÓXIDO NÍTRICO SINTASES DE
EOSINÓFILOS HUMANOS**

Responsável: Dra. Heloisa Helena de Araujo Ferreira
R.G. 18.170.785 C.P.F.059.11.20.38-04
Promotora: CCBS - USF
Av. São Francisco de Assis 218 fone 4034 8024
Bragança Paulista

O abaixo-assinado (nome, idade, RG, endereço)

Nome:

Idade:

RG:

Endereço:

declara que é de livre e espontânea vontade que está participando como voluntário do projeto de pesquisa supra-citado, de responsabilidade da bióloga Heloisa Helena de Araujo Ferreira. O abaixo-assinado está ciente que:

i - O objetivo da pesquisa é o efeito do óxido nítrico na atividade de eosinófilos (células relacionadas com processos alérgicos).

ii - Durante o estudo, serão coletadas amostras de sangue, a partir de uma veia de antebraço. Este procedimento poderá acarretar, embora infrequente, o desenvolvimento de inflamação da veia no ponto de punção.

iii - A participação neste estudo não lhe acarretará nenhum benefício terapêutico.

iv - Obteve todas as informações necessárias para poder decidir conscientemente sobre a participação do referido projeto de pesquisa.

v - Está livre para interromper sua participação a qualquer momento.

vi - A interrupção não causará prejuízo ao seu atendimento, cuidado e tratamento pela equipe do HUSF.

vii - Os resultados obtidos durante este ensaio serão mantidos em sigilo, e o HUSF não identificará o voluntário por ocasião da exposição e/ou publicação dos mesmos.

viii - Caso surja alguma intercorrência, deverá procurar o serviço de Pronto Socorro do HUSF e solicitar que o mesmo contacte o pesquisador responsável pelo estudo.

ix- Poderá contactar o Comitê de Ética em Pesquisa da USF para apresentar recursos ou reclamações em relação ao ensaio clínico.

Bragança Paulista, de de 200

Assinatura do Voluntário
ou responsável legal

Dra. Heloisa H. A. Ferreira