

**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

2020

**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<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria Regina D'Império Lima

Versão Original

São Paulo

2020

## 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 DImpério Lima. -- São Paulo, 2020.  
76 p.

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

1. Asma. 2. ATP. 3. P2X7. I. DImpério 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: <b>Biotério do Departamento de Imunologia</b>			
Espécie: <b>Camundongos isogênicos</b>	sexo: <b>Fêmeas</b>	Idade ou peso: <b>6 a 8 semanas</b>	
Linhagem: <b>CS7BL/6 Wild-type</b>		<b>N amostral: 162</b>	
Origem: <b>Biotério do Departamento de Imunologia</b>			
Espécie: <b>Camundongo geneticamente modificado (OGM)</b>	sexo: <b>Fêmeas</b>	Idade ou peso: <b>6 a 8 semanas</b>	
Linhagem: <b>OT-II (CS7BL/6)</b>		<b>N amostral: 240</b>	
Origem: <b>Biotério do Departamento de Imunologia</b>			
Espécie: <b>Camundongo híbrido</b>	sexo: <b>Fêmeas</b>	Idade ou peso: <b>6 a 8 semanas</b>	
Linhagem: <b>OT-II P2X7 KO (CS7BL/6)</b>		<b>N amostral: 240</b>	

São Paulo, 20 de outubro de 2020



Prof. 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; e 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 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. F. 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 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<sup>-/-</sup>* apresentam menor número de células CD4<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup> localizadas no parênquima pulmonar em comparação a camundongos C57BL/6 durante a asma experimental, e apresentam infiltrado de células CD4<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>GATA3<sup>+</sup>, similar aos camundongos não imunizados, mesmo após imunização. Além disso, o linfonodo de camundongos *P2rx7<sup>-/-</sup>* 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 regulação através dessas moléculas 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<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>GATA3<sup>+</sup>. 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. F. 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 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<sup>-/-</sup>* mice showed lower number of CD4<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup> cells localized in the lung parenchyma compared to C57BL/6 mice during experimental asthma, as well as, these mice have CD4<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>GATA3<sup>+</sup> cell infiltration similar to non-immunized mice, even upon immunization. In addition, mediastinal lymph node of immunized *P2rx7<sup>-/-</sup>* 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 the regulation through these molecules in the 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<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>GATA3<sup>+</sup> 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

<b>Figura 1.</b> Imunopatologia da asma. ....	21
<b>Figura 2.</b> Avaliação do tecido e das células do pulmão em camundongos C57BL/6 e P2rx7 <sup>-/-</sup> durante asma experimental. ....	36
<b>Figura 3.</b> Avaliação das células T CD4 <sup>+</sup> do pulmão de camundongos C57BL/6 e P2rx7 <sup>-/-</sup> durante asma experimental. ....	38
<b>Figura 4.</b> Avaliação das células T CD4 <sup>+</sup> CD44 <sup>+</sup> CD62L <sup>-</sup> do pulmão de camundongos C57BL/6 e P2rx7 <sup>-/-</sup> durante asma experimental. ....	40
<b>Figura 5.</b> Avaliação de células do parênquima e da vasculatura de camundongos C57BL/6 e P2rx7 <sup>-/-</sup> durante asma experimental. ....	43
<b>Figura 6.</b> Avaliação dos fatores de transcrição GATA3, T-bet e FOXP3 em células CD4 <sup>+</sup> do parênquima e da vasculatura de camundongos C57BL/6 e P2rx7 <sup>-/-</sup> durante asma experimental. ....	45
<b>Figura 7.</b> Caracterização de células do linfonodo mediastinal de camundongos C57BL/6 e P2rx7 <sup>-/-</sup> durante asma experimental. ....	47
<b>Figura 8.</b> Avaliação de IgE sérico de camundongos C57BL/6 e P2rx7 <sup>-/-</sup> durante asma experimental. ....	48
<b>Figura 9.</b> 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
<b>Figura 10.</b> 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
<b>Figura 11.</b> Avaliação por citometria de fluxo de células T CD4 <sup>+</sup> do pulmão após administração de ATP via i.n. durante desafios com OVA em camundongos previamente imunizados. ....	52
<b>Figura 12.</b> Caracterização do lavado bronquioalveolar (BAL) após administração de ATP via i.n. durante desafios com OVA em camundongos previamente imunizados. ....	54
<b>Figura 13.</b> 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
<b>Figura 14.</b> 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 $\alpha$ -** 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-** Linfopoietina do Estroma Tímico

**COX2-** Ciclooxigenase 2

**TNF-** Fator de necrose tumoral

**Th-** *T helper*

**Tfh-** *T helper* folicular

## **PCR- Reação em Cadeia de Polimerase**

# Sumário

<b>1 Introdução.....</b>	<b>16</b>
1.1 Inflamação pulmonar e a asma .....	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
<b>2 Objetivos .....</b>	<b>27</b>
2.1 Objetivo geral.....	28
2.2 Objetivos específicos.....	28
<b>3 Metodologia .....</b>	<b>29</b>
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
<b>4 Resultados.....</b>	<b>34</b>
4.1 O receptor P2X7 é crucial para o desenvolvimento da inflamação asmática experimental .....	35
4.2 Camundongos P2rx7 <sup>-/-</sup> apresentam infiltrado pulmonar de células TCD4 <sup>+</sup> CD44 <sup>+</sup> na asma experimental .....	37
4.3 Camundongos P2rx7 <sup>-/-</sup> não apresentam infiltrado pulmonar de células Th1 ou Th2 na asma experimental .....	39
4.4 Camundongos P2rx7 <sup>-/-</sup> apresentam menos células efectoras T CD4 <sup>+</sup> no parênquima pulmonar quando comparados a camundongos C57BL/6 durante asma experimental.....	41
4.5 Camundongos P2rx7 <sup>-/-</sup> não apresentam infiltrado pulmonar de células Th2 no parênquima e na vasculatura durante asma experimental .....	44
4.6 Linfonodo mediastinal de camundongos P2rx7 <sup>-/-</sup> apresentam menos células após desenvolvimento de asma experimental comparado a camundongos C57BL/6.....	46

4.7 Camundongos P2rx7 <sup>-/-</sup> 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
<b>5 Discussão.....</b>	<b>58</b>
<b>6 Conclusões.....</b>	<b>65</b>
<b>7 Referências.....</b>	<b>67</b>
<b>8 Anexos .....</b>	<b>73</b>

# 1 Introdução



## **1.1 Inflamação pulmonar e a asma**

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<sup>+</sup>. Desde a descoberta da subdivisão clássica de células T CD4<sup>+</sup> (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 linfopietina 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).

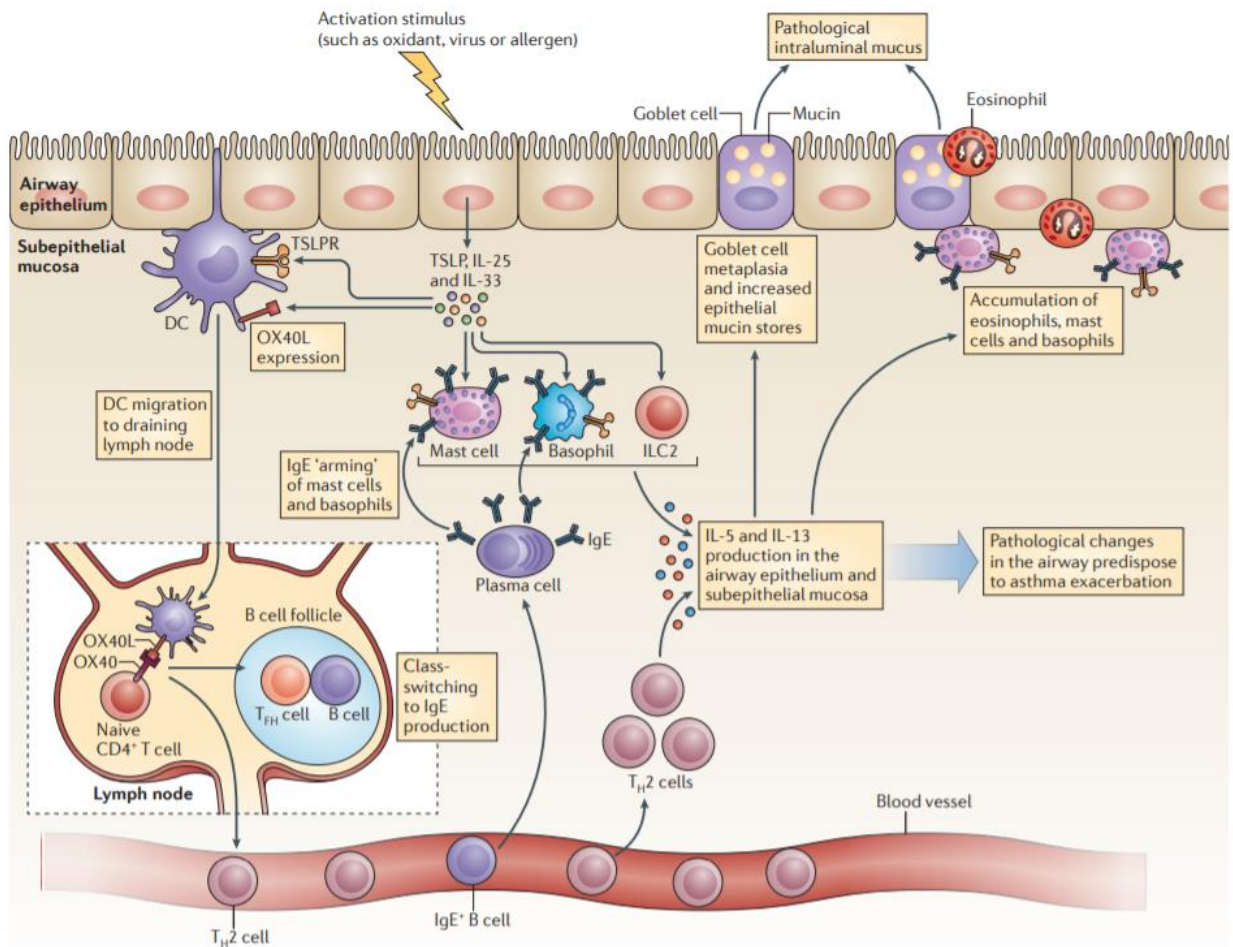
Além da ativação de ILC2, as alarminas são responsáveis pela ativação de APCs especializadas como células dendríticas, macrófagos e células B, que realizam o *uptake* do antígeno iniciando o processo de internalização e processamento antigênico após drenagem para o linfonodo mais próximo (EPSTEIN, 2004). Os peptídeos processados são apresentados através de complexos com moléculas de MHC de classe II e receptores de linfócitos T CD4<sup>+</sup>. 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<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> 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 $\alpha$ ) 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 $\alpha$ <sup>+</sup> 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- $\gamma$ , 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<sup>+</sup> *naive* para um perfil Th2. Essas células, por sua vez, migram para zonas de células B, iniciando sua diferenciação em células T<sub>H</sub>, 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- $\alpha$ ), 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 $\beta$ , 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<sup>+</sup> 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<sup>+</sup>, 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<sup>-/-</sup>* 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<sup>+</sup> 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

### **3.1 Camundongos**

Camundongos fêmeas C57BL/6 e B6.129P2-P2rx7tm1Gab/J (*P2rx7<sup>-/-</sup>*) livres de patógenos específicos (6-8 semanas de idade; originalmente do Laboratório Jackson, EUA) foram criados na instalação de camundongos isogênicos do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (USP), Brasil. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com os regulamentos nacionais das diretrizes éticas para experimentação em camundongos com o número de licença 2221100918.

### **3.2 Imunização e desafio com OVA e ATP**

Para a imunização, os camundongos foram anestesiados via intraperitoneal (i.p.) com cetamina (50mg/kg- Syntec, Brasil) e xilazina (20mg/kg- Syntec), e injetados duas vezes com intervalo de 7 dias por via subcutânea (s.c.) na área dorsal com 180 µL de uma solução contendo 60 µL de Imject® Alum (Thermo Fisher Scientific, EUA) e 100 µg de Ovalbumina V (OVA; Sigma-Aldrich, EUA) ou tampão fosfato salina (PBS). Sete dias após a última imunização, os camundongos foram desafiados por via intranasal (i.n.) com 3 doses a cada 2 dias de 10 µg / 40 µL de OVA diluído em PBS ou OVA + ATP (Amersham Biosciences, UK) nas concentrações 1 mM, 4,5 mM e 50 mM. Os camundongos controles receberam PBS nas mesmas condições. Para avaliação utilizando inibidor seletivo de receptores P2X7, camundongos foram tratados com BBG (50mg/kg - Sigma-Aldrich, EUA) por via i.p 30 minutos prévios a cada desafio intranasal.

### **3.3 Coloração intravascular**

Uma solução de 100 µL contendo 2,5 µg de anticorpos monoclonais marcados com V500 (mAbs) para CD45 (30-F11, BD Biosciences, EUA) foi injetada por via intravenosa (iv) e os pulmões foram colhidos após 3 minutos, conforme descrito anteriormente (SAKAI et al., 2014).

### **3.4 Obtenção de células de pulmão e linfonodo**

Para obtenção de células do pulmão, os lobos do pulmão direito foram digeridos com 100 U / mL de colagenase tipo IV (Sigma-Aldrich) em meio RPMI 1640 suplementado com penicilina (100 U/mL), estreptomicina (100µg/mL), L-glutamina (2 mM), piruvato de sódio (1 mM) e 3% de soro fetal de bovino inativado por calor (SBF) (Thermo Fisher Scientific), a 37° C por 40 minutos. As suspensões de células foram filtradas em um filtro de células (Corning, EUA), incubadas com tampão de lise (40mM

NH<sub>4</sub>Cl, 4.2mM Tris, pH 7,4) a 4 ° C por 4 minutos para eliminação dos eritrócitos sendo posteriormente contadas em câmara de Neubauer utilizando solução Azul de Tripán.

Para obtenção de células do linfonodo, linfonodos axiais e mediastinal foram coletados e macerados em 3 ml de meio RPMI suplementado. Após centrifugação, células foram ressuspensas em meio RPMI para contagem.

### **3.5 Histologia e score de infiltrado celular**

Os lobos do pulmão esquerdo foram fixados com formaldeído a 10% e incluídos em parafina. Cortes de tecido de 4 a 5 µm foram corados pelos métodos de hematoxilina-eosina (HE) ou ácido periódico de Schiff (PAS). Para determinar o grau de infiltração de células inflamatórias, toda a área da secção foi avaliada em microscópio óptico (Nikon Eclipse E200, Japão) com aumento de 200X. Escores de 0 a 5 foram atribuídos a cada campo microscópico, em que: 0, sem células inflamatórias; 1, células inflamatórias esparsas; 2, uma camada de células inflamatórias ao redor da estrutura avaliada; 3, anel de células inflamatórias contendo 2 a 4 camadas; 4, agrupamento focal de células inflamatórias ao redor da estrutura; 5, infiltrado inflamatório intenso (GOUVEIA et al., 2013).

### **3.6 Análise de citometria de fluxo**

As células ( $1 \times 10^6$ ) foram marcadas com mAbs FITC-, PE-, APC-, PerCP-, PE-Cy7-, APC-Cy7-, AmCyan-, BV605- ou Pacific Blue associados a CD4 (RM4-5), CD44 (IM7), CD62L (MEL-14), CD69 (H1.2F3), CD45 (30-F11) (BD Biosciences), CD3 (145-2C11) CD11b (M1/70), CD11c (HL13), LY6G (1A8), LY6C (HK1.4), CD64 (HL13) (Thermo Fisher Scientific). Para a marcação intracelular de fatores de transcrição, mAbs marcados com FITC-, PE- e PerCP para GATA3 (TWAJ, Thermo Fisher Scientific), FOXP3 (FJK-16s) e T-bet (eBio4B10) (BD Biosciences) foram usados de acordo com as instruções do fabricante. A viabilidade celular foi determinada com o kit de coloração de células mortas vermelhas fixas LIVE / DEAD (Thermo Fisher Scientific). As células foram analisadas por citometria de fluxo usando os dispositivos FACSCanto e LSRFortessa X-20 com o software DIVA (BD Biosciences). Os dados foram analisados com o software FlowJo v.10.5.3 (TreeStar Inc., EUA).

### 3.7 Estratégia de análise

Para avaliação das diferentes populações de interesse, diversas estratégias de análise foram realizadas. Para avaliação de células T CD4<sup>+</sup> infiltradas no pulmão, uma janela na região de *singlets* foi realizada, seguido da realização de janela na região dos leucócitos e posterior seleção das células CD45<sup>+</sup>. A partir dessa janela, as células vivas foram selecionadas e dentro dessa janela, células CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> foram selecionadas. Na janela de células CD4<sup>+</sup>, as células CD44<sup>+</sup> ou CD44<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup> (efetoras) foram analisadas (Anexo I). Para análise de células CD3<sup>-</sup> do pulmão, após seleção de células vivas, as células CD3<sup>-</sup> foram selecionadas, e janelas na região CD11b<sup>+</sup>CD11c<sup>-</sup> foram realizadas. Células Ly6G<sup>+</sup> foram selecionadas para identificação de neutrófilos e células Ly6G<sup>-</sup>CD64<sup>+</sup> foram selecionadas para análise de granulócitos (eosinófilos) e monócitos Ly6C<sup>low</sup> e Ly6C<sup>high</sup> (Anexo I). Para análise de diferenciação de células da vasculatura e do parênquima pulmonar, uma janela na região de *singlets* foi realizada, seguido da realização de janela na região dos leucócitos. A partir dessa janela, as células vivas foram selecionadas e dentro dessa janela, células CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> foram avaliadas. Na janela de células CD4<sup>+</sup>, as células CD44<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup> (efetoras) foram analisadas, seguida da diferenciação de células do parênquima e da vasculatura através do marcador CD45 i.v. (Anexo I).

Para análise de células do linfonodo mediastinal uma janela na região de *singlets* foi realizada, seguido da realização de janela na região de linfócitos e posterior seleção das células CD4<sup>+</sup>. A partir dessa janela, as células vivas foram selecionadas e dentro dessa janela, células CD4<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup> foram selecionadas para posteriores análises (Anexo II).

### 3.8 Obtenção de soro

Para obtenção de soro, após eutanásia do camundongo, 500 µL de sangue foram coletados via punção cardíaca. Após 3 minutos em descanso para formação de coágulo, os tubos foram centrifugados por 10 minutos (1000 rpm, 4°C). O soro foi obtido e armazenado à ≤ -20° C para posteriores análises.

### 3.9 Obtenção de lavado bronquioalveolar (BAL)

Para obtenção de lavado bronquioalveolar, após eutanásia do camundongo, uma incisão foi realizada na região da traqueia onde uma cânula acoplada à uma seringa foi inserida. Um volume de 1 mL de PBS gelado foi injetado no pulmão e



sugado de volta gentilmente para seringa. O conteúdo foi armazenado e esse procedimento repetido duas vezes. O conteúdo obtido foi centrifugado (10 minutos, 1600 rpm, 4°C). As células obtidas foram utilizadas para contagem diferencial de leucócitos e o sobrenadante armazenado a -80°C para posteriores análises.

### **3.10 Contagem diferencial de leucócitos**

A contagem diferencial de leucócitos foi realizada através de células obtidas pelo lavado bronquioalveolar. As células foram centrifugadas para transferência para lâminas (600rpm, 6minutos) e posteriormente as lâminas foram coradas pelo método panótico rápido com o uso de fixador, eosina e hematoxilina (Laborclin, Brasil). A contagem foi realizada utilizando microscópio óptico (Nikon Eclipse E200), em aumento de 400x.

### **3.11 Quantificação de IgE sérica e IL-4 obtida de BAL**

As concentrações séricas totais de IgE e IL-4 foram determinadas utilizando o kit BD OptEIA, de acordo com as diretrizes do fabricante (BD Biosciences). Os valores de absorvância foram quantificados em espectrofotômetro Spectra Max 190 com filtro de comprimento de onda de 450 nm (Molecular Devices, EUA).

### **3.12 Análise estatística**

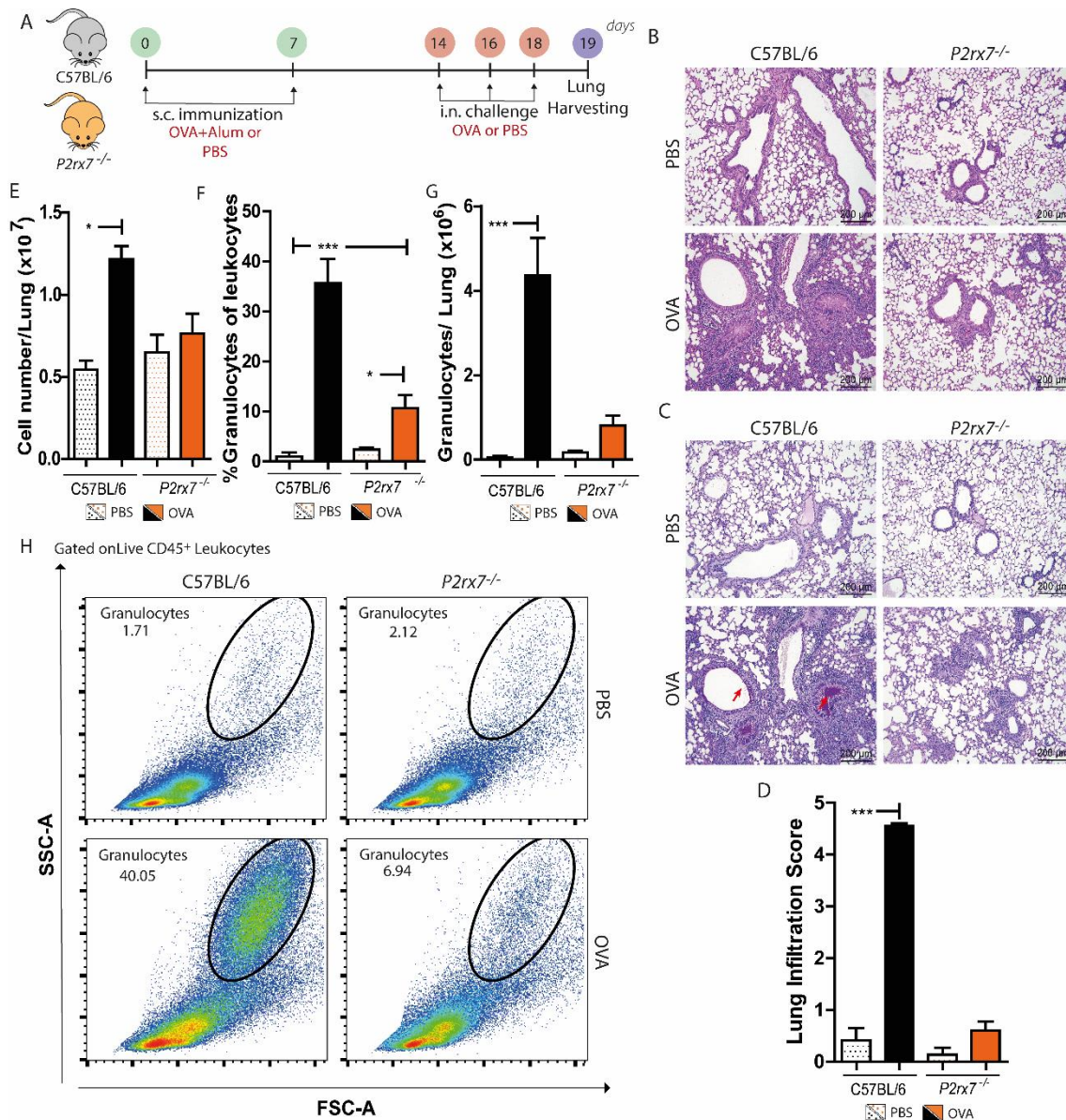
A análise estatística foi realizada por meio do software GraphPad Prism 5 (versão 5.0.0; GraphPad Software Inc., EUA). O teste *one-way ANOVA* com *post-test* Tukey foram usados para avaliar os efeitos de apenas 1 parâmetro entre mais de 2 grupos. O teste T não pareado foi realizado para comparar 2 grupos. As diferenças entre os grupos foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ .

# 4 Resultados

## PARTE 1. O PAPEL DO RECEPTOR P2X7 NA ASMA EXPERIMENTAL

### 4.1 O receptor P2X7 é crucial para o desenvolvimento da inflamação asmática experimental

A fim de investigar o papel do receptor P2X7 na inflamação pulmonar asmática, camundongos C57BL/6 e *P2rx7<sup>-/-</sup>* foram imunizados por via s.c. e desafiados via intranasal i.n. com OVA (Figura 2A). Camundongos C57BL/6 imunizados e desafiados com OVA exibiram infiltrado celular e produção de muco nos pulmões, enquanto camundongos *P2rx7<sup>-/-</sup>* submetidos ao mesmo protocolo não desenvolveram asma experimental, apresentando histologia pulmonar semelhante aos controles (Figuras 2B-D). A análise de células do pulmão por citometria de fluxo demonstrou aumento do número de células (Figura 2E), particularmente de granulócitos (Figuras 2F-H), no pulmão de camundongos C57BL/6 asmáticos; esse fenômeno não ocorreu em camundongos *P2rx7<sup>-/-</sup>* imunizados e desafiados.

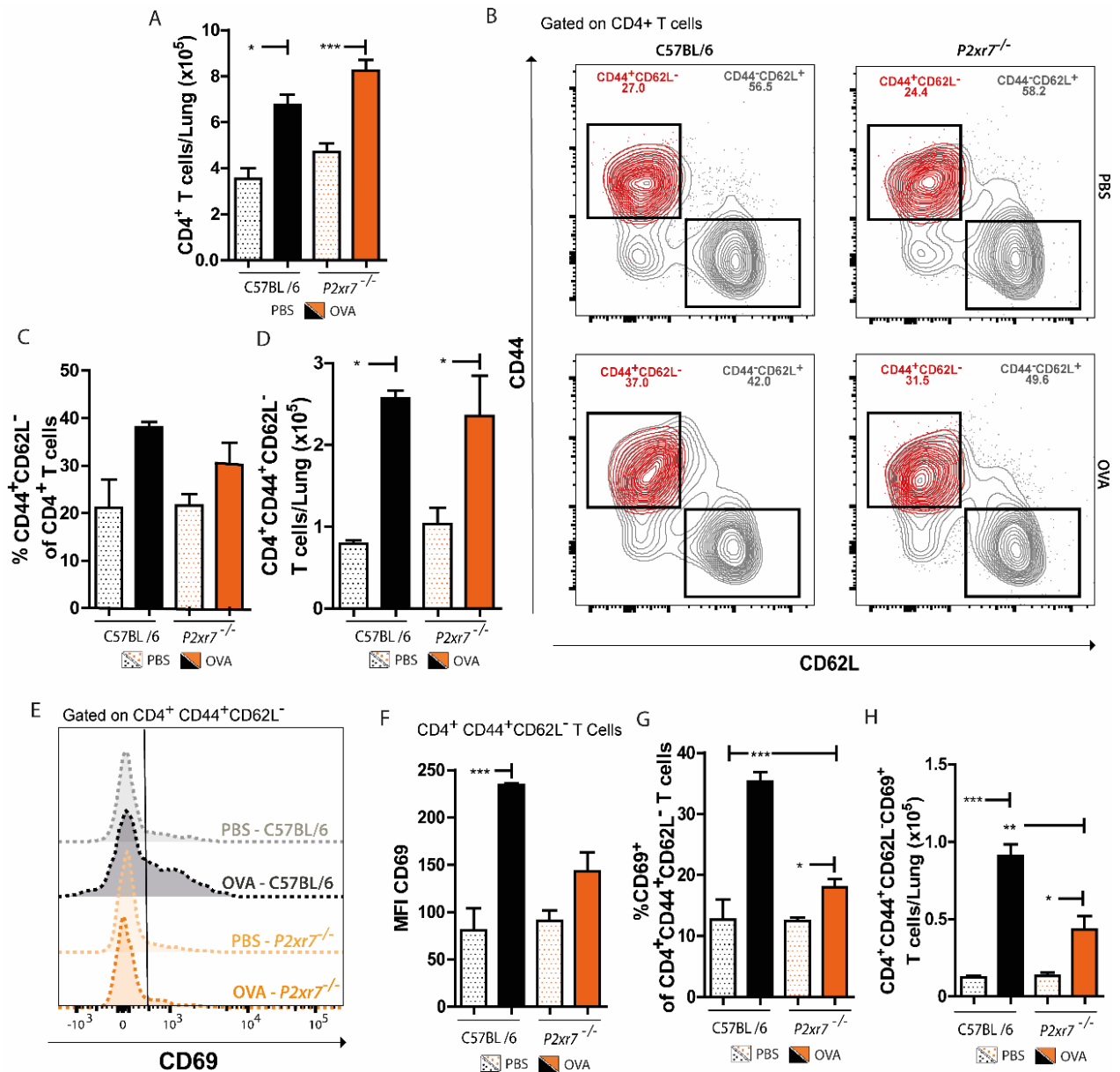


**Figura 2. Avaliação do tecido e das células do pulmão em camundongos C57BL/6 e P2rx7<sup>-/-</sup> durante asma experimental.** Camundongos C57BL/6 e P2rx7<sup>-/-</sup> foram inoculados com duas doses de OVA e Alum ou PBS por via s.c. com 7 dias de intervalo. Nos dias 14, 16 e 18, os animais foram inoculados via i.n. com 3 doses de OVA ou PBS. O pulmão foi avaliado no dia 19 pós-imunização. (A) A ilustração esquemática mostra o protocolo experimental. (B) Cortes corados com eosina-hematoxilina mostram o infiltrado inflamatório no pulmão (aumento de 10x; escalas de barra correspondem a 200  $\mu$ m). (C) Cortes corados com ácido periódico de Schiff mostram produção de muco nos pulmões (aumento de 10x; escalas de barra correspondem a 200  $\mu$ m). Setas vermelhas indicam presença de muco. (D) Os escores de infiltrados celulares foram determinados a partir da análise do tecido. (E) Os números totais de células por pulmão foram determinados utilizando contagem de leucócitos viáveis em câmara de Neubauer. (F e G) As frequências e os números de granulócitos por pulmão foram determinados por citometria de fluxo. (H) Os gráficos de ponto mostrando a dispersão frontal versus lateral (FSC vs SSC) das células do pulmão foram utilizados para calcular o número de granulócitos. Os dados foram expressos como médias  $\pm$  DP. Teste de comparação múltipla de grupos *One-way ANOVA* foi utilizado com \* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$ . Total de 2 experimentos

independentes (n = 14). C57BL/6 CTL n = 2, C57BL/6 OVA n = 5, *P2rx7<sup>-/-</sup>* CTL n = 2, *P2rx7<sup>-/-</sup>* OVA n = 5.

#### **4.2 Camundongos *P2rx7<sup>-/-</sup>* apresentam infiltrado pulmonar de células TCD4<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup> na asma experimental**

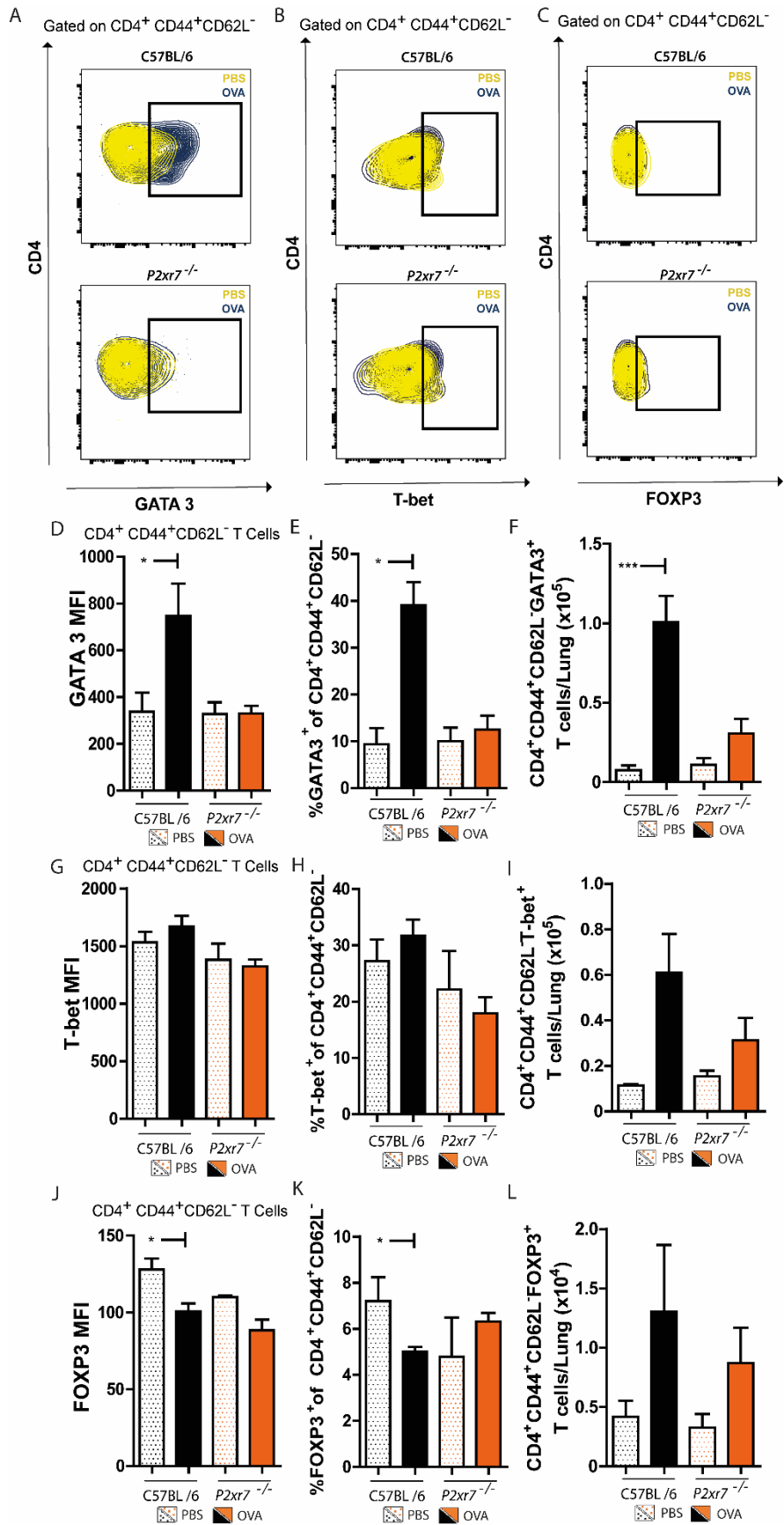
Utilizando citometria de fluxo avaliamos as células T CD4<sup>+</sup> no pulmão dos camundongos, sendo constatado o aumento de infiltrado pulmonar de células T CD4<sup>+</sup> nos camundongos C57BL/6 e *P2rx7<sup>-/-</sup>* após a imunização e o desafio com OVA (Figura 3A). Além disso, os camundongos de ambos os grupos imunizados e desafiados apresentaram aumento do número de células T CD4<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup> infiltradas no pulmão em comparação com os camundongos não imunizados, apesar de não terem sido observadas alterações nas frequências dessas células (Figuras 3B-D). Entretanto, a avaliação de células T CD4<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup> do pulmão de camundongos *P2rx7<sup>-/-</sup>* imunizados e desafiados demonstrou aumento discreto na expressão de CD69 (Figuras 3E-H) em comparação com os controles, enquanto estas respostas foram bastante evidentes nos camundongos C57BL/6 asmáticos. A molécula CD69 é descrita como um marcador de ativação recente de linfócitos, sendo associada ao processo de migração de células imunes para o sítio de inflamação (MIKI-HOSOKAWA et al., 2009 e RADULOVIC et al., 2013).



**Figura 3. Avaliação das células T CD4<sup>+</sup> do pulmão de camundongos C57BL/6 e P2rx7<sup>-/-</sup> durante asma experimental.** Camundongos C57BL/6 e P2rx7<sup>-/-</sup> foram inoculados com duas doses de OVA e Alum ou PBS por via s.c. com 7 dias de intervalo. Nos dias 14, 16 e 18, os animais foram inoculados via i.n. com 3 doses de OVA ou PBS. O pulmão foi avaliado no dia 19 pós-imunização. (A) O número total de células T CD4<sup>+</sup> do pulmão foi determinado por citometria de fluxo. (B-D) Com base na análise da expressão de CD44 e CD62L em células CD4<sup>+</sup>, as frequências e os números de células efetoras (CD44<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup>) foram determinados. (E-H) As células efetoras foram avaliadas quanto à expressão de CD69, utilizando histogramas para a determinação das frequências de células positivas. Os dados foram expressos como médias ± DP. Teste de comparação múltipla de grupos *One-way ANOVA* foi utilizado com \**p* < 0.05, \*\*\**p* < 0.001. Total de 2 experimentos independentes (n = 14). C57BL/6 CTL n = 2, C57BL/6 OVA n = 5, P2rx7<sup>-/-</sup> CTL n = 2, P2rx7<sup>-/-</sup> OVA n = 5.

### **4.3 Camundongos *P2rx7<sup>-/-</sup>* não apresentam infiltrado pulmonar de células Th1 ou Th2 na asma experimental**

As células Th2 são intimamente relacionadas com os processos de desenvolvimento da inflamação eosinofílica na asma (KURUVILLA et al., 2019). Dessa forma, investigamos os efeitos da ausência do receptor P2X7 em linfócitos T CD4<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup> CD62L<sup>-</sup> relacionados a expressão de fatores de transcrição durante a asma experimental (Figuras 4A-C). As células T CD4<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup> do pulmão de camundongos *P2rx7<sup>-/-</sup>* imunizados e desafiados praticamente não apresentam alteração na expressão de GATA3 e no número de células T CD4<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup> GATA3<sup>+</sup> em comparação com os controles (Figuras 4D-F), enquanto estas respostas foram bastante evidentes nos camundongos C57BL/6 asmáticos. As células T CD4<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup> de camundongos C57BL/6 e *P2rx7<sup>-/-</sup>* imunizados e desafiados não apresentam alterações na expressão de T-bet e no número dessas células, enquanto células T CD4<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup> de camundongos C57BL/6 apresentam diminuição na expressão de FOXP3, mas não no número de células em comparação aos controles e (Figuras 4G-L).



**Figura 4. Avaliação das células T CD4<sup>+</sup> CD44<sup>+</sup> CD62L<sup>-</sup> do pulmão de camundongos C57BL/6 e P2rx7<sup>-/-</sup> durante asma experimental. Camundongos C57BL/6 e P2rx7<sup>-/-</sup> foram**

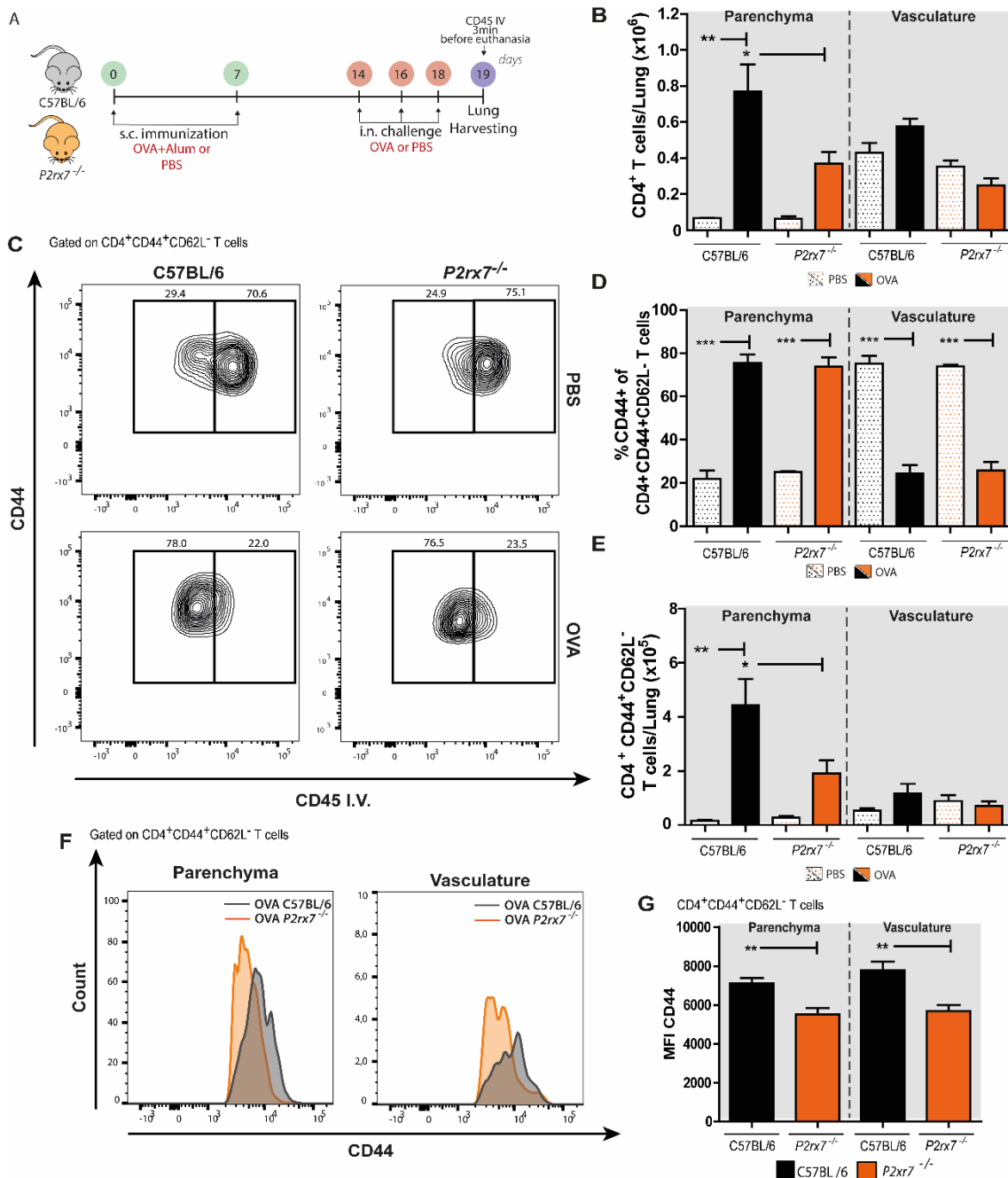


inoculados com duas doses de OVA e Alum ou PBS por via s.c. com 7 dias de intervalo. Nos dias 14, 16 e 18, os animais foram inoculados via i.n. com 3 doses de OVA ou PBS. O pulmão foi avaliado no dia 19 pós-imunização. (A-C) Gates representativos da expressão de GATA3, T-bet e FOXP3 em células T CD4<sup>+</sup> efetoras. (D-F) As células efetoras foram avaliadas quanto à expressão de GATA 3, sendo determinadas as frequências de células positivas, os números de células nos pulmões e as médias de intensidade de fluorescência (MFIs). (G-I) As células efetoras foram avaliadas quanto à expressão de T-bet, sendo determinadas as frequências de células positivas, os números de células nos pulmões e as médias de intensidade de fluorescência (MFIs). (J-L) As células efetoras foram avaliadas quanto à expressão de FOXP3, sendo determinadas as frequências de células positivas, os números de células nos pulmões e as médias de intensidade de fluorescência (MFIs). Os dados foram expressos como médias ± DP. Teste de comparação múltipla de grupos One-way ANOVA foi utilizado com \*p < 0.05, \*\*\*p < 0.001. Para figuras A-C, total de 2 experimentos independentes (n = 14). C57BL/6 CTL n = 2, C57BL/6 OVA n = 5, P2rx7<sup>-/-</sup> CTL n = 2, P2rx7<sup>-/-</sup> OVA n = 5. Para figuras D-I, total de 1 experimento (n=14). C57BL/6 CTL n=3, C57BL/6 OVA n=4, P2rx7<sup>-/-</sup> CTL n=2, P2rx7<sup>-/-</sup> OVA n=5.

#### **4.4 Camundongos P2rx7<sup>-/-</sup> apresentam menos células efetoras T CD4<sup>+</sup> no parênquima pulmonar quando comparados a camundongos C57BL/6 durante asma experimental**

Uma das hipóteses que buscamos para compreender o fenômeno de proteção relacionado a inflamação asmática observado em camundongos P2rx7<sup>-/-</sup> é a de que o receptor P2X7 estaria relacionado a capacidade de infiltração e/ou manutenção de células efetoras no parênquima pulmonar. Sakai e colaboradores (2014) demonstraram a importância da localização de células T CD4<sup>+</sup> efetoras para resposta efetivas na tuberculose, e recentemente nosso grupo tem demonstrado que a ausência do receptor P2X7 em células TCD4<sup>+</sup> está relacionada ao predomínio dessas células na vasculatura pulmonar, promovendo agravamento da inflamação sistêmica (SANTIAGO-CARVALHO et al., 2020, no prelo). Dessa forma, realizamos o protocolo de asma experimental em camundongos C57BL/6 e P2rx7<sup>-/-</sup>, e 3 minutos antes da eutanásia, anticorpo anti-CD45 foi injetado, a fim de diferenciar células do parênquima (CD45<sup>-</sup>) de células da vasculatura (CD45<sup>+</sup>) (Figura 5A). Utilizando citometria de fluxo, foi observado aumento de células T CD4<sup>+</sup> no parênquima de camundongos C57BL/6 asmáticos enquanto camundongos P2rx7<sup>-/-</sup> não demonstraram alterações dessas células em ambos os compartimentos do parênquima e da vasculatura pulmonar (Figura 5B). Posteriormente avaliamos a localização de células CD4<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup> CD62L<sup>-</sup> e observamos que não existem diferenças na frequência dessas células entre camundongos C57BL/6 e P2rx7<sup>-/-</sup> no parênquima ou na vasculatura (Figuras 5C-D).

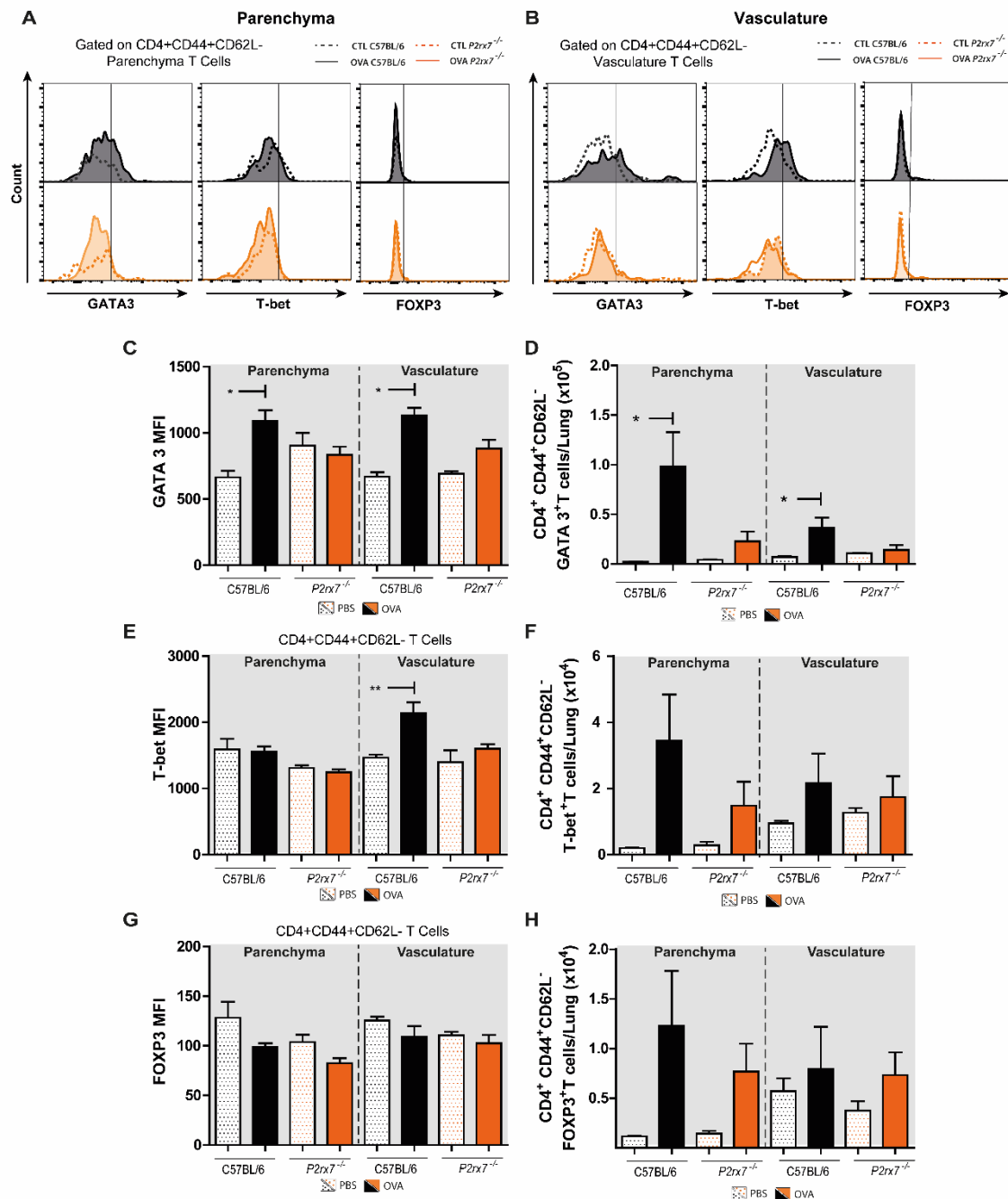
Entretanto, a avaliação do número de células CD4<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup> CD62L<sup>-</sup> demonstra o aumento dessas células no parênquima de camundongos C57BL/6 asmáticos, mas não no de camundongos *P2rx7<sup>-/-</sup>*, enquanto nenhuma alteração é observada na vasculatura de ambos os grupos (Figura 5E). Além disso, avaliação do MFI de CD44 das células efectoras dos camundongos desafiados e imunizados demonstraram que células CD4<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup> CD62L<sup>-</sup> de camundongos *P2rx7<sup>-/-</sup>* apresentam menores níveis de expressão dessa molécula durante a asma experimental se comparadas às células de camundongos C57BL/6 (Figuras 5F-G).



**Figura 5. Avaliação de células do parênquima e da vasculatura de camundongos C57BL/6 e *P2rx7*<sup>-/-</sup> durante asma experimental.** Camundongos C57BL/6 e *P2rx7*<sup>-/-</sup> foram inoculados com duas doses de OVA e Alum ou PBS por via s.c. com 7 dias de intervalo. Nos dias 14, 16 e 18, os animais foram inoculados via i.n. com 3 doses de OVA ou PBS. O pulmão foi avaliado no dia 19 pós-imunização e previamente a eutanásia os camundongos foram anestesiados e inoculados por via intravenosa com anticorpo anti-CD45 por 3 minutos. (A) A ilustração esquemática mostra o protocolo experimental. (B) O número total de células T CD4<sup>+</sup> presentes na vasculatura e no parênquima pulmonar foi determinado por citometria de fluxo. (C-G) Com base na análise da expressão de CD44 de células CD44<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup>CD4<sup>+</sup>, as frequências e os números de células efetoras (CD44<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup>) foram determinados, bem como o MFI de CD44. Os dados foram expressos como médias ± DP. Teste de comparação múltipla de grupos *One-way* ANOVA foi utilizado com \**p* < 0.05, \*\*\**p* < 0.001. Total de 1 experimento (n=14). C57BL/6 CTL n=3, C57BL/6 OVA n=4, *P2rx7*<sup>-/-</sup> CTL n=2, *P2rx7*<sup>-/-</sup> OVA n=5.

#### **4.5 Camundongos *P2rx7<sup>-/-</sup>* não apresentam infiltrado pulmonar de células Th2 no parênquima e na vasculatura durante asma experimental**

Tendo em vista que camundongos *P2rx7<sup>-/-</sup>* não apresentaram alterações no número de células efetoras  $CD4^+CD44^+CD62L^-$  presentes no parênquima e na vasculatura após imunização e desafio, investigamos a localização de células efetoras  $GATA3^+$ ,  $T-bet^+$  e  $FOXP3^+$  durante a asma experimental, a fim de compreender, em especial, se as células  $CD4^+GATA3^+$  de camundongos *P2rx7<sup>-/-</sup>* estavam retidas na vasculatura, ou até mesmo se as células  $CD4^+$  adquiriam outro perfil de polarização no parênquima (Figuras 6A-B). O MFI de  $GATA3$ ,  $Tbet$  e  $FOXP3$  foi realizado em células  $CD44^+CD62L^-$  do parênquima e da vasculatura, demonstrando que enquanto camundongos C57BL/6 apresentam aumento de expressão de  $GATA3^+$  em ambos os compartimentos e aumento de número de células  $CD4^+CD44^+CD62L^-GATA3^+$  no parênquima após imunização e desafio, os parâmetros equivalentes em camundongos *P2rx7<sup>-/-</sup>* permanecem inalterados (Figuras 6C-D). Além disso, análises do fator de transcrição  $Tbet$  e  $FOXP3$  demonstraram nenhuma alteração na expressão dessas moléculas ou no número de células  $CD4^+CD44^+CD62L^-$  que expressam essas moléculas em ambos os compartimentos pulmonares de camundongos C57BL/6 e *P2rx7<sup>-/-</sup>*, exceto pelo aumento da expressão de  $Tbet$  na vasculatura de camundongos C57BL/6 imunizados (Figuras 6E-H).

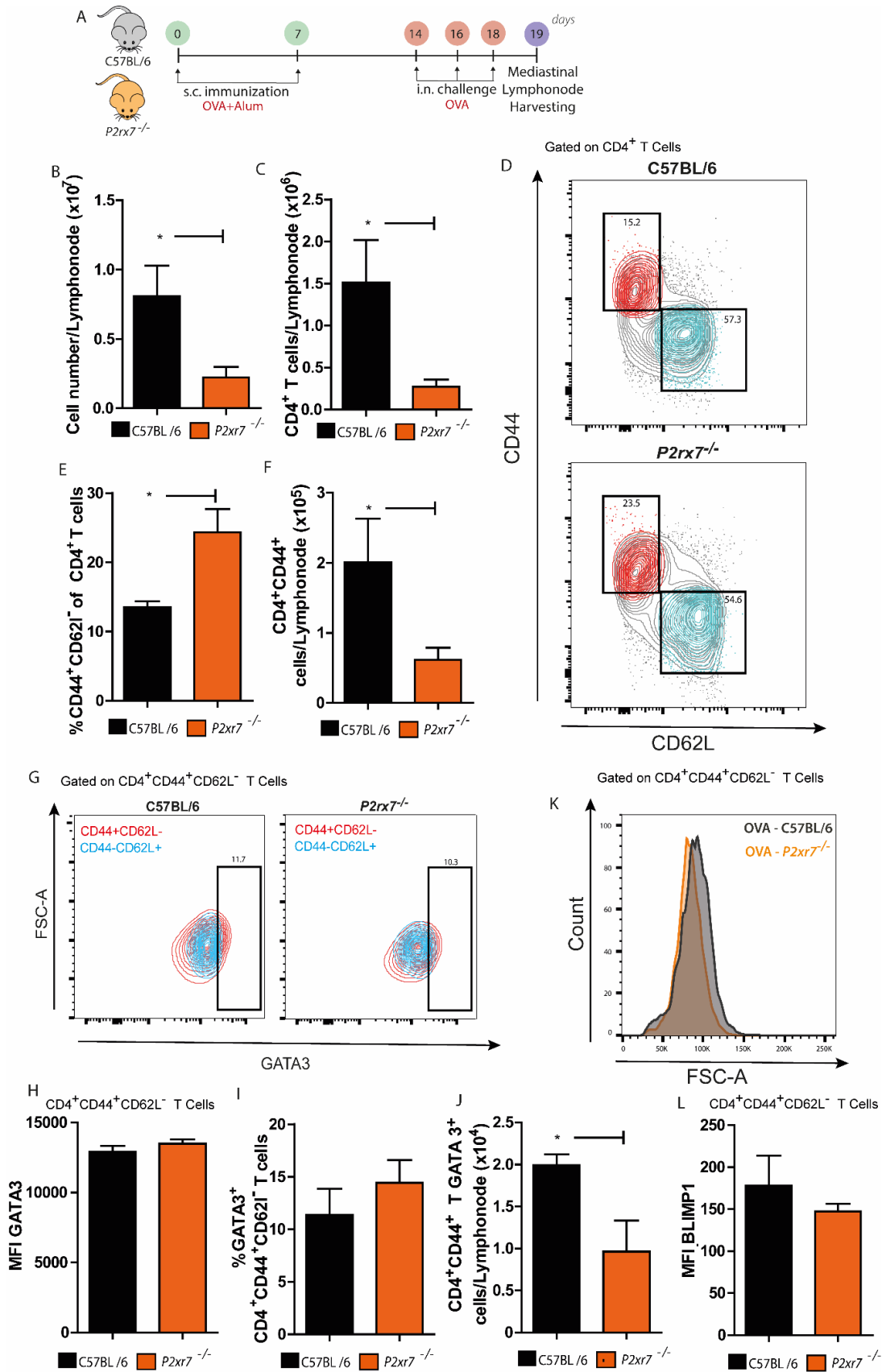


**Figura 6. Avaliação dos fatores de transcrição GATA3, T-bet e FOXP3 em células CD4+ do parênquima e da vasculatura de camundongos C57BL/6 e P2rx7<sup>-/-</sup> durante asma experimental.** Camundongos C57BL/6 e P2rx7<sup>-/-</sup> foram inoculados com duas doses de OVA e Alum ou PBS por via s.c. com 7 dias de intervalo. Nos dias 14, 16 e 18, os animais foram inoculados via i.n. com 3 doses de OVA ou PBS. O pulmão foi avaliado no dia 19 pós-imunização e previamente a eutanásia os camundongos foram anestesiados e inoculados por via intravenosa com anticorpo anti-CD45 por 3 minutos. (A-B) Histogramas representativos da expressão de GATA3, T-bet e FOXP3 em células T CD4+ efetoras do parênquima e da vasculatura pulmonar. (C) MFI de GATA3 e (D) número de células CD44<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup> CD4<sup>+</sup>GATA3<sup>+</sup>. (E) MFI de T-bet e (F) número de células CD44<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup> CD4<sup>+</sup>TBET<sup>+</sup>. (G) MFI de FOXP3 e (H) número de células CD44<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup> CD4<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup>. Os dados foram expressos como médias ± DP. Teste de comparação múltipla de grupos *One-way ANOVA* foi utilizado

com  $*p < 0.05$ ,  $***p < 0.001$ . Total de 1 experimento (n=14). C57BL/6 CTL n=3, C57BL/6 OVA n=4, *P2rx7<sup>-/-</sup>* CTL n=2, *P2rx7<sup>-/-</sup>* OVA n=5.

#### **4.6 Linfonodo mediastinal de camundongos *P2rx7<sup>-/-</sup>* apresentam menos células após desenvolvimento de asma experimental comparado a camundongos C57BL/6**

Investigamos as células do linfonodo mediastinal dos camundongos submetidos ao protocolo de asma experimental a fim de compreender se a resposta de produção de células de perfil GATA 3<sup>+</sup> de camundongos *P2rx7<sup>-/-</sup>* estava prejudicada durante a indução. Os camundongos foram submetidos ao protocolo de asma experimental (Figura 7A) e as células analisadas por citometria de fluxo. As análises demonstraram que os números de células do linfonodo e células CD4<sup>+</sup> são menores em camundongos *P2rx7<sup>-/-</sup>* imunizados, comparado ao número de células de camundongos C57BL/6 submetidos ao mesmo protocolo (Figuras 7B-C). A frequência de células CD4<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup> foi também demonstrada, com maior frequência dessas células em camundongos *P2rx7<sup>-/-</sup>* imunizados comparado a camundongos C57BL/6 imunizados (Figura 7D-E), entretanto, o número de células CD4<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup> é menor em camundongos *P2rx7<sup>-/-</sup>* imunizados comparado a camundongos C57BL/6 (Figura 7F). A avaliação da expressão de GATA3 em células CD4<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup> indica que não existem diferenças na expressão dessa molécula entre os grupos, entretanto camundongos *P2rx7<sup>-/-</sup>* imunizados apresentam menor número de células CD4<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>GATA3<sup>+</sup> comparado a camundongos C57BL/6 imunizados. Além disso, as células CD4<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup> de camundongos *P2rx7<sup>-/-</sup>* parecem apresentar tamanho menor que aquelas de camundongos C57BL6 (Figura 7K), enquanto a expressão de BLIMP1 pelas células CD4<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup> é semelhante entre os grupos (Figura 7L).

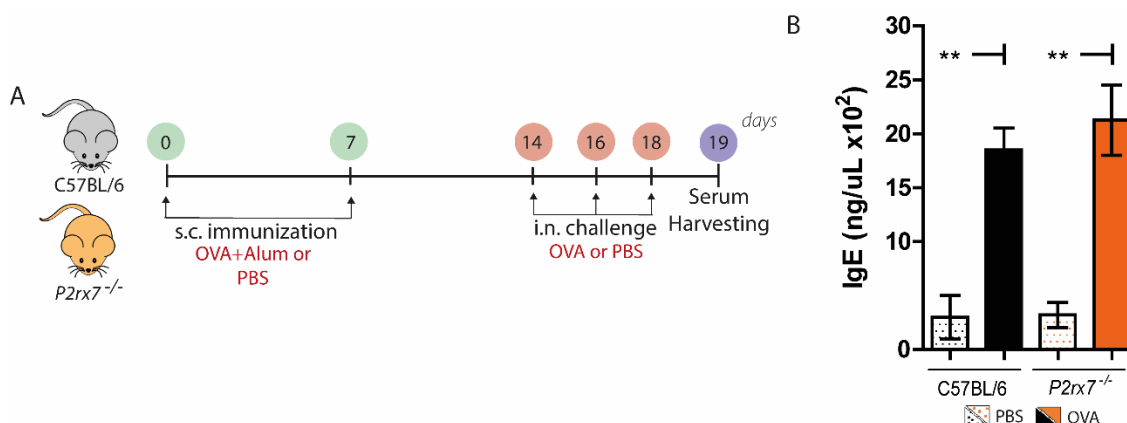


**Figura 7. Caracterização de células do linfonodo mediastinal de camundongos C57BL/6 e P2rx7<sup>-/-</sup> durante asma experimental.** Camundongos C57BL/6 e P2rx7<sup>-/-</sup> foram inoculados com duas doses de OVA e Alum por via s.c. com 7 dias de intervalo. Nos dias 14, 16 e 18, os

animais foram inoculados via i.n. com 3 doses de OVA. O linfonodo mediastinal foi avaliado no dia 19 pós-imunização. (A) A ilustração esquemática mostra o protocolo experimental. (B) Número de células do linfonodo mediastinal, (C) número de células CD4<sup>+</sup>, (D-F) Com base na análise da expressão de CD44 e CD62L em células CD4<sup>+</sup>, as frequências e os números de células efetoras (CD44<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup>) foram determinados. (G-J) As células efetoras foram avaliadas quanto à expressão de GATA 3, sendo determinadas as frequências de células positivas, os números de células nos pulmões e as médias de intensidade de fluorescência (MFIs), (K) Tamanho de células CD4<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup>, (L) Histograma demonstrativo do tamanho de células CD4<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup>. Os dados foram expressos como médias ± DP. Teste T não pareado foi utilizado com \*\*p <0.01. Total de 1 experimento (n=6). C57BL/6 OVA n=3, P2rx7<sup>-/-</sup> OVA n=3.

#### 4.7 Camundongos P2rx7<sup>-/-</sup> são capazes de produzir IgE durante a asma experimental

A imunização e desafios com OVA não é capaz de promover a formação de infiltrados celulares de perfil Th2 em camundongos P2rx7<sup>-/-</sup>, dessa forma, investigamos se as respostas humorais de produção de IgE estavam comprometidas devido à ausência do receptor P2X7. A avaliação do soro obtido após a imunização e desafios com OVA (Figura 8A) demonstrou que os camundongos P2rx7<sup>-/-</sup> produziram os mesmos níveis de IgE que os camundongos C57BL/6 após a imunização (Figura 8B).



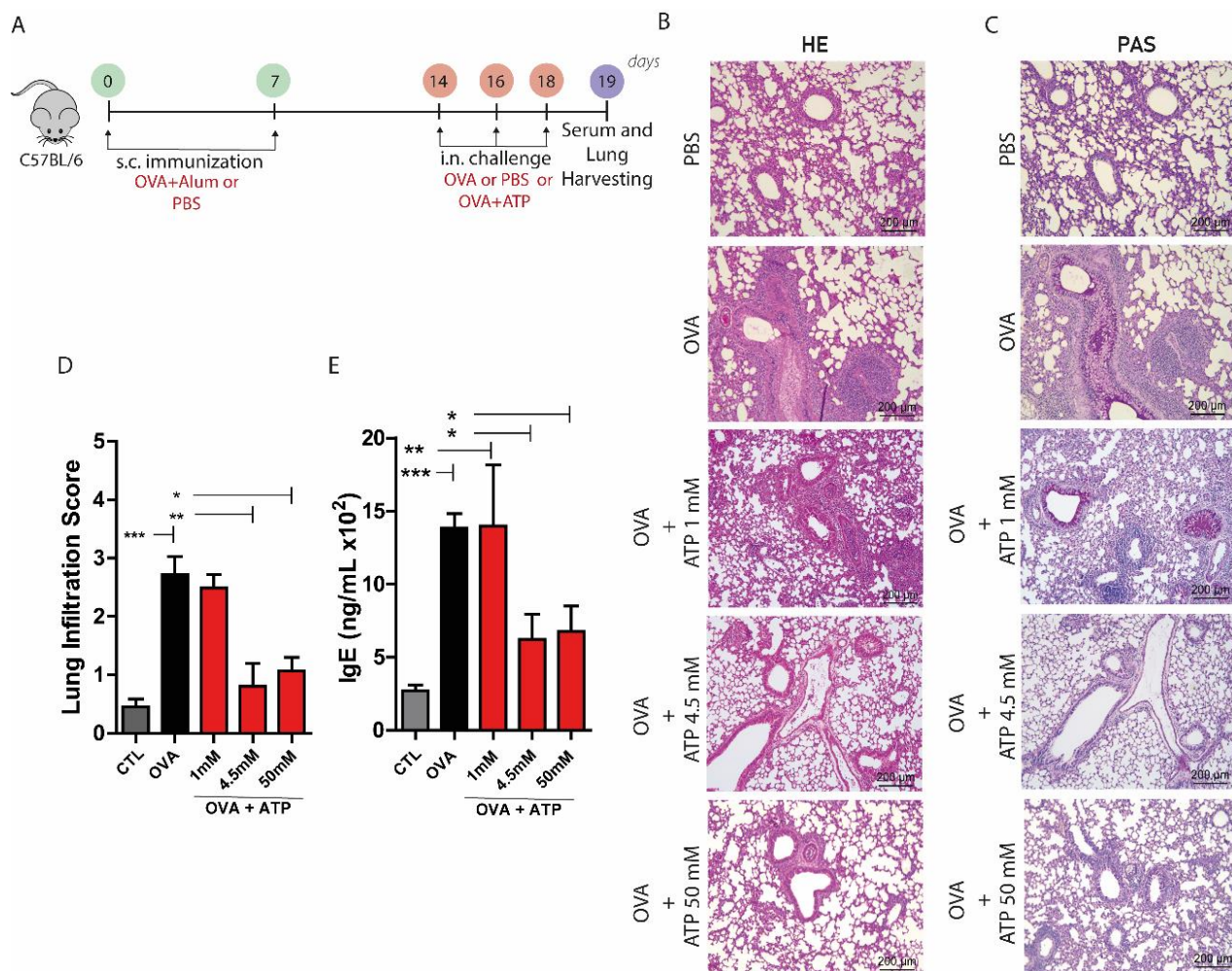
**Figura 8. Avaliação de IgE sérico de camundongos C57BL/6 e P2rx7<sup>-/-</sup> durante asma experimental.** Camundongos C57BL/6 e P2rx7<sup>-/-</sup> foram inoculados com duas doses de OVA e Alum por via s.c. com 7 dias de intervalo. Nos dias 14, 16 e 18, os animais foram inoculados via i.n. com 3 doses de OVA. Soro foi obtido por punção cardíaca após eutanásia no dia 19 pós-imunização. (A) A ilustração esquemática mostra o protocolo experimental. (B) Produção de anticorpo IgE total sérico. Os dados foram expressos como médias ± DP. Teste de comparação múltipla de grupos *One-way ANOVA* foi utilizado com \*\* p <0.01. Total de 2 experimentos independentes (n=14). C57BL/6 CTL n=2, C57BL/6 OVA n=5, P2rx7<sup>-/-</sup> CTL n=2, P2rx7<sup>-/-</sup> OVA n=5.



## **PARTE 2. AVALIAÇÃO DO PAPEL DA ADMINISTRAÇÃO DE ATP DURANTE DESAFIOS INTRANASAIS NA ASMA EXPERIMENTAL**

### **4.8 Desafios i.n. com OVA na presença de ATP resultam em redução da asma experimental de maneira dose-dependente**

Devido à observação de que a sinalização através do receptor P2X7 está envolvida no desenvolvimento da inflamação pulmonar de perfil Th2, investigamos o papel da administração intranasal de ATP, um agonista do receptor P2X7, durante os desafios i.n. com OVA. Dessa forma, camundongos C57BL/6 foram imunizados por via s.c. com OVA e, em seguida, desafiados via i.n. com PBS, OVA ou OVA + ATP (1 mM, 4,5 mM e 50 mM) (Figura 9A). Os camundongos desafiados com OVA ou OVA + ATP 1mM exibiram infiltrado celular e produção de muco aumentados em comparação com o grupo controle, no entanto, a administração de ATP 4,5 mM e ATP 50 mM durante o desafio com OVA reduziu o infiltrado celular (Figuras 9B-D). Além disso, a imunização seguida dos desafios com OVA induziram aumento dos níveis totais de IgE sérica, que diminuiu na presença de 4,5 e 50 mM de ATP durante os desafios (Figura 9E).

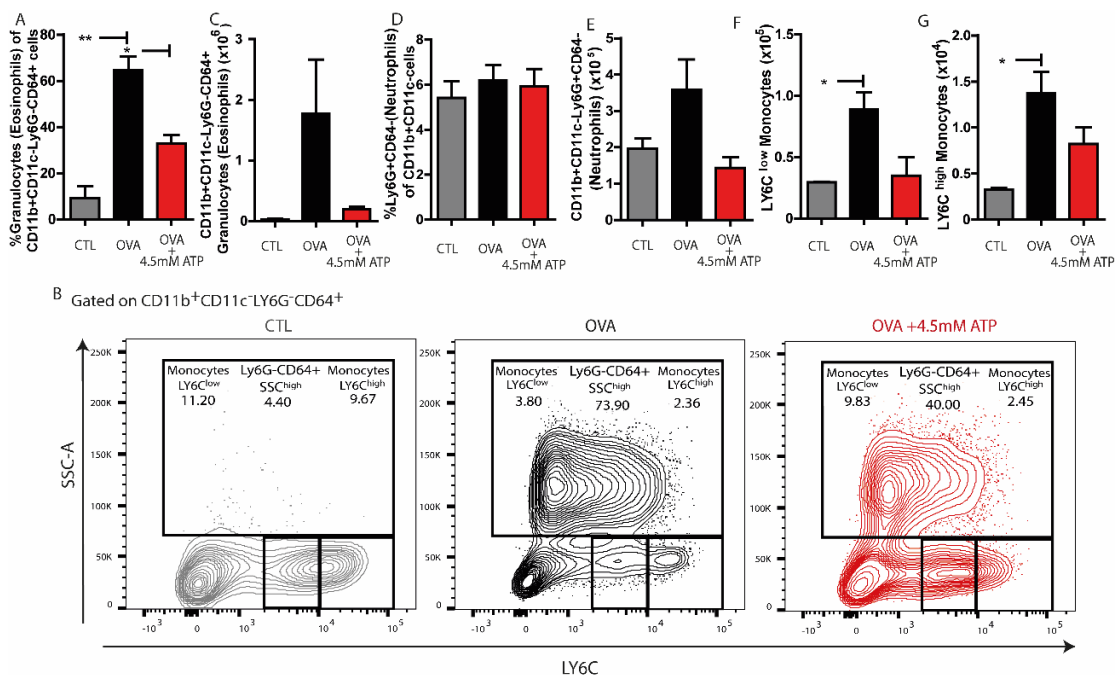


**Figura 9. Avaliação do infiltrado celular e muco no pulmão e da produção de IgE após administração de ATP durante desafios i.n. com OVA em camundongos previamente imunizados.** (A) O esquema mostra o protocolo de imunização e desafios utilizados para indução de asma. Os camundongos C57BL/6 foram imunizados via s.c. com OVA+Alum e, uma semana depois, desafiados via i.n. com OVA na presença ou ausência de ATP em diversas concentrações (1 mM, 4,5 mM e 50 mM). (B e C) Pulmões de camundongos controles e imunizados foram obtidos e corados pelos corantes eosina-hematoxilina (HE) e ácido periódico de Schiff (PAS) (aumento de 10x; as escalas de barra correspondem a 200  $\mu$ m). (D) Os escores de infiltrado celular foram determinados a partir da análise histológica. (E) Os soros dos camundongos avaliados foram obtidos e avaliados quanto à presença de IgE total. Os dados foram expressos como médias  $\pm$  DP. Teste de comparação múltipla de grupos *One-way ANOVA* foi utilizado com \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  e \*\*\*\* $p < 0,0001$ . Total de 3 experimentos independentes ( $n=32$ ). CTL  $n=8$ , OVA  $n=10$ , OVA+1 mM ATP  $n=6$ , OVA+4,5 mM ATP  $n=5$ , OVA+50 mM ATP  $n=3$ .

#### 4.9 A administração i.n. de ATP reduz o infiltrado de granulócitos durante a asma experimental

Uma vez que as doses de 4,5 mM e 50 mM de ATP promoveram a diminuição da presença de infiltrados celulares e IgE circulante, a dose de 4,5 mM foi utilizada para posteriores análises. As frequências de células CD11b<sup>+</sup>Ly6G<sup>-</sup>CD64<sup>+</sup>SSC<sup>high</sup>

(eosinófilos), que são características de resposta asmáticas de perfil Th2, diminuiu em decorrência da administração de 4,5 mM de ATP em comparação com os valores obtidos apenas com desafios com OVA (Figuras 10A-C). No entanto, neutrófilos (Figuras 10D-E) permaneceram inalterados, enquanto monócitos LY6C<sup>low</sup> (Figura 10F) e monócitos LY6C<sup>high</sup> (Figura 10G) apresentaram aumento após a imunização e desafio somente com OVA.

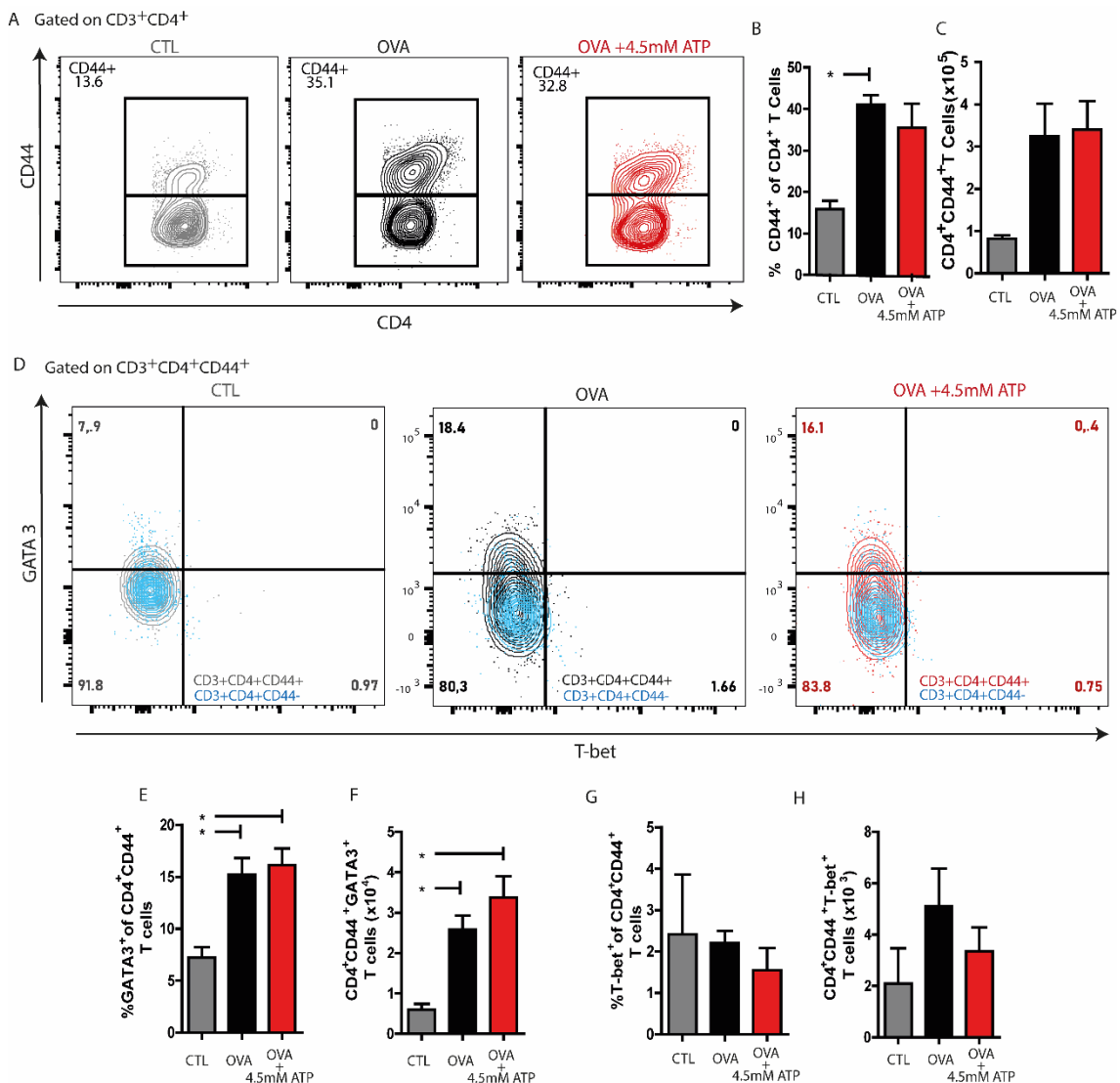


**Figura 10. Avaliação por citometria de fluxo de células do pulmão após administração de ATP via i.n. durante desafios com OVA em camundongos previamente imunizados.** Células foram avaliadas por citometria de fluxo demonstrando (A) frequência de células CD11b<sup>+</sup>CD11c<sup>-</sup>Ly6G<sup>+</sup>CD64<sup>+</sup>SSC<sup>high</sup> (Eosinófilos). (B) esquema de análise. (C) número de células CD11b<sup>+</sup>CD11c<sup>-</sup>Ly6G<sup>+</sup>CD64<sup>+</sup>SSC<sup>high</sup> (Eosinófilos). (D-E) frequência e número de células CD11b<sup>+</sup>CD11c<sup>-</sup>Ly6G<sup>+</sup>CD64<sup>-</sup> (neutrófilos). (F) número de monócitos LY6C<sup>low</sup> e (G) número de monócitos LY6C<sup>high</sup>. Os dados foram expressos como médias ± DP. Teste de comparação múltipla de grupos One-way ANOVA foi utilizado com \*p < 0.05, \*\*p < 0.02. Total de 1 experimento (n=10) CTL n=2, OVA n=4 e OVA+4,5 mM ATP n=4.

#### 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

Uma vez que as células T CD4<sup>+</sup>GATA3<sup>+</sup> são fundamentais na inflamação asmática Th2, e a resposta de células TCD4<sup>+</sup>T-bet<sup>+</sup> atuam de forma antagônica a essas respostas, investigamos se as alterações observadas durante a administração de 4,5 mM de ATP estavam relacionadas ou afetaram linfócitos T CD4<sup>+</sup>. Primeiramente a expressão de CD44 foi avaliada demonstrando que a administração

de OVA + 4,5 mM ATP não promoveu diferenças na expressão deste marcador de ativação em comparação com o protocolo OVA (Figuras 11A-C). Em seguida, avaliamos se havia alguma alteração na expressão de GATA3 ou T-bet nas células T CD4<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>. Os camundongos imunizados e desafiados com OVA exibiram uma assinatura típica de expressão de GATA 3 que foi mantida mesmo na presença de ATP 4,5 mM (Figuras 11D-F). Além disso, o grupo de camundongos OVA e OVA+ATP não demonstraram alterações na expressão de T-bet (Figuras 11G-H).

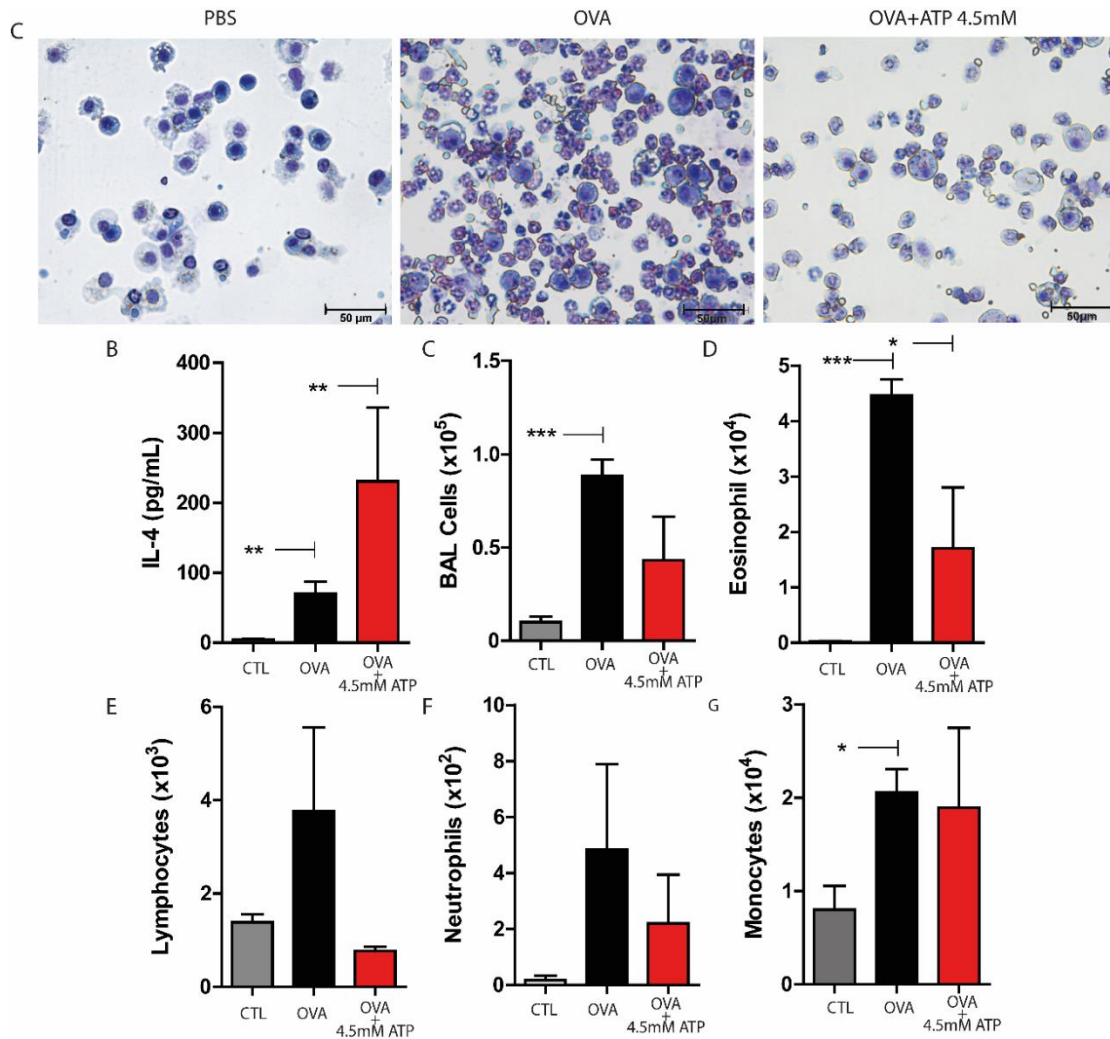


**Figura 11. Avaliação por citometria de fluxo de células T CD4<sup>+</sup> do pulmão após administração de ATP via i.n. durante desafios com OVA em camundongos previamente imunizados.** Células foram avaliadas por citometria de fluxo. (A) Esquema de análise de expressão de CD44 por células CD4<sup>+</sup>. (B-C) frequência e número de células CD4<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>. (D) Esquema de análise de expressão de GATA 3 e TBET. (E-F) frequência e número de células CD4<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>GATA<sup>+</sup>. (G-H) frequência e número de células CD4<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>TBET<sup>+</sup>. Os dados foram expressos como médias ± DP. Teste de comparação múltipla de grupos One-way ANOVA foi

utilizado com  $*p < 0.05$ . Total de 1 experimento (n=10) CTL n=2, OVA n=4 e OVA+4,5 mM ATP n=4.

#### **4.11 A administração de ATP via intranasal durante desafios com OVA promove o aumento de IL-4 no lavado bronquioalveolar**

A análise do lavado bronquioalveolar permitiu a avaliação de células e produção de IL-4 no pulmão dos grupos experimentais. Após imunização e desafio, os camundongos foram eutanasiados e o BAL foi adquirido. Devido a importância da citocina IL-4 na polarização e manutenção de células Th2, o BAL foi utilizado para determinar a produção dessa citocina. Foi observado um aumento da produção de IL-4 em camundongos imunizados e desafiados com OVA, e uma produção ainda maior dessa citocina no grupo desafiado com OVA + 4,5mM de ATP (Figura 12A). Além disso, células do BAL foram avaliadas por contagem diferencial indicando um aumento no número de células do lavado em camundongos imunizados e desafiados com OVA (Figura 12B). Apesar da ausência de diferença no número de células do BAL entre os grupos OVA e OVA+ATP, o número de eosinófilos no grupo OVA é significativamente maior que no grupo OVA+ATP (Figura 12C). Nenhuma diferença é observada no número de linfócitos e neutrófilos, entretanto, o número de monócitos demonstra-se aumentado no grupo OVA (Figuras 12D-F).

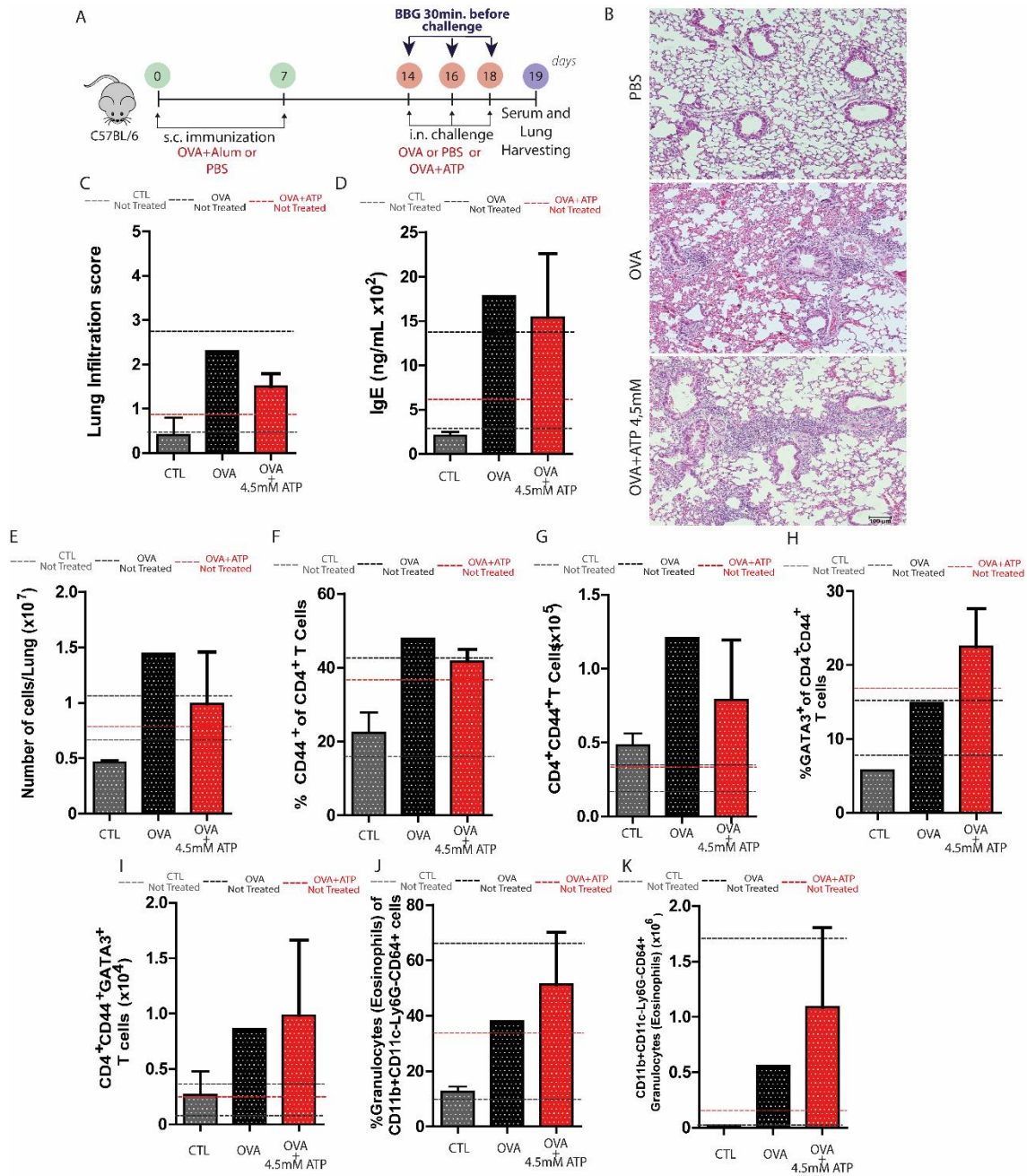


**Figura 12. Caracterização do lavado bronquioalveolar (BAL) após administração de ATP via i.n. durante desafios com OVA em camundongos previamente imunizados.** O lavado bronquioalveolar dos camundongos foram avaliados quanto a produção de citocinas e células. (A) Imagens representativas de lâminas coradas com eosina-hematoxilina (HE) (aumento de 40x; as escalas de barra correspondem a 50  $\mu$ m). Através de contagem diferencial, (C) células totais do BAL, (D) eosinófilos, (E) Linfócitos, (F) neutrófilos e (G) monócitos foram avaliados. Os dados foram expressos como médias  $\pm$  DP. Teste de comparação múltipla de grupos One-way ANOVA foi utilizado com \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ . Total de 1 experimento (n=11) CTL n=3, OVA n=4 e OVA+4,5 mM ATP n=4.

#### 4.12 O fenômeno de redução dos infiltrados de células durante a administração de ATP na asma experimental parece ser dependente do receptor P2X7

O ATP é capaz de sinalizar através de diversos receptores do tipo P2, dessa forma, para compreender se os efeitos observados durante os desafios intranasais com ATP na asma experimental estavam relacionados com sinalização via receptor P2X7, utilizamos um inibidor seletivo do receptor, o *Brilliant Blue G* (BBG) previamente a cada desafio intranasal (Figura 13A) através de um experimento preliminar. Análises

histológicas e de score de infiltrado celular indicam diminuição da inflamação pulmonar no grupo OVA e aumento da inflamação nos animais desafiados com OVA+ATP (Figuras 13B-C). A produção de IgE total sérica também foi avaliada indicando que mesmo após a administração de ATP durante os desafios intranasais com OVA, a produção de IgE é mantida quando os camundongos são tratados com BBG, indicando que o receptor P2X7 parece estar relacionado com a regulação da produção desse anticorpo (Figura 13D). As Células do pulmão também foram avaliadas (Figura 13E), indicando aumento na frequência e número de células CD4<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup> (Figuras 13F-G), frequência e número de células CD4<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>GATA3<sup>+</sup> (Figuras 13H-I), mas especialmente avaliando eosinófilos, observa-se aumento da frequência e número dessas células (Figuras 13J-K), indicando que o tratamento com o BBG parece reverter as características de proteção observadas durante a administração de 4,5mM ATP intranasal.



**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.** (A) O esquema mostra o protocolo de imunização e desafios utilizados para indução de asma. Os camundongos C57BL/6 foram imunizados via s.c. com OVA+Alum e, uma semana depois, desafiados via i.n. com OVA na presença ou ausência de 4,5 mM de ATP. Antes de cada desafio intranasal, os camundongos foram inoculados via peritoneal com BBG. (B) Pulmões de camundongos controles e imunizados foram obtidos e corados pelo corante eosina-hematoxilina (HE) (aumento de 10x; as escalas de barra correspondem a 200 µm). (C) Os escores de infiltrado celular foram determinados a partir da análise histológica. (D) Os soros dos camundongos avaliados foram obtidos e avaliados quanto à presença de IgE total. Análises de citometria de fluxo demonstraram (E) Células totais, (F-G) frequência e número de células CD4<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>, (H-I) frequência e número de células CD4<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>GATA3<sup>+</sup> e (J-K)



frequência e número de eosinófilos. Os dados foram expressos como médias  $\pm$  DP. Total de 1 experimento independentes (n=6). CTL n=2, OVA n=1 e OVA+4,5 mM ATP n=3.

# 5 Discussão

Grandes quantidades de ATP são liberadas no meio extracelular em consequência ao dano tecidual promovido por condições patológicas como fibrose cística, doença pulmonária obstrutiva crônica e a asma (ITO, Satoru et al, 2016). Uma vez no meio extracelular, moléculas de ATP podem ser reconhecidas por diversos receptores purinérgicos promovendo o desenvolvimento de respostas distintas (SAVIO et al.,2018). O reconhecimento de moléculas que sinalizam dano é importante para a definição dos padrões de respostas desenvolvidos e posteriormente o tipo de inflamação gerada frente ao estímulo. Estudos recentes sugerem que o ATP 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. Trabalhos anteriores utilizaram agonistas do receptor P2X7 para demonstrar sua importância no desenvolvimento da asma (IDZKO et al., 2007). Entretanto, pouco se sabe sobre o papel da administração de ATP durante o processo de estabelecimento da inflamação pulmonar de perfil Th2 e características do desenvolvimento da asma experimental na ausência de reconhecimento do ATP por receptores P2X7. Dessa forma, durante esse trabalho, avaliamos o papel da sinalização através do eixo ATP-P2X7 no desenvolvimento da inflamação pulmonar através do modelo de asma experimental.

Para avaliar o papel do receptor P2X7 no desenvolvimento da asma experimental, camundongos *knockout* para o receptor foram utilizados, sendo demonstrada ausência de características-chaves atribuídas à inflamação pulmonar asmática como infiltrado eosinofílico, bem como presença de muco nas vias aéreas. Esses dados ressaltaram a importância do receptor P2X7 no desenvolvimento da inflamação asmática. As respostas alérgicas envolvem dois processos para o seu desenvolvimento, a sensibilização e o recrutamento de células específicas para o sítio de ativação (EPSTEIN, 2004). Dessa forma, buscamos investigar se a ausência da resposta inflamatória asmática observada em camundongos *full P2rx7<sup>-/-</sup>* poderia estar relacionado a processos iniciais de desenvolvimento de células-chave para a inflamação asmática, ou até mesmo poderia estar relacionado ao recrutamento de células para o tecido específico, o pulmão.

O receptor P2X7 está presente em diversas células que contribuem para o desenvolvimento de respostas Th2 (DI VIRGILIO et al., 2017). Observamos que a ausência do receptor P2X7 não promoveu alterações no número de células CD4<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>, por sua vez, a ausência de sinalização por esse receptor promoveu a diminuição na expressão de GATA3 e, por sua vez, de células CD4<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>GATA3<sup>+</sup>. Dessa forma, observa-se que as células efetoras de camundongos *P2rx7*<sup>-/-</sup> não apresentam a assinatura típica da inflamação asmática durante a asma experimental, podendo dessa forma contribuir para as características de baixo infiltrado eosinofílico e baixa produção de muco observadas em camundongos *P2rx7*<sup>-/-</sup>.

A avaliação das células CD4<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup> demonstrou alterações na expressão de CD69, fornecendo indicativos de que essas células podem apresentar capacidade de migração afetada, sugerindo uma menor capacidade efetora dessas células. Nosso grupo vem demonstrando que durante a tuberculose experimental, a ausência do receptor P2X7 em células TCD4<sup>+</sup> está relacionada ao predomínio dessas células na vasculatura pulmonar, promovendo agravamento da inflamação sistêmica (SANTIAGO-CARVALHO et al., 2020, no plero). Tendo isso em vista, observamos que os camundongos *P2rx7*<sup>-/-</sup> não apresentam alterações no número de células em nenhum dos compartimentos durante a asma experimental. Esses dados indicam que o fenômeno observado não está relacionado a um processo de predomínio de células TCD4<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>GATA3<sup>+</sup> na vasculatura. Além disso, análises do fator de transcrição T-bet e FOXP3 indicam 'que alterações de t-bet e FOXP3 não são um fator decisivo no fenômeno observado em camundongos *P2rx7*<sup>-/-</sup>. De fato, o menor número de células efetoras no sítio de resposta em camundongos *P2rx7*<sup>-/-</sup> indicam um possível papel desse receptor para manutenção de células efetoras no microambiente da inflamação pulmonar asmática. Dessa forma, um dos fatores que poderiam estar relacionados à menor manutenção de células no parênquima de camundongos *P2rx7*<sup>-/-</sup> está ligado a processos de proliferação desencadeado por receptores P2X7 (BARICORDI et al., 1999), no qual, a ausência do receptor P2X7 pode promover a diminuição da proliferação dessas células.

Ademais, a molécula CD44 é associada a processos de ativação, capacidade efetora e em certo nível proliferação de células T (HUET et al., 1989, BAATEN et al., 2010). A menor expressão de CD44 pelas células efetoras de camundongos *P2rx7*<sup>-/-</sup> indica que além de menor número de células infiltradas no parênquima de

camundongos *P2rx7<sup>-/-</sup>* imunizados, essas células podem apresentar atividade efetora e de proliferação comprometidas, contribuindo para as características observadas nesses camundongos.

Os dados anteriores também ressaltam que o fenômeno observado durante a asma experimental em camundongos *P2rx7<sup>-/-</sup>* pode ter origem em processos anteriores ao recrutamento, como o processo de sensibilização. Realizamos a investigação inicial do linfonodo mediastinal, indicando a manutenção da capacidade de expressão de moléculas como CD44, GATA 3 e BLIMP1, todavia, em número de células os linfonodos de camundongos *P2rx7<sup>-/-</sup>* apresentaram menor número em comparação aos linfonodos de camundongos C57BL/6. Um dos fatores que podem estar relacionados ao menor número de células no linfonodo mediastinal de camundongos *P2rx7<sup>-/-</sup>* está ligado a processos de proliferação desencadeados por receptores P2x7 (BARICORDI et al., 1999). Dessa forma, apesar da ausência de receptores P2X7 parecer não afetar a capacidade de expressão de moléculas como GATA3 e BLIMP 1 em células TCD4<sup>+</sup> do linfonodo, a ausência deles pode promover a diminuição da proliferação dessas células através da diminuição da sinalização de crescimento. Entretanto, esses dados são preliminares e demonstram a necessidade de maior investigação sobre o processo de imunização na ausência do receptor P2X7.

O menor número de células TCD4<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>GATA3<sup>+</sup> no linfonodo mediastinal de camundongos *P2rx7<sup>-/-</sup>* não promoveu alterações na capacidade de geração de IgE durante a asma experimental. Essas células são reconhecidas como uma importante fonte de IL-4 e IL-33, citocinas intimamente relacionadas à promoção da mudança de isotipo de anticorpos IgE (OETTGEN e GEHA, 2001). *He e colaboradores (2020)* demonstraram que mesmo na ausência de células TCD4<sup>+</sup>GATA3<sup>+</sup>, durante a asma experimental, a produção de IgE permanece estável, isso porque as células Tfh demonstram ser capazes de produzir IL-4 suficiente para promoção do mudança de isotipo para IgE, dessa forma, alterações na expressão ou número de células GATA3<sup>+</sup> em centros germinativos não necessariamente promove alterações na produção dessas imunoglobulinas durante a asma experimental.

Além do papel do P2X7 em células TCD4<sup>+</sup>, outros subtipos celulares podem estar relacionados ao fenômeno observado em camundongos *P2rx7<sup>-/-</sup>* na asma experimental. *Li e colaboradores (2018)* ressaltaram a importância do receptor P2X7

em células dendríticas para o desenvolvimento da asma experimental através de dados de correlação e inibição *in vitro* desse receptor, evidenciando que não somente em células T, mas em outros tipos celulares, a ausência de sinalização via receptor P2x7 pode afetar o desenvolvimento da asma experimental. IDZKO e colaboradores (2007) já haviam indicado que a sinalização por ATP é importante para o gatilho e manutenção da asma, dessa forma, o reconhecimento do ATP pelo receptor P2X7, especialmente por células responsáveis pelo desenvolvimento inicial da asma podem ser importantes para as respostas inflamatórias da asma.

Tendo em vista a importância da sinalização do ATP no desenvolvimento de processos inflamatórios, especialmente na asma, a investigação da administração de ATP durante desafios i.n. permitiu a avaliação do desenvolvimento de respostas inflamatórias pulmonares de perfil Th2 frente a altas concentrações de ATP. Em conjunto, os resultados mostram que a administração de altas concentrações de ATP i.n. durante os desafios com OVA inibe a inflamação e a produção de IgE durante a asma experimental. Diversos fatores podem estar relacionados ao fenômeno observado, dentre eles a sinalização através do receptor P2X7, cuja ativação está relacionada à capacidade de polarização e desenvolvimento de morte celular. Além disso, esse fenômeno pode estar relacionado à sinalização do ATP através de outros receptores purinérgicos, como os P2Y, os quais são acoplados a proteínas G e, por sua vez, estão diretamente relacionados com processos como o controle do ambiente aquoso pulmonar, produção de muco e controle de cílios (LAZAROWSKI e BOUCHER, 2009). Esses receptores estão presentes em células importantes para o desenvolvimento da asma, como células epiteliais, entretanto o entendimento do reconhecimento do ATP por essas células na asma ainda permanecer obscuro, não obstante, a sinalização através desses receptores podem também estar relacionados às modificações observadas durante a administração de ATP neste trabalho.

O reconhecimento de ATP em concentrações elevadas ( $\geq 1$  mM) promove ativação de receptores P2X7 iniciando a formação de amplos poros transmembranares, permeáveis a moléculas de até 800 Da, levando a desregulação osmótica e morte celular (SURPRENANT, et al., 1996 e MESSEMER et al., 2013). Dessa forma, altas concentrações de ATP durante desafios i.n. poderiam estar relacionados com a morte de células que possuem esse receptor e são chave para o desenvolvimento da inflamação pulmonar asmática, como eosinófilos, bem como a

morte de células responsáveis pelo desenvolvimento inicial da asma como mastócitos, ILCs e outras células secretoras de IL-4 e IL-5 (WAREHAM e SEWARD, 2016), promovendo, dessa forma, diminuição de infiltrados e muco em maiores concentrações administradas de ATP. Por exemplo, na asma, monócitos M2 são células importantes no desenvolvimento da inflamação pulmonar através da produção de IL-4 (LIU et al., 2018), e dessa forma, poderiam estar afetadas durante a administração de altas concentrações de ATP. A investigação do lavado bronquioalveolar, por sua vez, demonstrou que o fenômeno de proteção observado durante a administração de ATP não parece estar relacionado a menor produção de IL-4, uma vez que aumento da produção dessa citocina ocorre nessa condição. Eosinófilos em humanos apresentam expressão de P2X7 tornando-se susceptíveis à sinalização do ATP, especialmente em resposta a altas concentrações (FERRARI et al., 2006). Dessa forma, o ATP poderia estar agindo diretamente em eosinófilos, promovendo sua morte, ou até mesmo em células responsáveis pela produção de IL-5, citocina importante para desenvolvimento e recrutamento de eosinófilos, como as ILCs (MATTES et al., 2002 e WOLTERINK, 2012).

Além disso, estudos publicados pelo nosso grupo sugerem que a sinalização do receptor P2X7 em linfócitos T CD4<sup>+</sup> 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). Dessa forma, altas concentrações de ATP poderiam promover a polarização de células específicas para perfis celulares distintos do perfil de assinatura Th2 asmática, promovendo, dessa forma, a diminuição dos sintomas asma-like. Entretanto, análises de células TCD4<sup>+</sup> demonstram ausência de alterações na expressão de GATA3 e T-bet durante administração 4,5mM de ATP, indicando que o fenômeno observado não está relacionado ao processo de mudança polarização de células TCD4<sup>+</sup> para perfil Th2 durante a administração de ATP. Esses dados indicam que a administração de altas concentrações de ATP parecem não afetar as células T CD4<sup>+</sup>, e o fenômeno de redução da inflamação pulmonar observado parece estar relacionado com outros tipos celulares.

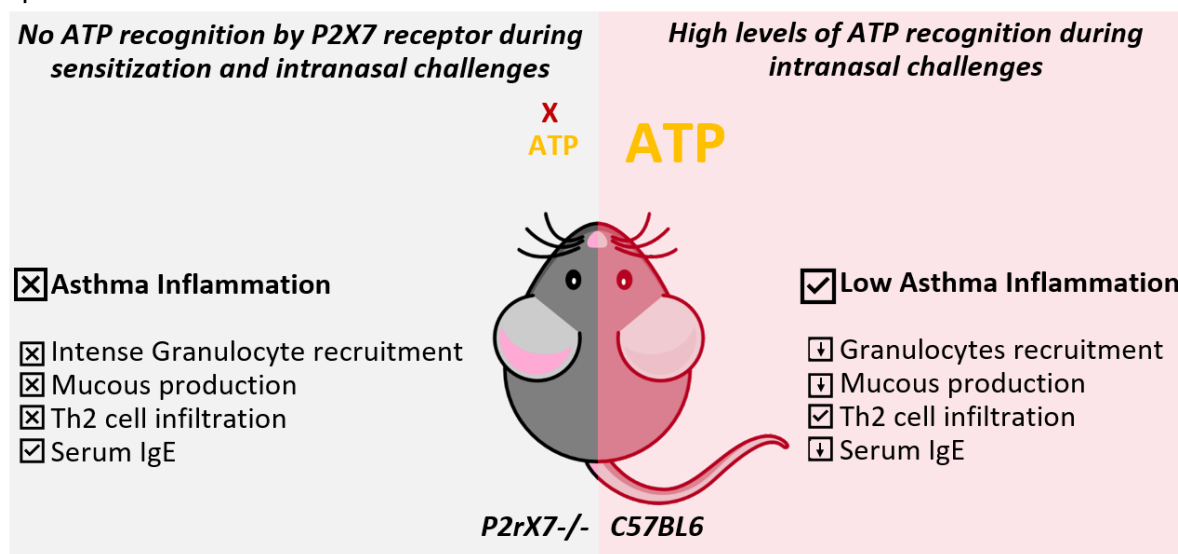
O eixo ATP-P2X7 vem sendo relacionado a processos de regulação de produção de anticorpos, uma vez que sinalizações exacerbadas através de receptores de dano podem promover a produção descontrolada de anticorpos autoimunes

(FALITI et al., 2019). Dessa forma, o reconhecimento de altos níveis de ATP por células Tfh promove a morte dessas células, e conseqüentemente a regulação da produção de anticorpos. Observamos nesse trabalho a diminuição da concentração de IgE total circulante em camundongos desafiados com ATP de forma dose dependente, indicando que o ATP administrado por via i.n. pode estar relacionado ao controle sistêmico da produção de IgE. Essa regulação parece estar relacionada a via de sinalização através do receptor P2X7, visto que os experimentos preliminares utilizando o BBG, bloqueador seletivo do receptor, parece promover a restauração da produção de IgE a níveis semelhantes aos de camundongos desafiados apenas com OVA. Além disso, algumas das características observadas durante a administração de ATP foram alteradas com o uso do BBG, especialmente aquelas relacionadas ao score de infiltrado celular no pulmão e número de eosinófilos. Dessa forma, sugere-se que os efeitos observados durante a administração de ATP na asma são dependentes do receptor P2X7.



# 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<sup>+</sup> no parênquima ou na vasculatura, entretanto indícios demonstram menor número de células T CD4<sup>+</sup> efetoras no parênquima de camundongos *P2rx7*<sup>-/-</sup>, 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<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>GATA3<sup>+</sup> 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*<sup>-/-</sup> 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- $\beta$ . **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. HUET, S. et al. CD44 contributes to T cell activation. **The Journal of Immunology**, v. 143, n. 3, p. 798-801, 1989.
28. 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.
29. 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.
30. 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.
31. 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.
32. KHADRA, Anmar et al. Dual gating mechanism and function of P2X7 receptor channels. **Biophysical journal**, v. 104, n. 12, p. 2612-2621, 2013.
33. KHAKH, B. S., e BURNSTOCK, G. The double life of ATP. **Scientific American**, 301(6), 84, (2009).
34. 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.
35. 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.
36. 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.

37. 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.
38. 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.
39. 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).
40. 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.
41. Lazarowski, E. R., & Boucher, R. C. (2009). Purinergic receptors in airway epithelia. *Current opinion in pharmacology*, 9(3), 262-267.
42. LEE, I.-Ta et al. TNF- $\alpha$  induces matrix metalloproteinase-9 expression in A549 cells: role of TNFR1/TRAF2/PKC $\alpha$ -dependent signaling pathways. **Journal of cellular physiology**, v. 224, n. 2, p. 454-464, 2010.
43. LEE, I.-Ta; YANG, Chuen-Mao. Inflammatory signalings involved in airway and pulmonary diseases. **Mediators of inflammation**, v. 2013, 2013
44. 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.
45. 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.
46. 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.
47. MESSEMER, Nanette et al. P2X7 receptors at adult neural progenitor cells of the mouse subventricular zone. **Neuropharmacology**, v. 73, p. 122-137, 2013.
48. 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.
49. 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.
50. NATHAN, Carl. Points of control in inflammation. **Nature**, v. 420, n. 6917, p. 846-852, 2002.
51. NELSON, Ryan K. et al. Eosinophilic asthma. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice**, v. 8, n. 2, p. 465-473, 2020.
52. NORTH, R. Alan. Families of ion channels with two hydrophobic segments. **Current opinion in cell biology**, v. 8, n. 4, p. 474-483, 1996.
53. 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.
54. PAUL, W. E. What determines Th2 differentiation, in vitro and in vivo?. **Immunology and cell biology**, 88(3), 236-239 (2010).

55. 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).
56. 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.
57. 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.
58. 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.
59. 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.
60. RISSIEK, Björn et al. P2X7 on mouse T cells: one channel, many functions. **Frontiers in immunology**, v. 6, p. 204, 2015.
61. 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.
62. 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.
63. 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.
64. 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.
65. 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.
66. 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.
67. 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.
68. 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).
69. 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.
70. 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.
71. 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.

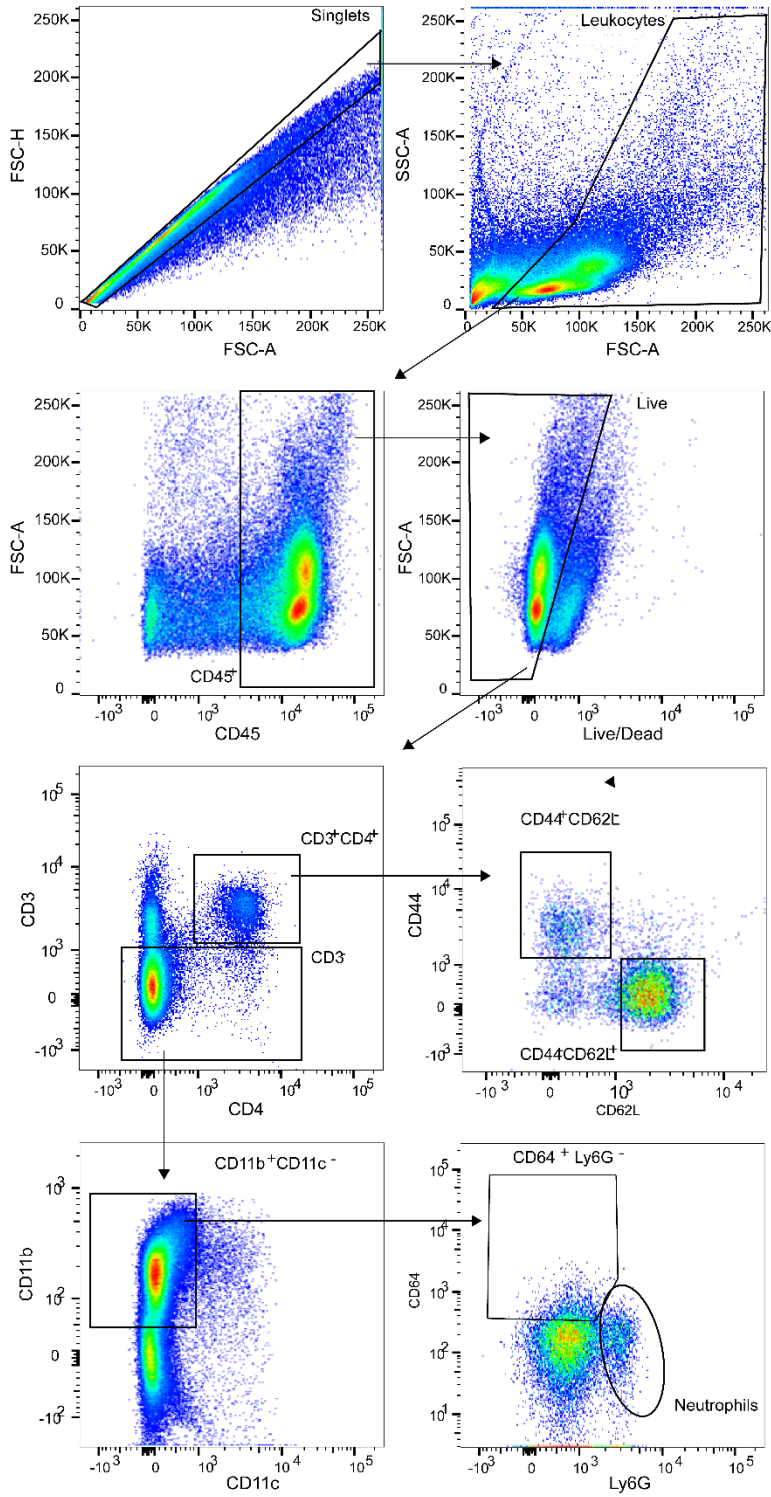
72. WAREHAM, Kathryn J.; SEWARD, Elizabeth P. P2X7 receptors induce degranulation in human mast cells. **Purinergic signalling**, v. 12, n. 2, p. 235-246, 2016.
73. WENZEL, S. E. et al. Evidence that severe asthma can be divided pathologically into two inflammatory subtypes with distinct physiologic and clinical characteristics. **American journal of respiratory and critical care medicine**, 160(3), 1001-1008 (1999).
74. WILHELM, Konrad et al. Graft-versus-host disease is enhanced by extracellular ATP activating P2X7 R. **Nature medicine**, v. 16, n. 12, p. 1434, 2010.
75. 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.
76. World Health Organization. Asma News. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/q-a-detail/asthma>> Acesso em: 19 de setembro de 2020



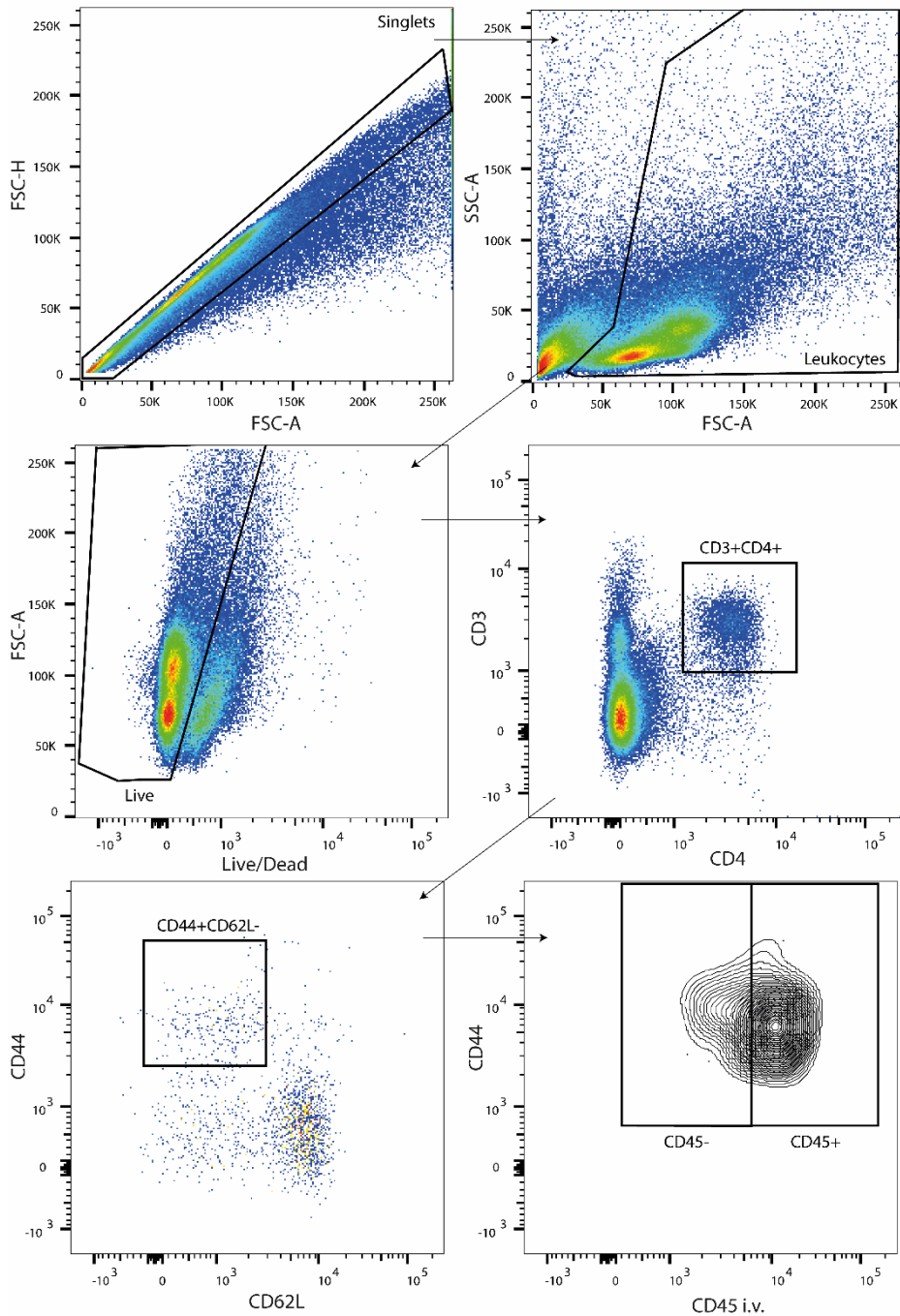
# 8 Anexos

# ANEXO I

A

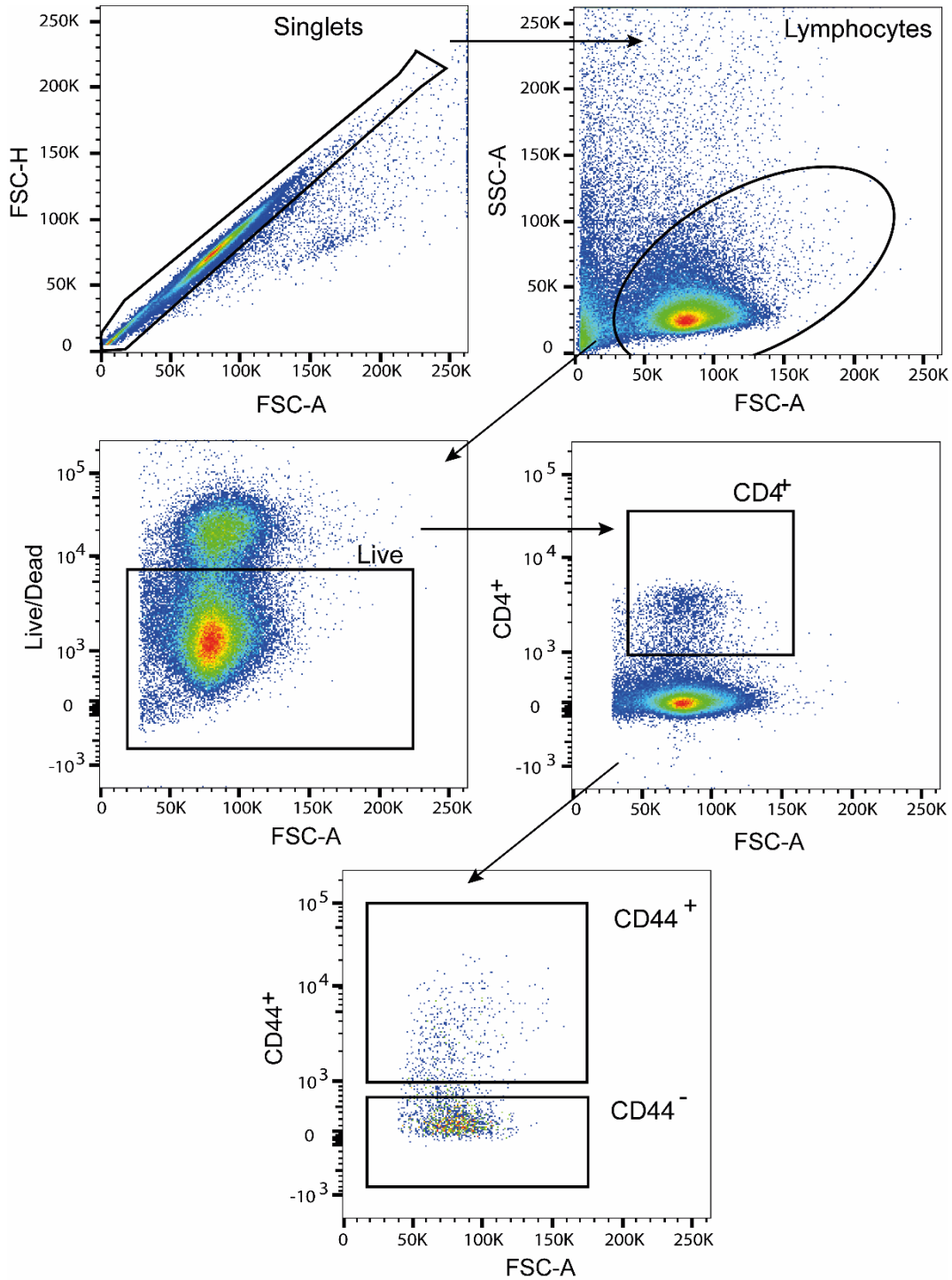


B



**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<sup>+</sup> obtidas através de citometria de fluxo.**