



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

ATHOS RODRIGUES DE MORAES

AVALIAÇÃO DO PAPEL DOS EOSINÓFILOS NOS PROCESSOS INICIAIS DA
VASO-OCCLUSÃO UTILIZANDO CAMUNDONGOS TRANSGÊNICOS PARA
ANEMIA FALCIFORME: PARTICIPAÇÃO DA VIA RHO-QUINASE

CAMPINAS

2018

ATHOS RODRIGUES DE MORAES

AVALIAÇÃO DO PAPEL DOS EOSINÓFILOS NOS PROCESSOS INICIAIS DA
VASO-OCCLUSÃO UTILIZANDO CAMUNDONGOS TRANSGÊNICOS PARA
ANEMIA FALCIFORME: PARTICIPAÇÃO DA VIA RHO-QUINASE

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Médicas
da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos
exigidos para a obtenção do título de Mestre em Ciências, na área de
concentração de Clínica Médica

ORIENTADOR: DRA. CARLA FERNANDA FRANCO PENTEADO

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELO
ALUNO ATHOS RODRIGUES DE MORAES, E ORIENTADO PELO
DRA. CARLA FERNANDA FRANCO PENTEADO.

CAMPINAS

2018

À minha família, por sua capacidade de acreditar e investirem em mim.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à minha família, principalmente a minha mãe Zenilda por estar ao meu lado durante toda essa etapa que passei, por me fortalecer com suas palavras, carinho e me ajudar a enxergar vitórias nesse caminho. Ao meu pai José por sempre me ajudar a caminhar, seguir em frente e atravessar barreiras. A minha irmã Bruna pelo compartilhamento de ideias e todos os incentivos dados a mim.

A Geovana pelo amor, carinho, por me cativar, me fortalecer, pela paciência e por estar ao meu lado em todas decisões. Acredito que sem vocês nada disso poderia ser possível. Amo muito todos!

À Dra. Carla Fernanda Franco Penteado por me aceitar como seu aluno, seu orientado, por me auxiliar em todos desafios da pós-graduação. Muito obrigado pela sua dedicação a mim e ao projeto ao decorrer desses dois anos e meio.

Ao Dr. Fernando Ferreira Costa primeiramente por ser incentivo à pesquisa, por ajudar nas discussões feitas nas reuniões que foram de imensa importância e por todas as ideias compartilhadas.

Agradeço a Dra. Nicola Conran pelo apoio laboratorial, sem seus equipamentos para microscopia intravital nada disso poderia ser feito.

À Hanan por me aturar e ajudar, por ser essa pessoa incrível com quem pude compartilhar bancada e muitas histórias de vida, por ser meu “braço direito” nessa dissertação.

Ao Felipe, por me apoiar, me ajudar a ter decisões importantes nessa vida de pós-graduando, pelos momentos de descontração, você foi um amigo de bancada e agora um amigo para vida.

Ao Prof. Dr. Magnun (vulgo Maguinho), meu amigo você foi simplesmente sensacional, um amigo, companheiro de cerveja..., tenho certeza de que aprendi muito mais do que ciência contigo, obrigado por tudo!

Aos meus amigos de laboratório, Ledi, Lidi, Quinha (Érica), Fer, Pam, Álvaro, Wilson, Rafa, obrigado pelas conversas, risadas, pelos congressos, pelo aprendizado, por todos compartilhamentos de ideias, vocês foram a minha família de laboratório, me acolheram e me deram suporte, obrigado mais um vez, vocês ficaram para sempre no meu coração.

Às meninas Dul, Carol e Flávia (Boca), por me acolherem, me darem conselhos, serem fontes de inspirações como cientistas, obrigado!

Aos meus colegas do laboratório do primeiro piso, Cris, Marina, Priscila (Japa), Dani, Dil, Pri (Técnica), Fábio, Ingrid, Myriam, obrigado por todos os momentos juntos.

Aos colegas Mariana e Vitor do INFABiC (Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Fotônica Aplicada à Biologia Celular) pelo todo auxílio ao uso dos equipamentos de microscopia confocal.

Aos membros da banca, Dr. Marcus Alexandre FinziCorat, Prof. Dr. Anderson Ferreira da Cunha pelas sugestões que colaboraram para a finalização deste trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo fomento à pesquisa durante todo o período em que foi desenvolvido.

RESUMO

Na anemia falciforme, os leucócitos possuem um importante papel na fisiopatologia da doença sendo consideradas as células iniciadoras do processo vaso-oclusivo. A vaso-oclusão na anemia falciforme resulta de um processo complexo que envolve diferentes mecanismos e interações dos glóbulos vermelhos, leucócitos, células endoteliais, plaquetas e proteínas plasmáticas. A via da Rho GTPases parece ter um papel importante nos mecanismos moleculares da quimiotaxia, adesão e migração de várias células inflamatórias e pouco se sabe o papel dessas proteínas da via Rho GTPases no rolamento, adesão ao endotélio vascular e extravasamento dos leucócitos. Objetivo desse trabalho foi avaliar *in vivo* a participação dos eosinófilos no processo de vaso-oclusão na anemia falciforme e o envolvimento da via das Rho GTPases nesse processona resposta inflamatória induzida por OVA nos animais controles (C57BL/6 J) e camundongos falciformes modelo Townes homozigotos (SS). Os resultados obtidos por microscopia intravital convencional do músculo cremaster dos camundongos mostraram que após 4 horas do desafio com eotaxina foi observado um aumento no número de leucócitos em rolamento e aderidos ao endotélio vascular em todos os grupos sensibilizados investigados, porém, essa inflamação é potencializada quando comparados os animais SS com o grupo controle. Resultados semelhantes foram observados em relação ao extravasamento dos leucócitos. O tratamento com o inibidor específico de Rho GTPase/ROCK, Fasudil, foi capaz de reduzir significativamente tanto o rolamento quando a adesão dos leucócitos ao endotélio vascular do músculo cremaster em todos os grupos, porém foi mais significativamente nos animais falciformes. Em contrapartida à transmigração endotelial, o tratamento com Fasudil foi capaz de reduzir significativamente somente o extravasamento dos leucócitos nos animais SS, não reduzindo nos animais controles. Foi feita microscopia intravital confocal para a diferenciação dos leucócitos totais, observamos que o número de eosinófilos em rolamento e aderidos ao endotélio vascular nos animais controles e SS sensibilizados com OVA foram significativamente maiores quando comparados aos seus respectivos grupos não sensibilizados. No entanto, os parâmetros de adesão e rolamento foram significativamente maiores nos animais falciformes quando comparados com os animais controle. Em relação ao extravasamento transendotelial dos eosinófilos não observamos diferenças significativas entre os grupos não

sensibilizados e sensibilizados SS, porém, nos animais controle observamos um aumento significativo de eosinófilos extravasados nos animais sensibilizados em comparação aos não sensibilizados. O tratamento com Fasudil foi capaz de reduziu significativamente o rolamento e adesão dos eosinófilos ao endotélio nos animais do grupo falciforme, além disso o Fasudil reduziu significativamente o extravasamento dos eosinófilos ao endotélio vascular do músculo cremaster nos animais falciformes. Tomados em conjunto, o tratamento com o inibidor de ROCK é capaz de reduzir a interação dos leucócitos e eosinófilos com o endotélio vascular no modelo de inflamação alérgica. Desse modo, sugerimos que inibidores dessa via podem ser novos agentes terapêuticos no tratamento das complicações clínicas da anemia falciforme.

Palavras-chave: leucócitos; eosinófilos; Rho GTPases; Fasudil;

ABSTRACT

In sickle cell disease, leukocytes play an important role in the pathophysiology of the disease and are considered the initiating cells of the vaso-occlusive process. Sickle cell disease (SCD) vaso-occlusion results from a complex process involving different mechanisms and interactions of red blood cells, leukocytes, endothelial cells, platelets, and plasma proteins. The Rho GTPases pathway seems to play an important role in the molecular mechanisms of chemotaxis, adhesion and migration of various inflammatory cells and little is known about the role of these Rho GTPases pathways in the rolling, vascular endothelial adhesion and leukocyte extravasation. The objective of this study was to evaluate *in vivo* the participation of eosinophils in the process of eosinophil-endothelium interaction, and in vaso-occlusion in SCD, besides the involvement of the Rho GTPases pathway in the inflammatory response induced by OVA and challenged with eotaxin in sensitized or not sensitized control animals, and transgenic animals for sickle cell anemia. We used male mice of the C57BL/6 J (control) lineage and sickle cell disease Townes model mice (SS). The results obtained by intravital microscopy of the cremaster muscle of the mice showed that after 4 hours of the challenge with eotaxin it was observed an increase in the number of leucocytes in rolling and adhered to the vascular endothelium in all sensitized groups investigated, however, this inflammation is potentiated when we compare the SS animals to the control group. Similar results were observed in relation to extravasation of leukocytes. Treatment with the specific ROCK inhibitor, Fasudil, was able to significantly reduce the rolling and adhesion of leukocytes to the vascular endothelium of the cremaster muscle in all groups, but was more significant in sickle cells disease group. In contrast to endothelial transmigration, treatment with Fasudil was able to significantly reduce leukocyte extravasation in SS animals, not reducing in control animals. With the objective to evaluate the participation of eosinophils in the initial processes of vaso-occlusion, confocal intravital microscopy was performed for the differentiation of total leukocytes in the cremaster muscle of controls and sickle cells diseases mice in a model of chemokine-induced allergic inflammation. We observed that the number of eosinophils in rolling and adhered to the vascular endothelium in the control and SS animals sensitized with OVA were significantly higher when compared to their respective non sensitized groups.

However, adhesion and rolling parameters were significantly higher in sickle animals when compared to control animals. In relation to the transendothelial extravasation of eosinophils, we did not observe significant differences between the non sensitized and sensitized SS groups, however, in the control animals we observed a significant increase of extravasated eosinophils in the sensitized animals compared to the non sensitized animals. Fasudil treatment was able to significantly reduce the rolling and adhesion of eosinophils to the endothelium in animals of the sickle cell disease group, and the specific ROCK inhibitor significantly reduced eosinophil extravasation to the vascular endothelium of the cremaster muscle in sickle cells mice. Taken together, treatment with the ROCK inhibitor is able to reduce the interaction of leukocytes and eosinophils with the vascular endothelium in the allergic inflammation model. Thus, we suggest that inhibitors of this pathway may be new therapeutic agents in the treatment of clinical complications of sickle cell disease.

Keywords: leukocytes; eosinophils; Rho GTPases; Fasudil;

LISTA DE ABREVIATURAS

AF – Anemia falciforme

ANOVA – Análise de variância

C57/BL6- Camundongos selvagens (controle)

HbS - Hemoglobina S

ICAM- Molécula de Adesão Intercelular

IL - Interleucina

NO – Óxido nítrico

NOS- Óxido nítrico síntase

NS – Não Sensibilizados

OVA- Ovalbumina

PBS - Phosphate Buffered Saline (solução salina tamponada com fosfato)

ROCK- Rho-associated, coiled-coil-containingproteinkinase

ROS – Espécies reativas de oxigênio

TNF- α - Fator de Necrose Tumoral alfa

VCAM- Molécula de Adesão Vascular

VLA-4 – Antígeno de expressão tardia 4

SS –Animais transgênicos para anemia falciforme

STA – Síndrome torácica aguda

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismo da vaso-oclusão na anemia falciforme.....	17
Figura 2. Árvore filogenética mostrando a superfamília de Ras GTPase de mamíferos	20
Figura 3. Modelo de sinalização intracelular da Rho GTPase.....	21
Figura 4. Esquema em dias do protocolo de sensibilização dos animais.....	28
Figura 5. Imagens do recrutamento dos leucócitos na microcirculação do músculo cremaster dos grupos controle (A, B e C) e SS (D, E e F), não sensibilizado (A e D), sensibilizado OVA (B e E) e tratado com Fasudil (C e F).....	32
Figura 6. Análise <i>in vivo</i> do recrutamento dos leucócitos na microcirculação do músculo cremaster no modelo de inflamação alérgica em camundongos controles e falciformes.....	34
Figura 7. Efeito do pré-tratamento com Fasudil no recrutamento dos leucócitos na microcirculação do músculo cremaster no modelo de inflamação alérgica em camundongos controle e falciforme.....	36
Figura 8. Imagens do recrutamento dos leucócitos/eosinófilos na microcirculação do músculo cremaster do grupo controle e falciforme (SS). Eosinófilos em vermelho e Leucócitos em roxo.	39
Figura 9. Análise <i>in vivo</i> do recrutamento dos eosinófilos na microcirculação do músculo cremaster no modelo de inflamação alérgica.....	40

Figura 10. Efeito do pré-tratamento com Fasudil no recrutamento dos eosinófilos na microcirculação do músculo cremaster no modelo de inflamação alérgica em camundongos controle e falciforme.....	42
--	----

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
1.1. Anemia Falciforme.....	15
1.2. Leucócitos e a Vaso-oclusão.....	16
1.3. Eosinófilos	18
1.4. Rho-quinases	19
1.5. Rho GTPase e a Inflamação	22
1.6. Rho GTPases e anemia falciforme.....	23
2. JUSTIFICATIVA.....	25
3. OBJETIVOS.....	26
3.1. Objetivo Geral.....	26
3.2. Objetivos Específicos	26
4. MATERIAIS E MÉTODOS	27
4.1. Animais.....	27
4.2. Indução da inflamação alérgica.....	27
4.2.1. Sensibilização com OVA.....	27
4.2.2. Desafio com eotaxina.....	27
4.3. Tratamento dos animais com o inibidor de Rho GTPase (Fasudil)	28
4.4. Microscopia Intravital.....	29
4.5. Microscopia Intravital Confocal.....	29
4.6. Análise estatística.....	30
5. RESULTADOS	31
5.1. Avaliação das interações dos leucócitos-endotélio no modelo de inflamação alérgica induzida por quimiocina.	33
5.2. Efeito do tratamento com inibidor de ROCK sobre as interações leucócito-endotélio no modelo de inflamação alérgica induzida por quimiocina.....	35
5.3. Imagens representativas do recrutamento dos leucócitos na microcirculação do músculo cremaster em modelo de inflamação alérgica induzida por quimiocina.	31

5.4. Avaliação das interações dos leucócitos-endotélio no modelo de inflamação alérgica induzida por quimiocina através de microscopia intravital confocal.....	37
5.5. Avaliação das interações dos eosinófilo-endotélio no modelo de inflamação alérgica induzida por quimiocina através de microscopia intravital confocal.....	39
5.6. Efeito do tratamento com inibidor de ROCK sobre as interações eosinófilos-endotélio no modelo de inflamação alérgica induzida por quimiocina.....	41
6. DISCUSSÃO.....	43
7. CONCLUSÃO	48
8. REFERÊNCIAS	49

1. INTRODUÇÃO

1.1. Anemia Falciforme

A anemia falciforme foi descrita pela primeira vez em 1910 pelo Dr. Herrick ao examinar um indivíduo negro de origem africana que apresentava um quadro de anemia, icterícia, úlceras nos membros inferiores e complicações pulmonares. O termo “forma de foice” foi utilizado por ele para descrever os eritrócitos peculiarmente alongados e em forma de foice no sangue periférico nesse paciente (1). Em 1949, verificou-se que a anemia falciforme se tratava de uma doença genética com herança autossômica recessiva causada por uma mutação de uma única base nitrogenada no sexto códon do gene da globina β no cromossomo 11 (2). Essa alteração molecular induz à substituição da base nitrogenada adenina (A) por uma timina (T) (GAG→GTC), levando consequentemente a substituição da produção do ácido glutâmico pelo aminoácido valina resultando na formação de uma hemoglobina anômala conhecida como hemoglobina S (HbS)(3–6).

Sob condições de hipóxia, a HbS tem a capacidade de formar polímeros, e a polimerização da HbS é o evento fundamental na fisiopatologia da anemia falciforme, ocasionando a formação de estruturas tubulares que resulta em maior rigidez, deformação e diminuição da flexibilidade das hemácias, as quais são impedidas de transitarem livremente na microvasculatura. Tal fato beneficia a formação de agregados celulares na microcirculação, ocasionando diversas manifestações clínicas presentes nos pacientes com doenças falciformes, tais como anemia, episódios recorrentes de vaso-oclusão, infecções, síndrome torácica aguda (STA), hipertensão pulmonar, priapismo, osteonecrose, insuficiência renal, úlceras de perna, retinopatia e doenças cardíacas(7–9).

1.2. Leucócitos e a Vaso-oclusão

A vaso-oclusão é a maior causa de morbidade nos pacientes com anemia falciforme. Os fenômenos vaso-oclusivos acontecem principalmente em órgãos com circulação sinuosa, onde o fluxo de sangue é lento, a tensão de oxigênio é baixa, ou ainda, naqueles órgãos onde há um suprimento sanguíneo arterial terminal limitado. No entanto, grandes artérias, principalmente nos pulmões e cérebro devido sua anatomia, também podem ser afetadas (10). Na anemia falciforme a vaso-oclusão resulta de um mecanismo complexo que culmina na adesão de células vermelhas, leucócitos e plaquetas ao endotélio anormalmente ativado e à parede vascular o que pode causar uma barreira física, levando a diminuição do fluxo sanguíneo, perpetuando os estímulos inflamatórios, e logo, a vaso-oclusão (11).

O papel do processo inflamatório da vaso-oclusão na anemia falciforme pode ser amplamente investigado utilizando a técnica de microscopia intravital em vênulas do músculo cremaster de camundongos que expressam genes humanos da globina β (12,13). Estudos com camundongos transgênicos portadores da HbS, mostraram que após um estímulo inflamatório, os leucócitos aderiram ao endotélio de vênulas pós-capilares e aos glóbulos vermelhos circulantes, e que a ativação do endotélio concomitante as respostas inflamatórias são necessárias para aderência dos leucócitos que conseqüentemente levam ao processo vaso oclusivo na anemia falciforme. Assim, tanto a adesão dos leucócitos ao endotélio vascular como adesão dos leucócitos aos eritrócitos falcizados, desempenham um papel direto no processo vaso-oclusivo, sugerindo que os leucócitos possuem um papel importante na fisiopatologia da vaso-oclusão, sendo consideradas as células iniciadoras desse processo (14,15).

A polimerização da hemoglobina falciforme (HbS) causa danos e disfunção da membrana eritrocitária levando à hemólise. A hemólise intravascular libera o conteúdo de eritrócitos no plasma. A Hb circulante consome o óxido nítrico (NO) sintetizados pelas células endoteliais, após a ativação das mesmas, as células endoteliais elevam a expressão de moléculas de adesão, como ICAM-1, VCAM-1 e E-selectina na superfície do vaso, além de liberarem mais citocinas e quimiocinas

como IL-8, IL-6, IL-1 β que junto ao TNF- α , contribuem para a inflamação vascular e ativação das células sanguíneas. Os glóbulos falcizados ou não circulantes aderem uns aos outros e ao endotélio, juntos aos leucócitos e a plaquetas contribuem para a ativação do endotélio. A vasoconstrição elevada e a barreira física causada pelo os agregados celulares, ocasionam a diminuição do fluxo sanguíneo e consequentemente a hipóxia e falcização das hemácias, gerando um ciclo de estímulos, levando a vaso-oclusão (16) (Figura 1).

Aparentemente, os neutrófilos são os leucócitos que mais participam do processo de vaso-oclusão, pelo menos em camundongos transgênicos para anemia falciforme(17). Em ensaios *in vitro* de adesão estática com neutrófilos de pacientes falciforme, mostraram que a adesão para fibronectina e ao endotélio quando ativado com TNF- α está aumentada nesses indivíduos (18,19). Em humanos é possível que os eosinófilos também estejam envolvidos no fenômeno vaso-oclusivo.

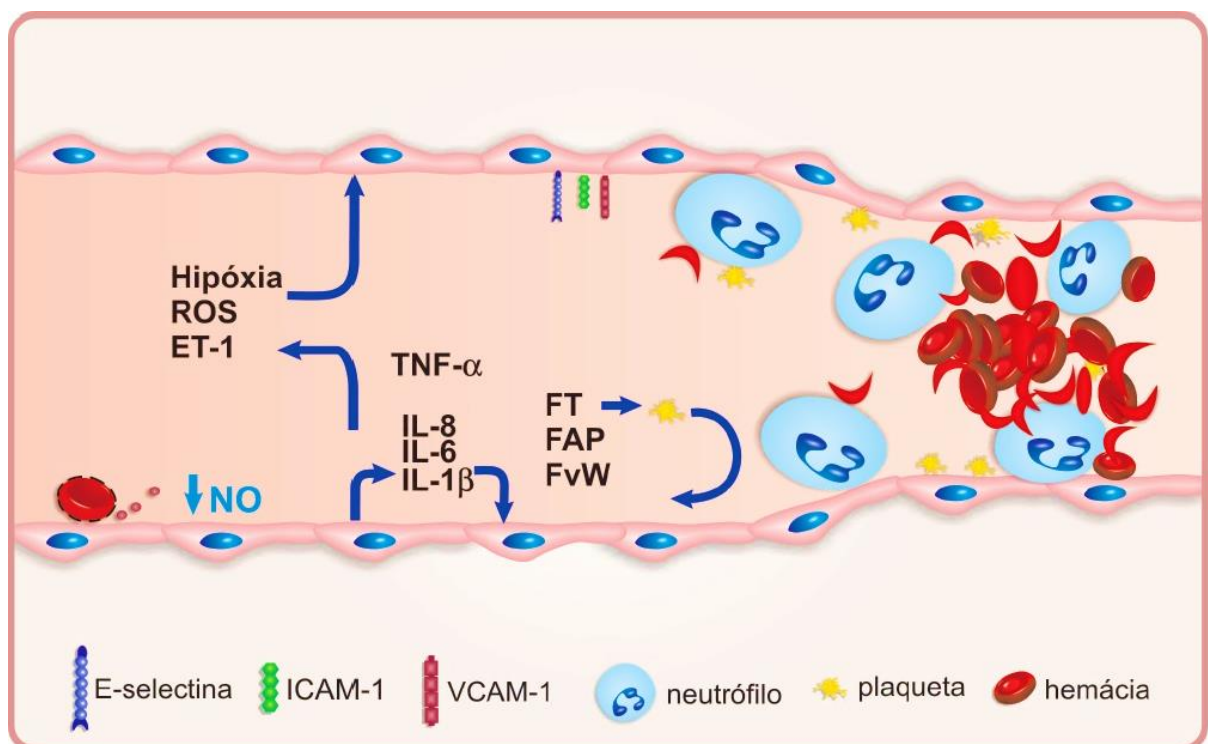


Figura 1. Mecanismo da vaso-oclusão na anemia falciforme.

1.3. Eosinófilos

Os eosinófilos foram descritos pela primeira vez por Paul Ehrlich em 1879, que demonstrou grande afinidade tintorial desta célula por corantes ácidos, como a eosina, e a partir desta data tem sido extensivamente estudado (20). Sabe-se que os eosinófilos são considerados as células efetoras no desenvolvimento de inflamações das vias aéreas. Infiltrados de eosinófilos estão presentes na estrutura da parede das vias aéreas e no lúmen do brônquio desses pacientes (21).

As complicações pulmonares são as principais causas de morbidade e mortalidade na anemia falciforme e incluem síndrome torácica aguda (STA), infecções e hipertensão pulmonar. A STA é caracterizada por dor torácica, febre, hipóxia, dispneia, infiltrado nos raios X de tórax e queda no nível de hemoglobina (22,23). Os eosinófilos participam intensamente de processos inflamatórios das vias aéreas, uma vez que os pulmões são particularmente vulneráveis aos eventos vaso-oclusivos devido a sua anatomia. Além disso, alguns trabalhos têm sugerido que a asma está associada com STA e crises de dor em pacientes com anemia falciforme, principalmente crianças. As crianças com anemia falciforme diagnosticadas com asma têm o primeiro episódio de STA mais cedo, requerem mais transfusões, além disso os episódios de dores são mais frequentes nesses pacientes (24).

Para que aconteça a inflamação das vias aéreas é necessário que os eosinófilos migrem da circulação para os pulmões (25). Inicialmente os eosinófilos deixam o fluxo sanguíneo e aderem ao endotélio pulmonar. A transmigração dos eosinófilos através do endotélio vascular envolve várias etapas: rolamento, “tethering”, adesão firme e migração transendotelial(26,27). A etapa inicial do rolamento é regulada pelas selectinas e seus coligantes expressos no endotélio. Os eosinófilos expressam constitutivamente a L-selectina, molécula de adesão responsável pelo rolamento das células no endotélio *in vivo*(28,29). Os ligantes para L-selectina incluem CD34 e MadCAM-1 expressos no endotélio (30). Os eosinófilos também expressam CD162 (P-selectina glicoproteína ligante1 ou PSGL-1) e sialyl-Lewis (CD15 s), o qual interage com a E-seletina e P-selectina e regulam o “tethering” do eosinófilo ao endotélio (31).

Quando células endoteliais são expostas à citocinas inflamatórias como IL-1, TNF- α e IL-4, a expressão de ICAM-1 e VCAM-1 são aumentadas. Desta forma, a adesão firme dos eosinófilos e a transmigração através do endotélio vascular nos tecidos são reguladas pela interação de quimiocinas, citocinas, moléculas de adesão (selectinas e integrinas) e receptores de integrinas (VCAM-1; MAdCAM-1 e ICAM-1) expressas nas células endoteliais (32). A interação específica das integrinas com os receptores da adesão (VCAM-1, MAdCAM-1, ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3, e fibrinogênio) facilita a migração dos eosinófilos para os tecidos durante o processo inflamatório, por exemplo, no recrutamento do eosinófilos ao sítio de inflamação alérgica na pele e no pulmão e regulado pela VLA-4 ($\alpha 4\beta 1$)/VCAM-1 (33,34). Além disso, o processo de migração dos eosinófilos para o local da injúria tecidual envolve a liberação de citocinas (IL-4, IL-5 e IL-13), moléculas de adesão (integrinas $\beta 1$, $\beta 2$ e $\beta 7$) e quimiocinas (RANTES e as eotaxinas).

Os eosinófilos de pacientes com anemia falciforme são numericamente maiores e apresentam propriedades adesivas aumentadas (35), no entanto, a participação dos eosinófilos no processo de vaso-oclusão ainda não está bem estabelecida. Recentemente, um trabalho desenvolvido no nosso laboratório mostrou que a capacidade de migração dos eosinófilos em direção aos agentes quimiotáticos e a sua degranulação é significativamente maior nesses pacientes (36).

A via da Rho-quinase parece ter um papel importante nos mecanismos moleculares da quimiotaxia, adesão e migração de várias células inflamatórias (37,38). A ativação da Rho-quinase pode levar à infiltração de qualquer tipo de células inflamatórias, incluindo eosinófilos para as vias aéreas. Em contrapartida, inibidores de Rho-quinase pode suprir a migração inibindo indiretamente a infiltração de eosinófilos para as vias aéreas, afetando os fatores quimiotáticos relacionados às células inflamatórias (38).

1.4. Rho-quinases

As Rho GTPases são proteínas altamente conservadas de eucariotos inferiores para plantas e mamíferos. As GTPases também são conhecidas como

proteínas de ligação ao GTP ou proteínas G, juntamente com outras famílias, tais como, Ras, Rab, Arf e Ran originam a superfamília de proteínas Ras. Atualmente a família das Rho GTPases é formada por 20 membros dispostos em oito subfamílias diferentes (39–41).

Em humanos foram encontrados até o momento 22 genes que codificam pelo menos 25 proteínas: três isoformas de Rho (RhoA, RhoB e RhoC), três isoformas de Rac (Rac1, Rac2 e Rac3), Cdc42, RhoD, Rnd1, Rnd2, Rnd3 (ou RhoE), RhoG, TC10, TCL, RhoH, Chp, Wrch, Rlf, RhoBTBT1, RhoBTBT2, Miro- 1 e Miro-2 (40–42).

Os 20 membros da família Rho GTPase são agrupados em oito subfamílias. Adaptado (41) (Figura 2).

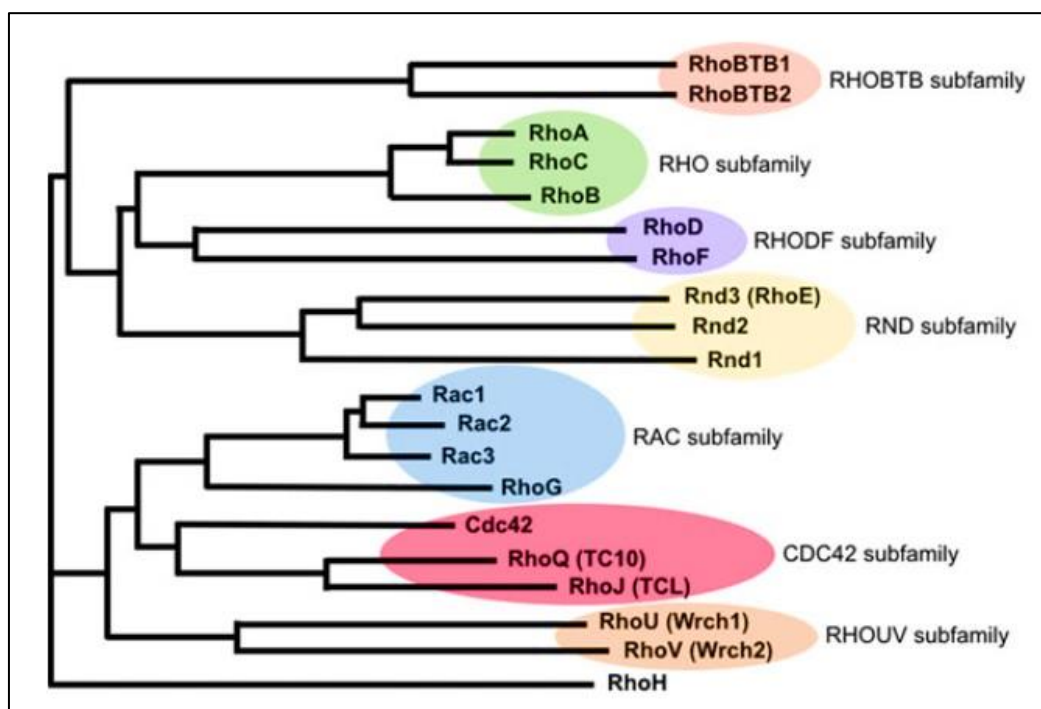


Figura 2. Árvore filogenética mostrando a superfamília de Ras GTPase de mamíferos

Descritas como “interruptores moleculares”, estas proteínas Rho GTPases desempenham papel importante na proliferação celular, na apoptose, na expressão gênica, adesão, migração, dentre outras funções celulares comuns (39).

Essas proteínas alternam entre dois estados conformacionais: 1 ativo ligado ao GTP e outro inativo ligada a GDP, quando ligado ao GTP a Rho ativa sua proteína alvo ROCK levando a ativação de várias vias. (Figura 3)

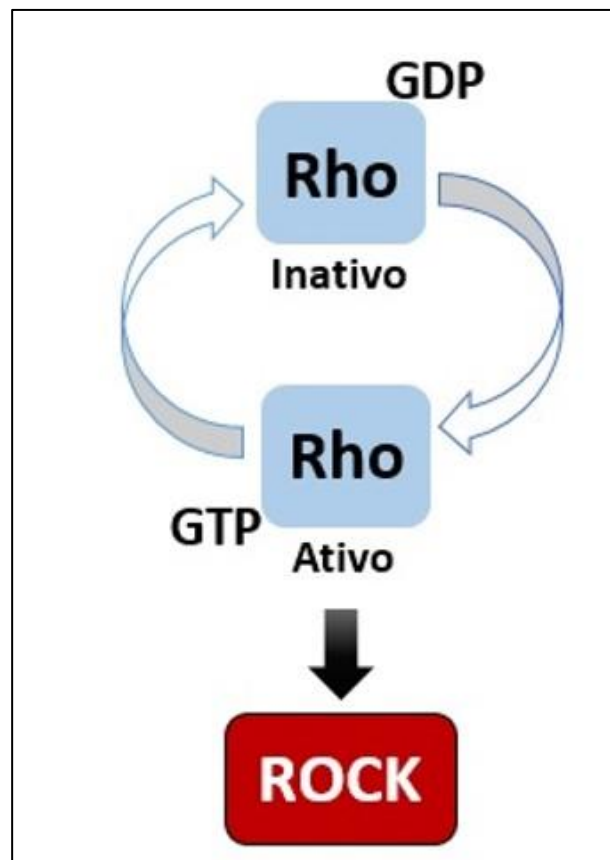


Figura 3. Modelo de sinalização intracelular da Rho GTPase.

1.5. Rho GTPase e a Inflamação

Os três membros mais estudados da família das Rho GTPases são Rho A, Rac1 e Cdc42, pois foram os primeiros a serem reportados com funções celulares importantes relacionados ao citoesqueleto de actina (43). A expressão da forma constitutivamente ativa de Rho A induz a organização dos filamentos de actina e miosina contrátil (formação de fibras de stress)(44). Enquanto a Rac1 induz a formação de protrusões de actina na superfície celular (lamelipódia) e Cdc42, por sua vez, induz a formação de extensões membranares também ricas em actina (filopódia) (44,45).

As Rho A, B e C são conhecidas por ativar diretamente a quinase alvo, ROCK. ROCK tem mostrado fosforilar diretamente um grande número de reguladores de citoesqueleto de actina, incluindo a cadeia leve de miosina fosfatase e LIM quinase (LIMK). A fosforilação direta da cadeia leve de miosina ou de cadeia leve da miosina fosfatase tem um impacto imediato sobre o nível de miosina fosforilada da cadeia leve, que contribui para a contractilidade (46).

As Rho GTPases medeiam à formação de fibras de stress em resposta a estímulos extracelulares tal como, trombina, histamina, TNF- α e tensão de cisalhamento, que levam a contração celular, alterações nas junções intracelulares e aumento da permeabilidade celular. Estas proteínas também são necessárias para adesão dos leucócitos ao endotélio, para o agrupamento de ICAM-1 e VCAM-1, e a formação de estruturas de “encaixe” em volta do leucócito aderido. Além disso, Rho, Rac e Cdc42 estão envolvidos na indução da força de cisalhamento da actina, na normalização dos microtubos do citoesqueleto e da polarização celular. A Rac também regula a adesão ao endotélio, migração e a formação de novos sítios de adesão (47,48). As proteínas da via Rho A/ROCK estão envolvidas na ativação do NF- κ B, sugerindo um papel importante desta via na inflamação induzida, por exemplo, pelo LPS (48,49).

Nos últimos anos, a ROCK passou a ser considerado um potente alvo em doenças das vias aéreas, incluindo asma alérgica (50). Estudos demonstraram que a via Rho A/ROCK medeia à sensibilização por Ca^{2+} e aumenta a contração induzida

pela acetilcolina do músculo liso brônquico obtido a partir de repetidos desafios por alérgenos em ratos (51). Além disso, foi demonstrado que a sensibilização alérgica, sem subsequente exposição aos alérgenos, foi suficiente para acrescentar o papel de ROCK na contração do músculo liso traqueal e responsividade das vias aéreas de cobaia *ex vivo* e *in vivo*(52).

A participação da via Rho A/ROCK nas respostas das vias aéreas pode aumentar a expressão de Rho A. A proteína Rho A é conhecida por ativar a via Rho A/ROCK, e os níveis dessa proteína ativadora estão elevados tanto após a sensibilização alérgica em cobaias quanto após o desafio repetido com alérgico em ratos (51,52).

Algumas das funções dessas proteínas como organização do citoesqueleto de actina, migração e adesão celular, a formação de espécies reativas de oxigênio, e apoptose (53,54), podem ser alteradas na presença de inibidores. Os inibidores mais conhecidos de Rho-quinase são HA -1077 (Fasudil, 5 - isoquinolinassulfonil - homopiperazina), o Y-27632 [(R)-(+)-trans-N-(4-piridil) -4-(1-aminoetil) -ciclo-hexanocarboxamida] e o NSC23766. (41,55–58).

O efeito anti-inflamatório é mediado, pelo menos em parte, pela redução da ativação do NF- κ B. O efeito de inibição de ROCK na sinalização de NF- κ B é uma consequência da redução da produção e da expressão de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, tais como, TNF - α , IL - 1β , IL - 6, IL - 8, e CCL2 (59).

1.6. Rho GTPases e anemia falciforme

Em 2010, Bivalacqua e colaboradores demonstraram que a via das Rho-GTPase pode estar alterada na anemia falciforme. As alterações na via Rho A/ROCK estão relacionadas com a fisiopatologia do priapismo em camundongos transgênicos para anemia falciforme(60). Em pacientes com anemia falciforme as alterações na função da PKC e Rac GTPase nas hemácias falciformes podem afetar a mecânica da membrana, agravando a rigidez e a fragilidade das células falciformes, ao mesmo tempo em que pode aumentar a produção de ROS, esses

processos contribuem tanto para vaso-oclusão como para a hemólise (61). Estudos da ROCK e seus inibidores, em diversas vias de sinalização, ganharam consideráveis interesses, uma vez que, mostraram o envolvimento desta enzima, efetora de Rho GTPases, na função vascular e inflamação (62). No entanto, o papel da via da Rho-GTPase nas propriedades adesivas dos eosinófilos na anemia falciforme ainda não está bem estabelecido. Dados do nosso laboratório mostraram que os pacientes com anemia falciforme em terapia ou não com HU também apresentou menor número de eosinófilos aderidos à HUVEC quando estas foram previamente tratadas com os inibidores dessa via. Em condições de fluxo, o número de eosinófilos aderidos à HUVEC reduziu significativamente quando estas foram tratadas com Y-27632 ou NSC23766 no grupo de pacientes com anemia falciforme. Além disso, nos estudos *in vivo*, utilizando camundongos falciformes, a inflamação pulmonar induzida pela OVA foi significativamente diminuída pelo tratamento com os inibidores da via Rho A/ROCK (Y-27632 ou Fasudil). Esses animais apresentaram menor contagem total e diferencial das células que migraram para os pulmões e níveis reduzidos dos mediadores pró-inflamatórios avaliados(63).

2. JUSTIFICATIVA

Atualmente, é amplamente aceito que os leucócitos desempenham papel fundamental na anemia falciforme, aderindo ao endotélio vascular e participando do estresse oxidativo e assim perpetuando o estado inflamatório crônico. Aparentemente, os neutrófilos são os leucócitos que mais participam do processo de vaso-oclusão, pelo menos em camundongos transgênicos para anemia falciforme. Sabe-se que os neutrófilos de pacientes com anemia falciforme, apresentam aumento nas propriedades adesivas e quimiotáticas. No entanto, poucos estudos avaliaram as possíveis alterações na função dos eosinófilos na anemia falciforme. Estudos preliminares do nosso grupo mostraram que os eosinófilos de pacientes com anemia falciforme encontram-se ativados no sangue periférico, a capacidade de migração dessas células em direção aos agentes quimiotáticos e a desgranulação é significativamente maior nesses pacientes. Porém, seu papel no processo vaso-oclusivo da doença ainda não está bem caracterizado. Portanto, a avaliação *in vivo* do mecanismo de adesão dos eosinófilos ao endotélio vascular e consequentemente no processo de vaso-oclusão poderá contribuir para melhor compreensão desse processo e permitir desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para o tratamento das complicações clínicas da doença, em especial as que afetam o sistema respiratório. A via das Rho GTPase parece estar envolvida em diversos aspectos da fisiopatologia da anemia falciforme. Entretanto ainda não existem estudos que demonstrem os efeitos de inibidores dessa via no processo de vaso-oclusão na anemia falciforme. O conhecimento do papel das proteínas Rho GTPases na anemia falciforme é de fundamental importância para compreensão da fisiopatologia da doença bem como para avaliar o papel de inibidores dessa via como possível agente terapêutico.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Avaliar *in vivo* a participação dos eosinófilos no processo de vaso-oclusão na anemia falciforme e o envolvimento da via das Rho GTPases nesse processo.

3.2. Objetivos Específicos

Em modelo de inflamação alérgica nos animais falciformes e no grupo controle:

- Investigar o papel dos leucócitos e eosinófilos nas etapas iniciais do processo de vaso-oclusão através da análise das interações do leucócito-endotélio;
- Avaliar o efeito do tratamento com o inibidor de ROCK, Fasudil, sobre os processos de rolamento, adesão e extravasamento dos leucócitos e dos eosinófilos.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Animais

Foram utilizados camundongos machos com aproximadamente 4 meses de idade da linhagem C57BL6/J Unib e Homozigotos transgênicos para anemia falciforme da linhagem $Hba^{tm1(HBA)Tow}Hbb^{tm2(HBG1,HBB^*)Tow}/Hbb^{tm3(HBG1,HBB)Tow}/J$ este modelo animal mimetiza a genética, as características hematológicas e histopatológicas presentes em humanos portadores de anemia falciforme, funcionando como uma importante ferramenta na elucidação de aspectos relacionados a doença(64). Aprovação do comitê de ética número 3909-1.

4.2. Indução da inflamação alérgica

4.2.1. Sensibilização com OVA

Os animais foram imunizados com injeção subcutânea no dorso de OVAalbumina grau V (100 µg de OVA, 1,6 mg de $Al(OH)_3$ em 0,4 ml de solução salina) no dia zero e reforço no sétimo dia, seguindo o protocolo de Riffo-Vasquez(65).

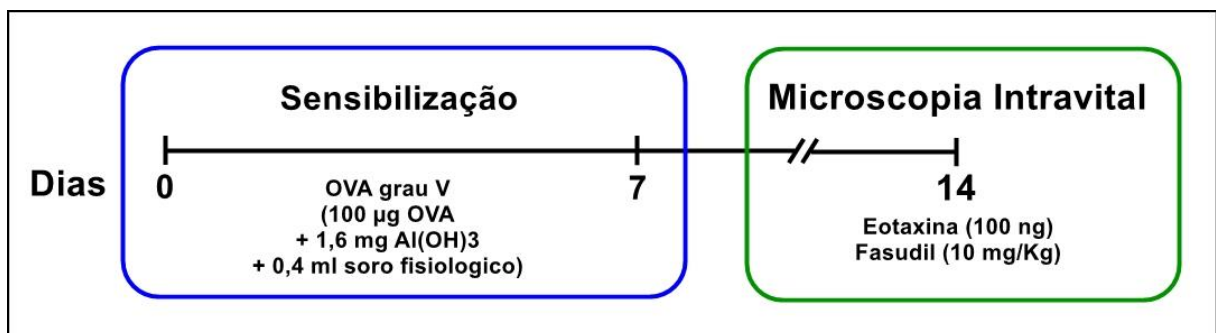
4.2.2. Desafio com eotaxina

Os animais receberam eotaxina murina (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) 100 ng por dose, pela via subcutânea no décimo quarto dia. Quatro horas após a administração da eotaxina, os animais foram cirurgicamente preparados para microscopia intravital.

4.3. Tratamento dos animais com o inibidor de Rho GTPase (Fasudil)

Os animais foram tratados com o inibidor específico de ROCK, Fasudil (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) 10 mg/kg pela via intraperitoneal 1 hora antes do desafio com eotaxina.

No dia zero os animais receberam uma injeção subcutânea no dorso de OVA grau V (100 µg de OVA, 1,6 mg de Al (OH)³ em 0,4 ml de solução salina e o reforço da sensibilização ocorreu no sétimo dia. No 14 dia os animais receberam 100 ng por dose de eotaxina via subcutânea no dorso 4 horas antes da microscopia intravital e para o grupo tratado com inibidor de ROCK receberam via intraperitoneal



10 mg/Kg de Fasudil 1 hora antes da eotaxina (Figura 4).

Figura 4. Esquema em dias do protocolo de sensibilização dos animais.

4.4. Microscopia Intravital

Esta técnica é uma ferramenta utilizada para estudar a microvasculatura e a interação das células do sangue com a parede vascular. Para isso, após os camundongos serem submetidos aos diferentes tratamentos com estímulos inflamatórios ou drogas, foram anestesiados (i.p.) com uma mistura de 2% α -cloralose e 10% uretano dissolvidos em PBS (6 ml/Kg). Um tubo de poliuretano foi inserido na traqueia para facilitar a respiração espontânea. Por manipulação cirúrgica da bolsa escrotal, o músculo cremaster foi exposto e fixado em área transparente da placa cirúrgica. Esta foi posicionada sobre o charriot do microscópio óptico, para possibilitar visualização *“in vivo”* da microcirculação local. As preparações foram mantidas úmidas e aquecidas por irrigação com PBS (phosphate buffer saline). Entre 8 e 12 micros vênulas por animal foram analisadas continuamente por 1 minuto cada uma. Foram avaliados os parâmetros de rolamento, aderência e extravasamento dos leucócitos. Foram considerados aderidos os leucócitos que permaneceram estacionados no endotélio vascular por um período mínimo de 30 segundos, enquanto que o rolamento foi considerado para os leucócitos que migravam da região central para a margem do vaso e se moviam a uma velocidade menor que a velocidade dos eritrócitos. Os resultados de rolamento e adesão foram expressos como número de células/min. As vênulas seguem o padrão específico para filmagem, na qual para vênulas pós-capilares temos as medidas de comprimento (100 μ m), largura (15-30 μ m) e para o extravasamento dos leucócitos padronizamos uma área de 50x100 μ m². O microscópio utilizado foi o Carl Zeiss Axio Imager D2

4.5. Microscopia Intravital Confocal

Para a técnica de microscopia intravital no microscópio confocal, foi feito o mesmo procedimento de microscopia intravital convencional, porém utilizamos a técnica confocal de fluorescência no microscópio Carl Zeiss Upright LSM780-NLO

disponível pelo INFABiC (Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Fotônica Aplicado à Biologia Celular) do Instituto de Física “Gleb Wataghin” da UNICAMP.

Foram utilizados anticorpos específicos para a diferenciação dos leucócitos na microvasculatura do músculo cremaster, no qual fizemos um mix de anticorpos, Ly6 (GR-1) FITC (Tonbo Bioscience, Califórnia, USA) para marcação de granulócitos/ neutrófilos, CD170 Siglec-F PE (BD Bioscience, Nova Jersey, USA) para marcação de eosinófilos e CD45 PE-Cyanine5 (eBioscience Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) para marcação de leucócitos, foram administrados pela via do plexo orbital do animal uma quantidade de 10 µg/ml por animal diluídos em 100 µl solução salina. Os parâmetros de rolamento, adesão e extravasamento dos eosinófilos avaliados seguem o mesmo protocolo de microscopia intravital convencional.

4.6. Análise estatística

Os dados foram expressos como média $\pm$ EPM. As diferenças entre as médias foram analisadas utilizando o teste de Mann-Whitney test ou ANOVA seguido pelo método de Bonferroni. Valores de $p < 0.05$ foram considerados significantes. Todos os cálculos foram realizados utilizando-se o programa GraphPad Prism. Para as análises e edição das imagens de microscopia intravital foi utilizado o software ImageJ.

5. RESULTADOS

5.1. Imagens do recrutamento dos leucócitos na microcirculação do músculo cremaster em modelo de inflamação alérgica induzida por quimiocina.

Na figura 5, observamos os parâmetros envolvidos no processo de recrutamento dos leucócitos: rolamento (indicado por flecha), a adesão (indicado pelo asterisco) e o extravasamento (indicado por X) dos leucócitos ao endotélio na microcirculação do músculo cremaster dos animais controles e falciformes.

As figuras 5A, B e C representam o grupo controle, Não sensibilizados (NS), Sensibilizado (OVA) e Sensibilizado com OVA e tratado com Fasudil (OVA+Fasudil) respectivamente.

As figuras 5D, E e F representam o grupo falciforme SS, Não sensibilizados (NS), Sensibilizado (OVA) e Sensibilizado com OVA e tratado com Fasudil (OVA+Fasudil) respectivamente.

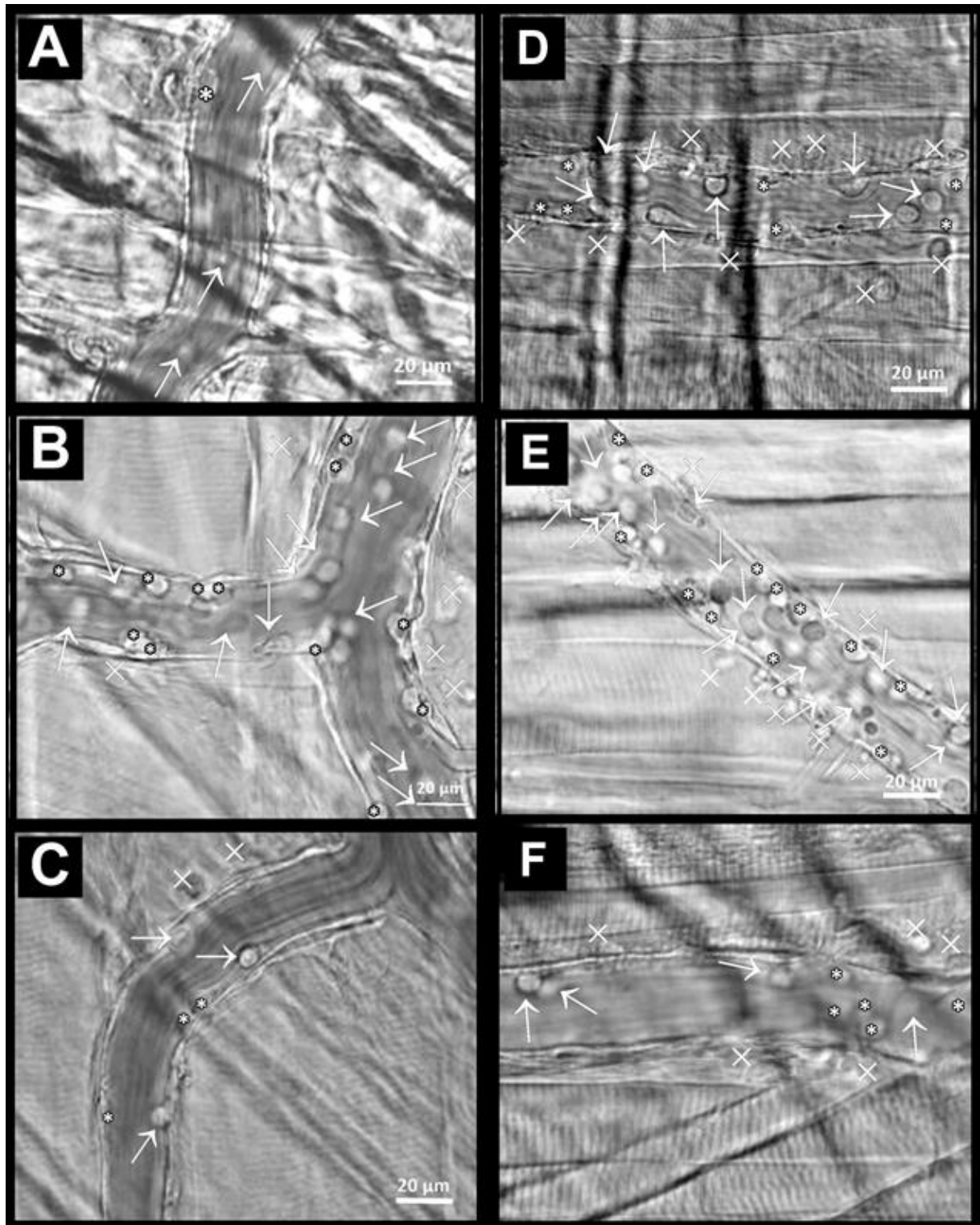


Figura 5. Imagens do recrutamento dos leucócitos na microcirculação do músculo cremaster dos grupos controle (A, B e C) e SS (D, E e F), não sensibilizado (A e D), sensibilizado OVA (B e E) e tratado com Fasudil (C e F).

5.2. Avaliação das interações dos leucócitos-endotélio no modelo de inflamação alérgica induzida por quimiocina.

A fim de avaliar as interações dos leucócitos com endotélio vascular realizamos um modelo de inflamatória alérgica, conforme descrito(65), nos animais controle e falciformes. Esse modelo consiste da sensibilização prévia com OVA e desafio com eotaxina.

Na figura 6A, mostramos que os animais sensibilizados e desafiados com eotaxina apresentaram um maior número de células em rolamento quando comparado com os animais não sensibilizados. O número de células em rolamento é significativamente maior nos animais falciformes (SS) modelo Townes quando comparado com o grupo controle.

Após o desafio com eotaxina observamos um aumento na quantidade de células aderidas ao endotélio vascular nos animais controle e falciformes. Esse aumento foi maior nos animais falciformes ($p \leq 0,0001$) (Figura 6B).

O extravasamento dos leucócitos também foi avaliado. A figura 6C mostra que o número de células extravasadas é maior nos animais sensibilizados e desafiados com eotaxina no grupo falciforme quando comparado com o grupo controle.

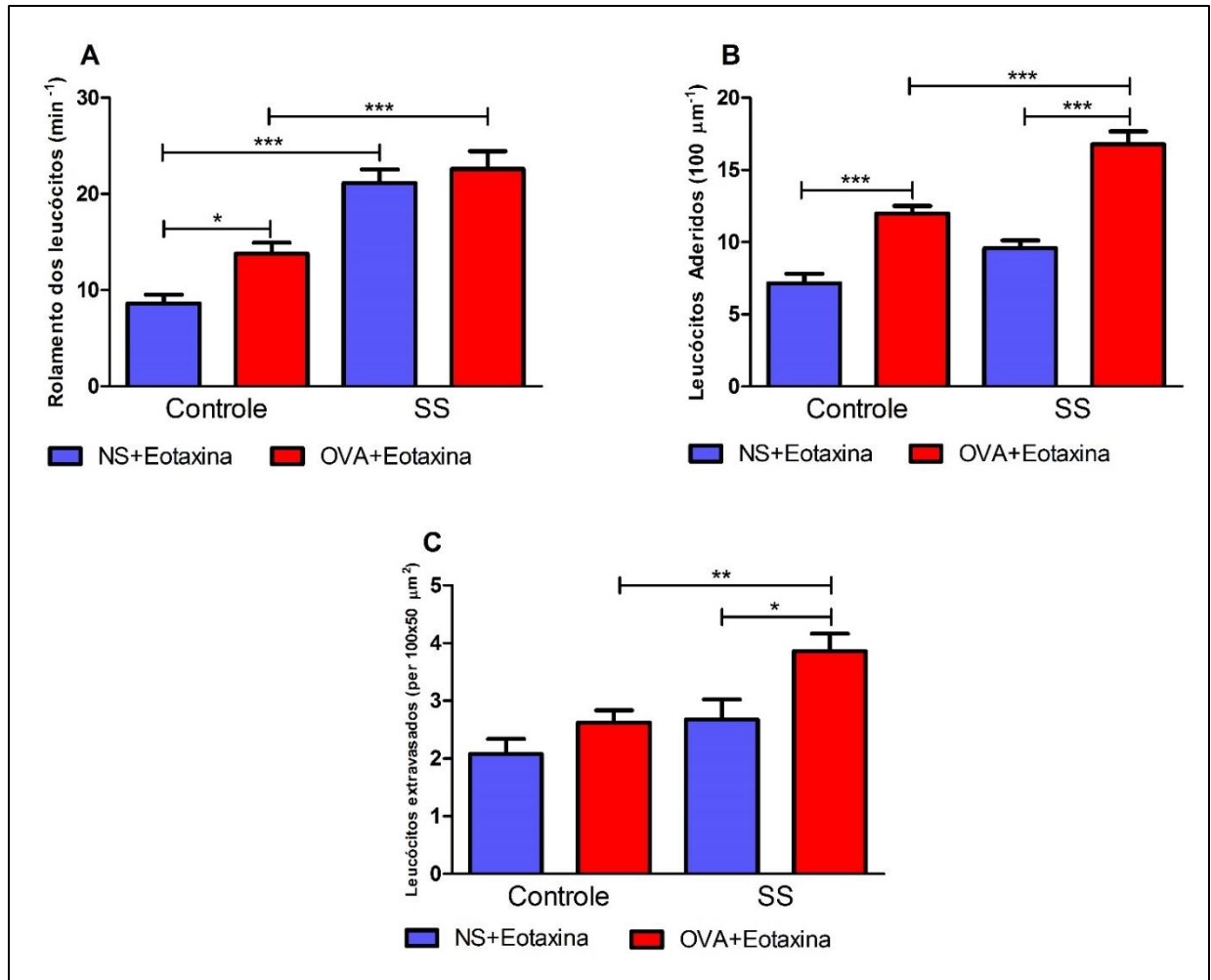


Figura 6. Análise *in vivo* do recrutamento dos leucócitos na microcirculação do músculo cremaster no modelo de inflamação alérgica em camundongos controles e falciformes.

A análise foi realizada através da técnica de microscopia intravital. Foram avaliados os parâmetros de rolamento (A), adesão (B) e extravasamento (C) dos leucócitos nos animais controles (C57BL/6 J Unib) e SS (Townes falciformes). Os valores foram obtidos 4 h após a administração de eotaxina. Os dados estão expressos como média $\pm$ EPM ($n=5-9$ animais). * $p \leq 0,05$; *** $p \leq 0,0001$.

5.3.Efeito do tratamento com inibidor de ROCK sobre as interações leucócito-endotélio no modelo de inflamação alérgica induzida por quimiocina.

Com o intuito de avaliar se o tratamento com o inibidor de ROCK poderia influenciar diretamente na interação leucócito-endotélio, os animais foram tratados com o inibidor específico de ROCK, Fasudil, pela via intraperitoneal 1 hora antes do desafio com eotaxina.

Na figura 7A e 7B, mostramos que o tratamento com Fasudil reduziu significativamente o rolamento e adesão dos leucócitos ao endotélio nos animais do grupo controle. Em relação aos animais falciformes, o inibidor de ROCK diminuiu apenas a adesão dos leucócitos ao endotélio vascular sem efeito significativo no rolamento.

O tratamento com Fasudil foi capaz de reduzir significativamente o extravasamento dos leucócitos nos animais falciformes, porém não reduziu nos animais do grupo controle (Figura 7C).

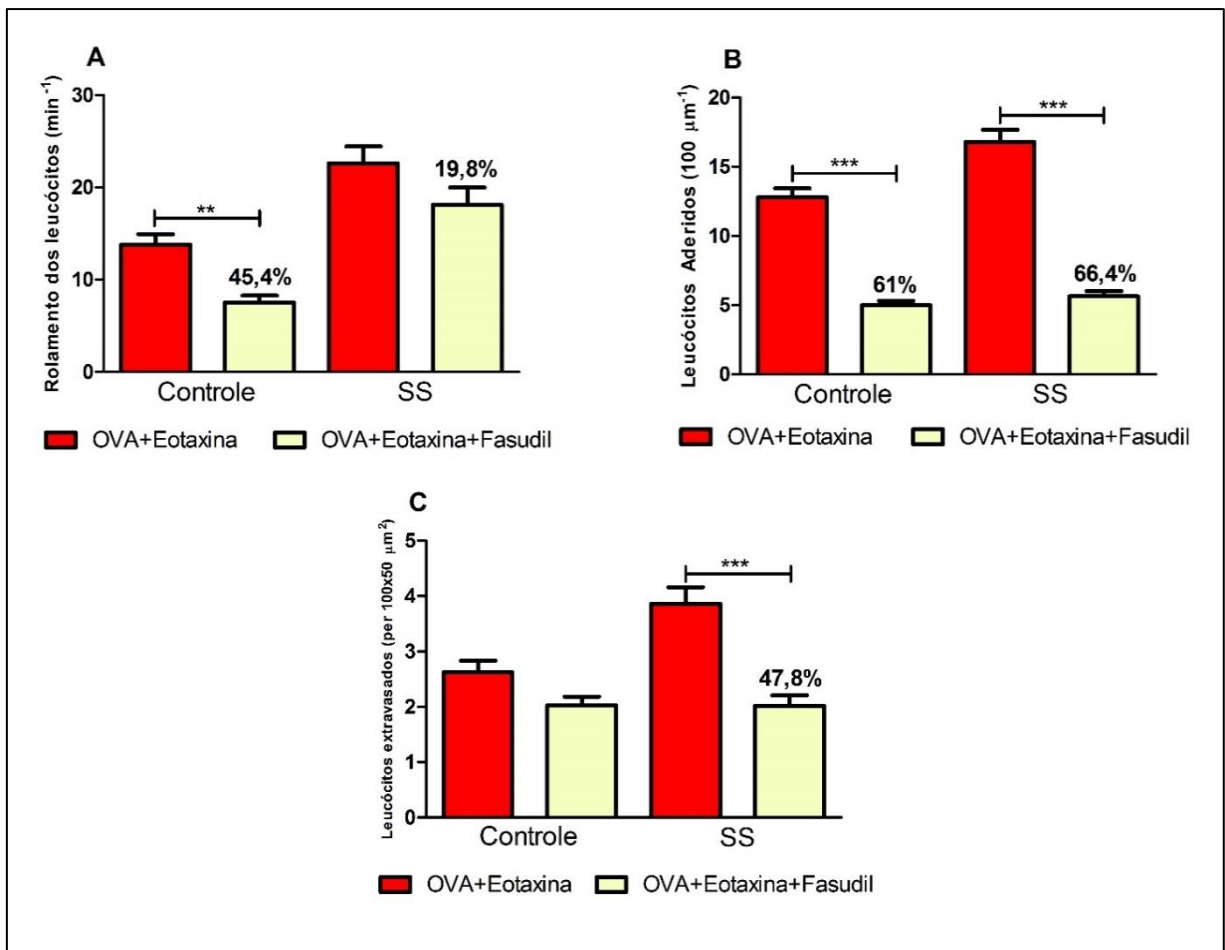


Figura 7. Efeito do pré-tratamento com Fasudil no recrutamento dos leucócitos na microcirculação do músculo cremaster no modelo de inflamação alérgica em camundongos controle e falciforme.

A análise foi realizada através da técnica de microscopia intravital, foram avaliados os parâmetros de rolamento (A), adesão (B) e extravasamento (C) dos leucócitos nos animais controles (C57BL/6 J Unib) e SS (Townes falciformes). O inibidor de ROCK, Fasudil (10 mg/kg) foi administrado pela via intraperitoneal 1 hora antes da eotaxina (100 ng/ml). Os valores foram obtidos 4 h após a administração de eotaxina. Os dados estão expressos como média $\pm$ EPM (n= 4-8 animais). * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,005$; *** $p \leq 0,0001$.

5.4.Avaliação das interações dos leucócitos-endotélio no modelo de inflamação alérgica induzida por quimiocina através de microscopia intravital confocal

Embora a técnica de microscopia intravital tenha mostrado que no modelo de inflamação alérgica induzida por quimiocina o número de leucócitos é maior, essa técnica não nos permite determinar quais tipos de leucócitos estão presentes nesse modelo. Portanto decidimos utilizar a técnica de microscopia intravital confocal que nos permite visualizar cada tipo de leucócito, através da marcação com anticorpos específicos. Os leucócitos nas figuras abaixo foram diferenciados pelo mix de anticorpos, de acordo com os canais: Canal 1, eosinófilos em vermelho (CD170 Siglec-F PE) e Canal 2, os leucócitos totais em roxo (CD45 PE-Cyanine5) e o Canal 3 em branco.

Nas figuras abaixo foram identificados os parâmetros de rolamento (Indicado pelas flechas) adesão (indicada pelo asterisco) e extravasamento dos leucócitos (indicado pelo X).

Na figura 8 A, B e C observamos o grupo dos animais controles NS (Não sensibilizados e desafiados com eotaxina), OVA+Eotaxina (Sensibilizados e desafiados com eotaxina) e OVA+Fasudil (Sensibilizados, desafiados com eotaxina e tratados com Fasudil), respectivamente.

Na figura 8 D, E e F observamos o grupo dos animais SS NS (Não sensibilizados e desafiados com eotaxina), OVA+Eotaxina (Sensibilizados e desafiados com eotaxina) e OVA+Fasudil (Sensibilizados, desafiados com eotaxina e tratados com Fasudil), respectivamente.

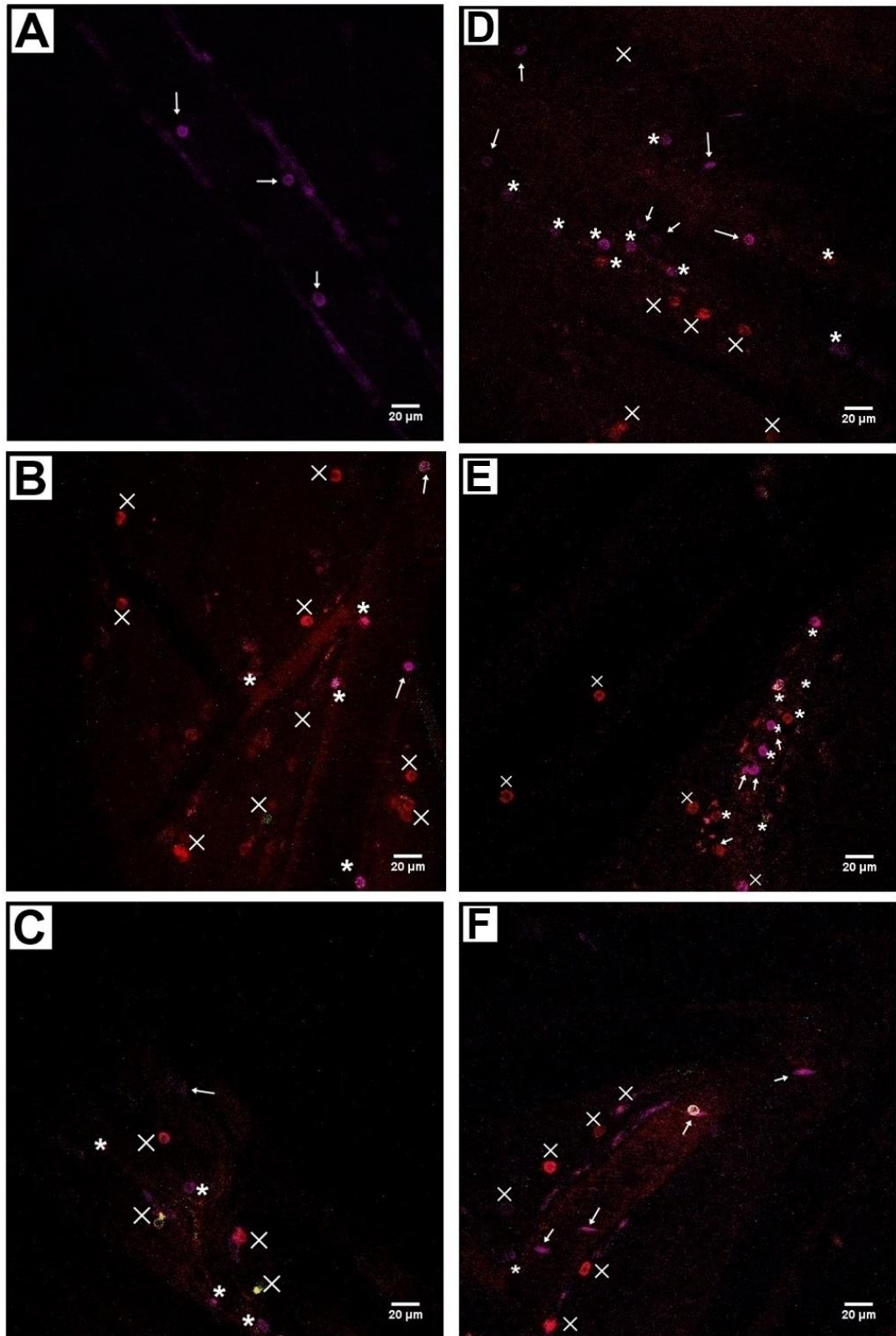


Figura 8. Imagens do recrutamento dos leucócitos/eosinófilos na microcirculação do músculo cremaster do grupo controle e falciforme (SS). Eosinófilos em vermelho e Leucócitos em roxo.

5.5. Avaliação das interações dos eosinófilo-endotélio no modelo de inflamação alérgica induzida por quimiocina através de microscopia intravital confocal

Nesse experimento, observamos que o modelo de inflamação alérgica induzida por quimiocina resulta em um aumento no número de eosinófilos. Na figura 14A e B podemos observar que o número de eosinófilos em rolamento e aderidos ao endotélio vascular nos animais controles (C57) e SS (falciformes) sensibilizados com OVA foram significativamente maiores quando comparados aos seus respectivos grupos não sensibilizados. No entanto, os parâmetros de adesão e rolamento foram significativamente maiores no grupo falciforme quando comparado com o controle ($p \geq 0,0001$).

Em relação ao extravasamento transendotelial dos eosinófilos não observamos diferenças significativas entre os grupos não sensibilizados (NS) e sensibilizados SS (Figura 14C). No entanto, no grupo controle observamos um número significativo de eosinófilos extravasados nos animais sensibilizados em comparação aos não sensibilizados. Quando comparamos o número de eosinófilos extravasados do grupo controle e falciforme sensibilizado não encontramos diferenças significativas (Figura 14C).

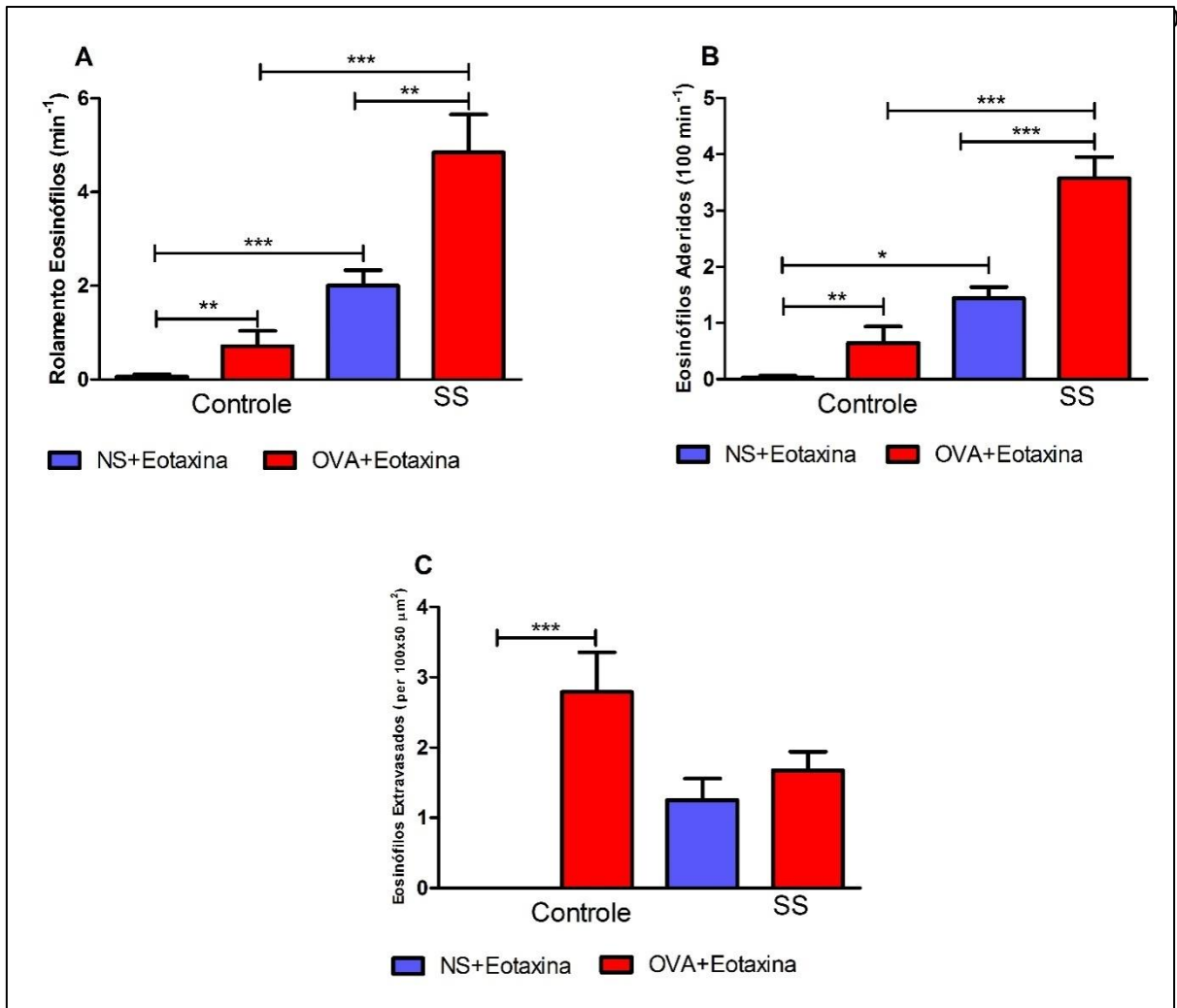


Figura 9. Análise *in vivo* do recrutamento dos eosinófilos na microcirculação do músculo cremaster no modelo de inflamação alérgica.

A análise foi realizada através da técnica de microscopia intravital confocal. Foram avaliados os parâmetros de rolamento (A), adesão (B) e extravasamento (C) dos eosinófilos nos animais controles (C57BL/6 J Unib) e SS (Townes falciformes). Os valores foram obtidos 4 h após a administração de eotaxina. Os dados estão expressos como média $\pm$ EPM (n= 3-5 animais). ** $p \leq 0,005$; *** $p \leq 0,0001$

5.6.Efeito do tratamento com inibidor de ROCK sobre as interações eosinófilos-endotélio no modelo de inflamação alérgica induzida por quimiocina

Com o objetivo de avaliar se o tratamento com o inibidor de ROCK influenciaria diretamente na interação eosinófilo-endotélio, os animais do grupo controle e SS sensibilizados com OVA foram tratados via intraperitoneal com inibidor específico de ROCK, Fasudil.

Na figura 15A e B, mostramos que o tratamento com Fasudil foi capaz de reduzir significativamente o rolamento ($p \geq 0,05$) e adesão ($p \geq 0,0001$) dos eosinófilos ao endotélio vascular nos animais do grupo falciforme sensibilizado com OVA, porém não foi observado essa redução no grupo controle.

O tratamento com Fasudil reduziu significativamente o extravasamento ($p \geq 0,05$) dos eosinófilos ao endotélio vascular do músculo cremaster nos animais falciformes (Figura 15C).

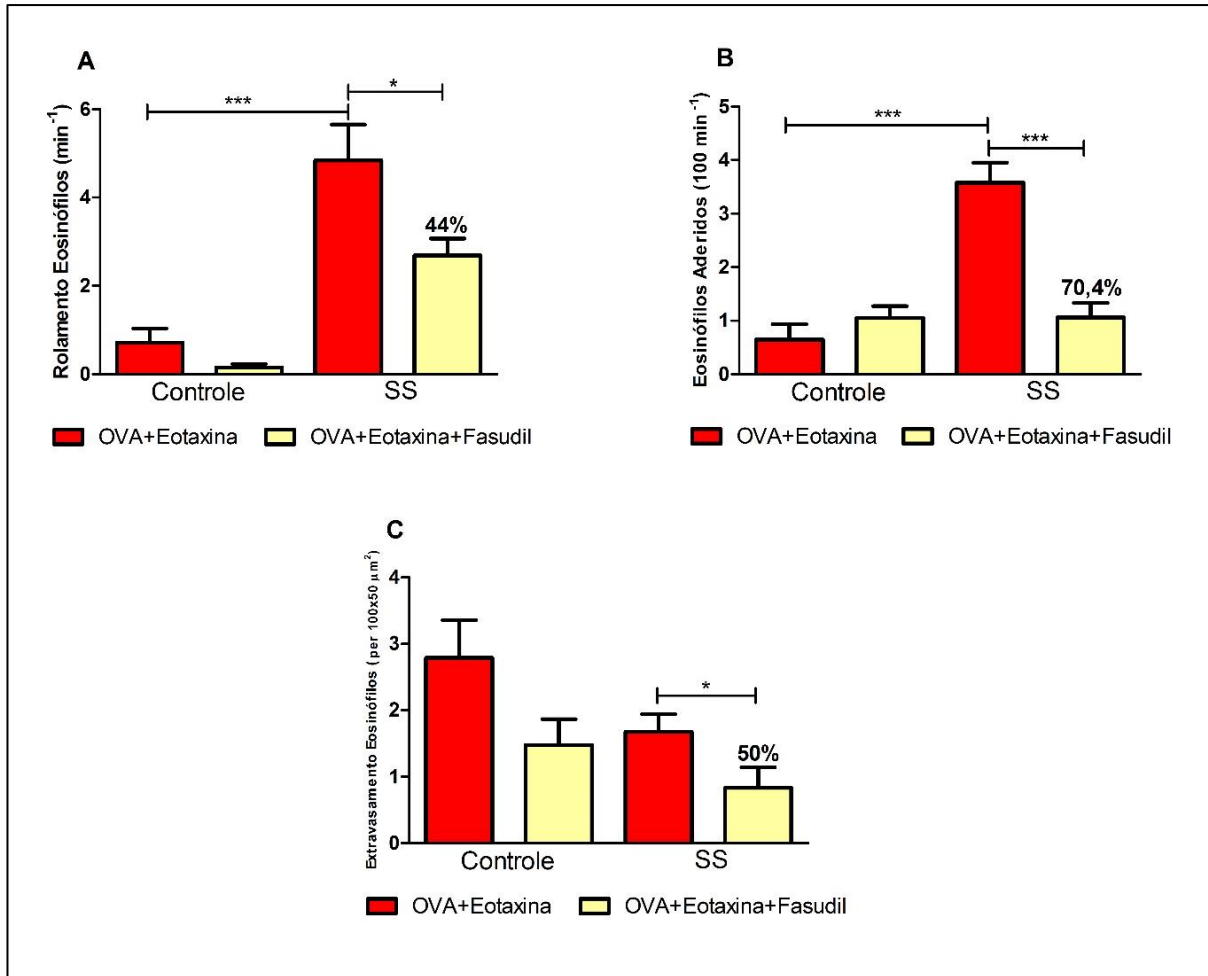


Figura 10. Efeito do pré-tratamento com Fasudil no recrutamento dos eosinófilos na microcirculação do músculo cremaster no modelo de inflamação alérgica em camundongos controle e falciforme.

A análise foi realizada através de microscopia intravital confocal. Foram avaliados os parâmetros de rolamento (A), adesão (B) e extravasamento (C) dos eosinófilos nos animais controles (C57BL/6 J Unib) e SS (Townes falciformes). O inibidor de ROCK, Fasudil (10 mg/kg) foi administrado pela via intraperitoneal 1 hora antes da eotaxina (100 ng/ml). Os valores foram obtidos 4 h após a administração de eotaxina. Os dados estão expressos como média $\pm$ EPM (n= 3-5 animais). * $p \leq 0,05$; *** $p \leq 0,0001$.

6. DISCUSSÃO

A vaso-oclusão compreende um processo complexo e multicelular iniciado pela adesão de hemácias e leucócitos ao endotélio ativado, causando a obstrução vascular, ativação de células endoteliais vasculares e lesões que podem induzir uma resposta inflamatória contínua na anemia falciforme(11,14,17,66). Dessa forma, acredita-se que os leucócitos, principalmente os neutrófilos, tem papel importante na vaso-oclusão, sendo consideradas as células iniciadoras do processo vaso-oclusivo(15).Estudos anteriores do nosso grupo demonstraram, que além dos neutrófilos, os eosinófilos de pacientes com anemia falciforme encontram-se ativados no sangue periférico e apresentam maior capacidade de adesão *in vitro*, portanto, sugerem que essas células também podem participar do processo de vaso-oclusão da doença (35,36).

Primeiramente nós avaliamos o recrutamento dos leucócitos ao endotélio vascular em modelo de inflamação alérgica induzida por quimiocina em animais controle e SS, através da técnica de microscopia intravital que é amplamente utilizada para estudar a microvasculatura e a interação das células do sangue com a parede vascular(15). Foi observado um aumento significativo do rolamento e a adesão dos leucócitos nos animais sensibilizados com OVA e desafiados com eotaxina nos grupos controles e SS comparado com o grupo dos animais não sensibilizados. Nossos resultados mostraram que esse aumento é significativamente maior nos animais SS quando comparado com os animais controle, sugerindo uma maior resposta inflamatória no modelo utilizado.Além disso, o número de leucócitos extravasadas também é maior nos animais SS nas etapas iniciais do processo de vaso-oclusão nesse modelo de inflamação. Esses dados estão de acordo com

estudos que demonstraram em modelos de inflamação induzida por TNF- α , que os leucócitos de camundongos SS apresentam maior aderência e extravasamento ao endotélio vascular em comparação com animais controle (15,67–71).

Utilizando a técnica de microscopia intravital convencional só podemos avaliar o processo de migração dos leucócitos em geral, não sendo possível caracterizar quais tipos de leucócitos estariam presentes na microvasculatura. O modelo de inflamação utilizado mimetiza uma resposta alérgica, uma vez que, os animais foram previamente sensibilizados com OVA e posteriormente desafiados com eotaxina, esse modelo resulta em um aumento do recrutamento de eosinófilos. Diante do exposto, realizamos os experimentos de microscopia intravital confocal, para determinamos se dentre os leucócitos, os eosinófilos participavam dessa etapa inicial do processo de vaso-oclusão nos animais falciformes. Os dados mostram que nos animais falciformes o número de eosinófilos em rolamento e aderidos é significativamente maior que nos animais controle. Esse resultado foi semelhante ao encontrado quando analisamos somente os leucócitos totais. Por outro lado, quando avaliamos o número de eosinófilos extravasados não encontramos diferenças significativas em relação aos animais controle, sugerindo que outro tipo de leucócito estaria migrando para espaço extravascular.

O processo inflamatório tem um papel central na fisiopatologia da anemia falciforme, portanto a inibição da adesão dos leucócitos ao endotélio vascular representa uma abordagem importante para minimizar o processo de vaso-oclusão na anemia falciforme. Muitas abordagens terapêuticas atualmente tentam inibir aspectos específicos da inflamação e é possível que, no futuro, tenhamos drogas anti-inflamatórias sendo usadas em conjunto com, ou no lugar de, hidroxiureia nos pacientes com anemia falciforme para os quais transplantes de células-tronco hematopoiéticas e terapias genéticas em evolução não são uma opção viável(72).

A via da Rho-quinase parece ter um papel importante nos mecanismos moleculares da quimiotaxia, adesão e migração de várias células inflamatórias (37,38). Estas proteínas também são necessárias para adesão dos leucócitos ao endotélio, para o agrupamento de ICAM-1 e VCAM-1, e a formação de estruturas de

“encaixe” em volta do leucócito aderido (47,48). As proteínas da via Rho A/ROCK estão envolvidas na ativação do NF- κ B, sugerindo um papel importante desta via em processos inflamatórios (48,49).

Em 2010, autores demonstraram que a via das RhoGTPases pode estar alterada na anemia falciforme. As alterações na via RhoA/ROCK estão relacionadas com a fisiopatologia do priapismo em camundongos transgênicos para anemia falciforme. Em pacientes com anemia falciforme as alterações na função da PKC e Rac GTPase nas hemácias falciformes podem afetar a mecânica da membrana, agravando a rigidez e a fragilidade das células falciformes, ao mesmo tempo em que pode aumentar a produção de ROS, esses processos contribuem tanto para vaso-oclusão como para a hemólise (60,61).

Estudos das ROCK e seus inibidores, em diversas vias de sinalização, ganharam consideráveis interesses, uma vez que, mostraram o envolvimento desta enzima, efetora de Rho GTPases, na função vascular e inflamação (62,73), além disso algumas das funções dessas proteínas como organização do citoesqueleto de actina, migração e adesão celular, a formação de espécies reativas de oxigênio, e apoptose (53,54), podem ser alteradas na presença de inibidores, como inibidores mais conhecidos de Rho GTPases temos, o Fasudil, Y-27632 e o NSC23766. (41,55–58).

A participação dessa via no processo de rolamento, adesão e extravasamento leucócito-endotélio *in vivo* e consequentemente no processo de vaso-oclusão na anemia falciforme ainda não havia sido investigada. Nesse estudo, o tratamento com o inibidor de ROCK, Fasudil, 1 h antes do desafio com eotaxina foi capaz de reduzir a adesão e o extravasamento dos leucócitos ao endotélio vascular nos animais falciformes (SS), sem alterar o rolamento dessas células. Resultados semelhantes ao nosso foram observados, por microscopia intravital de animais após a indução de inflamação por LPS quando tratados com Fasudil, houve uma redução significativa do rolamento e adesão dos leucócitos na parede vascular (74). Além disso, em modelo de isquemia e reperfusão nos animais tratados com Fasudil foi observado uma redução da interação dos leucócitos-endotélio analisados por microscopia intravital de vênulas peri-intestinal, além de reduzir a atividade da Rho

GTPase, também foi observado um aumento da produção de eNOS o que leva a redução de hipóxia e produção de citocinas pró-inflamatórias (75).

Nós também avaliamos o efeito do pré-tratamento com o inibidor específico de ROCK, Fasudil nas interações dos eosinófilos-endotélio nos animais sensibilizados com OVA e desafiados com eotaxina e através da microscopia intravital confocal. Foi observado uma diminuição significativa no rolamento e na adesão dos eosinófilos ao endotélio vascular, nos animais do grupo falciforme (SS) sensibilizados com OVA e tratados com o Fasudil quando comparado com os animais não tratados. É importante ressaltar que não observamos essa redução da interação dos eosinófilos-endotélio no grupo controle. Dados anteriores do nosso grupo mostraram que a adesão doseosinófilos de pacientes com anemia falciforme à HUVEC estimulada com TNF- α é maior quando comparado à adesão dos eosinófilos á HUVEC de indivíduoscontrole, em condições de fluxo e estática. Essa resposta foi reduzida porinibidores de ROCK. Além disso, os inibidores de ROCK foram capazes de minimizar a inflamação pulmonar induzida pela OVA em camundongos quimerafalciformes(36).

Dados da literaturamostram que a inibição da Rho GTPases leva ao aumento dos níveis e da atividade da proteína eNOS. Os trabalhos sugerem que a preservação de eNOS pela inibição de Rho GTPases pode bloquear a ligação precoce de leucócitos ao endotélio, diminuindo assim a produção local de citocinas pró-inflamatórias, o que pode reduzir a expressão de moléculas de adesão de células endoteliais(75,76). A perda de óxido nítrico (NO) derivado do endotélio leva ao aumento rápido da expressão da P-selectina na superfície da célula endotelial, que orquestra o início da interação leucocitária-endotélio durante processos inflamatórios.

Na anemia falciforme, repetidos ciclos de falcização das células vermelhas, processos de isquemia na microcirculação, auto oxidação da hemoglobina polimerizada e aumento da função da enzima eNOS, são processos que contribuem para a produção de ROS na doença, auxiliando no ciclo inflamatório (77–79). A hemólise intravascular na anemia falciforme pode prejudicar a biodisponibilidade do NO e levar ao estresse oxidativo, alterando o equilíbrio redox e ampliando processos fisiológicos que governam o fluxo sanguíneo, hemostasia,

inflamação e angiogênese (80). Acredita-se que a redução na biodisponibilidade do NO induzido por isquemia é provavelmente responsável pelo aumento da expressão das moléculas de adesão celular no endotélio microvascular e isso favorece agregação celular, a formação de uma barreira física e pôr fim a vaso-oclusão (80).

A migração dos eosinófilos envolve a interação de três componentes: citocinas que aumentam a expressão de quimiocinas, quimiocinas que ativam eosinófilos e moléculas de adesão e outras moléculas, como leucotrienos e prostaglandinas(81). Em condições inflamatórias, algumas citocinas estão envolvidas no tráfego dos eosinófilos, principalmente as produzidas pela Th2: IL-4, IL-5, e IL-13 (82,83). Dentre as quimiocinas responsáveis pelo recrutamento dos eosinófilos para os sítios inflamatórios podemos citar: RANTES, eotaxinas e a proteína quimiotática do monócito (MCP)(84–87). Portanto, é possível que o Fasudil também reduza os níveis de mediadores inflamatórios que estão diretamente envolvidos no processo de migração dos leucócitos/eosinófilos. Dados anteriores do nosso laboratório dão suporte a essa hipótese, o tratamento com Fasudil foi capaz de diminuir os níveis das citocinas pró-inflamatórias, IL-4, IL-5, IL-6 e IL-13 e quimiocinas RANTES, eotaxina e MCP-1 em modelo experimental de asma em camundongos SS e consequentemente reduzindo influxo de leucócitos, principalmente dos eosinófilos, para o tecido pulmonar(63).

É importante ressaltar que o Fasudil é o único inibidor de ROCK utilizadoclinicamente, esse medicamento é utilizado desde de 2005 no Japão para otratamento de vaso espasmo em decorrência de hemorragia subaracnóidea(62,75). Atualmente encontra-se em diversos clinical trials nosEstados Unidos para tratamento de esclerose amiotrófica lateral, síndrome deRaynaud's e aterosclerose de carótida(ClinicalTrials.gov NCT01935518, NCT00498615 e NCT00670202). Além disso,tem sido proposto que esse medicamento reduz os sintomas da asma(88,89).

Nossos dados *in vivo* indicam que os eosinófilos que são aderentes à parede vascular podem contribuir diretamente para a vaso-oclusão na anemia falciforme.O tratamento com o inibidor de ROCK, Fasudil, atenua a interação do eosinófilo ao endotélio vascular, e essa inibição poderia prevenir o processo de vaso-oclusão. Esses resultados dão suporte a hipótese de que os inibidores da via

da Rho GTPase podem representar uma nova alternativa terapêutica para o tratamento da anemia falciforme.

7. CONCLUSÃO

Nossos dados in vivo indicam que os leucócitos e eosinófilos que são aderentes à parede vascular podem contribuir diretamente para a vaso-occlusão na anemia falciforme.

O tratamento com o inibidor de ROCK, Fasudil, atenua a interação do leucócito/ eosinófilo ao endotélio vascular, e essa inibição poderia prevenir o processo de vaso-occlusão.

Tomando em conjunto, podemos concluir que o Fasudil inibe a adesão dos leucócitos e dos eosinófilos ao endotélio vascular e conseqüentemente o processo de vaso-occlusão na anemia falciforme. Nossos resultados fornecem evidências que inibidores da via Rho/ROCK podem representar uma nova alternativa terapêutica para o tratamento das manifestações clínicas da anemia falciforme.

8. REFERÊNCIAS

1. Herrick JB. Peculiar elongated and sickle shaped red blood corpuscles in a case of severe anemia. Arch Intern Med. 1910;6(5):517–21.
2. Pauling L, Itano H, Singer S, Wells K. Sickle cell anaemia, a molecular disease. Science . 1949;110(2865):543–8.
3. Ingram VM. Abnormal human haemoglobins. I. The comparison of normal human and sickle-cell haemoglobins by “fingerprinting.” BBA - Biochim Biophys Acta. 1958;28(C):539–45.
4. Shiu YT, Udden MM, McIntire L V. Perfusion with sickle erythrocytes up-regulates ICAM-1 and VCAM-1 gene expression in cultured human endothelial cells. Blood. 2000;95(10):3232–41.
5. M H Steinberg, B G Forget, D R Higgs RLN. Disorders of Hemoglobin: Genetics, Pathophysiology, and Clinical Management. J R Soc Med. 2001;94(11):602–3.
6. Serjeant GR. Sickle-cell disease. Lancet. 1997;350(9079):725–30.
7. Steinberg MH. Management of sickle cell disease. N Engl J Med. 1999;340:1021–30.
8. Nahavandi M, Wyche MQ, Perlin E, Tavakkoli F, Castro O. Nitric Oxide Metabolites in Sickle Cell Anemia Patients after Oral Administration of Hydroxyurea; Hemoglobinopathy. Hematol. 2000;5(4):335–9.
9. Frenette PS, Atweh GF. Sickle cell disease: Old discoveries, new concepts,

- and future promise. *J Clin Invest*. 2007;117(4):850–8.
10. Labie D, Elion J. Molecular and cellular pathophysiology of sickle cell anemia. *Pathol Biol (Paris)*. 1999;47(1):7–12.
 11. Conran N, Franco-Penteado CF, Costa FF. Newer aspects of the pathophysiology of sickle cell disease vaso-occlusion. *Hemoglobin*. 2009;33(1):1–16.
 12. Trudel M, de Paepe ME, Chrétien N, Saadane N, Jacmain J, Sorette M, et al. Sickle cell disease of transgenic SAD mice. *Blood*. 1994;84(9):3189–97.
 13. Pászty C, Brion CM, Mancini E, Witkowska HE, Stevens ME, Mohandas N, et al. Transgenic knockout mice with exclusively human sickle hemoglobin and sickle cell disease. *Science* (80-). 1997;278(5339):876–8.
 14. Frenette PS. Sickle cell vaso-occlusion: Multistep and multicellular paradigm. *Curr Opin Hematol*. 2002;9(2):101–6.
 15. Turhan A, Weiss LA, Mohandas N, Collier BS, Frenette PS. Primary role for adherent leukocytes in sickle cell vascular occlusion: a new paradigm. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(5):3047–51.
 16. Costa FF, Conran N. Sickle cell anemia: From basic science to clinical practice. *Sickle Cell Anemia: From Basic Science to Clinical Practice*. 2016. 75-90 p.
 17. Chiang EY, Frenette PS. Sickle cell vaso-occlusion. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2005;19(5):771–84.
 18. Assis A, Conran N, Canalli AA, Lorand-Metze I, Saad STO, Costa FF. Effect of cytokines and chemokines on sickle neutrophil adhesion to fibronectin. *Acta Haematol*. 2005;113(2):130–6.
 19. Canalli AA, Franco-Penteado CF, Traina F, Saad STO, Costa FF, Conran N. Role for cAMP-protein kinase a signalling in augmented neutrophil adhesion and chemotaxis in sickle cell disease. *Eur J Haematol*. 2007;79(4):330–7.
 20. Barthel SR, Johansson MW, McNamee DM, Mosher DF. Roles of integrin activation in eosinophil function and the eosinophilic inflammation of asthma. *J*

- Leukoc Biol. 2007;83(1):1–12.
21. Barnes PJ, Holgate ST, Laitinen LA, Pauwels R. Asthma mechanisms, determinants of severity and treatment: The role of nedocromil sodium report of a workshop held in Whistler, British Columbia, Canada, 18-19 May 1995. In: *Clinical and Experimental Allergy*. 1995. p. 771–87.
 22. Platt OS, Brambilla DJ, Rosse WF, Milner PF, Castro O, Steinberg MH, et al. Mortality in sickle cell disease. Life expectancy and risk factors for early death. *N Engl J Med*. 1994;330(23):1639–44.
 23. Castro O, Brambilla DJ, Thorington B, Reindorf CA, Scott RB, Gillette P, et al. The acute chest syndrome in sickle cell disease: incidence and risk factors. The Cooperative Study of Sickle Cell Disease. *Blood*. 1994;84(2):643–9.
 24. Boyd JH, Macklin EA, Strunk RC, DeBaun MR. Asthma is associated with increased mortality in individuals with sickle cell anemia. *Haematologica*. 2007;92(8):1115–8.
 25. Maria-Cristina Seminario and Gerald J Gleich. The role of eosinophils in the pathogenesis of asthma. *Curr Opin Immunol*. 1994;6(1):860–4.
 26. Wardlaw AJ, Walsh GM, Symon FA. Mechanisms of eosinophil and basophil migration. *Allergy*. 1994;49:797–807.
 27. Wardlaw AJ, Brightling C, Green R, Woltmann G, Pavord I. Eosinophils in asthma and other allergic diseases. *Br Med Bull*. 2000;56(4):985–1003.
 28. Georas SN, Liu MC, Newman W, Beall LD, Stealey BA, Bochner BS. Altered adhesion molecule expression and endothelial cell activation accompany the recruitment of human granulocytes to the lung after segmental antigen challenge. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1992;7(3):261–9.
 29. Sriramaraio P, von Andrian UH, Butcher EC, Bourdon MA, Broide DH. L-selectin and very late antigen-4 integrin promote eosinophil rolling at physiological shear rates in vivo. *J Immunol*. 1994;153(9):4238–46.
 30. Berg EL, McEvoy LM, Berlin C, Bargatze RF, Butcher EC. L-selectin-mediated lymphocyte rolling on MAdCAM-1. *Nature*. 1993;366(6456):695–8.

31. Symon F a, Lawrence MB, Williamson ML, Walsh GM, Watson SR, Wardlaw a J. Functional and structural characterization of the eosinophil P-selectin ligand. *J Immunol.* 1996;157(4):1711–9.
32. Hogan SP, Rothenberg ME, Forbes E, Smart VE, Matthaei KI, Foster PS. Chemokines in eosinophil-associated gastrointestinal disorders. *Curr Allergy Asthma Rep.* 2004;4(1):74–82.
33. PRETOLANI M, VARGAFTIG BB. Cytokines-Eosinophil Interactions in Experimental Allergy. *Ann N Y Acad Sci.* 1994;725(1):247–58.
34. Gonzalo JA, Lloyd CM, Kremer L, Finger E, Martinez-A C, Siegelman MH, et al. Eosinophil recruitment to the lung in a murine model of allergic inflammation. The role of T cells, chemokines, and adhesion receptors. *J Clin Invest.* 1996;98(10):2332–45.
35. Canalli AA, Conran N, Fattori A, Saad STO, Costa FF. Increased adhesive properties of eosinophils in sickle cell disease. *Exp Hematol.* 2004;32(8):728–34.
36. Pallis FR, Conran N, Fertrin KY, Olalla Saad ST, Costa FF, Franco-Penteado CF. Hydroxycarbamide reduces eosinophil adhesion and degranulation in sickle cell anaemia patients. *Br J Haematol.* 2014;164(2):286–285.
37. Kaibuchi K, Kuroda S, Amano M. Regulation of the Cytoskeleton and Cell Adhesion by the Rho Family GTPases in Mammalian Cells. *Annu Rev Biochem.* 1999;68(1):459–86.
38. Taki F, Kume H, Kobayashi T, Ohta H, Aratake H, Shimokata K. Effects of Rho-kinase inactivation on eosinophilia and hyper-reactivity in murine airways by allergen challenges. *Clin Exp Allergy.* 2007;37(4):599–607.
39. Boureux A, Vignal E, Faure S, Fort P. Evolution of the Rho family of Ras-like GTPases in eukaryotes. *Mol Biol Evol.* 2007;24(1):203–16.
40. Lawson CD, Ridley AJ. Rho GTPase signaling complexes in cell migration and invasion. *J Cell Biol.* 2017;217(2):447.
41. Narumiya S, Thumkeo D. Rho signaling research : history , current status and

- future directions. *FEBS Lett.* 2018;592:1763–76.
42. Aspenström P. Integration of signalling pathways regulated by small GTPases and calcium. In: *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*. 2004. p. 51–8.
 43. Wojciak-Stothard B, Ridley AJ. Rho GTPases and the regulation of endothelial permeability. *Vascul Pharmacol.* 2002;39(4–5):187–99.
 44. Ridley AJ, Hall A. The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell.* 1992;70(3):389–99.
 45. Kozma R, Ahmed S, Best A, Lim L. The Ras-related protein Cdc42Hs and bradykinin promote formation of peripheral actin microspikes and filopodia in Swiss 3T3 fibroblasts. *Mol Cell Biol.* 1995;15(4):1942–52.
 46. Narumiya S, Tanji M, Ishizaki T. Rho signaling, ROCK and mDia1, in transformation, metastasis and invasion. *Cancer Metastasis Rev.* 2009;28(1–2):65–76.
 47. Ridley A. Rho family proteins: coordinating cell responses. *Trends Cell Biol.* 2001;11(12):471–7.
 48. Perona R, Montaner S, Saniger L, Sánchez-Pérez I, Bravo R, Lacal JC. Activation of the nuclear factor- κ B by Rho, CDC42, and Rac-1 proteins. *Genes Dev.* 1997;11(4):463–75.
 49. Montaner S, Perona R, Saniger L, Lacal JC. Multiple signalling pathways lead to the activation of the nuclear factor kappaB by the Rho family of GTPases. *J Biol Chem.* 1998;273(21):12779–85.
 50. Schaafsma D, Gosens R, Zaagsma J, Halayko AJ, Meurs H. Rho kinase inhibitors: A novel therapeutical intervention in asthma? *Eur J Pharmacol.* 2008;585(2–3):398–406.
 51. Chiba Y, Takada Y, Miyamoto S, Mitsui-Saito M, Karaki H, Misawa M. Augmented acetylcholine-induced, Rho-mediated Ca^{2+} sensitization of bronchial smooth muscle contraction in antigen-induced airway

- hyperresponsive rats. *Br J Pharmacol*. 1999;127(3):597–600.
52. Schaafsma D, Gosens R, Bos IST, Meurs H, Zaagsma J, Nelemans SA. Allergic sensitization enhances the contribution of Rho-kinase to airway smooth muscle contraction. *Br J Pharmacol*. 2004;143(4):477–84.
 53. Doe C, Bentley R, Behm DJ, Lafferty R, Stavenger R, Jung D, et al. Novel Rho kinase inhibitors with anti-inflammatory and vasodilatory activities. *J Pharmacol Exp Ther*. 2007;320(1):89–98.
 54. Riento K, Ridley AJ. Rocks: Multifunctional kinases in cell behaviour. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2003;4:446–56.
 55. Nagumo H, Sasaki Y, Ono Y, Okamoto H, Seto M, Takuwa Y. Rho kinase inhibitor HA-1077 prevents Rho-mediated myosin phosphatase inhibition in smooth muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2000;278(1):C57–65.
 56. Sasaki Y, Suzuki M, Hidaka H. The novel and specific Rho-kinase inhibitor (S)-(+)-2-methyl-1-[(4-methyl-5-isoquinoline)sulfonyl]-homopiperazine as a probing molecule for Rho-kinase-involved pathway. *Pharmacol Ther*. 2002;93(2–3):225–32.
 57. Uehata M, Ishizaki T, Satoh H, Ono T, Kawahara T, Morishita T, et al. Calcium sensitization of smooth muscle mediated by a Rho-associated protein kinase in hypertension. *Nature*. 1997;389(6654):990–4.
 58. Yamamoto T, Ugawa Y, Kawamura M, Yamashiro K. Modulation of microenvironment for controlling the fate of periodontal ligament cells : the role of Rho / ROCK signaling and cytoskeletal dynamics. *J Cell Commun Signal*. 2017;12(1):369–378.
 59. Segain JP, Raingeard de la Bletiere D, Sauzeau V, Bourreille A, Hilaret G, Cario-Toumaniantz C, et al. Rho kinase blockade prevents inflammation via nuclear factor kappa B inhibition: evidence in Crohn's disease and experimental colitis. *Gastroenterology*. 2003;124(5):1180–7.
 60. Bivalacqua TJ, Ross AE, Strong TD, Gebaska MA, Musicki B, Champion HC, et al. Attenuated rhoA/rho-kinase signaling in penis of transgenic sickle cell mice.

Urology. 2010;76(2):510e7-510e12.

61. George A, Pushkaran S, Li L, An X, Zheng Y, Mohandas N, et al. Altered phosphorylation of cytoskeleton proteins in sickle red blood cells: The role of protein kinase C, Rac GTPases, and reactive oxygen species. *Blood Cells, Mol Dis.* 2010;45(1):41–5.
62. Santen S, Wang Y, Laschke MW, Menger MD, Jeppsson B, Thorlacius H. Rho-kinase signalling regulates CXC chemokine formation and leukocyte recruitment in colonic ischemia-reperfusion. *Int J Colorectal Dis.* 2010;25(9):1063–70.
63. Pallis FR. Avaliação dos efeitos da inibição da via Rho/Rho-quinase na adesão de eosinófilos de pacientes com anemia falciforme e no modelo de inflamação pulmonar em camundongos com anemia falciforme. 2015.
64. Ryan TM, Ciavatta DJ, Townes TM. Knockout-transgenic mouse model of sickle cell disease. *Science* (80-). 1997;278(5339):873–6.
65. Riffo-Vasquez Y, Coates ARM, Page CP, Spina D. Mycobacterium tuberculosis chaperonin 60.1 inhibits leukocyte diapedesis in a murine model of allergic lung inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2012;42(2):245–52.
66. Turhan A, Jenab P, Bruhns P, Ravetch J V., Coller BS, Frenette PS. Intravenous immune globulin prevents venular vaso-occlusion in sickle cell mice by inhibiting leukocyte adhesion and the interactions between sickle erythrocytes and adherent leukocytes. *Blood.* 2004;103(6):2397–400.
67. Chang J, Shi PA, Chiang EY, Frenette PS. Intravenous immunoglobulins reverse acute vaso-occlusive crises in sickle cell mice through rapid inhibition of neutrophil adhesion. *Blood.* 2008;111(2):915–23.
68. Hidalgo A, Chang J, Jang JE, Peired AJ, Chiang EY, Frenette PS. Heterotypic interactions enabled by polarized neutrophil microdomains mediate thromboinflammatory injury. *Nat Med.* 2009;15(4):384–91.
69. Almeida CB, Scheiermann C, Jang JE, Prophete C, Costa FF, Conran N, et al. Hydroxyurea and a cGMP-amplifying agent have immediate benefits on acute

- vaso-occlusive events in sickle cell disease mice. *Blood*. 2012;120(14):2879–88.
70. Zhang D, Chen G, Manwani D, Mortha A, Xu C, Faith JJ, et al. Neutrophil ageing is regulated by the microbiome. *Nature*. 2015;525(7570):528–32.
 71. Zhao Y, Schwartz EA, Palmer GM, Zennadi R. MEK1/2 inhibitors reverse acute vascular occlusion in mouse models of sickle cell disease. *FASEB J*. 2016;30(3):1171–86.
 72. Conran N, Belcher JD. Inflammation in sickle cell disease. *Clin Hemorheol Microcirc*. 2018;68(2–3):263–99.
 73. Rikitake Y, Liao JK. Rho GTPases, statins, and nitric oxide. *Circ Res*. 2005;97:1232–5.
 74. Slotta JE, Braun OÖ, Menger MD, Thorlacius H. Fasudil, a Rho-kinase inhibitor, inhibits leukocyte adhesion in inflamed large blood vessels in vivo. *Inflamm Res*. 2006;55:364–367.
 75. Wang QM, Stalker TJ, Gong Y, Rikitake Y, Scalia R, Liao JK. Inhibition of Rho-kinase attenuates endothelial-leukocyte interaction during ischemia-reperfusion injury. *Vasc Med (United Kingdom)*. 2012;17(6):379–85.
 76. McGown CC, Brown NJ, Hellewell PG, Brookes ZLS. ROCK induced inflammation of the microcirculation during endotoxemia mediated by nitric oxide synthase. *Microvasc Res*. 2011;81(3):281–8.
 77. Aslan M, Freeman BA. Redox-dependent impairment of vascular function in sickle cell disease. *Free Radic Biol Med*. 2007;43(11):1469–83.
 78. Sultana C, Shen Y, Rattan V, Johnson C, Kalra VK. Interaction of sickle erythrocytes with endothelial cells in the presence of endothelial cell conditioned medium induces oxidant stress leading to transendothelial migration of monocytes. *Blood*. 1998;92:3924–35.
 79. Wood KC, Granger DN. Sickle cell disease: Role of reactive oxygen and nitrogen metabolites. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2007;34:926–32.

80. Kato GJ, Steinberg MH, Gladwin MT. Intravascular hemolysis and the pathophysiology of sickle cell disease. *J Clin Invest*. 2017;127(4):750–60.
81. Blanchard C, Rothenberg ME. Chapter 3 Biology of the Eosinophil. *Advances in Immunology*. 2009. 81-121 p.
82. Horie S, Okubo Y, Hossain M, Sato E, Nomura H, Koyama S, et al. Interleukin-13 but not interleukin-4 prolongs eosinophil survival and induces eosinophil chemotaxis. *Intern Med*. 1997;36(3):179–85.
83. Sher A, Coffman RL, Hieny S, Cheever AW. Ablation of eosinophil and IgE responses with anti-IL-5 or anti-IL-4 antibodies fails to affect immunity against *Schistosoma mansoni* in the mouse. *J Immunol*. 1990;145(11):3911–6.
84. Jose PJ, Adcock IM, Griffiths-Johnson DA, Berkman N, Wells TNC, Williams TJ, et al. Eotaxin: Cloning of an eosinophil chemoattractant cytokine and increased mRNA expression in allergen-challenged guinea-pig lungs. *Biochem Biophys Res Commun*. 1994;205(1):788–94.
85. Rankin SM, Conroy DM, Williams TJ. Eotaxin and eosinophil recruitment: Implications for human disease. *Mol Med Today*. 2000;6(1):20–7.
86. Rothenberg ME, Luster AD, Leder P. Murine eotaxin: an eosinophil chemoattractant inducible in endothelial cells and in interleukin 4-induced tumor suppression. *Proc Natl Acad Sci*. 1995;92(19):8960–4.
87. Zimmermann N, Rothenberg ME. Receptor internalization is required for eotaxin-induced responses in human eosinophils. *J Allergy Clin Immunol*. 2003;111(1):97–105.
88. Wang, Jingjing Kong, Hui, Jian Xu, Yanli Wang, Hong Wang WX. Fasudil alleviates LPS-induced lung Injury by restoring aquaporin 5 expression and inhibiting inflammation in lungs. *J Biomed Res*. 2017;0(0):1–8.
89. Zhang L, Li Q, Liu Z, Liu W, Zhao M. Protective Effects of a Rho Kinase Inhibitor on Paraquat-Induced Acute Lung Injuries in Rats. *Inflamm Res*. 2018;41(218):1–13.