

BRUNA DE GOIS MACÊDO

**AVALIAÇÃO DO PAPEL DO EIXO ATP-P2X7 NA ASMA
EXPERIMENTAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências

São Paulo

2021

BRUNA DE GOIS MACÊDO

**AVALIAÇÃO DO PAPEL DO EIXO ATP-P2X7 NA ASMA
EXPERIMENTAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências

Área de concentração: Imunologia

Orientadora: Prof^a Dr^a Maria Regina D'Império Lima

Versão Corrigida

São Paulo

2021

FICHA CATALOGRÁFICA

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

de Gois Macêdo, Bruna
AVALIAÇÃO DO PAPEL DO EIXO ATP-P2X7 NA ASMA
EXPERIMENTAL / Bruna de Gois Macêdo; orientadora
Maria Regina D'Império Lima. -- São Paulo, 2021.
76 p.

Dissertação (Mestrado)) -- Universidade de São
Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Asma. 2. ATP. 3. P2X7. I. D'Império Lima,
Maria Regina , orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Bruna de Gois Macêdo

Título da Dissertação: Avaliação do papel do eixo ATP-P2X7 na asma experimental

Orientador(a): Prof.(a) Dr(a) Maria Regina D'Império Lima

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação, de Mestrado em sessão pública realizada a ___ / ___ / ___, considerou o(a) candidato(a):

Aprovado(a) Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:

Nome:

Instituição:

Examinador(a): Assinatura:

Nome:

Instituição:

Examinador(a): Assinatura:

Nome:

Instituição:

Presidente: Assinatura:

Nome:

Instituição:

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação do papel do ATP extracelular e do receptor P2X7 na modulação de linfócitos T CD4+ durante a inflamação pulmonar", protocolada sob o CEUA nº 2221100918, sob a responsabilidade de **Maria Regina D'Imperio Lima e equipe; Bruna de Gois Macêdo; Fernanda Rodrigues Holanda; Erika Machado de Salles** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo) (CEUA-ICB/USP) na reunião de 24/10/2018.

We certify that the proposal "Evaluation of extracellular ATP and P2X7 receptor in T CD4+ lymphocytes modulation during pulmonary inflammation", utilizing 162 Isogenics mice (162 females), 240 Genetically modified mice (GMO) (240 females), 240 Hybrid mice (240 females), protocol number CEUA 2221100918, under the responsibility of **Maria Regina D'Imperio Lima and team; Bruna de Gois Macêdo; Fernanda Rodrigues Holanda; Erika Machado de Salles** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Biomedical Sciences Institute (University of São Paulo) (CEUA-ICB/USP) in the meeting of 10/24/2018.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: **24 meses**

Depto/Setor: **Imunologia**

Origem: Biotério do Departamento de Imunologia			
Espécie: Camundongos isogênicos	sexo: Fêmeas	Idade ou peso: 6 a 8 semanas	
Linhagem: C57BL/6 Wild-type		N amostral: 162	
Origem: Biotério do Departamento de Imunologia			
Espécie: Camundongo geneticamente modificado (OGM)	sexo: Fêmeas	Idade ou peso: 6 a 8 semanas	
Linhagem: OT-II (C57BL/6)		N amostral: 240	
Origem: Biotério do Departamento de Imunologia			
Espécie: Camundongo híbrido	sexo: Fêmeas	Idade ou peso: 6 a 8 semanas	
Linhagem: OT-II P2X7 KO (C57BL/6)		N amostral: 240	

São Paulo, 20 de outubro de 2020



Profa. Dra. Luciane Valéria Sita

Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo)



Dr. Alexandre Ceroni

Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo)

Dedico esta dissertação a minha família e aos amigos que são família onde quer que eu esteja

AGRADECIMENTOS

A toda a minha família, muito obrigada! Em especial aos meus pais: Carla, Thomaz e minha querida Tia Franci. Aos meus irmãos: Bell, Guga, Ju, Mila e Zé. Obrigada por compartilhar meus sonhos e não medir esforços e renúncias para vivê-los. Minha vitória é inteiramente de vocês.

Agradeço também à professora Regina, que me aceitou tão corajosamente em seu laboratório acreditando no meu potencial sem nem ao menos me conhecer e contribuiu imensamente para o meu crescimento acadêmico e profissional. Agradeço também ao professor Pepe pela colaboração no trabalho e sugestões durante as reuniões.

Muito obrigada aos membros do Laboratório de Imunologia de Doenças Infecciosas pelo apoio e pelas as dúvidas e as ajudas recebidas durante o mestrado! Gostaria de agradecer em especial a nossa querida IC Fernanda, que foi meu apoio em vários momentos durante o mestrado. Agradeço a você pelos experimentos e por todas as conversas que tivemos. Sem você não seria possível.

Aos meus queridos amigos Caio e Igor, meu muito obrigada por todo o apoio, incentivo, risadas, experimentos e sugestões que vocês deram para o meu trabalho e para minha vida! À querida família que a vida me deu: Déborah, Gislane, Jaqueline, Joaquim e Paulo, todas as conquistas que vivo hoje tem um dedo de vocês. Obrigada por toda a ajuda nos experimentos e nas discussões de resultados. Obrigada por terem sido minha alegria, minha motivação, minha ajuda e minha paz durante essa jornada. Tenho orgulho de levar um pouquinho do que vocês são comigo, para onde eu for.

Agradeço por toda a ajuda fornecida por Silvana e Dona Áurea, pelo cuidado com os materiais e a atenção, sempre, com tudo que fazíamos. Aos queridos funcionários do ICB, a todos vocês meu muito obrigada, incluindo aos sempre atenciosos funcionários da secretaria e do CEFAP e também todo o pessoal do biotério. Agradeço em especial à toda a equipe da portaria, sempre me fazendo sorrir ao chegar e ao sair.

Meu obrigada aos membros da banca examinadora por sua disponibilidade e contribuições. Obrigada também a todos os colaboradores e professores que me auxiliaram por diversas vezes tanto nessa pesquisa quanto na minha formação. Especialmente a toda equipe do Laboratório de Imunologia de Mucosas, vocês foram

muito importantes para a construção do meu trabalho. Professora Denise, Marina, Bárbara e Luísa, muito obrigada por tudo!

Agradeço as agências FAPESP, CAPES e CNPq pelo auxílio financeiro para o desenvolvimento dessa pesquisa.

A todos que passaram pela minha vida e contribuíram de alguma forma para minha construção, meu muito obrigada.

Aos camundongos que deram suas vidas para que essa pesquisa fosse realizada e para que todas as descobertas que tanto nos auxiliam hoje acontecessem. Obrigada.

MACÊDO, B. G. Avaliação do papel do eixo ATP-P2X7 na asma experimental. 2020. 76f. Dissertação (Mestrado Departamento de Imunologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

Atualmente a asma é uma das doenças não transmissíveis mais disseminadas no mundo, com mais de 339 milhões de pessoas vivendo com a doença. Os sintomas relacionados à asma incluem dificuldade respiratória, produção excessiva de muco, tosse e chiado durante a respiração. Esses sintomas são reversíveis ao tratamento e são intimamente relacionados às respostas imunes promovidas através do gatilho gerado pelo alérgeno. Na asma experimental, o ATP extracelular e os receptores P2X apresentam um papel importante no desenvolvimento da doença, e essas moléculas parecem contribuir para regulação da produção de anticorpos durante processos inflamatórios. Nesse estudo nós investigamos o papel da sinalização através do eixo ATP-P2X7 no desenvolvimento da asma experimental. Foi observado um papel crítico da sinalização através do receptor P2X7 para o desenvolvimento de infiltrado eosinofílico, mas não para a produção de anticorpos IgE durante a asma experimental. Camundongos *P2rx7^{-/-}* apresentam menor número de células CD4⁺CD44⁺ localizadas no parênquima pulmonar em comparação a camundongos C57BL/6 durante a asma experimental, e apresentam infiltrado de células CD4⁺CD44⁺GATA3⁺, similar aos camundongos não imunizados, mesmo após imunização. Além disso, o linfonodo de camundongos *P2rx7^{-/-}* imunizados apresentam menor número de células comparados ao de camundongos C57BL/6. Caracterizamos o papel da administração de altas concentrações de ATP (1mM, 4,5mM e 50mM) durante desafios intranasais, demonstrando a administração de 4,5mM dessa molécula promove diminuição no recrutamento de eosinófilos e produção de anticorpos IgE, provavelmente através da sinalização pelo receptor P2X7, com aumento da produção de IL-4 e nenhuma alteração em células CD4⁺CD44⁺GATA3⁺. Este estudo contribui para a compreensão de como os sinais de dano afetam o desenvolvimento da asma em modelos experimentais, ressaltando o receptor P2X7 como um potencial alvo terapêutico relacionado a doença pulmonar asmática.

Palavras-chave: Asma. ATP. P2X7.

MACÊDO, B.G. Evaluation of ATP-P2X7 axis during experimental asthma. 2020. 76p. Thesis (Master degree Immunology Department) – Biomedical Sciences Institute, University of São Paulo, São Paulo, 2020.

Asthma is one of the most non-infectious widespread diseases in the world, with more than 339 million people living with the disease. Asthma-related symptoms include hardness to breath, excessive mucus production, coughing and wheezing. These symptoms are reversible after treatment and are closely related to the immune responses promoted through the trigger generated by the allergen. In experimental asthma, extracellular ATP and P2X play an important role during the development of the disease, and these molecules seem to contribute to the regulation of antibody production during inflammatory processes. In this study we investigated the role of signaling through the ATP-P2X7 axis during the development of experimental asthma. It was observed a critical role of signaling through the P2X7 receptor for the development of eosinophilic infiltrate, but not for production of IgE antibodies during experimental asthma. *P2rx7^{-/-}* mice showed lower number of CD4⁺CD44⁺ cells localized in the lung parenchyma compared to C57BL/6 mice during experimental asthma, as well as, these mice have CD4⁺CD44⁺GATA3⁺ cell infiltration similar to non-immunized mice, even upon immunization. In addition, mediastinal lymph node of immunized *P2rx7^{-/-}* mice presented lower number of cells compared to that of C57BL/6 mice. We also characterized the role of ATP at high concentrations (1mM, 4.5mM and 50mM) during intranasal challenges, demonstrating that the administration of 4.5mM of this molecule leads to diminished recruitment of eosinophils and production of IgE antibodies, probably through signaling by the P2X7 receptor, with increased production of IL-4 and no changes in CD4⁺CD44⁺GATA3⁺ cells. This study contributes to the understanding of how the signs of damage affect the development of asthma in experimental models, highlighting the P2X7 receptor as a potential therapeutic target related to asthmatic lung disease.

Key words: Asthma. ATP. P2X7.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Imunopatologia da asma.	21
Figura 2. Avaliação do tecido e das células do pulmão em camundongos C57BL/6 e P2rx7 ^{-/-} durante asma experimental.	36
Figura 3. Avaliação das células T CD4 ⁺ do pulmão de camundongos C57BL/6 e P2rx7 ^{-/-} durante asma experimental.	38
Figura 4. Avaliação das células T CD4 ⁺ CD44 ⁺ CD62L ⁻ do pulmão de camundongos C57BL/6 e P2rx7 ^{-/-} durante asma experimental.	40
Figura 5. Avaliação de células do parênquima e da vasculatura de camundongos C57BL/6 e P2rx7 ^{-/-} durante asma experimental.	43
Figura 6. Avaliação dos fatores de transcrição GATA3, T-bet e FOXP3 em células CD4 ⁺ do parênquima e da vasculatura de camundongos C57BL/6 e P2rx7 ^{-/-} durante asma experimental.	45
Figura 7. Caracterização de células do linfonodo mediastinal de camundongos C57BL/6 e P2rx7 ^{-/-} durante asma experimental.	47
Figura 8. Avaliação de IgE sérico de camundongos C57BL/6 e P2rx7 ^{-/-} durante asma experimental.	48
Figura 9. Avaliação do infiltrado celular e muco no pulmão e da produção de IgE após administração de ATP durante desafios i.n. com OVA em camundongos previamente imunizados.	50
Figura 10. Avaliação por citometria de fluxo de células do pulmão após administração de ATP via i.n. durante desafios com OVA em camundongos previamente imunizados.	51
Figura 11. Avaliação por citometria de fluxo de células T CD4 ⁺ do pulmão após administração de ATP via i.n. durante desafios com OVA em camundongos previamente imunizados.	52
Figura 12. Caracterização do lavado bronquioalveolar (BAL) após administração de ATP via i.n. durante desafios com OVA em camundongos previamente imunizados.	54
Figura 13. Avaliação de soro e células do pulmão após administração de ATP via i.n. durante desafios com OVA em camundongos previamente imunizados e tratados com BBG.	56
Figura 14. Imagem esquemática dos processos de reconhecimento de ATP durante o desenvolvimento da asma experimental.	66

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATP- Adenosina Trifosfato

OVA- Ovalbumina

DPOC- Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica

Ig- Imunoglobulina

MHC- Molécula de Histocompatibilidade

CD- *Cluster Differentiation*

FcARI- Receptor Fc de alta afinidade

IL-4R α - Cadeia alfa do receptor de IL-4

STAT- Signal Transducers and Activators of Transcription

IFN- Interferon

ILC- Célula Linfóide Inata

APC- Célula apresentadora de antígeno

TCR- Receptor de células T

UTP- Uridina Trifosfato

GTP- Guanosina Trifosfato

ADP- Adenosina difosfato

AMP- Adenosina monofosfato

TSLP- Linfopietina do Estroma Tímico

COX2- Ciclooxygenase 2

TNF- Fator de necrose tumoral

Th- *T helper*

Tfh- *T helper* folicular

PCR- Reação em Cadeia de Polimerase

Sumário

1 Introdução	16
1.1 Inflamação pulmonar aguda	17
1.2 A imunologia da asma	17
1.3 Asma experimental	22
1.4 ATP, outros nucleotídeos e seus derivados na inflamação asmática	23
1.5 O receptor P2X7	24
2 Objetivos	27
2.1 Objetivo geral	28
2.2 Objetivos específicos	28
3 Metodologia	29
3.1 Camundongos	30
3.2 Imunização e desafio com OVA e ATP	30
3.3 Coloração intravascular	30
3.4 Obtenção de células de pulmão e linfonodo	30
3.5 Histologia e score de infiltrado celular	31
3.6 Análise de citometria de fluxo	31
3.7 Estratégia de análise	32
3.8 Obtenção de soro	32
3.9 Obtenção de lavado bronquioalveolar (BAL)	32
3.10 Contagem diferencial de leucócitos	33
3.11 Quantificação de IgE sérica e IL-4 obtida de BAL	33
3.12 Análise estatística	33
4 Resultados	34
4.1 O receptor P2X7 é crucial para o desenvolvimento da inflamação asmática experimental	35
4.2 Camundongos <i>P2rx7^{-/-}</i> apresentam infiltrado pulmonar de células TCD4 ⁺ CD44 ⁺ na asma experimental	37
4.3 Camundongos <i>P2rx7^{-/-}</i> não apresentam infiltrado pulmonar de células Th1 ou Th2 na asma experimental	39
4.4 Camundongos <i>P2rx7^{-/-}</i> apresentam menos células efectoras T CD4 ⁺ no parênquima pulmonar quando comparados a camundongos C57BL/6 durante asma experimental	41
4.5 Camundongos <i>P2rx7^{-/-}</i> não apresentam infiltrado pulmonar de células Th2 no parênquima e na vasculatura durante asma experimental	44
4.6 Linfonodo mediastinal de camundongos <i>P2rx7^{-/-}</i> apresentam menos células após desenvolvimento de asma experimental comparado a camundongos C57BL/6	46

4.7 Camundongos <i>P2rx7^{-/-}</i> são capazes de produzir IgE durante a asma experimental	48
4.8 Desafios i.n. com OVA na presença de ATP resultam em redução da asma experimental de maneira dose-dependente.....	49
4.9 A administração i.n. de ATP reduz o infiltrado de granulócitos durante a asma experimental .	50
4.10 A redução do infiltrado celular durante a administração de ATP intranasal não parece ser uma característica da resposta dos linfócitos Th1 ou Th2 do pulmão.....	51
4.11 A administração de ATP via intranasal durante desafios com OVA promove o aumento de IL-4 no lavado bronquioalveolar	53
4.12 O fenômeno de redução dos infiltrados de células durante a administração de ATP na asma experimental parece ser dependente do receptor P2X7	54
5 Discussão.....	58
6 Conclusões.....	65
7 Referências.....	67
8 Anexos	73

1 Introdução

1.1 Inflamação pulmonar aguda

Respostas inflamatórias agudas são iniciadas através de processos de injúria, infecção e irritação, e estão intimamente relacionadas com a proteção do hospedeiro visando a reestruturação da homeostase (LEITCH, A. E. et al., 2008). Dessa forma, as respostas inflamatórias são associadas à tentativa de destruição e remoção dos agentes promotores da desordem homeostática e dos tecidos danificados, promovendo dessa forma reparo tecidual (LEE e YANG, 2013). Entretanto, as respostas agudas fisiológicas podem se tornar incontroláveis em termos de magnitude e especialmente em duração, levando a condições patológicas e de desenvolvimento de inflamações crônicas acarretando na destruição do tecido saudável (NATHAN et al., 2002; LEITCH, A. E. et al., 2008; SIMPSON et al., 2009).

No pulmão, respostas inflamatórias agudas desreguladas resultam em injúria do tecido pulmonar, contribuindo para o desenvolvimento de inflamações crônicas características de doenças humanas respiratórias, tais como a doença obstrutiva pulmonar crônica (DPOC), a fibrose cística e a asma (LEITCH, A. E. et al., 2008 e STARKEY et al., 2013). A asma, por sua vez, é uma doença crônica associada à desordem das vias aéreas com participação de diversos tipos celulares e mediadores moleculares do sistema imune na sua patogênese (MOROSCO e KILEY, 2007; NELSON et al., 2020)

Atualmente a asma é uma das doenças não transmissíveis mais disseminadas no mundo, com mais de 339 milhões de pessoas vivendo com a doença (2018; WHO, 2020). Os sintomas relacionados à asma incluem dificuldade respiratória, produção excessiva de muco, tosse e chiado durante a respiração (WHO, 2020), e são atrelados à baixa qualidade de vida dos portadores, especialmente devido ao cansaço, limitações de atividade física e perda de produtividade ocasionados pelas crises (PICKLES et al., 2018).

1.2 A imunologia da asma

As características clínicas relacionadas ao quadro sintomatológico asmático são amplas e diversas, dessa forma, Wenzel et al. (1999) subdividiu a asma em dois subtipos diferentes, utilizando como critério a presença de eosinófilos nas vias aéreas. Posteriormente, isso levou à classificação da doença em dois principais endotipos: T helper 2 (Th2)-alto (eosinofílico) e Th2-baixo (não-eosinofílico), que é atualmente a

classificação mais bem estabelecida de endotipos graves de asma (KURUVILLA et al., 2019).

O endotipo Th2-baixo é geralmente caracterizado pelo recrutamento neutrofílico, sendo relacionado à ativação de células Th1 e/ou Th17, entretanto, os mecanismos responsáveis pelo recrutamento e manutenção da inflamação neutrofílica nessa doença ainda são desconhecidos. Já o dogma tradicional clássico (Th2-alto) é relacionado ao quadro asmático de resposta excessiva de perfil Th2 com presença de elevados níveis de IgE, levando à responsividade exacerbada nas vias aéreas. Uma das ideias mecanicistas iniciais sobre o desenvolvimento da asma foi baseada no entendimento das respostas de células T CD4⁺. Desde a descoberta da subdivisão clássica de células T CD4⁺ (subpopulações Th1 e Th2), estudos relacionaram as células Th2 como o principal fator causador da inflamação eosinofílica das vias aéreas, gerando quantidades abundantes de IL4, IL-5 e IL-13 (KURUVILLA et al., 2019).

O desenvolvimento asmático em condições naturais e experimentais baseia-se em processos de sensibilização, iniciado quando um indivíduo entra em contato com o antígeno, seja através da pele, circulação, trato respiratório, gastrointestinal ou outros. As respostas imunes asmáticas se originam no epitélio, cuja redução da integridade e dano levam a produção de citocinas denominadas alarminas, responsáveis pelo desencadeamento de ações que garantem o desenvolvimento das respostas adaptativas do tipo 2. Dessa forma, as células epiteliais são reconhecidas como sentinelas para detecção de dano, através de receptores de reconhecimento de padrões moleculares, promovendo o a sensibilização de moléculas com potencial alérgeno. Alarminas como linfopoiétina tímica estromal (TSLP), IL-25, IL-33 são importantes para a ativação de células chave para o desenvolvimento da resposta asmática como células linfóides inatas do grupo 2 (ILC2) e células apresentadoras de antígeno (APCs).

As ILC2s são associadas ao desenvolvimento da inflamação asmática, desempenhando um papel crítico nas respostas imunes do tipo 2. Essas ILCs constituem uma família de linfócitos inatos, que são distintos das células T e B, sendo potentes produtoras de citocinas prototípicas do tipo 2. Embora tenham ampla distribuição tecidual, os números de ILC2s são particularmente altos nos tecidos das

vias aéreas, produzindo grandes quantidades de IL-5 e IL-13. Dessa forma, o reconhecimento de alarminas liberadas pelas células epiteliais em resposta ao dano promovem a liberação de citocinas como IL-5 e IL-13, desempenhando um papel inicial importante no aumento das respostas do tipo 2 nas vias aéreas (KURUVILLA et al., 2019).

Além da ativação de ILC2, as alarminas são responsáveis pela ativação de APCs especializadas como células dendríticas, macrófagos e células B, que realizam o *uptake* do antígeno iniciando o processo de internalização e processamento antigênico após drenagem para o linfonodo mais próximo (EPSTEIN, 2004). Os peptídeos processados são apresentados através de complexos com moléculas de MHC de classe II e receptores de linfócitos T CD4⁺. O reconhecimento de antígenos através dos receptores de células T, o processo de co-ativação dessas células e reconhecimento de citocinas são responsáveis pela ativação, diferenciação e expansão clonal dos linfócitos T CD4⁺ para um perfil Th2, com produção característica de citocinas como IL-4, IL-5 e IL-13 (EPSTEIN, 2004). Para tal, estímulos com citocinas como a IL-4 promovem a fosforilação da proteína STAT6, que por sua vez é responsável pela remodelação da cromatina em regiões que favorecem a transcrição do fator de transcrição GATA 3, um regulador chave na diferenciação de células Th2 (RAY et al., 1999).

Produção de citocinas como IL-4 e IL-13 por células Th2 e Tfh favorecem a formação de centros germinativos com produção de IgE alérgeno específico, de forma que os estímulos dessas citocinas em associação a interações críticas de moléculas de células T e células B promovem a mudança do isotipo IgM para IgE (OETTGEN e GEHA, 2001; KOBAYASHI et al., 2016). A IgE por sua vez realiza o *cross-link* entre moléculas do alérgeno e receptores de reconhecimento da porção Fc de alta afinidade presente na superfície de células como mastócitos. O reconhecimento de antígenos por esses complexos promove a degranulação dessas células e liberação de mediadores vasoreativos. Na asma, a combinação da produção de mediadores derivados de células Th2 e mastócitos nos pulmões, associado a fatores derivados do epitélio, musculatura lisa e sistema nervoso promovem a formação de infiltrado eosinofílico, produção de muco e obstrução das vias aéreas características da doença (EPSTEIN, 2004).

As células TCD4⁺ de perfil Th2, por sua vez, durante o processo de desenvolvimento asmático são recrutados para o pulmão, promovendo a secreção das citocinas IL-4, IL-5 e IL-13. Tanto a IL-4 quanto a IL-13 utilizam uma cadeia comum do receptor de IL-4 (IL-4R α) para iniciar a sinalização através da fosforilação e ativação do transdutor de sinal do STAT6 (PAUL, 2010). A IL-13 e a IL-4 promovem estímulos para células caliciformes, o que leva ao aumento da produção e secreção de muco e hiperresponsividade das vias aéreas (KURUVILLA et al., 2019). A IL-5 apresenta papel essencial na promoção de diferenciação e maturação dos progenitores de eosinófilos IL-5R α ⁺ na medula óssea, bem como subsequente mobilização e manutenção da sobrevivência dessas células. A IL-5 também suporta o desenvolvimento de outras células do tipo 2, incluindo mastócitos e basófilos (STONE et al., 2010). Enquanto os linfócitos Th2 promovem inflamação nas vias aéreas, é proposto que células com perfil Th1, que possuem como principal característica a produção de altos níveis de IFN- γ , são responsáveis pela proteção contra doenças alérgicas pela inibição da proliferação e da diferenciação dos linfócitos de perfil Th2 (ABBAS et al., 1996; STARKEY et al., 2013).

Os eosinófilos são o tipo de célula cardinal associada à asma tipo 2 e a produção e liberação de seus mediadores apresentam efeitos pleiotrópicos em diversas células inflamatórias. Muitos eosinófilos são recrutados para o local da inflamação através das eotaxinas como a CCL11, que são quimiocinas que respondem aos estímulos através dos receptores CCR3 expressos nos eosinófilos. Essas células têm a capacidade de sintetizar e armazenar proteínas citotóxicas em grânulos intracelulares (KURUVILLA et al., 2019). A ativação dessas células promove a liberação de diversos mediadores inflamatórios, incluindo citocinas (IL-13 e IL-5), quimiocinas (como eotaxinas) e leucotrienos. Os eosinófilos também são responsáveis pela ativação de fibroblastos brônquicos através da produção de fatores profibróticos e, portanto, estão associados a características de remodelamento

tecidual, em especial o espessamento da membrana basal, demonstrando dessa forma seu papel na patogênese da asma (DURRANI et al., 2011).

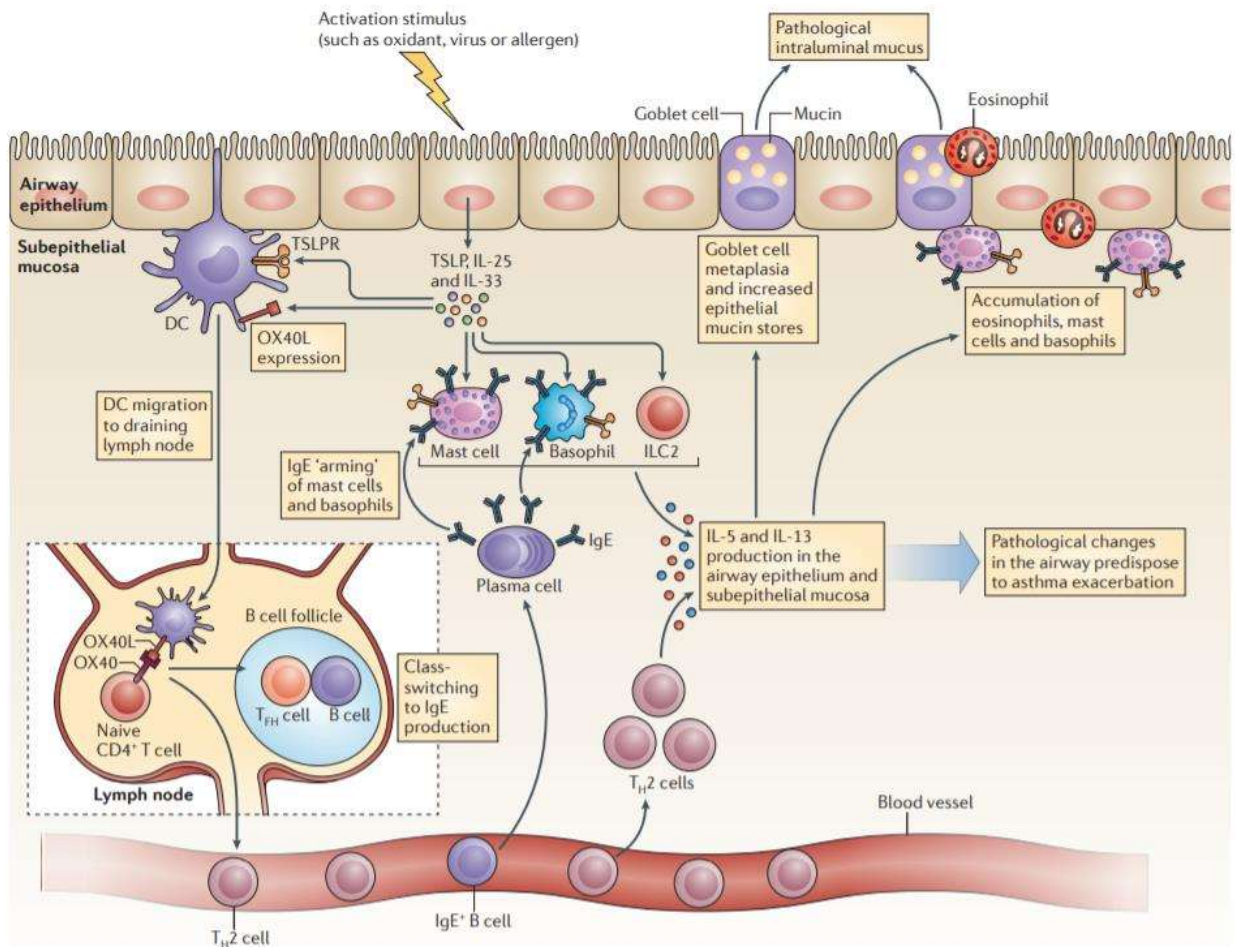


Figura 1. Imunopatologia da asma. O estímulo estressor do alérgeno promove em células epiteliais a indução de liberação de alarmina, como a IL-33, que favorecem o processo de ativação e migração de células dendríticas que capturam os antígenos e se dirigem aos linfonodos drenantes locais. Uma vez nos linfonodos, essas células são responsáveis pela ativação de linfócitos T CD4⁺ *naive* para um perfil Th2. Essas células, por sua vez, migram para zonas de células B, iniciando sua diferenciação em células T_{fh}, mediando o processo de mudança de classe para IgE em células B. Além disso, as células Th2, IL-4 competentes, realizam migração para a região das vias aéreas, promovendo a secreção de citocinas como IL-5, IL-13 e IL-4, favorecendo processos de inflamação celular pelo recrutamento de eosinófilos e remodelamento das vias aéreas características da doença asmática. Além disso, o IgE produzido pelas células B são responsáveis pela ativação de células como mastócitos, basófilos e eosinófilos que contribuem para o processo de inflamação local. **ILC2**- Células Linfóides Inatas do tipo 2; **TSLP**- Linfopietina tímica estromal; **TSLPR**- Receptor TSLP (FAHY et al., 2015).

1.3 Asma experimental

Os modelos murinos refletem de forma adequada as características essenciais do desenvolvimento de inflamações pulmonares e são de extrema importância na determinação de mecanismos de patogênese (STARKEY et al., 2013). Modelos murinos de inflamação pulmonar envolvem a indução de alergias agudas e crônicas através de moléculas como a ovalbumina (OVA), principal proteína do ovo da galinha (KOVACS-NOLAN et al., 2005; DANTAS et al., 2017). A OVA é o antígeno mais utilizado na pesquisa de asma em camundongos, por se tratar de uma substância disponível comercialmente, de fácil manipulação e com a qual o camundongo de laboratório não apresenta contato ambiental (GUALDI et al., 2010). A administração de OVA por via oral foi associada a processos de tolerância (RUSSO et al., 2001), entretanto o reconhecimento da OVA na presença de microambiente de dano, promove a formação de respostas asmáticas OVA-específicas, mimetizando processos de inflamação pulmonar asmática. O hidróxido de alumínio vem sendo empregado como adjuvante para a formação de respostas imune específicas através da indução imune de sinais de dano endógenos, como indução de morte, liberação de DNA e dessa forma, ativação do inflamassoma NLRP3 (GLENNY et al., 1926, KOOL et al., 2012).

Os protocolos de asma experimental que empregam a OVA como antígeno são diversos, entretanto comumente utilizam processos de sensibilização por inóculos intranasais, intraperitoniais ou subcutâneos, seguido por desafios intranasais múltiplos (KUMAR et al., 2008). Durante esses protocolos, características particulares da asma são observadas, como: respostas de ativação de linfócitos Th2 e presença de citocinas IL-4, IL-5, e IL-13 nas vias aéreas (PRESTON et al., 2007; THORNBURN et al., 2010; THORNBURN et al., 2012). Observa-se também a produção de IgE e consequente degranulação de mastócitos, bem como a formação de infiltrados celulares com números elevados de eosinófilos, produção de muco e hiperreatividade de vias aéreas.

Dessa forma, o processo inflamatório asmático é associado à desregulação de processos homeostáticos nas vias aéreas com participação de mediadores moleculares na doença (MOROSCO e KILEY, 2007; NELSON et al., 2020). Muitas proteínas são conhecidas como desencadeadoras de respostas inflamatórias como metaloproteinases, moléculas de adesão, cicloxigenase 2 (COX-2), fator de necrose

tumoral alfa (TNF- α), interleucina 1, e inclusive, o ATP (LEE et al. 2010; LEE e YANG, 2013). O ATP extracelular é um mediador dessa comunicação intercelular, atuando através da sinalização de receptores purinérgicos (P2XR e P2YR) (BURNSTOCK et al., 2006; KHAKH et al., 2006).

1.4 ATP, outros nucleotídeos e seus derivados na inflamação asmática

Nucleotídeos como ATP, UTP, GTP e ADP, assim como o nucleosídeo adenosina, são amplamente conhecidos por seus papéis intracelulares fundamentais na manutenção celular. O ATP representa a "reserva energética" para praticamente todas as células e, além disso, é um constituinte básico dos ácidos nucléicos e um modulador enzimático crucial. Entretanto, no meio extracelular, esses nucleotídeos e nucleosídeos apresentam papéis completamente distintos daqueles desempenhados no meio intracelular (FERRARI et al., 2016).

A liberação de ATP, UTP, UDP, ADP e adenosina ocorre em muitos tipos de células e em diferentes contextos (KHAKH e BURNSTOCK, 2009; FREDHOLM e VERKHRATSKY, 2010). Durante situações de estresse ou dano celular, nucleosídeos e nucleotídeos podem ser liberados por diversos tipos celulares, incluindo plaquetas, células estruturais e inflamatórias do pulmão, através de mecanismos líticos ou não-líticos, atuando como sinais de perigo (BURNSTOCK et al., 2006; BOURS et al., 2006). Os principais estressores da membrana celular incluem alérgenos, proteases extracelulares, radicais de oxigênio e forças de tensão de cisalhamento, além de microorganismos. Dessa forma, observa-se que as células liberam de forma fisiológica homeostática nucleotídeos e nucleosídeos que funcionam como moléculas de sinalização extracelular (KHAKH E BURNSTOCK, 2009; FREDHOLM e VERKHRATSKY, 2010).

Além disso, uma vez no meio extracelular, o ATP e o ADP podem ser rapidamente degradados por ectoenzimas como o CD39, uma NTPDase capaz de degradar ATP em adenosina 5'-difosfato (ADP) e ADP e adenosina monofosfato (AMP); e o CD73, capaz de converter AMP em adenosina. Dessa forma, nucleosídeos e nucleotídeos extracelulares, bem como seus produtos de degradação podem ser reconhecidos por receptores subdivididos em P1 (receptores de adenosina) e P2 (receptores de ATP e ADP) (BURNSTOCK, 1978).

Estudos recentes forneceram evidências de que as purinas, especialmente o ATP e o produto de sua quebra enzimática, a adenosina, têm efeitos potentes em vários tipos de células pulmonares, especialmente naquelas envolvidas na fisiopatologia da asma, incluindo mastócitos, linfócitos, eosinófilos, neutrófilos, células dendríticas e células epiteliais das vias aéreas pela ligação a seus respectivos receptores (ADRIAENSEN e TIMMERMANS, 2004). O ATP foi relacionado ao recrutamento e à função de diversos tipos celulares inflamatórios envolvidos na patogenia da asma, incluindo eosinófilos, mastócitos, células dendríticas e linfócitos (IDZKO et al., 2002; LA SALA et al., 2002; IDZKO et al., 2003; BOURS et al., 2006). Estudos sugerem que o ATP extracelular atua como um mediador pro-asmático, uma vez que essa molécula se encontra elevada nas vias respiratórias de indivíduos com asma após desafio com alérgeno, mas não após o desafio com salina (IDZKO et al., 2007). Além disso, altos níveis de ATP também são encontrados nas vias respiratórias de camundongos asmáticos sensibilizados e desafiados por OVA, bem como, a neutralização do ATP extracelular e o bloqueio inespecífico de receptores P2X nas vias respiratórias inibem o desenvolvimento da asma em camundongos (IDZKO et al., 2007), indicando o papel da sinalização através desses receptores na asma.

1.5 O receptor P2X7

Uma vez liberados no meio extracelular, os nucleotídeos ATP, ADP, UTP e UDP podem atuar através dos receptores purinérgicos P2X e P2Y. Os receptores P2X constituem uma família de canais iônicos modulados pelo ligante ATP e os receptores P2Y reconhecem ATP além de outros nucleotídeos, sinalizando através da fosforilação de proteínas G (GIULLIANI et al., 2018).

Os receptores P2X apresentam um terminal carboxi e amina e uma grande alça extracelular entre dois segmentos hidrofóbicos (NORTH, 1996) e estão distribuídos em diversos tecidos do organismo, incluindo o tecido nervoso (VALERA et al., 1994; DI VIRGILIO et al., 2017). O receptor P2X7, por sua vez, apresenta propriedades particulares. Na presença de concentrações micromolares de ATP extracelular, esse receptor induz influxo de cálcio (Ca^{2+}) e magnésio citosólico e efluxo de potássio(K^+) através da membrana celular, sendo relacionado ao favorecimento da ativação de células (KHADRA et al., 2013). Entretanto a exposição contínua do receptor P2X7 a altas concentrações de ATP induz a formação de poros citolíticos não específicos,

promovendo morte celular (FERRARI et al., 1996; SURPRENANT et al., 1996; RISSIEK et al., 2015; DI VIRGILIO et al., 2017).

Dessa forma, as atividades do receptor P2X7 têm sido reportadas em um número limitado de tipos celulares do sistema imune, incluindo células de linhagem hematopoiética como monócitos, macrófagos, mastócitos, eosinófilos, ILCs, células dendríticas e linfócitos (DI VIRGILIO et al., 2017). A função fisiológica deste receptor permanece um objeto de investigação, entretanto, diversas funções foram descritas relacionadas a sua ativação. Uma delas está relacionada à ativação do inflamassoma NLRP3. O reconhecimento de ATP pelo P2X7 inicia uma cascata de sinalização baseado na diminuição da concentração de K^+ e aumento de Ca^{2+} intracelular, através da formação de poros permeáveis na membrana, acarretando na ativação complexo NLRP3-IL1 β , moléculas decisivas no processo do desenvolvimento da inflamação.

Além disso, a sinalização via receptor P2X7 está relacionado com a morte de macrófagos infectados por patógenos, diferenciação e maturação de linfócitos T, bem como a formação de células de memória de longa duração (APASOV et al., 1997; HUMPHREYS et al., 2000; SHENKER et al., 2015, BORGES DA SILVA et al., 2018). Recentemente, nosso grupo demonstrou que a sinalização do receptor P2X7 em linfócitos T CD4⁺ induz a diferenciação de linfócitos Th1 esplênicos e controla as células Th foliculares (Tfh) durante a malária experimental, auxiliando na proteção contra a doença (SALLES et al., 2017).

A sinalização através do P2X7 está associada a processos regulatórios na produção de anticorpos e formação de centros germinativos. Por exemplo, foi demonstrado que células Tfh apresentam alta expressão de P2X7 na membrana celular, e dessa forma, a sinalização via ATP-P2X7 parece controlar o número de células Tfh nas placas de Peyer, responsáveis pela formação de IgA de alta afinidade, através de indução de morte celular (PROIETI et al., 2014). Além disso, utilizaram modelo de lúpus eritematoso sistêmico e demonstraram que a ausência de P2X7 em células Tfh promove a geração de autoanticorpos, indicando a participação desse receptor na regulação da geração de anticorpos. Apesar de diversos estudos acessarem o papel do ATP e do receptor P2X7 em células foliculares, ainda não é claro como altas concentrações de ATP extracelular influencia as células Tfh em sítios inflamatórios (WILHELM et al., 2010; e FALITI et al., 2019)

Dessa forma, compreende-se que a sinalização do ATP via receptores purinérgicos apresentam papel importante no desenvolvimento da inflamação pulmonar asmática (IDZKO et al., 2007). O receptor P2X7, por sua vez, pode ter um papel importante na indução dos linfócitos Th2 e, conseqüentemente, no desenvolvimento da doença asmática, uma vez que sua sinalização influencia o padrão de resposta de células T CD4⁺, como demonstrado em relação à polarização Th1 versus Tfh pelo nosso grupo na malária experimental (SALLES et al., 2017). No entanto, busca-se entender como o eixo ATP-P2X7 afeta o desenvolvimento da inflamação pulmonar durante a asma experimental.

2 Objetivos

2.1 Objetivo geral

Compreender o papel do eixo ATP-P2X7 no desenvolvimento da asma experimental.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar o papel do receptor P2X7 no desenvolvimento da inflamação pulmonar asmática;
- Avaliar o perfil dos linfócitos pulmonares infiltrados durante asma experimental na ausência do receptor P2X7;
- Avaliar células do parênquima e da vasculatura pulmonar de camundongos C57BL6 e *P2rx7^{-/-}* imunizados e desafiados;
- Elucidar o papel do receptor P2X7 na produção de IgE durante a asma experimental;
- Avaliar o efeito da administração de ATP durante o desafio i.n. com OVA na formação de infiltrado celular pulmonar;
- Avaliar o efeito da administração de ATP durante o desafio i.n. com OVA no perfil das células inatas pulmonares durante o desenvolvimento da asma experimental;
- Avaliar o efeito da administração de ATP durante o desafio i.n. com OVA no perfil das células T CD4⁺ pulmonares durante o desenvolvimento da asma experimental.
- Avaliar o efeito da administração de ATP, durante o desafio i.n. com OVA, na produção de IgE.
- Avaliar o papel do receptor P2X7 durante administração de ATP no desafio i.n. com OVA, para formação de infiltrado pulmonar e para produção de IgE, utilizando inibidor-específico do receptor P2X7 (BBG-Blue Brilliant G).

3 Metodologia

6 Conclusões

Esse trabalho demonstra que o receptor P2X7 é crucial para a formação de infiltrado de células de eosinófilos, bem como produção de muco característicos da inflamação asmática, mas não para a produção IgE durante a asma experimental. Esse fenômeno não parece estar associado à compartimentalização da resposta de células TCD4⁺ no parênquima ou na vasculatura, entretanto indícios demonstram menor número de células T CD4⁺ efetoras no parênquima de camundongos *P2rx7^{-/-}*, levantando a possibilidade de futuros estudos avaliando a capacidade funcional e de proliferação dessas células durante a asma experimental. Por outro lado, a administração de ATP por via i.n. durante desafios com OVA resultam em redução da inflamação asmática de maneira dose-dependente, demonstrando menor eosinofilia produção IgE, enquanto células TCD4⁺CD44⁺GATA3⁺ parecem inalteradas, apesar do aumento da concentração de IL-4. O uso do inibidor do receptor P2X7 parece promover reconstituição da produção de IgE e presença de eosinófilos, indicando que a regulação observada durante a administração de ATP pode ocorrer através da sinalização por P2X7. Juntos esses dados indicam que o reconhecimento do ATP por receptores P2X7 é imprescindível para o desenvolvimento da asma experimental, entretanto o reconhecimento de altas concentrações de ATP durante desafios i.n. são responsáveis pela regulação das respostas inflamatórias asmáticas.

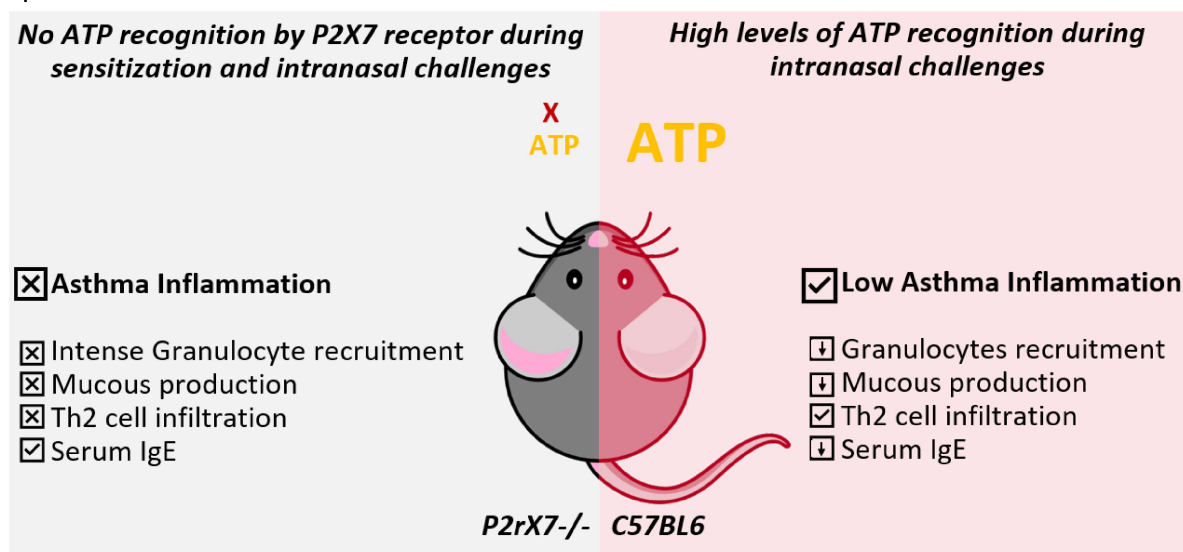


Figura 14. Imagem esquemática dos processos de reconhecimento de ATP durante o desenvolvimento da asma experimental. Camundongos *P2rx7^{-/-}* não apresentam produção de muco e infiltrado de células de assinatura típica da asma, apesar da manutenção da produção de IgE. Por outro lado, a administração de altas concentrações de ATP durante desafios intranasais promove a diminuição do recrutamento de infiltrado eosinofílico e produção de muco, apesar da manutenção de infiltrados de linfócitos Th2, e promove a regulação da produção de anticorpos IgE.

7 Referências

1. ABBAS, Abul K.; MURPHY, Kenneth M.; SHER, Alan. Functional diversity of helper T lymphocytes. **Nature**, v. 383, n. 6603, p. 787, 1996.
2. Adriaensen, D., & Timmermans, J. P. (2004). Purinergic signalling in the lung: important in asthma and COPD?. **Current opinion in pharmacology**, 4(3), 207-214.
3. APASOV, Sergey G. et al. Effects of extracellular ATP and adenosine on different thymocyte subsets: possible role of ATP-gated channels and G protein-coupled purinergic receptor. **The Journal of Immunology**, v. 158, n. 11, p. 5095-5105, 1997.
4. ASTHMA UK. Asthma Facts and Statistics. Disponível em: <<https://www.asthma.org.uk/about/media/facts-and-statistics/>> Acesso em: 20 de novembro de 2020.
5. BAATEN, Bas JG; LI, Cheng-Rui; BRADLEY, Linda M. Multifaceted regulation of T cells by CD44. **Communicative & integrative biology**, v. 3, n. 6, p. 508-512, 2010.
6. BARICORDI, O. Roberto et al. Increased proliferation rate of lymphoid cells transfected with the P2X7 ATP receptor. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 47, p. 33206-33208, 1999.
7. BARNDEN MJ et al. Defective TCR expression in transgenic mice constructed using cDNA-based alpha- and beta-chain genes under the control of heterologous regulatory elements. **Immunology and cell biology**.76(1):34-40 (1998).
8. BOURS, M. J. L. et al. Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. **Pharmacology & therapeutics**, v. 112, n. 2, p. 358-404, 2006.
9. BURNSTOCK, G. A. A basis for distinguishing two types of purinergic receptor. **Cell Membrane Receptors for Drugs and Hormone: A Multidisciplinary Approach**, p. 107-118, 1978.
10. BURNSTOCK, Geoffrey. Pathophysiology and therapeutic potential of purinergic signaling. **Pharmacological reviews**, v. 58, n. 1, p. 58-86, 2006.
11. DA SILVA, Henrique Borges et al. Sensing of ATP via the Purinergic Receptor P2RX7 Promotes CD8+ Trm Cell Generation by Enhancing Their Sensitivity to the Cytokine TGF- β . **Immunity**, v. 53, n. 1, p. 158-171. e6, 2020.
12. DANTAS, Maria Dayanne de A. et al. Interactions of tetracyclines with ovalbumin, the main allergen protein from egg white: Spectroscopic and electrophoretic studies. **International journal of biological macromolecules**, v. 102, p. 505-514, 2017.
13. DI VIRGILIO, Francesco et al. The P2X7 receptor in infection and inflammation. **Immunity**, v. 47, n. 1, p. 15-31, 2017.
14. DURRANI, S. R., VISWANATHAN, R. K., & BUSSE, W. W. What effect does asthma treatment have on airway remodeling? Current perspectives. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, 128(3), 439-448 (2011)..
15. EPSTEIN, Michelle M. Do mouse models of allergic asthma mimic clinical disease?. **International archives of allergy and immunology**, v. 133, n. 1, p. 84-100, 2004.
16. FAHY, John V. Type 2 inflammation in asthma—present in most, absent in many. **Nature Reviews Immunology**, v. 15, n. 1, p. 57-65, 2015.
17. FALITI, Caterina E. et al. P2X7 receptor restrains pathogenic Tfh cell generation in systemic lupus erythematosus. **Journal of Experimental Medicine**, v. 216, n. 2, p. 317-336, 2019.

18. FERRARI, D. et al. Mouse microglial cells express a plasma membrane pore gated by extracellular ATP. **The Journal of Immunology**, v. 156, n. 4, p. 1531-1539, 1996.
19. FERRARI, D. et al. Purinergic signaling during immune cell trafficking. **Trends in immunology**, 37(6), 399-411 (2016).
20. FERRARI, Davide et al. Activation of human eosinophils via P2 receptors: novel findings and future perspectives. **Journal of leukocyte biology**, v. 79, n. 1, p. 7-15, 2006.
21. FREDHOLM, B., e VERKHRATSKY, A. Purines—80 years and very much alive. **Acta Physiologica**, 199(2), 91-92 (2010).
22. GAVETT, Stephen H. et al. Depletion of murine CD4+ T lymphocytes prevents antigen-induced airway hyperreactivity and pulmonary eosinophilia. **American journal of respiratory cell and molecular biology**, v. 10, n. 6, p. 587-593, 1994.
23. GIULIANI, A. L., SARTI, A. C., & DI VIRGILIO, F. Extracellular nucleotides and nucleosides as signalling molecules. **Immunology Letters** (2018).
24. GLENNY, A. T. The antigenic value of toxoid precipitated by potassium alum. **J. Pathol. Bacteriol.**, v. 29, p. 38-45, 1926.
25. GOUVEIA, Ana Cláudia Carvalho et al. Th2 responses in OVA-sensitized BALB/c mice are down-modulated by Mycobacterium bovis BCG treatment. **Journal of clinical immunology**, v. 33, n. 1, p. 235-245, 2013.
26. GUALDI, Lucien Peroni et al. Modelos murinos para pesquisas em asma: uma análise crítica atualizada. **Scientia medica**, v. 20, n. 3, 2010.
27. HE, Kun et al. Blimp-1 is essential for allergen-induced asthma and Th2 cell development in the lung. *Journal of Experimental Medicine*, v. 217, n. 7, 2020.
28. HUET, S. et al. CD44 contributes to T cell activation. **The Journal of Immunology**, v. 143, n. 3, p. 798-801, 1989.
29. HUMPHREYS, Benjamin D. et al. Stress-activated protein kinase/JNK activation and apoptotic induction by the macrophage P2X7 nucleotide receptor. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 35, p. 26792-26798, 2000.
30. IDZKO, Marco et al. Extracellular ATP triggers and maintains asthmatic airway inflammation by activating dendritic cells. **Nature medicine**, v. 13, n. 8, p. 913, 2007.
31. IDZKO, Marco et al. Nucleotides induce chemotaxis and actin polymerization in immature but not mature human dendritic cells via activation of pertussis toxin-sensitive P2y receptors. **Blood**, v. 100, n. 3, p. 925-932, 2002.
32. IDZKO, Marco et al. Stimulation of P2 purinergic receptors induces the release of eosinophil cationic protein and interleukin-8 from human eosinophils. **British journal of pharmacology**, v. 138, n. 7, p. 1244-1250, 2003.
33. KHADRA, Anmar et al. Dual gating mechanism and function of P2X7 receptor channels. **Biophysical journal**, v. 104, n. 12, p. 2612-2621, 2013.
34. KHAKH, B. S., e BURNSTOCK, G. The double life of ATP. **Scientific American**, 301(6), 84, (2009).
35. KHAKH, Baljit S.; NORTH, R. Alan. P2X receptors as cell-surface ATP sensors in health and disease. **Nature**, v. 442, n. 7102, p. 527, 2006.
36. KOBAYASHI, Takao et al. Follicular helper T cells mediate IgE antibody response to airborne allergens. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 139, n. 1, p. 300-313. e7, 2017.

37. KOOL, Mirjam; FIERENS, Kaat; LAMBRECHT, Bart N. Alum adjuvant: some of the tricks of the oldest adjuvant. **Journal of medical microbiology**, v. 61, n. 7, p. 927-934, 2012.
38. KOVACS-NOLAN, Jennifer; PHILLIPS, Marshall; MINE, Yoshinori. Advances in the value of eggs and egg components for human health. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 53, n. 22, p. 8421-8431, 2005.
39. KUMAR, Rakesh K.; HERBERT, Cristan; FOSTER, Paul S. The “classical” ovalbumin challenge model of asthma in mice. **Current drug targets**, v. 9, n. 6, p. 485-494, 2008.
40. KURUVILLA, M. E., LEE, F. E. H., e LEE, G. B. Understanding asthma phenotypes, endotypes, and mechanisms of disease. **Clinical reviews in allergy & immunology**, 56(2), 219-233 (2019).
41. LA SALA, Andrea et al. Dendritic cells exposed to extracellular adenosine triphosphate acquire the migratory properties of mature cells and show a reduced capacity to attract type 1 T lymphocytes. **Blood**, v. 99, n. 5, p. 1715-1722, 2002.
42. Lazarowski, E. R., & Boucher, R. C. (2009). Purinergic receptors in airway epithelia. *Current opinion in pharmacology*, 9(3), 262-267.
43. LEE, I.-Ta et al. TNF- α induces matrix metalloproteinase-9 expression in A549 cells: role of TNFR1/TRAF2/PKC α -dependent signaling pathways. **Journal of cellular physiology**, v. 224, n. 2, p. 454-464, 2010.
44. LEE, I.-Ta; YANG, Chuen-Mao. Inflammatory signalings involved in airway and pulmonary diseases. **Mediators of inflammation**, v. 2013, 2013
45. LEITCH, A. E. et al. Relevance of granulocyte apoptosis to resolution of inflammation at the respiratory mucosa. **Mucosal immunology**, v. 1, n. 5, p. 350-363, 2008.
46. LI, Ruiting et al. ATP/P2X7-NLRP3 axis of dendritic cells participates in the regulation of airway inflammation and hyper-responsiveness in asthma by mediating HMGB1 expression and secretion. **Experimental Cell Research**, v. 366, n. 1, p. 1-15, 2018.
47. MATTES, Joerg et al. Intrinsic defect in T cell production of interleukin (IL)-13 in the absence of both IL-5 and eotaxin precludes the development of eosinophilia and airways hyperreactivity in experimental asthma. **The Journal of experimental medicine**, v. 195, n. 11, p. 1433-1444, 2002.
48. MESSEMER, Nanette et al. P2X7 receptors at adult neural progenitor cells of the mouse subventricular zone. **Neuropharmacology**, v. 73, p. 122-137, 2013.
49. MIKI-HOSOKAWA, Takako et al. CD69 controls the pathogenesis of allergic airway inflammation. **The Journal of Immunology**, v. 183, n. 12, p. 8203-8215, 2009.
50. MOROSCO, Gregory; KILEY, James. National asthma education and prevention program: Expert panel report 3 (EPR-3): Guidelines for the diagnosis and management of asthma-Summary report 2007. **Journal of allergy and clinical immunology**, v. 120, n. 5, 2007.
51. NATHAN, Carl. Points of control in inflammation. **Nature**, v. 420, n. 6917, p. 846-852, 2002.
52. NELSON, Ryan K. et al. Eosinophilic asthma. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice**, v. 8, n. 2, p. 465-473, 2020.
53. NORTH, R. Alan. Families of ion channels with two hydrophobic segments. **Current opinion in cell biology**, v. 8, n. 4, p. 474-483, 1996.
54. OETTGEN, Hans C.; GEHA, Raif S. IgE regulation and roles in asthma pathogenesis. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 107, n. 3, p. 429-441, 2001.

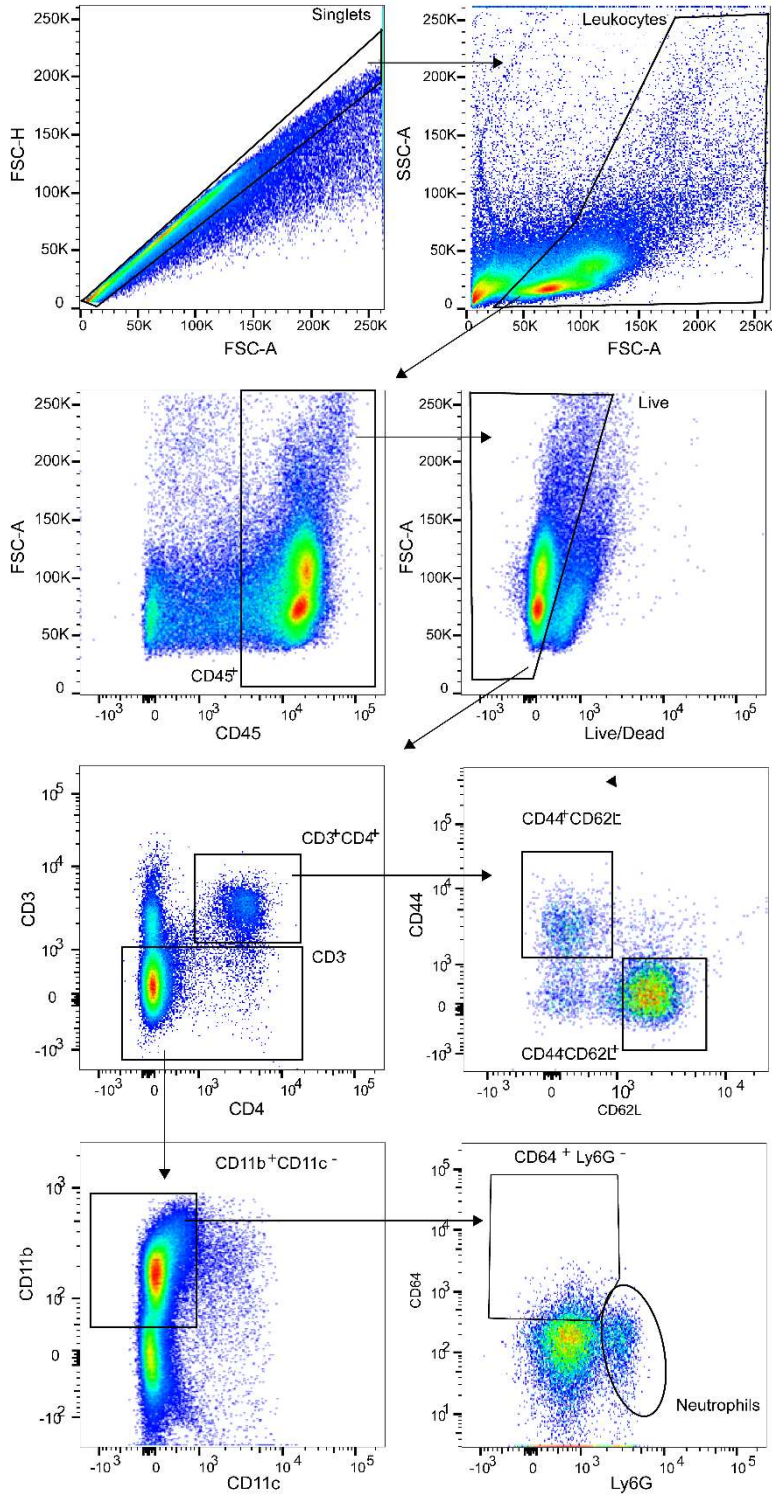
55. PAUL, W. E. What determines Th2 differentiation, in vitro and in vivo?. **Immunology and cell biology**, 88(3), 236-239 (2010).
56. PICKLES, K. et al. "This illness diminishes me. What it does is like theft": a qualitative meta-synthesis of people's experiences of living with asthma. **Health Expectations** 21, 23–40 (2018).
57. PRESTON, Julie A. et al. Inhibition of allergic airways disease by immunomodulatory therapy with whole killed *Streptococcus pneumoniae*. **Vaccine**, v. 25, n. 48, p. 8154-8162, 2007.
58. PROIETTI, Michele et al. ATP-gated ionotropic P2X7 receptor controls follicular T helper cell numbers in Peyer's patches to promote host-microbiota mutualism. **Immunity**, v. 41, n. 5, p. 789-801, 2014.
59. RADULOVIC, Katarina et al. The early activation marker CD69 regulates the expression of chemokines and CD4 T cell accumulation in intestine. **PLoS one**, v. 8, n. 6, p. e65413, 2013.
60. RAY, Anuradha et al. Th2 cells and GATA-3 in asthma: new insights into the regulation of airway inflammation. **The Journal of clinical investigation**, v. 104, n. 8, p. 985-993, 1999.
61. RISSIEK, Björn et al. P2X7 on mouse T cells: one channel, many functions. **Frontiers in immunology**, v. 6, p. 204, 2015.
62. ROBERTSON, Jennifer M.; JENSEN, Peter E.; EVAVOLD, Brian D. DO11. 10 and OT-II T cells recognize a C-terminal ovalbumin 323–339 epitope. **The Journal of Immunology**, v. 164, n. 9, p. 4706-4712, 2000.
63. RUSSO, Momtchilo et al. Suppression of asthma-like responses in different mouse strains by oral tolerance. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 24, n. 5, p. 518-526, 2001.
64. SAKAI, Shunsuke et al. Cutting edge: Control of *Mycobacterium tuberculosis* infection by a subset of lung parenchyma-homing CD4 T cells. **The Journal of Immunology**, v. 192, n. 7, p. 2965-2969, 2014.
65. SALLES, Érika M. et al. P2X7 receptor drives Th1 cell differentiation and controls the follicular helper T cell population to protect against *Plasmodium chabaudi* malaria. **PLoS Pathogens** v. 13, n. 8, p. e1006595, 2017.
66. SHENKER, Bruce J. et al. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* cytolethal distending toxin activates the NLRP3 inflammasome in human macrophages, leading to the release of proinflammatory cytokines. **Infection and immunity**, v. 83, n. 4, p. 1487-1496, 2015.
67. SIMPSON, Jodie L.; PHIPPS, Simon; GIBSON, Peter G. Inflammatory mechanisms and treatment of obstructive airway diseases with neutrophilic bronchitis. **Pharmacology & therapeutics**, v. 124, n. 1, p. 86-95, 2009.
68. STARKEY, Malcolm Ronald et al. Murine models of infectious exacerbations of airway inflammation. **Current opinion in pharmacology**, v. 13, n. 3, p. 337-344, 2013.
69. STONE, K. D., PRUSSIN, C., e METCALFE, D. D. IgE, mast cells, basophils, and eosinophils. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, 125(2), S73-S80 (2010).
70. SURPRENANT, A. et al. The cytolytic P2Z receptor for extracellular ATP identified as a P2X receptor (P2X7). **Science**, v. 272, n. 5262, p. 735-738, 1996.
71. THORBURN, Alison N. et al. Components of *Streptococcus pneumoniae* suppress allergic airways disease and NKT cells by inducing regulatory T cells. **The Journal of Immunology**, v. 188, n. 9, p. 4611-4620, 2012.

72. VALERA, Soledad et al. A new class of ligand-gated ion channel defined by P2x receptor for extracellular ATP. **Nature**, v. 371, n. 6497, p. 516, 1994.
73. WAREHAM, Kathryn J.; SEWARD, Elizabeth P. P2X7 receptors induce degranulation in human mast cells. **Purinergic signalling**, v. 12, n. 2, p. 235-246, 2016.
74. WENZEL, S. E. et al. Evidence that severe asthma can be divided pathologically into two inflammatory subtypes with distinct physiologic and clinical characteristics. **American journal of respiratory and critical care medicine**, 160(3), 1001-1008 (1999).
75. WILHELM, Konrad et al. Graft-versus-host disease is enhanced by extracellular ATP activating P2X 7 R. **Nature medicine**, v. 16, n. 12, p. 1434, 2010.
76. WOLTERINK, Roel GJ Klein et al. Pulmonary innate lymphoid cells are major producers of IL-5 and IL-13 in murine models of allergic asthma. **European journal of immunology**, v. 42, n. 5, p. 1106-1116, 2012.
77. World Health Organization. Asma News. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/q-a-detail/asthma>> Acesso em: 19 de setembro de 2020

8 Anexos

ANEXO I

A



B

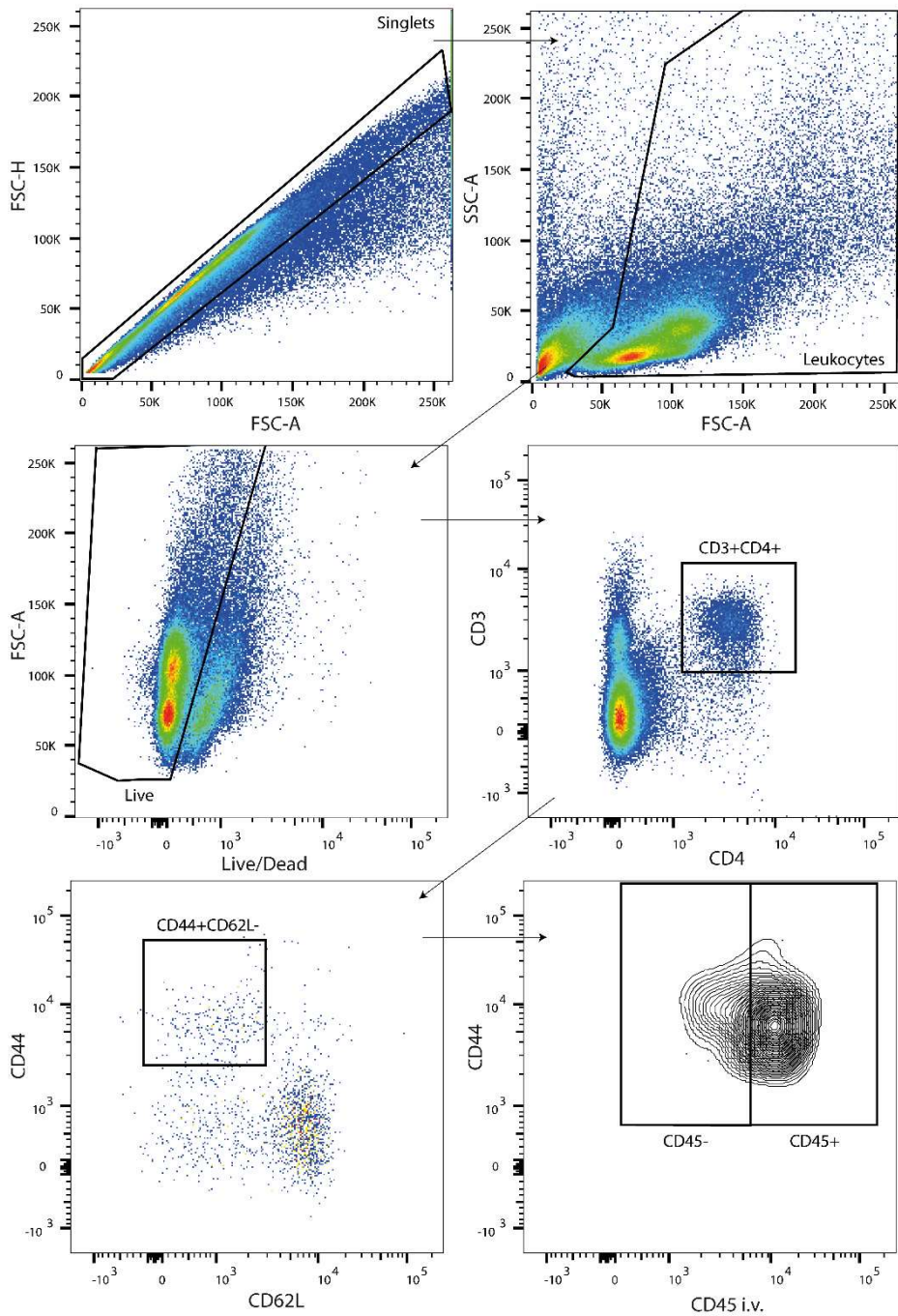


Figura 1. Estratégia de análise de células do pulmão. (A) Estratégia de janelas utilizada para análise de células CD4+ e células inatas pulmonares obtidas através de citometria de fluxo. (B) Estratégia de janelas utilizada para análise de diferenciação de células do parênquima e da vasculatura pulmonare obtidas através de citometria de fluxo.

ANEXO II

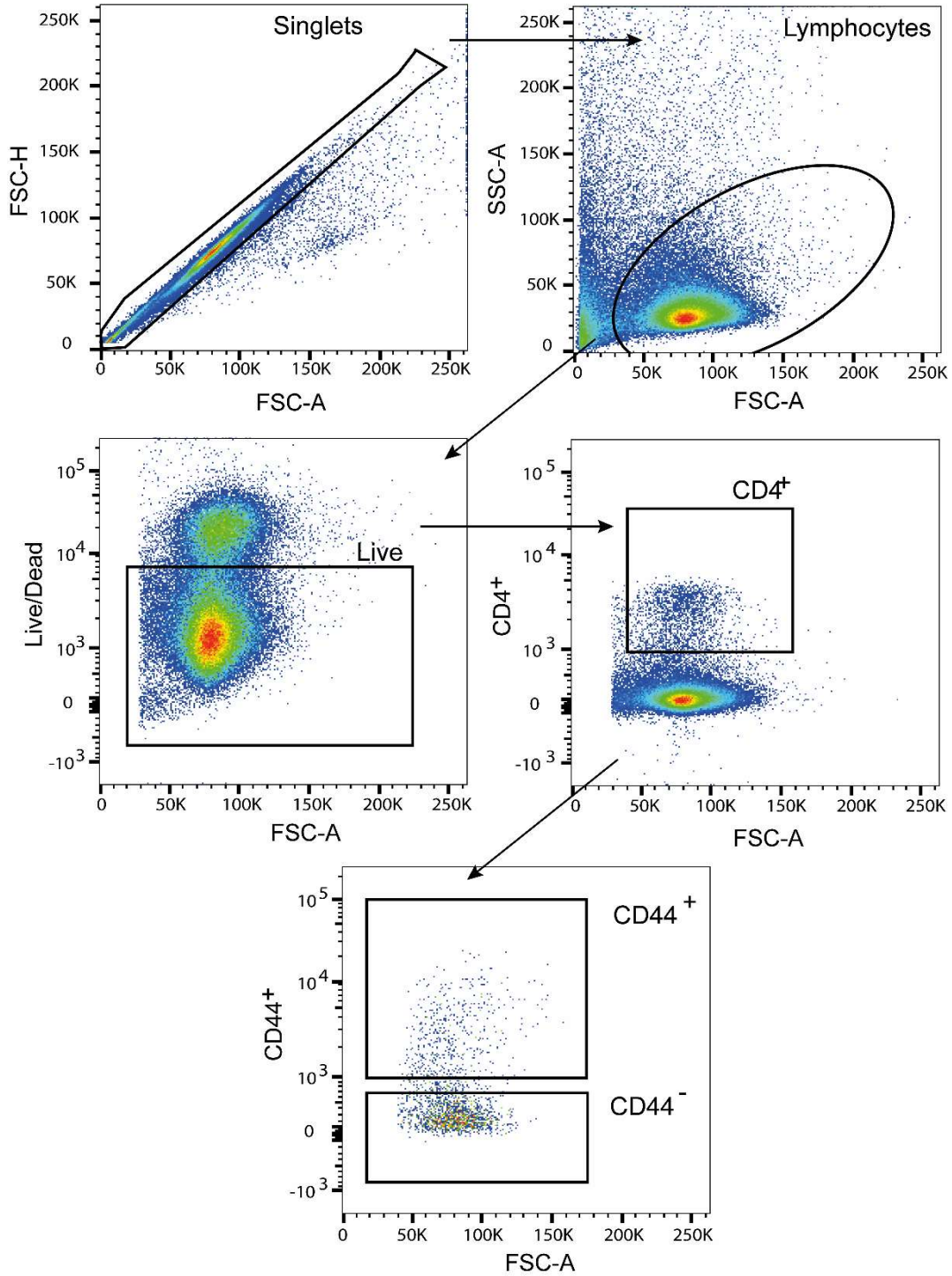


Figura 1. Estratégia de análise de células do linfonodo mediastinal. Estratégia de janelas utilizada para análise de células CD4⁺ obtidas através de citometria de fluxo.