



Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e
Química Medicinal
Instituto de Ciências Biomédicas
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Valdirene de Souza Muniz

**Estudo da Expressão e Funcionalidade do Receptor
Purinérgico P2Y₁₂ em Eosinófilos Humanos e em
Modelo Murino de Inflamação Eosinofílica
(*Schistosoma mansoni*)**

Rio de Janeiro

2013

Valdirene de Souza Muniz

**Estudo da Expressão e Funcionalidade do Receptor
Purinérgico P2Y₁₂ em Eosinófilos Humanos e em
Modelo Murino de Inflamação Eosinofílica
(*Schistosoma mansoni*)**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Farmacologia e Química Medicinal, do Instituto de Ciências Biomédicas, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Orientador: Josiane Sabbadini Neves

Rio de Janeiro

2013

Ficha catalográfica:

Muniz, Valdirene de Souza.

Estudo da expressão e funcionalidade do receptor purinérgico P2Y₁₂ em eosinófilos humanos e em modelo murino de inflamação eosinofílica (*Schistosoma mansoni*) / Valdirene de Souza Muniz.– Rio de Janeiro : ICB, 2013.

xiv, 76 f.: il. ; 31 cm.

Orientador: Josiane Sabbadini Neves.

Dissertação (mestrado) -- UFRJ, ICB, Programa de Pós-graduação em Farmacologia e Química Medicinal, 2013.

Referências bibliográficas: f. 73-90.

1. Eosinófilos - imunologia. 2. Inflamação - parasitologia. 3. Receptores Purinérgicos . 4. Difosfato de Adenosina - metabolismo. 5. Difosfato de Adenosina - agonistas . 6. *Schistosoma mansoni* - patogenicidade. 7. Imunofarmacologia - Tese. I. Neves, Josiane Sabbadini. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro ICB, Programa de Pós-graduação em Farmacologia e Química Medicinal. III. Título.

Estudo da Expressão e Funcionalidade do Receptor Purinérgico P2Y12 em Eosinófilos Humanos e em Modelo Murino de Inflamação Eosinofílica (*Schistosoma mansoni*)

Valdirene de Souza Muniz

Orientadora: Josiane Sabbadini Neves

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-graduação em Farmacologia e Química Medicinal, do Instituto de Ciências Biomédicas, da Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Data de aprovação: ____/____/____.

Aprovada por:

Josiane Sabbadini Neves (ICB - UFRJ)

Ana Luisa Palhares de Miranda (FF - UFRJ)

Christianne Bandeira de Melo (IBCCF – UFRJ)

Leticia de Albuquerque Maranhão Carneiro (IMPPG)

Marília Zaluar Passos de Guimarães (ICB – UFRJ)

Rio de Janeiro

Março/ 2013

A Deus por tudo que tem feito em minha vida....

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus que me deu condições físicas e psicológicas para realização desse trabalho.

A minha orientadora Josiane Sabbadini Neves pela oportunidade, por ter sido acolhida em seu laboratório, pela ótima orientação, atenção, paciência, pela confiança em mim depositada e por ter contribuído de maneira singular com este trabalho, muito obrigada por tudo!!!!

Ao meu esposo William pela paciência, atenção, cuidado, compreensão e companheirismo principalmente nos momentos difíceis e por acreditar em mim.

A minha grande amiga Nadjane que com muito carinho e atenção me ajudou durante todo esse trabalho.

Ao meu grande amigo Carlos da Rocha pela sua atenção e pela força que sempre me deu nos momentos mais difíceis.

As alunas do laboratório Cynthia e Renata Baptista pela amizade, apoio nos momentos difíceis e ajuda nos experimentos.

A professora Cláudia Benjamim por ceder o espaço físico, bem como alguns reagentes para realização de alguns experimentos.

Aos alunos Cyntia, Rafael, Paula Borges, Janaína Lima e Amanda pela amizade e ajuda nas dúvidas experimentais e, a Jana Barros e a Ariane pela colaboração das doações de sangue para os experimentos.

Ao professor Rodrigo Tinoco pela sua contribuição na elucidação das dúvidas experimentais, idéias e pela sua motivação.

Ao professor Alexandre Pyrrho por ter me recebido de forma carinhosa e hospitaleira em seu laboratório, e seus alunos Hilton e Rodrigo pela colaboração nos experimentos *in vivo* e pelas palavras de força e motivação nos momentos difíceis.

Ao Professor Paulo Melo e Marcelo Strauch pela colaboração nos experimentos *in vivo*.

A professora Marília pela cuidadosa revisão.

Aos membros da banca examinadora que aceitaram em discutir esse trabalho, o que certamente irá contribuir para o meu crescimento.

Ao Programa de Pós-graduação pela oportunidade e pelo então secretário Vinícius pela sua atenção e paciência com os alunos.

Às agências de fomentos CAPES, FAPERJ e CNPQ pelo apoio financeiro.

Resumo

Estudo da Expressão e Funcionalidade do Receptor Purinérgico P2Y₁₂ em Eosinófilos Humanos e em Modelo Murino de Inflamação Eosinofílica (*Schistosoma mansoni*)

Valdirene de Souza Muniz

Orientadora: Josiane Sabbadini Neves

Resumo da dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-graduação em Farmacologia e Química Medicinal, do Instituto de Ciências Biomédicas, da Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

A caracterização da expressão de novos alvos moleculares capazes de modular a função do eosinófilo e a secreção de seu conteúdo granular, bem como regular a inflamação eosinofílica em um modelo experimental relevante, é de grande importância, tanto para compreender as respostas inflamatórias eosinofílicas em desordens alérgicas e parasitárias, quanto para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas para o tratamento dessas patologias. Recentemente foi descrita a expressão do receptor purinérgico P2Y₁₂ (P2Y₁₂R) em eosinófilos humanos (NEVES *et al.*, 2010). No entanto, seu papel funcional neste tipo celular e o envolvimento na inflamação eosinofílica ainda são desconhecidos. Nesse estudo, investigamos a expressão e o papel funcional do P2Y₁₂R em eosinófilos humanos isolados e em modelo murino de inflamação eosinofílica (*Schistosoma mansoni*). Através de RT-PCR semi-quantitativo demonstramos a expressão do RNAm do P2Y₁₂R em eosinófilos humanos, confirmando que o P2Y₁₂R faz parte constitutivamente do eosinófilo periférico isolado de sangue humano. Além disso, confirmamos a expressão proteica do P2Y₁₂R nestas células utilizando diferentes técnicas como citometria de fluxo e microscopia de fluorescência. Em nossos achados, o ADP foi capaz de ativar eosinófilos humanos isolados levando à secreção de proteínas catiônicas, sendo a secreção de EPO claramente dependente do P2Y₁₂R. Em contrapartida, o ADP não foi capaz de interferir com a sobrevivência ou com a quimiotaxia direta *in vitro* deste tipo celular. *In vivo*, a administração de ADP na cavidade peritoneal de camundongos foi quimiotática para granulócitos e células singlec-F positivas. Utilizando um modelo murino relevante de inflamação eosinofílica (*S. mansoni*), constatamos que o bloqueio do P2Y₁₂R reduziu a área do granuloma hepático, promoveu uma redução sugestiva do infiltrado eosinofílico granulomatoso, além de inibir a deposição de colágeno e a produção de IL-13 no fígado, sem interferir com a oviposição. Além disso, constatamos um aumento da

eosinofilia sanguínea e uma diminuição da contagem de eosinófilos na medula. Nossos resultados são muito sugestivos de que o P2Y₁₂R tem um papel importante para a ativação e secreção de proteínas catiônicas pelo eosinófilo, bem como para o estabelecimento da inflamação eosinofílica, entretanto alguns experimentos ainda são necessários para um melhor delineamento dos mecanismos envolvidos.

Palavras chaves: Eosinófilos, inflamação, receptores purinérgicos, ADP, *S. mansoni*.

Abstract

Study of Expression and Functionality Purinergic P2Y₁₂ Receptor on Human Eosinophils and Eosinophilic Inflammation in Murine Model (*S. mansoni*)

Valdirene de Souza Muniz

Orientadora: Josiane Sabbadini Neves

Abstract da dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-graduação em Farmacologia e Química Medicinal, do Instituto de Ciências Biomédicas, da Universidade Federal do Rio de Janeiro-UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

The characterization of novel molecular targets capable of modulating the function of eosinophils and the secretion of their granular contents, as well as regulating the eosinophilic inflammation in a relevant experimental model, is of great importance, both for understanding the inflammatory responses involved in allergic and parasitic disorders and for the development of new therapeutic approaches for treatment of these pathologies. It was recently described the expression of the purinergic receptor P2Y₁₂ (P2Y₁₂R) on human eosinophils (NEVES *et al.*, 2010). However, its functional role in this cell type and involvement in eosinophilic inflammation are still unknown. In this work we investigated the expression and the functional roles of the P2Y₁₂R in isolated human eosinophils and in a murine model of eosinophilic inflammation (*Schistosoma mansoni*). By semi-quantitative RT-PCR we demonstrated the constitutive P2Y₁₂R mRNA expression in human peripheral blood eosinophils. In addition, we confirmed the P2Y₁₂R protein expression in these cells using different techniques such as flow cytometry and fluorescence microscopy. Functionally, we showed that ADP induced isolated human eosinophils to secrete cationic proteins, being the EPO secretion clearly dependent on the P2Y₁₂R activation. In contrast, ADP did not interfere with human eosinophil survival or promoted eosinophil direct chemotaxis. *In vivo*, mice intraperitoneal administration of ADP was chemotactic for granulocytes and for Singlec-F positive cells. In a relevant murine model of eosinophilic inflammation (*S. mansoni*) we found that the P2Y₁₂R blockage reduced the area of the hepatic granuloma, promoted a suggestive reduction of the eosinophilic granuloma infiltration, and also inhibited collagen deposition and IL-13 production in the liver. No interference with the parasite oviposition was observed. Furthermore, we found that the P2Y₁₂R blockage promoted blood eosinophilia and decreased the bone marrow eosinophil count. Taken together, our results suggest that the P2Y₁₂R has an important role in the eosinophil activation and cationic protein secretion, as well as in the establishment of the eosinophilic inflammation. However, additional experiments are needed for a better delineation of the mechanisms involved.

Keywords: Eosinophil, inflammation, purinergic receptors, ADP, *S. mansoni*.

Índice de figuras

1. Citocentrifugado de eosinófilos e neutrófilos humanos de sangue periférico	16
2. Eosinófilos e a complexidade de seus grânulos cristalóides	19
3. Nucleotídeos extracelulares como moléculas ativadoras dos eosinófilos	31
4. Expressão de RNAm para P2Y12R em eosinófilos humanos	44
5. Análise da expressão do P2Y12R em eosinófilos humanos por citometria de fluxo	45
6. Análise da expressão do P2Y12R em eosinófilos humanos através de microscopia de fluorescência	46
7. Secreção de proteína catiônica (ECP) induzida por ADP em eosinófilos humanos	47
8. Secreção de peroxidase eosinofílica (EPO) induzida por ADP em eosinófilos humanos	48
9. Secreção de peroxidase eosinofílica (EPO) por eosinófilos pré-tratados com antagonistas do P2Y12R e P2Y1R, após estimulação com ADP	48
10. Porcentagem de eosinófilos purificados viáveis em cultura por 96 h na presença de IL-5 e diferentes concentrações de ADP	50
11. Porcentagem de eosinófilos purificados viáveis em cultura por 24 h na ausência de IL-5 e diferentes concentrações de ADP	51
12. Porcentagem de eosinófilos purificados viáveis em cultura por 24h na ausência de IL-5 e tratados com DMSO e MRS 2395	52
13. O ADP não é quimiotático para eosinófilos humanos <i>in vitro</i>	53
14. A ADP não é quimiotático para eosinófilos humanos <i>in vitro</i> mesmo na presença de IL-5	54
15. O ADP induziu a migração dos eosinófilos <i>in vivo</i>	56

16. Teste da eficiência do bloqueio do P2Y12R <i>in vivo</i>	58
17. O bloqueio do P2Y12R reduziu a área do granuloma hepático num modelo de infecção por <i>S. mansoni</i>	59
18. O bloqueio do P2Y12R sugere uma redução do infiltrado eosinofílico granulomatoso	60
19. O bloqueio do P2Y12R não interfere com a oviposição	61
20. O bloqueio do P2Y12R diminui a deposição de colágeno e a produção de IL-13 hepático	62
21. O bloqueio do P2Y12R aumenta a eosinofilia sanguínea e diminui a contagem de eosinófilos na medula	63

Lista de Abreviaturas

ADP - Difosfato de adenosina

AMP - monofosfato de adenosina

ATP - trifosfato de adenosina

CCR3 - Receptor 3 de quimiotaxia

CD - integrina

CLC-P – do inglês *Charcot-Leyden Cristal Protein*

COX - Ciclooxigenase

cPLA2 - fosfolipase 2 citosólica

CXCL - quimiocina CXC ligante

C5a - Fragmento do complemento

DAMPs - do inglês *danger-associated molecular patterns*

DAPI – 4',6-diamidino-2-phenylindole

DMSO - dimetilsulfóxido

ECP - proteína catiônica eosinofílica

EDN - neurotoxina derivada do eosinófilo

EoSVs – do inglês *eosinophil sombrero vesicles*

EPO - peroxidase eosinofílica

ERK – do inglês *Extracellular-signal-related kinase*

Fab - fragmento de ligação-antígeno

FLA-P - proteína ativadora da 5-lipoxigenase

GM-CSF- fator estimulador de colônia de macrófagos-granulócitos

HES - síndrome hipereosinofílica

IDO - indoleamina 2,3-dioxigenase

IFN- γ - interferon gama

IL - interleucinas

LIR7 - receptor 7 semelhante a imunoglobulina

LO - lipoxigenase

LT - leucotrieno

MBP - proteína básica principal

MHC - Complexo principal de histocompatibilidade

NGF - fator de crescimento neural

PAF - Fator de ativação plaquetária

PMD – do inglês *Piecemeal degranulation*

ROS - espécies reativas de oxigênio

SCF - fator de células tronco

Th - Linfócito T helper

TGF- α - fator de crescimento tumoral

TNF- α - fator de necrose tumoral

TSLP - linfopoetina estromal tímica

UDP - difosfato de uridina

UTP - trifosfato de uridina

Sumário

1. INTRODUÇÃO	15
1.1 Eosinófilos	15
1.1.1 Aspectos gerais	15
1.1.2 Aspectos ultraestruturais	17
1.1.3 Mecanismos de desgranulação eosinofílica	21
1.1.4 Eosinófilos na resposta anti-helmíntica	22
1.1.4.1 Eosinófilos na resposta ao <i>Schistosoma mansoni</i>	24
1.1.5 Eosinófilos na resposta alérgica	26
1.1.6 Eosinófilos como células imunomoduladoras	27
1.2 Sinalização purinérgica e eosinófilos	29
2. OBJETIVOS	33
2.1 Objetivo geral	33
2.2 Objetivos específicos	33
3. MATERIAIS E MÉTODOS	34
3.1 Purificação de eosinófilos	34
3.2 RT-PCR	34
3.3 Citometria de fluxo	35
3.4 Microscopia	35
3.5 Tratamento e estimulação de eosinófilos	36
3.6 Quantificação de EPO (peroxidase eosinofílica) e ECP (proteína catiônica do eosinófilo)	37

3.7	Análise da apoptose de eosinófilos	37
3.8	Análise da quimiotaxia <i>in vitro</i>	38
3.9	Animais	38
3.10	Análise da migração celular <i>in vivo</i>	39
3.11	Tratamento	39
3.12	Infecção	40
3.13	Avaliação do tempo de sangramento da cauda	40
3.14	Coleta e armazenamento das amostras	41
3.15	Processamento histológico	41
3.16	Quantificação de ovos nos tecidos hepático e intestinal	42
3.17	Quantificação de hidroxiprolina	42
3.18	Quantificação de IL-13 hepática	43
3.19	Avaliação estatística	43
4.	RESULTADOS	44
4.1	Eosinófilos humanos expressam o receptor P2Y12	44
4.2	A secreção de EPO induzida por ADP em eosinófilos humanos é mediada pelo receptor P2Y12	46
4.3	O ADP e o bloqueio do P2Y12R não influenciam na apoptose de eosinófilos humanos	49
4.4	O ADP não é quimiotático para eosinófilos humanos <i>in vitro</i>	53
4.5	A administração intraperitoneal de ADP promove o recrutamento de granulócitos e aumenta o número de células singlec-F positivas na cavidade peritoneal <i>in vivo</i>	55
4.6	<i>In vivo</i> , o bloqueio do P2Y12R reduziu a área do granuloma hepático	57

num modelo de infecção por *S. mansoni* e sugere redução do infiltrado eosinofílico granulomatoso sem interferir com a oviposição

4.7 O bloqueio do P2Y₁₂R diminui a deposição de colágeno e a produção de IL-13 hepático 61

4.8 O bloqueio do P2Y₁₂R aumenta a eosinofilia sanguínea e diminui a contagem de eosinófilos na medula 62

5. DISCUSSÃO 64

6. CONCLUSÃO 72

7. REFERÊNCIAS 73

INTRODUÇÃO

1.1 Eosinófilos

1.1.1 Aspectos gerais

Eosinófilos são leucócitos granulócitos implicados na patogênese de numerosos processos inflamatórios incluindo infecções (helmínticas, bacterianas e virais), doenças alérgicas e até mesmo câncer (HOGAN *et al.*, 2008).

Os eosinófilos são produzidos e diferenciados na medula óssea a partir de progenitores mielóides CD34⁺. O processo de diferenciação leva em torno de 8 dias e é regulado por fatores de transcrição da família de proteínas de ligação GATA (GATA-1e GATA-2), CCAAT (C/EBP α and C/EBP ϵ) e PU.1 (ROSENBERG *et al.*, 2012). Esses fatores de transcrição quando estimulados por interleucinas (ILs) como IL-5, IL-3 e o fator estimulador de colônia macrófago-granulócitos (GM-CSF), desencadeiam o processo de diferenciação eosinofílica (HIRASAWA *et al.*, 2002). A IL-5 possui um papel central em todos os aspectos de desenvolvimento, ativação e sobrevivência dos eosinófilos (ROSENBERG *et al.*, 2012). Desta forma, outras citocinas não diretamente relacionadas com a eosinopose, como por exemplo as derivadas de células epiteliais como linfopoetina estromal tímica (TSLP), IL-25 e IL-33 podem promover eosinofilia por induzir a produção de IL-5 (WONG *et al.*, 2010; CORRIGAN *et al.*, 2011; CHERRY *et al.*, 2008).

Uma vez liberados da medula óssea, os eosinófilos circulam no sangue periférico por aproximadamente 18 h e finalmente migram para os tecidos específicos, predominantemente timo e trato gastrointestinal, onde residem sob condições homeostáticas (ROSENBERG *et al.*, 2012). Em resposta a estímulos inflamatórios, os eosinófilos migram para o sangue e subsequentemente acumulam-se nos tecidos periféricos, tendo sua sobrevida prolongada (ROSENBERG *et al.*, 2012). Relativamente poucos eosinófilos maduros são encontrados no sangue periférico de seres humanos saudáveis (pelo menos, 400 por mm³), mas estas células podem ser facilmente distinguidas dos neutrófilos (os quais são mais prevalentes) (Fig.1), em virtude de seu núcleo bilobado e a presença de grânulos específicos que apresentam-se avermelhados/rosa após coloração com eosina (ROSENBERG *et al.*, 2012).

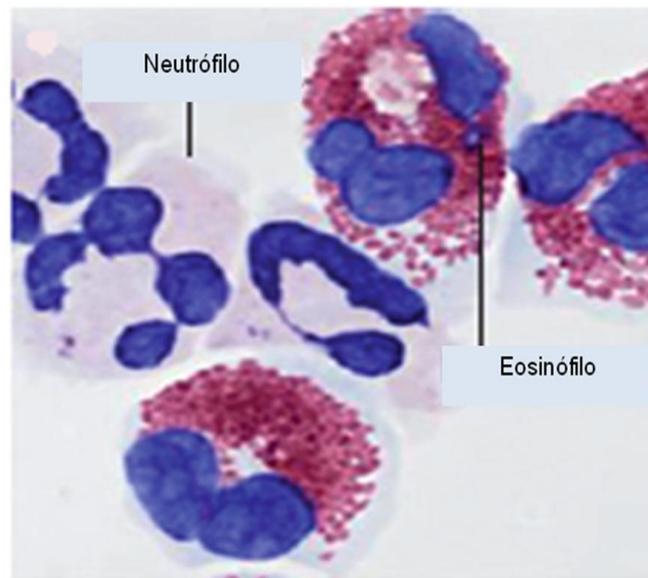


Figura 1: Citocentrifugado de eosinófilos e neutrófilos humanos de sangue periférico após coloração com eosina. Os eosinófilos exibem núcleo bilobado característico e grande grânulos secretórios citoplasmáticos corados em vermelho/rosa. Os neutrófilos exibem núcleo multilobado e sem grandes grânulos (Retirado de ROSENBERG *et al.*, 2012).

Os eosinófilos são leucócitos classicamente reconhecidos por sua função efetora citotóxica terminal na resposta do hospedeiro em infecções helmínticas e em doenças alérgicas. Estas células são rapidamente recrutadas para os sítios infectados por helmintos ou sítios de inflamação alérgica, onde através da liberação de suas proteínas catiônicas, citocinas e mediadores lipídicos, exercem funções efetoras, como potencialização da inflamação, alteração das funções teciduais e, até mesmo lesão tecidual. Entretanto, estudos mais recentes sugerem um quadro muito mais complexo, revelando um papel adicional imunomodulador para os eosinófilos fazendo deste tipo celular uma “ponte” entre a imunidade inata e adaptativa (SHAMRI, *et al.*, 2011), o que será mais bem descrito adiante. Além das respostas alérgicas e anti-helmínticas, os eosinófilos parecem estar envolvidos na patogênese de outros processos como em algumas infecções bacterianas, fúngicas e virais, respostas contra tumores e cicatrização (SVENSSON *et al.*, 2005; INOUE *et al.*, 2005; PHIPPS *et al.*, 2007; CORNIER *et al.*, 2006; LEITCH *et al.*, 2009). Muitas destas funções surgem da capacidade dos eosinófilos de estocar um arsenal de

citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento pré-formados disponíveis para liberação imediata e seletiva dependendo do microambiente (SHAMRI *et al.*, 2011).

1.1.2 Aspectos ultraestruturais

Eosinófilos são leucócitos polimorfonucleares que quando atingem seu grau máximo de ativação apresentam aproximadamente de 8 a 12 μm de diâmetro (SOKOL *et al.*, 1987). No seu citoplasma, além das organelas comuns a outros tipos celulares como complexo de golgi, mitocôndrias, entre outros, são encontrados grânulos (primário e secundário), vesículas secretórias e corpúsculos lipídicos (DVORAK & WELLER, 2000).

Grânulos: Duas populações de grânulos podem ser identificadas no citoplasma dos eosinófilos sendo denominados grânulos primários e secundários. Os grânulos primários são pequenos e esféricos e, estruturalmente, são privados de inclusões cristalóides, representando cerca de 5% da subpopulação total dos grânulos citoplasmáticos eosinofílicos (DVORAK *et al.*, 1988). São formados durante a fase promielocítica do desenvolvimento dos eosinófilos e possuem basicamente a proteína CLC-P (do inglês *Charcot-Leyden Cristal Protein*) (HOGAN *et al.*, 2008). Os grânulos secundários (também conhecidos como cristalóides, específicos ou secretórios), são os mais abundantes no citoplasma e mais bem caracterizados. São chamados cristalóides porque possuem um núcleo eletrondenso contendo um cristal de proteínas compactadas circundado por uma matriz eletrólúcida (HOGAN *et al.*, 2008). Seu conteúdo é composto por diferentes proteínas catiônicas pré-formadas, tais como EPO (peroxidase eosinofílica do inglês *eosinophil peroxidase*), MBP (proteína básica principal do inglês *major basic protein*) e ribonucleases como ECP (proteína catiônica eosinofílica do inglês *eosinophil cationic protein*) e EDN (neurotoxina derivada do eosinófilo do inglês *eosinophil derived neurotoxin*), além de uma variedade de citocinas e fatores de crescimento. As proteínas catiônicas foram durante muito tempo, consideradas responsáveis pelo papel clássico dos eosinófilos na citotoxicidade a parasitas e aos tecidos adjacentes a sítios de inflamação alérgica (ACKERMAN *et al.*, 1985). Entretanto, atualmente, estudos demonstram que essas proteínas também são capazes de modular a função de outras células do sistema imune. Por exemplo, alguns trabalhos mostram que a EDN é capaz de recrutar e

ativar células dendríticas, revelando um cenário um pouco mais complexo do que se imaginava anteriormente (YANG *et al.*, 2003; 2008).

Além disso, diferentes estudos de subfracionamento celular e citometria de fluxo revelaram que esses grânulos cristalóides são ricos em uma variedade de citocinas tanto T-helper 2 (Th2), quanto T-helper 1 (Th1), quimiocinas, enzimas e fatores de crescimento pré-formados, incluindo (IL-2,-3,-4,-5,-6,-10,-12 e -13, interferon (IFN)- γ , fator de necrose tumoral (TNF)- α , fator de crescimento neural (NGF), GM-CSF, fator de células tronco (SCF), (fator de crescimento tumoral (TGF)- α , eotaxina (CCL11), RANTES (CCL5), oncogene- α relacionado ao crescimento e CXCL5 (BLANCHARD *et al.*, 2009; KITA *et al.*, 2011; SPENCER *et al.*, 2006, 2009). Como ilustrado na Fig.2, além de conter essa variedade de proteínas pré-formadas no seu interior, estudos utilizando técnicas de microscopia eletrônica revelaram que os grânulos cristalóides do eosinófilo apresentam estruturas membranares intragranulares que exibem pontos de continuidade com a membrana que circunda o grânulo (MELO *et al.*, 2005). Especula-se que essas estruturas membranares intragranulares teriam um papel na mobilização seletiva, segregação e compartimentalização da variedade de proteínas pré-formadas dentro do grânulo, o que facilitaria sua secreção específica frente a um estímulo, entretanto evidências que provem essa hipótese ainda são necessárias. Entretanto, o que de fato foi demonstrado, é que a ativação do eosinófilo e a secreção seletiva e diferenciada de suas citocinas estocadas estão na dependência do rearranjo dessas membranas intragranulares (MELO *et al.*, 2005, 2010). Outros estudos ultraestruturais, também sugerem que esses grânulos eosinofílicos podem ser sítios de localização de RNA e possivelmente DNA indicando que potencialmente pode ocorrer síntese de proteínas dentro dessas estruturas (BEHZARD *et al.*, 2010).

Adicionalmente, trabalhos publicados anteriormente pelo nosso grupo descrevem que esses grânulos cristalóides são ricos sítios de receptores tanto para citocinas, como para quimiocinas e mediadores lipídicos (Fig. 2) (NEVES *et al.*, 2008, 2009, 2010; MUNIZ *et al.*, 2012). Esses estudos demonstraram que os grânulos eosinofílicos isolados de humanos podem exercer funções extracelulares, atuando como organelas independentes, após estimulação com ligantes incluindo quimiocinas e leucotrienos cisteínicos (cysLTs) (NEVES *et al.*, 2008; NEVES *et al.*, 2010). Considerando o papel para esses receptores expressos na membrana do

grânulo intracelular com domínios de ligação externos à membrana, esses achados não somente indicam a função extracelular desses grânulos, mas também sugerem que receptores expressos na membrana dos grânulos podem potencialmente servir como mediadores intrácrinos de secreção do conteúdo granular derivados dos eosinófilos (MUNIZ *et al.*, 2012).

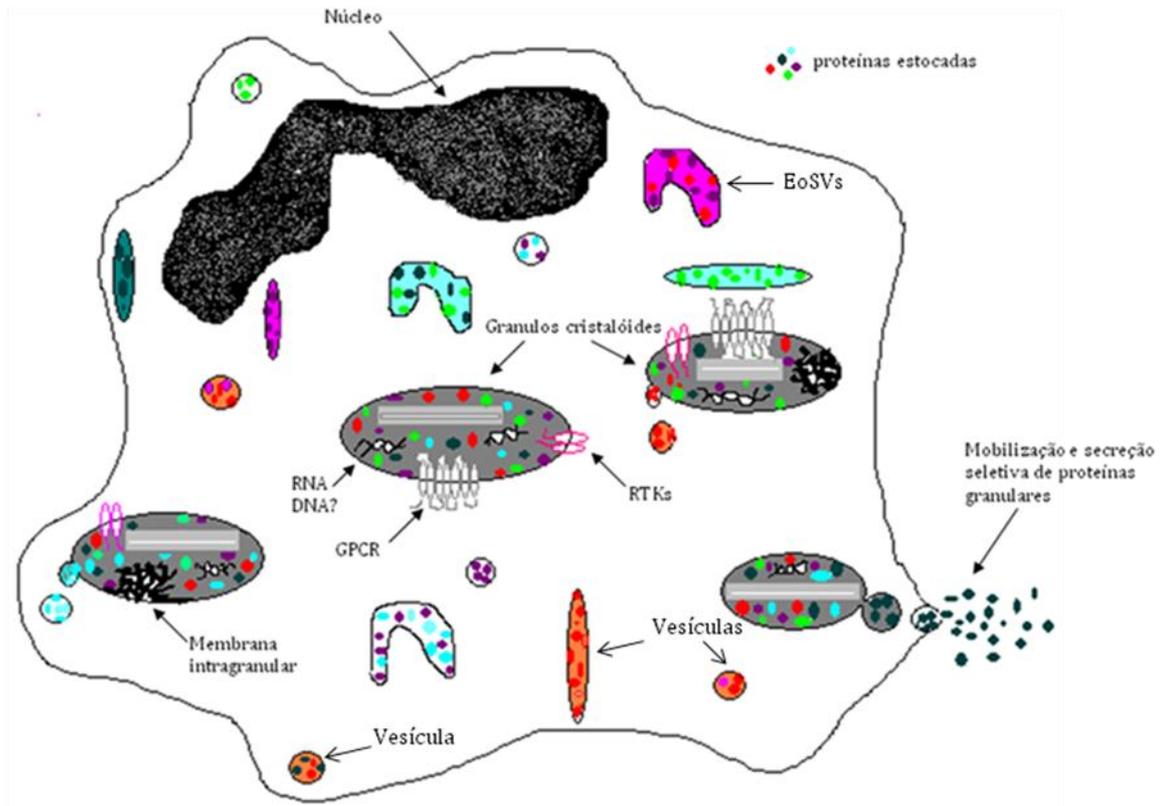


Figura 2: Eosinófilos e a complexidade de seus grânulos cristalóides. Grânulos cristalóides eosinofílicos estocam uma grande variedade de proteínas pré-formadas em seu interior e expressam em sua membrana, receptores topologicamente orientados com domínios de ligação externos à membrana do grânulo. Podem ser sítio de localização de RNA e possivelmente DNA. Possuem membranas intragranulares que podem estar envolvidas na segregação de proteínas estocadas nos grânulos e na sua secreção seletiva. GPCR: Receptores acoplados a proteína G; RTKs: Receptores tirosina cinase; EoSVs: do inglês *eosinophil sombrero vesicles* (Adaptado de MUNIZ *et al.*, 2012).

Vesículas secretórias: Atualmente, sabe-se que nos eosinófilos as vesículas representam um importante mecanismo de transporte do conteúdo proteico granular citoplasmático para o meio extracelular. Estudos de tomografia eletrônica demonstraram que em eosinófilos estimulados com eotaxina, a IL-4, assim como MBP foram transportadas a partir dos grânulos até a membrana plasmática por um complexo sistema vesicular envolvendo pequenas vesículas esféricas e grandes vesículas tubulares denominadas EoSVs (do inglês *eosinophil sombrero vesicles*) (MELO *et al.*, 2005, 2009; BANDEIRA-MELO, *et al.*, 2001a). Nestes mesmos trabalhos, foi demonstrado que quando eosinófilos são estimulados com eotaxina, o número de EoSV aumenta, além de serem observadas com frequência em torno e em contato com grânulos secretórios (MELO *et al.*, 2009). Além disso, estudos de tomografia eletrônica mostraram ainda que essas vesículas são formadas por brotamento a partir da membrana do grânulo (MELO *et al.*, 2005).

Corpúsculos lipídicos: São organelas citoplasmáticas que encontram-se presentes nas células em número variado. São também conhecidos como adipossomos, partículas, gotas, inclusões ou vacúolos lipídicos (MURPHY *et al.*, 2001). São estruturas ricas em lipídios apolares (TAUCHI-SATO *et al.*, 2002), sendo formados em resposta a doenças infecciosas, inflamatórias e em outros diferentes estímulos. Estímulos específicos podem induzir diferentes vias de sinalização que estimulam a biogênese de corpúsculos em eosinófilos humanos. Especificamente em eosinófilos humanos isolados, o tamanho e a quantidade de corpúsculos lipídicos encontram-se aumentados em quadros patológicos de características eosinofílicas, como por exemplo, em pacientes com síndrome hipereosinofílica (HES) (WELLER *et al.*, 1991; BOZZA *et al.*, 1998). Grande parte dos estudos descrevem que essas organelas são sítios importantes de síntese de eicosanóides em virtude de expressarem várias enzimas envolvidas na síntese dos eicosanóides como, proteína ativadora da 5-lipoxigenase (FLA-P) (SILVA *et al.*, 2009), fosfolipase 2 citosólica (cPLA2) (MOREIRA *et al.*, 2009), 5-lipoxigenase (5-LO) (BANDEIRA-MELO *et al.*, 2001b; SILVA *et al.*, 2009), ciclooxigenase (COX) (DVORAK *et al.*, 1994) e LTC₄ sintase (BOZZA *et al.*, 1997).

1.1.3 Mecanismos de desgranulação eosinofílica

Os eosinófilos podem secretar suas proteínas granulares através de três mecanismos principais, a saber:

Exocitose: Processo pelo qual ocorre a fusão da membrana dos grânulos com a membrana plasmática culminando com a liberação de todo o conteúdo granular para o meio extracelular e o desaparecimento do compartimento granular. Entretanto, não é um mecanismo frequentemente observado *in vivo*, parecendo ocorrer quando eosinófilos interagem com grandes parasitas (MELO *et al.*, 2008).

Desgranulação por piecemeal (PMD do inglês *piecemeal degranulation*): Também conhecida como transporte vesicular e corresponde ao processo pelo qual o conteúdo granular é seletivamente mobilizado dentro de vesículas tubulares e esféricas formadas a partir da membrana dos grânulos. Ao se destacarem da membrana dos grânulos, transitam pelo citoplasma e se fundem com a membrana plasmática liberando suas proteínas granulares no meio extracelular. Reconhecidamente é um dos mecanismos principais de desgranulação e secreção eosinofílica (MOQBEL *et al.*, 2006; MELO *et al.*, 2008, 2010). Um dos principais avanços na complexidade da desgranulação por piecemeal foi descrito por Spencer e colaboradores (2009), que fornece evidências de um mecanismo para explicar a liberação diferencial mediada por receptor. Os autores demonstraram que os eosinófilos humanos secretam citocinas (Th1 e Th2) de maneira dependente de estímulo. Por exemplo, eosinófilos estimulados com TNF- α foram capazes de secretar IL-6, IL-4 e interferon gama (IFN- γ), mas não IL-13, IL-10 e IL-12 (SPENCER *et al.*, 2009). Em outros trabalhos anteriormente publicados foi demonstrado que eosinófilos estimulados com IFN- γ , anticorpo para CD9 (integrina), ou anticorpo para LIR7 (receptor 7 semelhante a imunoglobulina) secretam IL-12, mas não IL-4, enquanto eosinófilos estimulados com eotaxina, RANTES e IL-16 secretam IL-4, mas não IL-12 (BANDEIRA-MELO *et al.*, 2001a, 2002; TEDLA *et al.*, 2003; GREWE *et al.*, 1998). Esses exemplos de secreção diferencial são enigmáticos porque todas essas citocinas são estocadas nos grânulos cristalóides eosinofílicos e secretadas mediante estímulo específico. Entretanto, essas citocinas podem mediar efeitos opostos, como no caso de IL-4 e IL-12 (O'GARRA *et al.*, 2000).

Citólise: Processo de perda da integridade da membrana celular que culmina com o depósito extracelular de grânulos intactos após lise da célula. Apesar de não se conhecer os mecanismos que levam ao desencadeamento deste processo, este mecanismo tem sido reconhecido como um processo comum de liberação e deposição de proteínas granulares eosinofílicas (CHENG *et al.*, 1997; ERJEFALT *et al.*, 1999). O primeiro reconhecimento de grânulos livres eosinofílicos em escarro de asmáticos foi relatado em 1880, mas estes achados eram em geral considerados artefatos, dando-se pouca importância a esses relatos. Atualmente, evidências crescentes de citólise e da presença de grânulos eosinofílicos livres localizados em tecidos associados com várias desordens eosinofílicas têm sido obtidas (ERJEFALT *et al.*, 2001; WATANABE *et al.*, 2003; ULLER *et al.*, 2005). Muito recentemente, Ueki e colaboradores (2013), demonstraram que a deposição de grânulos eosinofílicos intactos no meio extracelular, juntamente com redes de DNA, poderia estar ocorrendo por um mecanismo mais controlado e dependente de espécies reativas de oxigênio. Esses estudos ajudam a entender os mecanismos que governam o processo de extrusão de grânulos eosinofílicos intactos para o meio extracelular.

1.1.4 Eosinófilos na resposta anti-helmíntica

A marca imunológica de infecções helmínticas é a resposta do tipo Th2, a qual é caracterizada pela presença das citocinas IL-4, -5, -10, -13, além de eosinofilia sanguínea (ANTONY *et al.*, 2007).

Eosinófilos são reconhecidos por seu envolvimento com infecções helmínticas. A presença de eosinófilos em associação com parasitas mortos tem sido observada por mais de 70 anos (TALIAFERRO E SARLES 1939) e levou à hipótese de que os eosinófilos eram diretamente citotóxicos para helmintos. Numerosos estudos *in vitro* dão créditos a esta hipótese e implicam proteínas catiônicas derivadas do eosinófilo (MBP, ECP, EDN, EPO) na mediação da morte de parasitas (BUTTERWORTH *et al.* 1979; KEPHART *et al.*, 1988; HAMANN *et al.* 1990).

In vivo, o papel do eosinófilo na infecção por helmintos apresenta-se controverso. Estudos em modelos animais e utilizando diferentes métodos para bloquear o acúmulo de eosinófilos em locais de infecção parasitária demonstram

que esse tipo celular exibe um papel protetor para o hospedeiro contra infecções com os parasitas *Angiostrongylus cantonensis*, *Strongyloides stercoralis* (*S. stercoralis*), *Brugia malayi* e *Litomosoides sigmodontis* (SASAKI *et al.*, 1993; YOSHIDA *et al.*, 1996; HERBERT *et al.*, 2000; RAMALINGAM *et al.*, 2003; SIMONS *et al.*, 2005). Por exemplo, em um desses estudos, foi investigada a resposta imune inata da IL-5 frente a larvas do *S. stercoralis*. Utilizando duas linhagens distintas de camundongos, incluindo camundongos deficientes para IL-5 (IL-5^{-/-}) e transgênicos superexpressando o gene da IL-5 (TG), os autores demonstraram que a sobrevivência larval foi maior nos animais IL-5^{-/-} e menor nos TG quando comparados aos animais selvagens. Além disso, a morte da larva nos animais TG foi associada com infiltração e desgranulação eosinofílica, sugerindo que IL-5 é necessária na resposta imune para a eosinopoese e que os eosinófilos estão envolvidos na morte da larva (HERBERT *et al.*, 2000). Em outro estudo, quando as larvas de *Brugia malayi* foram administradas intraperitonealmente em camundongos selvagens e IL-5^{-/-}, os animais IL-5^{-/-} apresentaram carga parasitária maior, o que foi correlacionado com a diminuição drástica do número de eosinófilos na cavidade peritoneal (RAMALINGAM *et al.*, 2003). Simons e colaboradores (2005), utilizando dois modelos de infecção por *Brugia malayi*, demonstraram que quando o verme adulto foi injetado no peritônio de camundongos deficientes em eotaxina-1, estes apresentaram um aumento da sobrevivência do parasita associado com a redução do infiltrado eosinofílico na cavidade peritoneal quando comparados aos animais selvagens. Quando estes parasitas foram injetados intravenosamente, o clearance do parasita no sangue foi mais rápido nos animais deficientes em eotaxina-1 em comparação aos animais selvagens, o que foi associado com o aumento da eosinofilia sanguínea, sugerindo que neste modelo, os eosinófilos exibiram uma proteção para o hospedeiro dependente da atividade quimiotática da eotaxina-1 no peritônio e de maneira independente no sangue.

Indicações mais importantes de que os eosinófilos e especificamente suas proteínas granulares estariam envolvidos na morte de parasitas *in vivo* vieram de Specht e colaboradores (2006). Este estudo mostrou que camundongos deficientes tanto para EPO quanto para MBP desenvolveram carga parasitária significativamente maior do que camundongos do tipo selvagem após a infecção com *Litomosoides sigmodontis*. Além disso, nesse mesmo estudo, foi demonstrado

que esses animais apresentavam uma diminuição na produção de IL-4, sugerindo que MBP e EPO, além de efeitos citotóxicos, poderiam afetar o microambiente e modular a resposta Th2 para helmintos (SPECHT *et al.*, 2006). Em mamíferos, a ingestão de larvas do parasita *Trichinella spiralis* faz com que as mesmas passem pelo intestino delgado onde amadurecem para a vida adulta. As larvas são depositadas pelas fêmeas adultas na linfa ou no sangue e são levadas para o músculo esquelético. Gurish e colaboradores (2002) mostraram que camundongos deficientes em CCR3 (CCR3^{-/-}), um importante receptor envolvido na quimiotaxia de eosinófilos que tem por ligante quimiocinas como eotaxina e RANTES, exibiram um aumento no número de cistos no músculo esquelético, e um aumento no número de larvas encistadas, sugerindo que os eosinófilos podem estar envolvidos em limitar os cistos larvais.

Outros estudos *in vivo* levantam questionamentos sobre qual seria o real papel do eosinófilo em infecções helmínticas confrontando os achados que evidenciam o eosinófilo como uma célula importante para a morte do parasita. As infecções de duas linhagens de camundongos geneticamente modificadas para serem deficientes em eosinófilos (Δ dbIGATA e TgPHIL) exibiram uma diminuição no número de larvas encistadas de *Trichinella spiralis*, sugerindo que a presença de eosinófilos é benéfica para a sobrevivência dessas larvas (FABRE *et al.*, 2009). Entretanto, neste mesmo estudo, os autores propuseram que a presença de eosinófilos, mesmo em números muito baixos (como pode ser visto em camundongos CCR3^{-/-}), é suficiente para manter um meio de proteção larval Th2, enquanto que na ausência completa de eosinófilos, a consequente resposta Th1 é destrutiva para os cistos larvais (FABRE *et al.*, 2009).

1.1.4.1 Eosinófilos na resposta ao *Schistosoma mansoni*

A infecção crônica por *Schistosoma mansoni* (*S. mansoni*) afeta mais de 200 milhões de pessoas em todo o mundo e é endêmica em 76 países (WILSON *et al.*, 2010), sendo considerada a segunda doença parasitária mais importante considerando-se mortalidade, precedida apenas pela malária (WHO, 2009), o que gera encargos econômicos, sociais e médicos significativos para os países em que essas infecções são endêmicas. O homem (hospedeiro definitivo) é inicialmente

infectado por cercárias liberadas a partir de moluscos de água doce do gênero *Biomphalaria* sp. que rapidamente penetram a pele. Posteriormente à penetração das cercárias, as larvas tornam-se esquistossômulos. Nas veias hepáticas e mesentéricas, esquistossômulos diferencia-se em vermes adultos sexualmente dimórficos, onde o casal e os ovos produzidos migram através dos tecidos para o lúmen do intestino ou da bexiga de onde podem ser liberados para o ambiente. A patogênese do modelo animal de infecção helmíntica *S. mansoni* tem sido descrito com grande detalhe na literatura (MEEUSEN, *et al.*, 2000; PEARCE *et al.*, 2002, 2004; RAMALINGAM *et al.*, 2005). Esta infecção inclui uma fase proeminente Th2, resultando em aumento sérico de IL-5 em resposta à deposição de ovos na circulação portal na 6ª a 8ª semana após a exposição das cercárias. O aumento sérico de IL-5 resulta em proeminente eosinofilia sanguínea e medular (SWARTZ *et al.*, 2006). Mais especificamente no caso da infecção por *S. mansoni*, os dados obtidos *in vitro* e *in vivo* que tentam evidenciar o papel dos eosinófilos frente a este parasita também são controversos.

Ensaio *in vitro* mostram que os eosinófilos são capazes de reconhecer e matar esquistossômulos num mecanismo clássico de citotoxicidade dependente de anticorpos e complemento (CAPRON *et al.*, 1992; DOMBROWICZ *et al.*, 2000; KLION *et al.*, 2004). Este mecanismo de defesa do hospedeiro tem sido descrito em várias espécies, sendo necessária a aderência dos eosinófilos ao alvo. Especula-se que essa aderência é mediada pela ligação de anticorpos específicos à superfície do parasita, através de seu fragmento de ligação-antígeno (Fab) e através da ligação do fragmento Fc em seu receptor na superfície dos eosinófilos. No entanto, parece também que outras moléculas de superfície dos eosinófilos podem estar envolvidas, como por exemplo, Fc-epsilon-R11 e CCR-3 (GENTIL *et al.*, 2013).

In vivo, camundongos deficientes em eosinófilos Δ dbIGATA e TgPHIL, não apresentam alterações proeminentes na carga parasitária e na formação de granulomas durante infecção por *S. mansoni* (DAVIES *et al.*, 2005; SWARTZ *et al.*, 2006).

Vários achados utilizando metodologias para depletar IL-5 a fim de reduzir a eosinofilia sanguínea e tecidual característica da resposta Th2 também trouxeram importantes informações que podem ajudar a entender o papel do eosinófilo na

infecção por *S. mansoni*. Entre os primeiros desses estudos, Sher e colaboradores (1990) administraram um anticorpo monoclonal anti-IL-5 (TRFK-5) em camundongos infectados por *S. mansoni* e demonstraram que a neutralização desta citocina não teve impacto na carga parasitária, fibrose hepática ou na formação do granuloma. No entanto, houve uma diminuição significativa da eosinofilia tanto medular quanto sanguínea. Em outro estudo, Brunet e colaboradores (1999) estudaram esta infecção em camundongos IL-5^{-/-} e do mesmo modo concluíram que a patologia hepática e a susceptibilidade à infecção foram indistinguíveis entre a linhagem selvagem e a deficiente de IL-5. Diante dessas evidências e do questionamento sobre a importância direta do eosinófilo nesta patologia, muitos pesquisadores ainda se perguntam porque o recrutamento dos eosinófilos é uma característica marcante do granuloma hepático.

1.1.5 Eosinófilos na resposta alérgica

Assim como nas respostas anti-helmínticas, eosinófilos são bem conhecidos por sua associação com doenças alérgicas, incluindo aquelas que afetam a pele como dermatite atópica, sistema respiratório como rinosinusite e asma, e ainda sistema gastrointestinal como esofagite e gastroenterite eosinofílicas (SHAMRI *et al.*, 2011). O aumento de eosinófilos na parede e no lúmen das vias aéreas, sangue e medula óssea é característico da maioria dos fenótipos de asma e, em geral o número elevado correlaciona com a severidade da doença (HOGAN *et al.*, 2008).

Evidências obtidas a partir de modelos animais sugerem que a ativação de eosinófilos contribui diretamente para a produção de muco, broncoconstrição, disfunção e remodelamento das vias aéreas que são características da asma alérgica (ROSENBERG *et al.*, 2012). Como tal, os eosinófilos e moléculas que regulam o seu desenvolvimento e recrutamento são percebidos como alvos apropriados para ablação terapêutica, como por exemplo, a terapia utilizando anticorpo anti-IL-5 (FOSTER *et al.*, 1996; BUSSE *et al.*, 2010). Em um estudo publicado por Lee e colaboradores (2004), camundongos deficientes em eosinófilos (TgPHIL), sensibilizados e desafiados com um alérgeno apresentaram uma diminuição da produção de muco e níveis mais baixos de hiperreatividade das vias aéreas em comparação com os animais do tipo selvagem. Em outro estudo mais

recente foi sugerido um papel imunomodulatório para os eosinófilos na resposta alérgica. Utilizando camundongos deficientes em eosinófilos (Δ dbiGATA) foi mostrado que nesses animais a hiperresponsividade das vias aéreas também foi diminuída, bem como a produção de citocinas incluindo IL-4, -5, e -13 em modelo de inflamação alérgica induzida por ovalbumina em comparação aos camundongos selvagens. Isto foi causado pela diminuição do recrutamento de células T nos pulmões, uma vez que estes apresentaram expressão reduzida de quimiocinas como CCL-11, CCL-24 e MCP-3, sugerindo que os eosinófilos são participantes no desenvolvimento da resposta alérgica por modular a produção de quimiocinas e/ou citocinas nos pulmões, levando ao recrutamento de células T (WALSH *et al.*, 2008). Entretanto, em outro estudo utilizando camundongos Tg PHIL, os autores demonstraram que o aumento da hiperresponsividade das vias aéreas, bem como a secreção de muco foram similares nas linhagens selvagens e deficientes em eosinófilos, porém estes foram protegidos significativamente da deposição de colágeno e do aumento de células musculares lisas (HUMBLES *et al.*, 2004). De fato os eosinófilos são ricas fontes de TGF- β 1 e IL-13 nas vias aéreas de asmáticos, citocinas essas reconhecidamente envolvidas na fibrose e hiperplasia de células do músculo liso, respectivamente (ACEVES E BROIDE, 2008; WILLS-KARP *et al.*, 2004). Contudo estes achados controversos podem ser atribuídos às variações da linhagens dos modelos animais utilizados (WALSH *et al.*, 2008).

1.1.6 Eosinófilos como células imunomoduladoras

Eosinófilos têm sido associados com funções efetoras da resposta Th2 em doenças alérgicas e infecções parasitárias. Neste paradigma clássico linfócitos Th2, mastócitos, bem como outras células residentes em sítios infectados ou alérgicos podem secretar IL-5, eotaxina e outras citocinas, as quais irão recrutar os eosinófilos para o sítio da inflamação onde funções efetoras terminais mediadas pelas proteínas catiônicas contribuem para a morte do parasita e/ou para o dano tecidual. Entretanto, atualmente se torna cada vez mais claro que os eosinófilos estão associados não somente com a função efetora da imunidade inata, mas também na modulação da resposta adaptativa (SHAMRI *et al.*, 2011). Evidências obtidas até o momento implicam eosinófilos principalmente na iniciação e desenvolvimento da

resposta tipo Th2. Até o momento não se sabe ao certo se estas respostas variam de acordo com o modelo experimental utilizado (SHAMRI *et al.*, 2011). Eosinófilos parecem fornecer sinais imunorregulatórios muito precoces na resposta imune também atuando mais tardiamente como imunomoduladores na função de células T, numa interação dinâmica com o sistema imune adaptativo (SPENCER e WELLER, 2010). Dentre os sinais imunorregulatórios dos eosinófilos incluem-se: (a) secreção diferenciada de citocinas imunomodulatórias; (b) modulação de células dendríticas; (c) inibição do desenvolvimento da resposta Th1 através da expressão de indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO); (d) ativação de células T não diferenciadas através de apresentação direta de antígenos (SHAMRI *et al.*, 2011).

Alguns estudos demonstraram que os eosinófilos são capazes de estocar e secretar mais de 30 citocinas, incluindo citocinas Th1 (IL-12 e IFN- γ), Th2 (IL-4, -6, -13) e imunorregulatórias (IL-10 e TNF- α) (GREWE *et al.*, 1998; WOERLY *et al.*, 1999; SPENCER *et al.*, 2009). Spencer e colaboradores (2009) demonstraram que a estimulação com TNF- α e IFN- γ promoveu a secreção rápida e diferencial de IL-4, mas não de IL-12 em eosinófilos humanos. Neste mesmo trabalho foi mostrado que os eosinófilos humanos foram capazes de secretar IL-12 somente quando estimulados com IL-10. Essa multiplicidade de citocinas (Th1, Th2 e imunoregulatórias) pré-estocadas dentro dos grânulos dos eosinófilos, associado ao fato de serem secretadas diferencialmente de maneira estímulo-dependente (SPENCER *et al.*, 2009; MOQBEL E COUGHLIN, 2006) sugerem que essas células são capazes de imunomodular o microambiente em virtude desses estoques de citocinas e de estímulos específicos, o que pode representar uma perspectiva do papel do eosinófilo na inflamação e na iniciação da imunidade adaptativa (SPENCER *et al.*, 2009).

Uma vez nos sítios inflamados os eosinófilos podem ainda influenciar o recrutamento celular subsequente e o fenótipo de células dendríticas imaturas favorecendo a sua polarização para um fenótipo Th2. Além da sinalização através da secreção de citocinas polarizadoras como a IL-4, os eosinófilos podem modular a função das células dendríticas através da secreção de EDN. Nas células dendríticas, a EDN atuaria como uma alarmina, induzindo sua ativação e migração (YANG *et al.*, 2008). Em relação ao papel dos eosinófilos na manutenção da resposta de linfócitos, Odemuyiwa e colaboradores (2004) mostraram que estas

células expressam constitutivamente indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO) funcional, uma enzima responsável pelo catabolismo de triptofanos, cujo metabólito induz apoptose em células Th1 (FALLARINO *et al.*, 2002). Desta forma, quando eosinófilos produzindo quinurenina (metabólito de triptofanos) são colocados em cocultura com linhagens de células Th1 ou Th2, eles seletivamente inibem a proliferação das células Th1, mas não das Th2, sugerindo que podem promover um microambiente capaz de inibir a proliferação de células Th1, desencadeando assim um desequilíbrio entre as populações Th1 e Th2 (ODEMUYIWA *et al.*, 2004). Adicionalmente, em modelo murino, eosinófilos parecem migrar a partir dos tecidos para os linfonodos, onde co-localizam com células T (SHI *et al.*, 2000; DUEZ *et al.*, 2004). Dentro dos órgãos linfóides secundários, os eosinófilos podem instruir o desenvolvimento da resposta imune através da secreção diferenciada de mediadores e através da apresentação direta de antígeno (DUEZ *et al.*, 2004). Além disso, eosinófilos isolados do baço de camundongos transgênicos para IL-5, quando incubados com GM-CSF expressam MHC II e moléculas co-estimulatórias incluindo CD40, CD80 e CD86 (WANG *et al.*, 2007). Estudos em humanos também corroboram esses dados, reiterando o papel dos eosinófilos como células apresentadoras de antígeno (AKUTHOTA *et al.*, 2008). *In vitro*, eosinófilos isolados de escarro de asmático e do lavado broncoalveolar de pacientes com pneumonia eosinofílica também parecem expressar MHC II (HANSEL *et al.*, 1991; BENINATI *et al.*, 2003).

1.2 Sinalização purinérgica e eosinófilos

O envolvimento e liberação de nucleotídeos (ADP, UDP, ATP e UTP) frente a diversos estímulos e em diferentes condições patológicas tais como processos infecciosos, injúria e morte celular, agregação plaquetária e outros, têm sido demonstrados nos últimos anos (HANLEY *et al.*, 2004; FERRARI *et al.*, 2006; BOURS *et al.*, 2006). Entretanto, seu papel nas células do sistema imune e nas respostas inata e adaptativa só mais recentemente tem despertado interesse (KRONLAGE *et al.*, 2010; CORRIDEN E INSEL, 2010; JUNGER, 2011). Uma vez presentes extracelularmente, os nucleotídeos são conhecidos como DAMPs (do inglês *danger-associated molecular patterns*) ou alarminas por atuar como moléculas

endógenas sinalizadoras precoces de “perigo” ou lesão tecidual. Atualmente, grande atenção tem sido dada às ações imunorregulatórias autócrinas/parácrinas dos nucleotídeos, que mais do que um sinal de alarme de dano celular, estariam também funcionando como um segundo sinal amplificador em resposta a estímulos não necessariamente lesivos (CORRIDEN E INSEL, 2010). Dentre os nucleotídeos, os mais estudados são sem dúvida as moléculas de ATP e ADP. Intracelularmente o ATP é encontrado em concentrações milimolares (5-10 mM) participando de diferentes funções celulares (MYRTEK e IDZKO, 2007; TRAUTMANN, 2009), sendo conhecido predominantemente por seu papel central no metabolismo celular energético. Fisiologicamente, quando liberado no meio extracelular, o ATP atinge concentrações nanomolares e é rapidamente hidrolizado a ADP, AMP e adenosina pela ação das ectonucleotidases constitutivamente expressas nas membranas celulares. Extracelularmente o ATP parece influenciar diversos processos biológicos, tais como geração de sinais quimiotáticos e/ou ativação de diferentes células imune causando diferenciação, proliferação e migração de células inflamatória ou liberação de diversos mediadores inflamatórios (DI VIRGILIO *et al.*, 2001; FERRARI *et al.*, 2006). Por exemplo, o ATP liberado, juntamente com os outros nucleotídeos gerados extracelularmente, pode funcionar como molécula sinalizadora de migração e ativação macrofágica (KRONLAGE *et al.*, 2010).

Sob condições inflamatórias, ATP é frequentemente considerado por ser liberado passivamente seguindo stress ou morte celular. Entretanto recentemente, frente a estímulos não necessariamente relacionados a dano celular, tem sido discutida a participação autócrina/parácrina de nucleotídeos (ATP, ADP) na ativação e quimiotaxia de células inflamatórias incluindo neutrófilos e macrófagos (CHEN *et al.*, 2006; KRONLAGE *et al.*, 2010).

Os receptores responsivos a nucleotídeos são conhecidos como receptores purinérgicos e se subdividem nos grupos P1 e P2. Ambos são amplamente expressos por todo o corpo em várias células imunes e não imune. Os receptores P1 são também conhecidos como receptores de adenosina, sensíveis ao bloqueio por metilxantinas tais como a teofilina. Os receptores P2 são ativados por nucleotídeos e se subdividem nos subtipos P2X e P2Y. Os receptores P2X são do tipo ionotrópico e em geral, sensíveis ao ATP. Os receptores P2Y são do tipo metabotrópicos acoplados à proteína G e são ativados seletivamente pelos diferentes nucleotídeos.

Por exemplo, os receptores P2Y1, P2Y12 e P2Y13 ligam-se seletivamente ao ADP enquanto o ATP parece ativar preferencialmente os receptores P2Y2 e P2Y11 (CORRIDEN E INSEL, 2010). Os eosinófilos reconhecidamente expressam RNA mensageiro para P2X1, P2X4, P2X7, além dos subtipos P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6, P2Y11 e P2Y14. O primeiro relato para um efeito funcional de purinas em eosinófilos foi evidenciado a partir de experimentos mostrando que o ATP liberado das plaquetas pode ativar eosinófilos e induzir quimiotaxia (BURGERS *et al.*, 1993). Atualmente, o receptor P2Y2 tem sido sugerido como um potencial alvo terapêutico para o tratamento da asma por causa da sua implicação na quimiotaxia de células dendríticas e eosinófilos na inflamação alérgica pulmonar (MULLER *et al.*, 2010). A estimulação dos receptores P2 expressos nos eosinófilos induz múltiplas respostas celulares incluindo além da quimiotaxia, aumento de correntes transientes de cálcio intracelular, expressão de CD11b, polimerização de actina, produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), secreção de IL-8 e ECP (Fig.3) (FERRARI *et al.*, 2006).

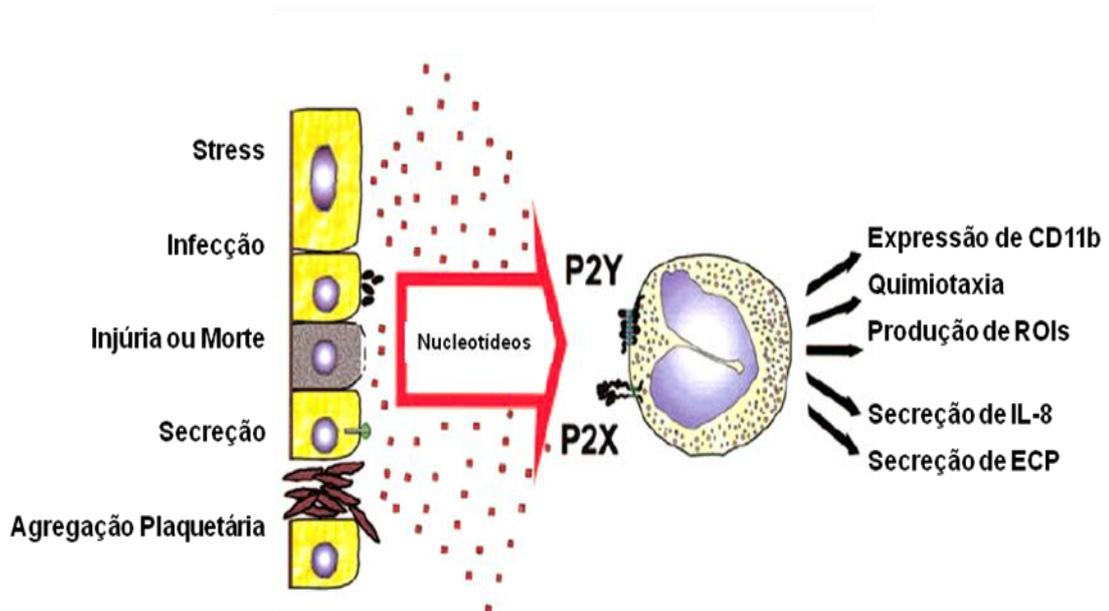


Figura 3: Nucleotídeos extracelulares como moléculas ativadoras dos eosinófilos. Mediante diferentes estímulos incluindo estresse, infecção, entre outros, os eosinófilos podem liberar nucleotídeos, os quais ativam receptores P2Y e/ou P2X disparam várias respostas celulares (Adaptado de FERRARI *et al.*, 2006).

Recentemente foi demonstrada pelo nosso grupo a caracterização da expressão do receptor P2Y12 em eosinófilos humanos isolados, no entanto seu papel funcional neste tipo celular e seu envolvimento na inflamação eosinofílica permanecem desconhecidos (NEVES *et al.*, 2010). O receptor P2Y12 é acoplado à proteína G inibitória (Gi) e tem por ligante clássico o ADP. Em plaquetas, a coexpressão dos receptores P2Y1 e P2Y12 é essencial para uma resposta normal de agregação plaquetária (TURNER *et al.*, 2001). Em mastócitos, a ativação do receptor P2Y1 leva a influxo de cálcio em resposta ao ADP e sinergiza com a ativação dos receptores P2Y12 na mediação da fosforilação da ERK e proteína cinase p38 (FENG *et al.*, 2004). Em macrófagos, os receptores P2Y12 e P2Y2 parecem estar envolvidos quimiotaxia e fagocitose via sinalização parácrina/autócrina (ISFORT *et al.*, 2011). Em estudos recentes, o receptor P2Y12 também foi sugerido como um novo receptor responsivo ao leucotrieno E₄ baseado em estudos de modelagem molecular, *in vitro* (NONAKA *et al.*, 2005) e *in vivo*, onde apresentou papel relevante na mediação da inflamação alérgica pulmonar em camundongos (PARUCHURI *et al.*, 2009).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

A caracterização da expressão de novos alvos moleculares capazes de modular a função do eosinófilo e a secreção de seu conteúdo granular, bem como regular a inflamação eosinofílica em um modelo experimental relevante, é de grande importância, tanto para compreender as respostas inflamatórias eosinofílicas em desordens alérgicas e parasitárias, quanto para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas para o tratamento dessas patologias. Desta forma, o presente trabalho tem como objetivo geral investigar a expressão e o papel funcional do receptor purinérgico P2Y12 em eosinófilos humanos isolados e em modelo murino de inflamação eosinofílica (*Schistosoma mansoni*).

2.2 Objetivos específicos

- Confirmar por diferentes metodologias a expressão do P2Y12R em eosinófilos humanos isolados;
- Caracterizar o papel funcional do P2Y12R na secreção de proteínas catiônicas pelo eosinófilo;
- Caracterizar o papel funcional do P2Y12R na sobrevida e na quimiotaxia *in vitro* de eosinófilos humanos isolados;
- Avaliar a participação do P2Y12R no recrutamento de eosinófilos *in vivo*;
- Avaliar o efeito *in vivo* da modulação do P2Y12R num quadro de inflamação eosinofílica induzida pela infecção de *Schistosoma mansoni*. Os parâmetros a serem avaliados incluem área do granuloma hepático, infiltrado eosinofílico granulomatoso hepático, carga parasitária, deposição de colágeno e secreção de IL-13 no fígado, eosinofilia sanguínea e medular.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Purificação de eosinófilos humanos

Doadores saudáveis foram selecionados, e o sangue periférico foi coletado de acordo com o protocolo aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Humanos do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro (protocolo n° 190/09). Todos os doadores preencheram e assinaram termos de consentimento informado. Foram coletados 240 mL de sangue no total utilizando seringas de 60 mL (BD Bioscience) e agulhas 19 ou 21G. Cada seringa foi preparada previamente com 10 mL de citrato de sódio 100 mM pH 7,4 e em seguida coletado 40 mL de sangue. Para sedimentação das células foram adicionados 10 mL de uma solução salina contendo Hetastarch 6% (Hospira) em cada seringa. As seringas permaneceram na posição vertical por 30 a 40 minutos em temperatura ambiente. Tubos de centrifugação de 50 mL foram preparados com 23 mL de Ficoll-Paque (GE Healthcare) e, após a sedimentação, 25 mL da fração do plasma foi transferido para parte superior do ficoll e em seguida as amostras foram centrifugadas a 1200 rpm (220 g), 25°C, 20min. O conteúdo superior foi descartado e o pellet contendo granulócitos e hemácias foi ressuspensão em solução de Hanks sem cálcio e sem magnésio (HBSS^{-/-}) (Sigma) a 4°C. A suspensão celular foi centrifugada a 1200 rpm (220 g), 4°C, 5 min. O número de granulócitos total foi estimado por contagem em câmara de Neubauer e líquido de Turk. Os granulócitos foram ressuspensos em tampão Macs (HBSS^{-/-} + 0.01% ovalbumina Sigma Grade VI) e os eosinófilos purificados por seleção imunomagnética negativa de acordo com instruções fornecidas pelo fabricante (EasySep, StemCell Technologies). O número e a viabilidade dos eosinófilos foram avaliados em azul de Tripán e a pureza em citocentrifugado após coloração com kit panótico (LaborClin). Este processo de purificação gera aproximadamente 95% de pureza.

3.2 RT- PCR

O RNA foi extraído dos eosinófilos (5×10^6 eosinófilos/amostra) utilizando-se kit RNeasy (Qiagen) segundo instruções fornecidas pelo fabricante. O RNA foi então

submetido à transcrição reversa (Invitrogen) e o RT-PCR foi realizado segundo procedimentos padrões.

A amplificação foi realizada utilizando-se o par de primers (Invitrogen) - P2Y12: 5'-CTGGGCATTCATGTTCTTACTC-3'; 5'-TGCCAGACTAGACCGAACTCT-3', seguindo os seguintes parâmetros: 94° C, 2 min; 40 x (94°C, 30 segundos; 55°C, 30 segundos; 72°C, 30 segundos); 72°C, 5 min; 4°C ∞. A revelação dos produtos da reação foi realizada após eletroforese em gel de agarose 2% e marcação com brometo de etídeo, sendo o tamanho do produto aproximadamente 117 pb.

3.3 Citometria de fluxo

Em condições não permeabilizantes, eosinófilos humanos purificados foram pré-incubados com anticorpo primário anti-P2Y12R humano (5 µg/ml - Abnova) que reconhece domínios N-terminais extracelulares durante 60 minutos, e sob condições permeabilizantes (saponina 0,1%), os eosinófilos purificados foram pré-incubados com anticorpo anti-P2Y12R (5 µg/ml-Alomone) que reconhece domínios C-terminais intracelulares por 60 minutos. Depois, os eosinófilos foram lavados e incubados com anticorpo secundário conjugado à fluorescência (FITC-Jackson Immunoresearch-1: 200) durante 15 min. A fim de confirmar a especificidade da marcação, foi incluída a condição onde o referido anticorpo anti-P2Y12R foi previamente incubado por 30 minutos com seu peptídeo bloqueador (20 µg/ml - Alomone). Anticorpos irrelevantes foram utilizados como controle negativo em todas as marcações. Após a incubação com a anticorpo secundário, todas as células foram fixadas com paraformaldeído 4% e posteriormente analisadas utilizando FACScam (BD Bioscience).

3.4 Microscopia

Os eosinófilos purificados de sangue humano foram fixados com paraformaldeído 4% e, em seguida expostos a condições permeabilizantes (saponina 0,1%) e marcados com DAPI (1: 10.000, Molecular Probes), o qual é um marcador nuclear. As células foram centrifugadas e ressuspensas em tampão de bloqueio (soro humano 5% em HBSS⁻) e em seguida pré-incubadas com anticorpo

primário anti-P2Y12R (5 µg/ml-Alomone) durante 60 min. Esses anticorpos são reativos contra porções carboxi terminais do receptor P2Y12. Após esse período de incubação, os eosinófilos foram lavados e incubados com anticorpo secundário conjugado à fluorescência (FITC-Jackson Immunoresearch-1: 200), por 15 min. Para confirmar a especificidade da marcação, o anticorpo anti-P2Y12R foi previamente incubado por 30 min com seu peptídeo bloqueador (20 µg/mL - Alomone). Anticorpos irrelevantes (IgG de coelho normal) foram utilizados como controle negativo em todas as marcações. Os eosinófilos foram observados sob microscopia de fluorescência e as imagens capturadas utilizando uma câmera Hamamatsu Orca AG (Bridgewater) acoplada a um microscópio Olympus BX-62 Olympus (Olympus) utilizando o software Ivision 4.0 (BioVision Technology).

3.5 Tratamento e estimulação dos eosinófilos

Eosinófilos isolados (25×10^4 células/condição) foram ressuspensos em meio RPMI-1640 (Sigma) + ovalbumina 0,1% (200µL por condição), distribuídos em ependorfs, pré-tratados e estimulados com diferentes concentrações de ADP (100 nM, 10 nM, 1 nM, 0,1 nM) por 60 min à 37°C. O ADP é um ligante clássico dos receptores purinérgicos P2Y1 e P2Y12. Após o período de incubação, as amostras foram centrifugadas a 2000 rpm (620 g) por 5 min. Em seguida foram coletadas duas alíquotas do sobrenadante de 100 µL cada e congeladas para posterior quantificação de EPO e ECP. Em outro conjunto de experimentos, os eosinófilos foram pré-tratados com o antagonista do receptor P2Y12 (MRS 2395 – 10 µM) e com o antagonista do receptor P2Y1 (MRS 2179 – 10 µM) por 15 min e depois estimulados com ADP na concentração de 100 nM por 60 min à 37°C. Após o período de incubação, as amostras foram centrifugadas a 2000 rpm (620 g) por 5 min. Em seguida foram coletadas e congeladas duas alíquotas do sobrenadante de 100 µL cada para posterior quantificação de EPO.

3.6 Quantificação de EPO (peroxidase eosinofílica) e ECP (proteína catiônica do eosinófilo)

Alíquotas de 40 μ L dos sobrenadantes das células estimuladas ou não com ADP ou pré-tratadas com antagonistas P2Y e subsequentemente submetidas à estimulação com ADP foram transferidas para poços de uma placa de 96 poços, em duplicata. A seguir, 100 μ L de substrato da EPO (50 nM Tris HCl, 1 nM H₂O₂, 2 nM O-fenilenodiamina di-hidroclorato (OPD) e Triton X-100, pH 8) foi colocado em cada poço contendo os sobrenadantes. Após 1 minuto de incubação com o substrato, 50 μ L de ácido sulfúrico 4 M foi acrescentado para paralisar a reação. A absorbância dos poços foi avaliada em leitor de ELISA (Molecular Probes) em um comprimento de onda de 492 nm e os resultados expressos em densidade óptica (DO).

A quantificação de ECP (MBL ECP ELISA kits) foi detectada nos sobrenadantes de acordo com as instruções do fabricante. A quantidade de ECP e EPO secretados, média de duplicatas \pm erro padrão da média, foram representados como a diferença (Δ) dos níveis dessas proteínas detectados nas condições estimuladas em relação à condição não estimulada.

3.7 Análise da apoptose de eosinófilos

Para analisar o papel da modulação do receptor P2Y₁₂ na apoptose dos eosinófilos, após purificação, estes foram ressuspensos em RPMI completo (20 mM HEPES, 2 mM glutamina, soro fetal bovino 10%, penicilina e estreptomicina 1: 100 - 5 x 10⁵ eosinófilos /200 μ L RPMI) e distribuídos na placa de 96 poços na ausência ou na presença de IL-5 (30 ng/mL) adicionada ao meio. As células foram tratadas com ADP (100 nM, 10 nM, 1 nM, 0,1 nM), IL-5 (30 ng/mL) (controle positivo) e/ou um antagonista P2Y₁₂R (MRS 2395) ou seu veículo DMSO (em diluições correspondentes ao do MRS 2395). Nos experimentos onde a IL-5 foi adicionada ao meio, o período de incubação em estufa de CO₂ foi de 96 h. Nos experimentos sem IL-5 adicionada ao meio, a incubação foi de 24 h. Ao término do período de incubação, as células foram marcadas com anexina V conjugada com fluoresceína (FITC, concentração final de 1mg/mL) em tampão de apoptose (10 mM HEPES, 0,15 M NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 1,8 mM CaCl₂, pH= 7,4). As amostras foram

incubadas por 15 min no escuro. As células foram analisadas imediatamente após marcação utilizando FACScam (BD Bioscience).

3.8 Análise da quimiotaxia *in vitro*

Para avaliar um possível papel quimiotático direto do ADP *in vitro* em eosinófilos humanos, após purificação, as células foram ressuspensas em RPMI 1640 + ovalbumina 0.1% e distribuídas no compartimento superior de placas de 48 poços (3×10^6 células por condição) com sistema *transwell* (Costar) na ausência ou presença de IL-5 (30 ng/mL) adicionada ao meio. Os estímulos ADP (100 nM, 10 nM, 1 nM, 0.1 nM) ou eotaxina (20 µg/mL) (controle positivo) foram colocados no compartimento inferior da placa enquanto os eosinófilos foram colocadas no compartimento superior do *transwell*. Após o período de incubação (3 h), o compartimento superior foi retirado e o meio de cultura presente nos compartimentos inferiores de cada poço foi transferido para microtubos de centrifugação. Cada poço foi ainda abundantemente lavado com solução de Hanks gelada sem cálcio e magnésio contendo EDTA (1%), para garantir a retirada de possíveis células ainda aderidas. A seguir os pellets foram ressuspensos em 200 µL dessa mesma solução de Hanks e o número de eventos (gate granulócitos) em 100 µL dessa suspensão celular foi estimado por citometria de fluxo (citômetro Accuri ajustado para módulo counter).

3.9 Animais

Foram utilizados camundongos machos isogênicos da linhagem C57BL/6, de 6 a 7 semanas de idade, oriundos do Biotério Central do Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes da UFRJ. Os animais foram então mantidos em condições onde receberam alimentação balanceada e água *ad libitum*, com ambiente climatizado ($21 \pm 2^\circ$ C) e condições padronizadas de ciclo claro-escuro. O protocolo de experimentação animal foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa de Uso de Animais em Pesquisa (CEUA) do Centro de Ciências da Saúde da UFRJ, o número do protocolo aprovado é DFBCICB 043.

3.10 Análise da migração celular *in vivo*

Para avaliar a capacidade do ADP em recrutar eosinófilos *in vivo*, camundongos C57BL/6 receberam uma injeção intraperitoneal de ADP (200 µL de ADP 100 nM ou 8,5 µg/cavidade) ou salina. Após 12 h os animais tiveram sua cavidade peritoneal lavada com 5 mL de solução de Hanks sem cálcio e magnésio e EDTA (1%) gelado. A suspensão celular foi centrifugada 1200 rpm (220 g), 4°C, 5 min e o pellet ressuspensão em Hanks contendo Fc block. As células foram então marcadas com anticorpo irrelevante e anti-Singlec-F (BD Pharmingen) (0,5 µg/ml) durante 45 minutos. O anti-Singlec-F tem sido descrito como uma molécula marcadora de eosinófilos murinos circulantes e de alguns precursores mielóides de medula, capazes de diferenciar eosinófilos de outros granulócitos. A análise foi realizada por citometria de fluxo (Accuri). Experimentos prévios demonstraram um pico de influxo de granulócitos 12 h após administração intraperitoneal de ADP, razão pela qual este tempo foi escolhido.

3.11 Tratamento

Durante duas semanas os animais foram submetidos ao tratamento com mebendazol (280 µg/mL) via água de bebida, a qual era trocada a cada três dias. Esse tratamento foi realizado com objetivo de se evitar possíveis interferências de outras infecções parasitárias no resultado final do experimento. Após uma semana de suspensão do tratamento com mebendazol, os animais foram infectados pelo *S. mansoni*. Três dias antes da infecção, um grupo de animais recebeu 500 µg/mL de clopidogrel (Medley-obtido comercialmente), um antagonista do receptor P2Y12, via água de bebida durante 55 dias, sendo o tratamento iniciado 3 dias antes da infecção com *S. mansoni* e mantido até o dia do sacrifício, dissolvidos em 100 µL de DMSO (em virtude de ser insolúvel em água), enquanto o grupo não tratado recebeu água adicionado do mesmo volume de DMSO (100 µL).

3.12 Infecção

Os camundongos foram infectados com cercárias de *S. mansoni* (cepa BH - Belo Horizonte, Minas Gerais), oriundas de moluscos de *Biomphalaria glabrata*, previamente infectados e expostos à luz artificial para obtenção das cercárias. As cercárias foram gentilmente fornecidas pela Dr^a. Lygia dos Reis Corrêa do Laboratório de Malacologia da Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. No momento da infecção, os camundongos foram expostos a um lava-pés, com objetivo de evitar possíveis interferências de fezes e urina no processo de penetração das cercárias. A infecção dos animais foi feita por via transcutânea em banho individual de água desclorada por 30-40 min contendo 60 cercárias vivas, previamente quantificadas com o auxílio de lupa estereoscópica (Olympus SZ40).

Os animais foram eutanasiados no 55º dia de infecção, fase na qual ocorre o ápice da forma aguda da esquistossomose, caracterizando alterações patológicas fundamentais com presença de ovos nos tecidos hepático e intestinal o que desencadeia uma proeminente reação granulomatosa ao redor destes.

3.13 Avaliação do tempo de sangramento da cauda

Para analisar a biodisponibilidade do clopidogrel (antagonista do P2Y₁₂R) no protocolo de administração utilizado (via água de bebida) e tendo em vista que o mesmo é utilizado na clínica como antiagregante plaquetário, foi realizado o teste do tempo de sangramento da cauda de acordo com o descrito por Broze e colaboradores (2001). Após 23 dias de tratamento com clopidogrel, quatro animais deste grupo e quatro do grupo não tratado foram separados para realização deste teste. Os animais foram anestesiados através de injeção intramuscular de 50 µL da mistura dos anestésicos pentobarbital (40 mg / Kg) e xilazina (2,5 mg / Kg). Minutos depois os animais foram imobilizados, suas caudas foram cortadas em 4 mm a partir da ponta, e imersas em 5 mL de água destilada à temperatura ambiente. A perda de sangue foi avaliada indiretamente em função da presença de hemoglobina na solução, sendo detectada por método colorimétrico com leitura de absorbância a 540 nm.

3.14 Coleta e armazenamento das amostras

O sangue foi coletado através de punção do plexo venoso retro-orbital e colocado em tubos de coleta pediátrica com gel separador (BD Bioscience), e em seguida centrifugado a 1200 rpm (220 g), 10 min, 25°C. O soro foi retirado e congelado para posterior análise de citocinas. O intestino foi removido, pesado inteiro individualmente e congelado para posterior quantificação de ovos. O fígado foi removido, pesado inteiro individualmente e em seguida foi fragmentado em três partes padronizadas para quantificação de ovos no tecido, dosagem de hidroxiprolina e para análise histológica. Para avaliação da eosinofilia sanguínea, foram feitos cortes de 1 mm na cauda de cada animal e em seguida foram retiradas alíquotas para contagem total das células em líquido de Turk e para a extensão sanguínea. As lâminas com a extensão sanguínea foram coradas com kit panótico (LaborClin) para realização de contagem diferencial das células. Para avaliação da eosinofilia medular, os fêmures foram retirados e em seguida a medula foi lavada com 1 mL de RPMI 1640. A suspensão celular obtida foi citocentrifugada e corada com kit panótico (LaborClin) para contagem diferencial por microscopia de campo claro.

3.15 Processamento histológico

Para avaliação morfológica dos granulomas foram realizados cortes histológicos a partir dos fragmentos padronizados dos fígados dos camundongos. Os materiais selecionados para histologia foram identificados e acondicionados em cassetes, em seguida preservados em solução de formol tamponado a 10%. Após 48h foi realizado o emblocamento, corte e coloração pelo método de hematoxilina-eosina (HE) clássico ou Syrius Red modificado para melhor visualização dos esinófilos. Resumidamente, na coloração de Syrius Red modificada, após a desparafinização em xileno e hidratação, os cortes foram lavados em água destilada (5 min), corados com hematoxilina de Mayer (4 min), lavados em água corrente (5 min), lavados em água destilada (2 min), imersos em álcool 70% (3 min), corados com Syrius Red (3 horas), lavados em água corrente (5 minutos), desidratados, clarificados e montados com lamínula. Após o preparo das lâminas, foram avaliadas as áreas de infiltrado celular inflamatório/granuloma e o número de eosinófilos/área

de granuloma onde se visualizava um ovo central de *S. mansoni*. Para a avaliação destes granulomas hepáticos foi utilizado microscopia de campo claro (40 x) seguida de captura das imagens, com o auxílio de um microscópio NIKON ECLIPSE E-200® acoplado a uma câmera digital COOLPIX 995® (NIKON). O processamento das imagens foi realizado com o auxílio do programa Scion Image versão 4b (Scioncorp - <http://www.scioncorp.com>).

3.16 Quantificação de ovos nos tecidos hepático e intestinal

Para esta avaliação, foi utilizada a técnica descrita por Cheever e colaboradores (1968) que consiste em manter os tecidos individualmente em solução aquosa de KOH 4%, no volume de 40 mL para o intestino e 20 mL para o fígado, em temperatura ambiente por 12 h e com posterior incubação em banho-maria a 37°C por aproximadamente 1 h para que ocorra a digestão dos tecidos. A contagem de ovos foi realizada misturando-se uma alíquota da digestão tecidual (20 mL intestino e 40 mL fígado) com água destilada (80 mL intestino e 60 mL fígado) totalizando 100 mL em cada poço (placa de 96 poços). A contagem dos ovos foi feita em octoplicata utilizando microscopia de campo claro (40x) em microscópio invertido (NIKON TMS). Os resultados foram expressos em número de ovos por g de tecido.

3.17 Quantificação de hidroxiprolina

A deposição de colágeno foi estimada através da concentração de hidroxiprolina (aminoácido mais abundante no colágeno) no tecido hepático. Para tal, frações padronizadas do fígado foram desidratadas em acetona PA por 24h, em temperatura ambiente. Após a desidratação, adicionou-se uma mistura de clorofórmio-etanol (2:1) por 24h em temperatura ambiente, permanecendo secando na estufa a 60°C por 1h. As amostras foram pesadas e hidrolizadas com 1 mL de HCL 6 N por 18 h a 100°C, de acordo com o método Wossner's. Após essa etapa, adicionou-se 5,7 mL de água destilada e 1 mL de NaOH 6 N. Em seguida, as amostras foram então centrifugadas a 2780 rpm (1400 g) por 15 min. As amostras foram ressuspendidas em 500 µL da solução cloramina T 0,05 M (1,41 g cloramina T; 10 mL de H₂O; 10 mL n-propanol; 80 mL tampão ácido pH 6) por 20 min em

temperatura ambiente. Em seguida, adicionou-se 500 μ L da solução aldeído/ ácido perclórico (15 g p-dimetil-amino-benzaldeído; 60 mL de n-propanol; 26 mL de ácido perclórico 70%) por 20 min no banho a 60°C. Após 10 min, tempo necessário para que as amostras e a curva padrão esfriassem, a leitura foi realizada no espectrofotômetro em absorvância de 570 nm (WOESSNER, 1961).

3.18 Quantificação de IL-13 hepática

Para esta avaliação, frações padronizadas do tecido hepático de cada animal foram homogeneizadas em 1 mL de solução tampão de homogeneização (PBS pH 7,4, triton x-100 0,1%, inibidor de protease (de acordo com as instruções do fabricante Roche #11836145001) e centrifugadas a 15000 rpm (24000 g), 4°C, por 10 min. O sobrenadante foi coletado para determinação de IL-13 através de kit de elisa (Peprotec) de acordo com instruções fornecidas pelo fabricante. A quantificação dos níveis de proteína total presentes nos sobrenadantes dos homogeneizados onde se realizou a determinação de IL-13 foi realizada pelo método de Bradford (Sigma). Os resultados foram expressos em ng de citocina/mg de proteínas totais.

3.19 Avaliação estatística

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM) e foram analisados por ANOVA (one-way) seguido por Newman-Keuls ou por teste t de Student não pareado. Os valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

4. RESULTADOS

4.1 Eosinófilos humanos expressam o receptor P2Y12.

A expressão protéica do receptor P2Y12 em eosinófilos humanos já foi demonstrada anteriormente pelo nosso grupo através da técnica de citometria de fluxo (NEVES *et al.*, 2010). Com o objetivo de confirmar este resultado em eosinófilos humanos purificados por diferente metodologia, utilizamos a técnica de reação em cadeia da polimerase após transcrição reversa (RT-PCR) a fim de se avaliar a expressão de RNA mensageiro (RNAm) para o receptor P2Y12. De acordo com a **Fig. 4**, após marcação do gel com brometo de etídio, pode-se observar a presença de uma banda de aproximadamente 100 pares de bases (bp) (o previsto seria 117 pb) na posição 1 que corresponde ao receptor P2Y12. Já nas condições controle, onde o RNA não foi transcrito reversamente (sem RNA transcrito, posição 2) ou omitido (sem cDNA posição 3) a banda mostrou-se ausente.

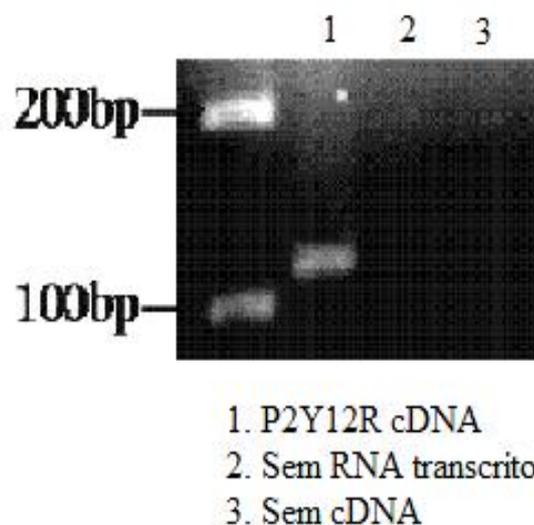


Figura 4: Expressão de RNA mensageiro para o P2Y12R em eosinófilos humanos. A banda correspondente ao receptor P2Y12 pode ser visualizada de aproximadamente 100 bp, mostrando-se ausente nas situações controle onde o RNA não foi reversamente transcrito ou foi omitido o cDNA. 1 experimento representativo de 2 experimentos com doadores distintos.

O objetivo seguinte foi o de confirmar a expressão protéica do P2Y12R nos eosinófilos no protocolo de purificação implantado nas nossas condições laboratoriais. Por citometria de fluxo, sob condições não-permeabilizantes, eosinófilos humanos apresentaram imunorreatividade contra o receptor P2Y12 (**Fig. 5, painel A**), após marcação utilizando anticorpos policlonais (linha verde) e quando comparado à condição onde anticorpos controle foram utilizados (histograma cinza). Em condições permeabilizantes, utilizando um anticorpo policlonal contra domínios carboxi-terminais intracelulares do receptor P2Y12 (linha verde), os eosinófilos também se mostraram imunorreativos quando comparados à condição controle (histograma cinza) (**Fig. 5, painel B**). A especificidade da marcação foi confirmada por neutralização através da incubação prévia dos anticorpos anti-P2Y12R com seu respectivo peptídeo bloqueador (**Fig. 5, painel B - linha rosa**).

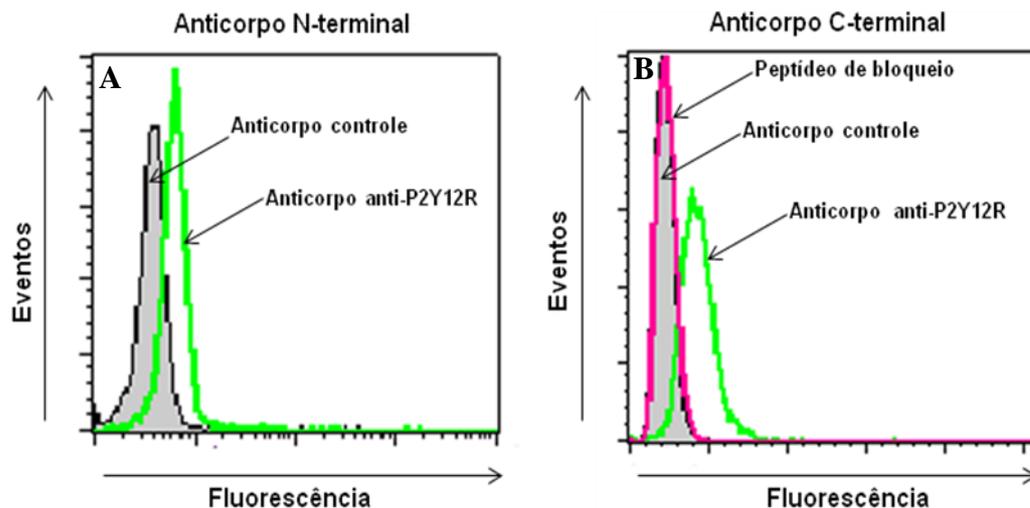


Figura 5: Análise da expressão de receptores P2Y12 em eosinófilos humanos por citometria de fluxo. Eosinófilos não-permeabilizados (**A**) e permeabilizados (**B**) apresentaram-se imunorreativos à marcação com anticorpos contra o receptor purinérgico P2Y12. Condição controle - histograma cinza; condições onde anticorpos específicos foram utilizados - linha verde; condição onde o anticorpo específico foi previamente incubado com seu respectivo peptídeo bloqueador – linha rosa. 1 experimento representativo de 3 experimentos independentes com doadores distintos.

Por microscopia de fluorescência (**Fig. 6**), os eosinófilos foram visualizados após marcação com anticorpos policlonais anti-P2Y12R e DAPI (um marcador nuclear) após permeabilização com saponina. A especificidade da marcação foi

confirmada por neutralização completa após incubação prévia do anticorpo com o seu respectivo peptídeo bloqueador. A técnica de microscopia foi capaz de nos fornecer informações não somente sobre a expressão, mas também sobre a localização do P2Y12R no eosinófilo. Na **Fig. 6** (painel mais à direita) observe a localização intracelular do P2Y12R. De fato, a expressão do P2Y12R em grânulos eosinofílicos isolados já foi demonstrada anteriormente pelo nosso grupo (NEVES, *et al.*, 2010).



Figura 6: Análise da expressão do P2Y12R em eosinófilos humanos através de microscopia de fluorescência. A marcação com anticorpo anti-P2Y12R pode ser visualizada em verde (painel da direita) contrastando com a marcação do núcleo por DAPI (azul). Imagem de 1 experimento representativo de 2 experimentos independentes com doadores distintos.

Através desses experimentos, foi possível confirmar a expressão do receptor purinérgico P2Y12 em eosinófilos humanos purificados no protocolo de purificação implantado nas nossas condições laboratoriais .

4.2 A secreção de EPO induzida por ADP em eosinófilos humanos é mediada pelo receptor P2Y12

Para avaliar o papel funcional da expressão do P2Y12R em eosinófilos humanos, as células isoladas foram estimuladas com ADP, um agonista clássico do P2Y12R e do receptor P2Y1 (P2Y1R), em diferentes concentrações. Eosinófilos responderam ao ADP secretando ECP (**Fig.7**) e EPO (**Fig.8**) sugerindo que estes

receptores poderiam ter importante papel funcional na indução da secreção de proteínas eosinofílicas. Buscando investigar se esta secreção estaria relacionada com o P2Y12R ou com o P2Y1R, eosinófilos isolados foram pré-tratados com um antagonista do P2Y12R (MRS 2395) ou com um antagonista do P2Y1R (MRS 2179), e em seguida estimulados com ADP na concentração de 100 nM (**Fig.9**). A concentração de 100 nM foi escolhida por induzir uma maior secreção de EPO (como ilustrado na **Fig.8**). Como se pode observar na **Fig. 9**, a secreção de EPO teve uma diminuição significativa na presença do antagonista do P2Y12R, quando comparada à condição estimulada com ADP 100 nM. Já na presença do antagonista do P2Y1R, não houve diferença significativa na secreção de EPO quando comparado à condição ADP 100 nM. Estes resultados sugerem que o P2Y12R tem um papel importante na secreção de EPO mediada pelo ADP.

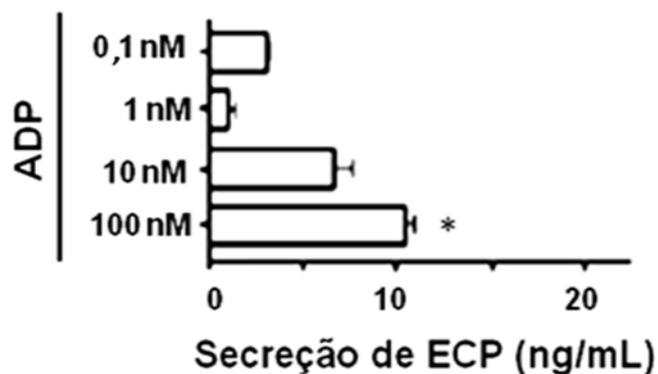


Figura 7: Secreção de proteína catiônica (ECP) induzida por ADP em eosinófilos humanos após 1h de estimulação. * $P < 0,05$ comparado com o não estimulado. O gráfico representa a média das triplicatas \pm EPM. A quantidade de ECP secretada foi representada como a diferença (Δ) dos níveis dessas proteínas detectadas nas condições estimuladas em relação à condição não estimulada. O resultado, 1 experimento representativo de 3, foi analisado por ANOVA one-way, seguido por Newman Keuls.

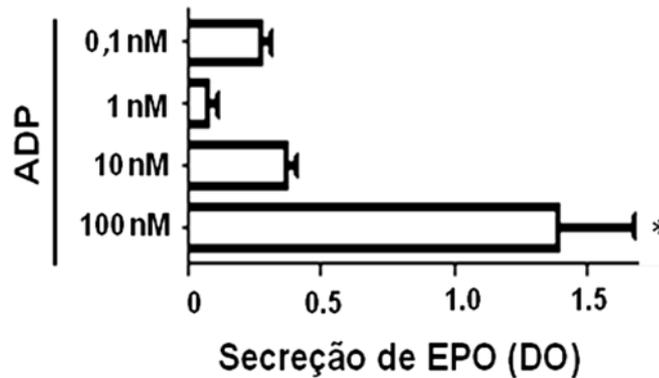


Figura 8: Secreção de peroxidase eosinofílica (EPO) induzida por ADP em eosinófilos humanos após 1h de estimulação. * $P < 0,05$ comparado com o não estimulado. O gráfico representa a média das triplicatas \pm EPM. A quantidade de EPO secretada foi representada como a diferença (Δ) dos níveis dessas proteínas detectadas nas condições estimuladas em relação à condição não estimulada. O resultado, 1 experimento representativo de 3, foi analisado por ANOVA one-way, seguido por Newman Keuls. DO: densidade ótica.

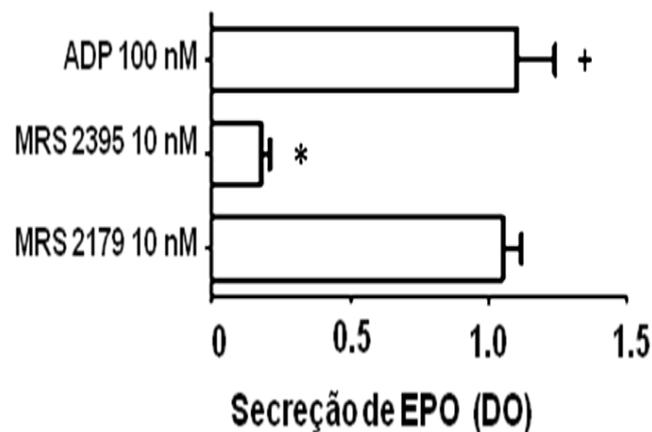


Figura 9: Secreção de peroxidase eosinofílica (EPO) por eosinófilos pré-tratados com antagonista do P2Y12R (10 μ M) e antagonista do P2Y1R (10 μ M), após estimulação com ADP 100 nM por 1h. MRS 2395 – antagonista P2Y12R. MRS 2179 – antagonista P2Y1R. + $P < 0,05$ comparado com o não estimulado; * $P < 0,05$ comparado com ADP 100 nM. O gráfico representa a média das triplicatas \pm EPM. A quantidade de EPO secretada, foi representada como a diferença (Δ) dos níveis dessas proteínas detectadas nas condições estimuladas em relação à condição não estimulada. O resultado, 1 experimento representativo de 3, foi analisado por ANOVA one-way, seguido por Newman Keuls. DO: densidade ótica.

4.3 ADP e o bloqueio do P2Y12R não influenciam na apoptose de eosinófilos humanos

Para avaliar o envolvimento do P2Y12R na sobrevivência dos eosinófilos, as células foram estimuladas com ADP (agonista clássico dos receptores P2Y12 e P2Y1) em diferentes concentrações. Experimentos com os antagonistas dos receptores P2Y12 (MRS 2395) e P2Y1 (MRS 2179) também foram realizados.

Nosso objetivo inicial foi o de investigar o papel do ADP na sobrevivência dos eosinófilos em condições que se aproximassem daquelas encontradas em sítios de inflamação eosinofílica, onde a presença de IL-5 já é bem documentada (NAKAJIMA E TAKATSU, 2007; KOURO e TAKATSU, 2009). Por esta razão inicialmente avaliamos o efeito do ADP sobre a sobrevivência do eosinófilo utilizando um protocolo onde as células foram incubadas com este por 96 h na presença de IL-5 (30 ng/ml), uma citocina reconhecida pelo seu papel no aumento da sobrevivência dos eosinófilos. Após incubação por 96h, as células foram marcadas com anexina V e analisadas por citometria de fluxo (**Fig. 10**). A anexina V é um marcador de estágios precoces de apoptose. Nesta fase, a fosfatidilserina, um componente fosfolipídico presente na face citosólica da membrana plasmática, sofre ação da enzima flipase que a transfere para a superfície extracelular da membrana. A anexina V é capaz de se ligar a fosfolipídeos de carga negativa, como a fosfatidilserina, permitindo dessa forma diferenciar as células em estágio precoce de apoptose das células não apoptóticas.

Como observado na **Fig. 10**, na ausência de IL-5 adicionada ao meio de cultura, somente 12,43% dos eosinófilos encontravam-se viáveis após 96 h de incubação, enquanto que na condição com IL-5 a porcentagem de eosinófilos viáveis passou a ser de 90,77%. Na concentração de ADP 100 nM, 92,51% dos eosinófilos estavam viáveis, valores que não são diferentes significativamente quando comparados com a condição só com IL-5. O mesmo ocorreu com as concentrações de ADP 10 nM, 1 nM e 0,1 nM, onde a porcentagem de células viáveis foi, respectivamente, 93,51%, 92,63% e 91,68%. Desta forma, quando esses valores são comparados com a condição apenas com IL-5, não se observam diferenças consideráveis.

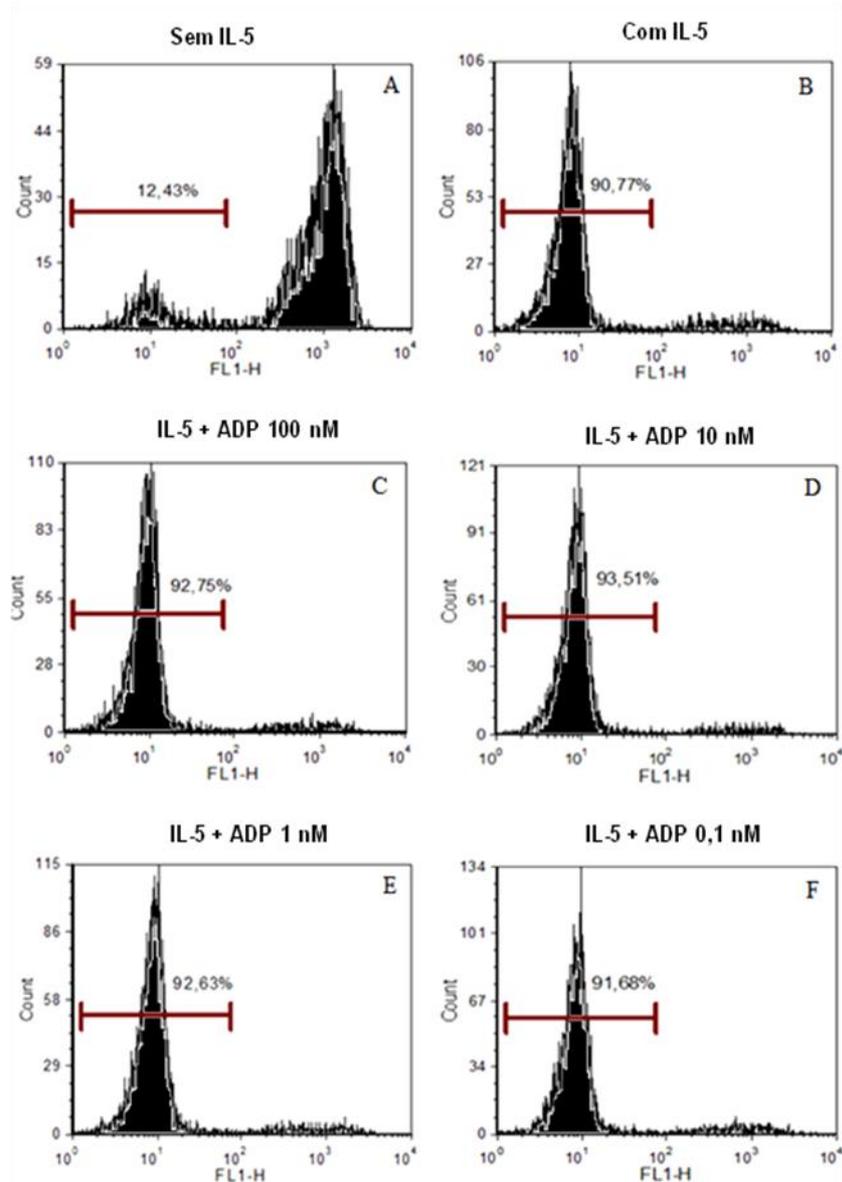


Figura 10: Porcentagem de eosinófilos purificados viáveis em cultura por 96h na presença de IL-5 (30 ng/ml) e tratados com ADP em diferentes concentrações. A, ausência de IL-5. B, IL-5 (30 ng/ml). C, IL-5 (30 ng/ml) + ADP 100nM. D, IL-5 (30 ng/ml) + ADP 10nM. E, IL-5 (30 ng/ml) + ADP 1nM. F, IL-5 (30 ng/ml) + ADP 0,1 nM . 1 experimento representativo de 2 experimentos independentes com doadores distintos.

Visando analisar se a ausência de efeito do ADP sobre a sobrevivência dos eosinófilos observado no experimento anterior poderia estar sofrendo interferência da IL-5, utilizamos outro protocolo de análise de sobrevivência, agora sem IL-5 adicionada ao meio e com apenas 24 h de incubação. Conforme pôde ser observado na **Fig. 11**, após marcação com anexina V, na ausência de IL-5, 61% dos eosinófilos encontravam-se viáveis. Na concentração de ADP 100 nM, 57,9% dos eosinófilos

estavam viáveis, valores que não são significativos estatisticamente quando comparados com a condição não estimulada. O mesmo ocorre com as concentrações de ADP 10 nM, 1 nM e 0,1 nM, onde a porcentagem de células viáveis foi, respectivamente, 60%, 60,2% e 63,3%. A condição com IL-5 (30 ng/ml), a qual 85,3% dos eosinófilos estavam viáveis, foi acrescentada como controle positivo.

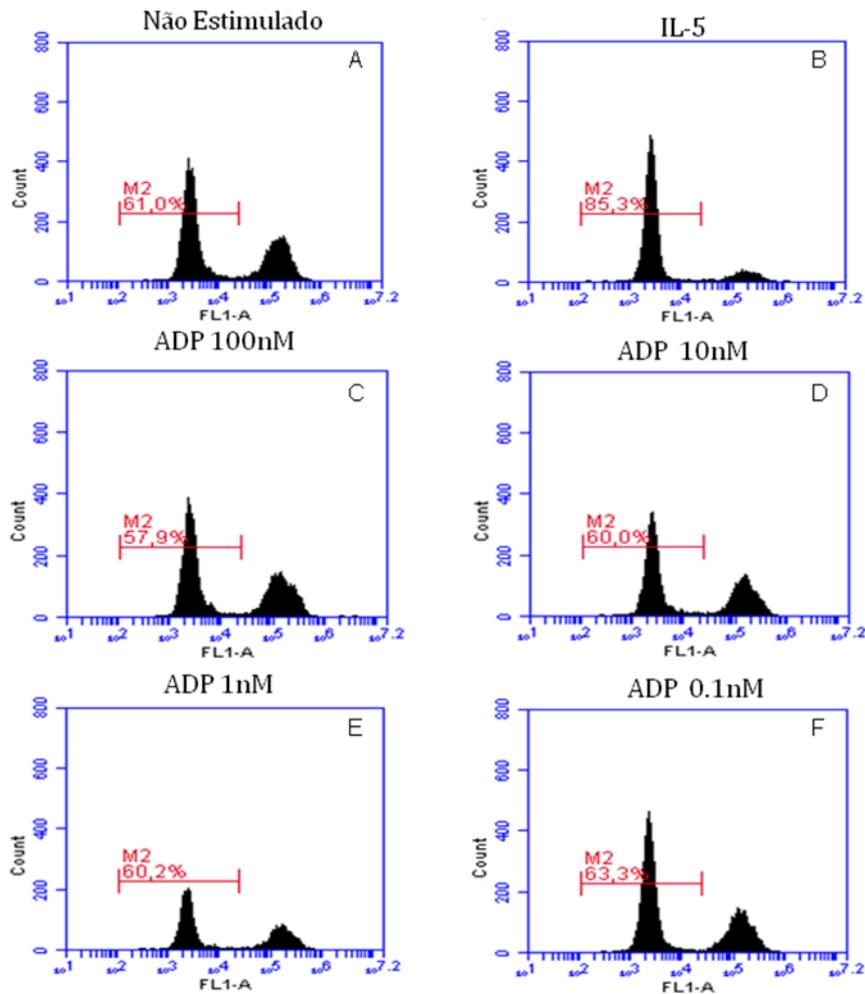


Figura 11: Porcentagem de eosinófilos purificados viáveis em cultura por 24h na ausência de IL-5 e tratados com ADP em diferentes concentrações. A, ausência de IL-5. B, IL-5 (30 ng/ml). C, ADP 100nM. D, ADP 10nM. E, ADP 1nM. F, ADP 0,1 nM. Imagem representativa de 1 experimento.

A fim de descartar uma possível participação da liberação de ADP endógeno sinalizando via P2Y12R na manutenção da sobrevivência do eosinófilo, utilizando ainda este último protocolo (incubação de 24 h sem IL-5), nós verificamos se um antagonista do P2Y12R (MRS 2395) nas concentrações de 10 nM e 1nM, bem como seu diluente (DMSO), estariam influenciando na sobrevivência do eosinófilo. Como pode

ser observado na **Fig. 12**, nas condições com DMSO (correspondentes às diluições de 10 nM e 1nM do MRS 2395), o percentual de eosinófilos viáveis foi 63,1% (ambas as condições). Nenhuma diferença sugestiva de efeito aconteceu na condição com MRS 2395 10 nM e 1nM onde os percentuais foram 67,1% e 66,3% respectivamente. Desta forma, quando esses valores são comparados com a condição sem IL-5, não se observam diferenças significativas, descartando uma possível participação do P2Y12R na manutenção da sobrevivência ou na indução da morte do eosinófilo. A condição com IL-5, a qual 85,3% dos eosinófilos estavam viáveis foi acrescentada como controle positivo.

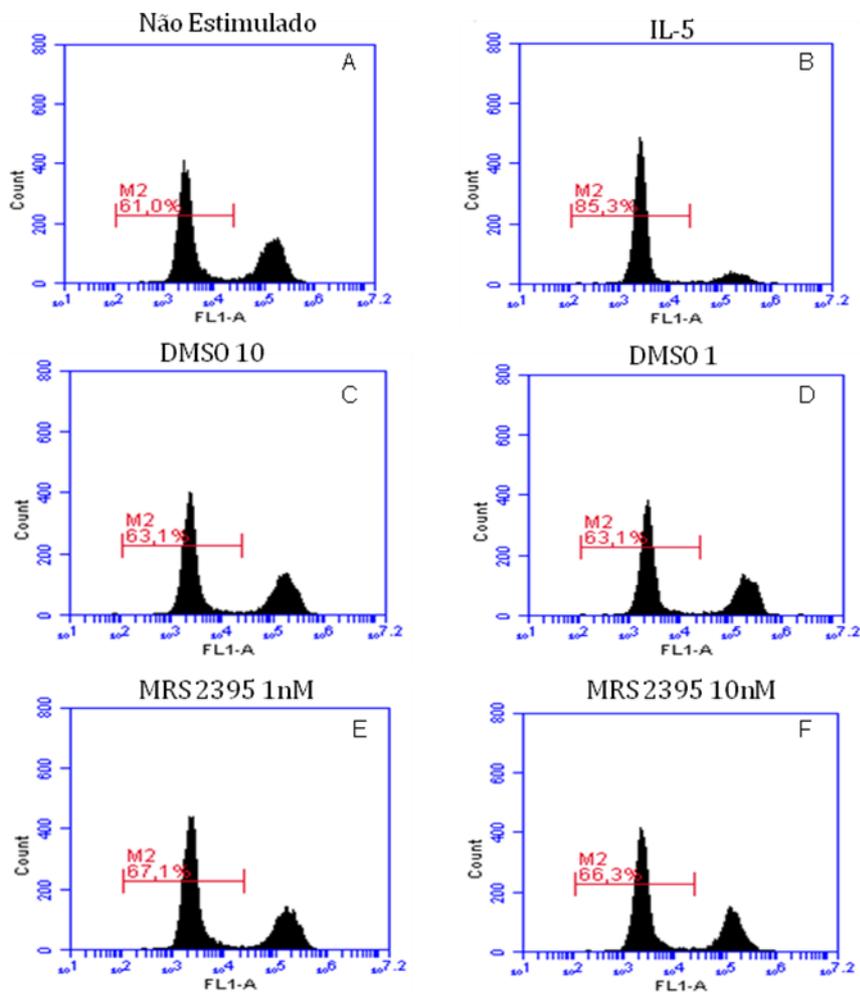


Figura 12: Porcentagem de eosinófilos purificados viáveis em cultura por 24 h na ausência de IL-5 e tratados com DMSO (diluyente) e MRS 2395. A, ausência de IL-5. B, IL-5 (30ng/ml). C, DMSO (correspondente à diluição de 10 nM de MRS 2395). D, DMSO (correspondente à diluição de 1 nM de MRS 2395). E, MRS 2395 10nM. F, MRS 2395 1 nM. Imagem representativa de 1 experimento.

4.4 O ADP não é quimiotático para eosinófilos humanos *in vitro*

Com o objetivo de se verificar o efeito quimiotático direto do ADP sobre eosinófilos humanos, as células isoladas foram incubadas com ADP em diferentes concentrações e a quimiotaxia avaliada utilizando placa de 48 poços com sistema *transwell* após 3 h de incubação. Como mostrado na **Fig. 13**, o ADP nas concentrações de 100 nM, 10 nM, 1 nM e 0.1 nM não apresentou atividade quimiotática aumentada quando comparada à condição controle sem estímulo quimiotático. A eotaxina (100 ng/ mL) foi utilizada como controle positivo.

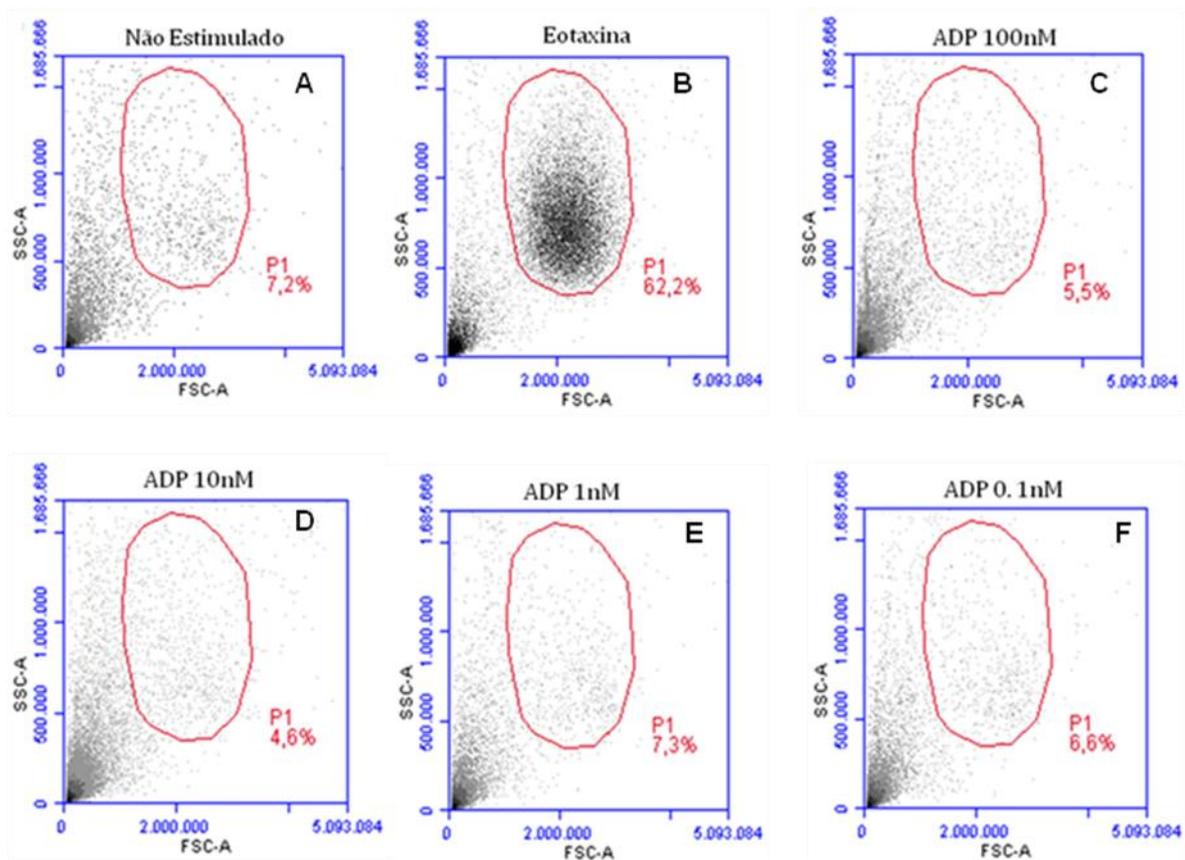


Figura 13: O ADP não é quimiotático para eosinófilos humanos *in vitro*. Porcentagem de eosinófilos no *gate* para granulócitos P1 após análise dos eventos em 100 μ l da suspensão celular recuperada no compartimento inferior da placa de 48 poços contendo o sistema *transwell*. **A**, ausência de estímulo. **B**, eotaxina (20 μ g/ mL). **C**, ADP 100 nM. **D**, ADP 10 nM. **E**, ADP 1 nM. **F**, ADP 0,1 nM. Imagem representativa de 1 experimento.

Diferentes estudos que abordam quimiotaxia e eosinófilos descrevem que quando eosinófilos são pré-incubados com IL-5 há um aumento da velocidade do movimento randômico das células (ou quimiocinesia) assim como da sensibilidade ao agente quimiotático dependendo do estímulo, muito possivelmente pela regulação positiva da expressão de moléculas envolvidas na resposta quimiotática (YAMAGUCHI *et al.*, 1988). Desta forma, a fim de avaliar se uma incubação prévia com a IL-5 poderia influenciar a atividade quimiotática do ADP utilizamos um protocolo de quimiotaxia onde os eosinófilos foram incubados com IL-5 (30 ng/mL) previamente ao contato com o estímulo migratório. De acordo com a **Fig. 14**, não houve um resultado sugestivo de atividade migratória para o ADP mesmo na presença de IL-5. A concentração de ADP 0,1 nM sugere uma pequena redução no número de células que migraram. A repetição sistemática desse experimento poderá evidenciar ou não essa observação.

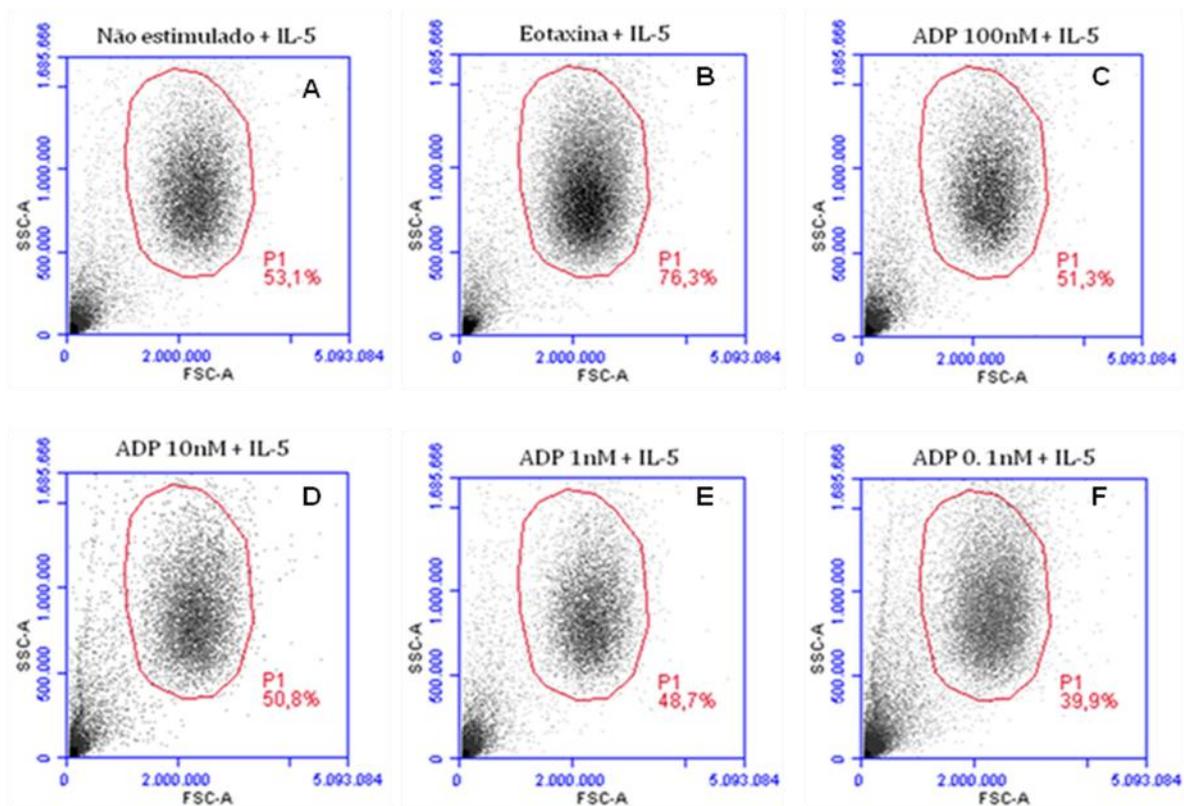


Figura 14: O ADP não é quimiotático para eosinófilos humanos *in vitro* após incubação prévia com IL-5. Porcentagem de eosinófilos no gate para granulócitos P1 após análise dos eventos em 100 μ l da suspensão celular recuperada no compartimento inferior da placa de 48 poços contendo o sistema *transwell*. **A**, IL-5. **B**, IL-5 + eotaxina (20 ng/mL). **C**, ADP 100nM + IL-5 (30 ng/mL). **D**, ADP 10 nM + IL-5 (30 ng/mL). **E**, ADP 1 nM + IL-5 (30ng/mL). **F**, ADP 0,1 nM + IL-5 (30 ng/ml). Imagem representativa de 1 experimento.

Esse conjunto de resultados sugere que pelo menos de uma maneira direta o ADP é incapaz de recrutar eosinófilos humanos, o que não descarta uma participação autócrina/parácrina de nucleotídeos (ADP, ATP) na quimiotaxia induzida por outros estímulos tais como eotaxina ou fragmentos do complemento (C5a). Experimentos adicionais ainda precisam ser realizados a fim de esclarecer esse ponto.

4.5 A administração intraperitoneal de ADP promove o recrutamento de granulócitos e aumenta o número de células singlec-F positivas na cavidade peritoneal de camundongos *in vivo*

A fim de avaliar a capacidade do ADP em recrutar eosinófilos *in vivo*, o mesmo (200 µL de ADP 100 nM ou 8,5 µg/cavidade) foi injetado na cavidade peritoneal de camundongos. Após 12 h, os animais tiveram sua cavidade peritoneal lavada e o perfil de células presentes avaliado por citometria de fluxo. De acordo com a **Fig. 15 A e B**, podemos observar um aumento da população de granulócitos na cavidade peritoneal dos animais desafiados com ADP em comparação com os animais que receberam apenas solução salina (veículo do ADP). Após marcação das células do lavado peritoneal com anticorpo anti-Singlec-F verificou-se um aumento da população de células Singlec-F positivas no grupo de animais que recebeu ADP em comparação com o controle salina (**Fig. 15 D**). Experimentos controle com o anticorpo irrelevante foram realizados (**Fig. 15 C**). Singlec-F tem sido descrito como uma molécula marcadora de eosinófilos murinos circulantes e em alguns precursores mielóides de medula, útil principalmente para diferenciar eosinófilos de outros granulócitos (ANGATA *et al.*, 2001; ZHANG, *et al.*, 2007). Sua expressão parece estar ausente em mastócitos, neutrófilos murinos e macrófagos peritoneais, embora alguns estudos descrevam sua expressão em macrófagos alveolares (ZHANG, *et al.*, 2007; FENG, 2012).

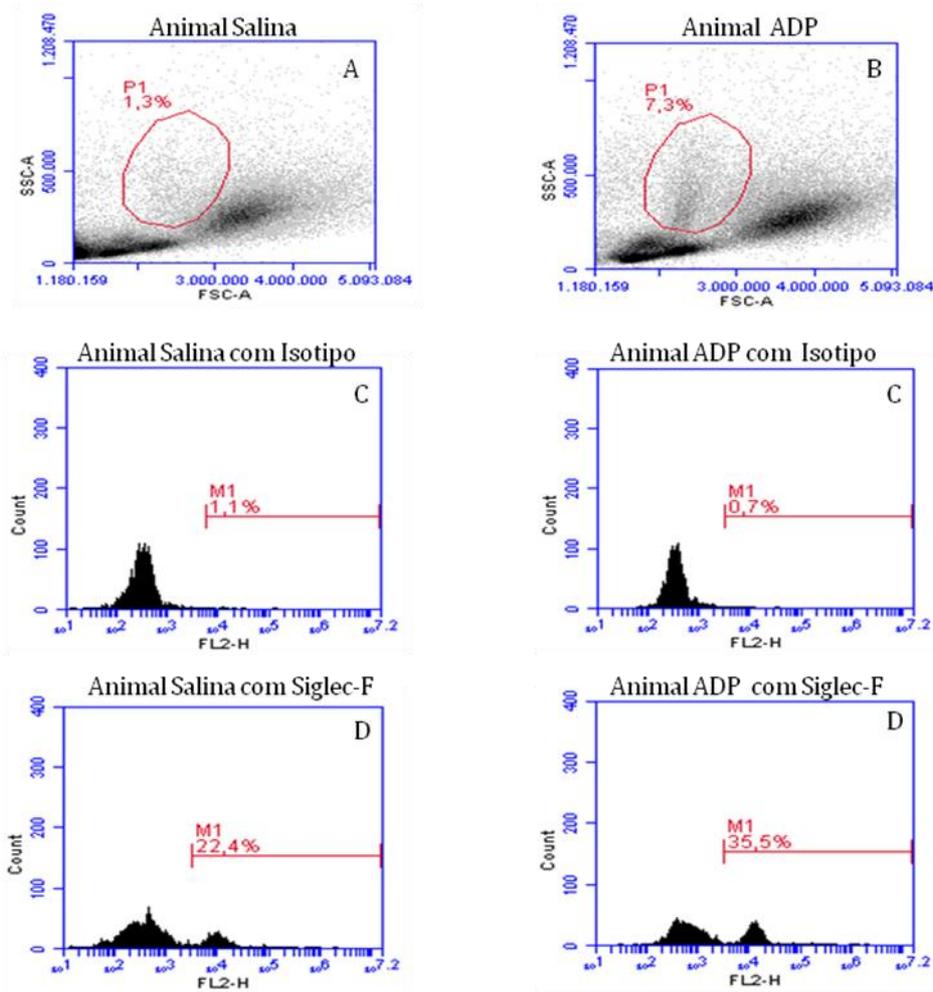


Figura 15: O ADP induziu a migração de eosinófilos *in vivo*. Porcentagem de granulócitos no *gate* P1 após análise de células do lavado peritoneal. **A**, animal que recebeu injeção intraperitoneal de salina (animal salina). **B**, animal que recebeu injeção intraperitoneal de ADP (100 nM) (animal ADP). **C**, células do lavado peritoneal do animal salina e animal ADP marcados com anticorpo irrelevante. **D**, células do lavado peritoneal do animal salina e animal ADP marcados com Siglec-F. M1 – porcentagem de células positivas para Siglec-F no *gate* P1. Imagem representativa de 1 experimento. N=5

Estes resultados sugerem que *in vivo* o ADP é capaz de recrutar eosinófilos. Uma das hipóteses é que esse recrutamento possa estar acontecendo de uma maneira indireta, via ativação de células residentes da cavidade peritoneal (como por exemplo macrófagos) e liberação de substâncias quimiotáticas para eosinófilos / neutrófilos. Outra hipótese é que este ADP (um clássico agregante plaquetário) possa estar sendo capaz de promover agregação e desgranulação plaquetária na microcirculação da cavidade peritoneal com consequente recrutamento de granulócitos através dos mediadores pré-estocados na plaqueta tais como PAF

(WARDLAW et al., 1986), α -grânulos e grânulos lisossomais (BURGES *et al.*, 1993). Entretanto experimentos confirmando a magnitude e caracterizando a migração de eosinófilos (e ou neutrófilos) para o peritônio de animais desafiados com ADP precisam ainda ser repetidos e/ou confirmados, assim como a ação de um antagonista P2Y12 (clopidogrel) nesta resposta. Além disso, experimentos capazes de evidenciar a participação das plaquetas e/ou de outros mediadores oriundos de células residentes da cavidade estão em andamento.

4.6 *In vivo*, o bloqueio do P2Y12R reduziu a área do granuloma hepático num modelo de infecção por *S. Mansoni* e sugere redução do infiltrado eosinofílico granulomatoso sem interferir com a oviposição.

Com objetivo de avaliar se num modelo de inflamação eosinofílica *in vivo* o bloqueio do P2Y12R poderia influenciar no infiltrado inflamatório granulomatoso hepático, em especial com a eosinofilia granulomatosa, os animais foram submetidos ao tratamento com clopidogrel durante 55 dias. Primeiramente, nós buscamos avaliar a biodisponibilidade do clopidogrel administrado via água de bebida, utilizando o protocolo do teste de sangramento da cauda através do método descrito por Broze e colaboradores (2001), tendo por base o fato de que o clopidogrel é utilizado clinicamente como um antiagregante plaquetário. De acordo com a **Fig. 16**, no grupo controle sem tratamento, o sangramento da cauda cessou em menos de 10 min, entretanto, no grupo que recebeu clopidogrel, o sangramento começou a cessar a partir de 60 min. Este resultado é um indicativo do sucesso de nosso protocolo de tratamento no que se relaciona à biodisponibilidade do clopidogrel.

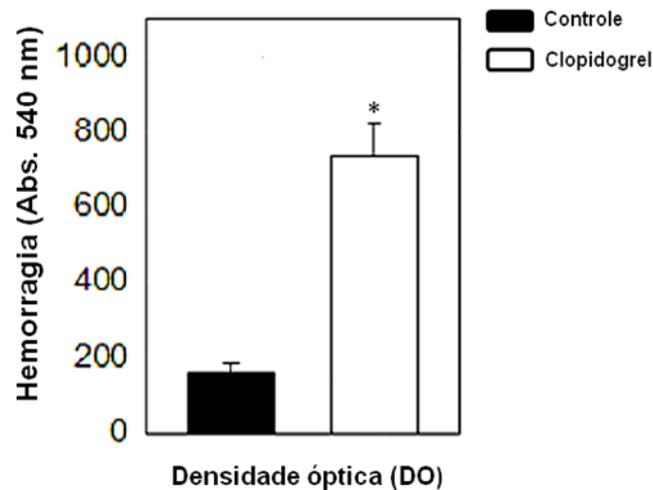


Fig. 16 Teste da eficiência do bloqueio do P2Y12R *in vivo*. O grupo controle recebeu água + DMSO (correspondente à diluição do clopidogrel) e o grupo tratado recebeu clopidogrel 500 µg/mL via água de bebida durante 23 dias. N=4. O gráfico representa a média ± EPM. A comparação entre os grupos foi avaliada pelo teste *t* de Student não pareado, * P<0,001.

A análise microscópica de cortes histológicos de fígados de animais infectados tratados e não tratados com clopidogrel após coloração com HE revela que o tratamento com o clopidogrel reduziu significativamente a área do granuloma hepático. Na **Fig. 17**, as imagens são representativas das diferenças observadas na área dos granulomas (setas) dos animais infectados não tratados (**Fig. 17 - painel A**) e tratados com clopidogrel (**Fig. 17 - painel B**). Uma análise quantitativa das áreas dos granulomas mostra que houve uma redução significativa da área granulomatosa nos animais infectados e tratados com clopidogrel quando comparado aos infectados não tratados (**Fig. 17 - painel C**).

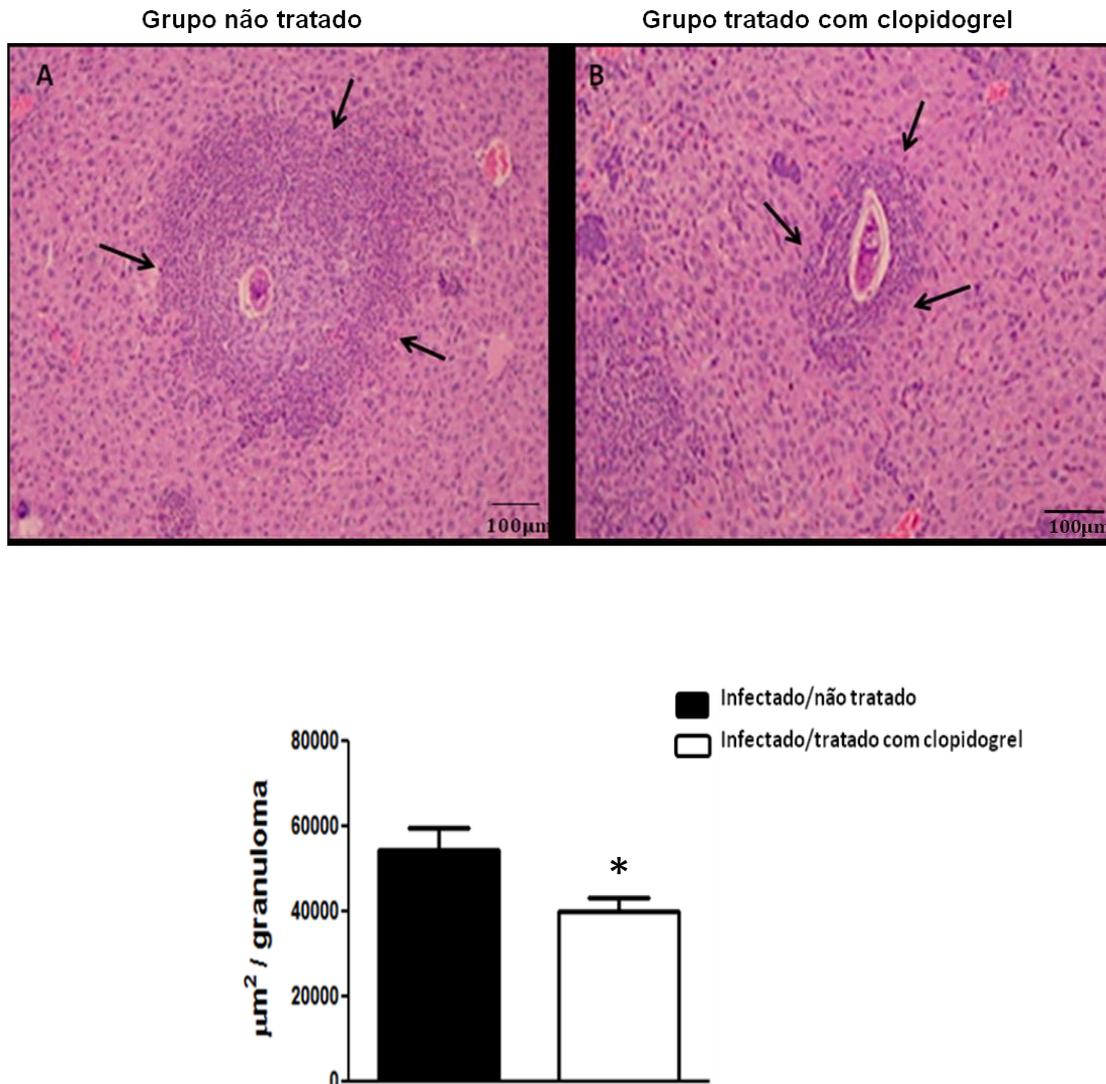


Fig.17: O bloqueio do P2Y12R reduziu a área do granuloma hepático num modelo de infecção por *S. mansoni*. Imagens representativas dos granulomas observados nos animais infectados não tratados (A) e tratados com clopidogrel (B) após coloração com HE. Imagem representativa de 1 experimento (n=5). (C) Quantificação da área dos granulomas através do programa Image J. O gráfico representa a média \pm EPM. A comparação entre os grupos foi avaliada pelo teste *t* de student não pareado. * $p < 0,05$.

Com o objetivo de avaliar diferenças no infiltrado eosinofílico na área do granuloma entre os animais infectados não tratados e tratados com clopidogrel, analisamos as imagens de cortes histológicos dos fígados dos camundongos após coloração com *Sirius Red*, coloração esta que permite uma boa diferenciação dos eosinófilos dos outros tipos celulares. Como ilustrado na **Fig. 18**, a coloração com

Sirius Red permite uma boa visualização dos eosinófilos e diferenças podem ser observadas no grupo não tratado (**Fig.18** painel **A**), onde pode ser visto uma intensa eosinofilia nas adjacências do ovo. Por outro lado, no grupo que recebeu tratamento com clopidogrel o infiltrado eosinofílico parece estar diminuído (**Fig. 18** painel **B**). A análise quantitativa do número de eosinófilos por área do granuloma revela que há uma tendência à diminuição do infiltrado eosinofílico granulomatoso no grupo tratado com clopidogrel, no entanto os valores não foram estatisticamente significativos (**Fig.18** painel **C**).

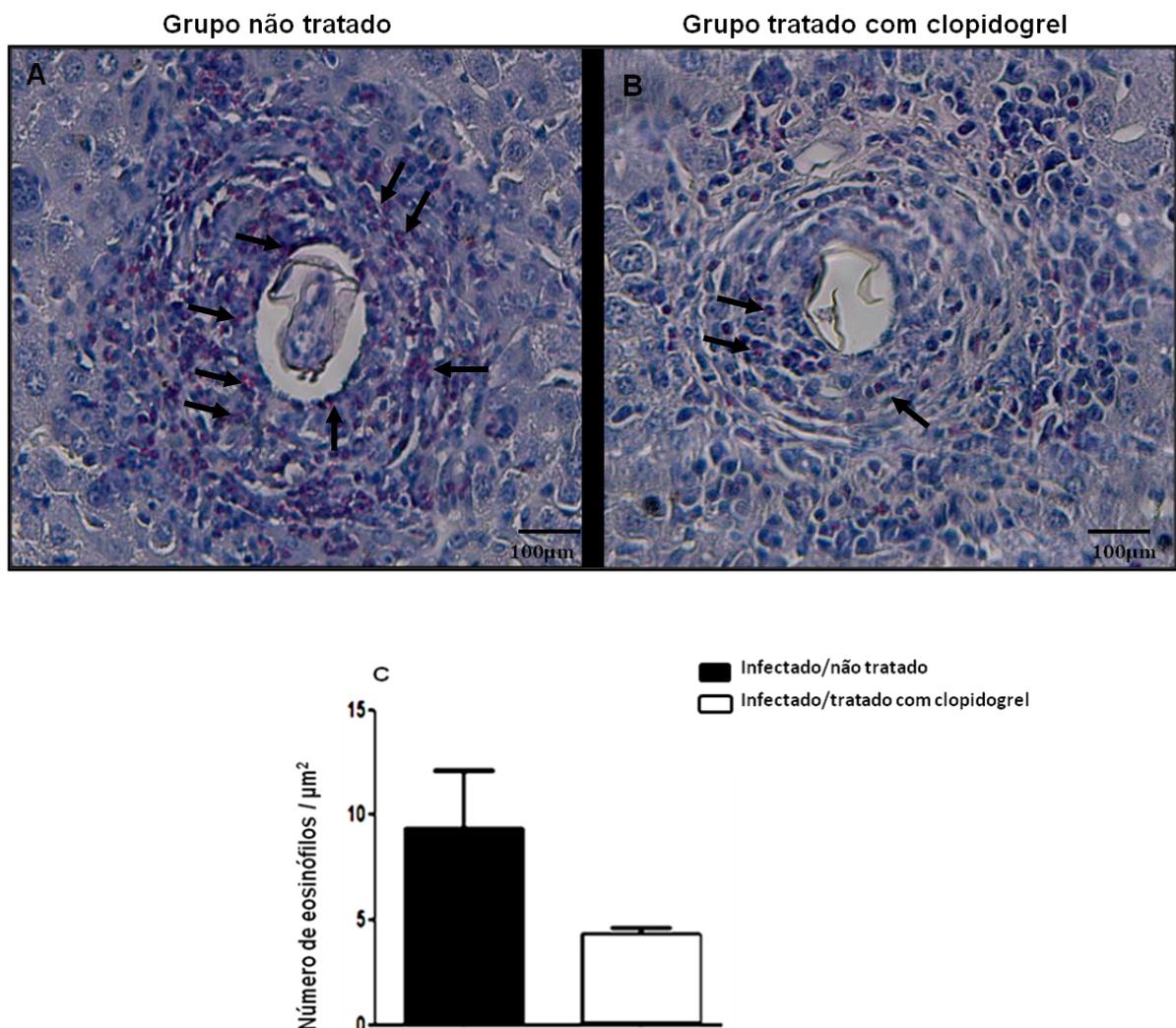


Figura 18: O bloqueio do P2Y12R sugere uma redução do infiltrado eosinofílico granulomatoso. Imagem representativa dos granulomas observados nos animais infectados não tratados (**A**) e tratados com clopidogrel (**B**) após coloração com *Sirius Red* (N=9). (**C**) Quantificação do número de eosinófilos por área do granuloma através do programa Image J (foram avaliados 7 granulomas por animal). O gráfico representa a média ± EPM. A comparação entre os grupos foi avaliada pelo teste *t* de Student não pareado.

Para verificar se o bloqueio do P2Y12R poderia influenciar no processo de oviposição do parasita foi realizada a quantificação de ovos presentes nos tecidos hepático e intestinal dos animais não tratados e tratados com clopidogrel, através da digestão tecidual, com posterior contagem dos ovos. Como se pode observar não houve diferenças significativas na oviposição entre os dois grupos tanto no tecido hepático quanto no intestinal, sugerindo que a redução da resposta inflamatória hepática observada no grupo tratado com clopidogrel não deve ser consequência de uma interferência com a carga parasitária (**Fig.19**).

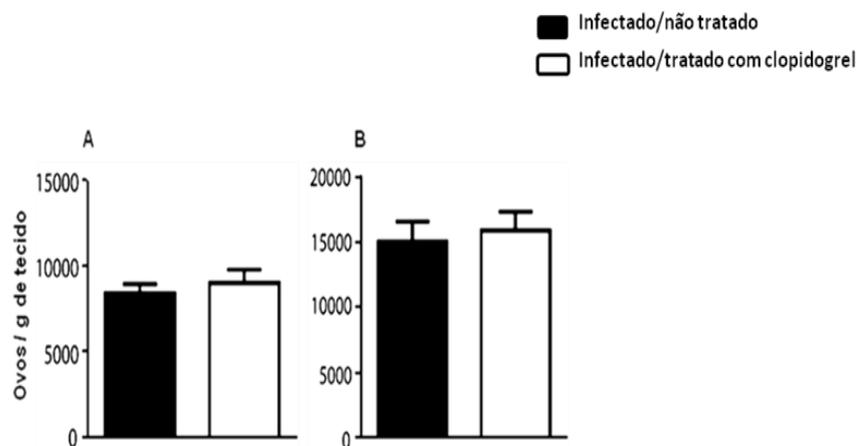


Figura 19: O bloqueio do P2Y12R não interfere com a oviposição. Quantificação dos ovos de *S. mansoni* por grama (g) de tecido no fígado (A) e intestino (B). O gráfico representa a média \pm EPM. A comparação entre os grupos foi avaliada pelo teste *t* de student não pareado. N=5

4.7 O bloqueio do P2Y12R diminui a deposição de colágeno e a produção de IL-13 hepático

No modelo murino de infecção por *S. mansoni* há um aumento característico da deposição de colágeno no fígado, bem como um aumento dos níveis de citocinas Th2 tais como a IL-13 e a IL-4 no tecido hepático. Para avaliar se o bloqueio do P2Y12R poderia influenciar na deposição de colágeno no fígado foi realizado o ensaio de quantificação de hidroxiprolina. Como observado na **Fig. 20** painel A, o tratamento com clopidogrel reduziu de maneira significativa os níveis de hidroxiprolina/g de tecido. De maneira semelhante o tratamento com clopidogrel

também reduziu de forma significativa os níveis de IL-13 no fígado como ilustrado na **Fig. 20** painel **B**.

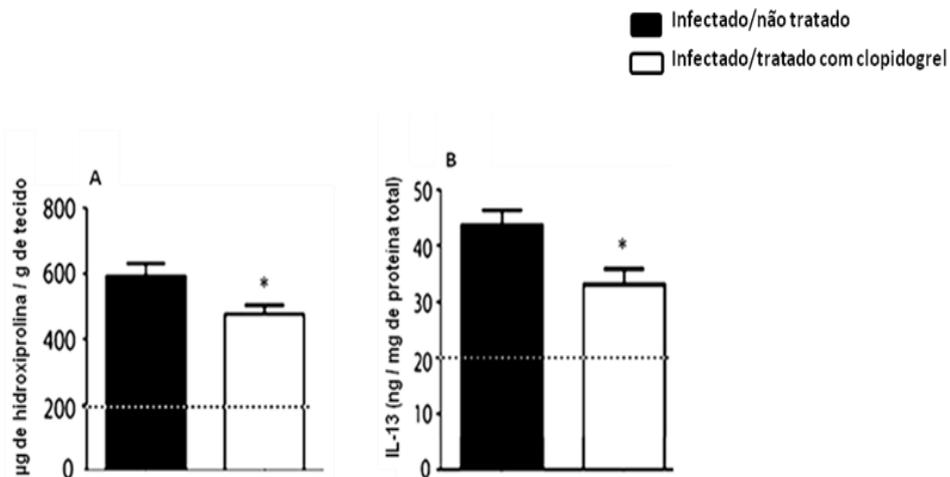


Figura 20: O bloqueio do P2Y12R diminui a deposição de colágeno e a produção de IL-13 hepática induzidos pela infecção com *S. mansoni*. Quantificação de hidroxiprolina (**A**) e IL-13 (**B**) no tecido hepático de animais tratados e não tratados com clopidogrel. O gráfico representa a média \pm EPM. A comparação entre os grupos foi avaliada pelo teste *t* de Student não pareado. * $p < 0,05$, Linha tracejada marca níveis no grupo não infectado, N=7.

4.8 O bloqueio do P2Y12R aumenta a eosinofilia sanguínea e diminui a contagem de eosinófilos na medula

Com objetivo de avaliar se o bloqueio do P2Y12R estaria interferindo com a eosinofilia sanguínea, uma vez que se sabe que no modelo de esquistossomose há um aumento expressivo no número de eosinófilos periféricos, foi realizada a análise de esfregaços de sangue de animais infectados tratados e não tratados com clopidogrel. Como pode ser observado na **Fig. 21A**, o bloqueio do P2Y12R aumentou significativamente o número de eosinófilos circulantes. Na medula o tratamento com clopidogrel diminuiu de maneira significativa a contagem de eosinófilos como o ilustrado na **Fig. 21B**.

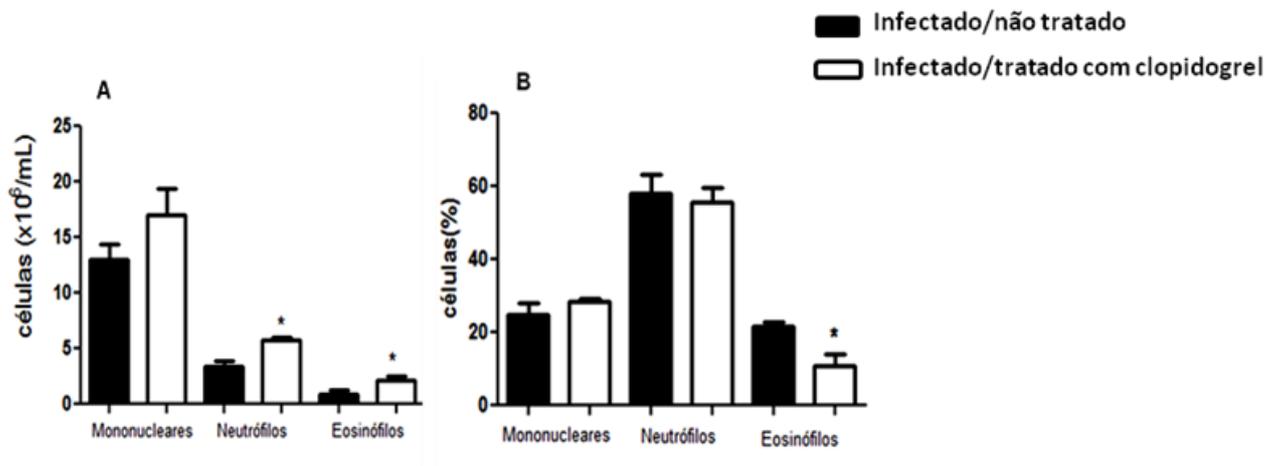


Fig.19 O bloqueio do P2Y12R aumenta a eosinofilia sanguínea e diminui a contagem de eosinófilos na medula. Contagem diferencial de células mononucleares, neutrófilos e eosinófilos no sangue (A) e na medula (B), em esfregaço e citocentrifugados, respectivamente, de animais não tratados e tratados com clopidogrel. O gráfico representa a média \pm EPM. A comparação entre os grupos foi avaliada pelo teste t de Student não pareado. * $p < 0,05$. N= 5

5 DISCUSSÃO

A caracterização da expressão de novos alvos moleculares capazes de modular a função do eosinófilo e a secreção de seu conteúdo granular, bem como interferir com a inflamação eosinofílica em um modelo experimental relevante, é de grande importância, tanto para compreender as respostas inflamatórias eosinofílica em desordens alérgicas e parasitárias, quanto para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas para o tratamento dessas patologias. Neste trabalho demonstramos que o ADP é capaz de ativar eosinófilos humanos isolados levando à secreção de proteínas catiônicas, estando a secreção de EPO claramente dependente do P2Y₁₂R, mas parece não interferir com a sobrevivência ou com a quimiotaxia direta *in vitro* deste tipo celular. Em contrapartida, *in vivo*, a administração de ADP na cavidade peritoneal de camundongos foi quimiotática para granulócitos e células singlec-F positivas enquanto o tratamento com clopidogrel (um antagonista do P2Y₁₂R) foi capaz de modular diferentes aspectos inflamatórios num modelo murino de inflamação eosinofílica induzida pela infecção por *S. mansoni*.

A importância de nucleotídeos (ADP, ATP, UDP e UTP) no meio extracelular para comunicação neuronal e no sistema vascular (agregação plaquetária), tem sido bastante estudada ao longo dos anos, mas o seu papel nas células do sistema imune e nas respostas inata e adaptativa só mais recentemente tem despertado interesse (MYRTEK E IDZKO, 2007). Extracelularmente o ATP é rapidamente hidrolizado a ADP, AMP e adenosina pela ação das ectonucleotidases expressas nas membranas celulares. Uma vez presentes extracelularmente os nucleotídeos são conhecidos por atuar como moléculas endógenas sinalizadoras precoces de “perigo” ou lesão tecidual. Frente a dano ou morte celular o ATP intracelular é liberado e juntamente com os outros nucleotídeos gerados extracelularmente podem funcionar como moléculas sinalizadoras para macrófagos se dirigirem ao sítio inflamado (*find me signal*) promovendo a fagocitose de células apoptóticas (ELLIOTT *et al.*, 2009). Entretanto, mais recentemente, grande atenção tem sido dada às ações imunorregulatórias autócrinas/parácrinas dos nucleotídeos, que mais do que um sinal de alarme de dano celular, estariam então funcionando como um segundo sinal amplificador em resposta a estímulos que não necessariamente levariam a dano ou morte da célula. A título de exemplo, atualmente muitos trabalhos vem mostrando que células do sistema imune como neutrófilos e

macrófagos liberam nucleotídeos em resposta a mediadores quimiotáticos, sendo que uma sinalização autócrina via receptores purinérgicos estaria regulando a quimotaxia dessas células (YU CHEN *et al.*, 2006; CORRIDEN e INSEL, 2010). Desta forma, dentro desse contexto, nosso trabalho pretende discutir um pouco dos mecanismos que regulam a ativação do eosinófilo e a inflamação eosinofílica tendo por base a modulação dos receptores purinérgicos, em especial o P2Y12R.

Neste trabalho, nós reproduzimos e complementamos em nossas condições laboratoriais os achados descritos por Neves e colaboradores (2010) que mostram que eosinófilos humanos expressam o P2Y12R. Através de RT-PCR nós constatamos a expressão do RNAm do P2Y12R em eosinófilos humanos, confirmando que este receptor faz parte constitutivamente do eosinófilo periférico não ativado isolado de sangue humano. Além disso, confirmamos a expressão proteica do P2Y12R nestas células utilizando diferentes técnicas como citometria de fluxo e microscopia de fluorescência. Interessantemente, as imagens de microscopia são sugestivas de uma localização intracelular do P2Y12R. Desta forma, os dados de citometria de fluxo em condições não permeabilizantes, juntamente com os dados de microscopia em situações permeabilizantes revelam que a expressão do P2Y12R não se limita à membrana plasmática. De fato, a expressão do P2Y12R em grânulos eosinofílicos isolados já foi demonstrada anteriormente pelo nosso grupo (NEVES *et al.*, 2010). No mesmo trabalho, Neves e colaboradores (2010) mostraram que tanto eosinófilos como grânulos eosinofílicos isolados expressam o P2Y12R. O trabalho ainda mostra que nos grânulos eosinofílicos isolados esses receptores são funcionais capacitando esses grânulos a funcionarem extracelularmente como organelas secretórias independentes (NEVES *et al.*, 2010). Nossos achados confirmam esses resultados anteriores e, estão de acordo com as discussões recentes baseadas em evidências crescentes que atestam que a expressão de receptores acoplados à proteína G (GPCR) não se restringem à membrana plasmática. Muitos trabalhos discutem que GPCRs são expressos e apresentam-se funcionais em diferentes compartimentos intracelulares (JALINK *et al.*, 2010; CALEBIRO *et al.*, 2010a; 2010b).

Funcionalmente, nossos resultados apontam que o P2Y12R está envolvido com a liberação de peroxidase eosinofílica (EPO), mas parece não interferir com a sobrevida ou com a quimiotaxia *in vitro* de eosinófilos humanos isolados. Nossos

dados de secreção de ECP mediados por ADP contrastam com dados da literatura onde não foi observado nenhum tipo de liberação de ECP quando eosinófilos humanos foram estimulados com ADP, ao contrário do observado para outros nucleotídeos como ATP, UTP e UDP (IDZO *et al.*, 2003). Entretanto, em nossos estudos, utilizamos concentrações de ADP em escala nanomolar condizentes com aquelas descritas como presentes em condições fisiológicas, enquanto nos experimentos realizados por Idzo e colaboradores (2003), as células foram estimuladas por nucleotídeos em concentrações muito mais altas (faixa micromolar). Em condições basais, o ATP está presente intracelularmente em concentrações milimolares (5-10 mM) (TRAUTMANN, 2009). Quando liberado extracelularmente é rapidamente hidrolizado pelas ectonucleotidases a ADP e outros nucleotídeos sendo que seus níveis detectados não ultrapassam a escala nanomolar (FITZ, 2007; TRAUTMANN, 2009). Desta forma acreditamos que a divergência entre os achados pode ter sua explicação nessa diferença entre as concentrações de ADP utilizadas. Ainda neste mesmo trabalho, os autores mostram que os eosinófilos liberam IL-8 em resposta aos diferentes nucleotídeos, menos ao ADP (IDZO *et al.*, 2003). Em nossas condições, ensaios de quantificação de citocinas nos sobrenadantes de eosinófilos estimulados com ADP na presença e na ausência de antagonistas dos P2Y12R e P2Y1R ainda estão em andamento. Esses resultados nos ajudarão a avaliar o papel do P2Y12R numa possível secreção diferencial de citocinas.

Nos ensaios de sobrevivência realizados com a finalidade de se verificar possíveis efeitos pró ou anti apoptóticos mediados pelo ADP, utilizamos as mesmas concentrações que foram capazes de induzir secreção de proteínas catiônicas nas nossas condições. Nos experimentos realizados verificamos possíveis efeitos do ADP na sobrevivência do eosinófilo na presença e na ausência de IL-5. A avaliação dos efeitos do ADP na presença de IL-5 é justificada pelo fato de que esta citocina está presente em sítios de inflamação eosinofílica. Entretanto, independente da IL-5, a porcentagem de células viáveis encontrada no tratamento com ADP não foi alterada em relação às situações controles. Quando utilizamos um antagonista do P2Y12R igualmente, não observamos nenhuma alteração, descartando uma possível participação da liberação de nucleotídeos endógenos na manutenção da sobrevivência do eosinófilo. Na literatura, não há relatos sobre o papel de nucleotídeos ou de receptores purinérgicos na sobrevivência de eosinófilos. Entretanto, para outras células,

em especial macrófagos, o ATP sinalizando via o receptor purinérgico P2X7 parece estar envolvido com um processo de morte celular que envolve ativação de proteínas do inflamasoma denominado piroptose (FERNANDES-ALNEMRI *et al.*, 2007).

Em nossos ensaios de quimiotaxia, o ADP não se mostrou quimotático para eosinófilos humanos nas concentrações em que foram capazes de induzir secreção de proteínas catiônicas em nossas condições. Vários trabalhos na literatura sugerem que nucleotídeos como o ADP e ATP são quimotáticos para eosinófilos (BURGES *et al.*, 1993; IDZKO *et al.*, 2001; MÜLLER *et al.*, 2010) e outros tipos celulares (LIU *et al.*, 1999; YU CHEN *et al.*, 2006; KRONLAGE e INSEL, 2010). Burgers e colaboradores (1993) descreveram que o ATP secretado por plaquetas ativadas por trombina é capaz de promover influxo de cálcio e ter efeito quimiotático sobre eosinófilos humanos (BURGES *et al.*, 1993). Esses primeiros estudos foram depois confirmados por outros onde ATP, ADP e outros nucleotídeos foram capazes de induzir a geração de espécies reativas de oxigênio, aumentar a expressão de CD11b e atuar como agentes quimiotáticos para eosinófilos humanos isolados (IDZKO *et al.*, 2001; FERRARI *et al.*, 2006; DICHMANN *et al.*, 2000; MYRTEK e IDZKO, 2007). Entretanto, o intrigante é que esses mesmos trabalhos utilizam ADP em escalas de concentração suprafisiológicas na faixa de micromolar, não observando os efeitos celulares acima relatados em concentrações menores. Nosso questionamento é se a utilização de concentrações altas de nucleotídeos nesses experimentos descritos na literatura não estaria criando situações artificiais, onde o efeito observado seria na verdade resultante da combinação de várias ações do ADP em diferentes receptores e sítios celulares, não configurando um efeito fisiologicamente relevante.

De fato, muitos trabalhos mostram o efeito quimiotático de ATP, ADP e outros nucleotídeos em diferentes células do sistema imune como neutrófilos, mastócitos, linfócitos, células dendríticas e macrófagos (para revisão ver Myrtek e Idzko, 2007). Mais uma vez, na maioria deles, as concentrações de estímulo utilizadas são da escala de micromolar (suprafisiológica) e a quimiotaxia é avaliada através de sistema *transwell* ou câmara de Boyden (McCLOSKEY *et al.*, 1999; KRONLAGE *et al.*, 2010). Entretanto, recentemente, alguns artigos utilizando um elegante método microscópico onde é possível se avaliar a velocidade e o movimento de cada célula, revelam que os nucleotídeos teriam uma ação no aumento do movimento randômico

dos macrófagos (quimiocinesia), mas não um efeito quimiotático propriamente dito (HANLEY *et al.*, 2010; ISFORT *et al.*, 2011). Kronlage e colaboradores (2010) demonstram que a quimiotaxia mediada pelo fragmento do complemento C5a em macrófagos está na dependência da ativação autócrina/parácrina dos receptores P2Y12 e P2Y2 enquanto Isfort e colaboradores (2011) mostram que estes mesmos receptores são importantes para a quimiocinesia, mas não constituem estímulos quimiotáticos para macrófagos, contrariando inclusive a teoria de que nucleotídeos funcionariam como moléculas atratoras (*find me*) de macrófagos para sítios inflamados (KRONLAGE *et al.*, 2010; ISFORT *et al.*, 2011). Ainda nestes trabalhos é discutido que nos sistemas *transwell* ou câmara de Boyden muitas vezes um aumento da quimiocinesia é interpretado erroneamente como quimiotaxia, fato que se agrava principalmente quando os estímulos são utilizados em concentrações altas ou não fisiológicas. Desta forma a ausência de efeito quimiotático mediado pelo ADP em nossos resultados não descarta por completo uma participação do P2Y12R na quimiotaxia. Uma ação autócrina/parácrina do P2Y12R na quimiotaxia induzida por eotaxina ou complemento em eosinófilos humanos será avaliada em experimentos futuros.

A utilização do ADP em nossas condições experimentais com o objetivo de se investigar o efeito do P2Y12R em diferentes aspectos da ativação do eosinófilo (secreção de proteínas catiônicas, sobrevivência e quimiotaxia), paralelamente ao uso de antagonistas P2Y12R e P2Y1R, justifica-se pelo fato de que o ADP parece ativar seletivamente os receptores P2Y1, P2Y12 e P2Y13. Os eosinófilos reconhecidamente expressam os receptores P2Y1 e P2Y12 e até o presente momento não há relatos da expressão do P2Y13R neste tipo celular. Além disso, há uma diferença de afinidade entre esses receptores e o ADP. O ADP ativa os receptores purinérgicos P2Y1, P2Y12 e P2Y13 com valores de EC_{50} de 8, 0,07 e 0,06 μ M, respectivamente (JUNGER, 2011). Logo, uma certa seletividade do ADP para o P2Y12R é esperada em nossas condições experimentais em relação ao P2Y1R. Um outro ponto importante a ser discutido é o fato de que muitos trabalhos questionam a estabilidade dos nucleotídeos quando utilizados como ferramenta experimental, uma vez que são suscetíveis à ação das ectonucleotidases expressas nas membranas de vários tipos celulares (KRONLAGE e INSEL, 2010; JUNGER, 2011). Muitos estudos, em paralelo ao uso do ADP, também utilizam seu análogo

menos suscetível à ação das ectonucleotidases conhecido como ADP β S. De uma maneira geral esses trabalhos não mostram diferenças significativas de resposta quando se usa o ADP ou o ADP β S, mas variações podem ocorrer de acordo com a condição experimental ou o tipo celular utilizado. Em contrapartida muitos estudos também verificam se a adição de apirase às condições experimentais, uma enzima que hidroliza nucleotídeos tri ou di fosfatados, abole o efeito induzido pelo nucleotídeo. No caso específico de nossos resultados, não há relatos na literatura que descrevam a capacidade de metabólitos do ADP (AMP ou adenosina) em promover ações biológicas que sejam suscetíveis ao bloqueio do P2Y₁₂R. Entretanto, devido à ausência de efeito na sobrevida e na quimotaxia mediada por ADP, não descartamos a possibilidade de incluir o ADP β S em experimentos futuros, para fins de comprovação.

Curiosamente, observamos um efeito quimiotático para granulócitos e células Singlec-F positivas *in vivo* quando ADP foi injetado na cavidade peritoneal de camundongos. No camundongo, o anticorpo anti-Singlec-F tem sido descrito como uma ferramenta importante para marcação e diferenciação de eosinófilos de outros granulócitos. Desta maneira, esses resultados sugerem que *in vivo*, o ADP é capaz de recrutar eosinófilos. Uma das hipóteses é que esse recrutamento possa estar acontecendo de uma maneira indireta via ativação de células residentes da cavidade peritoneal (como por exemplo macrófagos) e liberação de substâncias quimiotáticas (citocinas, quimiocinas) para eosinófilos/neutrófilos. Uma outra hipótese é que este ADP (um clássico agregante plaquetário) possa estar sendo capaz de promover agregação e desgranulação plaquetária na microcirculação da cavidade peritoneal com consequente recrutamento de granulócitos. Já foi descrito que plaquetas ativadas são capazes de recrutar eosinófilos *in vitro* (BURGERS *et al.*, 1993). Além disso, sabe-se que seus grânulos estocam uma série de mediadores inflamatórios inclusive nucleotídeos (ATP, ADP). Entretanto experimentos confirmando a magnitude e caracterizando a migração de eosinófilos (e ou neutrófilos) para o peritônio de animais desafiados com ADP precisam ainda ser repetidos e/ou confirmados, assim como ainda é preciso se avaliar o efeito de um antagonista P2Y₁₂R nesta resposta. Além disso, experimentos capazes de evidenciar a participação das plaquetas, macrófagos e/ou de outros mediadores oriundos de

células residentes da cavidade nesta resposta mediada pelo ADP estão em andamento.

A fim de avaliar a participação do P2Y₁₂R *in vivo* num modelo de inflamação eosinofílica relevante, utilizamos um modelo murino de infecção com *S. mansoni*. Infecções parasitárias causadas por helmintos, como a causada por *S. mansoni*, representam uma das causas mais comuns de eosinofilia periférica persistente. A infecção causada por *S. mansoni* causa aumento dramático de eosinopoiese e do número de eosinófilos no sangue, assim como nos granulomas que se formam em resposta aos ovos do parasita, num processo claramente dependente de citocinas Th2 (LENZI *et al.*, 1987; SHER *et al.*, 1990; BLANCHARD E ROTHENBERG 2009).

Nos nossos experimentos, três dias antes e durante todo o período da infecção por *S. mansoni*, os animais foram tratados com clopidogrel, um antagonista do P2Y₁₂R, utilizado clinicamente como antiagregante plaquetário. O clopidogrel é um pró-fármaco e é convertido *in vivo* a metabólito ativo que se liga covalentemente ao P2Y₁₂R inativando-o irreversivelmente (SAVI *et al.*, 2006). Interessantemente, observamos que os animais tratados com clopidogrel apresentaram uma redução significativa da área do granuloma hepático, bem como uma redução da deposição de colágeno e da produção de IL-13 no fígado. A fibrose hepática é uma característica importante na infecção por *S. mansoni* e a IL-13 é uma citocina com propriedades pró-fibróticas, secretada por células típicas da resposta Th2 incluindo eosinófilos (SPENCER *et al.*, 2009). Além disso, observamos uma sugestiva redução do número de eosinófilos infiltrados no granuloma, embora estatisticamente essa diminuição não tenha se apresentado significativa. A redução dos níveis de IL-13 e de deposição de colágeno nos homogenados de fígado podem ser reflexo da diminuição do infiltrado inflamatório hepático, embora um efeito específico na produção dos mesmos não possa ser descartado. No sangue periférico observamos um aumento da eosinofilia enquanto na medula observou-se uma diminuição da contagem de eosinófilos. A redução sugestiva do infiltrado inflamatório granulomatoso eosinofílico ao redor dos ovos de *S. mansoni* no fígado pode indicar um papel do P2Y₁₂R no recrutamento de eosinófilos para esses sítios infectados. Em contrapartida, essa redução de eosinófilos no infiltrado granulomatoso também pode ser um reflexo de um possível efeito do bloqueio no P2Y₁₂R na expressão de moléculas de adesão, uma vez que observou-se um aumento significativo da

eosinofilia sanguínea. Uma modulação negativa da expressão de moléculas de adesão resultante do bloqueio do P2Y₁₂R impediria ou dificultaria a migração dos eosinófilos dos leitos vasculares para os sítios inflamados, gerando um aumento do seu número no sangue periférico. Em contrapartida, não podemos descartar a hipótese de que essa eosinofilia sanguínea poderia ser consequência não de uma diminuição da transmigração de eosinófilos para os tecidos periféricos, mas de um aumento da mobilização de eosinófilos da medula, uma vez que observou-se uma diminuição da porcentagem de eosinófilos presentes no lavado medular nos animais tratados com clopidogrel. Experimentos avaliando o efeito da ativação ou bloqueio do P2Y₁₂R sobre a expressão de moléculas de adesão em eosinófilos serão realizados para ajudar a esclarecer este ponto. Possíveis efeitos do bloqueio do P2Y₁₂R na oviposição do parasita foram descartados, uma vez que não houve diferença na carga parasitária entre os animais infectados tratados e não tratados com clopidogrel.

Esses últimos resultados somados à capacidade do ADP de recrutar células singlec-F *in vivo* e ativar eosinófilos humanos *in vitro* são muito sugestivos de que o P2Y₁₂R tem um papel importante para o estabelecimento da inflamação eosinofílica, entretanto alguns experimentos ainda são necessários para um melhor delineamento dos mecanismos envolvidos.

6 CONCLUSÃO

Nossos achados apontam o P2Y₁₂R como um receptor importante para a ativação do eosinófilo e consequente secreção de EPO *in vitro*, embora pareça não interferir com a sobrevivência ou a quimiotaxia deste tipo celular. *In vivo*, a administração de ADP na cavidade peritoneal de camundongos foi quimiotática para granulócitos e células singlec-F positivas enquanto o tratamento com clopidogrel (um antagonista do P2Y₁₂R) foi capaz de modular diferentes aspectos inflamatórios num modelo murino de inflamação eosinofílica induzida pela infecção por *S. mansoni*. Nossos resultados são muito sugestivos de que o P2Y₁₂R tem um papel importante para o estabelecimento da inflamação eosinofílica, entretanto alguns experimentos ainda são necessários para um melhor delineamento dos mecanismos envolvidos.

7 REFERÊNCIAS

- Aceves, S. S., Broide, D. H. (2008) Airway fibrosis and angiogenesis due to eosinophil trafficking in chronic asthma. *Curr Mol Med* 8:350–358.
- Ackerman, S. J., Gleich, G. J., Loegering, D. A., Richardson, B. A., Butterworth, A. E. (1985) Comparative toxicity of purified human eosinophil granule cationic proteins for schistosomula of *Schistosoma mansoni*. *Am.J.Trop.Med. Hyg* 34(4): 735-45.
- Akuthota, P., Wang, H. B., Spencer, L. A., Weller, P. F. (2008) Immunoregulatory roles of eosinophils: a new look at a familiar cell. *Clin Exp Allergy* 38:1254–1263
- Andrade, Z. A. (2009) Schistosomiasis and liver fibrosis. *Parasite Immunol* 31 (11) 656-63.
- Angata, T., Hingorani, R., Varki, N. M., Varki, A. (2001) Cloning and characterization of a novel mouse Siglec, mSiglec-F: differential evolution of the mouse and human (CD33) Siglec-3-related gene clusters. *J Biol Chem.* 276:45128-45136.
- Anthony, R. M., Rutitzky, L. I., Urban, Jr. J. F., Stadecker, M. J., Gause, W. C. (2007) Protective immune mechanisms in helminth infection. *Nat Rev Immunol* 7:975-87.
- Bandeira-Melo, C., Sugiyama, K., Woods, L. J., Weller, P. F. (2001a) Cutting edge: eotaxin elicits rapid vesicular transport-mediated release of preformed IL-4 from human eosinophils. *J.Immunol.* 166 (8):4813-7.
- Bandeira-Melo C, Phoofolo M, Weller PF. (2001b) Extranuclear lipid bodies, elicited by CCR3-mediated signaling pathways, are the sites of chemokine-enhanced leukotriene C4 production in eosinophils and basophils. *J Biol Chem.* 276(25):22779-87.
- Bandeira-Melo, C., Sugiyama, K. L. J., Woods, M., Phoofolo, D. M., Cruikshank, C. W. W., Weller, P. F. (2002) IL-16 promotes leukotriene C(4) and IL-4 release from

human eosinophils via CD4- and autocrine CCR3-chemokine-mediated signaling. *J. Immunol.* 168, 4756–4763..

Beninati, W., Derdak, S., Dixon, P. F, Grider, D. J, Strollo, D. C., Hensley, R. E., Lucey, D. R (1993) Pulmonary eosinophils express HLA-DR in chronic eosinophilic pneumonia. *J Allergy Clin Immunol* 92: 442–449.

Behzad, A. R., Walker, D. C., Abraham, T., McDonough, J., Mahmudi-Azer, S., Chu, F., Shaheen, F., Hogg, J. C., Pare, P. D. (2010) Localization of DNA and RNA in eosinophil secretory granules. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 152, 12–27.

Bhardwaj, R., Skelly, P. J. (2009) Purinergic signaling and immune modulation at the schistosome surface? *Trends Parasitol.* 25 (6): 256-60

Blanchard, C., Rothenberg, M. E. (2009) Biology of the eosinophil. *Adv. Immunol.* 101, 81–121.

Bours, M. J., Swennen, E. L., Di Virgilio, F., Cronstein, B. N., Dagnelie, P. C. (2006) Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. *Pharmacol Ther.* 112(2): 358-404.

Bozza, P. T., Yu, W., Penrose, J. F., Morgan, E. S., Dvorak, A. M., Weller, P. F. (1997) Eosinophil lipid bodies: specific, inducible intracellular sites for enhanced eicosanoid formation. *J.Exp.Med.* 186 (6):909-20.

Bozza, P. T., Yu, W., Cassara, J., Weller, P. F. (1998) Pathways for eosinophil lipid body induction: differing signal transduction in cells from normal and hypereosinophilic subjects. *J.Leukoc.Biol.* 64 (4): 563-9.

Broze, G. J., Yin, ZF., Lasky, N. (2001) A tail vein bleending time model and delayed bleending in hemophiliac mice. *Thromb Haemost.* 85: 757-8.

Brunet, L. R., Sabin, E. A., Cheever, A. W., Kopf, M. A., Pearce, E. J. (1999) Interleukin-5 (IL-5) is not required for expression of a Th2 response of host resistance mechanisms during murine schistosomiasis mansoni but does play a role in development of IL-4 producing non-T non-B cells. *Infect Immun* 67: 3014-3018.

Burgers, J. A., Schweizer, R. C., Koenderman, L., Bruijnzeel, P. L., Akkerman, J. W. (1993) Human platelets secrete chemotactic activity for eosinophils. *Blood*. 81 (1): 49-55.

Busse, W. W., Ring, J., Huss-Marp, J., Kahn, J. E. (2010) A review of treatment with mepolizumab, an anti-IL-5 mAb, in hypereosinophilic syndromes and asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 125, 803–813.

Butterworth, A. E., Wassom, D. L., Gleich, G. J., Loegering, D. A., David, J. R. (1979) Damage to schistosomula of *Schistosoma mansoni* induced directly by eosinophil major basic protein. *J Immunol* 122:221–229.

Calebiro, D., Nikolaev, V. O., Lohse, M. J. (2010a) Imaging of persistent cAMP signaling by internalized G protein-coupled receptors. *J Mol Endocrinol* 45 (1): 1-8.

Calebiro, D., Nikolaev, V. O., Persani, L., Lohse, M. J. (2010b) Signaling by internalized G-protein-coupled receptors. *Trends Pharmacol Sci.* 31 (5): 221-8.

Capron M, Capron A. (1992) Effector functions of eosinophils in schistosomiasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 87 (Suppl. 4):167-70.

Carlson, M. G., Peterson, C. G., Venge, P. (1985) Human eosinophil peroxidase: purification and characterization. *Journal Immunol* 134:1875–1879.

Cheever, A. W. (1968) Conditions affecting the accuracy of potassium hydroxide digestion techniques for counting *Schistosoma mansoni* eggs in tissues. *Bull World Health Organ* 39: 328-31.

Cheever, A. W.; Dunn, M. A.; Dean, D. A. E Duvall, R. H. (1983) Differences in hepatic fibrosis in ICR, C3H, and C57BL/ 6 mice infected with *Schistosoma mansoni*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 32 (6): 1364-9.

Cheng, J. F., Ott, N. L., Peterson, E. A., George, T. J., Hukee, M. J., Gleich, G. J., Leiferman, K. M (1997) Dermal eosinophils in atopic dermatitis undergo cytolytic degeneration. *J Allergy Clin Immunol*, 99: 683-692.

Cherry, W. B., Yoon, J., Bartemes, K. R., Lijima, K., Kita, H. (2008) A novel IL-4 family cytokine, IL-33, potently activates human eosinophils. *J. Allergy Clin. Immunol.* 121, 1484-1490 .

Cormier, S. A., Taranova, A. G., Bedient, C., Nguyen, T., Protheroe, C., Pero, R., Dimina, D., Ochkur, S. I., O'Neill, K., Colbert, D., Lombardi, T. R., Constant, S. McGarry, M. P., Lee, J. J., Lee, N. A. (2006) Pivotal Advance: eosinophil infiltration of solid tumors is an early and persistent inflammatory host response. *J Leukoc Biol* 79:1131–1139

Corriden, R., Insel, P. A. (2010) Basal release of ATP: Autocrine-paracrine mechanism for cell regulation. *Science Signaling* 3 (104): 1-12.

Corrigan, C. J., Wang, W., Meng, Q., Fang, C., Eid, G., Caballero, B., Ze Lv, Yunqing An., Wang, Y., Liu, Y., A, Barry Kay., Lee, T. (2011) Allergen-induced expression of IL-25 and IL-25 receptor in atopic asthmatic airways and late-phase cutaneous responses. *J. Allergy Clin. Immunol.* 128, 116–124.

Davies, S. J., Smith, S. J., Lim, K. C., Zhang, H., Purchio, A. F., McKerrow, J.H. (2005) *In vivo* imaging of tissue eosinophilia and eosinopoietic responses to schistosome worms and eggs. *Int J Parasitol* 35:851-9.

Di Virgilio, F., Chiozzi, P., Ferrari, D., Falzoni, S., Sanz, J. M. (2001) Nucleotide receptors: na emerging family of regulatory molecules in blood cells. *Blood* 97: 587-600.

Dombrowicz, D., Quatannens, B., Papin, J. P., Capron, A., Capron, M. (2000) Expression of a functional Fc epsilon RI on rat eosinophils and macrophages. *J Immunol* 165:1266-71.

Dvorak, A.M., Morgan, E.S., Tzizik, D.M., Weller, P.F. (1994) Prostaglandin endoperoxide syntase (cicloxygenase): Ultrastructural localization to nonmembrane-bound cytoplasmic lipid bodies in human eosinophil and 3T3 fibroblasts. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 105:3, 245-250.

Dvorak, A. M., Letourneau, L., Login, G. R., Weller, P. F., Ackerman, S. J. (1988) Ultrastructural localization of the Charcot-Leyden crystal protein (lysophospholipase) to a distinct crystalloid-free granule population in mature human eosinophils. *Blood*.72:150-8.

Dvorak, A. M., Weller, P. F. (2000) Ultrastructural analysis of human eosinophils. In: Human eosinophils: Biological and chemical aspects. Marone G. (ed). *Basel. Karger.* 1-28.

Dubucquoi, S., Desreumaux, P., Janin, A., Klein, O., Goldman, M., Tavernier, J., Capron, A., Capron, M., (1994) Interleukin 5 synthesis by eosinophils: association with granules and immunoglobulin-independent secretion. *The Journal of Experimental Medicine*, 179:703–708.

Duez, C., Dakhama, A., Tomkinson, A., Marquillies, P., Balhorn, A., Tonnel, A. B., Bratton, D. L., Gelfand, E. W (2004) Migration and accumulation of eosinophils toward regional lymph nodes after airway allergen challenge. *J Allergy Clin Immunol* 114:820–825.

Elliott, M.R., Chekeni, F. B., Trampont, P. C., Lazarowski, E. R., Kadl, A., Walk, S. F., Park, D., Woodson, R. I., Ostankovich, M., Sharma, P., Lysiak, J. J., Harden, T. K., Leitinger, N., Ravichandran, K. S. (2009) Nucleotides released by apoptotic cells act as a find-me signal to promote phagocytic clearance. *Nature* 461 (7261):282-6.

Erjefält J. S., Greiff, L., Andersson M., Matsson, E., Petersen, H., Linden, M., Ansari, T., Jeffery, P. K., Persson, C.G. (1999) Allergen-induced eosinophil cytolysis is a

primary mechanism for granule protein release in human upper airways. *Am J Respir Crit Care Med* 160 (1):304-12.

Erjefalt, J. S., Greiff, L., Andersson, M., Adelroth, E., Jeffery, P. K., Persson, C. G. (2001) Degranulation patterns of eosinophil granulocytes as determinants of eosinophil driven disease. *Thorax* 56, 341–344.

Fabre, V., Beiting, D. P., Bliss, S. K., Gebreselassie, N. G., Gagliardo, L. F., Lee, N. A., Lee, J. J., Appleton, J. A (2009) Eosinophil deficiency compromises parasite survival in chronic nematode infection. *J Immunol* 182:1577–1583.

Fallarino, F., Grohmann, U., Vacca, C., Bianchi, R., Orabona, C., Spreca, A., Fioretti, M. C., Puccetti, P. (2002) T cell apoptosis by tryptophan catabolism. *Cell Death Differ* 9:1069–1077.

Fernandes-Alnemri, T., J Wu, J., Yu, J-W., P Datta, P., Miller, B., W Jankowski, W., Rosenberg, S., Zhang, J., Alnemri, E. S. (2007) The pyroptosome: a supramolecular assembly of ASC dimers mediating inflammatory cell death via caspase-1 activation. *Cell Death and Differentiation* 14, 1590–1604.

Feng, C., Mery, A. G., Beller, E. M., Favot, C., Boyce, J. A. (2004) Adenine nucleotides inhibit cytokine generation by human mast cells through a Gs-coupled receptor. *Journal of Immunology*, 173, 7539.

Feng, Y. H., Mao, H. (2012) Expression and preliminary functional analysis of Siglec-F on mouse macrophages. *J Zhejiang Univ Sci B*. 13 (5):386-94

Ferrari D., La Sala, A., Panther, E., Norgauer, J., Di Virgilio, F., Idzko, M. (2006) Activation of human eosinophils via P2 receptors: novel findings and future perspectives. *J Leukoc Biol* 79:7-15.

Foster, P., Hogan, S., Ramsay, A., Matthaei, K., Young, I. (1996) Interleukin-5 deficiency abolishes eosinophilia, airways hyperreactivity, and lung damage in a mouse asthma model. *J. Exp. Med.* 183, 195–201.

Gentil, K., Hoerauf, A., Layland, L. E. Eosinophil-Mediated Responses Toward Helminths in Lee, J. J., Rosenberg, H. F. (2013) Eosinophils in Health and disease; USA; Elsevier 10.2: 303-312.

Grewe, M., Czech, W., Morita, A., Werfel, T., Klammer, M., Kapp, A., Ruzicka, T., Schopf, E., Krutmann, J. (1998) Human eosinophils produce biologically active IL-12: implications for control of T cell responses. *J. Immunol.* 161, 415–420.

Gurish, M. F., Humbles, A., Tao, H., Finkelstein, S., Boyce, J. A., Gerard, C., Friend, D. S., Austen, K. F (2002) CCR3 is required for tissue eosinophilia and larval cytotoxicity after infection with *Trichinella spiralis*. *J Immunol* 168:5730–5736.

Hamann, K. J., Gleich, G. J., Checkel, J. L., Loegering, D.A., McCall, J. W., Barker, R. L. (1990) *In vitro* killing of microfilariae of *Brugia pahangi* and *Brugia malayi* by eosinophil granule proteins. *J Immunol* 144:3166–3173.

Hanley, P. J., Musset, B., Renigunta, V., Limberg, S. H., Dalpke, A. H, Sus, R., Heeg, K. M., Preisig-Müller, R., Daut, J. (2004) Extracellular ATP induces oscillations of intracellular Ca²⁺ and membrane potential and promotes transcription of IL-6 in macrophages. *Proc Natl Acad Sci* 101 (25): 9479-84.

Hanley, P.J., Xu, Y., Kronlage, M., Grobe, K., Schön, P., Song, J., Sorokin, L., Schwab, A., Bähler, M. (2010) Motorized RhoGAP myosin IXb (Myo9b) controls cell shape and motility. *Proc Natl Acad Sci* 107 (27): 12145-50.

Hansel, T. T., Braunstein, J. B., Walker, C., Blaser, K., Bruijnzeel, P. L., Virchow, J. C. Jr., Virchow, C. Sr. (1991) Sputum eosinophils from asthmatics express ICAM-1 and HLA-DR. *Clin Exp Immunol* 86: 271–277.

Herbert, D. R., Lee, J. J., Lee, N. A., Nolan, T. J., Schad, G. A., Abraham, D. (2000) Role of IL-5 in innate and adaptive immunity to larval *Strongyloides stercoralis* in mice. *J Immunol* 165:4544–4551.

Hirasawa, R., Shimizu, R., Takahashi, S., Osawa, M., Takayanagi, S., Kato, Y., Onodera, M., Minegishi, N., Yamamoto, M., Fukao, K., Taniguchi, H., Nakauchi, H., Iwama, A. (2002) Essential and instructive roles of GATA factors in eosinophil development. *J. Exp. Med.* 195, 1379–1386.

Hogan, S. P., Rosenberg, H. F., Moqbel, R., Phipps, S., Foster, P. S., Lacy, P., Kay, A. B., Rothenberg, M. E. (2008) Eosinophils: biological properties and role in health and disease. *Clin. Exp. Allergy* 38(5): 709-50.

Humbles, A. A., Lloyd, C. M., McMillan, S. J., Friend, D. S., Xanthou, G., McKenna, E. E., Ghiran, S., Gerard, N. P., Yu, C., Orkin, S. H., Gerard, C. (2004) A critical role for eosinophils in allergic airways remodeling. *Science* 305:1776–1779.

Idzko, M., Dichmann, S., Panther, E., Ferrari, D., Herouy, Y., Virchow, C. Jr., Luttmann, W., Di Virgilio, F., Norgauer, J. (2001) Functional characterization of P2Y and P2X receptors in human eosinophils. *Journal of Cellular Physiology* 188 (3) 329–336.

Idzko, M., Panther, E., Bremer, H. C., Sorichter, S., Luttmann, W., Virchow, C. J. Jr, Di Virgilio, F., Herouy, Y., Norgauer, J., Ferrari, D. (2003) Stimulation of P2 purinergic receptors induces the release of eosinophil cationic protein and interleukin-8 from human eosinophils. *Br J Pharmacol* 138 (7):1244-50.

Inoue, Y., Matsuwaki, Y., Shin, S. H., Ponikau, J. U., Kita H (2005) Nonpathogenic, environmental fungi induce activation and degranulation of human eosinophils. *J Immunol* 175: 5439–5447.

Isfort, K., Ebert, F., Bornhorst, J., Sargin, S., Kardakaris, R., Pasparakis, M., Bähler, M., Schwerdtle, T., Schwab, A., Hanley, P. J. (2011) Real-time imaging reveals that P2Y2 and P2Y12 receptor agonists are not chemoattractants and macrophage chemotaxis to complement C5a is phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)- and p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK)-independent. *J Biol Chem* 286 (52): 44776-87.

Jalink, K., Moolenaar, W. H. (2010) G protein-coupled receptors: the inside story. *Bioessays* 32 (1): 13-6.

Junger, W. G. (2011) Immune cell regulation by autocrine purinergic signaling. *Nature Rev.* 11: 201-212.

Kephart, G. M., Andrade, Z. A., Gleich, G. J. (1988) Localization of eosinophil major basic protein onto eggs of *Schistosoma mansoni* in human pathologic tissue. *Am J Pathol* 133: 389e96.

Kita, H. (2011) Eosinophils: multifaceted biological properties and roles in health and disease. *Immunol. Rev* 242: 161–177.

Klion, A. D., Nutman, T. B. (2004) The role of eosinophils in host defense against helminth parasites. *J Allergy Clin Immunol* 113: 30-37.

Kouro, T., Takatsu, K. (2009) IL-5- and eosinophil-mediated inflammation: from discovery to therapy. *International Immunology* 21: 1303-1309.

Kronlage, M., Song, J., Sorokin, L., Isfort, K., Schwerdtle, T., Leipziger, J., Robaye, B., Conley, P. B., Kim, H. C., Sargin, S., Schön, P., Schwab, A., Hanley, P. J. (2010) Autocrine purinergic receptor signaling is essential for macrophage chemotaxis. *Sci Signal.* 3 (132):ra55.

Lee, J. J., Dimina, D., Macias, M. P., Ochkur, S. I., McGarry, M. P., O'Neill, K. R., Protheroe, C., Pero, R., Nguyen, T., Cormier, S. A., Lenkiewicz, E., Colbert, D., Rinaldi, L., Ackerman, S. J., Irvin, C. G., Lee, N. A (2004) Defining a link with asthma in mice congenitally deficient in eosinophils. *Science* 305:1773–1776.

Leitch, V. D., Strudwick, X. L., Matthaei, K. I., Dent, L. A., Cowin, A. J. (2009) IL-5-overexpressing mice exhibit eosinophilia and altered wound healing through mechanisms involving prolonged inflammation. *Immunology and Cell Biology.* 87 (2): 131-40.

Lenzi, H. L., Sobral, A. C., Lenzi, J. A. (1987) "In vivo" kinetics of eosinophils and mast cells in experimental murine schistosomiasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1987;82 Suppl 4:67-76.

Liu, Q. H., Bohlen, H., Titzer, S., Christensen, O., Diehl, V., Hescheler, J., Fleischmann, B. K. (1999) Expression and a role of functionally coupled P2Y receptors in human dendritic cells. *FEBS Lett* 445 (2-3): 402-8.

McCloskey, M. A., Fan, Y., Luther, S. (1999) Chemotaxis of rat mast cells toward adenine nucleotides. *J Immunol* 163 (2): 970-7.

Meeusen, E. N., Balic, A. (2000) Do eosinophils have a role in the killing of helminth parasites? *Parasitol Today* 16: 95-101.

Melo, R. C., Perez, S. A., Spencer, L. A., Dvorak, A. M., Weller, P. F. (2005) Intragranular vesiculotubular compartments are involved in piecemeal degranulation by activated human eosinophils. *Traffic* 6, 866–879.

Melo, R. C., Spencer, L. A., Dvorak, A. M., Weller, P. F. (2008) Mechanisms of eosinophil secretion: large vesiculotubular carriers mediate transport and release of granule-derived cytokines and other proteins. *J. Leukoc. Biol.* 83, 229–236.

Melo, R. C.C., Spencer, L. A., Perez, S. A. C., Neves, J. S., Bafford, S. P., Morgan, E. S., Dvorak, A. M., Weller, P. F. (2009) Vesicle-mediated secretion of human eosinophil granule-derived major basic protein. *Laboratory Investigation* 89: 769-781.

Melo, R. C., Weller, P. F. (2010) Piecemeal degranulation in human eosinophils: a distinct secretion mechanism underlying inflammatory responses. *Histol. Histopathol.* 25, 1341–1354.

Möller, G. M., De Jong, T. A., Overbeek, S. E., Van der Kwast, T. H., Postma, D. S., Hoogsteden, H. C. (1996) Ultrastructural immunogold localization of interleukin 5 to the crystalloid core compartment of eosinophil secondary granules in patients with atopic asthma. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 44:67–69.

Moqbel, R., Coughlin, J. J. (2006) Differential secretion of cytokines. *Sci. Stke* 338, pe26.

Moreira, L. S., Piva, B., Gentile, L. B., Mesquita-Santos, F. P., D'Avila, H., Maya-Monteiro, C. M., Bozza, P. T., Bandeira-Melo, C., Dias, B. L. (2009) Cytosolic phospholipase2-driven PGE2 syntese within unsaturated fatty acids-induced lipid bodies of epithelial cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1791:3, 156-165.

Muniz, V. S; Weller, P. F., Neves, J. S. (2012) Eosinophil crystalloid granules: structure, function, and beyond. *Journal of Leukocyte Biology*. 92, 1-8.

Murphy, D. J. (2001). The biogenesis and functions of lipid bodies in animals, plants and microorganisms. *Prog.Lipid.Res.* 40:325-438.

Myrtek, D., Idzko, M. (2007) Chemotactic activity of extracellular nucleotides on human immune cells. *Purinergic Signalling*. 3: 5-11.

Nakajima, H., Takatsu, K. (2007). Role of cytokines in allergic inflammation. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 142: 265.

Neves, J. S., Perez, S. A., Spencer, L. A., Melo, R. C., Reynolds, L., Ghiran, I., Mahmudi-Azer, S., Odemuyiwa, S. O., Dvorak, A. M., Moqbel, R., Weller, P. F. (2008) Eosinophil granules function extracellularly as receptor-mediated secretory organelles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105, 18478–18483.

Neves, J. S., Weller, P. F. (2009) Functional extracellular eosinophil granules: novel implications in eosinophil immunobiology. *Curr. Opin. Immunol.* 21, 694–699.

Neves, J. S., Radke, A. L., Weller, P. F. (2010) Cysteinyl leukotrienes acting via granule membrane-expressed receptors elicit secretion from within cell-free human eosinophil granules. *J. Allergy Clin. Immunol.* 125, 477–482.

Nonaka, Y., Hiramoto, T., Fujita, N. (2005) Identification of endogenous surrogate ligands for human P2Y₁₂ receptors by *in silico* and *in vitro* methods. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 337: 281.

Odemuyiwa, S. O., Ghahary, A., Li, Y., Puttagunta, L., Lee, J. E., Musat-Marcu, S., Moqbel, R. (2004) Cutting edge: human eosinophils regulate T cell subset selection through indoleamine 2, 3-dioxygenase. *J Immunol* 173: 5909–5913.

O'Garra, A., Arai, N. (2000) The molecular basis of T helper 1 and T helper 2 cell differentiation. *Trends Cell Biol.* 10 (12) 542-550.

Olsen, R. L., Little, C. (1983) Purification and some properties of myeloperoxidase and eosinophil peroxidase from human blood. *The Biochemical Journal* 209: 781–787.

Olsson, I., Venge, P. (1974) Cationic proteins of human granulocytes. II. Separation of the cationic proteins of the granules of leukemic myeloid cells. *Blood.* 44 (2): 235-46.

Paruchuri, S., Tashimo, H., Feng, C., Maekawa, A., Xing, W., Jiang, Y., Kanaoka, Y., Conley, P., Boyce, J. A. (2009) Leukotriene E₄-induced pulmonary inflammation is mediated by the P2Y₁₂ receptor. *The Journal of Experimental Medicine*, 206: 2543-2555.

Pearce, E.J., MacDonald, A. S. (2002) The immunobiology of schistosomiasis. *Nat Rev Immunol* 2:499e511.

Pearce, E. J., Kane, C. M., Sun, J., Taylor, J. J., McKee, A. S., Cervi, L. (2004) Th₂ response polarization during infection with the helminth parasite *Schistosoma mansoni*. *Immunol Rev* 201: 117-126.

Phipps.,S., Lam, C. E., Mahalingam, S., Newhouse, M., Ramirez, R., Rosenberg, H. F., Foster, P. S., Matthaei, K. I (2007) Eosinophils contribute to innate antiviral immunity and promote clearance of respiratory syncytial virus. *Blood* 110:1578–1586.

Ramalingam, T., Ganley-Leal, L., Porte, P., Rajan, T. V (2003) Impaired clearance of primary but not secondary *Brugia* infections in IL-5 deficient mice. *Exp Parasitol* 105:131–139.

Ramalingam. T., Porte, P., Lee, J., Rajan, T. V. (2005). Eosinophils, but not eosinophil peroxidase or major basic protein, are important for host protection in experimental *Brugia pahangi* infection. *Infect Immun* 73:8442e3

Rosenberg, H. F., Dyer, K. D., Foster, P. S. (2012) Eosinophils: changing perspectives in health and disease. *Nature Reviews Immunology* 13 : 9-22.

Sasaki, O., Sugaya, H., Ishida, K., Yoshimura, K. (1993) Ablation of eosinophils with anti-IL-5 antibody enhances the survival of intracranial worms of *Angiostrongylus cantonensis* in the mouse. *Parasite Immunol* 15: 349–354.

Savi, P., Zacharyus, J. L., Delesque-Touchard, N., Labouret, C., Hervé, C., Uzabiaga, M. F., Pereillo, J. M., Culouscou, J. M., Bono, F., Ferrara, P., Herbert, J. M. (2006) The active metabolite of Clopidogrel disrupts P2Y12 receptor oligomers and partitions them out of lipid rafts. *Proc Natl Acad Sci U S A*.18;103 (29):11069-74.

Schweizer, R. C., Welmers-Kessel, B. A. C., Warringa, R. A. J., MaiKoe, T., Raaijmakers, J. A. M., Lammers, J. J., Koenderman, L. (1996) Mechanisms involved in eosinophil migration. Platelet-activating factor-induced chemotaxis and interleukin-5-induced chemokinesis are mediated by different signals. *J Leukocyte Biology* 59: 347-356.

Shamri, R., Xenakis, J. J., Spencer, L. A. (2011) Eosinophils in innate immunity: an evolving story. *Cell Tissue Res.* 343, 57–83.

Sher, A., Coffman, R. L., Hieny, S., Scott, P., Cheever, A. W. (1990) Interleukin 5 is required for the blood and tissue eosinophilia but not granuloma formation induced by infection with *Schistosoma mansoni*. *Proc Natl Acad Sci U S A*.87: 61-65.

Shi, H. Z., Humbles, A., Gerard, C., Jin, Z., Weller, P. F. (2000) Lymph node trafficking and antigen presentation by endobronchial eosinophils. *J Clin Invest* 105:945–953.

Silva, A. R., Pacheco, P., Vieira-de-Abreu, A., Maya-Monteiro, C.M., D'Alegria, B., Magalhães, K.G., De Assis, E.F., Bandeira-melo, C., Castro-Faria-Neto, H.C., Bozza, P.T. (2009) Lipid bodies in oxidized LDL-induced foam cells are leukotriene-synthesizing organelles: a MCP-1/CCL2 regulated phenomenon. *Biochim.Biophys. Acta* 1791:11, 1066-1075.

Simons, J. E., Rothenberg, M. E., Lawrence, R. A. (2005) Eotaxin-1-regulated eosinophils have a critical role in innate immunity against experimental *Brugia malayi* infection. *Eur J Immunol* 35:189–197.

Sokol, R. J., James, N. T., Wales, J., Hudson, G. (1987) Morphometry of eosinophils in human blood. *Acta Anat. (Basel)* 129:3, 211-213.

Specht, S., Saefel, M., Arndt, M., Endl, E., Dubben, B., Lee, N. A., Lee, J. J., Hoerauf, A. (2006) Lack of eosinophil peroxidase or major basic protein impairs defense against murine filarial infection. *Infect Immun* 74: 5236–5243.

Spencer, L. A., Melo, R. C., Perez, S. A., Bafford, S. P., Dvorak, A. M., Weller, P. F. (2006) Cytokine receptor-mediated trafficking of preformed IL-4 in eosinophils identifies an innate immune mechanism of cytokine secretion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 3333–3338.

Spencer, L. A., Szela, C. T., Perez, S. A., Kirchhoffer, C. L., Neves, J. S., Radke, A. L., Weller, P. F. (2009) Human eosinophils constitutively express multiple Th1, Th2, and immunoregulatory cytokines that are secreted rapidly and differentially. *J.Leukoc.Biol.* 85, 117-123.

Spencer, L. A., Weller, P. F (2010) Eosinophils and Th2 immunity: contemporary insights. *Immunol Cell Biol* 88:250–256.

Stegemann, H. e Stalder, K. (1967) Determination of hydroxyproline. *Clin Chim Acta* 18: 267-73.

Svensson. L., Wenneras, C. (2005) Human eosinophils selectively recognize and become activated by bacteria belonging to different taxonomic groups. *Microbes Infect* 7: 720–728.

Swartz, J. M., Dyer, K. D., Cheever, A. W., Ramalingam, T., Pesnicak, L., Domachowske, J. B, Lee, J. J, Lee, N. A, Foster, P. S., Wynn, T. A., Rosenberg, H. F. (2006) *Schistosoma mansoni* infection in eosinophil lineage-ablated mice. *Blood*. ;108 (7): 2420-7.

Taliaferro, W. H., Sarles, M. P. (1939) The cellular reactions in the skin, lungs, and intestine of normal and immune rats after infection with *Nippostrongylus brasiliensis*. *Journal of Infectious Diseases*, 64:157–192.

Tauchi-Sato, K., Ozeki, S., Houjou, T., Taguchi, R. Fujimoto, T. (2002) The surface of lipid droplets is a phospholipid monolayer with a unique Fatty Acid composition. *J.Biol.Chem* 277(46): 44507-12.

Tedla, N., Bandeira-Melo, C., Tassinari, P., Sloane, D. E., Samplaski, M., Cosman, D., Borges, L., Weller, P. F., Arm, J. P. (2003) Activation of human eosinophils through leukocyte immunoglobulin-like receptor 7. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 1174–1179.

Trautmann, A (2009) Extracellular ATP in the immune system: More than just a “danger signal”. *Cell Signaling* 2: 1-3.

Turner, N. A., Moake, J. L., Mcintire, L. V. (2001) Blockade of adenosine diphosphate receptors P2Y(12) and P2Y(1) is required to inhibit platelet aggregation in whole blood under flow. *Blood* 98, 3340.

Ueki, S., Melo, R. C. N., Ghiran, I., Spencer, L. A., Dvorak, A. M., Weller, P. F. (2013) Secretion competent eosinophil granules Eosinophil extracellular DNA trap cell death mediates lytic release of free. *Blood* 1-32.

Uller, L., Rydell-Tormanen, K., Persson, C. G., Erjefalt, J. S. (2005) Anti-Fas mAb-induced apoptosis and cytolysis of airway tissue eosinophils aggravates rather than resolves established inflammation. *Respir Res* 6: 90.

Walsh, E. R., Sahu, N., Kearley, J., Benjamin, E., Kang, B. H., Humbles, A., August, A. (2008) Strain-specific requirement for eosinophils in the recruitment of T cells to the lung during the development of allergic asthma. *J Exp Med* 205:1285–1292.

Wang, H. B., Ghiran, I., Matthaei, K., Weller, P. F (2007) Airway eosinophils: allergic inflammation recruited Professional antigen-presenting cells. *J Immunol* 179:7585–7592.

Wardlaw, A. J., Moqbel, R., Cromwell, O., Kay, A. B. (1986) Platelet-activating factor. A potent chemotactic and chemokinetic factor for human eosinophils. *J. Clin. Invest.* 78: 1707.

Watanabe, K., Misu, T., Inoue, S., Edamatsu, H. (2003) Cytolysis of eosinophils in nasal secretions. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 112 (2): 169-73.

Weller, P. F (1991) The immunobiology of eosinophils. *N.Engl.J.Med.* 324:16, 1110-1118.

Wilson, M. S., Mentink-Kane, M. M., Pesce, J. T., Ramalingam, T. R., Thompson, R., Wynn, T. A. (2007) Immunopathology of schistosomiasis. *Immunol Cell Biol* 85: 148-54.

Wilson, S., Vennervald, B. J., Kadzo, H., Ileri, E., Amaganga, C., Booth, M. (2010) Health implications of chronic hepatosplenomegaly in Kenyan school-aged children chronically exposed to malarial infections and *Schistosoma mansoni*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 104: 110e6.

Wills-Karp, M. (2004) Interleukin-13 in asthma pathogenesis. *Immunol Rev* 202:175–190.

WHO, W. H. O. Schistosomiasis Countries x indicators. v.2009 n:12 Nov. http://tp://www.who.int/neglected_diseases/preventive_chemotherapy/sch/db/index.html?units=minimal®ion=all&country=all&countries=all&year=2008,2009.

Woerly, G., Roger, N., Loiseau, S., Dombrowicz, D., Capron, A., Capron, M. (1999) Expression of CD28 and CD86 by human eosinophils and role in the secretion of type 1 cytokines (interleukin 2 and interferon γ): inhibition by immunoglobulin A complexes. *J. Exp. Med.* 190, 487–495.

Woessner, J. F. Jr. (1961) The determination of hydroxyproline in tissue and protein samples containing small proportions of this imino acid. *Arch Biochem Biophys* 93, 440-447.

Wong, C. K., Hu, S., Cheung, P. F., Lam, C. W. (2010) Thymic stromal lymphopoietin induces chemotactic and prosurvival effects in eosinophils: Implications in allergic inflammation. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 43, 305–315.

Yamaguchi Y, Hayashi Y, Sugama Y, Miura Y, Kasahari T, Kitamura S, Torisu M, Mita S, Tominaga A, Takatsu K, Suda T (1988) Highly purified murine interleukin-5 (IL-5) stimulates eosinophil function and prolongs in vitro survival. IL-5 as an eosinophil chemotactic factor. *J Exp Med* 167:1737.

Yang, D., Rosenberg, H., Chen, Q., Dyer, K. D., Kurosaka, K., and Joost J. Oppenheim, J. J. (2003) Eosinophil-derived neurotoxin (EDN), an antimicrobial protein with chemotactic activities for dendritic cells. *Blood.* 102, 3396–3403.

Yang, D., Chen, Q., Su, S. B., Zhang, P., Kurosaka, K., Caspi, R. R., Michalek, S. M., Rosenberg, H. F., Zhang, N., Oppenheim, J. J. (2008) Eosinophil-derived neurotoxin acts as an alarmin to activate the TLR2-MyD88 signal pathway in dendritic cells and enhances Th2 immune responses. *J Exp Med* 205:79–90.

Yoshida, T., Ikuta, K., Sugaya, H., Maki, K., Takagi, M., Kanazawa, H., Sunaga, S., Kinashi, T., Yoshimura, K., Miyazaki, J., Takaki, S., Takatsu, K. (1996) Defective B-1 cell development and impaired immunity against *Angiostrongylus cantonensis* in IL-5R α deficient mice. *Immunity* 4:483–494.

Yu Chen., Corriden, R., Inoue, Y., Yip, L., Hashiguchi, N., Zinkemagel, A., Nizet, V., Insel, P. A., Junger, W. G. (2006) ATP release guides neutrophil chemotaxis via P2Y₁₂ and A₃ receptors. *Science* 314: 1792-1795.

Zhang, M., Angata, T., Cho, J. Y., Miller, M., Broide, D .H., Varki, A. (2007) Defining the in vivo function of Siglec-F, a CD33-related Siglec expressed on mouse eosinophils. *Blood* 109: 4280-4287.