

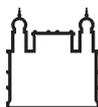
MINISTÉRIO DA SAÚDE  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

**Mestrado em Programa de Pós-graduação de Biologia Celular e Molecular**

**MECANISMOS DE SECREÇÃO DE EOSINÓFILOS MURINOS EM RESPOSTA A  
ESTÍMULOS INFLAMATÓRIOS E A ASMA EXPERIMENTAL**

**Kennedy Bonjour de Oliveira Ferreira**

Rio de Janeiro  
Setembro de 2015



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular**

***KENNEDY BONJOUR DE OLIVEIRA FERREIRA***

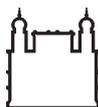
MECANISMOS DE SECREÇÃO DE EOSINÓFILOS MURINOS EM RESPOSTA  
A ESTÍMULOS INFLAMATÓRIOS E A ASMA EXPERIMENTAL

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como  
parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre  
em Biologia Celular e Molecular.

**Orientadora:** Prof. Dra. Rossana Correa Netto de Melo

RIO DE JANEIRO  
2015





Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular**

**AUTOR: Kennedy Bonjour de Oliveira Ferreira**

MECANISMOS DE SECREÇÃO DE EOSINÓFILOS MURINOS EM RESPOSTA A ESTÍMULOS INFLAMATÓRIOS  
E A ASMA EXPERIMENTAL

**ORIENTADORA:** Prof. Dra. Rossana Correa Netto de Melo

**Aprovada em:** \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

EXAMINADORES

Prof. Dra. Josiane Sabbadini (ICB/UFRJ)

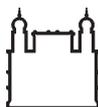
Prof. Dra. Carmen Penido (CDTS/FIOCRUZ)

Prof. Dra. Mírian Claudia de Souza Pereira (IOC/FIOCRUZ)

Prof. Dra. Suzana Côrte-Leal Faria (IOC/FIOCRUZ)

Prof. Dra. Sandra Aurora Chavez Perez Rodrigues (Farmanguinhos/FIOCRUZ)

Rio de Janeiro, 14 de Setembro de 2015



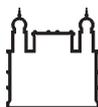
Ministério da Saúde

FIOCRUZ

**Fundação Oswaldo Cruz**

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biologia Celular da Universidade Federal de Juiz de Fora, UFJF, sob a orientação da Profa. Rossana Corrêa Netto de Melo.





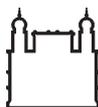
Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## Dedicatória

*Àos meus pais e minhas irmãs.  
Todas as conquistas e vitórias não seriam realizadas  
sem a força dessas pessoas maravilhosas presentes na  
minha vida.  
Em especial, à minha mãe, Maria Angélica.*



## Agradecimentos

Posso ficar horas escrevendo sobre os agradecimentos, mas nessas horas você se depara com algumas lembranças que te emocionam. Durante todo esse processo de amadurecimento pessoal e científico algumas pessoas que tiveram participação e marcaram essa estrada, sobretudo, alguns foram itinerantes outras permanentes, deixaram rastros de si em mim. E me fizeram perceber o quão importante são as perguntas que me move.

Digo sempre, a minha curiosidade é o que me movimenta, mas na verdade são essas pessoas que me tiram do centro e me fazem pensar de uma maneira eloquente e entusiasmada. Portanto, meus agradecimentos são para elas. Primeiramente, eu agradeço aos meus pais, Maria Angélica de Oliveira Ferreira e a Paulo César Ferreira. Meu pai, em apoio e a paciência que me prova em certas vezes que mais preciso. Minha mãe, neste contexto, tendo o papel que cabe a qualquer mãe, a pergunta clássica... “Por que você tanto estuda e não trabalha?” E mesmo com a resposta que ela menos entendia (lógico! eu explicava como era realizado o mecanismo de secreção de eosinófilo), ela concordava e me mostrava que eu chego aonde eu quiser!... Sinceramente, eu tenho muito orgulho de ser seu filho!

Às minhas irmãs, Kennya e Kellem que acreditam no meu trabalho e me apoiam nas minhas decisões. Em momentos que agente se depara com a responsabilidade de ser o primogênito e ter que ensinar, dar o exemplo, agente acaba aprendendo com as mais novas. Sempre tão amáveis!

À minha querida orientadora Rossana Melo. Quando desenvolvemos um trabalho científico, geralmente temos um certo respeito e admiração como profissional por nosso orientador. Pela Rossana, estas qualidades foram além. Hoje posso dizer que ela foi mais que uma orientadora... Foi amiga, mãe e conselheira durante todo esse crescimento, e me sinto honrado em desenvolver minhas teorias junto com essa pessoa admirável que forneceu esta investigação tão valiosa.

À minha vizinha Nadir Alves que me ensina a cada dia que a resposta de uma pergunta complexa só se pode responde-la com simplicidade. Nos momentos mais conturbados que passei, ela foi a mais sábia.

Aos meus avôs paterno, Laizy Bonjour e Sebastião Ferreira que provam que gentileza gera gentileza. Como bons vivans, os Bonjour sempre seguem a risca um ditado: “Entre a calamidade e a catástrofe, há sempre espaço pra uma taça de vinho”- Pensamento francês.

Às minhas primas Karla Olga e Karoline Ferreira, com seu amor incondicional e fraternal dividimos aventuras, sonhos, emoções e muito afeto.

Aos primos, Juan, Ian, Yasmin, Isabela, Izadora, Camille, Isabelle, Júlia, Karine, Bernard, Pedrinho e Liz que me encham de carinho e que eu adoro “atazanar”.

Aos meus tios e tias, Marise Amélia, Cristiane, Edelma, Sônia (Sônia Tereza), Adélia, Alessandra e Sandro pelo apoio em todas as idas e vindas nas cidades que eu me deslocava, pelo carinho e risadas em todos os momentos, sem exceções.

Aos meus amigos que eu não tenho palavras e nem papel suficiente para descrever o quanto eles foram muito mais que amigos pra mim, esses amigos me deixaram com sede de presença e com dores fortes de saudades quando estão longe. Uma vez ouvi, “amigo é aquela pessoa do momento”. E eu posso responder com toda certeza- não, não é! Nesta oportunidade, eu agradeço sem



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

ordem de classificação, pois não há. Aos meus amigos-irmãos, Magaiver, Hudson, Mônica, Josiane e Douglas que em nossa afinidade e amor, construída com um carinho inexplicável, resultou em uma história linda de amizade. Todo apoio, horas de conversas, tantas e tantas risadas juntas com vocês é combustível para qualquer aventura ou desafio em minha vida.

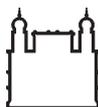
Aos meus amigos, Luciana (UFV), Magna (Francisca Hildemagna), Flávia, Natalinha, Perla, Jéssica, Catarina, Bruno, Marianne, Thábata sem eles não seria a mesma Fiocruz que encontro hoje. Eles abrem minha mente com suas ousadias e determinações.

Aos meus amigos do laboratório Thiago, Juliana, Vitor, Daniel, Lívia Andressa, Lívia Teixeira, Felipe e Kátia, uma família que proporciona muita força de vontade. Em especial, ao Thiago que acompanha todo o meu empreendedorismo na ciência e me dá força nas perspectivas dos projetos.

Aos colaboradores deste projeto Sandra Aurora Perez Chavez Rodrigues, Marco Aurélio Martins, Peter Weller, Revital Shamri e Ann M. Dvorak que deram luz para os resultados debatidos nesta dissertação.

E ao final, gostaria de agradecer às agências de fomento CNPq e FAPEMIG quais viabilizaram financeiramente os projetos relacionados a este estudo.

Que venham mais eosinófilos!



Ministério da Saúde

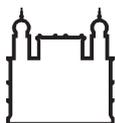
FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## Epígrafe

*“A Ciência é a percepção do óbvio”*

*Bonjour*



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
Fundação Oswaldo Cruz

## **INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

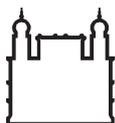
### **MECANISMOS DE SECREÇÃO DE EOSINÓFILOS MURINOS EM RESPOSTA À ESTÍMULOS INFLAMATÓRIOS E À ASMA EXPERIMENTAL**

Resumo

#### **DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR**

Kennedy Bonjour de Oliveira Ferreira

Em resposta à uma variedade de estímulos, os eosinófilos são recrutados da circulação para focos inflamatórios, onde modulam a resposta imune, através da liberação de proteínas derivadas dos grânulos secretores. Eosinófilos secretam suas proteínas através de diferentes maneiras de secreção: i) clássica exocitose dos grânulos; ii) desgranulação por piecemeal (PMD), um processo de secreção mediada por vesículas de transporte; e iii) a citólise. Estes mecanismos estão bem caracterizadas em humanos, mas ainda são poucos conhecidas em camundongos. Aqui, foram investigados os mecanismos subjacentes a desgranulação de eosinófilos murinos durante as respostas inflamatórias *in vivo* (modelo de asma) e *in vitro* (após estímulos pró-inflamatória). Camundongos Balb/c foram imunizados com uma suspensão de ovalbumina (OVA) (50 mg) e Al (OH) 3 (5 mg) em 200 ml de NaCl a 0,9% nos dias 0 (subcutaneamente) e 14 (por via intraperitoneal). Catorze dias depois, os desafios de OVA (50 mg) foram instilados intranasalmente 3 vezes por semana durante 4 semanas. O grupo controle recebeu solução de NaCl 0,9%. Após o tratamento, os fragmentos de pulmão foram fixados e processados para a microscopia de transmissão de eletrônica (MET). Além disso, a interleucina-13 (IL-13), IL-4, a eotaxina-1 (CCL11) e fator de crescimento transformante beta (TGF- $\beta$ ) foram medidos em tecido pulmonar. Nos experimentos *in vitro*, os eosinófilos foram isolados a partir do baço de camundongos transgênicos para interleucina-5, estimulados com fator estimulante de colônia granulócito-macrófago [GM-CSF (10 ng / mL)], Lipopolissacarídeo [LPS (100 ng / ml)] ou apenas meio, durante 1 h, imediatamente fixada e processada para MET e avaliação da atividade enzimática de ribonucleases. MET revelou uma intensa infiltrado de eosinófilos no pulmão de animais tratados com OVA, mas estas células foram raramente visualizadas em pulmões dos controles. Análise ultraestrutural de 975 grânulos de secreção de eosinófilos do infiltrado inflamatório pulmonar mostrou que 47% destes grânulos tinham sinais desgranulação associados à PMD, caracterizadas principalmente pela redução da densidade de elétrons, perdas na matriz ou núcleos, matriz grossa e / ou ampliação de grânulos. As vesículas foram visualizadas na proximidade de grânulos em esvaziamento. Os níveis de eotaxina-1, IL-4, IL-13 e EPO no tecido pulmonar dos camundongos estimulados com OVA foram significativamente aumentados em comparação com os controles, enquanto os níveis de TGF- $\beta$  não se alterou. Eosinófilos do baço estimuladas *in vitro* com GM-CSF e LPS apresentaram alterações morfológicas e cerca de 20% de grânulos apresentaram sinais de PMD. Não foram encontrados fusões de grânulo-grânulo ou grânulo-membrana plasmática. Curiosamente, foram identificadas por MET uma distinta bainha eletrodensa em áreas específicas da membrana limitante grânulo, uma característica morfológica que pode estar associados com a secreção de eosinófilos murinos. Nossos dados demonstram que os eosinófilos murinos são capazes de desgranular através PMD durante as respostas inflamatórias *in vivo* e *in vitro*. Embora as características morfológicas reconhecidos como indicativo de PMD são menos pronunciada camundongos em comparação com aquelas documentadas em seres humanos, estes sinais podem ser detectados em eosinófilos murinos sob investigação cuidadosa por TEM. Além disso, nosso estudo demonstram que outros sinais morfológicos, não descritas para eosinófilos humanos, pode ser útil para compreender os processos de secreção em eosinófilos de modelos experimentais.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ  
Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

### MECHANISM OF MOUSE EOSINOPHIL SECRETION IN RESPONSE TO INFLAMMATORY STIMULI AND EXPERIMENTAL ASTHMA

Abstract

#### DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Kennedy Bonjour de Oliveira Ferreira

Mechanisms governing secretion of proteins underlie the functions of human eosinophils, leukocytes involved in allergic, inflammatory and immunoregulatory responses. In response to varied stimuli, eosinophils are recruited from the circulation into inflammatory foci, where they modulate immune responses through the release of granule-derived protein. Eosinophils secrete proteins from their specific cytoplasmic granules through different secretion pathways: i) classical granule exocytosis; ii) piecemeal degranulation (PMD), a secretory process mediated by transport vesicles; and iii) cytolysis. These mechanisms are well characterized in humans, but are still poorly understood in mice. Here we investigated the mechanisms underlying eosinophil degranulation of murine models during inflammatory responses in vivo (asthma model) and in vitro (after stimulation with pro-inflammatory stimuli). Balb/c mice were immunized with a mixed suspension of ovalbumin (OVA) (50 µg) and Al(OH)<sub>3</sub> (5 mg) in 200 µL of 0.9% NaCl on days 0 (subcutaneously) and 14 (intraperitoneally). Fourteen days later, repetitive OVA challenges (50 µg) were intranasally instilled 3 times a week during 4 weeks. The control group received 0.9% NaCl solution. After treatment, lung fragments were fixed and processed for light and transmission electron microscopy (TEM). Moreover, interleukin-13 (IL-13), IL-4, eotaxin-1 (CCL11) and transforming growth factor beta (TGF-β) were measured in the lung tissue. For the in vitro experiments, eosinophils were isolated from the spleen of interleukin-5 transgenic mice, stimulated with GM-CSF (10 ng/mL), LPS (100 ng/mL) or medium alone for 1h, immediately fixed and processed to TEM. Both light and TEM revealed an intense eosinophil infiltration in perivascular and peribronchial spaces of OVA-treated animals, but these cells were rarely observed in control lungs. Ultrastructural analysis of 975 secretory granules from infiltrating eosinophils showed that 47% of these granules had degranulation signs associated with PMD, characterized mainly by reduced electron density, losses in the matrix or cores, coarse matrix and/or granule enlargement. Vesicles were visualized nearby emptying granules. Eotaxin-1, IL-4, IL-13 and EPO levels in the lung tissue from OVA-stimulated mice were significantly increased compared to controls while the levels of TGF-β did not change. Spleen eosinophils stimulated in vitro with GM-CSF and LPS exhibited shape changes and around 20% of emptying granules. Granule-granule or plasma membrane-granule fusions were not observed in any situation. Interestingly, we identified by TEM a distinct electron-dense brim at specific areas of the limiting granule membrane, a novel morphological feature which may be associated with secretion in mice eosinophils. Collectively, our data demonstrate that mouse eosinophils are able to degranulate through PMD during inflammatory responses occurring both in vivo and in vitro. Although the morphological features recognized as indicative of PMD are less pronounced in mice compared to those documented in humans, these signs can be detected in mice eosinophils under careful investigation by TEM. Moreover, our study demonstrate that other morphological signs, not described for human eosinophils, may be helpful to understand the secretory processes in eosinophils from mice models.



## LISTA DE SIGLAS E ABREVIações

APC	Células Apresentadora de Antígenos
BFA	Brefeldina-A
C/EBP	CCAAT/Enhancer-Bind Protein
Ca <sup>+</sup>	Íon de Cálcio
CCL	Ligante De Quimiocina De Motivo CC
CCR	Receptor De Citocina De Motivo CC
CD	Grupo de designação
Cfegs	Grânulos Livres das Células
CLC	Cristal de Charcot-Leyden
CLs	Corpúsculos Lipídicos
CXCL	Quimiocina Ligante do domínio CXC
Cys-LTs	Leucotrienos Cisteínados
DC	Célula Dendrítica
EARs	Ribonucleases associadas ao eosinófilo
ECP	Proteína Catiônica Do Eosinófilo
EDN/EPX	Neurotoxina Derivada Do Eosinófilo
EoP	Progenitores Comprometidos Com A Linhagem De Eosinófilos
EoSVs	Vesícula Sombrero do Eosinófilo
EPO/	Peroxidase Eosinofílica
ETS	E-Twenty-Six
ETs	Redes Extracelulares
FcεRI	Receptor de IgE de Alta Afinidade
G-CSF	Fator Estimulante de Colônia de Granulócitos
GM-CSF	Fator Estimulante de Colônia de Monócito-Macrófago
GTPγ	Guanosina 5'-O-[gama-tio]trifosfato
HES	Síndrome Hipereosinofílica
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
INF-γ	Interferon-gama
LMC	Leucemia Mielóide Crônica
LPS	Lipopolissacarídeo
LT	Leucotrieno
MBP	Proteína Básica Principal
MCP	Proteína quimiotática de Monócitos
MET	Microscopia Eletrônica De Transmissão
MHC	Principal Complexo de Histocompatibilidade



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

MIP	Proteína Inflamatória de Macrófago
ML	Microscopia De Luz
MMP	Matriz de Metaloproteinase
OVA	Ovalbumina
PAF	Fator de Ativação Plaquetário
PMA	Forbol-12-miristato-13-acetato
PMD	Desgranulação por Piecemeal
PMNs	Polimorfonucleares
PRG2/MBP	Proteína Básica Principal do Grânulo do Eosinófilo/ Medula Óssea
PVM	Vírus de Pneumonia de Camundongos
RANTES	Regulador De Ativação Expresso E Secretado Por Células T Normais
RBC	Células Vermelhas do Sangue
RNases	Ribonucleases
RSV	Vírus Sincicial Respiratório
SCF	Fator De Célula Tronco
TCR	Receptor de Célula T
TGF- $\beta$	Fator de Crescimento Tumoral-beta
TGI	Trato Gastrointestinal Inferior
TLR	Receptores do Tipo Toll
TNF- $\alpha$	Fator de Necrose Tumoral-alfa
VCAM	Molécula de adesão de Célula Vasculare
VEGF	Fator De Crescimento Endotelial Vasculare



# SUMÁRIO

1.1.	INTRODUÇÃO	16
<b>1. 1-</b>	A trajetória histórica do eosinófilo através da microscopia	.16
1. 1.1-	Elucidando a estrutura dos eosinófilos através da microscopia eletrônica	.18
<b>1. 2-</b>	Imunobiologia dos Eosinófilos	.25
1. 2.1-	Características Gerais	.25
1. 2.2-	Eosinofilopoiese	.27
1. 2.3-	Proteínas pré-estocadas nos grânulos e suas propriedades	.29
I.	Proteínas catiônicas	.29
II.	Citocinas, Quimiocinas e Fatores de crescimento	.32
1. 2.4-	Mecanismos de secreção	.34
I.	Exocitose	.34
II.	Desgranulação por Piecemeal	.35
III.	Citólise	.37
<b>1. 3-</b>	Participação dos eosinófilos durante respostas inflamatórias	.39
1. 3.1-	Aspectos Gerais na Inflamação Alérgica da Asma	.39
1. 3.2-	Infecção viral	.42
1. 3.3-	Infecção bacteriana	.42
2.	OBJETIVOS	44
<b>2. 1-</b>	Objetivo Geral	.44
<b>2. 2-</b>	Objetivo Específicos	.44



3.	METODOLOGIA	46
<b>3. 1-</b>	<b>Animais</b>	<b>.46</b>
<b>3. 2-</b>	<b>Purificação e estimulação de eosinófilos</b>	<b>.46</b>
<b>3. 3-</b>	<b>Avaliação da atividade enzimática de EARs</b>	<b>.47</b>
<b>3. 4-</b>	<b>Reação alérgica nas vias aéreas</b>	<b>.47</b>
<b>3. 5-</b>	<b>Quantificação de citocinas em tecido pulmonar</b>	<b>.47</b>
<b>3. 6-</b>	<b>Quantificação de peroxidase eosinofílica</b>	<b>.48</b>
<b>3. 7-</b>	<b>Microscopia eletrônica de transmissão</b>	<b>.48</b>
<b>3. 8-</b>	<b>Avaliação ultraestrutural de processos secretores de eosinófilos</b>	<b>.49</b>
<b>3. 9-</b>	<b>Análises Estatísticas</b>	<b>.49</b>
4.	RESULTADOS	51
<b>4. 1-</b>	<b>Eosinófilos murinos estimulados por GM-CSF e LPS apresentam características de ativação e desgranulação por piecemeal</b>	<b>.51</b>
<b>4. 2-</b>	<b>Eosinófilos murinos estimulados por GM-CSF ou LPS secretam RNases associadas ao eosinófilo (EARs)</b>	<b>.57</b>
<b>4. 3-</b>	<b>Eosinófilos são ativados e recrutados para o foco inflamatório durante a resposta alérgica pulmonar no modelo experimental de asma brônquica</b>	<b>.58</b>
<b>4. 4-</b>	<b>Perfil de citocinas Th2 são expressas no tecido pulmonar de camundongos asmáticos</b>	<b>.61</b>
<b>4. 5-</b>	<b>Níveis de proteínas catiônicas derivadas de eosinófilos mostram-se elevados no modelo de asma</b>	<b>.62</b>
<b>4. 6-</b>	<b>Desgranulação por piecemeal é o principal processo de secreção de eo-</b>	



**sinófilos durante a asma experimental .62**

**4. 7- Identificação de novos aspectos indicativos de desgranulação por piecema  
mal .67**

5. DISCUSSÃO 71

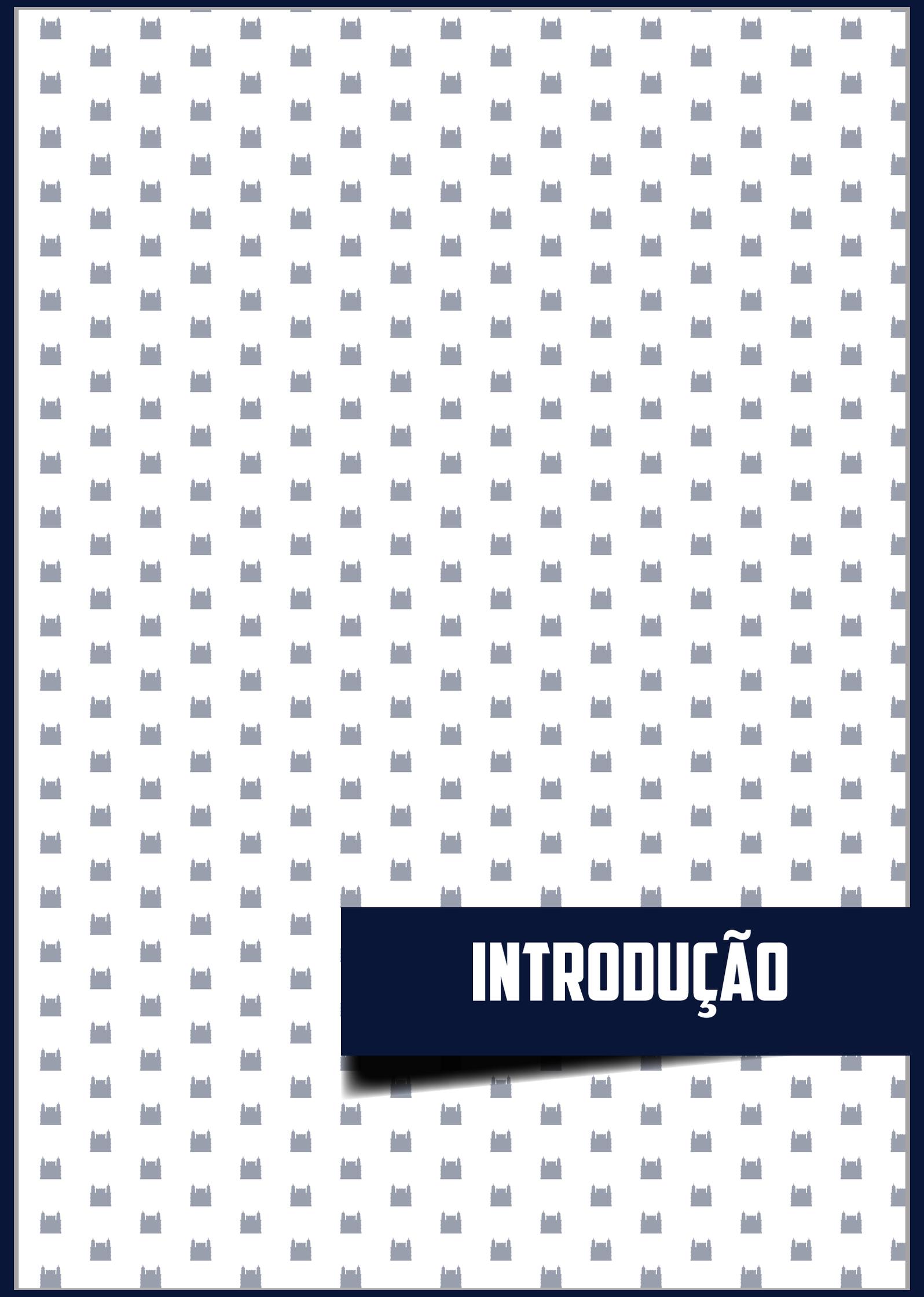
6. CONCLUSÃO 76

7. RESULTADOS 78



# Lista de Figuras

- Figura 1.1-** Paul Erlich no seu escritório em Frankfurt, meados de 1900. (fonte:History of Allergy, 2014) 20
- Figura 1.2-** Ilustração de Wharton-Jones mostrando as primeiras fases das células do homem e de outros mamíferos 20
- Figura 1.3-** Imagens do brotamento de vesículas (em rosa) a partir dos grânulos secretores de eosinófilos humanos, vistas através de elétron-tomografia. 26
- Figura 1.4-** Micrografia eletrônica de um eosinófilo humano não estimulado. 29
- Figura 1.5-** Ilustração dos tipos de processos de secreção em eosinófilo humano 37
- Figura 1.6-** Ultraestrutura de eosinófilo realizando exocitose composta em mucosa intestinal em resposta à infecção parasitária. 38
- Figura 1.7-** Ilustração científica demonstrando o mecanismo de desgranulação por piecemeal. 39
- Figura 1.8-** Micrografia de eosinófilo realizando o mecanismo de citólise. 41
- Figura 4.1.1-** Quantificação de grânulos e vesículas de secreção em eosinófilos do baço estimulados com LPS ou GM-CSF. 57
- Figura 4.1.2-** Ultraestrutura de eosinófilos isolados do baço de camundongos transgênicos para IL-5. 58
- Figura 4.1.3-** Micrografias eletrônicas de eosinófilos do baço estimulados com lipopolissacarídeo (LPS). 59
- Figura 4.1.4-** Micrografia eletrônica de eosinófilo do baço estimulado com fator estimulador de colônia de macrófago e monócito (GM-CSF). 60
- Figura 4.1.5-** Micrografias eletrônicas de eosinófilos do baço estimulados com fator estimulador de colônia de macrófago e monócito (GM-CSF). 61
- Figura 4.2.1** Quantificação de ribonuclease de eosinófilos estimulados por GM-CSF ou LPS. 62
- Figura 4.3.1-** Ultraestrutura do tecido pulmonar de camundongos submetidos à alérgeno e grupo controle. 64
- Figura 4.3.2-** Micrografia de tecido pulmonar de camundongos asmáticos apresentando eosinófilo ativado. 65
- Figura 4.4.1-** Quantificação de citocinas em tecido pulmonar através de ELISA. 66
- Figura 4.5.1-** Quantificação de peroxidase eosinofílica (EPO) no macerado pulmonar no grupo controle e asma. 67
- Figura 4.6.1-** Quantificação dos grânulos secretores de eosinófilos do grupo asma comparados com o grupo controle. 68
- Figura 4.6.2-** Ultraestrutura de eosinófilos coletados do baço de animais transgênicos para IL-5 como grupo controle. 69
- Figura 4.6.3-** Micrografia eletrônica de eosinófilo do tecido pulmonar coletado de camundongos do grupo asma exibindo sinais de piecemeal. 70
- Figura 4.6.4-** Micrografia de eosinófilo do tecido pulmonar de camundongos asmáticos mostrando vesículas fundidas com grânulos secretores ou com membrana plasmática. 71
- Figura 4.6.5-** Gráfico representativo da média de vesículas por eosinófilos do grupo asma comparados ao grupo controle. 72
- Figura 4.7.1-** Ultraestrutura de eosinófilos do tecido pulmonar de animais asmáticos exibindo grânulo com conteúdo polarizado. 73
- Figura 4.7.2-** Grânulos secretores com formação de bainha (área espessada) na membrana limitante. 74



# INTRODUÇÃO



## 1. INTRODUÇÃO

### 1. 1- A trajetória histórica do eosinófilo através da microscopia

Desde a caracterização do eosinófilo em 1879, muitos avanços têm permitido uma melhor compreensão desta célula multifuncional do sistema imune inato, envolvida em respostas inflamatórias, alérgicas, infecciosas e imunoregulatórias (Gleich, 2013; Lacy et al., 2014; Rosenberg et al., 2013; Spencer et al., 2014). Para muitos pesquisadores, esta é uma célula intrigante, cercada de perguntas e possibilidades que permitem explorar ainda mais as funcionalidades celulares e imunes do corpo humano. Para outros, esta é uma das células mais difíceis de entendimento, dada sua complexidade funcional e que necessita, portanto, de metodologias mais sofisticadas e de novos modelos para investigação.

Em 1846, Thomas Wharton Jones, em seus estudos no corpo humano, descreveu pela primeira vez células contendo grânulos no citoplasma com propriedades de refração de luz (Bielory, 2014; Gleich, 2013). No entanto, o conhecimento sobre o eosinófilo, propriamente nomeado, começou quando Paul Ehrlich, em meados de 1879, testando o corante eosina para a indústria alemã, decidiu aplicar seu produto em células e tecidos de diferentes espécies. Em uma observação feita com exsudato humano corado com eosina, Erlich pôde observar uma rica população de células com elevada quantidade de proteínas altamente básicas dentro de grânulos (Ehrlich, 1879). Devido às propriedades físico-químicas contidas na eosina, corante de caráter ácido e, portanto com afinidade por estruturas básicas (basófilas), tornaram-se evidentes, através da microscopia de luz, os grânulos intensamente corados no interior da célula (Ehrlich, 1891). Desde então, as células fortemente marcadas pela eosina foram denominadas de eosinófilos, despertando por sua vez, a atenção para a presença destas células em vários processos patológicos (Bergmann and Ring, 2014).

Durante dez anos, Ehrlich se propôs a investigar e desenvolver metodologias que auxiliassem no entendimento dos granulócitos encontrados em diferentes doenças humanas tais como asma, doenças de pele, leucemias, infecções parasitárias e bacterianas. Os estudos realizados, utilizaram criteriosamente ferramentas de microscopia de luz para avaliar e classificar a origem, função e composição destes leucócitos.

Após a padronização da eosina e de outros corantes hematológicos, a classificação dos leucócitos tornou-se viável, características como forma, afinidade por corantes ácidos e básicos e granulosidade foram usados como tópicos para a diferenciação entre as populações destas células. No entanto, devido à heterogeneidade das doenças, a distribuição de leucócitos passou a ser alvo de grandes debates.

No período correspondente as décadas de 50 e 60, Paul Ehrlich e Watanabe utilizaram a microscopia de luz como ferramenta para estudar as características gerais de todos os polimor-



fonucleares (PMNs), incluindo os eosinófilos (Bergmann and Ring, 2014; Gleich, 2013; Watana-be, 1957). A partir destes estudos pioneiros, o eosinófilo foi alvo de discussões que levantaram hipóteses sobre sua composição estrutural, a caracterização de sua forma e de seus grânulos específicos e a quimiotaxia por determinados estímulos (Archer, 1959, 1960a, b).

Várias teorias foram levantadas, principalmente no sentido de responder sobre a origem dos grânulos e a distinção dos eosinófilos dos demais granulócitos. De acordo com a tese levanta-



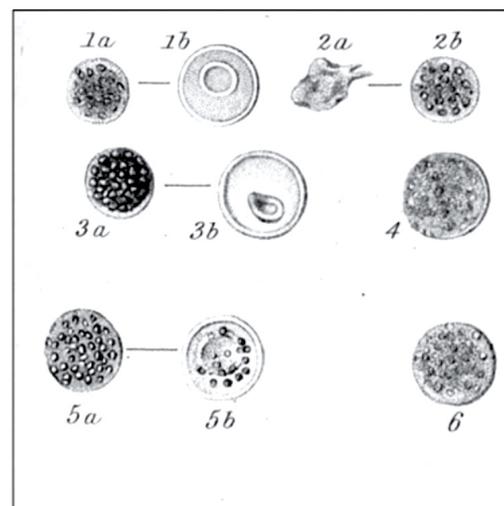
**Figura 1.1- Paul Erlich em seu escritório localizado em Frankfurt, meados de 1900. (Fonte: History of Allergy, 2014)**

tada por Ehrlich e Beggart, estes leucócitos poderiam ser divididos através da origem de seus grânulos e, baseando-se nesta propriedade, agruparam esta população celular em três formas: origem extrínseca, metamórfica ou intrínseca dos grânulos (Biggart, 1933).

Estas observações correlacionando a coloração da eosina com os grânulos, postulou a participação de proteínas armazenadas nestas organelas como fonte de degradação de hemácias e de demais células, ou seja, os eosinófilo possuíam capacidade de transportar proteínas em grânulos e liberar as mesmas em determinadas situações. Este conceito foi descrito como origem

extrínseca dos grânulos. Em paralelo, a teoria da origem metamórfica manteve-se em debate acreditando que eosinófilos eram derivados de uma transformação advinda de neutrófilos, resultado de uma observação realizada entre o acompanhamento da taxa de neutropenia sustentada por uma eosinofilia em algumas doenças. Este fato alimentou a ideia que estes tipos celulares poderiam ter uma linhagem em comum. Mais tarde, Ehrlich levantara a hipótese que eosinófilos e neutrófilos poderiam ser originados de um mesmo precursor, em tecido específico, tal como medula óssea. Por fim, a hipótese da origem intrínseca dos grânulos referia que, os a-grânulos (hoje denominados grânulos específicos ou secundários), eram produtos sintetizados pela própria célula, ou seja, sua origem era resultado da síntese ou alteração de organelas no interior da célula [revisto por (Gleich, 2013)], como por exemplo a partir de mitocôndrias alteradas, (Bainton and Farquhar, 1966; FEDORKO, 1968; Fedorko and Hirsch, 1966).

Com a evolução dos estudos na segunda metade do século XIX, principalmente a partir dos estudos de Ehrlich, os grânulos de eosinófilos foram definitivamente associados com produtos de secreção produzidos pela



**Figura 1.2- Ilustração de Wharton-Jones mostrando as primeiras fases das células do homem e de outros mamíferos, referindo-se as rugosidades em suas características. células humanas (1, 2), Cavallo (3,4), elefante(5,6). (Fonte: History of Allergy, 2014)**



célula. Desta forma, a microscopia de luz aliada a técnicas de coloração desenvolvidas no final do século XIX e início do século XX, tiveram um papel significativo para o entendimento dos eosinófilos e de outros leucócitos nos processos de homeostase e nas patologias humanas. Paul Ehrlich recebeu o prêmio Nobel por suas contribuições nas áreas de patologia e imunologia em 1908 (Kay, 2015).

As técnicas de microscopia de luz, no entanto, não apresentaram resolução suficiente para entender os processos de secreção envolvidos na desgranulação de eosinófilos em respostas à doenças ou em estados fisiológicos. Para tal, é necessária a utilização de outra ferramenta de microscopia - a microscopia eletrônica de transmissão (MET).

### 1. 1.1- Elucidando a estrutura dos eosinófilos através da microscopia eletrônica

A contribuição da MET para o entendimento do papel do eosinófilo vem ocorrendo nos seguintes aspectos: i) identificação morfológica precisa dos eosinófilos e da distribuição destas células em situações fisiológicas e patológicas; ii) caracterização ultraestrutural dos eosinófilos e de seus aspectos celulares, incluindo seus grânulos secretores; iii) imuno-localização das proteínas pré-formadas e armazenadas nos grânulos, incluindo citocinas; iv) descrição dos mecanismos e processos envolvidos na secreção de proteínas (exocitose clássica e composta, desgranulação por piecemeal e citólise ; v) identificação de eventos de transporte vesicular e da organização ultraestrutural de vesículas de transporte associados com o processo de desgranulação. Este conjunto de observações correlacionaram a atividade funcional do eosinófilo à sua extraordinária capacidade de secreção.

Archer & Hirsch, em 1963, apresentaram um estudo descrevendo características relevantes da composição bioquímica de grânulos de eosinófilos. Os autores avaliaram as principais enzimas dos grânulos secretores através do fracionamento de densidade e por pH. Enzimas como catepsina, arilsulfatase, ribonucleases, b-glucuronidase, fosfatase ácida, fosfatase alcalina e peroxidase foram isoladas dos grânulos e estudadas. Essas análises foram decisivas para investigação mais detalhada de uma proteína que apresentou ser frequente nos grânulos, a peroxidase (Archer et al., 1965; Archer and Hirsch, 1963b). Na mesma época, através da MET, os autores mostraram a cinética de liberação de conteúdos armazenados nos grânulos e na migração dos eosinófilos após o estímulo com anticorpos retirados do soro de animais ou estimulados pelo contato com partículas de zymozan. Além disso, mencionaram que a célula em contato com uma partícula fagocítica poderia mobilizar seus grânulos para uma determinada região no citoplasma e formar um grande vacúolo digestivo, descarregando quantidades significativas de produtos estocados (Archer and Hirsch, 1963c).

Nesta época, os grânulos secretores eram vistos como uma organela enigmática em poli-



morfonucleares. Após a demonstração do comportamento de células em contato com corpos estranhos, ou seja, na resposta imuno-patológica, essas organelas receberam maior atenção em estudos ultraestruturais e passaram a ser descritas em diferentes espécies de vertebrados. No entanto, as imagens dessa época apresentavam baixa resolução. Somente através de novas estratégias no protocolo de microscopia eletrônica, a visualização dos detalhes morfológicos passaram a ter melhor resolução, obtendo informações posteriores sobre a organização estrutural das organelas e das dimensões da célula (Hirsch and Fedorko, 1968). Empregando técnicas de citoquímica na MET, como lisina triaciada, Fedorko e col. em 1966, caracterizaram o fluxo de conteúdos do complexo de Golgi para a formação dos grânulos secretores. Estruturas marcadas com a lisina eram vistas acumuladas nos grânulos no tempo de 180-240 horas após estímulos de diferenciação celular. Esta mesma marcação apresentava-se com menor frequência no complexo de Golgi, sugerindo que estas proteínas eram fabricadas no Golgi e transportadas para os grânulos (Fedorko and Hirsch, 1966).

Em estudos sobre a diferenciação de progenitores de granulócitos de coelhos, observou-se que, a participação do complexo de Golgi era fundamental para diversificar a população de grânulos presentes na fase final de maturação de granulócitos. A produção dos grânulos específicos, foram assim caracterizados com origem na parte cis do complexo de Golgi enquanto na parte trans os grânulos azurófilos eram predominantes. Esta produção demonstra ser mais prevalente na fase de pró-granulócitos para mielócitos, onde características mitóticas podem ser visualizadas em algumas células (Bainton and Farquhar, 1966; Fedorko and Hirsch, 1966). Isso determinou classificar a biologia celular do eosinófilo, destacando os grânulos.

Durante a diferenciação da célula, os grânulos podem ser classificados de acordo com seu tempo de produção. Em artigos destacando a presença dos grânulos em estágio de maturação, as organelas foram agrupadas como primária, secundária e terciária. Cronologicamente, os grânulos primários, sendo os primeiros da população, eram descritos em células imaturas, os pró-mielócitos (o estado inicial da origem dos leucócitos), enquanto grânulos secundários são presentes no estado intermediário entre mielócitos, metamielócitos, e células do estágio final. Entretanto, estas classificações foram geralmente realizadas utilizando modelos experimentais, tal como coelhos, e portanto os grânulos terciários eram vistos em células nomeadas na época de heterófilos, o que corresponde ao neutrófilo humano na literatura atual (Seeman and Palade, 1967; Wetzel et al., 1967). Estas observações estabeleceram que esses grânulos se diferenciavam não apenas pelo critério cronológico de desenvolvimento da célula, mas também pela carga proteica distintamente encontrada na formação dessas organelas.

Com relação aos grânulos secundários de eosinófilos, Miller e col. realizaram observações importantes sobre a ultraestrutura destas organelas, mostrando as semelhanças e diferenças entre as espécies frequentemente usadas em laboratórios, como camundongos, ratos, porcos-da-índia, além de humanos (Miller et al., 1966). O resultado destas observações postulou a diversidade ultraestrutural entre a população de grânulos. Além disso, Miller descreve pela primeira vez as divisões internas dos grânulos de todas as espécies enfatizando as diferenças de elétron-densidade do núcleo cristalino (mais elétron-denso) circundado por uma matriz (menos



elétron-densa. Tais diferenças resultam da estocagem e organização de proteínas, de diferentes peso molecular, localizadas nestas regiões.

Interessantemente, examinando o comportamento de eosinófilos em situações distintas, o pesquisador Russell Ross identificou a participação de eosinófilos ativados no tecido uterino de ratas entre os períodos de ciclo hormonal. O autor descreve a vida útil dos eosinófilos em um tecido fortemente governado por um fluxo hormonal que pode levar, em determinado período ou patologia, à morte da célula (Ross and Klebanoff, 1966). Uma das evidências foi a visualização de grânulos fora das células, em processo de morte, com membrana plasmática circundante, além de ser encontrados no interior de vacúolos digestivos de macrófagos. Este não foi o primeiro trabalho a ser realizado com eosinófilos no útero (Bjersing and Borglin, 1963), porém foi o primeiro estudo a mostrar o processo de morte celular caracterizado como necrose. A partir desta observação, debates sobre a fagocitose e o controle de hormônios influenciando a quiescência e quimiotração destas células ganhou forças. Assim, foi possível enxergar o eosinófilo não só como uma célula participante nas condições patológicas, mas também na homeostase de órgãos (Baker et al., 1967; Kambara, 1967).

Considerando a associação do eosinófilo com patologias e a composição dos grânulos, levantava-se na época a pergunta: "quais proteínas eram encontradas em tecidos danificados que poderiam estar estocadas nestes grânulos?" (Kay, 2015). Portanto, a segunda fase do uso da MET para o entendimento dos eosinófilos envolveu o estudo das principais proteínas catiônicas e suas relações com eventos celulares.

A primeira proteína catiônica a ser descrita foi a peroxidase eosinofílica (EPO) (Archer and Hirsch, 1963a). Muitos estudos mostravam sua participação em tecidos e no soro de modelos experimentais de patologias (Archer, 1962; Archer et al., 1965; Archer and Hirsch, 1963a; Archer, 1964). Em 1962-65, um estudo apresentando a importância da peroxidase em processos celulares de eosinófilos recebeu grande destaque. Os resultados destes trabalhos mostraram que esta molécula podia ser transportada para regiões da célula sob o processo de fagocitose, ou seja, essas proteínas eram incorporadas no conteúdo total das organelas responsáveis pela digestão celular, os vacúolos fagocíticos (Archer, 1962; Archer et al., 1965). Essa ligação da EPO com eventos intracelulares foi possível graças a utilização da MET. Neste estudo, além da possibilidade de imagens que comprovassem o tráfico intracelular da molécula (dos grânulos para outra área citoplasmática) evidenciou-se também, a participação da mesma em mecanismos reguladores do sistema imune.

Mais tarde, nas clínicas Mayo, Gerald Gleich identificou uma proteína rica em sítios de arginina que constituía cerca de 57% do grânulo secretor. Utilizando a microscopia e metodologias bioquímicas, ele mostrou que esta proteína não possuía a mesma homogeneidade das demais, comprovando através de resultados obtidos por SDS-PAGE (Gleich et al., 1973). A heterogeneidade desta proteína é devido à elevada propensão de se agregar e isso é particularmente evidente quando a proteína está concentrada em grânulos secretores no eosinófilo, podendo



ser visualizada por MET. Assim, por esta proteína apresentar uma banda principal, diferente das outras proteínas extraídas dos grânulos secundários, foi chamada de Proteína Básica Principal (MBP- Major Basic Protein)(Gleich et al., 1974).

Outra proteína catiônica essencial na composição dos eosinófilos é a ECP. Essa proteína, Proteína Catiônica do Eosinófilo (ECP- Eosinophil Cationic Protein), foi amplamente estudada através de técnicas de biologia molecular, possibilitando o entendimento dessa molécula encontrada em situações de processos infecciosos. Apesar de ter uma íntima relação no combate de microrganismos, a ECP foi primeiramente evidenciada através dos grânulos de células mielóides obtidas de pacientes com leucemia mielóide crônica (LMC). Mesma abordagem exploratória que encontrou a proteína EDN, qual foi extraída de pacientes que apresentavam uma espécie de câncer (Olsson et al., 1977; Venge and Bystrom, 1998; Venge et al., 1999). Embora a microscopia eletrônica não tenha sido utilizada como uma das ferramentas para sua exploração inicial, a EDN é atualmente uma molécula bem caracterizada em estudos de infecção viral, baseando em sinais de ativação da célula visualizadas através da MET.

No entanto, a localização da EDN, e das demais proteínas catiônicas dos grânulos secundários foi determinada graças às técnicas de imuno-localização aplicadas nos eosinófilos participantes de processos inflamatórios. Portanto, a trajetória da história dos eosinófilos é marcada por estudos iniciais mostrando a localização de proteínas e citocinas estocadas em organelas especializadas na secreção dos eosinófilos.

A EPO foi a primeira proteína vista no interior dos grânulos através de marcações citoquímicas com a adição de diaminobenzidina aos eosinófilos fixados em formaldeído. Neste caso, as regiões onde havia EPO ficavam mais elétron-densas, resultado do sinal positivo da reação (Ackerman and Clark, 1971). Este testes foram repetidamente usados nos estudos do eosinófilo, inclusive quando objetivou-se verificar a localização da proteína MBP. Além de aplicarem a técnica para visualizar a EPO, incluíram como metodologia a fixação por glutaraldeído e paraformaldeído em grânulos secretores do eosinófilo no propósito de conservar a estrutura e composição das organelas (Hirsch and Fedorko, 1968). A análise realizada para localizar a MBP envolvia duas técnicas, uma citoquímica direcionada aos sítios ricos de arginina, o que caracteriza a composição desta molécula (Brown and Wood, 1978) e a outra usava uma estratégia imunológica para destacar os sítios de MBP. No entanto, as imagens ainda eram pouco informativas, e a localização proteica necessitava de técnicas mais sofisticadas.

Em meados dos anos 80, a localização subcelular de proteínas de eosinófilos foi elucidada graças à construção de anticorpos que podiam realizar ligações em regiões específicas. A primeira molécula a obter seu anticorpo monoclonal foi a ECP, tal anticorpo distinguia entre as formas secretadas ou estocadas nos grânulos (Spry et al., 1985; Tai et al., 1984). Utilizando a conjugação entre ouro coloidal e anticorpos secundários para cada tipo de proteína, a imuno-marcação para microscopia eletrônica revelou com alto grau de resolução a localização de proteínas armazenadas em compartimentos intracelulares (Roth et al., 1978), permitindo a visualização de proteínas catiônicas, citocinas e quimiocinas em várias situações. Fidedignamente a MBP, EPO, ECP e EDN foram relatadas em distintas regiões dos grânulos, tal como a MBP, era diretamente



relacionada ao núcleo cristalino, confirmando estudos anteriores, enquanto EPO, ECP e EDN foram encontradas na matriz (Dvorak et al., 1994; Egesten et al., 1986; Peters et al., 1986).

O armazenamento das proteínas catiônicas nos grânulos secretores de eosinófilos esclarecia vários processos celulares envolvidos na quimiotaxia desta célula, no sistema imune e na injúria tecidual das respostas patológicas (Butterfield et al., 1986; Kephart et al., 1988; Kephart et al., 1984; Maddox et al., 1984; Spry et al., 1985). No entanto, os mecanismos de secreção dessas células permaneciam ainda desconhecidos em diversas situações patológicas, como por exemplo, durante às respostas de certas doenças infecciosas caracterizadas por acentuada eosinofilia.

Estudos ultraestruturais mostraram que eosinófilos em contato com helmintos como o *Shistosoma mansoni*, um parasita que pode infectar o trato gastrointestinal inferior (TGI), liberam proteínas estocadas em seus grânulos através da exocitose. Esta observação foi comprovada através do estudo de Diane McKlaren em 1977, apresentando pela primeira vez evidências ultraestruturais do mecanismo secretor de eosinófilos, em conjunto com técnicas citoquímicas de marcação de EPO. Observaram-se, desta forma, grânulos fundiam entre si e formavam grandes vacúolos que posteriormente eram destinados à fusão com a membrana plasmática (McLaren et al., 1977).

Na mesma época, Ann M. Dvorak, investigando o comportamento dos grânulos de basófilos por MET em situações alérgicas, percebeu que a elétron-densidade e morfologia desses grânulos se alterava em paralelo com a liberação parcial de seus conteúdos para o meio extracelular. Este evento foi denominado de desgranulação por *piecemeal* (do inglês *piece-by-piece*, de pouco-a-pouco), onde grânulos de células secretoras podem expulsar quantidades seletivas de proteínas dependendo do estímulo (Dvorak et al., 1976a; Dvorak et al., 1976b).

Mais tarde, o mesmo mecanismo secretor foi descrito em eosinófilos e em outros leucócitos (Dvorak, 1980; Dvorak et al., 1982; Dvorak et al., 1989). Além da alteração morfológica dos grânulos secretores, os quais sofriam desestruturação do núcleo cristalóide, mas mantinham a integridade de seu envoltório, foi observada por MET a presença de vesículas de transporte na proximidade dos grânulos e em associação direta com a membrana dos mesmos, indicando que o esvaziamento dos grânulos ocorria por transporte vesicular até a superfície celular

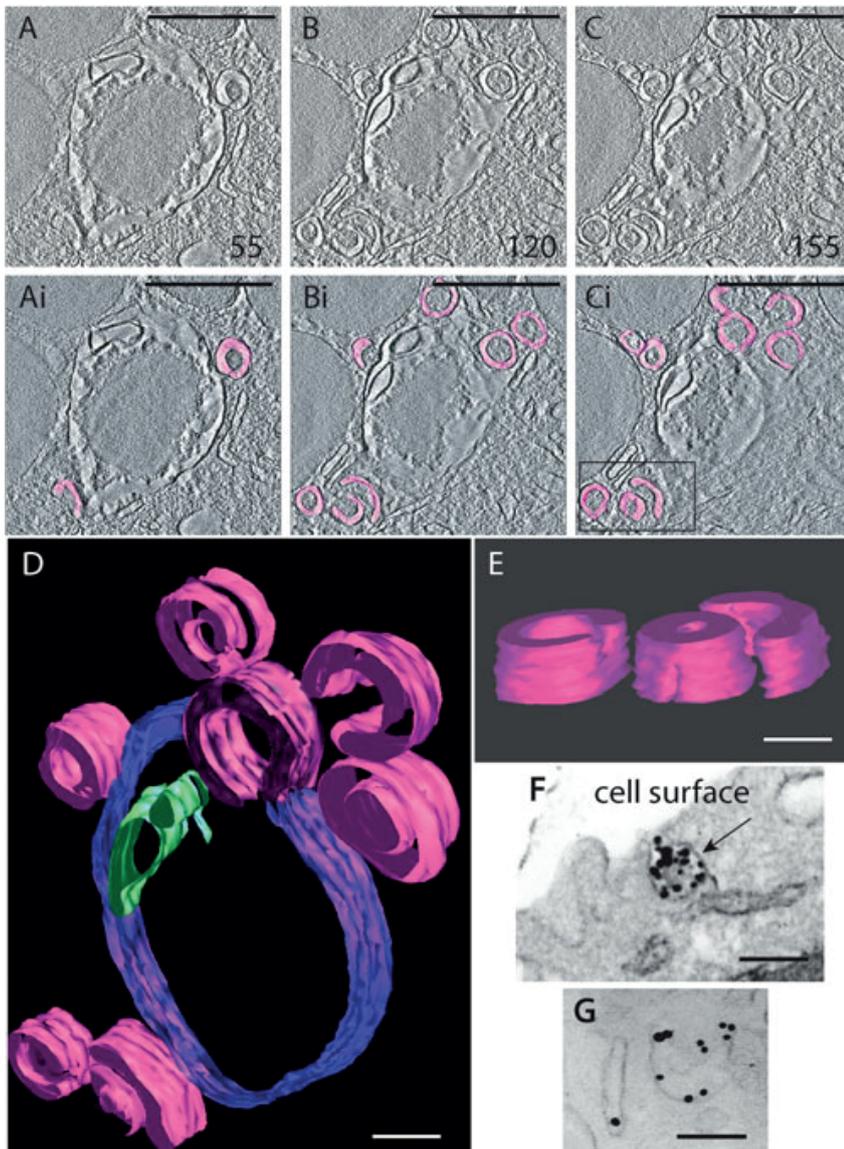
(Dvorak et al., 1992; Dvorak et al., 1991).

Na mesma década, um outro processo celular foi identificado em desordens patológicas associadas aos eosinófilos. Descrito mais tarde como citólise, este processo foi questionado como possível mecanismo secretor destas células. Apesar de haver relatos na literatura há cerca de 100 anos atrás, se desconhecia a importância da morte celular acompanhada pela presença de grânulos secretores depositados em tecidos como no útero de ratas [revisão em (Ross and Klebanoff, 1966)]. A citólise foi observada em outros tecidos em situações alérgicas, como por exemplo, na sinusite, rinite ou em doença de Chron, exibindo evidências de processo de morte celular seguida de deposição dos grânulos na matriz extracelular.

Em 1997, autores como Carl Persson e Jonas Erjefalt, com atenção voltada para este processo, fez um levantamento literário propondo a morte celular de eosinófilos e sua relação com o dano tecidual, associando a presença de grânulos secretores nos tecidos alérgicos (Patkowski



et al., 1997; Persson, 1997; Persson and Erjefalt, 1997a, b). Definiram que o processo de morte celular podia ser o último estágio de ativação do eosinófilo em resposta aos mediadores da inflamação. Assim, a citotóxicidade provocada pela citólise do eosinófilo pode orquestrar a inflamação, mesmo após a necrose da célula (Erjefält et al.; Korsgren et al., 1997; Persson and Erjefalt, 1997a,



**Figura 1.3- Imagens do brotamento de vesículas (em rosa) a partir dos grânulos secretores de eosinófilos humanos, vistas através de elétron-tomografia.** (Imagem retirada de Melo et al, 2005b)

b; Persson and Erjefält, 1997). Desde então, a citólise foi investigada como mecanismo de secreção em modelos de asma experimental (Erjefalt et al., 1999; Mei et al., 2002) e em determinadas doenças associadas aos eosinófilos (Ahlstrom-Emanuelsson et al., 2004; Erjefalt et al., 2001; Greiff et al., 1998).

A partir da década de 2000, avanços em técnicas de MET envolvendo a imuno-marcação com o uso de partículas de ouro da ordem de 1,4 nm e tomografia eletrônica automatizada contribuíram para o entendimento de mecanismos de secreção de eosinófilos humanos. (Melo et al., 2010; Melo et al., 2005a; Melo et al., 2009). Eosinófilos estimulados com agonistas clássicos, como a eotaxina-1 (CCL11), RANTES (CCL5) e Fator Ativador Plaquetário (PAF) mos-

traram secreção dos grânulos através da desgranulação por *piecemeal*. O esvaziamento dos grânulos foi acompanhado por aumento do número de vesículas transportadoras tubulares, além de vesículas redondas pequenas, em íntima associação com os grânulos (Melo et al., 2010).

Na obtenção de maiores detalhes sobre os mecanismos de mobilização de produtos estocados nos grânulos, investigou-se a organização estrutural destes grânulos através da tomografia eletrônica, técnica que permite a observação tridi-



mensional (3D) da célula por MET. A reconstrução tomográfica revelou que os grânulos secretores de eosinófilos não são meras estruturas para armazenamento de compostos, mas organelas com membranas internas. Estas estruturas membranosas vistas em 3D apresentam interconexões tubulares entre a rede membranosa intragranular no limite da membrana do grânulo. Estes estudos também demonstraram que os produtos estocados nos grânulos podem ser realocados nos compartimentos intragranulares, o que pode explicar, em parte a capacidade dos eosinófilos de selecionarem as moléculas a serem secretadas (Melo et al., 2008; Melo and Weller, 2010b).

Além de elucidar a organização estrutural dos grânulos secretores, estudou-se também, por MET convencional e tomografia eletrônica, a arquitetura das vesículas tubulares, presentes no citoplasma de eosinófilos humanos. Estas vesículas apresentam morfologia típica semelhante a um chapéu mexicano (“sombbrero”) e, por esta razão, foram denominadas de Eosinophil Sombbrero Vesicles (EoSV). Antes consideradas como “microgrânulos”, as EoSVs foram identificadas como tendo um papel importante na rota secretora, a partir do transporte de moléculas específicas como IL-4 e MBP (Melo et al., 2005a; Melo et al., 2005c).

A EoSV é uma vesícula de tamanho aproximado entre 150-300 nm, facilmente identificada por MET, podendo ser isoladas por fracionamento celular. A tomografia eletrônica revelou que as EoSVs são vesículas com elevada plasticidade, apresentando domínios cilíndricos completa ou parcialmente conectados, além de domínios curvos. Estes diferentes domínios explicam a presença de perfis tubulares alongados muito próximos à vesículas com morfologia típica de “sombreiros”, conforme se observa em secções 2D (Melo et al., 2005a; Melo et al., 2005c).

EoSVs são distribuídas no citoplasma de eosinófilos, principalmente na proximidade ou em contato com grânulos mobilizados, ou seja, sofrendo esvaziamento de seus conteúdos. Interessantemente, as EoSVs encontram-se aumentadas em número em eosinófilos ativados por agonistas *in vitro* ou *in vivo*, por exemplo, em eosinófilos de pacientes com síndrome hipereosinofílica (HES) em comparação com eosinófilos não estimulados (Melo et al., 2009, 2010). O uso de bloqueadores de transporte vesicular como brefeldina-A (BFA) leva à diminuição do número de EoSVs e acúmulo de inclusões lipídicas no interior dos grânulos secretores (Melo et al., 2009). Outras evidências importantes para a participação destas vesículas no mecanismo de transporte intracelular em eosinófilos foram fornecidas através da imuno-marcação ultraestrutural de EoSVs para produtos armazenados nos grânulos como também para receptores intracelulares destes produtos, por exemplo, receptor para IL-4 (Spencer et al, 2006).

Portanto, estudos de microscopia eletrônica forneceram fortes evidências para a ocorrência de eventos de sequestro e translocação de produtos dentro dos grânulos e identificaram um sistema de transporte vesicular rápido e dinâmico mediando a liberação destes produtos. O conjunto de dados gerado a partir dos estudos ultraestruturais suportam que a desgranulação por *piecemeal* é um processo de liberação de conteúdos que ocorre seletivamente a partir dos grânulos, como sugerido anteriormente (Bandeira-Melo and Weller, 2005; Bandeira-Melo et al., 2002; Spencer et al., 2006).

Os achados ultraestruturais em eosinófilos humanos, em conjunto com outras observa-



ções, levou à avaliação da capacidade funcional dos grânulos dos eosinófilos como organelas secretoras extracelulares. Estes grânulos são vistos livres em tecidos durante patologias como na Doença de Chron, asma e algumas infecções bacterianas (Neves et al., 2008). Demonstrou-se que os grânulos livres (fora das células) respondiam à estímulos de IFN-g e a CCL11 via receptores expressos na membrana granular cognatos à membrana das células, topologicamente orientados a responderem à citocinas e quimiocinas agindo externamente na membrana. Ambos, IFN-g e CCL11 ativaram vias de sinalização intragranular e quando tratados com BFA inibiram a secreção de enzimas, citocinas e proteínas catiônicas derivadas dos grânulos. Além disso, os grânulos estimulados apresentavam perdas de elétron-densidade e alterações morfológicas vistas por MET, compatíveis com liberação gradual de seus produtos pré-formados (Neves et al., 2008; Neves and Weller, 2009).

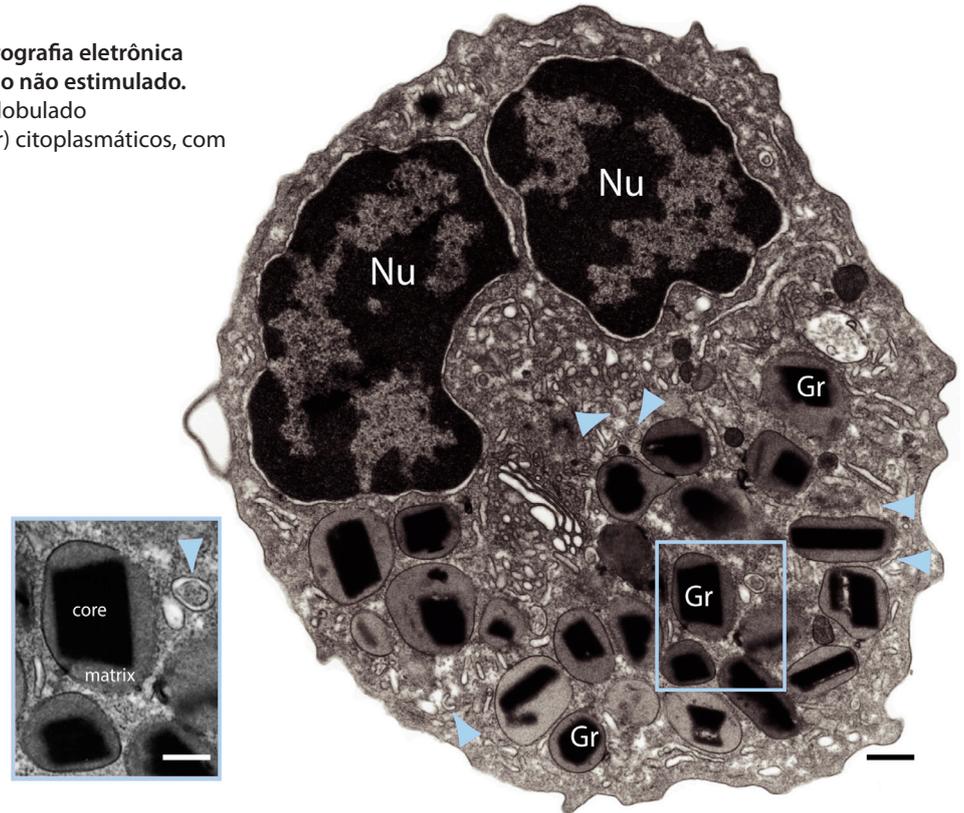
Estudo posterior envolvendo várias ferramentas, inclusive MET e microscopia eletrônica de varredura (MEV), investigaram se eosinófilos em processo de citólise eram capazes de realizar a liberação de DNA em resposta à estímulos inflamatórios, conforme observado para neutrófilos (Ueki et al., 2013). Demonstrou-se que, de fato, eosinófilos humanos são capazes de sofrer o processo de "ETosis" (morte extracelular por armadilha de DNA), em resposta a diversos estímulos, como imunoglobulinas e citocinas. Após cromatólise nuclear, ocorre lise da membrana plasmática liberando DNA que forma redes extracelulares e libera grânulos intactos, conhecidos como cell-free granules (Cfegs) (Ueki et al., 2013). Estas organelas exibiram um retenção de proteínas catiônicas mas permaneceram funcionalmente competentes a secretarem outras proteínas na presença de CCL11. Portanto, Cfegs após a lise das células, podem continuamente responder aos estímulos imuno-regulatórios e pró-inflamatórios mediando a resposta imunológica juntamente com outras vias de defesa fisiológica (Ueki et al., 2013).

Mais recentemente, estudos em biópsias humanas de pacientes com esofagite eosinofílica, revelaram a ocorrência de citólise e piecemeal como principais mecanismos secretores de eosinófilos nesta patologia. Além da identificação de grânulos intactos nos tecidos, como resultado da citólise, foi também observada a presença de EoSVs íntegras na periferia ou em contato com grânulos em processo de perdas de conteúdos. Estas imagens mostram que além dos grânulos, as vesículas derivadas dessas organelas podem desempenhar funções extracelulares (Saffari et al., 2014).

Coletivamente, os dados levantados da história dos eosinófilos destacam as técnicas de microscopia como ferramenta essencial para o entendimento dos processos de secreção e transporte vesicular envolvidos na liberação de mediadores armazenados em eosinófilos, contribuindo, assim, para o entendimento das respostas inflamatórias e imuno-regulatórias destas células.



**Figura 1.4- Micrografia eletrônica de um eosinófilo humano não estimulado.** Observe o núcleo (Nu) bilobulado e grânulos específicos (Gr) citoplasmáticos, com morfologia típica



## 1. 2- Imunobiologia dos Eosinófilos

### 1. 2.1- Características Gerais

Os eosinófilos humanos são granulócitos diferenciados a partir da medula óssea, caracterizados por um núcleo bi-lobulado e uma rica população de grânulos secretores citoplasmáticos contendo um núcleo cristalino denominados de grânulos secundários ou específicos ou cristalinos. Estes grânulos têm morfologia típica, com um núcleo elétron-denso e uma matriz elétron-lúcida. Uma pequena população de grânulos, sem a presença de núcleo cristalino, conhecidos como grânulos primários, também é descrita no citoplasma de eosinófilos humanos e parecem corresponder a grânulos secundários imaturos. Os grânulos primários armazenam os cristais de Charcot-Leyden (CLC, Chacot-Leyden Crystals).

Os eosinófilos humanos também são caracterizados pela presença de carreadores túbulo-vesiculares com morfologia típica (EoSv), conforme já mencionado, e corpúsculos lipídicos (CLs) elétron-densos. Além disso, nota-se a presença de um complexo de Golgi bem delimitado, mitocôndrias com cristas alongadas e retículo plasmático liso proeminente.

Durante o processo de amadurecimento desta célula, diversos mecanismos regulatórios permitem a diferenciação e a maturação tornando-se hábeis a serem responsivos a estímulos inflamatórios. Em resumo, estas células são derivadas de progenitoras CD34+, possui em sua



linhagem de diferenciação fatores de transcrição que atuam no controle do seu desenvolvimento, diferenciação e maturação tais como C/EBP, PU.1 e o fator GATA-1, sendo considerado os mais importantes, orquestrando vários eventos essenciais da célula.

Estes fatores regulam desde a apresentação de marcadores de superfície (IL-5R e CCR3) à liberação de proteínas específicas encontradas nos grânulos secretores. Proteínas como citocinas (IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-9, IL-13, GM-CSF, G-CSF, SCF), quimiocinas (CCL5 e CCL11) e proteínas catiônicas (EPO, MBP, EDN ECP) localizam-se em compartimentos no interior do grânulo secretor (Melo et al., 2010; Rothenberg and Hogan, 2006).

No cenário de diferentes proteínas imuno-reguladoras, citocinas de perfil Th2 (IL-4, IL-5 e IL-13) podem desempenhar um papel central na iniciação e perpetuação de doenças alérgicas, como exemplo a asma. A IL-5 pode regular o crescimento, diferenciação e ativação de eosinófilos além de fornecer um sinal essencial para o recrutamento destes aos pulmões durante a inflamação alérgica da asma. IL-4 induz a diferenciação de linfócitos Th0 em células Th2 e estimula os linfócitos B a produzir IgE (Proust et al., 2002). IL-13 parece ter atividade similar à IL-4, pois ambas são capazes de induzir a proliferação e migração de fibroblastos da conjuntiva, além de reduzir a taxa apoptótica dessa variedade celular (Fukuda, Kumagai et al., 2006).

O tráfego de eosinófilos para o foco inflamatório envolve uma gama de citocinas (em particular Th2 [IL-4, IL-5 e IL-13]), moléculas de adesão (integrinas) e quimiocinas e, baseando-se em observações in vitro, os eosinófilos teciduais podem sobreviver por pelo menos duas semanas. Das citocinas que modulam o recrutamento de leucócitos, somente IL-5 e eotaxina atuam seletivamente sobre o tráfego de eosinófilos (Collins et al., 1995; Jose et al., 1994). A IL-5 é responsável pelo crescimento, diferenciação, ativação e sobrevivência de eosinófilos e fornece um sinal essencial à expansão e mobilização dos eosinófilos da medula óssea para os pulmões, após a exposição ao alérgeno. Porém, a eosinofilia tecidual pode ocorrer independente da IL-5 (Rothenberg and Hogan, 2006; Shamri et al., 2011), visto que a CCL11 é uma potente quimioatratora de eosinófilos e pode ser produzida por células residentes, incluindo fibroblastos e miofibroblastos, e a produção desta quimiocina por essas células parece contribuir diretamente com a eosinofilia tecidual (Zhang et al., 1996).

## 1. 2.2- Eosinofiloiose

Eosinófilos são derivados de uma célula tronco hematopoiética e progenitora comum de multilinhagem na medula óssea.

A diferenciação de macrófagos e neutrófilos é regulada primariamente pelos fatores de transcrição da família CCAAT/enhancer-bind protein (C/EBP) e E-twenty-six (ETS) PU.1, enquanto a diferenciação de eritróide e megacarióide são regulados pelos fatores GATA-interacting protein, próximos de GATA protein 1 (Blanchet and McNagny, 2009; Graf, 2002; Hui et al., 2015; McNagny et al., 1998),

Eosinófilos são uma células que quebram essas regras, apresentam a co-expressão em



conjunto dos fatores PU.1, GATA e C/EBP. Através de um elegante estudo de expressão de gene ectópico, foi apresentado que o destino dos eosinófilos representa um equilíbrio combinatório entre o limiar do nível de expressão desses fatores de transcrição, porém uma sutil ruptura deste equilíbrio pode levar à linhagem mielóide ou eritróide (Akashi et al., 2000; Blanchet and McNagny, 2009). No entanto, esses fatores de transcrição (GATA, ETS, C/EBP), também regulam a expressam de genes específicos do eosinófilo. Em particular, sítios double GATA, são característicos de vários genes promotores no eosinófilo, como exemplo de Gata 1 gene (vistas em camundongos) e genes encoding the interleukin-5 receptor; alpha chain (IL5RA), proteoglycan 2, bone marrow/eosinophil granule major basic protein (PRG2/MBP) e chemokine (C-C motif) receptor-3 (CCR3) (Rothenberg and Hogan, 2006). O nível desses fatores mudam de acordo com a maturação dos eosinófilos. Estudos recentes têm demonstrado em detalhes como essas complexas interações regulam o comprometimento, diferenciação e maturação da linhagem dos eosinófilos (Uhm et al., 2012).

Enquanto estudos *in vitro* revelam a mecânica dos fatores de transcrição, sendo suficientes para dirigirem o comprometimento e maturação, estudos *in vivo* têm contribuído para o entendimento de como a população de progenitores dão origem aos eosinófilos. A expressão de dois marcadores da membrana, CD34<sup>+</sup> e subunidade alfa do receptor de interlucina-5 (IL-5RA, interleukine-5 receptor subunit alpha), somados com os marcadores de célula tronco, são usados para definir e distinguir os progenitores comprometidos com a linhagem de eosinófilos (EoPs) dos demais leucócitos. Em asmáticos, uma frequência aumentada dos marcadores CD34<sup>+</sup> e IL-5RA<sup>+</sup> é correlacionada com aumento da produção de eosinófilos maduros e com a expansão de EoPs [revisado em James Lee and Helene Rosenberg(2013)]. Além disso, em estudos com camundongos mostraram que CD34 é expresso em eosinófilos maduros sobre condições inflamatórias, apresentando importante papel na migração destas células tanto na asma quanto na colite ulcerativa (Blanchet et al., 2007; Maltby et al., 2010).

Eosinófilos são classificados como células originadas da medula óssea, entretanto este particular debate contem controvérsias sobre se surgem de um bipotente progenitor eosinófilo/basófilo [revisado por (Gauvreau et al., 2009)] ou se surgem de uma população comum de progenitores mielóide [revisto em (2013; Iwasaki et al., 2005; Mori et al., 2009)]. Durante a diferenciação desta célula, alguns receptores apresentam participação fundamental na diferenciação dentro da hipótese da origem eosinófilo/basófilo. A partir de ensaios *in vitro*, Reece et al demonstra que estas células sofrem suas transformações envolvendo receptores de reconhecimento de padrão, receptores do tipo toll (TLR). Células progenitoras coletadas da medula óssea e estimuladas com lipopolissacarídeo (LPS) resultou na liberação de citocinas, ativando a via de fator nuclear-kB (NFkB) levando a diferenciação dos progenitores, sugerindo que este mecanismo é ativado por receptor do tipo toll-4 (TLR-4)(Reece et al., 2013).

Deste modo, uma vez comprometidos, a maturação e proliferação dos eosinófilos é amplamente guiada pelo microambiente intracelular da célula. Receptores de citocinas, tal como GM-CSF, IL-3 e IL-5 são conhecidos por desempenharem um papel importante na maturação e na função efetoras do eosinófilo humano (Kouro and Takatsu, 2009). Dentre estas citocinas, a



IL-5 é a proteína mais específica à eosinófilos, devido a sua seletiva expressão de IL-5Ra, e de fato muito do entendimento dos fatores de transcrição que governam o desenvolvimento tem sido obtidos sobre análises do gene que codifica este receptor (Kouro and Takatsu, 2009).

A expressão de receptores na célula como CD34+ e IL-5Ra+ (EoP) são aumentados em pacientes asmáticos e em camundongos de modelos de asma, dentro da medula óssea e no sangue periférico (Inman et al., 1999; Sehmi et al., 1997; Voehringer et al., 2007). Estas células dão origem a colônias de eosinófilo/basófilo in vitro, quando cultivados na presença de GM-SCF, IL-3 e IL-5 (Dvorak et al., 1992; Wood et al., 1998). A população de células CD34+ com potencial unidade de formação de colônias eosinófilo/basófilo estão também presentes em tecidos de modelos de asma experimental, sugerindo que EoP ou uma população de progenitores iniciais podem migrar da medula óssea para o sítio de inflamação e produzir eosinófilos maduros in situ. Estes achados sugerem que intervenções objetivando unicamente a limitar a produção de eosinófilos na medula óssea, uma vez que a doença esteja estabelecida, não podem prevenir o acúmulo desta célula em sítios inflamatórios. Outras estratégias devem, portanto, ser usadas para inibir a invasão de EoPs no tecido e, conseqüentemente, a exacerbação de doenças eosinofílicas, em condições patológicas crônicas. Tais estratégias também atuariam na diminuição do perfil de proteínas quimiotáticas de eosinófilos e de proteínas derivadas dos grânulos que possuem características de realizarem sinalização parácrina e autócrina (El-Shazly and Lefebvre, 2011; Fulkerson et al., 2014; Karlsson et al., 2011; Radke et al., 2009; Stolarski et al., 2010).

### 1. 2.3- Proteínas pré-estocadas nos grânulos e suas propriedades

Durante e após o processo de maturação dos eosinófilos, vários fatores imuno-modulatórios são envolvidos na formação destas células. A maquinaria da produção desses fatores, em progenitores de eosinófilos, seguem o modelo clássico de fabricação de proteínas essenciais para a manutenção e para o estágio de maturação, com o processamento nos retículos endoplasmáticos e empacotamento pelo complexo de Golgi. No entanto, após estas etapas, o eosinófilo pode armazenar proteínas em grânulos secretores, tornando-se uma célula com características particulares dentre os demais leucócitos. Estas proteínas pré-estocadas nestes grânulos secretores são cruciais para determinar a resposta imune em condições fisiopatológicas. O interior dos grânulos é permeado por uma variedade de moléculas que podem ser liberadas rapidamente através de mecanismos de secreção em respostas à eventos inflamatórios. Dentre estas moléculas encontram-se proteínas catiônicas, citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento que podem participar da regulação, reparação e remodelamento envolvido no funcionamento do sistema imune



## I. Proteínas catiônicas

As seguintes proteínas catiônicas são encontradas nos grânulos secretores: EPO, MBP-1 e sua homóloga MBP-2 (Gleich et al., 1973; Plager et al., 1999; Plager et al., 1998) e ribonucleases (RNases)- RNase2 (conhecida como neurotoxina derivado do eosinófilo-EDN) (Durack et al., 1981; Gordon, 1933) e RNase3 (proteína catiônica do eosinófilo-ECP) (Gleich et al., 1986), são estocadas nos grânulos secundário e liberadas em condições imuno-regulatórias.

A MBP-1 é uma proteína abundante localizada no interior dos grânulos secretores, inicialmente expressada como um polipeptídeo de ~25kDa (pré-pró forma). Esta proteína é altamente tóxica para células de mamíferos e pode causar danos a helmintos e bactérias. Através de rupturas na camada lipídica, esta molécula pode ocasionar a morte da célula, além de alterar a atividade de enzimas dentro dos tecidos. MBP-1 estimula a liberação de mediadores, tal como histamina, por basófilos e mastócitos e ativa neutrófilos e plaquetas a aumentarem a produção de superóxidos de oxigênio por macrófagos (Gleich et al., 1993).

A MBP-1 possui homologia com a MBP-2, exclusivamente expressa em eosinófilos, mas esta proteína ainda requer maiores investigações. Apesar de serem distintas, estas duas proteínas também apresentam propriedades similares tal como mostrados em estudos *in vitro*, podem realizar danos e morte às células, indução de superperóxidos e IL-8 à partir de neutrófilos e mastócitos e a liberação de histamina e leucotrienos por basófilos. No entanto, a MBP-1 é considerada mais potente do que MBP-2, visto em eosinófilos humanos estimulados *in vitro*. Portanto, a MBP-2, presente somente em eosinófilos, pode ser utilizada como biomarcador específico para esta célula no cenário patológico [revisado por (Acharya and Ackerman, 2014; Gleich et al., 1993)].

Estudos direcionados ao entendimento da participação desta proteína MBP em doenças associadas aos eosinófilos, mostraram que quando diretamente instiladas dentro das vias aéreas de camundongos, induz ao remodelamento das vias aéreas, similar à asma, e incluindo a indução da expressão de fator de crescimento tumoral-beta (TGF- $\beta$ ) e matriz de metaloproteinase-1 (MMP1) epitelial e fibrose sub-epitelial (Pégorier et al., 2006). Estes sinais observados, foram investigados em modelos de asma experimental sob o gene MBP-1 deficientes. Os resultados demonstram que neste modelo não desenvolveu os sinais patológicos encontrados na asma, tal como recrutamento de células e alterações histopatológicas (Denzler et al., 2000; Macias et al., 2000). Por outro lado, quando camundongos deficientes do gene de EPO foram desafiados com alérgeno, não obtiveram resultados de resolução ou de inibição de fatores de desenvolvimento de asma, concluindo que estas duas moléculas participam das respostas inflamatórias em atividades combinadas (Denzler et al., 2001). Quando camundongos foram duplamente deficientes nestas proteínas (MBP-1<sup>-/-</sup> e EPO<sup>-/-</sup>), resultou em animais altamente específicos para eosinofiloiose, com perfil de eosinófilos imaturos, sugerindo que estas proteínas são intrinsecamente participantes no processo de granulogênese destas células [(Ackerman, 2013) e revisado por (Acharya and Ackerman, 2014)].

A EPO foi a primeira proteína a ser descrita em eosinófilos, encontrada em doenças



alérgicas, esta molécula possui característica altamente catiônica similar a MBP-1 e ECP e tem características estruturalmente distintas, com peso aproximado de 68 kDa. Além disso, é bioquimicamente relacionada com MPO (mieloperoxidase), presente em grânulos específicos de neutrófilos, apresentando comportamento autocatalítico. EPO é a proteína mais abundante, constituindo aproximadamente 25% da massa proteica da matriz dos grânulos secretores, usa seu peróxido de hidrogênio como um substrato oxidante para gerar espécies oxidantes, incluindo ácidos hipohalosos (Acharya and Ackerman, 2014; Rothenberg and Hogan, 2006). Mediante as condições inflamatórias, estas proteínas são liberadas dos eosinófilos, exercendo alguns efeitos citotóxicos como uma toxina catiônica, sendo hábil a levar à morte de parasitas e outras células de mamíferos, na ausência de peróxido de hidrogênio e cofator de hálido. Além disso, a EPO pode exercer ambas as funções, tanto anti-inflamatório quanto pró-inflamatória (Henderson et al., 1982; Locksley et al., 1982; Park et al., 1992).

EDN e ECP são ribonucleases associadas ao eosinófilo (EARs) pertencentes à superfamília das Ribonucleases A, com eficiência enzimática comparável às ribonucleases pancreáticas bovinas, capazes de gerar ribonucleotídeos de ácido insolúvel a partir do substrato de ácido polimérico insolúvel. (Acharya and Ackerman, 2014)

A EDN, é chamada por alguns autores de EPX, conhecida também como ribonuclease 2. Possui propriedades neurotóxicas e citotóxicas capazes de reproduzir o fenômeno de Gordon, são injeções administradas intratecalmente resultando em paralisia, ataxia, fraqueza muscular e morte das células de Purkinje cerebelar. Embora tenha sido descoberta e inicialmente nomeada como neurotoxina, a EDN é também expressa constitutivamente no tecido hepático humano e a sua expressão pode ser induzida em macrófagos por estímulos pró-inflamatórios (Blanchard and Rothenberg, 2009; Heidemann et al., 2010; Jonsson et al., 2014; Newton et al., 1994; Plager et al., 2009).

Eosinófilos são recrutados em respostas à infecções respiratórias causadas por vírus, tal como Vírus Sincicial Respiratório (RSV) e vírus influenza A H1N1 (Lacy, 2014; Samarasinghe et al., 2014). Ainda não está claro como os eosinófilos podem participar da resolução destas infecções, mas estas células podem realizar a liberação de suas proteínas e colaborar com a resposta imune. Dentre as proteínas, foi visto que a EDN efetua a diminuição da taxa de infecção do RSV por células endoteliais, mecanismo diretamente dependente da atividade ribonuclease. Desta forma, é considerada efetiva contra vírus de RNA de fita única. Além disso, esta proteína pode ativar células dendríticas (DCs) (levando à expressão de uma variedade de quimiocinas inflamatórias, citocinas, fatores de crescimento e receptores solúveis IL-6, CCL5, TNF- $\alpha$ , MCP-2, MIP-1 $\alpha$ , e IP-10 (Davoine and Lacy, 2014). Através do estímulo de EDN recombinante derivada de resposta bacteriana, demonstrou-se atividade quimiotática para DC, embora não se tenha identificado nenhum receptor específico. A ruptura realizada pela toxina pertussis, tornou sensível a atividade de quimioatração, sugerindo que este mecanismo pode ser mediado por receptor acoplado por proteína G. Além da atividade de recrutamento de células dendríticas, EDN promoveu maturação e ativação destas células, bem como parece atuar como uma alarmina ativando a via de sinalização de TLR2-MyD88 em DC, aumentando a resposta imune de perfil Th2 (Acharya and



Ackerman, 2014; Hung et al., 2012; Rosenberg, 2008; Yamaguchi et al., 2008; Yang et al., 2008)

A ECP, conhecida como ribonuclease 3, possui propriedades citotóxicas e neurotóxicas, reproduzindo os mesmos eventos do fenômeno de Gordon anteriormente mencionados para EDN. ECP é considerada mais catiônica do que EDN, com grande toxicidade para uma variedade de helmintos, hemoflagelados, bactérias, vírus de RNA de fita única e ao tecido do hospedeiro (Domachowske et al., 1998a; Lacy et al., 2014; Rosenberg, 1998; Topic and Dodig, 2011). Os níveis de ECP são usados como dados clínicos associados aos eosinófilos, avaliados em doenças de caráter alérgico como a asma e correlacionados com o grau de severidade da doença e atividade inflamatória dos eosinófilos (Jung et al., 2014; Park et al., 2014; Ramarokoto et al., 2014; Tedeschi et al., 2014).

A ECP é secretada por eosinófilos ativados através de duas maneiras: como dependente de anticorpo (IgG, IgA) ou independente de anticorpo (componentes C3 e C5 do complemento). Além disso, IL-5, IL-3 e GM-CSF têm um impacto positivo na desgranulação por eosinófilos (Carlson et al., 1993; Tomassini et al., 1991). Durante a secreção de ECP a partir dos grânulos de eosinófilos, ocorre uma deglicosilação que converte a forma inativa de ECP com alta peso molecular em ativa ECP com baixa peso molecular (Woschnagg et al., 2009). Tem sido confirmado um efeito inibitório na liberação desta proteína através da administração da ciclosporina A e de rapamicina após a ativação dos eosinófilos por IL-5 (Meng et al., 1997), e também, pela dexametasona e formoterol após indução de desgranulação por inóforo de cálcio (A23187) (Eda et al., 1993; Kawashima et al., 1994).

A atividade anti-bacteriana e a toxicidade anti-parasitária são consideradas maiores na ECP em comparação com a EDN. Em estudo in vitro, a ECP pode ser um agente antiviral, participando da defesa da infecção causada pelo vírus RSV, com a participação de exo- e endonucleases clivando o RNA de fita única (Domachowske et al., 1998b), estas investigações apresentam que baixas quantias de ECP podem diminuir a infectividade do vírus, utilizando sua atividade de ribonucleases, embora importante, ainda não é suficiente para um completo efeito antiviral que é atribuído ao eosinófilo (Acharya and Ackerman, 2014; Boix et al., 2012; Bystrom et al., 2011; Pulido et al., 2013)

Devido ao seu efeito anti-infeccioso, a ECP tem um potencial terapêutico no desenvolvimento de drogas para a indústria. Além disso, esta proteína tem efeitos citotóxicos em conjugação com peptídeos, pode causar a ruptura da membrana e combater a infecção causada por bactérias (Gram-negativas e Gram-positivas), (Sanchez et al., 2011; Torrent et al., 2009; Torrent et al., 2008) (Pulido et al., 2013).

## II. Citocinas, Quimiocinas e Fatores de crescimento

Além das proteínas catiônicas, os eosinófilos possuem inúmeros fatores imunomodulatórios que são liberados sob a ativação da célula. Diferente das células T e B, eosinófilos podem liberar rapidamente citocinas abrigadas em grânulos secretores em resposta à estímulos. Vários desses fatores elaborados por eosinófilos, são geralmente regulados por respostas imunes, parti-



cularmente por CCL3/MIP-1a, CCL5, CCL11, CXCL8/IL-8, GM-CSF, IL-1a, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-13, TNF, SCF e outros fatores de crescimento. Apesar de eosinófilos estarem geralmente em associação com a imunidade Th2, estas células podem expressar Th1, Th2 e citocinas regulatórias, assim como citocinas com fortes propriedade pro- ou anti-inflamatória. Assim, existe uma lista de cerca de 35 mediadores derivados dos eosinófilos (Davoine and Lacy, 2014; Hogan et al., 2008; Lacy and Moqbel, 2000; Lacy et al., 2014), com destaque para CCL5 (Lacy et al., 1999), CCL11 (Nakajima et al., 1998), GM-CSF (Levi-Schaffer et al., 1995), IL-2 (Levi-Schaffer et al., 1996), IL-4 (Melo et al., 2005b; Moller et al., 1996b; Moqbel et al., 1995), IL-5 (Desreumaux et al., 1992; Moller et al., 1996a), IL-6 (Hamid et al., 1992), IL-13 (Spencer et al., 2009; Woerly et al., 2002), TNF-a (Beil et al., 1993) e TGF-a (Egesten et al., 1996), os quais se encontram pré-formados nos grânulos.

Algumas quimiocinas, como CCL5 e CCL11, podem sustentar o recrutamento e manutenção de eosinófilos e linfócitos durante a inflamação alérgica. CCL5 ativa a via intracelular de íons de cálcio, conseqüentemente, levando à desgranulação e promovendo a liberação de superóxidos, seguida da quimiotaxia. CCL11, é uma quimiocina específica de eosinófilo fornecendo sinais na quimiotaxia desta célula. É considerada a quimiocina mais importante durante o processo alérgico, pois além de exercer o comportamento intracelular similar a CCL5, pode mobilizar  $Ca^{+}$  e realizar o buste respiratório, sugerindo um comportamento autócrino (Elsner et al., 1996; Tenscher et al., 1996).

Os primeiros estudos para a descoberta do CCL11 começou utilizando porco-da-índia como modelos do recrutamento de eosinófilo em experimentos mimetizando a resposta asmática (Pease et al., 2004). Após sucessivas análises, empregando uma metodologia de HPLC após o recrutamento de eosinófilos marcados com Índio radioativo ( $^{111}In$ ), chegaram à proteína CCL11, denominada assim de eotaxina. Graça aos modelos murinos, esta quimiocinas teve em sua trajetória elegantes estudos que permitiram uma descrição fidedigna de sua participação em condições patológicas. Posteriormente, em 1996, utilizando camundongos como plataforma de experimentos, para serem reproduzidos em células humanas, foi realizado uma elaborada investigação que resultou na caracterização de seu receptor (Ponath et al., 1996). A história da eotaxina foi recentemente escrita pelo idealizador de sua pesquisa, podendo ser lida livremente na *Frontiers in Immunology*, 2015 (Williams, 2015). Portanto, esta quimiocina, amplamente estudada nos processos de ativação, recrutamento e desgranulação dos eosinófilos teve seu caminho elucidado através de modelos murinos.

Eosinófilos secretam quantidade expressiva de GM-CSF, sob condições *in vitro*, que prolongaram a sua própria taxa de sobrevivência, sugerindo que esta molécula é criticamente importante para manter a viabilidade e a função efetora desta célula no foco inflamatório. Em paralelo, IL-4 tem sido extensivamente estudada em inflamações alérgicas, possui um papel importante na manutenção da resposta Th2 e pode estimular células B na produção de isotipos de IgE. A IL-4 tem vários papéis na inflamação alérgicas, como indução da quimiotaxia de eosinófilos, aumento da capacidade secretora destas células e estímulo para adesão e migração de leucócitos através da promoção do aumento de IgE e da expressão de molécula de adesão de célula vascular (VCAM) em células endoteliais [revisado por (Hogan et al., 2008)].



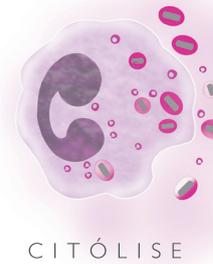
Similar à IL-4, a IL-5 é muito investigada em repostas alérgicas inflamatórias. Esta citocina é essencial para diferenciação de eosinófilos de progenitores CD34+ derivados da medula óssea (Shalit et al., 1995; Yamaguchi et al., 1988). A IL-5 possui inúmeros efeitos em eosinófilos, incluindo o prolongamento da sobrevivência, indução da quimiotaxia, priming, e desgranulação em repostas a agonistas.

A IL-13 tem funções em doenças das vias respiratórias como a asma, atuando na fibrose pulmonar e ativação de metaloproteases. Além da participação na resposta alérgica pulmonar, esta proteína é também requerida em infecções helmínticas experimentais, como função protetiva contra o parasito, ela fornece sinal para expulsão do organismo invasor (Urban et al., 1998; Wills-Karp et al., 1998; Zheng et al., 2000)..

Além desses mediadores, o eosinófilo também expressa em sua composição, fatores de crescimento relacionados à respostas inflamatórias. TGF- $\beta$  atua no remodelamento tecidual e cicatrização de feridas por induzirem o crescimento de fibroblastos e sua diferenciação em miofibroblastos. Este fator de crescimento é especificamente reconhecido pelo seu papel na fibrose e em inflamações crônicas (Proust et al., 2002; Todd et al., 1991; Wynn, 2011). Portanto, TGF- $\beta$  pode ser liberado por eosinófilos participando na deposição de proteínas extracelulares, tal como colágeno, contribuindo para as modificações estruturais vistas em tecidos fibrosados, como exemplo a resposta severa à inflamação alérgica (Aceves, 2014).

### 1. 2.4- Mecanismos de secreção

Em média, cada eosinófilo possui cerca de 300-400 grânulos específicos em seu citoplasma (Hartmann et al., 1995; Henderson and Chi, 1985), estocando uma quantidade expressiva de proteínas e mediadores lipídicos que são liberados para o meio extracelular durante respostas alérgicas, inflamatórias e imunoreguladoras. Três processos de secreção são identificados em eosinófilos: exocitose, desgranulação por picemeal e citólise.

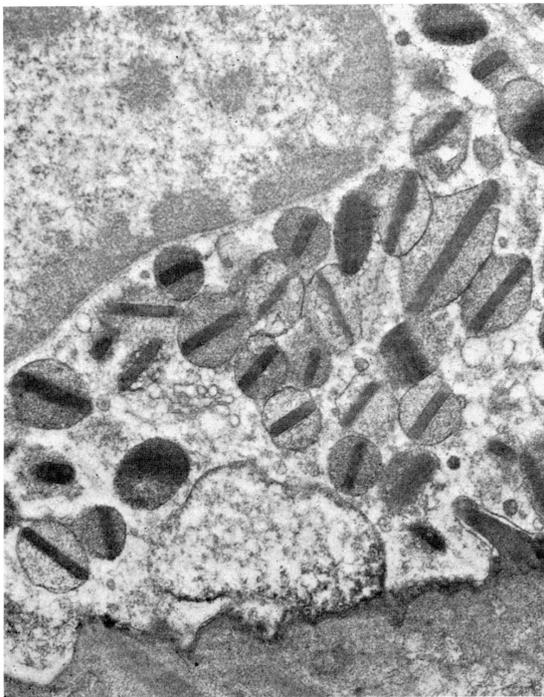


**Figura 1.5- Ilustração dos tipos de processos de secreção em eosinófilo humanos**



## I. Exocitose

A exocitose é conhecida como liberação clássica de conteúdos intracelulares para o meio extracelular, como descrito nos livros de biologia. A exocitose clássica de grânulos ocorre



**Figura 1.6- Ultraestrutura de eosinófilo realizando exocitose composta em mucosa intestinal em resposta à infecção parasitária. (Fonte: Dianne McLaren, 1977)**

através de uma série de eventos altamente regulados: (a) mobilização ou translocação de grânulos para a periferia da célula; (b) ligação do grânulo com a membrana plasmática; (c) acoplamento entre o grânulo e a membrana plasmática; (d) fusão das membranas e liberação do mediador (Logan et al., 2002). Sobre algumas circunstâncias, um ou mais grânulos secretores podem fundirem antes da fusão com a membrana plasmática, resultando em uma exocitose denominada de composta.

Em estudos co-culturas foi visualizada a interação de eosinófilos com alguns parasitos (*Schistosoma mansoni*, *Trichinella spiralis*, ou *Nippostrongylus brasiliensis*) com evidências ultraestruturais de exocitose e liberação

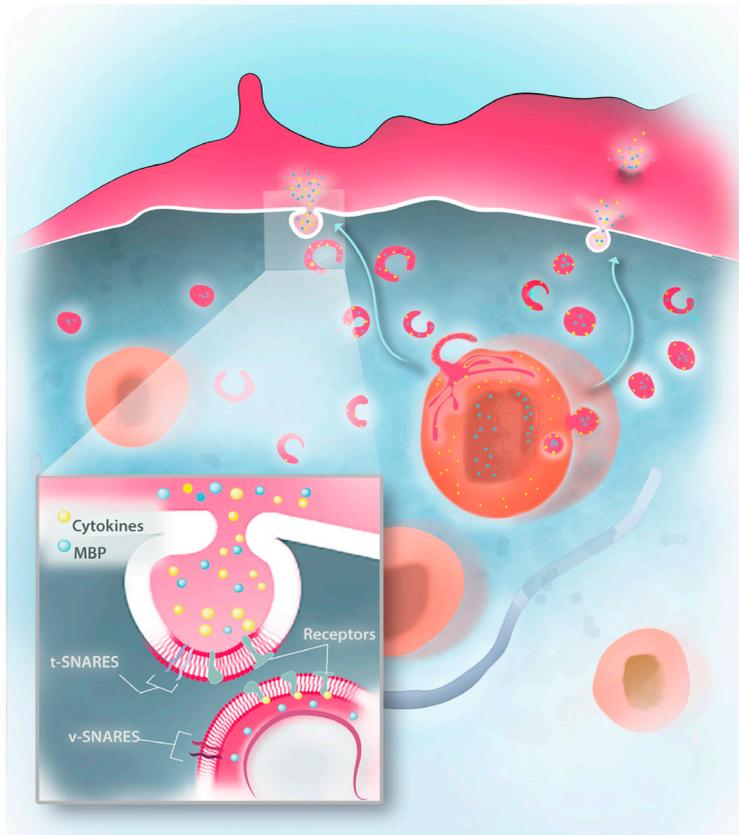
de conteúdos derivados dos grânulos na superfície dos parasitos (McLaren et al., 1977)(FER Lenzi). Outras observações in vitro mostraram a exocitose de eosinófilos sob estímulos com IgA e IgG (Weiler et al., 1996) e guanosina 5'-O-[gama-tio]trifosfato (GTPγS) (Hafez et al., 2003). Investigações usando técnicas de microscopia eletrônica de transmissão e de varredura mostraram que o ionóforo A23187 induz à exocitose dos grânulos em eosinófilos de cavalos (Henderson et al., 1983) e em humanos (Henderson and Chi, 1985). Além disso, análises ultraestruturais também demonstraram que o fungo *Alternaria* induz eosinófilos humanos à desgranulação através da fusão de grânulos entre si (exocitose composta) (Inoue et al., 2005).

No entanto, o processo de secreção por exocitose não é frequente em eosinófilos participando em diferentes situações fisiológicas e patológicas. A maioria destas situações envolve outros mecanismos de secreção, descritos abaixo. Isto significa que, durante a maioria das respostas dos eosinófilos não ocorre liberação de todo o conteúdo dos grânulos, promovido pela exocitose, mas sim liberação de componentes específicos. Este fato reflete a complexidade dos processos e das vias de secreção de eosinófilos.



## II. Desgranulação por Picemeal

O mecanismo de desgranulação por picemeal (PMD) foi primeiramente proposto há 30 anos atrás, através de observações ultraestruturais feitas em basófilos por Ann M. Dvorak, como relatado anteriormente na seção “Elucidando a estrutura dos eosinófilos através da microscopia eletrônica” (Dvorak et al., 1976a; Melo et al., 2013). Tem sido identificado como um importante processo secretor numa população de células, tanto em células do sistema imune (eosinófilos, mastócitos e basófilos) quanto em células endócrinas (Crivellato et al., 2003; Melo and Weller, 2010a). Atualmente sabe-se que este fenômeno é o mais frequente em eosinófilos em tecidos e



**Figura 1.7- Ilustração científica demonstrando o mecanismo de desgranulação por picemeal. Realizado através do transporte de vesículas denominada Eosinophil Sombreiro Vesicles (EoSVs).**

também podendo ser visto in vitro após a exposição a estímulos fisiológicos (Melo e cols., 2005a).

Dentre as evidências ultraestruturais de PMD incluem-se alterações na morfologia dos grânulos secretórios como: desorganização do núcleo cristalóide, redução da elétrondensidade, perda do conteúdo da matriz e do núcleo cristalóide, aumento de volume do grânulo e perda total do conteúdo do grânulo, mantendo-se, no entanto, a membrana limitante do mesmo. Além disso, o esvaziamento do grânulo ocorre em paralelo com a formação de vesículas, incluindo

vesículas arredondadas pequenas e EoSVs, as quais brotam dos grânulos e transportam os produtos de secreção, conforme já

mencionado (Melo et al., 2005a; Melo et al., 2008; Spencer et al., 2014)

As Alterações estruturais nos grânulos secretórios associadas com PMD são descritas em diversas desordens alérgicas e inflamatórias, incluindo a asma (Karawajczyk e cols., 2000), polipose nasal (Erjefalt e cols., 2001, Armengot e cols., 2009), rinite alérgica (Erjefalt e cols., 2001, Ahlstrom-Emanuelsson e cols., 2004); colite ulcerativa (Erjefalt e cols., 2001); doença de Crohn (Erjefalt e cols., 2001); dermatite atópica (Cheng e cols., 1997); carcinoma gástrico (Caruso e cols., 2005); shinguelose (Raqib e cols., 2003) e cólera (Qadri e cols., 2004). O número de grânulos esvaziando em eosinófilos humanos aumenta quando as células estão ativadas, tanto in vivo como



in vitro em diferentes condições (Erjefalt e cols., 1998, Karawajczyk e cols., 2000, Ahlstrom-Emanuelsson e cols., 2004, Melo e cols., 2005a).

Estímulos inflamatórios, tais como os agonistas clássicos de eosinófilos, a CCL5 e a CCL11 ou PAF, levam à desgranulação por piecemeal. E o pré-tratamento com brefeldina A, um inibidor do transporte vesicular (Nebenfuhr e cols., 2002), inibe o esvaziamento dos grânulos induzido por agonistas (Melo e cols., 2005a). Estudo utilizando agonistas de eosinófilos clássicos mostrou que, enquanto apenas 8% dos grânulos de eosinófilos não estimulados tinham grânulos com características de desgranulação por piecemeal, esse percentual aumentou para 25% em células estimuladas com CCL5, 43% nas estimuladas com CCL11, e 34% nas estimuladas com PAF (Melo e cols., 2005a).

Por MET, é frequentemente observada a presença de vesículas, bem como túbulos ao redor ou brotando de grânulos secretores em eosinófilos humanos ativados (Melo e cols., 2008b). Usando a técnica de imunomarcagem ultraestrutural chamada de pre-embedding que é realizada antes do processamento para microscopia eletrônica, nosso grupo identificou um trânsito vesicular de proteínas armazenadas nos grânulos (Melo e cols., 2005b, Melo e cols., 2009). Essa metodologia possibilitou a identificação em vesículas, de proteínas tipicamente estocadas nos grânulos como IL-4 e MBP (Melo e cols., 2005b, Melo e cols., 2008a, Spencer e cols., 2009).

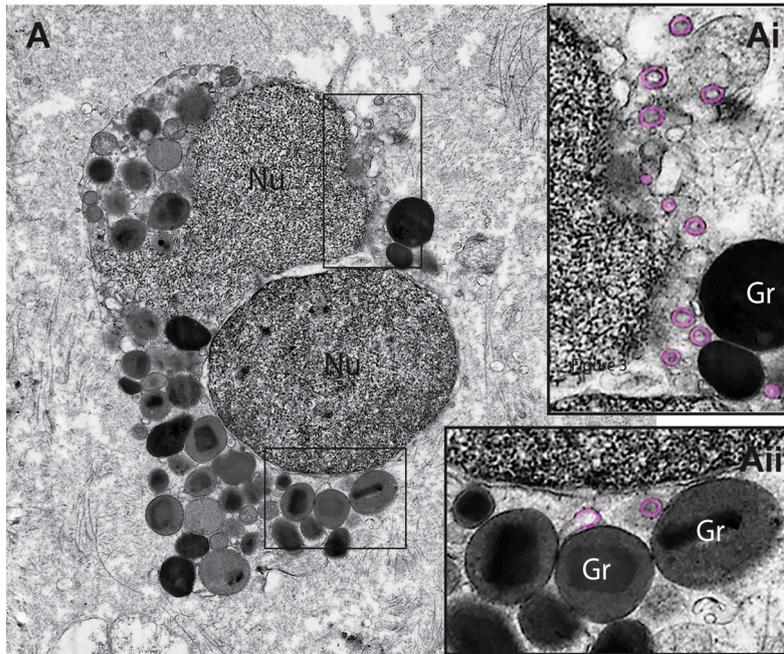
Agonistas, como CCL11, estimulam eosinófilos ocorre um aumento do número total de EoSVs citoplasmáticas. Essas EoSVs são frequentemente encontradas ao redor ou em contato com grânulos secretores (Melo e cols., 2005b). Curiosamente a maioria dessas EoSVs (90%) está associada com grânulos mostrando mudanças ultraestruturais típicas de desgranulação por piecemeal (Melo e cols., 2008b).

Estudos do nosso grupo demonstraram transporte vesicular de MBP (Melo e cols., 2009) e citocinas, como IL-4 (Bandeira-Melo e cols., 2001), a partir de grânulos secretores em eosinófilos ativados. O estímulo com CCL11 ou CCL5 em eosinófilos humanos, libera rapidamente IL-4 estocados, através de transporte vesicular (Bandeira-Melo e cols., 2001). Foi demonstrado que a IL-4, é transportada em EoSVs, a partir de ligação com seu receptor intracelular IL-4Ra, sendo que esse processo ocorre sem que haja a iniciação de uma cascata de sinalização mediada por IL-4R (Spencer e cols., 2006). Também foi demonstrado que eosinófilos possuem uma quantidade substancial de outros receptores de citocinas associados à grânulos e vesículas, como os receptores IL-6Ra e IL-13Ra1. Estoques de CCR3 intracelulares também são expressos em eosinófilos humanos, e sua detecção é aumentada após estímulo que induz a liberação de CCL5, conhecido como um ligante de CCR3 (Spencer e cols., 2006). A partir destes estudos, foi proposto um modelo através do qual receptores medeiam o trânsito de citocinas estocadas intracelularmente até serem secretadas (Fig. 1.5) (Melo e cols., 2013a).



### III. Citólise

O processo de citólise ocorre através da lise da célula e deposição dos grânulos secretores de eosinófilos, intactos no meio extracelular. Ultraestruturalmente este processo é caracterizado por alterações nucleares como cromatólise e dissolução do envoltório nuclear, assim como ruptura da membrana plasmática acompanhada de depósitos de grânulos livres aglomerados (cfegs) rodeados por tecidos (Persson e Erjefalt, 1997b, Erjefalt e cols., 1998). Os cfegs depositados nos tecidos aparecem como um conjunto heterogêneo de grânulos intactos, envoltos por membrana e organelas com diferentes graus de dissolução (Persson e Erjefalt, 1997b).



**Figura 1.8-**  
**Elteron-micrografia**  
**de eosinófilo**  
**realizando o**  
**mecanismo de**  
**citólise.** (Fonte:  
Spencer, 2014.)

com diferentes graus de dissolução (Persson e Erjefalt, 1997b).

Eosinófilos citolíticos e aglomerados de grânulos liberados são observados in vivo em estudos com vias aéreas humanas alérgicas (Erjefalt e cols., 1998) e pólipos nasais (Uller e cols., 2004) e após desafio com alérgeno ou em resposta à desnudação mecânica epitelial (revisto em Persson e Erjefalt, 1997a). Eosinófilos em citólise também podem ser observados in vitro após a exposição ao cátion ionóforo bivalente A23187

ou esferas opsonizadas com IgA secretado (revisto em Persson e Erjefalt, 1997a, Melo e cols., 2013a).

Recentemente, demonstrou-se, pela primeira vez, que eosinófilos são capazes de sofrer morte citolítica, acompanhada da liberação de DNA nuclear e extrusão de grânulos funcionais intactos, processo chamado de ETosis (Ueki e cols., 2013). Através deste processo, eosinófilos sofrem citólise para liberar redes extracelulares (ETs) de DNA juntamente com a liberação de grânulos intactos, competentes para secreção (Ueki e cols., 2013). Essas redes se assemelham as NETs liberadas por neutrófilos (Brinkmann e cols., 2004). Os autores demonstraram que a estimulação com IgG ou IgA23 imobilizados, ionóforo de cálcio, PAF ou forbol-12-miristato-13-acetato (PMA) podem desencadear ETosis em eosinófilos humanos, de uma maneira dependente de NADPH-oxidase (Ueki e cols., 2013).

Os grânulos de eosinófilos humanos (Neves e cols., 2008, Neves e cols., 2010, Shamri e cols., 2012) e murinos (Shamri e cols., 2012), isolados a partir de fracionamento subcelular, expressam o receptor CCR3 funcional e secretam ECP em resposta a CCL11, utilizando uma sinalização intragranular e sistemas de secreção baseados em uma rede membranotubular. Outro receptor expresso por esses grânulos é o IFN- $\gamma$ R. Esses fatos promovem evidências diretas que os receptores da membrana



dos grânulos são funcionais e capazes de iniciarem processos de sinalização. Foi observado também que grânulos isolados estimulados com IFN- $\gamma$  secretam ECP, EPO, IL-4 e IL-6 (Neves e cols., 2008).

Estudo de receptores funcionais para leucotrienos cisteínicos (cys-LTs) na membrana de grânulos extracelulares liberados de eosinófilos, sensíveis à inibição por montelukast e antagonista do receptor de P2Y<sub>12</sub>, identificou novos mecanismos nos quais cys-LTs podem servir como mediadores intrínsecos e parácrinos da secreção derivada de grânulos de eosinófilos (Neves e cols., 2010). Os grânulos livres de eosinófilos humanos têm a capacidade de secretar ECP em respostas a concentrações baixas e mesmo subnanomolares de três cys-LTs, incluindo dois cys-LTs gerados extracelularmente, LTD<sub>4</sub> e LTE<sub>4</sub> (Neves e cols., 2010).

O processo de desgranulação por citólise é frequentemente observado em doenças humanas. Grânulos podem ser visualizados extracelularmente em biópsias de tecidos de pacientes com dermatite atópica (Cheng e cols., 1997), alergia nasal (Erjefalt e cols., 1999, Watanabe e cols., 2003), pólipos nasais (Erjefalt e cols., 1998) e outras desordens de mucosa das vias respiratórias (Erjefalt e Persson, 2000), como também em amostras de escarro de asmáticos (Persson e cols., 2002), em associação com tecido em pacientes com i) rinossinusite crônica (Greiff e cols., 1998, Ponikau e cols., 2005), ii) lesões de necrose de gordura subcutânea em recém-nascidos (Tajirian e cols., 2007), iii) urticária (revisado em Melo e cols., 2013a), iv) esofagite eosinofílica (Aceves e cols., 2007), v) pacientes com *Onchocerca volvulus* tratados com amocazine (Gutierrez-Pena e cols., 1998) e vi) pacientes com carcinoma gástrico avançado (Caruso e cols., 2005).

Análises de ME mostraram a presença de grânulos, circundados por membrana, fora da célula, entre feixes de colágeno e na derme. Estes grânulos foram vistos em biópsias de paciente com dermatite atópica sem a presença de eosinófilos em suas adjacências (Cheng e cols., 1997). No tratamento com amocazine foram observados grânulos de eosinófilos necróticos na superfície da microfilaria danificada de *Onchocerca volvulus* after (Gutierrez-Pena e cols., 1998). Imagens de MET revelaram a deposição extracelular de grupos de grânulos rodeados por membrana misturados a corpúsculos lipídicos adjacentes a eosinófilos em apoptose tardia, em pacientes apresentando carcinoma gástrico avançado (Caruso e cols., 2005).

Os grânulos liberados extracelularmente por citólise são funcionalmente ativos e capazes de atuarem como “Cluster Bombs” que amplificam as propriedades secretoras funcionais de eosinófilos e contribuem para a exacerbação e persistência da resposta inflamatória (Neves e cols., 2008, Muniz e cols., 2013).



## 1. 3- Participação dos eosinófilos durante respostas inflamatórias

### 1. 3.1- Aspectos Gerais na Inflamação Alérgica da Asma

A base do mecanismo imunológico da reação de alergia junto às vias respiratórias está bem caracterizada. De forma geral, a sensibilização e a resposta efetora ocorrem numa série de passos no qual o primeiro envolve células apresentadora de antígenos (APC) ou macrófagos incorporando e processando o antígeno que entrou no organismo. Após o processamento, as APCs apresentam o antígeno para os linfócitos T CD4+ através dos receptores de MHC de classe II. A interação do linfócito T com as células APC ocorre via interação receptor de célula T (TCR) e MHC de classe II, respectivamente. Esta interação resulta na ativação do linfócito T e na polarização e liberação de citocinas de perfil Th2, tais como IL-4 e IL-13, as quais estimulam mais células T a responderem ao mesmo antígeno e induzindo a diferenciação de linfócitos B em plasmócitos, produtores de imunoglobulinas (anticorpos) da classe IgE. Estes anticorpos IgE específicos ligam-se aos receptores FcεRI presentes na membrana dos mastócitos, sensibilizando-os. A fase de resposta imune alérgica ocorre quando uma subsequente re-exposição ao alérgeno interage com os mastócitos sensibilizados provocando a desgranulação celular e produção de mediadores inflamatórios (Kim, Kita et al., 2010b; López, Zafra et al., 2011; Uhm, Kim et al., 2012).

Diversas células do sistema imune participam do processo inflamatório da asma. É evidente que um tipo celular não é capaz de gerar todo o complexo processo patofisiológico da asma, no entanto, alguns tipos celulares do sistema imune encontram-se predominantemente participando na resposta inflamatória. Abordaremos abaixo três tipos celulares principais: mastócito, eosinófilo e linfócitos.

Os mastócitos são células cruciais na resposta alérgica. Estas células estão envolvidas na fisiopatologia da asma através da sua capacidade de secretar uma variedade de mediadores após a sua ativação pelo alérgeno. A re-exposição à um alérgeno leva à ligação deste a anticorpo IgE específico, gerando o complexo antígeno-anticorpo. O sinal desencadeado pela ligação do complexo antígeno-anticorpo aos receptores FcεRI presentes na membrana dos mastócitos leva à desgranulação com a liberação de histamina, eicosanoide e espécie reativa de oxigênio resultando respectivamente, na contração das vias aéreas, secreção de muco e vasodilatação. Os mediadores produzidos pelos mastócitos podem ser divididos em mediadores pré-formados e mediadores recém-sintetizados, sendo cronologicamente secretados em resposta à fatores inflamatórios da reação alérgica, tal como a influência de IgE, promovendo a desgranulação dos mastócitos nas vias aéreas. Dentro da vasta quantidade de proteínas sintetizadas e armazenadas por esta célula, destacam-se estudos que descrevem a participação de mediadores lipídicos (ex: prostaglandina e leucotrienos), citocinas (IL-4, IL-13), quimiocinas (CXCL10, CXCL11, CXCL8), e fatores de crescimento (ex: TGF-β e VEGF), durante a resposta alérgica pulmonar (Alkhoury et al., 2014; Alkhoury et al., 2011; Vicario et al., 2010).

Linfócitos Th2, por outro lado, geram uma família de citocinas (IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 e IL-13) que mediam a inflamação alérgica. Indivíduos asmáticos apresentam em suas vias respiratórias um número aumentado de linfócitos T CD4+ com perfil Th2, bem como a pre-



sença elevada de citocinas de perfil Th2 nos lavados broncoalveolares de pacientes asmáticos enquanto que nos indivíduos normais o perfil é predominantemente Th1 (Jacobsen et al., 2015). Durante a fase indutora, citocinas como IL-4 e IL-13 são responsáveis pela indução da produção de anticorpos da classe IgE nos linfócitos B e na produção de CCL11 por células endoteliais (Rosenberg et al., 2007). Nas fases posteriores do processo asmático, citocinas como IL-5, envolvida na diferenciação de eosinófilos na medula óssea e IL-9 na quimiotaxia e diferenciação de mastócitos, são responsáveis pela manutenção do processo inflamatório (Mue, Ise et al., 1976; Kay, 2006; Kim, Kita et al., 2010a).

Como anteriormente descritos destacam-se a CCL11 e IL-5 que promovem o recrutamento desta células para as vias áreas e a manutenção da sobrevivência de eosinófilos no infiltrado inflamatório. Eosinófilos possuem uma meia-vida no sangue periférico de 8-18 horas, no entanto quando infiltrados nos tecidos, podem residir por 2-5 ou mais dias. O infiltrado eosinofílico no lavado broncoalveolar é um dos principais achados da fase tardia da resposta alérgica. Os eosinófilos são conhecidos pelo seu papel no processo de dano tecidual e podem estar associados ao desenvolvimento da hiperreatividade das vias aéreas através da liberação das proteínas básicas, radicais derivados de oxigênio e entre outros (Rothenberg e Hogan, 2006; Blanchard e Rothenberg, 2009).

A produção de eotaxina por células endoteliais, em respostas à IL-4 e IL-13, é realizada via sinal tradutor e ativador dependente de transcrição  $\beta$ , agindo sinergicamente com a IL-5 promovendo o recrutamento de eosinófilos para o pulmão na condição alérgica (Blanchard et al., 2005). Estas quimiocinas possuem três formas homólogas que podem ser expressadas durante o processo inflamatório da asma, visto que nas primeiras 6 h após o desafio há um pico de CCL11, seguindo em 24 h pela expressão de CCL26 e mais tardiamente a presença de eotaxina-3 (Rosenwasser et al.; Zimmermann et al., 2000). A CCL26 juntamente com a IL-5 promove a ação quimioatratória de eosinófilos e a produção de IL-13, no entanto, a interação entre CCL26 e IL-13, também promove o recrutamento de eosinófilos, amplificando a eosinofilia pulmonar em resposta à indução do alérgeno, levando ao quadro de broncoespasmos (Kelly-Welch et al., 2005; Rosenwasser et al.; Wills&Karp, 2004).

Quando estabelecidos no tecido pulmonar, eosinófilos respondem à sinais de citocinas, quimiocinas e outros mediadores pro-inflamatórios via receptores específicos da célula que iniciam seu processo de secreção de proteínas armazenadas em seus grânulos secretores. Alguns fatores fibrogênicos são classicamente secretados durante o desenvolvimento e progressão do remodelamento tecidual (Kay et al., 2004). Em particular, eosinófilos são um importante precursor de TGF- $\beta$  em tecidos inflamados, e em experimentos in vitro demonstraram que esta citocina é predominantemente responsável por habilitar eosinófilos ativados à estimular a proliferação, síntese de colágeno, e diferenciação de fibroblastos (Lee and Rosenberg, 2012; Minshall et al., 1997). Em fibroblastos coletados do pulmão humano, concentrações subcitotóxicas de MBP, em sinergias com IL-1 $\alpha$  e TGF- $\beta$ 1, aumenta a síntese de citocinas inflamatórias e fibrogênicas, tal como IL-6, IL-11 e fator inibidor de leucemia (Levi-Schaffer et al., 1999; Rosenberg et al., 2007). Estudos examinando a participação efetiva de eosinófilos em modelos de asma experimental



mostra que, camundongos deficientes na produção de IL-5, possuem números significativamente reduzidos de eosinófilos marcados positivamente para MBP na região peribronquial, em paralelo, acompanhados por similar redução na marcação positiva para TGF- $\beta$ , sugerindo que eosinófilos são um importante precursor de TGF- $\beta$  durante o remodelamento das vias aéreas (Cho et al., 2004).

Estas evidências mostram que eosinófilos utilizam mecanismos de secreção que podem regular o curso do remodelamento das vias aéreas. Entretanto alguns estudos discutem que, diferente de eosinófilos humanos, eosinófilos murinos não são vistos a realizarem secreções tipicamente encontradas em patologias humanas (Lee et al., 2012). Eosinófilos coletados de diferentes doenças alérgicas, inclusive na asma, mostram que estas células secretam predominantemente por PMD para liberarem as proteínas armazenadas em seus grânulos (Erjefält et al., 2001). No entanto, este mesmo mecanismo é questionado em eosinófilos analisados em modelos de asma experimental apresentando pouca evidência do mecanismo quando comparados aos humanos (Malm-Erjefält et al., 2001).

Em contrapartida, há trabalhos realizados em modelos experimentais que mostram que os eosinófilos murinos são hábeis a desgranularem por PMD através de estímulos *in vitro* ou na periferia de bronquíolos pulmonares (Clark et al., 2004). Em análises, para examinar a liberação de ribonucleases associadas aos eosinófilos (ECP e EDN), eosinófilos murinos transgênicos para IL-5 coletados do macerado de baço foram estimulados por fatores específicos do recrutamento dessas células e investigado o tipo de secreção de proteínas catiônicas armazenadas em seus grânulos secretores. Os resultados demonstraram que estas células podem secretar no meio extracelular quantidades significativas de ECP e EDN sob o comando de CCL11 (Shamri et al., 2012). Além disso, foi comprovado que os modelos de estudos de morbidade em animais infectados com vírus só sobrevivem à infecção se os eosinófilos estiverem presentes e desgranulando. Entretanto as imagens só apresentam grânulos esvaziando ou intactos e são tomados como referências de desgranulação (Percopo et al., 2014). Embora estes estudos mostrem grânulos perdendo seus conteúdos sobre indícios da PMD, eles não apresentam dados contundentes deste processo, apontando as principais mudanças estruturais na célula. Portanto, a disponibilidade destes dados sugere que eosinófilos de camundongos são capazes de sofrerem PMD, porém exemplos deste fenômeno são raros e somente sugestivos mecanicamente em comparação aos humanos.



### 1. 3.2- Infecção viral

O recrutamento de eosinófilos é observado durante infecções virais, indicando um papel para estas células na eliminação destes patógenos (Hogan e cols., 2008). Os eosinófilos humanos, de forma dose-dependente, mediam a redução da infectividade do RSV, devido ao efeito da desgranulação de suas ribonucleases únicas (Domachowske e cols., 1998). Eosinófilos também parecem ter papel protetor contra o vírus de RNA parainfluenza tipo I de roedores (revisado em Hogan e cols., 2008) e vírus de pneumonia de camundongos (PVM) in vivo (Adamko e cols., 1999, Rosenberg e Domachowske, 2001).

Importante destacar que eosinófilos tanto humanos como murinos liberam mediadores inflamatórios, como IL-6, em resposta à infecção com vírus respiratórios (Dyer e cols., 2009). No estágio avançado da infecção pelo vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) é observada hipereosinofilia em associação com disfunções alérgicas e/ou imunes e baixa contagem de células T CD4+ (Skiest e Keiser, 1997). Outro estudo mostrou que a EDN tem atividade inibitória em HIV (Rugeles e cols., 2003).

### 1. 3.3- Infecção bacteriana

De acordo com estudos in vitro, os eosinófilos podem fagocitar e matar bactérias, incluindo *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, mas não são tão eficientes como os neutrófilos (Yazdanbakhsh e cols., 1986). Eosinófilos são responsivos tanto a bactérias Gram-positivas como Gram-negativas. Ambas induzem a quimiotaxia e desgranulação de eosinófilos, com liberação de ECP e MBP (Svensson e Wenneras, 2005).

Os eosinófilos expressam sensores de imunidade inata necessários para a detecção de bactérias e expressão de proteínas citolíticas de seus grânulos, com atividade bactericida efetiva. Desta forma, eosinófilos podem ter funções alternativas em doenças inflamatórias intestinais que são causadas por antígenos bacterianos (Hogan e cols., 2013). Estudos in vitro demonstraram as propriedades bactericidas de MBP e ECP (Rosenberg, 1995). A demais Estudos in vivo documentaram a interação de eosinófilos com bactérias, evidenciando o estilo catapulta de estruturas semelhantes à redes extracelulares de neutrófilos a partir de eosinófilos (Yousefi e cols., 2008). As ETs derivadas de eosinófilos são compostas por DNA nuclear, MBP e ECP (von Kockritz-Blickwede e Nizet, 2009). Outro estudo demonstrou que ECP tem uma afinidade específica para lipopolissacarídeo e peptidoglicano bacterianos e pode aglutinar os patógenos bacterianos Gram-negativos (Torrent e cols., 2008).



# OBJETIVOS



## 2. OBJETIVOS

### 2. 1- Objetivo Geral

Estudar os processos de secreção de eosinófilos de camundongos em diferentes situações inflamatórias (in vivo e in vitro).

### 2. 2- Objetivo Específicos

- Investigar, através de MET, os processos de secreção de eosinófilos isolados do baço de camundongos transgênicos para IL-5 e estimulados com estímulos inflamatórios (GM-CSF e LPS).
- Avaliar a secreção de ribonucleases associadas ao eosinófilo murinos-ECP e EDN (EARs) a partir de eosinófilos isolados do baço de camundongos transgênicos para IL-5 e estimulados com estímulos inflamatórios (GM-CSF e LPS).
- Investigar, através da técnica de MET, o influxo de eosinófilos no pulmão de camundongos, no modelo asma brônquica; Avaliar a secreção de citocinas (IL-13 e IL-4) e proteína peroxidase eosinofílica (EPO) por eosinófilos infiltrados no tecido pulmonar, no modelo asma.
- Investigar, através de MET, os processos de secreção de eosinófilos inflamatórios no pulmão, induzidos por asma brônquica experimental;
-



# MATERIAIS & MÉTODOS



### 3. METODOLOGIA

#### 3. 1- Animais

Para os estudos de asma experimental, foram utilizados camundongos Balb/c (machos, peso corporal de 18 a 20g) provenientes do Centro de Criação de Animais (CECAL) da Fundação Oswaldo Cruz-FIOCRUZ (Rio de Janeiro, RJ, Brasil). Todos os procedimentos foram aprovados pelo comitê de Ética de Uso de Animais (CEUA) (Protocolo 0213-4). Para os estudos in vitro, foram utilizados camundongos Balb/c IL-5 Transgênicos (IL-5 Tg) (Dent et al., 1997) fornecidos por Dr. Alison A. Humbles e Dr. Craig Gerard (Children's Hospital Medical, Boston, MA, USA) e mantidos no Beth Israel Deaconess Medical Center (BIDMC), onde foram coletadas as amostras desses animais. Todos os protocolos experimentais foram aprovados pela Institucional Animal Care and Use Committee do BIDMC. Os animais foram mantidos sob condições de temperatura entre 25-28°C, ciclo de luz definido de 12h de claro e 12h escuros e livre acesso a água e ração.

#### 3. 2- Purificação e estimulação de eosinófilos

Eosinófilos foram isolados do baço de camundongos Balb/c IL-5 Tg de acordo com estudos anteriores (Shamri et al., 2012; Shamri et al., 2013; Wang et al., 2007). Após coleta, os baços foram fragmentados em pequenos pedaços e em seguida macerados. Células vermelhas do sangue (RBC) foram lisadas por adição de 5 mL 0.2% NaCl meio hipotônico por 15s seguido por um igual volume de 1.5% NaCl ou adicionando 3 mL NH<sub>4</sub>Cl tampão de lise (155 mM NH<sub>4</sub>Cl, 10 mM KHCO<sub>3</sub>, 0.1 mM EDTA) por 3 min. Uma única suspensão de esplenócitos de camundongos IL-5 Tg em PBS contendo 1% de Soro Bovino Fetal (PBS/FCS) foram submetidos em quatro passos descontínuos. Gradiente de densidade de Percoll (1,085, 1,080, 1,075 e 1,070 g/mL) e centrifugados durante 25 min a 1,500 X g, em temperatura ambiente. Células entre as camadas de 1.085 e 1.080 g/mL foram ressuspensas por PBS/FBS para retirada dos tampões. Macrófagos residuais foram removidos através aderência em placas de petri de plástico em meio RPMI 1640 suplementado com 5% FCS, por 1 h. Em seguida, eosinófilos foram isolados usando colunas magnéticas ordenando as células ativadas (Miltenyi Biotec). Por seleção negativa, eosinófilos foram >99,8% puro como avaliado por microscopia e citometria de fluxo. Pureza e viabilidade mostraram-se acima de 98%, conforme determinado por coloração Hema 3 e por exclusão pelo azul de trypan, respectivamente. Após coletados, eosinófilos foram estimulados por 10 ng/mL de GM-CSF ou 100 ng/mL de LPS e mantidos em meio RPMI 1640 durante 1 h. Para o grupo controle, os eosinófilos foram mantidos sob as mesmas condições porém sem estimulação com fatores inflamatórios.



### 3. 3- Avaliação da atividade enzimática de EARs

Foi avaliada a atividade RNase de eosinófilos coletados do macerado do baço de animais transgênicos para IL-5 após estimulados por 1h com 10ng/mL de GM-CSF ou por 100ng/mL de LPS. Eosinófilos estimulados por agonistas foram submetidos à análise de atividade enzimática de ribonucleases (ECP e EDN) através do ensaio de atividade de RNase usando um oligonucleótido fluorescente de RNA de cadeia simples (RNaseAlert QC sistema; Ambion, Austin, TX, EUA), de acordo com prévios do grupo (Shamri et al., 2012). A clivagem da sonda por RNases permite que a emissão fluorescente seja detectada por fluorometria. O conteúdo celular total de EARs foi avaliado nos eosinófilos lizadas em 0,2% de Triton X-100. Os dados foram adquiridos depois de 50 min pelo 7300 termociclador (Applied Biosystems, Austin, TX, EUA) e estavam dentro do intervalo linear. Todas as reações foram realizadas em poços em duplicatas ou triplicatas. Unidades de fluorescência relativa (RFU;  $\times 10^4$ ) representam os níveis de atividade de RNase das amostras estimuladas.  $10 \times 10^4$  RFU representa a atividade da enzima que é equivalente à atividade de  $4,0 \pm 1,8$  nU RNases ( $\sim 0,0398$  pg), como calibrado com RNase A pancreática bovina (Ambion). Uma unidade é a quantidade de RNase equivalente a 0.1177 Kunitz.

### 3. 4- Reação alérgica nas vias aéreas

Camundongos Balb/c foram sensibilizados através de injeções subcutâneas com ovalbumina (OVA) com 50  $\mu$ g/animal juntamente com adjuvante hidróxido de alumínio 5mg/animal, conforme modelo previamente estabelecido no Laboratório de Inflamação da Fundação Oswaldo Cruz (Antunes et al., 2010; Patricia et al., 2012), Rio de Janeiro. Após 14 dias, os animais receberam desafio intraperitoneal com a mesma dose do antígeno, passando mais 14 dias receberam estímulos intranasais com 50  $\mu$ g de OVA 3 vezes por semana, realizando análises sempre 24 horas após a última instilação, agrupados em 1<sup>a</sup> (28º dia), 2<sup>a</sup> (35º dia), 3<sup>a</sup> (42º dia), 4<sup>a</sup> (49º dia) semana, +7 dias e +30 dias após a última instilação da 4<sup>a</sup> semana. O grupo controle receberam apenas solução de 0,9% de NaCl (Antunes et al., 2010; Clark et al., 2004; Reis et al., 2015; Xisto et al., 2005).

### 3. 5- Quantificação de citocinas em tecido pulmonar

Após ser feita a perfusão, conforme descrito anteriormente, o lobo esquerdo do pulmão foi dividido em três partes, sendo cada uma delas destinada à análise de EPO e citocinas no tecido pulmonar, e foram armazenados a  $-20^\circ\text{C}$ . As amostras foram preparadas fazendo-se um homogenato do pulmão em PBS+Triton 0,1% acrescido de inibidor de proteases, que foram centrifugados e do sobrenadante foram quantificadas as citocinas CCL11, IL-13, IL-4 e TGF- $\beta$  através de ELISA, conforme trabalhos anteriores (Antunes et al., 2010) (Reis et al., 2015).

Placas de 96 poços foram sensibilizadas com o anticorpo específico para cada citocina, por um período de 12 h a  $25^\circ\text{C}$ . Em seguida, os poços foram lavados quatro vezes com o tampão fosfato de potássio 1 M (pH 7,5) acrescido de 0,2 mg/mL de timerosal e tween 20 (tampão 1).



Após a lavagem foi feito o bloqueio das regiões não específicas com a adição de soro albumina bovina (BSA 1%) diluído em PBS. Após 1 h os poços foram lavados quatro vezes com o tampão 1, e foram adicionadas as amostras, deixando a placa por 1 h a 25 °C. Os poços foram lavados quatro vezes com o tampão 2 contendo 0,14 M NaCl, 1 M NaPO<sub>4</sub>, 2,7 M KCl, timerosal 0,2 mg/mL e tween 20. A etapa seguinte foi a adição de um segundo anticorpo específico que estava marcado com a proteína biotina, sendo mantida a incubação por 1 h a 25°C. Os poços foram lavados com o tampão 2 e foi adicionada a neutravidina-HRP, deixando incubado por 1h. A última lavagem foi feita com o tampão 2, e o substrato K-blue foi adicionado, que ao se ligar ao HRP dará uma coloração azul. A reação foi interrompida com a adição de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,19 M, e a absorbância determinada a 450 nm. Os resultados são expressos em pg de citocinas produzidas por mg de tecido pulmonar.

### 3. 6- Quantificação de peroxidase eosinofílica

As amostras de pulmão, após serem perfundidas, pesadas e congeladas, foram homogeneizadas e centrifugadas. O sedimentos foram ressuspensos em solução salina e novamente centrifugado. Em seguida, foram congelado e descongelado em nitrogênio líquido por 3 vezes e novamente centrifugado. O sobrenadante foi coletado e a quantificação de peroxidase eosinofílica (EPO) foi realizada utilizando um substrato contendo 5 mM de OPD (o-fenildiaminadiidrocloreto) e peróxido de hidrogênio, diluídos em 4 mL Tris-HCl, e adicionando-se 4 M de ácido sulfúrico para finalizar a reação. As amostras foram colocadas em placa de 96 poços e a leitura foi feita a 492 nm em espectrofotômetro (Adamko et al., 2004; Varga et al., 2002).

### 3. 7- Microscopia eletrônica de transmissão

Fragmentos do pulmão de camundongos com asma experimental e do baço de camundongos transgênicos para IL-5 assim como eosinófilos murinos isolados e estimulados in vitro foram imediatamente fixados em uma mistura de 1% de paraformaldeído e 1,25% de glutaraldeído em tampão cacodilato de sódio 1M, pH 7,4, por 1h, em temperatura ambiente e processados de acordo com trabalhos prévios do grupo (Melo et al., 2014).

As suspensões celulares de eosinófilos, após fixação, foram lavadas no mesmo tampão e centrifugadas a 1500g por 1 min. Em seguida foram ressuspensas em ágar a 2% em tampão de cacodilato de sódio 1M, pH 7,4 e rapidamente recentrifugado. Os pellets de ágar resultantes foram mantidos no mesmo tampão, a 4°C para processamento posterior.

Os sedimentos contendo as células em ágar e os fragmentos de tecidos foram pós-fixados em tetróxido de ósmio 1% em tampão Sym-Collidine, pH 7,4, por 2 h. Depois de lavados com tampão maleato de sódio, pH 5,2, foram contrastados em bloco em acetato de uranila 2%, em tampão maleato de sódio, desidratados e incluídos em uma mistura de óxido de propileno-Epon (Eponate 12 Resin; Ted Pella, Redding, CA, USA). Após a polimerização a 60°C por 16h, foram obtidas secções ultrafinas em ultramicrótomo Leica (Leica, Bannockburn, IL). As secções foram



montadas em telinhas de cobre de 200 nm (Ted Pella), contrastada com citrato de chumbo e por fim analisadas em microscópio eletrônico de transmissão (Tecnai G2-20, FEI Company) a 60KV. As análises foram realizadas na Plataforma de Microscopia Eletrônica Carlos Chagas, Fiocruz.

### 3. 8- Avaliação ultraestrutural de processos secretores de eosinófilos

Para quantificar o número de grânulos específicos e vesículas secretoras, micrografias eletrônicas mostrando o perfil completo do citoplasma e núcleo foram estudadas em diferentes aumentos. Análises ultraestruturais qualitativas e quantitativas foram realizadas para caracterização dos processos de secreção (desgranulação por piecemeal, exocitose ou citólise), conforme trabalhos anteriores do grupo (Melo et al., 2005a; Melo et al., 2008; Melo et al., 2005b; Melo et al., 2009; Shamri et al., 2012)

Os grânulos secretores foram classificados em duas categorias: i) Grânulos intactos (completamente maduros ou em processo final de amadurecimento): alongados mostrando geralmente região central elétron-densa (núcleo cristalino ou cristalóide) e matriz mais elétron-lúcida (no caso dos grânulos completamente maduros) ou arredondados, com conteúdo interno elétron-denso em processo de condensação (no caso dos grânulos em fase final de amadurecimento) e ii) Grânulos em processo de esvaziamento: caracterizados por alteração da forma e elétron-densidade, desestruturação do cristalóide e/ou matriz, presença de vesículas membranosas intragranulares e/ou perigranulares, matriz com aspecto rugoso e/ou alterações da membrana limitante (Shamri et al., 2012).

As quantificações dos grânulos sofrendo piecemeal foram realizadas através do Adobe Photoshop, utilizando ferramentas de métricas e de contagem dos elementos. Em seguida, usamos o programa Image J (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>), para a descrição do tamanho, forma e volume das organelas de interesse.

Foram analisados um total de 118 eosinófilos (65 células do grupo asmático, 17 do grupo LPS, 16 do grupo GM-SCF, 9 células analisadas do baço de animais transgênico sem estímulo e 11 células mantidas somente em meio) quantificando um total de 1994 grânulos dentre eles 1310 grânulos encontravam-se intactos enquanto 684 em processo de esvaziamento e 4.238 vesículas secretoras.

### 3. 9- Análises Estatísticas

Os resultados foram expressos como média  $\pm$  EPM e analisados segundo o teste de ANOVA seguido pelo teste t de Student, com nível de significância  $p < 0.05$ . As análises estatísticas de Wilcoxon-Mann-Whitney, ANOVA e teste t foram realizadas utilizando o programa de estatística R, um software open source (<http://www.r-project.org/>).



**RESULTAODS**



## 4. RESULTADOS

### 4. 1- Eosinófilos murinos estimulados por GM-CSF e LPS apresentam características de ativação e desgranulação por piecemeal

Primeiramente, para investigar se eosinófilos murinos são capazes de sofrerem desgranulação, analisamos os sinais ultraestruturais de ativação e de desgranulação quando estas células foram submetidas à estímulos inflamatórios (citocina ou endotoxina bacteriana). Para isso, eosinófilos recém-coletados do macerado do baço de camundongos transgênicos para IL-5 foram estimulados durante 1 h com 10 ng de GM-CSF ou 100 ng de LPS. GM-CSF é um fator inflamatório autócrino encontrado em respostas alérgicas e inflamatórias, responsável pela maturação e ativação dos eosinófilos (Esnault and Malter, 2002; Fleetwood et al., 2005; Hamilton, 2002). Em paralelo, outro grupo de eosinófilos foi estimulado com LPS, uma endotoxina da parede celular de bactérias gram-negativas caracterizado por ativar eosinófilos através de CD14 e realizar a liberação de ECP dependente de dose (Plötz et al., 2001; Reece et al., 2013). Após estimulação por estes agonistas, os eosinófilos foram imediatamente fixados enquanto ainda em suspensão e processados para MET juntamente com células do grupo controle, as quais foram mantidas apenas em meio, durante o mesmo período de tempo.

Em comparação com os controles (Fig. 4.1.1), eosinófilos estimulados com LPS (Fig. 4.1.2) ou com GM-CSF (Fig. 4.1.3) apresentavam sinais de ativação caracterizados por mudança de forma, com aquisição de perfil polarizado e formação de prolongamentos característicos (urópodes), típicos de respostas imunológicas (Fais and Malorni, 2003). Eosinófilos estimulados não exibiam características de necrose ou grânulos livres, descartando o mecanismo de secreção por citólise.

Após as análises sobre a ativação dos eosinófilos, investigamos se estas células exibiam desgranulação por exocitose ou piecemeal. Foi analisado um total de 44 secções de eosinófilos mostrando todo o perfil celular e núcleo e 789 grânulos de secreção. Não foram encontrados grânulos em fusão com a membrana plasmática ou com outros grânulos, descartando a hipótese de desgranulação por exocitose clássica ou composta. Por outro lado, foram observados grânulos com perdas parciais à totais dos conteúdos, exibindo diferenças na elétrondensidade, características da desgranulação por piecemeal (Fig. 4.1.2, Fig. 4.1.3 e Fig. 4.1.4).

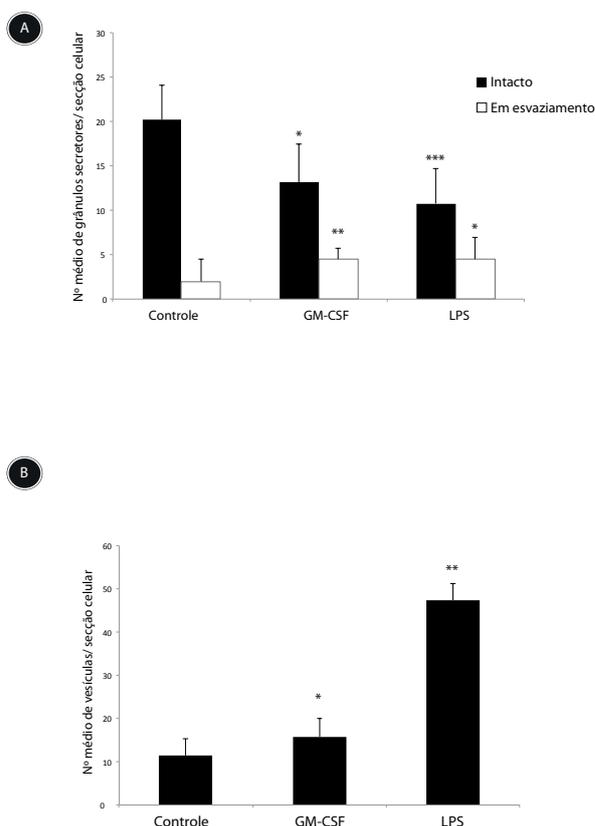
As análises mostraram um número de grânulos intactos significativamente menor nos grupos estimulados em comparação com o controle [média de  $20,1 \pm 4,3$  (controle);  $13,1 \pm 3,9$  (GM-CSF,  $p < 0,01$ ) e  $10,7 \pm 4,4$  (LPS,  $p < 0,001$ ) (Fig. 4.1.5). Por outro lado, o número de grânulos em processo de esvaziamento, com evidências de desgranulação por piecemeal aumentou nos grupos estimulados [média de  $2,0 \pm 1,2$  de controle;  $4,5 \pm 2,4$  (GM-CSF,  $p < 0,03$ );  $4,5 \pm 1,7$  (LPS,  $p < 0,06$ ) (Fig. 4.1.3 e Fig. 4.1.4).

Em uma proporção de grânulos secretores dos grupos estimulados, observamos a presença de vesículas de transporte localizadas na periferia dos grânulos, indicando a ocorrência de brotamento (Fig. 4.1.5), conforme descrito para eosinófilos humanos estimulados com agonistas, tais como, CCL11/eotaxina-1, PAF e CCL5 [revisado em (Melo et al., 2013; Spencer et al., 2014).

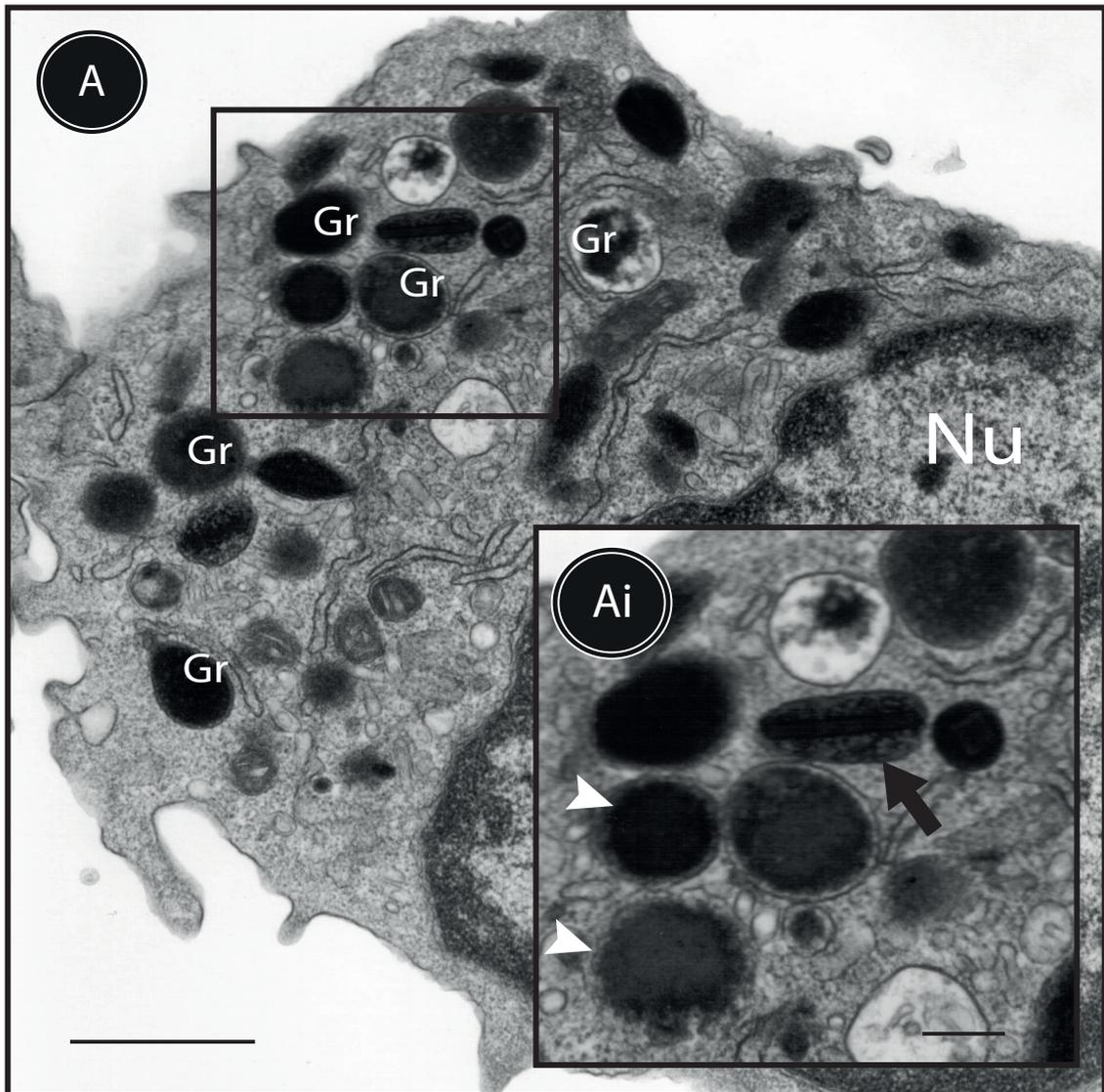


Em eosinófilos humanos, as vesículas derivadas dos grânulos são chamadas de EoSVs (Eosinophil Sombrero Vesicles) e são responsáveis por transportarem várias proteínas derivadas destas organelas, inclusive proteínas catiônicas como a MBP (Melo et al., 2009). Estas vesículas possuem formatos diferentes das originadas do complexo de Golgi, apresentando alto grau de plasticidade, o que em alguns planos de cortes em microscopia eletrônica, podemos visualizar sua morfologia semelhante à um chapéu mexicano, o sombrero, por isso são chamadas de vesículas tipo sombrero (Melo et al., 2008). Entretanto, estas vesículas ainda não foram descritas em eosinófilos murinos. No presente estudo, vesículas com morfologia similar às vesículas sombrero foram identificadas pela primeira vez. As EoSVs de eosinófilos murinos exibiam um formato alongado, parecido com uma “pastilha” ou, também, com forma semelhante à um “C”. Foram encontradas próximas, aderidas ou em contato com grânulos secretores e eram observadas próximas ou fundidas com a membrana plasmática (Fig 4.1.3, Fig 4.1.4).

Tendo em vista que o transporte de produtos armazenados nos grânulos é feito por vesículas, realizou-se, em seguida, um estudo quantitativo do número de vesículas citoplasmáticas nos três grupos. Um total de 1193 vesículas foram contadas dentre as células estimuladas (LPS ou GM-CSF) e não-estimuladas. Enquanto as células não-estimuladas mostraram média de  $11.4 \pm 3.8$  de vesículas por secção celular, o número total de vesículas aumentou significativamente nas células estimuladas ( $16.3 \pm 7.0$  e  $47.4 \pm 12.0$ , para o grupo estimulado com GM-CSF e LPS, respectivamente, média  $\pm$  EPM,  $p < 0,01$ ) (Fig.4.1.5). Estes dados demonstram que eosinófilos murinos estimulados com estímulos inflamatórios são capazes de formar vesículas, provavelmente envolvidas no transporte de produtos armazenados nos grânulos de secreção para serem liberados no meio extracelular.

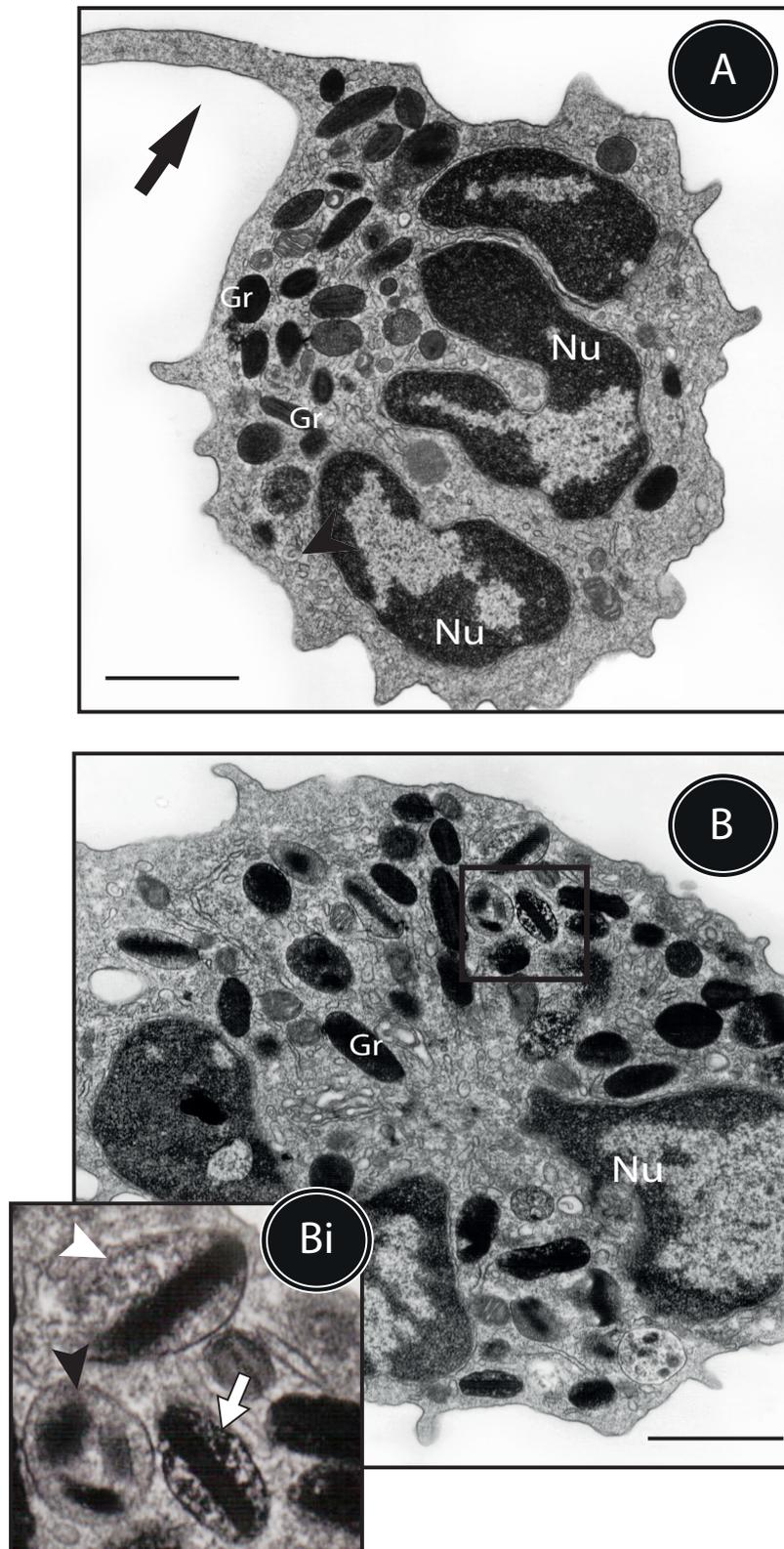


**Figura 4.1.1- Quantificação de grânulos e vesículas de secreção em eosinófilos do baço estimulados com LPS ou GM-CSF.** (A), ocorreu aumento significativo do numero de grânulos em esvaziamento em paralelo à redução do numero de grânulos intactos nos grupos estimulados em comparação com o grupo não estimulado. (B), o número total de vesículas por secção celular mostrou-se significativamente maior nos grupos estimulados em comparação com o não-estimulado. Células foram isoladas por seleção negativa mantidas em meio RPMI durante 1h e imediatamente fixadas e processadas para microscopia eletrônica de transmissão. Um total de 44 secções de eosinófilos, 789 grânulos de secreção e 1193 vesículas foram contato em micrografias eletrônicas mostrando todo perfil celular. Valores comparados aos controles de: A, (\*)  $p < 0,01$ ; (\*\*)  $p < 0,03$ ; (\*\*\*)  $p < 0,004$ . B, (\*)  $p < 0,001$ .



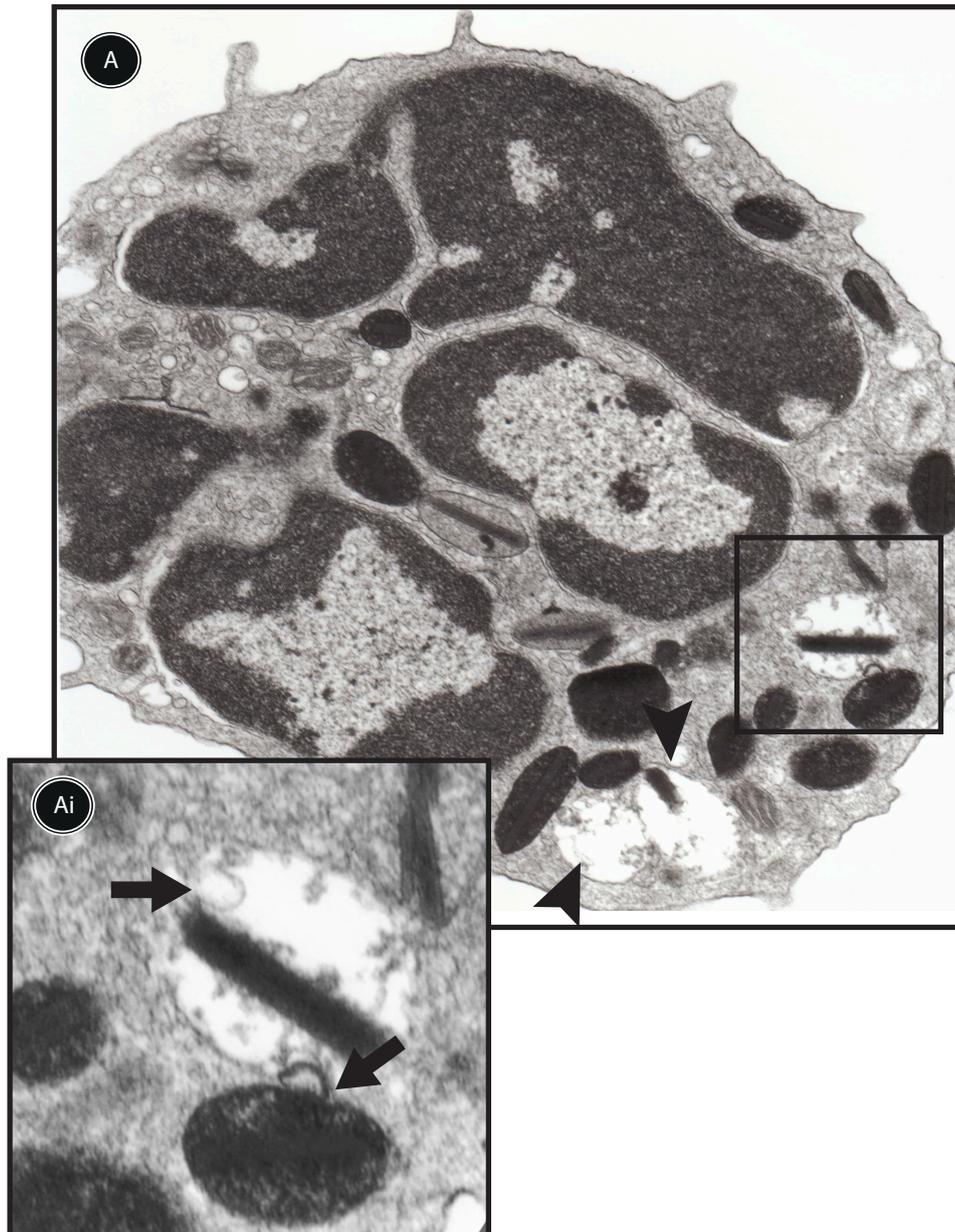
**Figura 4.1.2- Ultraestrutura de eosinófilos isolados do baço de camundongos transgênicos para IL-5.** Observe no citoplasma a população de grânulos de secreção (Gr), formada por grânulos completamente maduros, alongados (seta) e grânulos arredondados em processo de amadurecimento (cabeças de setas). (Ai), mostra em maior aumento a área destacada

em (A). As células foram isoladas por seleção negativa, mantidas em meio RPMI durante 1h e imediatamente fixadas e processadas para microscopia eletrônica de transmissão. Nu= núcleo Barra= 2  $\mu$ m (A), 800nm(Ai).



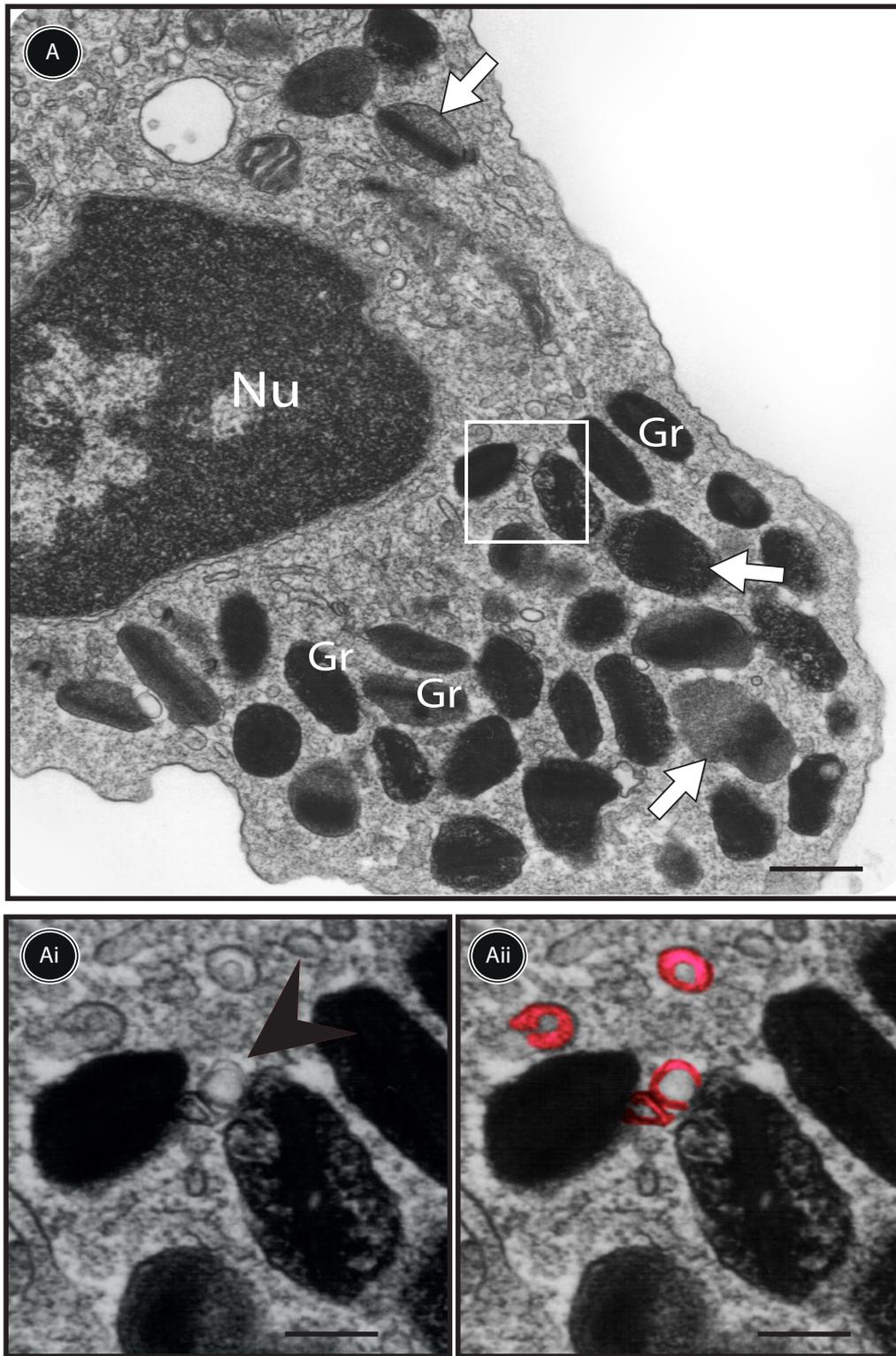
**Figura 4.1.3- Micrografias eletrônicas de eosinófilos do baço estimulados com lipopolissacarídeo (LPS).** (A) Eosinófilo ativado mostrando formação de urópode (seta). (B) Observe grânulos de secreção (Gr) em processo de esvaziamento de seus conteúdos (desgranulação por piecemeal), caracterizados por matriz elétron-lúcida (cabeça

de seta branca), matriz rugosa (cabeça de seta preta) e desestruturação do nucleóide (seta). Células foram isoladas por seleção negativa mantidas em meio RPMI durante 1h e imediatamente fixadas e processadas para microscopia eletrônica de transmissão. Nu= Núcleo. Barra: ~2  $\mu$ m (A), 1  $\mu$ m (B), 500nm (B, maior aumento).



**Figura 4.1.4- Micrografias eletrônicas de eosinófilos do baço estimulados com fator estimulador de colônia de macrófago e monócito (GM-CSF).** (A) População de grânulos secretores (Gr) apresentando alteração de formas indicativas de desgranulação de piecemeal (setas). Note a formação de vesículas tipo sombréiro ao redor deste

grânulos, delineados em rosa em Ai e Aii. Células foram isoladas por seleção negativa mantidas em meio RPMI durante 1h e imediatamente fixadas e processadas para microscopia eletrônica de transmissão. Nu= Núcleo. Barra: 2  $\mu$ m (A), 1  $\mu$ m (Ai e Aii).



**Figura 4.1.5- Micrografia eletrônica de eosinófilo do baço estimulado com fator estimulador de colônia de macrófago e monócito (GM-CSF).** Observe a presença de grânulos secretores com alterações morfológicas drásticas indicativas de grau elevado de esvaziamento ( cabeça de seta). Vesículas de transporte encontram-se em contato

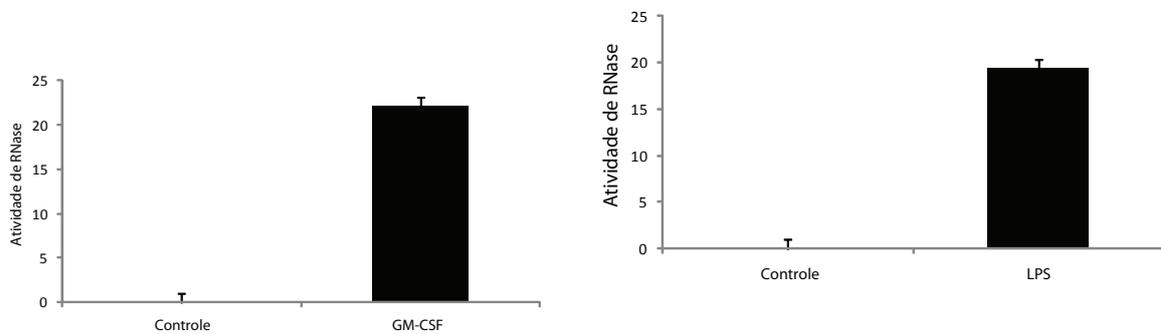
com estes grânulos (setas). Células foram isoladas por seleção negativa mantidas em meio RPMI durante 1h e imediatamente fixadas e processadas para microscopia eletrônica de transmissão. Nu= Núcleo. Barra: 2  $\mu\text{m}$  (A), 1  $\mu\text{m}$  (Ai e Aii).



#### 4. 2- Eosinófilos murinos estimulados por GM-CSF ou LPS secretam RNases associadas ao eosinófilo (EARs)

Para confirmar os dados morfológicos indicando a ocorrência de secreção pelos eosinófilos murinos, nós investigamos se GM-CSF e LPS poderiam induzir secreção de EARs nestas células. Os níveis de EARs foram avaliados com uso de um ensaio para atividade enzimática de RNase de acordo com estudo prévio do grupo (Shamri et al., 2012). Foram utilizadas as mesmas doses usadas para os estudos de MET.

Em respostas à estes estímulos, os lisados de eosinófilos mostraram atividade RNase aumentada após 1h de estímulo (Fig. 4.2.1). Estas células mostraram um aumento de x% e y% para GM-CSF e LPS em comparação ao controle.



**Figura 4.2.1** Quantificação de ribonuclease de eosinófilos estimulados por GM-CSF ou LPS. Eosinófilos estimulados por agonista foram lisados e submetidos a avaliação da

atividade de ribonucleases através de fluorimetria. 10ng de GMCSF (n=6,  $p < 0.0001$ ); 100ng de LPS (n=2,  $p < 0.01$ ).

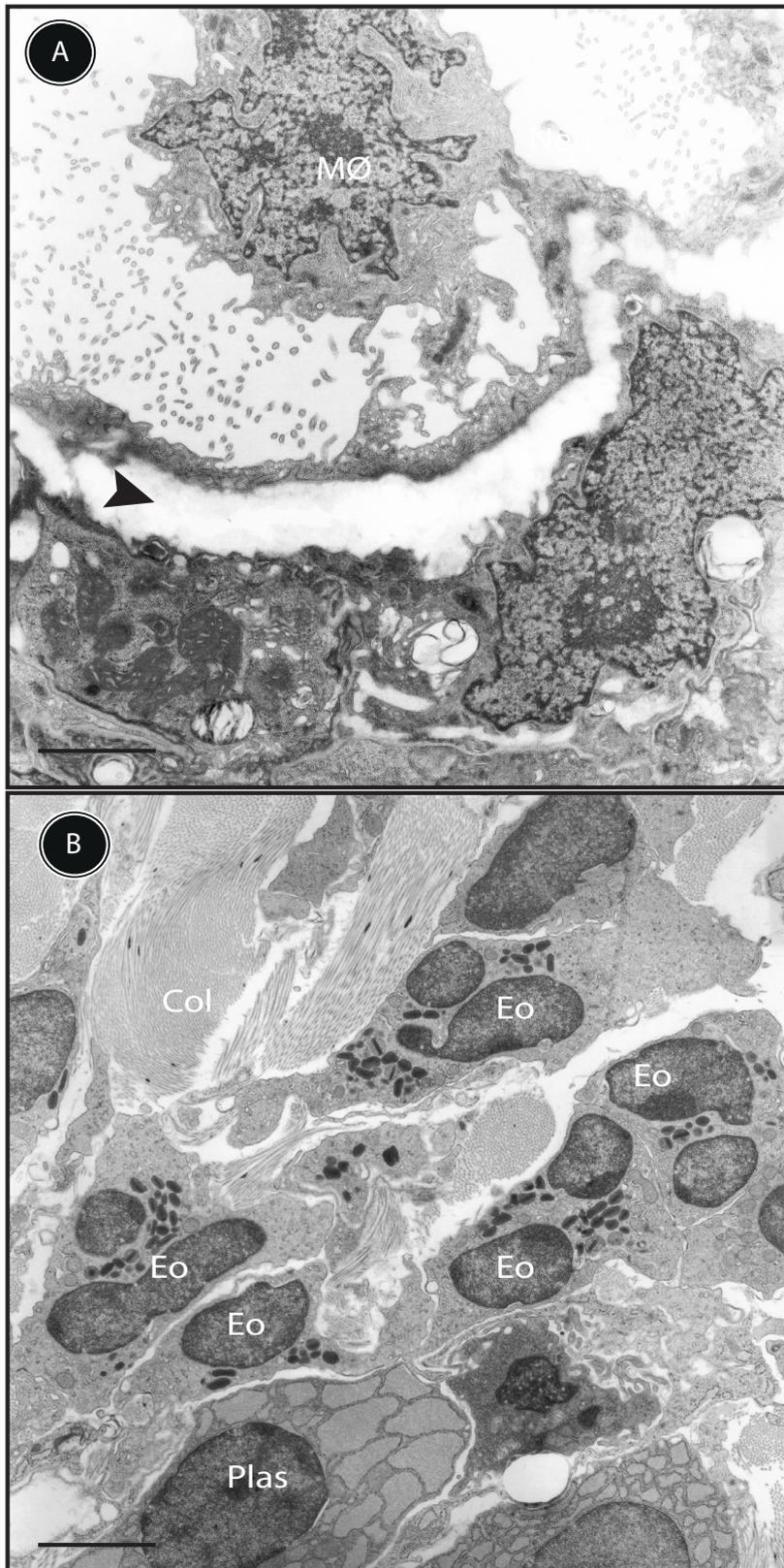


#### **4. 3- Eosinófilos são ativados e recrutados para o foco inflamatório durante a resposta alérgica pulmonar no modelo experimental de asma brônquica**

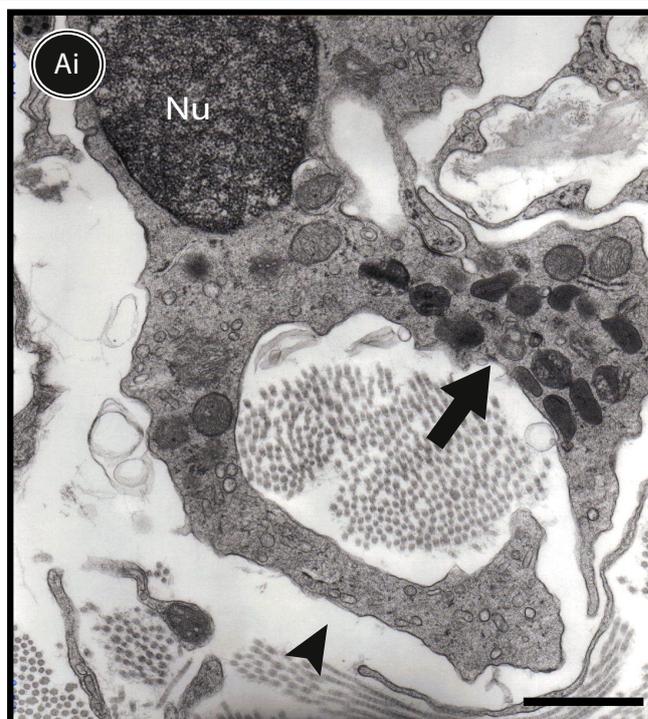
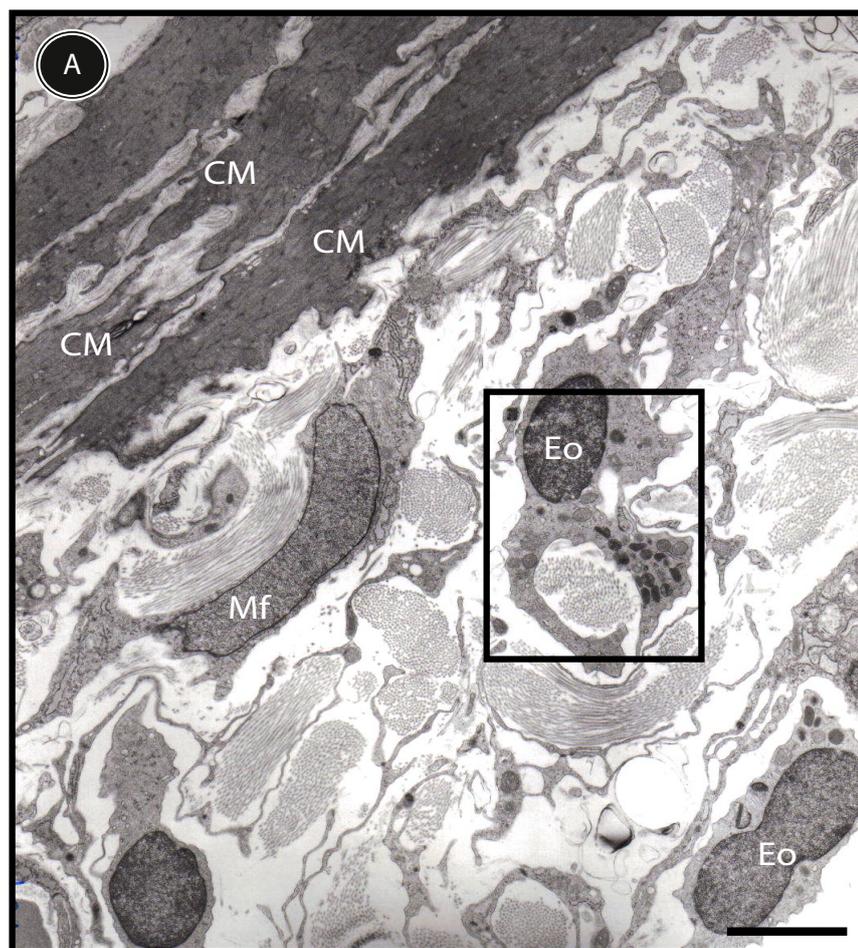
Uma vez estabelecido o processo de secreção de eosinófilos estimulados *in vitro*, investigamos a ocorrência de secreção e os processos envolvidos em modelo de asma *in vivo*. Primeiramente, foi investigado através de MET, se eosinófilos são ativados e recrutados para o pulmão de camundongos asmáticos em resposta à exposição de um alérgeno, seguindo o protocolo de alergia com ovalbumina.

Em comparação com o grupo controle, o infiltrado celular mostrou número acentuado de eosinófilos no tecido pulmonar de camundongos asmáticos, nas regiões peribronquial e perivascular, acompanhados de outras células como plasmócitos, neutrófilos, linfócitos, macrófagos e miofibroblastos e células residentes como fibroblastos e células do músculo liso. Todas essas células estavam em regiões ricas em colágeno (Fig. 4.3.1B e Fig 4.3.2). Estas características são típicas do remodelamento das vias aéreas durante do processo alérgico inflamatório. Não foram visualizados eosinófilos, miofibroblastos nem número significativo de outros leucócitos nos camundongos do grupo controle (Fig. 4.3.1A).

Eosinófilos do grupo alérgico apresentavam ultraestrutura típica de célula ativada, com núcleo predominantemente eucromático e alterações de forma (Fig. 4.3.2). Despertou a atenção o fato dos grânulos secretores não se encontrarem homogeneamente distribuídos no citoplasma e sim concentrados em uma região do citoplasma (Fig. 4.3.2). Este agrupamento dos grânulos foi frequentemente observado acontecendo com a população de vesículas citoplasmática.



**Figura 4.3.1- Ultraestrutura do tecido pulmonar de camundongos submetidos à alérgeno e grupo controle.** (A) Tecido pulmonar de camundongos do grupo controle mostra células típicas do pulmão como pneumócito (seta) e macrófagos residentes (MØ). (B) Tecido pulmonar de camundongos com asma experimental exibindo número acentuado de eosinófilos (Eo), acúmulo de fibras colágenas (Col) e plasmócitos (Plas). Amostras de pulmão foram coletadas, imediatamente fixadas e processadas para MET. Camundongos do grupo asma foram submetidos periodicamente à estímulos de ovalbumina de acordo com o protocolo de asma enquanto o grupo controle foi tratado apenas salina. Barra: 7  $\mu\text{m}$  (A) e 5  $\mu\text{m}$  (B).



**Figura 4.3.2- Micrografia de tecido pulmonar de camundongos asmáticos apresentando eosinófilo ativado.** (A e Ai), Eosinófilo (Eo) exibindo sinais de ativação caracterizado pela mudança da forma (cabeça de seta), agrupamento de grânulos (seta) em uma região do citoplasma. Miofibroblasto (Mf), células do músculo Liso (CM), Núcleo (Nu). Barra: -10  $\mu\text{m}$  (A), 3  $\mu\text{m}$  (B).



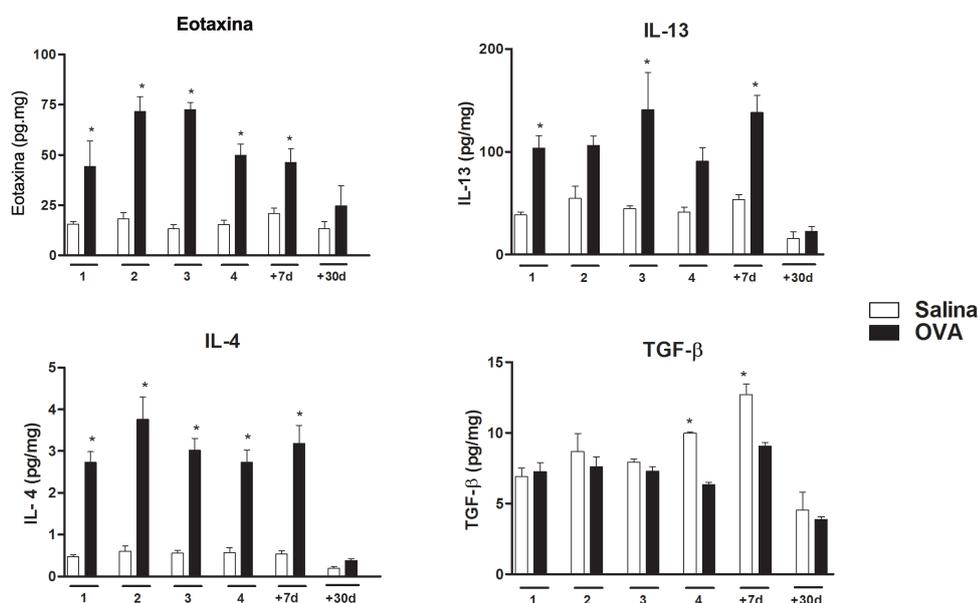
#### 4. 4- Perfil de citocinas Th2 são expressas no tecido pulmonar de camundongos asmáticos

Durante a resposta asmática é encontrado um perfil de citocinas e quimiocinas responsáveis pela modulação alérgica (Krug et al., 2001; Shannon et al., 2008). Dentre essas citocinas destacam-se a IL-4 e IL-13 como citocinas essenciais para o remodelamento das vias aéreas durante a resposta alérgica da asma, induzido o aumento da matriz extracelular e a diferenciação de células estromais. Juntamente com estas proteínas, analisamos a presença da quimiocina CCL11/eotaxina-1, importante no recrutamento de eosinófilos para o foco inflamatório (Willets et al., 2014; Williams, 2015). Em paralelo, foi analisada a presença da citocina pró-fibrótica TGF- $\beta$  (Puxeddu et al., 2004).

Observamos que no macerado do tecido pulmonar houve um aumento significativo das citocinas CCL11, IL-13 e IL-4 quando comparadas ao grupo salina no período compreendido entre 1 à 4 semanas de instilação nasal. A análise dos níveis destas citocinas após 7 dias do final do tratamento ainda detectou elevação dos mesmos. No entanto, 30 dias após o tratamento, estes níveis retornaram à valores basais indicando uma resolução da inflamação.

Quanto à TGF- $\beta$ , não foi observado aumento nos níveis desta citocina no grupo asma comparado ao controle (Fig. 4.3.1). Além disso, chamou a atenção o fato desta citocina ter aumento significativamente no grupo controle na última semana de tratamento e 7 dias após este.

Em conjunto, os dados de MET associados às dosagens de citocinas confirmam que o modelo experimental usado no presente trabalho representa de fato o estabelecimento da asma nos camundongos submetidos à estímulos alérgicos.



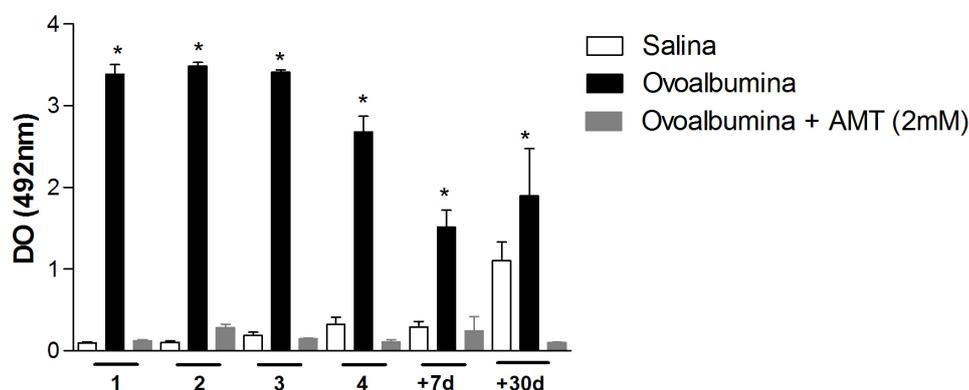
**Figura 4.4.1- Quantificação de citocinas em tecido pulmonar através de ELISA.** Os animais do grupo asma receberam instilação intranasal de ovalbumina durante 4 semanas. As análises de CCL11, IL-4, IL-13 e TGF- $\beta$  foram realizadas durante a 1<sup>a</sup>, 2<sup>a</sup>, 3<sup>a</sup>, 4<sup>a</sup>

semanas de instilação e 7 dias e 30 dias após a última instilação. O grupo controle recebeu salina nos mesmos dias de tratamento. Os dados estão expressos como média  $\pm$  EPM. \*  $p < 0,05$



#### 4. 5- Níveis de proteínas catiônicas derivadas de eosinófilos mostram-se elevados no modelo de asma

Para determinar a participação direta dos eosinófilos durante o processo inflamatório, foi quantificada a proteína catiônica EPO, armazenada como produto pré-formado nos grânulos de secreção de eosinófilos. Os níveis de EPO do macerado do tecido pulmonar mostrou-se significativamente maior em todos os grupos, mesmo após 30 dias de tratamento (Fig.4.4.1). A utilização de 3-amino-1,2,4-triazole (AMT), um inibidor específico da peroxidase de eosinófilos, certifica que este ensaio quantifica de fato somente a EPO (Fig. 4.4.1).



**Figura 4.5.1- Quantificação de peroxidase eosinofílica (EPO) no macerado pulmonar no grupo controle e asma.** Os níveis de EPO foram analisados após a 1ª, 2ª, 3ª e 4ª semanas, 7 e 30 dias após a última instilação

intranasal o tecido pulmonar de animais do grupo controle e asma. n=5/grupo. Valores expressos como média  $\pm$  EPM. \* P<0,05.

#### 4. 6- Desgranulação por piecemeal é o principal processo de secreção de eosinófilos durante a asma experimental

Para investigar o mecanismo de secreção de eosinófilos murinos durante a resposta alérgica inflamatória de animais asmáticos, estudamos eosinófilos do infiltrado inflamatório do tecido pulmonar através da MET. Tendo em vista que o pulmão não apresenta normalmente eosinófilos em sua população celular, a morfologia de eosinófilos do infiltrado inflamatório do grupo asmático foi comparada com a morfologia de eosinófilos de tecido (baço) de camundongos transgênicos para IL-5. Estes animais, em condições normais, hospedam no interior do órgão, um número significativo de eosinófilos não-ativados.

As análises de 64 secções de eosinófilos revelaram que eosinófilos do grupo asma apresentavam núcleo e membrana plasmática bem preservados, não havendo sinais do mecanismo de citólise (Fig. 4.5.2). Além disso, não foram observados eventos de fusão de grânulos de secreção entre si, eliminando o processo de exocitose composta. Raramente foi observada fusão de grânulos individuais com a membrana plasmática, indicando ausência significativa do processo

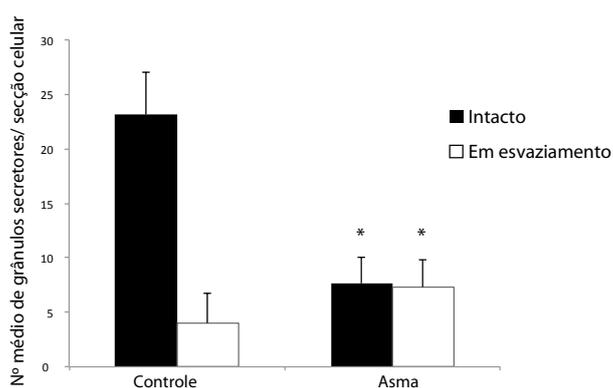


de secreção por exocitose clássica.

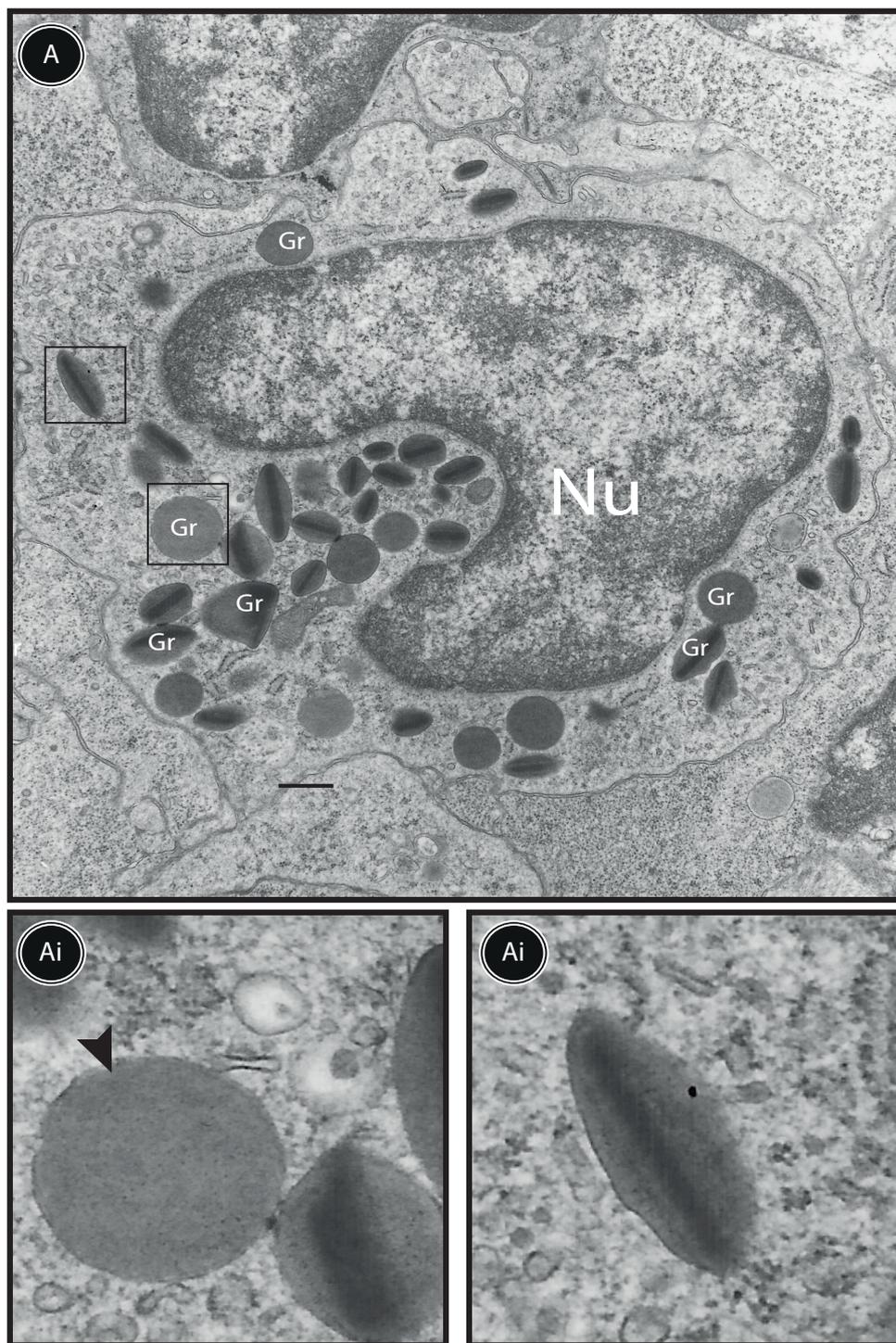
Os grânulos secretores dos eosinófilos do grupo asma (Fig. 4.5.2), em comparação ao grupo controle (Fig. 4.5.1) exibiam sinais de perda de conteúdos caracterizados por alteração da forma e elétrion-densidade, desestruturação do cristalóide e/ou matriz, presença de vesículas membranosas intragranulares e/ou perigranulares, matriz com aspecto rugoso e/ou alterações da membrana limitante (Fig. 4.5.2) (Shamri et al., 2012).

A quantificação do processo de PMD foi realizado conforme descrito no item 4.1, comparando o grupo asma com o grupo controle. A análise de um total de 1219 (n= 975 para o grupo asma e n=244 para o grupo controle) grânulos específicos revelou que, 52% ( $7.55 \pm 2.8$ , média  $\pm$ EPM) dos grânulos encontravam-se intactos e 47% em PMD ( $7.27 \pm 2.4$ , média  $\pm$ EPM) no grupo asma. Enquanto no grupo controle, 84% intactos ( $12.0 \pm 2.4$ , média  $\pm$ EPM) e 14% com sinais de mobilização ( $4.0 \pm 2.1$ , média  $\pm$ EPM), (Fig. 4.5.3).

Assim como analisado nos grupos de eosinófilos estimulados in vitro, eosinófilos estudados no modelo de asma experimental, exibiram também, uma grande população de vesículas distribuídas em todo o citoplasma (Fig. 4.5.4). Dentre as células, foram encontrados um aumento significativo do número de vesículas nos grupo asmático comparado ao grupo controle. A quantificação destas vesículas apresentou respectivamente um número de 76 vesículas ( $8.4 \pm 2.5$ , média  $\pm$ EPM) no grupo controle enquanto um número de 2.969 vesículas ( $46.3 \pm 21.2$ , média  $\pm$ EPM) foram contados no grupo asmático (Fig. 4.5.4). Estas vesículas apresentavam as mesmas características das vesículas sombreiro descritas em eosinófilo murino, sendo observadas próximas ou em fusão com os grânulos em processo de esvaziamento ou com a membrana plasmática (Fig. 4.5.4).

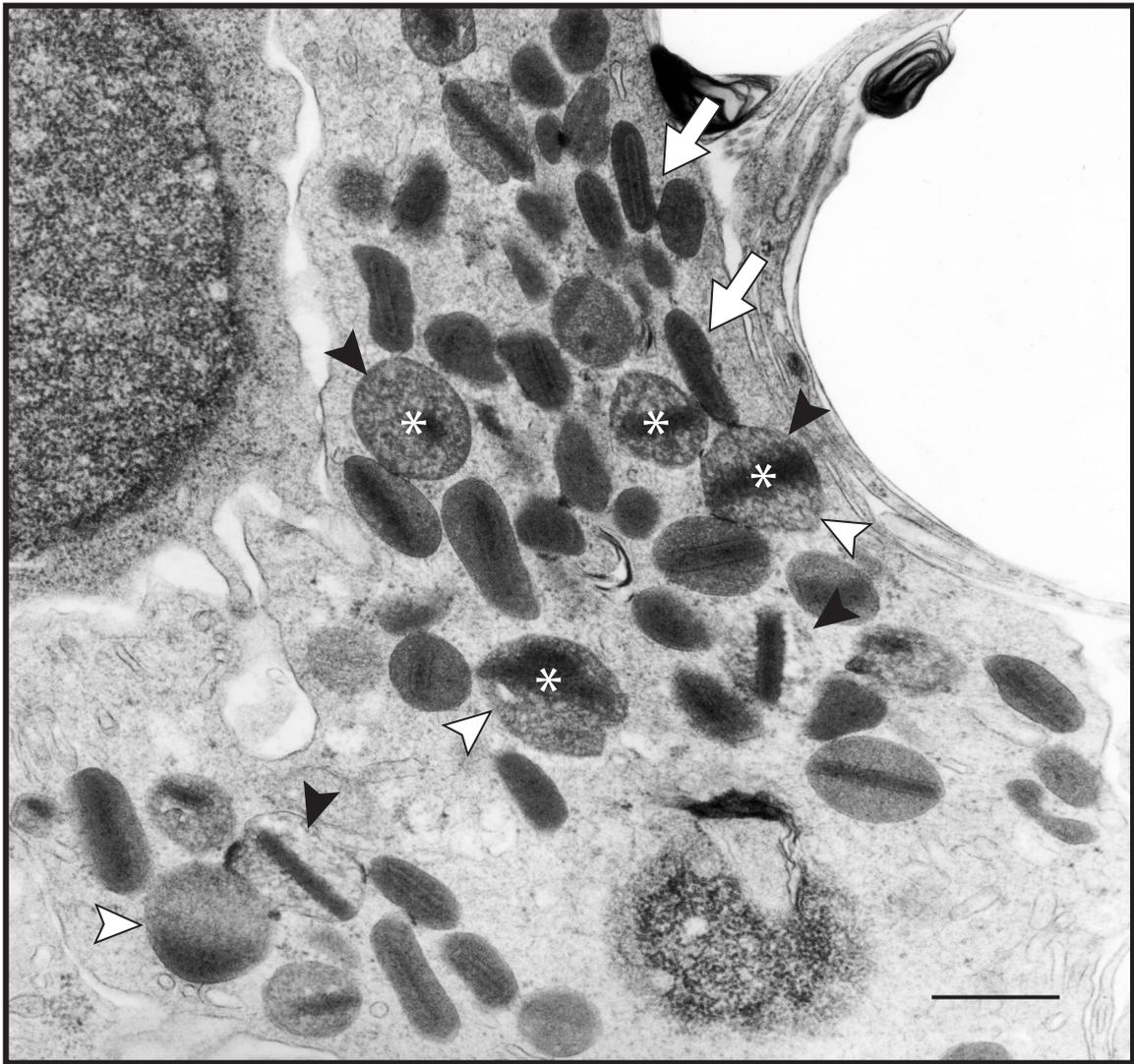


**Figura 4.6.1- Quantificação dos grânulos secretores de eosinófilos do grupo asma comparados com o grupo controle.** Os animais do grupo asma receberam instilação intranasal de ovalbumina durante 4 semanas. Eosinófilos deste grupo apresentaram aumento significativo dos números de grânulos em processo de esvaziamento enquanto os grânulos intactos houve uma diminuição significativa comparadas comparados ao grupo controle. O grânulos de eosinófilos do grupo controle foram analisados a partir do tecido esplênico de animais transgênicos para IL-5. Os dados estão expressos como média  $\pm$  EPM. \*  $p < 0,05$ .



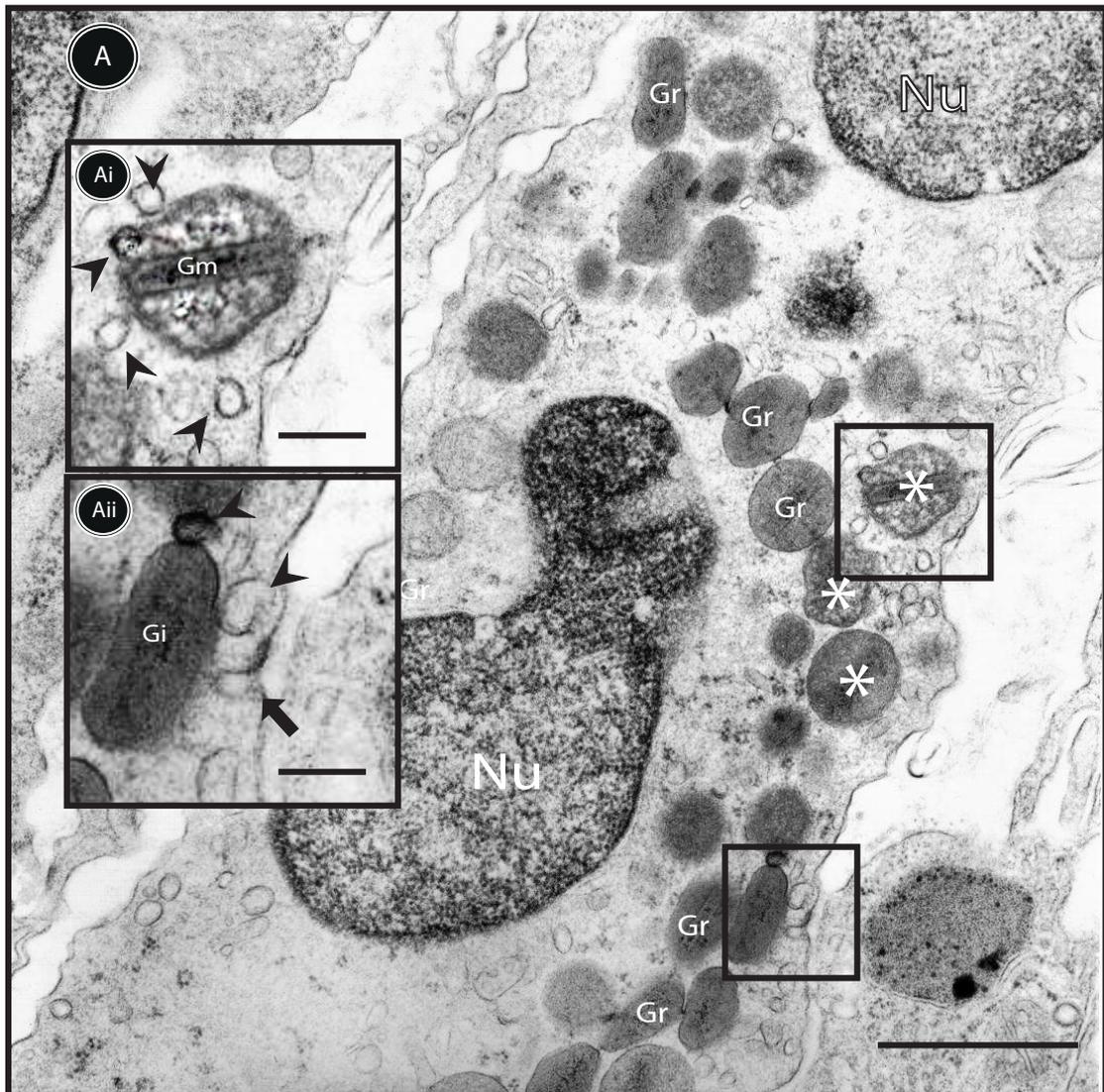
**Figura 4.6.2- Ultraestrutura de eosinófilos coletados do baço de animais transgênicos para IL-5 como grupo controle.** (A), Eosinófilos do tecido esplênico de camundongos transgênicos para IL-5 não estimulados exibindo grânulos intactos e alguns em proces-

so de amadurecimento. (Ai), Granulo intacto considerado como grânulo secretor em processo de amadurecimento. (Aii), Grânulo intacto. Grânulo (Gr), Núcleo (Nu). Barra: 1  $\mu$ m (A), 200 nm (Ai), 250nm (Aii).



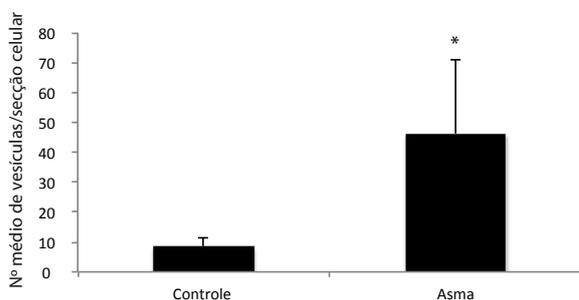
**Figura 4.6.3- Micrografia eletrônica de eosinófilo do tecido pulmonar coletado de camundongos do grupo asma exibindo sinais de piecemeal.** Eosinófilo exibindo grânulos secretores em PMD apresentando sinais de mobilização do conteúdo. Grânulos mostrando aumento de volume (\*), matriz rugosa (\*) associada à perdas de elétrons na matriz (cabeça de seta preta) e desestruturação do nucleóide (cabeça de seta branca) foram classificados como grânulos em pro-

cesso de esvaziamento enquanto grânulos secretores com a elétrons densidade preservados da matriz e nucleóide foram classificados como intactos (seta branca). Amostras de pulmão foram coletadas, imediatamente fixadas e processadas para MET. Camundongos do grupo asma foram submetidos periodicamente à estímulos de ovalbumina de acordo com o protocolo de asma enquanto o grupo controle foi tratado apenas salina. Núcleo (Nu). Barra: 5  $\mu$ m.



**Figura 4.6.4- Micrografia de eosinófilo do tecido pulmonar de camundongos asmáticos mostrando vesículas fundidas com grânulos secretores ou com membrana plasmática.** (A), Eosinófilo murino do tecido pulmonar de animais asmáticos apresentando grânulos secretores (Gr) em processo de esvaziamento (\*). (Ai), Grânulo em processo de esvaziamento apresentando vesículas de transporte próximas, aderidas ou em fusão com a membrana granular (cabeça de seta). (Aii), vesículas encontradas próxima

ou aderida (cabeça de seta) ou realizando fusão com a membrana plasmática (seta). Amostras de pulmão foram coletadas, imediatamente fixadas e processadas para MET. Camundongos do grupo asma foram submetidos periodicamente à estímulos de ovalbumina de acordo com o protocolo de asma enquanto o grupo controle foi tratado apenas salina. Barra: 2  $\mu$ m

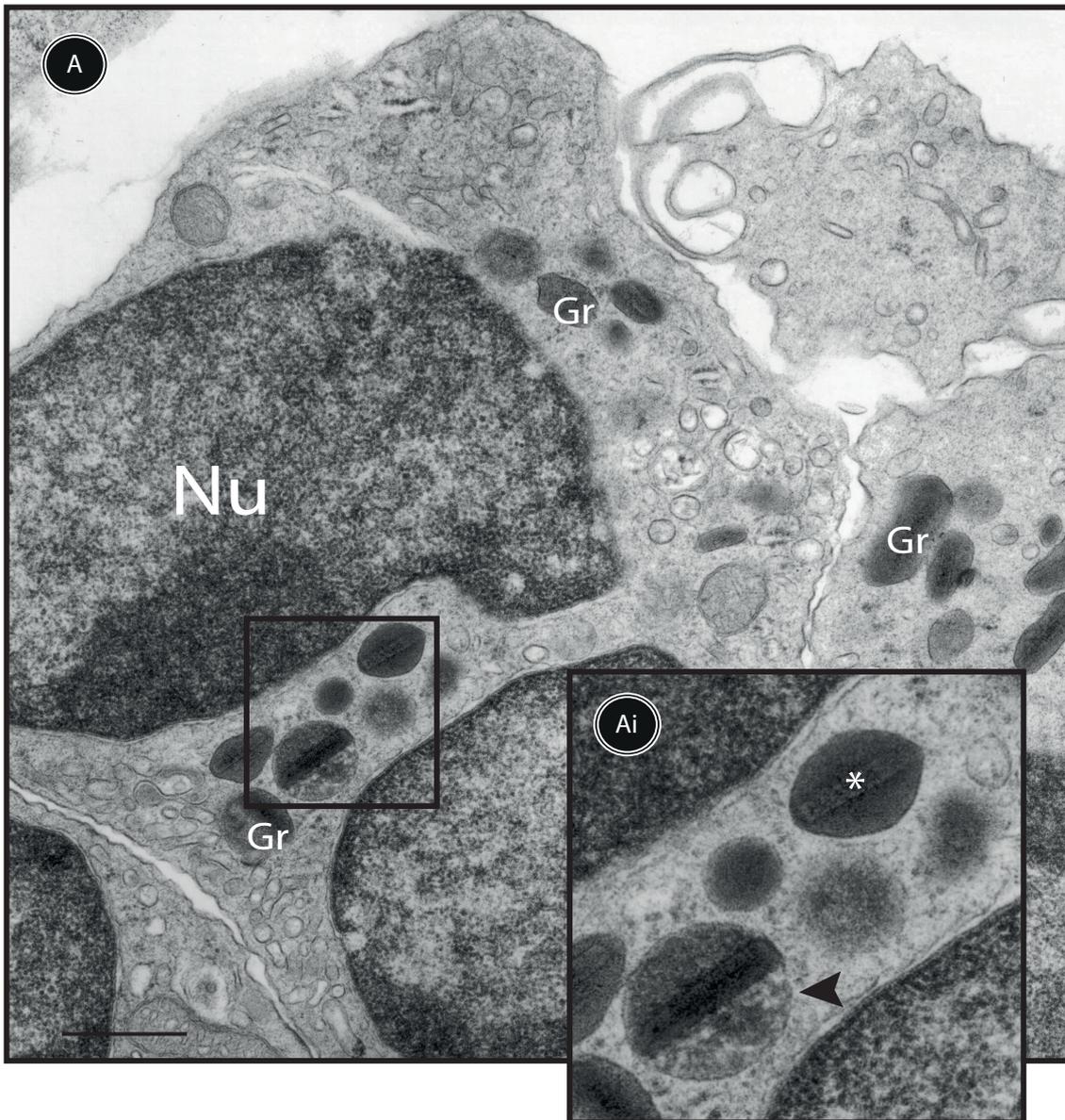


**Figura 4.6.5- Gráfico representativo da média de vesículas por eosinófilos do grupo asma comparados ao grupo controle.** Os animais do grupo asma receberam instilação intranasal de ovalbumina durante 4 semanas. Eosinófilos do grupo controle foram analisados a partir do tecido esplênico de animais transgênicos para IL-5. Os dados estão expressos como média  $\pm$  EPM. \*  $p < 0,05$

#### **4. 7- Identificação de novos aspectos indicativos de desgranulação por piecemeal**

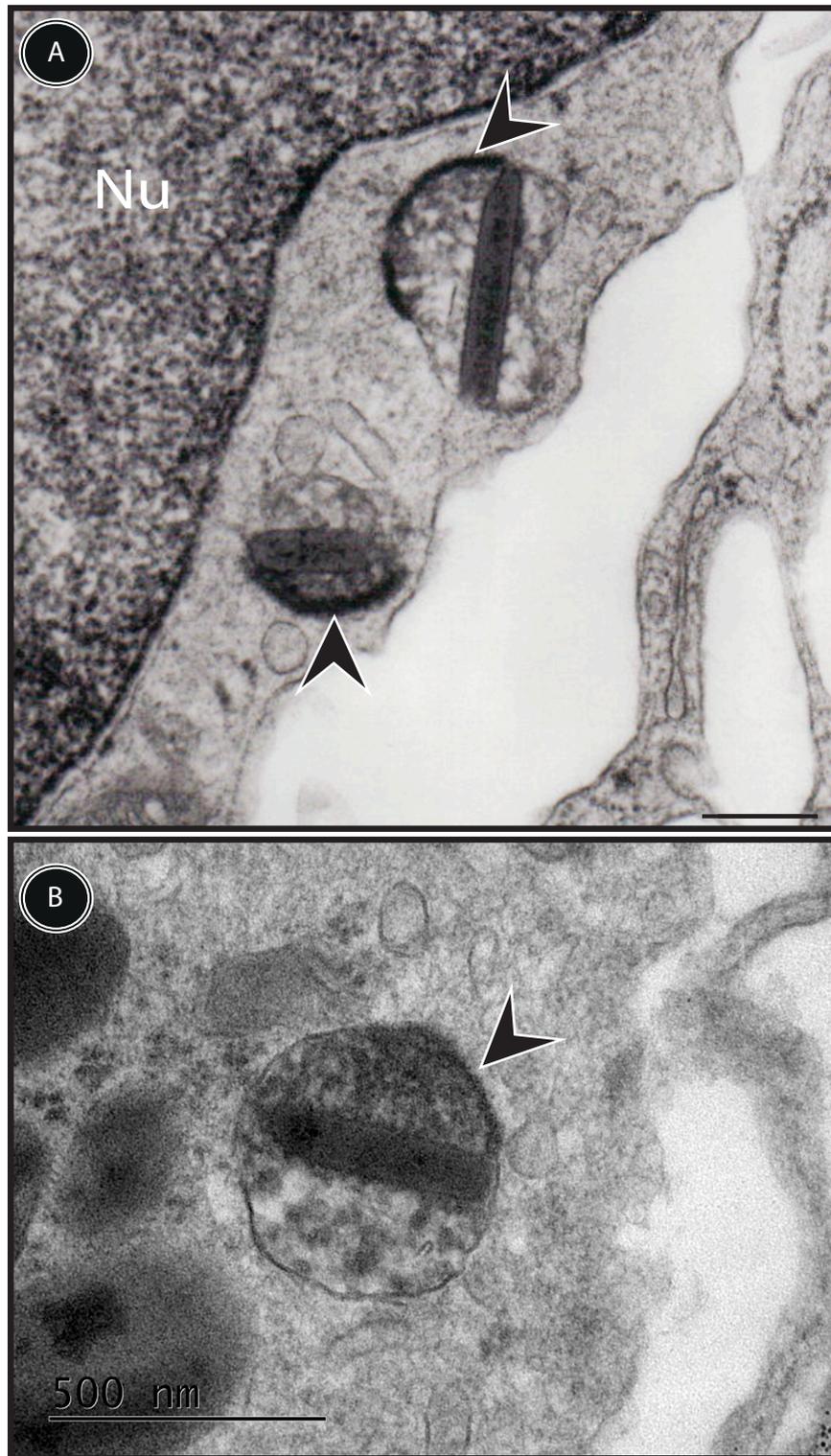
Ao estudar o mecanismo de secreção de eosinófilos na asma experimental e após os estímulos in vitro, chamou a atenção a ocorrência frequente nos grânulos secretores de características morfológicas associadas com desgranulação por piecemeal. Grânulos sofrendo este tipo de secreção mostravam polarização de seus conteúdos e formação de uma bainha (área espessada) na membrana limitante (Fig. 4.6.2). Estas duas características foram observadas em conjunto ou separadamente. No primeiro caso, a polarização caracterizou-se por alteração da elétron-densidade do conteúdo granular e mobilização deste para um dos polos do grânulo (Fig. 4.6.1). A formação da bainha caracterizou-se pela presença de uma área diferenciada da membrana limitante do grânulo, na qual esta se mostrava mais espessada e com aumento na elétron-densidade.

Em seguida, nós investigamos qual o tamanho destas bainhas encontradas nos grânulos em processo de esvaziamento. A avaliação de 11 secções de grânulos variou em tamanho (120-300nm), sendo em média de 10% da membrana limitante do grânulo (perímetro). Em conjunto, estes novos aspectos sugerem que a liberação de produtos estocados nos grânulos secretores ocorre numa área específica na membrana limitante.



**Figura 4.7.1- Ultraestrutura de eosinófilos do tecido pulmonar de animais asmáticos exibindo grânulo com conteúdo polarizado.** (A), Eosinófilo no tecido pulmonar do grupo asma exibe grânulos secretores em processo de esvaziamento (cabeça de seta) ou intactos (\*). (Ai), Grânulo em processo de

esvaziamento apresenta um dos polos com conteúdo mobilizado, resultando em uma parte com mais elétrons-densidade do que a outra (seta). Núcleo (Nu). Barra: 2  $\mu\text{m}$  (A) e ~500nm (Ai).



**Figura 4.7.2-Grânulos secretores com formação de bainha (área espessada) na membrana limitante.** (A), Grânulos exibindo formação da bainha no limite da membrana (cabeça de seta). (B), Grânulo polariza-

do apresentando mobilização em direção à bainha na membrana limitante (cabeça de seta). Núcleo (Nu). Barra: 250nm (A) e 500nm (B).



**DISCUSSÃO**



## 5. DISCUSSÃO

Eosinófilos humanos são células derivadas da medula óssea, originadas de células CD34<sup>+</sup>, a mesma progenitora de basófilos e mastócitos. Estas células possuem morfologia única, se diferenciando dos demais granulócitos por abrigarem uma população de grânulos secretores que armazenam proteínas em compartimentos internos, apresentando um núcleo cristalino banhado por uma matriz rica em citocinas. Durante respostas alérgicas, inflamatórias e imuno-regulatórias, eosinófilos são recrutados para interior do tecido liberando quantidades expressivas de proteínas. Portanto, a função efetora do eosinófilo é baseada na sua capacidade de secretar seus produtos pré-estocados. Desta forma, o estudo de mecanismos de secreção de eosinófilos é importante para o entendimento das vias intracelulares envolvidas na liberação de citocinas e outros mediadores durante patologias humanas (Melo et al., 2013; Melo and Weller, 2010a).

Em eosinófilos humanos, estudos *in vitro* demonstram que estas células são responsivas a se desenvolverem sob influência de citocinas como IL-3, IL-5 e GM-CSF. Estas proteínas podem promover a diferenciação, maturação e ativação dos eosinófilos na medula óssea e em tecidos secundários, como no tecido esplênico (Dvorak and Ishizaka, 1994; Dvorak et al., 1989). Além disso, GM-CSF e IL-5 são usados para o amadurecimento de eosinófilos coletados da medula óssea de camundongos para investigações *ex vivo* (Dyer et al., 2008; Dyer et al., 2009b). Essas citocinas também são encontradas em situações patológicas, tal como na dermatite, asma, doença de Chrons e infecções bacterianas, virais e helmínticas. Entre essas proteínas efetoras, GM-CSF realizada um papel essencial na eosinofilia durante o estágio inflamatório (Ilmarinen and Kankaanranta, 2014; Jacobsen et al., 2015; Lilly et al., 2014; Liu et al., 2015; Yamaya, 2012). Além de promover o recrutamento, maturação e a expressão de moléculas de adesão, GM-CSF também provoca a desgranulação e bloqueia a apoptose dos eosinófilos (Ilmarinen and Kankaanranta, 2014).

No entanto, estudos que descrevem a influência de GM-CSF na ativação e desgranulação de eosinófilos murinos em condições experimentais permanecem elusivas. Em nossas investigações utilizando a microscopia eletrônica de transmissão como ferramenta de análise, nós demonstramos que eosinófilos coletados do baço de camundongos transgênicos para IL-5 estimulado com GM-CSF apresentam sinais de polarização da célula caracterizada por presença de urópodes e concentração da população de grânulos secretores em uma polo da célula. A polarização do citoplasma em leucócitos é um requerimento crucial para ativação, migração e apoptose, no caso dos eosinófilos, esta polarização dá origem à uropodes. Estes uropodes, projetam porções do citoplasma no meio extracelular com o objetivo de realizarem processos celulares como contato célula-célula (Fais and Malorni, 2003).

Além disso, foram observados sinais típicos de desgranulação por piecemeal exibindo grânulos sofrendo perdas progressiva dos conteúdos. O mecanismo de secreção da piecemeal em eosinófilos humanos é descrito pela liberação de proteínas armazenadas nos grânulos através do transporte vesicular. Entretanto, nos eosinófilos murinos o mecanismo é descrito de forma superficial, apresentando apenas dados qualitativos de perda de eletrodensidade dos



grânulos (Clark et al., 2004; Dyer et al., 2009a; Malm-Erfjält et al., 2001; Shamri et al., 2012). Aqui apresentamos pela primeira vez dados quantitativos e qualitativos mostrando a característica principal da desgranulação por piecemeal, o transporte por vesículas. Interessantemente, foram visualizadas vesículas sendo liberadas de grânulos em diferentes estágios, tanto intacto quanto mobilizados. Esse fato pode explicar porque o eosinófilo murino foi por muito tempo considerado uma célula impossibilitada de realizar piecemeal (Lee et al., 2012; Malm-Erfjält et al., 2001), pois consideravam as características de desgranulação por piecemeal apenas os critérios de perdas na eletrodensidade dos grânulos.

Em estudo utilizando eosinófilos humanos foi demonstrado que estas células expressam receptores Notch e seus ligantes, responsáveis pela comunicação célula-célula, destinando o desenvolvimento celular. A expressão desses receptores em eosinófilos pode ser influenciada pela presença de GM-CSF, aumentando a expressão dessa molécula, favorecendo a sobrevivência da célula no tecido (Radke et al., 2009). De nota, sabe que esta proteína pode ser sintetizada e liberada por eosinófilos, promovendo um potente regulador autócrino (Rothenberg and Hogan, 2006). Há evidências que estas células podem realizar a liberação de suas proteínas através de piecemeal após o priming, sob estímulos inflamatórios fisiológicos (IL-3, IL-5 e GM-CSF). Além disso, estes mecanismos celulares que dirigem o priming aumentam a secreção de proteínas estocadas nos grânulos e que mediadores intracelulares pode agir nos receptores intracelulares, possivelmente expressos nos grânulos (Spencer et al., 2014). Nosso estudo, sobre os eventos da secreção entre os grânulos demonstrou que os eosinófilos murinos sob influencia de GM-CSF podem apresentar grânulos em processo de granulogênese, indicando que este estímulo pode auxiliar na maturação da população de grânulos.

A atuação dos receptores de Notch, além de fornecerem sinais para a ativação/especialização dos eosinófilos podem promover a sinalização da célula na liberação de proteínas. Há dados sobre a diferenciação de eosinófilo/basófilo que demonstram a participação de receptores do tipo toll (TLR) após estimulados por endotoxinas (Reece et al., 2014; Shimura et al., 2014a, b). A expressão de TLR de células progenitoras de eosinófilos humanos estimulados por lipopolissacarídeo (LPS), é aumentada favorecendo a diferenciação dos eosinófilos. Este estímulo foi mostrado que facilita a diferenciação destas células, promovendo a secreção de GM-CSF e a expressão significativa de receptores de GM-CSF (GM-CSFRa), via um mecanismo dependente de p38-MAP quinase (Reece et al., 2013; Reece et al., 2014).

O LPS é uma endotoxina da parede bacteriana considerado um potente indutor da ativação de granulócitos e promove a secreção de uma variedade de mediadores inflamatórios, incluindo o GM-CSF, CCL5, IL-8, MIF-1, fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e mediadores lipídicos (Alexander and Rietschel, 2001; Karima et al., 1999; Matsuura, 2013). A inalação de LPS obtidas de bactérias gram-negativas encontradas no ambiente urbano tem sido associado com a inflamação das vias aéreas e exacerbação da asma (He et al., 2012; Ren et al., 2014). Além disso, estas células são ativadas à secretarem seus produtos através da liberação de citocinas derivadas de monócitos estimulados por LPS. Evidências sugerem que, LPS pode regular a broncoconstrição e a função efetora de eosinófilos durante a resposta asmática causando tosse e broncoespas-



mos em humanos (Kobayashi et al., 2009).. Em estudos usando modelos experimentais, animais induzidos à pleurisia podem promover a recrutamento de eosinófilos via a sinalização de CCR3 através de mecanismo independente de CCL24 ou CCL11. Estas células podem aumentar a taxa de sobrevivência consequentemente permanecendo infiltrados mais tempo no tecido pulmonar participando do remodelamento das vias aéreas (Bozza et al., 1993; Larangeira et al., 2001; Penido et al., 2001). Entretanto, estudos utilizando eosinófilos murinos tem falhado em mostrar a via de sinalização e mecanismo de secreção após estímulos com LPS (Lee et al., 2012).

Nosso estudo mostra que eosinófilos murinos estimulados com LPS e GM-CSF pode secretar através da piecemeal assim como em eosinófilos murinos estimulados com GM-CSF. As células estimuladas apresentaram aspectos de polarização celular caracterizada por presença de urópodes, juntamente com a centralização do grupo de grânulos em determinada área da célula. Os grânulos apresentaram sinais de desgranulação por piecemeal acompanhados pelo brotamento de vesículas à partir de grânulos no estado intacto e grânulos mobilizados, indicando que a quantificação de ribonucleases resultam na liberação seletiva da PMD.

Estas evidências *in vitro* foram confirmadas usando modelo experimental de asma para investigar o mecanismo de secreção que eosinófilos no infiltrado inflamatório do tecido pulmonar. Nossos resultados mostraram a participação de eosinófilos no infiltrado inflamatório do tecido pulmonar de animais asmáticos apresentando o mesmo estado de polarização que as células estimuladas por estímulos fisiológicos (GM-CSF) ou por endotoxina (LPS). Observamos a centralização dos grânulos em um polo da célula acompanhadas por prolongamentos citoplasmáticos, certamente usados para migração da célula para foco inflamatório. Além disso, avaliamos se os eosinófilos do infiltrado pulmonar podiam liberar proteínas derivadas do grânulos secretores, por isso optamos em detectar uma proteína exclusiva desta célula, a peroxidase eosinofílica do crônico Eosinophil Peroxidase (EPO). Esta proteína reside na matriz dos grânulos secretores sendo liberada em situação diversas de patologias. Nos modelos empregados, a expressão de EPO no macerado pulmonar foi acompanhada pela presença de eosinófilos juntamente com as características do remodelamento das vias aéreas.

A ultraestrutura de eosinófilos murinos identificou grânulos sofrendo perdas da eletrodensidade com aspectos típicos de desgranulação por piecemeal. Os sinais de piecemeal eram visualizados em grânulos sob diferentes perfis ultraestruturais, liberando proteínas através do transporte vesicular. As vesículas, denominadas EoSvs murina, foram encontradas anexada ou próximas à grânulos intactos e/ou mobilizados. Além dos grânulos, podíamos observar vesículas fazendo fusão com a membrana plasmática ou com grânulos. Estes dados indicam que grânulos intactos são aptos a liberarem proteínas através de vesículas de secreção, assim como descritos em grânulos mobilizados de eosinófilos humanos (Melo et al., 2005a; Melo et al., 2005b; Melo et al., 2009).

Esta é a primeira vez que identificamos o mecanismo de piecemeal em eosinófilos murinos *in vivo* nos modelos asma experimental apresentando descrições adicionais aos estudos realizados em humanos. Além de visualizarmos os aspectos de ativação e desgranulação destas células, mostramos que apenas a perda de eletrodensidade dos grânulos não é uma forma fiel



de avaliar a secreção por piecemeal em eosinófilos murinos. Curiosamente, nossas observações identificaram grânulos com conteúdo da matriz polarizada, ou seja, estes grânulos exibiam perdas de um lado da organela enquanto o outro mantinham características preservadas. Alguns desses grânulos mostravam uma forte bainha eletrodensa na membrana granular juntamente com conteúdos acumulados abaixo desta formação. Este é um dado surpreendente pois sugere que a piecemeal promove a polarização da membrana dos grânulos fornecendo sinalização específica para proteínas armazenadas, fortalecendo o fato que desgranulação por piecemeal é realizada através da secreção seletiva de citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento e proteínas catiônicas.

Assim, exibimos neste estudo dados mostrando que eosinófilos murinos sob estímulos inflamatórios *in vitro* e *in vivo*, podem realizar a desgranulação por piecemeal apresentando uma nova perspectiva sobre o mecanismo, como detalhadamente visualizado pela microscopia, a presença da bainha eletrodensa na membrana plasmática dos grânulos secretores. Dada as dimensões e características da bainha eletrodensa, apostamos em novos estudos que tem como alvo a formação de balsas lipídicas nos grânulos secretores, podendo encontrar receptores que norteiam a liberação de proteínas armazenadas nestas organelas. Mais uma vez, a microscopia eletrônica de transmissão traz luz aos achados da biologia celular dos eosinófilos permitindo planejar novas estratégias de investigações que possibilitaram determinar a biologia molecular desta célula em situações patológicas, auxiliando na identificação de novos alvos farmacológicos.



**CONCLUSÃO**



## 6. CONCLUSÃO

- Coletivamente, os resultados do presente trabalho indicam que eosinófilos murinos são hábeis a secretarem proteínas pré-estocadas em grânulos através o mecanismo de piecemeal sob estímulos inflamatórios (in vitro) e em resposta à asma experimental (in vivo) apresentando sinais inéditos sobre a regulação da desgranulação por piecemeal. Isso é importante para o entendimento de mecanismos de liberação de mediadores imunes durante respostas de eosinófilos em doenças alérgicas e inflamatórias.
- Eosinófilos murinos são aptos a ativarem sob estímulos inflamatórios, tanto por fatores inflamatórios fisiológicos quanto por endotoxinas, apresentando características de polarização da células acompanhadas por agrupamento de grânulos secretores.
- As análises ultraestruturais mostram que eosinófilos murinos são aptos a secretarem através de piecemeal apresentando sinais similares à eosinófilos humanos.
- Eosinófilos murinos participam da resposta inflamatória asmática podendo liberar proteínas estocadas nos grânulos através do mecanismo de desgranulação da piecemeal.
- A ultraestrutura de eosinófilos murinos sob o mecanismo de secreção por piecemeal exibem aspectos adicionais durante a liberação de conteúdos, caracterizados pela polarização dos grânulos secretores e acompanhado por uma bainha eletrodensa da membrana granular polarizada.



# REFERÊNCIAS



## 7. REFERÊNCIAS

Aceves, S.S. (2014). Remodeling and fibrosis in chronic eosinophil inflammation. *Digestive diseases* 32, 15-21.

Acharya, K.R., and Ackerman, S.J. (2014). Eosinophil granule proteins: form and function. *The Journal of biological chemistry* 289, 17406-17415.

Ackerman, G.A., and Clark, M. (1971). Ultrastructural localization of peroxidase activity in normal human bone marrow cells. *Zeitschrift fur Zellforschung und mikroskopische Anatomie* 117, 463-475.

Ackerman, S.J. (2013). To be, or not to be, an eosinophil: that is the ???, Vol 122.

Adamko, D.J., Wu, Y., Gleich, G.J., Lacy, P., and Moqbel, R. (2004). The induction of eosinophil peroxidase release: improved methods of measurement and stimulation. *Journal of immunological methods* 291, 101-108.

Ahlstrom-Emanuelsson, C.A., Greiff, L., Andersson, M., Persson, C.G., and Erjefalt, J.S. (2004). Eosinophil degranulation status in allergic rhinitis: observations before and during seasonal allergen exposure. *The European respiratory journal* 24, 750-757.

Akashi, K., Traver, D., Miyamoto, T., and Weissman, I.L. (2000). A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature* 404, 193-197.

Alexander, C., and Rietschel, E.T. (2001). Invited review: Bacterial lipopolysaccharides and innate immunity. *Journal of Endotoxin Research* 7, 167-202.

Alkhouri, H., Cha, V., Tong, K., Moir, L.M., Armour, C.L., and Hughes, J.M. (2014). Human Lung Mast Cell Products Regulate Airway Smooth Muscle CXCL10 Levels. *Journal of Allergy* 2014, 13.

Alkhouri, H., Hollins, F., Moir, L.M., Brightling, C.E., Armour, C.L., and Hughes, J.M. (2011). Human lung mast cells modulate the functions of airway smooth muscle cells in asthma. *Allergy* 66, 1231-1241.

Antunes, M.A., Abreu, S.C., Silva, A.L., Parra-Cuentas, E.R., Ab, Saber, A.M., Capelozzi, V.L., Ferreira, T.P.T., Martins, M.A., Silva, P.M.R., and Rocco, P.R.M. (2010). Sex-specific lung remodeling and inflammation changes in experimental allergic asthma. *Journal of applied physiology* 109, 855-863.

Archer, G.T. (1962). Release of peroxidase from eosinophil granules in vitro. *Nature* 194, 973-974.

Archer, G.T., Air, G., Jackas, M., and Morell, D.B. (1965). Studies on Rat Eosinophil Peroxidase. *Biochimica et biophysica acta* 99, 96-101.

Archer, G.T., and Hirsch, J.G. (1963a). Isolation of Granules from Eosinophil Leucocytes and Study of Their Enzyme Content. *The Journal of experimental medicine* 118, 277-286.

Archer, G.T., and Hirsch, J.G. (1963b). ISOLATION OF GRANULES FROM EOSINOPHIL LEUCOCYTES AND STUDY OF THEIR ENZYME CONTENT. *The Journal of experimental medicine* 118,



277-286.

Archer, G.T., and Hirsch, J.G. (1963c). MOTION PICTURE STUDIES ON DEGRANULATION OF HORSE EOSINOPHILS DURING PHAGOCYTOSIS. *The Journal of experimental medicine* 118, 287-294.

Archer, R.K. (1959). Eosinophil leucocytes and their reactions to histamine and 5-hydroxytryptamine. *The Journal of pathology and bacteriology* 78, 95-103.

Archer, R.K. (1960a). Eosinophil leucocyte-attracting effect of histamine in skin. *Nature* 187, 155-156.

Archer, R.K. (1960b). Studies with eosinophil leucocytes isolated from the blood of the horse. *British journal of haematology* 6, 229-241.

Archer, R.K. (1964). The Eosinophil and Its Functions. *Transactions of the St. John's Hospital Dermatological Society* 50, 112-120.

Bainton, D.F., and Farquhar, M.G. (1966). ORIGIN OF GRANULES IN POLYMORPHONUCLEAR LEUKOCYTES Two Types Derived from Opposite Faces of the Golgi Complex in Developing Granulocytes. *The Journal of cell biology* 28, 277-301.

Baker, A.P., Bergman, F., and Paul, K.G. (1967). Studies of eosinophil granulocytes. 3. Steroid hormones and number of eosinophils in the uterus of the mouse and rat. *Acta endocrinologica* 54, 696-706.

Bandeira-Melo, C., and Weller, P.F. (2005). Mechanisms of eosinophil cytokine release. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 100 Suppl 1, 73-81.

Bandeira-Melo, C., Woods, L.J., Phoofolo, M., and Weller, P.F. (2002). Intracrine cysteinyl leukotriene receptor-mediated signaling of eosinophil vesicular transport-mediated interleukin-4 secretion. *The Journal of experimental medicine* 196, 841-850.

Beil, W.J., Weller, P.F., Tzizik, D.M., Galli, S.J., and Dvorak, A.M. (1993). Ultrastructural immunogold localization of tumor necrosis factor-alpha to the matrix compartment of eosinophil secondary granules in patients with idiopathic hypereosinophilic syndrome. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* 41, 1611-1615.

Bergmann, K.C., and Ring, J. (2014). *History of Allergy* (S. Karger AG).

Bielory, L. (2014). *History of Allergy*. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology* 113, 676.

Biggart, J.H. (1933). The Origin of the Eosinophil Granule. *The Ulster medical journal* 2, 47-52.

Bjersing, L., and Borglin, N.E. (1963). EFFECT OF HORMONES ON INCIDENCE OF UTERINE EOSINOPHILIA IN RATS. *Acta pathologica et microbiologica Scandinavica* 60, 27-35.

Blanchard, C., Durual, S., Estienne, M., Emami, S., Vasseur, S., and Cuber, J.-C. (2005). Eotaxin-3/CCL26 gene expression in intestinal epithelial cells is up-regulated by interleukin-4 and interleukin-13 via the signal transducer and activator of transcription 6. *The international journal of biochemistry & cell biology* 37, 2559-2573.



Blanchard, C., and Rothenberg, M.E. (2009). Biology of the eosinophil. *Advances in immunology* 101, 81-121.

Blanchet, M.R., Maltby, S., Haddon, D.J., Merkens, H., Zbytnuik, L., and McNagny, K.M. (2007). CD34 facilitates the development of allergic asthma. *Blood* 110, 2005-2012.

Blanchet, M.R., and McNagny, K.M. (2009). Stem cells, inflammation and allergy. *Allergy, asthma, and clinical immunology : official journal of the Canadian Society of Allergy and Clinical Immunology* 5, 13.

Boix, E., Salazar, V.A., Torrent, M., Pulido, D., Nogues, M.V., and Moussaoui, M. (2012). Structural determinants of the eosinophil cationic protein antimicrobial activity. *Biological chemistry* 393, 801-815.

Bozza, P.T., Castro-Faria-Neto, H.C., Martins, M.A., Lorangeira, A.P., Perales, J.E., e Silva, P.M.R., and Cordeiro, R.S.B. (1993). Pharmacological modulation of lipopolysaccharide-induced pleural eosinophilia in the rat; a role for a newly generated protein. *European Journal of Pharmacology: Environmental Toxicology and Pharmacology* 248, 41-47.

Brown, W.J., and Wood, E.M. (1978). Ultrastructural localization of cationic proteins in human polymorphonuclear leukocytes. *Journal of cell science* 30, 21-35.

Butterfield, J.H., Kephart, G.M., Banks, P.M., and Gleich, G.J. (1986). Extracellular deposition of eosinophil granule major basic protein in lymph nodes of patients with Hodgkin's disease. *Blood* 68, 1250-1256.

Bystrom, J., Amin, K., and Bishop-Bailey, D. (2011). Analysing the eosinophil cationic protein - a clue to the function of the eosinophil granulocyte. *Respiratory research* 12, 10.

Carlson, M., Peterson, C., and Venge, P. (1993). The influence of IL-3, IL-5, and GM-CSF on normal human eosinophil and neutrophil C3b-induced degranulation. *Allergy* 48, 437-442.

Cho, J.Y., Miller, M., Baek, K.J., Han, J.W., Nayar, J., Lee, S.Y., McElwain, K., McElwain, S., Friedman, S., and Broide, D.H. (2004). Inhibition of airway remodeling in IL-5-deficient mice. *Journal of Clinical Investigation* 113, 551.

Clark, K., Simson, L., Newcombe, N., Koskinen, A.M., Mattes, J., Lee, N.A., Lee, J.J., Dent, L.A., Matthaehi, K.I., and Foster, P.S. (2004). Eosinophil degranulation in the allergic lung of mice primarily occurs in the airway lumen. *Journal of leukocyte biology* 75, 1001-1009.

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.

Crivellato, E., Nico, B., Mallardi, F., Beltrami, C.A., and Ribatti, D. (2003). Piecemeal degranulation as a general secretory mechanism? *The Anatomical Record Part A: Discoveries in Molecular, Cellular, and Evolutionary Biology* 274, 778-784.

Davoine, F., and Lacy, P. (2014). Eosinophil cytokines, chemokines, and growth factors: emerging roles in immunity. *Frontiers in immunology* 5, 570.

Dent, L.A., Munro, G.H., Piper, K.P., Sanderson, C.J., Finlay, D.A., Dempster, R.K., Bignold, L.P.,



Harkin, D.G., and Hagan, P. (1997). Eosinophilic interleukin 5 (IL-5) transgenic mice: eosinophil activity and impaired clearance of *Schistosoma mansoni*. *Parasite immunology* 19, 291-300.

Denzler, K.L., Borchers, M.T., Crosby, J.R., Cieslewicz, G., Hines, E.M., Justice, J.P., Cormier, S.A., Lindenberger, K.A., Song, W., Wu, W., et al. (2001). Extensive eosinophil degranulation and peroxidase-mediated oxidation of airway proteins do not occur in a mouse ovalbumin-challenge model of pulmonary inflammation. *Journal of immunology* 167, 1672-1682.

Denzler, K.L., Farmer, S.C., Crosby, J.R., Borchers, M., Cieslewicz, G., Larson, K.A., Cormier-Regard, S., Lee, N.A., and Lee, J.J. (2000). Eosinophil major basic protein-1 does not contribute to allergen-induced airway pathologies in mouse models of asthma. *Journal of immunology* 165, 5509-5517.

Desreumaux, P., Janin, A., Colombel, J.F., Prin, L., Plumas, J., Emilie, D., Torpier, G., Capron, A., and Capron, M. (1992). Interleukin 5 messenger RNA expression by eosinophils in the intestinal mucosa of patients with coeliac disease. *The Journal of experimental medicine* 175, 293-296.

Domachowske, J.B., Dyer, K.D., Adams, A.G., Leto, T.L., and Rosenberg, H.F. (1998a). Eosinophil cationic protein/RNase 3 is another RNase A-family ribonuclease with direct antiviral activity. *Nucleic acids research* 26, 3358-3363.

Domachowske, J.B., Dyer, K.D., Adams, A.G., Leto, T.L., and Rosenberg, H.F. (1998b). Eosinophil cationic protein/RNase 3 is another RNase A-family ribonuclease with direct antiviral activity. *Nucleic acids research* 26, 3358-3363.

Durack, D.T., Ackerman, S.J., Loegering, D.A., and Gleich, G.J. (1981). Purification of human eosinophil-derived neurotoxin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 78, 5165-5169.

Dvorak, A.M. (1980). Ultrastructural evidence for release of major basic protein-containing crystalline cores of eosinophil granules in vivo: cytotoxic potential in Crohn's disease. *Journal of immunology* 125, 460-462.

Dvorak, A.M., Ackerman, S.J., Furitsu, T., Estrella, P., Letourneau, L., and Ishizaka, T. (1992). Mature eosinophils stimulated to develop in human-cord blood mononuclear cell cultures supplemented with recombinant human interleukin-5. II. Vesicular transport of specific granule matrix peroxidase, a mechanism for effecting piecemeal degranulation. *The American journal of pathology* 140, 795-807.

Dvorak, A.M., Dickersin, G.R., Connell, A., Carey, R.W., and Dvorak, H.F. (1976a). Degranulation mechanisms in human leukemic basophils. *Clinical immunology and immunopathology* 5, 235-246.

Dvorak, A.M., Furitsu, T., Estrella, P., Letourneau, L., Ishizaka, T., and Ackerman, S.J. (1994). Ultrastructural localization of major basic protein in the human eosinophil lineage in vitro. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* 42, 1443-1451.

Dvorak, A.M., Furitsu, T., Letourneau, L., Ishizaka, T., and Ackerman, S.J. (1991). Mature eosinophils stimulated to develop in human cord blood mononuclear cell cultures supplemented with recombinant human interleukin-5. Part I. Piecemeal degranulation of specific granules and



distribution of Charcot-Leyden crystal protein. *The American journal of pathology* 138, 69-82.

Dvorak, A.M., and Ishizaka, T. (1994). Human eosinophils in vitro. An ultrastructural morphology primer. *Histology and histopathology* 9, 339-374.

Dvorak, A.M., Mihm, M.C., Jr., and Dvorak, H.F. (1976b). Degranulation of basophilic leukocytes in allergic contact dermatitis reactions in man. *Journal of immunology* 116, 687-695.

Dvorak, A.M., Mihm, M.C., Jr., Osage, J.E., Kwan, T.H., Austen, K.F., and Wintroub, B.U. (1982). Bullous pemphigoid, an ultrastructural study of the inflammatory response: eosinophil, basophil and mast cell granule changes in multiple biopsies from one patient. *The Journal of investigative dermatology* 78, 91-101.

Dvorak, A.M., Saito, H., Estrella, P., Kissell, S., Arai, N., and Ishizaka, T. (1989). Ultrastructure of eosinophils and basophils stimulated to develop in human cord blood mononuclear cell cultures containing recombinant human interleukin-5 or interleukin-3. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 61, 116-132.

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 (Baltimore, Md. : 1950)* 181, 4004-4009.

Dyer, K.D., Percopo, C.M., Fischer, E.R., Gabryszewski, S.J., and Rosenberg, H.F. (2009a). Pneumoviruses infect eosinophils and elicit MyD88-dependent release of chemoattractant cytokines and interleukin-6. *Blood* 114, 2649-2656.

Dyer, K.D., Percopo, C.M., and Rosenberg, H.F. (2009b). Generation of eosinophils from unselected bone marrow progenitors: wild-type, TLR- and eosinophil-deficient mice. *The open immunology journal* 2, 163-167.

Eda, R., Sugiyama, H., Hopp, R.J., Okada, C., Bewtra, A.K., and Townley, R.G. (1993). Inhibitory effects of formoterol on platelet-activating factor induced eosinophil chemotaxis and degranulation. *International archives of allergy and immunology* 102, 391-398.

Egesten, A., Alumets, J., von Mecklenburg, C., Palmegren, M., and Olsson, I. (1986). Localization of eosinophil cationic protein, major basic protein, and eosinophil peroxidase in human eosinophils by immunoelectron microscopic technique. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* 34, 1399-1403.

Egesten, A., Calafat, J., Knol, E.F., Janssen, H., and Walz, T.M. (1996). Subcellular localization of transforming growth factor-alpha in human eosinophil granulocytes. *Blood* 87, 3910-3918.

Ehrlich, P. (1879). Ueber die spezifischen granulationen des Blutes. *Arch Anat Physiol* 3, 571.

Ehrlich, P. (1891). *Farbenanalytische Untersuchungen zur Histologie und Klinik des Blutes* (A. Hirschwald).

El-Shazly, A.E., and Lefebvre, P.P. (2011). Modulation of NK cell autocrine-induced eosinophil chemotaxis by interleukin-15 and vitamin D(3): a possible NK-eosinophil crosstalk via IL-8 in the pathophysiology of allergic rhinitis. *Mediators of inflammation* 2011, 373589.

Elsner, J., Hochstetter, R., Kimmig, D., and Kapp, A. (1996). Human eotaxin represents a po-



tent activator of the respiratory burst of human eosinophils. *European journal of immunology* 26, 1919-1925.

Erjefält, J.S., Andersson, M., Greiff, L., Korsgren, M., Gizycki, M., Jeffery, P.K., and Persson, C.G.A. Cytolysis and piecemeal degranulation as distinct modes of activation of airway mucosal eosinophils. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 102, 286-294.

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

Erjefält, J.S., Greiff, L., Andersson, M., Matsson, E., Petersen, H., Linden, M., Ansari, T., Jeffery, P.K., and Persson, C.G. (1999). Allergen-induced eosinophil cytolysis is a primary mechanism for granule protein release in human upper airways. *American journal of respiratory and critical care medicine* 160, 304-312.

Esnault, S., and Malter, J.S. (2002). GM-CSF regulation in eosinophils. *ARCHIVUM IMMUNOLOGIAE ET THERAPIAE EXPERIMENTALIS-ENGLISH EDITION-* 50, 121-130.

Fais, S., and Malorni, W. (2003). Leukocyte uropod formation and membrane/cytoskeleton linkage in immune interactions. *Journal of leukocyte biology* 73, 556-563.

FEDORKO, M.E. (1968). Formation of cytoplasmic granules in human eosinophilic myelocytes: an electron microscope autoradiographic study. *Blood* 31, 188-194.

Fedorok, M.E., and Hirsch, J.G. (1966). CYTOPLASMIC GRANULE FORMATION IN MYELOCYTES An Electron Microscope Radioautographic Study on the Mechanism of Formation of Cytoplasmic Granules in Rabbit Heterophilic Myelocytes. *The Journal of cell biology* 29, 307-316.

Ferreira, H.H., Costa, R.A., Jacheta, J.M., Martins, A.R., Medeiros, M.V., Macedo-Soares, M.F., De Luca, I.M., Antunes, E., and De Nucci, G. (2004). Modulation of eosinophil migration from bone marrow to lungs of allergic rats by nitric oxide. *Biochemical pharmacology* 68, 631-639.

Fleetwood, A.J., Cook, A.D., and Hamilton, J.A. (2005). Functions of Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor. 25, 405-428.

Fulkerson, P.C., Schollaert, K.L., Bouffi, C., and Rothenberg, M.E. (2014). IL-5 Triggers a Cooperative Cytokine Network That Promotes Eosinophil Precursor Maturation. *Journal of immunology*.

Gauvreau, G.M., Ellis, A.K., and Denburg, J.A. (2009). Haemopoietic processes in allergic disease: eosinophil/basophil development. *Clinical & Experimental Allergy* 39, 1297-1306.

Gleich, G.J. (2013). Chapter 1 - Historical Overview and Perspective on the Role of the Eosinophil in Health and Disease. In *Eosinophils in Health and Disease*, J.J.L.F. Rosenberg, ed. (Boston: Academic Press), pp. 1-11.

Gleich, G.J., Adolphson, C.R., and Leiferman, K.M. (1993). The biology of the eosinophilic leukocyte. *Annual review of medicine* 44, 85-101.

Gleich, G.J., Loegering, D.A., Bell, M.P., Checkel, J.L., Ackerman, S.J., and McKean, D.J. (1986). Biochemical and functional similarities between human eosinophil-derived neurotoxin and eo-



sinophil cationic protein: homology with ribonuclease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83, 3146-3150.

Gleich, G.J., Loegering, D.A., Kueppers, F., Bajaj, S.P., and Mann, K.G. (1974). Physiochemical and biological properties of the major basic protein from guinea pig eosinophil granules. *The Journal of experimental medicine* 140, 313-332.

Gleich, G.J., Loegering, D.A., and Maldonado, J.E. (1973). Identification of a major basic protein in guinea pig eosinophil granules. *The Journal of experimental medicine* 137, 1459-1471.

Gordon, M.H. (1933). Remarks on HODGKIN'S DISEASE: A PATHOGENIC AGENT IN THE GLANDS, AND ITS APPLICATION IN DIAGNOSIS. *British medical journal* 1, 641-644.

Graf, T. (2002). Differentiation plasticity of hematopoietic cells. *Blood* 99, 3089-3101.

Greiff, L., Erjefalt, J.S., Andersson, M., Svensson, C., and Persson, C.G. (1998). Generation of clusters of free eosinophil granules (Cfegs) in seasonal allergic rhinitis. *Allergy* 53, 200-203.

Hafez, I., Stolpe, A., and Lindau, M. (2003). Compound exocytosis and cumulative fusion in eosinophils. *Journal of Biological Chemistry* 278, 44921-44928.

Hamid, Q., Barkans, J., Meng, Q., Ying, S., Abrams, J.S., Kay, A.B., and Moqbel, R. (1992). Human eosinophils synthesize and secrete interleukin-6, in vitro. *Blood* 80, 1496-1501.

Hamilton, J.A. (2002). GM-CSF in inflammation and autoimmunity. *Trends in immunology* 23, 403-408.

Hartmann, J., Sceppek, S., and Lindau, M. (1995). Regulation of granule size in human and horse eosinophils by number of fusion events among unit granules. *The Journal of physiology* 483, 201-209.

He, M., Ichinose, T., Yoshida, S., Yamamoto, S., Inoue, K., Takano, H., Yanagisawa, R., Nishikawa, M., Mori, I., Sun, G., and Shibamoto, T. (2012). Asian sand dust enhances murine lung inflammation caused by *Klebsiella pneumoniae*. *Toxicology and applied pharmacology* 258, 237 - 247.

Heidemann, S.M., Fiore, M., Sood, S., and Ham, S. (2010). Eosinophil activation in the cerebrospinal fluid of children with shunt obstruction. *Pediatric neurosurgery* 46, 255-258.

Henderson, W.R., and Chi, E.Y. (1985). Ultrastructural characterization and morphometric analysis of human eosinophil degranulation. *Journal of cell science* 73, 33-48.

Henderson, W.R., Chi, E.Y., Jorg, A., and Klebanoff, S.J. (1983). Horse eosinophil degranulation induced by the ionophore A23187. Ultrastructure and role of phospholipase A2. *The American journal of pathology* 111, 341-349.

Henderson, W.R., Jörg, A., and Klebanoff, S.J. (1982). Eosinophil peroxidase-mediated inactivation of leukotrienes B4, C4, and D4. *The Journal of Immunology* 128, 2609-2613.

Hirsch, J.G., and Fedorko, M.E. (1968). ULTRASTRUCTURE OF HUMAN LEUKOCYTES AFTER SIMULTANEOUS FIXATION WITH GLUTARALDEHYDE AND OSMIUM TETROXIDE AND "POSTFIXATION" IN URANYL ACETATE. *The Journal of cell biology* 38, 615-627.



Hogan, S.P., Rosenberg, H.F., Moqbel, R., Phipps, S., Foster, P.S., Lacy, P., Kay, A.B., and Rothenberg, M.E. (2008). Eosinophils: biological properties and role in health and disease. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 38, 709-750.

Hui, C.C., McNagny, K.M., Denburg, J.A., and Siracusa, M.C. (2015). In situ hematopoiesis: a regulator of T2 cytokine-mediated immunity and inflammation at mucosal surfaces. *Mucosal immunology*.

Hung, S.C., Lu, X.A., Lee, J.C., Chang, M.D., Fang, S.L., Fan, T.C., Zulueta, M.M., and Zhong, Y.Q. (2012). Synthesis of heparin oligosaccharides and their interaction with eosinophil-derived neurotoxin. *Organic & biomolecular chemistry* 10, 760-772.

Ilmarinen, P., and Kankaanranta, H. (2014). Eosinophil apoptosis as a therapeutic target in allergic asthma. *Basic & clinical pharmacology & toxicology* 114, 109-117.

Inman, M.D., Ellis, R., Wattie, J., Denburg, J.A., and O'Byrne, P.M. (1999). Allergen-induced increase in airway responsiveness, airway eosinophilia, and bone-marrow eosinophil progenitors in mice. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 21, 473-479.

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

Iwasaki, H., Mizuno, S.-i., Mayfield, R., Shigematsu, H., Arinobu, Y., Seed, B., Gurish, M.F., Takatsu, K., and Akashi, K. (2005). Identification of eosinophil lineage-committed progenitors in the murine bone marrow. *The Journal of experimental medicine* 201, 1891-1897.

Jacobsen, E.A., Doyle, A.D., Colbert, D.C., Zellner, K.R., Protheroe, C.A., LeSuer, W.E., Lee, N.A., and Lee, J.J. (2015). Differential Activation of Airway Eosinophils Induces IL-13 Mediated Allergic Th2 Pulmonary Responses in Mice. *Allergy*, n/a-n/a.

Jonsson, U.B., Blom, K., Stalenheim, G., Hakansson, L.D., and Venge, P. (2014). The production of the eosinophil proteins ECP and EPX/EDN are regulated in a reciprocal manner. *APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica* 122, 283-291.

Jose, P.J., Griffiths-Johnson, D.A., Collins, P.D., Walsh, D.T., Moqbel, R., Totty, N.F., Truong, O., Hsuan, J.J., and Williams, T.J. (1994). Eotaxin: a potent eosinophil chemoattractant cytokine detected in a guinea pig model of allergic airways inflammation. *The Journal of experimental medicine* 179, 881-887.

Jung, J.W., Kang, H.R., Lee, H.S., Park, H.W., Cho, S.H., Min, K.U., and Sohn, S.W. (2014). Expression levels of eosinophil granule protein mRNAs in induced sputum reflect airway hyperresponsiveness and airflow limitation. *The Tohoku journal of experimental medicine* 233, 49-56.

Kambara, T. (1967). [Evaluation of circulating eosinophil and basophil count in the differential therapeutic policy of hyperthyroidism]. *Iryo* 21, 692-696.

Karima, R., Matsumoto, S., Higashi, H., and Matsushima, K. (1999). The molecular pathogenesis of endotoxic shock and organ failure. *Molecular medicine today* 5, 123-132.

Karlsson, A.K., Walles, K., Bladh, H., Connolly, S., Skrinjar, M., and Rosendahl, A. (2011). Small



molecule antagonists of CCR8 inhibit eosinophil and T cell migration. *Biochemical and biophysical research communications* 407, 764-771.

Kawashima, T., Iwamoto, I., Nakagawa, N., Tomioka, H., and Yoshida, S. (1994). Inhibitory Effect of Pemirolast, a Novel Antiallergic Drug, on Leukotriene C4 and Granule Protein Release from Human Eosinophils. *International archives of allergy and immunology* 103, 405-409.

Kay, A.B. (2015). The early history of the eosinophil. *Clinical & Experimental Allergy* 45, 575-582.

Kay, A.B., Phipps, S., and Robinson, D.S. (2004). A role for eosinophils in airway remodelling in asthma. *Trends in Immunology* 25, 477-482.

Kelly-Welch, A., Hanson, E.M., and Keegan, A.D. (2005). Interleukin-13 (IL-13) pathway. *Science Signaling* 2005, cm8-cm8.

Kephart, G.M., Andrade, Z.A., and Gleich, G.J. (1988). Localization of eosinophil major basic protein onto eggs of *Schistosoma mansoni* in human pathologic tissue. *The American journal of pathology* 133, 389-396.

Kephart, G.M., Gleich, G.J., Connor, D.H., Gibson, D.W., and Ackerman, S.J. (1984). Deposition of eosinophil granule major basic protein onto microfilariae of *Onchocerca volvulus* in the skin of patients treated with diethylcarbamazine. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 50, 51-61.

Kobayashi, N., Kayaba, H., Takeda, M., Yamaguchi, K., Chiba, T., Ito, W., and Chihara, J. (2009). Activation of eosinophils by lipopolysaccharide-induced monocyte-derived cytokines. *Allergology International* 58, 103-110.

Korsgren, M., Erjefalt, J.S., Korsgren, O., Sundler, F., and Persson, C.G. (1997). Allergic eosinophil-rich inflammation develops in lungs and airways of B cell-deficient mice. *The Journal of experimental medicine* 185, 885-892.

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

Krug, N., Erpenbeck, V.J., Balke, K., Petschallies, J., Tschernig, T., Hohlfeld, J.M., and Fabel, H. (2001). Cytokine Profile of Bronchoalveolar Lavage-Derived CD4+, CD8+, and  $\gamma\delta$  T Cells in People with Asthma after Segmental Allergen Challenge. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 25, 125-131.

Lacy, P. (2014). 28 days later: eosinophils stop viruses. *Blood* 123, 609-611.

Lacy, P., Mahmudi-Azer, S., Bablitz, B., Hagen, S.C., Velazquez, J.R., Man, S.F., and Moqbel, R. (1999). Rapid mobilization of intracellularly stored RANTES in response to interferon-gamma in human eosinophils. *Blood* 94, 23-32.

Lacy, P., and Moqbel, R. (2000). Eosinophil cytokines. *Chemical immunology* 76, 134-155.

Lacy, P., Rosenberg, H.F., and Walsh, G.M. (2014). Eosinophil overview: structure, biological properties, and key functions. *Methods in molecular biology* 1178, 1-12.



Larangeira, A.P., Silva, A.R., Gomes, R.N., Penido, C., Henriques, M.G., Castro-Faria-Neto, H.C., and Bozza, P.T. (2001). Mechanisms of allergen- and LPS-induced bone marrow eosinophil mobilization and eosinophil accumulation into the pleural cavity: a role for CD11b/CD18 complex. *Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society ... [et al.]* 50, 309-316.

Lee, J.J., Jacobsen, E.A., Ochkur, S.I., McGarry, M.P., Condjella, R.M., Doyle, A.D., Luo, H., Zellner, K.R., Protheroe, C.A., Willetts, L., et al. (2012). Human versus mouse eosinophils: "that which we call an eosinophil, by any other name would stain as red". *The Journal of allergy and clinical immunology* 130, 572-584.

Lee, J.J., and Rosenberg, H.F. (2012). *Eosinophils in health and disease* (Academic Press).

Levi-Schaffer, F., Barkans, J., Newman, T.M., Ying, S., Wakelin, M., Hohenstein, R., Barak, V., Lacy, P., Kay, A.B., and Moqbel, R. (1996). Identification of interleukin-2 in human peripheral blood eosinophils. *Immunology* 87, 155-161.

Levi-Schaffer, F., Garbuzenko, E., Rubin, A., Reich, R., Pickholz, D., Gillery, P., Emonard, H., Nagler, A., and Maquart, F.A.X. (1999). Human eosinophils regulate human lung- and skin-derived fibroblast properties in vitro: a role for transforming growth factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ). *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96, 9660-9665.

Levi-Schaffer, F., Lacy, P., Severs, N.J., Newman, T.M., North, J., Gomperts, B., Kay, A.B., and Moqbel, R. (1995). Association of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor with the crystalloid granules of human eosinophils. *Blood* 85, 2579-2586.

Lilly, L.M., Scopel, M., Nelson, M.P., Burg, A.R., Dunaway, C.W., and Steele, C. (2014). Eosinophil deficiency compromises lung defense against *Aspergillus fumigatus*. *Infection and immunity* 82, 1315-1325.

Liu, L.Y., Wang, H., Xenakis, J.J., and Spencer, L.A. (2015). Notch signaling mediates granulocyte-macrophage colony-stimulating factor priming-induced transendothelial migration of human eosinophils. *Allergy*.

Locksley, R.M., Wilson, C.B., and Klebanoff, S.J. (1982). Role for endogenous and acquired peroxidase in the toxoplasmicidal activity of murine and human mononuclear phagocytes. *Journal of Clinical Investigation* 69, 1099.

Logan, M.R., Lacy, P., Bablitz, B., and Moqbel, R. (2002). Expression of eosinophil target SNAREs as potential cognate receptors for vesicle-associated membrane protein-2 in exocytosis. *The Journal of allergy and clinical immunology* 109, 299-306.

Macias, M.P., Welch, K.C., Denzler, K.L., Larson, K.A., Lee, N.A., and Lee, J.J. (2000). Identification of a new murine eosinophil major basic protein (mMBP) gene: cloning and characterization of mMBP-2. *Journal of leukocyte biology* 67, 567-576.

Maddox, D.E., Kephart, G.M., Coulam, C.B., Butterfield, J.H., Benirschke, K., and Gleich, G.J. (1984). Localization of a molecule immunochemically similar to eosinophil major basic protein in human placenta. *The Journal of experimental medicine* 160, 29-41.

Malm-Erfjält, M., Persson, C.G.A., and Erfjält, J.S. (2001). Degranulation Status of Airway



Tissue Eosinophils in Mouse Models of Allergic Airway Inflammation. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 24, 352-359.

Maltby, S., Wohlfarth, C., Gold, M., Zbytnuik, L., Hughes, M.R., and McNagny, K.M. (2010). CD34 Is Required for Infiltration of Eosinophils into the Colon and Pathology Associated with DSS-Induced Ulcerative Colitis. *The American journal of pathology* 177, 1244-1254.

Matsuura, M. (2013). Structural Modifications of Bacterial Lipopolysaccharide that Facilitate Gram-Negative Bacteria Evasion of Host Innate Immunity. *Frontiers in immunology* 4, 109.

McLaren, D.J., Mackenzie, C.D., and Ramalho-Pinto, F.J. (1977). Ultrastructural observations on the in vitro interaction between rat eosinophils and some parasitic helminths (*Schistosoma mansoni*, *Trichinella spiralis* and *Nippostrongylus brasiliensis*). *Clinical and experimental immunology* 30, 105-118.

McNagny, K.M., Sieweke, M.H., Doderlein, G., Graf, T., and Nerlov, C. (1998). Regulation of eosinophil-specific gene expression by a C/EBP-Ets complex and GATA-1. *The EMBO journal* 17, 3669-3680.

Mei, Q., Korsgren, M., Erjefalt, J.S., and Sundler, F. (2002). Eosinophil infiltration and activation at the gastric ulcer margin in rats. *European journal of gastroenterology & hepatology* 14, 503-511.

Melo, R.C., Dvorak, A.M., and Weller, P.F. (2010). Contributions of electron microscopy to understand secretion of immune mediators by human eosinophils. *Microscopy and microanalysis: the official journal of Microscopy Society of America, Microbeam Analysis Society, Microscopical Society of Canada* 16, 653-660.

Melo, R.C., Liu, L., Xenakis, J.J., and Spencer, L.A. (2013). Eosinophil-derived cytokines in health and disease: unraveling novel mechanisms of selective secretion. *Allergy* 68, 274-284.

Melo, R.C., Morgan, E., Monahan-Earley, R., Dvorak, A.M., and Weller, P.F. (2014). Pre-embedding immunogold labeling to optimize protein localization at subcellular compartments and membrane microdomains of leukocytes. *Nature protocols* 9, 2382-2394.

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

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

Melo, R.C., Spencer, L.A., Perez, S.A., Ghiran, I., Dvorak, A.M., and Weller, P.F. (2005b). Human eosinophils secrete preformed, granule-stored interleukin-4 through distinct vesicular compartments. *Traffic* 6, 1047-1057.

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

Melo, R.C., and Weller, P.F. (2010a). Piecemeal degranulation in human eosinophils: a dis-



tinct secretion mechanism underlying inflammatory responses. *Histology and histopathology* 25, 1341-1354.

Melo, R.C., Weller, P.F., and Dvorak, A.M. (2005c). Activated human eosinophils. *International archives of allergy and immunology* 138, 347-349.

Melo, R.C.N., and Weller, P.F. (2010b). Piecemeal degranulation in human eosinophils: a distinct secretion mechanism underlying inflammatory responses. *Histology and histopathology* 25, 1341-1354.

Meng, Q., Ying, S., Corrigan, C.J., Wakelin, M., Assoufi, B., Moqbel, R., and Kay, A.B. (1997). Effects of rapamycin, cyclosporin A, and dexamethasone on interleukin 5 induced eosinophil degranulation and prolonged survival. *Allergy* 52, 1095-1101.

Miller, F., de Harven, E., and Palade, G.E. (1966). The structure of eosinophil leukocyte granules in rodents and in man. *The Journal of cell biology* 31, 349-362.

Minshall, E.M., Leung, D.Y.M., Martin, R.J., Song, Y.L., Cameron, L., Ernst, P., and Hamid, Q. (1997). Eosinophil-associated TGF- $\beta$ 1 mRNA expression and airways fibrosis in bronchial asthma. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 17, 326-333.

Moller, G.M., de Jong, T.A., Overbeek, S.E., van der Kwast, T.H., Postma, D.S., and Hoogsteden, H.C. (1996a). Ultrastructural immunogold localization of interleukin 5 to the crystalloid core compartment of eosinophil secondary granules in patients with atopic asthma. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* 44, 67-69.

Moller, G.M., de Jong, T.A., van der Kwast, T.H., Overbeek, S.E., Wierenga-Wolf, A.F., Thepen, T., and Hoogsteden, H.C. (1996b). Immunolocalization of interleukin-4 in eosinophils in the bronchial mucosa of atopic asthmatics. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 14, 439-443.

Moqbel, R., Ying, S., Barkans, J., Newman, T.M., Kimmitt, P., Wakelin, M., Taborda-Barata, L., Meng, Q., Corrigan, C.J., Durham, S.R., and Kay, A.B. (1995). Identification of messenger RNA for IL-4 in human eosinophils with granule localization and release of the translated product. *Journal of immunology* 155, 4939-4947.

Mori, Y., Iwasaki, H., Kohno, K., Yoshimoto, G., Kikushige, Y., Okeda, A., Uike, N., Niino, H., Takenaka, K., and Nagafuji, K. (2009). Identification of the human eosinophil lineage-committed progenitor: revision of phenotypic definition of the human common myeloid progenitor. *The Journal of experimental medicine* 206, 183-193.

Nakajima, T., Yamada, H., Iikura, M., Miyamasu, M., Izumi, S., Shida, H., Ohta, K., Imai, T., Yoshie, O., Mochizuki, M., et al. (1998). Intracellular localization and release of eotaxin from normal eosinophils. *FEBS letters* 434, 226-230.

Neves, J.S., Perez, S.A., Spencer, L.A., Melo, R.C., Reynolds, L., Ghiran, I., Mahmudi-Azer, S., Odemuyiwa, S.O., Dvorak, A.M., Moqbel, R., and Weller, P.F. (2008). Eosinophil granules function extracellularly as receptor-mediated secretory organelles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 18478-18483.

Neves, J.S., and Weller, P.F. (2009). Functional extracellular eosinophil granules: novel impli-



cations in eosinophil immunobiology. *Current opinion in immunology* 21, 694-699.

Newton, D.L., Nicholls, P.J., Rybak, S.M., and Youle, R.J. (1994). Expression and characterization of recombinant human eosinophil-derived neurotoxin and eosinophil-derived neurotoxin-anti-transferrin receptor sFv. *Journal of Biological Chemistry* 269, 26739-26745.

Olsson, I., Venge, P., Spitznagel, J., and Lehrer, R. (1977). Arginine-rich cationic proteins of human eosinophil granules: comparison of the constituents of eosinophilic and neutrophilic leukocytes. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 36, 493-500.

Park, M.K., Myers, R.A.M., and Marzella, L. (1992). Oxygen tensions and infections: modulation of microbial growth, activity of antimicrobial agents, and immunologic responses. *Clinical infectious diseases* 14, 720-740.

Park, S.Y., Oh, S., Kim, E.J., Yoon, S.Y., Park, H.S., Yoon, H.S., and Cho, S. (2014). Utility of eosinophil cationic protein levels in the diagnosis of intrinsic atopic dermatitis. *Acta dermato-venereologica* 94, 333-334.

Patkowski, J., Wytrychowski, K., and Medrala, W. (1997). Eosinophil cationic protein in serum of corticosteroid-sensitive and resistant bronchial asthma. *Archivum immunologiae et therapiae experimentalis* 45, 195-200.

Patricia, M.R.S., Daniele, M.S., Patricia, G.T., Ana Carolina, S.A., Tatiana Paula, T.F., Ana Lucia, A.P., Roderick, F., Mauro, P., and Marco Aurelio, M. (2012). Effect Of Annexin-1 Derived Peptide Ac2-26 On Allergic Lung Inflammation In Mice. In B37. NEW INSIGHTS INTO ASTHMA AND COPD TREATMENT (American Thoracic Society), pp. A2860-A2860.

Pease, J.E., Weller, C.L., and Williams, T.J. (2004). Regulation of eosinophil trafficking in asthma and allergy. *Ernst Schering Research Foundation workshop*, 85-100.

Pégorier, S., Wagner, L.A., Gleich, G.J., and Pretolani, M. (2006). Eosinophil-Derived Cationic Proteins Activate the Synthesis of Remodeling Factors by Airway Epithelial Cells. *The Journal of Immunology* 177, 4861-4869.

Penido, C., Castro-Faria-Neto, H.C., Vieira-de-Abreu, A., Figueiredo, R.T., Pelled, A., Martins, M.A., Jose, P.J., Williams, T.J., and Bozza, P.T. (2001). LPS induces eosinophil migration via CCR3 signaling through a mechanism independent of RANTES and Eotaxin. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 25, 707-716.

Percopo, C.M., Dyer, K.D., Ochkur, S.I., Luo, J.L., Fischer, E.R., Lee, J.J., Lee, N.A., Domachowske, J.B., and Rosenberg, H.F. (2014). Activated mouse eosinophils protect against lethal respiratory virus infection. *Blood* 123, 743-752.

Persson, C.G. (1997). Eosinophil lysis and plasma extravasation. *The European respiratory journal* 10, 2438-2439.

Persson, C.G., and Erjefalt, J.S. (1997a). Eosinophil lysis and free granules: an in vivo paradigm for cell activation and drug development. *Trends in pharmacological sciences* 18, 117-123.

Persson, C.G., and Erjefalt, J.S. (1997b). "Ultimate activation" of eosinophils in vivo: lysis and release of clusters of free eosinophil granules (Cfegs). *Thorax* 52, 569-574.



Persson, C.G., and Erjefält, J.S. (1997). Eosinophil lysis and free granules: an *in vivo* paradigm for cell activation and drug development. *Trends in pharmacological sciences* 18, 117-123.

Peters, M.S., Rodriguez, M., and Gleich, G.J. (1986). Localization of human eosinophil granule major basic protein, eosinophil cationic protein, and eosinophil-derived neurotoxin by immunoelectron microscopy. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 54, 656-662.

Plager, D.A., Davis, M.D., Andrews, A.G., Coenen, M.J., George, T.J., Gleich, G.J., and Leiferman, K.M. (2009). Eosinophil ribonucleases and their cutaneous lesion-forming activity. *Journal of immunology* 183, 4013-4020.

Plager, D.A., Loegering, D.A., Weiler, D.A., Checkel, J.L., Wagner, J.M., Clarke, N.J., Naylor, S., Page, S.M., Thomas, L.L., Akerblom, I., et al. (1999). A novel and highly divergent homolog of human eosinophil granule major basic protein. *The Journal of biological chemistry* 274, 14464-14473.

Plager, D.A., Stuart, S., and Gleich, G.J. (1998). Human eosinophil granule major basic protein and its novel homolog. *Allergy* 53, 33-40.

Plötz, S.G., Lentschat, A., Behrendt, H., Plötz, W., Hamann, L., Ring, J., Rietschel, E.T., Flad, H.-D., and Ulmer, A.J. (2001). The interaction of human peripheral blood eosinophils with bacterial lipopolysaccharide is CD14 dependent. *Blood* 97, 235-241.

Ponath, P.D., Qin, S., Ringler, D.J., Clark-Lewis, I., Wang, J., Kassam, N., Smith, H., Shi, X., Gonzalo, J.-A., and Newman, W. (1996). Cloning of the human eosinophil chemoattractant, eotaxin. Expression, receptor binding, and functional properties suggest a mechanism for the selective recruitment of eosinophils. *Journal of Clinical Investigation* 97, 604.

Proust, B., Ruffie, C., Lefort, J., and Vargaftig, B.B. (2002). Bronchopulmonary hyperreactivity and lung eosinophil sequestration but not their migration to the alveolar compartment are independent of interleukin-5 in allergic mice. *European cytokine network* 13, 340-349.

Pulido, D., Torrent, M., Andreu, D., Nogues, M.V., and Boix, E. (2013). Two human host defense ribonucleases against mycobacteria, the eosinophil cationic protein (RNase 3) and RNase 7. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 57, 3797-3805.

Puxeddu, I., Lack, G., Smith, S.J., and Levi-Schaffer, F. (2004). Reduced eosinophil pro-fibrogenic effect in severe childhood asthma compared to mild disease: an effect of corticosteroids? *Pediatric pulmonology* 38, 222-228.

Radke, A.L., Reynolds, L.E., Melo, R.C., Dvorak, A.M., Weller, P.F., and Spencer, L.A. (2009). Mature human eosinophils express functional Notch ligands mediating eosinophil autocrine regulation. *Blood* 113, 3092-3101.

Ramarokoto, C.E., Kildemoes, A.O., Randrianasolo, B.S., Ravoniarimbina, P., Ravaoalimalala, V.E., Leutscher, P., Kjetland, E.F., and Vennervald, B.J. (2014). Eosinophil granule proteins ECP and EPX as markers for a potential early-stage inflammatory lesion in female genital schistosomiasis (FGS). *PLoS neglected tropical diseases* 8, e2974.



Reece, P., Baatjes, A.J., Cyr, M.M., Sehmi, R., and Denburg, J.A. (2013). Toll-like receptor-mediated eosinophil-basophil differentiation: autocrine signalling by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in cord blood haematopoietic progenitors. *Immunology* 139, 256-264.

Reece, P., Gauvreau, G.M., Sehmi, R., and Denburg, J.A. (2014). IL-4 and IL-13 differentially regulate TLR-induced eosinophil-basophil differentiation of cord blood CD34+ progenitor cells. *PLoS one* 9, e100734.

Reis, A.C., Alessandri, A.L., Athayde, R.M., Perez, D.A., Vago, J.P., Avila, T.V., Ferreira, T.P.T., de Arantes, A.C., de Sa Coutinho, D., Rachid, M.A., et al. (2015). Induction of eosinophil apoptosis by hydrogen peroxide promotes the resolution of allergic inflammation. *Cell Death Dis* 6, e1632.

Ren, Y., Ichinose, T., He, M., Song, Y., Yoshida, Y., Yoshida, S., Nishikawa, M., Takano, H., Sun, G., and Shibamoto, T. (2014). Enhancement of OVA-induced murine lung eosinophilia by co-exposure to contamination levels of LPS in Asian sand dust and heated dust. *Allergy, Asthma & Clinical Immunology* 10, 30.

Rosenberg, H.F. (1998). The eosinophil ribonucleases. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 54, 795-803.

Rosenberg, H.F. (2008). Eosinophil-derived neurotoxin / RNase 2: connecting the past, the present and the future. *Current pharmaceutical biotechnology* 9, 135-140.

Rosenberg, H.F., Dyer, K.D., and Foster, P.S. (2013). Eosinophils: changing perspectives in health and disease. *Nature Reviews Immunology* 13, 9-22.

Rosenberg, H.F., Phipps, S., and Foster, P.S. (2007). Eosinophil trafficking in allergy and asthma. *The Journal of allergy and clinical immunology* 119, 1303-1310; quiz 1311-1302.

Rosenwasser, L.J., Zimmermann, N., Hershey, G.K., Foster, P.S., and Rothenberg, M.E. Chemokines in asthma: Cooperative interaction between chemokines and IL-13. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 111, 227-242.

Ross, R., and Klebanoff, S.J. (1966). THE EOSINOPHILIC LEUKOCYTE : FINE STRUCTURE STUDIES OF CHANGES IN THE UTERUS DURING THE ESTROUS CYCLE. *The Journal of experimental medicine* 124, 653-660.

Roth, J., Bendayan, M., and Orci, L. (1978). Ultrastructural localization of intracellular antigens by the use of protein A-gold complex. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 26, 1074-1081.

Rothenberg, M.E., and Hogan, S.P. (2006). The eosinophil. *Annual review of immunology* 24, 147-174.

Saffari, H., Hoffman, L.H., Peterson, K.A., Fang, J.C., Leiferman, K.M., Pease, L.F., 3rd, and Gleich, G.J. (2014). Electron microscopy elucidates eosinophil degranulation patterns in patients with eosinophilic esophagitis. *The Journal of allergy and clinical immunology* 133, 1728-1734 e1721.

Samarasinghe, A.E., Woolard, S.N., Boyd, K.L., Hoselton, S.A., Schuh, J.M., and McCullers, J.A. (2014). The immune profile associated with acute allergic asthma accelerates clearance of influenza virus. *Immunology and cell biology* 92, 449-459.



Sanchez, D., Moussaoui, M., Carreras, E., Torrent, M., Nogues, V., and Boix, E. (2011). Mapping the eosinophil cationic protein antimicrobial activity by chemical and enzymatic cleavage. *Biochimie* 93, 331-338.

Seeman, P.M., and Palade, G.E. (1967). ACID PHOSPHATASE LOCALIZATION IN RABBIT EOSINOPHILS. *The Journal of cell biology* 34, 745-756.

Sehmi, R., Wood, L.J., Watson, R., Foley, R., Hamid, Q., O'Byrne, P.M., and Denburg, J.A. (1997). Allergen-induced increases in IL-5 receptor alpha-subunit expression on bone marrow-derived CD34+ cells from asthmatic subjects. A novel marker of progenitor cell commitment towards eosinophilic differentiation. *Journal of Clinical Investigation* 100, 2466.

Shalit, M., Sekhsaria, S., and Malech, H.L. (1995). Modulation of growth and differentiation of eosinophils from human peripheral blood CD34+ cells by IL5 and other growth factors. *Cellular immunology* 160, 50-57.

Shamri, R., Melo, R.C., Young, K.M., Bivas-Benita, M., Xenakis, J.J., Spencer, L.A., and Weller, P.F. (2012). CCL11 elicits secretion of RNases from mouse eosinophils and their cell-free granules. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 26, 2084-2093.

Shamri, R., Xenakis, J.J., and Spencer, L.A. (2011). Eosinophils in innate immunity: an evolving story. *Cell and tissue research* 343, 57-83.

Shamri, R., Young, K.M., and Weller, P.F. (2013). PI3K, ERK, p38 MAPK and integrins regulate CCR3-mediated secretion of mouse and human eosinophil-associated RNases. *Allergy* 68, 880-889.

Shannon, J., Ernst, P., Yamauchi, Y., Olivenstein, R., Lemiere, C., Foley, S., Cicora, L., Ludwig, M., Hamid, Q., and Martin, J.G. (2008). Differences in airway cytokine profile in severe asthma compared to moderate asthma. *CHEST Journal* 133, 420-426.

Shimura, E., Shibui, A., Narushima, S., Nambu, A., Yamaguchi, S., Akitsu, A., Leonard, W.J., Iwakura, Y., Matsumoto, K., Suto, H., et al. (2014a). Potential role of myeloid cell/eosinophil-derived IL-17 in LPS-induced endotoxin shock. *Biochemical and biophysical research communications* 453, 1-6.

Shimura, E., Shibui, A., Narushima, S., Nambu, A., Yamaguchi, S., Akitsu, A., Leonard, W.J., Iwakura, Y., Matsumoto, K., Suto, H., et al. (2014b). Potential role of myeloid cell/eosinophil-derived IL-17 in LPS-induced endotoxin shock. *Biochemical and biophysical research communications*.

Spencer, L.A., Bonjour, K., Melo, R.C., and Weller, P.F. (2014). Eosinophil secretion of granule-derived cytokines. *Frontiers in immunology* 5, 496.

Spencer, L.A., Melo, R.C., Perez, S.A., Bafford, S.P., Dvorak, A.M., and Weller, P.F. (2006). Cytokine receptor-mediated trafficking of preformed IL-4 in eosinophils identifies an innate immune mechanism of cytokine secretion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 3333-3338.

Spencer, L.A., Szela, C.T., Perez, S.A., Kirchhoffer, C.L., Neves, J.S., Radke, A.L., and Weller, P.F.



(2009). Human eosinophils constitutively express multiple Th1, Th2, and immunoregulatory cytokines that are secreted rapidly and differentially. *Journal of leukocyte biology* 85, 117-123.

Spry, C.J., Tai, P.C., and Barkans, J. (1985). Tissue localization of human eosinophil cationic proteins in allergic diseases. *International archives of allergy and applied immunology* 77, 252-254.

Stolarski, B., Kurowska-Stolarska, M., Kewin, P., Xu, D., and Liew, F.Y. (2010). IL-33 exacerbates eosinophil-mediated airway inflammation. *Journal of immunology* 185, 3472-3480.

Tai, P.-C., Spry, C.J.F., Peterson, C., Venge, P., and Olsson, I. (1984). Monoclonal antibodies distinguish between storage and secreted forms of eosinophil cationic protein. *Nature* 309, 182-184.

Tedeschi, A., Marzano, A.V., Lorini, M., Balice, Y., and Cugno, M. (2014). Eosinophil cationic protein levels parallel coagulation activation in the blister fluid of patients with bullous pemphigoid. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology : JEADV*.

Tenscher, K., Metzner, B., Schopf, E., Norgauer, J., and Czech, W. (1996). Recombinant human eotaxin induces oxygen radical production, Ca(2+)-mobilization, actin reorganization, and CD11b upregulation in human eosinophils via a pertussis toxin-sensitive heterotrimeric guanine nucleotide-binding protein. *Blood* 88, 3195-3199.

Todd, R., Donoff, B.R., Chiang, T., Chou, M.Y., Elovic, A., Gallagher, G.T., and Wong, D.T. (1991). The eosinophil as a cellular source of transforming growth factor alpha in healing cutaneous wounds. *The American journal of pathology* 138, 1307.

Tomassini, M., Tscopoulos, A., Tai, P.C., Gruart, V., Tonnel, A.-B., Prin, L., Capron, A., and Capron, M. (1991). Release of granule proteins by eosinophils from allergic and nonallergic patients with eosinophilia on immunoglobulin-dependent activation. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 88, 365-375.

Topic, R.Z., and Dodig, S. (2011). Eosinophil cationic protein--current concepts and controversies. *Biochemia medica* 21, 111-121.

Torrent, M., de la Torre, B.G., Nogues, V.M., Andreu, D., and Boix, E. (2009). Bactericidal and membrane disruption activities of the eosinophil cationic protein are largely retained in an N-terminal fragment. *The Biochemical journal* 421, 425-434.

Torrent, M., Navarro, S., Moussaoui, M., Nogues, M.V., and Boix, E. (2008). Eosinophil cationic protein high-affinity binding to bacteria-wall lipopolysaccharides and peptidoglycans. *Biochemistry* 47, 3544-3555.

Ueki, S., Melo, R.C., Ghiran, I., Spencer, L.A., Dvorak, A.M., and Weller, P.F. (2013). Eosinophil extracellular DNA trap cell death mediates lytic release of free secretion-competent eosinophil granules in humans. *Blood* 121, 2074-2083.

Uhm, T.G., Kim, B.S., and Chung, I.Y. (2012). Eosinophil Development, Regulation of Eosinophil-Specific Genes, and Role of Eosinophils in the Pathogenesis of Asthma. *Allergy, asthma & immunology research* 4, 68-79.

Urban, J.F., Noben-Trauth, N., Donaldson, D.D., Madden, K.B., Morris, S.C., Collins, M., and Fin-



kelman, F.D. (1998). IL-13, IL-4R $\alpha$ , and Stat6 are required for the expulsion of the gastrointestinal nematode parasite *Nippostrongylus brasiliensis*. *Immunity* 8, 255-264.

Varga, S.M., Beckman, N.A., Chu, M., and Braciale, T.J. (2002). Sensitive detection and quantitation of mouse eosinophils in tissues using an enzymatic eosinophil peroxidase assay: its use to rapidly measure pulmonary eosinophilia during experimental respiratory syncytial virus infection of mice. *Journal of immunological methods* 262, 111-120.

Venge, P., and Bystrom, J. (1998). Eosinophil cationic protein (ECP). *The international journal of biochemistry & cell biology* 30, 433-437.

Venge, P., Bystrom, J., Carlson, M., Hakansson, L., Karawaczyk, M., Peterson, C., Seveus, L., and Trulsson, A. (1999). Eosinophil cationic protein (ECP): molecular and biological properties and the use of ECP as a marker of eosinophil activation in disease. *Clinical and experimental allergy: journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 29, 1172-1186.

Vicario, M., Guilarte, M., Alonso, C., Yang, P., Martínez, C., Ramos, L., Lobo, B., González, A., Guilà, M., Pigrau, M., et al. (2010). Chronological assessment of mast cell-mediated gut dysfunction and mucosal inflammation in a rat model of chronic psychosocial stress. *Brain, Behavior, and Immunity* 24, 1166-1175.

Voehringer, D., Van Rooijen, N., and Locksley, R.M. (2007). Eosinophils develop in distinct stages and are recruited to peripheral sites by alternatively activated macrophages. *Journal of leukocyte biology* 81, 1434-1444.

Wang, H.-B., Ghiran, I., Matthaei, K., and Weller, P.F. (2007). Airway Eosinophils: Allergic Inflammation Recruited Professional Antigen-Presenting Cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 179, 7585-7592.

Watanabe, Y. (1957). Observations of white blood cells with electron microscope. *Journal of Electron Microscopy* 5, 46-57.

Weiler, C.R., Kita, H., Hukee, M., and Gleich, G.J. (1996). Eosinophil viability during immunoglobulin-induced degranulation. *Journal of leukocyte biology* 60, 493-501.

Wetzel, B.K., Spicer, S.S., and Horn, R.G. (1967). FINE STRUCTURAL LOCALIZATION OF ACID AND ALKALINE PHOSPHATASES IN CELLS OF RABBIT BLOOD AND BONE MARROW. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 15, 311-334.

Willetts, L., Ochkur, S.I., Jacobsen, E.A., Lee, J.J., and Lacy, P. (2014). Eosinophil shape change and secretion. *Methods in molecular biology* 1178, 111-128.

Williams, T.J. (2015). Eotaxin-1 (CCL11). *Frontiers in immunology* 6.

Wills-Karp, M., Luyimbazi, J., Xu, X., Schofield, B., Neben, T.Y., Karp, C.L., and Donaldson, D.D. (1998). Interleukin-13: central mediator of allergic asthma. *Science* 282, 2258-2261.

Wills Karp, M. (2004). Interleukin 13 in asthma pathogenesis. *Immunological reviews* 202, 175-190.

Woerly, G., Lacy, P., Younes, A.B., Roger, N., Loiseau, S., Moqbel, R., and Capron, M. (2002). Human eosinophils express and release IL-13 following CD28-dependent activation. *Journal of*



leukocyte biology 72, 769-779.

Wood, L.J., Inman, M.D., Watson, R.M., Foley, R., Denburg, J.A., and O'Byrne, P.M. (1998). Changes in bone marrow inflammatory cell progenitors after inhaled allergen in asthmatic subjects. *American journal of respiratory and critical care medicine* 157, 99-105.

Woschnagg, C., Rubin, J., and Venge, P. (2009). Eosinophil cationic protein (ECP) is processed during secretion. *Journal of immunology* 183, 3949-3954.

Wynn, T.A. (2011). Integrating mechanisms of pulmonary fibrosis. *The Journal of experimental medicine* 208, 1339-1350.

Xisto, D.G., Farias, L.L., Ferreira, H.C., Picanço, M.R., Amitrano, D., Lapa e Silva, J.R., Negri, E.M., Mauad, T., Carnielli, D., Silva, L.F.F., et al. (2005). Lung Parenchyma Remodeling in a Murine Model of Chronic Allergic Inflammation. *American journal of respiratory and critical care medicine* 171, 829-837.

Yamaguchi, T., Kimura, H., Kurabayashi, M., Kozawa, K., and Kato, M. (2008). Interferon-gamma enhances human eosinophil effector functions induced by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor or interleukin-5. *Immunology letters* 118, 88-95.

Yamaguchi, Y., Suda, T., Suda, J., Eguchi, M., Miura, Y., Harada, N., Tominaga, A., and Takatsu, K. (1988). Purified interleukin 5 supports the terminal differentiation and proliferation of murine eosinophilic precursors. *The Journal of experimental medicine* 167, 43-56.

Yamaya, M. (2012). Virus infection-induced bronchial asthma exacerbation. *Pulmonary medicine* 2012, 834826.

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

Zhang, S., Mohammed, Q., Burbidge, A., Morland, C.M., and Roche, W.R. (1996). Cell cultures from bronchial subepithelial myofibroblasts enhance eosinophil survival in vitro. *The European respiratory journal* 9, 1839-1846.

Zheng, T., Zhu, Z., Wang, Z., Homer, R.J., Ma, B., Riese Jr, R.J., Chapman Jr, H.A., Shapiro, S.D., and Elias, J.A. (2000). Inducible targeting of IL-13 to the adult lung causes matrix metalloproteinase- and cathepsin-dependent emphysema. *Journal of Clinical Investigation* 106, 1081.

Zimmermann, N., Hogan, S.P., Mishra, A., Brandt, E.B., Bodette, T.R., Pope, S.M., Finkelman, F.D., and Rothenberg, M.E. (2000). Murine eotaxin-2: a constitutive eosinophil chemokine induced by allergen challenge and IL-4 overexpression. *Journal of immunology* 165, 5839-5846.



**ANEXO**



## 1. Artigo 1- Eosinophil secretion of granule-derived cytokines.

frontiers in  
IMMUNOLOGY

REVIEW ARTICLE  
published: 27 October 2014  
doi: 10.3389/fimmu.2014.00496



# Eosinophil secretion of granule-derived cytokines

Lisa A. Spencer<sup>1</sup>, Kennedy Bonjour<sup>2</sup>, Rossana C. N. Melo<sup>2†</sup> and Peter F. Weller<sup>1\*†</sup>

<sup>1</sup> Department of Medicine, Beth Israel Deaconess Medical Center, Harvard Medical School, Boston, MA, USA

<sup>2</sup> Laboratory of Cellular Biology, Department of Biology, Federal University of Juiz de Fora (UFJF), Juiz de Fora, Brazil

### Edited by:

Paige Lacy, University of Alberta, Canada

### Reviewed by:

Roma Sehmi, McMaster University, Canada

Nives Zimmermann, Cincinnati Children's Hospital, USA

### \*Correspondence:

Peter F. Weller, 330 Brookline Avenue, E/CLS Rm 940, Boston, MA 02215, USA

e-mail: pweller@bidmc.harvard.edu

<sup>†</sup>Rossana C. N. Melo and Peter F. Weller have contributed equally to this work.

Eosinophils are tissue-dwelling leukocytes, present in the thymus, and gastrointestinal and genitourinary tracts of healthy individuals at baseline, and recruited, often in large numbers, to allergic inflammatory foci and sites of active tissue repair. The biological significance of eosinophils is vast and varied. In health, eosinophils support uterine and mammary gland development, and maintain bone marrow plasma cells and adipose tissue alternatively activated macrophages, while in response to tissue insult eosinophils function as inflammatory effector cells, and, in the wake of an inflammatory response, promote tissue regeneration, and wound healing. One common mechanism driving many of the diverse eosinophil functions is the regulated and differential secretion of a vast array of eosinophil-derived cytokines. Eosinophils are distinguished from most other leukocytes in that many, if not all, of the over three dozen eosinophil-derived cytokines are pre-synthesized and stored within intracellular granules, poised for very rapid, stimulus-induced secretion. Eosinophils engaged in cytokine secretion *in situ* utilize distinct pathways of cytokine release that include classical exocytosis, whereby granules themselves fuse with the plasma membrane and release their entire contents extracellularly; piecemeal degranulation, whereby granule-derived cytokines are selectively mobilized into vesicles that emerge from granules, traverse the cytoplasm and fuse with the plasma membrane to release discrete packets of cytokines; and eosinophil cytolysis, whereby intact granules are extruded from eosinophils, and deposited within tissues. In this latter scenario, extracellular granules can themselves function as stimulus-responsive secretory-competent organelles within the tissue. Here, we review the distinctive processes of differential secretion of eosinophil granule-derived cytokines.

**Keywords:** secretion, eosinophil, granule, degranulation, piecemeal degranulation, cytolysis, cytokine

## INTRODUCTION

### EOSINOPHILS ARE DISTINGUISHED BY THEIR EOSIN-LOVING SPECIFIC GRANULES

Paul Ehrlich's discovery of eosinophils in 1879 was based on the distinctive "eosin-loving" property of eosinophil intracellular granules. The characteristic dark pink punctate staining seen in standard hematoxylin and eosin (H&E) preparations is due to the high cationic protein content of eosinophil granules reacting with the acid dye eosin (1). The most abundant (and most cationic) of the eosinophil granule-derived proteins is major basic protein (MBP), and it is MBP that forms the crystalline lattice structure of the eosinophil granule core, an identifying ultrastructural feature of eosinophils (Figure 1). Eosinophils store their hydrolytic enzymes and cationic granule proteins, including MBP, eosinophil cationic protein (ECP), eosinophil peroxidase (EPO), and eosinophil-derived neurotoxin (EDN), within the core and surrounding matrix of eosinophil specific granules (Figure 1), and it has been long appreciated that secretion of these granule-derived proteins can exert toxic effects on parasites, microbes, and host tissue cells [reviewed in Ref. (2)].

More recently appreciated is that in addition to cationic proteins and hydrolytic enzymes, eosinophils are sources of numerous (over three dozen identified to date) cytokines and chemokines,

with a range of biological functions (3, 4). It is now recognized that along with the cationic proteins, many, if not all, of these cytokines are stored within eosinophil specific granules, available for very rapid secretion without the need for *de novo* synthesis (5). A recent study demonstrated co-expression of at least seven immunomodulatory cytokines preformed within specific granules of human blood eosinophils (6), and a number of physiological stimuli have been identified that elicit differential secretion of granule-stored cytokines from eosinophils (7–10). Therefore, it is fitting that the distinguishing morphological feature of eosinophils (i.e., their specific granules) should also represent a functional distinction for these cells.

### VAST ARRAY AND BIOLOGICAL RELEVANCE OF EOSINOPHIL GRANULE-DERIVED MEDIATORS AND MECHANISMS OF SECRETION

With the growing awareness of the diverse repertoire of eosinophil granule-derived cytokines has come an evolution in understanding the varied roles eosinophils play in biology. Previously considered strictly end-stage effector cells in parasitic helminth infections and allergic diseases such as asthma, eosinophils, and their secreted products are now regarded as participants in organ development (11, 12), metabolism (13), maintaining (14–16) and/or recruiting (17) lymphocyte populations, anti-microbial (18–22)

