



ARTIGO ORIGINAL

Eosinófilos hipodensos no sangue de pacientes pediátricos com asma***Hypodense eosinophils in blood of pediatric patients with asthma*****Orlei Kantor Junior¹, Nelson Augusto Rosário Filho²****Resumo**

Objetivo: Determinar o número de eosinófilos hipodensos no sangue de asmáticos atópicos.

Métodos: A hipótese inicial era que os eosinófilos hipodensos, forma ativada destas células, encontravam-se em número maior em asmáticos do que em crianças não atópicas.

Os granulócitos foram separados das células mononucleares pelo Ficoll-Hypaque.

Através de diluições de Percoll foram criados gradientes de densidade para fracionamento de eosinófilos.

Resultados: Os asmáticos tinham eosinofilia significativa ($768 \pm 75/\text{mcl}$) comparados aos normais ($200 \pm 28/\text{mcl}$). A média de eosinófilos hipodensos era superior em asmáticos (39%) do que em indivíduos normais (11,7%).

Conclusão: Os eosinófilos se acumulam em indivíduos com asma, especialmente a forma ativada de baixa densidade, sugerindo sua participação no processo inflamatório alérgico.

J. pediatr. (Rio J.). 1997; 73(1):16-20: eosinófilos, asma, eosinofilia, espirometria, contagem de células sanguíneas.

Introdução

O eosinófilo é um granulócito capaz de fagocitar, mede 10 a 15 micra de diâmetro e apresenta granulações em seu interior, ricas em proteínas alcalinas. As populações dos eosinófilos são heterogêneas e, por meio de gradientes de densidade, identificam-se células com baixa densidade chamadas eosinófilos hipodensos ou “ativados” e com densidade normal chamadas de eosinófilos normodensos¹⁻⁵.

O estudo funcional dos eosinófilos hipodensos (EH) identificou que há aumento no metabolismo, nas atividades de quimiotaxia e citotoxicidade em relação aos normodensos⁶⁻⁹. Apresentam também aumento do número de vários receptores de membrana, como a imunoglobulina E

Abstract

Objective: Determine the number of circulating hypodense eosinophils in the blood of atopic asthmatics.

Methods: The hypothesis was that hypodense eosinophils, the activated cells, were higher in asthmatics than in non-atopic children.

Granulocytes were separated from mononuclear cells by Ficoll-hypaque. Gradients of density were generated through dilutions of Percoll for fractionations of cells.

Results: Asthmatics had blood eosinophilia ($768 \pm 75/\text{mcl}$) when compared to normal control ($200 \pm 28/\text{mcl}$), and higher mean hypodense eosinophils (39%) as compared to normal children (11.7%).

Conclusion: Eosinophils accumulate in asthmatic, especially the low density activated variant, suggesting its active role in the allergic inflammatory process.

J. pediatr. (Rio J.). 1997; 73(1):16-20: eosinophils, asthma, eosinophilia, spirometry, blood cell count.

(Fc IgE), secretam maiores quantidades de proteínas alcalinas e são capazes de produzir maiores quantidades de leucotrieno C₄ (LTC₄)^{5,10,11}. Os eosinófilos podem ser ativados “in vitro” pela interleucina-5 (IL-5), pelo fator de ativação plaquetária (PAF), pela histamina, pelo fator quimiotático para eosinófilos e outros que resultam em aumento do número de eosinófilos de baixa densidade^{3,9,12}.

Na asma e em outras doenças associadas à eosinofilia, há aumento do número absoluto e da percentagem de EH no sangue periférico. Este aumento também foi verificado no lavado broncoalveolar de pacientes na fase tardia da asma, quando submetidos à provocação brônquica com alérgenos^{8,13-15}.

Por meio da técnica de fracionamento celular por gradientes de densidade com Percoll, avaliamos a percentagem de EH em sangue periférico. Comparamos os resultados com o número de leucócitos, eosinófilos e basófilos de um grupo de asmáticos.

1 Médico pneumopediatra do Hospital de Clínicas - PAG UFPr - Curitiba.

2. Professor Adjunto do Depto. de Pediatria da UFPr - Curitiba.

Material e Métodos

Foram estudados 43 pacientes asmáticos com idade média de $11,0 \pm 0,4$ anos (limites: 6 a 16), todos obedecendo aos critérios do Consenso Internacional para diagnóstico e manejo da asma¹⁶.

Os pacientes foram selecionados do ambulatório de Alergia e Imunologia pediátrica do Hospital de Clínicas - UFPR.

Submetidos ao teste cutâneo alérgico de leitura imediata, com extrato alergênico de *D. pteronyssinus* (MERCK), todos reagiram com pápula de diâmetro médio maior que 3mm. Os testes de função pulmonar (Espirômetro 9 litros - Warren and Collins Inc.) foram realizados em todos. Foram coletadas amostras de sangue venoso para realização do hemograma e avaliação dos EH, entre 8 e 9h. Três exames parasitológicos de fezes foram obtidos previamente.

Para a realização das espirometrias e da coleta de sangue, foram suspensas as medicações broncodilatadoras por 12 horas e as drogas antiinflamatórias por 4 semanas. Todos os pacientes apresentaram aumento igual ou superior a 10% no volume expiratório forçado no primeiro segundo (VEF1) quando submetidos à prova broncodilatadora com 400 mcg de salbutamol por via inalatória (*Aerolin - Glaxo*)¹⁶⁻¹⁹.

O grupo controle foi constituído de 18 indivíduos não-atópicos com idade média de $10,8 \pm 0,4$ anos (8 a 15) que se submeteram às mesmas avaliações anteriores, não sendo encontrados sinais clínicos e laboratoriais de doenças alérgicas ou parasitárias.

Os hemogramas foram realizados por meio de um contador modelo D2 (*Coulter Eletronics Ltda.*). Para a contagem diferencial de leucócitos, foram utilizados esfregaços em lâminas coradas por May-Grünwald e Giemsa e contagem manual das células em microscópio óptico. O número absoluto de eosinófilos foi obtido multiplicando-se o percentual de eosinófilos pelo número total de leucócitos.

Fracionamento dos eosinófilos pela densidade

a. Suspensão de granulócitos

O sangue heparinizado (15 ml) foi misturado em um tubo cônico de 50 ml (*Corning Inc.*) com dextran 4,5% e tamponado com tris. A sedimentação das hemácias foi feita em temperatura ambiente por 45 minutos.

O volume de 7 ml do sobrenadante foi depositado em um tubo cônico de 15 ml (*Corning Inc.*) contendo 3 ml da solução de Ficoll-Hypaque (*Sigma Co.*) e centrifugado para a formação do anel de linfócitos^{3,20,21}. Este foi posteriormente eliminado, permanecendo o botão celular de hemácias e granulócitos, que novamente foi ressuspensionado em solução de Hanks⁴.

b. Autogeração dos gradientes com Percoll

As diluições do Percoll (*Pharmacia Fine Chemicals*) com a solução de Hanks foram adequadas até que a solução

final apresentasse uma densidade de 1.084 mg/ml (Picnômetro - GG) e osmolaridade 270 mOsm/l (*Osmette Precision Systems*)^{15,22}.

Esta solução, por meio de ultracentrifugação a 16.000 rpm (*Beckman Instruments Inc.*) formou vários gradientes de densidade. Estes gradientes foram confirmados pela utilização de um tubo controle contendo marcadores de densidade (*Density marker beads - Sigma Co.*) com limites entre 1.018 a 1.139 g/ml.

Em seguida, 2 ml da suspensão de granulócitos, preparada previamente, foi colocada na solução de Percoll. A solução foi centrifugada e posteriormente retiradas as bandas correspondentes³.

As bandas que se formam nas diferentes densidades foram retiradas individualmente (Tabela 1), diluídas, e as concentrações celulares ajustadas em 1×10^6 células/ml para processamento da lâmina em citocentrífuga (*Cytospin Shandon Instruments Inc*). As lâminas foram coradas, procedeu-se à leitura e à contagem das células^{8,23}.

Tabela 1 - Distribuição das células por meio da autogeração dos gradientes por ultracentrifugação com Percoll

Bandas	Densidade (g/ml)	Celularidade
I	1.018 - 1.063	algumas células
II	1.063 - 1.076	neutrófilos, eos. hipodensos
III	1.076 - 1.088	eos. normodensos
IV	1.088 - 1.099	hemácias
V	1.099 - 1.133	algumas células

Para a análise estatística dos dados, foram utilizados os testes de F para a análise da variância e o de Tukey para avaliação entre as médias. No teste de Tukey, letras diferentes (a, b) indicam $\text{PROB.} > F < 0,01$, ou seja, níveis de significância menores que 0,01, quando letras diferentes. O teste de Spearman foi utilizado para avaliação de correlações.

Resultados

Foram avaliados 43 pacientes asmáticos e 18 indivíduos não-atópicos, pareados para idade e sexo (Tabela 2). A média de leucócitos foi de $8.478,0 \pm 496,5 / \text{mm}^3$ (limites: 3.050 a 20.000) no grupo de asmáticos e $7.237,5 \pm 331,3 / \text{mm}^3$ (5.200 a 10.800) no grupo de indivíduos normais. Não houve diferença significativa entre as médias.

A média de eosinófilos foi $768,0 \pm 75,0 / \text{mcl}$ (100 a 1.830) em asmáticos e $200,1 \pm 27,9 / \text{mcl}$ (52 a 399) nos indivíduos normais. A eosinofilia nos asmáticos foi significativamente maior ($p < 0,01$).

Tabela 2 - Características de idade e sexo da casuística avaliada

Grupos	n	Idade (anos)	Sexo (M:F)
Normal	18	10,8 a ± 0,4 (8 -15)	8 : 10
Asma	43	11,0 a ± 0,4 (6 - 16)	24 : 19

Tukey: N.S. quando letras iguais.

Média ± EPM () limites.

Os valores médios de basófilos foram de 55,0 ± 8,1/mcl (0 a 200) nos asmáticos e 28,1 ± 8,7 /mcl (0 a 84) nos indivíduos normais. Houve também diferença significativa na contagem dos basófilos entre os dois grupos (p < 0,01).

Os eosinófilos hipodensos foram calculados em porcentagens e os resultados apresentados na Tabela 3. A média de 39,0% (6 a 63) encontrada nos asmáticos foi significativamente superior à média de 11,7% (4 a 29) dos indivíduos normais (p < 0,01).

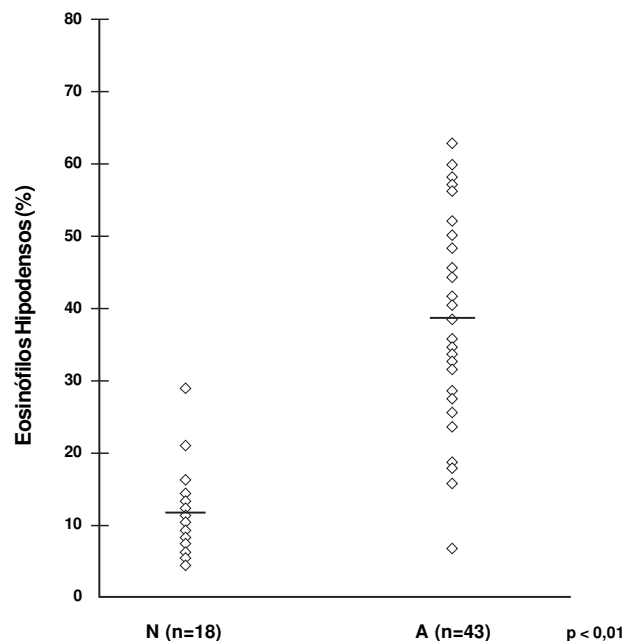
Nos asmáticos, havia correlação entre o número de eosinófilos e a porcentagem de EH (r = 0,41, p < 0,005), indicando uma dependência entre eosinofilia no sangue e ativação destas células. Não houve correlação entre basófilos e EH.

A Figura 1 é uma representação gráfica da distribuição individual das porcentagens de eosinófilos hipodensos nos asmáticos e no grupo controle. Há uma superposição dos valores mais baixos entre os dois grupos. O maior valor para normais foi 29%. Entre os asmáticos, 34 (79%) apresentaram percentual maior que 29%.

Discussão

A asma é uma doença inflamatória crônica e reversível das vias aéreas. Vários marcadores podem determinar a

atividade inflamatória, entre eles os eosinófilos periféricos, os eosinófilos hipodensos e seus mediadores^{1,2,5,21,24}. Algumas técnicas podem ser utilizadas para a separação de eosinófilos por gradientes de densidade. O grau de pureza na separação dos eosinófilos é menor com a técnica, usando metrizamida em relação à técnica com Percoll^{4,22}. Atualmente, a técnica de separação por meio de anticorpos monoclonais, utilizando separadores imunomagnéticos, preconizada por Hansel e cols.²⁵, propicia maior pureza, independente da concentração dos eosinófilos no sangue periférico.

**Figura 1** - Distribuição dos eosinófilos hipodensos nos indivíduos normais (N) e pacientes asmáticos (A)**Tabela 3** - Resultado das contagens celulares e porcentagens de eosinófilos hipodensos. Valores expressos em média e erro padrão

Grupos	n	Leucócitos (mm)	Eosinófilos (mcl)	Basófilos	Eos. Hipodensos
Normal	18	7.237,5 a ± 331,3 (5.200 - 10.800)	200,1 a ± 27,9 (52 - 399)	28,2 a ± 8,7 (0 - 84)	11,7 a ± 1,4 (4 - 29)
Asma	43	8.478,0 a ± 496,5 (3.050 - 20.000)	768,0 b ± 75,0 (100 - 1830)	55,0 b ± 8,1 (0 - 200)	39,0 b ± 2,2 (6 - 63)

() limites. Teste de Tukey: p < 0,01 quando letras # N.S. quando letras =

Com os trabalhos de Busse e cols.^{8,15}, aliados aos de Gleich e cols.^{2,14,23} e de Venge e cols.^{24,26} demonstrou-se que os asmáticos apresentam uma maior população de eosinófilos hipodensos, capaz de liberar proteínas alcalinas fortemente básicas (pH = 11) de seus grânulos como a proteína catiônica eosinofílica (ECP) e proteína alcalina principal (MBP). Com isto, formulou-se a hipótese de que esta degranulação seria responsável pela menor densidade destas células²⁷.

A média de 39% de EH foi encontrada nos pacientes asmáticos e 11 % nos indivíduos normais (Tabela 3). Shult e cols.⁸ encontraram 41%, enquanto Fukuda e cols.^{21,23} encontraram 35% destas células em grupos de pacientes asmáticos avaliados. Klopogge e cols.³ encontraram 65% de eosinófilos hipodensos nos pacientes estudados. Nos grupos controles, Frick e cols.¹⁵ encontraram percentagens médias inferiores a 10 %, enquanto Shult e cols.⁸ encontraram 18% de eosinófilos hipodensos.

Os valores encontrados para eosinófilos nos pacientes asmáticos e indivíduos normais foram maiores que os relatos de literatura. Shult e cols.⁸ encontraram a média de $457 \pm 57/\text{mm}^3$ nos pacientes asmáticos e $107 \pm 10/\text{mm}^3$ nos indivíduos normais. Fukuda e cols.^{21,23} encontraram $446/\text{mm}^3$ (175 a 1153) nos pacientes asmáticos e $116/\text{mm}^3$ (80 a 155) em indivíduos normais. Chama atenção que estes autores também não encontraram aneosinofilia nos indivíduos do seu grupo controle.

A correlação entre eosinófilos e eosinófilos hipodensos ($r=0,41$, $p<0,005$), no grupo de pacientes asmáticos encontrada em nossa pesquisa, foi maior que os valores encontrados por Fukuda e cols.²³ ($r=0,32$, $p<0,01$) em um grupo de 10 pacientes estudados. Os valores foram expressos na Figura 2^{21,23}.

Os leucócitos não apresentaram diferenças significativas entre as médias. Encontramos valores semelhantes

aos encontrados por Shult e cols.⁸, que obtiveram a média de $6.486 \pm 412/\text{mm}^3$ no grupo de pacientes asmáticos e $5531 \pm 334/\text{mm}^3$ nos indivíduos normais.

A avaliação dos eosinófilos hipodensos como marcadores da atividade inflamatória na asma é uma técnica laboriosa, mas importante para o entendimento de parte do mecanismo de doença. A baixa densidade está relacionada à ativação, degranulação dos eosinófilos e liberação de substâncias alcalinas como a proteína catiônica eosinofílica (ECP), por nós previamente estudada como marcador de gravidade da asma.

A fase tardia na asma, mediada principalmente por eosinófilos, pode ocorrer 6 a 8 horas após o contato com o antígeno, produz predomínio de inflamação e dano epitelial nas vias aéreas. Este processo inflamatório ou de hiper-reatividade brônquica deve ser compreendido, avaliado e tratado corretamente, porque ele está ligado à degranulação dos eosinófilos.

A determinação destes marcadores, realizados em laboratórios clínicos ou de pesquisa, poderia auxiliar melhor pediatras e clínicos na avaliação e terapêutica dos seus pacientes.

Conclusões

A técnica de fracionamento dos eosinófilos pela densidade, por meio da solução de Percoll, avaliou as percentagens de EH. Demonstramos haver diferenças significativas entre os resultados obtidos entre asmáticos e indivíduos normais. Houve uma relação entre eosinofilia periférica e a percentagem de eosinófilos hipodensos, demonstrando que estas células funcionam como marcadores para avaliar a atividade inflamatória na asma. Outros estudos se fazem necessários em nosso meio para avaliação destas células em relação a aspectos clínicos, laboratoriais e terapêuticos na asma.

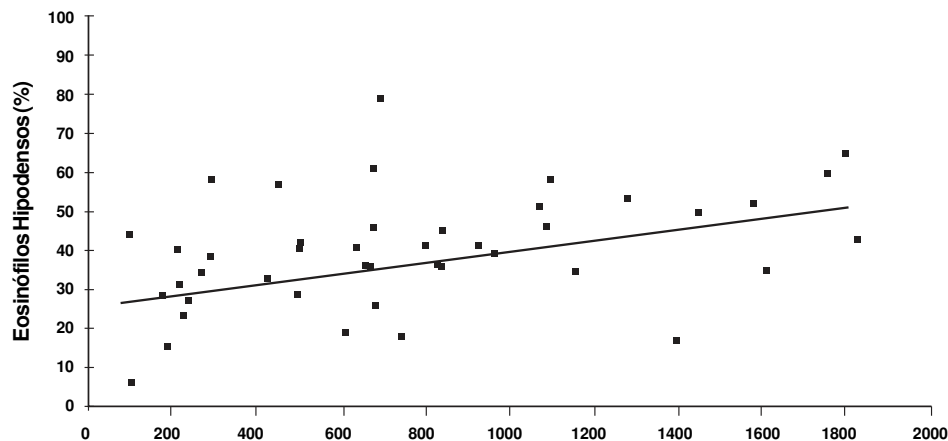


Figura 2 - Correlação entre a porcentagem de eosinófilos hipodensos com eosinófilos em sangue periférico nos pacientes asmáticos. Avaliação pelo método não-paramétrico de Spearman

Agradecimentos

Agradecemos aos professores Juarez Gabardo e José S. Cunha Fernandes do Departamento de Genética - UFPR pela orientação do trabalho estatístico.

Referências bibliográficas

1. Bass DA, Grover WH, Lewis JC, Szejda P, Dechatelet LR. Comparison of human eosinophils from normal and patients with eosinophilia. *J Clin Invest* 1980; 66:1265-73.
2. Durham SR, Loegering DA, Dunnette S, Gleich GJ, Kay B. Blood eosinophils and eosinophil derived proteins in allergic asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1989; 84:931-36.
3. Koprogge E, Leeuw AJ, De Monchy JGR, Kauffman. Hypodense eosinophilic granulocytes in normal individuals and patients with asthma: generation of hypodense cell populations "in vitro". *J Allergy Clin Immunol* 1989; 83:393-9.
4. Vadas MA, David JR, Butherworlh A, Pisani NT, Siongokta. A new method for purification of human eosinophils and neutrophils and a comparison of the ability of these cells to damage schistosomula of schistosoma mansoni. *J Immunol* 1979; 122:1228-36.
5. Weller PF. Eosinophilia. *J Allergy Clin Immunol* 1984; 73:1-11.
6. Holgate ST, Kay AB, Mast cell mediators and asthma. *Clin Allergy* 1985; 15:221-34.
7. Krouwels FH, Kerstens LCM, Van Der Maarel HWM, Degenhart HJ, Neijens HJ. Density of eosinophils reflects activity of disease in allergic asthmatic children. Academic medical center, Amsterdam, Netherlands 1991.
8. Shult PA, Lega M, Jadidi S, Vrtis R, Warner T, Graziano FM, Busse WW. The presence of hypodense eosinophils and diminished chemiluminescence response in asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1988; 81:429-37.
9. Yukawa T, Kroegel C, Evans P, Fukuda T, Chung KF, Barnes PJ. Density heterogeneity of eosinophil granulocytes: induction of hypodense eosinophils by platelet activating factor. *Immunology* 1989; 68:140-3.
10. Kauffman HF, Van Derbelt B, De Monchy JGR, Boelens H, Koeter GH, Vries K. Leukotriene C4 production by normal-density and low-density eosinophils from atopic individuals and other patients with eosinophilia. *J Allergy Clin Immunol* 1987; 79:611-19.
11. Windqvist I, Oloffson T, Olsson I, Persson A, Hallberg T. Altered density metabolism and surface receptors of eosinophils in eosinophilia. *Immunology* 1982; 47:531-39.
12. Ebisawa M, Yamada T, Klunk D, Bickel C, Liu M, Bochner BS, Schleimer RP. Regulation of eosinophil and neutrophil transendothelial migration by cytokinins and chemokines. *Allergy Clin Immunol* 1993; 91:313.
13. Bousquet J, Chanel P, Lacoste JY, Barneon G. Eosinophilic inflammation in asthma. *N Engl J Med* 1990; 323:1033-9.
14. Fukuda T, Gleich GJ. Heterogeneity of human eosinophils. *J Allergy Clin Immunol* 1989; 83: 369-73.
15. Frick WE, Sedgwick JB, Busse WW. The appearance of hypodense eosinophils in antigen-dependent late phase asthma. *Am Rev Respir Dis* 1989; 139:1401-6.
16. International Consensus Report on Diagnosis and Management of asthma, US. Department of Health and Human Services 1992.
17. ATS. Standardization of spirometry 1987 update. *Am Rev Respir Dis* 1987; 136:1265-98.
18. Mueller GA, Eigen H. Pediatric pulmonary function testing in asthma. *Ped Clin North America* 1992; 39: 1243-58.
19. Pepys J. Skin Testing. *Br J Hosp Med* 1975; 14: 412-17.
20. Boyum A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood, *Scand J Clin Lab Invest* 1968; 21:77.
21. Fukuda T, Makino S. Eosinophil heterogeneity. In: Morley J, Colditz I. *Eosinophils in Asthma*. London: Academic Press Limited, 1989:125-40.
22. Gartner I. Separation of human eosinophils in density gradients of polyvinylpyrrolidone - coat silica gel (Percoll). *Immunology* 1980; 40:133-6.
23. Fukuda T, Dunnette S, Reed CE, Ackerman SJ, Peters MS, Gleich GJ. Increased numbers of hypodense eosinophils in allergic asthma. *Am Rev Respir Dis* 1985; 132:981-5.
24. Matsson P, Ahlstedt S, Enander I, Peterson CGB, Venge P. Measurement of specific markers in the monitoring of the bronchial inflammation in asthma. In: Piper PJ, Krell RD. *Advances in the understanding and treatment of asthma*. New York: Clearance Center Inc, 1990: 383-7.
25. Hansel TT, Devries IM, Iff T, Rihs S et al. An Improved immunomagnetic procedure for the isolation of highly purified human blood eosinophils. *J Immunol Methods* 1991; 145:105-10.
26. Hakansson L, Carlson M, Stalenheim G, Venge P. Migratory responses of eosinophil and neutrophil granulocytes from patients with asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1990; 85:743-50.
27. Kauffman HF, Berends C, Dijkhuizen B, De Monchy JGR, Gerhstsen J. Hypodense, eosinophils and neutrophils in asthma? *Am Rev Resp Dis* 1991; 143:1745.

Endereço para correspondência:

Dr. Orlei Kantor Junior
Rua da Paz, 393 - ap. 152
CEP 80060-160 - Curitiba - PR