

-

**Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ
Pós Graduação em Biologia Celular e Molecular
Laboratório de Comunicação Celular**

**Caracterização dos receptores P2 em eosinófilos de ratos e
possíveis papéis funcionais**

ANAEL VIANA PINTO ALBERTO

**Rio de Janeiro,
Dezembro de 2007**

Anael Viana Pinto Alberto

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

A334

Alberto, Anael Viana Pinto

Caracterização dos receptores P2 em eosinófilos de ratos e possíveis papéis funcionais / Anael Viana Pinto Alberto. – Rio de Janeiro, 2007.

xiii, 68 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Biologia Celular e Molecular, 2007.

Bibliografia: f. 62-68

1. Eosinófilos. 2. Eletrofisiologia. 3. Imunofluorescência. 4. Migração. 5. Pleurisia I. Título.

CDD 611.0181

**Instituto Oswaldo Cruz
Pós-graduação de Biologia Celular e Molecular
Anael Viana Pinto Alberto**

**Caracterização dos receptores P2 em eosinófilos de ratos e
possíveis papéis funcionais**

**Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz
como requisito para a obtenção do título de
Mestre em Biologia Celular e Molecular**

**Orientador :
Luiz Anastácio Alves**

**Rio de Janeiro
Dezembro – 2007**

**Instituto Oswaldo Cruz
Pós-graduação de Biologia Celular e Molecular
Anael Viana Pinto Alberto**

**Caracterização dos receptores P2 em eosinófilos de ratos e
possíveis papéis funcionais**

**Orientador:
Luiz Anastácio Alves**

Revisor (a):

Prof. Patrícia Machado Rodrigues e Silva

Examinadores :

**Prof. João Ricardo Lacerda de Menezes
Prof. Robson Coutinho Silva
Prof. Válber da Silva Frutuoso**

**Trabalho realizado no Laboratório de Comunicação Celular do
Instituto Oswaldo Cruz-Fiocruz, sob orientação do Dr. Luiz Anastacio
Alves.**

Colaboradores:

Dr. Marco Aurélio Martins – Lab. de Inflamação-IOC

**Agências Financiadoras:
IOC – Instituto Oswaldo Cruz
CNPQ**

**“Quem questiona os outros
obtem apenas conhecimento, quem
questiona a si mesmo obtem
sabedoria.”**

“Autor desconhecido”

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer, em primeiro lugar, a Deus e as forças do universo que sempre estiveram a meu lado.

Quero agradecer a minha família que me deu educação e apoio durante toda a minha vida e não deixaram que nada me faltasse apesar das dificuldades. Faço um agradecimento especial para minha vó que sempre cuidou da família e ainda cuida.

Agradeço a uma pessoa que eu amo muito, minha namorada Patricia Gosling, por todo apoio, compreensão e amor que me dedicou todo o tempo em que estamos juntos.

Gostaria de agradecer ao meu orientador, Prof. Luiz Anastacio Alves, por toda ajuda nesse tempo todo que estou em seu laboratório. Agradeço ainda toda a compreensão, apoio, amizade e sobretudo paciência que foi dispensada a mim.

Agradeço a todos do Laboratório de Comunicação Celular por sempre disporem de tempo para me ajudar nos momentos em que foi necessários. Entre eles estão o Dr. Robson Xavier, pela ajuda em diversos experimentos e pela disposição de tempo para fazer os experimentos de cálcio no Fundão juntamente comigo e pela discussão dos mais diversos assuntos. À Dr. Cristina Souza, vice-chefe, por ajudar também quando foi preciso e pelo apoio na fase final da minha tese. Agradeço a Kátia que me ajudou na fase inicial dos experimentos de imunocitoquímica. E também ao Antonio por me ensinar a utilizar o Reference Manager e também um pouco de power point.

Agradeço ao Dr. Marco Aurélio Martins, chefe do Laboratório de Inflamação, por abrir seu laboratório, sem restrições para que eu pudesse fazer os isolamentos de eosinófilos, e a Ana Lúcia que foi fundamental nesse

processo de isolamento de eosinófilo. Além disso, agradeço muitíssimo à Dra. Magda pelo auxílio nos experimentos de pleurisia.

Agradeço a Dr. Adriana Vieira e ao Laboratório de Imunofarmacologia pelo auxílio nos experimentos de pleurisia.

Agradeço a todos no Laboratório de Neuroanatomia Celular que fizeram me sentir em casa e pela grande ajuda nos experimentos de imunofluorescência e permissão de usar o microscópio, com câmera acoplada.

Agradeço ao Laboratório de Imunobiofísica por permitir que fizéssemos os experimentos de cálcio e pela ajuda no que foi preciso.

ÍNDICE

Resumo	xii
Abstract.....	xiii
1-Introdução.....	1
1.1 – Histórico dos receptores para nucleotídeos e nucleosódeos	1
1.2- Fontes de ATP extracelular.....	4
1.3-Receptores purinérgicos.....	5
1.3.1- Estrutura.....	5
1.3.1.1-Receptores P2X.....	5
1.3.1.2-Receptores P2Y.....	6
1.3.2 - Distribuição.....	8
1.3.2.1- P2X e P2Y.....	8
1.4- Propriedades farmacológicas e eletrofisiológicas.....	10
1.4.1- P2X.....	10
1.5-Receptores p2 no sistema imunológico.....	12
1.6- Eosinófilos.....	12
1.6.1- Características morfológicas e estruturais.....	14
1.6.2- Funções dos eosinófilos.....	15
1.6.3- Receptores P2 e eosinófilos.....	19
2.0- Objetivo Geral.....	23
2.1- Objetivos Específicos.....	23
3.0- Materiais e Métodos.....	24
4.0- Resultados.....	33
4.1 – Estudo do perfil de receptores P2X em eosinófilos.....	33
4.2 – Estudo do perfil de receptores P2Y em eosinófilos.....	36

4.3 – Expressão dos receptores P2 por Imunofluorescência.....	38
4.4 – Efeito de receptores P2 na migração de eosinófilos <i>in vitro</i>.....	44
4.5 – Estudo de receptores P2 no modelo de pleurisia alérgica.....	47
5.0- Discussão.....	49
5.1 – Caracterização dos receptores P2X.....	49
5.2 – Caracterização dos receptores P2Y.....	53
5.3 – Estudo do possível papel funcional dos receptores P2 na migração <i>in vitro</i>.....	55
5.4 – Estudo preliminar da possível papel funcional dos receptores P2 na migração <i>in vivo</i>.....	56
6.0 – Conclusões.....	60
7.0- Referências.....	61

ABREVIATURAS

ATP –adenosina 5' trifosfato

ADP –adenosina 5'difosfato

AMP –adenosina 5' monofosfato

ATP γ S –adenosina 5'-O-(3-tio)trifosfato

2MeSATP – 2 - metil-tio adenosina 5'trifosfato

α,β -meATP – alfa beta metil adenosina 5'trifosfato

BzATP -- 2', 3' –O-bis-[4-benzoil-benzoil]- adenosina 5' trifosfato

ECP –eosinophil catiônica protein

EDN –eosinophil derivad neurotoxin

EPO – eosinofilic peroxidase

MPB – Major basic protein

Sur – suramina

PAF – Platelet activating factor

TNP-ATP – Sal 2',3'-O-(2,4,6-Trinitrofenil) adenosina 5'-trifosfato monolitio trisodio

PBS – Phosphate buffer saline

RESUMO

O ATP e outros nucleotídeos podem ser liberados das células para o meio extracelular, através de mecanismos regulados ou pela perda da integridade da membrana. Uma vez no meio extracelular, os nucleotídeos atuam via receptores P2, um grupo de receptores que abrange duas famílias: os receptores P2X que são canais iônicos ativados por ligantes e os receptores P2Y que são receptores acoplados à proteína G. Esses receptores foram caracterizados em diversas células do sistema imune de rato. Contudo, não há na literatura nenhuma caracterização descrita em eosinófilos. Estes são importantes por estarem envolvidos na asma e em diversos processos patológicos e fisiológicos. Por isso, fomos investigar a expressão dos receptores P2 nessas células, usando técnicas de eletrofisiologia, análise da variação de cálcio e imunofluorescência. Na primeira etapa do nosso trabalho, procuramos investigar a expressão de receptores P2X (ionotrópico) por eletrofisiologia. Através da amplitude da corrente máxima normalizada, obtivemos a seguinte ordem de potência: ATP > ATP γ S > 2meSATP > ADP > $\alpha\beta$ meATP > $\beta\gamma$ meATP > BzATP > UTP > UDP > cAMP, sugerindo a presença dos receptores P2X₂, P2X₄ e P2X₇. Nos experimentos de análise de variação de cálcio intracelular obtivemos a seguinte ordem de potência: UTP > ATP γ S > ADP > UDP > ATP > BzATP > 2meSATP > $\alpha\beta$ meATP > cAMP > Adenosina > $\beta\gamma$ meATP, sugerindo a presença de P2X₁, P2X₂ e P2X₄, P2Y₁, P2Y₂ e P2Y₄. Na imunofluorescência verificamos a expressão dos receptores P2Y₂, P2Y₄ e P2Y₁₃. A partir dessa caracterização, fomos investigar a participação desses receptores na migração, *in vitro*, dos eosinófilos em sistema de *transwell* e observamos que o ATP foi capaz de induzir maior migração dos mesmos. Esse efeito foi bloqueado pela suramina um antagonista geral dos receptores P2. Além disso, empregamos o modelo de pleurisia alérgica em ratos para verificar se os receptores P2 poderiam estar implicados na migração dos eosinófilos para algum sítio de inflamação. Nossos resultados mostraram que a suramina diminuiu o número de células na cavidade pleural, indicando a participação de receptores P2, na resposta inflamatória. Nossos resultados demonstraram que eosinófilos de rato expressam receptores P2X e P2Y e que

a ativação desses receptores pode aumentar a migração de eosinófilos *in vitro* e *in vivo*.

ABSTRACT

ATP and other nucleotides can be released from cells through regulated pathways or following the loss of plasma membrane integrity. Once outside the cell, these compounds take on new roles as intercellular signaling molecules that elicit a broad spectrum of physiological responses through the activation of numerous cell surface receptors. These nucleotides act on P2 family of receptors that respond by P2X ionotropic receptors and G protein-coupled P2Y receptors. These receptors have been characterized in many rat immune cells. However, there is a lack on yhe literature concerning to the characterization characterization of these receptors in eosinophils. These cells are involved in asthma and pathological and physiological processes. Dispite of that, we investigate, using different techniques, the expression of the P2 receptors in eosinophils. Our first step was to investigate the expression of P2X receptors (ionotropic) using electrophysiology thecnique. The results with the maximum current amplitude normalized gave us the following ranking of agonist potency: ATP> ATP γ S> 2meSATP> ADP> $\alpha\beta$ meATP> $\beta\gamma$ meATP> BzATP> UTP> UDP> cAMP, suggesting the presence of P2X₂, P2X₄. Following the characterization, intracellular calcium measurements were performed. We obtained the follow ranking order of potency: UTP> ATP γ S > ADP > UDP> ATP > BzATP >2meSATP > $\alpha\beta$ meATP > cAMP >Adenosine > $\beta\gamma$ meATP. Moreover, we did some immunofluorescence assays to corroborate our results and our data showed the presence of P2X₁, P2X₂, P2X₄ and P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄. Our next step was to verify the participation of these receptors in the *in vitro* migration of eosinophils by *transwell*, in these experiments the ATP was able to increase migration, an effect which could be blocked by suramin a general blocker of P2 receptors. Furthermore, we employed a model of rat allergic pleurisy to confirm our findings that P2 receptors are implicated in the migration of eosinophils to an inflammation site. Our results indicate that suramin decreased the number of cells per cavity, showing the participation of the P2 receptors.

We have demonstrated for the first time that rat eosinophils express P2X and P2Y and the activation of these receptors can increase migration of eosinophils *in vitro* and *in vivo*.

1- INTRODUÇÃO

1.1- Histórico dos receptores para nucleotídeos e nucleosídeos

Os receptores purinérgicos são um grupo de receptores ativados por nucleotídeos e nucleosídeos que tiveram sua primeira evidência em 1929 por Drury e Szent-Gyorgi. Tais pesquisadores observaram que a adenosina perfundida em cobaias alterava seu sistema circulatório, levando a bradicardia (Drury, 1929). Em 1934, Gillespie demonstrou o perfil farmacológico diferenciado da adenosina em relação ao ATP na vasodilatação e hipotensão de vasos coronários (Burnstock, 1978, Gillespie, 1934). Mais tarde, em 1947 (Fredholm et al., 1994, Abbracchio et al., 1994, Abbracchio and Burnstock, 1994a), Emmelin e Feldberg demonstraram que injeções intravenosas de ATP causavam vários efeitos no sistema nervoso central e periférico de ovelhas (Emmelin and Feldberg, 1947). Já em 1963, Berne sugeriu que a adenosina poderia ser um regulador do fluxo sanguíneo coronariano durante hiperemia ativa, com conseqüente dilatação vascular, por alteração do equilíbrio entre a pressão arterial versus resistência pré- e pós-capilar (Burnstock, 1976). Desde os primeiros experimentos, na década de 1920, até a década de 1970, muitos trabalhos, em vários tipos celulares, demonstraram a atividade biológica do ATP.

Entretanto, somente em 1976, após estudos com ATP em junções sinápticas, foi proposto por Burnstock uma divisão desses receptores em dois grupos: receptores P1 e P2. Os receptores P1 são aqueles ativados

por adenosina. Atualmente, foram identificados e clonados quatro tipos de receptores P1: A₁, A_{2A}, A_{2B}, A₃, como mostra a Tabela 1.1 (Burnstock, 1978).

Tabela 1.1 – Classificação e distribuição dos receptores P1

	Número de aminoácidos	Distribuição do transcrito do receptor	Referências
A ₁	326	Cérebro Humano	Libert <i>et al.</i> , 1992; Townsend-Nicholson and Shine, 1992
	326	Tireóide canina	Libert <i>et al.</i> , 1989, 1991
	326	Cérebro bovino	Tucker <i>et al.</i> , 1992; Olah <i>et al.</i> , 1992
	328	Rim de coelho	Bhattacharya <i>et al.</i> , 1993
	326/327	Cérebro de rato	Reppert <i>et al.</i> , 1991; Mahan <i>et al.</i> , 1991
	326	Cérebro de camundongo	Marquardt <i>et al.</i> , 1994
	326	Cérebro de porco	Meng <i>et al.</i> , 1994a
A _{2A}	409	Hipocampo humano	Furlong <i>et al.</i> , 1992
	411	Tireóide canina	Libert <i>et al.</i> , 1989; Maenhaut <i>et al.</i> , 1990
	410	Cérebro de rato	Chern <i>et al.</i> , 1992; Fink <i>et al.</i> , 1992
	409	Cérebro de porco	Meng <i>et al.</i> , 1994b
	410	Mastócitos de medula óssea de camundongo	Marquardt <i>et al.</i> , 1994
A _{2B}	328	Hipocampo humano	Pierce <i>et al.</i> , 1992
	332	Cérebro de rato	Stehle <i>et al.</i> , 1992; Rivkees and Reppert, 1992
	332	Mastócitos de medula óssea de camundongo	Marquardt <i>et al.</i> , 1994
A ₃	318	Striatum humano	Salvatore <i>et al.</i> , 1993
	318	Coração humano	Sajjadi <i>et al.</i> , 1993
	320	Pulmão de coelho	Hill <i>et al.</i> , 1997
	320	Cérebro de rato	Zhou <i>et al.</i> , 1992
		Testículo de rato	Meyerhof <i>et al.</i> , 1991; Zhou <i>et al.</i> , 1992

adaptado de Burnstock, 1998

De acordo com Burnstock (1985), os receptores P2 seriam aqueles ativados por ATP e divididos em dois tipos, P2X e P2Y (Burnstock and Kennedy, 1985). Nos anos seguintes foram caracterizados mais três membros da família: o receptor P2T, achado em plaquetas; o receptor P2Z em macrófagos, e o P2U, ativado por pirimidinas e ATP. Entretanto, apenas em 1994, Burnstock e Abbracchio propuseram uma classificação para que não se utilizasse letras do alfabeto aleatoriamente, pois todos os receptores purinérgicos deveriam pertencer às duas grandes famílias: P2Y, receptores

acoplados à uma proteína G, e P2X, de canais iônicos ativados por ligante (Abbracchio and Burnstock, 1994b). Na classificação atual, constam sete subtipos de receptores P2X (P2X₁, P2X₂, P2X₃, P2X₄, P2X₅, P2X₆, P2X₇) e oito subtipos de receptores P2Y (P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆, P2Y₁₁, P2Y₁₂, P2Y₁₃, P2Y₁₄), de acordo com critérios farmacológicos, bioquímicos e resultados obtidos em experimentos de clonagem (Abbracchio and Burnstock, 1994b). A Tabela 1.1.2 mostra a ordem de potência de diferentes agonistas para os receptores P1 e P2.

Tabela 1.1.2: Principais Agonistas dos receptores purinérgicos	
Receptor	Agonistas
P1 (adenosina)	
A1	CCPA>R-PIA=S-ENBA>NECA; CVT-510
A2A	NECA>CGS 21680=CVT-3146
A2B	NECA (não seletivo)
A3	IB-MECA>NECA>2-CI-IB-MECA; DBXRM; VT160
P2X	
P2X ₁	ATP = 2-MeSATP ≥ α,β- meATP = L-β,γ-meATP (rápida desensibilização)
P2X ₂	ATP ≥ ATP _γ S ≥ 2-MeSATP >> α,β-meATP (pH + sensível ao zinco)
P2X ₃	2-MeSATP ≥ ATP ≥ α,β- meATP ≥ Ap ₅ A (rápida desensibilização)
P2X ₄	ATP >> α,β-meATP = 2-MeSATP = CTP; potencialização pela Ivermectina
P2X ₅	ATP = 2-MeSATP = ATP _γ S > α,β- meATP
P2X ₆	(Funções diminuídas como homomultímero)
P2X ₇	BzATP ≥ 2-MeSATP ≥ ATP >> α,β- meATP
P2Y	
P2Y ₁	MRS2365 > 2-MeSADP = ADPβS > 2-MeSATP = ADP > ATP
P2Y ₂	2-tio-UTP > UTP = ATP > UTP _γ S; INS 37217; INS 365
P2Y ₄	UTP > ATP > Up ₄ U > UTP _γ S; INS 37217
P2Y ₆	3-Fenacil-UDP > UDPβS > UDP > UTP >> ATP
P2Y ₁₁	AR-C67085MX > BzATP = ATP _γ S > ATP; NF546
P2Y ₁₂	2-MeSATP ≥ 2-MeSADP > ADP > ATP
P2Y ₁₃	ADP = 2-MeSADP >> 2-MeSATP > ATP
P2Y ₁₄	UDP glucose ≥ UDP-galactose

(Adaptada de Burnstock, 2007).

1.2 - Fontes de ATP extracelular

Uma questão que emerge é: quais são as fontes de ATP extracelular existentes, já que os receptores P2 necessitam dessas moléculas para serem ativados? Dessa forma, descreveremos como o ATP pode ser encontrado no meio extracelular.

Atualmente, conhecemos 4 tipos principais de fontes de ATP extracelular: 1) terminações nervosas; 2) secreção vesicular; 3) liberação por estímulo osmótico ou mecânico através de transportadores de membrana; 4) citólise ou necrose.

Somente no citoplasma existem cerca de 5mM de ATP e concentrações mais altas podem ser encontradas em vesículas secretórias de neurônios liberadas por neurotransmissores (Novak, 2003). Dessa forma, um mecanismo de liberação de ATP é através de impulsos nervosos seguida de exocitose de grânulos que liberaram ATP em conjunto com neurotransmissores.

Outro mecanismo de liberação de ATP ocorre em células não-secretoras que, quando induzidas por estiramento, estresse osmótico e inflamação liberaram o ATP citosólico. O mecanismo envolvido nessa liberação ainda é desconhecido, porém sabe-se que um poro está envolvido. Nesse sentido, podemos citar alguns candidatos: o regulador transmembrana da fibrose cística (CFTR), o hemicanal de conexinas e panexinas, um canal regulado por volume (VRAC), o receptor P2X₇ ou membros da família de proteínas cassete que se ligam ao ATP (transportadores ABC) (Bal-Price et al., 2002, Maroto and Hamill, 2001, Reisin et al., 1994, Cotrina et al., 1998, Schwiebert, 2001, Hisadome et al., 2002, Bao et al., 2004).

A última fonte de ATP extracelular acontece quando a célula entra em processo de morte por necrose. Nesse processo há perda da integridade de membrana seguido do extravasamento do conteúdo citosólico, onde o ATP está presente.

1.3- Receptores purinérgicos

1.3.1 Estrutura

1.3.1.1- Receptores P2X

Os receptores P2X são canais iônicos ativados por ligantes, que segundo dados da literatura, seriam formados por três subunidades (Khakh et al., 2001). Cada subunidade dos receptores possui uma topologia, como mostra a Figura 1.3.1, com duas regiões transmembranas (M1 e M2), regiões N- e C-terminais intracelulares, com possíveis sítios de ligação a proteínas quinases, uma grande alça extracelular, contendo dez resíduos de cisteína conservados formando uma série de pontes dissulfeto, quatorze resíduos de glicina e dois a cinco sítios de N-glicosilação, que são iguais em todos os receptores P2X. Os receptores P2X₁₋₇ apresentam 40 a 50% de identidade em sua seqüência linear, o que gera diferentes perfis farmacológicos entre os receptores P2X (Burnstock, 1999, Nicke et al., 1998, North, 2002).

Esses receptores podem formar proteínas homoméricas através da união de três subunidades iguais ou podem formar proteínas heteroméricas. Nesse contexto, já existem descritos na literatura alguns receptores heteroméricos funcionais como, por exemplo, o receptor P2X_{2/3}, bem caracterizado em gânglios simpáticos de camundongo (Cockayne et al., 2005),

o receptor P2X_{4/6} em neurônios do sistema nervoso central (Bobanovic et al., 2002), P2X_{1/5} em veias do sistema cardíaco (Haines et al., 1999, Surprenant et al., 2000, Torres et al., 1998), P2X_{2/6} no cérebro (Torres et al., 1999) e o receptor P2X_{4/7} descrito recentemente em macrófagos de medula óssea (Guo et al., 2007).

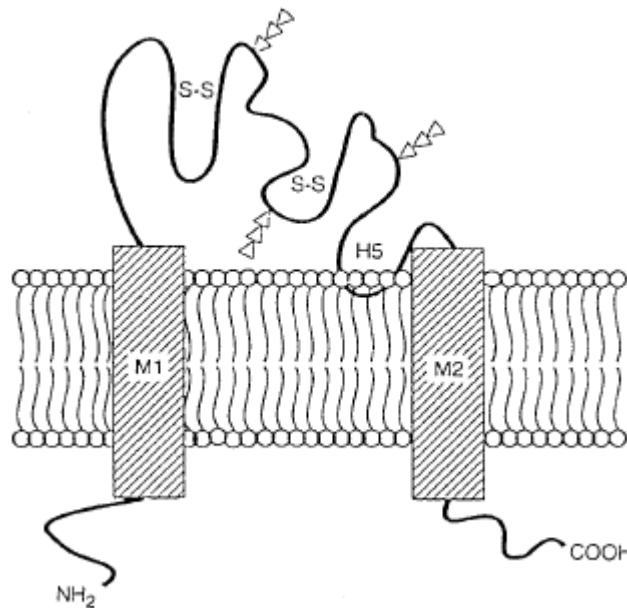


Figura 1.3.1 – Possível topologia dos receptores P2X. Esses receptores possuem dois domínios transmembrana, caudas C- e N-terminal intracelulares e um domínio extracelular com sítios de glicosilação (triângulos) e pontes disulfeto. (Adaptado de Burnstock, 2004)

1.3.1.2- Receptores P2Y

Os receptores P2Y possuem a região N-terminal extracelular e a região C-terminal intracelular. Além disso, possuem sete domínios transmembrana que contribuem para a formação do sítio de ligação para nucleotídeos, em cada subunidade desse receptor. As alças intracelulares e a região C-terminal possuem uma diversidade estrutural entre os subtipos de receptores P2Y que influenciam no grau de acoplamento à proteínas G, uma

vez que cada receptor pode estar acoplado a um tipo diferente de proteína G (Burnstock e Knight, 2004).

Os receptores P2Y, assim como os receptores P2X, podem formar agregados heteroméricos, e muitos tecidos expressam diferentes subtipos de receptores P2Y. Dessa maneira, a possibilidade de um receptor heteromérico se formar é real dependente das circunstâncias (King et al., 2000).

Esses receptores mostram baixo nível de homologia em sua seqüência peptídica: entre 19 e 55%. Como consequência disso, os subtipos têm perfis farmacológicos e operacionais diferentes. Na Figura 1.3.2 podemos ver o esquema geral da estrutura de um receptor P2Y.

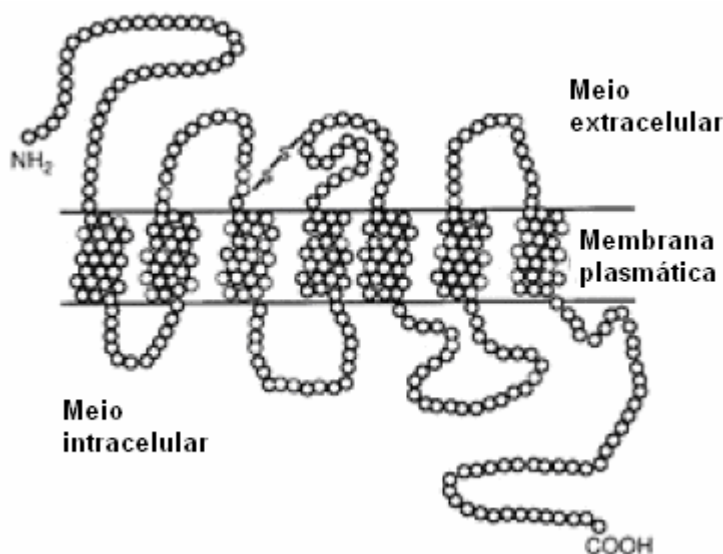


Figura 1.3.2 – Possível topologia dos receptores P2Y. Esses receptores possuem uma região N-terminal extracelular, uma região C-terminal intracelular e sete regiões transmembrana. (Adaptado de Ralevic e Burnstock, 1998).

Os receptores P2Y, são receptores que possuem uma proteína G acoplada (Figura 1.3.3) e, quando ativada, gera comunicação via cascatas

intracelulares, principalmente através da fosfolipase C, e por conseguinte, aumento do cálcio intracelular. Porém subtipos acoplados a uma proteína G_i podem gerar uma diminuição do cálcio intracelular. Alguns subtipos de receptores P2Y também afetam os níveis de AMPc intracelulares (Erb et al., 2006b).

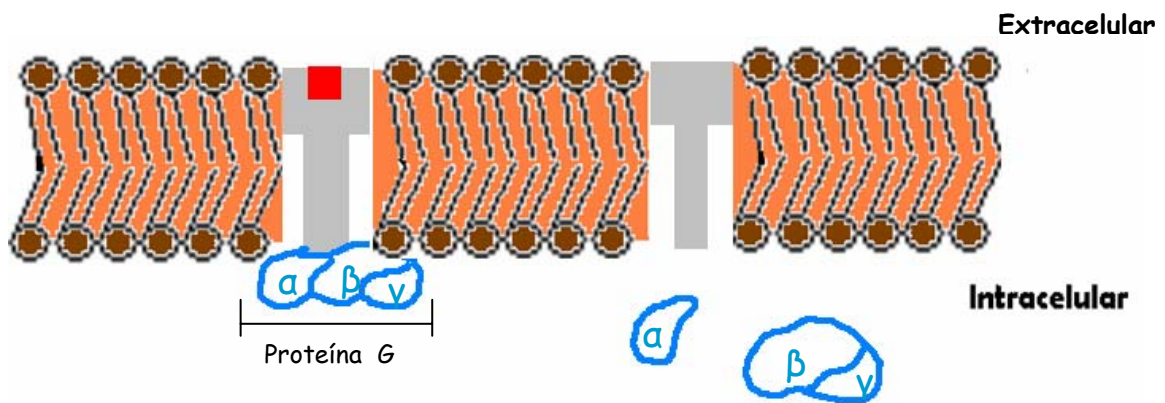


Figura 1.3.3 - Modelo de ativação dos receptores P2Y. Esquema geral de ativação dos receptores P2Y por um nucleotídeo com posterior ativação de uma proteína G.

1.3.2- DISTRIBUIÇÃO

1.3.2.1- P2X e P2Y

Os receptores P2X têm uma distribuição ampla no organismo, sendo expressos no sistema endócrino, cardiovascular, nervoso central, respiratório, digestivo e tecido muscular, como mostrado na Tabela 1.3.1. Os receptores P2Y também possuem distribuição bem ampla no organismo, sendo expressos em diversos sistemas, órgãos e tecidos do organismo (Tabela 1.3.1).

Tabela 1.3.1: Distribuição dos receptores purinérgicos e suas vias de transdução de sinal

Receptor	Distribuição Principal	Vias de Transdução
P2X		
P2X ₁	Músculo liso, plaquetas, cerebelo, corno dorsal, neurônios espinhais	Canal catiônico intrínseco (Ca ²⁺ e Na ⁺)
P2X ₂	Músculo liso, SNC, retina, células cromafins, gânglios autônomos e sensoriais	Canal catiônico intrínseco (particularmente Ca ²⁺)
P2X ₃	Neurônios sensoriais, Núcleo do trato solitário. alguns neurônios simpáticos	Canal catiônico intrínseco
P2X ₄	SNC, testículo, cólon	Canal iônico intrínseco (especialmente Ca ²⁺)
P2X ₅	Células proliferativas na pele, intestino, bexiga, timo, medula espinhal	Canal iônico intrínseco
P2X ₆	SNC, neurônios motores na medula espinhal	Canal iônico intrínseco
P2X ₇	Células apoptóticas em, por exemplo, células do sistema imunológico, pâncreas, pele	Canal catiônico intrínseco e um grande poro com ativação prolongada
P2Y		
P2Y ₁	Células epiteliais e endotélio, plaquetas, células do sistema imunológico, osteoclastos	Gq/G ₁₁ ; PLC-β ativação
P2Y ₂	Células do sistema imunológico, células epiteliais e endotélio, túbulos renais, osteoclastos	Gq/G ₁₁ e possivelmente Gi/Go; ativação PLC-β
P2Y ₄	Células endoteliais	Gq/G ₁₁ e possivelmente Gi, ativação PLC-β
P2Y ₆	Algumas células epiteliais, placenta, células T, timo	Gq/G ₁₁ ; PLC-β ativação
P2Y ₁₁	Baço, intestino, granulócitos	Gq/G ₁₁ e G _S ; ativação PLC-β
P2Y ₁₂	Plaquetas, células da glia	Gα _i , inibição da adenilato ciclase
P2Y ₁₃	Baço, cérebro, linfonodos, medula óssea	Gi/Go
P2Y ₁₄	Placenta, tecido adiposo, estômago, intestino, discretas regiões do cérebro	Gi/Go

Subtipos de receptores para purinas e pirimidinas: distribuição e mecanismos de transdução. BBG, "Brilliant blue green"; BzATP, 2_&3_-O-(4-benzoil-benzoil)-ATP; CCPA, clorociclopentil adenosina; CPA, ciclopentiladenosina; CTP, citosina trifosfato; IP3, inosina trifosfato; Ip5I, di-inosina pentafofato; 2-MeSADP, 2-metil ADP; 2-MeSATP, 2-metil ATP; NECA, 5_-N-etilcarboxamido adenosina; PLC, fosfolipase C; RB2, "Reactive blue 2" (Adaptada de Burnstock, 2007).

1.4 - PROPRIEDADES FARMACOLÓGICAS e ELETROFISIOLÓGICAS

1.4.1- P2X

Os receptores P2X são canais ativados por ligantes. Quando este receptor é ativado pelo seu principal agonista fisiológico, o ATP, abre-se um canal iônico que permite a passagem de cátions monovalentes, como o sódio e o potássio, e divalentes, como o cálcio.

Devido à necessidade de diferenciação dos subtipos de receptores P2, diversos análogos do ATP foram sintetizados. Dessa forma, determinado análogo é capaz de ativar com mais ou menos potência, diferentes subtipos permitindo a diferenciação dos mesmos segundo critérios farmacológicos considerando a ordem relativa de potência dos agonistas.

Outra característica diferencial entre os receptores P2X é que cada subtipo possui uma cinética de abertura e de dessensibilização distinta, quando exposto a um agonista. Os receptores P2X₁ e P2X₃ se dessensibilizam em poucos milisegundos de exposição ao agonista, enquanto os receptores P2X₂, P2X₄ e P2X₆ demoram alguns segundos para se dessensibilizarem. Já o receptor P2X₇ possui uma dessensibilização muito lenta, quase inexistente dependendo do tipo celular (Burnstock, 1999). A Tabela 1.5.1 mostra com mais detalhes essas características dos receptores P2X.

Tabela 1.4.1 – Cinética de ativação e dessensibilização dos receptores P2X

	Cinética		Agonista $\alpha\beta$ meATP EC ₅₀	Antagonista		
	Ativação	Dessensibilização		Suramina IC ₅₀	TNP-ATP IC ₅₀	Ip5I IC ₅₀
P2X ₁	Rápida	Rápida	1-3 μ M	1 μ M	6nM	3nM
P2X ₂	Rápida	Lenta	>100 μ M	10 μ M	1 μ M	Inativo
P2X ₃	Rápida	Rápida	1 μ M	3 μ M	1nM	3 μ M
P2X ₄	Bifásica	Moderadamente lenta	>>100 μ M	>300 μ M	15 μ M	Aumenta EC ₅₀ 2nM
P2X ₅	Rápida	Lenta	>>100 μ M	4 μ M	--	--
P2X ₇	Bifásica	Não possui	>>100 μ M	--	>30 μ M	--
P2X _{2/3}	Rápida	Lenta	>>300 μ M	~500 μ M	11nM	--
P2X _{1/5}	Rápida	Bifásica	1 μ M	--	~200n M	Inativo
P2X _{4/6}	Rápida	Moderadamente lenta	5 μ M	--	--	--
P2X _{2/6}	Bifásica	Bifásica	30 μ M	--	--	--

(Adaptado de Dunn et al., 2001)

Dados obtidos em experimentos de eletrofisiologia através de canais unitários sugerem que a condutância dos canais iônicos varia de 8 a 30 ps(Coutinho-Silva et al., 1996, Faria et al., 2005). Entretanto, alguns subtipos de receptores P2X, podem dar origem a poros como é o caso dos receptores P2X₂, P2X₄ e P2X₇ (Virginio et al., 1999). Esses poros possuem condutância maior que os canais, permitindo a passagem de moléculas de baixo peso molecular como corantes fluorescentes, como exemplo podemos citar o brometo de etídio ou o lucifer Yellow.

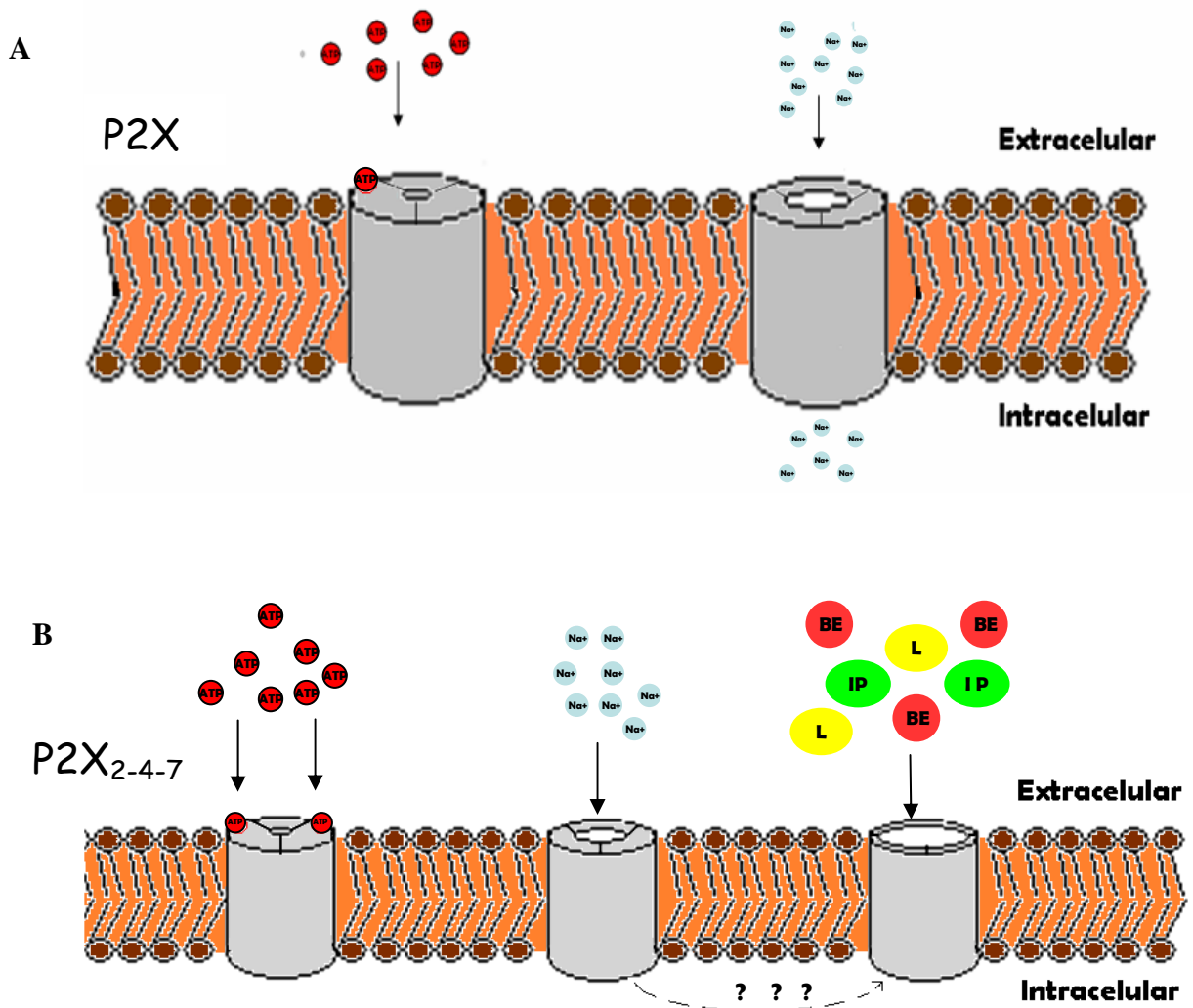


Figura 1.4.1 - Cinética de abertura dos receptores P2X. (A) Cinética de abertura dos canais dos receptores P2X que permite a passagem de cátions como Na^+ e Ca^{+2} . (B) Cinética de abertura dos receptores P2X_{2-4-7} quando expostos a altas concentrações de ATP que leva à abertura do canal um poro que permite a passagem de moléculas de maior peso molecular. LY: LúCIFer Yellow; BE: Brometo de etídio; IP: iodeto de propídeo.

1.5 - Receptores p2 no sistema imunológico

Como já mencionado no item Distribuição (Tabela 1.4.1), os receptores P2 são expressos em vários sistemas e órgãos do organismo, inclusive no sistema imunológico. Em todas as células estudadas do sistema imune há expressão de pelo menos um subtipo de receptor P2, seja ele P2Y seja P2X. Na Tabela 1.6.1 podemos observar exemplos de células do sistema

imune, os receptores expressos e o efeito causado pela ativação desses receptores.

Apesar de haver uma caracterização de receptores P2 em eosinófilos humanos, como mostra a Tabela 1.6.1, esta caracterização é parcial e foi feita em células humanas. Levando em conta que eosinófilos estão envolvidos em diversas patologias, resolvemos estudar a expressão dos receptores P2 em eosinófilos. Além disso, a necessidade de ser um modelo murino estabelecido nos levou a adotar um modelo em rato que nos permitiu, inclusive, realizar experimentos *in vivo*.

Tabela 1.5.1 – Expressão dos receptores P2 em células do SI

Tipo celular	Subtipo expresso	Efeito dos receptores P2	
Macrófagos peritoneais	P2X ₇ , P2Y ₂	Supressão da liberação de TNF- α e IL-12, geração de superóxido, liberação de IL-1 β acompanhado de morte celular, formação de células gigantes,	Haskó et al, 2000; Suh et al, 2001; Pelegrin et al, 2006; Di Virgilio et al, 1999; Pfeiffer et al; 2007
Macrófagos alveolares	P2X ₁ , P2X ₄ , P2X ₇ e P2Y ₁ , P2Y ₂ , P2Y ₄ , P2Y ₁₂	N/A;	
Células dendríticas	P2X ₁ , P2X ₄ , P2X ₅ , P2X ₇ e P2Y ₁ , P2Y ₂ , P2Y ₄ , P2Y ₅ , P2Y ₆ , P2Y ₁₀ , P2Y ₁₁ , P2Y ₁₂	Aumenta a migração e o Ca ⁺⁺ intracelular, P2X ₇ participa na apoptose, medeia a perda de CD23, associado com inflamação ATP e TNF- α tem efeito sinérgico no aumento da maturação celular, induz liberação de citocinas, P2Y medeia quimiotaxia e polimerização de actina;	Idzko et al, 2002; Coutinho-Silva et al, 1999; Sluyter and Wiley, 2002;
Linfócitos	P2X ₁ , P2X ₂ , P2X ₄ e P2X ₇ P2Y ₁ , P2Y ₂ , P2Y ₄ , P2Y ₆ , P2Y ₁₁	Regulação da diferenciação e morte celular, perda de L-selectina, envolvido na estimulação mitogênica, aumenta a taxa de proliferação em células linfóides transfectadas com P2X ₇ ;	Jamieson et al, 1996; Baricord et al, 1996; Baricord et al, 1999
Neutrófilos	P2X ₁ , P2X ₄ , P2X ₅ , P2X ₇ e P2Y ₁ , P2Y ₂	ATP e UTP promovem adesão a células endoteliais, aumentam Ca ⁺⁺ intracelular, indução da polimerização de actina, modulação de Fc γ ativado por fagocitose, produção de <i>burst</i> respiratório, liberação de elastase;	Vergnese et al, 1996; Mohanty et al, 2001; Chen et al 2006; Suh et al, 2001
Timócitos	P2X ₁ , P2X ₂ , P2X ₆ , P2X ₇ e P2Y ₁ e P2Y ₂	Ação mitogênica, indução de apoptose;	Lépine et al, 2006; Auger et al, 2005
Mastócitos	P2X ₁ , P2X ₄ e P2Y ₁ , P2Y ₂ , P2Y ₁₁ , P2Y ₁₂ , P2Y ₁₃	Aumenta a concentração de Ca ⁺⁺ interno, indução da fosforilação de ERK e p38 MAPK, apoptose e expressão de citocinas, quimiotaxia.	Bulanova et al, 2005; McCloskey et al, 1999; Feng et al, 2004
NK cell	P2X ₇ ,	Expressão de fosfatidil serina na membrana, regulação da proliferação;	Miller et al, 1999;
Eosinófilos	P2X ₁ , P2X ₄ , P2X ₅ , P2X ₇ e P2Y ₁ , P2Y ₂ , P2Y ₄ , P2Y ₆ , P2Y ₁₁	Indução de radicais de O ₂ , regeneração de actina, aumenta Ca ⁺⁺ intracelular, indução da liberação de IL-8 e ECP via P2Y ₆ , P2X ₁ e P2X ₇ .	Mohanty et al, 2001; Ferrari et al, 2000; Idzko et al, 2001; Dichman et al, 2000

1.6- Eosinófilos

1.6.1- Características morfológicas e estruturais

Os eosinófilos receberam tal denominação pela sua afinidade por corantes ácidos como a eosina, quando foram descobertos em 1898 por Ehrlich (Wardlaw et al., 1995). Essas células são derivadas da medula óssea, tendo um núcleo bilobado e grânulos citoplasmáticos. Possuem também corpúsculos lipídicos, estruturas vesicotubulares e grânulos citoplasmáticos. Os grânulos existentes no citoplasma dos eosinófilos são classificados em grânulos principais, grânulos primários e grânulos pequenos (Wardlaw et al., 1995). Os grânulos principais são ovóides e possuem um centro cristalóide circundado por uma matriz menos eletrodensa. Esse centro cristalóide é composto pela proteína básica principal e na matriz circundante encontramos três proteínas: proteína catiônica do eosinófilo, peroxidase eosinofílica (EPO) e neurotoxina derivada do eosinófilo (EDN). Os grânulos primários são diferenciados dos principais pela ausência do centro cristalóide e por apresentarem tamanhos variáveis. Além disso, essa organela é a única localização da proteína cristal de Charcot-Leyden. Já os grânulos pequenos contêm fosfatase ácida e arilsulfatase, mas também podem armazenar catalase (Wardlaw et al., 1995).

Outra estrutura encontrada nos eosinófilos são os corpúsculos lipídicos, estruturas sem membrana, aproximadamente esféricas, com 0,5 a 2 µm de diâmetro que são os principais estoques de ácido araquidônico esterificados em glicerofosfolipídios, mas também armazenam as enzimas

ciclooxigenase e 5-lipooxigenase (Wardlaw et al., 1995, Weller and Dvorak, 1994, Bozza et al., 1997).

As estruturas vesicotubulares contêm o citocromo b_{558} , um componente da NAHPH-oxidase, o qual está envolvido na produção de superóxido (Ginsel et al., 1990).

1.6.2- Funções dos eosinófilos

Eosinófilos são encontrados em pequeno número na circulação, em torno de 1 a 3% do total de leucócitos circulantes, e estão localizados, mais abundantemente, na pele e nos tecidos conjuntivos imediatamente abaixo do epitélio respiratório, intestinal e urogenital.

A função dos eosinófilos não está bem esclarecida. Classicamente tal célula teria atividade de combate a parasitas, porém dados recentes mostram que o eosinófilo pode ter uma atividade imunomoduladora. Dessa forma, sabe-se que em infecções helmínticas, os eosinófilos encontram-se em número bastante elevado sendo atribuída a eles a habilidade de defender o hospedeiro contra o helminto parasita. Essa habilidade se baseia em alguns fatos, como: i) eosinófilos medeiam toxicidade celular dependente de anticorpo contra helmintos *in vitro* (Butterworth, 1977); ii) o aumento do número de eosinófilos em infecções helmínticas, que se agregam e desgranulam no local próximo ao parasita (Behm and Ovington, 2000).

Além disso, evidências de que eosinófilos podem ter um papel protetor em outras infecções têm emergido, especialmente contra vírus de RNA, como o vírus sincicial respiratório e o vírus relacionado em roedores, e

ainda em pneumonia de camundongos *in vivo*. É notável a quantidade abundante de proteínas dos grânulos eosinofílicos, incluindo ribonucleases (como ECP e EDN em humanos e pelo menos 11 ortólogos em camundongos que degradam vírus contendo RNA de fita simples (Rosenberg and Domachowske, 2001).

Outra doença onde os eosinófilos têm participação é a asma, definida como a obstrução reversível do fluxo de ar nos brônquios e aumento da responsividade do pulmão à uma variedade de antígenos específicos e não-específicos associadas à atopia (produção de IgE). Histopatologicamente o pulmão asmático é caracterizado por uma inflamação rica em eosinófilos e por uma variedade de mudanças crônicas que induzem ao remodelamento do pulmão, incluindo produção de muco, hiperplasia do músculo liso e deposição de componentes da matriz extracelular. Na asma foram observadas também elevadas taxas de proteínas dos grânulos de eosinófilos em fluido de lavado broncoalveolar de pacientes, e o mais importante é que as concentrações observadas foram suficientes para induzir a citotoxicidade de uma variedade de tecidos do hospedeiro, incluindo células epiteliais do trato respiratório *in vitro* (Rothenberg, 1998b). A desgranulação de mastócitos e basófilos induzida possivelmente, pela proteína básica principal, também está envolvida na patogênese da doença (Rothenberg, 1998a). Além de ser citotóxica, a MPB pode estar envolvida diretamente com o aumento da reatividade do músculo liso, causando a disfunção de receptores muscarínicos M2, que pode contribuir para a hiper-reatividade das vias aéreas, uma característica marcante da asma (Jacoby et al., 1993).

Cabe ressaltar que os grânulos eosinofílicos contêm toda a maquinaria necessária para a síntese de cisteinil-leucotrienos e que essas moléculas são geradas em grandes quantidades pelas células (Bandeira-Melo et al., 2002). Estes mediadores levam ao aumento da permeabilidade vascular, da secreção de muco e são potentes vasoconstritores.

Vários estudos aplicando modelos de asma demonstraram que o bloqueio da citocina IL-5 pode bloquear vários aspectos da doença (Foster et al., 1996b, Hamelmann and Gelfand, 2001). Investigações extensivas têm responsabilizado os eosinófilos como sendo a célula efetora central na asma e um importante alvo terapêutico para a resolução da doença. Porém, o papel desse granulócito no desenvolvimento e exacerbação da doença é controverso (Rothenberg and Hogan, 2006a). Tal controvérsia em parte, é devido à diferença entre a asma humana e os modelos murinos experimentais de asma. Por exemplo, ao contrário da asma humana, camundongos com doença de pulmão eosinofílica, gerada por alérgenos ou infecções helmínticas, têm níveis variáveis de desgranulação eosinofílica (Shinkai et al., 2002). Em modelos experimentais, a inibição das ações da IL-5 suprime a eosinofilia pulmonar em resposta à inalação de antígenos. Entretanto, esse efeito nem sempre se correlaciona com a redução da hiper-reatividade das vias aéreas (Boyce and Austen, 2005).

Apesar disso, o tráfego de células para o pulmão alérgico é profundamente atenuado em camundongos deficientes de IL-5 ou naqueles tratados com anticorpo anti-IL-5 em comparação com camundongos normais não tratados (Foster et al., 2001, Mattes et al., 2002). Uma eosinofilia residual

pode permanecer no tecido do camundongo depois da inalação do alérgeno (Corry et al., 1996, Hamelmann et al., 1997). Todavia, o grau de eosinofilia tecidual residual está sob regulação genética. Como exemplo temos a eosinofilia pulmonar em BALB/c, que é de 10 a 100 vezes maior, onde a hiperreatividade das vias aéreas persiste, em comparação com camundongos C57BL/6, onde a hiper-reatividade das vias aéreas é abolida na ausência de IL-5 (Foster et al., 1996a, Hogan et al., 1997, Hogan et al., 1998).

Foi demonstrado que os eosinófilos também podem expressar moléculas de MHCII e moléculas coestimulatórias necessárias para a apresentação de antígenos (Weller et al., 1993). Porém, indivíduos normais e eosinofílicos possuem eosinófilos na circulação que não expressam essa molécula. Essas células só são induzidas a sintetizar e expressar HLA-DR (MHC de classe II em humanos) quando retiradas dos indivíduos e cultivadas *in vitro* com uma série de citocinas (IL-13, IL-4, GM-CSF). Além disso, a migração transendotelial de eosinófilos do sangue para os tecidos aumenta a expressão de HLA-DR (Yamamoto et al., 2000). Em pacientes com asma, os eosinófilos do sangue já expressam HLA-DR, enquanto os eosinófilos broncoalveolares expressaram essa molécula apenas depois de 6 ou 48 horas pós-desafio (Sedgwick et al., 1992,b Mengelers et al., 1994). Então, o desafio com o alérgeno leva a indução da expressão de HLA-DR nos eosinófilos recrutados para as vias aéreas. Eosinófilos também possuem, além dos receptores purinérgicos, uma série de moléculas de superfície, de adesão e receptores de membrana como listados na Tabela 1.7.2.

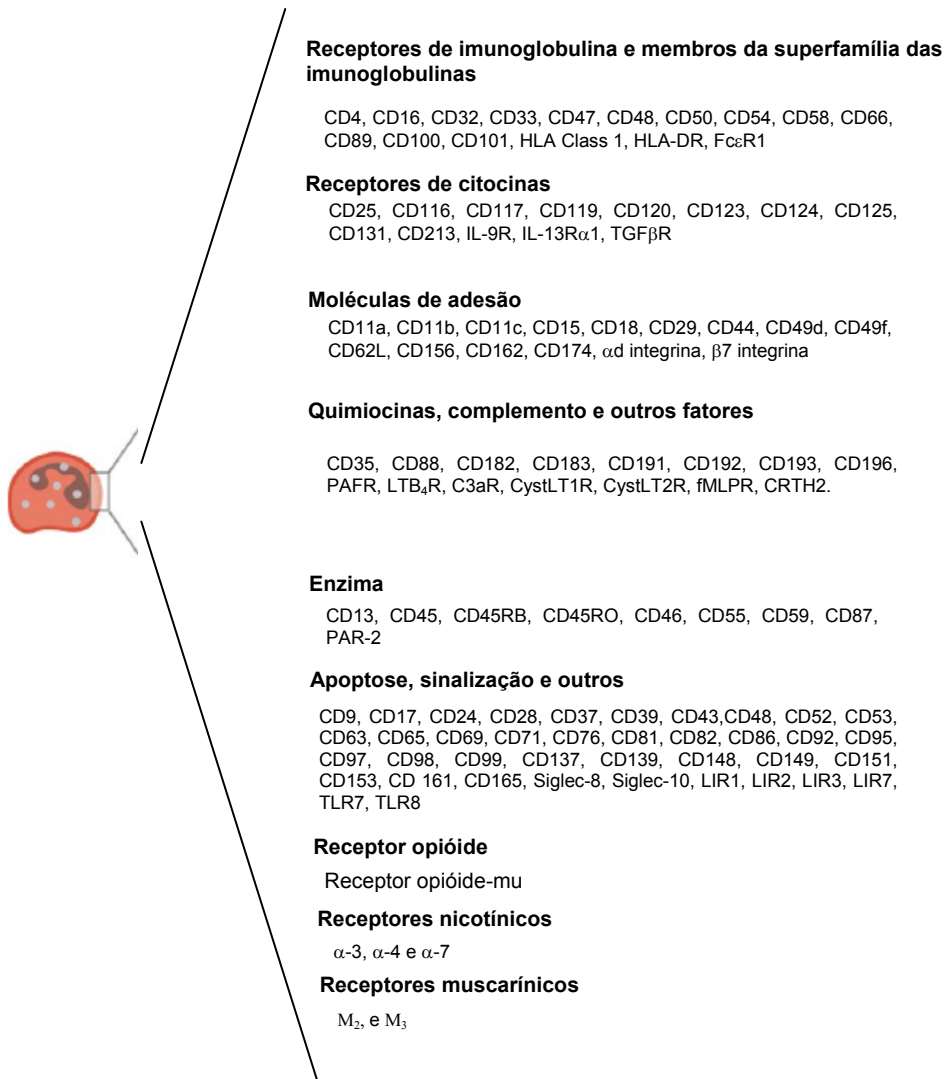


Tabela 1.6.2: Receptores e moléculas de membrana presentes em eosinófilos. (Adaptado de Rothenberg and Hogan, 2006b)

1.6.3- Receptores p2 e eosinófilos

Como mencionado anteriormente, os receptores P2 são expressos em diversas células do sistema imune, inclusive nos eosinófilos. No entanto, existem poucos relatos na literatura relacionados a esses receptores para esse tipo celular. Talvez pelo fato de que existam dificuldades no isolamento dessas células com a pureza e quantidade satisfatória para uso nos experimentos. Apesar disso, Ferrari e colaboradores (2000), utilizando sangue de doadores saudáveis, demonstraram, através de técnicas funcionais,

como medição da variação da concentração interna de cálcio, após a aplicação de diversos agonistas no meio extracelular, que existem receptores purinérgicos em eosinófilos. Nesse mesmo trabalho, o autor usou a técnica de RT-PCR para identificar quais os RNAs mensageiros estariam presentes nessas células. Eles constataram a presença do mRNA dos subtipos P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆, P2Y₁₁ e ainda P2X₁, P2X₄ e P2X₇. Além disso, eles demonstraram que o ATP extracelular é capaz de aumentar a produção de radicais de oxigênio nessas células (Ferrari et al., 2000).

Após esse trabalho, Idzko, em 2001, demonstrou que nucleotídeos extracelulares são capazes de aumentar os níveis de cálcio intracelular, aumentar a expressão de CD-11b, o *burst* respiratório, a polimerização de actina e a migração dos eosinófilos humanos (Idzko et al., 2001).

Já Mohanty e colaboradores, conseguiram demonstrar a presença dos receptores P2Y₁, P2Y₂, P2X₁, P2X₄ e P2X₅, pela técnica de RT-PCR, em pacientes com asma moderada (Mohanty et al., 2001d). Nesse trabalho, também foi testada a presença do receptor P2X₇. Porém, não foi vista a presença de RNAm desse receptor, atribuindo-se a causa da elevada concentração de IL-5, à uma citocina que aumenta a sobrevivência dos eosinófilos, ao contrário do P2X₇, que é considerado um receptor pró-apoptótico.

Dados mais recentes da literatura sugerem que nucleotídeos extracelulares também são capazes de induzir eosinófilos humanos a liberação de IL-8 e da proteína catiônica do eosinófilo (Zemkova et al., 2003), com perfis farmacológicos diferentes. A IL-8 é liberada quando a célula é exposta a UDP,

ATP, α - β me ATP e BzATP, mas sem efeito com UTP e ADP, enquanto ECP é liberada de maneira dose dependente pela exposição ao ATP, UTP e UDP. Contudo, o ADP, o BzATP e o α - β me ATP não têm efeito algum. O autor sugere ainda que a secreção de ECP acontece via ativação de receptores P2Y, uma vez que a secreção desses receptores foi bloqueada através da aplicação da toxina pertussis, uma molécula inibidora de proteína G. Por outro lado, a liberação de IL-8 deve ser decorrente da ativação de receptores P2X e P2Y, pois essa liberação foi totalmente abolida com o bloqueador KN-62 (bloqueador de receptores P2X) quando ativado pelo BzATP. Entretanto, foi apenas parcialmente inibida quando ativada pelo ATP e insensível se usado o UDP como agonista. No Quadro 1.7.3 podemos ver os subtipos de receptores expressos em eosinófilos humanos e a técnica de detecção.

Subtipos de receptores P2	Técnica de Detecção	Referências Bibliográficas
P2X ₁	RT-PCR	Ferrari et al, 2000
P2X ₂	X	X
P2X ₃	X	X
P2X ₄	RT-PCR	Ferrari et al, 2000 Mohanty et al, 2001
P2X ₅	RT-PCR	Mohanty et al, 2001
P2X ₆	X	X
P2X ₇	RT-PCR	Ferrari et al, 2000
P2Y ₁	RT-PCR	Ferrari et al, 2000 Mohanty et al, 2001
P2Y ₂	RT-PCR	Ferrari et al, 2000 Mohanty et al, 2001
P2Y ₄	RT-PCR	Ferrari et al, 2000
P2Y ₆	RT-PCR	Ferrari et al, 2000
P2Y ₁₁	RT-PCR	Ferrari et al, 2000
P2Y ₁₂	X	X
P2Y ₁₃	X	X
P2Y ₁₄	X	X

Quadro 1.6.3 – Receptores P2 descritos em eosinófilos humanos.

Como eosinófilos estão envolvidos em diversos estados patológicos, onde a quantidade dessas células encontra-se aumentada resolvemos testar se os receptores P2 poderiam estar envolvidos na migração dos eosinófilos para o sítio da inflamação. Pelo fato de já existirem evidências demonstrando que com o aumento da concentração de ATP no meio, ocorre também um aumento da quantidade de células no sítio inflamado. Nesse contexto, resolvemos avaliar quais os receptores P2 estariam expressos nos eosinófilos de rato por técnica de eletrofisiologia (P2X), sendo realizada pela primeira vez em eosinófilos. E pela técnica de análise da variação de cálcio intracelular para estudo de receptores P2Y. Além disso, fizemos imunofluorescências para os receptores P2X e P2Y, e testamos por experimentos de *transwell* se agonistas dos receptores P2 poderiam aumentar a migração dessas células. Ainda utilizamos um modelo de pleurisia em ratos para verificar se o efeito visto *in vitro* poderia acontecer *in vivo*.

2.0- OBJETIVO GERAL

1. Caracterização dos receptores P2 expressos em eosinófilos de rato e possíveis papéis funcionais.

2.1- Objetivos Específicos

1. Analisar a funcionalidade dos receptores P2X por experimentos de eletrofisiologia
2. Verificar a variação do Ca^{++} intracelular para traçar o perfil dos receptores P2 expressos em eosinófilos;
3. Avaliar a presença dos receptores P2 na membrana por imunofluorescência;
4. Verificar a participação dos receptores P2 em ensaios funcionais, de quimiotaxia;
5. Avaliar a participação dos receptores P2 no modelo de pleurisia alérgica em ratos.

3.0- MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 - Reagentes – ATP, UTP, ADP, Adenosina 5'- o –[3-tiotrifosfato] (ATP γ S), $\alpha\beta$ MetilenoATP, 2-MetilenoSATP (2-MeSATP), $\beta\gamma$ MetilenoATP, UDP, cAMP, meio de cultura RPMi 1640, HEPES, corante May-Grunwald, corante Giemsa, metanol absoluto, glicerina, PBS, Percoll, HBSS sem Ca⁺⁺/Mg⁺⁺ foram adquiridos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, E.U.A.). O Fura 2-AM foi procedente da Molecular Probes (Eugene, OR, E.U.A.).

3.2 - Animais – Utilizamos ratos Wistar do sexo masculino com peso entre 200 e 300 gramas procedentes do Biotério Central da Fundação Oswaldo Cruz. O trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética Animal (FIOCRUZ licença número 0-157).

3.3 - Isolamento de eosinófilos – Os eosinófilos foram obtidos através do lavado peritoneal de ratos. O procedimento foi feito da seguinte forma: primeiro os ratos foram eutanasiados e, então, foi feito um corte na região ventral para exposição da musculatura reto abdominal, em seguida aplicamos, com uma seringa graduada, 15 mL de RPMI na cavidade peritoneal do animal. Após uma leve massagem, o abdômen, foi aberto com uma tesoura cirúrgica, e recolhemos o RPMI com as células. Esse material recuperado do animal foi, então, colocado em um tubo de propileno e centrifugado a 870G por 10 minutos. Dessa forma, todas as células ficaram no *pellet*, e o sobrenadante foi descartado. Após esse procedimento, o *pellet* foi novamente ressuspendido em 5 mL de RPMI e foi feita a purificação dos eosinófilos. Em todos os isolamentos foi utilizado grupos de 4 animais.

Para o método de purificação dos eosinófilos utilizamos o gradiente descontínuo de percoll descrito por Gärtner em 1980, que é baseado na separação das células por suas densidades (Gartner, 1980). Foram preparados 3 mL de uma solução de percoll a 56% em um tubo estoque e em outro tubo com 2 mL a 72%. Dessa forma, adicionamos debaixo da solução celular os 3 mL de percoll 56% e em seguida, sob esse último, o percoll 72%. Assim, construímos duas fases de diferentes densidades (56% e 72%). Após a centrifugação a 1510 g durante 30 min, foram obtidos dois anéis, o primeiro formado pelas células retidas no percoll a 56% e o segundo, formado pelos eosinófilos retidos no percoll a 72%. Esse halo foi retirado utilizando uma seringa com agulha.

Utilizamos outro método para o isolamento de eosinófilos com um produto chamado metrizamida (Sigma-aldrich) que produz também um gradiente de densidade, porém com halos de 18% onde ficam retidos os mastócitos e monócitos, 20% onde ficam retidos os eosinófilos e no *pellet* que está a 24% ficam as hemácias e outras células. Para a produção do gradiente de metrizamida foi feito RPMI/gel (1 mg de gelatina por mL de RPMI). A metrizamida então foi adicionada ao RPMI/gel para formar a concentração de 24%, nesse estoque foi adicionado RPMI/gel para uma diluição de 20% e 18%. A metrizamida 18% foi homogenizada com as células recuperadas após a lavagem peritoneal.

Para a montagem do gradiente colocamos vagarosamente a metrizamida a 20% sobre a concentração de 24% para evitar que se misturassem. E sobre a concentração de 20% colocamos a concentração de

18% com as células. Depois da centrifugação (1000 g durante 18 min) recolhemos o segundo halo com os eosinófilos.

As células recuperadas do segundo halo foram novamente centrifugadas, dessa vez por 10 min a 870G, para retirada de qualquer resíduo de percoll ou metrizamida, e posteriormente suspensas em meio RPMI. Após a centrifugação uma lâmina foi feita na centrífuga Cytospin (350 rpm por 5min). Essas lâminas foram coradas pela técnica de May-Grunwald Giensa para o procedimento de contagem diferencial e estabelecimento do nível de pureza do isolamento. Essa pureza foi determinada utilizando características morfológicas como forma de diferenciação entre os tipos celulares, já que eosinófilos possuem núcleo bilobado e grânulos citoplasmáticos em abundância que ficam bem aparentes com o método de coloração utilizado. A próxima etapa foi a realização dos experimentos com pureza aceitável em torno de 80%.

3.4 - Registros eletrofisiológicos - Usamos a técnica de *patch clamp* na configuração *whole-cell* (Figura 3.1).

Os registros foram feitos usando amplificador Axopatch-1D (Axon instruments, Inc. San Mateo, E.U.A.). As células foram transferidas diretamente da estufa para o microscópio (Nikon eclipse TE-2000). O selamento foi feito aproximando a ponta da pipeta à célula e depois aplicando uma leve sucção até obtenção de um selamento de alta resistência elétrica (gigaohmico), seguido de nova sucção ou de pulsos elétricos com o objetivo de romper a membrana dentro da pipeta de forma que o vidro pudesse ficar em continuidade com a membrana. O potencial da pipeta foi corrigido após o selamento pelo amplificador. As pipetas foram feitas a

partir de capilares de borosilicato IBBL com 1,5 mm (World Precision Instruments, Inc, New Haven, E.U.A.). O potencial de *holding* aplicado foi de -60mV .

As pipetas utilizadas apresentavam resistência de 6-10 M Ω , que foram preenchidas com meio intracelular (em mM): 150 NaCl, 5 KCl, 1 MgCl₂, 1 CaCl₂ e 10 HEPES, pH 7,4.. O meio extracelular contém : 150 KCl, 5 NaCl, 1MgCl₂, 10 HEPES, e 0,1 EGTA, pH 7,4.

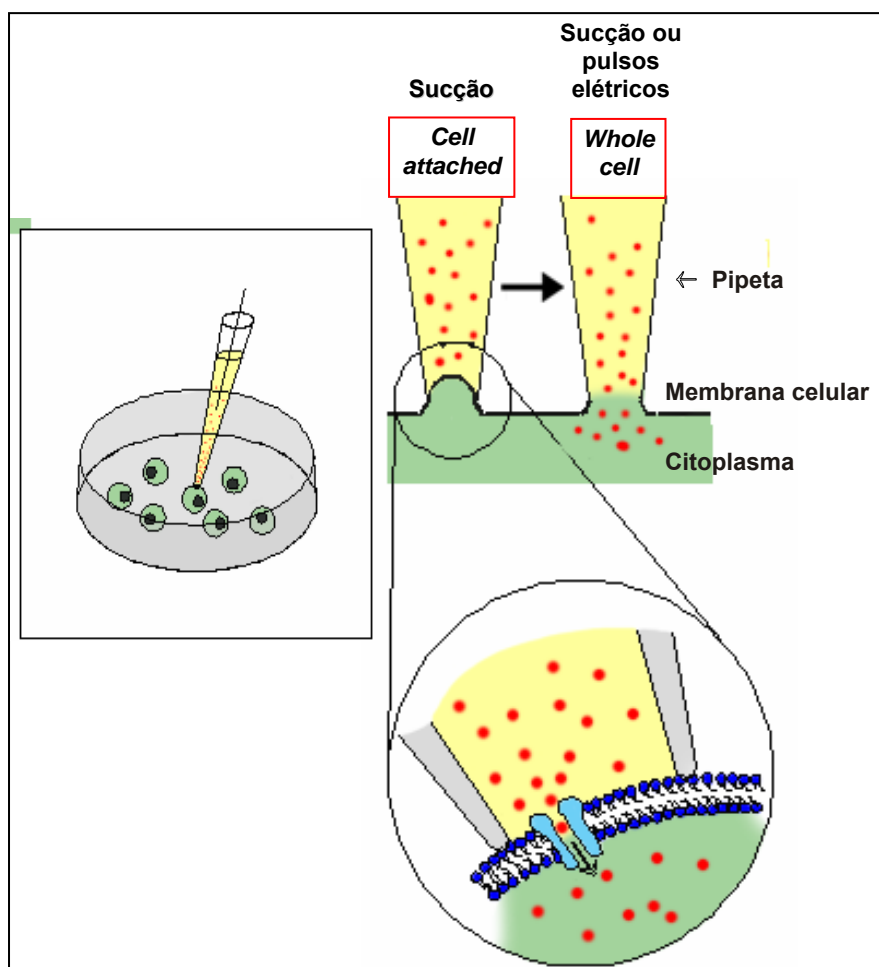


Figura 3.1- Visão esquemática das configurações de “patch clamp”. No centro da figura vemos a configuração *cell-attached* pré requisito para obtenção das demais configurações. Essa configuração é obtida aproximando a pipeta à célula e aplicando uma pequena sucção onde nesse momento pode ocorrer um selamento de alta resistência elétrica. A direita vemos a configuração *whole-cell*, obtida através da aplicação de pulsos elétricos. (Adaptada de Alves,LA, em preparação).

3.5 -Adição dos agonistas - Os agonistas foram adicionados às células usando uma micropipeta automática de volume variável, onde a ponta da micropipeta foi posicionada dentro do banho e os agonistas só foram aplicados após a estabilização da linha de base. As concentrações finais dos agonistas variaram de 10 nM a 1 mM, dependendo do protocolo e da droga usada.

3.6 - Análise das variações dos níveis de cálcio intracelular –

A maioria dos receptores P2Y, uma vez ativados, provocam uma elevação dos níveis de cálcio intracelular. Os registros dos níveis intracelulares de cálcio foram feitos através de microfluorimetria, utilizando FURA-2 AM, um corante capaz de entrar passivamente na célula devido ao seu caráter apolar. No interior da célula, grupamentos ésteres presentes na estrutura química do corante são clivados por esterases, provocando exposição de grupos polares de carga negativa. Dessa forma, o corante perde seu caráter apolar e fica retido no interior da célula. As células marcadas com FURA 2-AM foram então excitadas por luz com dois comprimentos de onda na faixa da radiação UV (340 e 380 nm), alternadamente, em alta frequência e analisadas em um microfluorímetro (Photon Technology Inc., Princeton, N.J.) acoplado a um microscópio NIKON TE-2000.

A emissão sob estímulo de ambos os comprimentos de onda ocorre em 510 nm, que, por sua vez, são monitorados durante todo o experimento. Os níveis de cálcio intracelular são proporcionais à razão entre as intensidades de emissão E1 (excitação a 340 nm e leitura a 510 nm) e E2 (excitação a 380 nm e leitura a 510 nm). Quando o ATP ou moléculas análogas

são aplicados nas células marcadas e ocorre a ativação de receptores P2, o cálcio aumenta no meio intracelular, onde se liga ao FURA 2-AM, fazendo com que a intensidade de emissão do comprimento de onda de 510 nm se eleve, quando estimulado por 340 nm e diminua, quando estimulado a 380 nm. A razão entre as intensidades de emissão, portanto, se eleva, sendo proporcional ao aumento dos níveis de cálcio intracelular. Para o experimento de análise de variação de cálcio 10^5 células foram colocadas em câmara de perfusão e foram recolhidos campos com pelo menos 30 células para a análise. A Figura 7.2 ilustra, de forma didática, o procedimento do experimento.

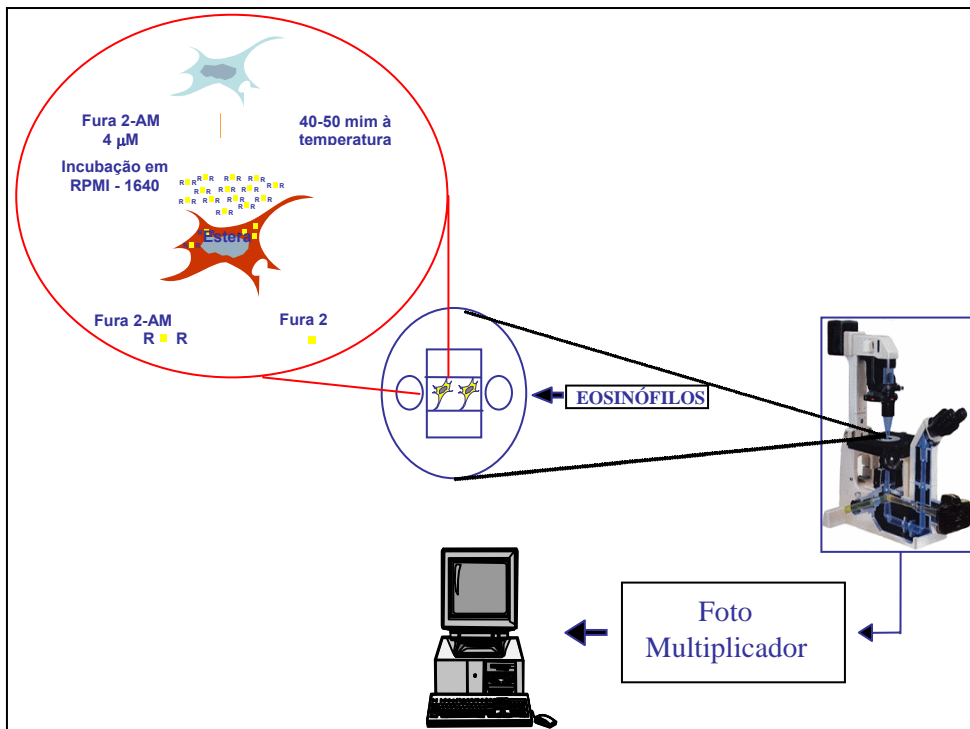


Figura 3.2 – Visão esquemática dos experimentos de cálcio.

O esquema mostra a incubação com o FURA2-AM (50 min), a quebra desse fluorocromo por esterases no interior da célula, o torna polar e incapaz de sair da célula. Após incubação, as células foram levadas ao microscópio e depois da estabilização da linha de base foram aplicados os agonistas. Os registros foram armazenados em um computador utilizando o programa PTI.

3.7 - Imunofluorescência – Nos experimentos de imunofluorescência, foram utilizados anticorpos primários policlonais anti-P2Xr e anti-P2Yr feitos em coelhos (Alomone company, Jerusalém, Israel). Todos os anticorpos tinham como alvo a parte intracelular dos receptores tanto P2X como P2Y (ver Tabela 7.1). Inicialmente, as lâminas preparadas em centrífuga de “citospin”, foram fixadas paraformaldeído 4% durante 5min. Após fixação, as lâminas foram lavadas com PBS, por 3 vezes, por 5 minutos para posterior adição as solução bloqueadora de PBS, Triton-X 0,1% e soro normal de cabra 10%. Os anticorpos primários foram incubados por 12h, a 4°C, para em seguida lavarmos, novamente, com PBS por 3 vezes de 5 min. A aplicação do anticorpo secundário anti-rabbit conjugado a Alexa 546 foi feita depois da lavagem. Deixamos incubar por 2 h e então lavamos com PBS 1X e montamos a lâmina com meio de montagem (N-propil-galato) e visualizamos ao microscópio. As imagens foram adquiridas com o programa *image pro IV* em um microscópio Nikon TE2000 invertido acoplado a um sistema de aquisição de imagem com lentes objetivas de 40x.

Quadro 3.1 - ANTICORPOS UTILIZADOS

ANTICORPO	REATIVIDADE	EPÍTOPO	POSSÍVEL LOCALIZAÇÃO NO EPÍTOPO
α -P2X ₁	RATO	Região C-terminal	Resíduos 382-399
α -P2X ₂	RATO	Região C-terminal	Resíduos 457-472
α -P2X ₄	RATO	Região C-terminal	Resíduos 370-388
α -P2X ₇	RATO	Região C-terminal	Resíduos 576-595
α -P2Y ₁	RATO	3º. Loop intracelular, entre TM5 e TM6	Resíduos 242-258
α -P2Y ₂	RATO	3º. Loop intracelular, entre TM5 e TM6	Resíduos 227-244
α -P2Y ₄	RATO	Região C-terminal	Resíduos 337-350

3.8 - Ensaio de migração de eosinófilos – Para estudar a resposta quimiotática dos eosinófilos *in vitro*, empregamos o sistema de quimiotaxia em *transwell*. Tal sistema possui dois compartimentos: 1) o inferior, com poços que comportam os estímulos quimiotáticos e seus respectivos veículos e 2) o superior, no qual são depositados os eosinófilos. Para investigar a atividade migratória dessas células, realizamos ensaios onde os agonistas dos receptores P2 foram adicionados aos poços da parte inferior do inserto com o intuito de atrair as células que estavam depositadas na parte superior fossem atraídas (Figura 7.3). As partes superior da inferior são sepadas por filtro com poro de 3 μm . A câmara foi incubada a 37⁰C na estufa (5% CO₂), por 1 ou 2 horas. Os resultados obtidos foram normalizados pelo PAF, ou seja, o número de células que migraram em função da [] do PAF foi considerado igual a 1. Dessa forma, foi estabelecida a relação com os agonistas ou antagonistas (1/ fator normalizado = no. de células do PAF/no. de células do agonista)

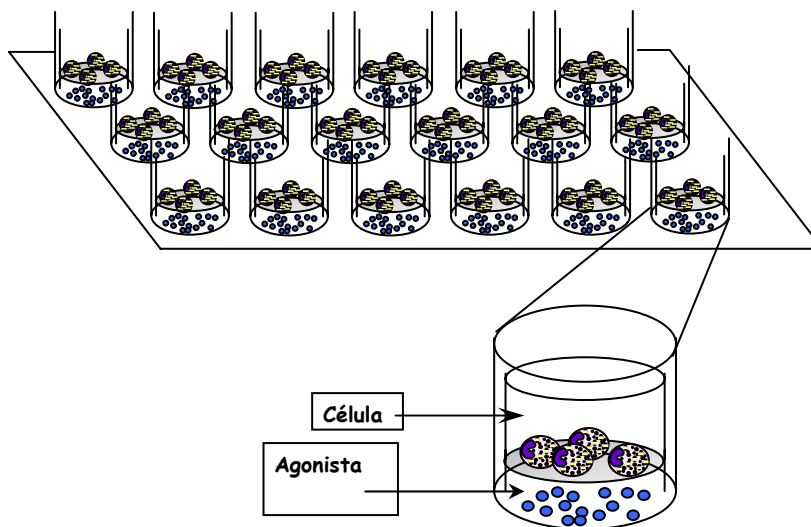


Figura 3.3 – Visão esquemática de um transwell. Esse aparato possui dois compartimentos um superior, onde as células depositadas, e um inferior, onde foram colocados os agonistas diluídos em meio RPMI. Após incubação de 1 h ou 2 h, as células que migraram para a parte inferior foram contadas em câmara de Neubauer.

3.9 - Ensaios de pleurisia – Nos ensaios de pleurisia os animais foram sensibilizados com uma injeção subcutânea (0,2 mL) de ovoalbumina (50 µg) e Al(OH)₃ (5 mg) em solução salina de NaCl 0,9%, no dia 1. No dia 14 os animais foram desafiados com ovoalbumina (12 µg/0,1 mL). De acordo com o protocolo, 1h antes do desafio foi feito o tratamento com os agonistas e antagonistas via injeção intratorácica (0,1 mL). Após 24 h foi feito um lavado pleural, através da abertura da cavidade torácica, foi injetada solução salina (3 mL). Após uma leve massagem da cavidade torácica o lavado recolhido.

As células totais foram contadas em Câmara de Neubauer e a contagem diferencial feita após preparação de um citocentrifugado para posterior coloração, pelo método May-Grunwald/Giensa. Para a contagem diferencial dos eosinófilos foi utilizado microscópio com objetiva de imersão em óleo.

3.10 - Análise estatística – Foi utilizada a análise de variância (ANOVA) e pós-teste de Bonferroni bicaudal utilizando o software Prism 4.0. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando $p \leq 0,05$.

4.0- RESULTADOS

4.1 – Estudo do perfil de receptores P2X em eosinófilos

Como descrito anteriormente, os receptores P2X são canais iônicos ativados por ligante. Quando esses canais se abrem ocorre a passagem de íons e uma corrente é gerada que pode ser medida através das técnicas de eletrofisiologia. No nosso trabalho, escolhemos a técnica de *patch-clamp* na configuração *whole-cell* para o estudo dos receptores ionotrópicos. Essa configuração de *patch-clamp* permite o estudo de todos os canais presentes e abertos a partir da aplicação dos agonistas. Assim, foi possível avaliarmos qual a ordem de potência dos agonistas e sugerirmos quais os receptores poderiam estar presentes nos eosinófilos.

Na Figura 4.1, podemos observar registros eletrofisiológicos após aplicação de diversos agonistas (Fig. 4.1 A-L). Uma vez que, o EC_{50} dos receptores P2X é de 1-10 μ M, exceto para o receptor P2X₇ que é aproximadamente 300 μ M, usamos a concentração de 10 μ M para a avaliação em eletrofisiologia. Dessa forma, conseguimos obter a ordem de potência relativa dos agonistas: ATP > ATP γ S > 2meSATP > ADP > $\alpha\beta$ meATP > $\beta\gamma$ meATP > BzATP > UTP > UDP > cAMP (Figura 4.1.1). É possível observarmos que os registros obtidos são do tipo catiônicos e de entrada de corrente na célula, já que por convenção um declínio da linha de base é considerado como corrente como de entrada. Cabe ressaltar que essa é a primeira vez que se registram correntes ativadas por nucleotídeos em eosinófilos. Pela comparação das ordens de potência relativa dos agonistas e cinética dos registros

eletrofisiológicos obtidos, podemos sugerir a presença de alguns subtipos de receptores P2, como os receptores P2X₂, P2X₄, P2X₅ e talvez o P2X₇. Não é possível descartar a presença dos receptores P2X₁ e P2X₃, pois foram obtidas correntes com uma cinética semelhante a desses receptores (rápida dessensibilização) quando aplicamos os agonistas $\alpha\beta$ meATP e $\beta\gamma$ meATP (Figura 4.1 B e D). Os agonistas UDP, adenosina e AMPc não ativaram correntes (Figuras 4.1 I, J e K) como esperado, já que o UDP ativa principalmente receptores P2Y, a adenosina - receptores P1, e o AMPc através da conversão por ectonucleotidases pode gerar AMP ou adenosina ativando também receptores P1.

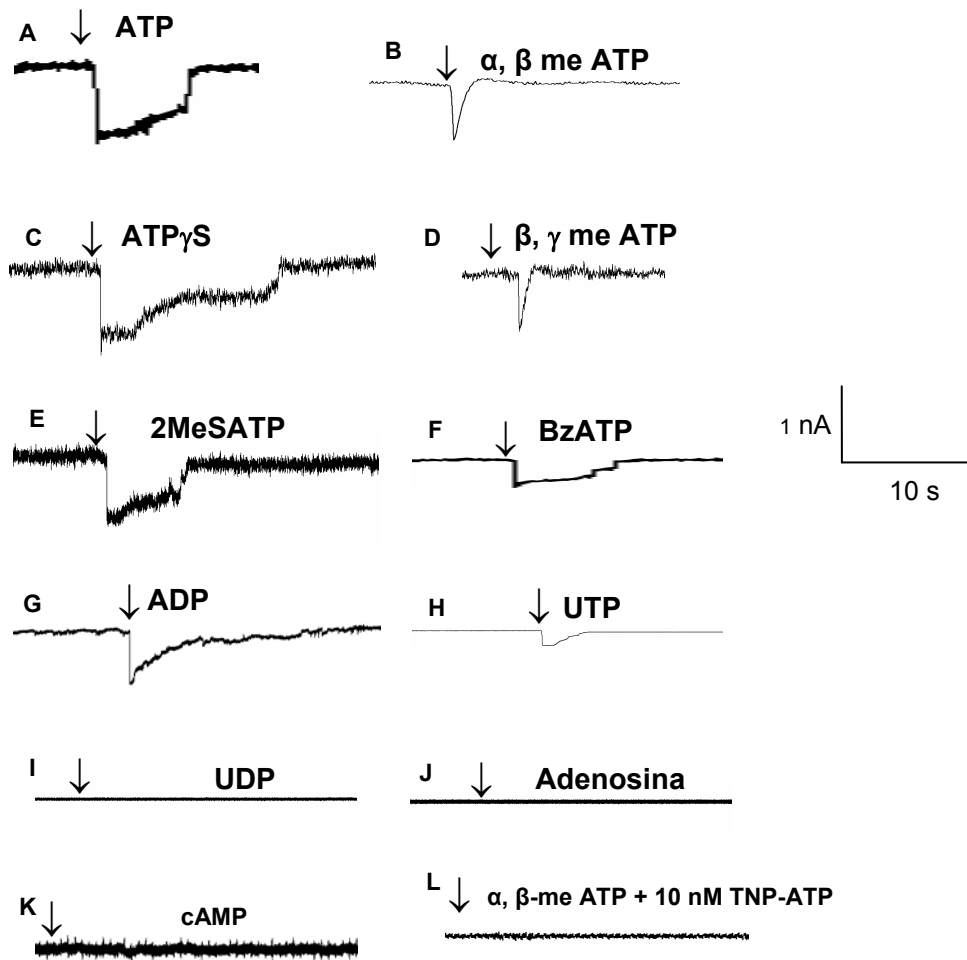


Figura 4.1: Registros eletrofisiológicos representativos em eosinófilos de rato. Eosinófilos de ratos foram isolados e utilizados nos experimentos de eletrofisiologia, com a configuração *whole-cell*, que permite o registro de todos os canais da membrana após ativação pelo agonista. O potencial de *holding* aplicado na células foi de -60 mV; a resistência de pipeta foi de 6 a 10MΩ. Podemos ver registros de correntes em eosinófilos de A-L, com a aplicação dos seguintes agonistas (indicado pela seta): (A) ATP, (B) $\alpha\beta$ meATP, (C) ATP γ S, (D) $\beta\gamma$ maATP,(E) 2meSATP, (F) BzATP, (G)ADP ,(H) UTP, (I) UDP, (J) adenosina, (K) AMPc, (L) TNP-ATP + $\alpha\beta$ meATP. Registros representativos de 5 experimentos independentes.

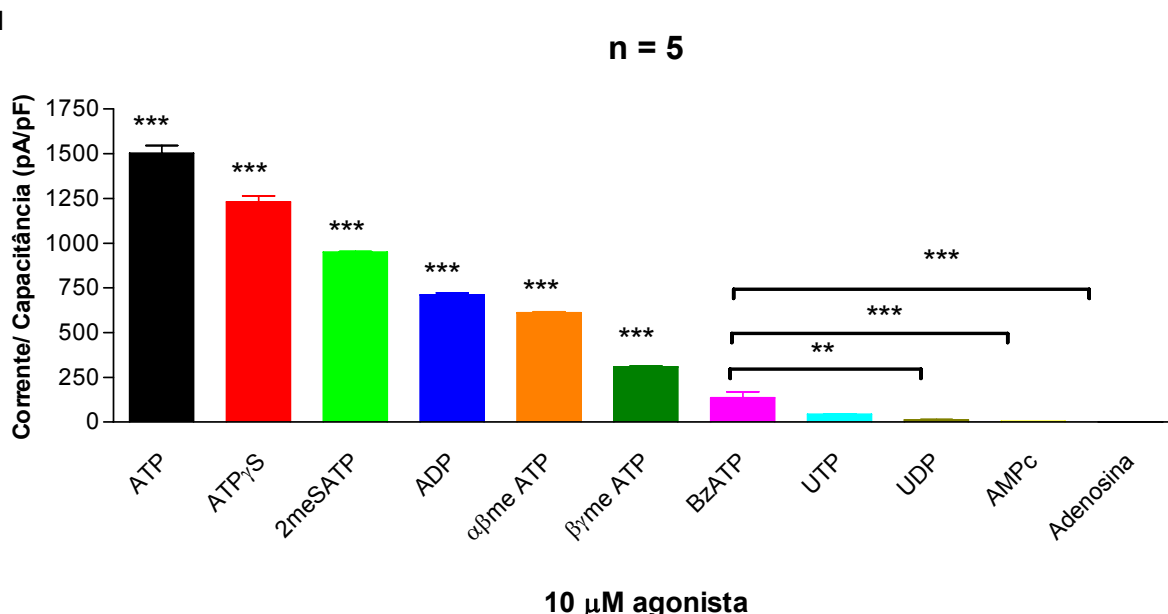


Figura 4.1.1 : Quantificação dos experimentos de eletrofisiologia. Gráfico de barras representativo de 5 experimentos independentes de eletrofisiologia. O valor de significância representa quanto cada agonista é diferente de todos os outros com exceção do BzATP que não estatisticamente diferente em relação ao UTP. *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,5$. Barras representam média \pm erro padrão.

4.2 – Estudo do perfil de receptores P2Y em eosinófilos

Dando continuidade à caracterização dos receptores P2 em eosinófilos, realizamos experimentos de análise da variação interna da concentração de cálcio aplicando diversos agonistas (Figura 4.2). Uma vez ativados, os receptores P2Y, em geral, induzem o aumento do cálcio com ativação de uma proteína G e aumento dos níveis de AMPc e IP3, dependendo do subtipo ativado (Erb et al., 2006a). A Figura 4.2.1 a análise quantitativa da variação do cálcio intracelular. Dessa forma, nossos resultados mostram que o agonista mais potente é o UTP seguido do ATP γ S. Assim, sugerimos a ordem de potência média da amplitude máxima de cálcio dos agonistas foi: UTP > ATP γ S > ADP > UDP > ATP > BzATP > 2meSATP > $\alpha\beta$ meATP > cAMP > Adenosina > $\beta\gamma$ meATP. Como podemos observar nos registros obtidos (Figura 4.2.1), as respostas são bifásicas com um componente lento,

indicando a ativação de receptores P2Y que é mais lenta em relação ao aumento de cálcio intracelular pela abertura de canais dos receptores P2X. Dessa forma, com esses resultados da ordem de potência relativa dos agonistas foi possível sugerirmos que existe a participação de alguns receptores P2Y, como: P2Y₂, P2Y₆ e P2Y₁₁.

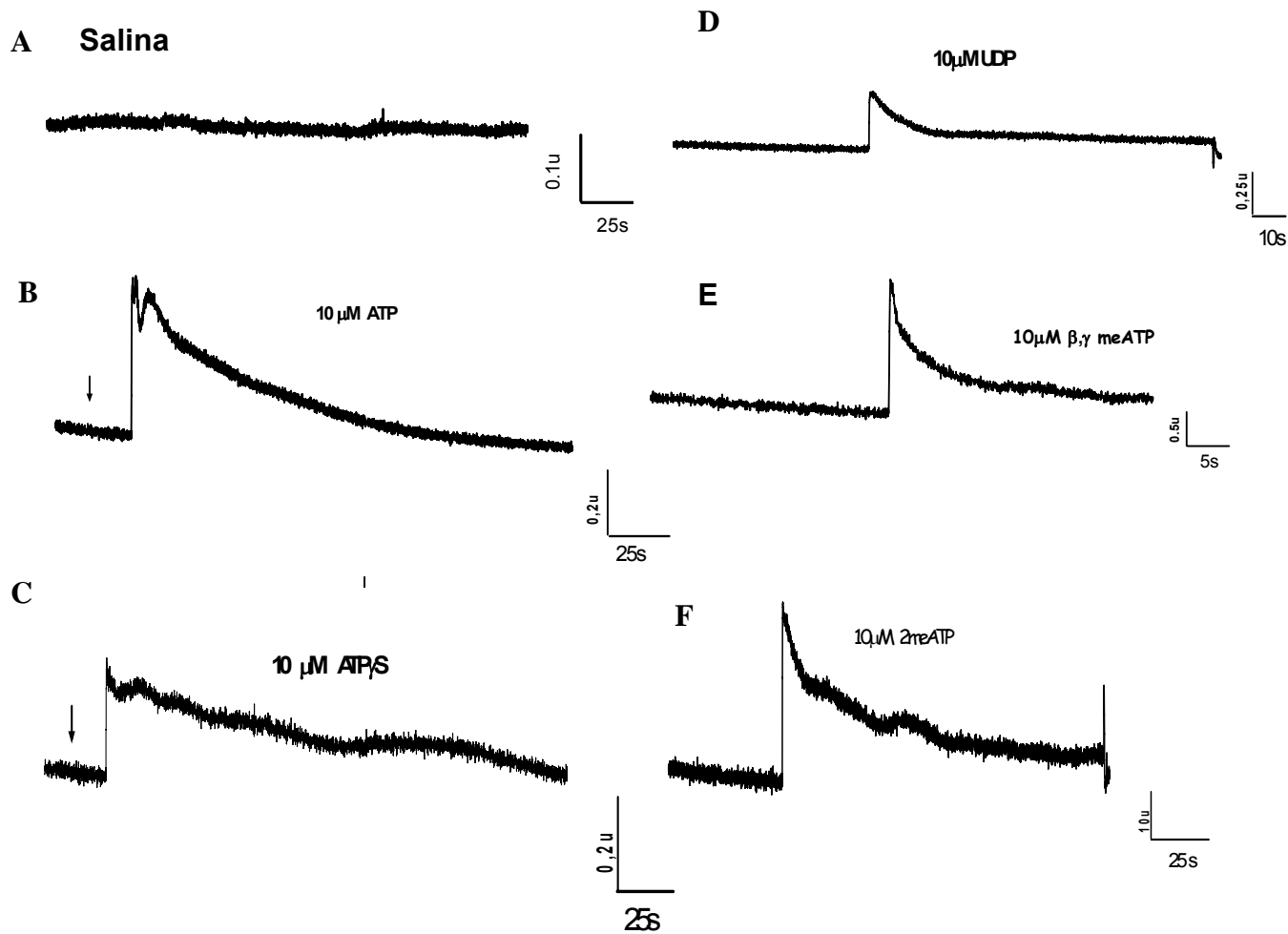


Figura 4.2: Registros representativos de análise da variação de cálcio intracelular. Os eosinófilos foram incubados por 40 minutos com FURA2-AM, e então transferidos para o microscópio para a leitura da variação de fluorescência com subsequente aplicação dos agonistas na concentração de 10 μ M. (A) Salina, (B) ATP, (C) ATP γ S, (D) UDP, (E) $\beta\gamma$ meATP, (F) 2meATP. Como podemos observar na Figura 4.2A-F, os registros da variação de cálcio intracelular utilizando o FURA2-AM, apresentam escalas diferentes decorrentes da variabilidade experimental. A leitura foi realizada em campos com pelo menos 30 células.

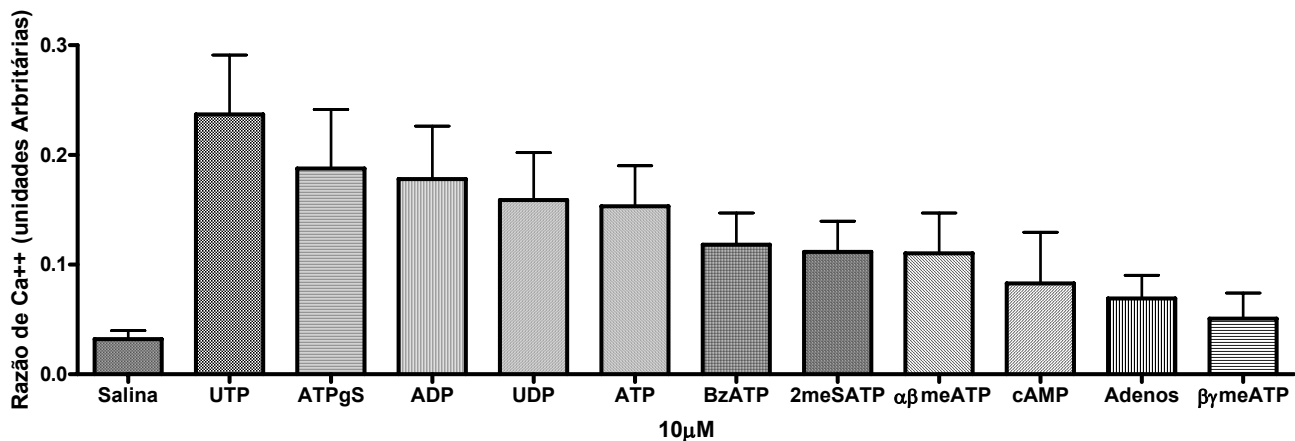


Figura 4.2.1: Análise de variação do cálcio intracelular. Gráfico de barras de 3 experimentos de análise de variação do cálcio intracelular em dias diferentes ($n \geq 4$). Barra representa média \pm erro padrão.

4.3 – Expressão dos receptores P2 por Imunofluorescência

Já que os nossos resultados com experimentos funcionais indicaram a expressão de alguns receptores e a caracterização através de agonistas por vezes se torna difícil devido a falta de agonistas específicos resolvemos verificar quais os receptores estariam realmente sendo expressos nos eosinófilos através de experimentos de imunomarcção.

Nas imunofluorescências para o receptor P2X₁ foi possível observar uma polarização da marcação (Figura 4.3, setas), representando uma maior concentração do receptor nesses pontos que possivelmente estão localizados na membrana plasmática. Na imagem de imunofluorescência representativa para o receptor P2X₁ as células parecem um pouco maior em relação àquelas vistas em outras imagens devido a um aumento digital que

pode ser feito pelo software utilizado (Photoshop CS), uma vez que na lâmina do citocentrifugado do experimento havia pouca concentração de células. Dessa forma, resolvemos ampliar a imagem para melhor visualização.

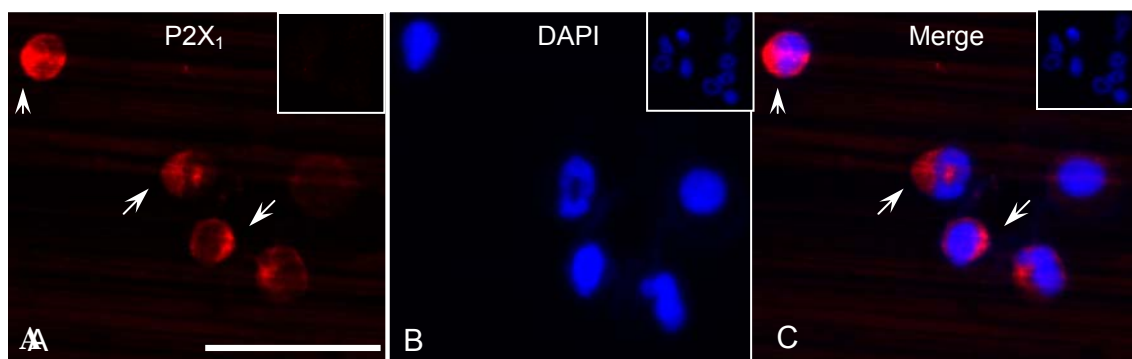


Figura 4.3 : Imunoreatividade do receptor P2X₁. (A) eosinófilos imunomarcados com anticorpo anti-P2X₁ ligado ao anticorpo secundário conjugado ao fluorocromo Alexa, em vermelho. Em (B) eosinófilos com DAPI que marca o núcleo em azul. (C) representa as figuras (A) e (B) sobrepostas mostrando em conjunto o núcleo e a imunomarcagem para o receptor P2X₁. Os inserts representam experimentos controles sem o anticorpo primário anti-P2X₁, para mostrar que não existe marcação inespecífica, da mesma forma o inserto em (A) mostra o experimento com o anticorpo secundário, (B) marcação de núcleo com o DAPI, (C) sobreposição dos inserts em (A) e (B). Setas mostram polarização da marcação do receptor P2X₁. Barra de calibração de 10 µm. Imagens representativas de 2 experimentos independentes.

Já nos experimentos de imunofluorescência para o receptor P2X₂ como havia uma concentração de células maior na lâmina do citocentrifugado, preferimos mostrar a imagem sem aumento digital para podermos visualizar toda a população de células da lâmina. Sendo assim, podemos ver também que existe uma polarização (setas) da marcação para o receptor em algumas células. Em outras células é possível também observar uma pequena marcação citoplasmática, contudo a confirmação só é possível através de imagens feitas por microscopia confocal em experimentos de colocalização. Além disso, podemos observar que todas as células da lâmina de citocentrifugação expressam o receptor P2X₂ mesmo que em níveis diferentes.

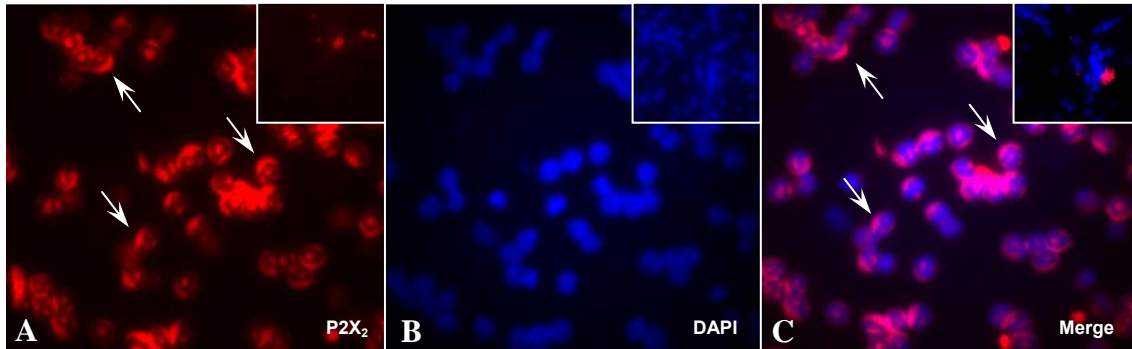


Figura 4.3.1 : Imunoreatividade do receptor P2X₂. (A) eosinófilos imunomarcados com anticorpo anti-P2X₂ ligado ao anticorpo secundário conjugado ao fluorocromo Alexa, em vermelho. Em (B) eosinófilos com DAPI que marca o núcleo em azul. (C) representa as Figuras (A) e (B) sobrepostas mostrando, em conjunto o núcleo e a imunomarcagem para o receptor P2X₂. Os insertos representam experimentos controles sem o anticorpo primário anti-P2X₂, para mostrar que não existe marcação inespecífica, da mesma forma o inserto em (A) mostra o experimento com o anticorpo secundário, (B) marcação de núcleo com o DAPI, (C) sobreposição dos insertos em (A) e (B). Setas mostram a possível polarização da marcação do receptor P2X₂. A objetiva utilizada foi de 40x. Imagens representativas de 2 experimentos independentes.

Assim, como para os receptores anteriores, nas imagens de imunofluorescência para o receptor P2X₄, podemos visualizar certos pontos de maior concentração de fluorescência (Figura 4.3.2- setas). Um aumento digital foi usado para melhor visualização da imagem, e em algumas células foi possível observarmos uma marcação dentro do núcleo, em forma de anel. Essa marcação poderia corresponder a marcação das faces superior e inferior da membrana celular.

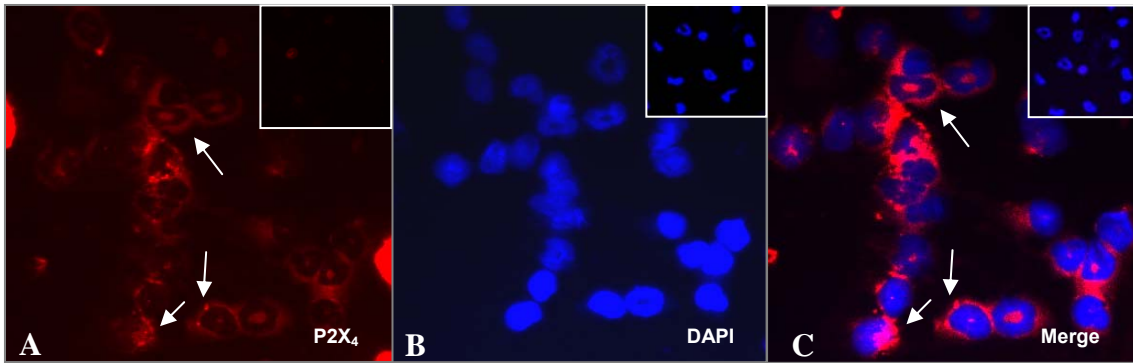


Figura 4.3.2: Imunoreatividade do receptor P2X₄. (A) eosinófilos imunomarcados com anticorpo anti-P2X₄ ligado ao anticorpo secundário conjugado ao fluorocromo Alexa, em vermelho. Em (B) eosinófilos com DAPI que marca o núcleo em azul. (C) representa as figuras (A) e (B) sobrepostas mostrando em conjunto o núcleo e a imunomarcagem para o receptor P2X₄. Os inserts representam experimentos controles sem o anticorpo primário anti-P2X₄, para mostrar que não existe marcação inespecífica, da mesma forma o inserto em (A) mostra o experimento com o anticorpo secundário, (B) marcação de núcleo com o DAPI, (C) sobreposição dos inserts em (A) e (B). Setas mostram uma possível polarização da marcação do receptor P2X₄. A objetiva utilizada foi de 40x. Imagens representativas de 2 experimentos independentes.

O último subtipo de receptor P2X testado foi o receptor P2X₇.

Como podemos observar na Figura 4.3.3 a marcação para esse receptor foi muito fraca. Além disso, não foi possível ver os pontos de concentração de fluorescência como nos outros receptores, talvez devido a uma baixa concentração do receptor e/ou ainda uma distribuição homogênea do mesmo na membrana.

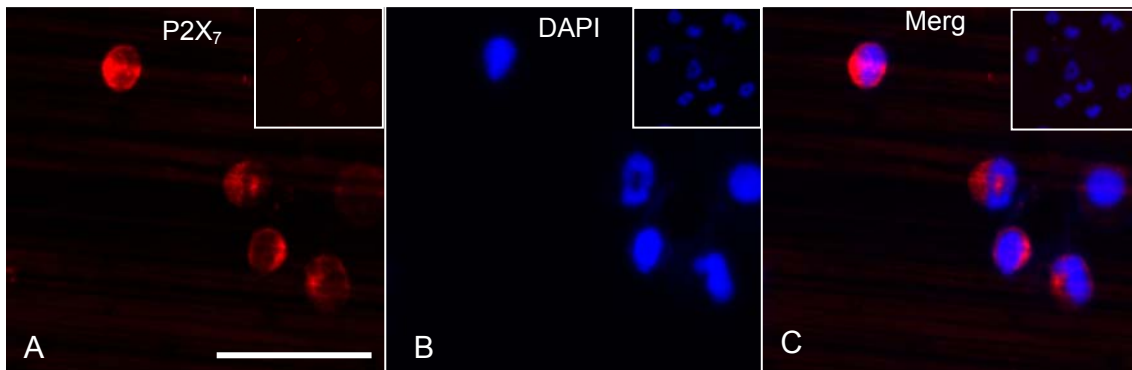


Figura 4.3.3 : Imunoreatividade do receptor P2X₇. (A) eosinófilos imunomarcados com anticorpo anti-P2X₇ ligado ao anticorpo secundário conjugado ao fluorocromo Alexa, em vermelho. Em (B) eosinófilos com DAPI que marca o núcleo em azul. (C) representa as figuras (A) e (B) sobrepostas mostrando em conjunto o núcleo e a imunomarcagem para o receptor P2X₇. Os insertos representam experimentos controles sem o anticorpo primário anti-P2X₇, para mostrar que não existe marcação inespecífica, da mesma forma o inserto em (A) mostra o experimento com o anticorpo secundário, (B) marcação de núcleo com o DAPI, (C) sobreposição dos insertos em (A) e (B). Barra de calibração de 10 μ m. Imagens representativas de 2 experimentos independentes.

Após a realização de ensaios de imunofluorescência para os receptores P2X, realizamos experimentos similares para os receptores P2Y e o primeiro subtipo a ser testado foi o receptor P2Y₁ (Figura 4.3.4). Nesses experimentos, observamos grande fluorescência representando, possivelmente, uma grande expressão desse receptor nos eosinófilos. Entretanto essa afirmação só poderá ser confirmada após uma equalização e uma quantificação da fluorescência de todos os experimentos realizados. Podemos ver novamente nesse experimento marcações pontuais em algumas células.

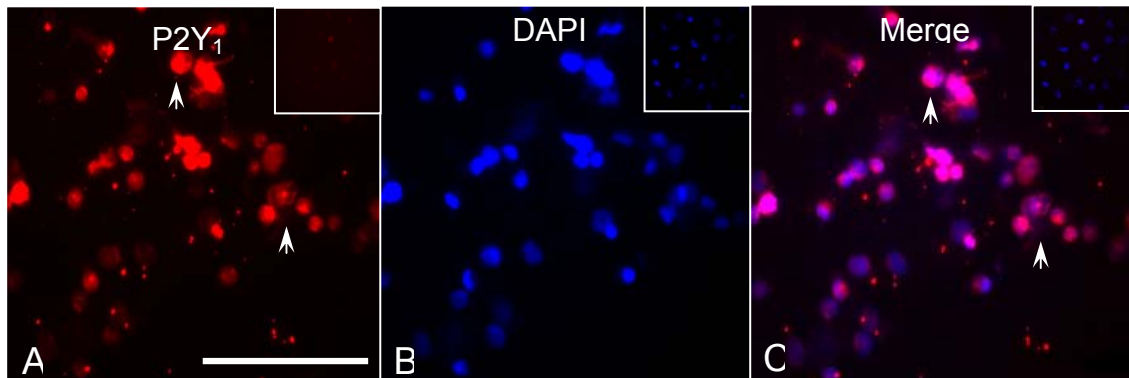


Figura 4.3.4 : Imunoreatividade do receptor P2Y₁. (A) eosinófilos imunomarcados com anticorpo anti-P2Y₁ ligado ao anticorpo secundário conjugado ao fluorocromo Alexa, em vermelho. Em (B) eosinófilos com DAPI que marca o núcleo em azul. (C) representa as figuras (A) e (B) sobrepostas mostrando em conjunto o núcleo e a imunomarcagem para o receptor P2Y₁. Os insertos representam experimentos controles sem o anticorpo primário anti-P2Y₁, para mostrar que não existe marcação inespecífica, da mesma forma o inserto em (A) mostra o experimento com o anticorpo secundário, (B) marcação de núcleo com o DAPI, (C) sobreposição dos insertos em (A) e (B). Setas mostram uma possível polarização da marcação do receptor P2Y₁. Barra de calibração de 10 μm. Imagens representativas de 2 experimentos independentes.

Nos experimentos de imunofluorescências para o receptor P2Y₂, as lâminas utilizadas continham poucas células, por isso utilizamos um aumento digital das células para melhor visualização da marcação, que como podemos observar (Figura 4.3.5) foi mais fraca quando comparada à do receptor P2Y₁, porém é possível observarmos claramente os pontos de concentração do receptor na membrana celular (Figura 4.3.5 – setas).

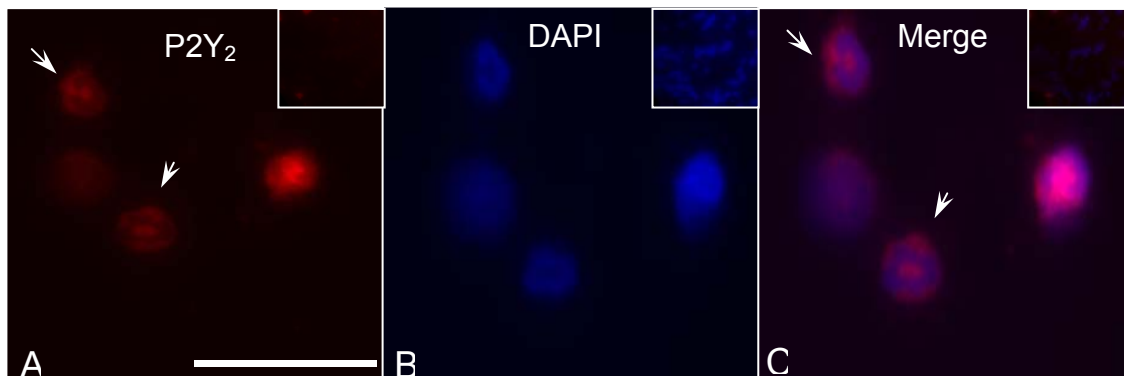


Figura 4.3.5 : Imunoreatividade do receptor P2Y₂. (A) eosinófilos imunomarcados com anticorpo anti-P2Y₂ ligado ao anticorpo secundário conjugado ao fluorocromo Alexa, em vermelho. Em (B) eosinófilos com DAPI que marca o núcleo em azul. (C) representa as figuras (A) e (B) sobrepostas mostrando em conjunto o núcleo e a imunomarcagem para o receptor P2Y₂. Os inserts representam experimentos controles sem o anticorpo primário anti-P2Y₂, para mostrar que não existe marcação inespecífica, da mesma forma o inserto em (A) mostra o experimento com o anticorpo secundário, (B) marcação de núcleo com o DAPI, (C) sobreposição dos inserts em (A) e (B). Setas mostram uma possível polarização da marcação do receptor P2Y₂. Barra de calibração de 5 μ m. Imagens representativas de 2 experimentos independentes.

O subtipo P2Y₄ também foi testado e é possível observarmos que esse receptor parece estar expresso em grande quantidade em eosinófilos com marcação principalmente membranar (Figura 4.3.6). Nesse experimento a lâmina continha uma grande quantidade de células, sendo assim, não foi necessário utilizarmos nenhum aumento digital. Como descrito anteriormente as setas representam pontos de polarização de fluorescência na membrana celular.

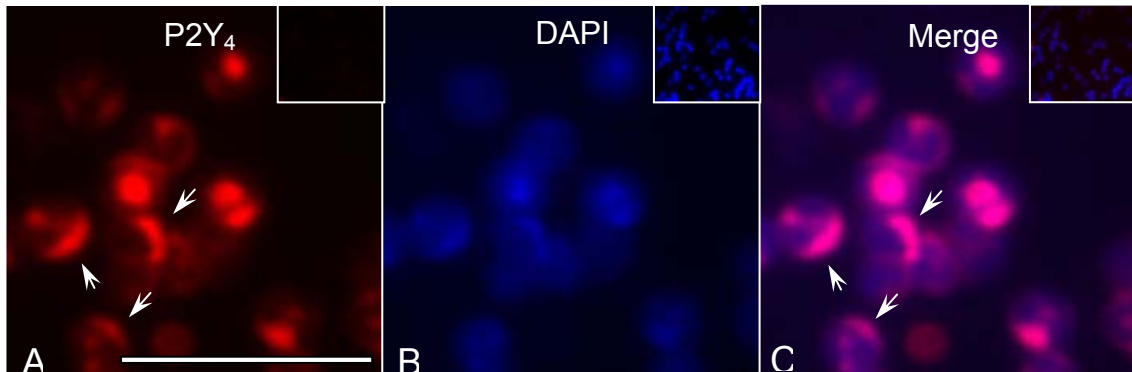


Figura 4.3.6 : Imunoreatividade do receptor P2Y₄. (A) eosinófilos imunomarcados com anticorpo anti-P2Y₄ ligado ao anticorpo secundário conjugado ao fluorocromo Alexa, em vermelho. Em B eosinófilos com DAPI que marca o núcleo em azul. (C) representa as Figuras (A) e (B) sobrepostas mostrando em conjunto o núcleo e a imunomarcagem para o receptor P2Y₄. Os insertos representam experimentos controles sem o anticorpo primário anti-P2Y₄, para mostrar que não existe marcação inespecífica, da mesma forma o inserto em (A) mostra o experimento com o anticorpo secundário, (B) marcação de núcleo com o DAPI, (C) sobreposição dos insertos em (A) e (B). Setas mostram uma possível polarização da marcação do receptor P2Y₄. Barra de calibração de 5 μ m. Imagens representativas de 2 experimentos independentes.

4.4 – Efeito de receptores P2 na migração de eosinófilos *in vitro*

Após a caracterização dos receptores P2 pela primeira vez em eosinófilos de rato, fomos investigar um possível papel funcional desses receptores. Começamos a investigar a quimiotaxia de eosinófilos, com base em informação da literatura, que mostravam a participação de P2 neste fenômeno, em diversos tipos celulares, como no caso de microglia (Wu et al., 2007, Ohsawa et al., 2007), neutrófilos (Chen et al., 2006), células dendríticas (Idzko et al., 2002), mastócitos (McCloskey et al., 1999) e eosinófilos humanos (Idzko et al., 2001). Verificamos a participação dos receptores P2 na migração de

eosinófilos de rato, *in vitro*, utilizando câmaras de transwell. Os ensaios de migração com períodos de incubação de 1 ou 2 horas podem ser observados nas Figura 4.4 A e B, respectivamente.

No experimento com incubação de 1h foi possível observarmos que todos os agonistas (ATPgS, UTP e ATP) induziram significativamente a migração, o que sugere uma possível participação de receptores P2Y, uma vez que o UTP ativa, principalmente, esses receptores. Além disso os dois bloqueadores gerais de receptores P2, a suramina ($p < 0.01$) e o PPADS ($p < 0.5$), bloquearam de forma significativa a migração induzida pelo ATP.

Já para o experimento realizado com 2 horas de incubação somente o ATP ($p < 0,01$) e o UTP ($p < 0,5$) foram capazes de induzir significativamente a migração. Contudo, outros agonistas mostraram uma tendência a aumentar a migração. E somente a suramina ($p < 0,05$) teve um efeito inibitório com relação a migração induzida pelo ATP (Figura 4.4 B).

Esses experimentos indicam que nucleotídeos induziram a migração de eosinófilos via receptores P2 e que antagonistas dos receptores bloquearam essa migração.

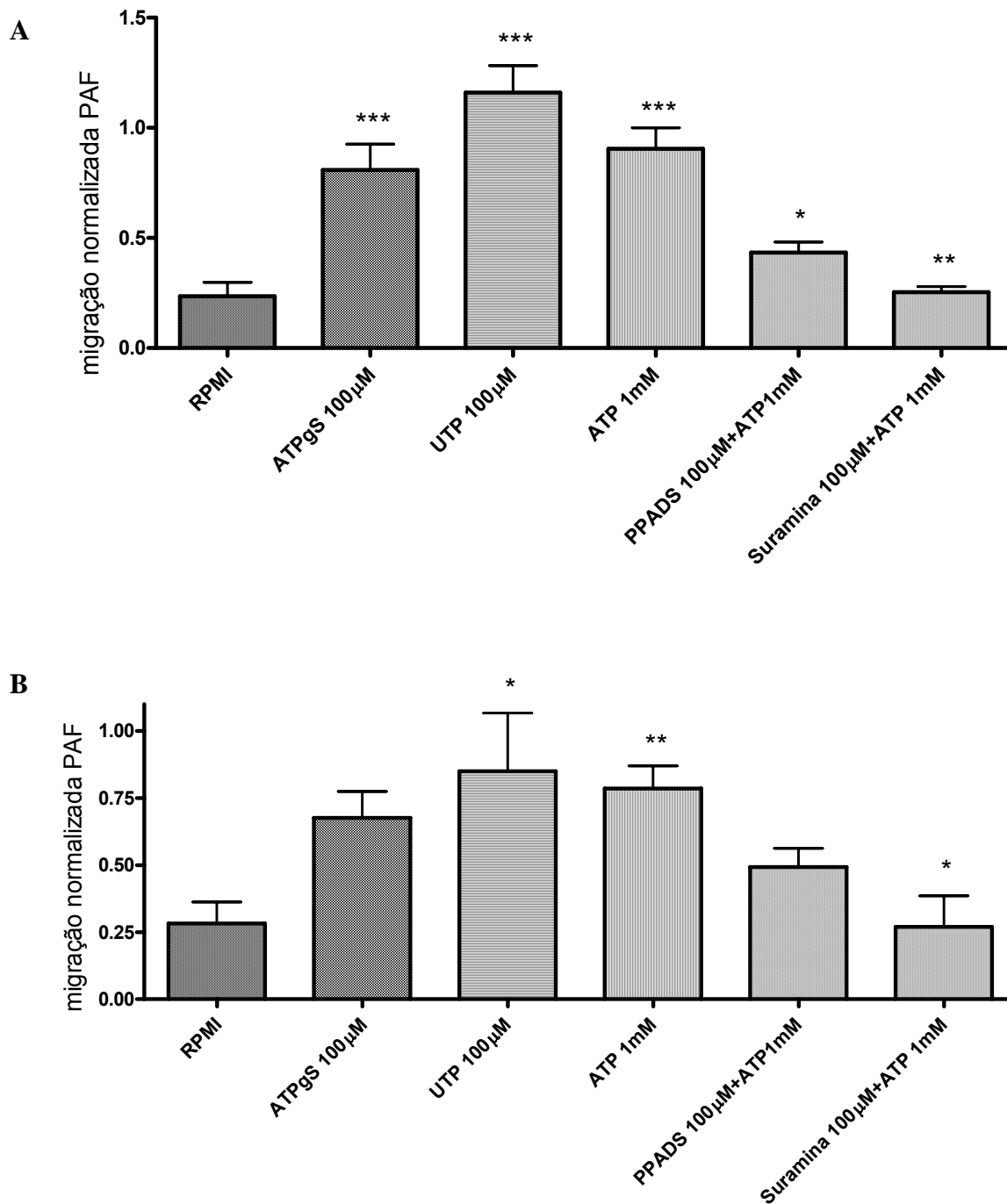
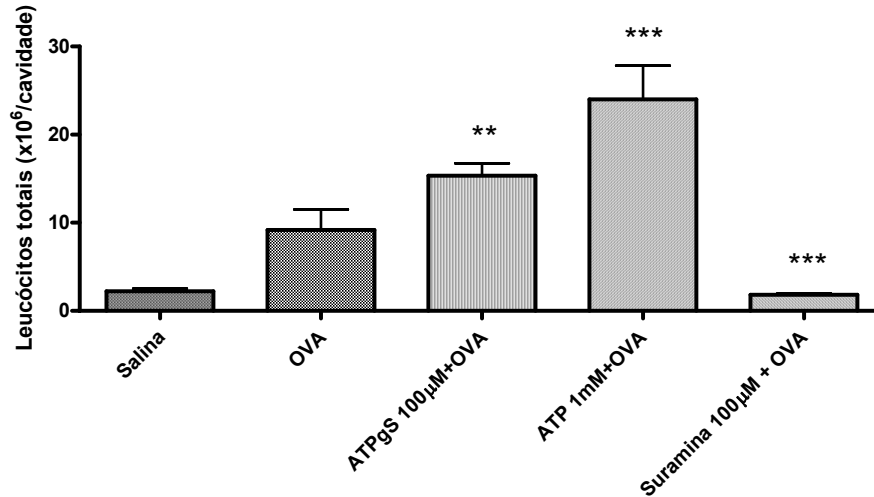


Figura 4.4: Ensaio de migração de eosinófilos *in vitro*. Eosinófilos isolados foram colocados para migrar em *transwell* conforme descrito em Materiais e Métodos. Após 1h (A) ou 2h (B) de incubação os eosinófilos contidos na parte de baixo do inserto eram contados em câmara de Neubaer. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$. Barras representam média \pm erro padrão. Gráficos representam a totalização de 4 experimentos independentes. Os resultados foram normalizados pela migração do PAF (fator de ativação plaquetária).

1.5 – Estudo de receptores P2 no modelo de pleurisia alérgica

Uma vez verificado que nos experimentos *in vitro* os agonistas aumentaram a migração e que os bloqueadores utilizados anulavam esse efeito, fomos verificar se um efeito similar ocorreria *in vivo*. Para tal, fizemos experimentos de pleurisia alérgica. Nesse modelo os animais foram sensibilizados (OVA) e após 14 dias, eles eram tratados com agonistas e antagonistas 1h antes do desafio (OVA) para posterior contagem das células totais e dos eosinófilos (Figura 4.5 A e B). Nesse experimento os animais foram tratados com ATP, ATP γ S, suramina. Como podemos observar o antagonista suramina, foi capaz de diminuir significativamente o número de células totais (aproximadamente 80%) assim como o de eosinófilos na cavidade pleural (aproximadamente 70%). Além disso, os agonistas ATP e ATP γ S foram capazes de aumentar a migração sugerindo que nucleotídeos extracelulares são capazes de modular a migração não só de eosinófilos mas também, de outras células para o sítio de inflamação.

A



B

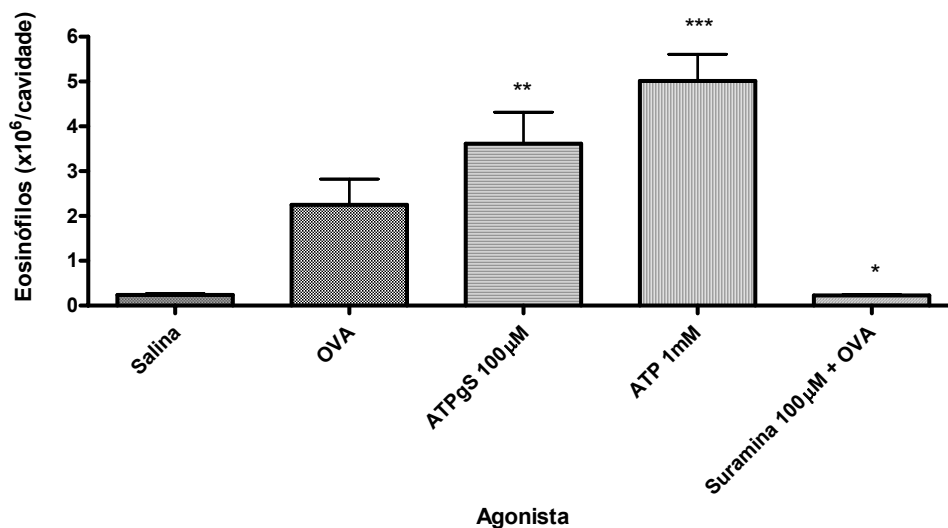


Figura 4,5: Ensaio de migração de eosinófilos *in vivo*. Experimentos de pleurisia foram feitos com sensibilização dos animais com OVA (conforme descrito em Materiais e Métodos). Após os períodos de sensibilização e desafio seguido de tratamento foram feitos os lavados da cavidade torácica e a contagem de células totais (A) e diferencial de eosinófilos (B). n=1, com grupo de 4 animais. As barras representam a média±erro padrão. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$. Os agonistas foram comparados contra o controle salina e a suramina contra a ovoalbumina.

5- DISCUSSÃO

5.1 – Caracterização dos receptores P2X

Neste trabalho, investigamos pela primeira vez a presença de receptores P2 em eosinófilos de rato e estudamos uma possível função desses receptores.

Nesse sentido, realizamos, primeiramente, experimentos de eletrofisiologia com a aplicação de diversos agonistas para podermos detectar a presença de receptores ionotrópicos. Em seguida, obtivemos ordens de potência relativa de diferentes agonistas de receptores P2X e comparamos nossos dados com os já descritos na literatura. Nossos resultados demonstram que a ordem de potência obtida nesses experimentos foi: ATP > ATP γ S > 2meSATP > ADP > $\alpha\beta$ meATP > $\beta\gamma$ meATP > BzATP > UTP > UDP > cAMP. Essa ordem de potência nos leva a sugerir que os eosinófilos expressam os receptores P2X₂ e P2X₄, sendo confirmado pelos ensaios de imunofluorescência. Porém, a presença de receptores P2X₁ e P2X₃ não pode ser descartada, devido à obtenção de registros de correntes característicos desses receptores, que são receptores de rápida abertura e rápido fechamento (Tabela 3.1), como o observado para aplicação de $\alpha\beta$ meATP e $\beta\gamma$ meATP. Nesse sentido, os experimentos de imunofluorescências auxiliavam na demonstração da presença do receptor P2X₁. Além disso, detectamos a presença dos receptores P2X₂, P2X₄ através da técnica de imunofluorescência.

O receptor P2X₅ foi excluído por ter uma equipotência entre três agonistas, o ATP, o ATP γ S e o 2meSATP (Burnstock, 2007). Nossos

resultados demonstram uma diferença significativa entre a amplitude das correntes obtidas dentre os agonistas. A presença do receptor P2X₆, que não forma homodímeros, também não pode ser descartada, já que o perfil das correntes obtidas em receptores heteroméricos P2X_{2/6} e P2X_{4/6} são muito similares a dos registros eletrofisiológicos dos receptores homoméricos P2X₂ e P2X₄. Não foi verificada a presença do receptor P2X₆ por experimentos de imunofluorescência (Gever et al., 2006) uma vez que, não possuíamos anticorpos para fazer tal experimento.

O receptor P2X₇ não pode ser excluído da lista de receptores expressos em eosinófilos, pois obtivemos respostas para o BzATP e essas células poderiam expressá-lo em número reduzido na membrana, já que a ordem de potência não foi compatível com a expressão majoritária desse receptor na membrana. Por outro lado, as correntes ativadas pelo BzATP possuem uma condutância similar a correntes registradas na configuração *whole-cell* do receptor P2X₇ transfectado em células HEK-293, uma linhagem de células embrionárias de rim humano, que é em torno de 5,5 nA, enquanto que os nossos registros estão em torno de 5 nA (Chessell et al., 1998). Cabe ressaltar que a configuração eletrofisiológica utilizada, *whole-cell*, pode gerar possíveis contaminantes na corrente registrada, uma vez que, são registrados todos os canais abertos e *presentes* na membrana após ativação. Acreditamos que experimentos adicionais utilizando antagonistas como o KN-62 que bloqueia o receptor P2X₇ na faixa de nano molar e o ATP oxidado que é um bloqueador irreversível desse receptor, para uma melhor caracterização eletrofisiológica do P2X₇ em eosinófilos.

Na literatura é descrita a presença dos receptores P2 em eosinófilos humanos tanto em ensaios funcionais como por técnicas de biologia molecular (Ferrari et al., 2000, Idzko et al., 2003, Idzko et al., 2001, Mohanty et al., 2001). Nesse trabalho realizamos experimentos de imunofluorescência, utilizando anticorpos primários de coelhos para os receptores P2X₁, P2X₂, P2X₄ e P2X₇. Nossos dados foram semelhantes aos observados em eosinófilos humanos, para receptores P2, uma vez que resultados obtidos por RT-PCR evidenciaram a presença do RNAm dos receptores P2X₁, P2X₂, P2X₄, assim como nossos resultados utilizando a técnica de imunofluorescência. Porém, nossos dados mostraram a presença de uma fraca marcação fluorescente para o receptor P2X₇. Em eosinófilos humanos, a presença desse receptor só foi vista quando as células de pacientes com histórico de asma ou alergia moderada eram colocadas em cultura com IFN- γ (Mohanty et al., 2001), demonstrando que dependendo do estado de ativação, essas células podem expressar ou não o receptor P2X₇. Ao contrário de Mohanty e colaboradores, Ferrari utilizando células de doadores saudáveis observou a presença do receptor P2X₇ nos eosinófilos por RT-PCR. Através de experimentos de análise de variação de cálcio intracelular demonstrou funcionalmente que o aumento de cálcio induzido pelo BzATP e ATP eram bloqueados pelo KN-62, um potente bloqueador de receptor P2X₇ (Ferrari et al., 2000b).

Nos experimentos de imunofluorescência para receptores P2, foi possível observarmos uma polarização dos receptores na membrana celular (setas, Figuras 4.3-4.3.6, setas). Porém, o mesmo não foi visto para o receptor P2X₇, talvez pelo fato do receptor estar disperso homoganeamente na membrana ou no citoplasma, já que nosso anticorpo tinha como alvo a parte

intracelular do receptor. Além disso uma possível reação cruzada pode ter ocorrido, apesar de não vermos o mesmo efeito nos controles. Ainda existe a possibilidade de haver baixa expressão desse receptor, pois os eosinófilos utilizados são eosinófilos não-ativados. Certamente, novos experimentos com citocentrifugados e com maior quantidade de células serão necessários para verificar a presença desse receptor na membrana. Para podermos comparar melhor as similaridades dos dados existentes na literatura com relação à expressão de receptores P2 em eosinófilos de rato e humano contruímos um quadro (Quadro 5.1).

Expressão dos receptores P2 em eosinófilos	
Rato	Humano
P2X₁ (Imunof)	P2X₁ (RT-PCR)
P2X₂ (Eletrof + Imunof)	_____
P2X₄ (Eletrof + Imunof)	P2X₄ (RT-PCR)
_____	P2X₅ (RT-PCR)
_____	P2X₇ (RT-PCR)
P2Y₁ (Imunof)	P2Y₁ (RT-PCR)
P2Y₂ (Eletrof + Imunof)	P2Y₂ (RT-PCR)
P2Y₄ (Eletrof + Imunof)	P2Y₄ (RT-PCR)
_____	P2Y₆ (RT-PCR)
P2Y₁₁ (Eletrof)	P2Y₁₁ (RT-PCR)

Quadro 5.1 – Comparação entre os receptores descritos em ratos e humanos. O quadro mostra o subtipo de receptor expresso e entre parentes a técnica de detecção do receptor. Os receptores não citados não foram estudados ou não foram detectados. Os dados obtidos por eletrofisiologia foram indicados como “eletrof” e os obtidos por imunofluorescência indicados como “imunof”.

5.2 – Caracterização dos receptores P2Y

Dando prosseguimento ao nosso estudo de caracterização de receptores P2 em eosinófilos de rato, avaliamos por microfluorimetria o perfil de receptores P2Y presentes nos eosinófilos. Nesses experimentos utilizamos campos com pelo menos 30 células, pois os eosinófilos não aderiam as lâminulas utilizadas no sistema de microfluorimetria e a medida que o agonista era aplicado, as células poderiam sair do campo escolhido para a análise da variação do cálcio intracelular. Após a aplicação dos agonistas foi verificado se o número de células permanecia inalterado. Somente os experimentos onde a quantidade de células permanecia pouco alterada eram aceitos, mesmo assim obtivemos grande variabilidade com relação à amplitude dos registros de cálcio. Contudo, os registros utilizados para o estabelecimento da ordem de potência, pela média de amplitude máxima dos registros, sempre tinham o mesmo perfil bifásico com um componente lento característico de receptores P2Y. Dessa forma, a ordem de potência obtida pela média de todos experimentos realizados foi: UTP > ATP γ S > ADP > UDP > ATP > BzATP > 2meSATP > $\alpha\beta$ meATP > cAMP > Adenosina > $\beta\gamma$ meATP, sugerindo uma possível expressão dos receptores P2Y₂, P2Y₆ e P2Y₁₁. A expressão de outros receptores não pôde ser excluída pela falta de agonistas mais específicos disponíveis atualmente no mercado. Porém com a realização dos experimentos de imunofluorescência foi confirmada a presença do P2Y₂. Além disso, foi observado através desses experimentos a presença dos receptores P2Y₁ e P2Y₄ (Quadro 5.1).

Nossos dados de cálcio corroboram, parcialmente, os dados de Mohanty e colaboradores, que obtiveram como agonistas mais potentes o UTP seguido pelo ATP (Mohanty et al., 2001a). Testamos ainda o ATP γ S, que foi o terceiro agonista mais potente, enquanto que Mohanty e colaboradores testaram o ITP. Contudo, os dados publicados por esse grupo mostraram outros agonistas como sendo agonistas fracos. Nesse mesmo trabalho, experimentos de RT-PCR demonstram a presença dos receptores P2Y₁ e P2Y₂. Dados corroborados por nossos resultados de imunofluorescência. Demonstramos ainda, que o ADP, $\alpha\beta$ me ATP e o UDP também apresentaram uma potência considerável sobre os eosinófilos. Por outro lado, o artigo publicado por Ferrari e colaboradores mostrou que o ATP foi o agonista mais potente e o UTP o segundo mais potente (Ferrari et al., 2000a). Nesse trabalho, os autores demonstram a presença de receptores P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆ e P2Y₁₁. O dado que diferencia os dois trabalhos é que Ferrari e colaboradores utilizaram eosinófilos humanos de doadores saudáveis e Mohanty e colaboradores, utilizaram eosinófilos de doadores com histórico de asma moderada. Esse fato pode ter alterado o perfil dos receptores expressos nas células. É sabido que em indivíduos asmáticos as células estão ativadas, fato que não ocorre nas células de indivíduos saudáveis (Kariyawasam and Robinson, 2006). Ainda em 2001, foi demonstrado por Idzko que a ordem de potência relativa dos agonistas, utilizando doadores saudáveis, foi UTP > ATP γ S > ATP > ADP > $\alpha\beta$ meATP > 2meSATP > CTP > BzATP (Idzko et al., 2001a). Esses resultados também corroboram, em parte, os nossos resultados, uma vez que o UTP foi o mais potente, enquanto que os outros agonistas tiveram efeito pouco conclusivo.

5.3 – Estudo do possível papel funcional dos receptores P2 na migração *in vitro*

A partir da caracterização funcional dos receptores P2, fomos investigar um possível papel funcional desses receptores em eosinófilos de rato na migração celular, uma vez que já é descrito em outras células que os receptores P2 podem aumentar a migração. Resolvemos assim, utilizar a câmara de *transwell* para verificar *in vitro* a participação dos receptores P2 na migração. Nossos resultados em câmara de migração em *transwell* mostraram que o ATP induz a migração, sendo estatisticamente significativo em relação ao controle (RPMI). Nos experimentos com incubação de 1h e de 2h o controle positivo, o PAF, um indutor de migração em eosinófilos, é menos potente que o UTP, fato que não era esperado já que o UTP, como outros nucleotídeos, pode ser clivado no meio extracelular por ectonucleotidases.

Recentemente, Chen e colaboradores (2006) também demonstraram que neutrófilos podem migrar frente a um gradiente de nucleotídeos [ATP e ATP γ S], porém na presença de um estímulo adicional com N-formil-Met-Leu-Phe. Estes autores verificaram a participação de receptores P2Y₂ e A₃. Dessa forma, o ATP liberado na presença de N-formil-Met-Leu-Phe ativa os receptores P2Y₂. Porém, de acordo com os autores ectonucleotidases presentes no meio extracelular converteriam esse ATP em adenosina que, então, ativaria o receptor A₃ para que ele amplificasse o sinal e desse continuidade ao processo de migração. Nesse trabalho o efeito foi inibido em

80% pela suramina, um antagonista geral dos receptores P2, porém KN-62 e ATP oxidado não tiveram o mesmo efeito (Chen et al., 2006a).

Na literatura é descrita a capacidade de microglias de migrar em uma câmara de Dunn, câmara de migração horizontal onde se pode acompanhar a migração ao microscópio e registrar os resultados minuto a minuto através de uma câmera acoplada. Quando aplicado o ATP e o ADP, mas não o UTP, as microglias se deslocam na câmara de Dunn. Nesse mesmo artigo, Honda e colaboradores também utilizaram câmara de Boyden com migração vertical e verificaram que esse efeito é bloqueado pela toxina pertussis, uma toxina inibidora de proteína G, geralmente utilizada para bloqueio de receptores P2Y (Honda et al., 2001).

Mastócitos são células do sistema imunológico que também migram frente a um gradiente de nucleotídeos, McCloskey e colaboradores demonstraram em câmara de Boyden que mastócitos de medula óssea migram quando são colocados ATP, ADP ou UTP no compartimento inferior da câmara (McCloskey et al., 1999a).

5.4 – Estudo preliminar do possível papel funcional dos receptores P2 na migração *in vivo*

Ao final da caracterização de receptores P2 em eosinófilos mostrando a presença de vários subtipos e tendo em vista que a ativação dos receptores aumenta a migração *in vitro* resolvemos, então, extrapolar para um modelo *in vivo* realizando experimento preliminar de pleurisia alérgica em ratos. Os dados obtidos nesse experimento corroboraram os resultados obtidos em

transwell. O ATP γ S e o ATP aumentaram o número total de células na cavidade pleural e a suramina foi capaz de diminuir significativamente a quantidade de eosinófilos e a quantidade de células totais na cavidade pleural. Apesar de nossos resultados demonstrarem que a suramina foi estatisticamente significativa na diminuição do número de células totais e também de eosinófilos, os agonistas utilizados não foram estatisticamente significativos com relação ao aumento do número de eosinófilos em relação ao controle com ovoalbumina. Os tratamentos com os agonistas nos ensaios de pleurisia alérgica foram realizados com o desafio com ovoalbumina após 1h. Esse protocolo foi escolhido porque, geralmente, os processos inflamatórios acontecem quando um antígeno específico ou não, entra em contato com as células residentes nas mucosas ativando essas células e dando início ao processo inflamatório. Contudo, novos experimentos serão necessários para verificar inclusive se a presença somente do ATP sem ovoalbumina seria capaz de induzir a migração de eosinófilos e/ou outras células para a cavidade pleural. Além disso, realizaremos experimentos de inflamação pulmonar seguido de lavado bronco-alveolar para verificar se o que foi visto na cavidade pleural acontece também nos pulmões. Testaremos também outros antagonistas de receptores P2, para verificarmos quais os receptores estariam envolvidos nesse efeito.

Nesse contexto, os dados obtidos por Idzko e colaboradores corroboram nossos dados, já que utilizando um modelo de inflamação pulmonar em camundongos, demonstraram que tanto a suramina como a apyrase, enzima que degrada ATP, foram eficazes na diminuição, tanto do número de células totais como de macrófagos, neutrófilos, linfócitos e

eosinófilos em camundongos desafiados com ovalbumina. É descrito ainda que o ATP γ S aumenta a quantidade neutrófilos, linfócitos e eosinófilos (Idzko et al., 2007).

Outro dado similar foi obtido por Greenberg e colaboradores (1997). Os autores verificaram que o agonista 2meSATP foi capaz de aumentar o número total de células e de polimorfonucleares no lavado bronco-alveolar. Porém, os autores utilizaram um pré-tratamento com PBS seguido do tratamento com o agonista em conjunto com LPS (lipopolisacarídeo), para posterior lavagem bronco-alveolar. Cabe ressaltar que, o agonista 2meSATP isolado não aumentou nem a quantidade total de células, nem o de polimorfonucleares. Outro protocolo usado no mesmo trabalho foi o pré-tratamento com DETC (dietilditiocarbamato) seguido de 2meSATP, em conjunto com o LPS, que também foi capaz de aumentar a quantidade de polimorfonucleares no lavado bronco-alveolar (Greenberg et al., 1997).

Nossos dados, em conjunto, demonstram a presença de receptores P2 funcionais em eosinófilos de rato. Constatamos a presença de receptores P2X através de ensaios de eletrofisiologia e imunofluorescência e de receptores P2Y através da microfluorimetria e imunofluorescência. Além disso, nossos dados sugerem que os receptores P2 possam estar envolvidos na migração dos eosinófilos, tanto *in vitro* como *in vivo*. Tais resultados seriam fisiologicamente viáveis, já que no microambiente onde os eosinófilos estão inseridos, pode ocorrer desgranulação quando ativados por um antígeno causando a morte de células próximas. Esse fato levaria ao extravasamento do ATP intracelular para o meio extracelular recrutando mais eosinófilos para

aquele sítio de inflamação, dando início a uma retroalimentação positiva que é prejudicial ao indivíduo. Nesse contexto, criamos um esquema para ilustrar uma hipótese gerada a partir dos dados existentes na literatura e os dados aqui apresentados.

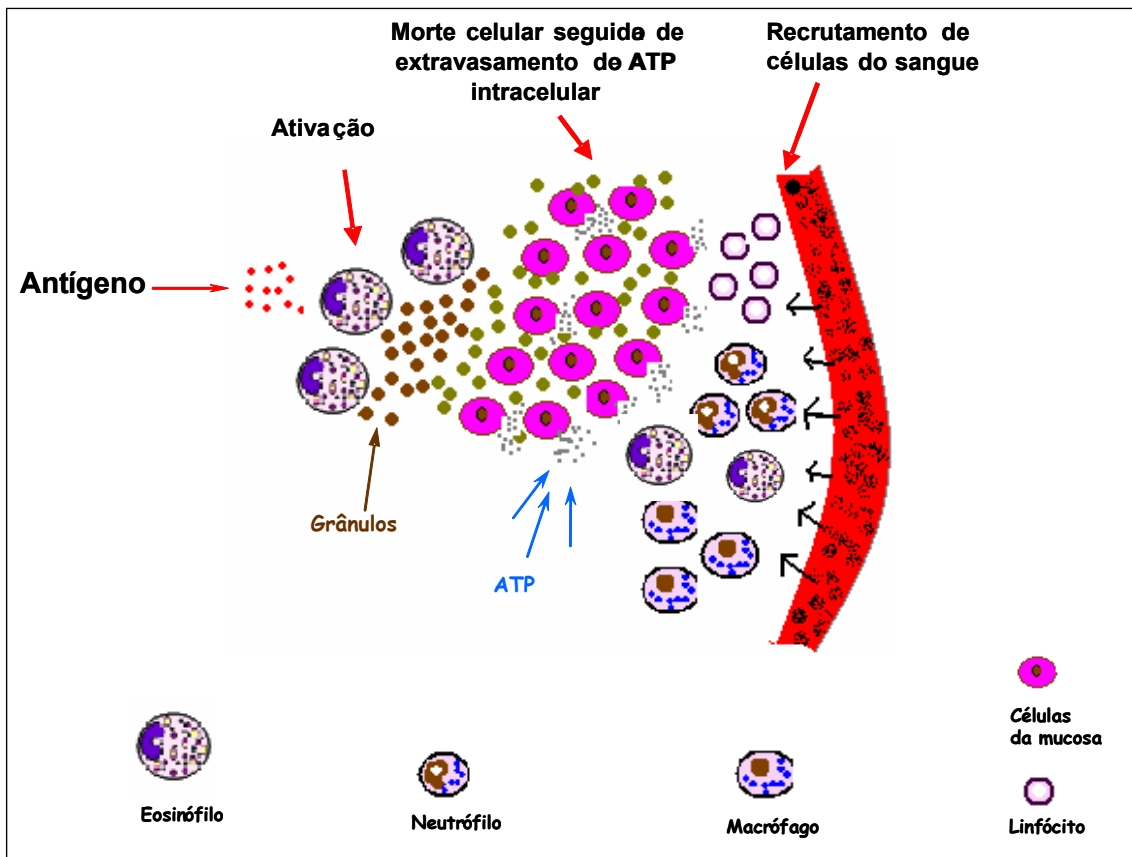


Figura 5.1 – Hipótese sobre migração de eosinófilos. Nesse esquema mostramos um antígeno que chega a mucosa do indivíduo, onde ativa eosinófilos, que por sua vez tentam eliminar o fator ativador através da desgranulação. Após a desgranulação os mediadores tóxicos causam morte das células do local fazendo com que o ATP intracelular extravase para o meio extracelular. Esse ATP causaria o recrutamento de outras células como: eosinófilos, macrófagos, neutrófilos e linfócitos. Esse ciclo é retroalimentado positivamente, causando cada vez mais injúria.

6.0 – CONCLUSÕES

- Os dados obtidos pelos experimentos de eletrofisiologia sugerem que pode haver a expressão dos receptores P2X₁ e/ou P2X₃, P2X₂ e P2X₄;
- Os experimentos de microfluorimetria sugerem uma possível participação dos receptores P2Y₂, P2Y₄ e P2Y₁₃;
- Os ensaios de imunofluorescência demonstraram a existência dos receptores P2X₁, P2X₂, P2X₄, P2Y₁, P2Y₂ e P2Y₄ ;
- Os resultados de quimiotaxia em *transwell* sugerem que o ATP pode aumentar a migração dos eosinófilos via receptores P2 e que esse aumento pode ser inibido por bloqueadores de receptores P2;
- Os dados do modelo de pleurisia alérgica sugerem que o ATP aumenta o número de células na cavidade após o desafio com ovoalbumina e que a suramina diminui a quantidade de células na cavidade sugerindo uma possível participação de receptores P2.

7.0 - REFERÊNCIAS

- Abbracchio M P, Burnstock G. Purinoceptors: are there families of P2X and P2Y purinoceptors? *Pharmacol Ther* 1994a; (64): 445-475.
- Abbracchio M P, Saffrey M J, Hopker V, Burnstock G. Modulation of astroglial cell proliferation by analogues of adenosine and ATP in primary cultures of rat striatum. *Neuroscience* 1994; (59): 67-76.
- Auger R, Motta I, Benihoud K, Ojcius D M, Kanellopoulos J M. A role for mitogen-activated protein kinase(Erk1/2) activation and non-selective pore formation in P2X7 receptor-mediated thymocyte death. *J Biol Chem* 2005; (280): 28142-28151.
- Bal-Price A, Moneer Z, Brown G C. Nitric oxide induces rapid, calcium-dependent release of vesicular glutamate and ATP from cultured rat astrocytes. *Glia* 2002; (40): 312-323.
- Bandeira-Melo C, Bozza P T, Weller P F. The cellular biology of eosinophil eicosanoid formation and function. *J Allergy Clin Immunol* 2002; (109): 393-400.
- Bao L, Locovei S, Dahl G. Pannexin membrane channels are mechanosensitive conduits for ATP. *FEBS Lett* 2004; (572): 65-68.
- Behm C A, Ovington K S. The role of eosinophils in parasitic helminth infections: insights from genetically modified mice. *Parasitol Today* 2000; (16): 202-209.
- Bobanovic L K, Royle S J, Murrell-Lagnado R D. P2X receptor trafficking in neurons is subunit specific. *J Neurosci* 2002; (22): 4814-4824.
- Boyce J A, Austen K F. No audible wheezing: nuggets and conundrums from mouse asthma models. *J Exp Med* 2005; (201): 1869-1873.
- Bozza P T, Yu W, Weller P F. Mechanisms of formation and function of eosinophil lipid bodies: inducible intracellular sites involved in arachidonic acid metabolism. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1997; (92 Suppl 2): 135-140.
- Bulanova E, Budagian V, Orinska Z, Hein M, Petersen F, Thon L, Adam D, Bulfone-Paus S. Extracellular ATP induces cytokine expression and apoptosis through P2X7 receptor in murine mast cells. *J Immunol* 2005; (174): 3880-3890.
- Burnstock G. Purinergic receptors. *J Theor Biol* 1976; (62): 491-503.
- Burnstock G. A basis for distinguishing two types of purinergic receptor. In: *Cell Membrane Receptors for Drugs and Hormones: A Multidisciplinary Approach*. (Eds. Straub RW, Bolis L). New York: Raven Press, 1978; 107-118.
- Burnstock G, Kennedy C. Is there a basis for distinguishing two types of P2-purinoceptor? *Gen Pharmacol* 1985; (16): 433-440.

- Burnstock G. Current status of P2X receptors: distribution and pathophysiological roles. *Proc West Pharmacol Soc* 1999; (42): 119-121.
- Burnstock G, Knight G E. Cellular distribution and functions of P2 receptor subtypes in different systems. *Int Rev Cytol* 2004; (240): 31-304.
- Burnstock G. Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission. *Physiol Rev* 2007; (87): 659-797.
- Butterworth A E. The eosinophil and its role in immunity to helminth infection. *Curr Top Microbiol Immunol* 1977; (77): 127-168.
- Chen Y, Corriden R, Inoue Y, Yip L, Hashiguchi N, Zinkernagel A, Nizet V, Insel P A, Junger W G. ATP release guides neutrophil chemotaxis via P2Y2 and A3 receptors. *Science* 2006a; (314): 1792-1795.
- Chessell I P, Michel A D, Humphrey P P. Effects of antagonists at the human recombinant P2X7 receptor. *Br J Pharmacol* 1998; (124): 1314-1320.
- Cockayne D A, Dunn P M, Zhong Y, Rong W, Hamilton S G, Knight G E, Ruan H Z, Ma B, Yip P, Nunn P, McMahon S B, Burnstock G, Ford A P. P2X2 knockout mice and P2X2/P2X3 double knockout mice reveal a role for the P2X2 receptor subunit in mediating multiple sensory effects of ATP. *J Physiol* 2005; (567): 621-639.
- Corry D B, Folkesson H G, Warnock M L, Erle D J, Matthay M A, Wiener-Kronish J P, Locksley R M. Interleukin 4, but not interleukin 5 or eosinophils, is required in a murine model of acute airway hyperreactivity. *J Exp Med* 1996; (183): 109-117.
- Cotrina M L, Lin J H, ves-Rodrigues A, Liu S, Li J, zmi-Ghadimi H, Kang J, Naus C C, Nedergaard M. Connexins regulate calcium signaling by controlling ATP release. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; (95): 15735-15740.
- Coutinho-Silva R, Alves L A, Savino W, Persechini P M. A cation non-selective channel induced by extracellular ATP in macrophages and phagocytic cells of the thymic reticulum. *Biochim Biophys Acta* 1996; (1278): 125-130.
- Coutinho-Silva R, Persechini P M, Bisaggio R D, Perfettini J L, Neto A C, Kanellopoulos J M, Motta-Ly I, utry-Varsat A, Ojcius D M. P2Z/P2X7 receptor-dependent apoptosis of dendritic cells. *Am J Physiol* 1999; (276): C1139-C1147.
- Di V F, Falzoni S, Chiozzi P, Sanz J M, Ferrari D, Buell G N. ATP receptors and giant cell formation. *J Leukoc Biol* 1999; (66): 723-726.
- Di V F, Ferrari D, Falzoni S, Chiozzi P, Munerati M, Steinberg T H, Baricordi O R. P2 purinoceptors in the immune system. *Ciba Found Symp* 1996; (198): 290-302.
- Drury A N. The physiological activity of adenine compounds with especial reference to their action upon the mammalian heart. *J Physiol* 1929; (68): 213-237.

- Dunn P M, Zhong Y, Burnstock G. P2X receptors in peripheral neurons. *Prog Neurobiol* 2001; (65): 107-134.
- Emmelin N, Feldberg W. The smooth muscle contracting effects of various substances supposed to act on nervous structures in the intestinal wall. *J Physiol* 1947; (106): 482-502.
- Erb L, Liao Z, Seye C I, Weisman G A. P2 receptors: intracellular signaling. *Pflugers Arch* 2006a; (452): 552-562.
- Faria R X, Defarias F P, Alves L A. Are second messengers crucial for opening the pore associated with P2X7 receptor? *Am J Physiol Cell Physiol* 2005; (288): C260-C271.
- Feng C, Mery A G, Beller E M, Favot C, Boyce J A. Adenine nucleotides inhibit cytokine generation by human mast cells through a Gs-coupled receptor. *J Immunol* 2004; (173): 7539-7547.
- Ferrari D, Idzko M, Dichmann S, Purlis D, Virchow C, Norgauer J, Chiozzi P, Di V F, Luttmann W. P2 purinergic receptors of human eosinophils: characterization and coupling to oxygen radical production. *FEBS Lett* 2000a; (486): 217-224.
- Foster P S, Hogan S P, Ramsay A J, Matthaie K I, Young I G. Interleukin 5 deficiency abolishes eosinophilia, airways hyperreactivity, and lung damage in a mouse asthma model. *J Exp Med* 1996a; (183): 195-201.
- Foster P S, Mould A W, Yang M, Mackenzie J, Mattes J, Hogan S P, Mahalingam S, McKenzie A N, Rothenberg M E, Young I G, Matthaie K I, Webb D C. Elemental signals regulating eosinophil accumulation in the lung. *Immunol Rev* 2001; (179): 173-181.
- Fredholm B B, Abbracchio M P, Burnstock G, Daly J W, Harden T K, Jacobson K A, Leff P, Williams M. Nomenclature and classification of purinoceptors. *Pharmacol Rev* 1994; (46): 143-156.
- Gartner I. Separation of human eosinophils in density gradients of polyvinylpyrrolidone-coated silica gel (Percoll). *Immunology* 1980; (40): 133-136.
- Gever J R, Cockayne D A, Dillon M P, Burnstock G, Ford A P. Pharmacology of P2X channels. *Pflugers Arch* 2006; (452): 513-537.
- Gillespie JH. The biological significance of the linkages in adenosine triphosphoric acid. *J Physiol* 80, 345-349. 1934.
Ref Type: Generic
- Ginsel L A, Onderwater J J, Fransen J A, Verhoeven A J, Roos D. Localization of the low-Mr subunit of cytochrome b558 in human blood phagocytes by immunoelectron microscopy. *Blood* 1990; (76): 2105-2116.

- Greenberg S S, Zhao X, Wang J F, Hua L, Ouyang J. cAMP and purinergic P2y receptors upregulate and enhance inducible NO synthase mRNA and protein in vivo. *Am J Physiol* 1997; (273): L967-L979.
- Guo C, Masin M, Qureshi O S, Murrell-Lagnado R D. Evidence for functional P2X4 / P2X7 heteromeric receptors. *Mol Pharmacol* 2007.
- Haines W R, Torres G E, Voigt M M, Egan T M. Properties of the novel ATP-gated ionotropic receptor composed of the P2X(1) and P2X(5) isoforms. *Mol Pharmacol* 1999; (56): 720-727.
- Hamelmann E, Gelfand E W. IL-5-induced airway eosinophilia--the key to asthma? *Immunol Rev* 2001; (179): 182-191.
- Hamelmann E, Oshiba A, Schwarze J, Bradley K, Loader J, Larsen G L, Gelfand E W. Allergen-specific IgE and IL-5 are essential for the development of airway hyperresponsiveness. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1997; (16): 674-682.
- Hasko G, Kuhel D G, Salzman A L, Szabo C. ATP suppression of interleukin-12 and tumour necrosis factor-alpha release from macrophages. *Br J Pharmacol* 2000; (129): 909-914.
- Hisadome K, Koyama T, Kimura C, Droogmans G, Ito Y, Oike M. Volume-regulated anion channels serve as an auto/paracrine nucleotide release pathway in aortic endothelial cells. *J Gen Physiol* 2002; (119): 511-520.
- Hogan S P, Matthaei K I, Young J M, Koskinen A, Young I G, Foster P S. A novel T cell-regulated mechanism modulating allergen-induced airways hyperreactivity in BALB/c mice independently of IL-4 and IL-5. *J Immunol* 1998; (161): 1501-1509.
- Hogan S P, Mould A, Kikutani H, Ramsay A J, Foster P S. Aeroallergen-induced eosinophilic inflammation, lung damage, and airways hyperreactivity in mice can occur independently of IL-4 and allergen-specific immunoglobulins. *J Clin Invest* 1997; (99): 1329-1339.
- Honda S, Sasaki Y, Ohsawa K, Imai Y, Nakamura Y, Inoue K, Kohsaka S. Extracellular ATP or ADP induce chemotaxis of cultured microglia through Gi/o-coupled P2Y receptors. *J Neurosci* 2001; (21): 1975-1982.
- Idzko M, Dichmann S, Ferrari D, Di V F, la S A, Girolomoni G, Panther E, Norgauer J. Nucleotides induce chemotaxis and actin polymerization in immature but not mature human dendritic cells via activation of pertussis toxin-sensitive P2y receptors. *Blood* 2002a; (100): 925-932.
- Idzko M, Dichmann S, Panther E, Ferrari D, Herouy Y, Virchow C, Jr., Luttmann W, Di V F, Norgauer J. Functional characterization of P2Y and P2X receptors in human eosinophils. *J Cell Physiol* 2001a; (188): 329-336.
- Idzko M, Hammad H, van N M, Kool M, Willart M A, Muskens F, Hoogsteden H C, Luttmann W, Ferrari D, Di V F, Virchow J C, Jr., Lambrecht B N. Extracellular ATP

- triggers and maintains asthmatic airway inflammation by activating dendritic cells. *Nat Med* 2007; (13): 913-919.
- Idzko M, Panther E, Bremer H C, Sorichter S, Luttmann W, Virchow C J, Jr., Di V F, Herouy Y, Norgauer J, Ferrari D. Stimulation of P2 purinergic receptors induces the release of eosinophil cationic protein and interleukin-8 from human eosinophils. *Br J Pharmacol* 2003; (138): 1244-1250.
- Jacoby D B, Gleich G J, Fryer A D. Human eosinophil major basic protein is an endogenous allosteric antagonist at the inhibitory muscarinic M2 receptor. *J Clin Invest* 1993; (91): 1314-1318.
- Jamieson G P, Snook M B, Thurlow P J, Wiley J S. Extracellular ATP causes loss of L-selectin from human lymphocytes via occupancy of P2Z purinoceptors. *J Cell Physiol* 1996; (166): 637-642.
- Kariyawasam H H, Robinson D S. The eosinophil: the cell and its weapons, the cytokines, its locations. *Semin Respir Crit Care Med* 2006; (27): 117-127.
- Khakh B S, Burnstock G, Kennedy C, King B F, North R A, Seguela P, Voigt M, Humphrey P P. International union of pharmacology. XXIV. Current status of the nomenclature and properties of P2X receptors and their subunits. *Pharmacol Rev* 2001; (53): 107-118.
- King B F, Townsend-Nicholson A, Wildman S S, Thomas T, Spyer K M, Burnstock G. Coexpression of rat P2X2 and P2X6 subunits in *Xenopus* oocytes. *J Neurosci* 2000; (20): 4871-4877.
- Lepine S, Le Stunff H, Lakatos B, Sulpice J C, Giraud F. ATP-induced apoptosis of thymocytes is mediated by activation of P2X7 receptor and involves de novo ceramide synthesis and mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta-Molecular and Cell Biology of Lipids* 2006; (1761): 73-82.
- Maroto R, Hamill O P. Brefeldin A block of integrin-dependent mechanosensitive ATP release from *Xenopus* oocytes reveals a novel mechanism of mechanotransduction. *J Biol Chem* 2001; (276): 23867-23872.
- Mattes J, Yang M, Mahalingam S, Kuehr J, Webb D C, Simson L, Hogan S P, Koskinen A, McKenzie A N, Dent L A, Rothenberg M E, Matthaei K I, Young I G, Foster P S. Intrinsic defect in T cell production of interleukin (IL)-13 in the absence of both IL-5 and eotaxin precludes the development of eosinophilia and airways hyperreactivity in experimental asthma. *J Exp Med* 2002; (195): 1433-1444.
- McCloskey M A, Fan Y, Luther S. Chemotaxis of rat mast cells toward adenine nucleotides. *J Immunol* 1999a; (163): 970-977.
- Mengelers H J, Maikoe T, Brinkman L, Hooibrink B, Lammers J W, Koenderman L. Immunophenotyping of eosinophils recovered from blood and BAL of allergic asthmatics. *Am J Respir Crit Care Med* 1994; (149): 345-351.

- Miller J S, Cervenka T, Lund J, Okazaki I J, Moss J. Purine metabolites suppress proliferation of human NK cells through a lineage-specific purine receptor. *J Immunol* 1999; (162): 7376-7382.
- Mohanty J G, Raible D G, McDermott L J, Pelleg A, Schulman E S. Effects of purine and pyrimidine nucleotides on intracellular Ca²⁺ in human eosinophils: activation of purinergic P2Y receptors. *J Allergy Clin Immunol* 2001a; (107): 849-855.
- Nicke A, Baumert H G, Rettinger J, Eichele A, Lambrecht G, Mutschler E, Schmalzing G. P2X1 and P2X3 receptors form stable trimers: a novel structural motif of ligand-gated ion channels. *EMBO J* 1998; (17): 3016-3028.
- North R A. Molecular physiology of P2X receptors. *Physiol Rev* 2002; (82): 1013-1067.
- Novak I. ATP as a signaling molecule: the exocrine focus. *News Physiol Sci* 2003; (18): 12-17.
- Ohsawa K, Irino Y, Nakamura Y, Akazawa C, Inoue K, Kohsaka S. Involvement of P2X4 and P2Y12 receptors in ATP-induced microglial chemotaxis. *Glia* 2007; (55): 604-616.
- Pelegrin P, Surprenant A. Pannexin-1 mediates large pore formation and interleukin-1beta release by the ATP-gated P2X7 receptor. *EMBO J* 2006; (25): 5071-5082.
- Ralevic V, Burnstock G. Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol Rev* 1998; (50): 413-492.
- Reisin I L, Prat A G, Abraham E H, Amara J F, Gregory R J, Ausiello D A, Cantiello H F. The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is a dual ATP and chloride channel. *J Biol Chem* 1994; (269): 20584-20591.
- Rosenberg H F, Domachowske J B. Assays for detection of RNase A superfamily ribonucleases. *Methods Mol Biol* 2001; (160): 355-362.
- Rothenberg M E. Eosinophilia. *N Engl J Med* 1998a; (338): 1592-1600.
- Rothenberg M E, Hogan S P. The eosinophil. *Annu Rev Immunol* 2006a; (24): 147-174.
- Schiebert E M. ATP release mechanisms, ATP receptors and purinergic signalling along the nephron. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2001; (28): 340-350.
- Sedgwick J B, Calhoun W J, Vrtis R F, Bates M E, McAllister P K, Busse W W. Comparison of airway and blood eosinophil function after in vivo antigen challenge. *J Immunol* 1992; (149): 3710-3718.
- Shinkai A, Komuta-Kunitomo M, Sato-Nakamura N, Anazawa H. N-terminal domain of eotaxin-3 is important for activation of CC chemokine receptor 3. *Protein Eng* 2002; (15): 923-929.

- Sluyter R, Wiley J S. Extracellular adenosine 5'-triphosphate induces a loss of CD23 from human dendritic cells via activation of P2X7 receptors. *Int Immunol* 2002; (14): 1415-1421.
- Suh B C, Kim J S, Namgung U, Ha H, Kim K T. P2X7 nucleotide receptor mediation of membrane pore formation and superoxide generation in human promyelocytes and neutrophils. *J Immunol* 2001a; (166): 6754-6763.
- Surprenant A, Schneider D A, Wilson H L, Galligan J J, North R A. Functional properties of heteromeric P2X(1/5) receptors expressed in HEK cells and excitatory junction potentials in guinea-pig submucosal arterioles. *J Auton Nerv Syst* 2000; (81): 249-263.
- Torres G E, Egan T M, Voigt M M. Hetero-oligomeric assembly of P2X receptor subunits. Specificities exist with regard to possible partners. *J Biol Chem* 1999; (274): 6653-6659.
- Torres G E, Haines W R, Egan T M, Voigt M M. Co-expression of P2X1 and P2X5 receptor subunits reveals a novel ATP-gated ion channel. *Mol Pharmacol* 1998; (54): 989-993.
- Vergheze M W, Kneisler T B, Boucheron J A. P2U agonists induce chemotaxis and actin polymerization in human neutrophils and differentiated HL60 cells. *J Biol Chem* 1996; (271): 15597-15601.
- Virginio C, MacKenzie A, Rassendren F A, North R A, Surprenant A. Pore dilation of neuronal P2X receptor channels. *Nat Neurosci* 1999; (2): 315-321.
- Wardlaw A J, Moqbel R, Kay A B. Eosinophils: biology and role in disease. *Adv Immunol* 1995; (60): 151-266.
- Weller P F, Dvorak A M. Lipid bodies: intracellular sites for eicosanoid formation. *J Allergy Clin Immunol* 1994; (94): 1151-1156.
- Weller P F, Rand T H, Barrett T, Elovic A, Wong D T, Finberg R W. Accessory cell function of human eosinophils. HLA-DR-dependent, MHC-restricted antigen-presentation and IL-1 alpha expression. *J Immunol* 1993; (150): 2554-2562.
- Wu L J, Vadakkan K I, Zhuo M. ATP-induced chemotaxis of microglial processes requires P2Y receptor-activated initiation of outward potassium currents. *Glia* 2007; (55): 810-821.
- Yamamoto H, Sedgwick J B, Vrtis R F, Busse W W. The effect of transendothelial migration on eosinophil function. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2000; (23): 379-388.
- Zemkova H, He M-L, Stojilkovic SS. Ecto-nucleotidases control the pattern of signalling by P2X receptor at nanomolar ATP concentrations. *Soc Neurosci Abstr* 29. 2003.
- Ref Type: Abstract

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](#)