



ALINE MENDES MAZIERO

INIBIÇÃO DA AGREGAÇÃO DE PLAQUETAS HUMANAS POR EOSINÓFILOS

CAMPINAS

2014



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS**

ALINE MENDES MAZIERO

INIBIÇÃO DA AGREGAÇÃO DE PLAQUETAS HUMANAS POR EOSINÓFILOS

Orientador: Prof. Dr. Gilberto De Nucci

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para obtenção de título de Doutora em Farmacologia.

**ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA
ALUNA ALINE MENDES MAZIERO E ORIENTADA
PELO PROF. DR. GILBERTO DE NUCCI**

Assinatura do Orientador

CAMPINAS

2014

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Juliana Ravaschio Franco de Camargo - CRB 8/6631

M457i Maziero, Aline Mendes, 1981-
Inibição da agregação de plaquetas humanas por eosinófilos / Aline Mendes Maziero. – Campinas, SP : [s.n.], 2014.

Orientador: Gilberto De Nucci.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Agregação plaquetária. 2. Plaquetas. 3. Eosinófilos. 4. Proteína catiônica de eosinófilo. 5. Proteínas granulares de eosinófilos. I. De Nucci, Gilberto, 1958-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Inhibition of human platelet aggregation by eosinophils

Palavras-chave em inglês:

Platelet aggregation

Blood platelets

Eosinophils

Eosinophil cationic protein

Eosinophil granule proteins

Área de concentração: Farmacologia

Titulação: Doutora em Farmacologia

Banca examinadora:

Gilberto De Nucci [Orientador]

Sisi Marcondes Paschoal

Eros Antonio de Almeida

Ivani Aparecida de Souza

Juliana Signori Baracat Zeferino

Data de defesa: 07-02-2014

Programa de Pós-Graduação: Farmacologia

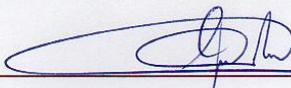
BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DOUTORADO

ALINE MENDES MAZIERO

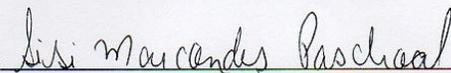
Orientador (a) PROF(A). DR(A). GILBERTO DE NUCCI

MEMBROS:

1. PROF(A). DR(A). GILBERTO DE NUCCI



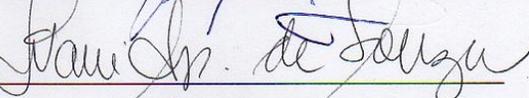
2. PROF(A). DR(A). SISI MARCONDES PASCHOAL



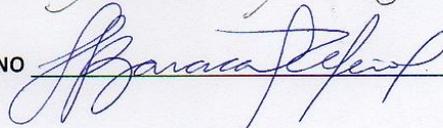
3. PROF(A). DR(A). EROS ANTONIO DE ALMEIDA



4. PROF(A).DR(A). IVANI APARECIDA DE SOUZA



5. PROF(A).DR(A). JULIANA SIGNORI BARACAT ZEFERINO



Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas

Data: 07 de fevereiro de 2014

AOS MEUS PAIS,

LOURDES TEIXEIRA MENDES

E

GILBERTO MAZIERO

*Por todo amor, incentivo e compreensão durante toda a
minha vida.*

*Pelo vasto esforço em me proporcionar uma boa
educação e por acreditarem sempre que eu sou capaz.*

É a vocês que eu dedico esta tese.

AGRADECIMENTOS

A Deus e a nossa senhora Maria, meus guias espirituais, pela vida, pela oportunidade de crescimento e busca pela evolução espiritual.

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Gilberto De Nucci, pelo acolhimento, orientação e oportunidade enriquecedora que tornaram possível a realização deste trabalho.

A você minha mãe, Lourdes Teixeira Mendes, exemplo de luta e coragem, mulher guerreira e batalhadora, que sempre fez o possível e o impossível para que nada me faltasse. Que muito contribuiu com todo seu amor e paciência nos momentos em que eu precisei sempre pronta a me ajudar, e principalmente nos momentos mais difíceis da minha vida. Obrigada por tudo!

A você meu pai, Gilberto Maziero, que sempre me apoiou, incentivou e que me deixou livre para que eu fizesse minhas escolhas, acreditando sempre que eu podia voar cada vez mais alto, muito obrigada!

À Eliane, atual esposa do meu pai, pela amizade e carinho, além de me proporcionar duas grandes alegrias na minha vida, que foram o nascimento das minhas duas irmãs, Yasmin e Jennifer.

A você Yasmin, depois de tantos anos a minha primeira irmã, que veio para encher a minha vida de alegria, me proporcionando grandes momentos de felicidade, descontração e aprendizado. Que me despertou para um tipo de amor único na vida de uma pessoa e que até então eu não conhecia.

A você Jennifer, minha segunda e mais nova irmãzinha, outra grande felicidade na minha vida, que chegou para preencher mais ainda a minha vida de alegria e amor, um amor especial que vai estar comigo por toda a minha vida.

Ao meu grande amor, Joab, por me proporcionar experiências maravilhosas, por tantos momentos de alegria compartilhados, por nossas belíssimas horas de lazer. Uma pessoa genial com há qual muito aprendi e ainda aprendo todos os dias.

À minha grande amiga Cristina Eunice Okuyama, por essa amizade tão especial e sincera, pelo convívio, pelas nossas longas horas de conversas, pelas boas risadas, pelos desabaços e confidências, por toda ajuda e apoio em experimentos, por tudo.

À minha outra grande amiga Raquel Lorenzetti, que tanto me apoiou, me ajudou, me ensinou, por toda ajuda nos experimentos, pelas longas horas de conversa mesmo quando distante. Obrigada por acreditar em mim, obrigada por sempre me lembrar de que sou capaz, que somos capazes, muito mais do que pensamos, pela amizade sincera e carinhosa de sempre.

Ao Prof. Dr. José Luiz Donato, pela oportunidade e orientação em minha iniciação científica na Unicamp, que me proporcionaram grande aprendizado, um interesse cada vez maior pela pesquisa e que me abriu as portas para a oportunidade de continuar e realizar minha pós-graduação.

Aos queridos colegas e docentes do Departamento de Farmacologia da Unicamp, Prof. Dr. Edson Antunes, Prof. Dr. Stephen Hyplop, Prof.^a Dra. Sisi Marcondes Paschoal, Prof.^a Dra. Elen C. T. Landucci, Prof. Dr. Cleber E. Teixeira (in memoriam), Prof.^a Dra. Angelina Zanescio, Prof. Marcos Fontana (in memoriam), Prof.^a Dra. Maricene Shaba, Prof.^a Dra. Albetiza L. Araújo e Prof. Dr. Heitor Moreno Jr, pelo convívio e pelos ensinamentos.

À todos os meus colegas e amigos presentes ou que já passaram pelo Departamento de Farmacologia da Unicamp, pelo convívio, amizade, e que de algum modo me apoiaram direta ou indiretamente durante a realização deste trabalho: Alice, Ana Cecília Montes Gil, Carla Penteado, Eduardo Abib, Emilton

Camargo, Fernanda e Marcelo Datti, Fernanda Priviero, Haroldo, Humberto, Ivani Ap. de Souza, Juliana Moreira, Juliana Baracat, Laura Esquisato, Leticia Lintomen, Leyge Couto, Lourdes, Luis Otávio, Márcia Cardoso, Mário Ângelo, Rafael Morgantti, Renata Pennachin, Renata Pereira, Renato Faro, Sara Thomazzi, Tatiane Ferreira.

Aos funcionários e ex-funcionários do departamento de Farmacologia da Unicamp: Gislaine, Vanderlei, Fran, Elaine, Quina, Toninho, Sr. Miguel, José Itton, Adilson.

Aos colegas do departamento de Investigação em Pediatria (CIPED) da Unicamp por toda ajuda e apoio: Edgar Borges e Juan López. Em especial ao Prof. Dr. Antonio Condino Neto e a bióloga Jussara Rehder, pela oportunidade de aprendizagem em cultura de células e pelo fornecimento das linhagens celulares eucarióticas utilizadas neste trabalho.

Aos meus colegas da Galeno Research Unit pela convivência, ajuda e aprendizado: Ângela Chinelatto, Beatriz, Geórgio Valadares, Jane Finzi e Sérgio Lilla.

Ao meu colega do departamento de Farmacologia da USP, Juan Aliaga, pelo apoio e grandes ensinamentos na área de biologia molecular e microbiologia, e também a Prof.^a Hamza El Dorry (Instituto de Química - USP - S.P.) por fornecer a linhagem bacteriana *E. coli* DH5 α .

Às colegas da Fundação André Tosello, Fabiana Martins, Vilma, Aline Maria e Josiane Conti, obrigada por tudo meninas, adorei conviver com vocês.

Ao Prof. Dr. Celso Benedetti (LNLS - Síncroton), pelo fornecimento das linhagens bacterianas e pela oportunidade de sequenciamento das amostras.

Aos animais e aos doadores de sangue.

Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro que permitiu minha dedicação exclusiva a este trabalho.

"Jamais considere seus estudos como uma obrigação, mas como uma oportunidade invejável (...) para aprender a conhecer a influência libertadora da beleza do reino do espírito, para seu próprio prazer pessoal e para proveito da comunidade à qual seu futuro trabalho pertencer."

(Albert Einstein)

Lista de abreviaturas e símbolos	xix
Lista de abreviaturas e símbolos de aminoácidos	xxiii
Lista de Materiais	xxv
Lista de Tabelas	xxix
Lista de Figuras	xxxí
Abstract.....	xxxv
1. Introdução	37
1.1. Morfologia e Função dos Eosinófilos.....	37
1.2. Grânulos dos Eosinófilos	38
1.3. Proteínas dos Eosinófilos.....	40
1.3.1. Proteína MBP	40
1.3.2. Proteína ECP.....	42
1.3.3. Proteína EDN	44
1.3.4. Proteína EPO	45
1.4. Ativação e adesão dos eosinófilos	46
1.5. Eosinofilia	47
1.6. Eosinófilos e hemostase (disfunção plaquetária)	48
1.7. Inflamação / Processo Inflamatório	51
1.8. Resposta Inflamatória / Mecanismos da resposta imune	52
1.8.1. Imunidade inata ou inespecífica.....	53
1.8.2. Imunidade adaptativa	53
1.9. Plaquetas e inflamação	54
1.10. Plaquetas (morfologia, fisiologia e função)	55
1.10.1. Receptores plaquetários	57
1.11. Agonistas Plaquetários	57
1.12. Ativação, Adesão e Agregação Plaquetária	60
2. Objetivo Geral	65

3. Objetivos Específicos	65
4. Métodos (Parte 01)	67
Agregação Plaquetária com Eosinófilos de Rato e Eosinófilos diferenciados a partir da linhagem HL-60 clone 15	67
4.1. Isolamento de eosinófilos de ratos	67
4.1.1. Contagem de células	68
4.2. Preparo da fração citosólica de eosinófilos de rato	68
4.3. Teste de termoestabilidade	69
4.4. Gel Filtração	69
4.5. Análise por cromatografia líquida (RP-HPLC) e espectrometria de massa	69
4.5.1. Cromatografia de alta pressão	69
4.5.2. Análise por espectrometria de massa	70
4.6. Ensaio de Agregação plaquetária	71
4.6.1. Obtenção de plasma rico e pobre em plaquetas para teste de agregação plaquetária	71
4.6.2. Obtenção de plaquetas lavadas para teste de agregação plaquetária	71
4.6.3. Monitoramento da Agregação Plaquetária	72
4.7. Cultura de Células HL-60 clone 15	73
4.7.1. Preparo da fração citosólica células HL-60 clone 15	74
5. Métodos (Parte 02)	75
Proteína ECP na Agregação Plaquetária	75
5.1. Proteína ECP	75
5.2. Agregação Plaquetária em PRP e PL	75
5.3. Atividade plaquetária por MTT (Teste de citotoxicidade)	75
6. Métodos (Parte 03)	77
Clonagem das proteínas do eosinófilo em Sistema Eucarioto	77
6.1. Cultura de Células HL-60 clone 15	77
6.2. Análise do mRNA pela técnica de RT-PCR e obtenção do cDNA das proteínas do eosinófilo	77
6.2.1. Extração do RNA total	77
6.2.2. Síntese do cDNA por transcrição reversa (RT-PCR)	78
6.3. Reação em cadeia da polimerase (PCR)	79

6.3.1. Oligonucleotídeos (<i>primers</i>).....	79
6.3.2. Enzimas.....	81
6.4. Eletroforese em gel de agarose para PCR.....	82
6.5. Vetor de clonagem (Sistema Eucarioto).....	82
6.6. Estoque das bactérias <i>E. coli</i> DH5 α	83
6.7. Extração de DNA plasmidial da bactéria <i>E. coli</i> DH5 α	84
6.8. Clivagem do DNA plasmidial.....	85
6.9. Ligação com T4 DNA ligase.....	85
6.10. Eletroforese em gel de agarose para análise da integridade dos produtos de clonagem.....	85
6.11. Preparação de células competentes para transformação pelo método de eletroporação.....	86
6.12. Transformação bacteriana pelo método de eletroporação.....	87
6.12.1. Verificação das Unidades Formadoras de Colônias (UFCs).	87
6.12.2. Isolamento de DNA plasmidial.....	87
6.13. Sequenciamento do inserto subclonado no vetor de expressão.....	88
6.13.1. Análise dos produtos de sequenciamento.....	89
6.14. Cultura de Células U937 para expressão de proteínas.....	89
6.14.1. Transfecção.....	89
6.15. Preparação da fração citosólica de células U937.....	90
7. Análise Estatística.....	91
8. Resultados (Parte 01).....	93
8.1. Purificação de eosinófilos de ratos.....	93
8.2. Efeito da fração citosólica de eosinófilos de rato sobre a agregação plaquetária.....	93
8.3. Gel filtração.....	98
8.4. Espectrometria de Massa.....	99
8.5. Cinética de diferenciação das células HL-60 clone 15 na avaliação do efeito de inibição da agregação plaquetária.....	102
9. Resultados (Parte 02).....	103
9.1. Efeito da proteína ECP sob a Agregação Plaquetária.....	103
9.2. Atividade Plaquetária por MTT (Teste de citotoxicidade).....	104
10. Resultados (Parte 03).....	107

10.1. PCR para obtenção dos cDNAs de proteínas eosinofílicas	107
10.2. Análise da integridade dos produtos de clonagem	109
10.3. PCR para amplificação do cDNA das proteínas MBP e EDN/ECP contendo sítios de restrição.....	110
10.4. Ligação com T4 DNA ligase.....	110
10.5. Transformação.....	111
10.6. Sequenciamento	112
10.7. Transfecção e expressão das proteínas	114
10.8. Efeito da fração citosólica de células das proteínas clonadas sob a agregação plaquetária.....	114
11. Discussão	117
12. Conclusão	125
13. Referências Bibliográficas	127

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

β -TG	beta-Tromboglobulina; <i>beta-Thromboglobulin</i>
5-HT	serotonina ou 5-hidroxitriptamina; <i>serotonin or 5-hydroxytryptamine</i>
AA	ácido araquidônico; <i>arachidonic acid</i>
AC	adenilato ciclase; <i>adenylate cyclase</i>
ACN	acetonitrila; <i>acetonitrile</i>
ADP	difosfato de adenosina; <i>adenosine diphosphate</i>
AMPc	monofosfato cíclico de adenosina; <i>cyclic adenosine monophosphate</i>
ATP	trifosfato de adenosina; <i>adenosine triphosphate</i>
BSA	albumina sérica bovina; <i>bovine serum albumin</i>
Ca	cálcio; <i>calcium</i>
Ca ²⁺	íon cálcio; <i>calcium ion</i>
CaCl ₂	cloreto de cálcio; <i>calcium chloride</i>
CD18	integrina beta 2; <i>integrin beta-2</i>
cDNA	DNA complementar; <i>complementary DNA</i>
céls	células; <i>cells</i>
CH50	atividade total do complemento; <i>total complement activity</i>
CLC	cristais de Charcot-Leyden; <i>Charcot-Leyden crystals</i>
CO ₂	dióxido de carbono; <i>carbon dioxide</i>
COX	ciclooxigenase; <i>cyclooxygenase</i>
D.O.	densidade óptica; <i>optical density</i>
D.P.	desvio padrão; <i>standard deviation</i>

DAG	diacilglicerol; <i>diacylglycerol</i>
DEPC	dietilpirocarbonato ou dicarbonato de dietila; <i>diethylpyrocarbonate</i>
DNA	ácido desoxiribonucléico; <i>deoxyribonucleic acid</i>
dNTP	desoxinucleotídeos trifosfatados; <i>deoxynucleotide triphosphates</i>
ECP	proteína catiônica do eosinófilo; <i>eosinophil cationic protein</i>
EDN	neurotoxina derivada do eosinófilo; <i>eosinophil-derived protein</i>
EDTA	ácido etilenodiaminotetraacético; <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>
eNOS	óxido nítrico sintase endotelial; <i>endothelial nitric oxide synthase</i>
Ephr	receptores tirosina quinase; <i>tyrosine kinase receptor</i>
EPO	peroxidase do eosinófilo; <i>eosinophil peroxidase</i>
fMLP	<i>Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanine</i>
GCs	guanilato ciclase solúvel; <i>guanylate cyclase</i>
GMPc	monofosfato cíclico de guanosina; <i>cyclic guanosine monophosphate</i>
GP	glicoproteína; <i>glycoprotein</i>
GTP	trifosfato de guanosina; <i>guanosine triphosphate</i>
ICAM-1	molécula de adesão intercelular 1; <i>intercellular adhesion molecule 1</i>
IFN- γ	interferon-gama; <i>interferon gamma</i>
IgE	imunoglobulina E; <i>immunoglobulin E</i>
IL-5	interleucina 5; <i>interleukin 5</i>
IP	receptor para prostaciclina; <i>prostacyclin receptor</i>
IP ₃	inositol trifosfato; <i>inositol trisphosphate</i>
KCl	cloreto de potássio; <i>potassium chloride</i>
LB	meio de cultura “Lúria-Bertani”; <i>Luria-Bertani culture medium</i>

LMs	leucócitos mononucleares; <i>mononuclear leukocytes</i>
MBP	proteína básica principal; <i>major basic protein</i>
MEM	meio mínimo essencial; <i>minimum essential medium eagle</i>
Mg	magnésio; <i>magnesium</i>
Mg ²⁺	íon magnésio; <i>magnesium ion</i>
MgCl ₂	cloreto de magnésio; <i>magnesium chloride</i>
Milli-Q	água ultra pura de tipo 1; <i>ultrapure water of type 1</i>
MNs	células mononucleares; <i>mononuclear cells</i>
mRNA	RNA mensageiro; <i>messenger RNA</i>
NO	óxido nítrico; <i>nitric oxide</i>
NOS	óxido nítrico sintase; <i>nitric oxide synthase</i>
Oligo (dT)	Oligo desoxitimidina trifosfato (oligonucleotídeo poli- T); <i>a short sequence of deoxy-thymine nucleotides</i>
PAF	fator ativador de plaquetas; <i>platelet-activating factor</i>
pb	pares de base; <i>base pairs</i>
PBS	tampão fosfato salino; <i>phosphate buffered saline</i>
PCR	reação em cadeia da polimerase; <i>polymerase chain reaction</i>
PDGF	fator de crescimento derivado de plaquetas; <i>platelet-derived growth factor</i>
PECAM-1	molécula de adesão celular endothelial plaquetária; <i>platelet endothelial cell adhesion molecule</i>
PF4	fator plaquetário 4; <i>platelet factor 4</i>
PGD ₂	prostaglandina D ₂ ; <i>prostaglandin D₂</i>
PGE ₁	prostaglandina E ₁ ; <i>prostaglandin E₁</i>
PGE ₂	prostaglandina E ₂ ; <i>prostaglandin E₂</i>

PGI ₂	prostaciclina; <i>prostacyclin</i>
PIP ₂	fosfatidilinositol bifosfato; <i>phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate</i>
PKC	proteína quinase C; <i>protein kinase C</i>
PLC	fosfolipase C; <i>phospholipase C</i>
PMNs	células polimorfonucleares; <i>polymorphonuclear cells</i>
PPP	plasma pobre em plaquetas; <i>platelet poor plasma</i>
<i>primer</i>	oligonucleotídeo iniciador; <i>strand of nucleic acid</i>
PRP	plasma rico em plaquetas; <i>platelet rich plasm</i>
RNA	ácido ribonucleico; <i>ribonucleic acid</i>
RNA _m	ácido ribonucleico mensageiro; <i>messenger ribonucleic acid</i>
RNA _{se}	ribonuclease; <i>ribonuclease</i>
RT-PCR	reação em cadeia da polimerase reversa; <i>reverse transcription polymerase chain reaction</i>
TFA	ácido trifluoroacético; <i>trifluoroacetic acid</i>
TNF- α	fator de necrose tumoral alfa; <i>tumor necrosis factor alpha</i>
TXA ₂	tromboxano A ₂ ; <i>tromboxane A₂</i>
VCAM-1	molécula de adesão vascular 1; <i>vascular cell adhesion protein 1</i>
VLA-4	antígeno de ativação tardia-4; <i>very late antigen-4</i>
FvW	fator de vonWillebrand; <i>vonWillebrand factor</i>

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS DE AMINOÁCIDOS

Nome	Abreviatura	Símbolo
Alanina	Ala	A
Arginina	Arg	R
Asparagina	Asn	N
Aspartato ou Ácido aspártico	Asp	D
Cisteína	Cys, Cis	C
Fenilalanina	Phe ou Fen	F
Glicina	Gly, Gli	G
Glutamato ou Ácido glutâmico	Glu	E
Glutamina	Gln	Q
Histidina	His	H
Isoleucina	Ile	I
Leucina	Leu	L
Lisina	Lys, Lis	K
Metionina	Met	M
Prolina	Pro	P
Serina	Ser	S
Tirosina	Tyr, Tir	Y
Treonina	Thr, The	T
Triptofano	Trp, Tri	W
Valina	Val	V

LISTA DE MATERIAIS

Substância	Procedência
Acetato de Potássio	Merck (Rio de Janeiro, Brasil)
Ácido Acético Glacial	Merck (Rio de Janeiro, Brasil)
Ácido butírico	Sigma (St. Louis, EUA)
Acetonitrila	J. T. Baker (EUA)
ADP	Sigma (St. Louis, EUA)
Agarose de alta resolução	Sigma (St. Louis, EUA)
Água DEPC	Life Technologies (CA, EUA)
Albumina bovina	Sigma (St. Louis, EUA)
Ampicilina	Sigma (St. Louis, EUA)
BamHI	New England Biolabs
Brometo de etídio	Sigma (St. Louis, EUA)
CaCl ₂	Merck (Rio de Janeiro, Brasil)
Canamicina	Sigma (St. Louis, EUA)
Citrato de sódio	Merck (Rio de Janeiro, Brasil)
dNTP Mix	Sigma (St. Louis, EUA)
DTT	Sigma (St. Louis, EUA)
EDTA	Invitrogen Inc. (EUA)
Estreptomicina	Sigma (St. Louis, EUA)
Etanol	Merck (Rio de Janeiro, Brasil)
Glicerol	Sigma (St. Louis, EUA)

Glicose	Merck (Rio de Janeiro, Brasil)
Halotano	Lab.Cristália (Itapira, Brasil)
HCl	Merck (Rio de Janeiro, Brasil)
Iloprost	Schering (Alemanha)
Indometacina	Sigma (St. Louis, EUA)
Isopropanol	Merck (Rio de Janeiro, Brasil)
KCl	Merck (Rio de Janeiro, Brasil)
KH ₂ PO ₄	Merck (Rio de Janeiro, Brasil)
L-glutamina	Sigma (St. Louis, EUA)
L-NAME	Sigma (St. Louis, EUA)
Metanol	J. T. Baker (EUA)
MgCl ₂	Merck (Rio de Janeiro, Brasil)
MgSO ₄ .7H ₂ O	Merck (Rio de Janeiro, Brasil)
NaCl	Merck (Rio de Janeiro, Brasil)
NaOH	Merck (Rio de Janeiro, Brasil)
Oligo (dT) ₁₈	Life Technologies (CA, EUA)
Ovoalbumina	Sigma (St. Louis, EUA)
PAF	Sigma (St. Louis, EUA)
Penicilina	Sigma (St. Louis, EUA)
RPMI 1640	Sigma (St. Louis, EUA)
SDS	Sigma (St. Louis, EUA)
Soro fetal bovino	Cultlab (Campinas, Brasil)
T4 DNA ligase	Sigma (St. Louis, EUA)
Tampão de reação (5X First-Strand Buffer)	Sigma (St. Louis, EUA)

Taq DNA polimerase	Sigma (St. Louis, EUA)
Transcriptase reversa (SuperScript III RT)	Sigma (St. Louis, EUA)
Tris base	Invitrogen Inc. (EUA)
Tris-HCl	Sigma (St. Louis, EUA)
Trizol	Invitrogen Inc. (EUA)
Trombina	Sigma (St. Louis, EUA)
XbaI	New England Biolabs
XhoI	New England Biolabs
ZnCl ₂	Merck (Rio de Janeiro, Brasil)

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Lista dos oligonucleotídeos (<i>primers</i>).....	80
Tabela 2. Lista dos oligonucleotídeos (<i>primers</i>) com sítios de restrição.	81
Tabela 3. Lista de enzimas de restrição.....	81
Tabela 4. Viabilidade celular das células U937 transfectadas com as proteínas....	114

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática dos processos de ativação, adesão, secreção e agregação plaquetária.....	63
Figura 2. Representação esquemática do eosinófilo e seus grânulos	63
Figura 3. Estrutura 3D da proteína MBP humana.....	63
Figura 4. Estrutura 3D da proteína ECP humana.	63
Figura 5. Estrutura 3D da proteína EDN humana.	63
Figura 6. Estrutura 3D da proteína EPO humana.	63
Figura 7. Representação esquemática do procedimento da agregação e inibição da agregação plaquetária.....	73
Figura 8. Mapa do plasmídeo pcDNA3.1 (+/-) contendo os sítios de restrição	83
Figura 9. Inibição da agregação plaquetária em plaquetas lavadas (PL) com a fração citosólica de eosinófilos e trombina.....	94
Figura 10. Inibição da agregação plaquetária em plasma rico em plaquetas (PRP) com a fração citosólica de eosinófilos e ADP	95
Figura 11. Inibição da agregação plaquetária em plasma rico em plaquetas (PRP) com a fração citosólica de eosinófilos e PAF	96
Figura 12. Inibição da agregação plaquetária em plasma rico em plaquetas (PRP) com a fração citosólica de eosinófilos e ácido araquidônico.	97
Figura 13. Inibição da agregação plaquetária em plasma rico em plaquetas (PRP) com a fração citosólica de eosinófilos e colágeno.....	98

Figura 14. Gel filtração em Sephadex G-75 da fração citosólica de eosinófilos e inibição da agregação plaquetária em plasma rico em plaquetas (PRP) ...	99
Figura 15. Cromatografia de fase reversa da fração ativa P-II obtida em Gel Filtração (Sephadex G-75).....	100
Figura 16. Espectro de massa da fração P-II1 em cromatografia de fase reversa.....	101
Figura 17. Espectro de massa da fração P-II2 em cromatografia de fase reversa.....	101
Figura 18. Diferenciação de células HL-60 clone 15 e inibição da agregação plaquetária em PRP induzida por PAF	102
Figura 19. Inibição da agregação plaquetária em PRP pela proteína ECP	103
Figura 20. Inibição da agregação plaquetária em PL pela proteína ECP	104
Figura 21. Ensaio de MTT para avaliar a citotoxicidade da proteína ECP sob as plaquetas humanas.....	105
Figura 22. Eletroforese em gel de agarose representando os produtos de amplificação por PCR da proteína MBP	107
Figura 23. Eletroforese em gel de agarose representando os produtos de amplificação por PCR das proteínas EPO e ECP/EDN.....	108
Figura 24. Eletroforese em gel de agarose representando a integridade dos produtos de clonagem.....	109
Figura 25. Eletroforese em gel de agarose representando os produtos de amplificação por PCR das proteínas MBP, ECP/EDN contendo os sítios de restrição.	111
Figura 26. Alinhamento da seqüência da proteína MBP.....	113
Figura 27. Alinhamento da seqüência da proteína EDN.	113
Figura 28. Efeito das proteínas clonadas sobre a agregação plaquetária.....	115

Os eosinófilos participam de processos inflamatórios e alérgicos. Estando relacionados com o sistema de imunidade inata do organismo, eles representam uma linha fundamental de defesa contra invasão microbiana e, quando ativados, produzem uma série de mediadores solúveis que atuam nas respostas inflamatórias e alérgicas.

A relação entre a atividade dos eosinófilos e plaquetas foi observada nas últimas décadas por muitos cientistas. Estas observações incluem o aumento do número de eosinófilos associados a desordens plaquetárias, incluindo alterações na cascata de coagulação e agregação plaquetária. Com base nessas observações, a interação entre os eosinófilos e plaquetas foram analisadas na agregação plaquetária.

Plaquetas humanas foram incubadas com a fração citosólica de eosinófilos, linhagem celular promielocítica humana HL-60 clone 15 e proteína catiônica do eosinófilo (ECP). A agregação em plasma rico em plaquetas (PRP) foi induzida por difosfato de adenosina, fator de ativação plaquetária, ácido araquidônico e colágeno, e as plaquetas lavadas (PL) foram ativadas por trombina.

A agregação induzida por todos os agonistas foi inibida de maneira concentração de células dependente pela fração citosólica de eosinófilos. Esta inibição foi apenas parcialmente revertida pela prévia incubação dos eosinófilos com L-Nitro-Arginina-metil-éster (L-NAME). A prévia incubação com indometacina não impediu a inibição induzida pela fração citosólica.

A separação da fração citosólica de eosinófilos por gel filtração em Sephadex G-75 mostrou que a atividade inibitória foi concentrada na fração de peso molecular mais baixo. As células HL -60 clone 15 diferenciadas em eosinófilos por 5 e 7 dias foram capazes de inibir a agregação plaquetária. A proteína de ECP inibiu a agregação plaquetária em PRP e PL. Esta inibição foi mais evidente em PL, e o ensaio de citotoxicidade com MTT demonstrou a viabilidade de plaquetas testadas, indicando que a inibição observada pela proteína ECP não ocorre simplesmente pela morte celular.

A proteína EDN, clonada e expressa em sistema eucarioto, também apresentou efeito de inibição sobre a agregação plaquetária em PRP, enquanto que a proteína MBP não apresentou efeito de inibição da agregação plaquetária significativo.

Os nossos resultados indicam que os eosinófilos desempenham um papel fundamental na inibição da agregação plaquetária.

Eosinophils participate in allergic and inflammatory processes, being related to innate immunity system of the body, they represent a fundamental line of defense against microbial invasion and when activated produce a number of soluble mediators that act in inflammatory and allergic responses.

The relationship between the activity of eosinophils and platelets has been observed in recent decades by many scientists. These observations include increased numbers of eosinophils associated with platelet disorders, including changes in the coagulation cascade and platelet aggregation. Based on these observations, the interaction between eosinophils and platelets in platelet aggregation was analyzed.

Human platelets were incubated with eosinophil cytosolic fraction, promyelocytic human HL-60 clone 15 cell lineage, and eosinophil cationic protein (ECP). Platelet rich plasma (PRP) aggregation was induced by adenosine diphosphate, platelet activating factor, arachidonic acid, and collagen, and washed platelets (WP) were activated by thrombin.

Aggregation induced by all agonists was dose dependently inhibited by eosinophil cytosolic fraction. This inhibition was only partially reversed by previous incubation of the eosinophils with L-Nitro-Arginine-Methyl-Ester (L-NAME). Previous incubation with indomethacin did not prevent the cytosolic fraction induced inhibition.

The separation of eosinophil cytosolic fraction by gel filtration on Sephadex G-75 showed that the inhibitory activity was concentrated in the lower molecular weight fraction. HL-60 clone 15 cells differentiated into eosinophils for 5 and 7 day were able to inhibit platelet aggregation. The ECP protein inhibited the platelet aggregation on PRP and WP. This inhibition was more evident in WP, and the cytotoxicity MTT assay proved the viability of tested platelets, showing that the observed inhibition by the ECP protein does not occur simply by cell death.

The EDN protein, cloned and expressed in eukaryotic system, also showed inhibitory effect on platelet aggregation in PRP, whereas the protein MBP had no effect significant inhibiting platelet aggregation.

Our results indicate that eosinophils play a fundamental role in platelet aggregation inhibition.

1.1. Morfologia e Função dos Eosinófilos

Os eosinófilos são células sanguíneas produzidas na medula óssea por células tronco pluripotentes (Rothenberg, 1998). Esta célula foi observada pela primeira vez por Wharton Jones em 1846 em preparações não coradas de sangue periférico, no entanto, apenas em 1879 é que essa célula foi descrita como eosinófilo por Paul Ehrlich. Ela foi assim denominada devido a sua intensa coloração por corantes ácidos, como a eosina, que as distinguem de outros granulócitos (Giembycz e Lindsay, 1999; Kita, 2011).

Eosinófilos humanos possuem diâmetro de aproximadamente 8 μm , volume aproximado de 275 fl. Geralmente, eosinófilos possuem núcleo bi-lobulado preenchido com cromatina parcialmente condensada, mas também podem ser observados três ou mais lóbulos. A característica mais proeminente nestas células é a presença de diversos grânulos esféricos ou ovóides, ocupando aproximadamente um quinto do citoplasma, e que são divididos em quatro populações distintas: grânulos primários, secundários, pequenos e corpos lipídicos (Figura 2).

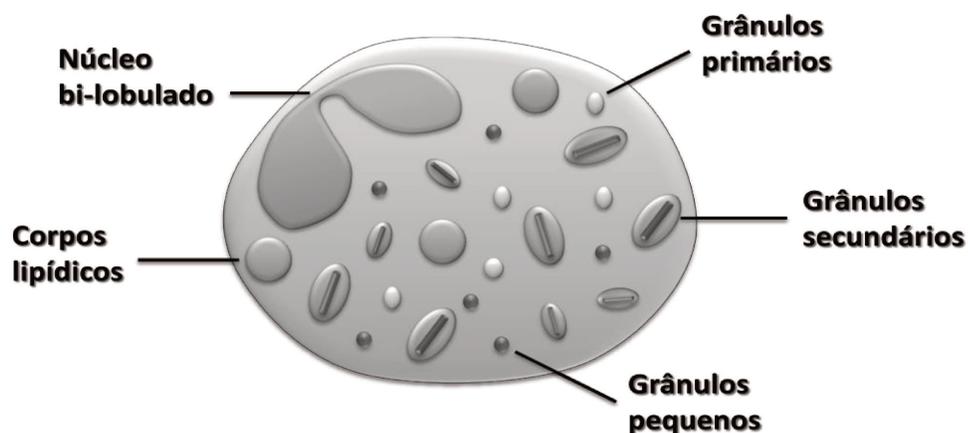


Figura 1. Representação esquemática do eosinófilo e seus grânulos.

O acúmulo de eosinófilos está implicado na patogênese de diversas doenças: infecções helmínticas parasitárias; doenças alérgicas, tais como asma, rinite alérgica e dermatite atópica; doenças pulmonares, como histiocitose, pneumonia eosinofílica crônica e sarcoidose; doenças vasculares granulomatosas, como vasculite temporal e síndrome de Churg-Strauss; doenças neoplásicas e mieloproliferativas, como síndrome hipereosinofílica, linfomas de células T e doença de Hodgkin; e mais recentemente, os eosinófilos também foram associados com as respostas imunoregulatórias, em reações autoimunes como esclerose múltipla. Em resposta a diversos estímulos, os eosinófilos são recrutados da circulação sanguínea para os pontos de inflamação, onde modulam a resposta imune através de uma vasta variedade de mecanismos (Munitz e Levi-Schaffer, 2004; Rothenberg e Hogan, 2006; Muniz, Weller e Neves, 2012).

Eosinófilos ativados são capazes de fagocitar bactérias e liberar mediadores lipídicos, no entanto, seu principal mecanismo de destruição é a liberação de proteínas citotóxicas do interior de seus grânulos, além da produção de radicais livres de oxigênio (Lampinen *et al.*, 2004).

1.2. Grânulos dos Eosinófilos

Os grânulos primários representam 5% do total de grânulos dos eosinófilos e constituem o local onde são encontrados os chamados cristais bipiramidais hexagonais de *Charcot-Leyden*. Esta proteína pode ser encontrada difusamente no núcleo e citoplasma de eosinófilos ativados e em basófilos numa quantidade aproximada da encontrada em eosinófilos. Os cristais de *Charcot-Leyden* são encontrados nas fezes e

expectoração de indivíduos com distúrbios gastrointestinais e doenças respiratórias, como a asma (Giembycz e Lindsay, 1999; Kita, 2011).

Os grânulos secundários são constituídos por duas regiões distintas, sendo uma região elétron-densa onde se encontra o núcleo cristalóide ou *internum* alongado e outra região denominada matriz ou *externum*. Na região do núcleo cristalóide encontra-se o seu principal componente, a proteína básica principal (*major basic protein*, MBP), proteína esta rica em arginina, que representa 50% das proteínas do grânulo secundário e é responsável por sua acidofilia. A região da matriz é constituída por uma fase líquida que circunda o *internum* e contém enzimas granulares, citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento, bem como as outras três proteínas características do eosinófilo, a proteína catiônica do eosinófilo (*eosinophil cationic protein*, ECP), neurotoxina derivada do eosinófilo (*eosinophil-derived neurotoxin*, EDN) e peroxidase do eosinófilo (*eosinophil peroxidase*, EPO) (Giembycz e Lindsay, 1999; Kita, 2011).

Os grânulos pequenos são melhores identificados em eosinófilos humanos que migraram para tecidos e não são visualizados em células circulantes ou na medula óssea. Estas estruturas são intensamente coradas por arilsulfatase B e fosfatase ácida e podem conter também catalase (Giembycz e Lindsay, 1999).

A última população de grânulos é conhecida como corpo lipídico, sendo encontrados aproximadamente cinco desses grânulos por eosinófilos, embora este número possa ser maior em células ativadas. Os corpos lipídicos são organelas esféricas (0,5 a 2 μm de diâmetro), elétron-densas e caracterizam-se como o principal sítio de armazenamento e metabolismo do ácido araquidônico (AA), além de

representar um local para biossíntese de mediadores lipídicos, onde podemos encontrar os seguintes componentes do metabolismo lipídico: ácido araquidônico, leucotrienos, PAF, tromboxano, prostaglandinas, 5-lipoxigenase, 15-lipoxigenase e ciclooxigenase (Junqueira, Carneiro e Kelley, 1998; Giembycz e Lindsay, 1999).

1.3. Proteínas dos Eosinófilos

Os eosinófilos contêm várias proteínas com fortes cargas positivas e citotóxicas armazenadas em seus grânulos. Quando ativados, os eosinófilos liberam essas proteínas e produzem um arsenal de enzimas e mediadores lipídicos, que estão implicados nas funções efetivas do eosinófilo. Entre as principais proteínas granulares liberadas estão: MBP, MBP-2, ECP, EDN e EPO (Giembycz e Lindsay, 1999; Kita, 2011).

1.3.1. Proteína MBP

Tal como uma das proteínas mais catiônicas sintetizadas pelos eosinófilos a MBP é uma proteína expressa como duas proteínas homólogas diferentes, a MBP-1 e MBP-2 (Hogan *et al.*, 2008). A proteína MBP é uma proteína com uma cadeia polipeptídica na forma de monômero, rica em arginina e cinco cisteínas não pareadas. Ela possui aproximadamente 13,8 kDa (117 resíduos de aminoácidos), forte característica básica, com ponto isoelétrico (pI) de 11,4 e uma carga líquida de +15,0 em pH 7,0. Em humanos, a proteína MBP é encontrada numa concentração de 5-10 pg/célula (Giembycz e Lindsay, 1999; Hogan *et al.*, 2008).

A proteína MBP é sintetizada inicialmente como proMBP. Ela possui em torno de 23 a 25,2 kDa (222 aminoácidos) e pI de 6-6,2. A diferença entre o tamanho da proMBP

e a proteína final, que é de 9,9 kDa parece ser responsável por proteger a célula durante o transporte da proteína citotóxica a partir do Aparelho de Golgi até o grânulo do eosinófilo onde ela fica armazenada (Giembycz e Lindsay, 1999; Kita, 2011).

Recentemente foi descoberta a MBP-2, uma proteína homóloga à MBP, que possui *pI* calculado de 8,7 e peso molecular teórico calculado em torno de 13,4 kDa. As proteínas MBP e MBP-2 possuem identidade de 42 dos 117 aminoácidos totais. A MBP-2 é 100 vezes mais básica que a MBP. Além disso, a MBP-2 parece ter os mesmos efeitos da MBP, no entanto, parece ter uma eficácia mais reduzida (Wagner *et al.*, 2007; Kita, 2011).

A proteína MBP-1 também pode ser encontrada nos grânulos dos basófilos, enquanto que a MBP-2 é expressa exclusivamente em eosinófilos. Por isso a MBP-2 apresenta atividade como marcador biológico em pacientes asmáticos ou com outras doenças associadas ao eosinófilo, onde os fluídos biológicos (como fluídos de lavado broncoalveolar e secreção) apresentam uma concentração elevada desta proteína (Wassom *et al.*, 1981; Hogan *et al.*, 2008).

A proteína MBP é uma potente helmintotoxina e é citotóxica para bactérias e células mamíferas *in vitro*. Ela se liga e rompe a membrana de schistomula's, danificando diretamente o *S. mansoni*. A MBP é citotóxica contra outros helmintos, como larvas recém-nascidas de *T. spiralis*, *Brugia pahangi*, *Brugia malayi*, *Trypanosoma cruzi*, e certas bactérias como *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. (Kita, 2011). A proteína MBP parece danificar as células pelo rompimento da bi-camada lipídica da membrana celular ou alterando a atividade de enzimas no interior de tecidos (Hastie *et al.*, 1987a; b). Esta proteína, assim como os cristais de Charcot-Leyden (CLC), que são proteínas encontradas principalmente na membrana plasmática de

células, também pode ser encontrada em basófilos, porém em menor quantidade do que nos eosinófilos (Lampinen *et al.*, 2004).



Figura 2. Estrutura 3D da proteína MBP humana¹.

1.3.2. Proteína ECP

A proteína ECP é um membro da subfamília de ribonucleases (RNAse), e é constituída de uma cadeia polipeptídica única com massa molecular de 15,5 kDa, contendo grandes quantidades de resíduos de arginina, resultando em um pl de 10,8. A concentração dessa proteína em eosinófilos humanos é de aproximadamente 15-25 pg/célula. Análise da seqüência de aminoácidos revelou que a proteína ECP e a proteína EDN são altamente homólogas (66% de homologia), sendo que dos primeiros 57 resíduos de aminoácidos, 37 são idênticos. A proteína ECP, assim como a proteína EDN, também apresenta homologia com a ribonuclease pancreática humana (32%), no entanto, ela é 100 vezes menos potente que a EDN (Giembycz e Lindsay, 1999; Hogan *et al.*, 2008; Kita, 2011).

¹ <http://www.ebi.ac.uk/pdbe-srv/view/entry/1h8u/visualisation.html>

Após cromatografia de afinidade em resina Sepharose-Heparina, dois picos cromatográficos foram identificados e definidos como ECP-1 e ECP-2. As duas formas têm sido identificadas imunologicamente, onde o anticorpo monoclonal EG1⁺ interage com a proteína armazenada nos grânulos de eosinófilos em repouso (não ativados) e com a proteína secretada, que é proveniente das células ativadas, enquanto que o anticorpo EG2⁺ apenas interage com a proteína secretada. Estas diferenças podem ocorrer devido a uma mudança estrutural que ocorre quando a proteína é excretada por exocitose. O gene para a ECP humana (*RNS3*) está localizado na região q24-q31 do cromossomo 14, que codifica uma pré-proteína que é subsequente processada para ser armazenada na matriz dos grânulos específicos (Giembycz e Lindsay, 1999).

Além de sua atividade RNase, a proteína ECP é citotóxica contra helmintos, bactérias e células epiteliais mamíferas, possui atividade antiviral em infecções respiratórias e promove a degranulação de mastócitos (Hogan *et al.*, 2008; Kita, 2011).

1h1h

PDB



PDB

1h1h

Figura 3. Estrutura 3D da proteína ECP humana².

² <http://www.ebi.ac.uk/pdbe-srv/view/entry/4a2o/summary.html>

1.3.3. Proteína EDN

Outro membro da subfamília de ribonucleases (RNase, 36% identidade), a proteína EDN possui cadeia polipeptídica simples com massa de aproximadamente 18,6 kDa, pI de 8,9 e como as demais proteínas dos grânulos de eosinófilos, tem forte característica catiônica (Giembycz e Lindsay, 1999). A expressão do RNAm da EDN pode ser detectada em células HL-60 diferenciadas em eosinófilos por IL-5 ou ácido butírico (Rosenberg, Tenen e Ackerman, 1989; Tiffany, Handen e Rosenberg, 1996; Van Dijk *et al.*, 1998) e sua concentração em eosinófilos humanos normais é de aproximadamente 10 pg/célula, embora exista variação entre indivíduos, e a quantidade seja menor em pacientes com diferentes formas de eosinofilia (Giembycz e Lindsay, 1999; Hogan *et al.*, 2008).

O gene para a EDN humana (*RNS2*) assim como o da proteína ECP também está localizado na região q24-q31 do cromossomo 14, que também codifica uma pré-proteína que é subsequente processada para ser armazenada na matriz dos grânulos específicos (Giembycz e Lindsay, 1999).

Apesar do nome, a expressão da proteína EDN não é exclusiva dos eosinófilos, ela também pode ser detectada em células mononucleares (MNs) e possivelmente em neutrófilos (Giembycz e Lindsay, 1999; Hogan *et al.*, 2008).

A proteína EDN é uma potente neurotoxina e ela apresenta 100 vezes mais atividade RNase do que a proteína ECP, além disso, ela apresenta toxicidade contra parasitas e células mamíferas e atividade antiviral em infecções respiratórias (Hogan *et al.*, 2008; Kita, 2011).

2c02

PDB



PDB

2c02

Figura 4. Estrutura 3D da proteína EDN humana³.

1.3.4. Proteína EPO

A EPO é uma proteína membro de uma família de peroxidases mamíferas. A sequência de aminoácidos deduzida da proforma desta proteína, que é rica em arginina e leucina, resulta numa proteína altamente básica (pI 10,9), com uma massa molecular de aproximadamente 79,5 kDa. Esta proteína é constituída por duas cadeias polipeptídicas, uma das cadeias é de alto peso molecular, denominada cadeia pesada, apresentando de 50-58 kDa, e a outra é de baixo peso molecular, ou cadeia leve, apresentando de 11-15 kDa. As propriedades e os níveis de expressão da EPO são as mesmas em eosinófilos purificados de indivíduos normais e indivíduos com eosinofilia. Esta proteína pode ser encontrada numa concentração de aproximadamente 15 pg/célula e também pode ser encontrada em basófilos e neutrófilos (Giembycz e Lindsay, 1999; Hogan *et al.*, 2008; Kita, 2011).

³ <http://www.ebi.ac.uk/pdbe-srv/view/entry/2c02/summary.html>

Esta proteína apresenta 68% de identidade com a mieloperoxidase (presente em neutrófilos e monócitos) e entre as suas funções, a proteína EPO apresenta toxicidade contra células mamíferas, citotoxicidade contra o epitélio das vias respiratórias, efeitos bactericidas, atuando na lise de membrana e via de sinalização bacteriana e induz defeito oxidativo e mutagênese de DNA e RNA (Hogan *et al.*, 2008; Kita, 2011).

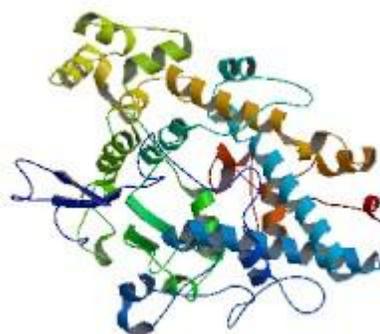


Figura 5. Estrutura 3D da proteína EPO⁴.

1.4. Ativação e adesão dos eosinófilos

A migração seletiva do eosinófilo da circulação através do endotélio e tecidos ocorre através de diversas etapas em seqüência. Inicialmente, ocorre ativação de algumas moléculas de adesão nas células endoteliais e ligantes específicos para os eosinófilos. A seguir, ocorre a passagem dos eosinófilos entre as células endoteliais. Os seguintes fatores estão envolvidos nestas etapas: 1) ligação reversível do eosinófilo às células endoteliais ativadas e subsequente *rolling* do eosinófilo; 2) firme adesão do eosinófilo ao endotélio; 3) transmigração do eosinófilo aderido através do endotélio até

⁴ <http://modbase.compbio.ucsf.edu/modbase->

[cgi/model_details.cgi?searchmode=default&displaymode=moddetail&seq_id=&model_id=27ed41c6e59bf5731a346fe-c6208b7b8&queryfile=1367944173_8337](http://modbase.compbio.ucsf.edu/modbase-cgi/model_details.cgi?searchmode=default&displaymode=moddetail&seq_id=&model_id=27ed41c6e59bf5731a346fe-c6208b7b8&queryfile=1367944173_8337)

tecidos. Mais especificamente, os eosinófilos aderem ao endotélio por meio de selectinas (moléculas de adesão sobre as células endoteliais) e seus ligantes correspondentes (Rothenberg, 1998). O *rolling* dos eosinófilos circulantes sobre o endotélio é mediado primeiramente pela P-selectina (Symon *et al.*, 1994; Wein *et al.*, 1995). Após ativação celular (isto é, após exposição à quimiotáticos tais como PAF e eotaxina), os eosinófilos aderem firmemente ao endotélio através das moléculas de adesão da família das integrinas. Estas incluem a família CD18 (integrinas β 2) e moléculas VLA-4 (antígeno de ativação tardia-4; integrinas β 1). As integrinas β 2 interagem com molécula de adesão intercelular 1 (ICAM-1) nas células endoteliais, enquanto as integrinas β 1 interagem com molécula de adesão de célula vascular 1 (VCAM-1) (Rothenberg, 1998; Hogan *et al.*, 2008). As moléculas de adesão ou receptores são reconhecidas como o centro do processo de migração dos eosinófilos da circulação sistêmica para tecidos. Além disso, os eosinófilos, diferentemente dos neutrófilos, expressam VLA-4 (Giembycz e Lindsay, 1999; Hogan *et al.*, 2008).

1.5. Eosinofilia

Eosinófilos representam de 1 a 3% do total de leucócitos no sangue periférico. Seus valores com relação à porcentagem e a contagem absoluta normal não devem exceder 5% e $0,5 \times 10^9/L$, respectivamente. A eosinofilia ocorre em uma variedade de distúrbios e pode ser classificada como leve ($0,5-1,5 \times 10^9/L$), moderada ($1,5-5 \times 10^9/L$) ou grave ($> 5 \times 10^9/L$) e ocorre como resultado de quatro processos, que são: 1) a diferenciação de células progenitoras e a proliferação de eosinófilos na medula óssea; 2) interações entre eosinófilos e células endoteliais que envolvem o *rolling*, adesão e

migração dessas células; 3) a quimiotaxia que direciona os eosinófilos a locais específicos; 4) ativação e destruição destas células (Rothenberg, 1998; Tefferi, Patnaik e Pardanani, 2006).

1.6. Eosinófilos e hemostase (disfunção plaquetária)

Com relação aos efeitos de eosinófilos na hemostase, uma relação foi observada entre a presença e a atividade destas células e o início da cascata de coagulação e a agregação de plaquetas (Takai, Kawada e Kohriyama, 1992). Estes autores observaram que em dois casos estudados os pacientes apresentavam eosinofilia e uma diminuição da agregação de plaquetas induzida pelo ADP, colágeno, ou epinefrina (Takai, Kawada e Kohriyama, 1992).

Uma síndrome rara, conhecida como disfunção plaquetária adquirida com eosinofilia, (APDE) tem sido relatada nas últimas décadas principalmente no sudeste da Ásia, em países como Tailândia, Singapura e Malásia, assim como em outros países, tais como a China e Venezuela, no entanto, sua verdadeira incidência não foi estudada (Lim *et al.*, 1989; Ruiz-Sáez *et al.*, 2005; Lee, 2012). A APDE é uma síndrome que afeta normalmente crianças, mas também pode se apresentar em jovens adultos. Ela é caracterizada pela apresentação de diátese hemorrágica adquirida associada à disfunção plaquetária com tempo de sangramento prolongado e eosinofilia. Além disso, os pacientes portadores dessa doença podem também apresentar hematomas, equimoses, petéquias e exames parasitológicos alterados (Hathirat *et al.*, 1993; Ruiz-Sáez *et al.*, 2005; Lee, 2012). Habitualmente a hipereosinofilia é a primeira pista para o diagnóstico, que é suportada pelos resultados associados com alterações plaquetárias (Lee, 2012).

Um estudo realizado em um grupo de 168 crianças com idade entre 13 meses e 12 anos, apresentando elevado número de eosinófilos mostrou que nesses pacientes o número de plaquetas era normal, mas em 8% dos indivíduos os sintomas de sangramento foram considerados graves, enquanto que em 53%, o tempo de sangramento apresentou-se marcadamente aumentado. A adesividade das plaquetas foi menor em 33% dos indivíduos estudados. A agregação plaquetária induzida por colágeno, ADP e epinefrina apresentou-se diminuída, não sendo observada a segunda onda de agregação (fase irreversível) típica em agregações induzidas por ADP e epinefrina (Laosombat *et al.*, 2001).

Em outro estudo realizado na Venezuela, a disfunção plaquetária associada à eosinofilia foi avaliada em um grupo de seis crianças, sendo dois meninos e quatro meninas, com idade média de oito anos, que apresentavam moderados episódios de sangramento mucoso ou epitelial, intensa reação eosinofílica ($> 650 \text{ cél}/\mu\text{L}$) e infecção intestinal. Neste estudo, todas as crianças apresentaram uma disfunção plaquetária caracterizada pela ausência constante da agregação plaquetária induzida por colágeno (100%). Em quatro pacientes, foi observada uma diminuição da agregação plaquetária induzida por adrenalina (66%) e ADP (66%), bem como a ausência da segunda onda de agregação. Foi avaliado também o tempo de sangramento, e três crianças do grupo o apresentaram prolongado, maior que 360 segundos (Ruiz-Sáez *et al.*, 2005).

Na China, sete homens previamente saudáveis com idade entre 19 e 22 foram estudados. Eles apresentavam hematomas nos membros superiores e inferiores. Nenhum deles possuía histórico pessoal ou familiar de tendências a sangramento e também não haviam tomado qualquer tipo de medicamento recentemente. O exame

físico em todos apresentou resultados normais, exceto para os hematomas, que limitaram-se aos membros, especialmente em torno dos cotovelos e joelhos. Todos os pacientes apresentaram eosinofilia, variando de $1,8-7 \times 10^9/L$. Em estudos anteriores havia sido demonstrado que os pacientes apresentavam apenas defeitos plaquetários qualitativos e nenhuma contagem havia sido menor que $100 \times 10^9/L$, no entanto, novos resultados demonstraram que em três destes casos ocorreram trombocitopenia moderada, sugerindo que esta pode ser outra extremidade do espectro desta condição. Esses autores indicam que a associação entre a reação mediada por IgE e a disfunção plaquetária variável permanece especulativa e que os resultados observados em seus estudos, bem como os de outros pesquisadores apontam para um defeito adquirido no *pool* de armazenamento plaquetário e que este defeito pode ser devido provavelmente a uma ativação plaquetária *in vivo* (Lim *et al.*, 1989).

Outro caso estudado foi o de um menino caucasiano de 11 anos que apresentava hematomas e equimoses cutâneas recorrentes durante cinco meses. A criança apresentava em seu histórico médico eventuais ataques de asma quando era pequeno, mas não havia história prévia de tendência ou excessivo sangramento, além disso, a história familiar era negativa para diátese hemorrágica. Quinze meses antes a família mudou-se dos Estados Unidos para Indonésia. Nos exames a criança apresentou-se com hematomas, petéquias nos membros, couro cabeludo, tórax e parede abdominal. Investigações laboratoriais revelaram eosinofilia ($7,4 \times 10^9/L$) com a presença de plaquetas cinzentas. O número de plaquetas era normal, mas os ensaios de agregação plaquetária demonstraram ser deficientes na presença de colágeno e epinefrina. Assim, foi feito o diagnóstico para APDE (Lee, 2012).

Outros estudos tem se concentrado na interação de células polimorfonucleares (PMNs) com plaquetas. Esta interação pode provocar o aumento da inflamação e da resposta de plaquetas, como por exemplo, metabólitos do ácido araquidônico, 5-HT, liberação de ATP e radicais de oxigênio (Schattner *et al.*, 1990; Zatta *et al.*, 1990; Maugeri *et al.*, 1992).

Em ensaios com PMNs não estimulados (95-98% de neutrófilos) demonstraram uma inibição da agregação plaquetária de 100% em plaquetas lavadas (PL), enquanto que em plasma rico em plaquetas (PRP), o efeito de inibição foi menos efetivo (74% de inibição), ambos com o agonista colágeno (Schattner *et al.*, 1990). PAF foi capaz de induzir a inibição da agregação plaquetária a partir de sangue total desprovido de leucócitos, o que sugere que os PMNs não estimulados podem liberar um fator que inibe a agregação plaquetária e libera β -tromboglobulina (Zatta *et al.*, 1990).

Outras células inflamatórias, como leucócitos mononucleares (LMs), também inibem a agregação plaquetária em PL induzida por trombina e colágeno (59% e 31%, respectivamente) (Schattner *et al.*, 1990).

1.7. Inflamação / Processo Inflamatório

A quimiotaxia de plaquetas e subsequente infiltração de leucócitos podem ser igualmente importantes na geração da inflamação alérgica das vias respiratórias, sugerindo que as plaquetas são necessárias para infiltração de eosinófilos, como demonstrado em um estudo com camundongos, onde a exposição à alérgenos pareceu induzir a migração de plaquetas nas vias respiratórias, que era uma condição necessária para o recrutamento e ativação de eosinófilos. Assim as plaquetas tiveram

um importante papel na via respiratória na presença de eosinofilia e no desencadeamento de reações inflamatórias (Pitchford, 2007; Huang e Chang, 2012).

A inflamação (do Latim *inflammatione*, que significa atear fogo) ou processo inflamatório, consiste em uma resposta complexa do organismo a estímulos endógenos ou exógenos, sejam eles de natureza química, física ou biológica, que podem causar lesão tecidual ou reação imunológica. É uma resposta de defesa do organismo, que promove a proteção aos tecidos, restringindo os danos no local em que ocorreu a injúria (Tincani *et al.*, 2007).

Nas primeiras fases da inflamação, células endoteliais, epiteliais e leucócitos infiltrantes teciduais produzem uma série de mediadores inflamatórios, como citocinas e lipídeos, sendo que a ação combinada dessas moléculas atrai e ativa outros leucócitos para o sítio reativo, promovendo a angiogênese e a remodelação do tecido, orientando a imunidade específica. Duas classes de moléculas são responsáveis por essa regulação do recrutamento dos leucócitos: os mediadores quimiotáticos (citocinas, quimiocinas, lipídeos bioativos) e as proteínas de aderência (selectinas e integrinas) (Tincani *et al.*, 2007).

1.8. Resposta Inflamatória / Mecanismos da resposta imune

Em indivíduos saudáveis a proteção do organismo contra a invasão de micro-organismos ocorre através de duas vias inter-relacionadas do sistema imune, a imunidade inata ou inespecífica (resposta natural) e a imunidade adaptativa ou específica (resposta adquirida). Na imunidade inata a principal estratégia é identificar e destruir. Já na imunidade adaptativa os processos são a detecção específica e morte seletiva com regulação e memória (Liaskou, Wilson e Oo, 2012).

1.8.1. Imunidade inata ou inespecífica

A inflamação aguda está relacionada com a imunidade inata e as principais células envolvidas incluem os mastócitos, granulócitos, fagócitos mononucleares, vários tipos de linfócitos inatos e as células epiteliais. Entre os granulócitos, destacam-se três tipos, os basófilos, os neutrófilos polimorfonucleares e os eosinófilos (Minnicozzi, Sawyer e Fenton, 2011).

Os basófilos são granulócitos circulantes que deixam o sangue e entram nos tecidos. Quando ativadas, essas células liberam mediadores da inflamação e da resposta alérgica. Os neutrófilos polimorfonucleares são os leucócitos circulantes mais abundantes nos seres humanos e representam uma das primeiras linhas de defesa contra micróbios invasores, com base na sua capacidade para rapidamente reconhecer, fagocitar e matá-los.

Os eosinófilos são granulócitos circulantes que migram do sangue para as mucosas, representando uma linha fundamental de defesa contra a invasão microbiana nas barreiras epiteliais. Quando ativados produzem uma série de mediadores solúveis que atuam nas respostas inflamatórias e alérgicas (Minnicozzi, Sawyer e Fenton, 2011).

1.8.2. Imunidade adaptativa

A inflamação crônica está relacionada com a imunidade adaptativa, que é caracterizada pela persistência do agente lesivo, levando a uma concomitância entre destruição e reparo tecidual.

As principais células envolvidas nesta fase do processo inflamatório são as células mononucleares, representadas pelos monócitos, macrófagos e linfócitos. O tecido apresenta caracteristicamente um infiltrado desses tipos celulares, além de sinais de angiogênese e fibrose.

Além das células do sistema imunológico, as células endoteliais e as plaquetas estão ativamente envolvidas na inflamação aguda e crônica. Elas liberam seus mediadores pró-inflamatórios, expõem moléculas de adesão e receptores, proteases e seus inibidores, fatores de coagulação e proteínas associadas, além de também recrutarem os leucócitos (Strukova, 2006). As interações plaqueta-leucócito contribuem para a troca de sinais entre as plaquetas e diferentes tipos de leucócitos que fazem ponte frente a reações imunes inflamatórias (Huang e Chang, 2012).

1.9. Plaquetas e inflamação

Uma característica importante das doenças inflamatórias é o recrutamento de leucócitos para o tecido inflamado e isto envolve alguns processos, como a interação inicial entre plaquetas, leucócitos e células endoteliais, através de receptores de adesão expressos nas superfícies. Entre as várias moléculas envolvidas nessas interações, a P-selectina, que é uma proteína transmembranar da família selectina dos receptores de adesão, é uma molécula essencial no recrutamento de leucócitos e as respostas inflamatórias subsequentes (Huang e Chang, 2012).

Plaquetas ativadas e células endoteliais podem translocar a P-selectina para a superfície celular para mediar às interações leucócito-plaqueta e leucócito-células endoteliais. As plaquetas são essenciais para o recrutamento de leucócitos e subsequente firme adesão às células endoteliais no local da inflamação, o que,

conseqüentemente, provoca processos de ativação autócrina e parácrina na parede vascular (Huang e Chang, 2012).

Diversos estudos tem revelado uma alteração nas funções plaquetárias de pacientes com doenças alérgicas inflamatórias, como asma, rinite alérgica, dermatite atópica, entre outras. Dados clínicos de pacientes que sofrem com reações alérgicas inflamatórias mostram que a contagem de plaquetas e marcadores da ativação plaquetária no plasma são significativamente alterados após exposição a um alérgeno. As plaquetas e seus mediadores inflamatórios desempenham um papel importante em muitas doenças inflamatórias, isso porque envolve uma série de mudanças na expressão de moléculas de superfície, além de adesão, agregação e metabolismo do ácido araquidônico. A ativação plaquetária transforma o ácido araquidônico em mediadores lipídicos que exarcebam a resposta alérgica. Portanto, as plaquetas provavelmente estão mais diretamente envolvidas na iniciação alérgica do que simplesmente exercendo um papel acessório para facilitar o rolamento e adesão de leucócitos (Pitchford, 2007; Huang e Chang, 2012).

1.10. Plaquetas (morfologia, fisiologia e função)

As plaquetas, também conhecidas como trombócitos, são fragmentos celulares anucleados com forma discóide e achatada, medindo cerca de 2-4 μm de diâmetro, provenientes da fragmentação citoplasmática de megacariócitos a partir da medula óssea, com uma vida média de aproximadamente 8-10 dias na circulação sanguínea. Sob condições normais, as plaquetas circulam livremente no sangue numa concentração de 150-400 x 10⁹/L de sangue, não aderindo a elas mesmas ou a parede

dos vasos sanguíneos (Gachet, 2006; Thon e Italiano, 2012). As plaquetas, assim como outros tipos celulares, contêm organelas e complexos moleculares tais como grânulos, lisossomos, mitocôndrias, complexo de golgi, ribossomos e sistema tubular denso, porém carentes de DNA nuclear (Junqueira, Carneiro e Kelley, 1998; Jurk e Kehrel, 2005; Thon e Italiano, 2012).

Apesar de serem anucleadas e não possuírem DNA nuclear, as plaquetas conservam pequenas quantias de mRNA derivado de megacariócitos. Plaquetas também contêm retículo endoplasmático e poliribossomos, conservando a capacidade para biossíntese de proteínas do mRNA citoplasmático. Plaquetas inativadas apresentam mínima atividade translacional. Contudo a ativação plaquetária induz a rápida translação do mRNA pré-existente, com a liberação de proteínas plaquetárias secretadas, citocinas, exossomos e micropartículas (Gnatenko, Perrotta e Bahou, 2006). Sua principal função é atuar na fase inicial da hemostasia, através de sua habilidade na rápida aderência às proteínas da matriz subendotelial (adesão plaquetária) e a outras plaquetas ativadas (agregação plaquetária) formando o tampão plaquetário (Zahedi *et al.*, 2006).

Três tipos de grânulos são encontrados nas plaquetas: grânulos α , grânulos densos (ou delta; δ) e lisossomos (ou grânulos lambda; λ). Nesses grânulos são armazenados uma grande variedade de moléculas biologicamente ativas, que são depositadas nos locais de lesão vascular e também responsáveis por recrutar outras células sanguíneas (Nurden, 2005; Thon e Italiano, 2012).

1.10.1. Receptores plaquetários

Em locais de lesão vascular, a interação ligante-receptor é essencial para o recrutamento de plaquetas da circulação aos componentes da matrix extracelular subendotelial exposta, além da ativação de plaquetas e subsequente agregação.

Os receptores plaquetários expressos na membrana plasmática das plaquetas são diversos e estruturalmente distintos, e atuam em três fases. 1) Fase de recrutamento, adesão e agregação plaquetária: integrinas ($\alpha_{IIb}\beta_3$, $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_2\beta_1$, $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_6\beta_1$, $\alpha_8\beta_1$), leucina (GPIb/IX/V) e imunoglobulinas (GPVI); 2) Fase de amplificação: receptores acoplados às proteínas G (P2Y, PAR, TP α , receptores PGE₂ e PAF_r), receptores tirosina quinase (c-mpl) e íon canal (P2X₁); 3) Fase de estabilização e regulação negativa da ativação plaquetária: receptores tirosina quinase (Ephr), selectinas (P-selectina), imunoglobulinas (PECAM-1) e os receptores acoplados às proteínas G (PGI₂, PGD₂ e PGE₂); (Shattil, Kashiwagi e Pampori, 1998; Jurk e Kehrel, 2005; Kauskot e Hoylaerts, 2012).

1.11. Agonistas Plaquetários

Uma série de substâncias é capaz de se ligar às plaquetas e iniciar reações bioquímicas que levam à formação de agregados plaquetários e secreção granular (Fitzgerald, 2001; Ruggeri e Mendolicchio, 2007). Estes agonistas plaquetários são classificados como fortes e fracos, dependendo da capacidade destes em estimular a secreção de grânulos plaquetários na ausência (forte) ou na presença (fraco) de agregação plaquetária.

O difosfato de adenosina (ADP) foi o primeiro agonista plaquetário a ser identificado e é considerado um fraco agonista. Esta substância é secretada dos grânulos densos após ativação plaquetária e também é liberado a partir de células danificadas nos locais de lesão vascular servindo como um estímulo para o recrutamento de mais plaquetas e estabilização do tampão hemostático (Holmsen e Weiss, 1979; Stalker *et al.*, 2012). Este agonista, quando adicionado às plaquetas *in vitro* provoca a formação de tromboxano A2 (TXA2), fosforilação de proteína, um aumento do cálcio (Ca^{2+}) citosólico, mudança de forma (*shape change*), agregação e secreção. Além disso, ele também induz inibição da adenilato ciclase, resultando em diminuição dos níveis de AMPc no citoplasma. Plaquetas humanas e de camundongos expressam dois grupos distintos de receptores acoplados a proteína G para o agonista ADP, denominados P2Y₁ e P2Y₁₂. A ativação máxima de plaquetas por ADP requer ativação de ambos os receptores (Haslam, Davidson e Desjardins, 1978; Stalker *et al.*, 2012). O receptor P2Y₁ medeia a mobilização de Ca^{2+} , mudança de forma e agregação transitória, já o receptor P2Y₁₂ é conhecido por potencializar a secreção plaquetária e está envolvido na sustentação irreversível da agregação (Jurk e Kehrel, 2005).

A trombina é considerada o mais forte agonista plaquetário, e é capaz de ativar as plaquetas a concentrações muito baixas, como 0,1 nM (Ofosu, 2002; Abrams, 2005; Stalker *et al.*, 2012). Plaquetas ativadas por trombina liberam rapidamente fragmentos pró-coagulantes adicionais dos seus grânulos α e muitas destas entidades pró-coagulantes, ligam-se a superfície de plaquetas ativadas para ajudar a localizar a formação de trombina nos sítios de lesão extravascular (Ofosu, 2002). Entre os agonistas fisiológicos conhecidos, a trombina possui uma forma particular de ativação

do receptor, como vários outros receptores com sete domínios intramembranares, a extremidade N-terminal do receptor para trombina é extracelular enquanto a C-terminal é intracelular. A trombina cliva o receptor após o resíduo Arg 41 na extremidade amino-terminal, e a nova extremidade N-terminal funciona como ligante do próprio receptor, promovendo sua ativação (Vu *et al.*, 1991; Stalker *et al.*, 2012). As respostas plaquetárias à trombina são mediadas através dos receptores de protease ativados (PAR), membros da família de receptores acoplados a proteína G. Existem quatro receptores desta família, no entanto apenas três deles, o PAR-1, PAR-3 e PAR-4 podem ser ativados pela trombina. Os receptores PAR-1 e PAR-4 são expressos em plaquetas humanas, enquanto que plaquetas de camundongos expressam PAR-3 e PAR-4 (Stalker *et al.*, 2012).

O colágeno é mais um conhecido agonista plaquetário e considerado um dos componentes mais potentes do vaso sanguíneo na iniciação da adesão e agregação plaquetária. Dependendo do tipo de colágeno e das condições de fluxo, as plaquetas se ligam direta ou indiretamente a ele através de uma série de receptores de membrana, que podem ser o complexo GPIb/V/IX, GPVI e GPIa/IIa (ou integrina $\alpha 2\beta 1$) (Nguyen, Packham e Rand, 1999; Andrews e Berndt, 2004; Cimmino e Golino, 2013). Apesar de muito estudado, os papéis exatos dos receptores relativos à ativação e adesão plaquetária ainda são alvos de debates, questionando se o GPVI pode mediar sozinho a adesão e ativação das plaquetas ou se os receptores funcionam de maneira independente em sua interação com o colágeno, mas operam de forma sinérgica para atuar de forma ideal (Broos *et al.*, 2012).

O termo PAF (fator ativador de plaquetas) surgiu, pois esta substância foi primeiramente descrita como responsável pela agregação de plaquetas que era liberada de basófilos de coelho após estimulação com IgE (imunoglobulina E). A estrutura química do PAF foi posteriormente determinada em 1979 por três laboratórios como sendo 1-*O*-alkyl-2-acetyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (Ishii, Nagase e Shimizu, 2002; Liu e Xia, 2006). O PAF atua por ligação a seu receptor específico, PAFr, e após a ligação ao seu receptor induz a sinalização mediada por proteínas G. Este composto possui muitas ações além da ativação de plaquetas, como ativação de leucócitos polimorfonucleares, monócitos e macrófagos, aumento da permeabilidade vascular, hipotensão, diminuição do volume cardíaco, estimulação da contração uterina, entre outros. Estas ações parecem acontecer em ambos os eventos fisiológicos normais e, particularmente, na inflamação e alergia (Prescott, McIntyre e Zimmerman, 1990; Liu e Xia, 2006).

1.12. Ativação, Adesão e Agregação Plaquetária

A ativação inicia-se pela interação de um determinado agonista a um receptor específico presente na superfície externa da membrana plasmática plaquetária, que desencadeia uma série de reações, tais como a adesão, agregação plaquetária e secreção de grânulos (Figura 1).

A adesão, bem como a agregação plaquetária, são considerados processos distintos pelos quais as plaquetas estabelecem contatos individuais com uma superfície extracelular ou umas com as outras. No entanto, estas considerações são baseadas mais na interpretação dos estudos experimentais, visto que ambas adesão e agregação envolvem a transição das plaquetas de um fluxo livre de sangue para determinada

superfície, frequentemente mediado pelos mesmos ligantes adesivos ou pares de receptores (Ruggeri e Mendolicchio, 2007).

A adesão de plaquetas à matriz subendotelial é o passo inicial na hemostase primária. As plaquetas circulam passivamente pela circulação sanguínea, e após uma lesão na parede vascular ou exposição a superfícies estranhas as plaquetas interagem com proteínas da matriz extracelular via glicoproteínas (GP) adesivas específicas e assim iniciam-se rapidamente alguns processos, denominados: *shape change*, que é a mudança da forma discóide da plaqueta para a forma esférica, além de apresentar uma extensa formação e emissão de pseudópodes provenientes da membrana plasmática; adesão plaquetária, que é o processo onde as plaquetas se ligam a superfícies extracelulares, que não a de outras plaquetas, tais como membrana de outras células e outros componentes da matriz extracelular; agregação plaquetária, processo onde as plaquetas se ligam exclusivamente a superfície de outras plaquetas; secreção, que é a liberação do conteúdo dos grânulos plaquetários que modulam as interações entre plaquetas, sangue e células vasculares durante a adesão, agregação ou mesmo na ausência de ambas (Ofosu, 2002; Woulfe, 2005).

Uma distinção didática é feita para indicar as sequências de sinalizações desencadeadas durante a ativação plaquetária, e estas são conhecidas como sinalização *inside-out* e sinalização *outside-in* (Shattil, Kashiwagi e Pampori, 1998).

Na sinalização *inside-out* as reações são iniciadas pela ligação de um ou mais agonistas aos seus receptores de membrana plasmática específicos, que em sua maioria são receptores acoplados à proteína G e que levam à ativação da fosfolipase C (PLC). A PLC cataliza a hidrólise de fosfatidil-inositol-2-fosfato (PIP₂) em inositol trifosfato (IP₃) que atua aumentando o Ca⁺² intracelular a partir do sistema tubular

denso, além da ativação de uma série de enzimas dependentes deste íon. Além disso, a PLC também leva a formação de diacilglicerol (DAG), que ativa a proteína quinase C (PKC). Esta cascata de sinais intracelulares conduz a conversão do receptor GPIIb/IIIa de um estado de baixa atividade, para um de alta afinidade, permitindo assim a ligação de seu ligante (Shattil, Kashiwagi e Pampori, 1998; Jurk e Kehrel, 2005; Li *et al.*, 2010).

Quando o receptor GPIIb/IIIa se liga ao seu ligante inicia-se uma série de eventos intracelulares, denominado sinalização *outside-in*. Nesta fase, mudanças conformacionais nos domínios extracelulares da integrina IIb3 após ativação promove a interação com os ligantes do receptor GPIIb/IIIa, principalmente o fibrinogênio e fator de Von Willebrand (FvW), mas outros ligantes, tais como a vitronectina e fibronectina também podem ser ativados. Esta sinalização é responsável pela segunda onda de agregação (fase irreversível) e reorganização do citoesqueleto, importante etapa para a firme adesão bem como para a estabilização dos grandes agregados plaquetários (Li *et al.*, 2010; Goggs e Poole, 2012).

A agregação plaquetária é modulada por substâncias como a prostaciclina (PGI₂) e o óxido nítrico (NO), ambos liberados pelo endotélio vascular lesionado. A PGI₂ se liga ao receptor IP que é acoplado a proteína Gs, que ativa a adenilato ciclase (AC) convertendo o ATP em AMPc. Já o NO, ativa a guanilato ciclase solúvel (GCs) convertendo o GTP em GMPc. Os aumentos nos níveis desses nucleotídeos cíclicos regulam a ativação plaquetária (Bennett, 2001; Broos *et al.*, 2012).

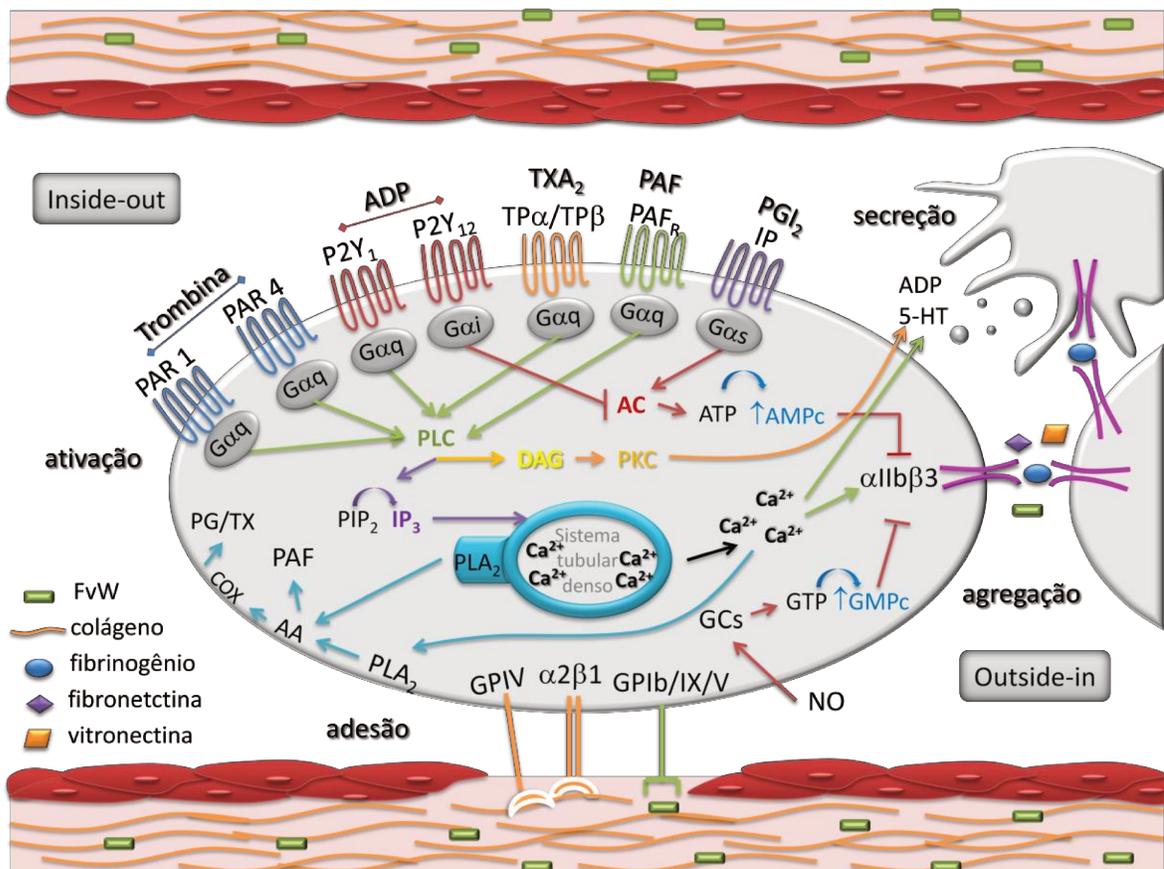


Figura 6. Representação esquemática dos processos de ativação, adesão, secreção e agregação plaquetária. ADP: difosfato de adenosina, TXA₂: tromboxano A₂; PAF: fator de ativação de plaquetas; PGI₂: prostaciclina; 5-HT: serotonina; PLC: fosfolipase C; PIP₂: fosfatidilinositol bifosfato; IP₃: inositol trifosfato; DAG: diacilglicerol; PKC: fosfolipase C; AC: adenilato ciclase; ATP: trifosfato de adenosina; AMPc: monofosfato cíclico de adenosina; PLA₂: fosfolipase A₂; PG: prostaglandina; TX: tromboxano; COX: ciclooxigenase; AA: ácido araquidônico; NO: óxido nítrico; GPCs: guanilato ciclase solúvel; GTP: trifosfato de guanosina; GMPc: monofosfato cíclico de guanosina.

2. OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho foi verificar o papel dos eosinófilos e de suas principais proteínas na agregação de plaquetas humanas, *in vitro*.

3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Investigar se os eosinófilos de rato e provenientes da cultura da linhagem celular promielocítica humana (HL-60 clone 15) interferem na agregação de plaquetas humanas *in vitro*.
- ✓ Avaliar o efeito da(s) proteína(s) do eosinófilo na agregação de plaquetas humanas *in vitro*.
- ✓ Avaliar o efeito citotóxico da(s) proteína(s) do eosinófilo na agregação de plaquetas humanas *in vitro*.
- ✓ Realizar a clonagem das principais proteínas dos eosinófilos, e avaliar seu(s) efeito(s) na agregação de plaquetas humanas *in vitro*.

4. MÉTODOS (PARTE 01)

AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA COM EOSINÓFILOS DE RATO E EOSINÓFILOS DIFERENCIADOS A PARTIR DA LINHAGEM HL-60 CLONE 15

4.1. Isolamento de eosinófilos de ratos

Foram utilizados ratos machos da raça wistar com aproximadamente 200-230g. Os ratos foram submetidos à anestesia por inalação com Halotano e sacrificados por aprofundamento anestésico. Os eosinófilos foram purificados a partir da cavidade peritoneal dos ratos, utilizando-se gradiente descontínuo de metrizamida (Vadas *et al.*, 1979). Inicialmente, 20 mL de PBS foram injetados intraperitonealmente, e a o abdômem massageado por 5 minutos. A seguir, o lavado peritoneal foi coletado em banho de gelo e centrifugado a 1.000 x *g* por 10 min à 20 °C. O precipitado foi ressuspenso em solução de metrizamida 18% (em tampão HEPES enriquecido com MEM e 1 mg/mL de gelatina).

A mistura foi adicionada sobre o topo de um gradiente descontínuo em dois níveis, consistindo de 2,5 mL de metrizamida a 23,5% coberta por 2,5 mL de metrizamida a 20%. O tubo com o gradiente foi centrifugado primeiro a 90 x *g* por 11 min à 4 °C e a seguir a 1.000 x *g* por 14 min à 4 °C. Os eosinófilos, concentrados na interface destas duas soluções (entre 20 e 23,5%), foram coletados, lavados uma vez com solução MEM + Ovoalbumina hidrolisada (1mg/mL ou 0,1%), centrifugados a 1.200 x *g* por 10 min à 4 °C e ressuspenso novamente na mesma solução em um volume de aproximadamente 1 mL.

4.1.1. Contagem de células

A determinação total de células foi verificada utilizando-se a câmara de Neubauer, obtendo-se 10^5 células /mL.

As lâminas foram preparadas na citocentrífuga por 10 min contendo 2×10^6 células/lâmina, posteriormente coradas com May-Grünwald-Giemsa antes da determinação diferencial de células em microscópio óptico.

A solução de eosinófilos de rato foi ajustada para uma concentração de 5×10^7 células/mL em solução Hanks balanceada (pH 7,2).

4.2. Preparo da fração citosólica de eosinófilos de rato

A fim de investigar a interferência da liberação do NO ou de prostaglandinas, os eosinófilos foram tratados com L-NAME ($10 \mu\text{M}$) e/ou indometacina ($10 \mu\text{M}$) durante 60 e 20 min a temperatura ambiente, respectivamente. Os dois inibidores foram utilizados em associação ou separadamente antes da lise dos eosinófilos.

As células foram lisadas por sonicação (Sonic Dismembrator, Model 100; Fischer Scientific) em banho de gelo utilizando 3 ciclos de 10 segundos em intensidade máxima e armazenadas imediatamente à $-80 \text{ }^\circ\text{C}$. Após o completo congelamento, o homogenado de células foi descongelado à temperatura ambiente. Após o processo de congelamento e descongelamento as amostras foram centrifugadas a $12.000 \times g$ por 5 min à $4 \text{ }^\circ\text{C}$ e o sobrenadante coletado e utilizado para os testes de inibição da agregação plaquetária (item 4.6).

4.3. Teste de termoestabilidade

Uma alíquota de 20 µl de fração citosólica de eosinófilos foi aquecida em banho-maria a 100 °C por 20 min, em seguida foi analisada no ensaio de agregação plaquetária (item 4.6).

4.4. Gel Filtração

A fração ativa foi isolada utilizando gel filtração em Sephadex G-75. A fração citosólica de eosinófilos de rato liofilizada foi dissolvida em tampão Tris-HCL (0,05 M; pH 7,2), e centrifugada a 10.000 x *g* por 5 min. O sobrenadante foi aplicado em uma coluna (1,5 x 24 cm) com Sephadex G-75 e eluída com o mesmo tampão sob um fluxo de 10 mL/h e coletando amostras de 0,5 mL por tubo. As frações coletadas foram agrupadas em seus respectivos picos, conforme perfil cromatográfico e armazenados a -20 °C para futuras análises. O perfil de eluição foi monitorado pela leitura a 280 nm em espectrofotômetro (Espectrofotômetro 700, FEMTO), utilizando-se cubetas de quartzo com 1,0 cm de caminho óptico. Posteriormente cada pico foi analisado quanto a sua atividade na agregação plaquetária (item 4.6).

4.5. Análise por cromatografia líquida (RP-HPLC) e espectrometria de massa

4.5.1. Cromatografia de alta pressão

Antes de injetar a amostra da fração citosólica de ratos, a mesma foi preparada através de um processo de desalinização utilizando-se uma coluna Pepmap C-18 e a eluição do material foi realizada com solução de água contendo 0,1% de TFA (ácido trifluoroacético) em fluxo de 30 µL/min, durante 3 min.

A amostra foi injetada em cromatógrafo de alta pressão (HPLC), utilizando coluna de fase reversa C 18 (75 μm) com fluxo de 200 nL/min sendo constituída de fase móvel A (água com 0,1% TFA) e fase móvel B (Acetonitrila, ACN, com 0,1% de TFA). As amostras foram eluídas em gradiente linear de 30 a 65% de fase móvel B durante 60 min e detectadas por espectrometria de massa.

4.5.2. Análise por espectrometria de massa

Todos os espectros de massa foram adquiridos usando um espectrômetro de massa híbrido, de aceleração ortogonal, quadrupolo e tempo de voo (Q-TOF Ultima, Micromass, Manchester, UK, Ltd), equipado com uma fonte nano Z *spray* operando em modo positivo. As condições de ionização utilizadas incluíam a voltagem capilar de 2,3 kV, voltagem do cone e das lentes RF1 de 30 e 100 V, respectivamente, e energia de colisão de 10 eV. A temperatura da fonte foi de 70 °C, com gás interno de N₂ e fluxo de arraste de 80 L/h, não foi utilizado gás nebulizador no eletrospray.

O Argônio foi usado para o *collisional cooling* e para a fragmentação dos íons na célula de colisão. Foi utilizado um espectro no intervalo de 800-2800 m/z e a leitura realizada a cada 2,8 seg. Todos os espectros foram adquiridos com análise em Q-TOF, modelo "V" (Q-TOF voltage D 9,1 kV) e a voltagem MCP em 2150 V.

Alíquotas da fração ativa liofilizada e purificada por RP-HPLC foram dissolvidas em acetonitrila com 0,1% de TFA e introduzida no espectrômetro de massa com uma seringa sob um fluxo de 500 nL/minuto. Todas as massas foram relatadas como média, e foram calculados utilizando o procedimento "*find manual*" ou usando o algoritmo de deconvolução MassLynx-MaxEnt 1.

4.6. Ensaio de Agregação plaquetária

4.6.1. Obtenção de plasma rico e pobre em plaquetas para teste de agregação plaquetária

Sangue humano obtido de voluntários sadios, que não receberam qualquer medicamento durante 10 dias anteriores ao experimento, foi coletado em tubos de plástico contendo citrato tri-sódico 3,8% (9 partes de sangue para 1 parte de citrato). O plasma rico em plaquetas (PRP) foi obtido coletando-se o sobrenadante da centrifugação do sangue total a 200 x *g*, em temperatura ambiente por 15 min. O sobrenadante (PRP) foi coletado e armazenado a temperatura ambiente para os testes de agregação plaquetária. O sangue remanescente foi novamente centrifugado a 2.000 x *g*, em temperatura ambiente por 15 min, para obtenção do plasma pobre em plaquetas (PPP) utilizado para calibrar o agregômetro. O sangue do mesmo indivíduo nunca foi usado mais de uma vez para o mesmo protocolo experimental.

4.6.2. Obtenção de plaquetas lavadas para teste de agregação plaquetária

Sangue humano obtido de voluntários sadios, que não receberam qualquer medicamento durante 10 dias anteriores ao experimento, foi coletado em tubos de plástico contendo 9 partes de sangue para 1 parte de ACD-C (citrato tri-sódico 12 mM, ácido cítrico 13 mM e glicose 11 mM). O PRP foi obtido coletando-se o sobrenadante da centrifugação do sangue total a 200 x *g*, em temperatura ambiente por 15 min. Ao PRP foi adicionado Iloprost (0,8 µM) e centrifugado a 800 x *g* por 12 min à temperatura

ambiente. O sobrenadante foi descartado, o *pellet* foi cuidadosamente ressuspenso em solução Krebs-Ringer desprovida de cálcio (NaCl 118 mM, NaHCO₃ 25 mM, KH₂PO₄ 1,2 mM, MgSO₄.7H₂O 17 mM, glucose 5,6 mM). Após nova adição de Iloprost (0,8 µM), a suspensão de células foi centrifugada a 800 x *g* por 10 min. O *pellet* foi ressuspenso em solução Krebs-Ringer desprovida de cálcio e o número de plaquetas ajustado para 2 x 10⁸ plaquetas/mL através de contagem em câmara de Newbauer. Finalmente, 1 mM de cloreto de cálcio (CaCl₂) foi adicionado à suspensão plaquetária imediatamente antes do ensaio de agregação plaquetária.

4.6.3. Monitoramento da Agregação Plaquetária

A agregação plaquetária foi monitorada utilizando-se um agregômetro de dois canais (Chrono-Log Corporation; Aggregometer model 560-Ca, Havertown, PA, EUA) calibrado para 0% com PRP ou PL e 100% utilizando-se PPP ou solução de Krebs-Ringer.

Em cada ensaio, utiliza-se uma amostra de 400 µl de PRP ou PL adicionado em cubetas siliconizadas, mantidas sob agitação constante à 37 °C no agregômetro. As plaquetas foram mantidas nestas condições por 1 min antes da adição do agonista ou inibidor. Nos testes de inibição, após esse período o PRP ou as PL foram pré-incubadas com o inibidor antes da adição do agonista e a agregação registrada por 5 min. Os resultados são expressos como a porcentagem do máximo de transmissão de luz obtida quando o agregômetro foi calibrado para 100% de transmissão com PPP ou solução de Krebs-Ringer.

Em PRP, os agonistas utilizados foram: Fator de ativação de plaquetas (PAF, 1 μ M), colágeno (4 μ g/mL), Difosfato de adenosina (ADP, 5 μ M) e ácido araquidônico (1 mM). Nos experimentos com PL, utilizamos trombina humana na concentração de 50-100 mU/mL.

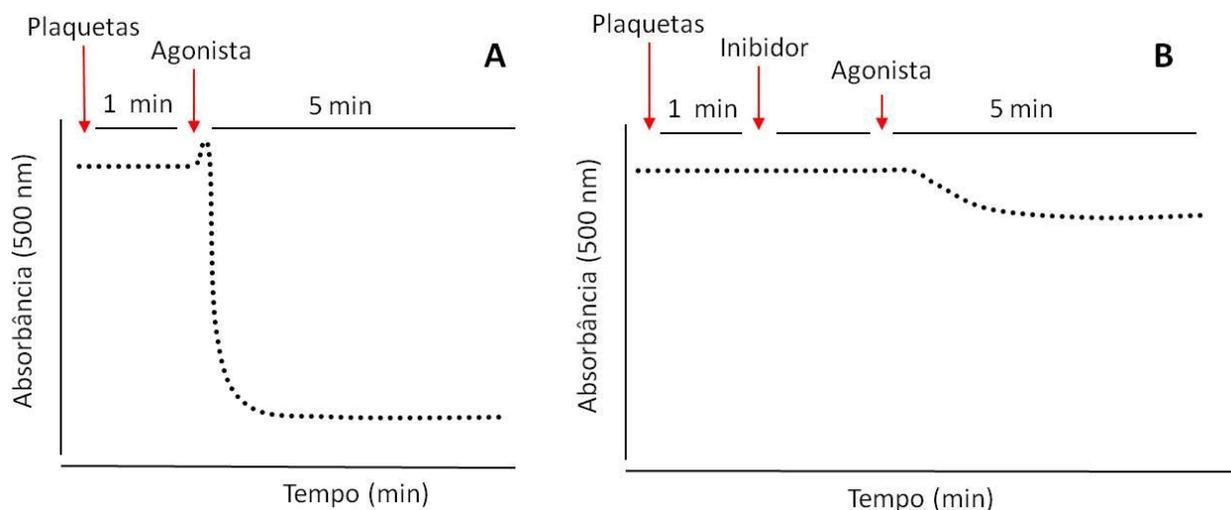


Figura 7. Representação esquemática do procedimento de agregação (painel A) e inibição (painel B) da agregação plaquetária.

4.7. Cultura de Células HL-60 clone 15

A linhagem celular promielocítica humana HL-60 clone 15 foi cultivada em meio RPMI-1640 (Zagai *et al.*, 2004), contendo soro bovino fetal (10 % v/v), L-glutamina (2 mM), penicilina (100 U/mL) e estreptomicina (100 μ g/mL), numa densidade de 0,5-1,0 x 10⁶ células/mL, à 37 °C, em atmosfera úmida (5% CO₂). Para diferenciação celular, foi adicionado ao meio de cultura, ácido butírico (0,5 mM), por um período máximo de 7 dias (Fischkoff, 1988). A contagem absoluta, assim como a estimativa da viabilidade celular foi realizada pela técnica de exclusão com azul de tripan.

4.7.1. Preparo da fração citosólica células HL-60 clone 15

As células foram obtidas em diferentes dias de diferenciação. Após a contagem total da suspensão de células contida na garrafa de cultura (50-60 mL), as células foram ajustadas numa concentração final de 5×10^7 células/mL e incubadas com indometacina ($10 \mu\text{M}$) por 20 min a temperatura ambiente, a fim de inibir a ação da ciclooxigenase e a síntese de prostaglandinas. Posteriormente, as células foram centrifugadas a $200 \times g$ por 5 min a $20 \text{ }^\circ\text{C}$ e ressuspendidas em água Milli-Q. Para confirmação da lise total das células e das suas organelas, incluindo os grânulos onde as proteínas de interesse ficam armazenadas, as células foram lisadas por sonicação (Sonic Dismembrator, Model 100; Fischer Scientific) em banho de gelo utilizando 3 ciclos de 10 segundos em intensidade máxima e armazenadas imediatamente à $-80 \text{ }^\circ\text{C}$. Após o completo congelamento, o homogenado de células foi descongelado à temperatura ambiente.

Após o processo de descongelamento as amostras foram centrifugadas a $12.000 \times g$ por 5 min a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ e o sobrenadante coletado e utilizado para os testes de inibição da agregação plaquetária (item 4.6).

5. MÉTODOS (PARTE 02)

PROTEÍNA ECP NA AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA

5.1. Proteína ECP

A proteína ECP pura foi adquirida do laboratório Lee Biosolutions, Inc. (St. Louis, Missouri, USA), proveniente de eosinófilos humanos, numa concentração de 2 mg/mL. A proteína foi obtida numa concentração de 2 mg/mL e as diluições foram realizadas utilizando o tampão próprio da proteína (Acetato de Amônio 50 mM, NaCl 0,2 M, pH 4,7).

5.2. Agregação Plaquetária em PRP e PL

A obtenção do PRP e PL, bem como os testes de agregação plaquetária, foram realizados conforme descrito anteriormente (item 4.6).

5.3. Atividade plaquetária por MTT (Teste de citotoxicidade)

Com o objetivo de avaliar a citotoxicidade da proteína ECP sobre as plaquetas, utilizamos o método originalmente descrito por Mosmann (Mosmann, 1983) e modificado por Xia *et al.* (Xia *et al.*, 2000). Este teste é um ensaio colorimétrico baseado na redução do MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5 diphenyl tetrazolium bromide] pelas desidrogenases mitocondriais de plaquetas metabolicamente ativas. A reação produz o sal formazan que é insolúvel em água, mas solúvel em solventes orgânicos. Para tanto, foram adicionados 50 µL/poço de suspensão plaquetária contendo $1,2 \times 10^8$

plaquetas/mL a uma placa de 96 poços. Os ensaios foram realizados com plaquetas não ativadas e ativadas com Trombina (50 mU/mL). A proteína ECP foi adicionada à placa numa concentração final de 10 ng/mL e incubada a 37 °C por 15 e 60 minutos na presença ou ausência de Trombina (50 um/mL). Após o período de incubação foi adicionado a cada poço solução de Krebs-Ringer para um volume final de 100 µL e, em seguida, 10 µL de MTT (5 mg/mL em Krebs-Ringer). Finalmente, após incubação por 3 horas à 37 °C, a reação foi interrompida com 100 µL de SDS 10% em HCl (0,01 M). Mais uma incubação adicional foi realizada por 1h à 37 °C, no final da qual se seguiu a leitura da placa em leitor de microplacas (Spectra Max 340, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, E.U.A.), no comprimento de onda de 570 nm.

6. MÉTODOS (PARTE 03)

CLONAGEM DAS PROTEÍNAS DO EOSINÓFILO EM SISTEMA EUCARIOTO

6.1. Cultura de Células HL-60 clone 15

A cultura de células HL-60 clone 15 foi cultivada e diferenciada em eosinófilos na concentração final de 5×10^7 células/mL conforme citado anteriormente (Item 4.7).

6.2. Análise do mRNA pela técnica de RT-PCR e obtenção do cDNA das proteínas do eosinófilo

6.2.1. Extração do RNA total

O RNA total foi extraído da cultura de células HL-60 clone 15 (diferenciada durante 7 dias) utilizando o reagente Trizol (kit GIBCO BRL) numa concentração de 5×10^6 células/mL do reagente. As células foram homogeneizadas em Trizol e incubadas por 5 min a temperatura ambiente (15 a 30 °C) para completa dissociação dos complexos nucleoprotéicos. Após a incubação foi adicionado 0,2 mL de clorofórmio para cada 1 mL de Trizol utilizado inicialmente e os tubos agitados manualmente e vigorosamente (15 segundos) para a extração dos lipídeos. A seguir os tubos foram incubados durante 2 a 3 minutos a temperatura ambiente e posteriormente centrifugados a $12.000 \times g$, (15 min a 2-8 °C). Os sobrenadantes, que correspondem a fase aquosa, foram coletados e o RNA precipitado pela adição de 0,5 mL de isopropanol para cada 1 mL de Trizol utilizado na homogeneização inicial. Após 10 minutos a temperatura ambiente, os tubos foram centrifugados ($12.000 \times g$, 10 min a 2-

8 °C), e o sobrenadante descartado. Os precipitados de RNA foram lavados uma vez com etanol 75% em água tratada com DEPC, adicionando pelo menos 1 mL de etanol 75% para cada 1 mL de Trizol utilizado na homogeneização. As amostras foram agitadas em vórtex e centrifugadas a 7.500 x g (5 min a 2-8 °C). Os sobrenadantes foram descartados e o etanol removido por evaporação.

Posteriormente, o RNA foi dissolvido em 50 µL de água livre de RNase e a solução incubada por 10 minutos a 55-60 °C.

Alíquotas desta solução foram diluídas 1:100 e as concentrações de RNA calculadas com base nas leituras da absorbância a 260 e 280 nm. A integridade do RNA isolado foi verificada através de eletroforese em gel de agarose (1% em tampão TAE contendo 0,5 µg/mL de brometo de etídio) e as bandas reveladas sob luz ultravioleta. As amostras foram armazenadas a -80 °C.

6.2.2. Síntese do cDNA por transcrição reversa (RT-PCR)

Utilizando um tubo eppendorf de volume apropriado e livre de RNase, adicionou-se 1 µL de oligo (dT)₁₈ (125 ng/µL), 1 µg de RNA (500 ng/µL), 1 µL de dNTP Mix (10 mM) e 17 µL de água tratada com DEPC. Esta solução foi aquecida a 65 °C durante 5 minutos e posteriormente incubada em gelo por 1 min.

A seguir, adicionamos os reagentes na ordem estabelecida: 4 µL de tampão de reação (5X *First-Strand Buffer*), 1 µL de DTT (0,1 mM), 1 µL de Transcriptase reversa (*SuperScript III RT*; 200 U/µL) e 1 µL de inibidor de RNase (RNA guard). A amostra foi incubada a 50 °C durante 1 hora e posteriormente a reação foi inativada por

aquecimento a 70 °C por 15 min. As amostras foram mantidas a –20 °C até serem submetidas ao PCR.

6.3. Reação em cadeia da polimerase (PCR)

As reações de PCR foram realizadas para um volume final de 50 µL de amostra. Adicionou-se 2 µL de cDNA, 5 µL de tampão para PCR (10X), 1,5 µL de MgCl₂ (50 mM), 1 µL de dNTP Mix (10 mM), 1 µL do *primer forward* (10 µM), 1 µL do *primer reverse* (10 µM), 38,1 µL de água tratada com DEPC e finalmente 0,4 µL de Taq DNA polimerase (5 U/µL). Os ciclos de amplificação foram realizados da seguinte maneira:

- ✓ Desnaturação inicial (*Hot Start*): 2 minutos a 94 °C;
- ✓ Amplificação (30 ciclos): 30 segundos a 94 °C (desnaturação), 30 segundos com a temperatura de anelamento específica para cada par de *primer* e 1 minuto a 72 °C (extensão);
- ✓ Extensão final: 7 minutos a 72 °C.

Ao final dos ciclos a reação foi interrompida por esfriamento a 4 °C e as amostras armazenadas a -20 °C.

6.3.1. Oligonucleotídeos (*primers*)

Os *primers* utilizados nas reações de PCR para amplificação específica do cDNA das proteínas MBP, ECP/EDN e EPO (Tabela 1), bem como os *primers* para amplificação da região transcrita em proteína contendo sítios de restrição para clonagem em vetores (Tabela 2) foram desenhados utilizando como referência os

dados contidos no *GenBank* (Tabela 1). Os *primers* foram sintetizados pela empresa IDT (*Integrated DNA Technologies*).

Tabela 1. Lista dos oligonucleotídeos (*primers*) utilizados no presente trabalho para amplificação do cDNA total das proteínas eosinofílicas.

Nome	Sentido*	Sequência	Ref. Sequência <i>Gen Bank</i>
MBP-F1	F	5' – ACTGGGCTTTGGGAAGATC – 3'	NM_002728.4
MBP-F2	F	5' – CTAAAGACCCAGGAAGGTC – 3'	NM_002728.4
MBP-R	R	5' – TTTATTGCAGGGAGGTGGAG – 3'	NM_002728.4
ECP/EDN-F1	F	5' – CAGGAGCCACAGCTCAGAGA – 3'	NM_002935.2
ECP/EDN-F2	F	5' – AGCTGGATCAGTTCTCACAG – 3'	NM_002934.2 NM_002935.2
ECP/EDN-F3	F	5' – ATCAGTTCTCACAGGAGC – 3'	NM_002934.2 NM_002935.2
ECP/EDN-R	R	5' – TGATTGAGGAGCTTGGCAGA – 3'	NM_002934.2 NM_002935.2
EPO-F	F	5' – ATGCATCTGCTCCCAGCC – 3'	NM_000502.2
EPO-R	R	5' – TCATGTCCCTCGCCAGGCTGAT – 3'	NM_000502.2

* F (*Forward*): Oligonucleotídeo que equivale à pequena porção 5' da fita do DNA ou do RNA que codifica a proteína (fita molde). R (*Reverse*): Oligonucleotídeo que equivale à pequena porção 5' da fita de DNA complementar àquela que codifica a proteína.

Tabela 2. Lista dos oligonucleotídeos (*primers*) para amplificação da região transcrita em proteína contendo sítios de restrição para clonagem em vetores, utilizados no presente trabalho.

Nome	Sentido*	Seqüência
MBP-BamHI	F	5' - CGGGATCCCCACCATGAAACTCCCCCTACTTC - 3'
MBP-XhoI	R	5' - CCGCTCGAGGCTCAGTAGGAACAGATG - 3'
ECP/EDN-BamHI	F	5' – CGGGATCCCCACCATGGTTCCAAAAGTTC – 3'
ECP/EDN-XhoI	R	5' – CCGCTCGAGGCTTAGATGATTCTATCCAGG – 3'

* F (*Forward*): Oligonucleotídeo que equivale à pequena porção 5' da fita do DNA ou do RNA que codifica a proteína (fita molde). R (*Reverse*): Oligonucleotídeo que equivale à pequena porção 5' da fita de DNA complementar àquela que codifica a proteína.

6.3.2. Enzimas

A combinação das enzimas de restrição utilizadas foi escolhida com base nas possíveis combinações dos pares de *primers* utilizados e os sítios de restrição presentes no vetor de clonagem utilizado (Tabela 3).

Tabela 3. Lista de enzimas de restrição utilizadas no presente trabalho (*New England BioLabs Inc.*)

Nome	Microorganismo	Tipo de restrição*	Seqüência Alvo
BamHI	<i>Bacillus amyloliquefaciens H</i>	S	5' – G↓GATC C – 3' 3' – C CTAG↑G – 5'

XhoI	<i>Xanthomonas holcicola</i>	S	5' – C↓TCGA G – 3' 3' – G AGCT↑C – 5'
------	------------------------------	---	--

* S (*Sticky*): Restrição que gera extremidades do tipo coesivas no DNA.

6.4. Eletroforese em gel de agarose para PCR

Alíquotas dos produtos da reação de PCR (aproximadamente 10 µL) foram submetidas a um gel de agarose 1% (agarose de alta resolução; Sigma-Aldrich) em tampão TAE 1 X (diluído a partir do tampão TAE 50 X: 242 g de Tris base; 57,1 mL Ácido Acético Glacial e 100 mL EDTA 0,5 M, pH 8,0). A migração eletroforética foi realizada sob uma corrente de 80 mA, 100 V, durante aproximadamente 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente o gel foi incubado em solução contendo 0,5 µg/mL de brometo de etídio. Os géis foram visualizados sob luz UV, as imagens captadas e as intensidades das bandas determinadas. Utilizamos como controle negativo o mix de reação sem a adição dos *primers*.

6.5. Vetor de clonagem (Sistema Eucarioto)

O vetor de clonagem utilizado foi o pcDNA3.1+ (Figura 8).

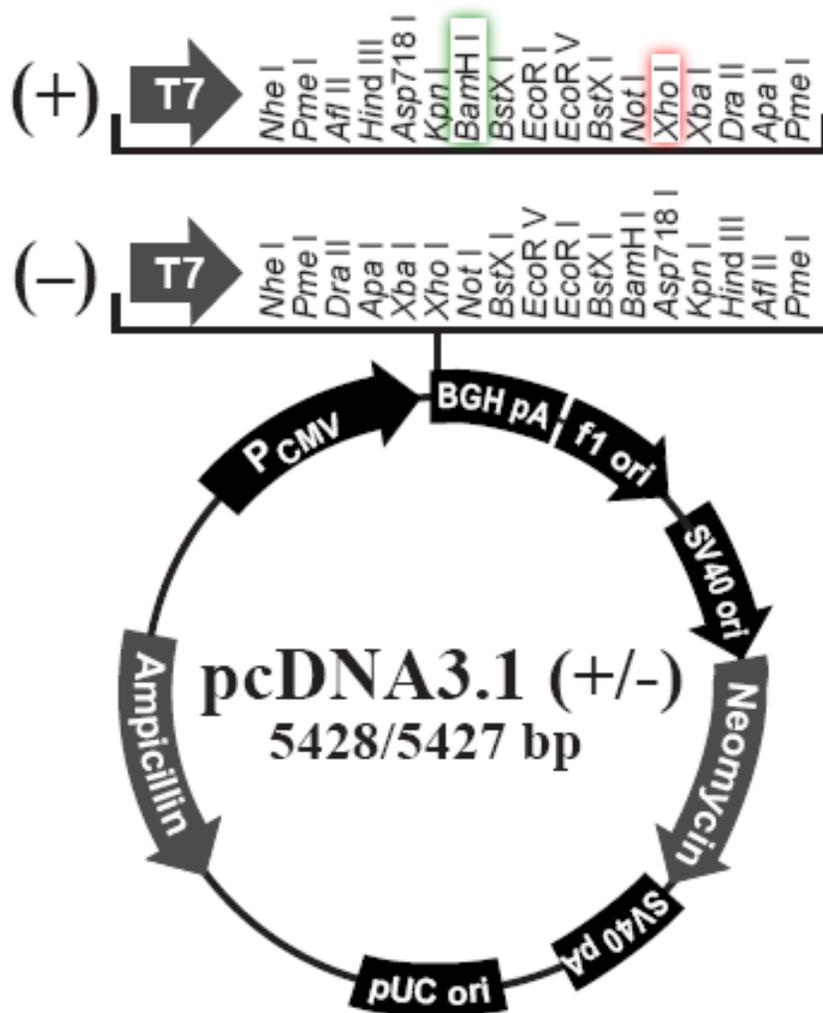


Figura 8. Mapa do plasmídeo pcDNA3.1 (+/-) contendo os sítios de restrição (modificado a partir de: *Invitrogen Catalog*⁹).

6.6. Estoque das bactérias *E. coli* DH5 α

As bactérias *E.coli* foram cultivadas em meio líquido LB (Luria-Bertani) por 16 horas, a 37 °C e alíquotas de 1 mL do meio contendo 10% (v/v) de glicerol estéril foram congeladas a -80 °C. Quando necessário, uma alíquota era descongelada e inoculada no meio apropriado. As bactérias contendo o plasmídeo pcDNA3.1+ que possuem resistência a ampicilina (100 μ g/mL) foram estocadas na presença deste antibiótico.

⁹ <http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/vectors/pcdna3.1+.pdf>

6.7. Extração de DNA plasmidial da bactéria *E. coli* DH5 α

Este protocolo foi modificado a partir do original de Sambrook *et al.* (Sambrook e Russell, 2001). Uma colônia bacteriana com o vetor de clonagem pcDNA3.1+ foi inoculada em 10 mL de meio LB contendo ampicilina (100 μ g/mL). As bactérias foram cultivadas a 37 °C *overnight* sob vigorosa agitação. Em seguida, a cultura foi transferida para um tubo e centrifugada a 12.000 x *g* por 5 minutos em microcentrífuga, descartando-se o sobrenadante. Após a centrifugação o precipitado bacteriano foi ressuspenso em 100 μ L de Solução I (Tris-HCl 25 mM, pH 8,0; EDTA 50 mM, pH 8,0; 1% Glicose) e agitado em vórtex. Em seguida foram adicionados 200 μ L da Solução II (NaOH 20 mM; 1% SDS), os tubos foram agitados por inversão e incubados a temperatura ambiente por 5 minutos. Após a incubação, foram adicionados 150 μ L de Solução III (60 mL de Acetato de Potássio 5 mM; 11,5 mL de Ácido Acético Glacial; 28,5 mL de Água), em seguida os tubos foram agitados por inversão e incubados novamente a temperatura ambiente por mais 5 minutos. Posteriormente a solução foi centrifugada a 12.000 x *g* por 5 minutos e o sobrenadante transferido para outro tubo limpo. Ao sobrenadante foram adicionados 500 μ L de isopropanol, os tubos invertidos e centrifugados a 12.000 x *g* por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado, o *pellet* lavado com 500 μ l de etanol 70% gelado, os tubos agitados em vórtex e centrifugados novamente a 12.000 x *g* por 5 minutos. O sobrenadante foi cuidadosamente descartado e o *pellet* ressuspenso em 60 μ L de tampão TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 1 mM, pH 8,0) e incubados por 5 minutos à 65 °C.

6.8. Clivagem do DNA plasmidial

As endonucleases de restrição utilizadas para este procedimento foram as enzimas específicas para os sítios de restrição criadas no PCR para a clonagem do gene de interesse. Inicialmente, escolhemos a seguinte combinação, baseado nos resultados observados nas reações de PCR: BamHI (20 U/ μ L) + XhoI (20 U/ μ L) para o vetor de clonagem pcDNA3.1+. Após a preparação da reação, a amostra foi incubada por 2 horas à 37 °C. Posteriormente purificamos a amostra com o kit *Wizard DNA Clean-Up System* (Promega) segundo as especificações do fabricante.

6.9. Ligação com T4 DNA ligase

A amostra da reação previamente clivada foi purificada com o *kit DNA Clean-Up System* (Promega) conforme utilizado anteriormente. A reação de ligação foi realizada adicionando-se 2 μ L do DNA plasmidial e 4 μ L do DNA do inserto juntamente com a enzima T4 DNA ligase (400 U/ μ L), BSA (100 X), T4 DNA ligase *buffer* (10 X) e água Milli-Q para um volume final de 10 μ L, e incubada *overnight* à 16 °C. As concentrações do DNA plasmidial e do inserto utilizadas foram 30 ng/ μ L e 90 ng/ μ L, respectivamente.

6.10. Eletroforese em gel de agarose para análise da integridade dos produtos de clonagem

Os géis foram preparados utilizando-se agarose de alta resolução numa concentração de 1% em tampão TAE 1 X (diluído a partir do tampão TAE 50 X: 242 g de Tris base; 57,1 mL Ácido Acético Glacial e 100 mL EDTA 0,5 M, pH 8,0). A migração eletroforética foi realizada sob uma corrente de 80 mA, 100 V, durante

aproximadamente 30 minutos a temperatura ambiente. Em seguida o gel foi corado com brometo de etídeo, visualizado sob luz UV, as imagens captadas e as intensidades das bandas determinadas.

6.11. Preparação de células competentes para transformação pelo método de eletroporação

Para a preparação de células competentes foi utilizada a bactéria *E. coli* DH5 α . Uma colônia bacteriana foi inoculada em 10 mL de meio LB sem antibiótico e cultivada *overnight* a 37 °C sob agitação vigorosa. Após esse período, o meio de cultura com as bactérias foi adicionado em um frasco contendo 990 mL de meio LB e cultivado como anteriormente. As células foram mantidas em cultura até atingirem a densidade óptica (D.O.₆₆₀) entre 0,5 e 0,8. Posteriormente, as células foram centrifugadas a 4.000 x *g* por 15 min à 4 °C e o sobrenadante descartado. As bactérias foram ressuspensas cuidadosamente em 1 litro de água Milli-Q estéril gelada, os tubos foram centrifugados conforme anteriormente citado e em seguida o sobrenadante descartado. O conteúdo dos frascos foram ressuspensas em um único tubo com 500 mL de água Milli-Q estéril gelada e centrifugado conforme anteriormente. Após a centrifugação o sobrenadante foi descartado, o *pellet* ressuspendido em glicerol 10% gelado (20 mL por tubo), e centrifugado novamente nas mesmas condições. Em seguida o sobrenadante foi descartado e as bactérias ressuspensas em glicerol 10% em um volume final de 2-3 mL, numa concentração final de 1-3 x 10¹⁰ cél/mL. Para estocagem das bactérias, 100 μ L das células competentes foram adicionadas em tubos de crioconservação e os tubos mantidos em nitrogênio líquido para posterior armazenagem a -80 °C.

6.12. Transformação bacteriana pelo método de eletroporação

O procedimento de transformação foi realizado com os materiais e amostras em banho de gelo. Uma alíquota de célula competente foi descongelada a temperatura ambiente e em seguida armazenada em banho de gelo. As cubetas de eletroporação foram mantidas em gelo por 10 minutos anteriormente ao início do experimento. Foram adicionados na cubeta do eletroporador 40 μL de células competentes, e em seguida 1-2 μL de DNA (produto de ligação) e mantidos em banho de gelo por 30 minutos. Posteriormente a cubeta com mistura de célula competente com o DNA foi inserida no equipamento de eletroporação (EC 100 Electroporator; ThermoEC) nas seguintes condições: 1260 μF , 220 Ω e 400 V. Após o *shock*, a cubeta foi retirada da base e colocada imediatamente em banho de gelo e o material ressuspendido em 1 mL de meio SOC. Em seguida o material foi transferido para um tubo e incubado à 37 °C por 1 hora sob agitação (225 rpm).

6.12.1. Verificação das Unidades Formadoras de Colônias (UFCs).

A verificação de UFCs transformadas foi baseada no crescimento de colônias em placas com meio LB contendo ampicilina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e na análise de restrição do DNA plasmidial dos clones resistentes.

Após confirmação do crescimento das colônias, diferentes colônias foram selecionadas, repicadas e transferidas em diferentes tubos contendo 2 mL de meio LB com antibiótico (ampicilina; 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e mantidos em estufa à 37 °C *overnight*.

6.12.2. Isolamento de DNA plasmidial

O isolamento de DNA plasmidial foi realizado pela técnica de lise celular alcalina seguida de precipitação com etanol conforme o protocolo anteriormente descrito e modificado a partir do original de Sambrook *et al.* (Sambrook e Russell, 2001). As enzimas BamHI e XhoI foram novamente empregadas na restrição dos plasmídeos obtidos de possíveis transformantes.

Posteriormente a extração do DNA plasmidial, as amostras foram purificadas com o kit *Wizard DNA Clean-Up System* (Promega) segundo as especificações do fabricante e submetidas a um gel de agarose para a confirmação do tamanho do fragmento de DNA e posterior sequenciamento.

6.13. Sequenciamento do inserto subclonado no vetor de expressão

O sequenciamento foi realizado em colaboração com o Laboratório de Biologia Molecular do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), utilizando um seqüenciador *ABI Prism 377 DNA Sequencer™* (Applied Biosystems – Foster City, CA, EUA). O equipamento possui dois softwares produzidos para a análise dos dados, onde o software *Sequencing Analysis* é utilizado para analisar os dados de sequenciamento de DNA, enquanto o software *GeneScan™* permite que se faça análises de tamanho e de quantidade de fragmentos de DNA.

O sequenciamento das amostras foi realizado utilizando o kit *DYEnamic ET Terminator Kit* (Amersham Biosciences) de acordo com as especificações do fabricante. O DNA plasmidial extraído de cada um dos clones foi amplificado com o *primer* T7 (*forward*) para ambos os clones e os *primers* contendo o sítio de restrição XhoI para ambas as proteínas MBP e ECP/EDN (*reverse*).

6.13.1. Análise dos produtos de sequenciamento

Após o sequenciamento do inserto subclonado no vetor de expressão, a fim de se identificar se as seqüências dos fragmentos clonados correspondem com as seqüências das proteínas, os eletroferogramas das amostras foram comparados com as seqüências das proteínas depositadas no banco de dados *GenBank* com o auxílio do programa *BLAST*¹⁰.

6.14. Cultura de Células U937 para expressão de proteínas

A linhagem celular humana U937 foi cultivada em meio RPMI 1640, contendo soro bovino fetal (10% v/v), L-glutamina (2 mM), penicilina (100 U/mL) e estreptomicina (100 µg/mL), numa densidade de 0,5-1,0 x 10⁶ células/mL, à 37 °C, em atmosfera úmida com 5% CO₂, a fim de serem utilizadas para o processo de transfecção e expressão das proteínas do eosinófilo.

6.14.1. Transfecção

Este protocolo foi modificado a partir do original de Sambrook *et al.* (Sambrook e Russell, 2001).

As células U937 foram cultivadas numa concentração de 0,5-1 x 10⁶ células/mL. A suspensão de células contida na garrafa de cultura foi centrifugada à 200 x *g* por 5 minutos e a concentração de células ajustadas em 20 x 10⁶ células/mL em meio RPMI-1640 puro (sem antibióticos). Em seguida, a suspensão de células e as amostras de DNA (inserto) foram mantidas em banho de gelo por aproximadamente 10 minutos.

¹⁰ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

Foram adicionados em cada cubeta do eletroporador 800 μ L da suspensão de células (20×10^6 células/mL) juntamente com 5 μ g de DNA. Em seguida, as cubetas com as suspensões de células e o DNA foram inseridas no equipamento de eletroporação (EC 100 Electroporator; ThermoEC) nas seguintes condições: 1.260 μ F, 220 Ω e 400 V.

Após o *shock*, as cubetas foram retiradas da base do eletroporador e mantidas em banho de gelo por aproximadamente 10 minutos. Posteriormente, cada amostra de célula transfectada foi transferida para as garrafas de cultura de células juntamente com meio RPMI-1640 completo (com antibióticos e soro fetal bovino). As culturas de células transfectadas foram mantidas numa concentração de aproximadamente 1×10^6 células/mL, à 37 °C, em atmosfera úmida com 5% CO₂.

6.15. Preparação da fração citosólica de células U937

A preparação da fração citosólica de células U937 foi realizada da mesma maneira que a fração citosólica de células HL-60 clone 15 diferenciadas em eosinófilos (Item 4.7.1).

7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como a média \pm desvio padrão das médias (D.P.) de n experimentos. Diferenças estatísticas significativas foram determinadas por análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Bonferroni.

Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

Todas as análises estatísticas foram realizadas usando o software Prism versão 5 (GraphPad Inc., La Jolla, CA, EUA).

8. RESULTADOS (PARTE 01)

8.1. Purificação de eosinófilos de ratos

Obteve-se uma média de pureza > 90% de eosinófilos após a contagem diferencial das células.

8.2. Efeito da fração citosólica de eosinófilos de rato sobre a agregação plaquetária

A agregação plaquetária em Plaquetas Lavadas (PL) induzida pela trombina foi inibida de maneira dose-dependente pela fração citosólica dos eosinófilos isolados da cavidade peritoneal de ratos. Esta inibição foi apenas parcialmente revertida pela prévia incubação dos eosinófilos com L-NAME (Figura 9). A inibição da síntese de prostaglandinas pela incubação das células com indometacina 10 μM não reverteu à inibição induzida pela fração citosólica.

Mesmo com adição de L-NAME na plaquetas lavadas ocorreu inibição da agregação, embora menor que sem L-NAME.

Em PRP, a fração citosólica de eosinófilos inibiu a agregação plaquetária induzida por ADP 5 μM (Figura 10), PAF 1 μM (Figura 11), ácido araquidônico 1 mM (Figura 12) e colágeno 40 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 13). O efeito inibidor mais potente foi observado em plaquetas estimuladas com PAF. Da mesma forma que o observado com plaquetas lavadas, a inibição induzida pela fração citosólica de eosinófilos não foi revertida pela incubação prévia destas células com indometacina ou L-NAME (dados não mostrados).

O fator ativo sobre a agregação plaquetária proveniente de eosinófilos foi inativado após incubação da fração citosólica à 100 °C por 20 min (Figura 10). Após este tratamento, o efeito inibidor sobre a agregação plaquetária induzida por ADP foi drasticamente reduzido: $76,5 \pm 25,6\%$ de inibição antes do aquecimento e $25,3 \pm 6,3\%$ de inibição após o aquecimento.

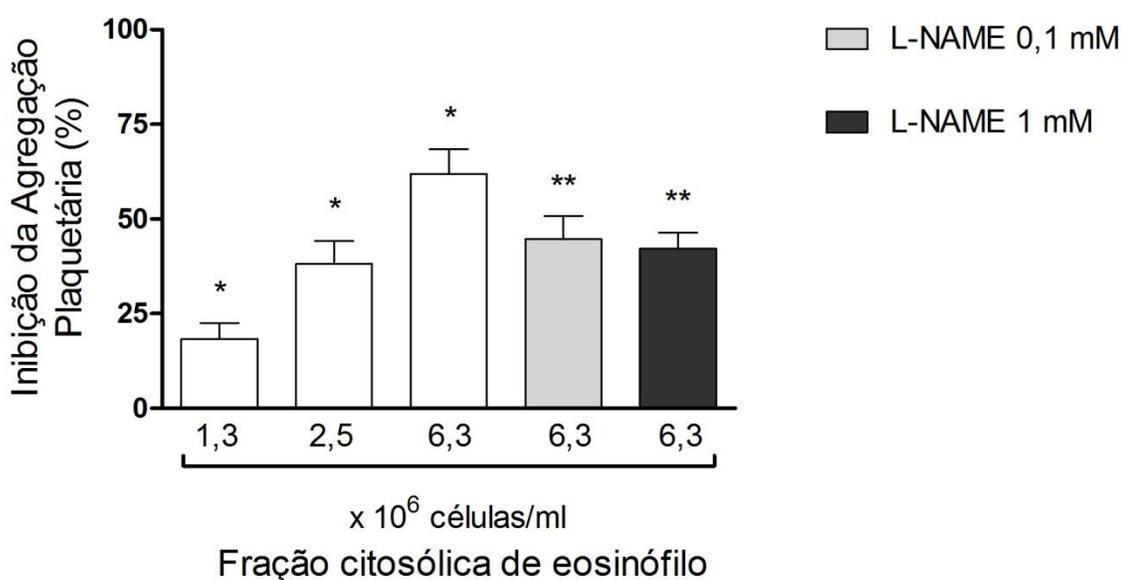


Figura 9. Inibição da agregação plaquetária em plaquetas lavadas (PL). As PL foram incubadas com a fração citosólica de eosinófilo de rato por 1 min antes da adição da Trombina (50-100 mU/mL). Os resultados representam a média \pm D.P. de 4 experimentos independentes. * $p < 0,001$ foi considerado significativo quando comparado ao controle (trombina) e ** $p < 0,01$, quando comparado à inibição da agregação plaquetária pela fração citosólica de eosinófilos ($6,3 \times 10^6$ células/mL) sem L-NAME.

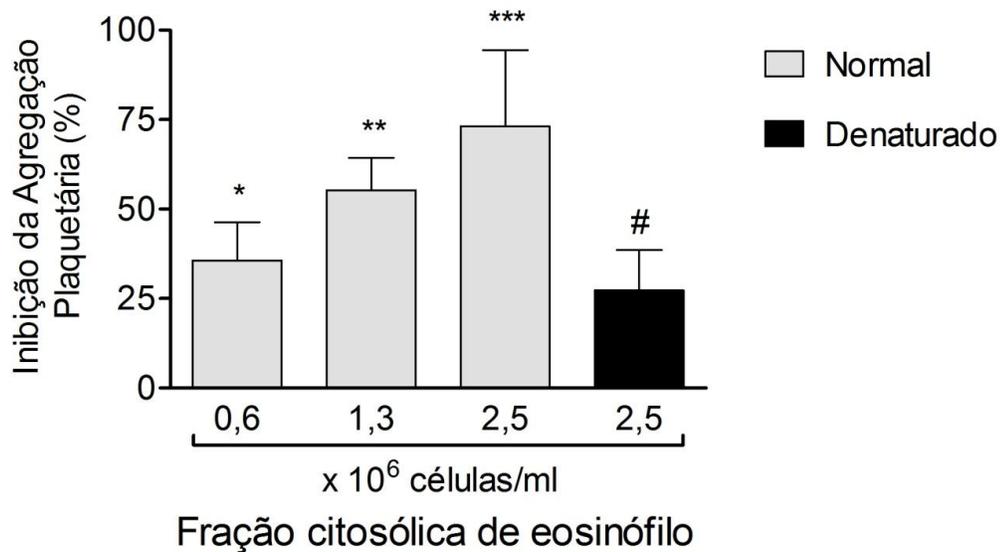


Figura 10. Inibição da agregação plaquetária em plasma rico em plaquetas (PRP). O PRP foi incubado com a fração citosólica de eosinófilos de rato por 1 min antes da adição do agonista ADP. A fração citosólica denaturada foi obtida por aquecimento a 100 °C por 20 min. Os resultados representam a média \pm D.P. de 4 experimentos independentes. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ foram considerados significativos quando comparados ao controle e # $p < 0.01$ comparado com a fração citosólica de eosinófilos normal ($2,5 \times 10^6$ células/mL).

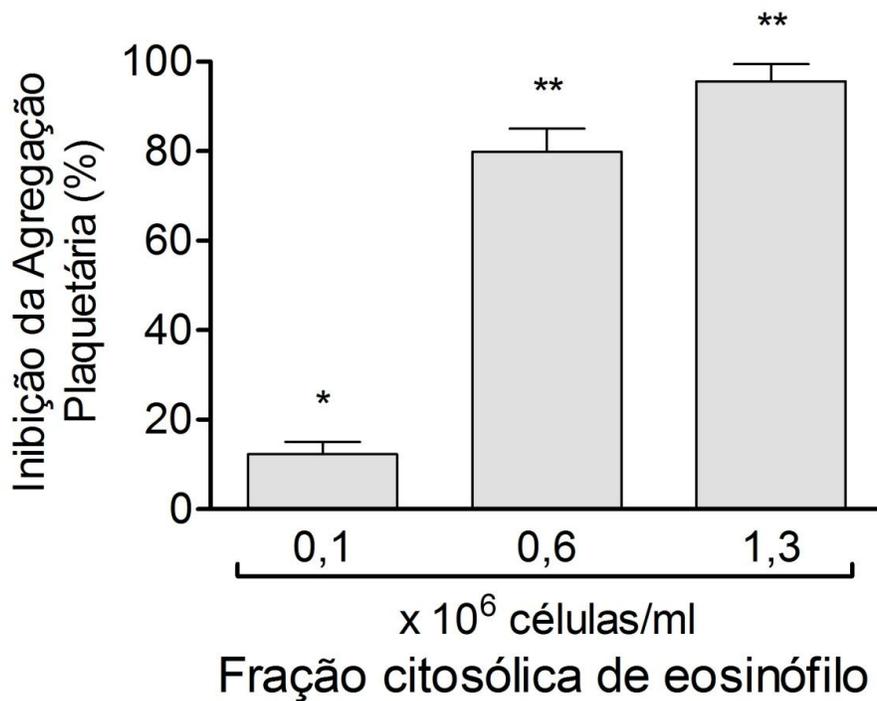


Figura 11. Inibição da agregação plaquetária em plasma rico em plaquetas (PRP). O PRP foi incubado com a fração citosólica de eosinófilos de rato por 1 min antes da adição do agonista PAF 1 μ M. Os resultados representam a média \pm D.P. de 4 experimentos independentes. * $p < 0.01$, ** $p < 0.001$ foram considerados significativos quando comparados ao controle.

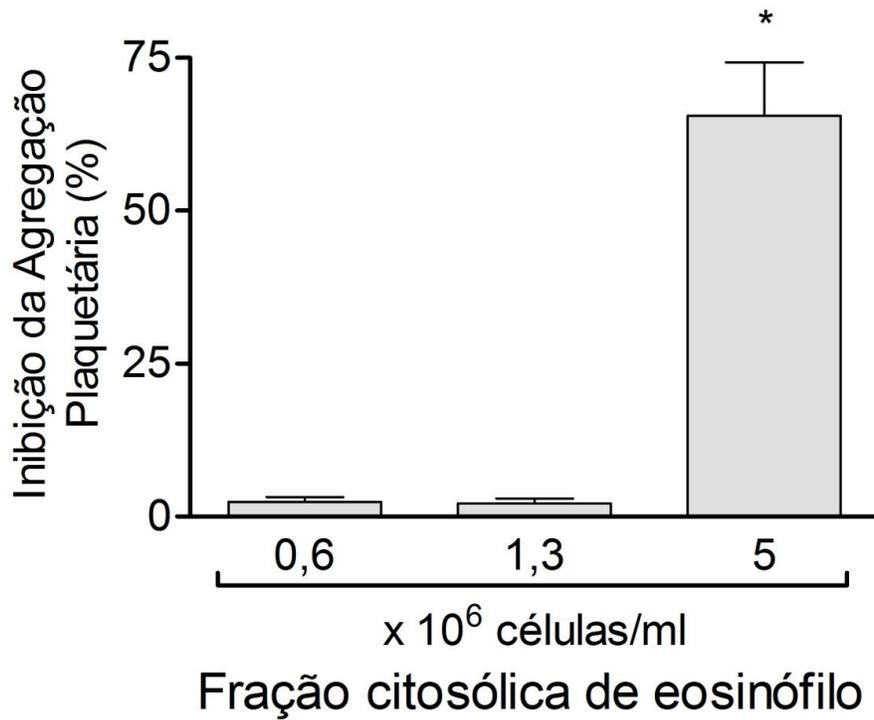


Figura 12. Inibição da agregação plaquetária em plasma rico em plaquetas (PRP). O PRP foi incubado com a fração citosólica de eosinófilos de rato por 1 min antes da adição do agonista Ácido araquidônico 1mM. Os resultados representam a média \pm D.P. de 4 experimentos independentes. * $p < 0.001$ foram considerados significativos quando comparados ao controle.

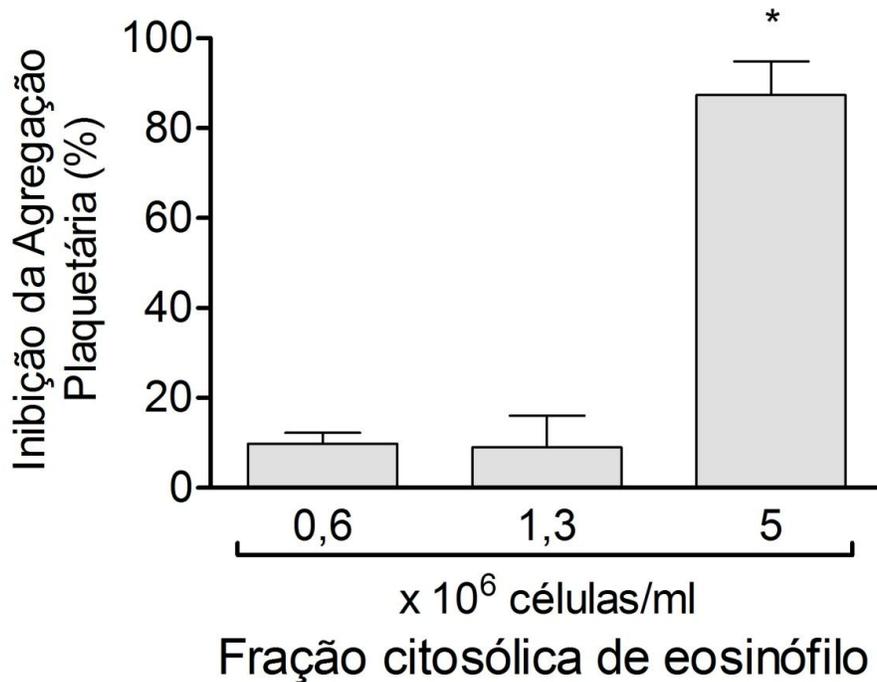


Figura 13. Inibição da agregação plaquetária em plasma rico em plaquetas (PRP). O PRP foi incubado com a fração citosólica de eosinófilos de rato por 1 min antes da adição do agonista Colágeno 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Os resultados representam a média \pm D.P. de 4 experimentos independentes. * $p < 0.001$ foram considerados significativos quando comparados ao controle.

8.3. Gel filtração

Após a gel filtração as frações cromatográficas foram coletadas e agrupadas em dois principais picos cromatográficos, classificados como P-I e P-II (P-I mostra proteínas com peso molecular maiores do que P-II), de acordo com o perfil de leitura a 280 nm (Figura 14, painel A). Cada pico cromatográfico foi testado na agregação plaquetária

induzida por PAF, demonstrando que P-II apresenta maior atividade inibitória da agregação plaquetária *in vitro* (Figura 14, painel B).

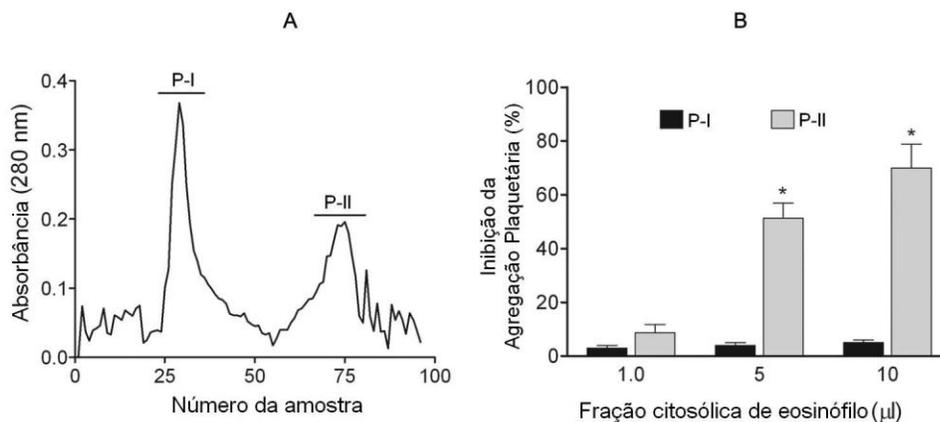


Figura 14. Gel filtração em Sephadex G-75 da fração citosólica de eosinófilos de rato e inibição da agregação plaquetária em plasma rico em plaquetas (PRP). A coluna foi equilibrada com Tris-HCl 0,05 M, pH 7,2. O material foi eluído a 4 °C utilizando fluxo de 10 mL/hora e amostras de 0,5 mL foram coletadas. As amostras foram agrupadas em duas frações principais, P-I e P-II (painel A), de acordo com o perfil da leitura da absorbância a 280 nm. As frações foram testadas na agregação plaquetária utilizando o agonista PAF (1 µM; painel B).

8.4. Espectrometria de Massa

Após a gel filtração o pico P-II foi submetido a uma cromatografia de fase reversa, o cromatograma resultante demonstrou dois picos principais denominados P-II1 e P-II2, eluídos em 30,2 e 25 minutos respectivamente (Figura 15). A análise por espectrometria de massa das duas frações identificou cadeias polipeptídicas com peso molecular de 15053, 15070 (Figura 16) e 13790 (Figura 17). Essas massas são próximas as das proteínas de rato: proteína catiônica do eosinófilo (ECP; 15334,43),

neurotoxina derivada do eosinófilo (EDN; 15463,56) e proteína principal do eosinófilo (MBP; 13451,58). *UniProt ID*¹¹: P70709, P10153 e Q63189, respectivamente.

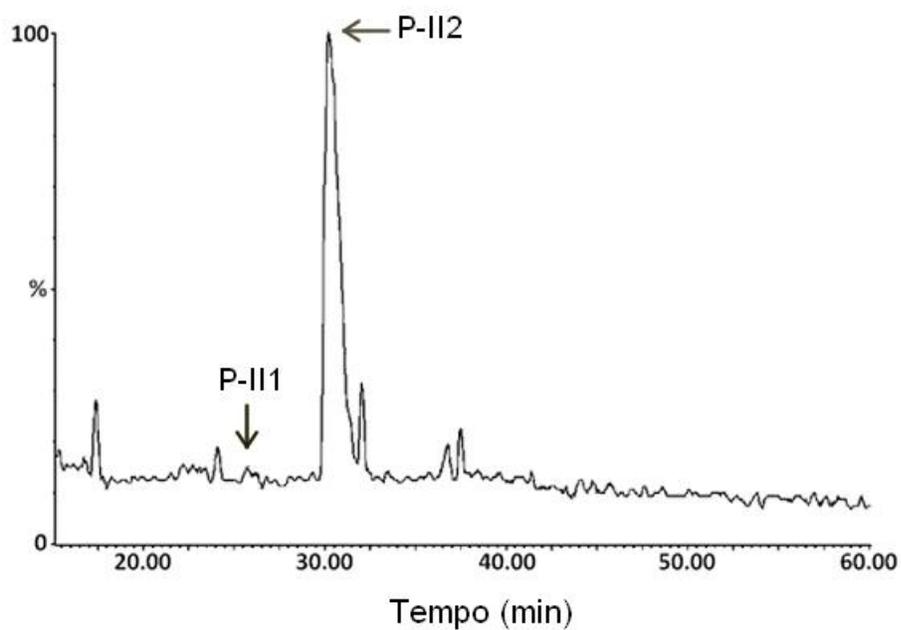


Figura 15. Cromatografia de fase reversa da fração ativa P-II obtida em Gel Filtração (Sephadex G-75).

¹¹ <http://www.uniprot.org/>

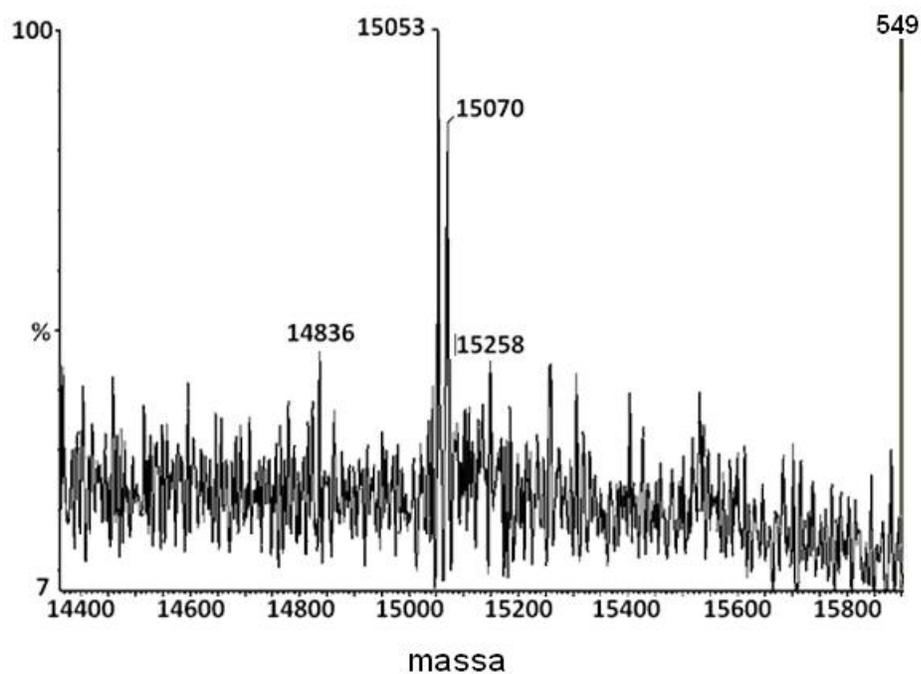


Figura 16. Espectro de massa obtido da fração P-II1 em cromatografia de fase reversa.

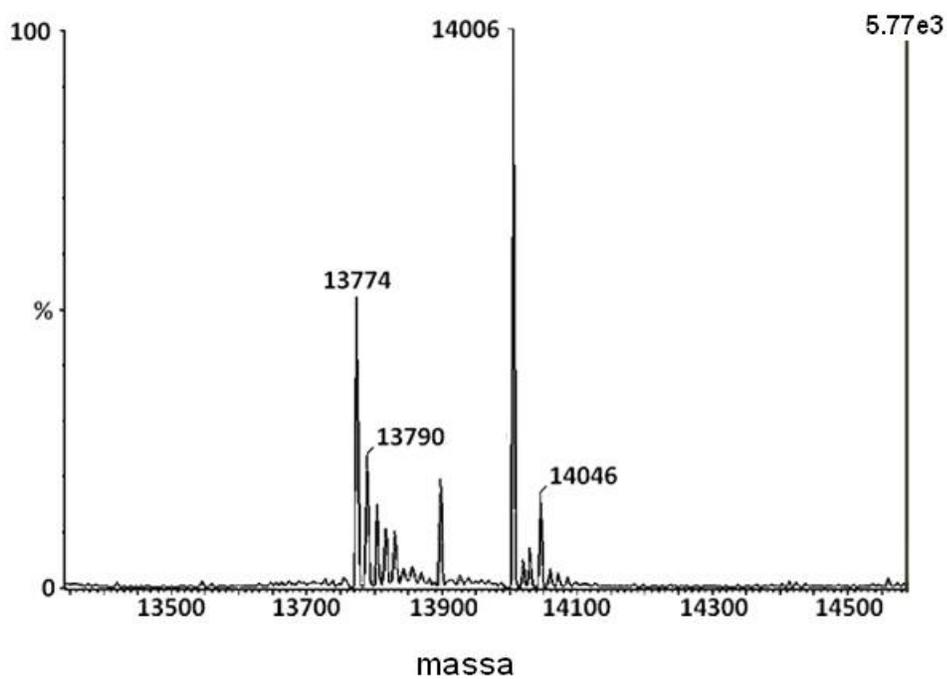


Figura 17. Espectro de massa obtido da fração P-II2 em cromatografia de fase reversa.

8.5. Cinética de diferenciação das células HL-60 clone 15 na avaliação do efeito de inibição da agregação plaquetária

A fim de investigar se os eosinófilos humanos também apresentam o fator de inibição da agregação plaquetária utilizamos as células HL-60 clone 15. Após a diferenciação durante 3, 5 e 7 dias a fração citosólica foi capaz de aumentar a inibição da agregação plaquetária. Foi observado que as células diferenciadas após 3 dias apresentaram $34,7 \pm 12,8\%$ de inibição da agregação plaquetária (Figura 18). As células diferenciadas por 5 dias inibiram $70,8 \pm 11,8\%$ e aquelas diferenciadas por 7 dias inibiram $75,6 \pm 1,8\%$ da agregação plaquetária induzida por PAF (Figura 18).

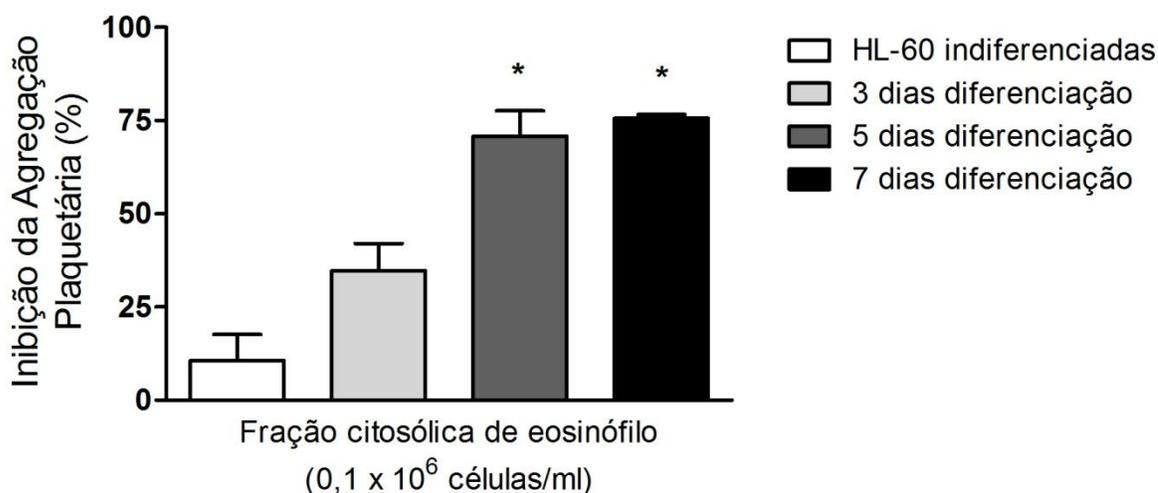


Figura 18. Diferenciação de células HL-60 clone 15 e inibição da agregação plaquetária em PRP induzida por PAF. O PRP foi incubado com a fração citosólica de células por 5 min antes da indução da agregação plaquetária utilizando PAF. Os resultados representam a média \pm D.P. ($n = 3$). * $p < 0,01$ foi considerado significativo quando comparado às células HL-60 clone 15 indiferenciadas.

9. RESULTADOS (PARTE 02)

9.1. Efeito da proteína ECP sob a Agregação Plaquetária

A fim de confirmar se as proteínas catiônicas do eosinófilo podem ser a responsáveis pelo efeito de inibição da agregação plaquetária, nós utilizamos a proteína ECP pura nos testes de agregação plaquetária.

Os resultados demonstraram que a proteína ECP causa inibição da agregação plaquetária em PRP e esta inibição ocorre de maneira tempo dependente (Figura 19).

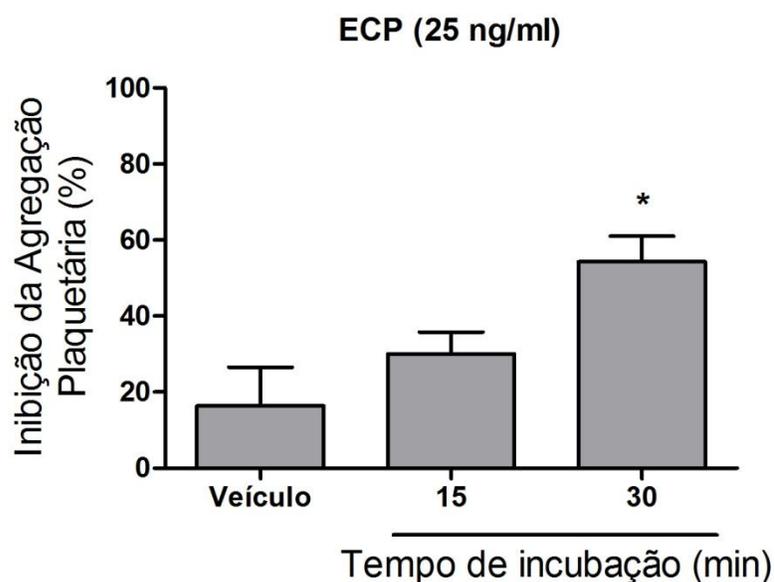


Figura 19. Inibição da agregação plaquetária em PRP pela proteína ECP. As plaquetas (PRP) foram incubadas com a proteína ECP por 15 e 30 minutos a 37 °C utilizando o ADP como agonista. Os resultados representam a média \pm D.P. de 3 experimentos independentes. * $p < 0.01$ quando comparado com o controle com ADP.

Em PL a inibição foi maior que observada em PRP, $74 \pm 33,8\%$, e esta inibição também ocorreu de maneira tempo dependente (Figura 20).

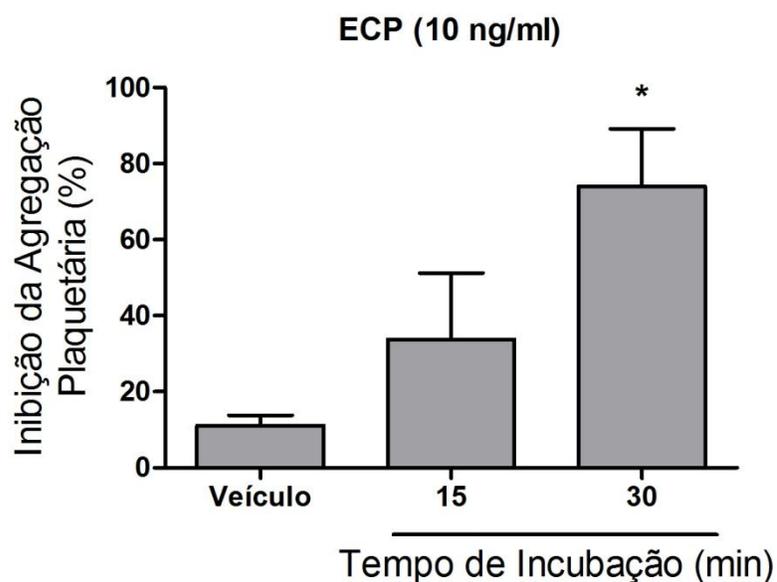


Figura 20. Inibição da agregação plaquetária em PL pela proteína ECP. As plaquetas (PL) foram incubadas com a proteína ECP por 15 e 30 minutos a 37 °C utilizando Trombina como agonista. Os resultados representam a média \pm D.P. de 5 experimentos independentes. * $p < 0.01$ quando comparado com o controle com Trombina.

9.2. Atividade Plaquetária por MTT (Teste de citotoxicidade)

O ensaio de viabilidade celular pelo teste de redução do MTT demonstrou que a proteína ECP (10 ng/mL) não causa efeito citotóxico sob as plaquetas humanas com 15 e 60 minutos de incubação (Figura 21).

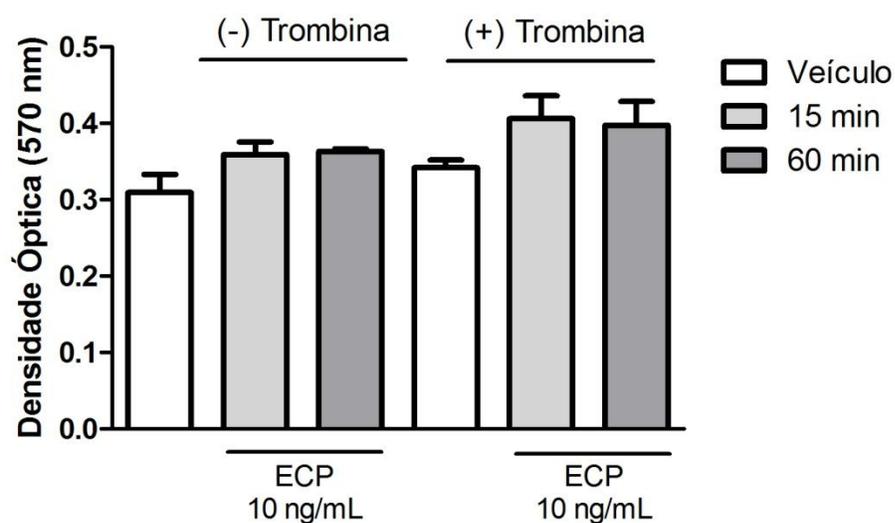


Figura 21. Ensaio de MTT para avaliar a citotoxicidade da proteína ECP sob as plaquetas humanas. As plaquetas ($1,2 \times 10^8$ plaquetas/mL) foram incubadas com a proteína ECP (10 ng/mL) e o MTT (5 mg/mL) por 15 e 60 minutos na presença ou ausência de Trombina (50 mU/mL). Os resultados representam a média \pm D.P. dos valores de densidade óptica (570 nm) de 3 experimentos independentes em duplicata.

10. RESULTADOS (PARTE 03)

10.1. PCR para obtenção dos cDNAs de proteínas eosinofílicas

A reação de PCR para obtenção do cDNA da proteína MBP foi realizada em um volume final de 25 μ l utilizando como *template* 2 μ l do *pool* de cDNA (obtido no RT-PCR) e as seguintes combinações de *primers*: MBP-F1 + MBP-R (reação 1); MBP-F2 + MBP-R (reação 2, Figura 22). Utilizamos como controle negativo o *mix* de reação sem a adição dos *primers*.

Pode-se observar na primeira reação três bandas, sendo a primeira com tamanho entre 739-861 pb, a segunda com 492 pb e a terceira em torno de 246-369 pb. Na segunda reação observa-se apenas a primeira banda com tamanho entre 739-861 pb (Figura 22). As bandas observadas nas duas reações possuem o mesmo número de pares de base, correspondendo ao tamanho do fragmento esperado quando avaliado o cDNA da proteína MBP.

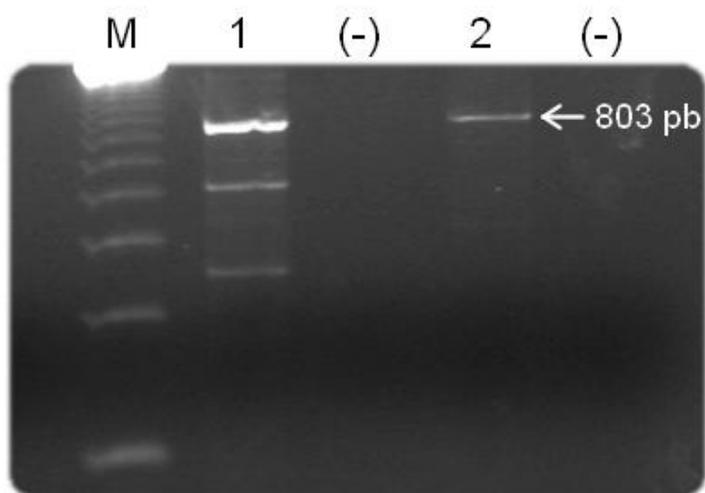


Figura 22. Eletroforese em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio representando os produtos de amplificação por PCR da proteína MBP, utilizando dois

diferentes *primers forward* e um *reverse*. M: marcador de peso molecular de DNA (123 *bp* DNA ladder), (-) controle negativo, (1) reação com os *primers* MBP-F1 + MBP-R, (2) reação com os *primers* MBP-F2 + MBP-R.

Na amplificação do cDNA para a proteína EPO não obteve-se resultados satisfatórios. O gel apresenta diversas bandas inespecíficas, com número de pares de base abaixo do esperado (reação 1; Figura 23). Já na amplificação do cDNA para as proteínas ECP/EDN, pode-se observar uma única banda significativa com tamanho de aproximadamente 600 pb (reação 2, Figura 19). As reações 3 e 4 amplificaram muitos produtos inespecíficos e não foram utilizadas nas reações subsequentes (Figura 23).

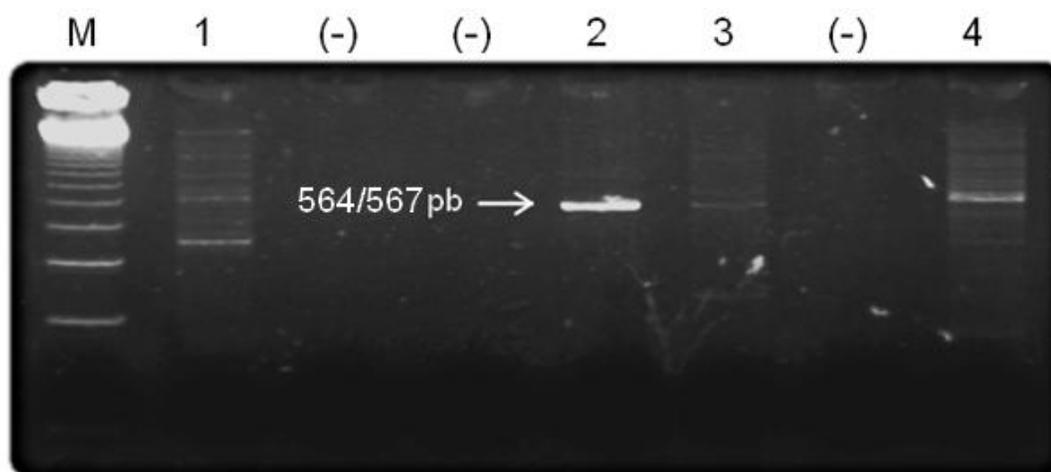


Figura 23. Eletroforese em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio representando os produtos de amplificação por PCR das proteínas EPO e ECP/EDN. M: marcador de peso molecular de DNA (123 *bp* DNA ladder), (-) controle negativo, (1) reação com os *primers* EPO-F + EPO-R, (2) reação com os *primers* ECP/EDN-F1 + ECP/EDN-R, (3) reação com os *primers* ECP/EDN-F2 + ECP/EDN-R, (4) reação com os *primers* ECP/EDN-F3 + ECP/EDN-R.

10.2. Análise da integridade dos produtos de clonagem

A fim de se avaliar a integridade do plasmídeo pcDNA3.1+ circular (reação 1, Figura 24) e do plasmídeo linear clivado com as enzimas de restrição BamHI e XhoI (reação 2, Figura 24), os mesmos foram avaliados por eletroforese em gel de agarose. Também avaliou-se as amostras de RNA utilizadas inicialmente para a obtenção do cDNA das proteínas, demonstrando nas reações 3, 4 e 5 a integridade do material utilizado (Figura 24).

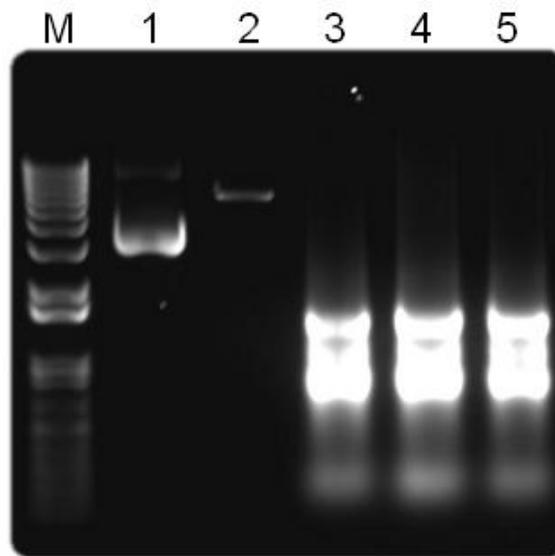


Figura 24. Eletroforese em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio representando a integridade dos produtos de clonagem: M: marcador de peso molecular de DNA (1 kb plus DNA ladder), (1) plasmídeo pcDNA3.1+ circular, (2) plasmídeo pcDNA3.1+ linear clivado com as enzimas de restrição BamHI e XhoI, (3) amostra de RNA 1, (4) amostra de RNA 2 e (5) amostra de RNA 3.

10.3. PCR para amplificação do cDNA das proteínas MBP e EDN/ECP

contendo sítios de restrição

Para a amplificação das proteínas criando sítios de restrição, efetuou-se a reação para amplificação do cDNA das proteínas em um volume final de reação de 50 μL , utilizando-se como molde 2 μL do *pool* de cDNA. Os sítios de restrição adicionados as extremidades do produto da reação foram BamHI + XhoI, para ambas proteínas MBP e ECP/EDN. Observou-se nas duas reações a amplificação de bandas com peso molecular de aproximadamente 700 pb (reação 1, Figura 25), que corresponde ao tamanho esperado de 669 pb para a proteína MBP com o sítio de restrição e uma banda com aproximadamente 500 pb (reação 2, Figura 25), que também corresponde ao tamanho esperado de 483 pb para a proteína ECP e 486 pb para a proteína EDN com o sítio de restrição (Figura 25).

10.4. Ligaç o com T4 DNA ligase

Ap s a rea o de liga o do DNA plasmidial com a seq ncia das prote nas de interesse, as amostras foram submetidas a um gel de agarose para a confirma o da rea o de liga o, onde a rea o 3 representa a liga o com o DNA da prote na MBP e a rea o 4 representa a liga o com o DNA da prote na EDN/ECP (Figura 25).

Ap s a rea o de liga o, os mesmos foram submetidos a uma clivagem do DNA plasmidial com as enzimas de restri o BamHI e XhoI para a confirma o da libera o do inserto, onde pode-se constatar que os tamanhos dos fragmentos liberados correspondem novamente ao tamanho esperado para as prote nas MBP

(reação 6, Figura 25) e EDN/ECP (reação 5, Figura 25), conforme descrito anteriormente.

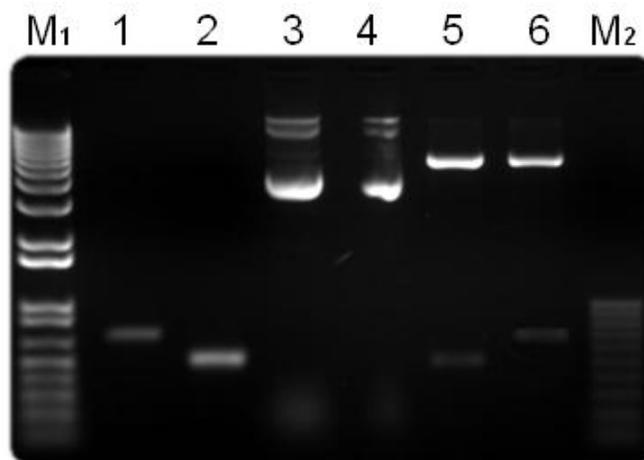


Figura 25. Eletroforese em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio representando os produtos de amplificação por PCR da proteína MBP, ECP/EDN; produtos de amplificação para as proteínas criando os sítios de restrição com as enzimas BamHI e XhoI; produto de clivagem do plasmídeo pcDNA3.1+ com a liberação do inserto. M₁: marcador de peso molecular de DNA (1 kb Plus DNA ladder), (1) reação de PCR da proteína MBP contendo os sítios de restrição BamHI e XhoI, (2) reação de PCR das proteínas EDN/ECP contendo os sítios de restrição BamHI e XhoI, (3) reação de ligação do plasmídeo pcDNA3.1+ com o cDNA da proteína proteína MBP, (4) reação de ligação do plasmídeo pcDNA3.1+ com o cDNA da proteína proteína ECP/EDN, (5) clivagem do DNA plasmidial para proteína EDN/ECP, (6) clivagem do DNA plasmidial para proteína MBP e M₂: marcador de peso molecular de DNA (100 bp DNA ladder).

10.5. Transformação

Após o período estabelecido para o crescimento das colônias bacterianas, pode-se observar o crescimento de colônias em ambas as placas que continham o inserto

para as proteínas MBP e EDN/ECP. Para a proteína MBP selecionou-se duas colônias, e para as proteínas EDN/ECP. Selecionou-se seis colônias, visto que as proteínas são homólogas e os *primers* utilizados proporcionam a possibilidade de obter-se a seqüência das duas proteínas.

10.6. Sequenciamento

Após o alinhamento dos produtos de sequenciamento com os dados contidos no *GenBank* para as proteínas de interesse, os resultados demonstraram uma identidade de 91% do sequenciamento de 79,82% da proteína MBP (Figura 26).

Quando analisou-se os produtos de sequenciamento para as proteínas EDN e ECP, pode-se confirmar que o clone obtido é o da proteína EDN, onde pode-se demonstrar uma identidade de 97% (Figura 27).

```

ATGAAACTCCCCCTACTTCTGGCTCTTCTATTTGGGGCAGTTTCTGCTCTTCATCTAAGG
1  ATGAAACTCCCCTTACTTCTGGCTCTTCTATTTGGGGCAGTTTCTGCTCTTCATCTAAGG 60
TCTGAGACTTCCACCTTTGAGACCCCTTTGGGTGCTAAGACGCTGCCTGAGGATGAGGAG
61  TCTGAGACTTCCACCTTTGAGACCCCTTTGGGTGCTAAGACGCTGCCTGAGGATGAGGAG 120
ACACCAGAGCAGGAGATGGAGGAGATCCCTTGCAGGGAGCTGGAGGAAGAGGAGGAGTGG
121  ACACCAGAGCAGGAGATGGAGGAGACCCCTTGCAGGGAGCTGGAGGAAGAGGAGGAGTGG 180
GGCTCTGGAAGTGAAGATGCCTCCAAGAAAGATGGGGNTGTTGAGTCTATCTCAGTGCCA
181  GGCTCTGGAAGTGAAGATGCCTCCAAGAAAGATGGGGCTGTTGAGTCTATCTCAGTGCCA 240
NATATGGTGGACAAAAACCTTACGTGTCTGAGGAAGAGGACACAGTNAAGTGGTGGGC
241  GATATGGTGGACAAAAACCTTACGTGTCTGAGGAAGAGGACACAGTAAAGTGGTGGGC 300
ATCCCTGGGTGCCAGATCTGCCGCTACCTCCTGNTTGAGAAGTCTTCAGACGTTTGGT
301  ATCCCTGGGTGCCAGACCTG-CCGCTACCTCCTGG-TGAGAAGTCTTCAGACGTTTAG-T 357
CCAGCTTGGNTTTACTTTGCCGGGAGGTGCTACNCGGGCAACCTGGTTTTTCATCCACN
358  CAAGCTTGG-TTTACTT-GCCGG-AGGTGCTACA-GGGGCAACCTGGTTTCCATCC-ACA 412
ANCCTCACTGATTTAAATTATTTCGGAATCCAGNNGTTTNTGTNCTNGCGTCGCCCAAC
413  A-CTTCAAT-ATT-AA-TTAT-CG-AA-TCCAGT-GTTC-TGT-CA-GCG-CGCTC-AAC 459
CAGGGNTCAAGTCTTGNGATTGGGAGNGCACGGAATCACANGCTCGGGTCNGCT-----
460  CAGGG-TCAAGTCT-G-GATTGG-AG-GCA-GG-ATCACAGGCTCGGGTC-GCTGCAGAC 511

```

```

-----
512 GCTTTCAGTGGGTTGACGGCAGCCGCTGGAAC TTTGCGTACTGGGCTGCTCACCAGCCCT 571
-----
572 GGTCCC GCGGTGGTCACTGCGTGGCCCTGTGTACCCGAGGAGGCCACTGGCGTCGAGCCC 631
-----
632 ACTGCCTCAGAAGACTTCCTTTTCATCTGTTCTACTGA 669

```

Figura 26. Alinhamento da seqüência da proteína MBP clonada comparada com a seqüência depositada no banco de dados *GenBank* sob o nº NM_002728.4. A seqüência de nucleotídeos encontra-se numerada na direção 5'-3' • *Subject:* NM_002728.4; ● *Query:* clone proteína MBP (*Match*); ● Inserção ou deleção de nucleotídeo (*Gap*) e ● nucleotídeo trocado (*Mismatch*).

```

ATGGTTCCAAAAC TGTTCAC TTTCCCAAATTTGTCTGCTTCTTCTGTTGGGGCTTCTGGCT
1 ATGGTTCCAAAAC TGTTCAC TTTCCCAAATTTGTCTGCTTCTTCTGTTGGGGCTTCTGGCT 60
GTGGAGGGCTCACTCCATGTCAAACCTCCACAGTTTACCTGGGCTCAATGGTTTGAAAAC
61 GTGGAGGGCTCACTCCATGTCAAACCTCCACAGTTTACCTGGGCTCAATGGTTTGAAAAC 120
CAGCACATCAATATGACCTCCAGCAATGCACCAATGCAATGCAGGTCATTAACAATTAT
121 CAGCACATCAATATGACCTCCAGCAATGCACCAATGCAATGCAGGTCATTAACAATTAT 180
CAACGGCGATGCAAAAACCAAATACTTTCTTCTTACAAC TTTTGCTAACGTGTTAAT
181 CAACGGCGATGCAAAAACCAAATACTTTCTTCTTACAAC TTTTGCTAACGTAGTTAAT 240
GTTTGTGGTAACCCAAATATGACCTGTCTTAGTAACAAAAC TCGCAAAAATTTGTCACCAC
241 GTTTGTGGTAACCCAAATATGACCTGTCTTAGTAACAAAAC TCGCAAAAATTTGTCACCAC 300
AGTGGAAAGCCA GGGTGCCTTTAATCCACTGTAACCTCACAAC TCCAAGTCCACAGAATA
301 AGTGGAAAGCCA -GGTGCCTTTAATCCACTGTAACCTCACAAC TCCAAGTCCACAGAATA 358
TTTCAAAAC TGCAGGTATGCGCAGACACC AAGCAAACA TTGTTCTATATAGTTGCA TTGTG
359 TTTCAAAAC TGCAGGTATGCGCAGACACC -AGCAAACA -TGTTCTATATAGTTGCA -TGTG 415
ACAACAGANATCAACGACGAGA -NCTCCACAGTATTCGGTGGTNC AGT TTCACCTGGATN
416 ACAACAGAGATCAACGACGAGACCC TCCACAGTATCCGGTGGTTCAGTTCACCTGGATA 475
GAATCATCTAA
476 GAATCATCTAA 486

```

Figura 27. Alinhamento da seqüência da proteína EDN clonada comparada com a seqüência depositada no banco de dados *GenBank* sob o nº NM_002934.2. A

sequência de nucleotídeos encontra-se numerada na direção 5'-3' • *Subject*: NM_002934.2; • *Query*: clone proteína EDN (*Match*); • Inserção ou deleção de nucleotídeo (*Gap*) e • nucleotídeo trocado (*Mismatch*).

10.7. Transfecção e expressão das proteínas

As células U937 transfectadas, bem como as não transfectadas foram mantidas em cultura por aproximadamente 48 horas, ocasião em que foi realizada a estimativa da viabilidade celular pela técnica de exclusão com azul de tripan (Tabela 4).

Tabela 4. Viabilidade celular das células U937 transfectadas com as proteínas MBP, proteína EDN e células U937 não transfectadas após 24 e 48 horas.

Amostra	Viabilidade Celular (%)	
	24 horas	48 horas
Célula U937	89	89
Célula U937 + MBP	89	90
Célula U937 + EDN	90	92

10.8. Efeito da fração citosólica de células das proteínas clonadas sob a agregação plaquetária

Utilizou-se como controle para este estudo as células U937 não transfectadas, e verificou-se que este tipo celular possui um pequeno efeito de inibição sob a agregação plaquetária ($18 \pm 8,1\%$), bem como a proteína MBP ($22 \pm 3,5\%$). Já a proteína EDN, apresenta uma inibição de $63,9 \pm 26,1$ quando comparado com as células U937 não transfectadas (Figura 28).

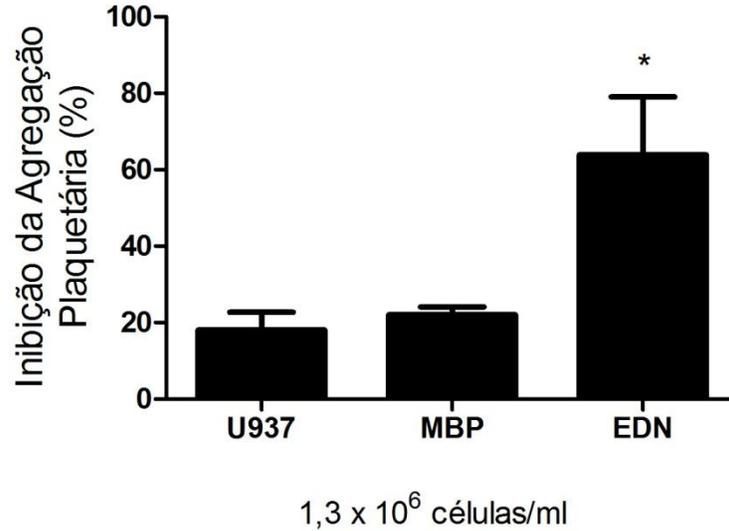


Figura 28. Efeito das proteínas clonadas sobre a agregação plaquetária induzida por PAF (0,5-1 μ M). A fração citosólica de células ($1,3 \times 10^6$ células/mL) foi adicionada ao PRP e incubada por 3 minutos antes da adição do agonista e a agregação foi registrada por 5 minutos. U937, fração citosólica de células não transfectadas; MBP, células U937 transfectadas com o vetor de expressão com o cDNA da proteína MBP; EDN, células U937 transfectadas com o vetor de expressão com o cDNA da proteína EDN. Os resultados representam a media \pm D.P. de 3 experimentos independentes. * $p < 0.05$ quando comparado com o controle (células U937 não transfectadas).

11. DISCUSSÃO

Tem sido observada por pesquisadores uma relação entre a presença e atividade de eosinófilos e o início da cascata de coagulação e agregação plaquetária. Alguns estudos apontam para disfunções plaquetárias, como ausência ou diminuição da agregação plaquetária por diferentes agonistas, tempo de sangramento prolongado, deficiência do *pool* de armazenamento plaquetário, e ambos estão relacionados com eosinofilia, ou doenças associadas à eosinofilia.

Outros estudos tem se concentrado na interação de células polimorfonucleares com plaquetas. Esta interação pode provocar o aumento da inflamação e da resposta de plaquetas, como por exemplo, metabólitos do ácido araquidônico, 5-HT, liberação de ATP e radicais de oxigênio (Schattner *et al.*, 1990; Zatta *et al.*, 1990; Maugeri *et al.*, 1992).

Os resultados apresentados demonstraram que a fração citosólica de eosinófilos de rato apresentou uma atividade inibitória da agregação plaquetária humana em ambos PRP e PL. No entanto, a inibição em PRP (agonista PAF) foi mais pronunciada, 99%, enquanto que em PL (agonista trombina) esta inibição foi de 70%.

Em ensaios com polimorfonucleares (PMNs) não estimulados (95-98% de neutrófilos) demonstraram uma inibição da agregação plaquetária de 100% em PL, enquanto que em PRP, o efeito de inibição foi menos efetivo (74% de inibição), ambos com o agonista colágeno (Schattner *et al.*, 1990). O PAF foi capaz de induzir a inibição da agregação plaquetária a partir de sangue total desprovido de leucócitos, o que

sugere que os PMNs não estimulados podem liberar um fator que inibe a agregação plaquetária e libera β -tromboglobulina (Zatta *et al.*, 1990).

Outras células inflamatórias, como leucócitos mononucleares, também inibem a agregação plaquetária em PL induzida por trombina e colágeno (59% e 31%, respectivamente) (Schattner *et al.*, 1990).

A agregação plaquetária induzida por diferentes agonistas foi inibida após a incubação das plaquetas com quantidades crescentes da fração citosólica de eosinófilos. O efeito máximo de inibição foi observado numa concentração de $1,25 \times 10^6$ células/mL com o agonista PAF, levando em consideração que o PAF é considerado um fraco agonista plaquetário (Pelagalli *et al.*, 2002). Doses mais altas da fração citosólica de eosinófilos (5×10^6 células/mL) foram necessárias para inibir 100% de agregação quando utilizado o agonista colágeno. Em estudos com neutrófilos, apenas $2,5 \times 10^6$ células/mL foram suficientes para causar 100% de inibição, no entanto, com LMs, 16×10^6 células/mL são necessárias para causar inibição quando o agonista utilizado é o colágeno (Schattner *et al.*, 1990; Schattner *et al.*, 1994). Uma possível explicação é que proteínas tais como a MBP, podem estar presentes em outros PMNs (Malik e Batra, 2012).

Como o óxido nítrico pode inibir a agregação de plaquetas (Wallis, 2005), testamos a possibilidade de que o efeito inibitório tenha ocorrido devido a presença de secreção de NO pelos eosinófilos (Rimele *et al.*, 1988; Persson *et al.*, 2001). O NO derivado de PMNs é um inibidor da agregação de plaquetas (Mccall *et al.*, 1989; Salvemini *et al.*, 1989). Esta hipótese foi descartada, primeiro pelo fato de que o NO é uma molécula muito instável em solução aquosa, além disso, pré-incubamos a fração citosólica de eosinófilos com L-NAME, um inibidor da síntese de NO. Em PL, o efeito

inibitório não foi inibido de forma significativa pela prévia incubação da fração citosólica de eosinófilos com L-NAME. Em nossos experimentos, concentrações de 0,1 e 1 mM de L-NAME também foram adicionadas para inibir a produção de NO pelas plaquetas, e nossos resultados sugerem que o efeito de inibição da fração citosólica de eosinófilos não ocorre exclusivamente através da via do NO, no entanto, são necessários mais estudos a fim de investigar este mecanismo de inibição.

O aquecimento a 100 °C das substâncias contidas na fração citosólica de eosinófilos não causaram a inibição da agregação plaquetária, demonstrando que há o envolvimento de proteínas termossensíveis neste processo.

A análise por espectrometria de massa indica a existência de proteínas catiônicas conhecidas na fração citosólica de eosinófilos ativa (pico P-II da Gel filtração). No entanto, essas medidas da massa intacta não podem ser utilizadas isoladamente para identificar as proteínas, mais ensaios de espectrometria de massa ou ensaios imunológicos são necessários para caracterizar completamente a fração de proteína ativa. Sabe-se que estas proteínas apresentam diversas formas de glicosilação (Peterson, Jörnvall e Venge, 1988; Rosenberg e Tiffany, 1994; Kita, 2011) e esta diferença pode ser crítica na regulação das suas funções biológicas (Venge *et al.*, 1999; Boix *et al.*, 2001).

A quantidade de material analisada não foi suficiente para realizar o seqüenciamento dos peptídeos no Q-TOF. Um fator complicador na análise foi a propriedade que as cadeias polipeptídicas presentes nesta fração tem de formar agregados insolúveis, provavelmente devido a sua alta densidade de cargas. Novas tentativas foram feitas de se acumular mais material e utilizar condições que evitem a formação destes agregados. No entanto, para isso seria necessária à obtenção de

maior quantidade de material e a dificuldade nesta etapa foi a de que o rendimento por animal é muito pequeno, o que torna necessário o sacrifício de um número muito grande de ratos.

Com o objetivo de verificar se o mesmo fator com a atividade inibitória sobre a agregação plaquetária identificado na fração citosólica de eosinófilos de ratos estava presente, também, em eosinófilos humanos, optou-se por utilizar um sistema de diferenciação celular *in vitro*. A similaridade do efeito observado sobre a agregação plaquetária da fração citosólica de células da linhagem HL-60 clone 15 após diferenciação em eosinófilos, quando comparado ao obtido com a fração citosólica obtido de células isoladas de ratos, mostrou que esta era uma alternativa viável.

As células da linhagem HL-60 se diferenciam primeiramente em eosinófilos em vez de neutrófilos quando cultivados com ácido butírico, se tiverem previamente sido cultivados sob condições alcalinas (pH 7,6) (Fischkoff, 1988). Sabe-se que células HL-60 cultivadas na presença de 0,5 mM de ácido butírico durante 5 dias conduz ao processo de diferenciação e aumenta drasticamente a expressão dos genes da peroxidase do eosinófilo (EPO) e da proteína básica principal (MBP) dos eosinófilos, que é semelhante ao obtido quando induzida a diferenciação celular com interleucina-5 (IL-5), interferon-gama (IFN- γ ; 100 U/mL) e com o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α ; 1000 U/mL) (Lopez, Newburger e Condino-Neto, 2003). Quando realizado um RT-PCR, utilizando iniciadores específicos para as proteínas EPO e MBP, este demonstrou que durante a diferenciação com 0,5 mM de ácido butírico, durante 7 dias, a expressão de mRNA destas proteínas é drasticamente aumentada (Lopez, Newburger e Condino-Neto, 2003).

Os resultados demonstraram que as células HL-60 foram efetivamente diferenciadas em eosinófilos, e a expressão de proteínas catiônicas foi significativamente aumentada.

A cinética de diferenciação das células HL-60 em eosinófilos foi paralelo ao aumento do efeito de inibição da agregação plaquetária, indicando que o aparecimento de proteínas específicas dos eosinófilos pode ser responsável por esta atividade.

A atividade da proteína EPO foi descartada pois o seu peso molecular não se encaixa com o das proteínas contidas na fração ativa.

Para confirmar se uma das proteínas catiônicas dos eosinófilos pode ser efetivamente responsável pelo efeito da inibição da agregação plaquetária, utilizou-se a proteína de ECP pura nos testes de agregação. Os resultados demonstram que a proteína de ECP provoca uma inibição da agregação plaquetária em PRP, e esta inibição é tempo-dependente. Este percentual de inibição, $54,33 \pm 11,68\%$ é menor do que o observado com a fração citosólica do eosinófilo, isto pode ser devido ao fato de que o ADP é considerado um forte agonista plaquetário, enquanto que o PAF é considerado um fraco agonista plaquetário.

Em PL, a inibição da agregação plaquetária foi maior do que em PRP, $74 \pm 33,8\%$, e esta inibição também ocorreu de maneira tempo-dependente.

Decidiu-se verificar se o efeito de inibição da agregação plaquetária poderia estar ocorrendo devido à citotoxicidade da proteína ECP, e por esta razão avaliou-se a viabilidade celular utilizando o ensaio de MTT. Observou-se que o efeito de inibição da proteína observado na agregação plaquetária é devido a algum mecanismo exercido pela proteína sobre as plaquetas e não uma inibição observada através da morte das plaquetas.

Outros autores demonstraram que existe uma associação positiva entre a ativação de plaquetas e ativação de eosinófilos nas vias respiratórias humanas de indivíduos com asma (Benton *et al.*, 2010). Neste estudo, eles demonstraram uma associação positiva entre a P-selectina e a proteína ECP, ambos marcadores de plaquetas e eosinófilos, respectivamente. A concentração da proteína ECP encontrada em amostras de lavado nasal foi de 11,6 ng/mL (Benton *et al.*, 2010). Esta concentração é muito próxima da utilizada para testar a inibição da agregação plaquetária em PL.

A fim de verificar se o fator inibidor da agregação plaquetária presente nos eosinófilos ainda poderia estar relacionado às outras das quatro principais proteínas, partiu-se para a clonagem dessas proteínas em sistema eucarioto. Além disso, a clonagem das proteínas permite iniciar a produção de cDNAs mutantes para a proteínas de interesse, utilizando técnicas de biologia molecular, como a mutação sítio-dirigida, a fim de obter a expressão de variantes das proteínas. Desta forma, poderia-se identificar domínios essenciais para a atividade sobre a agregação plaquetária.

Selecionou-se alguns *primers* para dar início a amplificação do cDNAs das proteínas eosinofílicas e na análise por PCR e pode-se verificar que a amplificação do cDNA para a proteína MBP ocorreu de forma correta.

No caso da proteína EPO, a amplificação do cDNA não foi satisfatória. Isso pode ser devido ao fato da EPO ser a maior proteína presente nos grânulos dos eosinófilos e o fragmento esperado ser longo demais para uma reação simples de PCR. Nesta etapa optou-se por não dar continuidade à clonagem desta proteína, pois além das dificuldades encontradas, ela possui peso molecular superior a das outras principais proteínas do eosinófilo e a cromatografia em Sephadex G-75 já havia demonstrado que

o fator inibidor da agregação plaquetária se concentrou no último pico, demonstrando um peso molecular mais baixo, não correspondente com o tamanho da proteína EPO.

Como as proteínas ECP e EDN são altamente homólogas, com 37 dos 57 primeiros aminoácidos idênticos, utilizou-se três seqüências de *primers* para amplificar o fragmento de DNA correspondente, e apenas um deles foi utilizado nas reações subsequentes, pois as demais amplificaram muitos produtos inespecíficos.

Ao analisar-se por eletroforese em gel de agarose o RNA utilizado na obtenção do cDNA das proteínas de interesse, assim como o plasmídeo pcDNA3.1+, clivado ou não, pode-se confirmar a integridade dos materiais utilizados, assim como a correta amplificação do cDNA para as proteínas.

A Transformação foi realizada com sucesso e obteve-se o crescimento de várias colônias. Escolheu-se algumas amostras e as submeteram ao seqüenciamento a fim de identificar as proteínas obtidas nesta etapa (clonagem). O sequenciamento foi satisfatório e pode-se confirmar que os clones obtidos apresentam 91% de identidade com a proteína MBP e 97% de identidade com a proteína EDN.

Utilizou-se para a transfecção das proteínas as células U937. Ao testar a fração citosólica dessas células contendo o cDNA para as proteínas MBP e EDN pode-se observar que este tipo celular possui um discreto efeito de inibição da agregação plaquetária, bem como a proteína MBP, Já a proteína EDN, apresenta o efeito de inibição da agregação plaquetária significativa, quando comparado com as células U937 não transfectada. Este resultado sugere que as proteínas EDN e ECP devem compartilhar a mesma região responsável pela atividade de inibição da agregação plaquetária observada no presente estudo, já que essas proteínas são homólogas.

As proteínas MBP e EPO foram descritas como fortes agonistas plaquetários, induzindo a secreção de grânulos (Rohrbach *et al.*, 1990). No entanto, até o momento não há relatos na literatura da atividade antiagregante de alguma das proteínas granulares de eosinófilos. Estas proteínas foram classificadas como agonistas plaquetários com um mecanismo distinto de ativação. Ambas MBP e EPO provocam uma secreção dose-dependente de 5-HT plaquetário em suspensões de plaquetas mesmo na presença de 10 uM de indometacina. As proteínas EDN e ECP liberam baixas quantidades de 5-HT, e esta observação sugere que a liberação de 5-HT não é devido à propriedade altamente catiônica destas proteínas, já que as proteínas EDN e ECP possuem pI essencialmente idênticos (Rohrbach *et al.*, 1990).

Este trabalho em conjunto com os resultados reportados por outros autores destacam a contribuição de proteínas catiônicas dos eosinófilos na regulação da agregação plaquetária. Mais estudos são necessários para caracterizar os mecanismos de ação envolvidos nos efeitos observados e com isso ajudar no tratamento de indivíduos com eosinofilia, que apresentam uma clara evidência de alterações na hemostase.

12. CONCLUSÃO

Em conclusão, este trabalho descreve uma atividade inibitória do eosinófilo na agregação plaquetária humana *in vitro*. Os resultados apresentados mostram uma nova evidência da relação entre eosinófilos e plaquetas. Além disso, também foi demonstrado que uma das proteínas do eosinófilo, a ECP, pode ser potencialmente responsável pelo efeito de inibição da agregação plaquetária observados em indivíduos com doenças associadas à eosinofilia. Novas investigações ainda são necessárias para elucidar os mecanismos envolvidos na inibição da agregação plaquetária e se outras proteínas presentes nos eosinófilos também possam ter o mesmo tipo de atividade inibitória, como por exemplo, a proteína EDN, que é altamente homóloga à proteína ECP.

Os resultados apresentados são importantes para o esclarecimento da interação do eosinófilo com as plaquetas na inflamação.

13. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAMS, C. S. Intracellular signaling in platelets. **Curr Opin Hematol**, v. 12, n. 5, p. 401-5, Sep 2005. ISSN 1065-6251. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16093787> >.

ANDREWS, R. K.; BERNDT, M. C. Platelet physiology and thrombosis. **Thromb Res**, v. 114, n. 5-6, p. 447-53, 2004. ISSN 0049-3848. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15507277> >.

BENNETT, J. S. Novel platelet inhibitors. **Annu Rev Med**, v. 52, p. 161-84, 2001. ISSN 0066-4219. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11160773> >.

BENTON, A. S. et al. Airway platelet activation is associated with airway eosinophilic inflammation in asthma. **J Investig Med**, v. 58, n. 8, p. 987-90, Dec 2010. ISSN 1708-8267. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20930644> >.

BOIX, E. et al. Identification and characterization of human eosinophil cationic protein by an epitope-specific antibody. **J Leukoc Biol**, v. 69, n. 6, p. 1027-35, Jun 2001. ISSN 0741-5400. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11404391> >.

BROOS, K. et al. Blood platelet biochemistry. **Thromb Res**, v. 129, n. 3, p. 245-9, Mar 2012. ISSN 1879-2472. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22119499> >.

CIMMINO, G.; GOLINO, P. Platelet biology and receptor pathways. **J Cardiovasc Transl Res**, v. 6, n. 3, p. 299-309, Jun 2013. ISSN 1937-5395. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23307175> >.

FISCHKOFF, S. A. Graded increase in probability of eosinophilic differentiation of HL-60 promyelocytic leukemia cells induced by culture under alkaline conditions. **Leuk Res**, v. 12, n. 8, p. 679-86, 1988. ISSN 0145-2126. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3184985> >.

FITZGERALD, D. J. Vascular biology of thrombosis: the role of platelet-vessel wall adhesion. **Neurology**, v. 57, n. 5 Suppl 2, p. S1-4, 2001. ISSN 0028-3878. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11552046> >.

FUSE, I. Disorders of platelet function. **Crit Rev Oncol Hematol**, v. 22, n. 1, p. 1-25, Jan 1996. ISSN 1040-8428. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8672250> >.

GACHET, C. Regulation of platelet functions by P2 receptors. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, v. 46, p. 277-300, 2006. ISSN 0362-1642. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16402906> >.

GIEMBYCZ, M. A.; LINDSAY, M. A. Pharmacology of the eosinophil. **Pharmacol Rev**, v. 51, n. 2, p. 213-340, Jun 1999. ISSN 0031-6997. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10353986> >.

GNATENKO, D. V.; PERROTTA, P. L.; BAHOU, W. F. Proteomic approaches to dissect platelet function: Half the story. **Blood**, v. 108, n. 13, p. 3983-91, Dec 2006. ISSN 0006-4971. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16926286> >.

GOGGS, R.; POOLE, A. W. Platelet signaling-a primer. **J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)**, v. 22, n. 1, p. 5-29, Feb 2012. ISSN 1476-4431. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22316389> >.

HARRISON, P.; CRAMER, E. M. Platelet alpha-granules. **Blood Rev**, v. 7, n. 1, p. 52-62, Mar 1993. ISSN 0268-960X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8467233> >.

HASLAM, R. J.; DAVIDSON, M. M.; DESJARDINS, J. V. Inhibition of adenylate cyclase by adenosine analogues in preparations of broken and intact human platelets. Evidence for the unidirectional control of platelet function by cyclic AMP. **Biochem J**, v. 176, n. 1, p. 83-95, Oct 1978. ISSN 0264-6021. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/215136> >.

HASTIE, A. T. et al. The effect of purified human eosinophil major basic protein on mammalian ciliary activity. **Am Rev Respir Dis**, v. 135, n. 4, p. 848-53., 1987a.

_____. The effect of purified human eosinophil major basic protein on mammalian ciliary activity. **Am Rev Respir Dis**, v. 135, n. 4, p. 848-53, Apr 1987b. ISSN 0003-0805. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2952033> >.

HATHIRAT, P. et al. Immunoglobulins in acquired platelet dysfunction with eosinophilia. **Southeast Asian J Trop Med Public Health**, v. 24 Suppl 1, p. 206-9, 1993. ISSN 0125-1562. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7886575> >.

HOGAN, S. P. et al. Eosinophils: biological properties and role in health and disease. **Clin Exp Allergy**, v. 38, n. 5, p. 709-50, May 2008. ISSN 1365-2222. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18384431> >.

HOLMSEN, H.; WEISS, H. J. Secretable storage pools in platelets. **Annu Rev Med**, v. 30, p. 119-34, 1979. ISSN 0066-4219. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/233610> >.

HUANG, H. S.; CHANG, H. H. Platelets in inflammation and immune modulations: functions beyond hemostasis. **Arch Immunol Ther Exp (Warsz)**, v. 60, n. 6, p. 443-51,

Dec 2012. ISSN 1661-4917. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22940877> >.

ISHII, S.; NAGASE, T.; SHIMIZU, T. Platelet-activating factor receptor. **Prostaglandins Other Lipid Mediat**, v. 68-69, p. 599-609, Aug 2002. ISSN 1098-8823. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12432946> >.

JUNQUEIRA, L. C. U. A.; CARNEIRO, J.; KELLEY, R. O. **Basic histology**. 9th. Stamford, Conn.: Appleton & Lange, 1998. x, 494 p. ISBN 9780838505908 0838505902.

JURK, K.; KEHREL, B. E. Platelets: physiology and biochemistry. **Semin Thromb Hemost**, v. 31, n. 4, p. 381-92, 2005. ISSN 0094-6176. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16149014> >.

KAUSKOT, A.; HOYLAERTS, M. F. Platelet receptors. **Handb Exp Pharmacol**, n. 210, p. 23-57, 2012. ISSN 0171-2004. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22918726> >.

KING, S. M.; REED, G. L. Development of platelet secretory granules. **Semin Cell Dev Biol**, v. 13, n. 4, p. 293-302, Aug 2002. ISSN 1084-9521. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12243729> >.

KITA, H. Eosinophils: multifaceted biological properties and roles in health and disease. **Immunol Rev**, v. 242, n. 1, p. 161-77, Jul 2011. ISSN 1600-065X. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21682744> >.

KLINGER, M. H. Platelets and inflammation. **Anat Embryol (Berl)**, v. 196, n. 1, p. 1-11, Jul 1997. ISSN 0340-2061. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9242884> >.

LAMPINEN, M. et al. Cytokine-regulated accumulation of eosinophils in inflammatory disease. **Allergy**, v. 59, n. 8, p. 793-805, Aug 2004. ISSN 0105-4538. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15230810> >.

LAOSOMBAT, V. et al. Acquired platelet dysfunction with eosinophilia in children in the south of Thailand. **Platelets**, v. 12, n. 1, p. 5-14, Feb 2001. ISSN 0953-7104. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11281630> >.

LEE, A. C. Unusual hematologic disease affecting Caucasian children traveling to Southeast Asia: acquired platelet dysfunction with eosinophilia. **Hematol Rep**, v. 4, n. 1, p. e5, Jan 2012. ISSN 2038-8330. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22567219> >.

LI, Z. et al. Signaling during platelet adhesion and activation. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 30, n. 12, p. 2341-9, Dec 2010. ISSN 1524-4636. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21071698> >.

LIASKOU, E.; WILSON, D. V.; OO, Y. H. Innate immune cells in liver inflammation. **Mediators Inflamm**, v. 2012, p. 949157, 2012. ISSN 1466-1861. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22933833> >.

LIM, S. H. et al. Acquired platelet dysfunction with eosinophilia: review of seven adult cases. **J Clin Pathol**, v. 42, n. 9, p. 950-2, Sep 1989. ISSN 0021-9746. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2794084> >.

LIU, L. R.; XIA, S. H. Role of platelet-activating factor in the pathogenesis of acute pancreatitis. **World J Gastroenterol**, v. 12, n. 4, p. 539-45, Jan 2006. ISSN 1007-9327. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16489665> >.

LOPEZ, J. A.; NEWBURGER, P. E.; CONDINO-NETO, A. The effect of IFN-gamma and TNF-alpha on the eosinophilic differentiation and NADPH oxidase activation of human HL-60 clone 15 cells. **J Interferon Cytokine Res**, v. 23, n. 12, p. 737-44, Dec 2003. ISSN 1079-9907. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14769150> >.

MALIK, A.; BATRA, J. K. Antimicrobial activity of human eosinophil granule proteins: involvement in host defence against pathogens. **Crit Rev Microbiol**, v. 38, n. 2, p. 168-81, May 2012. ISSN 1549-7828. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22239733> >.

MAUGERI, N. et al. Transcellular metabolism of arachidonic acid: increased platelet thromboxane generation in the presence of activated polymorphonuclear leukocytes. **Blood**, v. 80, n. 2, p. 447-51, Jul 1992. ISSN 0006-4971. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1627802> >.

MCCALL, T. B. et al. Synthesis of nitric oxide from L-arginine by neutrophils. Release and interaction with superoxide anion. **Biochem J**, v. 261, n. 1, p. 293-6, Jul 1989. ISSN 0264-6021. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2549965> >.

MCNICOL, A.; ISRAELS, S. J. Platelet dense granules: structure, function and implications for haemostasis. **Thromb Res**, v. 95, n. 1, p. 1-18, Jul 1999. ISSN 0049-3848. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10403682> >.

MINNICOZZI, M.; SAWYER, R. T.; FENTON, M. J. Innate immunity in allergic disease. **Immunol Rev**, v. 242, n. 1, p. 106-27, Jul 2011. ISSN 1600-065X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21682741> >.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, Dec 1983. ISSN 0022-1759. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6606682> >.

MUNITZ, A.; LEVI-SCHAFFER, F. Eosinophils: 'new' roles for 'old' cells. **Allergy**, v. 59, n. 3, p. 268-75, Mar 2004. ISSN 0105-4538. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14982507> >.

MUNIZ, V. S.; WELLER, P. F.; NEVES, J. S. Eosinophil crystalloid granules: structure, function, and beyond. **J Leukoc Biol**, v. 92, n. 2, p. 281-8, Aug 2012. ISSN 1938-3673. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22672875> >.

NGUYEN, A.; PACKHAM, M. A.; RAND, M. L. Effects of ethanol on platelet responses associated with adhesion to collagen. **Thromb Res**, v. 95, n. 6, p. 303-14, Sep 1999. ISSN 0049-3848. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10527408> >.

NURDEN, A. T. Qualitative disorders of platelets and megakaryocytes. **J Thromb Haemost**, v. 3, n. 8, p. 1773-82, Aug 2005. ISSN 1538-7933. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16102044> >.

OFOFU, F. A. The blood platelet as a model for regulating blood coagulation on cell surfaces and its consequences. **Biochemistry (Mosc)**, v. 67, n. 1, p. 47-55, Jan 2002. ISSN 0006-2979. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11841339> >.

PELAGALLI, A. et al. Species variability in platelet aggregation response to different agonists. **J Comp Pathol**, v. 127, n. 2-3, p. 126-32, 2002 Aug-Oct 2002. ISSN 0021-9975. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12354523> >.

PERSSON, T. et al. Bactericidal activity of human eosinophilic granulocytes against Escherichia coli. **Infect Immun**, v. 69, n. 6, p. 3591-6, Jun 2001. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11349018> >.

PETERSON, C. G.; JÖRNVALL, H.; VENGE, P. Purification and characterization of eosinophil cationic protein from normal human eosinophils. **Eur J Haematol**, v. 40, n. 5, p. 415-23, May 1988. ISSN 0902-4441. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3132400> >.

PITCHFORD, S. C. Defining a role for platelets in allergic inflammation. **Biochem Soc Trans**, v. 35, n. Pt 5, p. 1104-8, Nov 2007. ISSN 0300-5127. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17956289> >.

PRESCOTT, S. M.; MCINTYRE, T. M.; ZIMMERMAN, G. A. The role of platelet-activating factor in endothelial cells. **Thromb Haemost**, v. 64, n. 1, p. 99-103, Aug 1990. ISSN 0340-6245. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2274933> >.

RIMELE, T. J. et al. Interaction of neutrophils with vascular smooth muscle: identification of a neutrophil-derived relaxing factor. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 245, n. 1, p. 102-11, Apr 1988. ISSN 0022-3565. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3129547> >.

ROHRBACH, M. S. et al. Activation of platelets by eosinophil granule proteins. **J Exp Med**, v. 172, n. 4, p. 1271-4, Oct 1990. ISSN 0022-1007. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2212954> >.

ROSENBERG, H. F.; TENEN, D. G.; ACKERMAN, S. J. Molecular cloning of the human eosinophil-derived neurotoxin: a member of the ribonuclease gene family. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 86, n. 12, p. 4460-4, Jun 1989. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2734298> >.

ROSENBERG, H. F.; TIFFANY, H. L. Characterization of the eosinophil granule proteins recognized by the activation-specific antibody EG2. **J Leukoc Biol**, v. 56, n. 4, p. 502-6, Oct 1994. ISSN 0741-5400. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7930947> >.

ROTHENBERG, M. E. Eosinophilia. **N Engl J Med**, v. 338, n. 22, p. 1592-600, May 1998. ISSN 0028-4793. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9603798> >.

ROTHENBERG, M. E.; HOGAN, S. P. The eosinophil. **Annu Rev Immunol**, v. 24, p. 147-74, 2006. ISSN 0732-0582. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16551246> >.

RUGGERI, Z. M.; MENDOLICCHIO, G. L. Adhesion mechanisms in platelet function. **Circ Res**, v. 100, n. 12, p. 1673-85, Jun 2007. ISSN 1524-4571. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17585075> >.

RUIZ-SÁEZ, A. et al. Platelet dysfunction-eosinophilia syndrome in parasitized Venezuelan children. **Am J Trop Med Hyg**, v. 73, n. 2, p. 381-5, Aug 2005. ISSN 0002-9637. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16103609> >.

SALVEMINI, D. et al. Human neutrophils and mononuclear cells inhibit platelet aggregation by releasing a nitric oxide-like factor. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 86, n. 16, p. 6328-32, Aug 1989. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2548208> >.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular cloning : a laboratory manual**. 3rd. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. ISBN 9780879695767 (cloth)
0879695765 (cloth)
9780879695774 (paper)
0879695773 (paper).

SCHATTNER, M. A. et al. Platelet aggregation inhibition by mononuclear leukocytes. **Thromb Res**, v. 73, n. 3-4, p. 205-14, Feb 1994. ISSN 0049-3848. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7514819> >.

_____. Inhibition of human platelet activation by polymorphonuclear leukocytes. **Br J Pharmacol**, v. 101, n. 2, p. 253-6, Oct 1990. ISSN 0007-1188. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2257433> >.

SHATTIL, S. J.; KASHIWAGI, H.; PAMPORI, N. Integrin signaling: the platelet paradigm. **Blood**, v. 91, n. 8, p. 2645-57, Apr 1998. ISSN 0006-4971. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9531572> >.

STALKER, T. J. et al. Platelet signaling. **Handb Exp Pharmacol**, n. 210, p. 59-85, 2012. ISSN 0171-2004. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22918727> >.

STRUKOVA, S. Blood coagulation-dependent inflammation. Coagulation-dependent inflammation and inflammation-dependent thrombosis. **Front Biosci**, v. 11, p. 59-80, 2006. ISSN 1093-4715. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16146714> >.

SYMON, F. A. et al. Eosinophil adhesion to nasal polyp endothelium is P-selectin-dependent. **J Exp Med**, v. 180, n. 1, p. 371-6, Jul 1994. ISSN 0022-1007. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7516413> >.

TAKAI, Y.; KAWADA, K.; KOHRIYAMA, K. [Abnormalities of coagulation, fibrinolysis and kallikrein-kinin system in 2 cases with remarkable eosinophilia]. **Rinsho Ketsueki**, v. 33, n. 3, p. 288-96, Mar 1992. ISSN 0485-1439. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1578631> >.

TEFFERI, A.; PATNAIK, M. M.; PARDANANI, A. Eosinophilia: secondary, clonal and idiopathic. **Br J Haematol**, v. 133, n. 5, p. 468-92, Jun 2006. ISSN 0007-1048. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16681635> >.

THON, J. N.; ITALIANO, J. E. Platelets: production, morphology and ultrastructure. **Handb Exp Pharmacol**, n. 210, p. 3-22, 2012. ISSN 0171-2004. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22918725> >.

TIFFANY, H. L.; HANDEN, J. S.; ROSENBERG, H. F. Enhanced expression of the eosinophil-derived neurotoxin ribonuclease (RNS2) gene requires interaction between the promoter and intron. **J Biol Chem**, v. 271, n. 21, p. 12387-93, May 1996. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8647842> >.

TINCANI, A. et al. Inflammatory molecules: a target for treatment of systemic autoimmune diseases. **Autoimmun Rev**, v. 7, n. 1, p. 1-7, Nov 2007. ISSN 1568-9972. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17967717> >.

VADAS, M. A. et al. A new method for the purification of human eosinophils and neutrophils, and a comparison of the ability of these cells to damage schistosomula of *Schistosoma mansoni*. **J Immunol**, v. 122, n. 4, p. 1228-36, Apr 1979. ISSN 0022-1767. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/448088> >.

VAN DIJK, T. B. et al. The role of transcription factor PU.1 in the activity of the intronic enhancer of the eosinophil-derived neurotoxin (RNS2) gene. **Blood**, v. 91, n. 6, p. 2126-32, Mar 1998. ISSN 0006-4971. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9490699> >.

VENGE, P. et al. Eosinophil cationic protein (ECP): molecular and biological properties and the use of ECP as a marker of eosinophil activation in disease. **Clin Exp Allergy**, v. 29, n. 9, p. 1172-86, Sep 1999. ISSN 0954-7894. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10469025> >.

VU, T. K. et al. Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation. **Cell**, v. 64, n. 6, p. 1057-68, Mar 1991. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1672265> >.

WAGNER, L. A. et al. Human eosinophil major basic protein 2: location of disulfide bonds and free sulfhydryl groups. **Protein J**, v. 26, n. 1, p. 13-8, Jan 2007. ISSN 1572-3887. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17136616> >.

WALLIS, J. P. Nitric oxide and blood: a review. **Transfus Med**, v. 15, n. 1, p. 1-11, Feb 2005. ISSN 0958-7578. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15713123> >.

WASSOM, D. L. et al. Elevated serum levels of the eosinophil granule major basic protein in patients with eosinophilia. **J Clin Invest**, v. 67, n. 3, p. 651-61, Mar 1981. ISSN 0021-9738. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7204553> >.

WEIN, M. et al. Comparison of human eosinophil and neutrophil ligands for P-selectin: ligands for P-selectin differ from those for E-selectin. **Am J Respir Cell Mol Biol**, v. 12, n. 3, p. 315-9, Mar 1995. ISSN 1044-1549. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7532979> >.

WOULFE, D. S. Platelet G protein-coupled receptors in hemostasis and thrombosis. **J Thromb Haemost**, v. 3, n. 10, p. 2193-200, Oct 2005. ISSN 1538-7933. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16194198> >.

XIA, Y. et al. Thrombopoietin and the TPO receptor during platelet storage. **Transfusion**, v. 40, n. 8, p. 976-87, Aug 2000. ISSN 0041-1132. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10960526> >.

ZAGAI, U. et al. The effect of eosinophils on collagen gel contraction and implications for tissue remodelling. **Clin Exp Immunol**, v. 135, n. 3, p. 427-33, Mar 2004. ISSN 0009-9104. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15008974> >.

ZAHEDI, R. P. et al. Phosphoproteomics of human platelets: A quest for novel activation pathways. **Biochim Biophys Acta**, v. 1764, n. 12, p. 1963-76, Dec 2006. ISSN 0006-3002. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17049321> >.

ZATTA, A. et al. Inhibition of platelet function by polymorphonuclear leukocytes. **J Lab Clin Med**, v. 116, n. 5, p. 651-60, Nov 1990. ISSN 0022-2143. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2146349>>.