

Universidade Federal do Rio de Janeiro

Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho

**RAFAELA FERNANDES SAMICO**

**Caracterização funcional de  
eosinófilos murinos derivados de  
medula óssea**

**Rio de Janeiro**

**2010**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**RAFAELA FERNANDES SAMICO**

**Caracterização funcional de  
eosinófilos murinos derivados de medula  
óssea**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biofísica), Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Biofísica).

**ORIENTADORES : Prof. Dr. BRUNO LOURENÇO DIAZ**

**Prof. Dr. CHRISTIANNE BANDEIRA DE MELO**

**Rio de Janeiro**

**2010**

**Samico, Rafaela Fernandes**

**Caracterização funcional de eosinófilos murinos derivados de medula óssea.**

Rio de Janeiro, 2010

páginas.: 27.9 cm

Dissertação apresentada ao Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho - Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Área de concentração: Imunologia – Imunidade Inata.

Orientadores: Diaz, Bruno Lourenço (UFRJ); Bandeira-Melo, Christianne (UFRJ)

1-Eosinófilos    2- Diferenciação    3- Corpúsculos lipídicos    4- Eicosanóides

# FOLHA DE APROVAÇÃO

Rafaela Fernandes Samico

Caracterização funcional de eosinófilos murinos derivados de medula óssea.

Rio de Janeiro, 24 de setembro de 2010

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Biofísica, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Biofísica).

---

Prof. Dr. Bruno Lourenço Diaz IBCCF/UFRJ

---

Prof. Dr. Christianne Bandeira de Melo IBCCF/UFRJ

---

Prof. Dr. Pedro Muanis Persechini IBCCF/UFRJ

---

Prof. Dr. Heloisa D'Ávila da Silva Bizarro UFJF

---

Prof. Dr. Sandra Aurora Chavez Perez Rodrigues FIOCRUZ

---

Revisor e Suplente interno Prof. Dr. Célio Geraldo Freire de Lima IBCCF/UFRJ

---

Suplente externo Prof. Dr. Clarissa Maya Monteiro IOC/FIOCRUZ

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus por ter me dado saúde e sabedoria para concluir mais essa etapa da minha vida e por não me deixar desanimar;

Aos meus orientadores, Bruno Lourenço Diaz e Christianne Bandeira de Melo pela confiança e pelos ensinamentos passados ao longo dessa jornada;

Ao professor Cláudio Canetti pelas contribuições dadas nos seminários, mas principalmente pelos papos sobre o Flu!

A todos os alunos do laboratório Intermediário de Inflamação, meus amigos e companheiros de trabalho. Ao grupo dos eosinófilos, Fábio Mesquita Santos, Ilka Baker e Tatiana Luna por terem me acolhido e ajudado quando eu entrei para esse mundo eosinofílico. Ao Bruno Piva, também conhecido como colega, por deixar meu dia-a-dia no laboratório mais divertido, com implicâncias e desafios absurdos. Ao Daniel Zamith companheiro de biotério, passamos várias horas cheirando maravalha juntos! À Ana Paula Teixeira Monteiro e à Carla Pinheiro da Silva, juntamente com a Tati, companheiras de almoço (às 11h da manhã), doces, tagarelices (principalmente a Ana e a Tati) e fofocas na sala de cultura, quer dizer, no laboratório inteiro! Mas mais do que isso, grandes amigas. Meninas obrigada pelo carinho, pelas ajudas (que foram muitas) e pela amizade!

Ao eterno coração! Beta, Carol, Dani, Sartorinha e Tata! E ao agregado do coração, Chicão! Amigos queridos para o resto da vida. Obrigada pelo carinho, por sempre estarem por perto (mesmo quando estão longe), por sempre estarem dispostos a me ajudar, pelo apoio e pelas muitas risadas e brincadeiras que compartilhamos por todos esses anos.

Aos meus pais, Otto Borges Samico e Rute Fernandes Samico e aos meus irmãos Gabriela Fernandes Samico e Matheus Fernandes Borges Samico e ao Fred (irmão peludo), obrigada por tudo! Pelo carinho, amor, dedicação, pelas brincadeiras e maluquices, pelo apoio que sempre me deram e me darão. Família Samico, amo vocês!

Ao meu xuxuzinho, namorado, amigo e companheiro, Fábio Keidel. Muito obrigada pelo carinho, companheirismo e incentivo. Pelos ouvidos para eu reclamar, pela alegria e bom humor, por saber me alegrar! Te amo Keidelzinho!

## RESUMO

### Caracterização funcional de eosinófilos murinos derivados de medula óssea

Eosinófilos são reconhecidos como tendo um papel importante na patogênese de diversas doenças inflamatórias, como infecções por helmintos e asma. Entender melhor a biologia dos eosinófilos pode trazer grande impacto na atual compreensão sobre essas doenças e contribuir para o desenvolvimento de novas terapias. No entanto, poucas abordagens experimentais permitem o estudo adequado da biologia dos eosinófilos. Nosso objetivo é implementar uma nova metodologia que permita atingir um grande número de eosinófilos murinos e demonstrar que estes eosinófilos diferenciados a partir de medula óssea (bmEos) são células funcionalmente ativas capazes de responder à estimulação *in vitro* com rápida síntese de eicosanóides e biogênese de corpúsculos lipídicos. Para atingir uma população de eosinófilos murinos com pureza satisfatória nós coletamos células totais da medula óssea, que foram retiradas de camundongos Balb/c e as células foram cultivadas com RPMI-1640 contendo 20% SFB suplementado com FLT3-L (100 ng/mL) e SCF (100 ng/mL) do dia 0 ao 4. Do dia 4 em diante, o meio foi substituído por meio fresco contendo somente IL-5 (10 ng/mL). Utilizando esta metodologia, grande quantidade ( $\sim 2 \times 10^7$  células) de eosinófilos murinos derivados de medula óssea (bmEos) com pureza  $\geq 70\%$  foram obtidos e utilizados em ensaios funcionais para melhor caracterização desses eosinófilos. Como a partir do dia 14 de cultura o número células começou a diminuir nós decidimos usar dia 14 como o dia de experimentação. Como parâmetros de ativação de eosinófilos, nós avaliamos a produção de eicosanóides e a biogênese de corpúsculos lipídicos. Para verificar se os bmEos exibem características funcionais similares àquelas bem descritas para eosinófilos humanos, nós inicialmente estudamos a produção de eicosanóides por bmEos. Nós observamos que bmEos estimulados *in vitro* com A23187 ou ácido arquidônico (AA) são capazes de sintetizar PGD<sub>2</sub> e PGE<sub>2</sub>, bem como LTC<sub>4</sub>. Assim como acontece em eosinófilos humanos, bmEos também foram incapazes de sintetizar LTB<sub>4</sub>. Como descrito para eosinófilos humanos, a estimulação *in vitro* com AA, PGD<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>, bradicinina (BK), PAF ou substância P (SP) foi capaz de induzir a biogênese de corpúsculos lipídicos em bmEos. Novamente semelhante à eosinófilos humanos, o pré-tratamento de bmEos com inibidores de PKA, enquanto bloqueia biogênese de corpúsculos lipídicos por PGD<sub>2</sub> e BK, não foi capaz de afetar a biogênese induzida por SP. Com isso, nossos resultados mostram que nós conseguimos estabelecer uma metodologia que fornece eosinófilos murinos com número suficiente e pureza adequada para estudar biologia dos eosinófilos. Esses eosinófilos diferenciados são células biologicamente ativas e com maquinaria enzimática comparável aos eosinófilos humanos. Uma vantagem dessas células sobre eosinófilos humanos é a possibilidade de usar eosinófilos diferenciados de camundongos geneticamente modificados.

## ABSTRACT

### Functional Characterization of murine bone marrow-derived eosinophils

Eosinophils are recognized as key players of inflammatory diseases, like asthma and helminthic infections. Further understanding eosinophil biology may impact current comprehension of these disorders and contribute to development of new therapies. However, few experimental approaches allow proper study of eosinophil biology. Our aim is to implement a new method to achieve a large number of mouse eosinophils and demonstrate that these *in vitro*-differentiated bone marrow-derived eosinophils (bmEos) are functionally active cells capable of responding to *in vitro* stimulation with rapid eicosanoid synthesis and lipid body biogenesis. To achieve a mouse eosinophil population with satisfactory purity and size we collect total bone marrows recovered from Balb/c mice and cells were cultured with RPMI-1640 containing 20% FBS and supplemented with rmFLT3-L (100 ng/mL) and rmSCF (100 ng/mL) from day 0 to 4. From day 4 onwards, cell supernatant was replaced with medium containing rmIL-5 only (10 ng/mL). By employing such method, large numbers ( $\sim 2 \times 10^7$  cells) of *in vitro*-differentiated bone marrow-derived eosinophils (bmEos) with purity  $\geq 70\%$  were obtained and used in functional assays for further eosinophil characterization. As after day 14 of culture the cell number started to decrease we decided to use day 14 as the day for experimentation. As eosinophil activation parameters, production of eicosanoids was evaluated by EicosaCell technique and EIA, and lipid body biogenesis was studied in osmium-stained cells. To verify whether bmEos display functional features similar to those well-established ones described for human eosinophils, we initially studied bmEos-produced eicosanoid profile. As immunodetected by EicosaCell and dosed in the supernatant by EIA, bmEos stimulated *in vitro* for 15 min with A23187 or arachidonic acid (AA) synthesized PGD<sub>2</sub> and PGE<sub>2</sub>, as well as LTC<sub>4</sub>. As well-defined for eosinophils, bmEos were also unable to synthesize LTB<sub>4</sub>. As described for human eosinophils, *in vitro* stimulation with AA, PGD<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>, bradykinin (BK), PAF or substance P (SP) triggered rapid assembly of cytoplasmic lipid bodies within bmEos. Again similar to human eosinophils, pre-treatment of bmEos with PKA inhibitors while blocking PGD<sub>2</sub>- or BK-triggered lipid body biogenesis, failed to affect SP-induced effect. Altogether, our findings show that, indeed, we have established a methodology that supplies mouse eosinophils with sufficient number and proper purity to study eosinophil biology. Such *in vitro*-differentiated eosinophils are biologically active cells with functionality and receptor-driven intracellular signaling comparable to human eosinophils. An advantage of these cells over human eosinophils is the opportunity to use eosinophils differentiated from genetically modified mice.

## Lista de Figuras

Figura 1: Modelo esquemático de eosinopoiese na medula óssea.	15
Figura 2: Características básicas dos eosinófilos.	32
Figura 3: Celularidade da cultura expandidos a partir de células da medula óssea de camundongos Balbc.	40
Figura 4: Porcentagem de eosinófilos murinos (bmEos) diferenciados <i>in vitro</i> .	41
Figura 5: Produção de mediadores lipídicos por bmEos dosados no sobrenadante.	42
Figura 6: Produção de mediadores lipídicos por bmEos <i>in situ</i> .	44
Figura 7: Número basal de corpúsculos lipídicos em bmEos.	46
Figura 8: Biogênese de corpúsculos lipídicos em bmEos.	47
Figura 9: bmEos produzem PGD <sub>2</sub> em resposta ao AA.	49
Figura 10: A biogênese de corpúsculos lipídicos induzida por AA é inibida por HQL-79.	50
Figura 11: A biogênese de corpúsculos lipídicos induzida por PGD <sub>2</sub> é inibida por PKI e H89.	51
Figura 12: BK e SP induzem biogênese de corpúsculos lipídicos por bmEos.	52
Figura 13: Calfostina-C e Bapta-AM não são capazes de inibir a biogênese de corpúsculos lipídicos induzida por BK e SP.	53
Figura 14: A biogênese de corpúsculos lipídicos induzida por BK, mas não SP é inibida por PKI e H89.	54
Figura 15: Estímulos indutores da biogênese de corpúsculos lipídicos por eosinófilos humanos e murinos.	61
Figura 16: Caracterização funcional de bmEos.	63
Figura 17: Sinalização intracelular envolvida na biogênese de corpúsculos lipídicos por bmEos.	64

## LISTA DE SIGLAS

5-HPETE	5-hidroperóxido eicosatetraenóico
5-LO	5-Lipoxigenase
AA	Ácido araquidônico
ADRP	Adipose differentiation-related protein
BK	Bradicinina
bmEos	Eosinófilos murinos diferenciados da medula óssea
C/EBP $\alpha$	<i>CCAAT/enhancer-binding protein <math>\alpha</math></i>
cisLT	Leucotrieno cisteinado
COX	Ciclooxigenase
CR	Receptor de complemento
ECP	Proteína eosinofílica catiônica
EDN	Neurotoxina derivada de eosinófilo
EDAC	N-(Dimetilaminopropil)-N-etilcarbodiimida hidrocloreto
EIA	Ensaio de Ligação a Enzima
EPM	Erro padrão da média
EPO	Peroxidase eosinofílica
EX	Eoxina
FLAP	Proteína ativadora da 5-LO
FLT3	FMS-like tyrosine kinase 3
FLT3-L	Ligante de FLT3
GFP	Proteína verde fluorescente
GM-CSF	Fator de estimulação de colônia de macrófagos e granulócitos
GMP	Progenitor de granulócito/macrófago
HES	Síndrome hipereosinofílica
IL	Interleucina
IL-5R	Receptor de IL-5
INFGR	Receptor de IFN- $\gamma$
LO	Lipooxigenase
LT	Leucotrieno

MBP	Proteína básica principal
MHC	Complexo de Histocompatibilidade Principal
MHCII	MHC de classe II
MIP 1 $\alpha$	Proteína inflamatória de macrófago 1 $\alpha$
OVA	Ovalbumina
PAF	Fator de ativação plaquetária
PAFR	Receptor de PAF
PG	Prostaglandina
PGDS	PGD sintase
PGES	PGE sintase
PGI	Prostaciclina
PGIS	PGI sintase
PKA	Proteína cinase A
PKC	Proteína cinase C
PLA2	Fosfolipase A <sub>2</sub>
RE	Retículo endoplasmático
SCF	Fator de célula tronco (stem cell factor)
SFB	Soro fetal bovino
SIGLEC	sialic acid-binding immunoglobulin-like lectins
SP	Substância P
TCH	Tiocarbohidrazida
TXA	Troboxano
TXAS	TXA sintase
VCAM-1	Molécula de adesão vascular-1

## SUMÁRIO

CAPA

FOLHA DE ROSTO

FOLHA DE APROVAÇÃO

DEDICATÓRIA

AGRADECIMENTOS

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE SIGLAS

SUMÁRIO

1.	Introdução	13
	1.1 Biologia dos eosinófilos	13
	1.2 Eosinopoiese	14
	1.3 Papel fisiopatológico dos eosinófilos	18
	1.4 Caracterização dos eosinófilos	22
	(a) Grânulos / Secreção de conteúdo granular	22
	(b) Corpúsculos lipídicos / Produção de mediadores lipídicos	25
	(c) Moléculas de superfície / Ativação eosinofílica	29
2.	Objetivos	33
	2.1. Objetivo Geral	33
	2.2. Objetivos Específicos	33
3.	Materiais e Métodos	34
	3.1. Animais	34
	3.2. Reagentes	34
	3.3. Isolamento e cultura de eosinófilos derivados de medula óssea murinos (bmEos)	35
	3.4. Coloração por May-Grünwald Giemsa	36
	3.5. Estimulação e tratamentos in vitro	37
	3.6. Análise de corpúsculos lipídicos	37
	3.7. Dosagem de mediadores lipídicos por EIA	38

3.8. EicosaCell para PGD <sub>2</sub> , PGE <sub>2</sub> , LTB <sub>4</sub> e LTC <sub>4</sub>	38
3.9. Análises estatísticas	39
4. Resultados	40
4.1 Diferenciação <i>in vitro</i> de eosinófilos induzida por citocinas (SCF, FLT3-L e IL-5) partir de progenitores de medula óssea murinos	40
4.2 bmEos são capazes de produzir CIS-LT, PGD <sub>2</sub> e PGE <sub>2</sub>	42
4.3 bmEos induzem a biogênese de corpúsculos lipídicos em resposta a diversos estímulos	45
4.4 HQL-79 inibe a biogênese de corpúsculos lipídicos induzida por AA em bmEos	47
4.5 PGD <sub>2</sub> induz biogênese de corpúsculos lipídicos via PKA	50
4.6 BK e SP induzem biogênese de corpúsculos lipídicos por bmEos	52
4.7. BK, mas não SP, induz biogênese de corpúsculos lipídicos via PKA	53
5. Discussão	55
6. Conclusões	63
7. Referências	65

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Biologia dos eosinófilos

Eosinófilos são granulócitos polimorfonucleares envolvidos na patogênese de diversos processos inflamatórios, com destaque para doenças alérgicas e para infecções por helmintos, mas também estão envolvidos em infecções por bactérias e vírus, além de lesões teciduais e imunidade tumoral (GLEICH et al, 1984; WELLER, 1994; ROTHENBERG, 1998).

No século XIX o médico cientista Paul Ehrlich fez grandes contribuições na área da hematologia com seus estudos feitos em leucócitos derivados de sangue e tecidos. Utilizando diferentes metodologias de fixação e coloração, Ehrlich conseguiu identificar um grupo distinto de leucócitos que apresentava grande quantidade grânulos em seus citoplasmas, sendo capaz de diferir entre grânulos acidofílicos ( $\alpha$ ), basofílicos ( $\beta$ ) e neutrofílicos ( $\epsilon$ ), conforme sua afinidade bioquímica pelos corantes utilizados (EHRlich, 1879). As células foram denominadas, basófilos e neutrófilos, de acordo com o tipo de grânulo, enquanto que os eosinófilos receberam seu nome por se corarem pelo corante eosina, um corante ácido de cor alaranjada, que se liga às estruturas carregadas positivamente presente nos grânulos dos eosinófilos. Ehrlich expandiu os estudos sobre eosinófilos e descreveu a existência de centros germinativos dessas células localizados na medula óssea (EHRlich, 1879).

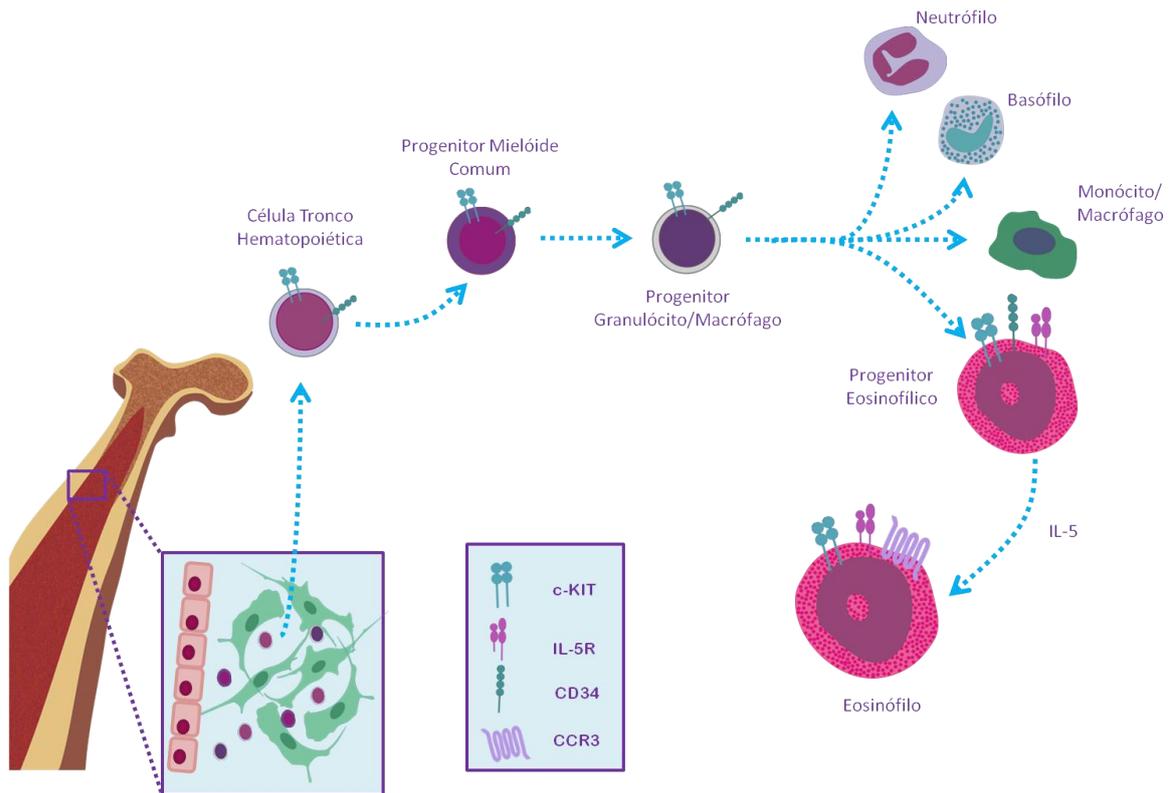
Hoje se sabe que os eosinófilos de fato se diferenciam na medula óssea e durante sua maturação são liberados na corrente sanguínea, onde constituem apenas 1-3% das células nucleadas do sangue periférico. Uma vez na corrente sanguínea, os eosinófilos são recrutados para os tecidos, onde podem ser encontrados como células residentes. Em condições normais, grande parte dos eosinófilos migra para o trato

gastrointestinal onde residem na lâmina própria da maioria de seus segmentos, atraídos pela quimiocina eotaxina-1 (MISHRA et al, 1999). Além disso, eosinófilos ainda são encontrados residindo no timo, nas glândulas mamárias e no útero, também recrutados pela eotaxina-1, que é constitutivamente expressa nesses órgãos (revisado por HOGAN et al, 2008).

## **1.2 Eosinopoiese**

Em adultos, a maior parte da atividade hematopoiética, incluindo a eosinopoiese (Figura 1), ocorre na medula óssea sob a influência das células estromais e seus produtos. Esse complexo microambiente é crucial para prover os sinais necessários para a manutenção de populações de progenitores de diferentes linhagens e em diversos estágios de diferenciação. Células progenitoras são primeiramente identificadas pelos altos níveis de expressão de CD34 em sua superfície. Esses níveis decrescem progressivamente conforme a maturação celular vai acontecendo (revisado por GAUVREAU, ELLIS e DENBURG, 2009). Eosinófilos imaturos expressam CD34 em sua superfície, entretanto essa molécula, assim como em outras células, não está presente em eosinófilos maduros (SERGEJEVA et al, 2004).

Divergências são encontradas na literatura a respeito dos progenitores eosinofílicos. Alguns autores sugerem a existência de um progenitor em comum para eosinófilos e basófilos, que posteriormente divergem para dar origem aos eosinófilos (BOYCE et al, 1995; revisado por GAUVREAU, ELLIS e DENBURG, 2009), enquanto outros defendem um progenitor exclusivo para eosinófilos derivado do progenitor de granulócito/macrófago - GMP (IWASAKI et al, 2005; revisado por KOURO e TAKATSU, 2009) (Figura 1).



**Figura 1: Modelo esquemático de eosinopoiese na medula óssea.** Ênfase na expressão de marcadores de células indiferenciadas (ex. CD34 e c-Kit) e marcadores de eosinófilos maduros (IL-5R e CCR3). Modificado a partir de Terese Winslow e Lydia Kibiuk, 2001.

O desenvolvimento dos eosinófilos depende de uma variedade de citocinas, como o fator de célula tronco (SCF), GM-CSF, IL-3 e IL-5. Essas citocinas induzem sinais de proliferação e diferenciação através dos fatores de transcrição GATA-1, GATA-2, PU.1 e C/EBP $\alpha$  (*CCAAT/enhancer-binding protein  $\alpha$* ) (MCNAGNY et al, 1998; YU et al, 2002). O fator de transcrição GATA-1 é um regulador essencial para a diferenciação da linhagem eosinofílica, uma vez que a deleção de um sítio no promotor de GATA-1 em camundongos acarreta na perda dessa linhagem celular (HIRASAWA et al, 2002; YU et al, 2002). Iwasaki e colaboradores (2005) utilizaram camundongos

transgênicos para GATA-1 acoplado com proteína verde fluorescente (GFP) e viram que quando as células GMP eram cultivadas com um coquetel de citocinas, incluindo GM-CSF, IL-3, IL-5 e IL-9, uma pequena quantidade de células com níveis intermediários de GFP começavam a aparecer no dia 3 de cultura. Níveis intermediários da proteína GATA-1 são consistentes com a diferenciação de eosinófilos. A maioria das células GATA-1-GFP<sup>+</sup> expressavam IL-5R $\alpha$ , CD34 e baixos níveis de c-Kit. Quando purificada, essa população celular se diferenciava exclusivamente em eosinófilos, enquanto que as células GMP GATA-1-GFP<sup>-</sup> davam origem somente a neutrófilos e macrófagos.

A IL-5 é a principal citocina envolvida na eosinopoiese, e possui um papel crucial na diferenciação dos eosinófilos. Células progenitoras comprometidas com a linhagem eosinofílica co-expressam CD34 e o receptor IL-5R $\alpha$  em sua superfície. Células CD34<sup>+</sup>IL-5R $\alpha$ <sup>+</sup> já foram encontradas nas vias aéreas de indivíduos asmáticos e o número de células progenitoras encontradas, nas vias aéreas, estava diretamente relacionado à severidade da doença, sugerindo que possa ocorrer diferenciação de eosinófilos no sítio inflamatório (ROBINSON et al, 1999). Esses dados foram corroborados por Dorman e colaboradores que demonstraram que em indivíduos asmáticos, após a exposição ao alérgeno, ocorre uma migração de células progenitoras CD34<sup>+</sup> para as vias aéreas, com aumento na expressão do receptor IL-5R $\alpha$ , que na presença de IL-5, pode mediar a diferenciação das células progenitoras em eosinófilos (DORMAN et al, 2004).

A IL-5 induz a maturação terminal de eosinófilos, tanto em camundongos quanto em humanos, prolonga a sobrevivência e retarda a morte por apoptose dessas células, além de aumentar a adesão de eosinófilos às células endoteliais e suas funções

efetoras (revisado por RADINGER e LÖTVALL, 2009). Tanto IL-5 quanto IL-9 são capazes de regular positivamente a expressão do receptor IL-5R $\alpha$  durante a diferenciação terminal de eosinófilos (TAVERNIER et al, 2000; GOUNNI et al, 2000). IL-5 também induz a regulação positiva de CCR3 em células progenitoras CD34<sup>+</sup> humanas de cordão umbilical, permitindo a diferenciação terminal dessas células e quimiotaxia dependente de CCR3 induzida por eotaxina (STIRLING et al, 2001; LAMKHIUED et al, 2003). Apesar de induzir sua diferenciação terminal, essa citocina não induz o comprometimento de progenitores com a linhagem eosinofílica, mas funciona como um fator de estimulação para diferenciação e proliferação desses progenitores (PIERCE et al, 1998). A deleção do gene de IL-5 causa uma acentuada redução de eosinófilos na corrente sanguínea e nos pulmões após desafio alérgico (FOSTER et al, 1996; KOPF et al, 1996), enquanto que quando produzida em excesso por animais transgênicos, a IL-5 causa intensa eosinofilia (Dent et al, 1990). Além disso, ela também induz a saída de eosinófilos da medula óssea para a corrente sanguínea (COLLINS et al, 1995).

Recentemente Dyer e colaboradores (2008) desenvolveram um protocolo de diferenciação de eosinófilos murinos a partir de células totais de medula óssea utilizando um coquetel de citocinas, incluindo SCF, FLT3-L e IL-5. Apesar da escassez de informações na literatura relacionando FLT3-L e a diferenciação de eosinófilos, foi visto que FLT3-L em conjunto com SCF, mas não sozinho, promove a proliferação da linhagem de células tronco Thy<sup>lo</sup>SCA1<sup>+</sup>, e a formação de colônias, sendo estas formadas apenas de granulócitos e macrófagos (HUDAK et al, 1995). Além disso, FLT3-L sozinho foi capaz de estimular a proliferação de células progenitoras humanas CD34<sup>+</sup> (LYMAN et al, 1994). Portanto, FLT3-L e SCF expandem a população de progenitores, enquanto a adição de IL-5 garante a posterior diferenciação terminal dessas células em eosinófilos (DYER et al 2008).

### 1.3 Papel Fisiopatológico dos eosinófilos

Em resposta a um estímulo, como exposição à alérgenos ou a helmintos, os eosinófilos são recrutados da circulação para os sítios inflamatórios. O tráfego de eosinófilos para os sítios de inflamação é coordenado por diversas citocinas, quimiocinas, mediadores lipídicos e moléculas de adesão (BOCHNER e SCHLEIMER, 1994; ROSENBERG, 2007). Entre as citocinas mais importantes para o tráfego de eosinófilos estão os produtos das células T<sub>H</sub>2, como IL-4, IL-5 e IL-13. Enquanto que a IL-5, assim como as quimiocinas RANTES e eotaxinas, regula a mobilização dos eosinófilos da medula óssea para a corrente sanguínea, a IL-4 e a IL-13 estão envolvidas na transmigração dessas células do leito vascular para o tecido, visto que controlam o aumento da expressão de moléculas de adesão, como a P-selectina e VLA-4, no endotélio (WOLTMAN et al, 2000; BOCHNER et al, 1995). A P-selectina é expressa em níveis que permitem a migração de eosinófilos, mas não de neutrófilos (WOLTMAN et al, 2000), enquanto que VLA-4 é expresso por eosinófilos, mas não por neutrófilos (BOCHNER et al, 1995). Diversas quimiocinas são quimioatraentes para eosinófilos, tais como RANTES, proteína inflamatória de macrófagos 1 $\alpha$  (MIP-1 $\alpha$ ) e eotaxina (revisado por HOGAN et al, 2008).

Uma vez no sítio inflamatório, os eosinófilos contribuem para a manifestação dos sintomas da inflamação, direta ou indiretamente, através da liberação do conteúdo de seus grânulos, que acontece rapidamente após a provocação antigênica. Por exemplo, as proteínas granulares podem aumentar a permeabilidade vascular e estimulam a produção de muco, resultando em edema tissular e obstrução das vias aéreas (revisado por RADINGER e LÖTTVAL, 2009). Além disso, MBP ativa mastócitos, que ao degranularem, liberam leucotrienos e histamina, resultando em broncoconstrição (ROTHENBERG et al, 1998).

A importância dos eosinófilos para a patogênese de diversas doenças alérgicas respiratórias é controversa. Alguns autores sugerem que os eosinófilos participam apenas no processo de remodelamento pulmonar, que ocorre, por exemplo, em asmáticos, enquanto outros apontam efeitos diretos ou indiretos dessas células no desenvolvimento da asma alérgica.

Utilizando modelos de alergia crônica, uma série de estudos foi feita com animais transgênicos, nos quais o gene da IL-5 foi deletado (CHO et al, 2004) ou amplificado (TANAKA et al, 2004), ou a cadeia  $\alpha$  do receptor de IL-5 foi deletada (TANAKA et al, 2004), sugerindo o papel dos eosinófilos na indução de dois dos sinais cardinais associados com o remodelamento das vias aéreas observados na asma, fibrose peribronquiolar e aumento da espessura da musculatura lisa da mesma região, quando comparado aos animais selvagens desafiados repetidamente com ovalbumina (OVA).

Ainda em 2004, Lee e colaboradores demonstraram que os eosinófilos contribuem para os sintomas que são classicamente descritos como característicos da asma. Para isso desenvolveram uma linhagem de camundongo congenitamente destituídos de eosinófilos (PHIL). Esses animais são geneticamente modificados para não sintetizar a proteína específica de eosinófilo EPO, com isso, os animais PHIL não possuem eosinófilos, mas todas as outras células hematopoiéticas estão presentes (LEE et al, 2004). Os mesmos autores também observaram que os animais PHIL quando tratados com OVA apresentavam uma histopatologia atenuada, com redução na hipertrofia epitelial das vias aéreas e menor acúmulo de muco, em relação aos animais selvagens. Entretanto, essa redução não foi total, indicando que, os eosinófilos são importantes e necessários para a patologia da asma observada nos animais selvagens, mas que outras células também estariam envolvidas nesse processo (LEE et al, 2004).

Já Humbles e colaboradores (2004) utilizando animais deficientes para o gene GATA ( $\Delta$ dblGATA), que como dito anteriormente não possuem eosinófilos, obtiveram dados contundentes da participação destas células no remodelamento das vias aéreas, visto que estes animais são protegidos dos efeitos deletérios dessas células, como deposição de colágeno e aumento da musculatura lisa das vias aéreas em modelo de asma crônica.

Apesar dos dados em camundongos sugerirem que os eosinófilos teriam um papel importante na patogênese da asma, estudos em humanos que tentaram depletar seletivamente eosinófilos não obtiveram o mesmo sucesso. A infusão com anticorpos anti-IL-5 induziu uma redução significativa de eosinófilos no sangue e no escarro, porém, mesmo com o tratamento, não foram observadas mudanças na hiperresponsividade das vias aéreas (LECKIE et al, 2000).

Os eosinófilos foram classicamente descritos como células participantes da resposta imune contra helmintos. Tal hipótese foi baseada em evidências histológicas onde se observa eosinófilos circundando os parasitas em biopsias (revisado por KLION e NUTMAN, 2004). Essa ideia pode ser reforçada pelo fato de helmintos serem parasitas extracelulares em sua maioria de tamanho grande, que não podem ser fagocitados, e, como dito anteriormente, pelo fato de eosinófilos serem capazes de secretar diversas proteínas citotóxicas que atuam na tentativa de eliminar esses patógenos. Apesar dessas evidências iniciais, hoje o papel dos eosinófilos durante a infecção por helmintos ainda não é bem elucidado. Pode-se destacar, por exemplo, os estudos utilizando anticorpos neutralizantes para IL-5 para se investigar o papel dos eosinófilos. O tratamento com anticorpo anti-IL-5 foi capaz de evitar a ocorrência de eosinofilia, tanto no tecido como no sangue, que ocorre durante a infecção helmíntica por *Nippostrongylus brasiliensis* (COFFMAN et al, 1989; RENNICK et al, 1990). Porém, esse tratamento não aumentou a

suscetibilidade dos animais para a infecção por diversos helmintos, incluindo *Nippostrongylus brasiliensis* (COFFMAN et al, 1989; revisado por KLION e NUTMAN, 2004). Korenaga e colaboradores (1991) demonstraram que apesar do tratamento com anticorpo anti-IL-5 não ter nenhum efeito na infecção primária com *Strongyloides venezuelensis*, após um desafio, a recuperação desses parasitas é aumentada nos animais que receberam o tratamento em comparação aos animais controle (KORENAGA et al, 1991), sugerindo que os eosinófilos tenham um papel preferencialmente prevenindo a reinfecção por esses parasitas.

Além dos papéis efetores descritos para eosinófilos, recentemente tem sido proposto um papel imunomodulador para essas células. Eosinófilos tem a capacidade de modular o sistema imune tanto de forma direta como indireta. Eosinófilos são potenciais células apresentadoras de antígeno em vias aéreas e em infecções por helmintos, pois podem expressar MHC de classe II (MHC-II). Inicialmente, a expressão de MHC-II só havia sido detectada quando eosinófilos humanos purificados da circulação eram cultivados *in vitro* com citocinas como GM-CSF, IL-4 e interferon- $\gamma$  (WELLER et al, 1993). Posteriormente, foi visto que a migração transendotelial de eosinófilos aumenta a expressão de MHC-II por essas células (YAMAMOTO et al, 2000) e ainda, que eosinófilos das vias aéreas de indivíduos asmáticos expressam MHC-II (HANSEL et al, 1991). Padigel e colaboradores em 2007 observaram que eosinófilos que foram expostos a antígenos do parasita *Strongyloides stercoralis* quando transferidos para a cavidade peritoneal de camundongos não-infectados, migraram para o baço e foram capazes de estimular a proliferação de linfócitos T (PADIGEL et al, 2007).

Eosinófilos tem a capacidade de secretar grande variedade de citocinas e mediadores lipídicos. Essas células possuem a capacidade de apresentar antígenos solúveis para células T CD4<sup>+</sup>, assim promovendo proliferação e polarização de

linfócitos T. Eosinófilos secretam ainda diversas citocinas, como IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, capazes de promover proliferação, ativação e polarização  $T_H1/T_H2$  de células T (revisado por ROTHENBERG e HOGAN, 2006). Eosinófilos podem também funcionar como células acessórias para a ativação de células T  $CD4^+$ , já que estocam e, quando estimuladas, secretam IL-4, podendo representar a fonte inicial de IL-4 para promover a diferenciação de células  $T_H2 CD4^+$  (GESSNER et al, 2005).

#### **1.4 Caracterização dos eosinófilos**

Eosinófilos humanos são fenotipicamente bem caracterizados pela presença de um núcleo bilobulado, que, dependendo do seu estado de ativação, pode chegar a quatro lóbulos (SOKOL *et.al.* 1987), e pela presença de grandes grânulos citoplasmáticos eosinofílicos. Já eosinófilos murinos apresentam núcleos com formatos variados, predominantemente em forma de rosca e grânulos menores em comparação aos humanos (revisado por ROSENBERG, PHIPPS e FOSTER, 2007).

Aqui, para caracterizarmos este tipo celular focaremos em três dos mais contemporâneos aspectos do eixo estrutura-função dos eosinófilos. Especificamente, ao descrevermos aspectos morfológicos e de composição de (a) grânulos, (b) corpúsculos lipídicos e (c) membrana plasmática eosinofílicos, respectivamente, serão discutidos seus impactos sobre a secreção diferencial de proteínas pré-formadas, geração de mediadores lipídicos e a capacidade seletiva de responder a agonistas.

##### *(a) Grânulos / Secreção de conteúdo granular*

Os grânulos dos eosinófilos estocam proteínas catiônicas específicas dessas células, que dão aos eosinófilos suas características tintoriais, entre elas a proteína básica principal (MBP), a peroxidase eosinofílica (EPO), proteína eosinofílica catiônica (ECP), a neurotoxina derivada de eosinófilo (EDN) e ribonucleases (EGESTEN *et al.*,

1986; PETERS *et al.*, 1986). Esses grânulos possuem um núcleo cristalóide constituído principalmente por MBP e uma matriz composta por EPO, ECP e EDN. Essas proteínas são responsáveis por boa parte das funções citotóxicas desempenhadas pelos eosinófilos, funções essas que podem ser protetoras, no caso da toxicidade contra helmintos e da propriedade bactericida de algumas dessas proteínas, ou deletérias, já que uma vez no meio extracelular, causam lesões teciduais devido ao efeito citotóxico nas células do próprio organismo, como o que acontece em respostas inflamatórias de fundo alérgico de caráter eosinofílico (GLEICH *et al.*, 1986). Em contrapartida, os eosinófilos estocam ainda em seus grânulos, na forma de mediadores pré-formados, diversas citocinas, que mostram-se biologicamente ativas quando liberadas (LACY e MOQBEL, 2000). O que permite que essas células secretem suas citocinas imediatamente após sua ativação.

Os eosinófilos são capazes de secretar seu conteúdo granular pré-formado de forma rápida e seletiva em resposta a diferentes estímulos. Os eosinófilos raramente secretam suas proteínas granulares por exocitose clássica, que envolve a fusão da membrana dos grânulos à membrana plasmática com liberação de seu conteúdo. Essas células sofrem predominantemente degranulação por um processo conhecido como degranulação *piecemeal*, no qual os eosinófilos secretam parte de, mas não todo, seu conteúdo granular, mas alternativamente, a degranulação eosinofílica pode ocorrer através de um processo que envolve a lise celular (revisado por MELO *et al.*, 2008; NEVES e WELLER, 2009).

A degranulação *piecemeal* é uma forma de secreção importante para que eosinófilos desempenhem suas funções, pois permite que essas células secretem seu conteúdo pré-formado nos grânulos de forma diferenciada dependendo do estímulo dado. Já foi visto, por exemplo, que eosinófilos humanos secretam IL-4 de forma

*piecemeal* quando estimulados com eotaxina e RANTES, mas não quando IL-8 e IFN- $\gamma$  são utilizados como estímulos (BANDEIRA-MELO et al, 2001), por outro lado, IFN- $\gamma$  induz a liberação de forma *piecemeal* de RANTES *in vitro* (LACY et al, 1999). Recentemente tem sido estudado o mecanismo pelo qual eosinófilos fazem degranulação *piecemeal* e foi visto que esse tipo de degranulação ocorre através do brotamento, a partir dos grânulos dos eosinófilos, de um tipo especial de vesícula que transporta o conteúdo a ser secretado para fora da célula. Essas vesículas são morfológicamente distintas de vesículas comuns, são estruturas grandes, curvadas e em formato tubular, conhecidas como vesículas sombreiro (MELO et al, 2005).

Alternativamente, o conteúdo granular pode chegar ao meio extracelular por uma via que depende de lise celular. De fato, a lise de eosinófilos com deposição de grânulos extracelulares livres está associada a diversas patologias eosinofílicas, como asma e rinite (PERSSON et al, 1997; GREIFF et al, 1998). Mas como o conteúdo de grânulos livres seria secretado? Neves e colaboradores em 2008 demonstraram que grânulos isolados de eosinófilos humanos funcionam extracelularmente como organelas secretoras, já que possuem receptores, como por exemplo, para citocinas, como IFNGR (receptor de IFN- $\gamma$ ) e para quimiocinas, como CCR3 – receptor de eotaxina e RANTES (NEVES et al, 2008). Em resposta a um estímulo, há uma secreção diferencial das proteínas estocadas nos grânulos. A estimulação com IFN- $\gamma$  e eotaxina leva a liberação de ECP, por exemplo. IFN- $\gamma$  também induz a secreção diferencial de IL-4 e IL-6 pelos grânulos isolados, utilizando a via de sinalização de MAPK, uma vez que, a liberação induzida por IFN- $\gamma$  não foi observada quando inibidores de proteínas cinases foram utilizados (NEVES et al, 2008).

*(b) Corpúsculos lipídicos / Produção de mediadores lipídicos*

O citoplasma de eosinófilos contém, além dos grânulos, corpúsculos lipídicos, que são organelas ricas em lipídios neutros presentes em diversos organismos, incluindo desde plantas a mamíferos. Apesar de conter grande quantidade lipídica, os corpúsculos não são apenas reservatórios lipídicos. Hoje já se sabe que os corpúsculos lipídicos são organelas altamente reguladas, dinâmicas e funcionalmente ativas.

Os corpúsculos lipídicos são formados por uma monocamada de fosfolipídios e um núcleo rico em lipídios neutros e diversas proteínas, dentre elas, proteínas estruturais, proteínas envolvidas na sinalização celular, no tráfego de membranas, citocinas e quimiocinas, enzimas envolvidas no metabolismo lipídico e enzimas envolvidas na formação de eicosanóides (revisado por BOZZA, MAGALHÃES e WELLER, 2009).

Dentre as proteínas estruturais destaca-se a ADRP (do inglês, *adipose differentiation-related protein*). A proteína ADRP pode ser utilizada como marcador para corpúsculos lipídicos já que é vastamente expressa por essas organelas (BRASAEMLE et al, 1997). Sua função mais bem estabelecida parece estar envolvida com a biogênese desta organela, facilitando a transferência de lipídios do retículo endoplasmático (RE) para o corpúsculo lipídico (IMAMURA et al, 2002).

Apesar de leucócitos não ativados apresentarem alguns corpúsculos lipídicos, essas organelas caracteristicamente aumentam em número em células, incluindo leucócitos, como macrófagos e neutrófilos, e outros tipos celulares, como o endotélio, associadas com diversas respostas inflamatórias, como sepse bacteriana e artrite, por exemplo (revisado por BOZZA, MAGALHÃES e WELLER, 2009).

Em eosinófilos, assim como em outras células do sistema imune, a biogênese de corpúsculos lipídicos acontece de forma rápida e em resposta a processos inflamatórios. Por exemplo, eosinófilos humanos purificados da circulação de pacientes com síndrome hipereosinofílica (HES, *hypereosinophilic syndrome*) apresentam aproximadamente o dobro de corpúsculos lipídicos basais quando comparados aos eosinófilos humanos na circulação de indivíduos saudáveis. Apesar dos níveis basais elevados, os eosinófilos de pacientes com HES são capazes de induzir a biogênese de corpúsculos lipídicos mediante um estímulo inflamatório como PAF – fator de ativação plaquetária (BOZZA et al, 1998). Além disso, em modelo de inflamação alérgica murina, os eosinófilos atraídos para o sítio inflamatório apresentaram números aumentados de corpúsculos lipídicos (VIEIRA-DE-ABREU et al, 2005; MESQUITA-SANTOS et al, 2006).

Assim como PAF, outros mediadores lipídicos, como PGD<sub>2</sub> e agonistas protéicos, como eotaxina e RANTES, também induzem a biogênese de corpúsculos lipídicos em eosinófilos, mas não em macrófagos e neutrófilos, demonstrando que o estímulo para a biogênese de corpúsculos é dependente do tipo celular (MESQUITA-SANTOS et al, 2006; VIEIRA-DE-ABREU et al, 2005). Esse efeito foi comprovado pelo tratamento dos eosinófilos recrutados para o sítio inflamatório com anticorpos neutralizantes para eotaxina, RANTES, ou para o receptor de ambas quimiocinas, CCR3, assim como com o uso do inibidor da PGD sintase, HQL-79, ao inibirem a biogênese de corpúsculos lipídicos nessas células (VIEIRA-DE-ABREU et al, 2005; MESQUITA-SANTOS et al, 2006).

Corpúsculos lipídicos são estruturas com alto grau de organização interna. Os corpúsculos lipídicos, além de ADRP, contêm proteínas variadas. Em leucócitos destacam-se as proteínas relacionadas à metabolização do ácido araquidônico. Por imunolocalização foi observado que a enzima 5-lipoxigenase (5-LO), que depende da

associação à membrana para que seja ativada, é encontrada com ampla distribuição pelo corpúsculo lipídico e não somente na membrana externa da organela em eosinófilos humanos (BOZZA et al, 1997). Além disso, proteínas com localização membranar, como a ciclooxigenase (COX) e a LTC<sub>4</sub> sintase também se encontram localizadas no interior dos corpúsculos lipídicos (BOZZA et al, 1997). Recentemente, Wan e colaboradores observaram por microscopia eletrônica, em eosinófilos humanos, a presença de membranas dentro dos corpúsculos lipídicos, formando uma estrutura similar a uma colméia (WAN et al, 2007). Além disso, eles também observaram por microscopia eletrônica a presença de ribossomos tanto na superfície quanto no interior dos corpúsculos lipídicos e ainda, foram encontradas diversas proteínas presentes no lúmen do RE em corpúsculos, como caveolina-1 e calnexina (WAN et al, 2007). Com isso, Wan e colaboradores sugeriram um modelo para a biogênese de corpúsculos lipídicos que consiste na incorporação de múltiplos *loops* de membranas do RE, tanto de folhetos citoplasmáticos quanto de folhetos luminais. Esse modelo é condizente com a presença de proteínas do RE e com a presença de ribossomos no interior dessas organelas (WAN et al, 2007).

De fato, além da 5-LO, os corpúsculos lipídicos podem conter todas as enzimas necessárias para a síntese de eicosanóides, incluindo a fosfolipase (PL) A<sub>2</sub>, 15-LO, a COX, LTC<sub>4</sub> sintase e PGE sintase (BOZZA et al, 1997; revisado por BOZZA, MAGALHÃES e WELLER, 2009). Mais ainda mostrou-se que estas enzimas encontram-se ativas sendo capazes de efetivamente se organizarem em complexos enzimáticos capazes de sintetizar eicosanóides. Dessa forma, dependendo do tipo de estimulação, corpúsculos lipídicos funcionam como sítio intracelular de síntese de mediadores lipídicos (revisado por BADEIRA-MELO, BOZZA, WELLER, 2002).

Eicosanóides são uma família de mediadores lipídicos derivados de ácidos graxos contendo 20 átomos de carbono, sendo seu principal precursor, em células de mamíferos, o ácido araquidônico (AA). Os eicosanóides são produzidos pela maioria das células e são divididos em dois grupos principais, os prostanóides e os leucotrienos, que são resultado da atividade de duas enzimas, as ciclooxigenases (COX) e as lipooxigenases (LO).

Eicosanóides não são estocados nas células e sim sintetizados de novo quando ocorre ativação celular. Durante o processo inflamatório, o AA é mobilizado de fosfolídeos pela ação da PLA<sub>2</sub> citosólica (cPLA<sub>2</sub>). Esse AA livre poderá então ser alvo da ação de COXs ou LOs. Considerando a via de formação de prostanóides, o AA é metabolizado por COX formando PGH<sub>2</sub>, que por sua vez é substrato para enzimas terminais, como a PGI sintase (PGIS), a TXA sintase (TXAS), PGE sintase (PGES) e a PGD sintase (PGDS), gerando PGI, TXA<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub> e PGD<sub>2</sub>, respectivamente (revisado por FUNK, 2001). Essas enzimas terminais são expressas de forma diferencial pelos tipos celulares. Existem duas isoformas de COX, a COX-1 e a COX-2, sendo a primeira responsável pela síntese constitutiva de prostaglandinas e a segunda tem sua expressão induzida durante o processo inflamatório, e vale ainda destacar que ambas as enzimas podem ser expressas por eosinófilos (revisado por ROUZER e MARNETT, 2009). Visto que eosinófilos humanos são capazes de sintetizar TXA<sub>2</sub> e PGE<sub>2</sub>, mas não PGI, assumiu-se que eosinófilos expressam TXAS e PGES, mas não PGIS. Muito embora não se tenha descrito na literatura a capacidade de eosinófilos sintetizarem PGD<sub>2</sub>, recentemente um estudo demonstrou que eosinófilos infiltrantes de pólipos nasais expressam a H-PGDS (PGD<sub>2</sub> sintase hematopoiética) (HYO et al, 2007).

A síntese de leucotrienos ocorre principalmente em polimorfonucleares, macrófagos e mastócitos, majoritariamente através da ação da 5-LO que catalisa duas

reações: primeiro insere uma molécula de oxigênio na posição 5 do AA formando ácido 5-hidroperóxido eicosatetraenóico (5-HPETE), e em seguida transforma o 5-HPETE em LTA<sub>4</sub>. Esse processo requer a interação do AA com a FLAP (do inglês, *5-LO-activating protein*). O LTA<sub>4</sub> pode ser então hidrolisado ou conjugado a uma glutationa. Quando hidrolisado pela LTA<sub>4</sub> hidrolase, o LTA<sub>4</sub> é convertido em LTB<sub>4</sub>, o que ocorre, por exemplo, em neutrófilos e macrófagos, mas não em eosinófilos. Enquanto que, quando ocorre a conjugação de glutationa pela LTC<sub>4</sub> sintase, há formação de LTC<sub>4</sub> a partir de LTA<sub>4</sub>, como é visto em eosinófilos e basófilos. No meio extracelular o LTC<sub>4</sub> pode ser sequencialmente convertido a LTD<sub>4</sub> e LTE<sub>4</sub>, sendo esses três conhecidos como leucotrienos cisteinados (cisLT) (revisado por FUNK, 2001).

Em eosinófilos o AA pode, alternativamente, ser alvo de outra LO, a 15-LO. Recentemente foi descrito um novo metabólito da via do AA, as eoxinas – EX (14,15-LT), que são produtos da 15-LO. Essa enzima converte o AA em 15-HPETE, que posteriormente poderá sofrer redução para 15-HETE ou desidratação para ácido 14,15-epóxi-eicosatetraenóico (14,15-LTA<sub>4</sub>). A 14,15-LTA<sub>4</sub> será alvo da LTC<sub>4</sub> sintase gerando EXC<sub>4</sub>, que extracelularmente pode ser convertido em EXD<sub>4</sub> e EXE<sub>4</sub>. As eoxinas são estruturalmente bastante relacionadas com os produtos da 5-LO (FELTENMARK et al, 2008).

### *(c) Moléculas de superfície / Ativação eosinofílica*

Uma grande variedade de moléculas de superfície celular são expressas por eosinófilos, incluindo moléculas de adesão, moléculas de sinalização apoptótica, receptores de citocinas, quimiocinas, de mediadores lipídicos e de complemento e receptores de imunoglobulina. Mais recentemente também foi descrita a presença de

receptores da imunidade inata, como receptores do tipo Toll (revisado por HOGAN et al, 2008).

Eosinófilos expressam diversas moléculas de adesão em sua superfície, como selectinas e integrinas, que interagem com seus receptores, por exemplo, a molécula de adesão vascular (VCAM)-1 presente em células endoteliais, permitindo que os eosinófilos migrem para o tecido em resposta a um processo inflamatório. Por exemplo, o recrutamento de eosinófilos para o sítio de inflamação alérgica nos pulmões e na pele é dependente da interação da integrina VLA-4 com VCAM-1 (ABRAHAM et al, 1994).

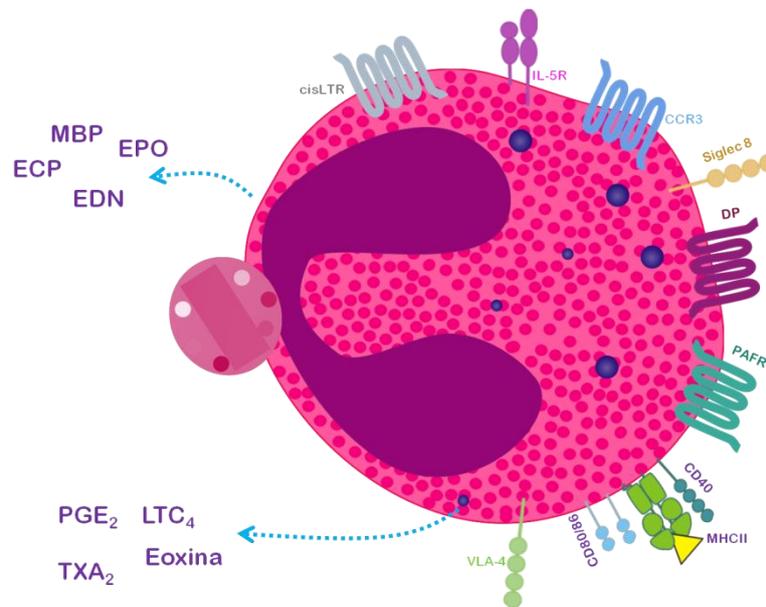
Eosinófilos também expressam vários receptores para quimiocinas e citocinas, destacando-se principalmente o receptor para RANTES e eotaxina, CCR3, modulando a migração e ativação de eosinófilos, e os receptores para as citocinas IL-3, IL-5 e para o fator de estimulação de colônia de macrófagos e granulócitos (GM-CSF), que são muito importantes para o processo de proliferação e diferenciação de eosinófilos, como dito anteriormente.

Eosinófilos expressam ainda receptores para mediadores lipídicos. Os cisLTRs, são receptores transmembranares que podem sinalizar via proteína G (revisado por BANDEIRA-MELO e WELLER, 2003). Eosinófilos humanos parecem expressar os dois receptores de cisLT, o receptor cisLT1 (LYNCH et al, 1999) e o cisLT2 (HEISE et al, 2000), já que já foram observados os RNAm de ambos os receptores em eosinófilos, porém somente o cisLT1 foi encontrado na membrana de eosinófilos humanos (revisado por BANDEIRA-MELO e WELLER, 2003). Eosinófilos também expressam os dois receptores para PGD<sub>2</sub>. Tanto DP1 quanto o CRTH2 (também conhecido como DP2) são receptores transmembranares acoplados a proteína G. O receptor DP1 está acoplado a proteína G $\alpha$ , que induz um aumento nas concentrações intracelulares de AMPc e

parece regular a sobrevivência dos eosinófilos, pela inibição da apoptose, e ainda induz a liberação de citocinas. O CRTH2, por outro lado, aumenta as concentrações intracelulares de cálcio e diminui de AMPc, pois está acoplado a proteína  $G_{i\alpha}$ . A expressão de CRTH2 é limitada à eosinófilos, basófilos e linfócitos  $T_H2$ , sendo esse receptor um potente receptor quimiotático (revisado por OGUMA, ASANO e ISHIZAKA, 2008). Assim como outros receptores de mediadores lipídicos, os receptores para PAF e  $PGE_2$  também sinalizam via proteína G. A sinalização pelo receptor de PAF (PAFR), assim como o CRTH2, leva a um aumento nas concentrações intracelulares de cálcio, induzindo quimiotaxia em eosinófilos (revisado por KATO et al, 2004). Já  $PGE_2$  possui quatro receptores EP1 - EP4, todos acoplados a proteínas G específicas, ativando diferentes moléculas como segundos mensageiros. EP1, por exemplo, está acoplado a proteína  $G_{q\alpha}$  e quando  $PGE_2$  se liga a esse receptor induz aumento nas concentrações intracelulares de cálcio, enquanto EP2 e EP4, se acoplam a proteína  $G_{s\alpha}$ , aumentando os níveis de AMPc. E por fim, EP3 é conhecido como um receptor inibitório, acoplado a proteína  $G_{i\alpha}$  diminuindo os níveis de AMPc (revisado por LEGLER et al, 2010).

Uma molécula de superfície bastante importante para os eosinófilos é a siglec (do inglês *sialic acid-binding immunoglobulin-like lectins*), siglec 8 para eosinófilos humanos, e siglec F para eosinófilos murinos. Ela está envolvida com a indução de apoptose, tanto pela ativação de caspases quanto por gerar espécies livres de oxigênio. A siglec 8 funciona ainda como um marcador de diferenciação terminal de eosinófilos, pois aparecem somente em estágios tardios de diferenciação e é expressa predominantemente por eosinófilos humanos, porém também é encontrada em pequenas quantidades em mastócitos e basófilos humanos. Já a siglec F também é expressa predominantemente por eosinófilos murinos, entretanto pode ser encontrada em macrófagos alveolares e em pequenas quantidades em linfócitos T e neutrófilos

(revisado por BOCHNER, 2009). Zhang e colaboradores foram capazes de depletar o gene de siglec F de camundongos. Apesar de fenotipicamente normais, quando esses animais foram sensibilizados e desafiados em um modelo de asma, apresentaram intensa eosinofilia na medula óssea, na corrente sanguínea e no tecido, uma vez que essas células não estavam sofrendo apoptose (ZHANG et al, 2007).



**Figura 2: Características básicas dos eosinófilos.**

Então, resumidamente como mostrado na Figura 2, para uma célula ser considerada um eosinófilo ela precisa ter: um núcleo com formato característico de eosinófilos (bilobulado em humanos e em formato de anel em camundongos); ter grânulos citoplasmáticos que contenham as proteínas catiônicas específicas de eosinófilos que se coram por eosina; além de receptores para IL-5 (IL-5R), eotaxina/RANTES (CCR3), PGD<sub>2</sub> (DP) e PAF (PAFR); ter corpúsculos lipídicos; serem capazes de produzir eicosanóides (LTC<sub>4</sub>, PGE<sub>2</sub> e TXA<sub>4</sub>); e apresentarem em sua superfície moléculas como siglec, o complexo de apresentação de antígenos, MHC de classe II e moléculas co-estimulatórias, e ainda moléculas de adesão como VLA-4.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo geral**

Em vista da ainda controversa importância dos eosinófilos e da necessidade de se melhor compreender a fisiobiologia deste tipo celular, associado às dificuldades para o estudo de eosinófilos isolados, tivemos como objetivo implementar a metodologia de diferenciação *ex vivo* de eosinófilos murinos a partir de células da medula óssea nos baseando no protocolo recentemente descrito por Dyer e colaboradores (2008). Para a subsequente caracterização destas células como eosinófilos utilizamos uma abordagem funcional com ênfase na capacidade desta célula responder a estímulos específicos e a sintetizar eicosanóides.

### **2.2. Objetivos específicos**

O trabalho foi equacionado em quatro objetivos específicos:

1. Implementar a metodologia de diferenciação de eosinófilos murinos a partir de medula óssea como uma nova ferramenta para o estudo de eosinófilos em nosso grupo.
2. Caracterizar funcionalmente *in vitro* as células derivadas de medula óssea como eosinófilos murinos (bmEos).
3. Avaliar a sinalização intracelular de bmEos em resposta a ativação por AA.
4. Identificar novos estímulos capazes de ativar a biogênese de corpúsculos lipídicos por bmEos (bradicinina e substância P).

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. Animais

Foram utilizados camundongos da linhagem BALB/c, com idade de aproximadamente 8 semanas. Os animais foram mantidos sob condições de temperatura (23-25°C) e ciclo claro/escuro controlados, com livre acesso à ração e água. Os animais foram mantidos no Laboratório de Animais Transgênicos do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho. Os experimentos foram conduzidos de acordo com o protocolo aprovado pelo comitê de ética para o uso de animais de experimentação do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, da Universidade Federal do Rio de Janeiro (IBCCF065).

#### 3.2. Reagentes

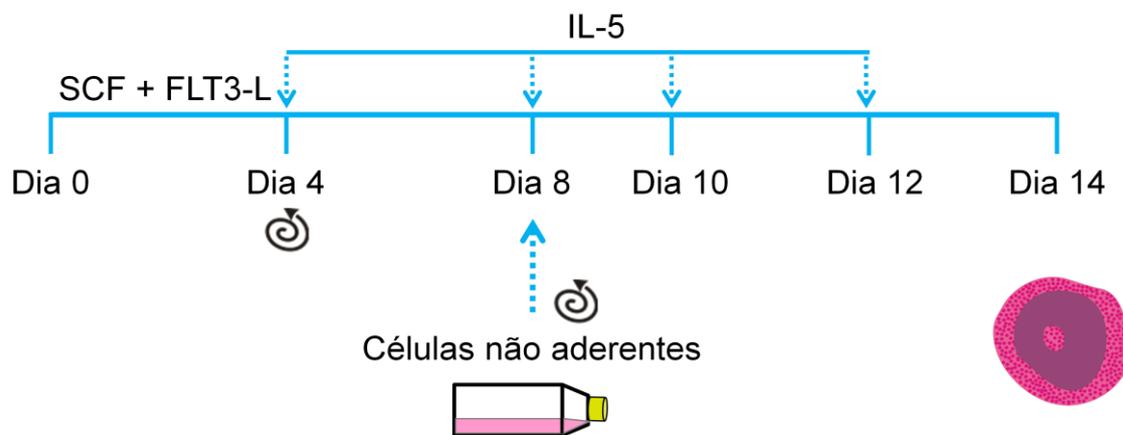
Reagente	Sigla	Concentração	Fabricante
A23187	-	0,1 $\mu$ M	Sigma
Ácido araquidônico	AA	10 $\mu$ M	Cayman Chemical
Bradicinina	BK	10nM	Calbiochem
Calfostina C	-	10nM	Calbiochem
Eotaxina	-	10ng/mL	Peprtech
Fator de ativação plaquetária	PAF	10ng/mL	Sigma
Fator de célula tronco	SCF	100ng/mL	Peprtech
H89	-	10 $\mu$ M	Calbiochem

HQL-79	-	10µM	Cayman
Interleucina -5	IL-5	10ng/mL	Peptotech
		100nM	
Leucotrieno B <sub>4</sub>	LTB <sub>4</sub>	10nM	Cayman
		1nM	
Ligante de FLT3	FLT3-L	100ng/mL	Peptotech
PKI	-	10µM	Calbiochem
Prostaglandina D <sub>2</sub>	PGD <sub>2</sub>	25nM	Cayman Chemical
Prostaglandina E <sub>2</sub>	PGE <sub>2</sub>	1nM	Cayman Chemical
Substância P	SP	1nM	Sigma

### 3.3. Isolamento e cultura de eosinófilos derivados de medula óssea murinos (bmEos)

As células da medula óssea foram coletadas dos fêmures e tíbias de camundongos BALB/c selvagens. As epífises dos ossos foram retiradas e foi feito um lavado das medulas com RPMI-1640 (Gibco, Grand Island, NY) com 20% de soro fetal bovino (SFB). As células foram centrifugadas a 800 rpm por 5 min e ressuspensas em água destilada para lisar as hemácias, seguida pela adição de PBS 10 x concentrado. As células foram centrifugadas e ressuspensas e mantidas em RPMI com 20% de SFB em garrafas médias com volume final de 10 mL.

As células foram cultivadas em condição estéril, em RPMI-1640 com 20% de SFB (antibiótico, L-Glutamina, piruvato) e mantidas a uma concentração de  $1 \times 10^6$  células/mL. Conforme o esquema abaixo, do dia 0 ao dia 4 o meio foi suplementado com 100 ng/mL de fator de célula tronco (SCF, do inglês *stem cell factor*) e 100 ng/mL de ligante de FLT3 (FLT3-L). A partir do dia 4 o meio contendo SCF e FLT3-L foi completamente substituído por meio fresco contendo 10 ng/mL de IL-5 murina recombinante (rmIL-5; R&D system). No dia 8 de cultura as células do sobrenadante foram centrifugadas e movidas para garrafas novas e mantidas em meio fresco suplementado com rmIL-5. Desse ponto em diante metade do meio foi substituído por meio fresco contendo rmIL-5 a cada dois dias e a concentração das células reajustada para  $1 \times 10^6$  células/mL.



### 3.4. Coloração por May-Grünwald Giemsa

Para analisar bmEos morfológicamente, as células foram citocentrifugadas e as lâminas geradas foram fixadas e coradas por May-Grünwald por 15 min e posteriormente por 20 min com Giemsa. Após a coloração, as células foram lavadas em água destilada e a diferenciação analisada por microscopia de campo claro.

### **3.5. Estimulação e tratamentos *in vitro***

Para analisar a biogênese de corpúsculos lipídicos  $2 \times 10^6$  células/mL foram incubados em RPMI-1640 sem soro com estímulos diferentes, entre eles AA, eotaxina, BK, PGD<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>, LTB<sub>4</sub>, PAF e SP (as doses estão descritas na tabela do item 3.2) durante 1 h a 37°C. Além dos estímulos, foram feitos pré-tratamentos, com os inibidores da proteína quinase A (PKA), PKI e H89, e com o inibidor da proteína quinase C (PKC), calfofina-C, por 5 min a 0°C. Também foi utilizado o inibidor de PGD sintase (PGDS), HQL-79 em um pré-tratamento por 30 min a 0°C. Após 1 h de estimulação, uma alíquota foi retirada para citocentrifugação e posterior coloração por ósmio para contagem de corpúsculos lipídicos.

Para analisar a produção de mediadores lipídicos  $2 \times 10^6$  células/mL foram incubadas em RPMI-1640 sem soro por 15 min a 37°C com AA ou com ionóforo de cálcio, A23187. Após 15 min de estimulação as células foram centrifugadas e o sobrenadante foi recolhido e estocado a -80°C para posterior dosagem por EIA.

### **3.6. Análise de corpúsculos lipídicos**

As lâminas, obtidas a partir da citocentrifugação das células previamente estimuladas, foram fixadas com formalina 3,7%. Em uma capela de exaustão as lâminas foram lavadas com água e incubadas com ácido cacodílico 0,1 M. Após esta etapa as lâminas foram submetidas a uma primeira incubação com ósmio (1,5%) por 30 min, em seguida lavadas e uma solução de TCH (thiocarbohidrazida 1%) foi adicionada. Após 3 min, as lâminas foram novamente lavadas e foi acrescentado ácido cacodílico, seguida de uma segunda incubação com ósmio por 5 min, seguida de uma última lavagem com água. Os corpúsculos lipídicos foram contados em 50 células com auxílio de um

microscópio ótico com aumento de 1000x (metodologia adaptada de WELLER *et al.*, 2001).

### **3.7. Dosagem de mediadores lipídicos por EIA**

A quantificação de PGD<sub>2</sub> e PGE<sub>2</sub>, de cis-leucotrienos (cisLT) e LTB<sub>4</sub> foi feita utilizando kits de ensaio imuno-enzimático (EIA; Cayman Chemical, EUA) a partir de sobrenadantes obtidos de bmEos estimulados *in vitro* por 15 min com AA. Em uma placa sensibilizada e bloqueada foram adicionados amostra ou padrão, *tracer* e anticorpos, e a placa foi incubada *overnight*, 4°C. Após 5 lavagens, a reação foi revelada adicionando o reagente Ellman's. A intensidade da coloração – inversamente proporcional à quantidade de substrato contida na amostra – foi quantificada em um comprimento de onda de 405 nm. Com os valores da curva padrão foi feita uma regressão não-linear no programa SoftMax Pro 4.8 para determinação da concentração de PGD<sub>2</sub> e E<sub>2</sub>, cisLT e LTB<sub>4</sub> presentes nas amostras.

### **3.8. EicosaCell para PGD<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>, LTB<sub>4</sub> e LTC<sub>4</sub>**

Após o processo de estimulação com AA ou com ionóforo de cálcio, A23187 (0,1 µM) por 15 min a 37°C, foi feito um citocentrifugado e os bmEos foram incubados com 1-ethyl-3 (3-dimethylamino-propyl) carbomidina (EDAC - SIGMA- 0,1% em HBSS) por 15 min a temperatura ambiente. Após bloqueio de 30 min com HBSS + BSA 1%, foi utilizado o anticorpo de detecção do lipídio, segundo a tabela abaixo, ou um isotipo controle por 18 h 4°C. Após esta etapa as lâminas foram lavadas 3 vezes por 10 min com HBSS + BSA 1% e então foi adicionado o anticorpo secundário anti-IgG por 1 h a temperatura ambiente. As lâminas foram lavadas novamente 3 vezes por 10 min com HBSS + BSA 1% e cobertas com uma gota de VectaShield (Vector Laboratories), cobertas com uma lamínula e vedadas com esmalte. As marcações foram

analisadas com um microscópio de fluorescência (Olympus BX51TF, Tokio, Japão) em aumento de 1000x, no comprimento de onda correspondente ao espectro de excitação do fluorocromo utilizado, e a aquisição de imagens foi feita com o programa Cell F 3.1 (Olympus) e câmera DP72.

<b>Anticorpos Primários</b>	<b>Concentração</b>	<b>Fabricante</b>	<b>Anticorpo Secundário</b>	<b>Diluição</b>	<b>Fabricante</b>
mouse PGD <sub>2</sub>	25 µL	Cayman	DyLight 488 anti mouse	1:800	Jackson
mouse PGE <sub>2</sub>	25 µL	Cayman	DyLight 488 anti mouse	1:800	Jackson
mouse LTB <sub>4</sub>	25 µL	Cayman	DyLight 488 anti mouse	1:800	Jackson
rabbit LTC <sub>4</sub>	25 µL	Cayman	DyLight 488 anti rabbit	1:800	Jackson

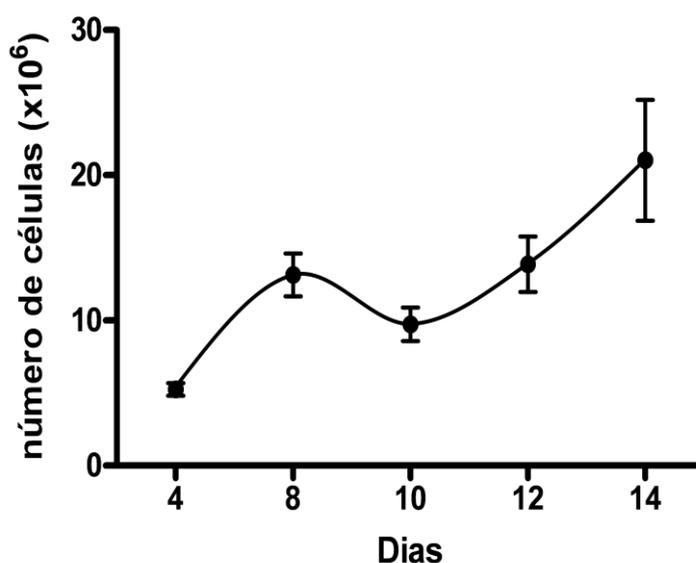
### 3.9. Análises estatísticas

Aos dados experimentais foram aplicados testes estatísticos para a determinação da média e erro padrão da média ( $\chi \pm \text{EPM}$ ) e da significância entre os grupos experimentais, através do teste ONE WAY ANOVA seguido por Bonferroni. A significância estatística foi considerada para valores de  $P < 0,05$ . O número de ensaios realizados será expresso por  $n$ .

## 4. RESULTADOS

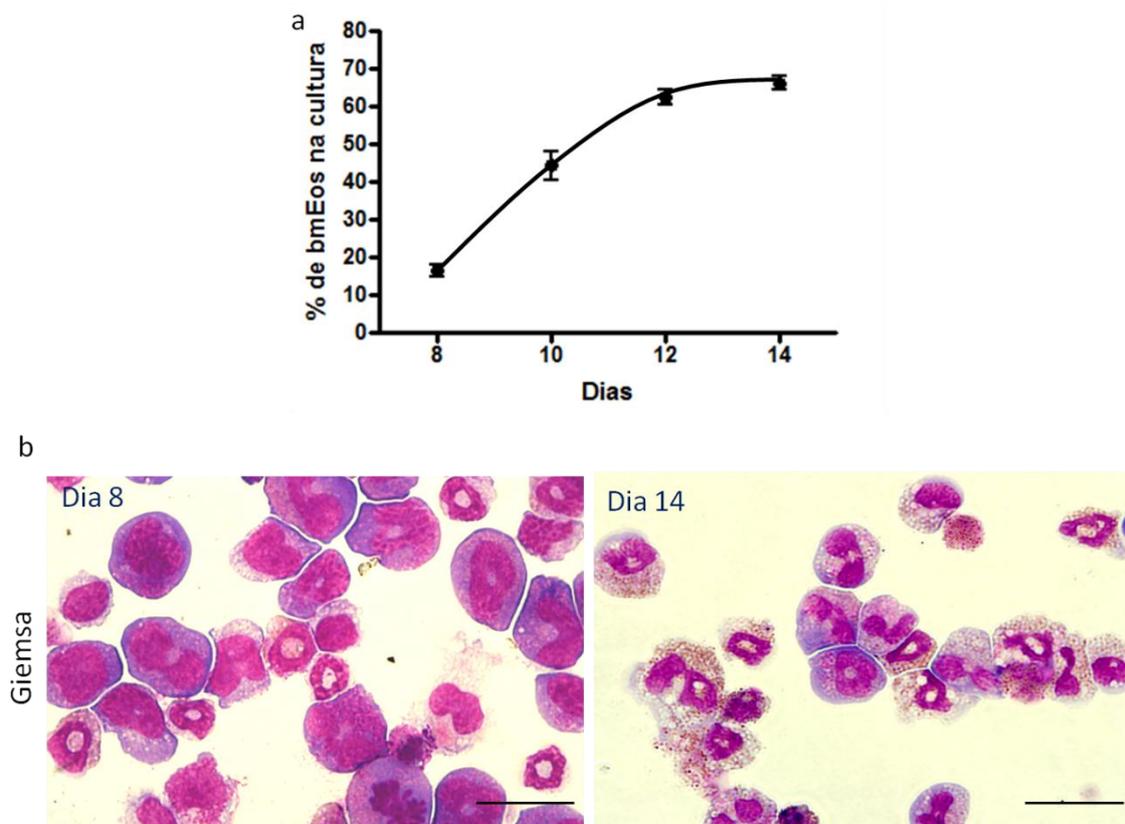
### 4.1. Diferenciação *in vitro* de eosinófilos induzida por citocinas (SCF, FLT3-L e IL-5) partir de progenitores de medula óssea murinos

As células isoladas a partir da medula óssea foram cultivadas na presença de SCF (100 ng/mL) e FLT3-L (100 ng/mL) até o dia 4 de cultura e em rmIL-5 (10 ng/mL) desse dia em diante, como foi descrito em Materiais e Métodos. O número de células encontrado nas culturas aumentou progressivamente e após 14 dias o número total de células dobra em relação ao número inicialmente plaqueado ( $10 \times 10^6$  células), podendo atingir aproximadamente  $20 \times 10^6$  células por cultura (Figura 3).



**Figura 3:** *Celularidade da cultura expandidos a partir de células da medula óssea de camundongos Balbc.* As células foram retiradas da cultura nos dias 4, 8, 10, 12 e 14, como foi descrito nos materiais e métodos, e contadas. O gráfico mostra o número total de células. Os dados representam a média  $\pm$  EPM;  $N > 3$ .

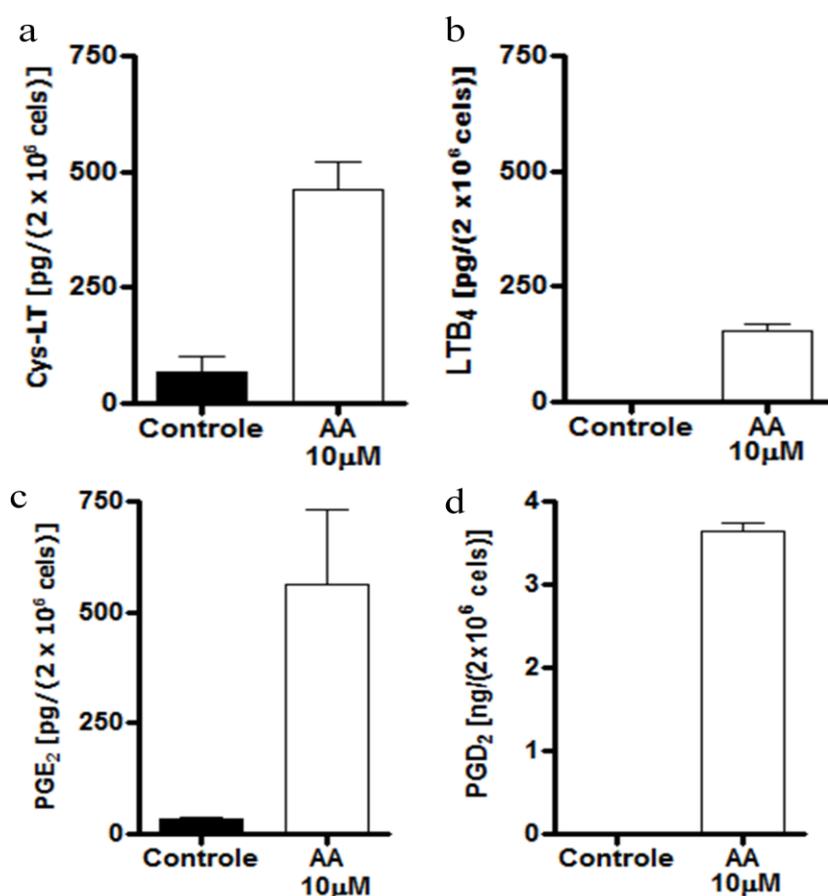
A porcentagem de eosinófilos na cultura, determinada pela coloração de May-Grünwald Giemsa, também aumentou progressivamente chegando ao nível máximo de diferenciação no dia 14 onde obtivemos em média 70% de eosinófilos murinos (Figura 4). Entretanto no dia 16 de cultura há uma redução de aproximadamente 31% no número total de células e de 14% no número de eosinófilos diferenciados (dado não mostrado). Considerando isso, o dia 14 foi escolhido como o dia para experimentação e, doravante, adotaremos o termo bmEos para designar esta população celular.



**Figura 4: Porcentagem de eosinófilos murinos (bmEos) diferenciados in vitro.** As células foram retiradas da cultura nos dias 8, 10, 12 e 14 para acompanhamento da diferenciação dos progenitores da medula óssea em eosinófilos, após a adição de IL-5 nas culturas. (a) porcentagem de eosinófilos na cultura nos dias indicados e (b) imagem de microscopia de campo claro nos dias 8 e 14 de cultura mostrando o processo de diferenciação celular em lâminas coradas com May-Grünwald Giemsa. Aumento: 1000x. Os dados representam a média  $\pm$  EPM;  $N > 3$ .

## 4.2. bmEos são capazes de produzir cisLT, PGD<sub>2</sub> e PGE<sub>2</sub>

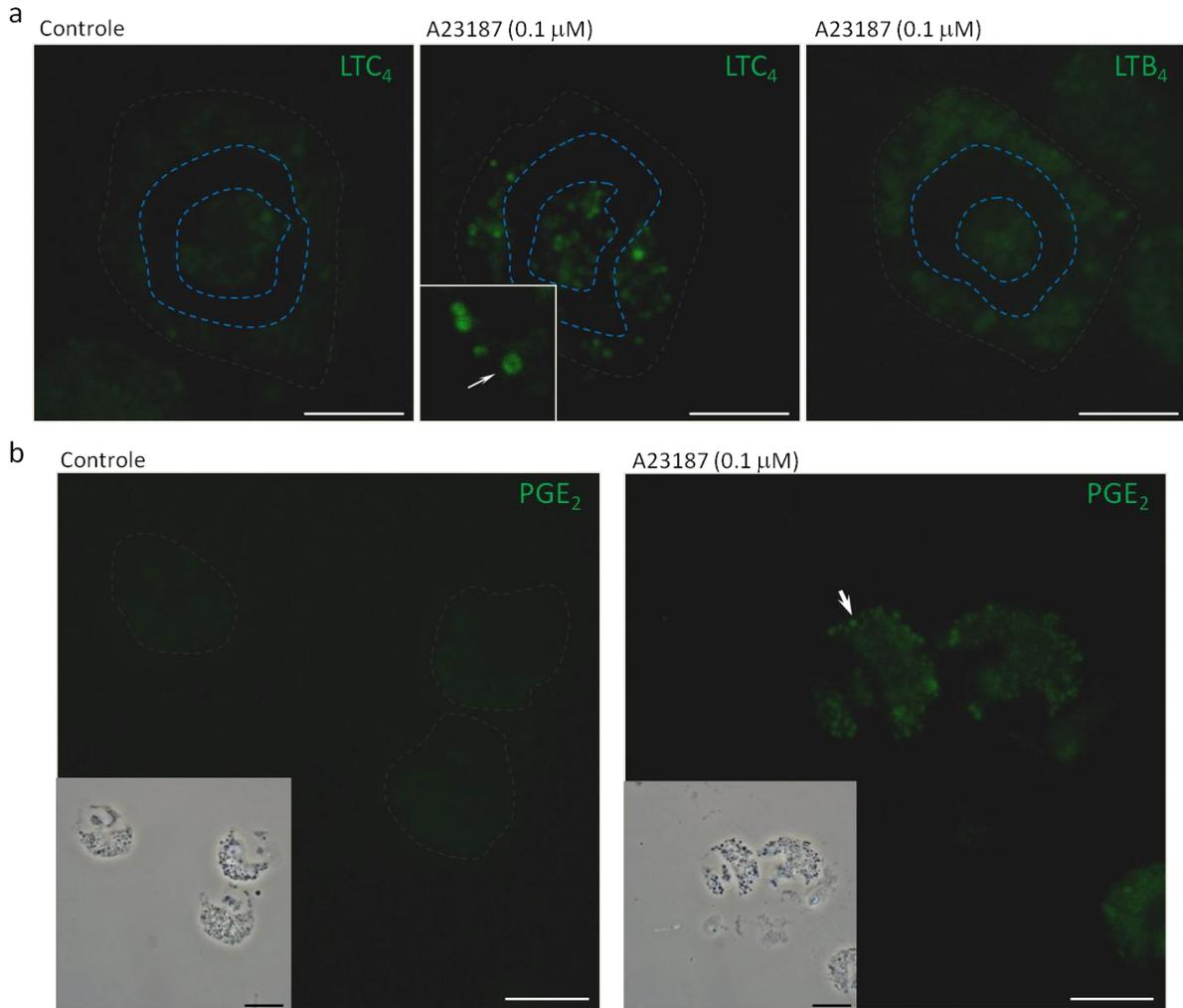
Para caracterizar a capacidade de produção de eicosanóides as células foram estimuladas por 15 min a 37°C com 10µM de AA exógeno, e foi feita a dosagem no sobrenadante de cisLTs, LTB<sub>4</sub>, PGE<sub>2</sub> e PGD<sub>2</sub> por EIA (Figura 5). A figura 5 mostra que bmEos foram capazes de metabolizar o AA exógeno, indicando a presença da maquinaria enzimática necessária para a produção e secreção de cisLTs, PGE<sub>2</sub> e PGD<sub>2</sub>, e em menor quantidade de LTB<sub>4</sub>.



**Figura 5:** *Produção de mediadores lipídicos por bmEos dosados no sobrenadante.* bmEos foram incubados com 10 µM de AA exógeno a 37°C por 15 min. Os níveis de (a) cisLT, (b) LTB<sub>4</sub>, (c) PGE<sub>2</sub> e (d) PGD<sub>2</sub> encontrados no sobrenadante celular foram dosados por EIA. A dosagem foi feita como descrita na metodologia. Os dados representam a média ± EPM; N > 3.

Esses dados foram corroborados utilizando uma metodologia que permite a imuno-deteccção de lipídios em seu sítio de síntese, conhecida como EicosaCell (Bandeira-Melo *et al.*, 2001). Após a estimulação de bmEos por 15 min com 0,1  $\mu$ M de ionóforo de cálcio (A23187), fomos capazes de detectar a produção de LTC<sub>4</sub>, mas não de LTB<sub>4</sub> (Figura 6a). Em outro grupo de ensaios, foi também detectada a síntese de PGE<sub>2</sub> em bmEos por EicosaCell (Figura 6b). Esta contradição encontrada nos resultados de produção de LTB<sub>4</sub> pode ser devido: (i) aos diferentes estímulos utilizados o nos ensaios de EIA e EicosaCell, AA e A23187, respectivamente; (ii) o EicosaCell para LTB<sub>4</sub> precise de ajustes e não esteja sendo eficiente em detectar pequenas quantidades de LTB<sub>4</sub> intracelular; ou (iii) o LTB<sub>4</sub> encontrado no sobrenadante das células estimuladas com AA (Figura 5b) ser derivado das outras células presentes na cultura e não por bmEos.

Considerando tanto tamanho quanto o formato dos sítios de produção desses eicosanóides podemos sugerir que esses mediadores lipídicos estejam sendo sintetizados em corpúsculos lipídicos. Esses dados sugerem que bmEos possuem uma maquinaria enzimática para a produção de mediadores lipídicos funcional e que os eicosanóides produzidos por essas células são compatíveis com o perfil de mediadores lipídicos associado à eosinófilos.

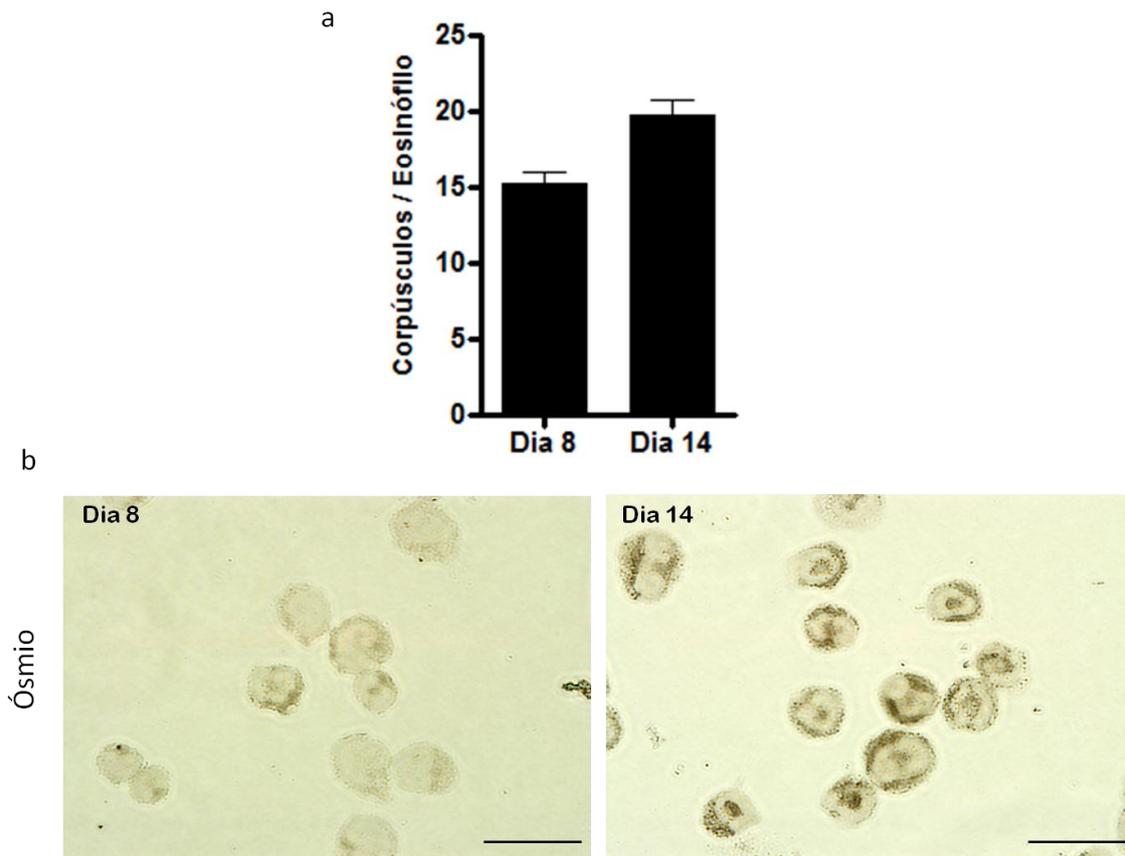


**Figura 6: Produção de mediadores lipídicos por bmEos in situ.** bmEos foram incubados ou não com 0,1 μM de A23187 a 37°C por 15 min fixados com EDAC e submetidos a imuno-marcação para (a) LTC<sub>4</sub> (painel do meio) e LTB<sub>4</sub> (painel da direita) e (b) PGE<sub>2</sub>. As setas mostram o sítio de produção dos eicosanóides condizentes com corpúsculos lipídicos. Barra = 5 μM.

### **4.3. bmEos induzem a biogênese de corpúsculos lipídicos em resposta a diversos estímulos**

Outra forma de caracterização funcional dos bmEos é demonstrar que estas células assim como eosinófilos humanos e murinos são capazes de formar novos corpúsculos lipídicos em resposta à estímulos específicos. Diversos agonistas são capazes de disparar mecanismos intracelulares que ativam a rápida biogênese de novos corpúsculos lipídicos, que acontece dentro de poucos minutos após a estimulação (revisado por BANDEIRA-MELO, BOZZA e WELLER, 2002).

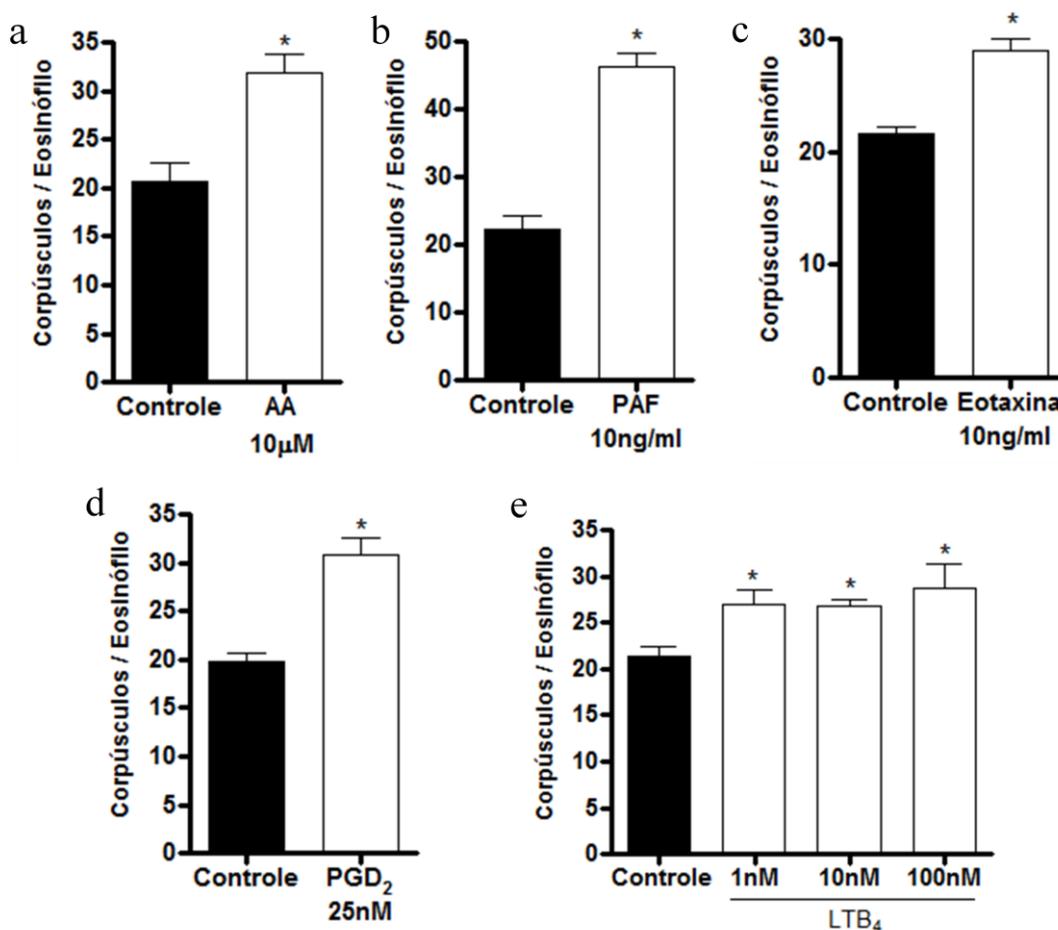
Visto que eosinófilos não-estimulados, sejam eles humanos ou murinos, contém corpúsculos lipídicos seus citoplasmas (revisado por BANDEIRA-MELO, BOZZA e WELLER, 2002), inicialmente analisamos o número basal de corpúsculos lipídicos citoplasmáticos encontrados nos bmEos não-estimulados. Como ilustrado na Figura 7, bmEos também apresentam um número basal de corpúsculos lipídicos. bmEos que foram retirados da cultura nos dias 8 e 14 e corados por ósmio, apresentaram em média um número basal de 15 e 20 corpúsculos lipídicos, respectivamente (Figura 7).



**Figura 7: Número basal de corpúsculos lipídicos em bmEos.** As células foram retiradas da cultura nos dias 8 e 14, fixadas em paraformaldeído e coradas por tetróxido de ósmio. **(a)** número de corpúsculos lipídicos por bmEos nos dias 8 e 14 de cultura e **(b)** imagem de microscopia de campo claro nos dias 8 e 14 de cultura mostrando o número basal de corpúsculos lipídicos durante o processo de diferenciação. Aumento: 1000x.

bmEos foram capazes de montar uma maquinaria para rápida biogênese de corpúsculos lipídicos quando apropriadamente estimulados (Figura 8). AA, PAF, eotaxina e PGD<sub>2</sub>, que conhecidamente induzem biogênese de corpúsculos lipídicos em eosinófilos humanos por mecanismos intracelulares distintos (BOZZA et al, 1996; BANDEIRA-MELO et al, 2001; MESQUITA-SANTOS et al, 2006), também foram capazes de induzir a biogênese dessa organela em bmEos (Figura 8 a-d). Além desses estímulos,

o LTB<sub>4</sub>, diferente do que ocorre em eosinófilos humanos, também induziu a biogênese de corpúsculos lipídicos em bmEos (Figura 8 e).



**Figura 8: Biogênese de corpúsculos lipídicos em bmEos.** bmEos foram tratados por 1 h a 37°C com diversos estímulos: (a) 10 μM de AA; (b) 10 ng/mL de PAF; (c) 10 ng/mL de eotaxina; (d) 25 nM de PGD<sub>2</sub> e (e) 1, 10 e 100 nM de LTB<sub>4</sub>. Todos os tratamentos foram capazes de induzir a biogênese de corpúsculos lipídicos. Os dados representam a média ± EPM de no mínimo 3 experimentos independentes; N > 3. \*P<0,05 comparado ao grupo controle.

#### 4.4. HQL-79 inibe a biogênese de corpúsculos lipídicos induzida por AA em bmEos

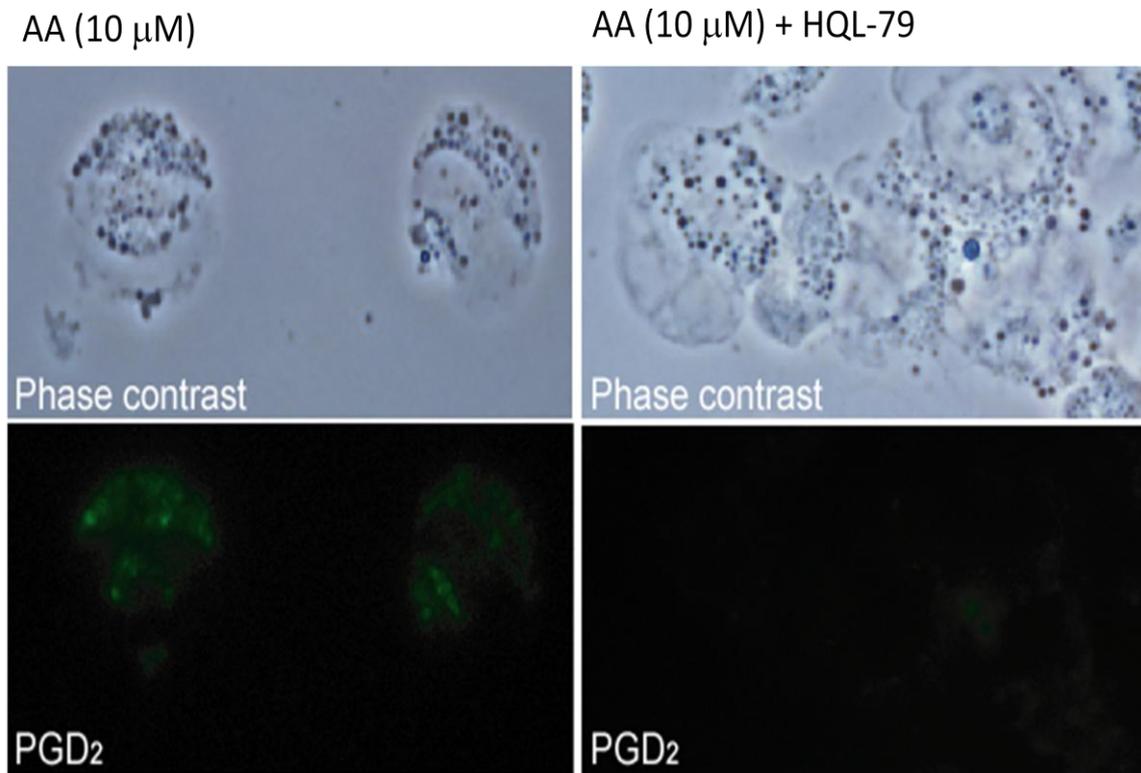
Até o momento, os dados sugerem que bmEos são uma boa ferramenta para o estudo da biologia dos eosinófilos, já que ao final do processo de diferenciação nós

conseguimos obter uma boa quantidade de células total e um bom percentual de células diferenciadas. Além disso, bmEos foram capazes de responder como eosinófilos humanos à diversos estímulos, sendo capazes de serem ativados. bmEos mostraram-se capazes de ativar o processo de biogênese de corpúsculos lipídicos e a maquinaria enzimática para a síntese e secreção de eicosanóides, como LTC<sub>4</sub>, PGE<sub>2</sub> e PGD<sub>2</sub>.

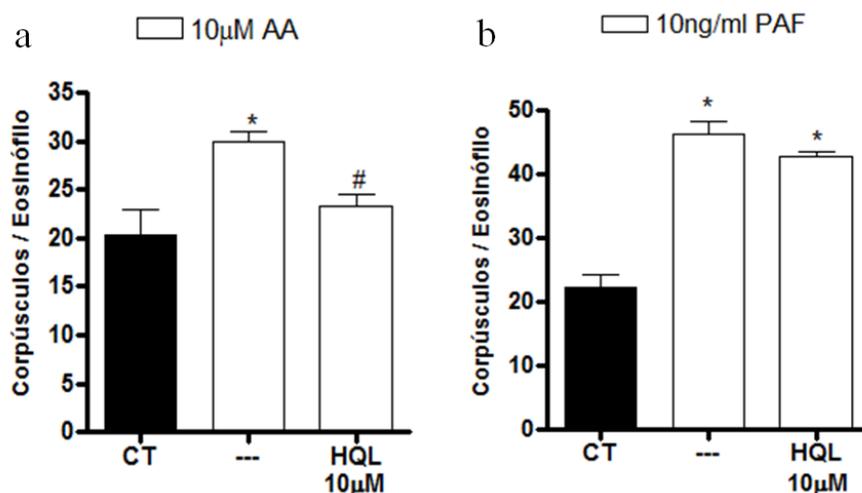
Em seguida investigamos a sinalização intracelular em resposta à estimulação de bmEos pelo AA. Como foi visto anteriormente, o AA induz a liberação de PGD<sub>2</sub>. Visto que a PGD<sub>2</sub> por sua vez é um potente indutor da biogênese de corpúsculos lipídicos (MESQUITA-SANTOS et al, 2006), hipotetizamos parte dos efeitos estimulatórios do AA se devem a uma atividade autócrina/parácrina de PGD<sub>2</sub> endógena.

Inicialmente por EicosaCell, confirmamos que a estimulação por AA induz a rápida (1 h) síntese de PGD<sub>2</sub> por bmEos (Figura 9). Ao analisarmos as imagens, identificamos mais uma vez os corpúsculos lipídicos como os compartimentos intracelulares responsáveis por esta síntese. A Figura 9 também mostra que a pré-tratamento dos bmEos com HQL-79, um inibidor seletivo da H-PGDS, foi capaz de bloquear a síntese de PGD<sub>2</sub> induzida por AA, dado este que possibilita o estudo da potencial atividade autócrina/parácrina da PGD<sub>2</sub> endógena. Para isso, bmEos foram pré-tratados com HQL-79, estimuladas com 10 µM de AA por 1 h a 37°C e analisadas quanto a ativação celular utilizando-se como parâmetro a biogênese de corpúsculos lipídicos. Como mostrado na Figura 10a, a biogênese de corpúsculos lipídicos induzida por AA em bmEos foi significativamente reduzida pelo HQL-79. Vale notar que este efeito inibitório do HQL-79 não foi observado quando os bmEos foram alternativamente estimulados por PAF (Figura 10b), sugerindo que a PGD<sub>2</sub> especificamente sintetizada/secretada por bmEos em resposta à estimulação com AA

atue de forma autócrina/parácrina para indução da biogênese de corpúsculos lipídicos por essas células.



**Figura 9:** *bmEos produzem PGD<sub>2</sub> em resposta ao AA.* bmEos foram pré-tratados ou não com 10  $\mu$ M de HQL-79 por 30 min a 0°C e estimulados com 10 $\mu$ M AA a 37°C por 15 min. Em seguida fixados com EDAC e submetidos à imuno-marcação para PGD<sub>2</sub>.

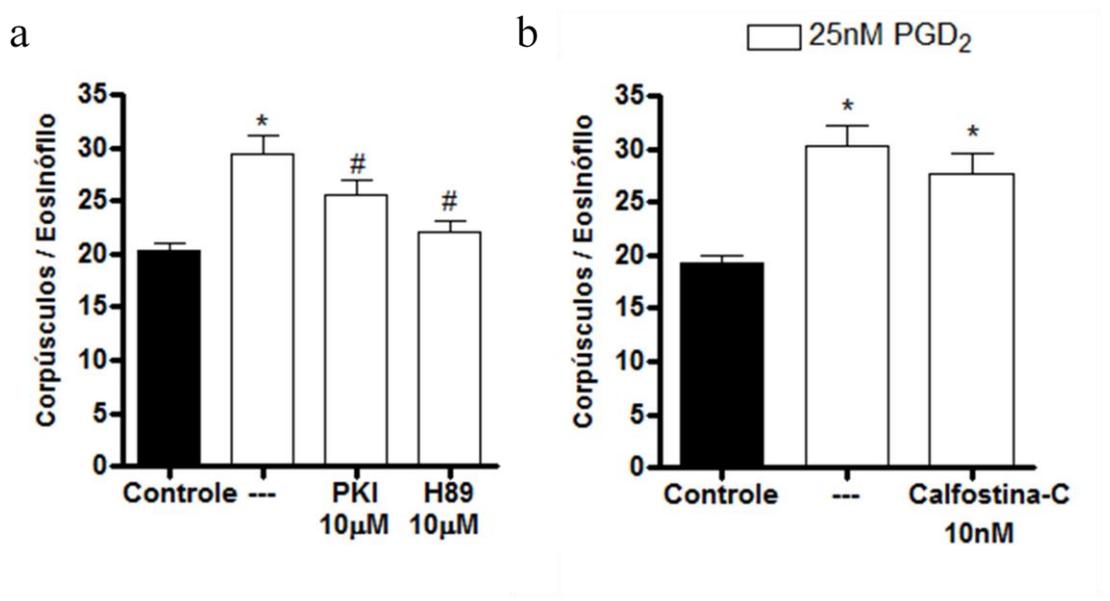


**Figura 10:** A biogênese de corpúsculos lipídicos induzida por AA é inibida por HQL-79. bmEos foram pré-incubados ou não com 10 μM de HQL-79 por 30 min a 0°C e estimulados com (a) 10 μM AA ou (b) 10 ng/mL de PAF a 37°C por 1 h. Os dados representam a média ± EPM de no mínimo 3 experimentos independentes; N > 3. \* $P < 0,05$  comparado ao controle. #  $P < 0,05$  comparado ao estímulo.

#### 4.5. PGD<sub>2</sub> induz biogênese de corpúsculos lipídicos via PKA

Sabe-se que, muito embora uma variedade de tipos de estimulação celular culmine na ativação do processo de biogênese dos corpúsculos lipídicos, os mecanismos intracelulares envolvidos podem variar grandemente. Dessa forma, objetivamos caracterizar por qual via intracelular a PGD<sub>2</sub> sinalizaria para induzir a rápida biogênese de corpúsculos lipídicos em bmEos. Inicialmente, foram utilizados dois inibidores da proteína cinase A (PKA), estruturalmente não-relacionados, o PKI e o H89. O pré-tratamento com os inibidores por 5 min a 0°C foi capaz de inibir a biogênese de corpúsculos lipídicos induzida pela PGD<sub>2</sub>, sugerindo que a via de sinalização usada para a biogênese de corpúsculos lipídicos pela PGD<sub>2</sub> é a via de sinalização dependente da ativação de PKA (Figura 11a).

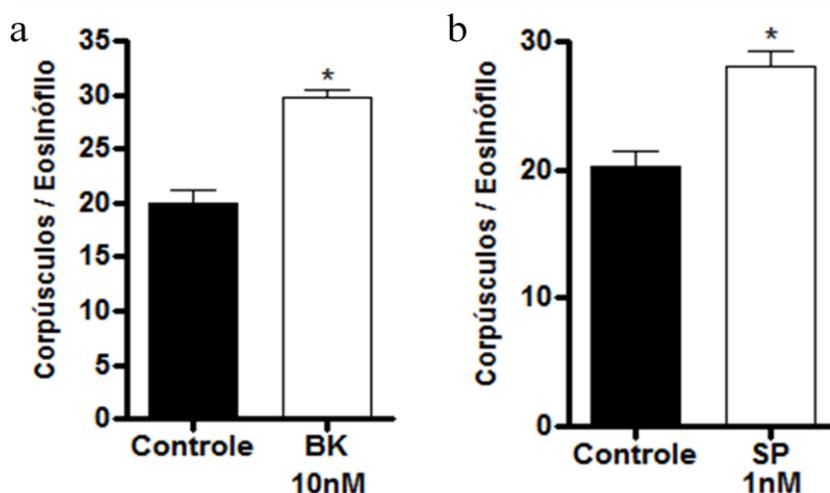
Investigamos também o envolvimento da sinalização dependente de PKC na indução da formação de corpúsculos lipídicos por PGD<sub>2</sub> em bmEos. Como ilustrado na Figura 11b, o pré-tratamento com a Calfostina-C, um inibidor da proteína cinase C (PKC) por 5 min a 0°C seguido da estimulação com PGD<sub>2</sub>, não foi capaz de inibir a biogênese de corpúsculos lipídicos induzida pela PGD<sub>2</sub>, sugerindo que a via de sinalização utilizada para a biogênese de corpúsculos lipídicos pela PGD<sub>2</sub> é uma via de sinalização independente de PKC (Figura 11b).



**Figura 11:** A biogênese de corpúsculos lipídicos induzida por PGD<sub>2</sub> é dependente de PKA, mas não PKC. bmEos foram pré-tratados com (a) os inibidores de PKA, PKI ou H89, ou com (b) o inibidor de PKC, Calfostina-C por 5 min a 0°C e estimulados com PGD<sub>2</sub> por 1 h a 37°C. Os dados representam a média ± EPM de no mínimo 3 experimentos independentes; N > 3. \*P <0,05 comparado ao controle. #P <0,05 comparado ao estímulo.

#### 4.6. BK e SP induzem biogênese de corpúsculos lipídicos por bmEos

Bradicinina (BK) e substância P (SP) são peptídeos inflamatórios classicamente descritos como potentes moléculas vasoativas. Dentre suas funções inflamatórias destacam-se a indução de edema e o recrutamento de leucócitos. Hoje se sabe que esses peptídeos participam de processos alérgicos como rinite alérgica e asma, patologias associadas com eosinofilia. Assim, fomos avaliar se BK e SP são capazes de ativar eosinófilos. Para isso, bmEos foram estimuladas por 1 h a 37°C com BK ou SP e como parâmetro de ativação fomos avaliar a biogênese de corpúsculos lipídicos. Como pode ser observado na Figura 12, tanto 10 nM de BK (Figura 12a) quanto 1 nM de SP (Figura 12b) foram capazes de induzir a rápida e significativa biogênese de corpúsculos lipídicos por bmEos.

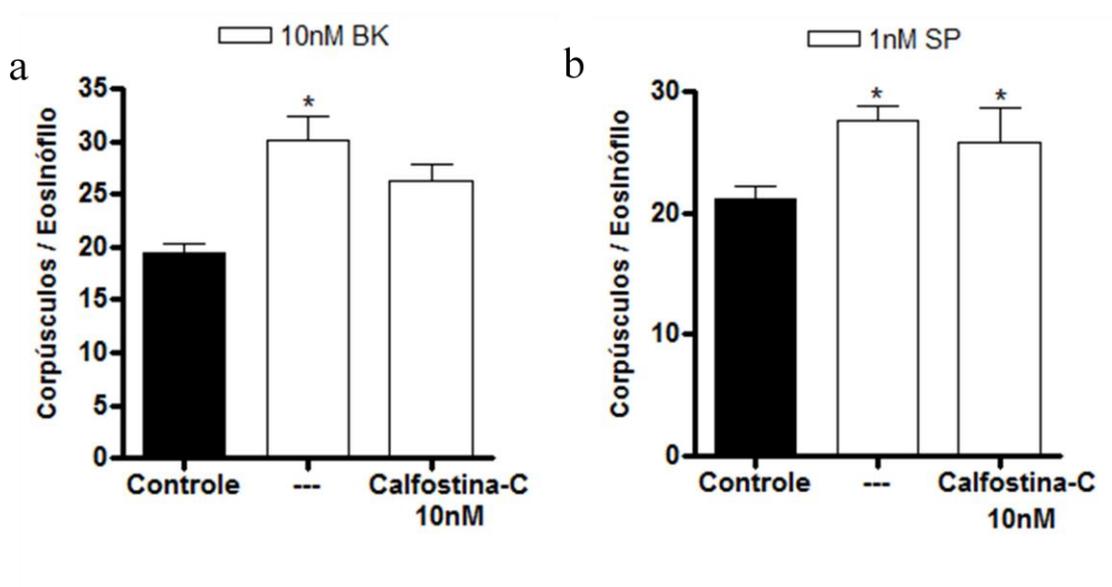


**Figura 12:** *BK e SP induzem biogênese de corpúsculos lipídicos por bmEos.* bmEos foram tratados por 1 h a 37°C com (a) 10 nM de BK e (b) 1 nM de SP. Os dados representam a média ± EPM de no mínimo 3 experimentos independentes; N > 3. \*P < 0,05 comparado ao controle.

#### 4.7. BK, mas não SP, induz biogênese de corpúsculos lipídicos via PKA

Em seguida fomos verificar qual via de sinalização estaria envolvida na biogênese de corpúsculos lipídicos induzida por BK e SP.

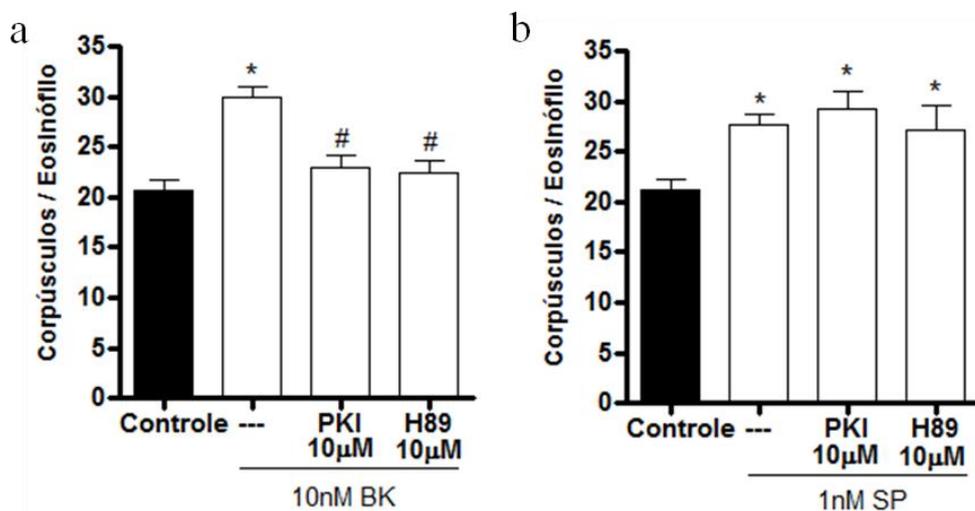
Para estudarmos se a participação de uma via de sinalização dependente de PKC contribui para a sinalização gerada pelas estimulações por BK e SP que culminam com a biogênese de corpúsculos lipídicos em bmEos, empregamos a Calfostina-C. bmEos foram pré-tratados com 10 nM de Calfostina-C por 5 min a 0°C antes das estimulações com BK ou SP. A Figura 13 mostra que o inibidor não foi capaz de inibir a biogênese de corpúsculos lipídicos induzida por BK (Figura 13a) ou SP (Figura 13b), sugerindo que a biogênese de corpúsculos lipídicos aconteça por uma via independente de PKC.



**Figura 13:** *Calfostina-C não é capaz de inibir a biogênese de corpúsculos lipídicos induzida por BK e SP.* bmEos foram pré-tratados com inibidor de PKC por 5 min a 0°C e estimulados com (a) BK ou (b) SP por 1 h a 37°C. Os dados representam a média  $\pm$

EPM de no mínimo 3 experimentos independentes;  $N > 3$ .  $*P < 0,05$  comparado ao controle.

Para verificar se a via de sinalização dependente de PKA também participa na sinalização que ativa a biogênese de corpúsculos lipídicos por bmEos foram novamente utilizados os dois inibidores da PKA, PKI e H89. O pré-tratamento com os inibidores por 5 min a  $0^{\circ}\text{C}$  foi capaz de inibir a biogênese de corpúsculos lipídicos induzida pela BK (Figura 14a), sugerindo que a via de sinalização usada para a biogênese de corpúsculos lipídicos pela BK é dependente da ativação de PKA. Entretanto, nem PKI nem H89 foram capazes de inibir a biogênese de corpúsculos lipídicos induzida por SP (Figura 14b), sugerindo que a biogênese destas organelas induzida por SP em bmEos não envolve a ativação de PKA.



**Figura 14:** A biogênese de corpúsculos lipídicos induzida por BK, mas não SP é inibida por PKI e H89. bmEos foram pré-tratados com inibidores de PKA por 5 min a  $0^{\circ}\text{C}$  e estimulados com (a) BK ou (b) SP por 1 h a  $37^{\circ}\text{C}$ . Os dados representam a média  $\pm$  EPM de no mínimo 3 experimentos independentes;  $N > 3$ .  $*P < 0,05$  comparado ao controle.  $\#P < 0,05$  comparado ao estímulo.

## 5. DISCUSSÃO

Eosinófilos parecem estar envolvidos na patogênese de diversas doenças inflamatórias, como por exemplo, infecções por helmintos e doenças alérgicas. Além de seu conhecido papel efetor em processos inflamatórios, vem sendo sugerido para essas células um papel imunomodulador. Com isso, entender melhor a fisiobiologia dos eosinófilos se faz necessário. Entretanto, ainda existem poucas ferramentas que permitam um estudo apropriado dessas células.

Em nosso laboratório, utilizamos rotineiramente como modelo de estudo eosinófilos, eosinófilos humanos purificados a partir do sangue periférico de doadores voluntários e saudáveis. Apesar de ser um excelente modelo de estudo que permite a avaliação de vários parâmetros da fisiobiologia eosinofílica, a purificação de eosinófilos humanos apresenta diversas desvantagens como: custo elevado, dificuldade de obtenção de doadores, um baixo rendimento de células ao final do processo e a variabilidade de respostas celular decorrente das diferenças individuais dos doadores. Assim, é de grande interesse do nosso laboratório o desenvolvimento de outras estratégias experimentais que permitam o estudo dessas células.

Dyer e colaboradores desenvolveram um modelo de diferenciação *ex vivo* que permite gerar grandes quantidades de eosinófilos com alto grau de pureza a partir do conteúdo medular total. Para isso eles utilizaram um coquetel de citocinas que inclui, em um primeiro momento SCF, FLT3-L, para expansão celular (com um aumento de cerca de 10 vezes no número total de células ao final do processo em relação ao número inicial), e posteriormente IL-5, para diferenciação (com uma pureza de cerca de 90% de eosinófilos) (Dyer et al, 2008). Nesse mesmo trabalho foi feita uma caracterização fenotípica dessas células, onde os autores observaram a expressão de diversos

marcadores de eosinófilos, como por exemplo, do fator de transcrição GATA-1, do receptor CCR3 e dos receptores de IL-5, IL-3 e GM-CSF, que como descrito anteriormente são de extrema importância para a diferenciação da linhagem eosinofílica. Além disso, eles avaliaram a expressão das proteínas catiônicas específicas de eosinófilos, como MBP e EPO e observaram a presença de siglec F na membrana dessas células. O conjunto dos dados comprova que as células em questão são de fato eosinófilos (Dyer et al, 2008).

Tendo em vista a demanda de eosinófilos que nosso grupo apresenta, com o crescente número de projetos e teses que de modo geral visam o entendimento dos processos de ativação eosinofílica com ênfase na caracterização dos mecanismos de síntese e ação de eicosanóides por este tipo celular, nós resolvemos reproduzir o protocolo de Dyer e colaboradores e fazer uma caracterização funcional dessas células, para verificar se estas estariam respondendo como eosinófilos para os parâmetros que são de interesse do nosso grupo.

A análise da celularidade e da diferenciação mostrou que o cultivo *ex vivo* de eosinófilos a partir da medula óssea teve um bom rendimento celular e um nível de pureza razoável. Apesar de ainda não conseguirmos reproduzir totalmente o resultado de Dyer e colaboradores, que obtiveram celularidade e pureza mais elevadas, quando comparado à purificação de eosinófilos humanos, a diferenciação de células da medula óssea em eosinófilos é bastante vantajosa, quando consideramos o alto custo para a purificação de eosinófilos humanos e o rendimento final de células (em média  $10 \times 10^6$  células, dependendo do doador).

Essa diferença observada na pureza das culturas em relação ao trabalho de Dyer pode ser justificada por diferenças entre os fabricantes das citocinas. Algumas

modificações neste protocolo foram feitas na tentativa de melhorar a pureza obtida, como aumentar a quantidade de dias em que as células ficavam expostas ao SCF e FLT3-L ou dobrar a concentração de IL-5. Entretanto, essas alterações ou diminuíram ou pouco alteraram a pureza das culturas.

Por se tratar de uma população mista, algumas preocupações foram tomadas. Como as técnicas utilizadas permitiam a visualização das células (por exemplo, o EicosaCell), tanto os corpúsculos lipídicos quanto a produção *in situ* de eicosanóides, só foram avaliados em células que morfologicamente são consideradas eosinófilos.

A caracterização funcional de bmEos foi feita através da utilização de parâmetros de ativação celular de rotina em nosso laboratório, como produção de mediadores lipídicos e indução da biogênese de corpúsculos lipídicos. Encontra-se bem caracterizado na literatura que eosinófilos humanos são capazes de sintetizar diferentes mediadores lipídicos em resposta a diversos estímulos. Eosinófilos humanos estimulados com AA ou com ionóforo de cálcio (A23187) produzem altos níveis de LTC<sub>4</sub>, que é o principal produto da 5-LO em eosinófilos (BOZZA et al, 1996; revisado por BANDEIRA-MELO, BOZZA e WELLER, 2002). Além desses estímulos supra-fisiológicos, estudos empregando estímulos com moléculas de caráter mais fisiológicas, que possuem relevância para distúrbios eosinofílicos, demonstraram a capacidade de estas células produzirem eicosanóides em resposta à estimulação. Por exemplo, a estimulação com PAF potencializa a síntese de LTC<sub>4</sub> e PGE<sub>2</sub> por eosinófilos humanos (BOZZA et al, 1997), enquanto que a estimulação PGD<sub>2</sub> induziu a síntese de LTC<sub>4</sub> mas não de PGE<sub>2</sub> por estas células (MESQUITA-SANTOS et al, 2006). Além disso, dados não publicados do nosso laboratório demonstram pela primeira vez que eosinófilos humanos são capazes de produzir PGD<sub>2</sub> (LUNA-GOMES et al, 2010 submetido). Já estudos utilizando estímulos protéicos, como a eotaxina e RANTES, demonstram que os

eosinófilos sintetizam/secretam LTC<sub>4</sub> e que essa produção está relacionada com o aumento do número de corpúsculos lipídicos por eosinófilos (Bandeira-Melo et al, 2001a; BANDEIRA-MELO et al, 2001b).

Coletivamente, estes estudos demonstram uma capacidade de síntese de eicosanóides, que apesar de ser estímulo específica, caracteriza os eosinófilos humanos como capazes de secretar o seguinte grupo de eicosanóides: LTC<sub>4</sub>, PGE<sub>2</sub> e PGD<sub>2</sub>. Aqui, nós demonstramos que, assim como acontece com eosinófilos humanos, bmEos também possuem a capacidade de secretar LTC<sub>4</sub>, PGE<sub>2</sub> e PGD<sub>2</sub>, em resposta à adição de AA exógeno às células ou à estimulação com ionóforo de cálcio, sugerindo que bmEos tem a maquinaria enzimática necessária para a produção de eicosanóides.

Aqui vale destacar que, além dos estudos *in vitro* com eosinófilos humanos, Vieira-de-Abreu e colaboradores (2005) demonstraram que, em um modelo murino de asma, também há produção de LTC<sub>4</sub> *in vivo* nos eosinófilos recrutados para o sítio inflamatório, quando os animais são desafiados com estímulo alérgico e que essa produção ocorre em domínios intracelulares específicos dos eosinófilos denominados corpúsculos lipídicos.

Para eosinófilos humanos, dois domínios intracelulares foram descritos como capazes de organizar a maquinaria enzimática para síntese de eicosanóides e efetivamente gerar estes mediadores, o envelope nuclear e os corpúsculos lipídicos. Para os estímulos fisiológicos utilizados aqui, incluindo PAF, eotaxina e PGD<sub>2</sub>, o principal sítio de produção de eicosanóides em eosinófilos humanos estimulados são os corpúsculos lipídicos (BOZZA et al, 1997; VIEIRA-DE-ABREU et al, 2010; MESQUITA-SANTOS et al, 2006).

Corpúsculos lipídicos são organelas citoplasmáticas que parecem estar presentes em todas as células nucleadas humanas. Estão relacionadas a processos inflamatórios, onde caracteristicamente se encontram aumentadas em número e em tamanho em leucócitos e em outras células relacionadas com a inflamação, sendo assim um excelente marcador de ativação celular (revisado por BANDEIRA-MELO, BOZZA e WELLER, 2002).

Eosinófilos não estimulados, assim como outras células, apresentam corpúsculos lipídicos. Eosinófilos humanos apresentam um número basal de nove corpúsculos lipídicos/célula e quando ativados são capazes gerar novos corpúsculos lipídicos por um processo biogênico altamente regulado. Entretanto, o número de corpúsculos lipídicos basal pode variar conforme a localização em que o eosinófilo é encontrado. Por exemplo, eosinófilos no sítio inflamatório apresentam um basal mais elevado em comparação aos eosinófilos presentes no sangue periférico.

bmEos também apresentaram um número basal de corpúsculos lipídicos. Eles apresentaram um número elevado de corpúsculos lipídicos em relação aos eosinófilos humanos (em média 20 corpúsculos lipídicos/célula), o que pode ser justificado por essas células serem cultivadas em um coquetel de citocinas e ainda em um meio rico em soro (20% SFB), o que poderia estar mimetizando o que acontece com o eosinófilo no sítio inflamatório. Apesar do número basal elevado, bmEos também foram capazes de induzir a biogênese de corpúsculos lipídicos quando ativados. A Figura 15 sumariza esses dados, mostrando que estímulos como AA, PAF, PGD<sub>2</sub> e eotaxina, induzem a biogênese de corpúsculos lipídicos tanto em eosinófilos humanos quanto em bmEos. Já o LTB<sub>4</sub>, que em humanos não induzem a biogênese de corpúsculos lipídicos, foi capaz de induzir em bmEos. Existem algumas explicações cabíveis para justificar esse dado. A primeira opção é que bmEos, por se tratarem de células diferenciadas *in vitro* em um

coquetel de citocinas possam apresentar essa diferença em relação aos eosinófilos humanos, e estejam de fato respondendo ao  $\text{LTB}_4$  com biogênese de corpúsculos lipídicos. A segunda opção se justificaria por não se tratar de uma população pura de células. Como existem outros tipos celulares junto com bmEos na cultura, as células contaminantes poderiam estar respondendo ao  $\text{LTB}_4$  e secretando mediadores no meio, que por sua vez estariam induzindo a biogênese de corpúsculos lipídicos por bmEos.

Após verificar que bmEos respondem da mesma forma que eosinófilos humanos, nós demonstramos que o AA induz a biogênese de corpúsculos lipídicos em bmEos por uma ação autócrina/parácrina de  $\text{PGD}_2$ , já que o uso do HQL-79 inibiu a biogênese de corpúsculos lipídicos. Essa participação da  $\text{PGD}_2$  na indução da biogênese de corpúsculos lipídicos, porém, se mostrou estímulo-específica, uma vez que o pré-tratamento com HQL-79 não foi capaz de inibir a biogênese induzida por PAF.

Já está bem caracterizado que eicosanóides podem agir de forma autócrina/parácrina ou até mesmo intrácrina. Por exemplo, eosinófilos humanos estimulados com eotaxina são capazes de secretar IL-4 e RANTES. Entretanto, a secreção de IL-4, mas não a de RANTES, depende da ação de  $\text{LTC}_4$ . A adição exógena de  $\text{LTC}_4$  estimula a secreção de IL-4. Além disso, o tratamento com dois inibidores da via da 5-LO (MK886 e AA861) bloquearam a liberação de IL-4 após o estímulo com eotaxina, o que não foi observado para RANTES (Bandeira-Melo et al, 2002).

Eosinófilos		Referências: Eosinófilos Humano
bmEos	Humano	
<b>Ácidos Graxos</b>		
Ácido araquidônico	+	Bozza et al. (1996), <i>PNAS</i>
<b>Fosfolipídios</b>		
PAF	+	Bozza et al. (1996), <i>J Exp Med</i>
<b>Eicosanóides</b>		
PGD <sub>2</sub>	+	Mesquita-Santos et al. (2006), <i>J Immunol</i>
LTB <sub>4</sub>	+	Bozza et al. (1996), <i>J Exp Med</i>
<b>Quimiocinas</b>		
Eotaxina	+	Bandeira-Melo et al. (2001), <i>Am J R Cel Mol Biol</i>
RANTES	n.d.	Bandeira-Melo et al. (2001), <i>J Immunol</i>

**Figura 15:** Estímulos indutores da biogênese de corpúsculos lipídicos por eosinófilos humanos e murinos.

Além dos estímulos já bastante conhecidos, como AA, PAF e eotaxina, recentemente têm sido descritos na literatura novos estímulos relevantes para a fisiobiologia dos eosinófilos, entre eles encontra-se a PGD<sub>2</sub>. Mesquita-Santos e colaboradores (2006) demonstraram que a PGD<sub>2</sub> ativa eosinófilos humanos in vitro e ainda potencializa a síntese de LTC<sub>4</sub> in vivo. Ainda em 2006, Cheung e colaboradores demonstraram os efeitos de IL-25 em eosinófilos, aumentando sua sobrevivência e induzindo a produção de citocinas e a expressão de moléculas de adesão por essas células.

Assim, a fim de identificar novos estímulos que possam ser relevantes para a fisiobiologia de eosinófilos nós avaliamos como bmEos responderiam a estímulos como BK e SP.

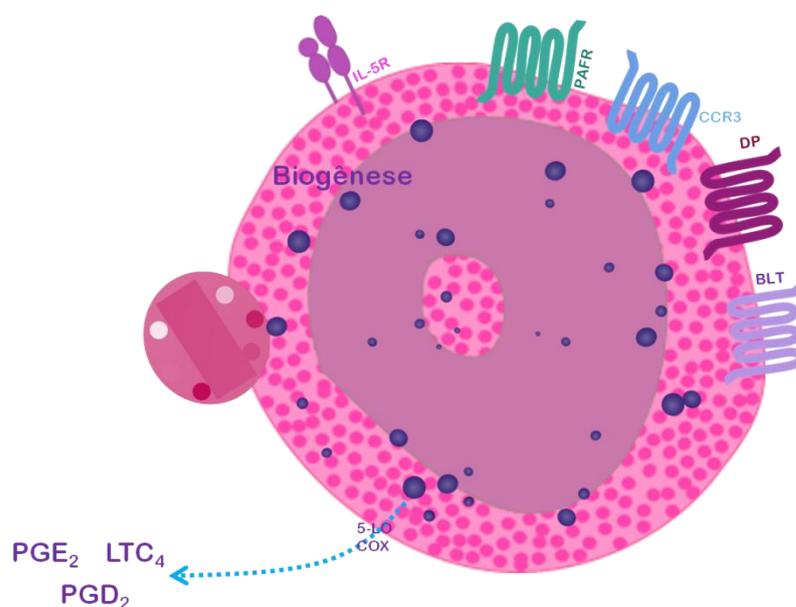
BK e SP são peptídeos inflamatórios envolvidos em patologias associadas com eosinofilia, como rinite alérgica e asma. São potentes peptídeos vasoativos e participam do processo inflamatório induzindo edema, migração de leucócitos e dor. Por estarem associados a patologias alérgicas, nós hipotetizamos que BK e SP seriam potenciais estímulos para a ativação de eosinófilos. Aqui, nós mostramos que bmEos foram ativados por BK e SP com indução da biogênese de corpúsculos lipídicos. Nós observamos que BK e SP, assim como PGD<sub>2</sub>, utilizam uma via independente de PKC para induzir a biogênese de corpúsculos lipídicos, já que o uso do inibidor de PKC, Calfofostina-C, não inibiu a biogênese de corpúsculos lipídicos. Entretanto, novamente como acontece com PGD<sub>2</sub>, BK também induz a biogênese de corpúsculos lipídicos por uma via dependente de PKA, visto que o pré-tratamento com os inibidores de PKA, PKI e H89, inibiram a biogênese de corpúsculos lipídicos. O mesmo não foi observado para SP, no qual o pré-tratamento com os inibidores em questão não foi capaz de inibir a biogênese de corpúsculos lipídicos.

Tendo em vista os resultados aqui obtidos, bmEos mostraram-se uma boa ferramenta para o estudo da fisiobiologia dos eosinófilos e de grande importância para o nosso laboratório, permitindo o estudo da biogênese de corpúsculos lipídicos e da maquinaria enzimática intracelular dos eosinófilos, e ainda apresentam-se como uma alternativa ao modelo de purificação de eosinófilos humanos. Além disso, o uso de bmEos se torna extremamente vantajoso considerando que teremos a possibilidade de gerar eosinófilos diferenciados a partir da medula óssea de animais transgênicos ou *knockouts*, o que permite uma ampliação do estudo sobre a fisiobiologia dessas células.

## 6. CONCLUSÕES

A metodologia descrita por Dyer e colaboradores (2008) de diferenciação de eosinófilos murinos (denominados bmEos) foi implementada com sucesso em nosso laboratório. bmEos se mostraram uma boa ferramenta para o estudo da biologia dos eosinófilos, visto que:

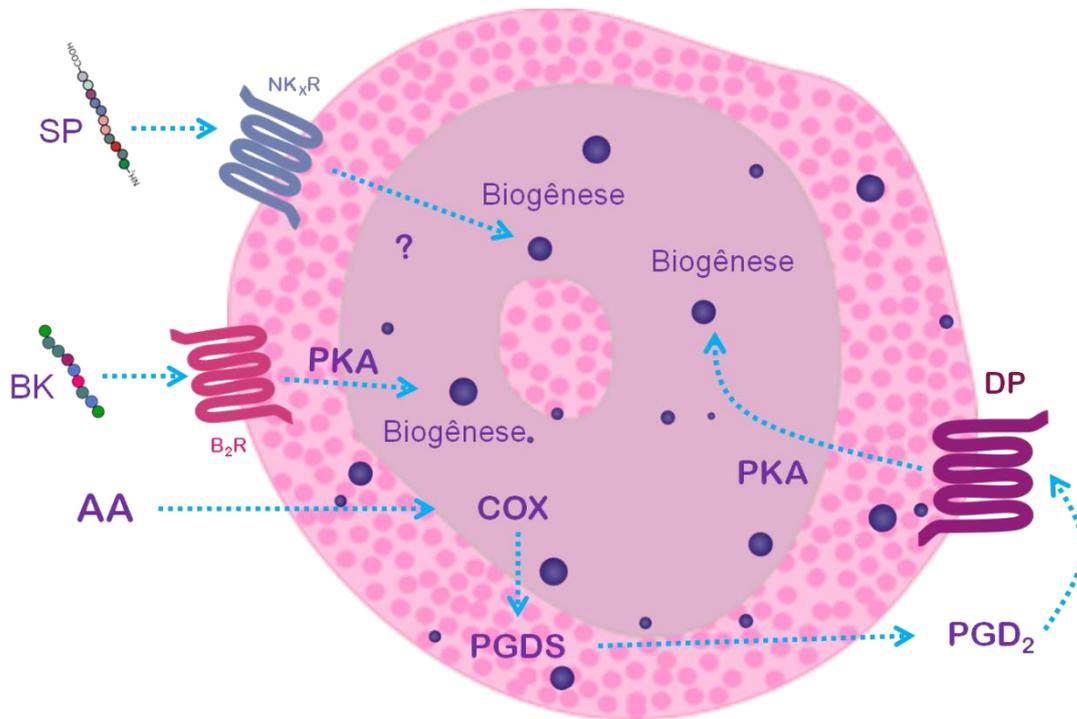
1. bmEos respondem como eosinófilos humanos à diversos estímulos, sendo capazes de serem ativados já que induzem a biogênese de corpúsculos lipídicos e possuem a maquinaria enzimática para a secreção de eicosanóides, como LTC<sub>4</sub>, PGE<sub>2</sub> e PGD<sub>2</sub> (Figura 16).



**Figura 16:** Caracterização funcional de bmEos.

2. O AA induz a secreção de PGD<sub>2</sub>, que atua de forma autócrina, induzindo a biogênese de corpúsculos lipídicos utilizando uma via de sinalização intracelular dependente de PKA (Figura 17).

3. BK e SP são capazes de ativar bmEos, induzindo a biogênese de corpúsculos lipídicos. BK, mas não SP, utiliza a ativação de PKA como via de sinalização para a biogênese de corpúsculos (Figura 17).



**Figura 17:** Sinalização intracelular envolvida na biogênese de corpúsculos lipídicos por *bmEos*. BK e PGD<sub>2</sub> utilizam uma via de sinalização dependente de PKA para a indução da biogênese de corpúsculos lipídicos, enquanto que SP induz a biogênese de corpúsculos lipídicos por uma via que não fomos capazes de identificar.

## 7. REFERÊNCIAS

ABRAHAM, WM, SIELCZAK, MW, AHMED, A, CORTES, A, LAUREDO, IT, KIM, J, PEPINSKY, B, BENJAMIN, CD, LEONE, DR, LOBB, RR, WELLER, PF (1994). **Alpha 4-integrins mediate antigen-induced late bronchial responses and prolonged airway hyperresponsiveness in sheep.** *Journal of Clinical Investigation*, 93: 776–87.

BANDEIRA-MELO, C, HERBST, A, WELLER, PF (2001) a. **Eotaxins. Contributing to the diversity of eosinophil recruitment and activation.** *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 24: 653-7.

BANDEIRA-MELO, C, PHOOFOLO, M, WELLER, PF (2001) b. **Extranuclear lipid bodies, elicited by CCR3-mediated signaling pathways, are the sites of chemokine-enhanced leukotriene C4 production in eosinophils and basophils.** *The Journal of Biological Chemistry*, 276 (25): 22779-87.

BANDEIRA-MELO, C, SUGIYAMA, K, WOODS, LJ, WELLER, PF (2001). **Cutting edge: eotaxin elicits rapid vesicular transport-mediated release of preformed IL-4 from human eosinophils.** *The Journal of Immunology*, 166: 4813-17.

BANDEIRA-MELO, C, WOODS, LJ, PHOOFOLO, M, WELLER, PF (2002). **Intracrine cysteinyl leukotriene receptor-mediated signaling of eosinophil vesicular transport-mediated interleukin-4 secretion.** *Journal of Experimental Medicine*, 196 (6): 841-50.

BANDEIRA-MELO, C, BOZZA, PT, WELLER, PF (2002). **The cellular biology of eosinophil eicosanoid formation and function.** *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 109: 393-400.

BANDEIRA-MELO, WELLER, PF (2003). **Eosinophils and cysteinyl leukotrienes**. Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids, 69: 135–143.

BOCHNER, BS (2009). **Siglec-8 on human eosinophils and mast cells, and Siglec-F on murine eosinophils, are functionally related inhibitory receptors**. Clinical and Experimental Allergy, 39 (3): 317–324.

BOCHNER, BS, SCHLEIMER, RP (1994). **The role of adhesion molecules in human eosinophil and basophil recruitment**. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 94: 427–38.

BOCHNER, BS, KLUNK, DA, STERBINSKY, SA, COFFMAN, RL, SCHLEIMER, RP (1995). **IL-13 selectively induces vascular cell adhesion molecule-1 expression in human endothelial cells**. The Journal of Immunology, 154 (2): 799-803.

BOYCE, JA, FRIEND, D, MATSUMOTO, R, AUSTEN, KF, OWEN, WF (1995). **Differentiation *in vitro* of hybrid eosinophil/basophil granulocytes: autocrine function of an eosinophil developmental intermediate**. Journal of Experimental Medicine, 182: 49-57.

BOZZA, PT, PAYNE, JL, GOULET, JL, WELLER, PF (1996). **Mechanisms of platelet-activating factor-induced lipid body formation: requisite roles for 5-lipoxygenase and de novo protein synthesis in the compartmentalization of neutrophil lipids**. Journal of Experimental Medicine, 183: 1515-25.

BOZZA, PT, YU, W, PENROSE, JF, MORGAN, ES, DVORAK, AM, WELLER, PF (1997). **Eosinophil lipid bodies: specific, inducible intracellular sites for enhanced eicosanoid formation**. Journal of Experimental Medicine, 186 (6): 909-20.

BOZZA, PT, YU, W, CASSARA, J, WELLER, PF (1998). **Pathways for eosinophil lipid body induction: differing signal transduction in cells from normal and hypereosinophilic subjects.** Journal of Leukocyte Biology, 64: 563-569.

BOZZA, PT, MAGALHÃES, KG, WELLER, PF (2009). **Leukocyte lipid bodies – biogenesis and functions in inflammation.** Biochimica et Biophysica Acta, 1791: 540-51.

BRASAEMLE, DL, BARBER, T, WOLINS, NE, SERRERO, G, BLANCHETTE-MACKIE, EJ, LONDOS, C (1997). **Adipose differentiation-related protein is an ubiquitously expressed lipid storage droplet-associated protein.** Journal of Lipid Research, 38 (11): 2249-63.

CHEUNG, PF, WONG, CK, IP, WK, LAM, CW (2006). **IL-25 regulates the expression of adhesion molecules on eosinophils: mechanism of eosinophilia in allergic inflammation.** Allergy, 61: 878-85.

CHO, JY, MILLER, M, BAEK, KJ, HAN, JW, NAYAR, J, LEE, SY, MCELWAIN, K, MCELWAIN, S, FRIEDMAN, S, BROIDE, DH (2004). **Inhibition of airway remodeling in IL-5-deficient mice.** Journal of Clinical Investigation, 113: 551-60.

COFFMAN, RL, SEYMOUR, BW, HUDAK, S, JACKSON, J, RENNICK, D (1989). **Antibody to interleukin-5 inhibits helminth-induced eosinophilia in mice.** Science, 245: 308-10.

COLLINS, PD, MARLEAU, S, GRIFFITHS-JOHNSON, DA, JOSE, PJ, WILLIAMS, TJ (1995). **Cooperation between Interleukin-5 and the chemokine eotaxin to induce eosinophil accumulation *in vivo*.** Journal of Experimental Medicine, 182: 1169-74.

DENT, LA, STRATH, M, MELLOR, AL, SANDERSON, CJ (1990). **Eosinophilia in transgenic mice expressing interleukin 5**. Journal of Experimental Medicine, 172: 1425-31.

DORMAN, SC, EFTHIMIADIS, A, BABIRAD, I, WATSON, RM, DENBURG, JA, HARGREAVE, FE, O'BYRNE, PM, SEHMI, R (2004). **Sputum CD34<sup>+</sup>IL-5R $\alpha$ <sup>+</sup> Cells Increase after Allergen: Evidence for *In Situ* Eosinophilopoiesis**. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, 169: 573-77.

Dyer, KD, Moser, JM, Czapiga, M, Siegel, SJ, Percopo, CM, Rosenberg, HF (2008). **Functionally competent eosinophils differentiated ex vivo in high purity from normal mouse bone marrow**. The Journal of Immunology, 181: 4004-09.

EGESTEN, A, ALUMETS, J, VON MECKLENBURG, C, PALMEGREN, M, OLSSON, I (1986). **Localization of eosinophil cationic protein, major basic protein, and eosinophil peroxidase in human eosinophils by immunoelectron microscopic technique**. Journal of Histochemistry and Cytochemistry, 34: 1399-403.

EHRlich, P (1879). **Ueber die spezifischen Granulationen des Blutes**. Arch ges Physiology, 36: 571-79.

FELTENMARK, S, GAUTAM, N, BRUNNSTRÖM, A, GRIFFITHS, W, BACKMAN, L, EDENIUS, C, LINDBOM, L, BJÖRKHOLM, M, CLAESSON, HE (2008). **Eoxins are proinflammatory arachidonic acid metabolites produced via the 15-lipoxygenase-1 pathway in human eosinophils and mast cells**. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 105 (2): 680-85.

FOSTER, PS, HOGAN, SP, RAMSAY, AJ, MATTHAEI, KI, YOUNG, IG (1996). **Interleukin 5 deficiency abolishes eosinophilia, airways hyperreactivity, and lung damage in a mouse asthma model.** Journal of Experimental Medicine, 183: 195-201.

FUNK, CD (2001). **Prostaglandins and leukotrienes: Advances in eicosanoid biology.** Science, 294: 1871-75.

GAUVREAU, GM, ELLIS, AK, DENBURG, JA (2009). **Haemopoietic processes in allergic disease: eosinophil/basophil development.** Clinical and Experimental Allergy, 39: 1297-1306.

GESSNER, A, MOHRS, K, MOHRS, M (2005). **Mast cells, basophils, and eosinophils acquire constitutive IL-4 and IL-13 transcripts during lineage differentiation that are sufficient for rapid cytokine production.** The Journal of Immunology, 174: 1063–72.

GLEICH, GJ, LOEGERING, DA (1984). **Immunobiology of eosinophils.** Annual Review Immunology, 2: 429-59.

GLEICH, GJ, LOEGERING, DA, BELL, MP, CHECKEL, JL, ACKERMAN, SJ, MCKEAN, DJ (1986). **Biochemical and functional similarities between human eosinophil-derived neurotoxin and eosinophil cationic protein: homology with ribonuclease.** Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 83 (10): 3146-50.

GOUNNI, AS, GREGORY, B, NUTKU, E, ARIS, F, LATIFA, K, MINSHALL, E, NORTH, J, TAVERNIER, J, LEVIT, R, NICOLAIDES, N, ROBINSON, D, HAMID, Q (2000). **Interleukin-9 enhances interleukin-5 receptor expression, differentiation, and survival of human eosinophils.** Blood, 96: 2163-71.

GREIFF, L, ERJEFÄLT, JS, ANDERSSON, M, SVENSSON, C, PERSSON, CG (1998). **Generation of clusters of free eosinophil granules (Cfegs) in seasonal allergic rhinitis.** *Allergy*, 53(2): 200-3.

HANSEL, TT, BRAUNSTEIN, JB, WALKER, C, BLASER, K, BRUIJNZEEL, PLB, VIRCHOW, JCJR, VIRCHOW, C (1991). **Sputum eosinophils from asthmatics express ICAM-1 and HLA-DR.** *Clinical and Experimental Immunology*, 86: 271-77.

HEISE, CE, O'DOWD, BF, FIGUEROA, DJ, SAWYER, N, NGUYEN, T, IM, DS, STOCCO, R, BELLEFEUILLE, JN, ABRAMOVITZ, M, CHENG, R, WILLIAMS, DL JR, ZENG, Z, LIU, Q, MA, L, CLEMENTS, MK, COULOMBE, N, LIU, Y, AUSTIN, CP, GEORGE, SR, O'NEILL, GP, METTERS, KM, LYNCH, KR, EVANS, JF (2000). **Characterization of the human cysteinyl leukotriene 2 (CysLT2) receptor.** *The Journal of Biological Chemistry*, 275: 30531-36.

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.** *Journal of Experimental Medicine*, 195 (11): 1379-86.

HOGAN, SP, ROSENBERG, HF, MOQBEL, R, PHIPPS, S, FOSTER, PS, LACY, P, KAY, AB, ROTHENBERG, ME (2008). **Eosinophils: Biological properties and role in health and disease.** *Clinical and Experimental Allergy*, 38: 709-50.

HUDAK, S, HUNTE, B, CULPEPPER, J, MENON, S, HANNUM, C, THOMPSON-SNIPES, L, RENNICK, D (1995). **FLT3/FLK2 ligand promotes the growth of murine stem cells and the expansion of colony-forming cells and spleen colony-forming units.** *Blood*, 85 (10): 2747-55.

HUMBLES, AA, LLOYD, CM, McMILLAN, SJ, FRIEND, DS, XANTHOU, G, MCKENNA, EE, GHIRAN, S, GERARD, NP, YU, C, ORKIN, SH, GERARD, C (2004). **A critical role for eosinophils in allergic airways remodeling.** *Science*, 305: 1776-79.

HYO, S, KAWATA, R, KADOYAMA, K, EGUCHI, N, KUBOTA, T, TAKENAKA, H, URADE, Y (2007). **Expression of prostaglandin D2 synthase in activated eosinophils in nasal polyps.** *Archives of Otolaryngology - Head & Neck Surgery*, 133 (7): 693-700.

IMAMURA, M, INOBUCHI, T, IKUYAMA, S, TANIGUCHI, S, KOBAYASHI, K, NAKASHIMA, N AND NAWATA, H (2002). **ADRP stimulates lipid accumulation and lipid droplet formation in murine fibroblasts.** *American Journal of Physiology, Endocrinology and Metabolism*, 283 (4): E775-83.

IWASAKI, H, MIZUNO, S, MAYFIELD, R, SHIGEMATSU, H, ARINOBU, Y, SEED, B, GURISH, MF, TAKATSU, K, AKASHI, K (2005). **Identification of eosinophil lineage-committed progenitors in the murine bone marrow.** *Journal of Experimental Medicine*, 201 (12): 1891-97.

KATO, M, KITA, H, TACHIBANA, A, HAYASHI, Y, TSUCHIDA, Y, KIMURA, H (2004). **Dual signaling and effector pathways mediate human eosinophil activation by platelet-activating factor.** *International Archives of Allergy and Immunology*, 134 (1): 37-43.

KLION, AD, NUTMAN, TB (2004). **The role of eosinophils in host defense against helminth parasites.** *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 113: 30-37.

KOPF, M, BROMBACHER, F, HODGKIN, PD, RAMSAY, AJ, MILBOURNE, EA, DAI, WJ, OVINGTON, KS, BEHM, CA, KÖHLER, G, YOUNG, IG, MATTHAEI, KI (1996). **IL-5-**

**deficient mice have a developmental defect in CD5+ B-1 cells and lack eosinophilia but have normal antibody and cytotoxic T cell responses.** *Immunity*, 4: 15-24.

KORENAGA, M, HITOSHI, Y, YAMAGUCHI, N, SATO, Y, TAKATSU, K, TADA, I (1991). **The role of interleukin-5 in protective immunity to *Strongyloides venezuelensis* infection in mice.** *Immunity*, 72: 502-7.

KOURO, T, TAKATSU, K (2009). **IL-5 and eosinophil-mediated inflammation: from Discovery to therapy.** *International Immunology*, 21 (12): 1303-9.

LACY P, MOQBEL, R (2000). **Eosinophil cytokines.** *Chemical Immunology*, 76: 134–55.

LACY, P, MAHMUDI-AZER, S, BABLITZ, B, HAGEN, SC, VELAZQUEZ, JR, MAN, SFP, MOQBEL, R (1999). **Rapid mobilization of intracellularly stored RANTES in response to interferon- $\gamma$  in human eosinophils.** *Blood*, 94 (1): 23-32.

LAMKHIUED, B, GOUNNI AS, HAMID, Q, MANSOUR, N, DELESPESE, G, RENZI, PM (2003). **The CCR3 Receptor Is Involved in Eosinophil Differentiation and Is Up-Regulated by Th2 Cytokines in CD34<sup>+</sup> Progenitor Cells.** *The Journal of Immunology*, 170: 537-47.

LECKIE, MJ, TEN BRINKE, A, KHAN, J, DIAMANT, Z, O'CONNOR, BJ, WALLS, CM, MATHUR, AK, COWLEY, HC, CHUNG, KF, DJUKANOVIC, R, HANSEL, TT, HOLGATE, ST, STERK, PJ, BARNES, PJ (2000). **Effects of an interleukin-5 blocking monoclonal antibody on eosinophils, airway hyper-responsiveness, and the late asthmatic response.** *The Journal-lancet*, 356: 2144-48.

LEE, JJ, DIMINA, D, MACIAS, MP, OCHKUR, SI, MCGARRY, MP, O'NEIL, KR, PROTHEROE, C, PERO, R, NGUYEN, T, CORMIER, SA, LENKIEWICZ, E, COLBERT, D,

RINALDI, L, ACKERMAN, SJ, IRVIN, CG, LEE, NA (2004). **Defining a link with asthma in mice congenitally deficient in eosinophils.** Science, 305: 1773-76.

LEGLER, DF, BRUCKNER, M, UETZ-VON ALLMEN, E, KRAUSE, P (2010). **Prostaglandin E2 at new glance: Novel insights in functional diversity offer therapeutic chances.** The International Journal of Biochemistry and Cell Biology, 42: 198-201.

LUNA-GOMES, T, MAGALHÃES, KG, MESQUITA-SANTOS, FP, BAKKER-ABREU, I, SAMICO, RF, BOZZA, PT, DIAZ, BL, BANDEIRA-MELO, C (2010). **Eosinophils synthesize prostaglandin D2: functions on eosinophil activation?** submetido.

LYMAN, SD, JAMES, L, JOHNSON, L, BRASEL, K, DE VRIES, P, ESCOBAR, SS, DOWNEY, H, SPLETT, RR, BECKMANN, MP, MCKENNA, HJ (1994). Cloning of the Human Homologue of the Murine flt3 Ligand: **A Growth Factor for Early Hematopoietic Progenitor Cells.** Blood, 83 (10): 2795-2801.

LYNCH, KR, O'NEILL, GP, LIU, Q, IM, DS, SAWYER, N, METTERS, KM, COULOMBE, N, ABRAMOVITZ, M, FIGUEROA, DJ, ZENG, Z, CONNOLLY, BM, BAI, C, AUSTIN, CP, CHATEAUNEUF, A, STOCOCO, R, GREIG, GM, KARGMAN, S, HOOKS, SB, HOSFIELD, E, WILLIAMS, DL JR, FORD-HUTCHINSON, AW, CASKEY, CT, EVANS, JF (1999). **Characterization of the human cysteinyl leukotriene CysLT1 receptor.** Nature, 399: 789-93.

MCNAGNY, KM, SIEWEKE, MH, DÖDERLEIN, G, GRAF, T, NERLOV, C (1998). **Regulation of eosinophil-specific gene expression by a C/EBP–Ets complex and GATA-1.** The EMBO journal, 17 (13): 3669-80.

MELO, RCN, SPENCER, LA, PEREZ, SAC, GHIRAN, I, DVORAK, AM, WELLER, PF (2005). **Human eosinophils secrete preformed, granule-stored interleukin-4 through distinct vesicular compartments.** *Traffic*, 6: 1047-57.

MELO, RCN, SPENCER, LA, DVORAK, AM, WELLER, PF (2008). **Mechanisms of eosinophil secretion: large vesiculotubular carriers mediate transport and release of granule-derived cytokines and other proteins.** *Journal of Leukocyte Biology*, 83: 229-36.

MESQUITA-SANTOS, FP, VIEIRA-DE-ABREU, A, CALHEIROS, AS, FIGUEIREDO, IH, CASTRO-FARIA-NETO, HC, WELLER, PF, BOZZA, PT, DIAZ, BL, BANDEIRA-MELO, C (2006). **Cutting edge: prostaglandin D<sub>2</sub> enhances leukotriene C<sub>4</sub> synthesis by eosinophils during allergic inflammation: synergistic *in vivo* role of endogenous eotaxin.** *The Journal of Immunology*, 176: 1326–1330.

MISHRA, A, HOGAN, SP, LEE, JJ, FOSTER, PS AND ROTHENBERG, ME (1999). **Fundamental signals that regulate eosinophil homing to the gastrointestinal tract.** *The Journal of Clinical Investigation*, 103 (12): 1719-27.

NEVES, JS, PEREZ, SA, SPENCER, LA, MELO, RC, REYNOLDS, L, GHIRAN, I, MAHMUDI-AZER, S, ODEMUYIWA, SO, DVORAK, AM, MOQBEL, R, WELLER, P (2008). **Eosinophil granules function extracellularly as receptor mediated secretory organelles.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105: 18478-83.

NEVES, JS, WELLER, P (2009). **Functional extracellular eosinophil granules: novel implications in eosinophil immunobiology.** *Current Opinion in Immunology*, 21: 694-99.

OGUMA, T, ASANO, K, ISHIZAKA, A (2008). **Role of prostaglandin D2 and its receptors in the pathophysiology of asthma.** Allergology International, 57: 307-12.

PADIGEL, UM, HESS, JA, LEE, JJ, LOK, JB, NOLAN, TJ, SCHAD, GA, ABRAHAM, D (2007). **Eosinophils act as antigen-presenting cells to induce immunity to *Strongyloides stercoralis* in mice.** Journal of Infectious Disease, 196: 1844-51.

PERSSON, CG, ERJEFALT, JS (1997). **“Ultimate activation” of eosinophils *in vivo*: lysis and release of clusters of free eosinophil granules (Cfegs).** Thorax, 52: 569-74.

PETERS, MS, RODRIGUEZ, M, GLEICH, GJ (1986). **Localization of human eosinophil granule major basic protein, eosinophil cationic protein, and eosinophil-derived neurotoxin by immunoelectron microscopy.** Laboratory Investigation, 54 (6): 656-62.

PIERCE, A, WHETTON, AD, OWEN-LYNCH, PJ, TAVERNIER, J, SPOONER, E, DEXTER, TM, HEYWORTH, CM (1998). **Ectopic interleukin-5 receptor expression promotes proliferation without development in a multipotent hematopoietic cell line.** Journal of Cell Science, 111: 815-23.

RADIGER, M, LÖTVALL, J (2009). **Eosinophil progenitors in allergy and asthma — Do they matter?** Pharmacology & Therapeutics, 121: 174-84.

RENNICK, DM, THOMPSON-SNIPES, L, COFFMAN, RL, SEYMOUR, BW, JACKSON, JD (1990). ***In vivo* administration of antibody to interleukin-5 inhibits increased generation of eosinophils and their progenitors in bone marrow of parasitized mice.** Blood, 76: 312-6.

ROBINSON, DS, DAMIA, R, ZEIBECOGLOU, K, MOLET, S, NORTH, J, YAMADA, T, KAY, AB, HAMID, Q (1999). **CD34<sup>+</sup>/Interleukin-5R a messenger RNA<sup>+</sup> cells in the bronchial mucosa in asthma: potential airway eosinophil progenitors.** American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology, 20: 9–13.

ROSENBERG, HF, PHIPPS, S, FOSTER, PS (2007). **Eosinophil trafficking in allergy and asthma.** Journal of Allergy and Clinical Immunology, 119: 1303-10.

ROTHENBERG, ME (1998). **Eosinophilia.** The New England Journal of Medicine, 338: 1592–600.

ROTHENBERG, ME, HOGAN, SP (2006). **The eosinophil.** The Annual Review of Immunology, 24: 147–74.

ROUZER, CA, MARNETT, LJ (2009). **Cyclooxygenases: structural and functional insights.** Journal of Lipid Research, 50: S29–S34.

SERGEJEVA, S, JOHANSSON, AK, MALMHALL, C, LOTVALL, J (2004). **Allergen exposure-induced differences in CD34<sup>+</sup> cell phenotype: relationship to eosinophilopoietic responses in different compartments.** Blood, 103: 1270-7.

SOKOL, RJ, JAMES, NT, WALES, J, HUDSON, G (1987). **Morphometry of eosinophils in human blood.** Acta Anatomica, 129: 211-3.

STIRLING, RG, VAN RENSEN, ELJ, BARNES, PJ, CHUNG, KF (2001). **Interleukin-5 induces CD34<sup>+</sup> eosinophil progenitor mobilization and eosinophil CCR3 expression in asthma.** American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, 164: 1403-09.

TANAKA, H, KOMAI, M, NAGAO, K, ISHIZAKI, M, KAJIWARA, D, TAKATSU, K, DELESPESE, G, NAGAI, H (2004). **Role of interleukin-5 and eosinophils in allergen-induced airway remodeling in mice.** American journal of respiratory cell and molecular biology, 31: 62-68.

TAVERNIER, J, VAN DER HEYDEN, J, VERHEE, A, BRUSSELLE, G, VAN OSTADE, X, VANDEKERCKHOVE, JI, NORTH, J, RANKIN, SM, KAY, AB, ROBINSON, DS (2000). **Interleukin 5 regulates the isoform expression of its own receptor  $\alpha$ -subunit.** Blood, 95: 1600-1607.

VIEIRA-DE-ABREU, A, ASSIS, EF, GOMES, GS, CASTRO-FARIA-NETO, HC, WELLER, PF, BANDEIRA-MELO, C, BOZZA, PT (2005). **Allergic challenge–elicited lipid bodies compartmentalize *in vivo* leukotriene C4 synthesis within eosinophils.** American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology, 33: 254-61.

WAN, HC, MELO, RCN, JIN, Z, DVORAK, AM, WELLER, PF (2007). **Roles and origins of leukocyte lipid bodies: proteomic and ultrastructural studies.** The FASEB Journal, 21: 167–178.

WELLER, PF, RAND, TH, BARRET, T, ELOVIC, A, WONG, DT, FINBERG, RW (1993). **Accessory cell function of human eosinophils. HLA-dependent, MHC-restricted antigen-presentation and IL-1 $\alpha$  expression.** The Journal of Immunology, 150: 2554-62.

WELLER, PF (1994). **Eosinophils: structure and functions.** Current Opinion in Immunology, 6 (1): 85-90.

WOLTMAN, G, MCNULTY, CA, DEWSON, G, SYMON, FA, WARDLAW, AJ (2000). **Interleukin-13 induces PSGL-1/P–selectin–dependent adhesion of**

**eosinophils, but not neutrophils, to human umbilical vein endothelial cells under flow.** *Blood*, 95 (10): 3146-52.

YAMAMOTO, H, SEDGWICK, JB, VRTIS, RF, BUSSE, WW (2000). **The effect of transendothelial migration on eosinophil function.** *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 23 (3): 379-88.

YU, C, CANTOR, AB, YANG, H, BROWNE, C, WELLS, RA, FUJIWARA, Y, ORKIN, SH (2002). **Targeted deletion of a high-affinity GATA-binding site in the GATA-1 promoter leads to selective loss of the eosinophil lineage *in vivo*.** *Journal of Experimental Medicine*, 11: 1387-95.

ZHANG, M, ANGATA, T, CHO, JY, MILLER, M, BROIDE, DH, VARKI, A (2007). **Defining the *in vivo* function of Siglec-F, a CD33-related Siglec expressed on mouse eosinophils.** *Blood*, 109: 4280–7.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)