

DANIELLA GRANDO

LOCALIZAÇÃO ULTRAESTRUTURAL DE CADEIAS ALFA(α) DE
INTEGRINAS E DE OLIGOSSACARÍDEOS EM LEUCÓCITOS

Monografia apresentada para obtenção do grau de Bacharel no Curso de Ciências Biológicas do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná. Orientadora: Prof^a. Dr^a. Dorly de Freitas Buchi.

CURITIBA
1996

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todos os meus parentes e amigos que compartilharam comigo, desde o início, os momentos de alegria, dúvidas, dificuldades, até esta hora de conquista e realização.

A todas as pessoas do departamento de Biologia Celular, pela amizade, solidariedade e colaboração demonstradas ao longo do convívio, destacando o Prof. e amigo Marco pela disposição ao me ajudar na fabricação e correção deste trabalho.

Especialmente quero agradecer a minha "família de laboratório", "As pessoas entram em nossa vida por acaso, mas não é por acaso quando queremos que estas mesmas pessoas permaneçam": Dorly, Mariana, Laura, Jayme (nosso bendito fruto), Verinha, Loara, Célia Regina, Ana Paula. Todos verdadeiros amigos, cheios de alegria, descontração, bom humor, competência, dedicação, solidariedade, (seria preciso todo um dicionário). Agradeço por estarem sempre ao meu lado, pelos conselhos nesta Monografia. Irei lembrar com saudades das nossas horas de bate-papo, dos almoços comunitários, das discussões biológicas, dos nossos congressos animadíssimos, das conversas alegres na cantina, do nosso inesquecível amigo-secreto. Saibam que estarão sempre no meu lado esquerdo do peito.

Quero dizer um Muito Obrigada todo especial à Mariana, pela "assistência técnica" ao longo do trabalho. Por ter me ajudado a confeccionar esta Monografia, e mais do que isso, pela amizade, carinho e companheirismo sempre. De alguma maneira você sabe que esta Monografia também é sua.

Sempre ficarei grata a minha incrível Orientadora Dorly, por toda a alegria, o aprendizado, a liberdade, a confiança, a experiência que talvez eu não teria conhecido se você não fosse parte da minha vida. Você é muito especial, maravilhosa, mágica, capaz de transformar lágrimas em um belo sorriso. Valeu!

A gratidão para cada um dos meus irmãos, especialmente à minha irmã Rosa, por compartilhar a vida comigo, em todos os momentos.

Agradeço aos meus pais Darniz e Nilce pela dedicação, perseverança, pelo eterno perdoar, por serem meu refúgio nas horas difíceis, minha alegria nas conquistas, o meu orgulho por serem como são.

A Deus, por iluminar os meus dias, pela Vossa proteção aos meus apelos, enfim pela Vossa presença constante.

SUMÁRIO

Lista de Fotografias	V
Resumo	VI
1. Introdução e Revisão Bibliográfica	1
1.2. O Papel dos Leucócitos	1
1.3. A Família das Integrinas	5
1.3.1. A Subfamília VLA	7
1.3.2. A Subfamília LEU-CAM	10
1.3.3. A Subfamília das Citoadesinas	13
1.3.4. Novas Integrinas	13
1.4. Tabela 1 - Receptores da Família das Integrinas	16
2. Objetivos	17
3. Material e Métodos	18
3.1. Amostra controle	18
3.2. Amostra alérgica	18
3.3. Obtenção dos Leucócitos	18
3.4. Processamento dos Leucócitos pelo método <i>"post - embedding"</i>	19
3.5. Incubação com Anticorpos	20
3.6. Incubação com Lectinas	21
3.7. Contrastação	22
4. Resultados	23

4.1. Tabela 2 - Resumo dos resultados encontrados -----	24
5. Discussão -----	25
6. Conclusão -----	27
7. Documentação Fotográfica -----	28
8. Referências Bibliográficas -----	34

LISTA DE FOTOGRAFIAS

Fotografia 1 - localização da cadeia α_2 das Integrinas -----	29
Fotografia 2 - localização da cadeia α_6 das Integrinas -----	30
Fotografia 3 - localização da Lectina Con-A -----	31
Fotografia 4 - localização da Lectina PNA -----	32
Fotografia 5 - localização da Lectina HPA -----	33

RESUMO

A asma é uma doença inflamatória crônica das vias aéreas, onde linfócitos, neutrófilos, mastócitos e eosinófilos participam ativamente. O sintoma mais comum da asma é a obstrução do fluxo aéreo, que é reversível com ou sem tratamento. Leucócitos liberam mediadores químicos citotóxicos na asma e na fase tardia a árvore brônquica é destruída pela liberação de tais mediadores químicos e também pela liberação de histaminases, arilsulfatases e fosfolipases que inativam os mastócitos; portanto verifica-se que a reação inflamatória nada mais é que uma interação entre os leucócitos e outros sistemas que podem promover lesões nas estruturas pulmonares. As células utilizam receptores de membrana para comunicar-se com o meio onde estão, estes permitem a adesão célula/célula e célula/matriz e são fundamentais para ocorrer uma resposta inflamatória adequada; a imunocitoquímica permite a visualização, comparação e quantificação de tais moléculas. Por esse motivo utilizamos os leucócitos como células alvo para o estudo da fagocitose e imunocitoquímica ultraestrutural. Neste trabalho pretendemos comparar leucócitos de pessoas alérgicas e normais a nível de Microscopia Eletrônica de Transmissão, utilizando imunocitoquímica, método "*post-embedding*" onde, com o auxílio do ouro coloidal,

visualizamos os receptores que temos interesse, não só na membrana plasmática, mas também no citoplasma e organelas. Resultados prévios foram obtidos com os anticorpos anti- α_2 e anti- α_6 das cadeias de integrinas e também a localização de alguns resíduos de açúcares foram observados, utilizando três tipos de lectinas: PNA, Con-A, HPA. Este material foi observado em Microscopia Eletrônica de Transmissão e fotografado. Com as integrinas encontrou-se pouca marcação sempre em membranas de vesículas citoplasmáticas com conteúdo eletrondenso situadas na região perinuclear e no citoplasma periférico; também foi encontrada marcação na membrana plasmática. Com as lectinas : Con-A , encontrou-se maior marcação e com HPA e PNA encontrou-se pouca marcação. Novos estudos necessitam ser feitos na continuidade, principalmente para aumentar o tamanho da amostra.

1. - INTRODUÇÃO

1.1. - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.2. - O PAPEL DOS LEUCÓCITOS NAS REAÇÕES ALÉRGICAS

Manifestações alérgicas representam um fator de morbidade na população em geral, entre as quais a asma é considerada a mais importante. A asma é uma doença inflamatória crônica das vias aéreas, resultante da atividade de várias células que atuam em diversos níveis de defesa do nosso organismo, entre as quais destacam-se linfócitos, neutrófilos, mastócitos e eosinófilos. Os sintomas desta inflamação em indivíduos sensíveis estão usualmente associados à obstrução em graus variados das vias aéreas (WELLER,1984; GLEICH,1990).

Os leucócitos são células originadas da medula óssea que, assim como outras células sanguíneas, desempenham suas funções de defesa orgânica no tecido conjuntivo; São células capazes de liberar mediadores químicos potentes relevantes na patogenia da asma. Entre os mediadores, tanto de natureza proteica como lipídica, estão a proteína catiônica eosinofílica (ECP), proteína básica principal (MBP), leucotrienos, prostaglandinas e fator ativador plaquetária (HUBSCHER,1975; HENDERSON & col.,1984; BRUIJNZEEL & col.,1989).

As reações de defesa celulares nada mais são do que uma interação entre os leucócitos com os outros sistemas: o Sistema Imunológico, a Matriz Extracelular etc.

Na fase tardia da asma encontramos maciça infiltração de leucócitos no parênquima pulmonar, que promovem intensa destruição da árvore brônquica devido a liberação de mediadores e enzimas como histaminases, arilsulfatases e fosfolipases, que inativam a ação dos mastócitos. Portanto existem interações entre os leucócitos e outros sistemas de defesa, que podem promover tanto lesões quanto proteção das estruturas pulmonares (FRIGAS & GLEICH,1986). Atualmente os eosinófilos são considerados os principais responsáveis pelas lesões inflamatórias que ocorrem na asma (FRIGAS & GLEICH,1986; ZIMMERMAN & col.,1988; VENGE & HAKANSSON,1991; VENGE,1993).

Para que as células se localizem e se organizem nos órgãos e tecidos, elas dependem da interação de moléculas da superfície celular com moléculas de outras células e com a Matriz Extracelular. O que regula a aderência celular e direciona a migração celular são os receptores (AGONDI,1993).

Para proteger efetivamente o corpo contra organismos infecciosos, as células do Sistema Imune devem circular como células não-

aderentes no sangue e linfa e migrar como células aderentes através dos tecidos (SPRINGER,1990).

A aproximação célula/célula ocorre pela interação eletrostática de cargas negativas nas membranas celulares, e também pela baixa expressão das moléculas de adesão (estão em repouso)(AGONDI,1993). Na presença de antígenos estranhos, os leucócitos devem ser capazes de aderir às células endoteliais, atravessar o endotélio e a membrana basal para agregar nos locais de infecção e aderir às células carregadoras de antígenos estranhos (diapedese) (PARROT & WILKINSON,1981).

BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS / UFPR

Investigando em cobaias, WEGNER & col.,1990 e RUGGERO & col.,1992, encontraram evidências de que a Molécula de Adesão Intercelular (ICAM-1) é importante para a adesão dos leucócitos no endotélio vascular, permitindo a diapedese e conseqüentemente a migração dos leucócitos nos tecidos inflamados. Os mecanismos de atração e migração dos leucócitos nas vias aéreas, assim como a descoberta da ICAM-1 e da citocina RANTES, acrescentaram novas informações sobre a reação inflamatória na asma.

Em reações alérgicas ocorre a apresentação do antígeno e então a ativação celular com mudanças nas cargas elétricas das membranas celulares ativando as moléculas de adesão célula/célula ou

célula/matriz, facilitando a migração celular e comunicação entre os componentes do sistema; Esta aderência é transitória (SHIMIZU,1990).

A transição rápida entre os dois estados (aderente e não-aderente) é a importante chave para a dupla função da vigilância imune e capacidade de resposta (SPRINGER,1990). As células, principalmente as que se deslocam pela Matriz Extracelular, utilizam-se de receptores localizados na membrana plasmática para comunicar-se com o meio onde estão inseridas. Estes receptores têm um papel importante na produção, migração e distribuição dos leucócitos nos tecidos e permitem a adesão entre células e célula/matriz, sendo fundamentais para que ocorra uma resposta inflamatória adequada.

Neste estudo utilizamos técnicas como a imunocitoquímica que nos permitem não apenas visualizar a presença ou não das moléculas investigadas, mas também comparar e quantificar estas moléculas. Em nosso Laboratório de Cultivo Celular dispomos de vários anticorpos monoclonais contra receptores para matriz extracelular como as integrinas e suas frações peptídicas (beta-1, alfa-2, -6). Tais anticorpos nos foram gentilmente cedidos pelo Instituto Ludwig.

1.3. - A FAMÍLIA DAS INTEGRINAS

Todas as moléculas que parecem participar do reconhecimento pelas células durante os seus trajetos, são identificadas por anticorpos monoclonais contra moléculas da superfície celular. Os linfócitos, assim como os outros leucócitos, expressam nas suas superfícies uma série de moléculas diferentes. Algumas destas aparecem em estágios particulares de diferenciação celular ou quando são ativadas por curto período, enquanto outras são características de linhagens celulares distintas entre si. Tais moléculas podem ser usadas para distinguir populações de células, sendo então chamadas de Marcadores. Muitas destas células podem ser identificadas com o uso de anticorpos monoclonais. Recentemente uma nomenclatura sistematizada foi criada para as moléculas de superfície - o sistema CD, no qual os marcadores são numerados CD1, CD2, etc. O termo CD (Cluster Designation = Denominação de Grupamento) é derivado da análise por computador dos anticorpos monoclonais criados em diferentes laboratórios, contra antígenos leucocitários humanos. Os anticorpos com especificidade similar foram agrupados e receberam um número de CD. Este número é também utilizado para indicar a molécula específica que é reconhecida por um grupo de anticorpos monoclonais. Em muitos casos a função das

moléculas é conhecida; por exemplo, CD35 é um receptor para complemento C3b (RC1). Os marcadores podem ser demonstrados usando anticorpos fluorescentes como sondas. Nestas situações os marcadores de superfície agem como antígenos; por exemplo, anticorpos de camundongo irão se ligar a antígenos específicos (receptores) (ROITT,1992).

As integrinas são glicoproteínas transmembranas que formam uma família de receptores para várias moléculas. São chamadas integrinas porque integram o meio extracelular com o citoesqueleto. Promovem adesão célula/célula, célula/matriz, fazendo agregação plaquetária, reparação tecidual e invasão tumoral (AGONDI,1993). São formadas por duas subunidades: α e β . A cadeia α é formada por dois peptídeos unidos e a cadeia β por um peptídeo maior (BUCHI,1993). São conhecidas 22 tipos diferentes de subunidades α e 9 subunidades β (RUOSLAHTI,1991; RUOSLAHTI *et al.*, 1994; CUMBIER & YAMADA,1995; Ver Tabela 1). As várias combinações formam pelo menos 31 integrinas e essa diversidade proporciona às células maior capacidade para reconhecer diversos substratos adesivos. As subfamílias de integrinas existentes são definidas cada uma por uma subunidade β comum. As subunidades β_1 ou CD29, β_2 ou CD18 e β_3 ou CD61 são subunidades que podem associar-se com várias subunidades α distintas e define três subfamílias das integrinas:

- a família da proteína VLA (HEMLER,1988; SPRINGER,1990);
- a família LEU-CAM (SPRINGER *et al.*,1987; SPRINGER,1990);
- as citoadesinas (GINSBERG *et al.*,1988).

1.3.1 - A subfamília VLA: Os membros da subfamília VLA contêm uma subunidade β comum, sendo esta a subunidade β_1 (Ver Tabela 1). A sigla VLA designa Antígenos de Ativação Tardia (Very Late Antigen) porque duas delas, a VLA-1 e a VLA-2, aparecem nos linfócitos duas a quatro semanas depois da estimulação com o antígeno. Inclui receptores para os componentes da Matriz Extracelular, a Fibronectina, a Laminina e o Colágeno, os quais são encontradas em células não-hematopoiéticas e leucócitos (Ver Tabela 1). Estes receptores têm papel importante na organização dos tecidos, por se ligarem às moléculas da Matriz Extracelular existentes nos vários tecidos. Estas subunidades reconhecem a sequência de aminoácidos arginina-glicina-ácido aspártico (seqüência RGD), que está incluso nos componentes da matriz (RUOSLAHTI,1991; AGONDI,1993; HEMLER,1988; SPRINGER,1990).

Algumas moléculas VLA são localizadas nos leucócitos, e a expressão delas em células não-hematopoiéticas não requer ativação. A indução da VLA-1,-2,-3, e -5, que são expressadas em leucócitos e atravessam o endotélio, pode ser de grande importância na localização

dos leucócitos e no controle da inflamação (SPRINGER,1990). Cinco destas sete proteínas VLA, VLA-1 ($\alpha_1\beta_1$), VLA-2 ($\alpha_2\beta_1$), VLA-3 ($\alpha_3\beta_1$), VLA-4 ($\alpha_4\beta_1$), VLA-5 ($\alpha_5\beta_1$), VLA-6 ($\alpha_6\beta_1$), VLA-7 ($\alpha_7\beta_1$) atuam como receptores para Laminina e quatro delas ligam-se a Fibronectina (ELICES & HEMLER,1989; SONNEMBERG *et al.*,1990; HYNES, 1992; Ver Tabela 1).

A VLA-1 é um receptor para Colágeno e Laminina em células de Melanoma Murino (KRAMER *et al.*, 1989; VEIGA, 1994). A VLA-3 liga-se a Colágeno, Laminina e Fibronectina em Fibroblastos humanos e Osteossarcoma (GEHLSSEN *et al.*, 1989). A especificidade da VLA-2 como receptor para Laminina pode variar de acordo com o tipo celular que expressa esta molécula. Então, nas plaquetas a VLA-2 atua como um receptor específico para Colágeno (STAATZ *et al.*,1989), entretanto nas células endoteliais e células de melanoma a mesma molécula também pode atuar como receptor para Laminina (LANGUINO *et al.*,1989; Ver Tabela 1).

A VLA-4 (CD49d / CD29) é uma integrina não usual, encontrada nos linfócitos residentes, monócitos e células derivadas da crista neural, atuando como receptor da matriz e de outras células (HEMLER,1990). Como receptor de matriz, a VLA-4 liga-se a um domínio da Fibronectina diferente do sítio reconhecido pela VLA-5 (GUAN & HYNES,1990). Como receptor celular, liga-se a moléculas recentemente

descritas como VCAM-1 ou INCAM 110 as quais são membros da superfamília das Imunoglobulinas. Esta molécula é induzida no endotélio por mediadores inflamatórios com cinética semelhante a ICAM-1 e sua interação com VLA-4 sugere um segundo mecanismo de adesão linfócito-endotélio diferente da interação LFA-1 / ICAM (ELICES,1990; SPRINGER,1990).

Em deficiências congênitas de integrinas β_2 , as quais não afetam a VLA-4, os linfócitos retêm a habilidade para migrar e atravessar o endotélio no local da inflamação (TAKADA *et al.*,1989; HOLZMANN *et al.*,1989). A única proteína VLA conhecida até o momento, cuja função é específica para a Laminina, é o receptor VLA-6 (SONNEMBERG *et al.*,1990). A VLA-7 é encontrada em Melanomas humanos; seu ligante é a Laminina. Outra integrina, a $\alpha_v\beta_1$, liga-se a Colágeno, Fibrinogênio, Fibronectina, Fator de Von-Willebrand e Vitronectina (KRAMER *et al.*, 1989; VEIGA,1994; Ver Tabela 1). A complexidade da família das integrinas tem sido recentemente aumentada pela descoberta de novas subunidades β que podem associar-se com as subunidades α_4 , α_6 e α_v (SHIMIZU & SHAW,1991; Ver Tabela 1). Ambas as subunidades α e β têm ligantes específicos. O uso combinatório destas subunidades confere consideráveis diversidades no domínio transmembrana e citoplasmático controlando a comunicação dentro e fora da célula.

1.3.2 - A subfamília LEU-CAM: Compreende as integrinas dos leucócitos, que fazem parte da subunidade β_2 , formam heterodímeros em que a subunidade α é associada não covalentemente a uma subunidade β comum, neste caso β_2 , e têm como principais funções a citotoxicidade, fagocitose, quimiotaxia e indução de proliferação e diferenciação de linfócitos (SPRINGER,1990; Ver Tabela 1). Foram identificadas 3 subunidades α por separação com anticorpos monoclonais, estando envolvidas em interações com antígenos não-específicos: LFA-1, LFA-2 (CD2) e LFA-3. São moléculas denominadas Antígenos de Função Leucocitária (Lymphocyte Function Antigen), as quais auxiliam na localização de células T ativadas pelo acúmulo de antígenos nos linfonodos. São receptores que interagem com o endotélio e controlam a migração dos leucócitos para os diferentes tecidos (DUSTIN & SPRINGER,1989).

A LFA-1 ou CD11a: está presente em todos os leucócitos, colônias formadoras de eritrócitos e têm como funções a localização de linfócitos em órgãos linfóides, interação com endotélio vascular (inflamação e enxerto) e interação com fibroblastos, queratinócitos, células sinoviais e hepatócitos (AGONDI,1993). Seus ligantes são ICAM-1 (CD54) e ICAM-2, que fazem parte da superfamília das Imunoglobulinas: a ICAM-1 é uma glicoproteína que se expressa em níveis baixos em células

não-hematopoiéticas, porém aumentando seu nível quando as células são estimuladas por Citocinas como IL-1, TNF e IFN; também está proeminente em células endoteliais durante inflamação. Este co-receptor contém 5 domínios e não contém seqüência RGD (STAUNTON *et al.*,1989). A ligação LFA-1 / ICAM-1 media a adesão de linfócitos T às células endoteliais, fibroblastos, queratinócitos, sinóvia, macrófagos, células tímicas e células T ativadas (ANDERSON & SPRINGER,1987); a ICAM-2 é uma glicoproteína com 2 domínios, sem seqüência RGD e está relacionada à adesão de células endoteliais (PATARROYO,1989; STAUNTON *et al.*,1989; AGONDI,1993).

A LFA-2 ou CD2: é um membro da família das Imunoglobulinas, expressado nos linfócitos T, seu ligante é a LFA-3 de outras células. A LFA-3 também faz parte da família das Imunoglobulinas (BIERER *et al.*,1989; SPRINGER, 1990).

A interação entre os ligantes LFA-1 / ICAM e CD2 / LFA-3 pode ser mostrada pelos efeitos na adesão de anticorpos monoclonais contra moléculas individuais independentes. Os anticorpos monoclonais para um destes ligantes ou para os Receptores das Células T (TCR) ou CD8, podem impedir a morte dos linfócitos T, mostrando que é um processo altamente complexo e que requer cooperação entre diversas moléculas de superfície (MARTZ,1987; KISHIMOTO *et al.*,1989).

A LFA-1 é a mais versátil das moléculas de adesão da família das integrinas; pertence a subunidade β_2 e está mais relacionada a 2 outras integrinas, a Mac-1 e p150,95 com as quais compartilha a subunidade β_2 (Ver Tabela 1). Estas três integrinas β_2 ocorrem somente em células brancas do sangue. A Mac-1 ou CR3 é encontrada principalmente na superfície de Macrófagos (BUCHI,1993), Monócitos e Granulócitos. A p150,95 ou CR4 está presente na maioria dos Leucócitos, sendo envolvidas na adesão destas células ao endotélio (POHLMANM *et al.*,1986; SPRINGER *et al.*,1987). Ambas integrinas - Mac-1 e p150,95 - tem como ligante o iC3b do complemento, que é gerado pela clivagem de C3b e contém seqüência RGD que não se sabe se é essencial à ligação (AGONDI,1993).

A importância das integrinas em leucócitos está ilustrada na Deficiência Congênita de Adesão em Leucócitos, nos quais elas são deficientes por causa de mutações na subunidade β_2 . Os pacientes têm infecções recorrentes, às vezes fatal na infância. Nos neutrófilos destes pacientes falta uma orientação na migração como resposta à quimioatração e são incapazes de ligar e atravessar o endotélio nos locais de infecção (KISHIMOTO *et al.*,1989; ANDERSON & SPRINGER,1987). Recentemente, descobriu-se que, com transplante de medula óssea de parentes com HLA idênticos, ocorre uma expressão normal do complexo

CD11x/CD18 nos Leucócitos circulantes, neutralizando tal Deficiência (STARY *et al.*, 1996).

1.3.3 - A subfamília das Citoadesinas ou CD61: Compreende a subunidade β_3 , são receptores para Vitronectina e receptor IIb / IIIa (GINSBERG *et al.*, 1988; Ver Tabela 1). O receptor de Vitronectina (VNR) é encontrado em muitas células tumorais, células endoteliais, plaquetas e osteoclastos. Os osteoclastos estão relacionados com a osteoporose e o bloqueio da Vitronectina poderia ser usado na terapêutica da osteoporose; em contraste, o IIb / IIIa é encontrado somente em plaquetas (AGONDI, 1993). A principal integrina das plaquetas - a glicoproteína IIb / IIIa - requer ativação para se unir a seu ligante, portanto nas plaquetas em repouso, mas não resulta em agregação (DEJANA, 1990; Ver Tabela 1). Esta glicoproteína complexa serve como um receptor para quatro proteínas: Fibrinogênio, Fibronectina, Fator de Von Willebrand e Vitronectina (HYNES, 1987; Ver Tabela 1). A deficiência hereditária deste receptor tem como consequência um defeito em agregar plaquetas após resposta a ativação - é a Tromboastenia ou Doença de Glanzmann (PYTELA *et al.*, 1986). Algumas integrinas pouco conhecidas, como $\alpha_v\beta_3$ e $\alpha_{vb}\beta_3$ também fazem parte da subfamília das Citoadesinas e o ligante de ambas parece ser a Fibronectina (HENDEY *et al.*, 1996).

1.3.4. - Novas integrinas:

- a cadeia β_4 ou Intepsina ($\alpha_6\beta_4$) está presente em células de origem epitelial e células de Schwann e sua função não está bem definida, mas provavelmente media adesão de células à matriz. Seu provável ligante é a Laminina (JONES *et al.*, 1993; EDWARDS, 1996). A integrina $\alpha_1\beta_4$ media a adesão de Linfócitos ao VCAM-1 e L1/2.
- A cadeia β_5 ou $\alpha_v\beta_5$ está presente em células epiteliais e de carcinoma; seus ligantes são Vitronectina e Fibronectina.
- A cadeia β_7 , especificamente a $\alpha_4\beta_7$, liga-se a MadCAM-1 resultando no recrutamento de células mononucleares de sangue periférico nos locais da inflamação (AGONDI, 1993; CAMPBELL *et al.*, 1996; JOHNSTON *et al.*, 1996; Ver Tabela 1).
- A integrina $\alpha_v\beta_3$ é encontrada em Neutrófilos, permitindo a ligação a outros Neutrófilos fazendo a desunião e restabelecimento da mobilidade (HENDEY *et al.*, 1996). BUCKLEY *et al.*, 1996, identificaram um novo membro da Superfamília das Imunoglobulinas, a CD31 ou PECAM-1 (Moléculas de Adesão das Células Endoteliais e Plaquetas), a qual tem um papel importante nas funções das células endoteliais, incluindo angiogênese, inflamação, ativação de integrinas e adesão célula-célula. Através de anticorpos anti-CD31 e anti-integrinas, foi descoberto que a integrina $\alpha_v\beta_3$ é o ligante para CD31 em células monocíticas. A interação de CD31 com a integrina $\alpha_v\beta_3$ pode ser importante em vários

aspectos de funções endoteliais, incluindo angiogênese e transmigração leucócito-endotélio.

BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS / UFPA

O crescente interesse nas interações célula/célula e célula/matriz extracelular tem demonstrado que estas relações receptor/ligante modulam várias funções, como migração, reconhecimento e diferenciação destas células; além disso, estudos futuros sobre novos receptores junto aos já conhecidos podem fornecer informações para uma nova modalidade terapêutica, por manipulação da resposta imune. Portanto, quanto mais se desenvolve o conhecimento humano nas diversas áreas relacionadas com a manutenção do equilíbrio orgânico e da saúde, mais relevante se torna o estudo da dinâmica envolvida com receptores celulares.

1.4. - TABELA 1 - RECEPTORES DA FAMÍLIA DAS INTEGRINAS

SUBFAMÍLIAS (NOMES)	SUBUNIDADES	LIGANTES	DISTRIBUIÇÃO
VLA-1	$\alpha_1\beta_1$	Col, Ln	AMPLA
VLA-2	$\alpha_2\beta_1$	Col, Ln, $\alpha_3\beta_1$, Fn	AMPLA
VLA-3	$\alpha_3\beta_1$	Col, Ln, Fn, Ep, En, $\alpha_2\beta_1$, $\alpha_3\beta_1$	AMPLA
VLA-4	$\alpha_4\beta_1$	Fn (VCAM-1)	AMPLA
VLA-5 (FnR)	$\alpha_5\beta_1$	Fn	AMPLA
VLA-6	$\alpha_6\beta_1$	Ln	AMPLA
VLA-7	$\alpha_7\beta_1$	Ln	AMPLA
$\alpha_8\beta_1$	$\alpha_8\beta_1$?	AMPLA
$\alpha_v\beta_1$	$\alpha_v\beta_1$	Fn, Vn	AMPLA
LFA-1	$\alpha_L\beta_2$	ICAM-1/ICAM-2	LEUCÓCITOS
Mac-1	$\alpha_M\beta_2$	iC3b, Fb, Fx, ICAM-1	LEUCÓCITOS
p150,95	$\alpha_x\beta_2$	iC3b, Fb	LEUCÓCITOS
$\alpha_{IIb}\beta_3$	$\alpha_{IIb}\beta_3$	Fb, Fn, Fvw, Vn, Ts	PLAQUETAS
VNR	$\alpha_v\beta_3$	Vn, Fb, Fvw, Fn, Ts, Os, Col	CELS. ENDOTELIAIS
$\alpha_{v\beta}\beta_3$	$\alpha_{v\beta}\beta_3$	Fn, Vn	NEUTRÓFILOS
$\alpha_1\beta_4$	$\alpha_1\beta_4$	VCAM-1, L1/2	LINFÓCITOS
$\alpha_6\beta_4$	$\alpha_6\beta_4$	Ln	CÉLS. ENDOTELIAIS
$\alpha_v\beta_5$	$\alpha_v\beta_5$	Vn	CÉLS. EPITELIAIS E DE CARCINOMA
$\alpha_v\beta_6$	$\alpha_v\beta_6$	Fn	?
$\alpha_4\beta_7$	$\alpha_4\beta_7$	Fn, VCAM-1, MadCAM	?
$\alpha_{IEL}\beta_7$	$\alpha_{IEL}\beta_7$?	?
$\alpha_v\beta_8$	$\alpha_v\beta_8$?	?
$\alpha_8\beta_9$	$\alpha_8\beta_9$?	?

ABREVIACÕES:

Ln → Laminina; Col → Colágeno; Fn → Fibronectina; Fb → Fibrinogênio; En → Entactina; VCAM → Molécula de adesão da célula vascular; Ep → Epiligrina; Vn → Vitronectina; ICAM → Molécula de adesão intercelular; iC3b → Componente C3 do complemento inativado; Fx → Fator X; Fvw → Fator de Von Willebrand; Ts → Thrombospondina; Os → Osteopontina; MadCAM → Molécula de adesão das células da mucosa. FONTE: LARSON & SPRINGER, 1990; DANEN *et al.*, 1995; RUOSLAHTI *et al.*, 1994.

2. OBJETIVOS

a) Objetivos específicos: em indivíduos alérgicos identificar:

- a ultraestrutura dos leucócitos;
- mapear alguns receptores através de anticorpos específicos;
- mapear oligossacarídeos, utilizando lectinas complexadas com ouro coloidal.

b) Objetivo geral: em pacientes alérgicos realizar um estudo dos leucócitos a nível ultraestrutural e imunocitoquímico.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 - Amostra controle: indivíduos não alérgicos

Foram utilizados 21 indivíduos numa faixa etária compreendida entre 20 a 25 anos, ambos os sexos, seguramente não alérgicos, atuando como controle.

3.2 - Amostra alérgica: indivíduos alérgicos

Indivíduos alérgicos, obtidos através do consultório do Dr. Orley Kantor Júnior, pneumologista. Um total de 30 pacientes foram diagnosticados através de uma série de exames, tais como: espirometria com prova broncodilatadora, teste cutâneo alérgico de leitura imediata para alérgeno, hemograma, esfregaço de muco nasal e dosagem de IgE plasmática.

3.3 - Obtenção dos leucócitos

Faz-se a obtenção do sangue, o qual é coletado em seringas de 10 ml previamente heparinizadas. Após a coleta, os 10 ml de sangue periférico venoso são levados ao fluxo laminar, onde são distribuídos em tubos de centrifuga siliconizados. Estes tubos são colocados na centrífuga para que o sangue possa ser separado em eritrócitos, leucócitos e plasma. Após centrifugação, obtemos uma separação bem evidente, dessa

maneira podemos retirar o plasma e congelá-lo em ependorfes identificados com o número do paciente, para posterior observação dos níveis de IgE. Com o auxílio de pipetas siliconizadas retiramos a camada de leucócitos, chamada "BUFF" e colocamos em ependorfes os quais já devem conter PBS estéril gelado para manter as células vivas. E os eritrócitos são desprezados.

3.4 - Processamento dos leucócitos pelo método "*post-embedding*"

Os leucócitos são lavados com PBS estéril, centrifugados, lavados com Tampão Cacodilato de Sódio 0,1M e centrifugados. Em seguida ocorre a fixação das células durante trinta minutos, sendo os últimos dez minutos de centrifugação; a solução fixadora é composta por: Glutaraldeído 0,5%, Paraformaldeído 4%, Cloreto de Cálcio 1mM diluídos em Tampão Cacodilato de Sódio 0,1M. Volta-se a lavar as células com Tampão Cacodilato 0,1M e em seguida faz-se a desidratação das células em acetona 70%, 90% e 100%; em dois períodos de quinze minutos. Terminada a desidratação deve-se iniciar a infiltração das células com a resina hidrofílica, que se realiza da seguinte forma:

x de resina LRWhite : x de acetona 100% (overnight)

x de resina LRWhite : x/2 de acetona 100% (overday)

resina LRWhite pura (overnight)

resina LRWhite pura (overday)

Realizados todos os passos da infiltração com resina inicia-se o emblocamento em cápsula "beem" : centrifuga-se, retira-se o sobrenadante e adiciona-se resina pura apenas para que cubra a ponta do ependorfe, ressuspende-se e aspira-se a resina com as células, coloca-se na cápsula "beem", completando-a com resina que fique cheia até a sua borda, deve-se então etiquetar a cápsula com o número correspondente ao paciente. Por último a cápsula é mantida durante aproximadamente quatro a cinco dias em estufa a sessenta graus.

3.5. - Incubação com os anticorpos

Após a polimerização os blocos são ultramicrotomados e os cortes pescados em grades de níquel. Estas grades são então processadas para observarmos a localização dos receptores de acordo com o seguinte protocolo:

- incubar com o Metaperiodato de Sódio durante trinta minutos;
- incubar com PBS-albumina 1%, Tween 20 a 0,01% durante trinta minutos;
- incubar com o primeiro anticorpo, anti- α_2 ou anti- α_6 , diluídos no mesmo PBS durante doze horas;

- lavar com PBS-albumina, Tween 20 durante cinco minutos;
- incubar com proteína-G complexada com ouro coloidal durante doze horas, para localizar o primeiro anticorpo;
- lavar com PBS por cinco minutos;
- lavar com água destilada.

3.6. - Incubação com lectinas

As lectinas são glicoproteínas de plantas ou animais que reconhecem resíduos de açúcares (oligossacarídeos). No glicocálix das células de mamíferos encontramos quantidades diferentes de oligossacarídeos (ALBERTS *et al.*, 1989) e para podermos detectar possíveis diferenças moleculares no "coat" celular entre os indivíduos alérgicos utilizaremos algumas lectinas. Portanto, foi feita incubação primária durante 1 hora com as seguintes lectinas complexada com ouro:

- Con-A (Concanavalina - A): Que tem afinidade por resíduos de α -D-Manose;
- HPA (*Helix pomatia*): Que tem afinidade por resíduos de N-Acetilgalactosamina;
- PNA (*Araxis hypogaea*): Tem afinidade pelo dissacarídeo- β -D-Galactose (1-3).

3.7 - Contrastação

Após incubação primária e secundária das grades, o material é contrastado com Acetato de Uranila e Citrato de Chumbo para então ser observado no Microscópio Eletrônico de Transmissão JEOL (JEM-1200) do Centro de Microscopia Eletrônica da UFPR.

Observação

A metodologia compreende um estudo mais aprofundado, porém, referindo-se a uma Monografia, os resultados dizem respeito apenas aos indivíduos alérgicos de nossa amostra.

4. RESULTADOS

Este material foi observado em Microscopia Eletrônica de Transmissão e fotografado. Com os anticorpos anti-integrinas encontrou-se pouca marcação, sempre em membranas de vesículas citoplasmáticas com conteúdo eletrondenso situadas na região perinuclear e no citoplasma periférico; também foi encontrada marcação na membrana plasmática (ver Fotografias 1 e 2; ver Tabela 2). Com a lectina Con-A encontrou-se maior marcação nas membranas das vesículas e na própria matriz citoplasmática, em linfócitos, eosinófilos e neutrófilos (ver Fotografia 3; ver Tabela 2); com as lectinas HPA e PNA encontrou-se pouca marcação em vesículas citoplasmáticas, de linfócitos e eosinófilos, não tendo sido encontrado até o momento marcação em neutrófilos (ver Fotografias 4 e 5; ver Tabela 2).

4.1. - TABELA 2 - RESUMO DOS RESULTADOS ENCONTRADOS

	anti - α_2	anti - α_6	Con - A	PNA	HPA
Membrana Plasmática	-	+	+	-	-
Vesículas Periféricas	-	+	++	+	+
Vesículas Perinucleares	+	-	-	-	-
Matriz Citoplasmática	-	+	+++	-	-

LEGENDA

- não encontrou-se marcação

+ pouca marcação

++ média marcação

+++ muita marcação

5. DISCUSSÃO

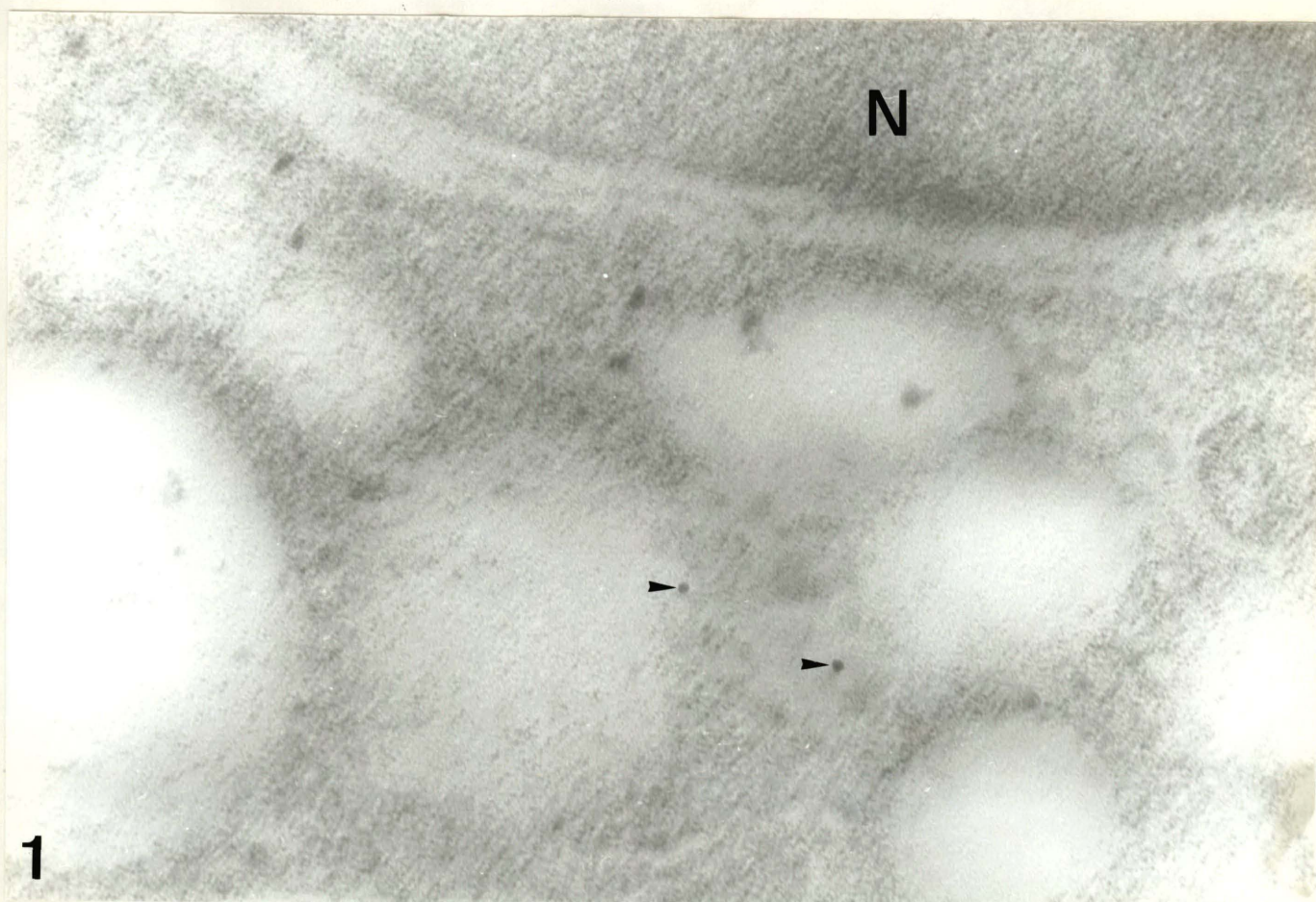
Neste processo a concentração de Glutaraldeído na fixação das células é em pequena quantidade (0,5%) para evitar a perda de sítios antigênicos. Após a polimerização da resina LRWhite, a qual é hidrofílica ocorrerá a incubação do material com dois tipos de anticorpos monoclonais, contra a cadeia α_2 e α_6 das integrinas. Como estes anticorpos foram produzidos em camundongos, utilizou-se proteína-G complexada com ouro coloidal na segunda incubação. Os anticorpos com esta resina permite que os anticorpos acessem também ao interior da célula. Os blocos são ultramicrotomados e para serem incubados com anticorpos são colocados em grade de níquel, as quais não oxidam facilmente, não contaminando o material. A proteína-G é produzida pelo *Streptococcus* e tem mais afinidade pela porção Fc dos anticorpos produzidos por camundongos, ratos, carneiros e cabras. Também fizemos a incubação com três tipos de lectinas: Con-A, PNA e HPA, específicos para os oligossacarídeos citados anteriormente. A maior marcação encontrada com a lectina Con-A, específica para resíduos de manose no citoplasma de leucócitos, corresponde ao esperado, uma vez que esta lectina reconhece não só resíduos terminais mas também os intermediários (ver Fotografia 3). A maioria das proteínas sintetizadas são glicosiladas, sendo

que no Reticúlo Endoplasmático Rugoso ocorre a adição de um "core" de manose (ALBERTS,B. e colaboradores, 1989), justificando assim maior marcação encontrada com a lectina Con-A.

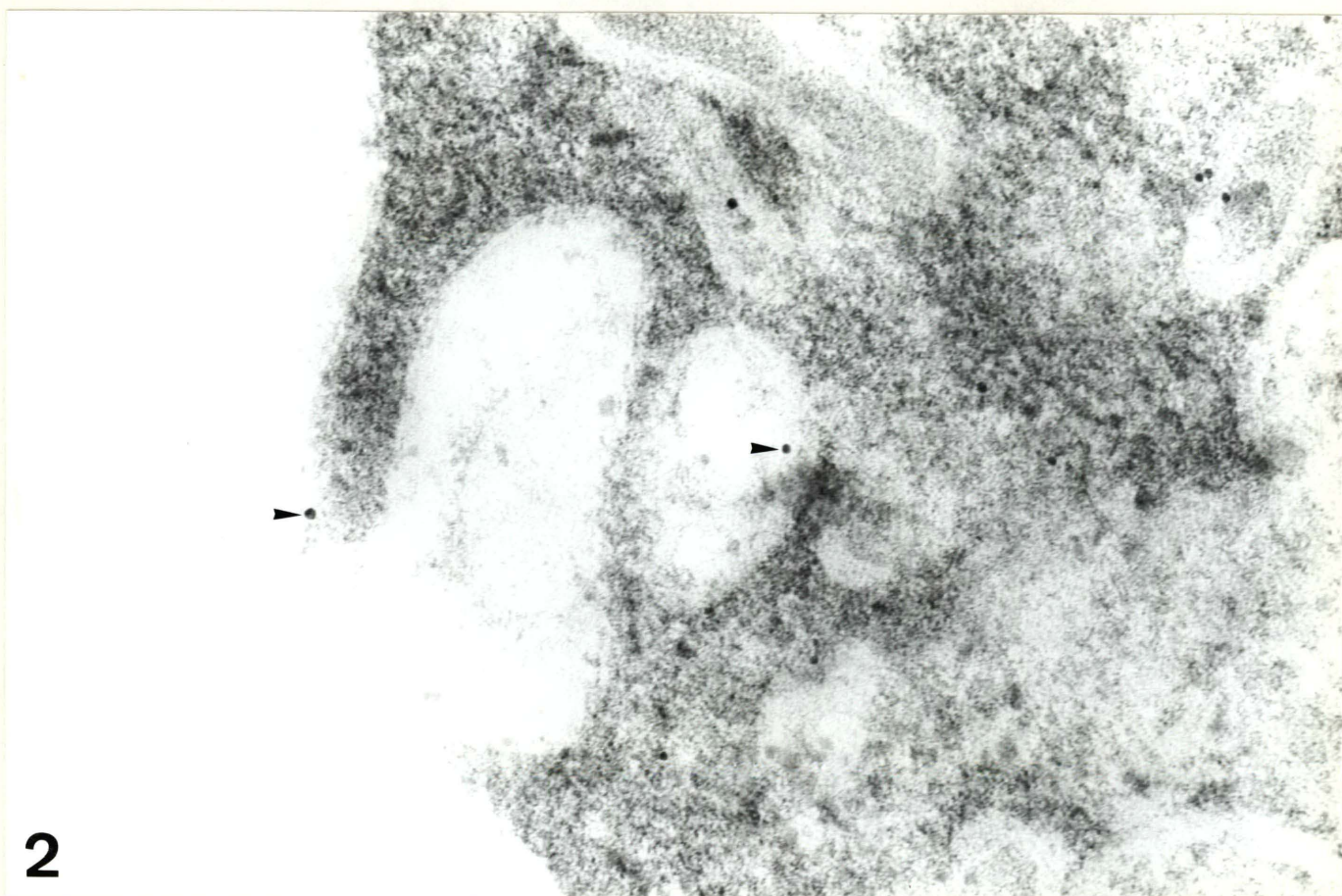
6. CONCLUSÃO

Os resultados encontrados com o processamento "*post-embedding*" correspondem ao esperado, isto é, pouca marcação, uma vez que os anticorpos são monoclonais e portanto muito específicos. Sabe-se que a maioria dos receptores da membrana fazem um processo de "turnover" e um "pool" de receptores da superfície são encontrados também no citoplasma, só emergindo quando necessário. O fato de que a marcação foi encontrada em vesículas citoplasmáticas é um resultado interessante, principalmente por estar altamente específica na membrana das vesículas. Estes resultados são inéditos (ver Fotografia 2).

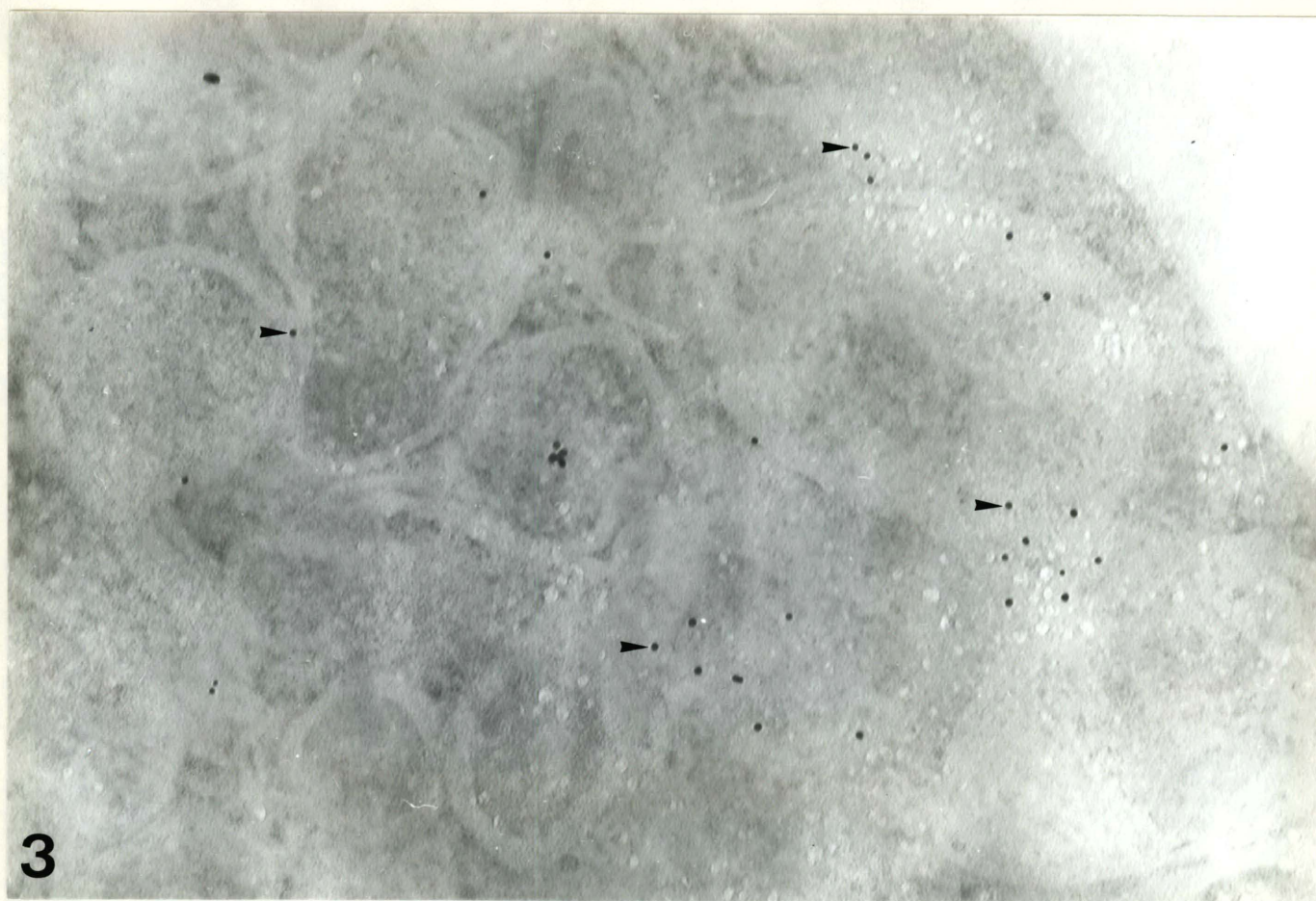
7. DOCUMENTAÇÃO FOTOGRÁFICA



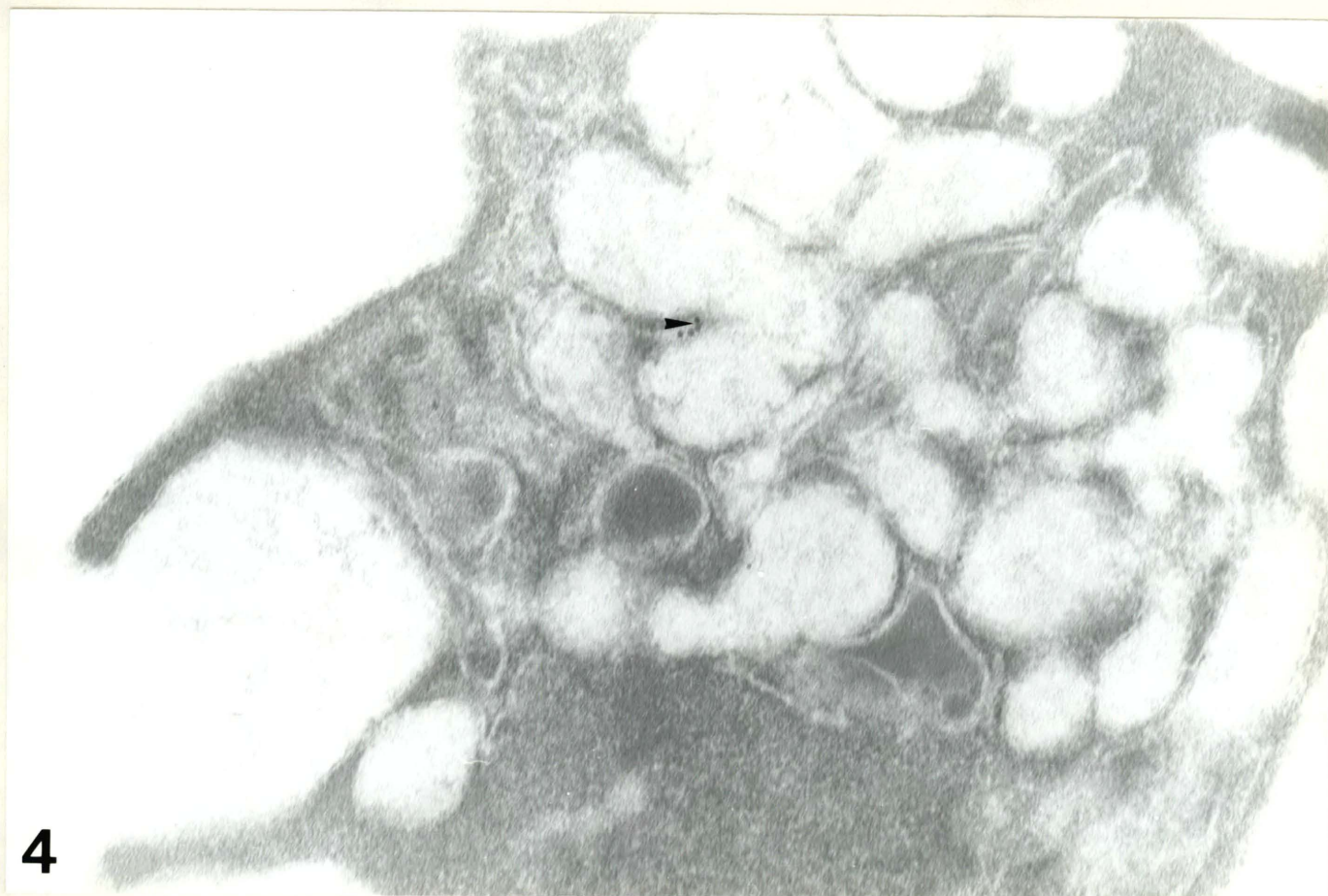
Fotografia 1: localização da cadeia α_2 em vesículas perinucleares em leucócito de indivíduo alérgico. Ampliação original: 100.000 vezes. Seta indicando ouro coloidal. N = núcleo.



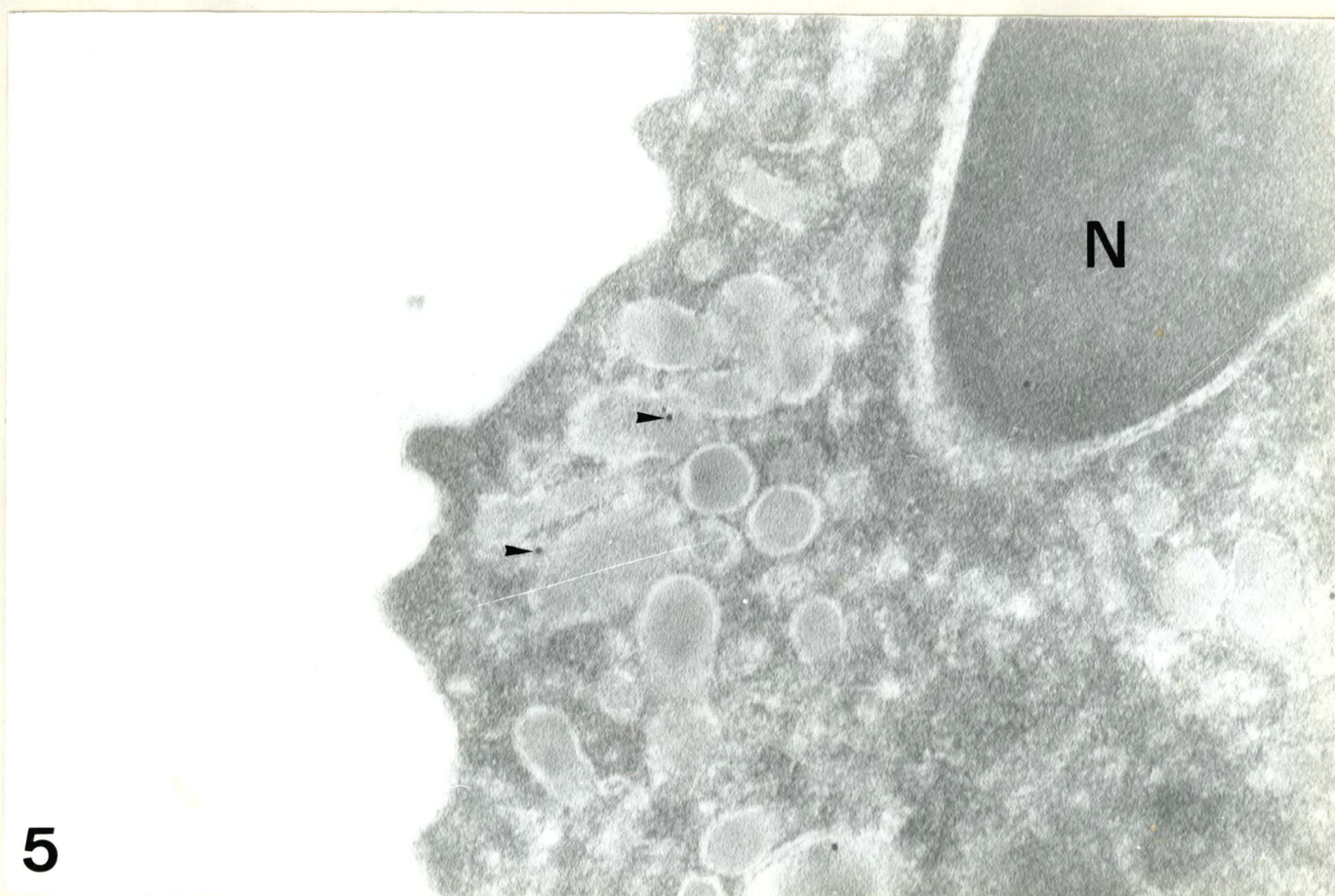
Fotografia 2: localização da cadeia α_6 em vesículas periféricas e na própria membrana plasmática em leucócito de indivíduo alérgico. Ampliação original: 80.000 vezes. Seta indicando ouro coloidal.



Fotografia 3: localização da lectina Con-A (resíduos de manose) em membranas de vesículas e na própria matriz citoplasmática, em leucócito de indivíduo alérgico. Ampliação original: 50.000 vezes. Seta indicando ouro coloidal.

**4**

Fotografia 4: localização da lectina PNA (Dissacarídeo- β -D-Galactose) em vesículas citoplásmicas em leucócito de indivíduo alérgico. Ampliação original: 40.000 vezes. Seta indicando ouro coloidal.



Fotografia 5: localização da lectina HPA (N-acetil-galactosamina) em vesículas citoplasmáticas em leucócito de indivíduo alérgico. Ampliação original: 40.000 vezes. Seta indicando ouro coloidal. N = núcleo.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGONDI, R.C. Moléculas de adesão do sistema imune. Rev. Bras. Alerg. Immunopatol. São Paulo, v. 16, p.185-189, 1990.
- AKIYAMA, S.K.; YAMADA, S.S.; CHEN, W.-T.; YAMADA, K. Analysis of Fibronectin Receptor function with monoclonal antibodies: Roles in cell adhesion, migration, matrix assembly, and cytoskeletal organization. The Journal of Cell Biology. Washington, v.109, p. 863-875, 1989.
- AKIYAMA, S.K.; KAZUHIRO, N.; YAMADA, K.M. Cell surface receptors for extracellular matrix components. Biochimica et Biophysica Acta. Washington, v.1031, p. 91-110, 1990.
- ALBERTS, B; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J.D. Molecular Biology of the Cell. Second edition, Garland Publishing, Inc, New York & London, 1989, pg 298-300.
- BASS, D.A.; GROVER, W.H.; LEWIS, J.C.; SZEJDA, P.; DECHATELET, L.R. Comparison of human eosinophils from normals and patients with eosinophilia. J. Clin. Invest., New York, v. 66, p. 165-1273, 1980.
- BRUIJINZEEL, P. L. B.; VERHAGEN, J. Lipid metabolism by eosinophils. In: Morley, Colditz, I. Eosinophils in asthma, Academic Press Limited, London, p. 69-85, 1989.
- BUCHI, D.F. Incorporação de alguns componentes da superfície de macrófagos durante a fagocitose mediada por receptores. Tese de Doutorado. Rio de Janeiro, 1993.
- BUCKLEY, C.D.; DOYONNAS, R.; NEWTON, J.P.; BLYSTONE, S.D.; BROWN, E.J.; WATT, S.M.; SIMMONS, D.L. Identification of alpha(V) Beta(3) as a heterotypic ligand for Cd 31/PECAM-1. Journal of Cell Science. v.109 (Part 2), p. 437-445, 1996.

- CAMPBELL, J.J.; QIN, S.X.; BACON, K.B.; MACKAY, C.R.; BUTCHER, E.C. Biology of chemokine and classical chemoattractant receptors-differential requirements for adhesion-triggering versus chemotactic responses in lymphoid cells. *Journal of Cell Biology*. v.134(1), p. 255-266, 1996.
- DANEN, E.; MUIJEN, G.; RUITER, D. Role of a signal transducing cell adhesion on molecules in human cutaneous melanoma. *Cancer Surveys*. Netherlands, v. 24, p. 43-65, 1995.
- DE SIMONE, C.; DONELLI, G.; MELI, D.; ROSATI, F.; SORICE, F. Human eosinophils and parasitic diseases II. Characterization of two cell fractions isolated at different densities. *Clin. Exp. Immunol.*, Oxford, v. 48 p. 249, 1982.
- EDWARDS, S.W. Cell signalling by integrins and immunoglobulin receptors in primed neutrophils. *TIBS*. Liverpool, v. 20, p. 362-367, 1995.
- FRIGAS, E.; GLEICH, G.J. The eosinophil and the pathophysiology of asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.*, St. Louis, v. 77, p. 527-537, 1986.
- GLEICH, G.J. The eosinophil and bronchial asthma: Current understanding. *J. Allergy Clin. Immunol.*, St. Louis, v. 85, p. 422-433, 1990.
- HAAS, N.; INEN, W.; GRABBE, J.; HAMANN, K.; CZARNETZKI, B.M. β_2 Integrins in different forms of Urticaria. *British Journal of Dermatology*. Berlin, v. 133, p. 48-53, 1995.
- HENDERSON, W.R.; HARLEY, J.B.; FAUCI, A.S. Arachidonic acid metabolism in normal and hypereosinophilic syndrome human eosinophils generation of leucotrienes B₄, C₄, D₄ and 15 lipoxygenase products. *Immunology*, Oxford, v.51, p. 679-686, 1980.
- HENDEY, B.; LAWSON, M.; MARCANTONIO, E.E.; MAXFIELD, F.R. Intracellular calcium and calcineurin regulate neutrophil mobility on vitronectin through a receptor identified by antibodies to integrins α -V and β -3. *Blood*, v. 87(5), p. 2038-2048, 1996.

- HUBSCHER, T. Role of the eosinophil in the allergic reactions II. Release of prostaglandins from human eosinophil leucocytes. *J. Immunol.*, Baltimore, v. 144, p. 1389-1393, 1975.
- HYNES, R.O. Integrins: A Family of Cell Surface Receptors. *Cell*. Cambridge, v. 48, p. 549-554, 1987.
- JOHNSON, B.; ISSEKUTZ, T.B.; KUBES, P. The Alpha(4) integrin supports leukocyte rolling and adhesion in chronically inflamed post capillary venules in vivo. *Journal of Experimental Medicine*. v. 183(5), p. 1995-2006, 1996.
- LARSON, R. & SPRINGER, T. Structure and Function of Leukocyte Integrins. *Immunological Reviews*. Copenhagen, v. 114, p. 182-191, 1990.
- LEE, T.C.; LENIHAN, D.J.; MALONE, B.; RODDOY, L.L.; WASSERMAN, S.I. Increased biosynthesis of platelet activating factor in activated human eosinophils. *J. Biol. Chem.*, Baltimore, v. 259, p. 5526-5530, 1989.
- NAGAI, T.; YAMAKAWA, N.; AOTA, S.; YAMADA, S.; AKIYAMA, S.; OLDEN, K.; YAMADA, K. Monoclonal antibody characterization of two distant sites required for function of the central cell-binding domain of Fibronectin in cell adhesion, cell migration, and matrix assembly. *The Journal of Cell Biology*. Washington, v. 114, p. 1295-1305, 1991.
- PELLETIER, A.J.; KUNICKI, T.; QUARANTA, V. Activation of the Integrin Alpha (V) Beta(3) involves a discrete cation-binding site that regulates conformation. *Journal of Biological Chemistry*. v. 271(3), p. 1364-1370, 1996.
- PRIN, L.; CAPRON, M.; TONNEL, A.B.; BLETRY, O.; CAPRON, A. Heterogeneity of human peripheral blood eosinophils: variability in cell density and cytotoxic ability in relation to the level and origin of hypereosinophilia. *Int. Arch. Allerg. Appl. Immunol.*, Basel, v. 72, p. 336-346, 1993.

- QUARANTA, V.; JONES, J. The internal affairs of an integrin. *Trends in Cell Biology*. Chicago, v. 1, p. 2-4, 1991.
- ROITT, I.; BROSTOFF, J.; MALE, D. *Immunology*. Second edition, Gower Medical Publishing, London, pg 2.4, 1992.
- RUGGERO, P.; INVERARDI, L.; BENDER, J.R.; Regulatory mechanisms in leukocyte adhesion: flexible receptors for sophisticated travelers. *Immunology Today*, Cambridge, v. 13, p. 195-238, 1992.
- RUOSLAHTI, E.; NOBLE, N.; KAGAMI, S.; BORDER, W. Integrins. *Kidney International*. California, v. 45, p. S-17 - S-22, 1994.
- SHULT, P.A.; GRAZIANO, F.M.; WALLOW, I.H.; BUSSE, W.W. Comparison of superoxide generation and luminol-dependent chemiluminescence with eosinophils and neutrophils from normal individuals. *J. Lab. Clin. Med.*, St. Louis, v. 106, p. 638-645, 1985.
- SHAW, L.M.; MESSIER, J.M.; MERCURIO, A.M. The activation dependent adhesion of Macrophages to Laminin involves cytoskeletal anchoring and phosphorylation of the $\alpha_6\beta_1$ Integrin. *The Journal of Cell Biology*. v. 110, p. 2167-2174, 1990.
- SONNENBERG, A.; LINDERS, C.J.T.; MODDERMAN, P.W.; DAMSKY, C.H.; AUMAILLEY, M.; TIMPL, R. Integrin recognition of different cell-binding fragments of Laminin (P1, E3, E8) and evidence that $\alpha_6\beta_1$ but not $\alpha_6\beta_4$ functions as a major receptor for fragment E8. *The Journal of Cell Biology*. Amsterdam, v. 110, p. 2145-2155, 1990.
- SPRINGER, T.A. Adhesion receptors of the immune system. *Nature*. v.346, p. 425-433, 1990
- STARY, J.; BARTUNKOVA, J.; KOBYLKA, P.; VAURA, V.; HRUSAR, O.; CALDA, P.; KRAL, V.; SVORC, K. Successful HLA-identical sibling cord blood transplantation in a 6-year-old boy with leukocyte adhesion deficiency syndrome. *Bone Marrow Transplantation*. v. 18(1), p. 249-252, 1996.

- SUN, J.; WILLIAMS, S.; YAN, H.C.; AMIM, K.M.; ABELDA, S.M.; DELISSER, H.M. Platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM) hemophilic adhesion is mediated by immunoglobulin-like domains 1 and 2 and depends on the cytoplasmic domain and the level of surface expression. *Journal of Biological Chemistry*, v. 271(31), p. 18561-18570, 1996.
- SUN, Q.H.; DELISSER, H.M.; ZUKOWSKI, M.M.; PADDOCK, C.; ABELDA, S.M.; NEWMANN, P.J. Individually distinct Ig homology domains in PECAM-1 regulate hemophilic binding and modulate receptor affinity. *Journal of Biological Chemistry*, v. 271(19), p. 11090-11098, 1996.
- VEIGA, S.S. Detecção e caracterização bioquímica da GP 120/140 (uma proteína ligante de Laminina) em Melanoma Murino. Homologias em Melanoma Humano. Tese de Doutorado. São Paulo, 1994.
- VENGE, P.; HAKANSSON, L. Current understanding of the role the eosinophil granulocyte in asthma. *Clin. Exp. Allergy*, Oxford, v. 21, p. 31-37, 1991. VENGE, P. The eosinophil granulocyte in allergic inflammation. *Ped. Allergy Immunol.*, Copenhagen, v.4, p.19-24, 1993.
- VENGE P. Serum measurements of eosinophil cationic protein (ECP). *Clin. Exp. Allergy*, Oxford, v. 23, p. 3-7, 1993.
- WANG, N.; INGBER, D.E. Probing transmembrane mechanical coupling and cytomechanics using magnetic twisting cytometry. *Biochemistry & Cell Biology*, v. 73(7-8), p. 327-335, 1995.
- WEGNER, C.D.; KOKER, P.J.; GUNDEL, R.H.; REILLY, P.; HAYNES, N.; LETTS, L.G.; ROTHLEIN, R. Intracellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in the pathogenesis of asthma. *Science*, Washington, v. 247, p. 456-459, 1990.
- WELLER, P.F. Eosinophils: structure and functions. *Current Opinion Immunol.*, London, v. 6, p. 85-90, 1994.
- WELLER, P.F. Eosinophilia. *J. Allergy Clin Immunol.*, St. Louis, v. 73, p. 1-11, 1984.

WINQVIS, I.; OLOFFSON, T.; OLSSON, I.; PERSSON, A.M.; HALLBERG, T. Altered density metabolism and surface receptors of eosinophil in eosinophilia. *Immunology, Oxford*, v. 47, p. 531-539, 1982.

ZIMMERMAN, B.; FEANNY, S.; REISMAN, J.; HAK, H.; RASHED, N.; MCLAUGHLIN, F.J.; LEVISON, H. Allergy in asthma. *Clin. Exp. Allergy, Oxford*, v. 23, p. 8-12, 1993.