

VITÓRIA FERNANDA DO ROSÁRIO GARCIA

**SENSIBILIZAÇÃO ALÉRGICA *IN VIVO* COMO ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL
DE OTIMIZAÇÃO DO PROTOCOLO CONVENCIONAL *IN VITRO* DE
DIFERENCIAÇÃO EOSINOFÍLICA: IMPACTO NA PRODUTIVIDADE**



**Monografia apresentada ao Instituto de
Microbiologia Paulo de Góes, da Universidade
Federal do Rio de Janeiro, como pré-requisito
para a obtenção do grau de Bacharel em Ciências
Biológicas: Microbiologia e Imunologia.**

**INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
RIO DE JANEIRO
MARÇO / 2022**

Trabalho realizado no Laboratório de Inflamação, no Departamento de Imunologia, do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, UFRJ, sob a orientação da Professora Christianne Bandeira de Melo e coorientação de Natália Recardo Amorim Tasmô.

FICHA CATALOGRÁFICA

do Rosário Garcia, Vitória Fernanda
dD631s Sensibilização alérgica in vivo como estratégia
experimental de otimização do protocolo convencional
in vitro de diferenciação eosinofílica: impacto na
produtividade / Vitória Fernanda do Rosário Garcia.
- Rio de Janeiro, 2022.
59 f.

Orientadora: Christianne Bandeira de Melo.
Coorientador: Natália Recardo Amorim Tasmó.
Trabalho de conclusão de curso (graduação) -
Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto
de Microbiologia, Bacharel em Ciências Biológicas:
Microbiologia e Imunologia, 2022.

1. eosinófilos. 2. sensibilização alérgica. 3.
células murinas. 4. microambiente medular pró
eosinopoiético. 5. diferenciação eosinofílica. I.
Bandeira de Melo, Christianne , orient. II. Amorim
Tasmó, Natália Recardo, coorient. III. Título.

INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES / UFRJ
COORDENAÇÃO DE ENSINO DE GRADUAÇÃO

**ATA DA APRESENTAÇÃO DE MONOGRAFIA PARA APROVAÇÃO
 NO RCS DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO,
 BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA E
 IMUNOLOGIA**

ALUNO: Vitória Fernanda do Rosário Garcia
 DRE: 118045659

BANCA EXAMINADORA: Dr. Herbert Leonel de Matos (Presidente)
 Dra. Camila Ribeiro Rodrigues Pão
 M.Sc. Fábio Pereira Mesquita dos Santos
 Dra. Alessandra d'Almeida Filardy (Suplente)

Título da Monografia: “Sensibilização alérgica *in vivo* como estratégia experimental de otimização do protocolo convencional *in vitro* de diferenciação eosinofílica: impacto na produtividade”

Local: Sala virtual <https://meet.google.com/rnp-dfaq-xjs>
Data e hora de início: 11 de março de 2022 às 13:00h

Em sessão pública, após exposição de cerca de 50 minutos, o aluno foi argüido pelos membros da Banca Examinadora, demonstrando suficiência de conhecimentos e capacidade de sistematização no tema de sua Monografia, tendo, então, obtido nota 10,0 neste requisito do RCS de **TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**. Na forma regulamentar, foi lavrada a presente ata que é assinada pelo presidente da banca examinadora, aluno, orientador (ou coorientador) e pelo coordenador do RCS.

Rio de Janeiro, 11 de março de 2022.

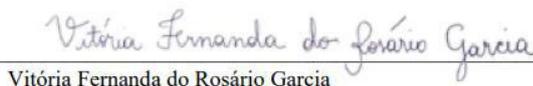
NOTA	Banca Examinadora:
10,0	Dr. Herbert Leonel de Matos Guedes
10,0	Dra. Camila Ribeiro Rodrigues de Pão Cunha
10,0	Dr. Fábio Pereira Mesquita dos Santos
	Dra. Alessandra d'Almeida Filardy (suplente)

Presidente da banca:



Dr. Herbert Leonel de Matos Guedes

Aluno:



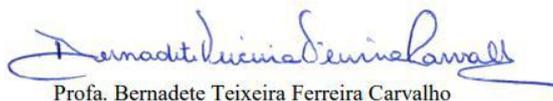
Vitória Fernanda do Rosário Garcia

Orientador:




Dra. Christianne Bandeira de Melo / Coorientador: Dra. Natália Recardo Amorim Tasmô

**Coordenador
de TCC**



Profa. Bernadete Teixeira Ferreira Carvalho

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Jesus, pois sem Ele eu não estaria aqui finalizando um ciclo tão importante em minha vida. Agradeço por ter me dado forças, pela oportunidade, por ser tão fiel a mim e me dar essa profissão como presente, que um dia tanto almejei! Concluo essa fase com muita gratidão!

Agradeço à minha orientadora, Christianne Bandeira, por todo apoio incondicional, por ser sempre uma fonte de conhecimento, sabedoria para todos os seus alunos, por ser uma pessoa que não mede esforços para nos ajudar, independente de qual seja o motivo da ajuda. Por ter acreditado em mim todos esses anos e ter me incentivado. Além disso, sua doçura e alegria sempre nos contagia. Christianne, você é uma inspiração para mim!

Agradeço à minha coorientadora, Natália Tasmó, por ter se disponibilizado sempre a me ensinar tudo o que aprendeu ao longo desses anos. Sem dúvida, seus ensinamentos têm sido cruciais para o meu crescimento profissional. Agradeço por ter se preocupado em me dar carona, por ter a paciência de esperar eu realizar as atividades no meu tempo e ter me conduzido até aqui da melhor forma possível.

Agradeço aos professores do Laboratório de Inflamação Bruno Diaz e Cláudio Canetti. Bruno por seus conhecimentos sempre compartilhados e por ser exemplo de profissionalismo. Canetti, por todas as suas contribuições seja pessoalmente, seja nos “Lab meetings”, sempre foi notável que o propósito de ambos foi de nos conduzir para raciocinar de forma clara, nos fazendo mais confiantes. Além das conversas engraçadas e extrovertidas que ensinam que a vida é feita para coletar bons momentos fazendo o que gostamos.

Agradeço à minha mãe, nossa jornada para a conclusão desta graduação tem sido intensa, renunciamos muito, nos separamos fisicamente para que eu pudesse realizar meu sonho. Sem todo o seu investimento em mim (seja de apoio emocional ao financeiro) eu não estaria aqui, definitivamente. Acredito que chagamos na reta final com muita honra, determinação, trabalho duro, garra e coragem! Essas palavras, todas, aprendi com você, mãe! Me ensinou a não desistir de meus sonhos e nas incertezas sempre esteve comigo para me passar segurança e confiança. Dedico a você tudo o que fiz e farei para ser uma pessoa e profissional melhor. Não esquecendo nunca de que se sou o que sou, é porque você é o que é!

Agradeço ao meu noivo, Diego Henrique Rocha, que desde o princípio foi um porto seguro. Sabemos de tudo o que abrimos mão para que eu estivesse aqui, sempre foi minha fortaleza e meu alicerce nos dias de alegria e caos. Foi quem me deu meu primeiro jaleco e nunca esquecerei! Me ensinou que trabalhando e sendo honestos conseguimos conquistar nossos objetivos.

Agradeço à minha prima Simone, por ser paciente, compreensiva e amável com minha maneira de ser. Por ser a pessoa que posso conversar e ter a certeza de que tenho alguém para escutar sem julgamentos, agradeço pelas risadas que sempre tira de mim. Agraço à minha tia Enedina, que não mede esforços para me ajudar nas diversos afazeres do cotidiano para que eu possa ter mais tempo para me dedicar aos estudos. Nessa fase final, vocês foram um apoio crucial para mim!

Agradeço às minhas amigas de coração e companheiras de trabalho, Hellen Zissou e Caroline Montenegro. Nossa troca é única! Nossos momentos sempre foram extremamente especiais, leves, calmos e tranquilos. Caroline, sua tranquilidade sempre nos acalmou! Hellen, sua amizade tem sido, ao longo desses anos, muito importante para mim, sua dedicação, palavra amiga, sua escuta, nossa partilha de muitos momentos especiais, seja no laboratório, seja na vida (todos felizes e engraçados) são motivos para me sentir grata. É uma amiga fiel, sei que posso contar com você e a guardarei para sempre em meu coração.

Agradeço à Mariane Nogueira, por sua amizade tão leal, ao longo desses anos também tem sido minha grande e fiel amiga, companheira de trabalhos, provas, de dificuldades e, principalmente, de muitas alegrias, sem você eu também não estaria aqui! Agradeço por podermos conversar sobre tudo por horas a fio, por ser alguém para compartilhar as lutas e incertezas da fase que nos encontramos. Espero que ao longo de nossas vidas possamos ter sempre essa amizade que nos agradece profissionalmente e, principalmente, pessoalmente. A guardarei sempre em meu coração também!

O início da sabedoria é a admissão
da própria ignorância. Todo o meu
saber consiste em saber que nada sei.

Sócrates

RESUMO

VITÓRIA FERNANDA DO ROSÁRIO GARCIA

SENSIBILIZAÇÃO ALÉRGICA *IN VIVO* COMO ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL DE OTIMIZAÇÃO DO PROTOCOLO CONVENCIONAL *IN VITRO* DE DIFERENCIAÇÃO EOSINOFÍLICA: IMPACTO NA PRODUTIVIDADE

Orientador: Christianne Bandeira de Melo

Eosinófilos apresentam desde funções citotóxicas efetoras em infecções helmínticas e reações alérgicas, quanto funções imunomodulatórias essenciais à homeostasia de tecidos como o gastrointestinal, adiposo e mamário. Estudos *in vitro* empregando eosinófilos murinos são essenciais para avançar na compreensão funcional desta célula. O protocolo de obtenção de eosinófilos murinos mais empregado atualmente é o descrito por Dyer e colaboradores (2008), permitindo obter ao final de 14 dias de cultura eosinófilos maduros com mais de 90% de pureza (fase inicial de proliferação de precursores induzida por SCF e FLT3-L, seguida de indução de diferenciação por IL-5). Embora eficiente, o protocolo ainda exhibe limitações como o alto custo *versus* produtividade e a qualidade das células produzidas. Como estratégia de otimização, estudamos ajustes do protocolo padrão baseado no emprego de células de medula óssea de camundongos pré-sensibilizados com ovalbumina (modelo de inflamação alérgica), que hipotetizamos apresentar microambiente medular já pró-eosinopoiético. Para validar a existência deste microambiente pró-eosinopoiético, avaliamos, inicialmente, se a sensibilização alérgica induz eosinofilia medular e/ou alteração dos níveis medulares de mediadores pró-eosinopoiéticos. Nossos dados mostram que houve aumento da eosinofilia medular em animais sensibilizados quando comparados aos animais “naive”. Mais ainda, observamos elevação discreta dos níveis das citocinas IL-3, IL-5 e dos eicosanóides CysLTs e PGD₂ (dosados por ELISA e EIA, respectivamente) no lavado medular dos animais BALB/c sensibilizados; indicando que a sensibilização de fato induziu instalação de microambiente medular pró-eosinopoiético *in vivo*. A sensibilização também promoveu alterações no protocolo *in vitro* de produção de eosinófilos, incluindo: (i) aumento nos números de eosinófilos ao final da fase inicial de proliferação (8 dias de cultura) nas culturas provenientes de animais sensibilizados; (ii) no 8º dia de cultura iniciada com células medulares de animal BALB/c sensibilizado, foi detectado intenso aumento na concentração de IL-3 no sobrenadante da cultura em comparação aos níveis de IL-3 encontrados nas culturas iniciadas com células medulares de camundongos BALB/c “naives”; e (iii) aos 14 dias de cultura, a produção total de eosinófilos mostrou-se aumentada nas culturas iniciadas a partir de animais sensibilizados. Nossos dados confirmam nossa hipótese de que a sensibilização alérgica *in vivo* de animais BALB/c corresponde à estratégia de baixo custo para otimização do protocolo de obtenção de eosinófilos murinos visando estudos funcionais *in vitro*.

Palavras-chave: eosinófilos, sensibilização alérgica, células murinas, microambiente medular pró-eosinopoiético, diferenciação eosinofílica.

ABSTRACT

VITÓRIA FERNANDA DO ROSÁRIO GARCIA

IN VIVO ALLERGIC SENSITIZATION AS AN EXPERIMENTAL OPTIMIZATION STRATEGY OF THE *IN VITRO* CONVENTIONAL EOSINOPHILIC DIFFERENTIATION PROTOCOL: IMPACT ON PRODUCTIVITY

Orientador: Christianne Bandeira de Melo

Eosinophils have cytotoxic effector functions in helminth infections and allergic reactions, as well as immunomodulatory functions essential to homeostasis of tissues such as the gastrointestinal, adipose and mammary tissues. *In vitro* studies employing murine eosinophils are essential to advance the functional understanding of this cell. The protocol for obtaining murine eosinophils most used today is the one described by Dyer *et al.* (2008), allowing to obtain, after 14 days of culture, mature eosinophils with more than 90% purity (initial phase of precursor proliferation induced by SCF and FLT3-L, followed by induction of differentiation by IL-5). Although efficient, the protocol still exhibits limitations such as high cost versus productivity and the quality of the cells produced. As an optimization strategy, we studied adjustments in the standard protocol based on the use of bone marrow cells from mice pre-sensitized with ovalbumin (a model of allergic inflammation), which we hypothesized to have an already pro-eosinopoietic bone marrow microenvironment. To validate the existence of this pro-eosinopoietic microenvironment, we initially evaluated whether allergic sensitization induces medullary eosinophilia and/or changes in medullary levels of pro-eosinopoietic mediators. Our data show that there was an increase in medullary eosinophilia in sensitized animals when compared to naive animals. Furthermore, we observed a slight increase in the levels of the cytokines IL-3 and IL-5 and of the eicosanoids CysLTs and PGD2 (dosed by ELISA and EIA, respectively) in the bone marrow lavage of the sensitized BALB/c animals; indicating that sensitization actually induced the installation of a pro-eosinopoietic medullary microenvironment *in vivo*. Sensitization also promoted changes in the *in vitro* eosinophil production protocol, including: (i) increase in eosinophil numbers at the end of the initial proliferation phase (8 days of culture) in cultures from sensitized animals; (ii) on the 8th day of culture initiated with medullar cells from sensitized BALB/c animal, an intense increase in the concentration of IL-3 was detected in the culture supernatant compared to the IL-3 levels found in the cultures initiated with medullary cells of mice BALB/c “naives”; and (iii) at 14 days of culture, the total production of eosinophils was shown to be increased in cultures initiated from sensitized animals. Our data confirm our hypothesis that *in vivo* allergic sensitization of BALB/c animals corresponds to the low cost strategy for optimizing the protocol of obtaining murine eosinophils for functional *in vitro* studies.

Key-words: *eosinophils, allergic sensitization, murine cells, pro-eosinopoietic medullary microenvironment, eosinophilic differentiation.*

RESUMO PARA LEIGOS

VITÓRIA FERNANDA DO ROSÁRIO GARCIA

SENSIBILIZAÇÃO ALÉRGICA *IN VIVO* COMO ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL DE OTIMIZAÇÃO DO PROTOCOLO CONVENCIONAL *IN VITRO* DE DIFERENCIAÇÃO EOSINOFÍLICA: IMPACTO NA PRODUTIVIDADE

Orientador: Christianne Bandeira de Melo

Eosinófilos são células com múltiplas funções, atuando na proteção em infecções helmínticas, indução da sintomatologia asmática, modulação das ações imunomodulatórias de outras células e na homeostasia de diversos tecidos, incluindo o adiposo, mamário e uterino. Por serem multifacetados é muito importante conhecer a biologia e a capacidade funcional dessas células. Para tal, modelos *in vitro* que permitam o estudo da fisiobiologia dos eosinófilos são fundamentais. E para se estudar *in vitro*, faz-se necessário metodologias que permitam a obtenção dessas células. No Laboratório de Inflamação (IBCCF/UFRJ) empregamos o protocolo de obtenção de eosinófilos murinos, que depende de uma diferenciação *in vitro* a partir de células de medula óssea de camundongos. Esse protocolo, muito utilizado ao redor do mundo, é de alto custo e tem rendimento que poderia ser melhor para gerar eosinófilos, permitindo o estudo dessa célula *in vitro*. Este estudo foi desenvolvido visando otimização deste protocolo padrão de obtenção de eosinófilos. Especificamente, buscamos aumento da produtividade do protocolo sem aumento nos custos já elevados. Assim, introduzimos a sensibilização alérgica dos camundongos doadores das células medulares para o protocolo *in vitro* de diferenciação. E, de fato, esta simples alteração de custo irrisório foi bem-sucedida, pois ao final da cultura de diferenciação, quando as células da medula vinham desses animais, a cultura se mostrou mais produtiva.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Conteúdo eosinofílico.....	15
Figura 2. Citoplasma eosinofílico	17
Figura 3. Síntese de PGD ₂	19
Figura 4. Regulação de eosinopoiese por IL-33 (adaptado de Johnston e Bryce, 2017). A IL-33 regula a diferenciação de eosinófilos a partir de progenitores mielóides comuns GATA+.....	22
Figura 5. Diferenciação de eosinófilos <i>in vitro</i> iniciada a partir de células de medula óssea (bmEos) utilizamos camundongos BALB/c	30
Figura 6. Sensibilização alérgica com injeção dorsal subcutânea em camundongos BALB/c.	30
Figura 7. Obtenção das células da medula óssea de camundongos em camundongos BALB/c naive ou BALB/c sensibilizados.....	31
Figura 8. Parâmetros analisados: impacto da sensibilização alérgica no microambiente medular	32
Figura 9. Diferenciação <i>in vitro</i> de eosinófilos murinos de animais “naive” e sensibilizados	33
Figura 10. Parâmetros analisados: Análise de proliferação, diferenciação celular e liberação de citocinas ao longo da cultura <i>in vitro</i> de eosinófilos.	33
Figura 11. Estimulação <i>in vitro</i> dos eosinófilos murinos diferenciados <i>in vitro</i> (recolhidos no 14º dia de cultura).	34
Figura 12. Parâmetros analisados: biogênese de corpúsculos lipídicos.	34
Figura 13. Parâmetros analisados: síntese e secreção de eicosanóides.....	35
Figura 14. Parâmetros analisados: síntese e secreção de citocinas.....	36
Figura 15. Sensibilização alérgica induz eosinofilia medular.....	37
Figura 16. Sensibilização alérgica de animais BALB/c parece modificar padrão de citocinas eosinopoiéticas e eicosanóides de caráter eosinofílico presentes no microambiente medular <i>in vivo</i> ..	38
Figura 17. Sensibilização alérgica de animais BALB/c modifica padrão da citocina eosinopoiética IL-3 ao longo dos dias de cultura de diferenciação de eosinófilos <i>in vitro</i>	39
Figura 18. Semelhança no perfil de diferenciação eosinofílica entre culturas iniciadas com células provenientes de animais sensibilizados e “naives”	40
Figura 19. Sensibilização alérgica <i>in vivo</i> induz aumento na produção total de eosinófilos na cultura montada a partir de animais sensibilizados	41
Figura 20. Sensibilização alérgica <i>in vivo</i> potencializa em eosinófilos produzidos <i>in vitro</i> a indução da biogênese de corpúsculos lipídicos induzida <i>in vitro</i> pela estimulação por PGD ₂ e BW245c	42
Figura 21. Sensibilização alérgica induziu microambiente medular com caráter eosinopoiético, sendo capaz de impactar positivamente o protocolo de diferenciação <i>in vitro</i> com aumento da produtividade, gerando eosinófilos viáveis, responsivos e funcionais.	48

LISTA DE ABREVIATURAS

- Δ dblGATA-/- - deleção do sítio GATA duplo
- 5-LO – 5-lipoxigenase
- 15-LO – 15-lipoxigenase
- AA – Ácido Araquidônico
- AMPc – adenosina 3,5-monofosfato cíclico
- ANOVA – Análise de Variância One-Way
- APC – Células apresentadoras de antígenos
- BW245C – agonista seletivo para o receptor DP₁
- CCL11 – Ligante 11 de Quimiocina Motivo C-C
- CCR3 – Receptor de eotaxina
- CD34 – Molécula CD34
- CD69 – Molécula CD69
- CD116 – Subunidade alfa do receptor do fator 2 estimulador de colônias
- CD117 – KIT proto-oncogene, receptor tirosina quinase
- CD123 – Cluster de Diferenciação 123
- CD120a – Cluster de Diferenciação 120a
- CD120b – Cluster de Diferenciação 120b
- CD124 – Cluster de Diferenciação 124
- CD125 – Cluster de Diferenciação 125
- CD131 – Cluster de Diferenciação 131
- CD132 – Cluster de Diferenciação 132
- CDw119 – Receptor de IFN- γ
- CLC – Proteína do cristal de Charcot-Leyden
- CMP – progenitor mielóide GATA-1⁺
- COX – ciclooxigenase
- COX-1- ciclooxigenase 1
- COX-2 – ciclooxigenase 2
- cPLA₂ - Fosfolipase A₂ citosólica

CR3 – Receptor de superfície celular integrina 3
Cys-LT – Leucotrienos cisteinado
CysLT1R – Receptor 1 de leucotrieno cisteinado
CysLT2R – Receptor 2 de leucotrieno cisteinado
DHA – Ácido docosaenoico
DK-PGD2 – Agonista receptor DP₂
DP₁ – Receptor DP₁
DP₂ – Receptor DP₂
ECP – Proteína Catiônica de Eosinófilos
EDN – Neurotoxina Derivada de Eosinófilos
EIA – Ensaio de Ligação a Enzima
ELISA – Ensaio de imunoabsorção enzimática
EoMP – Progenitores de eosinófilos e mastócitos
EoPre – Precursor de eosinófilos
EP – Receptor de Prostaglandina E₂
EPM - Erro padrão da média
EPO – Peroxidase de Eosinófilos
FLT-3L – Ligante de FLT3 murino recombinante
FP – Receptor da prostaglandina F
GATA – Fator de transcrição GATA
GM-CSF – Fator estimulador de colônia de granulócito-macrófago
GM-CSFR α – Cadeia α do Receptor de Fator estimulador de colônia de granulócito-macrófago
H-PGDS – PGD sintase hematopoética
IFN γ – Interferon- γ
IFN- γ R – Receptor de Interferon- γ
IgA – Imunoglobulina A
IL-1 – Interleucina 1
IL1RL1 – Receptor 1 de Interleucina 1
IL – 3 – Interleucina 3
IL-3R α – Cadeia α do Receptor de Il-3

IL-4 – Interleucina 4
IL-4R – Receptor de Interleucina 4
IL-5 – Interleucina 5
IL-5R – Receptor de Interleucina 5
IL-5R α – Cadeia α do Receptor de Il-5
IL-8 – Interleucina 8
IL-9 – Interleucina 9
IL-9R – Receptor de interleucina 9
IL-12 – Interleucina 12
IL-13 – Interleucina 13
IL-33 – Interleucina 33
ILC-2 – Células linfoides inatas do grupo 2
IP – Receptor de Prostaciclina
L-PGDS – PGD sintase tipo lipocalina
LTB₄ – Leucotrieno B₄
LTC₄ - Leucotrieno C₄
LTC₄S – Leucotrieno C₄ sintase
LXA₄ – Lipoxina A₄
MBP – Proteína Básica Principal
OVA – Ovalbumina
PAF – Fator ativador de plaquetas
PAFR – Receptor de Fator ativador de plaquetas
PBS – Tampão fosfato-salino
PD₁ – Proteína D₁
PGD – Prostaglandina
PGD₂ – Prostaglandina D₂
PGE₂ – Prostaglandina E₂
PGH₂ – Prostaglandina H₂
PI3K – Fosfatidilinositol-3-quinase
PU.1 – Fator de transcrição PU.1
RANTES – Regulado na ativação, célula T normal expressa e presumivelmente secretada

rmIL-5 – Interleucina-5 murina recombinante

rmSCF – Fator de célula tronco murino recombinante

SCF – Fator de células-tronco

SFB – Soro fetal bovino

SIGLEC-8 – Lectinas semelhantes a imunoglobulinas de ligação ao ácido siálico humano

SIGLEC-F – Lectinas semelhantes a imunoglobulinas de ligação ao ácido siálico murina

ST2 – Receptor ST2 da IL-33

TCH – Thiocarbohidrazida

Th1 – Linfócito T helper 1

Th 2 – Linfócito T helper 2

TNF- α – Fator de necrose tumoral α

TP – Receptor de tromboxano

VCAM-1- Molécula de adesão vascular-1

VLA-4 – Antígeno muito tardio 4

ÍNDICE

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 Eosinófilos: apresentação da célula e aspectos gerais	13
1.1.1 Aspectos celulares que promovem eosinopoiese	13
1.1.2 Morfologia dos eosinófilos: ênfase nos grânulos citoplasmáticos.	14
1.1.3 Marcadores de ativação eosinofílica: ênfase na biogênese de corpúsculos lipídicos e síntese de mediadores lipídicos.....	17
1.1.4. Principais marcadores de superfície de eosinófilos.....	20
1.1.5 Fatores que promovem eosinofilia	22
1.2 Multifuncionalidade dos eosinófilos, de indutores da pró-inflamação à indutores de pró-resolução: papel dos eosinófilos na asma, em infecções helmínticas, na homeostasia tecidual, na imunomodulação e pró-resolução da inflamação.....	23
1.2.1 Eosinófilos na asma e doenças alérgicas.....	23
1.2.2 Eosinófilos em infecções helmínticas	24
1.2.3 Eosinófilos desempenhando papel crucial na homeostasia tecidual	24
1.2.4. Eosinófilos desempenhando papel na pró-resolução da inflamação	25
1.3 Protocolos experimentais de obtenção de eosinófilos	26
2 JUSTIFICATIVA.....	27
3 OBJETIVOS	29
3.1 Objetivo Geral.....	29
3.2 Objetivos Específicos.....	29
4 MATERIAIS E MÉTODOS	30
4.1 Animais	30
4.2 Sensibilização alérgica dos animais	30
4.3 Obtenção das células da medula óssea de camundongos	31
4.4 Análise do impacto da sensibilização alérgica no microambiente medular	31
4.5 Protocolo de diferenciação de eosinófilos <i>in vitro</i> de acordo com Dyer e colaboradores (2008).....	32
4.6 Análise de proliferação e diferenciação celular ao longo da cultura <i>in vitro</i> de eosinófilos	33
4.6.1 Estimulação das células <i>in vitro</i>	34
4.6.2 Quantificação de corpúsculos lipídicos citoplasmáticos	34
4.6.3 Análise da produção de eicosanóides	35
4.6.4 Quantificação de citocinas	35
4.7 Análise Estatística	36
5 RESULTADOS.....	37
5.1 Impacto da sensibilização alérgica de camundongos BALB/c no microambiente medular: ênfase na análise de características eosinopoiéticas	37
5.1.1 A sensibilização alérgica induz eosinofilia medular	37
5.1.2 Sensibilização alérgica parece induzir aumento de citocinas e eicosanóides de caráter eosinopoiético no lavado medular.....	38

5.2 Impacto da sensibilização alérgica de camundongos BALB/c na cultura <i>in vitro</i> de eosinófilos	39
5.2.1 Sensibilização parece induzir aumento de IL-3 (função na proliferação de precursores eosinofílicos) ao longo da cultura de diferenciação.	39
5.2.2 Perfil de diferenciação de eosinófilos <i>in vitro</i> ao longo da cultura é semelhante entre as culturas iniciadas com medulas de animais sensibilizados e não-sensibilizados.	40
5.2.3 Sensibilização alérgica <i>in vivo</i> induz aumento na produtividade <i>in vitro</i> do protocolo de diferenciação de eosinófilos.	40
5.2.4 Eosinófilos gerados <i>in vitro</i> a partir de células medulares de animais submetidos à sensibilização alérgica <i>in vivo</i> são biologicamente responsivos à estimulação <i>in vitro</i>	41
6 DISCUSSÃO.....	43
7 CONCLUSÕES.....	48
8 REFERÊNCIAS.....	48

1 INTRODUÇÃO

1.1 Eosinófilos: apresentação da célula e aspectos gerais

Os eosinófilos foram descritos pela primeira vez em amostras de secreção traqueal de pacientes asmáticos em 1879 pelo médico Paul Ehrlich, que identificou um grupo de leucócitos de núcleos bilobados com grande quantidade de grânulos citoplasmáticos e afinidade por corantes acidófilos, como a eosina de cor alaranjada – o que deu nome a essas células.

Os eosinófilos são leucócitos granulócitos que se desenvolvem na medula óssea a partir de progenitores pluripotentes. O modelo de eosinopoiese mais aceito atualmente postula que estes leucócitos se diferenciam primeiramente em um precursor híbrido comum aos eosinófilos e basófilos antes de se diferenciarem em uma linhagem específica de eosinófilos (Hogan *et al.*, 2008) em função da atividade de fatores transcricionais e citocinas específicas capazes de influenciar o desenvolvimento de eosinófilos em células maduras (Blanchard e Rothenberg, 2009).

1.1.1 Aspectos celulares que promovem eosinopoiese

O fator de transcrição PU.1 expresso em células hematopoiéticas funciona sinergicamente com GATA-1 para regular a diferenciação de eosinófilos e a transcrição de suas proteínas granulares (Hogan *et al.*, 2008; Blanchard e Rothenber, 2009). Na maioria das células, PU.1 e GATA-1 se antagonizam, porém têm atividade sinérgica na regulação da linhagem eosinofílica e transcrição de proteínas de grânulos de eosinófilos (Du *et al.*, 2002).

Destes fatores de transcrição, GATA-1 é o mais importante para desenvolvimento da linhagem de eosinófilos. Localizado no cromossomo X em humanos e camundongos, o fator de transcrição GATA-1 foi nomeado por sua capacidade de se ligar à sequência promotora composta por bases GATA. O sítio de ligação GATA-1 está presente como uma sequência palindrômica (sítio duplo GATA) em vários genes relacionados a eosinófilos (incluindo genes de proteínas específicas granulares, o do receptor de quimiocinas CCR3 e do receptor de IL-5) e no próprio gene GATA-1 (Du *et al.*, 2002 ; Yu *et al.*, 2002; Zimmermann *et al.*, 2000). A mutação direcionada aos dois sítios de ligação GATA presente no gene GATA-1 leva à perda da linhagem de eosinófilos em camundongos (Yu *et al.*, 2002). Além disso, a expressão ou superexpressão de GATA-1 promove aumento da diferenciação de células progenitoras mielóides na linhagem eosinofílica (Bedi *et al.*, 2009).

Sabe-se também que o nível elevado de IL-5 na corrente sanguínea pode promover aumento da eosinofilia na medula óssea, o que resulta em uma elevação do número de eosinófilos circulantes, sem afetar outros tipos de leucócitos sanguíneos (Sanderson, 1992). Apesar da importância desta via de sinalização na diferenciação de eosinófilos, já foi descrito que progenitores mielóides de camundongos Δ dbl-GATA knockouts quando estimulados com as citocinas IL-3, IL-5 e GM-CSF são capazes de se diferenciar *ex vivo* em eosinófilos, demonstrando que existem outros mecanismos de compensação envolvidos (Dyer *et al.*, 2007).

Para o desenvolvimento e a maturação de eosinófilos, que ocorre na medula óssea, é necessário ter aproximadamente uma semana de exposição aos precursores mielóides: IL-3, GM-CSF e IL-5. A IL-5 tem extrema importância no estágio final da diferenciação de eosinófilos, além disso essa citocina induz a mobilização a partir da medula de eosinófilos para o sangue circulante e também é uma citocina chave na sobrevivência e persistência dos eosinófilos circulantes e teciduais, prevenindo a apoptose e preparando os eosinófilos para a ativação celular. Células progenitoras CD34⁺, células linfoides inatas do grupo 2 (ILC-2), linfócitos Th2, células T “natural killers” invariáveis e mastócitos são as principais fontes de IL-5 (Nussbaum *et al.*, 2013; Symowski e Voehringer, 2017). Além disso, a IL-5 pode ser liberada pelos próprios eosinófilos e atuar de forma autócrina/parácrina regulando suas funções (Fulkerson e Rothenberg, 2013; Bagnasco, 2017).

1.1.2 Morfologia dos eosinófilos: ênfase nos grânulos citoplasmáticos.

Os eosinófilos possuem quatro tipos de organelas secretoras: grânulos cristalóides (também denominados grânulos específicos), grânulos primários, pequenos grânulos e vesículas secretoras. Estes compartimentos citoplasmáticos são ricos em proteínas específicas dessa linhagem granulocítica, de caráter catiônico e citotóxico (**Figura 1**). A Proteína Básica Principal (“major basic protein”; MBP) encontra-se em altas concentrações e cristalizada no núcleo do grânulo cristalóide (Gleich *et al.*, 1973; Lewis *et al.*, 1978). A Peroxidase de Eosinófilos (EPO), Proteína Catiônica de Eosinófilos (ECP) e Neurotoxina Derivada de Eosinófilos (EDN) encontram-se principalmente distribuídas na matriz dos três tipos de grânulos (Egsten *et al.*, 1986; Peters *et al.*, 1986).

Os grânulos primários aparecem durante o estágio promielocítico do desenvolvimento de eosinófilos e são enriquecidos da proteína do cristal de Charcot-Leyden (CLC). Também foram identificadas pequenas vesículas secretoras que se sobrepõem em seu conteúdo aos de pequenos grânulos e são densamente encontradas no citoplasma dos eosinófilos. Todas essas proteínas

granulares eosinofílicas são catiônicas e apresentam importantes atividades citotóxicas entre outras ações; como por exemplo, a liberação de MBP por eosinófilos é capaz de ativar neutrófilos, induzindo a liberação de superóxido e IL-8 e aumenta a expressão do receptor de superfície celular integrina 3 (CR3) (Haskell *et al.*, 1995).

Essas proteínas granulares são em parte determinantes da dicotomia das funções eosinofílicas. Devido às ações citotóxicas, eosinófilos podem desenvolver um papel importante na defesa do organismo contra helmintos, algumas infecções virais e bacterianas. Por outro lado, durante respostas inflamatórias, essas proteínas podem causar graves danos teciduais; como observado no “fenômeno de Gordon”, caracterizado por rigidez, ataxia e paralisia, induzido pela neurotoxicidade de ECP e EDN (Durack *et al.*, 1979).

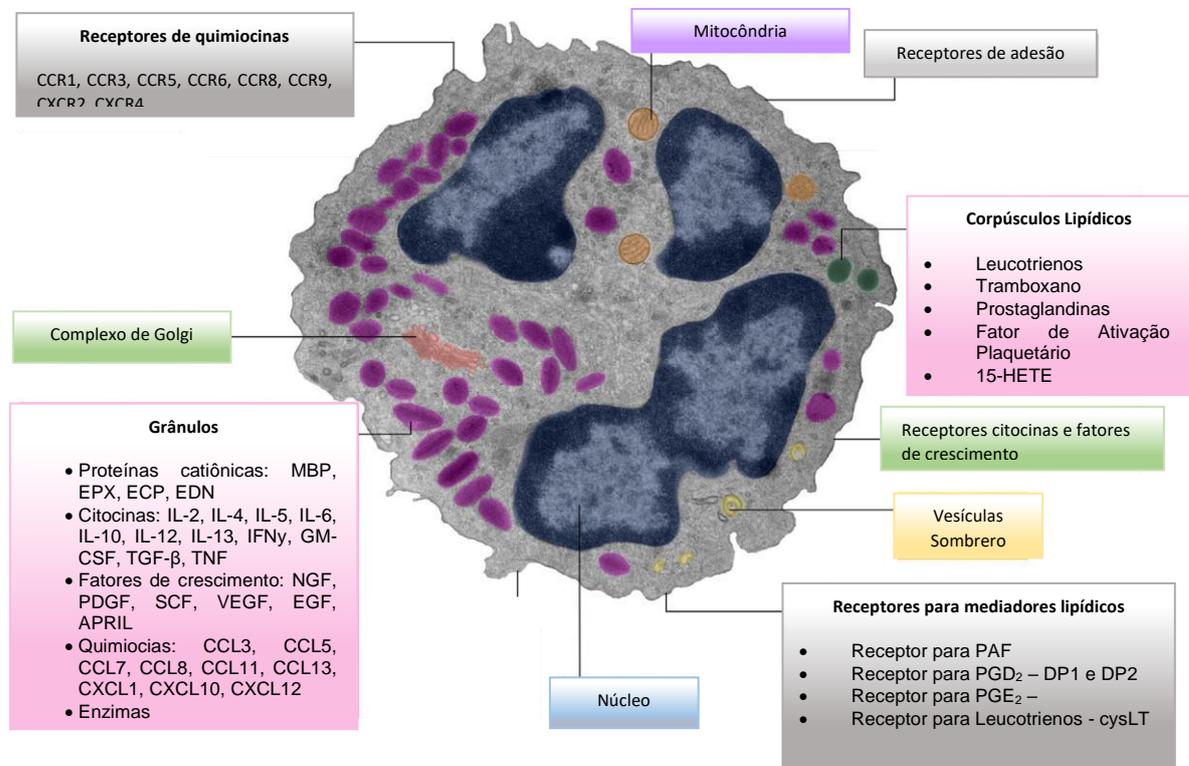


Figura 1. Conteúdo eosinofílico. Eosinófilos possuem em sua superfície receptores de quimiocinas, de adesão, de citocinas, para fatores de crescimento e mediadores lipídicos. O núcleo é bilobulado, a célula é composta por vesículas sombrero e grânulos que estocam proteínas catiônicas e citocinas pré-formadas, de caráter pró-inflamatórias, fibrogênicas e quimiotáticas (adaptado de Diny, Rose e Čiháková, 2017).

Além das proteínas catiônicas eosinofílicas, estocados nesses grânulos há grande variedade de citocinas pré-formadas, enzimas e fatores de crescimento (**Figura 1**). A capacidade de armazenar e rapidamente secretar essas citocinas pré-formadas distingue eosinófilos de outras células produtoras de citocinas como os linfócitos que necessitam de horas para efetiva secreção destas moléculas imunoreguladoras. Os eosinófilos sanguíneos humanos além de estocarem citocinas Th2, também armazenam constitutivamente um estoque de

citocinas do tipo Th1, fatores de crescimento e quimiocinas. Estudos confirmam que os eosinófilos humanos podem secretar mais de 30 citocinas (Spencer *et al.*, 2008). A liberação rápida e diferencial de cada citocina ocorre em resposta estímulos específicos, como, por exemplo, a estimulação de eosinófilos por eotaxina provoca a liberação de IL-4, mas não de IL-12 (Bandeira-Melo *et al.*, 2002).

A liberação do conteúdo dos grânulos no espaço extracelular é uma função eosinofílica proeminente. Anteriormente, presumia-se que a liberação de mediadores ocorria principalmente por meio de degranulação exocítica (podendo ser citolítica), um mecanismo pelo qual uma estimulação resulta no esvaziamento granular completo do “arsenal” citotóxico de proteínas catiônicas pré-formadas do eosinófilo e depleção (desaparecimento) dos grânulos citoplasmáticos.

Análises cuidadosas de micrografias eletrônicas de eosinófilos degranulando em tecidos mostrou um processo mais controlado, que recebeu o nome de degranulação gradativa, chamado “degranulação piecemeal” (Dvorak , Estrella e Ishizaka, 1994) para refletir o fato de que o eosinófilo é capaz de liberar parte de seu conteúdo granular em resposta a um determinado estímulo – enquanto os grânulos, embora parcialmente “esvaziados”, permanecem presentes e aparentemente ativos no citoplasma eosinofílico. A degranulação piecemeal é agora aceita como a forma fisiológica mais comumente observada de degranulação de eosinófilos.

Eosinófilos que sofrem degranulação piecemeal em resposta a citocinas, como interferon- γ (IFN γ) e CCL11, desenvolvem vesículas secretoras citoplasmáticas, conhecidas como vesículas sombrero de eosinófilos (**Figura 2**) e permanecem viáveis e totalmente responsivos a estímulos subsequentes (Melo *et al.*, 2005).

1.1.3 Marcadores de ativação eosinofílica: ênfase na biogênese de corpúsculos lipídicos e síntese de mediadores lipídicos.

Além dos grânulos e vesículas, no citoplasma dos eosinófilos encontram-se também os corpúsculos lipídicos – organelas complexas ricas em lipídeos apolares como triacilglicerol e ésteres de colesterol (Murphy, 2001), com importante conteúdo proteico específico sendo envoltas por uma monocamada de fosfolipídios (Tauchi-Sato *et al.*, 2002) e encontradas em todas as células eucarióticas, desde protozoários a mamíferos, e em procariotos também, como bactérias (Murphy, 2012) (**Figura 2**).

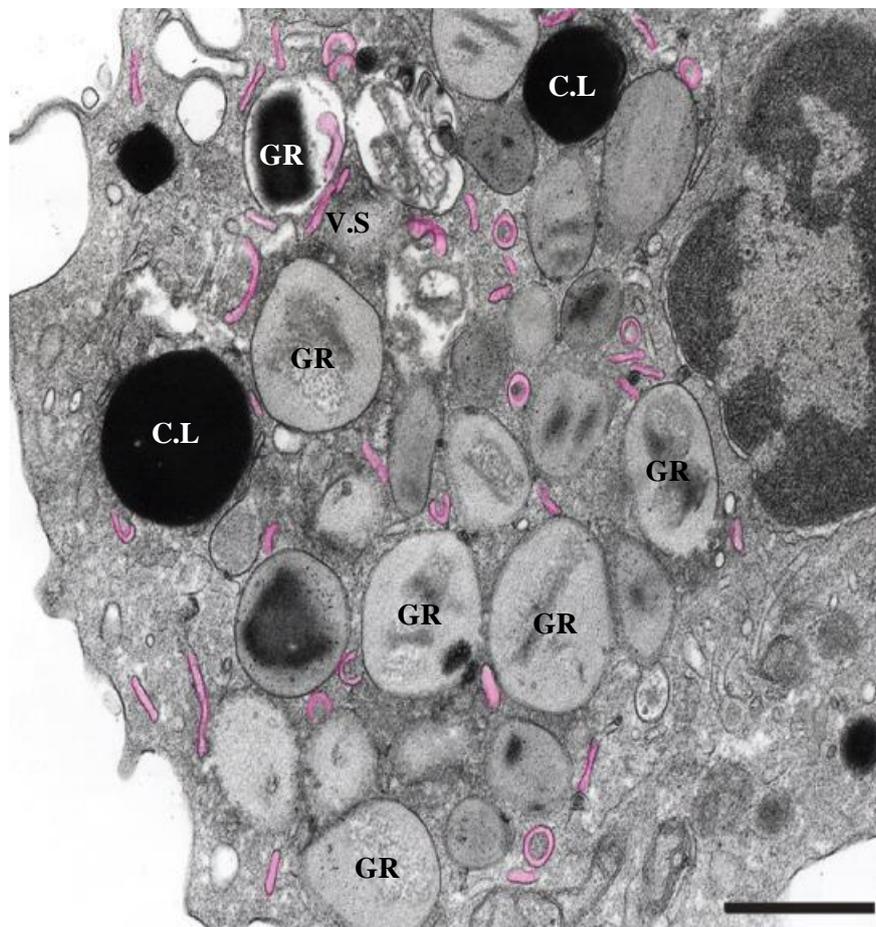


Figura 2. Citoplasma eosinofílico. No citoplasma dos eosinófilos encontram-se diversas organelas específicas como grânulos (GR), vesículas sombrero em rosa (V.S) e corpúsculos lipídicos (C.L), (adaptado de Weller e Spencer, 2017).

Leucócitos não estimulados já apresentam corpúsculos lipídicos em seu citoplasma, mas foi visto que, quando estimulados, podem formar rapidamente novos corpúsculos lipídicos. Em células como eosinófilos, neutrófilos e macrófagos, os corpúsculos lipídicos são rapidamente formados no citoplasma em resposta à inflamação ou doenças infecciosas e funcionam como marcadores estruturais de ativação destas células (Melo *et al.*, 2011). Por exemplo, a

estimulação de eosinófilos *in vitro* com eotaxina e RANTES, (via receptores CCR3), induz a biogênese de corpúsculos lipídicos em eosinófilos (Bandeira-Melo *et al.*, 2001).

Também se sabe que leucócitos ativados naturalmente, como eosinófilos de pacientes com hipereosinofilia, apresentam o número de corpúsculos lipídicos aumentado no citoplasma. Além disso, a estimulação com diferentes citocinas como TNF- α ou INF induziram o aumento de números corpúsculos lipídicos de eosinófilos humanos, indicando que vias de sinalização distintas podem desencadear a formação de corpúsculos lipídicos dentro de leucócitos (Melo *et al.*, 2013).

O corpúsculo lipídico é uma organela que tem um comportamento dinâmico, sendo funcionalmente ativa, modificando sua estrutura de acordo com o tipo de estímulo que a célula é submetida (Bozza, Magalhães e Weller, 2009), podendo se movimentar dentro da célula de forma dependente de microtúbulos e exercer funções específicas nos diferentes tipos celulares em que atuam (Pol *et al.*, 2004).

Em eosinófilos e em todos os leucócitos, corpúsculos lipídicos exibem como principal função a compartimentalização da síntese de eicosanóides, como prostaglandinas e leucotrienos (Bozza *et al.*, 1997; Bandeira-Melo *et al.*, 2001; Vieira-de-Abreu *et al.*, 2005). Em eosinófilos, a presença de proteínas ligadas à síntese de mediadores inflamatórios lipídicos, como as enzimas ciclooxigenase (COX), 5-lipoxigenase (5-LO), leucotrieno C4 sintase (LTC4S) e PGD sintase hematopoética, foram localizados inteiramente dentro de corpúsculos lipídicos de eosinófilos humano, bem como nos de neutrófilos e macrófagos (Dvorak *et al.*, 1992; Dvorak *et al.*, 1994; Bozza *et al.*, 1997; Luna-Gomes *et al.*, 2011; Melo *et al.*, 2013).

Por exemplo, especificamente em relação à síntese de prostaglandina D₂ (PGD₂), que se inicia através da ação da Fosfolipase A₂ citosólica (cPLA₂), que realiza a clivagem de um éster na posição 2 dos fosfolipídios de membrana, liberando Ácido Araquidônico (AA) (Diaz *et al.*, 2002). O AA livre passa a ser processado pela via das cicloxigenases (COX), o que dá origem a classe de prostanóides (prostaglandinas, prostaciclina e o tramboxano). A enzima COX possui duas isoformas, a COX-1, que é expressa constitutivamente, e a COX-2, que durante processos inflamatórios tem sua expressão induzida em células ativadas (O'Banion, 1999). As enzimas COXs irão metabolizar o AA formando um produto intermediário instável, o PGH₂, que foi convertido em PGD₂ bioativa por isomerases específicas (Kanaoka e Urade, 2003). Existem dois tipos de isomerases que participam deste processo: a PGD sintase tipo lipocalina (L-PGDS) e a PGD sintase hematopoética (H-PGDS), ambas igualmente capazes de promover a isomerização da PGH₂ à PGD₂ (**Figura 3**) (Kanaoka e Urade, 2003).

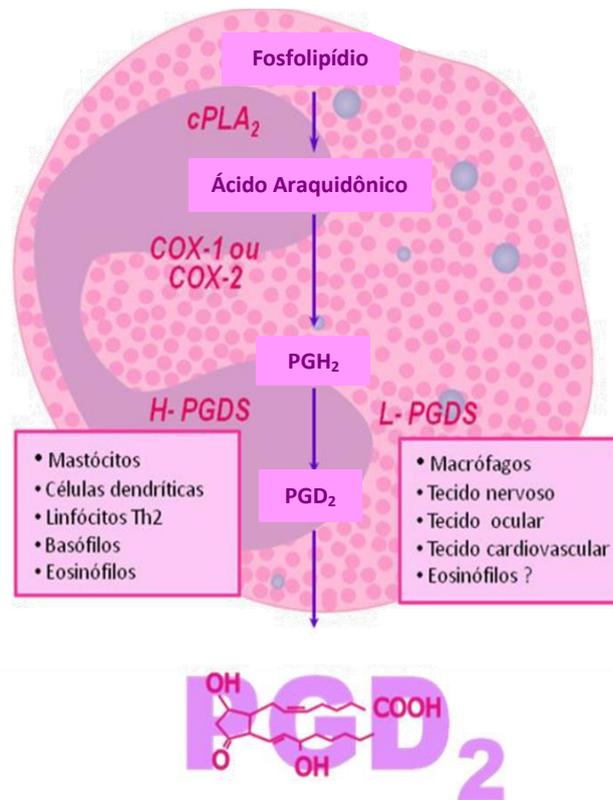


Figura 3. Síntese de PGD₂. Nos eosinófilos a via de síntese do mediador lipídico PGD₂ ocorre pela ação de uma série de enzimas, iniciada pela clivagem de um fosfolípido de membrana pela cPLA₂, liberando o Ácido Araquidônico para ser metabolizado pelas enzimas da família COX, que, de forma geral, culmina em uma cascata de sinalização para a via de síntese desse mediador.

Funcionalmente, a PGD₂ é um eicosanóide central em inflamações alérgicas, promovendo vasodilatação, formação de edema, broncoconstrição, produção de muco e eosinofilia, dessa forma contribui para patologias como asma, dermatite atópica ou rinite alérgica (Doyle *et al.*, 1990; Widdicombe, 1990). Além de uma atuação clássica como um fator quimiotático para eosinófilos, basófilos e linfócitos Th2, a PGD₂ também é um fator de sobrevivência de eosinófilos, sendo potente estímulo indutor de biogênese de corpúsculos lipídicos e síntese aumentada de LTC₄, da mesma forma que outros quimioatraentes eosinofílicos como a eotaxina, RANTES e fator ativador de plaquetas (PAF) (Bozza *et al.*, 1996; Bandeira-Melo *et al.*, 2001; Mesquita-Santos *et al.*, 2006; Fabre *et al.*, 2009).

A PGD₂ também é conhecida por promover diretamente a ativação da formação de corpúsculos lipídicos e a síntese de LTC₄ por eosinófilos tanto *in vitro* quanto *in vivo* (Mesquita-Santos *et al.*, 2006).

1.1.4. Principais marcadores de superfície de eosinófilos

Os eosinófilos expressam receptores de superfície para fatores de crescimento, de adesão e quimiotáticos, que promovem efeitos variados: migração, degranulação, interações célula a célula e inibição de apoptose (Rosenberg, Dyer e Foster, 2013).

Dentre os principais receptores expressos por eosinófilos, destacam-se os receptores de IL-5 (IL-5R), de eotaxina (CCR-3), de PAF (PAFR), de PGD₂ (DP₂), o SIGLEC-8 em humanos e o SIGLEC-F em camundongos. Como já mencionado, a IL-5 possui um papel central, na diferenciação, migração, sobrevivência e ativação eosinofílica. A eotaxina, via ativação de seu receptor CCR-3, é potente indutora de eosinofilia tecidual, atuando em conjunto com a IL-5 ou de forma independente (Collins *et al.*, 1995; Mould *et al.*, 1997). Os receptores SIGLEC são lectinas de superfície celular. Apesar da função deste receptor ainda não estar tão clara, anticorpos específicos para SIGLEC-8 promovem a apoptose específica destas células em modelos *in vivo* (Kiwamoto *et al.*, 2012), e servem como marcadores específicos de eosinófilos. E, dentre as moléculas de adesão, ressaltamos o papel fundamental e de caráter mais seletivo da molécula VLA-4 (integrina $\alpha 4\beta 1$ que se liga à VCAM-1) no recrutamento de eosinófilos para o local da inflamação alérgica no pulmão e na pele (Weg *et al.*, 1993; Abraham *et al.* 1994; Nakajima *et al.* 1994; Pretolani *et al.* 1994; Gonzalo *et al.*, 1996)

Os eosinófilos expressam receptores para mediadores lipídicos, como os CysLT₁R e CysLT₂R para os leucotrienos cisteínados (LTC₄/D₄/E₄), receptores para prostanóides, com destaque para os de PGD₂ denominados DP₁ e DP₂, e o receptor de alta afinidade para PAF, o PAFR (Wang *et al.*, 1999; Fujii *et al.*, 2005; Zinchuk *et al.*, 2005). Importante para o presente estudo, a supressão *in vitro* da atividade do leucotrienos cisteínados por um antagonista de CysLT₁R bloqueia a diferenciação e/ou maturação de eosinófilos, sugerindo que os leucotrienos cisteínados podem desempenhar um papel no compromisso e na maturação da linhagem de eosinófilos (Thivierge *et al.*, 2000).

A PGD₂ tem funções imunomoduladoras e inflamatórias e essas funções são mediadas pela interação de alta afinidade entre os dois receptores, DP₁ e DP₂. Os receptores DP₁ são membros da família de receptores de prostanóides que incluem EP₁₋₄, FP, IP e TP. Receptores DP₁ são acoplados à proteína G e sinalizam através da elevação dos níveis intracelulares de AMPc (Sawyer *et al.*, 2002). Os eosinófilos expressam os receptores DP₁ acoplados à adenilil ciclase (Monneret *et al.*, 2001).

O receptor DP₂ foi identificado em humanos em linfócitos do tipo 2, basófilos, eosinófilos e monócitos, sendo importante indutor de quimiotaxia destas células (Cosmi, L., F *et al.*, 2000; Nagata, K *et al.* 1999; Gosset, P. *et al.*, 2003). O receptor DP₂ medeia a quimiotaxia de eosinófilos induzida por produtos de mastócitos (Nagata *et al.*, 1999). A ativação de DP₂ é responsável pela quimiotaxia e degranulação de eosinófilos induzida por PGD₂, enquanto a ativação de DP₁ retarda seu início de apoptose (Gervais, F. G. *et al.*, 2001). Os receptores DP₂ são acoplados à proteína G e sua ativação induz a elevação de cálcio intracelular, redução do AMPc (Sawyer *et al.*, 2002) e ativação a jusante de fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K) (Xue *et al.*, 2007).

Embora a capacidade do PGD₂ de ativar eosinófilos enquanto simultaneamente eleva os níveis de AMPc pareça paradoxal, os receptores DP₁ parecem ser capazes de mediar, com os receptores DP₂, a mobilização de eosinófilos da medula óssea, bem como a quimiotaxia (Schratl *et al.*, 2007).

Spik e colaboradores (2005) observaram que ativação DP₂ medeia a migração de eosinófilos de camundongo *in vitro*. O grupo testou PGD₂, BW245C (agonista do receptor DP₁ específico) e DK-PGD₂ (agonista do receptor DP₂ específico) quanto à sua capacidade de atrair eosinófilos e viram que os eosinófilos além de terem sido atraídos pela quimiocina CCL11 (usada como controle positivo), também foram atraídos por PGD₂ e DK-PGD₂ de uma forma dependente da concentração empregada. Quanto ao BW245C, não se obteve efeito. Com isso, o grupo concluiu que DP₂ é funcional em eosinófilos de camundongos e promove, como é o caso em humanos, a quimiotaxia de eosinófilos *in vitro* (Spik *et al.*, 2005)

IL-3, IL-5 e fator estimulador de colônia de granulócito-macrófago (GM-CSF), são particularmente importantes na regulação do desenvolvimento de eosinófilos, como já mencionado. Os eosinófilos expressam a subunidade do receptor de citocina específica para IL-3 (IL-3R α ; CD123), IL-5 (IL-5R α ; CD125) e GM-CSF (GM-CSFR α ; CD116) e também a cadeia β compartilhada pelos 3 receptores (CD131) (Lopez *et al.* 1986, 1988; Rothenberg *et al.* 1988; Takatsu *et al.* 1994). Estudos mostraram que citocinas incluindo fator de células-tronco (SCF), IFN- γ , fator de necrose tumoral (TNF)- α , IL-4 e IL-9 ativam funções de eosinófilos, sugerindo que essas células expressam os receptores c-kit (CD117), IFN- γ R (CDw119), receptor de TNF- α tipos 1 e 2 (CD120a e CD120b), receptor de IL-4 tipo 1 [tanto cadeia α de IL-4R (CD124) quanto cadeia α comum (CD132)], e o receptor de IL-9 [cadeia α de IL-9R (CD129) e CD132] (Wallen *et al.* 1991; Yuan *et al.* 1997; Dubois *et al.* 1998; Nutku *et al.* 1999; Hauber *et al.*, 2004).

1.1.5 Fatores que promovem eosinofilia

Como já mencionado, IL-5 é uma citocina importante para a diferenciação de eosinófilos e a proliferação das células progenitoras mielóides em eosinófilos têm a participação das citocinas IL-3 e de GM-CSF (fator de estimulação de macrófago-granulócito).

O GM-CSF é um fator de crescimento hematopoiético que induz a proliferação celular e a diferenciação de granulócitos e macrófagos. Os receptores GM-CSF estão presentes nos progenitores hematopoiéticos, bem como em granulócitos maduros, em células leucemicas e em algumas células não hematopoiéticas (Burdach, 1991).

A IL-3 foi originalmente denominada como um multi-CSF por sua capacidade de conduzir todo o espectro de mielopoiese, não apenas produzindo neutrófilos, monócitos e macrófagos, mas também eosinófilos, basófilos e mastócitos a partir de precursores da medula óssea. O receptor para IL-3 é expresso em progenitores granulocíticos-monocíticos e, em menor grau, em progenitores dendríticos comuns. Nas células maduras, eosinófilos, mastócitos e basófilos, expressam IL3-R α (Dougan *et al.*, 2019).

Já a citocina IL-33 tem função destacável pois promove eosinofilia via a produção de IL-5. A IL-33, membro da família das citocinas IL-1, é expressa por células epiteliais, células endoteliais, fibroblastos e adipócitos e é um sinal endógeno de perigo conhecido como alarmina. A IL-33 modula especificamente os sinais pró-inflamatórios do tipo Th2 após sua liberação das células necróticas. O receptor ST2 da IL-33 (IL1RL1) é encontrado principalmente nas células Th2 (Kurowska-Stolarska M *et al.*, 2008), mas também em basófilos (Suzukawa M *et al.*, 2008), eosinófilos (Cherry WB *et al.*, 2008) e mastócitos (Allakhverdi Z *et al.*, 2007).

Mais especificamente, a IL-33 regula os eosinófilos em três estágios: desenvolvimento na medula óssea, ativação de células maduras no sangue e desenvolvimento e ativação de progenitores no tecido. Na medula óssea (**Figura 4**), o progenitor mielóide GATA-1⁺ (CMP) diferencia-se em progenitor pré-macrófago-granulócito GATA-1⁺ (Pre-GMP), depois em

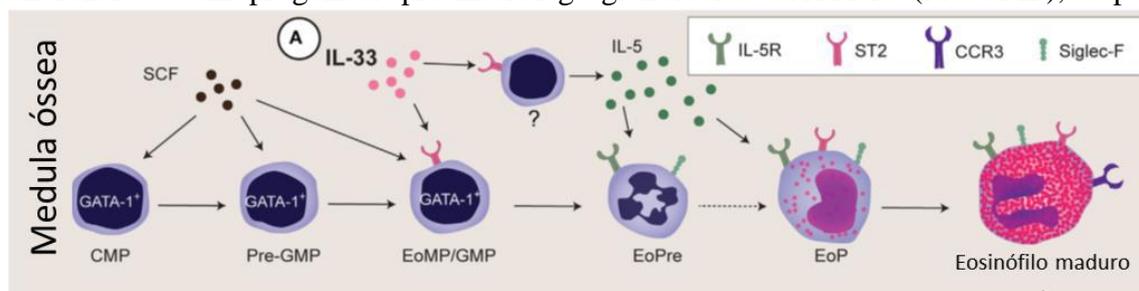


Figura 4. Regulação de eosinopoiese por IL-33 (adaptado de Johnston e Bryce, 2017). A IL-33 regula a diferenciação de eosinófilos a partir de progenitores mielóides comuns GATA⁺.

progenitor macrófago-granulócito GATA-1⁺ (GMP), também conhecido como progenitores de eosinófilos e mastócitos (EoMP). Nesta fase, a IL-33 induz a diferenciação da EoMP/GMP no precursor de eosinófilos (EoPre). A IL-33 também regula positivamente a expressão de IL-5R α no precursor de eosinófilos (EoPre). Além do mais, a IL-33 induz a produção de IL-5 por outra célula, atualmente não identificada na medula óssea, que promove a maturação final dos eosinófilos (Johnston e Bryce, 2017).

Segundo Dyer e colaboradores (2013) a administração sistêmica de IL-33 em camundongo BALB/c por 7 dias resulta em níveis séricos aumentados das citocinas Th2 como IL-4, IL-5 e IL-13. O total de células na medula óssea aumentou de 2,3 para $4,0 \times 10^7$ células por camundongo em associação com um aumento dramático na porcentagem de eosinófilos, de 5% para quase 80%, identificado com coloração Diff-Quik e por citometria de fluxo com anticorpo anti-Siglec. O acúmulo profundo de eosinófilos também foi observado na cavidade peritoneal e no baço. IL-33 também foi incapaz de induzir eosinofilia em camundongos deficientes para IL-5, confirmando a dependência de IL-5 desta resposta (Rosenberg, Dyer e Foster, 2013).

1.2 Multifuncionalidade dos eosinófilos, de indutores da pró-inflamação à indutores de pró-resolução: papel dos eosinófilos na asma, em infecções helmínticas, na homeostasia tecidual, na imunomodulação e pró-resolução da inflamação.

Os eosinófilos são células que desempenham diversos papéis funcionais relevantes. A clássica visão que os relaciona à citotoxicidade, à proteção contra infecções helmínticas e à promoção da sintomatologia em reações alérgicas vem sendo substituída pelo conceito de que estas células também atuam na imunomodulação de várias condições fisiopatológicas e na pró-resolução da inflamação. Destacam-se uma série de estudos publicados em revistas de alto impacto mostrando o eosinófilo como célula indutora e mantenedora de um perfil homeostático em diversos tecidos, incluindo tecidos como o adiposo e intestinal (Sugawara *et al.*, 2016; Wu *et al.*, 2011). De forma genérica, encontra-se descrito na literatura que mecanismo imunomodulador eosinofílico é realizado principalmente através da rápida secreção de citocinas pré-formadas estocadas nos grânulos dos eosinófilos.

1.2.1 Eosinófilos na asma e doenças alérgicas

A asma é uma doença inflamatória crônica caracterizada pela obstrução e hiperreatividade das vias aéreas. Durante crises de asma, ocorre um recrutamento desregulado de

eosinófilos para o tecido pulmonar e vias aéreas em função da liberação de citocinas liberadas por células do tipo Th2 ativadas, além de serem atraídos por conta das quimiocinas, principalmente da família das eotaxinas. Uma vez presentes nas vias aéreas de asmáticos, os eosinófilos são ativados e liberam uma variedade de mediadores, incluindo os leucotrienos cisteínados (Cys-LT) que promovem broncoconstrição, hipersecreção de muco e vasodilatação (Gleich, 1990). Além disso, a degranulação de eosinófilos ativados leva a liberação de proteínas citotóxicas, danificando a mucosa e nervos (revisado em Rothenberg & Hogan, 2006). Eosinófilos também estão envolvidos no remodelamento tecidual, pela secreção de vários fatores fibrinogênicos e de crescimento, assim participando da fibrose e vascularização das vias aéreas em pacientes asmáticos crônicos (Aceves & Broide, 2008).

1.2.2 Eosinófilos em infecções helmínticas

Eosinófilos são classicamente associados às infecções helmínticas, visto que ocorre aumento da eosinofilia no sangue e no tecido, decorrente da ativação de linfócitos Th2. No entanto, nesse contexto, o papel dessas células é controverso e parece ser helminto-específica. Por exemplo, a análise de CCR3 e camundongos deficientes em eotaxina-1 sugerem um papel para eosinófilos no controle da infecção por microfilárias de *Brugia malayi* e no encistamento de larvas em *Trichinella spiralis* (Gurish *et al.*, 2002; Simons *et al.*, 2005), mas a evidência final para um papel dos eosinófilos na defesa hospedeiro contra parasitas ainda não foi elucidada. Já estudo de Swartz e colaboradores (2006) explorou o papel dos eosinófilos na defesa do hospedeiro contra *Schistosoma mansoni* em um modelo de infecção de duas linhagens de camundongos com ablação de eosinófilos (Δ dblGATA e PHIL). Eles descobriram que a ablação de eosinófilos não parece afetar importante a carga de vermes ou a deposição de ovos (Swartz *et al.*, 2006).

1.2.3 Eosinófilos desempenhando papel crucial na homeostasia tecidual

Os eosinófilos desempenham funções completamente diferentes de acordo com o tecido que reside e/ou infiltra; e dependendo do microambiente ao qual é submetido, os eosinófilos podem desempenhar papéis de mantenedor homeostático à pro-resolução com retorno à homeostasia.

Por exemplo, no trato gastrointestinal, os eosinófilos residentes do intestino delgado atuam como mantenedores ativos da homeostase intestinal, permitindo ao hospedeiro lidar com a exposição constante e intensa a microrganismos potencialmente patogênicos e antígenos

estranhos e alimentares. Um estudo mostrou os eosinófilos sendo para promover a mudança de classe de imunoglobulinas para a IgA secretora, que é um componente envolvido na neutralização e regulação de microrganismos intestinais (Chu *et al.*, 2014)

Gouon-Evans e colaboradores (2000) demonstraram papel dos eosinófilos na regulação do desenvolvimento da glândula mamária pós-natal em camundongos. Segundo o artigo e similar ao observado para animais deficientes em IL-5, a ablação específica da presença de eosinófilos para as glândulas mamárias em animais com deficiência de eotaxina resultou em um número reduzido de ramos da árvore ductal mamária e de gomos terminais (isto é, os precursores dos botões alveolares).

Quanto ao ainda controverso papel homeostático para eosinófilos nos pulmões, análises de “microarray” revelaram que eosinófilos humanos do pulmão expressam vários genes, como *Anxa1*, *Nedd4*, *Runx3*, *Serpina11* e *Ldlr*, que estão envolvidos na manutenção da homeostase imunológica pulmonar e, especialmente, na regulação negativa das respostas das células Th2. Em concordância com estes dados, os camundongos Δ dblGATA^{-/-} exibem sensibilidade aumentada aos ácaros da poeira doméstica (Mesnil *et al.*, 2016), indicando que eosinófilos pulmonares residentes podem apresentar capacidade de prevenir a alergia das vias aéreas conduzida por resposta Th2. Esta função imunossupressora dos eosinófilos pulmonares residentes mostrou-se associada à capacidade eosinofílica de inibir a maturação e, portanto, a função pró-Th2 de células dendríticas carregadas com alérgeno (Mesnil *et al.*, 2016).

1.2.4. Eosinófilos desempenhando papel na pró-resolução da inflamação

Nos últimos anos, nosso grupo vem trabalhando com a hipótese de que o papel imunorregulador, homeostático e/ou pró-resolução dos eosinófilos é também mediado por mediadores lipídicos. De fato, estudos antigo do grupo mostram que o eicosanóides metabólitos da COX-2 (ou CO-2 acetilada), PGE₂ e LXA₄ produzidos por eosinófilos infiltrantes foram capazes de acelerar a resolução de edema alérgico em modelo experimental alérgico em ratos (Bandeira-Melo *et al.*, 1997).

Além disso, nosso grupo hipotetiza que eosinófilos são capazes de sintetizar mediadores lipídicos de caráter pró-resolução por conterem a maquinaria enzimática de síntese desses mediadores, as enzimas cPLA₂, 5-LO e 15-LO, que são biologicamente ativas nessas células. E, contribuindo com esta vertente, os eosinófilos são capazes de usar ácido docosaexaenóico (DHA) como substrato para metabolização pela via das lipoxigenases para sintetizar PD₁ (Protectina, um mediador lipídico anti-inflamatório e pró-resolutivo (Miyata *et al.*, 2013).

Juntos, esses aspectos indicam importante potencial dos eosinófilos no âmbito da resolução de processos inflamatórios.

1.3 Protocolos experimentais de obtenção de eosinófilos

Como apresentado acima, os eosinófilos são células muito importantes pois estão envolvidos em diversos processos imunológicos, podendo atuar tanto como efetores fisiopatológicos em processos alérgicos e infecções por helmintos, como células regulatórias mantenedoras de homeostase tecidual, com destaque para tecidos onde estes leucócitos residem de forma constitutiva, como o trato gastrointestinal, tecido adiposo, útero, glândulas mamárias e pulmão ((Marichal *et al.*, 2017). Portanto, devida a multifuncionalidade destas células, é de extrema importância realizar investigações sobre a fisiobiologia destas células multifacetadas e, para isso, aprimorar as técnicas de obtenção dessas células que possibilitem estudos *in vitro*.

O protocolo de purificação de eosinófilos humanos a partir do sangue de indivíduos doadores saudáveis é amplamente empregado e fornece informações valiosas sobre a fisiobiologia da célula. Entretanto este protocolo fornece (i) eosinófilos primários, e, portanto, de vida curta e de difícil manipulação genética; (ii) em números restritos a partir de grandes volumes de sangue; e (iii) a altos custos. Sem deixar de reconhecer a maior relevância de dados gerados a partir de células humanas, estudos *in vitro* empregando eosinófilos isolados a partir de camundongos nos possibilita ter menos variáveis que podem interferir no estudo pois podemos trabalhar com animais de mesmo sexo, idade, linhagem, ampliar o “n” de animais. Essa estratégia metodológica também pode ampliar o acesso a ferramentas, como animais geneticamente modificados, e às manipulações experimentais como sensibilização dos animais, estimulações e silenciamento *in vitro*.

O protocolo de obtenção de eosinófilos murinos mais empregado atualmente é o descrito por Dyer e colaboradores em 2008 (Dyer *et al.*, 2008). Estes autores – se valendo tanto do entendimento cada vez mais completo sobre as características únicas dos progenitores de eosinófilos, quanto da compreensão que as condições de cultura *ex vivo* estimuladas por citocinas necessitavam de adaptações para geração eficiente de eosinófilos puros e fenotipicamente maduros a partir dos progenitores de medula óssea – desenvolveram protocolo baseado em: (i) **fase inicial de proliferação** de células progenitoras mielóides da medula óssea de camundongos BALB/c induzidas pela combinação dos fatores FLT-3L e SCF (“ckit ligand”); e (ii) **fase de diferenciação** em eosinófilos induzida pela adição de IL-5 à cultura que gera eosinófilos maduros. Essa metodologia permite obter uma quantidade considerável de

eosinófilos, ao final da cultura celular *in vitro*, com mais de 90% de pureza (Dyer *et al.*, 2008). Muito embora o advento deste protocolo tenha permitido que estudos com eosinófilos murinos *in vitro* tenham sido realizados, pesquisadores que se interessam por este tipo de modelo experimental ainda encontram limitações, como: (i) o alto custo *versus* produtividade das culturas de diferenciação; (ii) a qualidade das células produzidas; e (iii) a restrição ao background BALB/c. Dessa forma, especialistas se beneficiariam de ajustes na metodologia.

2 JUSTIFICATIVA

Os eosinófilos desempenham atividade importante em diversos contextos, como já mencionado, como por exemplo (i) na proteção contra a infecção por helmintos e (ii) na indução de resposta inflamatória alérgica promovendo a sintomatologia da asma. Também são células capazes de sintetizar citocinas e mediadores lipídicos que atuam induzindo pró-homeostase tecidual e pró-resolução da inflamação. Por conta dessa plasticidade e atividade multifuncional desempenhada pelos eosinófilos, é de grande relevância termos técnicas de obtenção dessas células bem estabelecidas e caracterizadas para que possamos estudá-las *in vitro*.

Nosso grupo vem estudando a fisiobiologia de eosinófilos desde 1995, em que ao longo dos anos publicamos em revistas voltadas para o campo da Imunologia a versatilidade dessas células, como *Journal of Leukocyte Biology*, *Journal of Pharmacology*, *Journal of Immunology*, *Frontiers in Immunology*, etc. Eosinófilos são células de difícil manipulação e pouquíssimos laboratórios ao redor do mundo concentram suas pesquisas nesta célula. Nosso laboratório, assim, pode ser considerado pioneiro pois vem desempenhando um importante papel para a construção do conhecimento e estudo dessa célula ao longo de mais de duas décadas.

O método de diferenciação de eosinófilos segundo Dyer e colaboradores (2008) é bem estabelecido no Laboratório de Inflamação, é empregado desde 2008 e nos proporcionou o estudo *in vitro* dessa célula. Seguindo esse protocolo, é possível obter a diferenciação de eosinófilos a partir da medula óssea de camundongos. No entanto, é de grande interesse otimizar a diferenciação destes eosinófilos *in vitro*, visando uma maior produtividade na diferenciação de eosinófilos maduros. Naturalmente, ajustes na metodologia padrão poderiam incluir: (i) novos “pulsos” das citocinas já usadas para proliferação e diferenciação; (ii) aumento das concentrações empregadas de IL-5; e/ou (iii) adição de citocinas extras como IL-3 ou IL-33 às três já adicionadas à cultura do método padrão. Embora de interesse, estes ajustes acarretariam custos adicionais elevados ao já alto custo de relativa produtividade do protocolo. Como alternativa, postulamos um ajuste deste protocolo de diferenciação baseado no emprego de

medulas ósseas de camundongos que apresentem microambiente medular de caráter pró-eosinopoiético pré-estabelecido para iniciação da cultura de diferenciação *in vitro*.

Medulas ósseas provenientes de camundongos submetidos a modelos experimentais *in vivo* de reação inflamatória alérgica ou infecção helmíntica contém números elevados de eosinófilos visto que apresentam microambiente medular caracterizado pela presença aumentada de moléculas e células produtoras de fatores eosinopoiéticos – com a variedade e concentrações específicas de moléculas para uma eosinopoiese bem-sucedida. Dessa forma nossa hipótese prevê que culturas de diferenciação de eosinófilos seguindo o protocolo de Dyer e colaboradores (2008), mas iniciado a partir de medulas pró-eosinopoiéticas, devem gerar maior produtividade na geração dos eosinófilos bem como eosinófilos mais similares aos produzidos *in vivo*.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Aprimorar a metodologia de diferenciação de eosinófilos descrita por Dyer e colaboradores (2008), e utilizada de forma rotineira em nosso laboratório, através do emprego de medula óssea pró-eosinopoiética de camundongos sensibilizados com ovalbumina (modelo de inflamação alérgica) para iniciar o protocolo.

3.2 Objetivos Específicos

- Verificar se o protocolo de sensibilização alérgica, de uso rotineiro em nosso laboratório, promove um microambiente medular de caráter pró-eosinopoiético *in vivo*, comparando as medulas ósseas de camundongos BALB/c sensibilizados “*versus*” àquelas de animais não-sensibilizados.

- Investigar se a sensibilização alérgica de camundongos BALB/c *in vivo* otimiza a produção *in vitro* de eosinófilos, comparando a cinética e produto do protocolo *in vitro* de diferenciação de eosinófilos (de acordo com Dyer e colaboradores, 2008) iniciado a partir de células medulares obtidas de camundongos BALB/c sensibilizados “*versus*” não-sensibilizados

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

Para diferenciação de eosinófilos a partir de células de medula óssea (bmEos) utilizamos camundongos BALB/c de ambos os sexos com 6 a 8 semanas de idade, pesando entre 20 e 25 g, mantidos de 22 a 25°C e com livre acesso a água e comida. Os animais foram obtidos do Biotério do Laboratório de Inflamação no IBCCF – UFRJ. Os procedimentos de experimentação animal foram aprovados pelo CEUA/UFRJ, sob protocolo de número 065.



Figura 5. Diferenciação de eosinófilos in vitro iniciada a partir de células de medula óssea (bmEos) utilizamos camundongos BALB/c

4.2 Sensibilização alérgica dos animais

Camundongos BALB/c foram sensibilizados com injeção dorsal subcutânea (s.c.) de 200 µL de solução contendo 50 µg de ovalbumina (OVA grade V – Sigma) e 5 mg de Hidróxido de Alumínio Al(OH)_3 em 0.9 % (w/v) NaCl por animal nos dias 0 e 7. Todas as sensibilizações foram realizadas em grupos pareados em que um grupo era de animal sensibilizados e outro grupo de animais não sensibilizados,

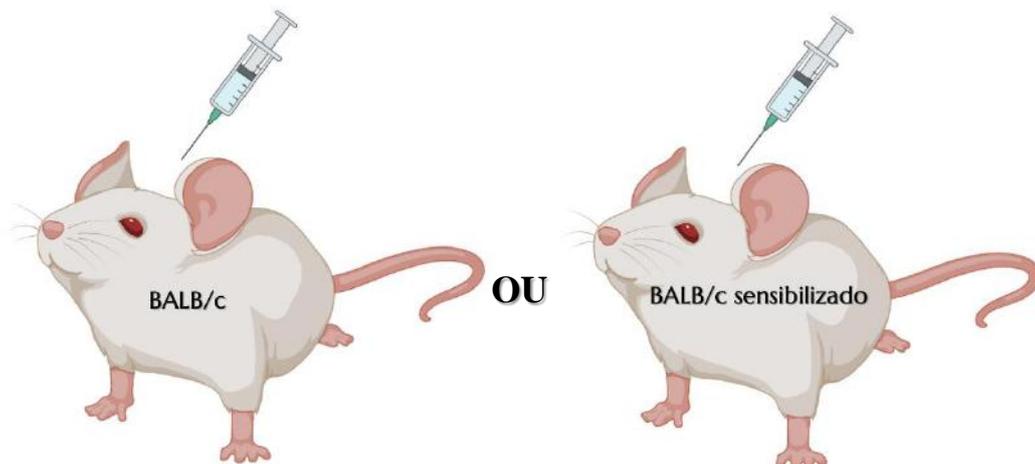


Figura 6. Sensibilização alérgica com injeção dorsal subcutânea em camundongos BALB/c.

4.3 Obtenção das células da medula óssea de camundongos

As células da medula óssea foram coletadas dos fêmures e tíbias de camundongos BALB/c de mesma idade e gênero, sensibilizados ou não no 14º dia após primeira sensibilização. As epífises dos ossos foram retiradas e foram feitos lavados das medulas com RPMI-1640 (Sigma), utilizando uma seringa com agulha 26G. As células recolhidas foram centrifugadas a 800 rpm por 5 min, e ao pellet foi adicionado salina 0,2% seguida de 1,6% para lisar as hemácias presentes. As células livres de hemácias foram centrifugadas novamente na mesma velocidade, o sobrenadante recolhido e armazenado para posterior quantificação de mediadores, as células ressuspendidas em meio RPMI (20% SFB) para cultura de células, e alíquotas destas células separadas para contagem de células totais e diferenciais.

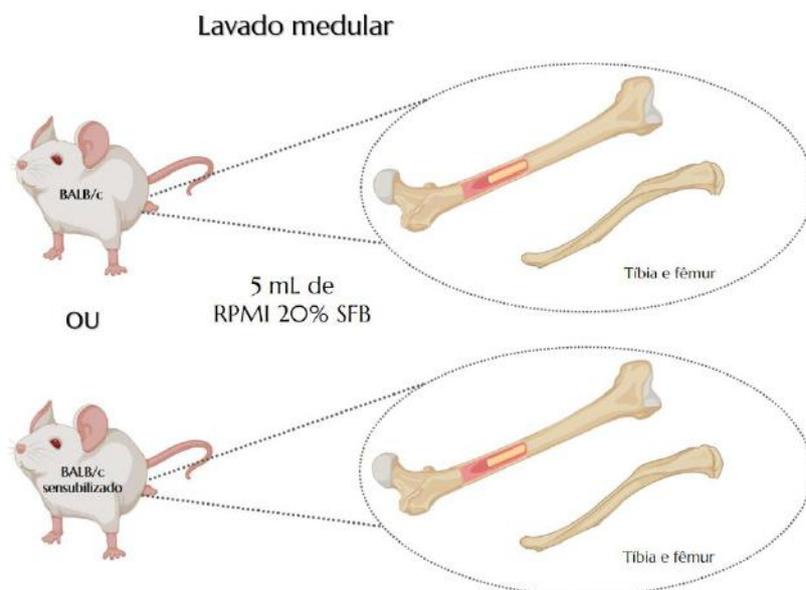


Figura 7. Obtenção das células da medula óssea de camundongos em camundongos BALB/c naive ou BALB/c sensibilizados.

4.4 Análise do impacto da sensibilização alérgica no microambiente medular

Com a coleta do lavado medular de animais sensibilizados e “naive”, algumas análises foram realizadas para avaliar se a sensibilização alérgica induz microambiente medular com característica pró-eosinopoiese, incluindo: (i) contagem das células totais, em que as células foram coradas com Trypan Blue 0,4% e contadas na Câmara de Neubauer; (ii) análise diferencial dos leucócitos medulares, por coloração com Panótipo das células para avaliar o percentual de eosinófilos medulares; e (iii) quantificação de moléculas com caráter eosinopoético, especificamente a dosagem de citocinas IL-3 e IL-5 por ELISA e eicosanóides LTC₄ e PGD₂ por EIA (detalhes abaixo).

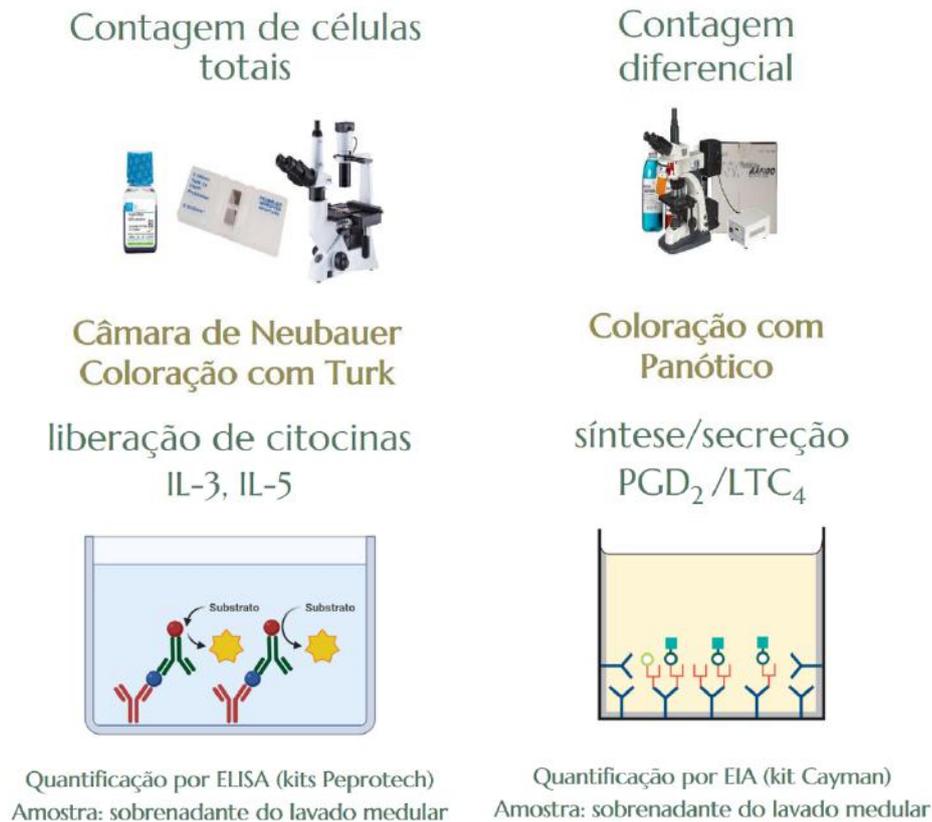


Figura 8. Parâmetros analisados: impacto da sensibilização alérgica no microambiente medular

4.5 Protocolo de diferenciação de eosinófilos *in vitro* de acordo com Dyer e colaboradores (2008)

As células foram cultivadas em RPMI-1640 (Sigma) com 20% de SFB, bicarbonato de sódio (2g – Sigma) e 1% de antibiótico (penicilina e estreptomicina), suplementado com piruvato de sódio (10 µl/mL - Gibco), aminoácidos não essenciais (10 µl/mL - Gibco) e β-mercaptop (0.0004 µl/mL). As células foram mantidas a uma concentração de 1×10^6 células/mL.

Do dia 0 ao dia 4 de cultura, o meio foi suplementado com 100 ng/mL de fator de célula tronco murino recombinante (rmSCF - Peprotech) e 100 ng/mL de ligante de FLT3 murino recombinante (FLT3-L - Peprotech). A partir do dia 4, o meio contendo SCF e FLT3-L foi substituído por meio contendo 10 ng/mL de IL-5 murina recombinante (rmIL-5 - Peprotech). Com 8 dias de cultura, as células foram transferidas para garrafas novas e mantidas em meio fresco suplementado com rmIL-5 (10 ng/mL). Desse ponto em diante, metade do meio foi substituído por meio fresco contendo rmIL-5 a cada dois dias e a concentração das células foi reajustada para 1×10^6 células/mL. Ao final de 14 dias de cultura, eosinófilos diferenciados com mais de 99% de viabilidade foram obtidos e a pureza das populações foi analisada (definição do percentual de eosinófilos).

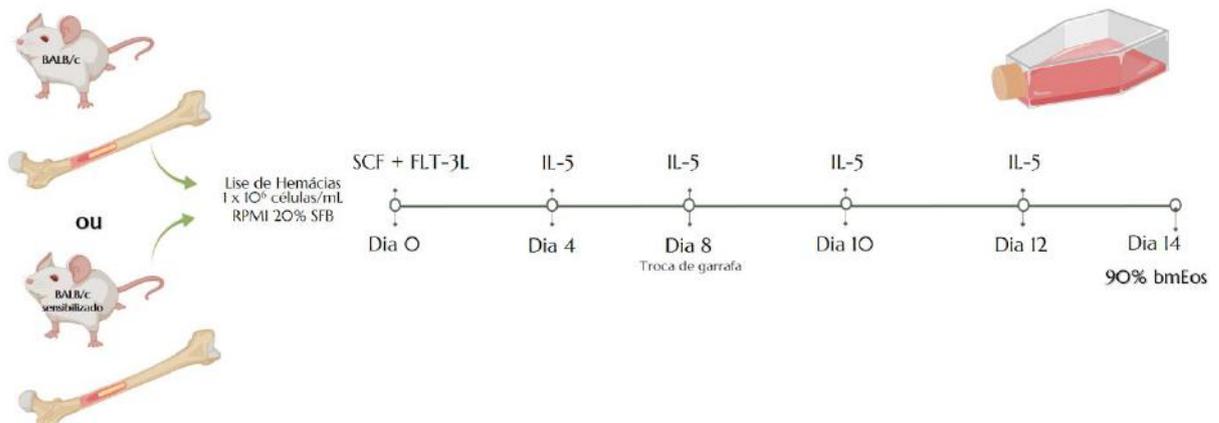


Figura 9. Diferenciação in vitro de eosinófilos murinos de animais “naive” e sensibilizados

4.6 Análise de proliferação e diferenciação celular ao longo da cultura *in vitro* de eosinófilos

Nos dias de manutenção da cultura, dia 4 (quatro), 8 (oito), 10 (dez), 12 (doze) e 14 (quatorze) foram retiradas alíquotas de células, e estas coradas com Azul de Trypan para contagem total das células em Câmara de Neubauer e avaliação da viabilidade celular.

Foram coletadas também da cultura nos mesmos dias de análise, alíquotas de células que foram citocentrifugadas e coradas com kit Panótico para análise do processo de diferenciação dos eosinófilos ao longo da cultura, quantificando a porcentagem de eosinófilos já diferenciados em relação à população total de células.

Sobrenadantes livres de células foram armazenados congelados (a -80°C) para posterior análise dos níveis de IL-3 e IL-33 ao longo da cultura de células nestes mesmos dias (4, 8, 10, 12 e 14) por kits de ELISA específicos.



Figura 10. Parâmetros analisados: Análise de proliferação, diferenciação celular e liberação de citocinas ao longo da cultura in vitro de eosinófilos.

4.6.1 Estimulação das células *in vitro*

Eosinófilos murinos diferenciados *in vitro* (recolhidos no 14º dia de cultura) foram incubados *in vitro* na concentração de 3×10^6 células/mL em HBSS^{+/+} com os estímulos PGD₂ (25 µM) ou BW245c (agonista seletivo DP₁; 25 µM) por 1 hora a 37 °C. Após citocentrifugação, eosinófilos foram corados com ósmio (detalhes abaixo) para contagem de corpúsculos lipídicos, e o sobrenadante celular foi armazenado a -80°C para posterior dosagem de citocinas e eicosanóides.



Figura 11. Estimulação *in vitro* dos eosinófilos murinos diferenciados *in vitro* (recolhidos no 14º dia de cultura).

4.6.2 Quantificação de corpúsculos lipídicos citoplasmáticos

Eosinófilos (citocentrifugados) foram fixados com formalina 3,7% por no mínimo de 1 h. Em uma capela de exaustão, as lâminas contendo células foram lavadas com água e incubadas com ácido cacodílico 0,1 M (Sigma). Após esta etapa, as lâminas foram submetidas a uma primeira incubação com tetróxido de ósmio (1,5%) por 30 min, logo foram lavadas e foi adicionada uma solução de TCH (thiocarbohidrazida 1% - Sigma). Após 3 min, as lâminas foram cobertas com ácido cacodílico, seguida de uma segunda incubação com tetróxido de ósmio por 5 minutos e então lavadas com água. Os corpúsculos lipídicos foram contados em 50 células com auxílio de um microscópio óptico com aumento de 1000x, e em seguida foi calculado um valor médio de corpúsculos lipídicos/eosinófilo utilizado como parâmetro de ativação celular.



Figura 12. Parâmetros analisados: biogênese de corpúsculos lipídicos.

4.6.3 Análise da produção de eicosanóides

A quantificação de eicosanóides – leucotrienos cisteínados ($LTC_4/D_4/E_4$) e PGD_2 – foi feita nos sobrenadantes dos lavados medulares e das culturas de diferenciação de eosinófilos utilizando kits de EIA de acordo com as instruções do fabricante (Cayman Chemical). A metodologia baseia-se em um ensaio de competição, onde a uma placa de 96 poços contendo anticorpos de captura (“coat”) foram adicionadas amostras ou padrão, “tracer” e anticorpos, e a placa foi incubada *overnight*, 4°C. Após 5 lavagens, a reação foi revelada adicionando o reagente Ellman's. A intensidade da coloração – inversamente proporcional à quantidade de eicosanóide contida na amostra – foi quantificada em comprimento de onda de 405 nm. Com os valores da curva padrão foi realizada regressão não-linear no programa GraphPad Prism 6 para determinação da concentração de eicosanóides presentes nas amostras.



Figura 13. Parâmetros analisados: síntese e secreção de eicosanóides.

4.6.4 Quantificação de citocinas

A análise dos níveis das citocinas eosinopoiéticas IL-3, IL-5 e IL-33 – foi feita nos sobrenadantes dos lavados medulares e das culturas de diferenciação de eosinófilos empregando kits de “Enzyme-Linked Immunosorbent Assay” (ELISA; Preprotech) de acordo com as instruções do fabricante.

Para recobrir a placa de 96 poços foi adicionado anticorpo de captura (nas concentrações indicadas pelos kits), por 18 h a 4°C. A placa foi lavada em tampão contendo bicarbonato e tartrazina, e bloqueada com PBS contendo 1% albumina de soro bovino por 1 h a 20°C. Após a incubação outra lavagem foi realizada, seguida da aplicação por 1 h a 4°C das amostras e dos padrões com diluições seriadas, conforme recomendação do fabricante.

Na sequência, a placa foi lavada com tampão contendo cloreto de sódio, fosfato de sódio, cloreto de potássio, trimerosal e tween 20 para posterior adição do anticorpo de detecção, permanecendo incubada por 1 h. Decorrido esse tempo, a placa foi novamente lavada com o mesmo tampão e adicionou-se a enzima estreptoavidina, por 1 h. O substrato (K-Blue) foi adicionado e a reação foi interrompida com H₂SO₄ (0,19 M). A leitura da placa foi realizada com a utilização de um espectrofotômetro (450 nm). Os resultados obtidos foram expressos como pg/mg.

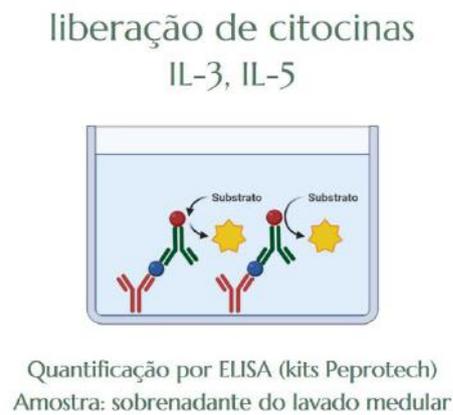


Figura 14. Parâmetros analisados: síntese e secreção de citocinas.

4.7 Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism 5.0. Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). Análise estatística foi avaliada empregando teste de Análise de Variância One-Way ANOVA, seguido por Newman Keuls, em que foram considerados significativos quando $p \leq 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Impacto da sensibilização alérgica de camundongos BALB/c no microambiente medular: ênfase na análise de características eosinopoiéticas

5.1.1 A sensibilização alérgica induz eosinofilia medular

Como ilustrado na **Figura 5**, o protocolo de sensibilização alérgica de camundongos BALB/c rotineiramente empregado em nosso laboratório (2 injeções subcutâneas de ovalbumina e AIOH; como descrito em Métodos) promoveu clara indução eosinofilia medular; com aumento do percentual (**Figura 5A**) e número total (**Figura 5B**) de eosinófilos encontrado no espaço medular quando comparado com animais “naives” não-sensibilizados

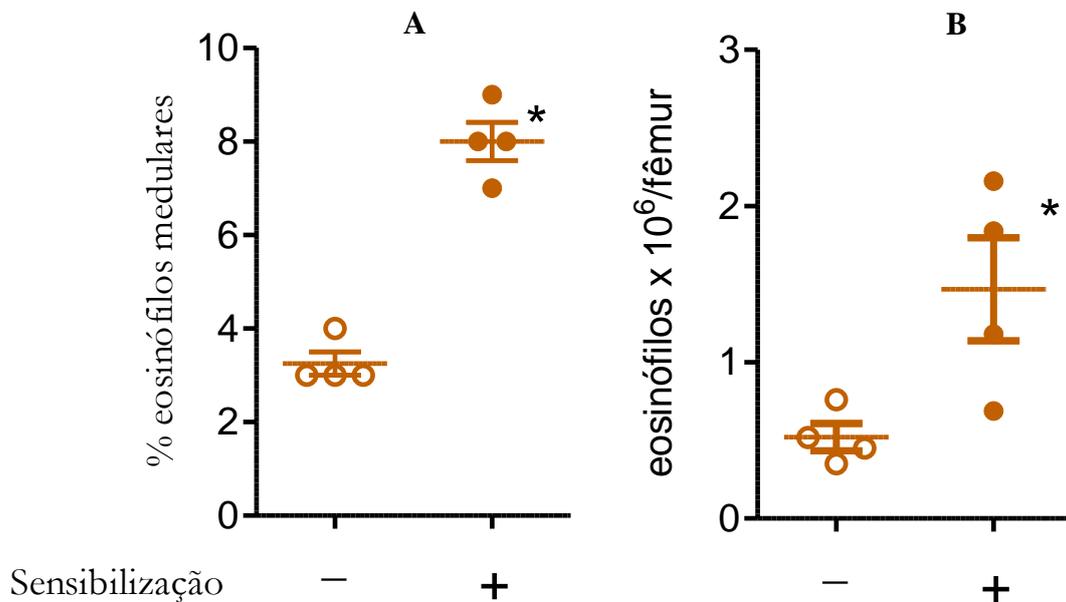


Figura 15. Sensibilização alérgica induz eosinofilia medular. O percentual (A) e número total (B) de eosinófilos na medula óssea dos animais BALB/c sensibilizados ou não-sensibilizados foram obtidos como descritos em Métodos. Valores mostram média \pm EPM calculados a partir de 4 animais não-sensibilizado e 4 sensibilizados em (A) e média \pm EPM calculados a partir de 5 animais não-sensibilizado e 5 sensibilizados em (B). * $p < 0.05$.

5.1.2 Sensibilização alérgica parece induzir aumento de citocinas e eicosanóides de caráter eosinopoiético no lavado medular

Como pode ser observado abaixo na **(Figura 6A)**, os gráficos mostram importante tendência de aumento dos níveis das citocinas eosinopoiéticas IL-3 e IL-5 (análise estatística não realizada ainda pois necessitamos aumentar o número de amostras analisadas; até o momento temos $n = 3$ para BALB/c não-sensibilizados e apenas $n = 1$ para animais sensibilizados) no espaço medular de animais submetidos à sensibilização alérgica em comparação a animais “naive”. Mais ainda, este perfil de tendência de aumento também foi observado para os eicosanóides PGD₂ e LTC₄ **(Figura 6B)** – mediadores lipídicos com reconhecido papel no controle da população eosinofílica.

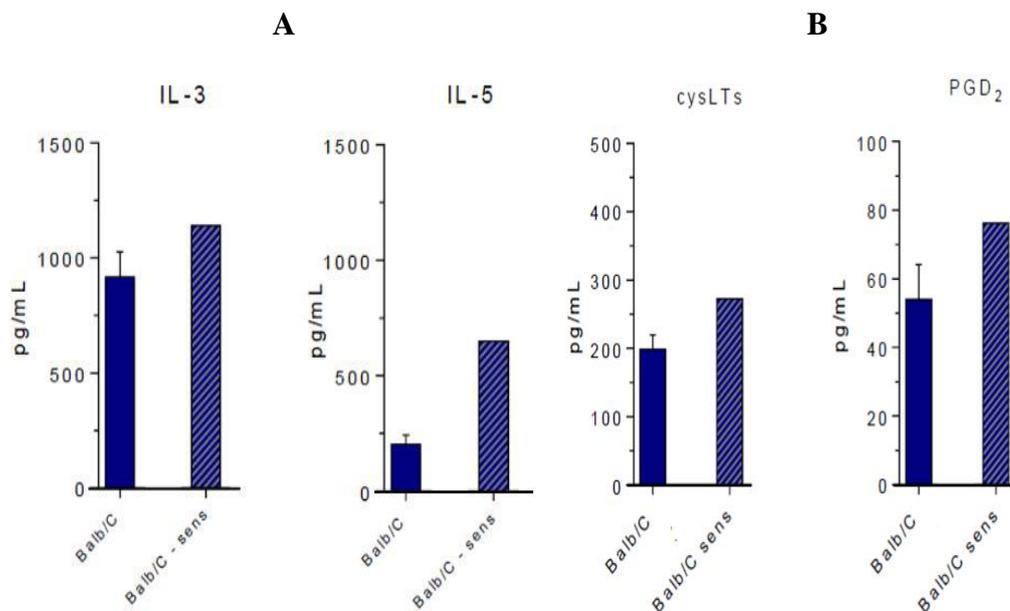


Figura 16. Sensibilização alérgica de animais BALB/c parece modificar padrão de citocinas eosinopoiéticas e eicosanóides de caráter eosinofílico presentes no microambiente medular in vivo. **(A)** Os níveis de citocinas IL-3 e IL-5 foram dosados por ELISA e **(B)** níveis de cysLTs e PGD₂ dosados por EIA no sobrenadante livre de células do flushing da medula óssea dos animais BALB/c sensibilizados ou não. Valores mostram médias \pm EPM de 3 animais não-sensibilizados e 1 animal sensibilizado.

5.2 Impacto da sensibilização alérgica de camundongos BALB/c na cultura *in vitro* de eosinófilos

5.2.1 Sensibilização parece induzir aumento de IL-3 (função na proliferação de precursores eosinofílicos) ao longo da cultura de diferenciação.

De forma similar ao observado para alterações ocasionadas pela sensibilização alérgica no espaço medular *in vivo*, foram também observadas alterações nos níveis da citocina eosinopoiética IL-3 quantificada nos sobrenadantes livres de células recolhidos ao longo dos dias do protocolo de diferenciação *in vitro* de eosinófilos (**Figura 7**). Em particular no 8º dia de cultura iniciada com células medulares de camundongo BALB/c sensibilizado, intenso aumento na concentração de IL-3 foi detectado no sobrenadante da cultura em comparação aos níveis de IL-3 encontrados nas culturas iniciadas com células medulares de camundongos BALB/c “naives” (**Figura 7A**). Destacamos ainda que os níveis de IL-33 acompanhado ao longo da cultura de diferenciação não se mostrou alterado em nenhum dia analisado (**Figura 7B**).

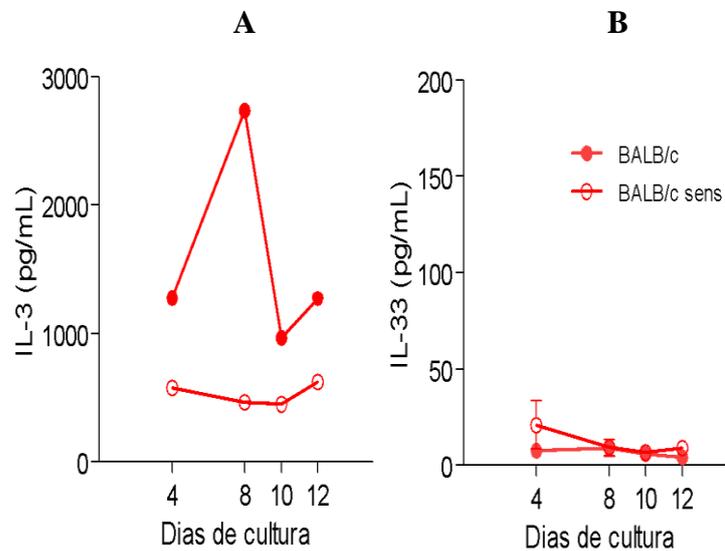


Figura 17. Sensibilização alérgica de animais BALB/c modifica padrão da citocina eosinopoiética IL-3 ao longo dos dias de cultura de diferenciação de eosinófilos *in vitro*. (A) Os níveis de citocinas IL-3 e (B) IL-33 foram dosados por ELISA no sobrenadante livre de células provenientes dos dias 4, 8, 10 e 12 da cultura iniciadas com células medulares provenientes de animais sensibilizados ou não-sensibilizados (animais “naives”). Valores mostram médias \pm EPM de 3 animais não-sensibilizados e 1 animal sensibilizado.

5.2.2 Perfil de diferenciação de eosinófilos *in vitro* ao longo da cultura é semelhante entre as culturas iniciadas com medulas de animais sensibilizados e não-sensibilizados.

Em concordância com o resultado preliminar (**Figura 7B**) que parece indicar que a sensibilização *in vivo* não altera, ao longo do processo *in vitro* de diferenciação eosinofílica, os níveis de IL-33 – molécula com reconhecida função na diferenciação de eosinófilos – produzidos pela cultura *in vitro*, o perfil de diferenciação *in vitro* de eosinófilos (analisado pela determinação do percentual de eosinófilos durante os 14 dias diferenciação *in vitro*) também mostrou que a sensibilização alérgica *in vivo* não altera a cinética de diferenciação de eosinófilos ao longo do protocolo *in vitro* estabelecido por Dyer e colaboradores (2008) que emprega originalmente camundongos “naive” (**Figura 8**).

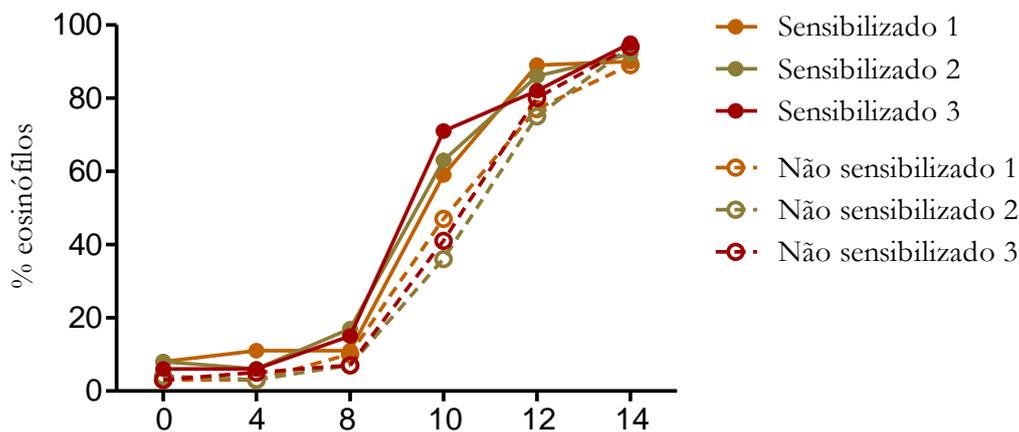


Figura 18. Semelhança no perfil de diferenciação eosinofílica entre culturas iniciadas com células provenientes de animais sensibilizados e “naives”. O percentual de eosinófilos nas culturas *in vitro* de eosinófilos iniciadas a partir de células medulares oriundas provenientes dos animais BALB/c sensibilizados ou não foi obtido através da contagem de lâminas coradas com Panótipo. Valores mostram 3 animais não-sensibilizado e 3 sensibilizados.

5.2.3 Sensibilização alérgica *in vivo* induz aumento na produtividade *in vitro* do protocolo de diferenciação de eosinófilos.

Em função de aparente potencial amplificação da capacidade eosinopoiética (elevação do fator de proliferação IL-3) (**Figura 7A**) do protocolo *in vitro* de diferenciação de eosinófilos induzida pela sensibilização alérgica *in vivo* dos animais doadores das medulas usadas para iniciar a cultura, postulamos que a produção de eosinófilos ao final dos 14 dias do protocolo de diferenciação encontraria-se aumentada. E de fato, como ilustrado na **Figura 9**, o número total de eosinófilos recuperados ao final de culturas convencionais geradas a partir de camundongos

“naive” é inferior àquele produzido pelas culturas iniciadas a partir de animais previamente sensibilizados.

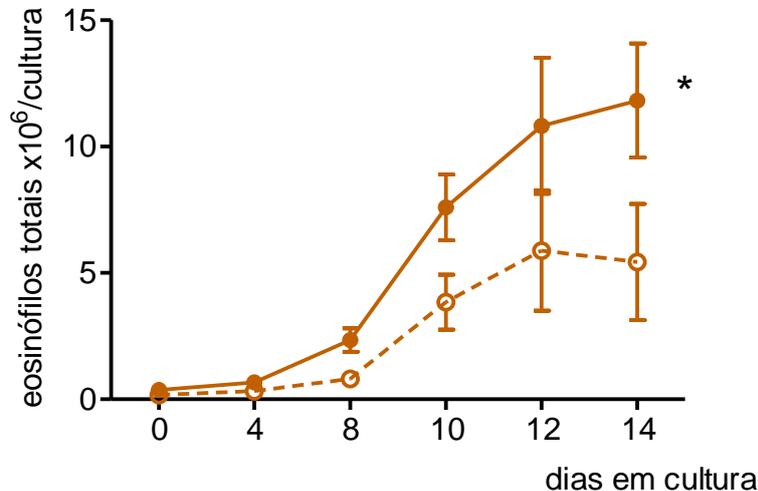


Figura 19. Sensibilização alérgica *in vivo* induz aumento na produção total de eosinófilos na cultura montada a partir de animais sensibilizados. O número total de eosinófilos nas culturas *in vitro* de eosinófilos iniciadas a partir de células provenientes dos animais BALB/c sensibilizados ou não foi obtido através da contagem total de células coradas com Trypan Blue (0.4%) e diferencial em células coradas por Panótico. Valores mostram médias \pm EPM de 3 animais não-sensibilizados e 3 sensibilizados. * $p < 0.05$.

5.2.4 Eosinófilos gerados *in vitro* a partir de células medulares de animais submetidos à sensibilização alérgica *in vivo* são biologicamente responsivos à estimulação *in vitro*.

A obtenção de eosinófilos murinos a partir do protocolo convencional de Dyer e colaboradores (2008) tem como objetivo primário permitir estudos funcionais *in vitro* com estas células isoladas. Para tanto, foi essencial que nos certificássemos que a alteração adicionada ao protocolo (sensibilização alérgica) neste estudo não diminuía a responsividade *in vitro* dos eosinófilos produzidos. Como mostrado na **Figura 10**, os eosinófilos obtidos no 14º dia do protocolo de diferenciação *in vitro* iniciado a partir de células medulares de animais sensibilizados mostram-se biologicamente responsivos à estimulação *in vitro*. Mais detalhadamente, observamos que:

(i) ao sair da cultura de diferenciação (14º dia), os eosinófilos gerados *in vitro* a partir de camundongos sensibilizados parecem conter números discretamente aumentados de corpúsculos lipídicos citoplasmáticos quando comparados aos eosinófilos gerados a partir de animais “naive” (a comparação estatística ficou impossibilitada em função de termos ainda apenas $n = 2$ para eosinófilos gerados a partir de animais não-sensibilizados);

(ii) muito embora seja amplamente estabelecido que eosinófilos produzidos *in vitro* pelo protocolo convencional (a partir de animais “naive”) respondam à estimulação com PGD₂ ou BW245c com biogênese de novos corpúsculos lipídicos (Mesquita-Santos *et al.*, 2011), em nossos 2 ensaios mostrados aqui não observamos tal efeito (postulamos que o atípico elevado número de organelas nas células controles dificultou a estimulação; o n experimental precisa ser aumentado); e

(iii) a estimulação *in vitro* dos eosinófilos gerados a partir de animais sensibilizados com PGD₂ (25 μM) ou BW245c (25 μM) promoveu rápida (1 h) formação de novos corpúsculos lipídicos, indicando que estes eosinófilos são biologicamente ativos e aparentemente mais preparados (“priming”) à estimulação para ativação celular.

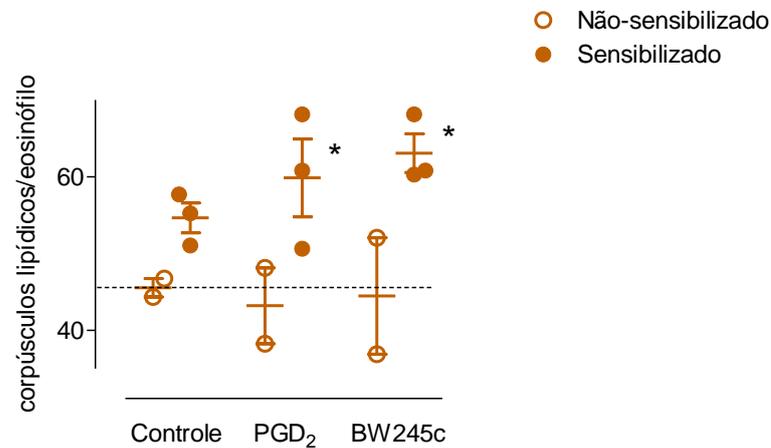


Figura 20. Sensibilização alérgica *in vivo* potencializa em eosinófilos produzidos *in vitro* a indução da biogênese de corpúsculos lipídicos induzida *in vitro* pela estimulação por PGD₂ e BW245c. A contagem dos corpúsculos lipídicos em eosinófilos gerados *in vitro* de acordo com Dyer e colaboradores (2008) a partir de células medulares de animais BALB/c sensibilizados ou não, foi realizada em células coradas com Tetróxido de Ósmio. Eosinófilos recuperados no 14º dia do protocolo de diferenciação foram estimulados por 1 h a 37°C com 25 μM dos prostanóides indicados no gráfico. Valores mostram média ± EPM de 2 animais não-sensibilizados e 3 sensibilizados. *p < 0.05.

6 DISCUSSÃO

Em busca de modificações de baixo custo que resultem em uma maior produtividade do protocolo *in vitro* para obtenção de eosinófilos murinos, de uso rotineiro em nosso laboratório, em nosso estudo, verificamos que a simples sensibilização alérgica de camundongos BALB/c foi de fato uma estratégia experimental eficaz de otimização do protocolo *in vitro* de diferenciação eosinofílica.

A sensibilização alérgica com a injeção subcutânea contendo ovalbumina e hidróxido de alumínio em camundongos BALB/c, assim como o protocolo *in vitro* de diferenciação eosinofílica, correspondem a técnicas utilizadas rotineiramente em nosso laboratório, com vários artigos publicados ao longo dos anos se valendo dessas metodologias (Amorim *et al.*, 2020; Luna-Gomes *et al.*, 2011). Apesar disso, não tínhamos, até então, caracterizado o impacto que a sensibilização causa na medula de animais submetidos a esse protocolo experimental.

A sensibilização alérgica, de forma bem geral, culmina na ligação de imunoglobulinas IgE ao receptor FcεRI de alta afinidade presente principalmente em mastócitos. Esse processo ocorre em função de exposição inicial a alérgenos que, após processamento por células dendríticas, são apresentados por estas para linfócitos T “naives” e conduzem a diferenciação destes em linfócitos T auxiliares foliculares para um fenótipo do tipo Th2. Esses linfócitos Th2 secretam, principalmente, IL-4, IL-5 e IL-13. A IL-4 induz a troca de classe de IgE em linfócitos B, de forma que plasmócitos passem a produzir IgE. IgEs específicas contra o antígeno inicial, por sua vez, “sensibilizam” os mastócitos ligando-se ao FcεRI, e uma exposição posterior ao alérgeno ativa os mastócitos a secretarem os mediadores responsáveis pelas reações patológicas de hipersensibilidade imediata (Abbas, Lichtman e Pillai, 2019)

Nossa motivação de utilizar a sensibilização alérgica como ajuste do protocolo de diferenciação eosinofílica segundo Dyer e colaboradores (2008) foi por conta de ser um método eficiente em promover o shift para resposta imunológica do tipo 2, que, como mencionado anteriormente, é mediado pelas citocinas que inclui a IL-5, secretada por células Th2 e também ILC2s (Abbas, Lichtman e Pillai, 2019). Principalmente via ação da IL-5, as células Th2 montam uma inflamação de caráter eosinofílico principalmente (Coffman, 1989). Como já descrito ao longo dessa Monografia, a IL-5 é uma citocina importante para a diferenciação

seletiva de eosinófilos (Sanderson, 1992). De forma resumida, a sensibilização alérgica através da injeção subcutânea de ovalbumina e hidróxido de alumínio em camundongos BALB/C, sabidamente monta uma resposta Th2 efetiva, aumenta o perfil de citocinas que são importantes para promover a eosinofilia medular, o que foi comprovado através de nossos experimentos.

Durante a sensibilização utilizamos como adjuvante o hidróxido de alumínio e diversos fatores nos motivaram para isso. Primeiramente é o químico mais utilizado como adjuvante (He, Zou e Hu, 2015). Além disso, os adjuvantes promovem interações entre antígenos e células imunes por longos períodos e prolongam as respostas imunes; os antígenos se agregam na superfície e no interior das partículas adjuvantes à base de hidróxido de alumínio, o que auxilia na manutenção das características físicas e químicas dos antígenos (He; Zou; Hu, 2015). O hidróxido de alumínio em combinação com antígenos forma partículas, que contribuem para a absorção pelas APCs. (Mannhalter *et al.*, 1985). Além do mais, o hidróxido de alumínio é sabidamente um forte indutor de resposta imunológica do tipo 2 (Grun e Maurer, 1989). Também, como já mencionado, esse protocolo é utilizado de forma rotineira em nosso laboratório, sem interferir na diferenciação *in vitro* de eosinófilos e o custo adicional para desempenhar a sensibilização é irrisório, sendo praticamente o mesmo que custo de um protocolo de diferenciação sem a sensibilização alérgica.

De fato, nossos dados confirmam que a sensibilização parece promover um ambiente diferenciado multifatorial, que induz a atuação de moléculas com efeito direto sobre a eosinofilia e promove um aumento do percentual de eosinófilos já na medula óssea dos camundongos BALB/C sensibilizados em comparação com os “naives”. Isso é comprovado pelo aumento do percentual de eosinófilos medulares, de citocinas sabidamente reguladoras da proliferação e diferenciação de eosinófilos (IL-3 e IL-5) e eicosanóides (PGD₂ e LTB₄) com caráter eosinopoiético. Muito embora não seja clássico se pensar em LTC₄ e PGD₂ como moléculas eosinopoiéticas como é o caso de IL-3 e IL-5, nós estudamos o papel desses eicosanóides por conta de serem moléculas reguladoras dos eosinófilos.

Vimos que sensibilização alérgica de animais BALB/c promoveu *in vitro* aumento do número total de eosinófilos e modificou o padrão da citocina IL-3 ao longo dos dias de protocolo de Dyer e colaboradores (2008) de diferenciação de eosinófilos *in vitro*. Como não adicionamos IL-3 no processo de diferenciação *in vitro* de eosinófilos murinos, esses resultados, juntos, mostram a existência de um perfil diferenciado da medula proveniente de animais sensibilizados, como já mencionado. Foi quantificado a IL-3 também na cultura *in vitro* de células provenientes de animais não sensibilizados, porém, quando observamos a curva

relacionada à cultura de células provenientes de animais sensibilizados, esse perfil é aumentado, com destaque para o pico de IL-3, que se dá no dia 8 da cultura *in vitro*, correspondente ao fim da fase inicial de proliferação dos progenitores eosinofílicos. Postulamos que a presença desses níveis aumentados de IL-3 pode ter contribuído para que o número aumentado de eosinófilos produzidos na cultura *in vitro* proveniente de animais sensibilizados, quando comparado com a cultura montada a partir de animais “naives”. Fica claro que o protocolo *in vitro* convencional de Dyer e colaboradores (2008) não recapitula todas as moléculas que agem no espaço medular para garantir a eosinopoiese que se tem *in vivo*. Mais ainda, nos parece que enquanto a sensibilização alérgica parece reconstituir ao menos a presença de um destes componentes moleculares (IL-3) fundamentais para a proliferação dos precursores eosinofílicos ao protocolo *in vitro*, não parece recuperar todos (IL-33). A citocina IL-33 a nível medular regula a expansão do precursor de eosinófilos, regula positivamente a expressão de IL-5R α em precursores de eosinófilos e induz outra célula (ainda não identificada) na medula óssea a produzir IL-5, que promove a maturação final dos eosinófilos (Johnston e Bryce, 2017). O protocolo de Dyer e colaboradores (2008) não inclui adição desta citocina fundamental e mesmo a sensibilização alérgica falhou em criar um microambiente que *in vitro* promovesse a presença de IL-33. Dessa forma fica claro que, apesar da sensibilização alérgica ter “adicionado” IL-3 ao sistema *in vitro* impactando a magnitude da produção final de eosinófilos no 14º dia, mesmo com o emprego da sensibilização a protocolo *in vitro* de obtenção de eosinófilos murinos ainda se encontra comprometido quanto à recapitulação da característica multifatorial da eosinopoiese *in vivo* que deve impactar a fidelidade do perfil estrutural/funcional dos eosinófilos produzidos.

A sensibilização alérgica dos animais doadores das células medulares empregada para iniciar a cultura não modificou a viabilidade dos eosinófilos gerados no 14º dia de diferenciação *in vitro* quando comparado ao nível de viabilidade do protocolo convencional (~90%; dados não mostrados). Mais ainda, observamos também padrões similares na cinética temporal de diferenciação eosinofílica ao longo dos 14 dias de cultura entre animais sensibilizados e “naives” com ambas as condições alcançando pureza de ~90%. A única alteração embutida pela sensibilização prévia dos animais doadores de células medulares foi o significativo aumento na magnitude da produção de eosinófilos ao final da cultura, indicando que enquanto a IL-5 exógena adicionada à cultura *in vitro* parece ser suficiente para induzir a diferenciação celular e inibição da apoptose (manutenção de sobrevivência celular), fatores que induzem a proliferação de precursores eosinofílicos são adicionados à cinética pela pré-sensibilização (como a IL-13).

Outro aspecto que ainda necessita de nossa atenção na continuação desse estúdio refere-se à “qualidade” das células geradas pelo protocolo convencional bem como por este que inclui a pré-sensibilização dos animais. Especificamente, uma melhor caracterização dos eosinófilos gerados *in vitro* e identificação de diferenças morfofuncionais entre os eosinófilos produzidos *in vivo* na medula do animais e estes obtidos *in vitro* precisam ser estudadas. Aqui verificamos que os eosinófilos obtidos na cultura *in vitro* iniciadas a partir de animais sensibilizados são responsivos e biologicamente ativos, de forma similar aos produzidos no protocolo convencional (Amorim *et al.*, 2018; da Silva Marques *et al.*, 2021). Aqui faz-se importante destacar que para este “set” de experimentos, os níveis basais de corpúsculos lipídicos citoplasmáticos encontravam-se atipicamente elevados para células não estimuladas o que dificultou nossas análises. Entretanto, mesmo a partir desse conteúdo citoplasmático elevado, a estimulação *in vitro* dos eosinófilos produzidos a partir animais pré-sensibilizados com estímulos sabidamente indutores de biogênese de corpúsculos lipídicos promoveu formação de novas organelas. Essa observação revela que estas células estão viáveis, mantém sua capacidade de ativação funcional, respondem à estimulação específica e expressam (como deveriam) receptores eosinofílicos, incluindo o DP₁ para a PGD₂.

Nossa conclusão de que um aumento da “produtividade” do protocolo convencional foi alcançado por nossa estratégia de otimização se baseia na análise de custos que revela que apenas a implementação *in vivo* da sensibilização alérgica (seringa/ovalbumina/hidróxido de alumínio) do animal doador das células de medula óssea que soma valor irrisório ao protocolo *in vitro* de custo elevado (~ 3 mil reais/medula inicial), quase o triplo de eosinófilos *in vitro*.

Juntos, esses dados mostram que a sensibilização alérgica *in vivo* impactou gerando tanto um microambiente medular de caráter pró-eosinopoiético quanto impactando positivamente a cultura de diferenciação *in vitro* de eosinófilos conferindo aumento da produtividade para um custo similar.

Naturalmente, ensaios para aumentar o “n” experimental de nosso projeto, incluindo a quantificação das citocinas IL-3, IL-5 e IL-33 no lavado medular ainda se fazem necessários. Quanto às análises adicionais que serão realizadas para conclusão de nosso projeto, *in vivo* ainda caracterizaremos para fins de comparação os eosinófilos provenientes das medulas de animais *sensibilizados*, também os *eosinófilos* produzidos no protocolo convencional *versus* eosinófilos gerados no protocolo otimizado aqui, quanto:

(i) ao conteúdo citoplasmático de corpúsculos lipídicos;

- (ii) nível de expressão de algumas moléculas de membrana incluindo IL-5R α , Siglec-F, CCR3 (Rosenberg, Dyer e Foster, 2013) e CD69 (molécula marcadora de ativação eosinofílica);
- (iii) composição intragranular de citocinas pré-formadas e armazenadas, incluindo IL-4, IL-10 e a quimiocina RANTES que em eosinófilos maduros são sabidamente estocadas (Rosenberg, Dyer e Foster, 2013) e
- (iv) capacidade de síntese de leucotrienos, avaliando a produção de LTC₄ que é esperada *versus* a de LTB₄, que não é característica de eosinófilos, mas encontrada nos eosinófilos produzidos pelo protocolo convencional (Samico, 2010).

7 CONCLUSÕES

O método de diferenciação de eosinófilos segundo Dyer e colaboradores (2008) é bem estabelecido no Laboratório de Inflamação, sendo usado em várias dissertações de Mestrado, teses de Doutorado e publicações de nosso grupo de pesquisa para o estudo da fisiobiologia deste granulócitos em estudos *in vitro* desde 2009 (Luna-Gomes *et al.*, 2011; Amorim *et al.*, 2018; Magalhães *et al.*, 2019; Marques *et al.*, 2021). Com a experiência acumulada ao longo dos anos, ficou clara a necessidade do desenvolvimento de melhorias na técnica que visem maior produtividade e qualidade das células geradas ao final dos 14 dias de cultura de diferenciação *in vitro*. Na tentativa de implementação de tais melhorias e como estratégia experimental para aumento de produtividade de eosinófilos produzidos *in vitro*, neste estudo empregamos para o estabelecimento inicial da cultura de diferenciação de eosinófilos segundo Dyer (2008) uma população de células medulares provenientes de camundongos BALB/c que foram previamente submetidos ao protocolo de sensibilização alérgica pela mistura de ovalbumina e hidróxido de alumínio – protocolo sabidamente indutor de robusta resposta imunológica do tipo 2 caracterizada por geração de microambiente medular pró-eosinopoiético. Vale lembrar que este protocolo de sensibilização também é empregado rotineiramente nos estudos de nosso grupo (Luna-Gomes *et al.*, 2011; Amorim *et al.*, 2020).

A análise conjunta de nossos dados, revela que sim nossa estratégia de otimização da produção *in vitro* de eosinófilos murinos foi bem-sucedida: a sensibilização alérgica induziu microambiente medular com caráter eosinopoiético, que foi capaz de impactar positivamente o protocolo de diferenciação eosinofílica *in vitro* com maior produtividade e geração de eosinófilos viáveis, responsivos e funcionais.

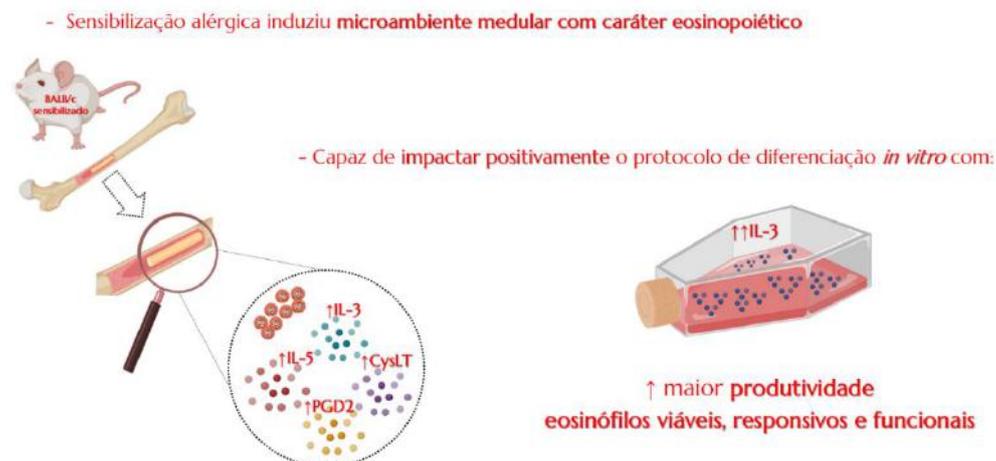


Figura 21. Sensibilização alérgica induziu microambiente medular com caráter eosinopoiético, sendo capaz de impactar positivamente o protocolo de diferenciação *in vitro* com aumento da produtividade, gerando eosinófilos viáveis, responsivos e funcionais.

8 REFERÊNCIAS

- Abbas, A.K., Lichtman, A.H.H., Pillai, S. (2019). *Imunologia Celular e Molecular*.
- Abraham WM, Sielczak MW, Ahmed A, Cortes A, Lauredo IT, Kim J, Pepinsky B, Benjamin CD, Leone DR, Lobb RR, *et al.* (1994). Alpha 4-integrins mediate antigen-induced late bronchial responses and prolonged airway hyperresponsiveness in sheep. *J Clin Invest.* 93, 776-87.
- Aceves, S S., e David H. Broide (2008). Airway Fibrosis and Angiogenesis due to Eosinophil Trafficking in Chronic Asthma. *Current Molecular Medicine* 8,350–58.
- Allakhverdi Z, Smith DE, Comeau MR, Delespesse G. (2007). Cutting edge: The ST2 ligand IL-33 potently activates and drives maturation of human mast cells. *Journal of Immunology* 179, 2051–2054.
- Amorim, N.R.T., Luna-Gomes, T., Gama-Almeida, M., Souza-Almeida, G., Canetti, C., Diaz, B.L., Weller, P.F., Torres Bozza, P., Maya-Monteiro, C.M., Bandeira-Melo, C. (2018). Leptin Elicits LTC₄ Synthesis by Eosinophils Mediated by Sequential Two-Step Autocrine Activation of CCR3 and PGD₂ Receptors. *Front. Immunol.* 9, 2139.
- Amorim, N.R.T., Souza-Almeida, G., Luna-Gomes, T., Bozza, P.T., Canetti, C., Diaz, B.L., Maya-Monteiro, C.M., Bandeira-Melo, C. (2020). Leptin Elicits In Vivo Eosinophil Migration and Activation: Key Role of Mast Cell-Derived PGD₂. *Front. Endocrinol.* 11, 572113.
- Bagnasco D, Ferrando M, Varricchi G, Puggioni F, Passalacqua G, Canonica GW. Anti-Interleukin 5 (IL-5) and IL-5Ra Biological Drugs: Efficacy, Safety, and Future Perspectives in Severe Eosinophilic Asthma. (2017). *Front Med (Lausanne)* 4,135
- Bandeira-Melo, C., Cordeiro, R.S., Silva, P.M., Martins, M.A. (1997). Modulatory role of eosinophils in allergic inflammation: new evidence for a rather outdated concept. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 92, 37–43.
- Bandeira-Melo, C., Serra MF, Diaz BL, Cordeiro RS, Silva PM, Lenzi HL, Bakhle YS, Serhan CN, Martins MA. (2000). Cyclooxygenase-2-derived prostaglandin E₂ and lipoxin A₄ accelerate resolution of allergic edema in *Angiostrongylus costaricensis*-infected rats: relationship with concurrent eosinophilia. *J Immunol.* 164,1029-36.
- Bandeira-Melo, C., M. Phoofolo, e P. F. Weller. (2001). Extranuclear Lipid Bodies, Elicited by CCR3-Mediated Signaling Pathways, Are the Sites of Chemokine-Enhanced Leukotriene C₄ Production in Eosinophils and Basophils. *The Journal of Biological Chemistry* 276, 22779–87.
- Bandeira-Melo, C, Sugiyama K., Woods J. L., Phoofolo M., Center D. M, Cruikshank W. W., e Weller P. F (2002). IL-16 Promotes Leukotriene C₄ and IL-4 Release from Human Eosinophils via CD4- and Autocrine CCR3-Chemokine-Mediated Signaling. *Journal of Immunology* 168, 4756–63.
- Bedi, R., Du, J., Sharma, A.K., Gomes, I., and Ackerman, S.J. (2009). Human C/EBP-epsilon activator and repressor isoforms differentially reprogram myeloid lineage commitment and differentiation. *Blood* 113, 317-327.
- Blanchard C., Rothenberg ME. (2009). Biology of the eosinophil. *Adv Immunol* 101, 81–121
- Bozza, P.T., Payne, J.L., Goulet, J.L., and Weller, P.F. (1996). Mechanisms of platelet-activating factor-induced lipid body formation: requisite roles for 5-lipoxygenase and de novo protein synthesis in the compartmentalization of neutrophil lipids. *The Journal of experimental medicine* 183, 1515-1525.
- Bozza, P. T., W. Yu, J. F. Penrose, E. S. Morgan, A. M. Dvorak, e P. F. Weller (1997). Eosinophil Lipid Bodies: Specific, Inducible Intracellular Sites for Enhanced Eicosanoid Formation. *The Journal of Experimental Medicine* 186, 909–20.
- Bozza, P. T., Magalhães K. G., e Weller P. F. (2009). Leukocyte Lipid Bodies - Biogenesis and Functions in Inflammation. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1791, 540–51.
- Burdach S. (1991). The granulocyte/macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF): basic science and clinical application. *Klin Padiatr.* 203, 302-10.

- Cherry WB, Yoon J, Bartemes KR, Iijima K, Kita H. (2008). A novel IL-1 family cytokine, IL-33, potently activates humaneosinophils. *J Allergy Clin Immunol* 121,1484–1490.
- Chu DK, Jimenez-Saiz R, Verschoor CP, Walker TD, Goncharova S, Llop-Guevara A, Shen P, Gordon ME, Barra NG, Bassett JD, Kong J, Fattouh R, McCoy KD, Bowdish DM, Erjefält JS, Pabst O, Humbles AA, Kolbeck R, Wasserman S, Jordana M. (2014). Indigenous enteric eosinophils control DCs to initiate a primary Th2 immune response in vivo. *J Exp Med*. 211, 1657-72.
- Chu VT, Beller A, Rausch S, Strandmark J, Zänker M, Arbach O, Kruglov A, Berek C. (2014). Eosinophils promote generation and maintenance of immunoglobulin-A-expressing plasma cells and contribute to gut immune homeostasis. *Immunity*. 40, 582-93.
- Coffman RL, Seymour BW, Hudak S, Jackson J, Rennick D. (1989). Antibody to interleukin-5 inhibits helminth-induced eosinophilia in mice. *Science* 245, 308–310.
- Collins, P.D., Marleau, S., Griffiths-Johnson, D.A., Jose, P.J., and Williams, T.J. (1995). Cooperation between interleukin-5 and the chemokine eotaxin to induce eosinophil accumulation in vivo. *The Journal of experimental medicine* 182, 1169-1174.
- Cosmi, L., F. Annunziato, M. I. G. Galli, R. M. E. Maggi, K. Nagata, S. Romagnani. (2000). CRTH2 is the most reliable marker for the detection of circulating human type 2 Th and type 2 T cytotoxic cells in health and disease. *Eur. J. Immunol.* 30, 2972.
- Da Silva Marques, P., da Fonseca-Martins, A.M., Carneiro, M.P.D., Amorim, N.R.T., de Pão, C.R.R., Canetti, C., Diaz, B.L., de Matos Guedes, H.L., Bandeira-Melo, C. (2021). Eosinophils increase macrophage ability to control intracellular *Leishmania amazonensis* infection via PGD2 paracrine activity in vitro. *Cell. Immunol.* 363, 104316.
- Diaz, B.L., Fujishima, H., Sapirstein, A., Bonventre, J.V., and Arm, J.P. (2002). Participation of cytosolic phospholipase A2 in eicosanoid generation by mouse bone marrow-derived mast cells. *Advances in experimental medicine and biology* 507, 41-46.
- Dougan, M., Dranoff, G., Dougan, S.K. (2019). GM-CSF, IL-3, and IL-5 Family of Cytokines: Regulators of Inflammation. *Immunity* 50, 796–811.
- Doyle, W.J., Boehm, S., and Skoner, D.P. (1990). Physiologic responses to intranasal dose-response challenges with histamine, methacholine, bradykinin, and prostaglandin in adult volunteers with and without nasal allergy. *The Journal of allergy and clinical immunology* 86, 924-935.
- Du J, Stankiewicz MJ, Liu Y, Xi Q, Schmitz JE, Lekstrom-Himes JA, Ackerman SJ. (2002). Novel combinatorial interactions of GATA-1, PU.1, and C/EBPepsilon isoforms regulate transcription of the gene encoding eosinophil granule major basic protein. *J Biol Chem*. 277, 43481-94.
- Dubois G.R., Schweizer R.C., Versluis C., Bruijnzeel-Koomen C.A., & Bruijnzeel P.L. (1998). Human eosinophils constitutively express a functional interleukin-4 receptor: interleukin-4-induced priming of chemotactic responses and induction of PI-3 kinase activity. *Am J Respir Cell Mol Biol* 19, 691–9.
- Durack, D.T., Sumi, S.M., and Klebanoff, S.J. (1979). Neurotoxicity of human eosinophils. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76, 1443-1447.
- Dvorak, A. M., E. Morgan, R. P. Schleimer, S. W. Ryeom, L. M. Lichtenstein, e P. F. Weller. (1992). Ultrastructural Immunogold Localization of Prostaglandin Endoperoxide Synthase (cyclooxygenase) to Non-Membrane-Bound Cytoplasmic Lipid Bodies in Human Lung Mast Cells, Alveolar Macrophages, Type II Pneumocytes, and Neutrophils. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry: Official Journal of the Histochemistry Society* 40, 759–69.
- Dvorak AM, Estrella P, Ishizaka T. (1994). Vesicular transport of peroxidase in human eosinophilic myelocytes. *Clin. Exp. Allergy*.
- Dyer KD, Czapiga M, Foster B, Foster PS, Kang EM, Lappas CM, Moser JM, Naumann N, Percopo CM, Siegel SJ, Swartz JM, Ting-De Ravin S, Rosenberg HF. (2007). Eosinophils from lineage-ablated Delta dβGATA bone marrow progenitors: the dβGATA enhancer in the promoter of GATA-1 is not essential for differentiation ex vivo. *J Immunol*. 177, 1693-9.

- Dyer, K.D., Moser, J.M., Czapiga, M., Siegel, S.J., Percopo, C.M., and Rosenberg, H.F. (2008). Functionally competent eosinophils differentiated ex vivo in high purity from normal mouse bone marrow. *Journal of immunology* 181, 4004-4009.
- Egesten A., Alumets J., Von Mecklenburg C., Palmegren M., & Olsson I. (1986). Localization of eosinophil cationic protein, major basic protein, and eosinophil peroxidase in human eosinophils by immunoelectron microscopic technique. *J Histochem Cytochem* 34, 1399-403.
- Fabre, V., Beiting, D.P., Bliss, S.K., Gebreselassie, N.G., Gagliardo, L.F., Lee, N.A., Lee, J.J., and Appleton, J.A. (2009). Eosinophil deficiency compromises parasite survival in chronic nematode infection. *Journal of immunology* 182, 1577-1583.
- Fujii M., Tanaka H., & Abe S. (2005). Interferon- gamma up-regulates expression. of cysteinyl leukotriene type 2 receptors on eosinophils in asthmatic patients. *Chest* 128, 3148-55.
- Fulkerson PC, Rothenberg ME. (2013). Targeting eosinophils in allergy, inflammation and beyond. *Nat Rev Drug Discov.* 2, 117-29.
- Gervais FG, Cruz RP, Chateaufneuf A, Gale S, Sawyer N, Nantel F, Metters KM, O'Neill GP. (2001). Selective modulation of chemokinesis, degranulation, and apoptosis in eosinophils through the PGD2 receptors CRTH2 and DP. *J Allergy Clin Immunol* 108, 982-8.
- Gleich G.J., Loegering D.A., & Maldonado J.E. (1973), Identification of a major basic protein in guinea pig eosinophil granules. *J Exp Med.* 137:1459-71.
- Gleich, G. J. (1990). The Eosinophil and Bronchial Asthma: Current Understanding. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 85, 422-36.
- Gonzalo JA, Lloyd CM, Kremer L, Finger E, Martinez-A C, Siegelman MH, Cybulsky M, Gutierrez-Ramos JC. (1996). Eosinophil recruitment to the lung in a murine model of allergic inflammation. The role of T cells, chemokines, and adhesion receptors. *J Clin Invest.* 98, 2332-45.
- Gosset, P., F. Bureau, V. Angeli, M. Pichavant, C. Faveeuw, A.-B. Tonnel, F. Trottein. (2003). Prostaglandin D2 affects the maturation of human monocyte-derived dendritic cells: consequence on the polarization of naive Th cells. *J. Immunol.* 170, 4943.
- Gouon-Evans V, Rothenberg ME, Pollard JW. (2000). Postnatal mammary gland development requires macrophages and eosinophils. *Development.* 127, 2269-82.
- Gurish MF, Humbles A, Tao H, Finkelstein S, Boyce JA, Gerard C, Friend DS, Austen KF. (2002). CCR3 is required for tissue eosinophilia and larval cytotoxicity after infection with *Trichinella spiralis*. *J Immunol.* 168, 5730-6.
- Grun JL, Maurer PH. (1989). Different T helper cell subsets elicited in mice utilizing two different adjuvant vehicles: the role of endogenous interleukin 1 in proliferative responses. *Cell Immunol.* 121, 134-145.
- Hauber H.P., Bergeron C., & Hamid Q. (2004). IL-9 in allergic inflammation. *Int Arch Allergy Immunol* 134, 79-87.
- Haskell, M.D., Moy, J.N., Gleich, G.J., and Thomas, L.L. (1995). Analysis of signaling events associated with activation of neutrophil superoxide anion production by eosinophil granule major basic protein. *Blood* 86, 4627-4637.
- He, P., Zou, Y., Hu, Z. (2015). Advances in aluminum hydroxide-based adjuvant research and its mechanism. *Hum. Vaccines Immunother.* 11, 477-488.
- Hogan SP, Rosenberg HF, Moqbel R, Phipps S, Foster PS, Lacy P, Kay AB, Rothenberg ME. (2008). Eosinophils: biological properties and role in health and disease. *Clin Exp Allergy.* 38, 709-50.
- Johnston, L.K., Bryce, P.J. (2017). Understanding Interleukin 33 and Its Roles in Eosinophil Development. *Front. Med.* 4, 51.
- Kanaoka, Y., and Urade, Y. (2003). Hematopoietic prostaglandin D synthase. *Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids* 69, 163-167.

- Kiwamoto, T., Kawasaki, N., Paulson, J.C., and Bochner, B.S. (2012). Siglec-8 as a drugable target to treat eosinophil and mast cell-associated conditions. *Pharmacology & therapeutics* 135, 327-336.
- Kurowska-Stolarska M, Kewin P, Murphy G, Russo RC, Stolarski B, Garcia CC, Komai-Koma M, Pitman N, Li Y, Niedbala W, McKenzie AN, Teixeira MM, Liew FY, Xu D. (2008). IL-33 induces antigen-specific IL-5+ T cells and promotes allergic-induced airway inflammation independent of IL-4. *J Immunol.* 181, 4780-90
- Lopez A.F., Begley C.G., Williamson D.J., Warren D.J., Vadas M.A., & Sanderson C.J. (1986). Murine eosinophil differentiation factor. An eosinophil-specific colony-stimulating factor with activity for human cells. *J Exp Med* 163, 1085–99.
- Lopez A.F., Sanderson C.J., Gamble J.R., Campbell H.D., Young I.G., & Vadas M.A. (1988). Recombinant human interleukin 5 is a selective activator of human eosinophil function. *J Exp Med* 167, 219–24.
- Lewis D.M., Lewis J.C., Loegering D.A., & Gleich G.J. (1978) Localization of the guinea pig eosinophil major basic protein to the core of the granule. *J Cell Biol* 77, 702–13
- Luna-Gomes, T., Magalhães, K.G., Mesquita-Santos, F.P., Bakker-Abreu, I., Samico, R.F., Molinaro, R., Calheiros, A.S., Diaz, B.L., Bozza, P.T., Weller, P.F., Bandeira-Melo, C. (2011). Eosinophils as a Novel Cell Source of Prostaglandin D2: Autocrine Role in Allergic Inflammation. *J. Immunol.* 187, 6518–6526.
- Magalhães, Kelly G.; Luna-Gomes, Tatiana; Mesquita-Santos, Fabio; Corrêa, Rafael; Assunção, Leonardo Santos; Atella, Georgia Correa; WELLER, Peter F.; Bandeira-Melo, Christianne; Bozza, Patricia T. (2019). Schistosomal Lipids Activate Human Eosinophils via Toll-Like Receptor 2 and PGD2 Receptors: 15-l_o role in cytokine secretion. *Frontiers In Immunology.*
- Mannhalter JW, Neychev HO, Zlabinger GJ, Ahmad R, Eibl MM. (1985) Modulation of the human immune response by the non-toxic and non-pyrogenic adjuvant aluminium hydroxide: effect on antigen uptake and antigen presentation. *Clin Exp Immunol.* 61, 143-51
- Marichal, T., Mesnil, C., Bureau, F. (2017). Homeostatic Eosinophils: Characteristics and Functions. *Front. Med.* 4, 101.
- Mesquita-Santos, F.P., Vieira-de-Abreu, A., Calheiros, A.S., Figueiredo, I.H., Castro-Faria-Neto, H.C., Weller, P.F., Bozza, P.T., Diaz, B.L., and Bandeira-Melo, C. (2006). Cutting edge: prostaglandin D2 enhances leukotriene C4 synthesis by eosinophils during allergic inflammation: synergistic in vivo role of endogenous eotaxin. *Journal of immunology* 176, 1326-1330.
- Mesquita-Santos, F., Bakker-Abreu, I., Luna-Gomes, T., Bozza, P., Diaz, B., Bandeira-Melo, C. (2011). Co-operative signalling through DP₁ and DP₂ prostanoid receptors is required to enhance leukotriene C4 synthesis induced by prostaglandin D2 in eosinophils: DP₁ and DP₂ cooperate to elicit LTC₄ synthesis. *Br. J. Pharmacol.* 162, 1674–1685.
- Melo, Rossana C. N.; Spencer, Lisa A.; Perez, Sandra A. C.; Ghiran, Ionita; Dvorak, Ann M.; Weller, Peter F. Human. (2005). Eosinophils Secrete Preformed, Granule-Stored Interleukin-4 Through Distinct Vesicular Compartments. *Traffic* 6, 1047-1057.
- Melo, R. C. N., D’Avila H., Wan H., Bozza P. T., Dvorak A. M., e Weller P. F. (2011). Lipid Bodies in Inflammatory Cells: Structure, Function, and Current Imaging Techniques. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry: Official Journal of the Histochemistry Society* 59, 540–56.
- Melo, R. C. N., Paganoti G. F., Dvorak A. M., e Weller P. F. (2013). The Internal Architecture of Leukocyte Lipid Body Organelles Captured by Three-Dimensional Electron Microscopy Tomography. *PloS One* 3, e59578.
- Mesnil C, Raulier S, Paulissen G, Xiao X, Birrell MA, Pirottin D, Janss T, Starkl P, Ramery E, Henket M, Schleich FN, Radermecker M, Thielemans K, Gillet L, Thiry M, Belvisi MG, Louis R, Desmet C, Marichal T, Bureau F. (2016). Lung-resident eosinophils represent a distinct regulatory eosinophil subset. *J Clin Invest.* 126, 3279-95.
- Miyata, J., Fukunaga, K., Iwamoto, R., Isobe, Y., Niimi, K., Takamiya, R., Takihara, T., Tomomatsu, K., Suzuki, Y., Oguma, T., Sayama, K., Arai, H., Betsuyaku, T., Arita, M., Asano, K. (2013). Dysregulated synthesis of protectin D1 in eosinophils from patients with severe asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 131, 353-360.

- Mould, A.W., Matthaei, K.I., Young, I.G., and Foster, P.S. (1997). Relationship between interleukin-5 and eotaxin in regulating blood and tissue eosinophilia in mice. *The Journal of clinical investigation* 99, 1064-1071.
- Monneret G, Gravel S, Diamond M, Rokach J, Powell WS. (2001). Prostaglandin D2 is a potent chemoattractant for human eosinophils that acts via a novel DP receptor. *Blood*. 98,1942-8.
- Murphy, D. J. (2001). The Biogenesis and Functions of Lipid Bodies in Animals, Plants and Microorganisms. *Progress in Lipid Research* 40, 325-438.
- Murphy, D. J. (2012). The Dynamic Roles of Intracellular Lipid Droplets: From Archaea to Mammals. *Protoplasma* 249, 541-85.
- Nakajima H., Sano H., Nishimura T., Yoshida S., & Iwamoto I. (1994). Role of vascular cell adhesion molecule 1/very late activation antigen 4 and intercellular adhesion molecule 1/lymphocyte function associated antigen 1 interactions in antigen-induced eosinophil and T cell recruitment into the tissue. *J Exp Med* 179, 1145-54.
- Nutku E., Soussi Gounni A., Hazcku A. *et al.* (1999). Stimulation of IL-9 receptors on human eosinophils upregulates IL-5 receptor mRNA expression. *J Allergy Clin Immunol* 103, S113.
- Nagata, K., H. Hirai, K. Tanaka, K. Ogawa, T. Aso, K. Sugamura, M. Nakamura, S. Takano (1999). CRTH2, an orphan receptor of T-helper-2-cells, is expressed on basophils and eosinophils and responds to mast cell-derived factor(s). *FEBS Letters* 459, 195-99
- Nussbaum JC, Van Dyken SJ, von Moltke J, Cheng LE, Mohapatra A, Molofsky AB, Thornton EE, Krummel MF, Chawla A, Liang HE, Locksley RM. (2013). Type 2 innate lymphoid cells control eosinophil homeostasis. *Nature*. 502, 245-8.
- O'Banion, M.K. (1999). COX-2 and Alzheimer's disease: potential roles in inflammation and neurodegeneration. *Expert opinion on investigational drugs* 8, 1521-1536.
- Peters M.S., Rodriguez M., & Gleich G.J. (1986). Localization of human eosinophil granule major basic protein, eosinophil cationic protein, and eosinophil-derived neurotoxin by immunoelectron microscopy. *Lab Invest* 54, 656-62.
- Pretolani M., Ruffie C., Lapa e Silva J.R., Joseph D., Lobb R.R., & Vargaftig B.B. (1994). Antibody to very late activation antigen 4 prevents antigen-induced bronchial hyperreactivity and cellular infiltration in the guinea pig airways. *J Exp Med* 180, 795-805.
- Pol, A., S. Martin, M. A. Fernandez, C. Ferguson, A. Carozzi, R. Luetterforst, C. Enrich, e R. G. Parton. (2004). Dynamic and Regulated Association of Caveolin with Lipid Bodies: Modulation of Lipid Body Motility and Function by a Dominant Negative Mutant. *Molecular Biology of the Cell* 15, 99-110.
- Rosenberg, H.F., Dyer, K.D., Foster, P.S. (2013). Eosinophils: changing perspectives in health and disease. *Nature Reviews Immunology* 13, 9-22.
- Rothenberg ME, Pomerantz JL, Owen WF Jr, Avraham S, Soberman RJ, Austen KF, Stevens RL. Characterization of a human eosinophil proteoglycan, and augmentation of its biosynthesis and size by interleukin 3, interleukin 5, and granulocyte/macrophage colony stimulating factor. (1988). *J Biol Chem*. 263, 13901-8.
- Samico, R.F. (2010). Caracterização funcional de eosinófilos murinos derivados de medula óssea. Dissertação de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biofísica), Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro 81f.
- Sanderson, C. (1992). Interleukin-5, eosinophils, and disease. *Blood* 79, 3101-3109.
- Sawyer N, Cauchon E, Chateaufneuf A, Cruz RP, Nicholson DW, Metters KM, O'Neill GP, Gervais FG. (2002). Molecular pharmacology of the human prostaglandin D2 receptor, CRTH2. *Br J Pharmacol*. 137, 1163-72.
- Schratl P, Royer JF, Kostenis E, Ulven T, Sturm EM, Waldhoer M, Hoefler G, Schuligoi R, Lippe IT, Peskar BA, Heinemann A. (2007). The role of the prostaglandin D2 receptor, DP, in eosinophil trafficking. *J Immunol*. 179, 4792-9.
- Simons JE, Rothenberg ME, Lawrence RA. (2005). Eotaxin-1-regulated eosinophils have a critical role in innate immunity against experimental *Brugia malayi* infection. *Eur J Immunol*. 35, 189-97.

- Spencer, L. A.; Szela, C. T.; Perez, S. A. C.; Kirchhoffer, C. L.; Neves, J. S.; Radke, A. L.; Weller, P. F. (2008). Human eosinophils constitutively express multiple Th1, Th2, and immunoregulatory cytokines that are secreted rapidly and differentially. *Journal Of Leukocyte Biology* 85, 117-123
- Spik, Isabelle; Brénuchon, Céline; Angéli, Véronique; Staumont, Delphine; FLEURY, Sébastien; Capron, Monique; Trottein, François; Dombrowicz, David (2005). Activation of the Prostaglandin D2 Receptor DP₂/CRTH2 Increases Allergic Inflammation in Mouse. *The Journal Of Immunology* 174,3703-3708
- Sugawara, R., Lee, E.-J., Jang, M.S., Jeun, E.-J., Hong, C.-P., Kim, J.-H., Park, A., Yun, C.H., Hong, S.-W., Kim, Y.-M., Seoh, J.-Y., Jung, Y., Surh, C.D., Miyasaka, M., Yang, B.-G., Jang, M.H. (2016). Small intestinal eosinophils regulate Th17 cells by producing IL-1 receptor antagonist. *J. Exp. Med.* 213, 555–567.
- Suzukawa M, Iikura M, Koketsu R, Nagase H, Tamura C, Komiya A, Nakae S, Matsushima K, Ohta K, Yamamoto K, Yamaguchi M. (2008). An IL-1 cytokine member, IL-33, induces human basophil activation via its ST2 receptor. *J Immunol.* 181, 5981-9.
- Swartz JM, Dyer KD, Cheever AW, Ramalingam T, Pesnicak L, Domachowske JB, Lee JJ, Lee NA, Foster PS, Wynn TA, Rosenberg HF. (2006). *Schistosoma mansoni* infection in eosinophil lineage-ablated mice. *Blood* 108, 2420-7.
- Symowski C, Voehringer D. (2017). Interactions between Innate Lymphoid Cells and Cells of the Innate and Adaptive Immune System. *Front Immunol* 8, 1422.
- Takatsu K., Takaki S., & Hitoshi Y. (1994). Interleukin-5 and its receptor system: implications in the immune system and inflammation. *Adv Immunol* 57, 45–90.
- Tauchi-Sato K, Ozeki S, Houjou T, Taguchi R, Fujimoto T. (2002). The surface of lipid droplets is a phospholipid monolayer with a unique Fatty Acid composition. *J Biol Chem* 277, 44507-44512.
- Thivierge M., Doty M., Johnson J., Stankova J., & Rola-Pleszczynski M. (2000). IL-5 up-regulates cysteinyl leukotriene 1 receptor expression in HL-60 cells differentiated into eosinophils. *J Immunol* 165, 5221–6.
- Vieira-de-Abreu, A., E. F. Assis, G. S. Gomes, H. C. Castro-Faria-Neto, P. F. Weller, C. Bandeira-Melo, e P. T. Bozza. (2005). Allergic Challenge-Elicited Lipid Bodies Compartmentalize in vivo Leukotriene C4 Synthesis within Eosinophils. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 33, 254–61.
- Wang H., Tan X., Chang H., Huang W., Gonzalez-Crussi F., & Hsueh W. (1999). Platelet-activating factor receptor mRNA is localized in eosinophils and epithelial cells in rat small intestine: regulation by dexamethasone and gut flora. *Immunology* 97, 447–54.
- Wallen N., Kita H., Weiler D., & Gleich G.J. (1991). Glucocorticoids inhibit cytokine-mediated eosinophil survival. *J Immunol* 147, 3490–5.
- Weg V.B., Williams T.J., Lobb R.R., & Nourshargh S. (1993). A monoclonal antibody recognizing very late activation antigen-4 inhibits eosinophil accumulation in vivo. *J Exp Med* 177, 561–6.
- Widdicombe, J.G. (1990). Nasal pathophysiology. *Respiratory medicine* 84 Suppl A, 3-9; discussion 9-10.
- Wu, D., Molofsky, A.B., Liang, H.-E., Ricardo-Gonzalez, R.R., Jouihan, H.A., Bando, J.K., Chawla, A., Locksley, R.M. (2011). Eosinophils Sustain Adipose Alternatively Activated Macrophages Associated with Glucose Homeostasis. *Science* 332, 243–247.
- Xue L, Gyles SL, Barrow A, Pettipher R. (2007). Inhibition of PI3K and calcineurin suppresses chemoattractant receptor-homologous molecule expressed on Th2 cells (CRTH2)-dependent responses of Th2 lymphocytes to prostaglandin D(2) *Biochem Pharmacol.* 73, 843–853.
- Yuan Q., Austen K.F., Friend D.S., Heidtman M., & Boyce J.A. (1997). Human peripheral blood eosinophils express a functional c-kit receptor for stem cell factor that stimulates very late antigen 4 (VLA-4)-mediated cell adhesion to fibronectin and vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1). *J Exp Med* 186, 313–23.
- Yu, C., Cantor, A.B., Yang, H., Browne, C., Wells, R.A., Fujiwara, Y., and Orkin, S.H. (2002). Targeted deletion of a high-affinity GATA-binding site in the GATA-1 promoter leads to selective loss of the eosinophil lineage in vivo. *The Journal of experimental medicine* 195, 1387-1395.

Zimmermann, N., Daugherty, B.L., Kavanaugh, J.L., El-Awar, F.Y., Moulton, E.A., Rothenberg, M.E. (2000). Analysis of the CC chemokine receptor 3 gene reveals a complex 5' exon organization, a functional role for untranslated exon 1, and a broadly active promoter with eosinophil-selective elements. *Blood* 96, 2346–2354.

Zinchuk O., Fukushima A., Zinchuk V., Fukata K., & Ueno H. (2005). Direct action of platelet activating factor (PAF) induces eosinophil accumulation and enhances expression of PAF receptors in conjunctivitis. *Mol Vis* 11, 114–23.