



**Catarina Alexandra  
da Silva Maia**

**A presença de eosinofilia reativa após  
transplantação hepática pediátrica e a sua relevância  
no processo de disfunção do enxerto**

**The presence of eosinophilia after pediatric liver  
transplantation and its relevance to graft dysfunction  
process**





**Catarina Alexandra  
da Silva Maia**

**A presença de eosinofilia reativa após  
transplantação hepática pediátrica e a sua  
relevância nos processos de disfunção do enxerto**

**The presence of eosinophilia after pediatric liver  
transplantation and its relevance to graft  
dysfunction process**

Tese apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica com especialização em Bioquímica Clínica, realizada sob a orientação científica do Professor Doutor Artur Augusto Paiva, Coordenador da Unidade de Gestão Operacional de Citometria do Serviço de Patologia Clínica do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, e da Professora Doutora Maria do Rosário Gonçalves dos Reis Marques Domingues, Professora Associada com agregação ao Departamento de Química da Universidade de Aveiro.

**Apoio institucional:**





Dedico este trabalho aos meus Pais e aos meus Avós Carminda e Manuel.



## **O júri**

Presidente

Prof. Doutor Pedro Miguel Dimas Neves Domingues  
Professor Auxiliar no Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Prof. Doutor Artur Augusto Paiva  
Coordenador da Unidade de Gestão Operacional de Citometria do Serviço de Patologia Clínica do Centro Hospitalar de Coimbra e Professor Adjunto Equiparado da Escola Superior de Saúde de Coimbra

Prof. Doutora Maria Teresa Teixeira Cruz Rosete  
Professora Auxiliar da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra





## Agradecimentos

Em primeiro lugar, quero agradecer ao meu orientador, Dr. Artur Paiva, pelos conhecimentos transmitidos e pela oportunidade que me deu de realizar o meu estágio e dissertação de Mestrado no seu laboratório. Muito obrigada à Professora Rosário Domingues por toda a atenção, compreensão e carinho que me deu durante esta etapa e por estar sempre disponível a ajudar-me.

Agradeço ao Serviço de Hepatologia do Hospital Pediátrico do CHUC, principalmente à Dr.<sup>a</sup> Isabel Gonçalves, por fornecerem as amostras analisadas neste estudo.

O meu sincero agradecimento à equipa da UGOC (Isabel Silva, Susana Pedreiro, Dr.<sup>a</sup> Manuela Fortuna, Susana Santos, Sandra Silva, Anabela Carvalho e Dr. Rui) por estarem sempre disponíveis a ajudar no trabalho prático e por todos os conhecimentos técnicos fornecidos.

Muito obrigada à Dr.<sup>a</sup> Adriana Roque pela ajuda na recolha de dados clínicos e pelos conhecimentos que me transmitiu.

Obrigada à Ana, à Cátia e à Sofia por todos os momentos partilhados, por estarem sempre dispostas a ajudar-me e por todo o apoio durante esta etapa, sem vocês este percurso não teria sido o mesmo!

Obrigada aos amigos de Coimbra, sobretudo à Ana Sofia, à Ana Carolina, à Marina, à Andreia, à Helena, à Patrícia, ao João, ao Davide, ao Artur e aos meus padrinhos Heloísa, Pedro, Teresa, Rui e Filipe Chichorro por acreditarem sempre em mim e por me incentivarem a nunca desistir dos meus objetivos, levo-vos comigo p'rá vida!

Obrigada aos amigos do Porto, principalmente às melhores amigas de sempre, Isabel, Catarina e Rita por sempre acreditarem em mim e nas minhas capacidades e por todo o apoio durante esta etapa!

Por fim, o agradecimento mais importante e especial, à minha família, à minha Mãe, ao meu Pai e aos meus Avós Carminda e Manuel. Obrigada por acreditarem sempre em mim, pelo apoio incondicional, por me incentivarem a lutar pelos meus sonhos e a ser cada vez mais e melhor, por me ensinarem que o céu é o limite e que o meu futuro está nas minhas mãos. Só o vosso amor, força e carinho é que me permite superar todos os obstáculos e alcançar as minhas metas.

*“Foi o tempo que dedicaste à tua rosa que fez a tua rosa tão importante.”*

*Príncipezinho, Antoine de Saint- Exupéry.*



## Palavras-chave

Eosinófilos; citocinas; eosinofilia reativa; transplantação hepática pediátrica; disfunção do enxerto hepático.

## Resumo

Nas últimas décadas, vários estudos têm mostrado que um elevado número de eosinófilos no sangue periférico ( $> 500$  células/ $\mu\text{L}$  ou 10% do total de leucócitos) pode ser um sinal de rejeição celular aguda, particularmente no primeiro mês após transplantação. Especialmente em crianças, a aquisição de eosinofilia persistente e de diferentes patologias de cariz alérgico, pode estar associado com a disfunção crónica do enxerto hepático. Contudo, a etiologia desta eosinofilia periférica reativa e a sua influência no processo de disfunção do enxerto hepático permanecem pouco claras.

Neste trabalho, avaliou-se se a presença de eosinofilia induzia alterações fenotípicas e funcionais nos basófilos; nas subpopulações de monócitos (clássicos, intermédios, não-clássicos e uma população de monócitos clássicos que expressa o recetor de alta-afinidade da IgE); nas células dendríticas plasmacitóides (pDC) e mieloides (mDC); nas subpopulações de células B (imaturas/transicionais, *naïve*, células memória ou plasmoblastos IgA+, IgG ou IgM+); nas células T (Th7c1, Th/c17, Th9, Th produtoras de IL-6 e T- $\gamma\delta$ ) e nas células NK (CD56<sup>bright</sup> e CD56<sup>dim</sup>) do sangue periférico.

Estudaram-se 35 crianças (16 do sexo feminino e 19 do sexo masculino) sem eosinofilia (TRH S/ Eosinofilia) e 17 crianças (8 do sexo feminino e 9 do sexo masculino) com eosinofilia (TRH C/ Eosinofilia), cujas médias de idades eram  $9,9 \pm 5,6$  e  $8,2 \pm 4,7$ , respetivamente.

A expressão dos recetores CD123, CD33, CD15, CD16, CD14, HLA-DR e IgE ligada ao seu receptor de alta afinidade, nos monócitos, neutrófilos, basófilos, eosinófilos e células dendríticas do sangue periférico, bem como a caracterização das diferentes populações de células B, foi efetuada por citometria de fluxo. A quantificação das subpopulações funcionais de células T, nomeadamente, Th/c17, Th/c1, Th9 e células T IL-6+, foi efetuada por citometria de fluxo, após ativação, *in vitro*, com PMA e ionomicina.

No grupo com eosinofilia, foi observado um aumento estatisticamente significativo na expressão de CD123 em eosinófilos; da IgE ligada ao seu recetor de alta-afinidade em basófilos, pDC, mDC e na subpopulação de monócitos clássicos IgE+; da expressão de CD16 em neutrófilos e da expressão de HLA-DR na subpopulação de monócitos clássicos CD15+. Relativamente às populações de células B, verificou-se um aumento da frequência de plasmoblastos, e destes dos que expressavam IgA e de células memória CD27+/IgA+. Nas diferentes subpopulações de células T não foram observadas diferenças estatisticamente significativas. No entanto, observou-se uma tendência forte para um aumento da percentagem de células Th17 no grupo de doentes com eosinofilia.

Assim, os nossos resultados apontam para uma eosinofilia reativa mediada por IgE, que parece estar a induzir uma ativação dos eosinófilos, neutrófilos e subpopulação de monócitos clássicos. Como esperado, detetaram-se alterações nos compartimentos de células B, parecendo ocorrer um aumento destas células a expressar IgA e uma tendência para um aumento das células Th17 no grupo TRH C/Eosinofilia.



## Keywords

Eosinophils; cytokines; reactive eosinophilia; pediatric liver transplantation; liver allograft dysfunction.

## Abstract

In recent decades, several studies have reported that a higher eosinophil count (>500 cells/ $\mu$ L or 10% of total of leucocytes) can be a sign of acute cellular rejection, particularly in the first month after liver transplantation. Specifically in children, the acquisition of persistent eosinophilia and different pathologies of allergic nature, might be associated with chronic liver graft dysfunction. However, the etiology of peripheral reactive eosinophilia, after pediatric liver transplantation, and their consequences on the liver graft dysfunction remain unclear.

In this work we evaluated if the presence of eosinophilia induced phenotypic and functional alterations on peripheral blood basophils; monocyte subpopulations (classical, intermediate, non-classical and high affinity IgE receptor+ classical monocytes); plasmacytoid (pDC) and myeloid dendritic cells (mDC); B cell subpopulations (immature/transitional, naïve, IgA+, IgG+ or IgM+ memory (CD27+ and CD27-) or plasmablasts, T cells (Th/c1; Th/c 17; Th9; Th producing IL-6 and T- $\gamma\delta$ ) and NK cells (CD56<sup>bright</sup> and CD56<sup>dim</sup>).

With that purpose we studied 35 children (16 females and 19 males) without peripheral eosinophilia (TRH S/ Eosinophilia) and 17 children (8 females and 9 males) with eosinophilia (TRH C/Eosinophilia) at time of blood collection, whose average age were  $9.9 \pm 5.6$  and  $8.2 \pm 4.7$  respectively.

The expression of CD123, CD33, CD15, CD16, CD14, HLA-DR and IgE bounded to its high-affinity receptor on peripheral blood monocytes, basophils, neutrophils, eosinophils and dendritic cells, as well as, the characterization of the different B cell compartments, was performed by flow cytometry. The quantification of the functional T cell subpopulations, namely Th/c17, Th/c1, Th9 and IL-6+ T cells were also done by flow cytometry, after *in vitro* activation with PMA/ionomycin.

We observed, in the eosinophilia group, a statistical significant increase on the expression of CD123 on eosinophils; IgE bounded to its receptor on basophils, pDC, and mDC and on a small subpopulation IgE+ on classical monocytes, on the expression of CD16 on neutrophils and on the expression of HLA-DR on CD15+ classical monocyte subpopulation.

Concerning B Cells populations, a significant increase in the total plasmablasts, plasmablasts that express IgA and CD27+ memory cells that express IgA was found in the eosinophilia group. No statistical differences were observed among the different T cell subsets. However, we observed a strong tendency for a higher frequency of Th17 cells, in the eosinophilia group.

Our results point to an IgE-mediated eosinophilia, since a significant increase of IgE bounded to its receptor was observed in all leucocytes that express Fc $\epsilon$ RI, which, somehow, seem to induce a higher degree of activation on eosinophils, neutrophils and classical monocytes subpopulations. As expected, some changes were detected in B cell compartments, particularly an increase of B cells expressing IgA and a tendency to an increase of Th17 cells in TRH C/Eosinophilia group.



# Índice

---





## Índice de Conteúdos

|   |           |
|---|-----------|
| Abreviaturas .....  | XIII      |
| <b>1-Transplantação Hepática Pediátrica .....</b>   | <b>3</b>  |
| 1.1. Imunologia da transplantação.....  | 3         |
| 1.1.1. Fisiopatologia da disfunção e consequente rejeição do enxerto hepático.....  | 3         |
| 1.1.2. Terapia imunossupressora após transplante .....  | 7         |
| <b>2 – Eosinofilia reativa após transplantação hepática pediátrica .....</b>  | <b>10</b> |
| 2.1. Breve introdução ao Eosinófilo .....   | 10        |
| 2.2. Eosinofilia.....   | 11        |
| 2.2.1. Classificação das Eosinoflias pela OMS .....   | 11        |
| 2.2.2. Principais causas de eosinofilia reativa .....   | 12        |
| 2.3. Mecanismos responsáveis pelo recrutamento e expansão eosinofílica .....  | 13        |
| 2.3.1. Outras subpopulações envolvidas no recrutamento de eosinófilos .....   | 18        |
| 2.4. Eosinofilia em doentes pediátricos submetidos a transplante hepático.....  | 19        |
| <b>3 – Impacto da eosinofilia periférica no processo inflamatório associado à disfunção do enxerto hepático.....</b>  | <b>20</b> |
| 3.1. Papel imunoregulatório e inflamatório do eosinófilo .....  | 21        |
| <b>4- Objetivos: .....</b>  | <b>29</b> |
| <b>5 - Materiais e Métodos:.....</b>  | <b>33</b> |
| 5.1. População em estudo .....  | 33        |
| 5.2. Recolha de dados clínicos e bioquímicos .....  | 33        |
| 5.3. Quantificação das várias populações leucocitárias e a sua caracterização fenotípica.....   | 35        |
| 5.4. Identificação e quantificação das várias subpopulações de Células B em circulação: Imaturas ou Transicionais, B <i>naïve</i> , B memória e Plasmoblasto .....          | 39        |
| 5.5. Quantificação de subpopulações de Células T funcionais e avaliação da produção das citocinas IL-17, IL-9, IL-2, IL-6; TNF $\alpha$ e IFN $\gamma$ .....                | 40        |
| 5.6. Aquisição e análise por citometria de fluxo .....  | 42        |
| 5.7. Análise Estatística .....  | 42        |
| <b>6 – Resultados .....</b>   | <b>47</b> |
| 6.1. Populações leucocitárias estudadas (eosinófilos, basófilos, neutrófilos, monócitos, pDC e mDC) e a sua caracterização fenotípica .....                                 | 47        |
| 6.1.1. Expressão dos vários marcadores membranares e do IgE ligado ao recetor membranar de alta-afinidade em Eosinófilos, Basófilos, Neutrófilos, Monócitos, pDC e mDC..... | 47        |
| 6.2. Subpopulações de Linfócitos B em circulação .....  | 52        |

|   |    |
|---|----|
| 6.2.1. Células B-memória e quantificação das células que expressam IgA, IgG e IgM ..... | 54 |
| 6.2.2. Plasmoblastos e quantificação das células que expressam IgA, IgG e IgM .....     | 56 |
| 6.3. Subpopulações de Linfócitos-T e Células NK.....                                    | 58 |
| 6.3.1. Percentagem das subpopulações de Células-T: Th/c 17 e Th/c1 .....                | 60 |
| 7 – Discussão .....   | 63 |
| 8 - Conclusão .....   | 79 |
| 9 - Bibliografia .....  | 83 |

## Índice de Figuras:

**Figura 1. Vias de reconhecimento do aloantígeno**, adaptado de [200]. **Legenda:** A- Via direta de reconhecimento, na qual as células T aloreativas do recetor se ligam diretamente às moléculas intactas do complexo Major de Histocompatibilidade (MHC) do dador, apresentadas por células apresentadoras de antígeno (APCs) do enxerto. B - Via indireta de reconhecimento, na qual as moléculas MHC do enxerto são fagocitadas, processadas e apresentadas pelas células APC do recetor às células T aloreativas do recetor..... 6

**Figura 2. Mecanismos de ação dos fármacos imunossupressores**, adaptado de [201]. **Legenda:** A proliferação de células-T dá-se após a apresentação do antígeno do dador, através de células apresentadoras de antígeno (APCs). Este fenómeno resulta na ativação da calcineurina, que conduz à produção de interleucina-2 (IL-2). A IL-2, por sua vez, estimula a proliferação de linfócitos T, através da via de transdução de sinal, que envolve a TOR (target of rapamycin) e a cinase-dependente- de Ciclina (Ciclina/CDK). Os agentes imunossupressores, representados nas caixas cor-de-rosa, têm como objetivo bloquear a proliferação de célula T, atuando em várias etapas desta via de transdução de sinal. AMF- Ácido micofenólico; AZA-Azatioprina; G1- 1<sup>a</sup>.fase do crescimento celular; S – síntese de ADN/replicação; G2- 2<sup>a</sup>.fase do crescimento celular; M- mitose/divisão celular..... 9

**Figura 3. Mecanismo de recrutamento de eosinófilos durante a homeostase no tecido gastrointestinal**, adaptado de [70]. **Legenda:** CEH (célula estaminal hematopoiética), PEO (progenitora eosinofílica); CLI 2 (célula linfóide inata do tipo 2 ativada), CCR3 (recetor de quimiocina 3), IL- Interleucina, VIP (neurohormone vasoactive intestinal peptide), VCAM-1 (molécula de adesão da célula vascular 1), MAdCAM1 (mucosal vascular addressin adhesion protein) e ICAM1 (intercellular adhesion sequence-binding protein)..... 15

**Figura 4. Via de recrutamento das células imunes após o contacto do organismo com um alérgeno**, adaptado de [93]. **Legenda:** B- célula-B; BAS- Basófilos; EOS – Eosinófilos; IL- Interleucina; LTs – Leucotrienos; PGs – prostaglandinas; MAST- Mastócitos; MHCII- Major Histocompatibility Complex Type II; mDC- célula dendrítica mieloide; pDC- célula dendrítica plasmacitóide; TCR- T- Cell Receptor; Th- células-T helper, T-reg – célula-T reguladora; TSLP- linfopoiética do estroma tímico..... 16

**Figura 5. Via de recrutamento das células imunes na EE**, adaptado de [70]. **Legenda:** PBM (proteína básica maior); PCE (proteína catiónica eosinofílica); NDE (neurotoxina derivada do eosinófilo); POE (peroxidase eosinofílica); DSG1 (desmogleína-1); POSTN (periostina); TGF (fator de crescimento de transformação); MAST (mastócito); CE (célula epitelial); CCL (ligando de quimiocina-CC); IL-Interleucina; TSLP (thymic stromal lymphopoietin); BAS (basófilo); Th (células-T helper); T-reg (célula-T reguladora); iNKT (invariante natural killer T- cell); DCs (células dendríticas); FBT (fibroblasto). ..... 18

**Figura 6. Mecanismo de ação dos eosinófilos infiltrados no enxerto hepático**, adaptado de [13]. **Legenda:** IL- Interleucina; TNF- $\alpha$  – Factor de necrose tumoral - $\alpha$ ; GM-CSF- fator estimulador de colónias de granulócitos e macrófagos; PDGEs- proteínas derivadas de grânulos eosinofílicos. .... 20

**Figura 7. Funções efetoras dos eosinófilos**, adaptado de [70]. **Legenda:** A ativação dos eosinófilos é mediada por uma vasta variedade de recetores membranares que respondem a diversos estímulos, incluindo citocinas, quimiocinas, lípidos bioativos e padrões moleculares associados a agentes patogénicos (PRRs). Após ativação, os eosinófilos promovem várias respostas imunológicas, tais como dano e remodelação tecidual, ativação de mastócitos, e imunorregulação de linfócitos (T e B) e células dendríticas (DCs). ..... 21

**Figura 8. Os eosinófilos modulam a função de outros leucócitos**, adaptado de [46]. **Legenda:** MHCII-complexo maior de histocompatibilidade, classe II; Th- células T helper, CCL- ligando de quimiocina-CC, APRIL- A- proliferation- inducing, IL- interleucina, NDE- neurotoxina derivada do eosinófilo, PBM- proteína básica maior, PCE- proteína catiónica eosinofílica, POE- peroxidase eosinofílica, NGF- nerve growth factor, MO- medula óssea. .... 25

**Figura 9. Esquema que ilustra as células da imunidade inata estudadas e as respectivas moléculas cuja expressão foi avaliada por citometria de fluxo.** **Legenda:** pDC- células dendríticas plasmacitóide, mDC- células dendríticas mieloides, CD- Cluster differentiation, HLA-DR – antígeno leucocitário humano-DR, IgE- imunoglobulina E e FcεRI – recetor de alta-afinidade da imunoglobulina E. .... 37

**Figura 10. Os vários dot plot bidimensionais que ilustram a determinação de algumas das populações leucocitárias estudadas, por citometria de fluxo.** (A). Identificação as populações leucocitárias basófilos, células dendríticas plasmacitóides (pDC) e células dendríticas mieloides (mDC) com base na expressão de CD123 e HLA-DR: a verde-claro os basófilos; a azul-ciano as pDC e rosa as mDC. (B). Identificação das populações leucocitárias que expressam o recetor FcεRI: a verde-claro os basófilos; a azul-ciano as pDC; a rosa as mDC e verde-escuro a população de monócitos clássicos IgE+. (C). Identificação da população de monócitos IgE+: a azul a população total de monócitos clássicos e a verde-escuro a população de monócitos clássicos IgE+. (D). Identificação das várias subpopulações de monócitos com base na expressão de CD16 e CD14. .... 38

**Figura 11. Esquema que ilustra as subpopulações de células B estudadas: B naïve, B imaturas/transicionais, B memória (CD27+, CD27-) totais e as células B memória que expressam IgA, IgG e IgM e plasmoblastos totais e plasmoblastos que expressam IgA, IgG e IgM, que foram analisadas por citometria de fluxo.** **Legenda:** CD- Cluster Differentition, Ig- imunoglobulina. .... 39

**Figura 12. Esquema que ilustra as subpopulações de células Te células NK estudadas: Th/c 1, Th/c17, Th9, Th produtoras de IL-6, Tγδ produtoras de TNF-α e IFNγ e células NK produtoras de TNF-α e IFNγ, que foram analisadas por citometria de fluxo.** **Legenda:** células NK- células natural killer, IL-interleucina, TNF-α – fator de necrose tumoral- alfa, e IFNγ – interferão gama. .... 41

**Figura 13. Identificação das populações linfocitárias:** (A) Th17 (representadas a azul) e Tc17 (representadas a preto) e (B) Th1 (representadas a azul) e Tc1 produtoras de TNF-α (representadas a preto). .... 42

**Figura 14. Gráfico da expressão de CD123 em eosinófilos, dada pela média de intensidade de fluorescência (MIF). Valor de significância estatística dado pelo p value, calculado através do Teste de Mann-Whitney, sendo considerado estatisticamente significativo quando o  $p < 0,05$ .** As linhas limite do box-plot representam o 1º quartil (25%) e o 3ºquartil (75%); a linha a meio representa a mediana e as linhas verticais correspondem ao intervalo de 95% de confiança. .... 50

**Figura 15. Gráfico da expressão de CD16 em neutrófilos, dado pela média de intensidade de fluorescência (MIF). Valor de significância estatística dado pelo p value, calculado através do Teste de Mann-Whitney, sendo considerado estatisticamente significativo quando o  $p < 0,05$**  As linhas limite do box-plot representam o 1º quartil (25%) e o 3ºquartil (75%); a linha a meio representa a mediana e as linhas verticais correspondem ao intervalo de 95% de confiança ..... 50

**Figura 16. Gráficos que representam o IgE ligado ao recetor membranar de alta-afinidade em basófilos (A), células dendríticas plasmacitóides (pDC) (B), células dendríticas mieloides (mDC) (C) e na subpopulação de monócitos clássicos IgE+ (D), dado pelo valor da média de intensidade de fluorescência (MIF). Valor de significância estatística dado pelo p value, calculado através do Teste de Mann-Whitney, sendo considerado estatisticamente significativo quando o  $p < 0,05$**  As

linhas limite do box-plot representam o 1º quartil (25%) e o 3ºquartil (75%); a linha a meio representa a mediana e as linhas verticais correspondem ao intervalo de 95% de confiança. .... 51

**Figura 17. Gráfico da expressão de HLA-DR nas populações de monócitos clássicos, dada pela média de intensidade de fluorescência (MIF).** (A). Gráfico da expressão de HLA-DR na população de monócitos CD15+. (B). Gráfico da expressão de HLA-DR na população de monócitos CD15- (próximo do valor estatisticamente significativo,  $p=0,055$ ). (C). Gráfico de expressão de HLA-DR na população de monócitos IgE+ (próximo do valor estatisticamente significativo ( $p=0,056$ )). Valor de significância estatística dado pelo p value, calculado através do **Teste de Mann-Whitney**, sendo considerado estatisticamente significativo quando o  $p < 0,05$  As linhas limite do box-plot representam o 1º quartil (25%) e o 3ºquartil (75%); a linha a meio representa a mediana e as linhas verticais correspondem ao intervalo de 95% de confiança. .... 52

**Figura 18.** Gráficos da percentagem (A) e valor absoluto (nº. de células/microlitro) (B) de Células B-memória (população total). ..... 54

**Figura 19.** Gráfico da percentagem de Células B-memória que expressam imunoglobulinas IgA, IgG e IgM. Contudo, no caso da percentagem de células-B memória produtoras de IgA, o valor está próximo da significância ( $p=0,061$ ). ..... 54

**Figura 20.** Gráficos das percentagens médias e valores absolutos das células B-memória CD 27+ (A e B) e CD27- (C e D). ..... 55

**Figura 21.** Gráficos das percentagens de Células B-memória CD27+ que expressam as imunoglobulinas IgA, IgG e IgM (A) e de Células CD27- que expressam imunoglobulinas IgA e IgG (B). Valor de significância estatística dado pelo p value, calculado através do **Teste de Mann-Whitney**, sendo considerado estatisticamente significativo quando o  $p < 0,05$ . Em nenhum dos casos se verificou significância estatística ( $p < 0,05$ ). Contudo, no caso da percentagem de células CD27+ produtoras de IgA, o valor está próximo da significância ( $p=0,071$ ). ..... 56

**Figura 22.** Gráficos da percentagem (A) e do valor absoluto (nº. de células/microlitro) de plasmoblastos (B). Valor de significância estatística dado pelo p value, calculado através do **Teste de Mann-Whitney**, sendo considerado estatisticamente significativo quando o  $p < 0,05$ . As linhas limite do box-plot representam o 1º quartil (25%) e o 3ºquartil (75%); a linha a meio representa a mediana e as linhas verticais correspondem ao intervalo de 95% de confiança. .... 57

**Figura 23.** Gráfico da percentagem de plasmoblastos que expressam imunoglobulinas IgA, IgG e IgM. Valor de significância estatística dado pelo p value, calculado através do **Teste de Mann-Whitney**, sendo considerado estatisticamente significativo quando o  $p < 0,05$ . ..... 57

**Figura 24.** Gráfico que representa as percentagens das diferentes populações de Células T. Valor de significância estatística dado pelo p value, calculado através do **Teste de Mann-Whitney**, sendo considerado estatisticamente significativo quando o  $p < 0,05$ . Em nenhum dos casos se verificou significância estatística ( $p < 0,05$ ). ..... 58

**Figura 25.** Gráfico que representa as percentagens das células Th17 e Tc17. Em nenhum dos casos se verificou significância estatística ( $p < 0,05$ ). Contudo, no caso das Th17 o valor está muito próximo da significância ( $p=0,05$ ). ..... 60

**Figura 26.** Gráfico que representa as percentagens das células Th1 e Tc1. Em nenhum dos casos se verificou significância estatística ( $p < 0,05$ ). ..... 60

**Figura 27. Papel do recetor FcεRI em Células dendríticas (DCs) e monócitos que ligam IgE, adaptado de [188]. Legenda: (A). Vias de sinalização pro-inflamatória ou anti-inflamatória.** O recetor FcεRI transmite a sinalização intracelular após ligação cruzada do IgE com o antigénio, que resulta na produção de citocinas e quimiocinas com potencial pro- e anti-inflamatório. A

ligação cruzada do IgE ligado ao antígeno ao seu recetor promove a internalização deste complexo para os lisossomas intracelulares, onde os antígenos são processados e depois expostos através de moléculas MHC II na membrana celular para serem apresentados a células T CD4+ naïve. O resultado funcional desta apresentação ainda é pouco clara, no entanto, considera-se o desenvolvimento de células Th2 efectoras. **(B). Tolerância imunitária por deleção de células-T CD4+.** O IgE ligado ao antígeno liga-se ao recetor FcεRI, sem ligação cruzada, sendo o complexo internalizado e digerido nos lisossomas intracelulares e apresentado através de moléculas do MHC II a células T CD4+ específicas para o antígeno, que ao reconhecerem o antígeno entram em apoptose, resultando no desenvolvimento de tolerância imunitária. **(C). Remoção do IgE extracelular.** Os recetores FcεRI membranares das DCs e dos monócitos que ligam IgE, capturam IgE extracelular, que é internalizado em lisossomas intracelulares, resultando na degradação intracelular destas moléculas de IgE. .... 70

**Figura 28. Esquema que resume as principais conclusões do estudo realizado. .... 80**

## Índice de Tabelas:

**Tabela 1.** Caracterização quanto ao género e idade dos participantes incluídos nos dois grupos considerados (TRH sem Eosinofilia e TRH com Eosinofilia). ..... 33

**Tabela 2.** Dados clínicos referentes aos participantes (de cada grupo) do estudo: patologia de base (problema hepático que conduziu ao transplante); presença de autoanticorpos e tipo de dador do enxerto: Legenda: AVBEH - Atrésia das vias biliares extra-hepáticas; CIHF - Colestase intra-hepática familiar; ANA's - anticorpos antinucleares; NR- não-relacionado e R- relacionado. ... 34

**Tabela 3.** Dados Clínicos referentes aos participantes de cada grupo do estudo: terapia imunossupressora em curso; presença de disfunção do enxerto, presença de infeções e nível de IgE e IgA no total no sangue periférico na altura em que a amostra de SP foi analisada. Legenda: PDN - Prednisolona (corticosteroide); AM - Ácido Micofenólico; AZA- Azatioprina; CSA - ciclosporina; SIR - Sirolimus; TAC - Tacrolimus; EVE - Everolimus. .... 35

**Tabela 4.** Combinação dos anticorpos monoclonais em oito fluorescências e respetiva especificidade e fonte comercial do reagente para os cinco tubos em estudo. .... 43

**Tabela 5.** Quantificação (% e valor absoluto, representados pela média  $\pm$  desvio padrão) do total de leucócitos e de eosinófilos, basófilos, neutrófilos, monócitos, células dendríticas plasmacitóides (pDC), células dendríticas mieloides (mDC) e linfócitos totais. Expressão das recetores membranares envolvidos na maturação e ativação das populações celulares consideradas, dada pela intensidade média de fluorescência, representada pela média ( $\pm$  desvio padrão). Os valores estatisticamente significativos estão a azul. Valor de significância estatística dado pelo p value, calculado através do **Teste de Mann-Whitney**, sendo considerado estatisticamente significativo quando o **p <0,05**. .... 48

**Tabela 6.** Quantificação (% e valor absoluto, representados pela média  $\pm$  desvio padrão) da população total de monócitos e das suas várias subpopulações de monócitos estudadas: monócitos clássicos (população CD15+, população CD15- e população IgE+), monócitos intermédios (população HLA-DR ++ e população HLA-DR+) e monócitos não-clássicos. Expressão das recetores membranares envolvidos na maturação e ativação das populações celulares consideradas, dada pela intensidade média de fluorescência, representada pela média ( $\pm$  desvio padrão). Os valores estatisticamente significativos estão a azul e os valores próximos do valor estatisticamente significativo estão a negrito. Valor de significância estatística dado pelo p value, calculado através do **Teste de Mann-Whitney**, sendo considerado estatisticamente significativo quando o **p <0,05**. .... 49

**Tabela 7.** Quantificação (% e valor absoluto, representados pela média ( $\pm$  desvio padrão)) dos linfócitos-B (população total) e das várias subpopulações de linfócitos-B: Imaturas ou Transicionais, B-naïve, B- memória (população total, população CD27+ e população CD27-) e Plasmoblasto. Quantificação (%) Células B-memórias (CD27+ e CD27-) e Plasmoblastos que produzem as imunoglobulinas IgA, IgG e IgM. Os valores estatisticamente significativos estão assinalados a azul. Valor de significância estatística dado pelo p value, calculado através do **Teste de Mann-Whitney**, sendo considerado estatisticamente significativo quando o **p <0,05**. .... 53

**Tabela 8.** Quantificação (% e valor absoluto, representados pela média  $\pm$  desvio padrão) dos linfócitos-T e das várias subpopulações de linfócitos-T: T helper (CD4+) (Th17, Th9, Th2 e Th1), T citotóxicos (T CD8+) (Tc17 e Tc1), T- $\gamma\delta$  e de Células NK (CD56<sup>brigh</sup> e CD56<sup>dim</sup>). Os valores próximos do valor estatisticamente significativo estão a negrito. Valor de significância estatística dado pelo p value, calculado através do **Teste de Mann-Whitney**, sendo considerado estatisticamente significativo quando o **p <0,05**. Em nenhum dos casos se verificou significância

estatística ( $p < 0,05$ ). Contudo, no caso das Th17 o valor está muito próximo da significância ( $p = 0,05$ )..... 59



# **Abreviaturas**

---



## **Abreviaturas**

ADN- ácido desoxirribonucleico

APC- célula apresentadora de antigénio

APRIL- ligando de indução de proliferação – A (*A-proliferation-inducing ligand*)

AM – Ácido Micofenólico

AVBH- atresia das vias biliares extra-hepáticas

AZA - Azatioprina

CCR – receptor de quimiocina-CC

CCL - ligando de quimiocina-CC

CD – *cluster of differentiation*

CEH- célula estaminal hematopoiética

CLI-2 – células linfóides inatas do tipo 2

CMV- citomegalovírus

CPM- célula progenitora mieloide

CSA – Ciclosporina A

DCs – células dendríticas (pDC- DC plasmacitóides e mDC- DC mieloides)

DECH- Doença do enxerto-contra-hospedeiro

EBV- vírus *Epstein-Bar*

EE- Esofagite Eosinofílica

EoP- progenitor do eosinófilo

EVE - Everolimus

FA- fosfatase alcalina

Fc $\alpha$ RI – recetor para a fração constante da cadeia pesada da IgA

Fc $\gamma$ RI – recetor para a fração constante da cadeia pesada da IgG

Fc $\epsilon$ RI – recetor para a fração constante da cadeia pesada da IgE de alta-afinidade

Fc $\epsilon$ RII – recetor da imunoglobulina IgE baixa-afinidade

FGFs – fator de crescimento de fibroblastos

FGFR1- receptor 1 do fator de crescimento de fibroblastos

GM-CSF- fator estimulador de colónias de granulócitos e macrófagos

GMP – progenitor granulócito/monócito

HLA- antigénio leucocitário humano

HE- Hipereosinofilia

IDO- indolamina 2, 3- dioxigenase

IFN $\gamma$  – Interferão- $\gamma$   
ICAM-1- molécula de adesão intercelular-1  
Ig- imunoglobulina  
IL- interleucina (citocina)  
LTs- leucotrienos  
MAdcAM-1 – molécula de adesão adesina vascular de mucosas  
MHC I/II – Complexo *major* de histocompatibilidade do tipo I/II  
MO- medula óssea  
m-TOR - alvo de rapamicina em mamíferos (*mammalian target of rapamycin*)  
NDE- neurotoxina derivada do eosinófilo  
NF-AT- fator nuclear das células-T ativadas  
NF- $\kappa$ B – fator nuclear kappa B  
OMS- Organização Mundial de Saúde  
PAF- fator de ativação plaquetário  
PBM- proteína básica maior  
POE- peroxidase eosinofílica  
PCE- proteína catiónica eosinofílica  
PGs- prostaglandinas  
PDGEs- proteínas derivadas dos grânulos eosinofílicos  
PDGF- fator de crescimento derivado de plaquetas  
PMA- Phorbol 12-myristato-13 acetato  
PRRs – recetores de reconhecimento padrão  
RA- rejeição aguda  
RANTES – quimiocina regulada após ativação, expressa e secretada por células-T  
RC – rejeição crónica  
RCA – rejeição celular aguda  
SCF- fator de células estaminais  
SHEi – Síndrome Hipereosinofílica  
SIR – Sirolimus  
SP- sangue periférico  
STAT-6 – transdutor de sinal e ativador de transcrição -6  
TAC - Tacrolimus  
TBXs- tromboxanos  
Tc- células T citotóxicas (linfócitos T citotóxicos)

TGF- $\beta$ - fator de crescimento transformante-  $\beta$   
Th- células T *helper* (linfócitos T auxiliares)  
TNF- $\alpha$  – fator de necrose tumoral-  $\alpha$   
TRH- Transplante Hepático  
TSLP- linfopietina do estroma tímico  
TLR – recetor do tipo *Toll*  
VCAM-1- molécula de adesão da célula vascular 1  
VEGF- fator de crescimento endotelial vascular



# **Estado da arte**

---





## 1-Transplantação Hepática Pediátrica

A alotransplantação hepática é um procedimento clínico que consiste na implantação de um órgão ou enxerto, podendo ser um fígado inteiro ou apenas um dos lóbulos do fígado, proveniente de um dador cadáver ou vivo para um recetor cuja função hepática se encontra comprometida [1]. Este procedimento clínico tem sido realizado com sucesso no tratamento de crianças com doença hepática em último estágio, oferecendo-lhes a oportunidade de ter uma vida longa e saudável. As doenças hepáticas mais comuns, em crianças, que podem torná-las possíveis candidatas a receber um transplante de fígado dividem-se em cinco tipos principais de patologias: 1) colestase extra-hepática (atresia das vias biliares extra-hepáticas (AVBH)); 2) colestase intra-hepática (colangite esclerosante, Síndrome de Alagille e colestase intra-hepática familiar progressiva); 3) doenças metabólicas (doença de Wilson, deficiência em  $\alpha$ 1-antitripsina, deficiência do metabolismo de ácidos biliares, Síndrome de Crigler-Najjar, deficiência da ornitina transcarbamilase, tirosinemia, desordens do ciclo da ureia e desordens do metabolismo de hidratos de carbono e lípidos); 4) falha hepática aguda e 5) outras patologias (tumores hepáticos e fibrose cística) [2].

### 1.1. Imunologia da transplantação

#### 1.1.1. Fisiopatologia da disfunção e consequente rejeição do enxerto hepático

Apesar do fígado ser um órgão de eleição na transplantação, devido ao sucesso das técnicas cirúrgicas inovadoras e à eficácia da terapia imunossupressora utilizada atualmente, por vezes, podem surgir complicações, que culminam na disfunção ou rejeição do enxerto [1]. Uma das maiores limitações na transplantação é a resposta imunológica do organismo do recetor ao enxerto (tecido do dador), uma vez que este é intrinsecamente antigénico para o organismo do recetor. O enxerto/órgão transplantado expressa dois aloantigénios *minor* e *major*, sendo estes últimos pertencentes ao complexo *major* de histocompatibilidade (MHC) de classe I e classe II. As moléculas que constituem este complexo apresentam um elevado polimorfismo que está na origem de uma possível rejeição do enxerto por parte do recetor. Nos humanos, estes aloantigénios são conhecidos por antígenos de leucócitos humanos (HLA) e estão localizados no cromossoma 6, com vários alelos identificados nos *loci HLA-A; HLA-B; HLA-C; HLA-DR, HLA-DQ*, entre outros. Os aloantigénios menores são péptidos derivados de proteínas polimórficas, que existem exclusivamente no dador ou no recetor, e

possuem características estruturais distintas do MHC. Contudo, apesar de ser designados aloantígenos *minor*, em casos de pares dador-recetor com HLA idênticos, estes são também capazes de causar um episódio de rejeição do enxerto quando existe a combinação de vários aloantígenos *minor* que produzem uma resposta vigorosa, semelhante á resposta imunológica dos aloantígenos maiores [3,4].

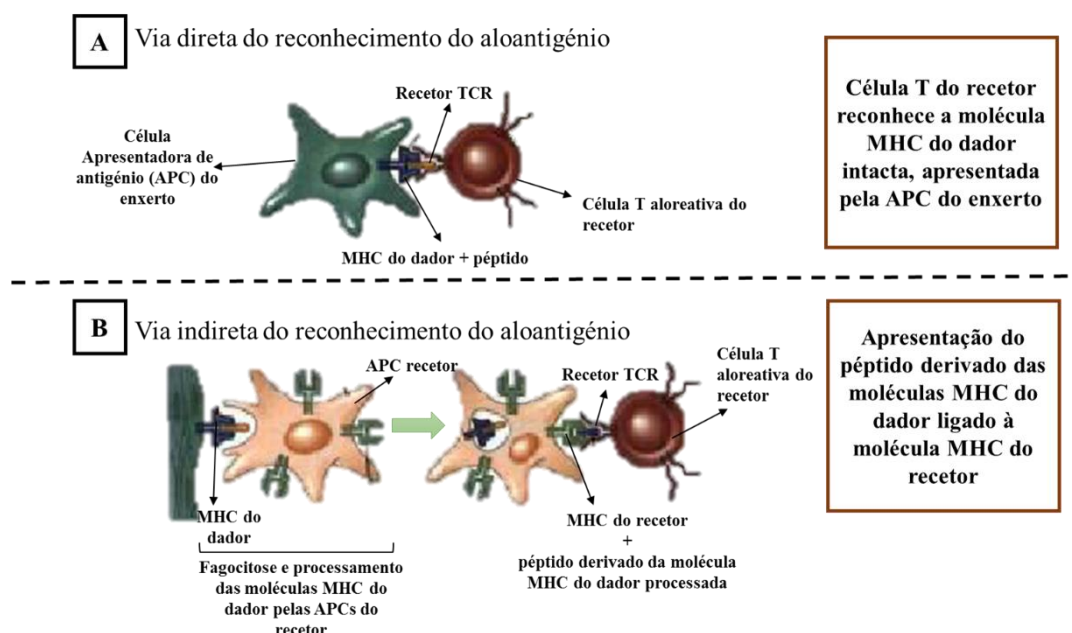
O processo de rejeição pode ser classificado de acordo com as características histopatológicas do enxerto e com o tempo de rejeição após o transplante. Assim, podem considerar-se três principais tipos de rejeição: hiperaguda (pós-operatório), aguda (geralmente depois da primeira semana após o transplante) e crónica (disfunção tardia do aloenxerto hepático) [5]. Nas primeiras 24 horas após o transplante pode surgir um processo de rejeição hiperaguda, caracterizado por oclusão trombótica da vascularização do enxerto [6]. Esta oclusão resulta da presença de anticorpos pré-formados, devido à exposição anterior aos aloantígenos através de transfusões sanguíneas ou outras transplantações, que se ligam ao endotélio dos vasos sanguíneos do enxerto, ativando o sistema de complemento. Os anticorpos, maioritariamente IgG, ligam-se aos aloantígenos HLA do dador, expressos nas células do endotélio do enxerto, com um MHC distinto do MHC do recetor. Desta forma, ativam o sistema de complemento, responsável pelas respostas imunes reativas contra as células do enxerto. Dão-se, então, modificações no endotélio dos vasos que levam à sua oclusão e à consequente, falta de irrigação sanguínea do enxerto, conduzindo à necrose deste [7].

A rejeição aguda (RA), onde se incluem a rejeição celular aguda (RCA), mediada por células T, e a rejeição mediada por anticorpos (RMA), (episódio de rejeição raro, com deposição de anticorpos e moléculas complemento em várias regiões do enxerto), surge em cerca de 20-50% dos pacientes durante os primeiros três meses após o transplante e consiste num processo de lesão do parênquima e da vascularização do enxerto [8]. O quadro clínico apresentado pelos pacientes inclui febre, irritabilidade, leucocitose (muitas vezes com eosinofilia) e um aumento dos níveis de bilirrubina, da gama-glutamyltransferase ( $\gamma$ -GT) e das transaminases hepáticas (aspartato (AST) e alanina (ALT) aminotransferases) [1]. Adicionalmente, para a confirmação do diagnóstico de rejeição aguda é necessária a realização de uma biópsia hepática, com o objetivo de avaliar a presença de inflamação e infiltração leucocitária em, pelo menos, um destes três locais: veia porta, ductos biliares ou sistema vascular hepático [8]. Considera-se que a RA é predominantemente mediada por

linfócitos T *helper* (Th) (CD4+) e linfócitos T citotóxicos (Tc) (CD8+) aloativados, pertencentes ao recetor do transplante. As células T CD4 reconhecem os antígenos do dador, apresentados por moléculas MHC classe II à superfície de APCs, através do seu recetor (TCR.), enquanto as células-T CD8 reconhecem moléculas de MHC classe I [3]. Este aloreconhecimento depende da origem da célula apresentadora de antígeno (APC, *Antigen Presenting Cell*), podendo ser realizado através de dois principais mecanismos: via direta e via indireta de aloreconhecimento, representadas na **Figura 1**. Na **via direta do aloreconhecimento**, os recetores das células T são capazes de identificar moléculas intactas de MHC presentes nas células APC do dador, residentes no enxerto (macrófagos e células dendríticas (DCs)). Após o transplante, estas APCs podem migrar para os nódulos linfáticos do recetor, onde os aloantígenos são reconhecidos pelas células T deste. Através desta via direta de reconhecimento, as células T CD8 aloreativas são ativadas e podem diferenciar-se em linfócitos citotóxicos capazes de destruir diretamente as células do enxerto que expressam moléculas MHC classe I. Na **via indireta do aloreconhecimento**, as células APC do recetor, podem migrar para o enxerto e fagocitar as moléculas de MHC do enxerto ou outras moléculas do dador, processando-as e apresentando-as à superfície celular, na forma de um complexo MHC-peptídeo [9]. Recentemente, uma terceira via foi descrita, a **via semidirecta de aloreconhecimento**. Este mecanismo baseia-se na evidência de que as DCs do recetor ao contactarem com células do dador (macrófagos, DCs, linfócitos T ou linfócitos B ativados) que expressam moléculas HLA do dador, têm capacidade de adquirir essas moléculas HLA intactas. Assim, as DCs do recetor podem expô-las à superfície da sua membrana e, ao mesmo tempo continuar a manter a capacidade de estimular/ativar células T aloreativas do recetor [10]. Desta forma, através destas três possíveis vias de aloreconhecimento, as células T aloreativas são ativadas e podem migrar para o enxerto e participar num possível processo de rejeição deste.

Depois de ativadas, as células T CD4 polarizam, dando origem a duas subpopulações principais, Th1 e Th2. Estas células, sobretudo as Th1, produzem as citocinas IL-2 e Interferão- $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) pro-inflamatórias que vão contribuir para o recrutamento e ativação de outras células imunitárias e inflamatórias, nomeadamente células T CD8, conduzindo à destruição do enxerto [3]. Em contrapartida, as citocinas IL-4, IL-10 e IL-5, produzidas pelas células Th2, vão contribuir para a inibição da proliferação de células Th1 e da sua produção de citocinas, contribuindo para a tolerância do recetor ao aloenxerto. Segundo o estudo de

Paiva *et.al.*, a quantificação destas citocinas produzidas por células T ativadas, com recurso à citometria de fluxo, revela-se importante no prognóstico de episódios de rejeição aguda, após transplante hepático [11]. A libertação de moléculas pro-inflamatórias pelas células Th1 é a responsável pela inflamação ao nível da veia porta, ductos biliares e vasos centrais do enxerto, podendo surgir com frequência infiltração exacerbada de outros leucócitos à volta dos vasos centrais, contribuindo para a fibrose e consequente obstrução [12]. Um dos leucócitos envolvido no processo de infiltração leucocitária, característica no episódio de rejeição aguda, é o eosinófilo [13–16]. Através da sua desgranulação e posterior libertação de proteínas citotóxicas e mediadores inflamatórios, como citocinas, quimiocinas e lípidos bioativos, os eosinófilos contribuem para os danos teciduais do enxerto associado ao processo de RCA e também no processo de RMA [13,17,18].



**Figura 1. Vias de reconhecimento do aloantígeno**, adaptado de [200]. **Legenda:** A- Via direta de reconhecimento, na qual as células T aloreativas do receptor se ligam diretamente às moléculas intactas do complexo Major de Histocompatibilidade (MHC) do doador, apresentadas por células apresentadoras de antígeno (APCs) do enxerto. B - Via indireta de reconhecimento, na qual as moléculas MHC do enxerto são fagocitadas, processadas e apresentadas pelas células APC do receptor às células T aloreativas do receptor.

A rejeição crónica (RC) do enxerto hepático surge em cerca de 5-10% dos pacientes pediátricos transplantados, sobretudo nos cinco primeiros anos após o transplante, observando-se uma colestase progressiva como manifestação clínica primária em consequência de uma função deteriorada das vias biliares fibróticas. A progressiva insuficiência no funcionamento do transplante, deve-se a uma persistente infiltração de leucócitos, lesão vascular, arteriosclerose do enxerto e elevada deposição de matriz

extracelular [1,8,19]. Apesar dos mecanismos inerentes à rejeição crónica estarem pouco esclarecidos, evidências sugerem que a RC pode iniciar-se e perpetuar-se por mecanismos independentes ou dependentes de aloantígenos [20]. Os mecanismos independentes de aloantígenos estão associados a lesão por isquémica/reperfusão, adquirida durante o tempo entre a recolha do enxerto do dador e a implantação deste no recetor, ou por lesão devido à possível morte cerebral do dador. Os mecanismos dependentes de aloantígenos estão associados à perpetuação de um episódio de RA ou à sensibilização prévia do recetor a aloantígenos, através de transfusões sanguíneas ou outras transplantações [20].

A Doença do enxerto – contra - hospedeiro (DECH), embora ocorra raramente, pode surgir como uma complicação após transplantação hepática [21,22]. Esta é causada pelas células T aloreativas e imunocompetentes presentes no enxerto, que podem reconhecer os tecidos do recetor como estranhos e induzir uma resposta imunológica capaz de conduzir à disfunção e destruição do enxerto. Esta situação acontece muitas vezes devido ao facto do organismo do recetor se encontrar imunodeprimido e incapaz de atuar contra as células alogénicas do enxerto [23].

### **1.1.2.Terapia imunossupressora após transplante**

Os fenómenos de rejeição associados a uma resposta imune destrutiva contra o enxerto podem ser controlados por terapias avançadas de imunossupressão [2]. Na última década, novos fármacos imunossupressores, seletivos para diversas vias de ativação celular, têm sido propostos. Os fármacos mais frequentemente utilizados em pacientes pediátricos incluem quatro principais classes de imunossupressores: corticosteroides; inibidores de calcineurina (Tacrolimus e Ciclosporina); antilinfoproliferativos (Azatioprina, Micofenolato mofetil (Ácido micofenólico), Sirolimus (rapamicina), Everolimus) e anticorpos específicos anti-recetor da IL-2 [1,24,25].

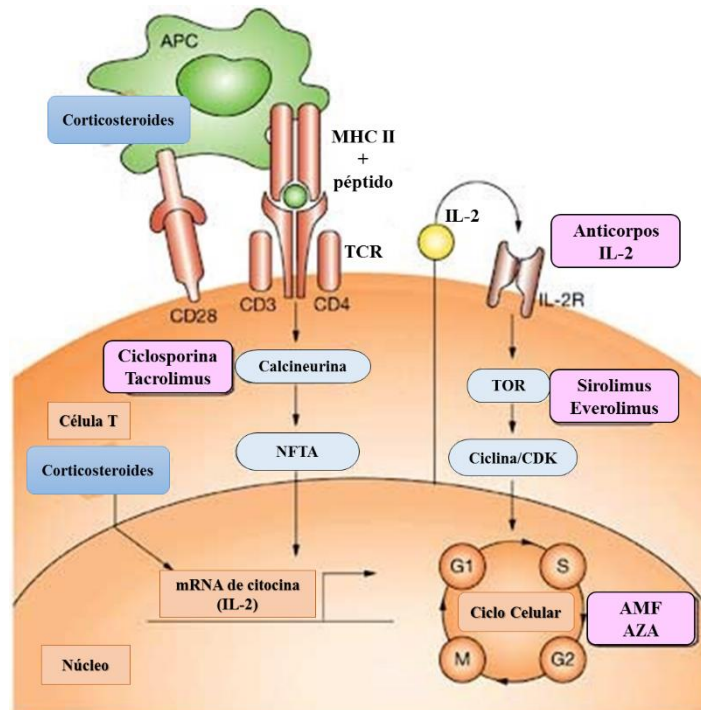
Os corticosteroides atuam promovendo a supressão da produção de anticorpos, a inibição da síntese de citocinas, como a IL-2 e o IFN $\gamma$ ; a redução da proliferação de células Th, Tc e T supressoras e de células B e ainda contribuem para uma diminuição da migração e atividade dos neutrófilos [26].

Os inibidores de calcineurina, como o Tacrolimus (TAC) e a Ciclosporina (CSA), são dos fármacos mais utilizados no pós-transplante hepático e têm como alvo a calcineurina. Estes fármacos inibem a resposta das células T, após a apresentação do aloantígenos pelas

APCs, ligando-se a proteínas intracelulares, as imunofilinas. O complexo fármaco-imunofilina vai se ligar à calcineurina, inibindo a sua atividade de fosfatase. Desta forma, o complexo inibe a desfosforilação catalisada pela calcineurina, importante para permitir o movimento do fator nuclear das células T ativadas (NFAT) para o núcleo. Como este fator é necessário para que haja a transcrição de citocinas, em particular da IL-2, a inibição da calcineurina bloqueia indiretamente a transcrição das citocinas que regulam a resposta proliferativa das células T (diferenciação e proliferação de células T) [27,28].

A Azatioprina (AZA) inibe a síntese de purinas, que são essenciais na formação de nucleótidos fundamentais para que haja proliferação de linfócitos. [29]. O Micofenolato de Mofetil é rapidamente convertido no seu metabolito ativo, o ácido micofenólico (AM), que é um inibidor seletivo e reversível da inosina monofosfato desidrogenase, uma enzima essencial para a formação de novos nucleótidos de guanina, essencial à síntese *de novo* de purinas [30]. Visto que, ao contrário de outros tipos de células, os linfócito T e B não são capazes de recorrer a vias alternativas para a síntese de purinas, estas células estão muito dependentes da via catalisada pela enzima inosina monofosfato desidrogenase. Desta forma, quando a sua função está comprometida, a proliferação celular dos linfócitos T e B é seletivamente inibida [31]. Os inibidores do alvo da rapamicina em mamíferos (inibidores m-TOR), como o Sirolimus (SIR) ou o Everolimus (EVE), têm um elevado poder de imunossupressão e tal como os inibidores de calcineurina, ligam-se a uma proteína imunofilina, formando um complexo que se vai ligar à cinase TOR, bloqueando a ativação desta. Esta proteína cinase é essencial ao normal funcionamento do ciclo celular e, por isso, quando está inibida, dá-se um bloqueio na progressão do ciclo celular e consequentemente uma quebra na proliferação celular dos linfócitos [32,33].

A terapia com anticorpos monoclonais específicos para o recetor da IL-2 (anti-CD25) também tem sido proposta como terapia imunossupressora em casos pediátricos. Estes anticorpos funcionam como agentes imunomoduladores, ligando-se à cadeia  $\alpha$  do recetor da IL-2, presente nas células T, bloqueando a ativação destas células, cuja ativação é, normalmente, mediada pela IL-2 [34].



**Figura 2. Mecanismos de ação dos fármacos imunossupressores**, adaptado de [201]. **Legenda:** A proliferação de células-T dá-se após a apresentação do antígeno do dador, através de células apresentadoras de antígeno (APCs). Este fenómeno resulta na ativação da calcineurina, que conduz à produção de interleucina-2 (IL-2). A IL-2, por sua vez, estimula a proliferação de linfócitos T, através da via de transdução de sinal, que envolve a TOR (target of rapamycin) e a cinase-dependente- de Ciclina (Ciclina/CDK). Os agentes imunossupressores, representados nas caixas cor-de-rosa, têm como objetivo bloquear a proliferação de célula T, atuando em várias etapas desta via de transdução de sinal. AMF- Ácido micofenólico; AZA-Azatioprina; G1- 1ª.fase do crescimento celular; S – síntese de ADN/replacação; G2- 2ª.fase do crescimento celular; M- mitose/divisão celular.

Apesar do uso de fármacos imunossupressores ser necessário para controlar episódios de disfunção e rejeição do enxerto, estes fármacos criam um ambiente ótimo para o desenvolvimento de infeções, sendo estas um das complicações associadas ao consumo de imunossupressores após transplante [1]. As infeções habitualmente mais severas são as causadas por vírus da família do herpes, como o vírus *Epstein-Bar* (EBV); citomegalovírus (CMV) e o vírus *herpes simplex* [35–37]. Infeções por EBV estão associadas a um aumento do risco de desenvolvimento de desordens linfoproliferativas após transplante em crianças que são submetidas a transplante hepático, sendo esta uma das maiores complicações após transplantação, sobretudo em casos de enxerto proveniente de dador vivo relacionado com o recetor [38].

Nas duas últimas décadas, estudos têm sugerido que a utilização de determinados tipos de fármacos imunossupressores, nomeadamente a utilização do inibidor de calcineurina Tacrolimus, estará associada ao desenvolvimento de eosinofilia periférica (aumento do número de eosinófilos ao nível do sangue periférico (SP)); o surgimento de

alergias alimentares *de novo*; desordens gastrointestinais (gastroenterite eosinofílica (GE), colites, esofagite eosinofílica (EE), entre outras) e a uma elevação dos níveis séricos de imunoglobulina E (IgE) em crianças submetidas a transplante hepático [39–42]. Estas complicações associadas à utilização desta terapia imunossupressora podem estar na origem de um processo inflamatório associado a episódios de disfunção ou rejeição do enxerto hepático, em crianças e/ou jovens submetidos a transplante de fígado [43].

## **2 – Eosinofilia reativa após transplantação hepática pediátrica**

### **2.1. Breve introdução ao Eosinófilo**

Os eosinófilos consistem numa família de leucócitos de grandes dimensões, pertencente à classe dos granulócitos. Possuem um núcleo bilobado e vários tipos de grânulos onde se encontram armazenadas diversos tipos de moléculas: citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento, corpos lipídicos e proteínas citotóxicas, designadas proteínas derivadas dos granulócitos eosinofílicos (PDGEs). As PDGEs incluem a proteína básica maior (PBM) (a proteína mais abundante nos grânulos eosinofílicos), a peroxidase eosinofílica (POE), a proteína catiónica eosinofílica (PCE) e a neurotoxina derivada do eosinófilo (NDE) [44–46]. Estas células foram observadas, pela primeira vez, por Wharton Jones em 1846, numa preparação de sangue periférico (SP) sem coloração [47]. Contudo, foi apenas em 1879 que este tipo de leucócito passou a ser designado como eosinófilo, por proposta de Paul Ehrlich, e devido à intensa coloração apresentada pelos seus grandes grânulos com um corante acídico, a eosina [48]. À semelhança do que acontece nas restantes células imunitárias, o eosinófilo tem origem na medula óssea (MO), através do processo de hematopoiese. Este processo consiste na formação, diferenciação e maturação das várias células sanguíneas a partir de células estaminais hematopoiéticas (CEH) CD34+[49]. Inicialmente, sob ação de vários fatores de transcrição e componentes da matriz do estroma, as CEH dão origem a células progenitoras linfoides (linhagem linfoide) e a células progenitoras mieloides (CPMs) (linhagem mieloide). A partir das CPMs origina-se o progenitor granulócito/monócito (GMP), que pode conduzir às várias linhagens de granulócitos (eosinófilos, neutrófilos, basófilos, mastócitos) e à linhagem monocítica [49]. É a partir do GMP que surge o precursor do eosinófilo (EoP) que inicia a linhagem eosinofílica, da qual se vão desenvolver eosinófilos maduros por ação de uma cascata



regulatória de eventos interdependentes que inclui vários fatores de transcrição e as citocinas IL-5, IL-3 e o GM-CSF (fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos) [50]. Atualmente, sabe-se que o eosinófilo intervém na defesa do hospedeiro contra agentes patogênicos, na fase tardia de reações alérgicas e na imunomodulação de outras células imunitárias, nomeadamente linfócitos (B e T), DCs e mastócitos [51].

## **2.2. Eosinofilia**

Geralmente, no SP, o número absoluto de eosinófilos varia entre os 300-500 células/mm<sup>3</sup> [52]. Assim, quando este é superior a 500 células/mm<sup>3</sup> no SP ou quando o número relativo de eosinófilos é cerca de 10% do total de leucócitos, diz-se que se está perante um caso de eosinofilia. Porém, a severidade da eosinofilia tem sido dividida em suave (500-1500 células/mm<sup>3</sup>), moderada (1500-5000 células/mm<sup>3</sup>) e severa (> 5000 células/mm<sup>3</sup>) [53]. Quando os níveis de eosinófilos são superiores 1500 células/mm<sup>3</sup>, a desordem passa a designar-se hipereosinofilia (HE). Esta pode ser dividida em vários subtipos: variante hereditária ou familiar (HEf); HE com significância indeterminada ou idiopática (HEi); HE primária ou clonal, produzida por eosinófilos clonais ou neoplásicos (HEc) e a HE secundária ou reativa (HEr). Qualquer variante da HE que esteja associada a disfunção de órgãos é referida como Síndrome Hipereosinofílica (SHE), passando a ser designados por SHEf; SHEi; SHEc e SHEr, conforme as suas variantes específicas. No entanto, o termo SHE não deve ser aplicado no caso de certas doenças associadas a HEr, como a GE e a pneumonia eosinofílica, nas quais a disfunção envolve um único órgão, com presença de eosinofilia periférica, mas cujo papel da eosinofilia na disfunção do órgão permanece indeterminado [54].

### **2.2.1. Classificação das Eosinofilias pela OMS**

Segundo a atualização de 2015 [55] da definição da Organização Mundial de Saúde (OMS) de 2008 [56], para as desordens eosinofílicas, estas abrangem uma ampla gama de desordens não-hematológicas (secundárias ou reativas) e hematológicas (primárias ou clonais), com potencial disfunção final em diversos órgãos [55]. A elevação do número de eosinófilos pode dever-se à expressão exacerbada de citocinas que promovem a hematopoiese para a linha eosinofílica (IL-5, a IL-3 e o GM-CSF), que promovem a expansão de eosinófilos, sendo esta a principal causa das eosinofilias secundárias. Por outro

lado, as eosinofílias primárias ou clonais, estão associadas a mutações nos recetores tirosina cinase oncogénicos das quimiocinas PDGF (*platelet derived growth regulators*) e FGFs (*fibroblast growth factors*), que desencadeiam também a ativação de eosinófilos [57]. Se estes recetores, expressos à superfície dos eosinófilos, permanecerem ativados continuamente, levam ao aumento de eosinófilos neoplásicos, cuja função está alterada.

Durante as duas últimas décadas, têm sido propostas várias classificações diferentes das desordens eosinofílicas em vários ramos da medicina [58]. Contudo, os respectivos critérios e definições sobrepõem-se parcialmente, não existindo um consenso global multidisciplinar desenvolvido. Tendo por base o algoritmo de diagnóstico baseado na classificação de desordens eosinofílicas da OMS de 2008 [55], a eosinofilia ou HE pode dividir-se em: 1) eosinofilia/HE reativa ou secundária, 2) eosinofilia/HE clonal ou primária (variante mieloproliferativa da HE), 3) variante linfoproliferativa da HE e 4) HE idiopática [55].

### **2.2.2.Principais causas de eosinofilia reativa**

A eosinofilia/HE reativa, causada pela excessiva produção ou ação exacerbada de IL-5, IL-3 e GM-CSF, deve-se a um aumento do número absoluto de eosinófilos transitório ou crónico [54]. A eosinofilia transitória observa-se frequentemente em processos reativos agudos, como inflamações não-específicas, reações alérgicas ou reações a fármacos e infeções por vírus ou bactérias (sobretudo na fase de recuperação de uma infeção). A eosinofilia crónica é encontrada em pacientes com infeções crónicas persistentes (causadas por parasitas, fungos ou certos vírus); doenças autoimunes; doenças atópicas (como a asma, rinite alérgica e dermatites); desordens endocrinológicas distintas e certos tumores [53]. Assim, a elevação reativa de eosinófilos no SP ou nos tecidos surge em várias condições patológicas. Esta pode surgir associada a doenças inflamatórias e doenças alérgicas respiratórias (asma atópica) e gastrointestinais (alergias alimentares, GE e EE) ou em resposta a reações a drogas (reações alérgicas ou tóxicas) e infeções por parasitas (helminhas) [59]. Infeções crónicas provocadas por parasitas como os helmintas (nematodes, cestodes ou trematodes) são uma das maiores causas de eosinofilia persistente. O contacto do organismo com helmintas desencadeia respostas inflamatórias mediadas por células Th2 e pelo aumento de IgE, promovendo eosinofilia persistente, devido ao aumento do recrutamento e ativação de eosinófilos nos tecidos infetados [60].

Doenças alérgicas ou atópicas (mediadas por ativação de IgE) tais como a rinite alérgica, a asma e a dermatite estão associadas, geralmente, a uma eosinofilia suave no SP ( $< 1500$  células/mm<sup>3</sup>) [61]. Estudos como o de Jacobsen *et.al.* [62], têm mostrado que a eosinofilia reativa, observada nestes tipos de patologias, resulta da produção excessiva de citocinas inflamatórias IL-5, IL-4 e IL-13 por células Th2 ativadas pela presença de alérgenos inalados pelo organismo [62]. Estes mecanismos fisiopatológicos, que incluem respostas imunes e inflamatórias mediadas por células Th2, estão também na origem de eosinofilia reativa em desordens alérgicas gastrointestinais, como a GE e a EE, embora neste caso a reação seja desencadeada por alérgenos alimentares [63].

As reações de hipersensibilidade a fármacos são uma das causas mais frequentes de eosinofilia reativa [64]. Dos fármacos associados a estas reações severas destacam-se os medicamentos anticonvulsivos, antiepiléticos, antibióticos e anti-inflamatórios não esteroides [65]. Estes fármacos ativam células T, que por sua vez conduzem à expansão de eosinófilos, através de dois principais mecanismos. Num deles, os fármacos são reconhecidos por células apresentadoras de antígenos, que vão promover ativação de células T. No outro mecanismo, os fármacos ativam as células T diretamente, através de um mecanismo fisiopatológico que consiste na interação farmacológica com os recetores imunes localizados à superfície destas células [66].

Algumas imunodeficiências, nomeadamente o Síndrome de Omenn e o Síndrome Hiper-IgE, também têm sido associadas à ocorrência de eosinofilia secundária, mediadas por células T produtoras de IL-5 [67]. Porém o mecanismo pelo qual estas células Th2 são ativadas neste tipo de doenças ainda não é muito claro. Além destas imunodeficiências, outras desordens imunológicas, como a DECH, têm sido associadas à presença de eosinofilia [68]. A DECH desenvolve-se sobretudo após alotransplantação de células estaminais hematopoiéticas, iniciando-se quando células T aloreativas e imunocompetentes do enxerto (dador) reagem contra células T do recetor, através do reconhecimento de aloantígenos [23,69].

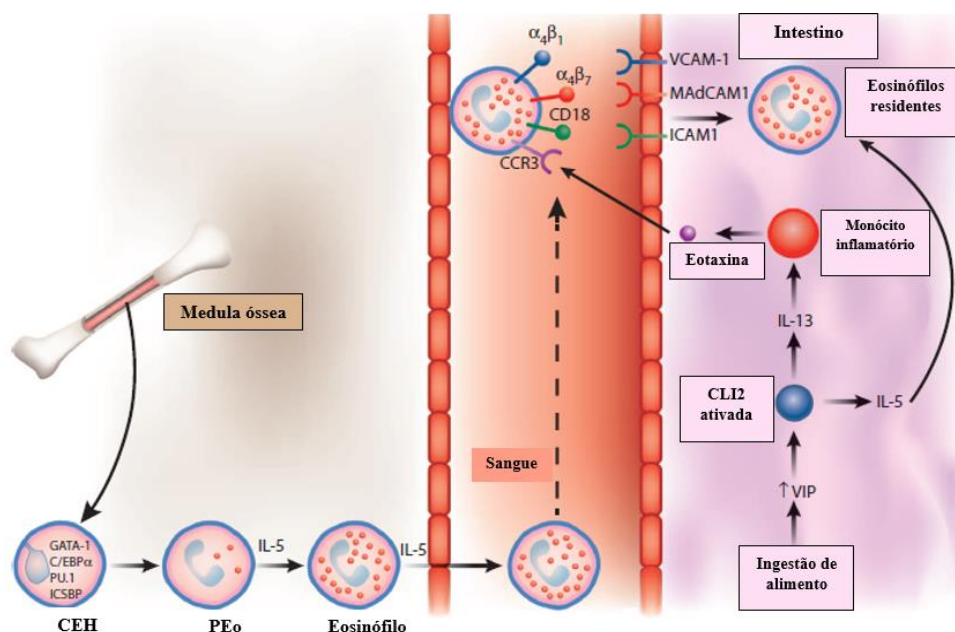
### **2.3. Mecanismos responsáveis pelo recrutamento e expansão eosinofílica**

Após o processo de diferenciação na MO, os eosinófilos são libertados no SP podendo, numa última fase, ser recrutados para vários tecidos, onde podem exercer as suas funções de homeostase tecidual ou integrar um processo inflamatório associado a uma determinada

patologia [70]. Como já foi referido, a IL-5 é uma das moléculas responsáveis pela diferenciação e maturação dos eosinófilos na MO, estando também envolvida na passagem dos eosinófilos maduros para o SP. Tal fenómeno foi demonstrado por Collins *et.al.* [71], em ratinhos, onde se observou que após injeção intravenosa de elevados níveis de IL-5, os ratinhos apresentam um aumento dos níveis de eosinófilos no SP (eosinofilia periférica) [71]. No SP humano, os níveis de eosinófilos maduros são habitualmente reduzidos (inferiores a 400 células/mm<sup>3</sup>), aumentando em caso de desordens eosinofílicas ou eosinofilias associadas a processos patológicos [46]. O tempo de semi-vida destas células em circulação não ultrapassa um dia e a vasta maioria desloca-se para tecidos como as superfícies de mucosas, sobretudo do trato gastrointestinal, onde desempenham funções na homeostase tecidual [72].

Em indivíduos saudáveis, os eosinófilos são recrutados para vários tecidos, nomeadamente trato gastrointestinal (exceto esófago), glândula mamária, gânglios linfáticos, útero e timo [73]. Este recrutamento é regulado por citocinas secretadas por células Th2 (IL-5 e IL-13) e pela eotaxina-1, que se liga ao seu recetor localizado na membrana dos eosinófilos, o recetor de quimiocina-CC 3 (CCR3) [70]. Desta forma, a eotaxina-1, a IL-5 e a IL-13 têm um papel fulcral no recrutamento dos eosinófilos durante a homeostase (**Figura 3**). A eotaxina-1, responsável pelo tráfego dos eosinófilos do SP para o interior dos tecidos, é produzida por monócitos inflamatórios ativados pela IL-13, ou pode ser secretada pelas próprias células epiteliais intestinais [74,75]. A IL-5 promove a mobilização dos eosinófilos para o trato gastrointestinal, em cooperação com a eotaxina-1, e contribui para a sobrevivência e persistência dos eosinófilos nestes tecidos, conjuntamente com o GM-CSF e a IL-3, através da inibição de várias vias apoptóticas dos eosinófilos [76,77]. Como a IL-5 e o GM-CSF são também produzidos pelos próprios eosinófilos, estas citocinas atuam num mecanismo autócrino nos eosinófilos, o que contribui para contínua ativação destes e para a sua sobrevivência nos tecidos [77]. A IL-13, produzida por células linfoides inatas do tipo 2 (CLI-2), induz a expressão de eotaxina-1, através da ativação de monócitos inflamatórios [78]. A entrada dos eosinófilos nos tecidos requer a intervenção de várias integrinas ( $\alpha 4\beta 1$  e  $\alpha 4\beta 7$ ) e membros da família CD18 expressas à superfície dos eosinófilos que vão interagir com as respetivas moléculas de adesão (molécula de adesão da célula vascular 1 (VCAM-1), molécula de adesão adesina vascular de mucosas (MAdCAM-1) e molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1)) existentes nas células epiteliais dos tecidos

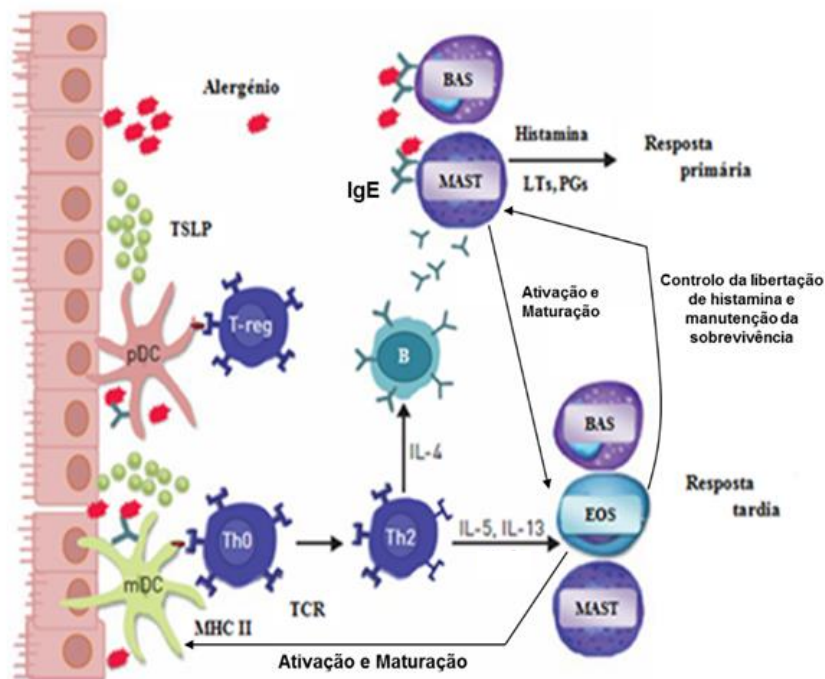
[79]. Nos tecidos, segundo observações *in vitro*, os eosinófilos são capazes de sobreviver durante cerca de 2 semanas e depois entram em processo apoptótico [80].



**Figura 3. Mecanismo de recrutamento de eosinófilos durante a homeostase no tecido gastrointestinal**, adaptado de [70]. **Legenda:** CEH (célula estaminal hematopoética), PEo (progenitora eosinofílica); CLI 2 (célula linfóide inata do tipo 2 ativada), CCR3 (receptor de quimiocina 3), IL- Interleucina, VIP (neurohormone vasoativo intestinal peptide), VCAM-1 (molécula de adesão da célula vascular 1), MAdCAM1 (mucosal vascular adressin adhesion protein) e ICAM1 (intercelular adhesion sequence-binding protein).

Em condições patológicas e inflamatórias, o recrutamento de eosinófilos para os locais inflamados e a ativação destas células envolve citocinas produzidas pelas células endoteliais e células Th2 (IL-4, IL-5 e IL-13) [81], moléculas de adesão (integrinas e moléculas da família CD18) [82], quimiocinas como o ligando de quimiocina-CC, regulada após ativação e expressa e secretada por células-T (CCL-5 ou RANTES) e as eotaxinas [83] e metabolitos lipídicos (leucotrienos (LTs) e prostaglandinas (PGs)) [84]. Neste caso, a IL-5 é produzida nos tecidos inflamados, dominados por células Th2, conduzindo ao aumento da libertação de eosinófilos maduros para o SP [85]. Quando os eosinófilos já se encontram em circulação, a RANTES e as eotaxinas vão intervir na passagem destas células para os tecidos afetados [86]. A ativação dos eosinófilos pode ocorrer ainda no SP, sendo que estes são ativados diretamente através da ligação da IL-5 ao seu recetor IL-5R $\alpha$ , e indiretamente através das ações produzidas pelas IL-4 e a IL-13 [83]. Estas promovem o aumento da expressão de quimiocinas que atuam diretamente nos eosinófilos, particularmente as eotaxinas, através de uma via mediada pelo ativador e transdutor de sinais de transcrição-6 (STAT-6) [87].

Recentemente foi descrita, em modelos animais com processo inflamatório associado a situações patológicas como asma e esofagite eosinofílica (EE) (acumulação de eosinófilos no esôfago), a periostina, uma proteína da matriz extracelular que tem sido observada como tendo um importante papel na reparação e remodelação do tecido cardíaco [88,89]. A sua expressão é induzida pela IL-13, citocina altamente expressa em pacientes com EE, e pelo fator de crescimento transformante -  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), produzido por mastócitos ou pelos próprios eosinófilos, o que sugere que os eosinófilos têm também a capacidade de contribuir para a sua infiltração nos tecidos [89]. Ratinhos com deleção no gene alvo da periostina revelaram uma redução da concentração de eosinófilos nos pulmões e no esôfago. No mesmo estudo foi demonstrado, *in vitro*, o papel desta molécula na adesão dos eosinófilos aos tecidos, sugerindo que a periostina facilita a infiltração de eosinófilos nos tecidos inflamados [88].



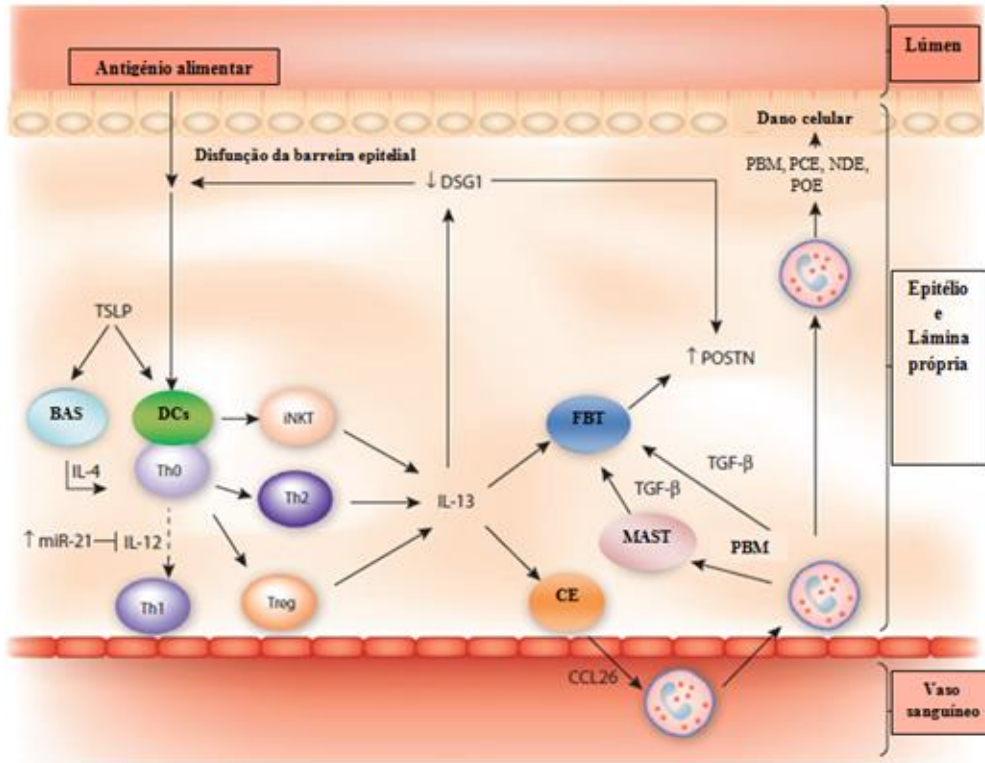
**Figura 4.** Via de recrutamento das células imunes após o contacto do organismo com um alergénio, adaptado de [93].  
**Legenda:** B- célula-B; BAS- Basófilos; EOS – Eosinófilos; IL- Interleucina; LTs – Leucotrienos; PGs – prostaglandinas; MAST- Mastócitos; MHCII- Major Histocompatibility Complex Type II; mDC- célula dendrítica mieloide; pDC- célula dendrítica plasmacitóide; TCR- T- Cell Receptor; Th- células-T helper, T-reg – célula-T reguladora; TSLP- linfopietina do estroma tímico.

Em processos patológicos como a asma e a EE (**Figura 4 e 5**), após a exposição do organismo a um alergénio (ambiental ou alimentar), as células epiteliais libertam a linfopietina do estroma tímico (TSLP), uma citocina inata derivada do epitélio, que promove a ação das DCs como apresentadores de antígeno às células T CD4 *naïve* (Th0),

que se desenvolvem dando origem a células Th2 [90]. As células Th2 vão secretar citocinas, nomeadamente IL-5, que vai conduzir diretamente ao recrutamento e ativação de eosinófilos e a IL-13 que vai induzir a produção de eotaxina-3 (CCL26) no caso da EE [86,91] e das eotaxinas-1 (CCL11) e 2 (CCL24) no caso da asma [92], contribuindo para a infiltração e ativação dos eosinófilos nos tecidos inflamados. Os eosinófilos recrutados para o epitélio das vias aéreas ou do intestino e ativados pela exposição aos alérgenos produzem vários tipos de respostas imunes, nomeadamente a desgranulação de proteínas citotóxicas, que conduzem a danos nos tecidos inflamados [70,93]. Além disso, outras células imunitárias, como os basófilos e os mastócitos, que estão envolvidas na resposta imune primária, após o contacto do alérgeno com o organismo, contribuem também para a ativação, maturação e sobrevivência de eosinófilos [94,95]. Os basófilos e os mastócitos possuem morfologia e mecanismos de ação idênticos e são ativados pela ligação de IgE aos seus recetores existentes nas membranas destas células [96]. Estas IgE são geradas por linfócitos B que foram, anteriormente, ativados por linfócitos Th2, através de secreção de IL-4 (**Figura 4**). Após ativados, os mastócitos e os basófilos desgranulam, libertando histamina e outros mediadores inflamatórios solúveis, como LTs, PGs e proteases, que vão contribuir para o recrutamento de outras células imunitárias, tal como os eosinófilos, promovendo o processo inflamatório [93].

Atualmente ainda não existe consenso relativamente a qual será a maior via de ativação dos eosinófilos [96]. Contudo, sabe-se que para além da ativação por citocinas e quimiocinas regulatórias, os eosinófilos podem ainda ser ativados, através de recetores de reconhecimento padrão (PRRs) localizados na superfície celular dos eosinófilos, tais como os recetores do tipo *Toll* (TLRs). Com o auxílio destes recetores, os eosinófilos são capazes de reconhecer agentes patogénicos que entram em contacto com o organismo, induzindo a sua ativação, para que estes executem as suas respostas imunes inatas [97]. Segundo o estudo de Muraki *et.al.* [98], os eosinófilos podem ainda ser ativados por IgA e IgG, secretadas nos tecidos inflamados. Estas ligam-se aos respetivos recetores localizados na superfície celular destas células imunitárias, desempenhando um importante papel na inflamação asmática e alérgica [98]. Embora estudos como o de Muraki *et.al.* [98] revelem que a IgE não é capaz de ativar os eosinófilos em processos inflamatórios e reações alérgicas, outros estudos realizados com eosinófilos isolados de doentes com eosinofilia, demonstraram resposta eosinofílica (desgranulação) após tratamento com anti-IgE ou com parasitas cobertos com

IgE [51]. Também tem sido referido que o recetor de alta-afinidade para a IgE (FcεRI) está presente em eosinófilos de doentes com eosinofilia e que várias funções eosinofílicas, incluindo a desgranulação e a atividade citotóxica contra parasitas são medidas por este recetor [99]. Contudo, o papel da IgE na ativação de eosinófilos ainda é muito controverso.



**Figura 5. Via de recrutamento das células imunes na EE, adaptado de [70].** **Legenda:** PBM (proteína básica maior); PCE (proteína catiónica eosinofílica); NDE (neurotoxina derivada do eosinófilo); POE (peroxidase eosinofílica); DSG1 (desmogleína-1); POSTN (periostina); TGF (fator de crescimento de transformação); MAST (mastócito); CE (célula epitelial); CCL (lingando de quimiocina-CC); IL-Interleucina; TSLP (thymic stromal lymphopietin); BAS (basófilo); Th (células-T helper); T-reg (célula-T reguladora); iNKT (invariante natural killer T- cell); DCs (células dendríticas); FBT (fibroblasto).

### 2.3.1. Outras subpopulações envolvidas no recrutamento de eosinófilos

Nos últimos anos, outras subpopulações têm sido indicadas como estando envolvidas no recrutamento, ativação e sobrevivência dos eosinófilos. As células Th17 desempenham um papel importante na patogénese da inflamação alérgica das vias aéreas, através da produção da sua citocina específica, a IL-17A, estando envolvidas sobretudo no recrutamento de neutrófilos para as vias aéreas. Contudo, segundo o estudo de Wakashin *et.al*, as células Th17 promovem o recrutamento de eosinófilos para as vias aéreas, através da estimulação de respostas imunes mediadas por células Th2, após o estímulo de um



antigénio [100]. Além disso, outros estudos como o de Dias *et.al.*, referem também o papel da citocina IL-17A, produzida pelas Th17, na ativação de eosinófilos do SP, promovendo um aumento da atividade citolítica destas células [101].

Recentemente, também foi sugerido que as células Th9, produtoras da citocina IL-9, parecem estar envolvidas nas respostas alérgicas [102]. Estudos recentes, como o de Hoppenot *et.al.*, têm demonstrado que pacientes com asma alérgica apresentam número aumentado de células Th9 no SP e também um incremento da produção de IL-9 no soro destes pacientes [103]. Além disso, parece existir uma correlação positiva entre o aumento da presença das Th9 no SP e a diminuição da apoptose dos eosinófilos. Contudo, as vias de interação entre estas novas subpopulações linfocitárias e os eosinófilos, ainda estão pouco estudadas.

#### **2.4. Eosinofilia em doentes pediátricos submetidos a transplante hepático**

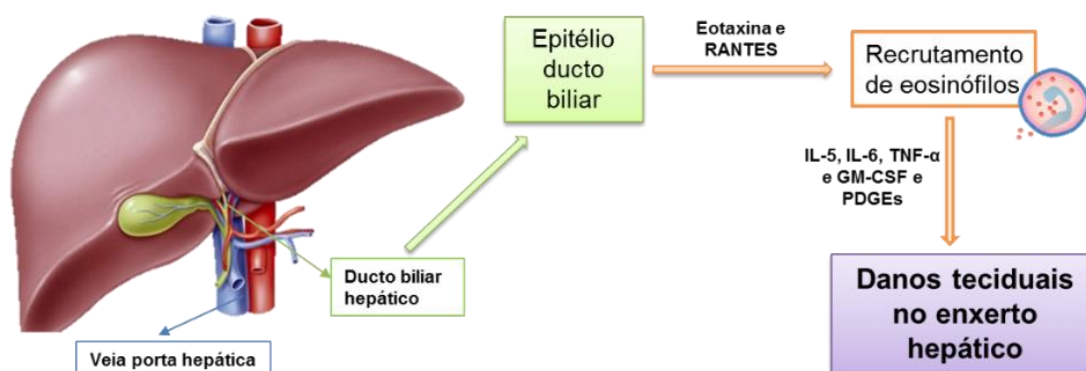
Em transplantação hepática, o papel dos eosinófilos tem sido estudado no contexto da rejeição celular aguda (RCA) do enxerto [104]. Estudos como o de Rodríguez-Perálvarez *et.al.*, realizados em pacientes sujeitos a transplante hepático, referem que uma contagem de eosinófilos superior a 500 células/mL ou superior a 10% do total de leucócitos pode sugerir ocorrência de RCA, sobretudo durante o primeiro mês após o transplante [105]. Segundo o estudo de Barnes *et.al.*[106], existe uma correlação positiva entre o elevado número de eosinófilos no SP e a severidade do processo de rejeição [106]. Desta forma, evidências têm mostrado que a eosinofilia no SP poderá ser um bom marcador no diagnóstico não invasivo da RCA (sem recorrer a biópsia hepática), podendo também contribuir para a análise da severidade da RCA após transplante hepático [107]. Porém, o papel da eosinofilia como marcador de diagnóstico da RCA ainda é um pouco limitado, uma vez que ainda não foi possível explicar de que forma é que o número aumentado de eosinófilos no SP poderá estar a influenciar a disfunção no enxerto [108].

No caso particular da transplantação hepática pediátrica, tem-se verificado que crianças submetidas a transplante têm apresentado eosinofilia periférica persistente e também têm adquirido diferentes patologias de cariz alérgico, com características de inflamação eosinofílica do trato gastrointestinal, tais como gastroenterites eosinofílicas, colites eosinofílicas e esofagites eosinofílicas [40,109–113]. Recentemente, o estudo de

Catal *et.al.* [114] mostrou também que após transplante hepático, várias crianças adquiriam alergias alimentares, mediadas por IgE, uma das imunoglobulinas capazes de ativar eosinófilos reativos [114]. Aliás, no estudo de Granot *et.al.* de 2006 [39], já se tinha verificado que mais de 50% das crianças incluídas no estudo, curiosamente medicadas com Tacrolimus, apresentavam eosinofilia. A maioria revelou também níveis elevados de IgE total e de IgE específica para um determinado alergénio alimentar [39–42].

### 3 – Impacto da eosinofilia periférica no processo inflamatório associado à disfunção do enxerto hepático

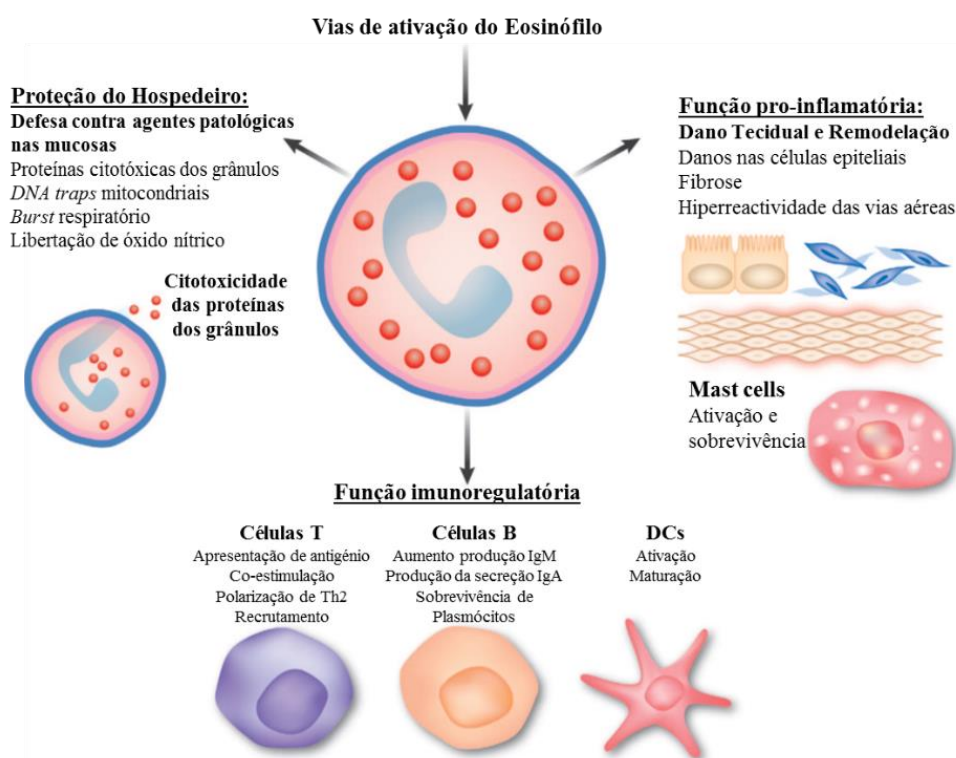
O papel dos eosinófilos recrutados, nomeadamente pela ação da eotaxina e da RANTES (produzidas pelo epitélio do ducto biliar do enxerto), no processo de RCA, tem sido estudado através da análise de biópsias de enxertos com disfunção tecidual [13]. Um possível mecanismo imune na rejeição do enxerto hepático poderá ser a ação dos eosinófilos infiltrados sobretudo no ducto biliar do enxerto, que através da produção de mediadores inflamatórios como as citocinas IL-5, IL-6, fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) e GM-CSF e PDGEs, poderá contribuir para danos teciduais no enxerto hepático [13]. Contudo, os efeitos negativos no enxerto hepático provocados pelos eosinófilos ativados no SP ainda não foram muito estudados.



**Figura 6. Mecanismo de ação dos eosinófilos infiltrados no enxerto hepático**, adaptado de [13]. **Legenda:** IL- Interleucina; TNF- $\alpha$  – Factor de necrose tumoral - $\alpha$ ; GM-CSF- fator estimulador de colónias de granulócitos e macrófagos; PDGEs- proteínas derivadas de grânulos eosinofílicos.

### 3.1. Papel imunoregulatório e inflamatório do eosinófilo

Nos últimos 20 anos, vários investigadores têm mostrado que os eosinófilos são capazes de executar numerosas funções imunes além da participação na defesa inata do hospedeiro contra agentes patogênicos e em fases tardias de episódios de reações alérgicas [115]. Atualmente, as funções efetoras dos eosinófilos podem dividir-se em quatro principais categorias: 1) funções efetoras citotóxicas; 2) homeostase tecidual; 3) dano e remodelação tecidual e 3) imunorregulação e interações celulares (**Figura 7**).



**Figura 7. Funções efetoras dos eosinófilos**, adaptado de [70]. **Legenda:** A ativação dos eosinófilos é mediada por uma vasta variedade de receptores membranares que respondem a diversos estímulos, incluindo citocinas, quimiocinas, lípidos bioativos e padrões moleculares associados a agentes patogênicos (PRRs). Após ativação, os eosinófilos promovem várias respostas imunológicas, tais como dano e remodelação tecidual, ativação de mastócitos, e imunorregulação de linfócitos (T e B) e células dendríticas (DCs).

As funções efetoras citotóxicas consistem na libertação das PDGEs e outros mediadores inflamatórios (através da desgranulação), produção de compostos tóxicos como o óxido nítrico (ação da POE), entre outras atividades citotóxicas [116]. Estas propriedades citotóxicas são fundamentais na defesa do hospedeiro contra infeções por parasitas, vírus ou bactérias, sendo também as responsáveis pelos danos colaterais nos tecidos infetados. [44]. Apesar dos efeitos destrutivos causados por alguns mediadores derivados dos eosinófilos, estes também expressam citocinas e fatores de crescimento com propriedades de reparação

tecidual [116]. Em várias condições fisiológicas e patológicas, os eosinófilos interagem com componentes teciduais, mantendo a homeostase ou mediando a reparação e remodelação celular [70]. Nos tecidos, os eosinófilos podem interagir com as células epiteliais, células do músculo liso, fibroblastos e células endoteliais [116]. Desta forma, os eosinófilos atuam nas funções da barreira epitelial de vários tipos de tecidos, na hiperplasia de células do músculo liso e células epiteliais, na diferenciação de miofibroblastos, na deposição de componentes da matriz extracelular e na angiogênese. Quando os eosinófilos detetam danos no tecido epitelial, secretam múltiplos mediadores, incluindo o TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$ , a IL-13 e o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), que promovem a reparação e remodelação tecidual, através da deposição de proteínas da matriz extracelular, da indução da angiogênese e da ativação de outras células imunitárias [117].

Atualmente, considera-se que os eosinófilos desempenham um importante papel como imunoregulador, modulando as funções imunológicas de outras células imunitárias (DCs, linfócitos T e B, macrófagos, neutrófilos, plasmoblastos e mastócitos) (**Figura 8**). Desta forma, os sinais imunoregulatórios primários promovidos pelos eosinófilos compreendem: 1) inibição do desenvolvimento de células Th1 através da expressão da indolamina 2, 3-dioxigenase (IDO); 2) ativação de células T *naïve* (Th0) através de funções como APC e 3) secreção de citocinas e moléculas imunomoduladoras, que permitem a modulação da diferenciação, maturação, ativação e sobrevivência de outras células imunitárias, tais como os linfócitos T (sobretudo Th2); linfócitos B; DCs; mastócitos; entre outras [116,118].

Segundo o que foi referido no capítulo anterior, os eosinófilos claramente respondem a sinais promovidos por células T, que estimulam a sua diferenciação, migração e ativação. Todavia, sabe-se atualmente que células T também respondem a vários sinais acionados pelos eosinófilos, nomeadamente através da apresentação de antígenos e em resposta a moléculas secretadas pelos eosinófilos, nomeadamente várias citocinas (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12) responsáveis pela proliferação de células T [119]. A polarização de células T pode ser regulada pelos eosinófilos humanos, através da expressão da IDO, uma enzima envolvida no metabolismo oxidativo do triptofano, convertendo-o em quinureninas. Estas regulam o balanço de Th1 e Th2, através da promoção da apoptose de células Th1, o que favorece a geração de linfócitos Th2 [120]. Adicionalmente, para promover o recrutamento específico de Th2 para os tecidos, os eosinófilos podem aumentar a função de células T residentes nos tecidos, através da libertação de IL-25 [116]. Os eosinófilos são uma das fontes de IL-25,

uma citocina que promove o aumento da proliferação e polarização Th2, bem como o aumento da produção de citocinas específicas de células T [121]. Segundo Wang *et.al.*, tanto células T *naïve*, como células Th2 memória respondem ao estímulo de IL-25. Assim, o próprio estímulo da IL-25 criado pelos eosinófilos também pode suportar a sua própria diferenciação e recrutamento, uma vez que células T ativadas por IL-25, podem produzir IL-5 que, por sua vez, tem um papel fundamental na maturação e ativação dos eosinófilos [121]. Apesar dos eosinófilos não serem consideradas células apresentadoras de antígeno “profissionais”, são capazes de processar antígenos e apresentar péptidos derivados destes à sua superfície de forma a estimular a proliferação de células T, específicas para esses antígenos [46]. Assim, a função dos eosinófilos como APC perante células T *naïve* requer a presença de moléculas do MHC classe II e de moléculas co-estimuladoras CD80 e CD86 [122].

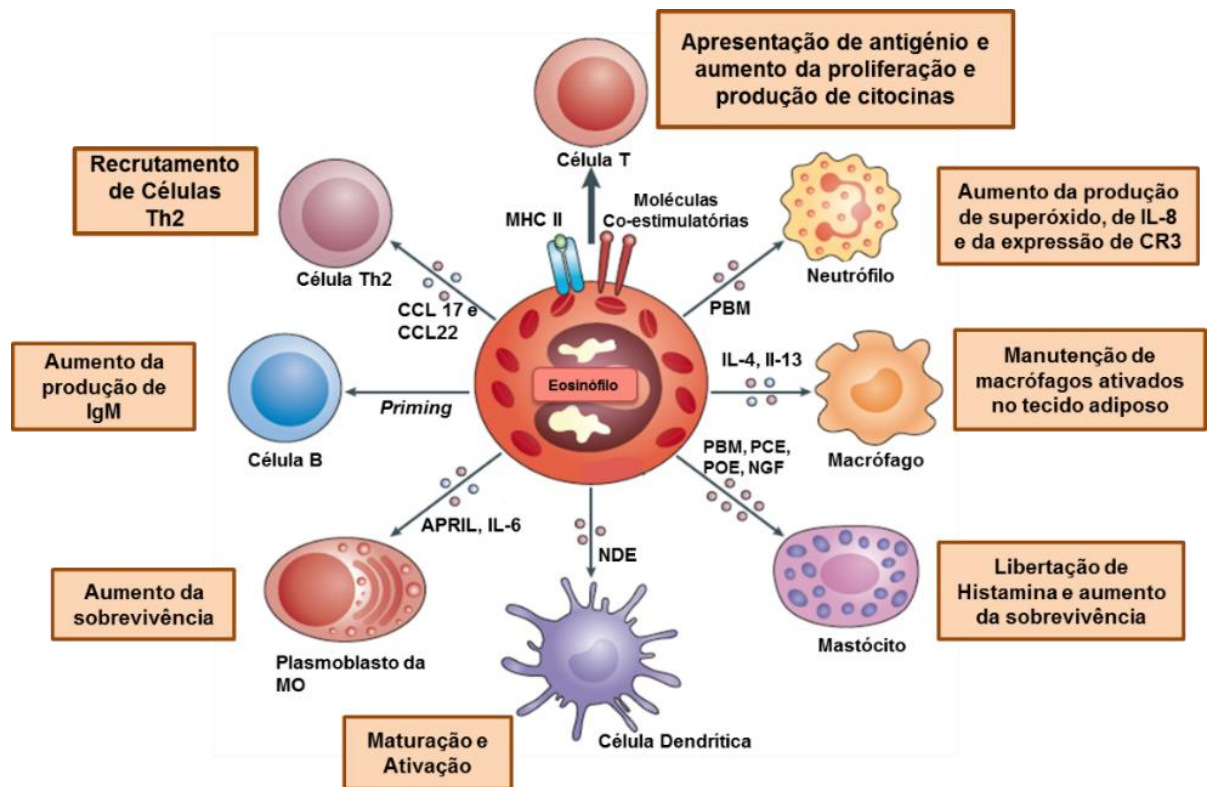
Os eosinófilos promovem também as respostas imunes humorais (produção de anticorpos), através do seu contributo no *priming* de células B, estimulando a produção de anticorpos IgM, específicos para um determinado antígeno [123]. Recentemente, estudos têm demonstrado que os eosinófilos têm um papel importante na homeostase e sobrevivência de células B tanto em ratinhos como em humanos. Em ratinhos, tem-se verificado que a produção de moléculas produzidas pelos eosinófilos, nomeadamente do ligando de indução de proliferação A (APRIL) e da IL-6, promovem o aumento da sobrevivência de plasmoblastos na MO [124]. Noutro estudo mais recente, verificou-se que em ratinhos hipereosinofílicos, transgênicos para a IL-5, o aumento de células B (linfocitose de células B) está dependente da presença de eosinófilos. Já em humanos, observou-se a presença de eosinófilos próximos de células B foliculares nos órgãos linfóides secundários e num ensaio, *in vitro*, verificou-se um aumento da proliferação de células B do SP, após estimulação/ativação, num meio enriquecido com eosinófilos [125].

A maturação, ativação, recrutamento e modulação da função das DCs são reguladas por mediadores derivados dos eosinófilos [126]. Tal como Yang *et.al.*, demonstraram no seu estudo, a NDE derivada dos grânulos eosinofílicos está envolvida na migração de DCs para os locais de inflamação e tem a capacidade de ativar estas mesmas células através da via de sinalização do TLR-2, potenciando a expressão de várias quimiocinas e citocinas inflamatórias, fatores de crescimento e recetores solúveis [118]. Mais recentemente, um estudo demonstrou que eosinófilos em co-cultura com DCs, na presença de dinucleótidos

CpG com moléculas de padrão molecular associadas a agentes patogênicos, promovem a maturação de DCs. Adicionalmente, este estudo mostrou que a indução da maturação das DCs pode estar também dependente da ação da PBM, outra proteína derivada dos grânulos eosinofílicos [127]. Assim, verifica-se o efeito imunoregulatório dos eosinófilos sobre as DCs.

Como já foi referido, os eosinófilos respondem a estímulos acionados pelos mastócitos ativados por IgE, contudo sabe-se que os mastócitos também respondem a estímulos enviados pelos eosinófilos, tendo sido descrito um eixo eosinófilo-mastócito, no qual estas duas células imunitárias estimulam e controlam as suas funções reciprocamente [116]. Os eosinófilos regulam as funções dos mastócitos através da libertação de proteínas dos grânulos (PBM, PCE e POE) e citocinas, ativando-os e promovendo a libertação de mediadores inflamatórios, como a histamina [128]. Em contrapartida, os mastócitos ativados libertam histamina, PGD-2, GM-CSF e TNF- $\alpha$ , que, por sua vez, ativam os eosinófilos [129]. Para além de estimular a libertação de histamina, os eosinófilos controlam a sua produção, nomeadamente através da síntese da enzima histaminase, que degrada a histamina, regulando a resposta inflamatória [130]. Além disso, proteases dos mastócitos, como a *chymase*, promovem a produção do *stem cell factor* (SCF) pelos eosinófilos, sendo que o SCF é um importante fator de crescimento dos mastócitos [131]. O *nerve growth factor* (NGF) secretado pelos eosinófilos também está envolvido no processo de diferenciação, crescimento e sobrevivências dos mastócitos [132]. Tais evidências mostram que existe uma sinalização bidirecional entre mastócitos e eosinófilos que envolve vários mediadores, contribuindo para sobrevivência destes dois leucócitos [94].

Evidências têm mostrado também o efeito imunoregulatório dos eosinófilos sobre outras células fagocitárias, nomeadamente os neutrófilos e os macrófagos [46]. A PBM libertada pelos eosinófilos tem a capacidade de se ligar aos neutrófilos, ativando-os e conduzindo à conseqüente secreção de IL-8 e geração de anião superóxido [133,134]. Através da produção das citocinas IL-4 e IL-13, os eosinófilos recrutam macrófagos, mantendo-os alternativamente ativados no tecido adiposo [135].



**Figura 8. Os eosinófilos modulam a função de outros leucócitos**, adaptado de [46]. **Legenda:** MHCII-complexo maior de histocompatibilidade, classe II; Th- células T *helper*, CCL- ligando de quimiocina-CC, APRIL- *A-proliferation-inducing*, IL- interleucina, NDE- neurotoxina derivada do eosinófilo, PBM- proteína básica maior, PCE- proteína catiónica eosinofílica, POE- peroxidase eosinofílica, NGF- *nerve growth factor*, MO- medula óssea.





# **Objetivos**

---



#### 4- Objetivos:

Nos últimos anos, vários estudos têm revelado a presença de eosinofilia periférica persistente em crianças/jovens após transplante hepático. A ocorrência deste tipo de desordem imunológica parece estar associada à terapêutica imunossupressora, nomeadamente com Tacrolimus, e vários estudos têm mostrado que este aumento de eosinófilos no SP estará relacionado com o aumento da disfunção do enxerto e consequente rejeição do mesmo. Contudo, a etiologia desta eosinofilia reativa e a sua relevância na função do enxerto hepático são ainda desconhecidos.

Desta forma, este estudo consistiu na análise de amostras de sangue periférico de crianças/jovens que foram submetidas a transplante hepático, divididas em dois grupos de acordo com a presença ou ausência de eosinofilia periférica, de forma a **verificar se o aumento de eosinófilos está associado a alterações numéricas e funcionais em outras células do sistema imune em circulação, promovendo uma eventual inflamação periférica que poderá estar na origem de disfunção do enxerto e consequente episódio de rejeição deste.**

Neste sentido foram objetivos específicos:

- A quantificação eosinófilos, basófilos, neutrófilos, monócitos (clássicos, não-clássicos e intermédios), células dendríticas plasmacitóides (pDC), células dendríticas mieloides (mDC), linfócitos (B e T);
- A caracterização fenotípica e a avaliação da expressão das moléculas membranares: CD14, CD15, CD16, CD33, CD45, CD123 e HLA-DR em eosinófilos, basófilos, neutrófilos, monócitos (clássicos, não-clássicos e intermédios), pDC e mDC;
- A quantificação e a avaliação da expressão da IgE ligada ao seu recetor membranares de alta-afinidade nos basófilos, monócitos, pDC e mDC;
- O estudo das várias subpopulações de Células-B em circulação: Imaturas ou Transicionais; B *naïve*; B memória e Plasmoblasto, e nestas duas últimas procedeu-se à quantificação das células que expressavam IgA, IgG e IgM;

- A quantificação de células Th/c produtoras de IL-17, TNF- $\alpha$ , IL-9, IFN $\gamma$ , IL-6 e IL-2 e de células *Natural Killer* (NK) (CD56<sup>dim</sup> e CD56<sup>brigt</sup>) produtoras de TNF- $\alpha$  e IFN $\gamma$ , após a ativação *in vitro* com PMA e Ionomicina.

# **Material e Métodos**



## 5 - Materiais e Métodos:

### 5.1. População em estudo

Este estudo consistiu na análise de **52** amostras de SP (tubo de 2 mL EDTA e tubo de 2mL Heparina) de crianças e jovens que foram submetidas a transplante hepático, entre Junho de 1999 e Maio de 2016, que estão a ser seguidos no Serviço de Hepatologia do Hospital Pediátrico pertencente ao Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra. A idade dos participantes varia entre os 9 meses e os 17 anos de idade ( $9,34 \pm 5,38$ ), sendo **24 (46,2%)** do sexo feminino e **28 (54,9%)** do sexo masculino. As crianças/jovens incluídas no estudo foram integradas em dois grupos de acordo com a presença ou ausência de eosinofilia reativa periférica (número absoluto de eosinófilos superior a 500 células/ $\mu$ L ou uma percentagem igual ou superior a 10% do total de leucócitos em duas contagens num intervalo de 3 meses), sendo que **35** apresentavam ausência de eosinofilia periférica (grupo **TRH com Eosinofilia**) e **17** presença de eosinofilia periférica (grupo **TRH sem Eosinofilia**) (Tabela 1).

**Tabela 1.** Caracterização quanto ao género e idade dos participantes incluídos nos dois grupos considerados (TRH sem Eosinofilia e TRH com Eosinofilia).

| GRUPO               | SEXO FEMININO | SEXO MASCULINO | IDADE (MÉDIA $\pm$ DESVIO PADRÃO) |
|---------------------|---------------|----------------|-----------------------------------|
| TRH SEM EOSINOFILIA | 45,7 % (n=16) | 54,3% (n=19)   | 9,9 $\pm$ 5,6                     |
| TRH COM EOSINOFILIA | 47,1 % (n=8)  | 52,9% (n=9)    | 8,2 $\pm$ 4,7                     |

### 5.2. Recolha de dados clínicos e bioquímicos

Com recurso a plataformas de informação clínica do Centro Hospitalar de Coimbra e Hospital Pediátrico de Coimbra, foram registados vários dados clínicos e bioquímicos referentes a cada doente participante no estudo. Os dados clínicos recolhidos incluíram a patologia de base que levou à necessidade de intervenção de um transplante hepático; o tempo de seguimento após transplante (data da transplantação); protocolo de imunossupressão em curso; episódios de rejeição e/ou disfunção de enxerto; positividade de autoanticorpos e presença de infeções víricas (sobretudo EBV e CMV); bacterianas ou fúngicas. Consideraram-se os valores bioquímicos das enzimas hepáticas AST; ALT, GGT;

fosfatase alcalina (FA); bilirrubina total e direta; a medida *standardizada* para análise do tempo de protrombina (controlo do nível de coagulação do sangue), o *INR* (*International Normalized Ratio*), os níveis da proteína-C reativa e do IgE total. A disfunção de enxerto foi definida através da informação clínica fornecida e pela observação de uma elevação (cerca de **duas vezes superior** ao valor de referência) das enzimas AST; ALT; GGT e FA.

Os doentes que foram submetidos a mais do que um transplante hepático e que apresentavam, na altura da análise da amostra de SP considerada, qualquer tipo de infeção e disfunção do enxerto foram excluídos do estudo. Os dados clínicos referentes aos participantes de cada grupo do estudo estão apresentados nas **Tabelas 2 e 3**.

**Tabela 2.** Dados clínicos referentes aos participantes (de cada grupo) do estudo: patologia de base (problema hepático que conduziu ao transplante); presença de autoanticorpos e tipo de dador do enxerto: Legenda: AVBEH - Atrésia das vias biliares extra-hepáticas; CIHF - Colestase intra-hepática familiar; ANA's - anticorpos antinucleares; NR- não-relacionado e R- relacionado.

| Dados Clínicos e Bioquímicos                  |                          | TRH sem Eosinofilia (n=35) | TRH com Eosinofilia (n=17)                 |
|---|--------------------------|----------------------------|--|
| Patologia de base /Indicação para transplante | AVBEH                    | 34,3% (n=12)               | 70,6% (n=12), Síndrome de Caroli 25% (n=3) |
|   | CIHF                     | 2,8% (n=1)                 | 5,9% (n=1)                                 |
|   | Colestase idiopática     | 0% (n=0)                   | 5,9% (n=1)                                 |
|   | Doenças metabólicas      | 27,8% (n=10)               | 11,8% (n=2)                                |
|   | Falência hepática aguda  | 11,1% (n=4)                | 0% (n=0)                                   |
|   | Cirrose 2ª ou idiopática | 11,1 % (n=4)               | 5,9% (n=1)                                 |
|   | Hepatite Autoimune       | 2,8% (n=1)                 | 0% (n=0)                                   |
|   | Síndrome de Budd-Chiari  | 2,8% (n=1)                 | 0% (n=0)                                   |
|   | Tumores hepáticos        | 5,6% (n=2)                 | 5,9% (n=1)                                 |
| Autoanticorpos                                | Negativos                | 71,4% (n=25)               | 70,6% (n=12)                               |
|   | ANA's positivos          | 8,3 (n=3)                  | 11,8% (n=2)                                |
|   | Sem informação           | 19,4% (n=7)                | 17,6% (n=3)                                |
| Tipo de dador                                 | Dador cadáver (NR)       | 55,6% (n=20)               | 52,9% (n=9)                                |
|   | Dador vivo (R)           | 22,9% (n=8)                | 17,6% (n=3)                                |
|   | Sem informação           | 19,4% (n=7)                | 29,4% (n=5)                                |



**Tabela 3.** Dados Clínicos referentes aos participantes de cada grupo do estudo: terapia imunossupressora em curso; presença de disfunção do enxerto, presença de infeções e nível de IgE e IgA no total no sangue periférico na altura em que a amostra de SP foi analisada. Legenda: PDN - Prednisolona (corticosteroide); AM - Ácido Micofenólico; AZA- Azatioprina; CSA - ciclosporina; SIR - Sirolimus; TAC - Tacrolimus; EVE - Everolimus.

| Dados Clínicos e Bioquímicos   | TRH sem Eosinofilia (n=35)                      | TRH com Eosinofilia (n=17)                                      |               |
|--|---|---|---------------|
| <b>Terapia Imunossupressora</b>  | <b>PDN (terapia imunossupressora adicional)</b> | 41,7 % (n=15)   | 58,8 % (n=10) |
|  | <b>AM</b>                                       | 13,9 % (n=5)  | 0 % (n=0)     |
|  | <b>AZA</b>                                      | 2,7 % (n=1)   | 0 % (n=0)     |
|  | <b>CSA</b>                                      | 5,5 % (n=2)   | 5,8 % (n=1)   |
|  | <b>SIR</b>                                      | 2,7 % (n=1)   | 0 % (n=0)     |
|  | <b>TAC</b>                                      | 51,4 % (n=18)   | 82,4 % (n=14) |
|  | <b>TAC + AM</b>                                 | 19,4 % (n=7)  | 5,8 % (n=1)   |
|  | <b>TAC + AZA</b>                                | 0 % (n=0)   | 5,8 % (n=1)   |
| <b>TAC + EVE</b>   | 2,7 % (n=1)                                     | 0 % (n=0)   |               |
| <b>Disfunção do enxerto</b>  | <b>Presença</b>                                 | 0 % (n=0)   | 0 % (n=0)     |
|  | <b>Ausência</b>                                 | 100 % (n=35)  | 100% (n=17)   |
| <b>Infeções víricas, bacterianas ou fúngicas</b>   | <b>Presença</b>                                 | 0 % (n=0)   | 0 % (n=0)     |
|  | <b>Ausência</b>                                 | 100 % (n=35)  | 100% (n=17)   |
| <b>[IgE] Total no SP (UI/mL)<br/>(doentes em que foi detetado do nível de IgE, n=15)</b> | 20% (n=7)<br>Média: 73 ± 39                     | 47,1% (n=8, todos medicados com Tacrolimus)<br>Média: 263 ± 352 |               |
| <b>[IgA] Total no SP (UI/mL)<br/>(doentes em que foi detetado do nível de IgA, n=19)</b> | 40% (n=14)<br>Média: 2,1±1,1                    | 29,4% (n=5)<br>Média: 2,1±0,7                                   |               |

### 5.3. Quantificação das várias populações leucocitárias e a sua caracterização fenotípica

A identificação das várias populações celulares e a avaliação da expressão das moléculas CD14, CD15, CD16, CD33, CD45, CD123, HLA-DR e de IgE ligada ao seu recetor membranar foram realizadas com recurso à técnica de citometria de fluxo (**Figura 9**). Para tal, realizou-se inicialmente a lavagem do SP para retirar o excesso de IgE do plasma e de seguida a marcação direta com anticorpos monoclonais, de acordo com o seguinte protocolo. Foram pipetados 200 µL de SP proveniente do tubo de EDTA fornecido. No tubo com os 200 µL SP pipetado, adicionou -se 2 mL de solução salina de fosfato (PBS, *Gibco, Life Technologies, Paisley, UK*), sendo depois a amostra centrifugada durante 5 minutos, a 1500G. Após a centrifugação, foi aspirado o sobrenadante com o recurso a uma pipete de

*Pasteur*, ficando apenas o *pellet* contendo as células de interesse. De seguida, procedeu-se à marcação da amostra com os anticorpos monoclonais (**Tubo 1**), apresentados na **Tabela 4**, sendo a amostra depois incubada a temperatura ambiente e com ausência de luz, durante 15 minutos. De seguida, efetuou-se a lise celular com 2mL de *FACS Lysing* (1x) (*FACS™ Lysing Solution; Becton Dickinson Biosciences, U.S.A.*), previamente diluído numa proporção de 1:10 em água destilada, durante 20 minutos à temperatura ambiente e com ausência de luz. Depois da incubação com o lisante realizou-se uma sequência de centrifugações (com uma duração de 5 minutos, a 1500G) seguida da decantação do sobrenadante, na qual a primeira foi ainda com a solução lisante e as restantes com 2 mL de PBS (2x). Após a última centrifugação o sobrenadante foi decantado e ressuspendeu-se o *pellet* com 500 mL de PBS (1X), sendo depois a amostra adquirida no citómetro de fluxo.

As populações leucocitárias estudadas foram: eosinófilos, basófilos, neutrófilos, células dendríticas plasmacitóides (pDC) e mieloides (mDC) e as várias subpopulações de monócitos (monócitos clássicos, monócitos intermédios e monócitos não-clássicos). Estas populações foram identificadas segundo o seu tamanho e complexidade e segundo a expressão diferencial dos vários marcadores mencionados anteriormente (**Figura 9**). Os eosinófilos apresentam maior tamanho e maior complexidade (granulosidade) e apresentam também uma elevada expressão de CD15 e uma expressão intermédia de CD123 e HLA-DR. Os neutrófilos são os leucócitos existentes em maior percentagem e revelam grandes expressões de CD15 e CD16. Os basófilos apresentam o fenótipo  $CD123^{high}/HLA-DR^{-}$  (representado no *dot plot* (A), da **Figura 10**), com elevada capacidade de ligar IgE. As pDC revelam o fenótipo  $CD123^{high}/HLA-DR^{high}$  (representado no *dot plot* (A), da **Figura 10**), enquanto as mDC apresentam uma expressão elevada de HLA-DR e grande capacidade de ligar IgE na sua membrana (representadas nos *dot plot* (A) e (B), da **Figura 10**). Os monócitos estão divididos em três principais classes: os clássicos, os intermédios e os não-clássicos, que foram identificados segundo a expressão diferencial de CD16 e CD14 (representadas no *dot plot* (D), da **Figura X**). Os monócitos clássicos ( $CD14^{++}/CD16^{-}$ ), subdividem-se em três subpopulações: a população  $CD15^{high}$  (monócitos clássicos mais maduros);  $CD15^{-}$  e a população  $IgE^{+}$  (população de monócitos com capacidade para ligar IgE na sua superfície celular, representa no *dot plot* (B) e no *dot plot* (C), da **Figura 10**). Os monócitos intermédios ( $CD16^{+}/CD14^{+}$ ) dividem-se em duas subpopulações: população

HLA-DR<sup>high</sup> (população com maior capacidade de apresentação de antígeno) e população HLA-DR<sup>+</sup>. E por último, os monócitos não-clássicos com o fenótipo CD16<sup>high</sup>/ CD14<sup>-</sup>).

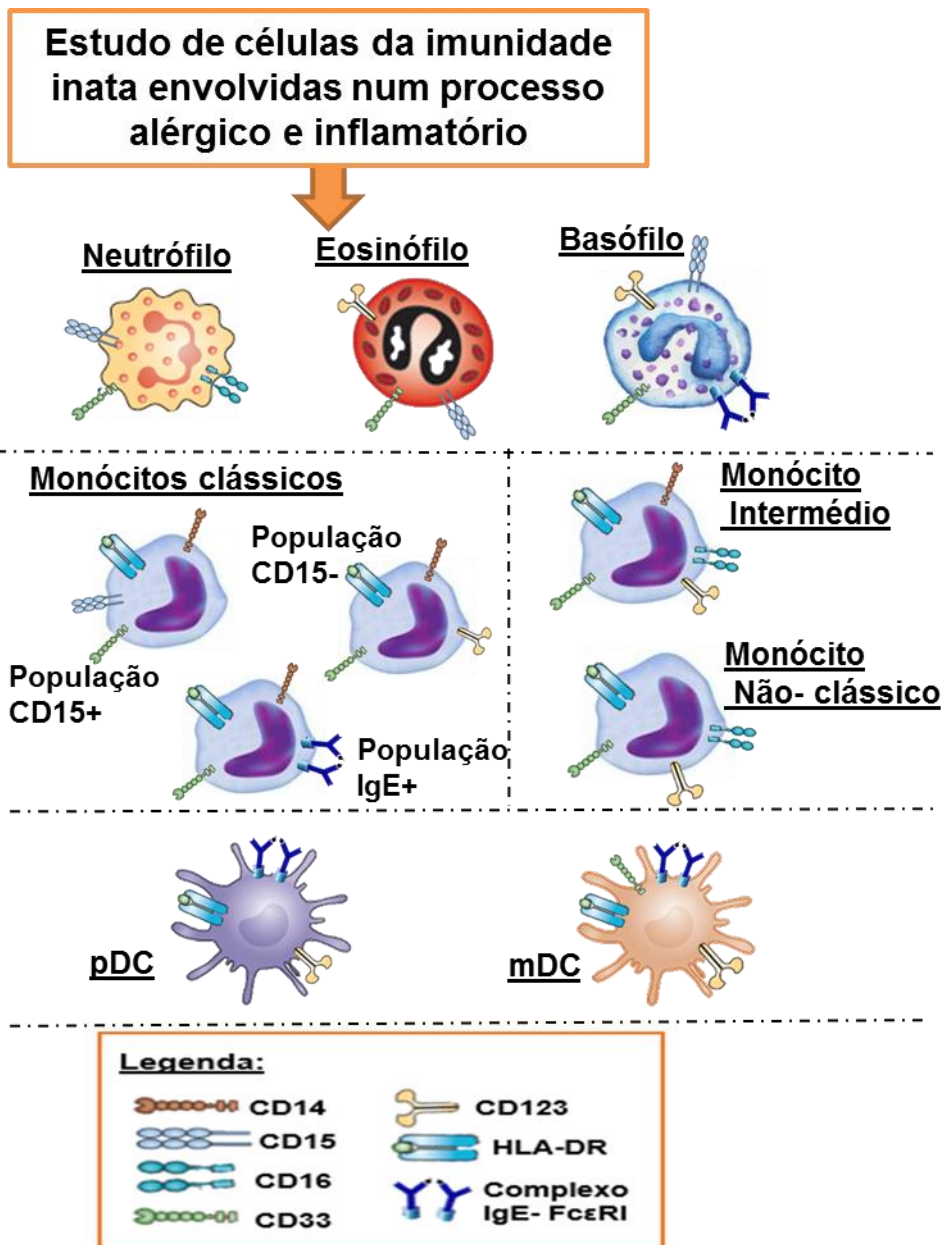
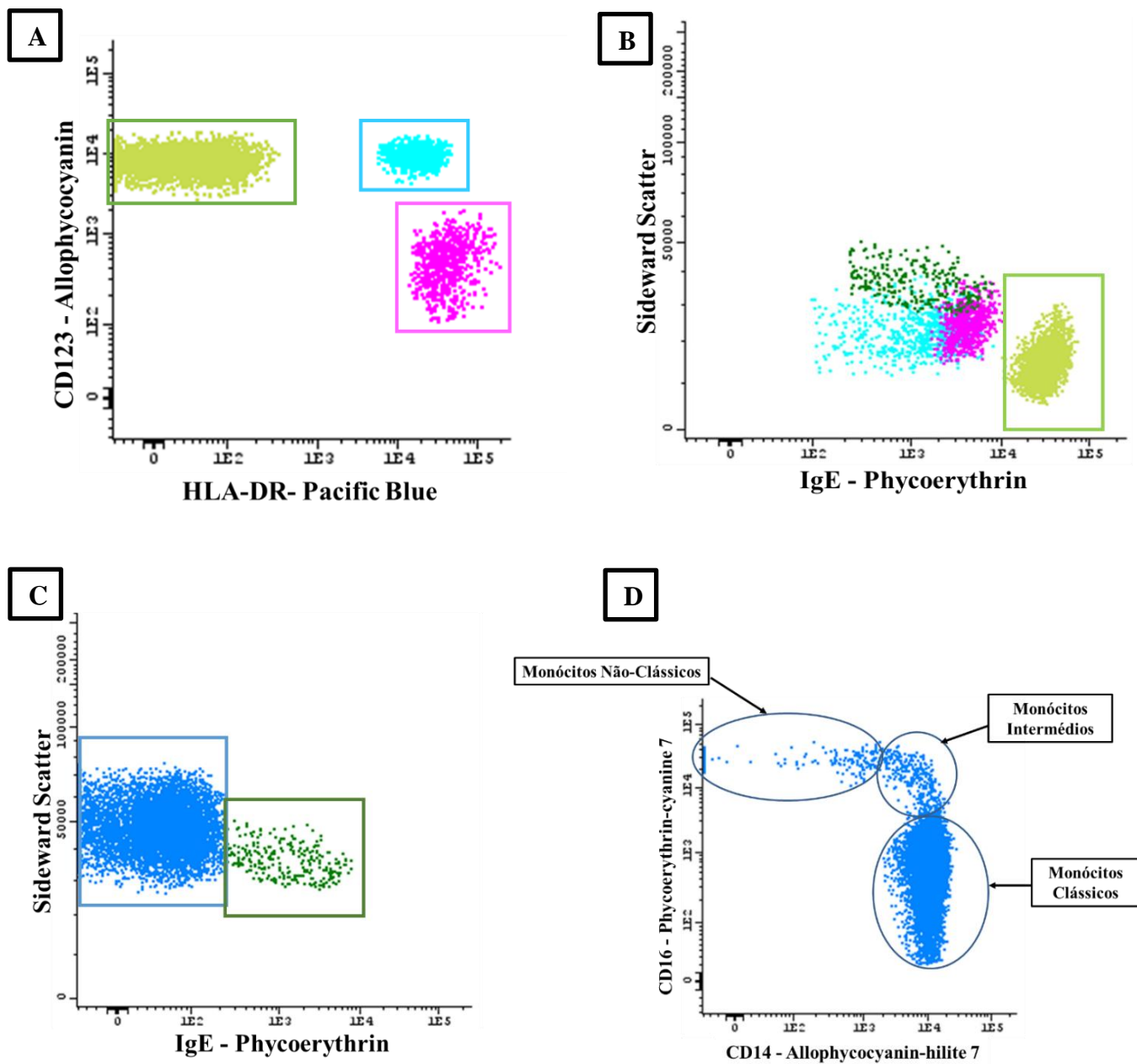


Figura 9. Esquema que ilustra as células da imunidade inata estudadas e as respectivas moléculas cuja expressão foi avaliada por citometria de fluxo. **Legenda:** pDC- células dendríticas plasmacitóide, mDC- células dendríticas mielóides, CD- *Cluster differentiation*, HLA-DR – antígeno leucocitário humano-DR, IgE- imunoglobulina E e FcεRI – receptor de alta-afinidade da imunoglobulina E.



**Figura 10.** Os vários *dot plot* bidimensionais que ilustram a determinação de algumas das populações leucitárias estudadas, por citometria de fluxo. (A). Identificação as populações leucitárias basófilos, células dendríticas plasmatóides (pDC) e células dendríticas mieloides (mDC) com base na expressão de CD123 e HLA-DR: a verde-claro os basófilos; a azul-ciano as pDC e rosa as mDC. (B). Identificação das populações leucitárias que expressam o receptor FcεRI: a verde-claro os basófilos; a azul-ciano as pDC; a rosa as mDC e verde-escuro a população de monócitos clássicos IgE+. (C). Identificação da população de monócitos IgE+: a azul a população total de monócitos clássicos e a verde-escuro a população de monócitos clássicos IgE+. (D). Identificação das várias subpopulações de monócitos com base na expressão de CD16 e CD14.

#### 5.4. Identificação e quantificação das várias subpopulações de Células B em circulação: Imaturas ou Transicionais, B *naïve*, B memória e Plasmoblasto

A identificação das várias subpopulações de Células B em circulação no SP foi realizada com base na expressão diferencial dos marcadores CD45, CD20, CD38, CD19, CD27, IgG, IgA e IgM (**Tubo 2 – Tabela 4 e Figura 11**), recorrendo à técnica de citometria de fluxo.

Desta forma, inicialmente foram pipetados 200 µL de SP para o tubo, procedeu-se a um ciclo de três lavagens com 2 mL de PBS cada, seguidas de centrifugação a 1500G, durante 5 minutos cada, para retirar o excesso de Igs contidas no plasma. Após as lavagens, adicionaram-se os marcadores membranares (CD45, CD20, CD38, CD19, CD27 e IgM) e colocou-se o tubo em incubação à temperatura ambiente e na ausência de luz, durante 15 minutos. De seguida, adicionou-se à amostra 100 µL de Solução A (*Fix & Perm Medium A, Life Technologies, USA*), com o objetivo de fixar as células já previamente marcadas com os anticorpos monoclonais membranares, e colocou-se o tubo novamente em incubação durante 15 minutos à temperatura ambiente e com ausência de luz. Depois, adicionou-se 2 mL de PBS, procedeu-se à centrifugação durante 5 minutos a 1500G e decantou-se o sobrenadante. Ao *pellet* acrescentou-se 100 µL de Solução B (*Fix & Perm Medium B, Life Technologies, USA*), de forma a lisar e permeabilizar as células, adicionando-se logo de seguida, os anticorpos monoclonais intracitoplasmáticos (IgA e IgG). O tubo foi incubado, novamente a temperatura ambiente e com ausência de luz, durante 15 minutos. Por último, procedeu-se a duas lavagens com PBS, seguidas de centrifugação a 1500G com uma duração de 5 minutos, decantando-se de seguida o sobrenadante e ressuspendendo o *pellet* com 500 µL de PBS para adquirir a amostra no citómetro de fluxo.

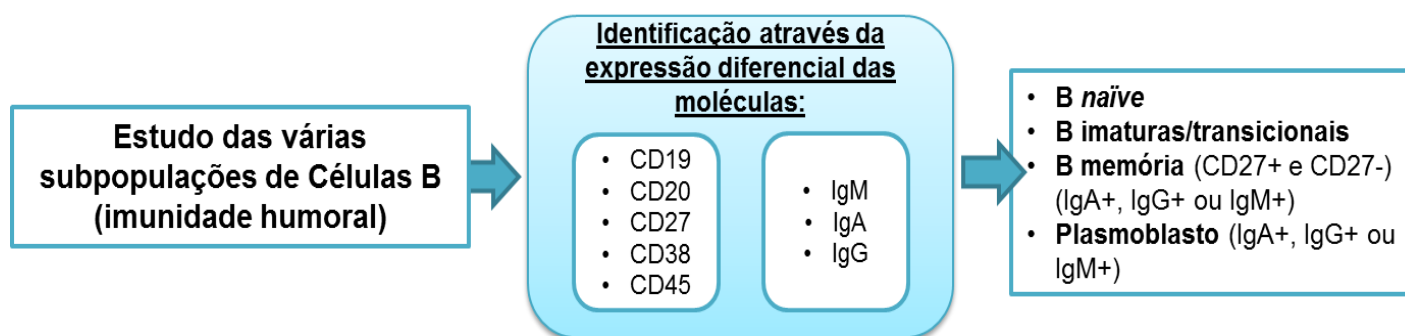
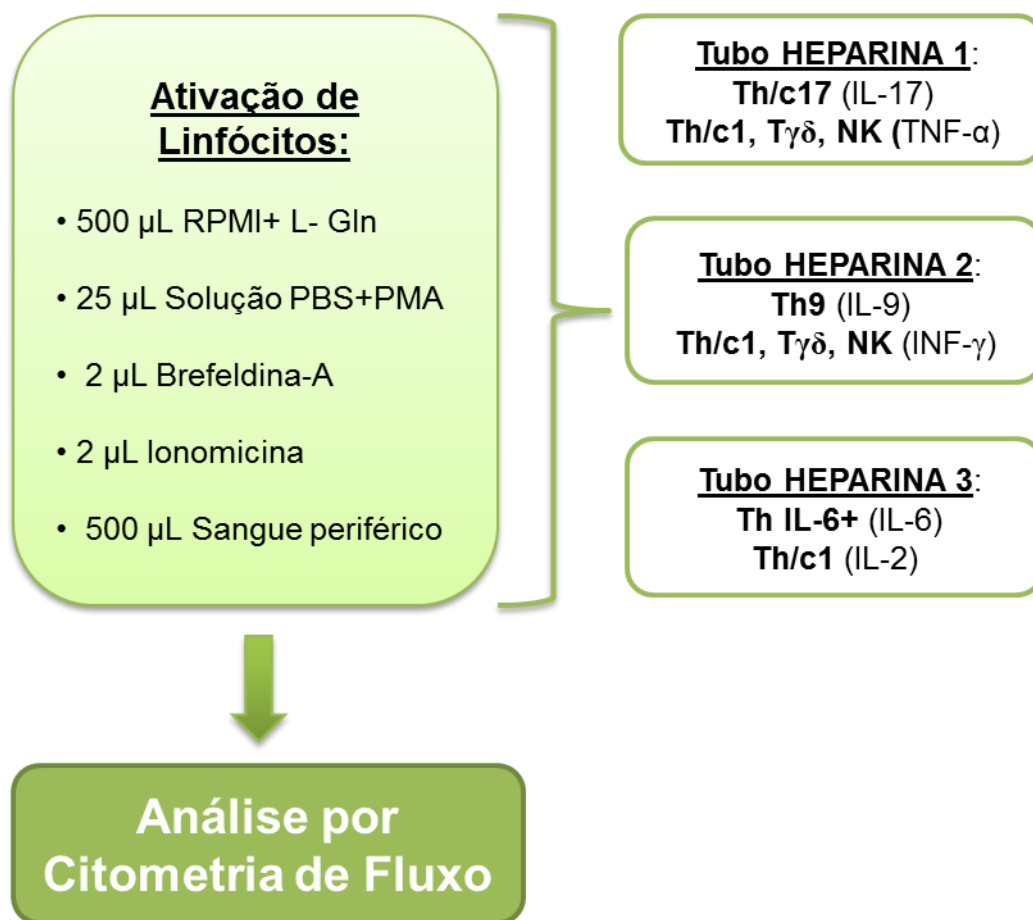


Figura 11. Esquema que ilustra as subpopulações de células B estudadas: B *naïve*, B imaturas/transicionais, B memória (CD27+, CD27-) totais e as células B memória que expressam IgA, IgG e IgM e plasmoblastos totais e plasmoblastos que expressam IgA, IgG e IgM, que foram analisadas por citometria de fluxo. **Legenda:** CD- Cluster Differentition, Ig- imunoglobulina.

## 5.5. Quantificação de subpopulações de Células T funcionais e avaliação da produção das citocinas IL-17, IL-9, IL-2, IL-6; TNF $\alpha$ e IFN $\gamma$

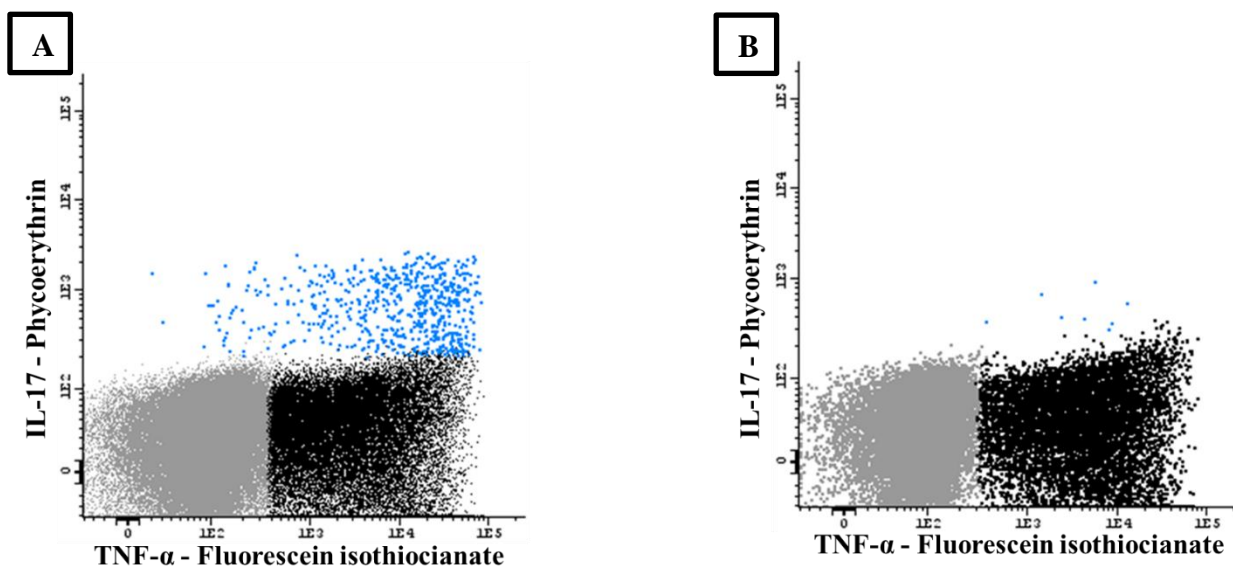
Com o objetivo de quantificar as subpopulações de células T funcionais Th/c17, Th/c1, Th9, Th produtoras de IL-6, T $\gamma\delta$  produtoras de TNF- $\alpha$ , IFN $\gamma$  e IL-2 e NK (CD56<sup>dim</sup> e CD56<sup>bright</sup>) produtoras de TNF- $\alpha$  e IFN $\gamma$ , bem como avaliar a produção das citocinas produzidas por estas, realizou-se a estimulação destas células *in vitro* (**Figura 12**). Para isso, juntou-se num tubo 500  $\mu$ L de uma solução RPMI *Medium* 1640 (1x) + GlutaMax<sup>TM</sup> (GIBCO, USA); 500  $\mu$ L de amostra de SP; 25  $\mu$ L de uma diluição de 1:100 de PMA (Phorbol 12-myristato 13 acetato; conc.0,1mg/mL; SIGMA,USA) (um potente ativador da proteína cinase C); 2  $\mu$ L de Ionomicina (*Calcium Salt From de Spetomyces conglobatus*; conc.0,5mg/mL; SIGMA, USA) (um ionóforo de Ca<sup>+</sup>) e 2  $\mu$ L de Brefeldina A de *Penicillium brefeldiamun* (conc.5mg/mL; SIGMA,USA) (um inibidor do transporte proteico do retículo endoplasmático para o aparelho de *Golgi*). Posteriormente, este tubo de ativação foi colocado numa estufa a 37° C, 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de humidade, durante 4 horas.

Após as 4 horas de incubação, pipetou-se 200  $\mu$ L da amostra de SP ativada para três tubos distintos (**Tubo 3.1; Tubo 3.2 e Tubo 3.3, Tabela 4**) e procedeu-se à marcação com os marcadores de superfície (CD3, CD4, CD8, CD20 e CD56) em cada tubo. De seguida, os tubos permaneceram durante 15 minutos em incubação, a uma temperatura ambiente e na ausência de luz e depois, foram adicionados 100  $\mu$ L de Solução A a cada um dos três tubos, voltando a ser incubados nas mesmas condições durante 15 minutos. Depois dos 15 minutos de incubação, adicionou-se 2 mL de PBS a cada um dos tubos e foram a centrifugar a 1500G durante 5 minutos. Posteriormente, decantou-se o sobrenadante e adicionou-se 100  $\mu$ L de Solução B ao *pellet* obtido, de forma a lisar e permeabilizar as células para, logo de seguida adicionar a cada um dos três tubos um conjunto de dois marcadores de citocinas intracitoplasmáticos: **Tubo 3.1** (IL-17 e TNF $\alpha$ ); **Tubo 3.2** (IL9 e IFN $\gamma$ ) e **Tubo 3.3** (IL-6 e IL-2). Depois da marcação, os tubos foram novamente a incubar nas mesmas condições descritas e de seguida foram adicionados 2 mL de PBS a cada um dos tubos para as lavagens finais. Por último, decantou-se o sobrenadante de cada tubo e ressuspendeu-se os *pellets* obtidos com 500  $\mu$ L, para, de seguida, adquirir as amostras no citómetro de fluxo.



**Figura 12.** Esquema que ilustra as subpopulações de células Te células NK estudadas: Th/c 1, Th/c17, Th9, Th produtoras de IL-6, T $\gamma$  $\delta$  produtoras de TNF- $\alpha$  e IFN $\gamma$  e células NK produtoras de TNF- $\alpha$  e IFN $\gamma$ , que foram analisadas por citometria de fluxo. **Legenda:** células NK- células *natural killer*, IL-interleucina, TNF- $\alpha$  – fator de necrose tumoral- alfa, e IFN $\gamma$  – interferão gama

Na **Figura 13**, estão representados o *dot plot* (A) e o *dot plot* (B) bidimensionais que ilustram a forma como foram identificadas a células Th/c17 e Th/c1 produtoras de TNF- $\alpha$ , respectivamente, que se assemelha à forma como foram identificados as restantes subpopulações de Células-T CD4+ (Th9, Th produtoras de IL-6 e Th1 produtoras de IFN- $\gamma$  e IL-2), CD8+ (Tc1 produtoras de IFN- $\gamma$  e IL-2),  $\gamma$  $\delta$  (produtoras de TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-2) e as Células NK (CD56<sup>bright</sup> e CD56<sup>dim</sup> produtoras de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ ).



**Figura 13.** Identificação das populações linfocitárias: (A) Th17 (representadas a azul) e Tc17 (representadas a preto) e (B) Th1 (representadas a azul) e Tc1 produtoras de TNF- $\alpha$  (representadas a preto).

## 5.6. Aquisição e análise por citometria de fluxo

A aquisição das amostras foi realizada num citómetro de fluxo *BD FACSCanto™ II*, (*BD Biosciences*; San José, CA, USA), usando o *software BD FACSDiva* (v6.1.2; BD). A análise dos resultados obtidos por citometria de fluxo foi realizada com recurso ao *software Infinicyt 1.8* (*Cytognos, S.L., Salamanca, Spain*).

## 5.7. Análise Estatística

De forma a determinar o significado estatístico das diferenças observadas entre os dois grupos em estudo foi realizado um teste estatístico não paramétrico de amostras independentes (Teste de Mann-Whitney), usando o *software Statistical Package for Social Sciences (SPSS, version 23.0, Armonk, NY, USA)*. Os resultados foram expressos através de gráficos no modelo *box-plot* e no modelo de barras e através da apresentação da percentagem média  $\pm$  desvio padrão, juntamente com a média do valor absoluto  $\pm$  desvio padrão das várias populações estudadas, sendo que as diferenças estatisticamente significativas foram consideradas quando o *p value*  $< 0,05$ . As linhas limite do *box-plot* representam o 1º quartil (25%) e o 3º quartil (75%); a linha a meio representa a mediana e as linhas verticais correspondem ao intervalo de 95% de confiança.



**Tabela 4.** Combinação dos anticorpos monoclonais em oito fluorescências e respetiva especificidade e fonte comercial do reagente para os cinco tubos em estudo.

| <b>Fluorescências</b>   | <b>Tubo 1</b>   | <b>Tubo 2</b>   | <b>Tubo 3.1</b>   | <b>Tubo 3.2</b>   | <b>Tubo 3.3</b>  |
|---|---|---|---|---|--|
| <b>APC<br/>(Allophycocyanin)</b>                                    | <b>CD123</b> (clone AC145, Miltenyi Biotec, Cologne, Germany) | <b>IgM</b> (clone G 20-127) , BD Pharmingen, Biosciences, USA)    | <b>CD20</b> (clone L27 , BD Biosciences, USA)                                 | <b>CD20</b> (clone L27 , BD Biosciences, USA)                                 | -  |
| <b>APC H7<br/>(Allophycocyanin-hilite 7)</b>                        | <b>CD14</b> (clone MΦP9, BD Biosciences, USA)                 | <b>CD38</b> (clone HB7 , BD Biosciences, USA)                     | <b>CD8</b> (clone SK1, BD Biosciences, USA)                                   | <b>CD8</b> (clone SK1, BD Biosciences, USA)                                   | <b>CD8</b> (clone SK1, BD Biosciences, USA)                      |
| <b>FITC<br/>(Fluorescein isothiocyanate)</b>                        | <b>CD15</b> (clone MMA, BD Biosciences, USA)                  | <b>cyIgG</b> (clone G18-145) , BD Pharmingen, Biosciences, USA)   | <b>TNF<math>\alpha</math></b> (clone Mab11 , BD Pharmingen, Biosciences, USA) | <b>IFN-<math>\gamma</math></b> (clone 4S.B3, BD Pharmingen, Biosciences, USA) | <b>IL-2</b> (clone MQ1-17H12) , BD Pharmingen, Biosciences, USA) |
| <b>PB<br/>(Pacific Blue)</b>  | <b>HLA-DR</b> (clone L243, BD Biosciences, USA)               | <b>CD20</b> (clone L27, BD Biosciences, USA)                      | <b>CD4</b> (clone MOPC-21, BD Horizon, Biosciences, USA)                      | <b>CD4</b> (clone MOPC-21, BD Horizon, Biosciences, USA)                      | <b>CD4</b> (clone MOPC-21, BD Horizon, Biosciences, USA)         |
| <b>PE<br/>(Phycoerythrin)</b>                                       | <b>IgE</b> (clone BE5, EXBIO, Praha, Czech Republic)          | <b>cyIgA</b> (clone IS11-8E10, Miltenyi Biotec, Cologne, Germany) | <b>IL-17</b> (clone SCPL1362, BD Pharmingen, Biosciences, USA)                | <b>IL-9</b> (clone MH9A3, BD Pharmingen, Biosciences, USA)                    | <b>IL-6</b> (clone MQ2-6A3), BD Pharmingen, Biosciences, USA)    |
| <b>PE Cy7<br/>(Phycoerythrin-cyanine 7)</b>                         | <b>CD16</b> (clone 3G8) , BD Pharmingen, Biosciences, USA)    | <b>CD19</b> (clone J3-119), Beckman Coulter, USA)                 | <b>CD56</b> (clone N901 (NKH-1), Beckman Coulter, USA)                        | <b>CD56</b> (clone N901 (NKH-1), Beckman Coulter, USA)                        | -  |
| <b>PerCp Cy 5.5<br/>(Peridinin chlorophyll protein-cyanine 5.5)</b> | <b>CD33</b> (clone P67.6, BD Biosciences, USA)                | <b>CD27</b> (clone L128, BD Biosciences, USA)                     | <b>CD3</b> (clone SK7, BD Biosciences, USA)                                   | <b>CD3</b> (clone SK7, BD Biosciences, USA)                                   | <b>CD3</b> (clone SK7, BD Biosciences, USA)                      |
| <b>PO<br/>(Pacific Orange)</b>                                      | <b>CD45</b> (clone H130, BD Biosciences, USA)                 | <b>CD45</b> (clone H130, BD Biosciences, USA)                     | -   | -   | -  |



# **Resultados**

---



## 6 – Resultados

De forma a verificar se o aumento de eosinófilos induz alterações numéricas e funcionais em outras células do sistema imune em circulação, analisaram-se amostras de SP de crianças e jovens que foram submetidos a transplante hepático, agrupadas em dois grupos segundo a presença ou ausência de eosinofilia periférica: grupo TRH sem eosinofilia (n=35) e grupo TRH com eosinofilia (n=17). Desta forma, procedeu-se ao estudo de diferentes populações leucocitárias: eosinófilos, basófilos, neutrófilos, monócitos, pDC, mDC, as várias subpopulações de linfócitos B (imaturas, B *naïve*, B memória e plasmoblasto), algumas subpopulações de linfócitos T (Th/c 17, Th/c1, Th9, Th produtoras de IL-6 e T $\gamma\delta$  produtoras de TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-2) e Células NK (CD56<sup>brigh</sup> e CD56<sup>dim</sup>).

### 6.1. Populações leucocitárias estudadas (eosinófilos, basófilos, neutrófilos, monócitos, pDC e mDC) e a sua caracterização fenotípica

Na quantificação dos eosinófilos, basófilos, neutrófilos, monócitos (clássicos, não-clássicos e intermédios), pDC e mDC, verificou-se apenas um aumento significativo da percentagem e valor absoluto de eosinófilos no grupo TRH C/Eosinofilia ( $p = 0,000$  para ambos os parâmetros). Os valores de percentagem e valor absoluto, bem como a média de intensidade de fluorescência (MIF) referente a cada molécula membranar estudada nestes vários tipos celulares estão apresentados nas **Tabela 5** e **Tabela 6**.

#### 6.1.1. Expressão dos vários marcadores membranares e do IgE ligado ao recetor membranar de alta-afinidade em Eosinófilos, Basófilos, Neutrófilos, Monócitos, pDC e mDC

Relativamente à expressão dos vários marcadores membranares estudados e da IgE ligada ao seu recetor, dada pelos valores de MIF correspondentes, nas populações celulares anteriormente mencionadas, observamos no grupo TRH C/ Eosinofilia um **aumento da expressão de CD123** (recetor para a IL-3, IL-3R $\alpha$ ) nos eosinófilos (**Figura 14**), um **aumento de CD16** (recetor para a fração constante da cadeia pesada da IgG de baixa-afinidade (Fc $\gamma$ RIII)) nos neutrófilos (**Figura 15**), um **aumento da IgE ligada ao seu recetor de alta-afinidade** nos basófilos ((**A**), **Figura 16**), pDC ((**B**), **Figura 16**), mDC ((**C**), **Figura 16**) e na população de monócitos clássicos IgE+ ((**D**), **Figura 16**) e um **aumento da expressão de HLA-DR** (molécula de MHC de classe II) (**Figura 17**) nos monócitos clássicos. Apesar de não se observar um aumento estatisticamente

significativo da expressão do HLA-DR nas restantes subpopulações de monócitos clássicos, constata-se a existência de uma forte tendência para o aumento desta expressão nas subpopulações CD15<sup>-</sup> e IgE<sup>+</sup> no grupo TRH C/Eosinofilia ( $p=0,055$  e  $p= 0,056$ ).

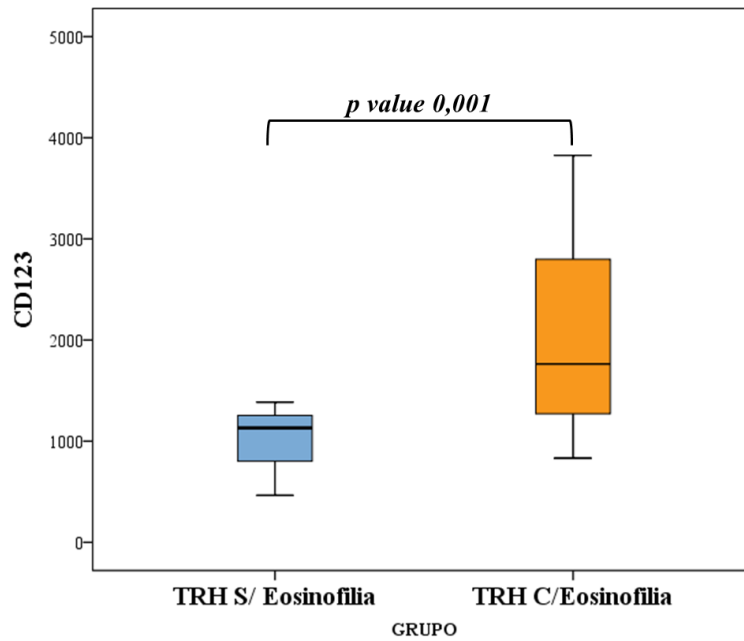
**Tabela 5.** Quantificação (% e valor absoluto, representados pela média  $\pm$  desvio padrão) do total de leucócitos e de eosinófilos, basófilos, neutrófilos, monócitos, células dendríticas plasmacitóides (pDC), células dendríticas mieloides (mDC) e linfócitos totais. Expressão dos receptores membranares envolvidos na maturação e ativação das populações celulares consideradas, dada pela intensidade média de fluorescência, representada pela média ( $\pm$  desvio padrão). Os valores estatisticamente significativos estão a azul. Valor de significância estatística dado pelo p value, calculado através do **Teste de Mann-Whitney**, sendo considerado estatisticamente significativo quando o  $p < 0,05$ .

|                                     |                       | TRH s/Eosinofilia | TRH c/Eosinofilia  | Teste de Mann-Whitney ( $p < 0,05$ ) |
|-------------------------------------|-----------------------|-------------------|--------------------|--------------------------------------|
| <b>Valor absoluto de Leucócitos</b> |                       | 7473 $\pm$ 3656   | 9159 $\pm$ 3323    | <b>0,037</b>                         |
| <b>Eosinófilos</b>                  | <b>%</b>              | 2,60 $\pm$ 1,66   | 10,49 $\pm$ 4,96   | <b>0,000</b>                         |
|                                     | <b>Valor absoluto</b> | 185 $\pm$ 107     | 899 $\pm$ 404      | <b>0,000</b>                         |
|                                     | <b>MIF CD15</b>       | 19693 $\pm$ 10445 | 20127 $\pm$ 10611  | 0,984                                |
|                                     | <b>MIF CD123</b>      | 1147 $\pm$ 544    | 1841 $\pm$ 862     | <b>0,001</b>                         |
|                                     | <b>MIF CD33</b>       | 1633 $\pm$ 1326   | 2317 $\pm$ 2306    | 0,851                                |
| <b>Basófilos</b>                    | <b>%</b>              | 0,55 $\pm$ 0,44   | 0,56 $\pm$ 0,34    | 0,734                                |
|                                     | <b>Valor absoluto</b> | 37 $\pm$ 22       | 45 $\pm$ 24        | 0,200                                |
|                                     | <b>MIF CD15</b>       | 367 $\pm$ 376     | 285 $\pm$ 160      | 0,976                                |
|                                     | <b>MIF CD123</b>      | 27202 $\pm$ 19777 | 29522 $\pm$ 23532  | 0,950                                |
|                                     | <b>MIF CD33</b>       | 1469 $\pm$ 1108   | 1859 $\pm$ 1458    | 0,278                                |
|                                     | <b>MIF IgE</b>        | 19721 $\pm$ 15978 | 46451 $\pm$ 28380  | <b>0,001</b>                         |
| <b>Neutrófilos</b>                  | <b>%</b>              | 48,54 $\pm$ 14,79 | 41,32 $\pm$ 13,50  | 0,101                                |
|                                     | <b>Valor absoluto</b> | 3615 $\pm$ 1664   | 3578 $\pm$ 1194    | 0,992                                |
|                                     | <b>MIF CD15</b>       | 54952 $\pm$ 21243 | 50436 $\pm$ 21801  | 0,231                                |
|                                     | <b>MIF CD16</b>       | 81289 $\pm$ 38477 | 111673 $\pm$ 43781 | <b>0,033</b>                         |
|                                     | <b>MIF CD33</b>       | 442 $\pm$ 240     | 539 $\pm$ 231      | 0,287                                |
| <b>pDC</b>                          | <b>%</b>              | 0,16 $\pm$ 0,11   | 0,14 $\pm$ 0,08    | 0,682                                |
|                                     | <b>Valor absoluto</b> | 12 $\pm$ 13       | 13 $\pm$ 8         | 0,350                                |
|                                     | <b>MIF CD123</b>      | 28112 $\pm$ 12877 | 25122 $\pm$ 14477  | 0,349                                |
|                                     | <b>MIF IgE</b>        | 761 $\pm$ 1014    | 3280 $\pm$ 4382    | <b>0,029</b>                         |
|                                     | <b>MIF HLA-DR</b>     | 19592 $\pm$ 8686  | 19056 $\pm$ 6861   | 0,857                                |
| <b>mDC</b>                          | <b>%</b>              | 0,26 $\pm$ 0,16   | 0,24 $\pm$ 0,15    | 0,897                                |
|                                     | <b>Valor absoluto</b> | 18 $\pm$ 14       | 21 $\pm$ 19        | 0,310                                |
|                                     | <b>MIF CD123</b>      | 2154 $\pm$ 2416   | 2300 $\pm$ 2867    | 0,787                                |
|                                     | <b>MIF CD33</b>       | 3884 $\pm$ 2478   | 3476 $\pm$ 2237    | 0,719                                |
|                                     | <b>MIF IgE</b>        | 2645 $\pm$ 3792   | 8356 $\pm$ 8794    | <b>0,022</b>                         |
|                                     | <b>MIF HLA-DR</b>     | 38279 $\pm$ 14203 | 39006 $\pm$ 14800  | 0,764                                |
| <b>Linfócitos (população total)</b> | <b>%</b>              | 40,72 $\pm$ 14,16 | 40,79 $\pm$ 14,22  | 0,905                                |
|                                     | <b>Valor absoluto</b> | 3128 $\pm$ 2653   | 4044 $\pm$ 2670    | 0,143                                |

**Tabela 6.** Quantificação (% e valor absoluto, representados pela média  $\pm$  desvio padrão) da população total de monócitos e das suas várias subpopulações de monócitos estudadas: monócitos clássicos (população CD15+, população CD15- e população IgE+), monócitos intermédios (população HLA-DR ++ e população HLA-DR+) e monócitos não-clássicos. Expressão dos recetores membranares envolvidos na maturação e ativação das populações celulares consideradas, dada pela intensidade média de fluorescência, representada pela média ( $\pm$  desvio padrão). Os valores estatisticamente significativos estão a azul e os valores próximos do valor estatisticamente significativo estão a negrito. Valor de significância estatística dado pelo *p value*, calculado através do **Teste de Mann-Whitney**, sendo considerado estatisticamente significativo quando o *p* <0,05.

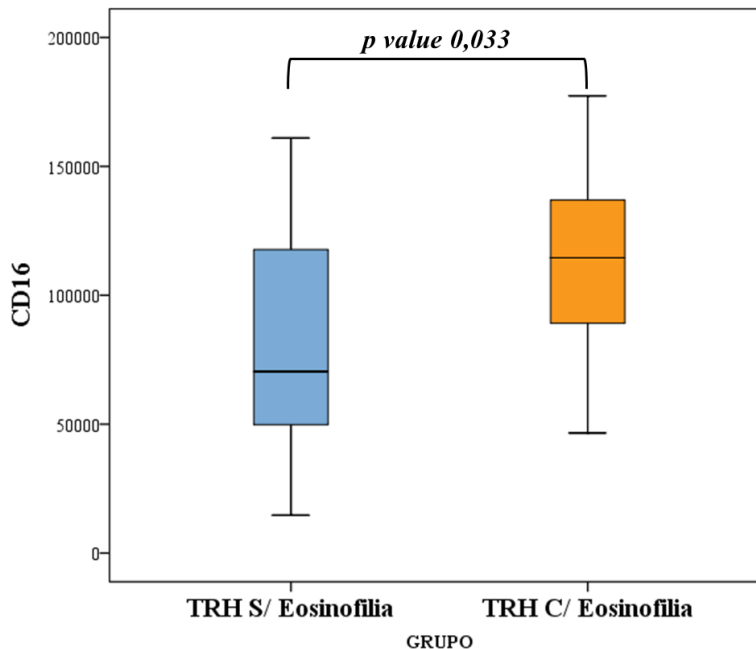
|  |                | TRH s/Eosinofilia | TRH c/Eosinofilia | Teste de Mann-Whitney ( <i>p</i> <0,05) |
|--|----------------|-------------------|-------------------|---|
| <b>Monócitos (população total)</b>           | %              | 7,18 $\pm$ 3,30   | 6,42 $\pm$ 3,03   | 0,523                                   |
|  | Valor absoluto | 504 $\pm$ 278     | 559 $\pm$ 300     | 0,424                                   |
| <b>Monócitos Clássicos</b>                   | %              | 90,87 $\pm$ 14,05 | 91,14 $\pm$ 5,49  | 0,246                                   |
|  | Valor absoluto | 460 $\pm$ 270     | 504 $\pm$ 270     | 0,455                                   |
| <b>Monócitos-Clássicos (pop.CD16-/CD15+)</b> | %              | 68,00 $\pm$ 17,61 | 74,71 $\pm$ 10,13 | 0,174                                   |
|  | Valor absoluto | 311 $\pm$ 187     | 382 $\pm$ 232     | 0,282                                   |
|  | MIF CD15       | 2672 $\pm$ 1860   | 1804 $\pm$ 888    | 0,110                                   |
|  | MIF CD14       | 9961 $\pm$ 4166   | 10842 $\pm$ 5035  | 0,734                                   |
|  | MIF CD33       | 4116 $\pm$ 2619   | 4684 $\pm$ 2888   | 0,526                                   |
|  | MIF HLA-DR     | 7868 $\pm$ 2946   | 10563 $\pm$ 4112  | <b>0,011</b>                            |
| <b>Monócitos-Clássicos (pop.CD16-/CD15-)</b> | %              | 32,00 $\pm$ 17,60 | 25,29 $\pm$ 10,13 | 0,174                                   |
|  | Valor absoluto | 149 $\pm$ 134     | 121 $\pm$ 65      | 0,959                                   |
|  | MIF CD14       | 10079 $\pm$ 4217  | 10763 $\pm$ 4856  | 0,780                                   |
|  | MIF CD33       | 3976 $\pm$ 2719   | 4890 $\pm$ 2953   | 0,362                                   |
|  | MIF HLA-DR     | 15216 $\pm$ 5895  | 18225 $\pm$ 5279  | <b>0,055</b>                            |
| <b>Monócitos- Clássicos (pop. IgE+)</b>      | %              | 5,68 $\pm$ 4,31   | 5,30 $\pm$ 3,72   | 0,645                                   |
|  | Valor absoluto | 26 $\pm$ 20       | 28 $\pm$ 19       | 0,636                                   |
|  | MIF CD14       | 7851 $\pm$ 3679   | 8439 $\pm$ 4514   | 0,690                                   |
|  | MIF CD123      | 911 $\pm$ 358     | 1227 $\pm$ 723    | 0,272                                   |
|  | MIF CD33       | 4708 $\pm$ 3118   | 5042 $\pm$ 2846   | 0,582                                   |
|  | MIF IgE        | 1125 $\pm$ 1365   | 2334 $\pm$ 2143   | <b>0,011</b>                            |
|  | MIF HLA-DR     | 20032 $\pm$ 10188 | 23469 $\pm$ 7716  | <b>0,056</b>                            |
| <b>Monócitos Intermédios</b>                 | %              | 6,26 $\pm$ 13,21  | 6,39 $\pm$ 5,37   | 0,231                                   |
|  | Valor absoluto | 20 $\pm$ 14       | 27 $\pm$ 22       | 0,545                                   |
| <b>Monócitos Intermédios (DR++)</b>          | %              | 56,05 $\pm$ 14,07 | 62,03 $\pm$ 14,38 | 0,145                                   |
|  | Valor absoluto | 10 $\pm$ 6        | 17 $\pm$ 16       | 0,248                                   |
|  | MIF CD16       | 16689 $\pm$ 9264  | 16371 $\pm$ 6827  | 0,889                                   |
|  | MIF CD14       | 7667 $\pm$ 3340   | 7597 $\pm$ 3956   | 0,590                                   |
|  | MIF CD123      | 2710 $\pm$ 2511   | 3221 $\pm$ 2568   | 0,519                                   |
|  | MIF CD33       | 3710 $\pm$ 2395   | 4088 $\pm$ 2407   | 0,572                                   |
| <b>Monócitos Intermédios (DR+)</b>           | %              | 43,95 $\pm$ 14,07 | 38,50 $\pm$ 14,27 | 0,174                                   |
|  | Valor absoluto | 8 $\pm$ 6         | 11 $\pm$ 10       | 0,581                                   |
|  | MIF CD16       | 19965 $\pm$ 11583 | 19911 $\pm$ 13091 | 0,749                                   |
|  | MIF CD14       | 6603 $\pm$ 3776   | 7274 $\pm$ 5169   | 0,968                                   |
|  | MIF CD123      | 2630 $\pm$ 2560   | 3541 $\pm$ 3288   | 0,771                                   |
|  | MIF CD33       | 3205 $\pm$ 2047   | 3752 $\pm$ 2596   | 0,797                                   |
| <b>Monócitos Não- Clássicos</b>              | %              | 2,91 $\pm$ 2,69   | 2,42 $\pm$ 1,99   | 0,689                                   |
|  | Valor absoluto | 15 $\pm$ 18       | 12 $\pm$ 13       | 0,992                                   |
|  | MIF CD16       | 32617 $\pm$ 14597 | 31074 $\pm$ 15122 | 0,719                                   |
|  | MIF CD123      | 2651 $\pm$ 1688   | 5530 $\pm$ 4629   | 0,072                                   |
|  | MIF CD33       | 2246 $\pm$ 1487   | 2545 $\pm$ 1581   | 0,572                                   |
|  | MIF HLA-DR     | 20369 $\pm$ 8376  | 23495 $\pm$ 8404  | 0,215                                   |

### Expressão de CD123 em Eosinófilos



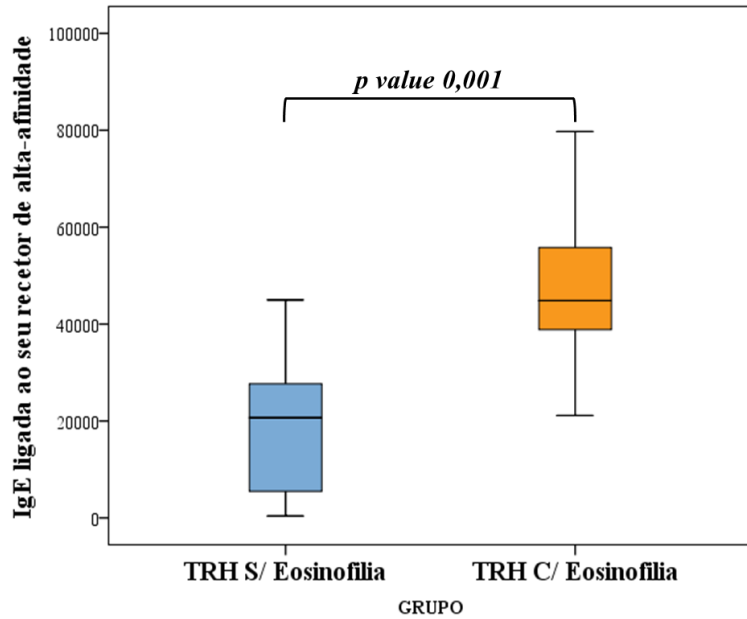
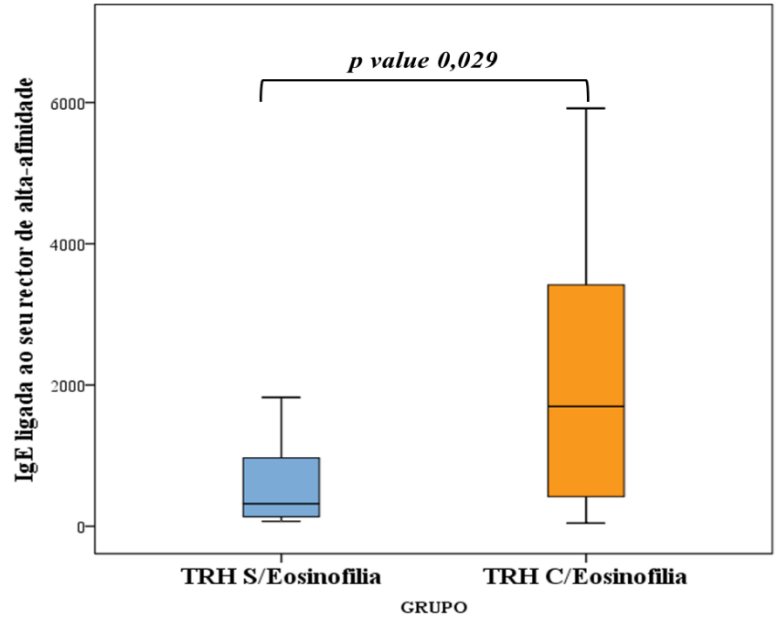
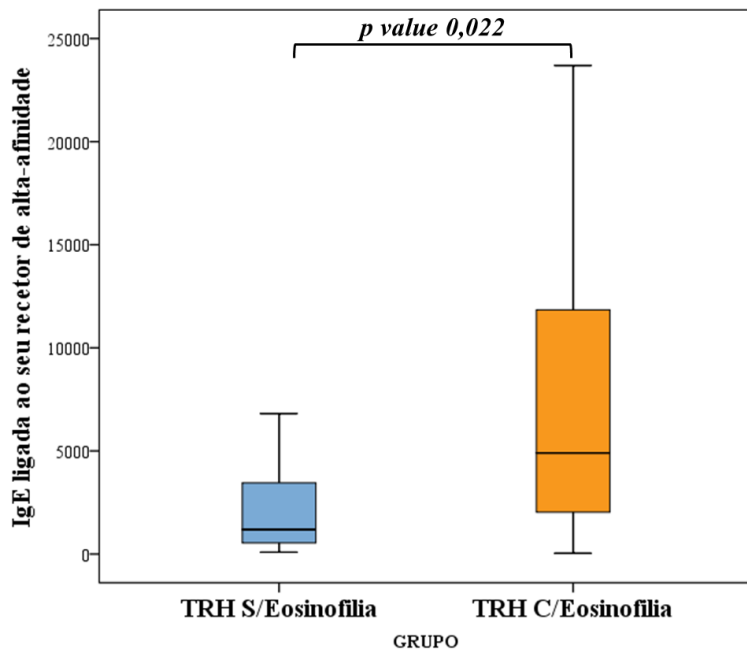
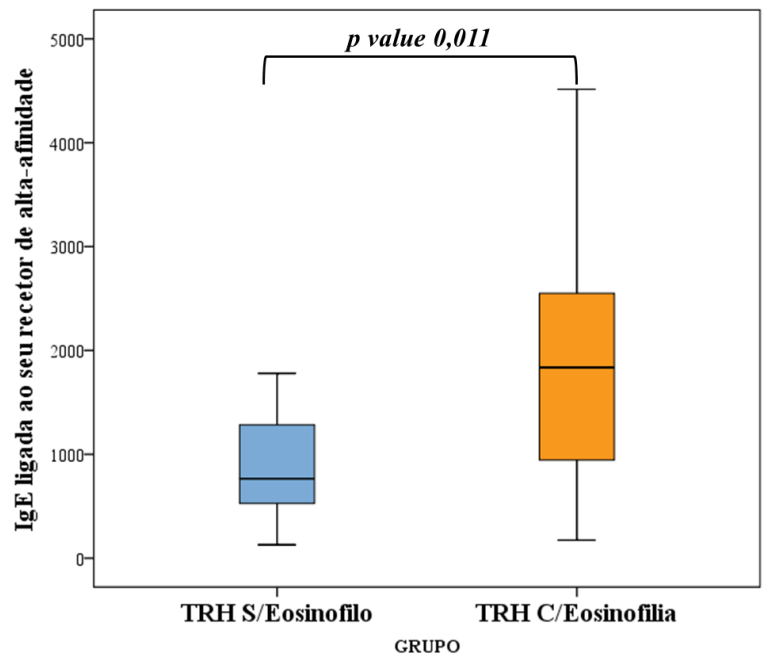
**Figura 14.** Gráfico da expressão de CD123 em eosinófilos, dada pela média de intensidade de fluorescência (MIF). Valor de significância estatística dado pelo *p value*, calculado através do **Teste de Mann-Whitney**, sendo considerado estatisticamente significativo quando o  $p < 0,05$ . As linhas limite do box-plot representam o 1º quartil (25%) e o 3º quartil (75%); a linha a meio representa a mediana e as linhas verticais correspondem ao intervalo de 95% de confiança.

### Expressão de CD16 em Neutrófilos

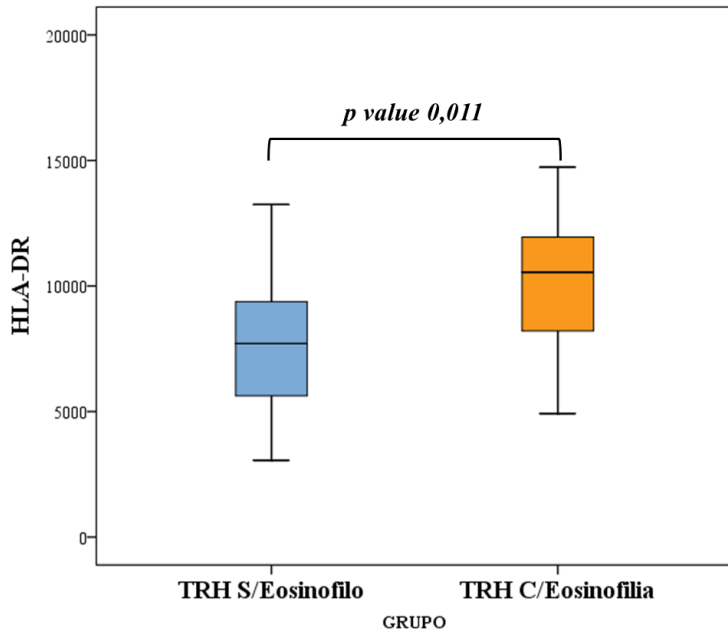
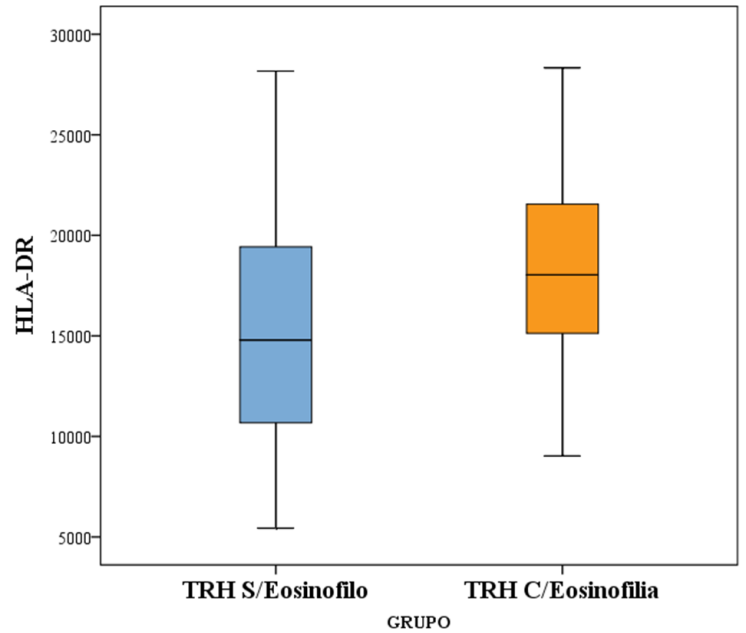
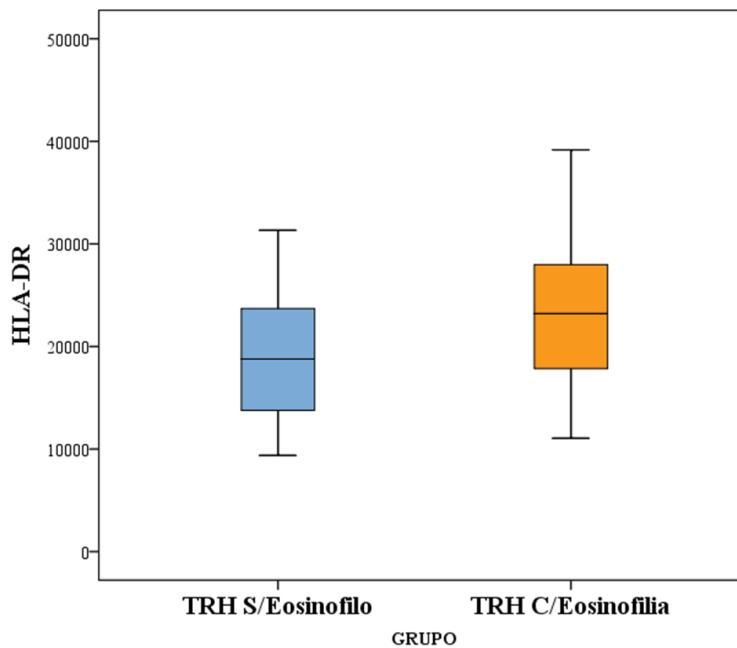


**Figura 15.** Gráfico da expressão de CD16 em neutrófilos, dado pela média de intensidade de fluorescência (MIF). Valor de significância estatística dado pelo *p value*, calculado através do **Teste de Mann-Whitney**, sendo considerado estatisticamente significativo quando o  $p < 0,05$ . As linhas limite do box-plot representam o 1º quartil (25%) e o 3º quartil (75%); a linha a meio representa a mediana e as linhas verticais correspondem ao intervalo de 95% de confiança.



**A****IgE ligada ao FcεRI em Basófilos****B****IgE ligada ao FcεRI em pDC****C****IgE ligada ao FcεRI em mDC****D****IgE ligada ao FcεRI na população de Monócitos Clássicos IgE+**

**Figura 16.** Gráficos que representam o IgE ligado ao recetor membranal de alta-afinidade em basófilos (A), células dendríticas plasmacitóides (pDC) (B), células dendríticas mieloides (mDC) (C) e na subpopulação de monócitos clássicos IgE+ (D), dado pelo valor da média de intensidade de fluorescência (MIF). Valor de significância estatística dado pelo p value, calculado através do **Teste de Mann-Whitney**, sendo considerado estatisticamente significativo quando o  $p < 0,05$ . As linhas limite do box-plot representam o 1º quartil (25%) e o 3º quartil (75%); a linha a meio representa a mediana e as linhas verticais correspondem ao intervalo de 95% de confiança.

**A****Expressão de HLA-DR na população de Monócitos Clássicos CD15+****B****Expressão de HLA-DR na população de Monócitos Clássicos CD15-****C****Expressão de HLA-DR na população de Monócitos Clássicos IgE+**

**Figura 17.** Gráfico da expressão de HLA-DR nas populações de monócitos clássicos, dada pela média de intensidade de fluorescência (MIF). (A). Gráfico da expressão de HLA-DR na população de monócitos CD15+. (B). Gráfico da expressão de HLA-DR na população de monócitos CD15- (próximo do valor estatisticamente significativo,  $p=0,055$ ). (C). Gráfico de expressão de HLA-DR na população de monócitos IgE+ (próximo do valor estatisticamente significativo ( $p=0,056$ )). Valor de significância estatística dado pelo p value, calculado através do **Teste de Mann-Whitney**, sendo considerado estatisticamente significativo quando o  $p < 0,05$ . As linhas limite do box-plot representam o 1º quartil (25%) e o 3º quartil (75%); a linha a meio representa a mediana e as linhas verticais correspondem ao intervalo de 95% de confiança.

## 6.2. Subpopulações de Linfócitos B em circulação

Na identificação e quantificação das subpopulações de Células B em circulação (com valor absoluto aumentado no grupo com eosinofilia,  $p=0,013$ ), verificou-se apenas

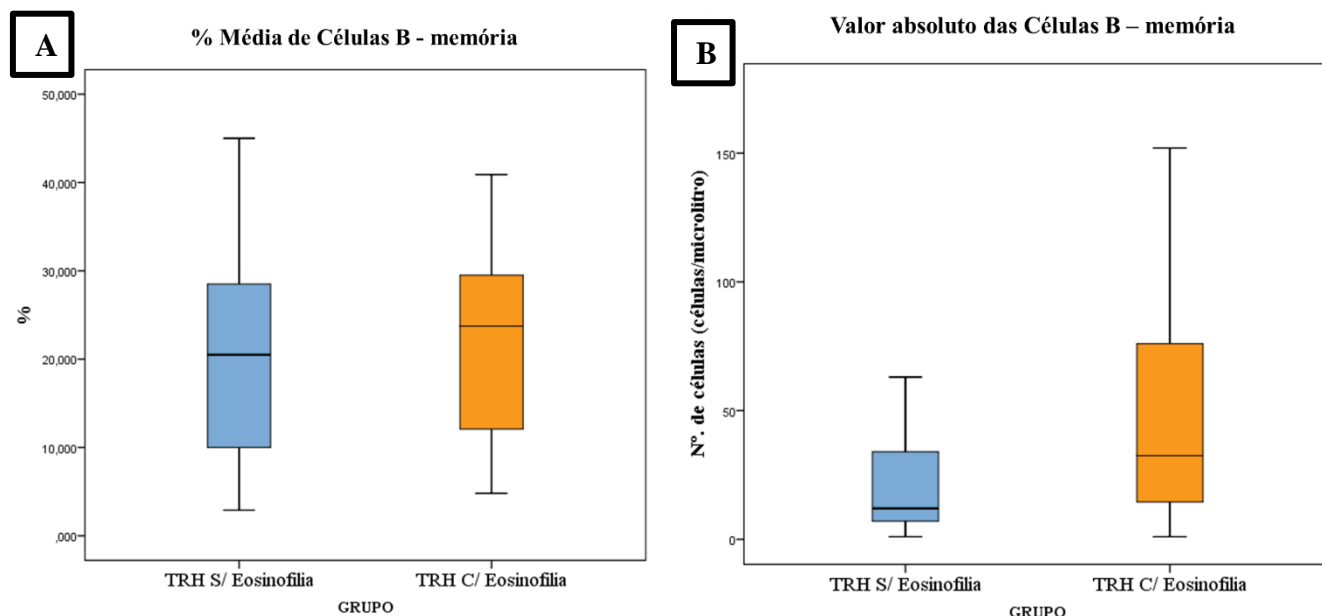
um **aumento** estatisticamente significativo do número de Células B *naïve* por microlitro ( $p=0,012$ ), da percentagem e do valor absoluto de plasmoblastos ( $p=0,014$  e  $p=0,017$ , respetivamente) e na percentagem de células B-memória CD27+ que produzem IgA ( $p=0,009$ ), no grupo TRH C/Eosinofilia. Todos os resultados obtidos: percentagem média ( $\pm$  desvio padrão) e valor absoluto médio ( $\pm$  desvio padrão) referentes a todas as subpopulações de Células B estudadas estão representados na **Tabela 7**.

**Tabela 7.** Quantificação (% e valor absoluto, representados pela média ( $\pm$  desvio padrão)) dos linfócitos-B (população total) e das várias subpopulações de linfócitos-B: Imaturas ou Transicionais, B-*naïve*, B- memória (população total, população CD27+ e população CD27-) e Plasmoblasto. Quantificação (%) Células B-memórias (CD27+ e CD27-) e Plasmoblastos que produzem as imunoglobulinas IgA, IgG e IgM. Os valores estatisticamente significativos estão assinalados a azul. Valor de significância estatística dado pelo *p value*, calculado através do **Teste de Mann-Whitney**, sendo considerado estatisticamente significativo quando o  $p < 0,05$ .

|   |                | TRH s/Eosinofilia | TRH c/Eosinofilia | Teste de Mann-Whitney ( $p < 0,05$ ) |
|---|----------------|-------------------|-------------------|--------------------------------------|
| <b>Linfócitos-B (total)</b>               | %              | 3,69 $\pm$ 3,04   | 4,60 $\pm$ 2,37   | 0,130                                |
|   | Valor absoluto | 97 $\pm$ 104      | 226 $\pm$ 209     | <b>0,013</b>                         |
| <b>Células B-imaturas (transicionais)</b> | %              | 13,38 $\pm$ 9,44  | 12,46 $\pm$ 7,58  | 0,943                                |
|   | Valor absoluto | 11 $\pm$ 13       | 15 $\pm$ 14       | 0,085                                |
| <b>Células B-naïve</b>                    | %              | 62,15 $\pm$ 18,69 | 59,35 $\pm$ 14,03 | 0,526                                |
|   | Valor absoluto | 60 $\pm$ 71       | 126 $\pm$ 115     | <b>0,012</b>                         |
| <b>Células B-memória (Total)</b>          | %              | 22,01 $\pm$ 15,72 | 21,75 $\pm$ 11,71 | 0,633                                |
|   | Valor absoluto | 24,44 $\pm$ 29,12 | 50,87 $\pm$ 53,27 | <b>0,061</b>                         |
|   | % IgA          | 17,73 $\pm$ 8,16  | 22,89 $\pm$ 8,31  | <b>0,066</b>                         |
|   | % IgG          | 40,36 $\pm$ 16,30 | 35,22 $\pm$ 18,29 | 0,399                                |
|   | % IgM          | 38,92 $\pm$ 20,06 | 35,33 $\pm$ 21,56 | 0,405                                |
| <b>Células B-memória (CD27+)</b>          | %              | 78,62 $\pm$ 12,60 | 75,63 $\pm$ 15,30 | 0,570                                |
|   | Valor absoluto | 18,71 $\pm$ 21,70 | 36,44 $\pm$ 38,01 | 0,077                                |
|   | % IgA          | 13,11 $\pm$ 8,04  | 22,25 $\pm$ 12,18 | <b>0,009</b>                         |
|   | % IgG          | 27,22 $\pm$ 10,68 | 25,97 $\pm$ 15,02 | 0,626                                |
|   | % IgM          | 59,60 $\pm$ 16,47 | 51,77 $\pm$ 18,33 | 0,118                                |
| <b>Células B-memórias (CD27-)</b>         | %              | 21,33 $\pm$ 12,62 | 24,37 $\pm$ 15,30 | 0,570                                |
|   | Valor absoluto | 5,71 $\pm$ 8,61   | 14,56 $\pm$ 18,59 | 0,088                                |
|   | % IgA          | 32,31 $\pm$ 18,59 | 40,16 $\pm$ 19,15 | <b>0,071</b>                         |
|   | % IgG          | 63,99 $\pm$ 19,82 | 58,81 $\pm$ 20,53 | 0,167                                |
| <b>Plasmoblasto</b>                       | %              | 1,50 $\pm$ 1,29   | 4,15 $\pm$ 3,55   | <b>0,014</b>                         |
|   | Valor absoluto | 3 $\pm$ 5         | 10 $\pm$ 12       | <b>0,017</b>                         |
|   | % IgA          | 37,12 $\pm$ 16,58 | 47,92 $\pm$ 10,79 | <b>0,047</b>                         |
|   | % IgG          | 17,87 $\pm$ 12,03 | 17,43 $\pm$ 13,61 | 0,911                                |
|   | % IgM          | 36,30 $\pm$ 18,60 | 31,19 $\pm$ 19,64 | 0,381                                |

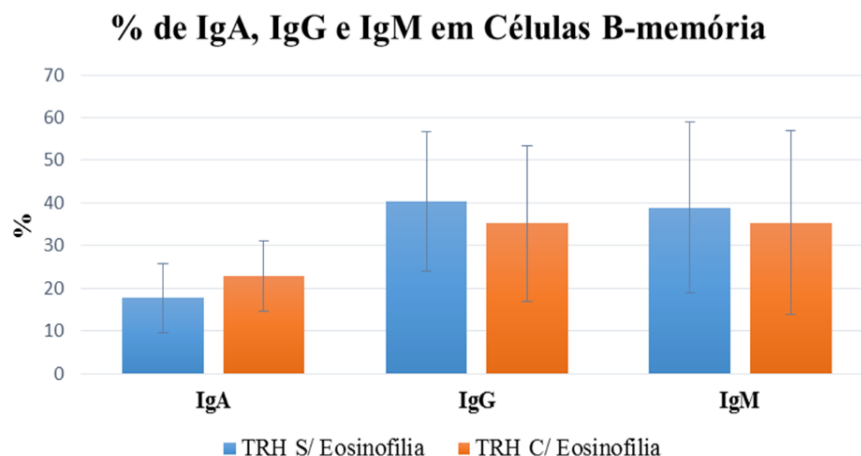
### 6.2.1. Células B-memória e quantificação das células que expressam IgA, IgG e IgM

Tal como pode ser observado nos gráficos da **Figura 18**, na quantificação de Células B-memória (% **(A)**) e valor absoluto (**(B)**) não se verificou qualquer alteração estatisticamente significativa, apesar de se verificar uma tendência para o aumento do número de Células-B memória por microlitro no grupo TRH C/Eosinofilia.



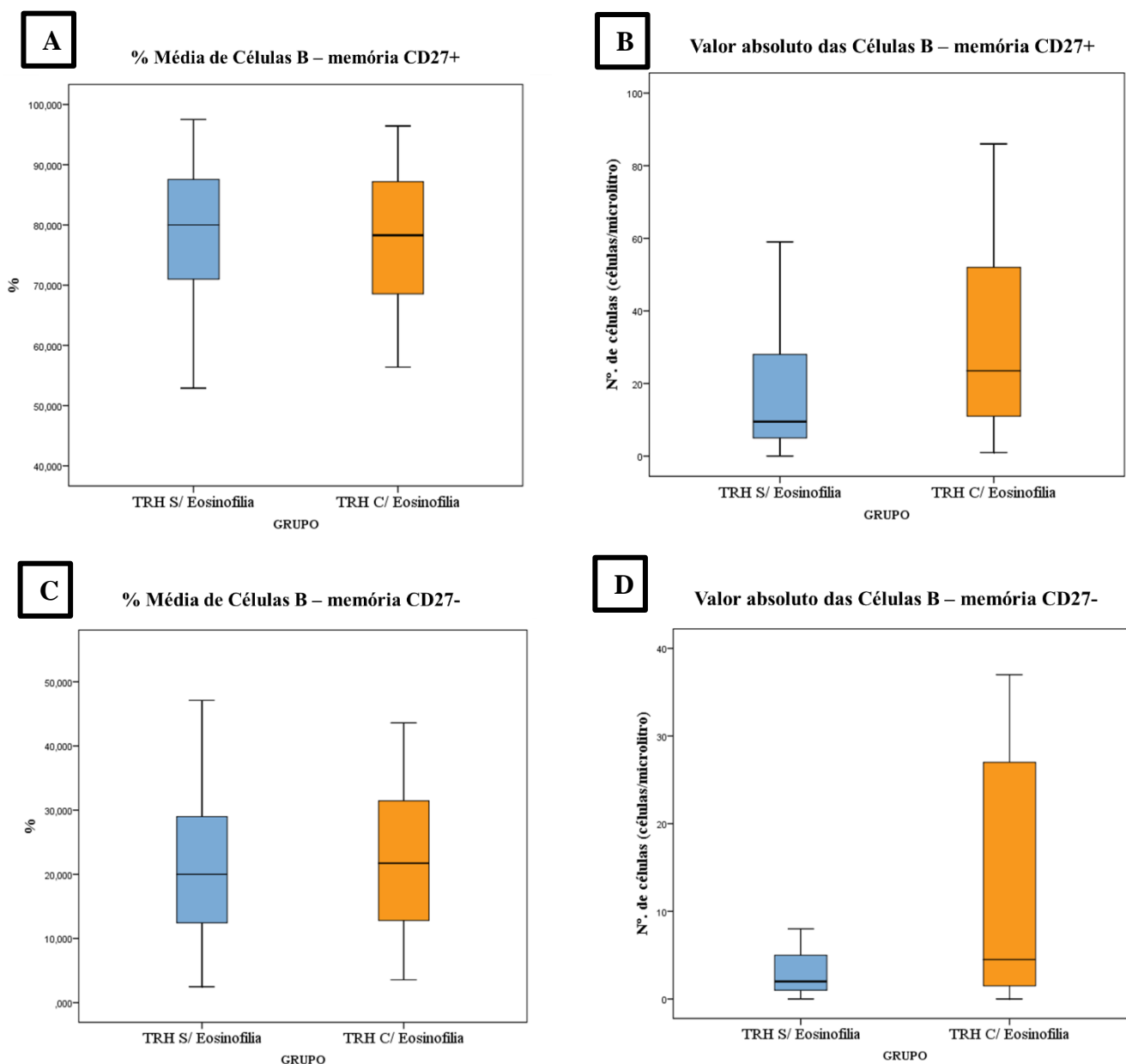
**Figura 18.** Gráficos da percentagem **(A)** e valor absoluto (nº. de células/microlitro) **(B)** de Células B-memória (população total).

Embora não existam alterações significativas entre as percentagens de células B-memória que expressam IgA, IgG e IgM, verifica-se que em ambos os grupos existe maior proporção de células B-memória a expressar IgG e IgM do que células B-memória a expressar IgA (**Figura 19**). Contudo, observou-se que as células B memória dos doentes com eosinofilia expressavam mais IgA do que os doentes sem eosinofilia.



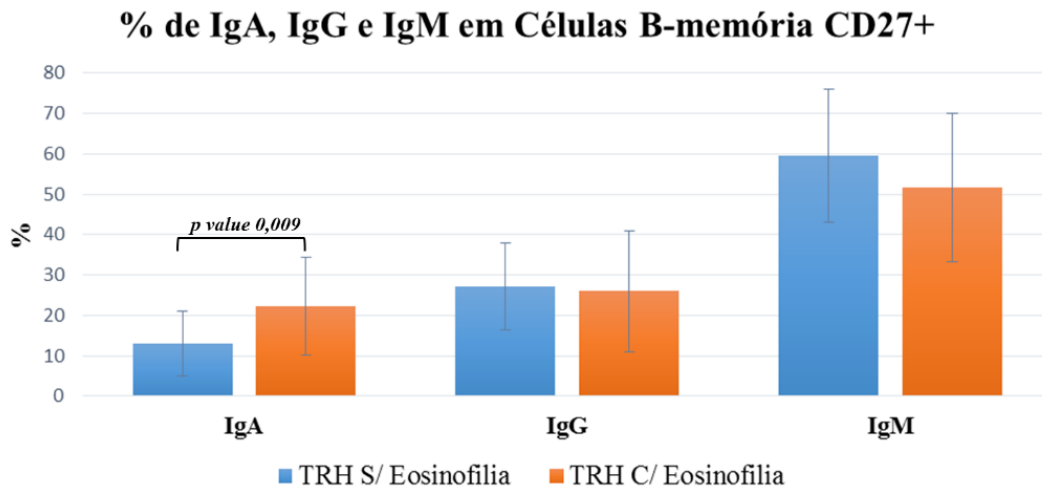
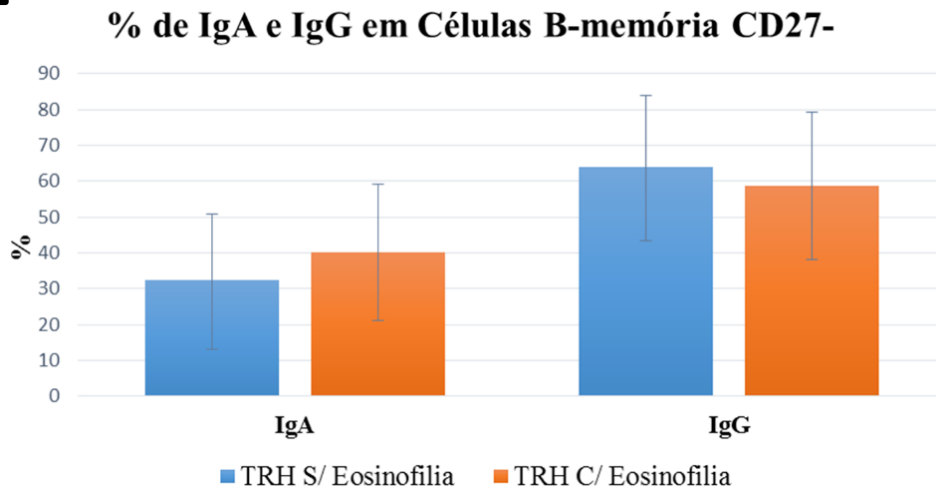
**Figura 19.** Gráfico da percentagem de Células B-memória que expressam imunoglobulinas IgA, IgG e IgM. Contudo, no caso da percentagem de células-B memória produtoras de IgA, o valor está próximo da significância ( $p=0,061$ ).

Tendo em atenção os gráficos da **Figura 20** constata-se que também não existem diferenças estatisticamente significativas na % e VA nas duas subpopulações de Células-B memória (CD27+ e CD27-) entre os dois grupos do estudo.



**Figura 20.** Gráficos das percentagens médias e valores absolutos das células B-memória CD 27+ (A e B) e CD27- (C e D).

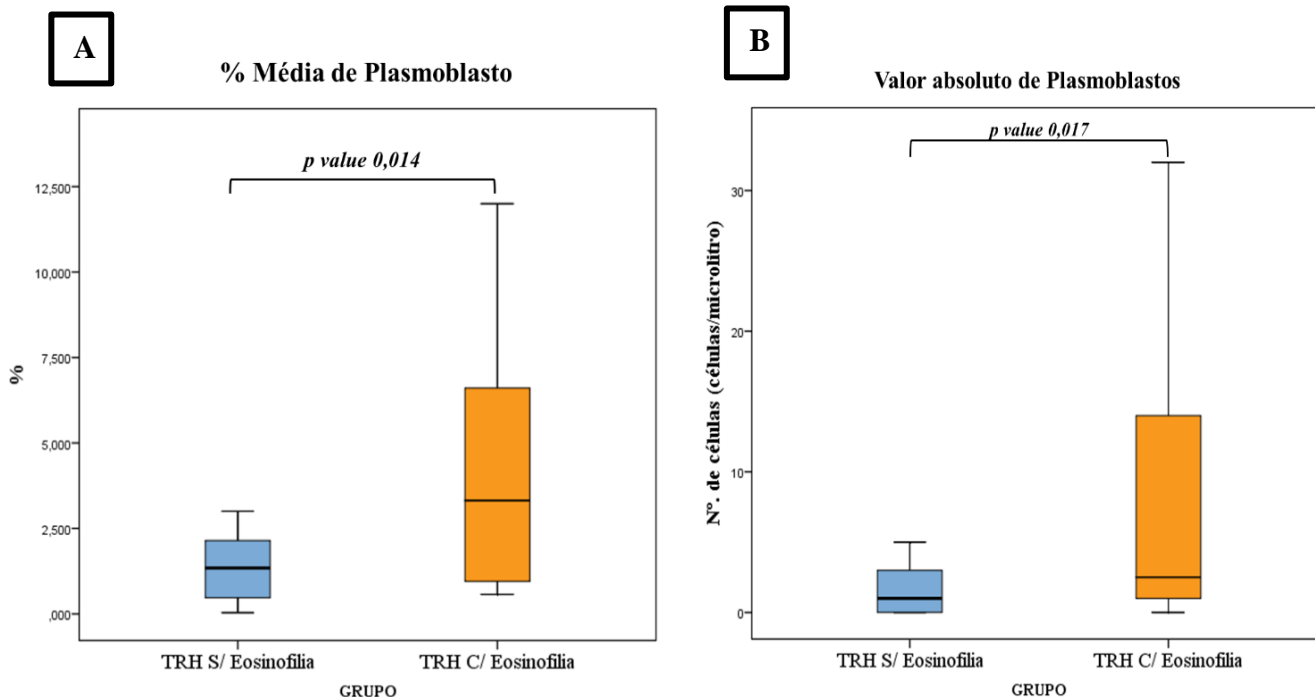
Como podemos observar na **Figura 21**, apenas se observou um **aumento** estatisticamente significativo nas Células B memória CD27+ que expressam IgA no grupo TRH C/Eosinofilia (A). No entanto, pode-se visualizar no gráfico (B), que existe uma tendência para um aumento da % de Células-B memória CD27- que expressam IgA no grupo de doentes com eosinofilia.

**A****B**

**Figura 21.** Gráficos das percentagens de Células B-memória CD27+ que expressam as imunoglobulinas IgA, IgG e IgM (A) e de Células CD27- que expressam imunoglobulinas IgA e IgG (B). Valor de significância estatística dado pelo p value, calculado através do **Teste de Mann-Whitney**, sendo considerado estatisticamente significativo quando o  $p < 0,05$ . Em nenhum dos casos se verificou significância estatística ( $p < 0,05$ ). Contudo, no caso da percentagem de células CD27+ produtoras de IgA, o valor está próximo da significância ( $p = 0,071$ ).

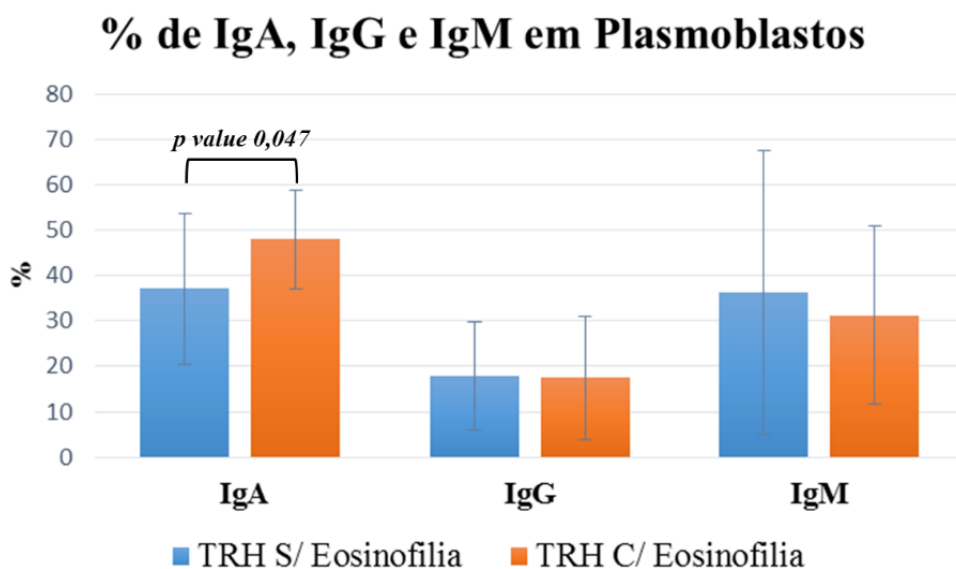
### 6.2.2. Plasmoblastos e quantificação das células que expressam IgA, IgG e IgM

Como podemos observar na **Figura 22**, verificou-se um **aumento** estatisticamente significativo da percentagem média (A) e valor absoluto (B) de plasmoblastos no grupo de doentes com eosinofilia.



**Figura 22.** Gráficos da percentagem (A) e do valor absoluto (nº. de células/microlitro) de plasmoblastos (B). Valor de significância estatística dado pelo p value, calculado através do **Teste de Mann-Whitney**, sendo considerado estatisticamente significativo quando o  $p < 0,05$ . As linhas limite do box-plot representam o 1º quartil (25%) e o 3º quartil (75%); a linha a meio representa a mediana e as linhas verticais correspondem ao intervalo de 95% de confiança.

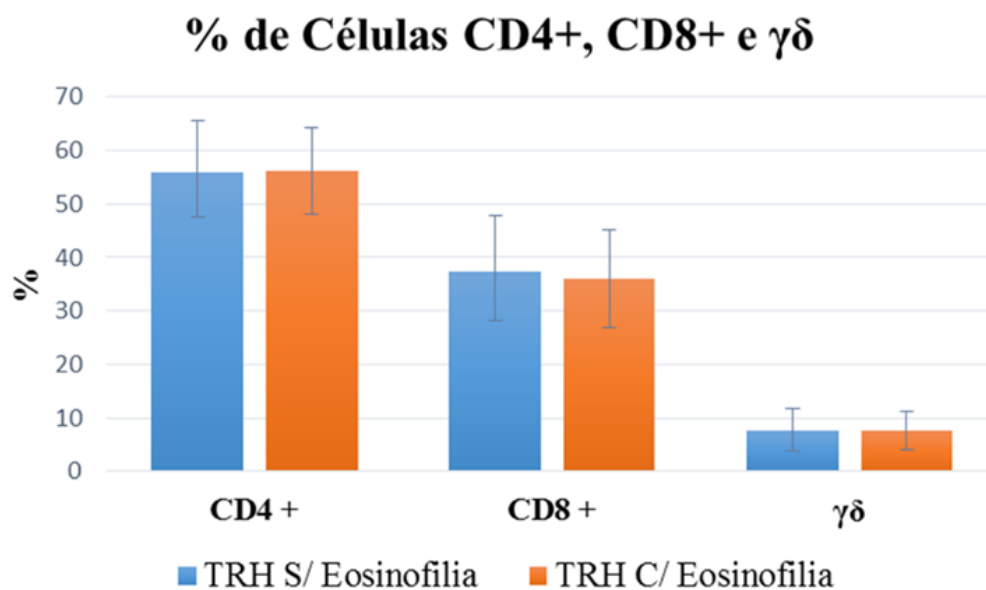
Relativamente aos plasmoblastos que expressam IgA, IgG e IgM, foi observado apenas um **aumento** estatisticamente significativo na % de células que expressam IgA no grupo TRH C/ Eosinofilia. Os resultados obtidos estão representados na **Figura 23**.



**Figura 23.** Gráfico da percentagem de plasmoblastos que expressam imunoglobulinas IgA, IgG e IgM. Valor de significância estatística dado pelo p value, calculado através do **Teste de Mann-Whitney**, sendo considerado estatisticamente significativo quando o  $p < 0,05$ .

### 6.3. Subpopulações de Linfócitos-T e Células NK

Tal como podemos visualizar na **Tabela 8**, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre o grupo TRH S/Eosinofilia e TRH C/Eosinofilia para as percentagens de linfócitos T (CD4+, CD8+ e T- $\gamma\delta$ ) e das suas subpopulações linfocitárias (Th/c17, Th/c1, Th9 e Th produtoras de IL-6). Contudo, em ambos os grupos, verifica que a maior parte da população de Células T é constituída por linfócitos T *helper* (CD4+), seguida de uma percentagem intermédia de linfócitos T citotóxicos (CD8+) e em menor percentagem células T- $\gamma\delta$  (**Figura 24**). Relativamente às Células-NK, tal como se encontra apresentado na **Tabela 8**, também não se obtiveram resultados estatisticamente significativos para a sua percentagem e das suas duas principais subpopulações (CD56<sup>brigh</sup> e CD56<sup>dim</sup>).



**Figura 24.** Gráfico que representa as percentagens das diferentes populações de Células T. Valor de significância estatística dado pelo p value, calculado através do **Teste de Mann-Whitney**, sendo considerado estatisticamente significativo quando o **p < 0,05**. Em nenhum dos casos se verificou significância estatística ( $p < 0,05$ ).

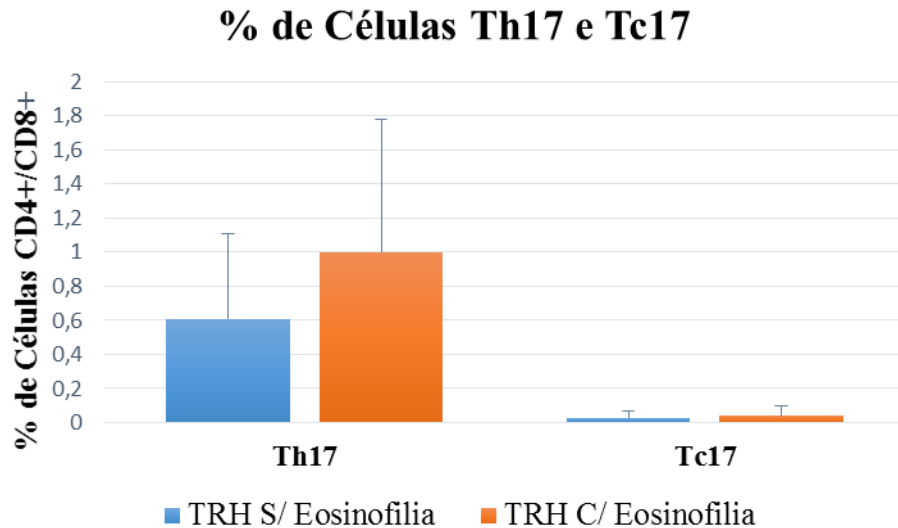


**Tabela 8.** Quantificação (% e valor absoluto, representados pela média  $\pm$  desvio padrão) dos linfócitos-T e das várias subpopulações de linfócitos-T: T helper (CD4+) (Th17, Th9, Th2 e Th1), T citotóxicos (T CD8+) (Tc17 e Tc1), T- $\gamma\delta$  e de Células NK (CD56<sup>bright</sup> e CD56<sup>dim</sup>). Os valores próximos do valor estatisticamente significativo estão a negrito. Valor de significância estatística dado pelo p value, calculado através do **Teste de Mann-Whitney**, sendo considerado estatisticamente significativo quando o **p < 0,05**. Em nenhum dos casos se verificou significância estatística ( $p < 0,05$ ). Contudo, no caso das Th17 o valor está muito próximo da significância ( $p=0,05$ ).

|  | TRH s/Eosinofilia | TRH c/Eosinofilia | Teste de Mann-Whitney ( $p < 0,05$ ) |
|--|-------------------|-------------------|--------------------------------------|
| % Linfócitos T (CD3+)                                  | 71,96 $\pm$ 9,76  | 70,21 $\pm$ 9,78  | 0,574                                |
| % Linfócitos Th (CD4+)                                 | 55,78 $\pm$ 9,82  | 56,26 $\pm$ 8,11  | 0,901                                |
| % Th17 (todas as células que produzem IL-17)           | 0,61 $\pm$ 0,50   | 1,00 $\pm$ 0,78   | <b>0,050</b>                         |
| % Th9 (todas as células que produzem IL-9)             | 0,14 $\pm$ 0,11   | 0,14 $\pm$ 0,10   | 0,971                                |
| % Th produtoras de IL-6                                | 0,01 $\pm$ 0,01   | 0,02 $\pm$ 0,02   | 0,441                                |
| % Th1 que produzem TNF- $\alpha$                       | 31,75 $\pm$ 20,61 | 36,48 $\pm$ 15,66 | 0,349                                |
| % Th1 que produzem IFN- $\gamma$                       | 9,71 $\pm$ 6,88   | 12,25 $\pm$ 7,26  | 0,279                                |
| % Th1 que produzem IL-2                                | 29,10 $\pm$ 19,72 | 31,87 $\pm$ 15,77 | 0,530                                |
| % Linfócitos Tc (CD8+)                                 | 37,28 $\pm$ 10,50 | 36,03 $\pm$ 9,02  | 0,852                                |
| % Tc17 (todas as células que produzem IL-17)           | 0,029 $\pm$ 0,041 | 0,038 $\pm$ 0,063 | 0,705                                |
| % Tc1 que produzem TNF- $\alpha$                       | 27,07 $\pm$ 17,97 | 30,35 $\pm$ 16,54 | 0,506                                |
| % Tc1 que produzem IFN- $\gamma$                       | 30,78 $\pm$ 18,94 | 36,14 $\pm$ 21,38 | 0,519                                |
| % Tc1 que produzem IL-2                                | 9,51 $\pm$ 7,38   | 9,89 $\pm$ 9,73   | 0,753                                |
| % Células $\gamma\delta$                               | 7,56 $\pm$ 4,30   | 7,73 $\pm$ 3,62   | 0,382                                |
| % $\gamma\delta$ que produzem TNF- $\alpha$            | 38,51 $\pm$ 26,47 | 39,35 $\pm$ 22,60 | 0,945                                |
| % $\gamma\delta$ que produzem IFN- $\gamma$            | 36,63 $\pm$ 26,96 | 40,07 $\pm$ 22,97 | 0,712                                |
| % $\gamma\delta$ que produzem IL-2                     | 8,92 $\pm$ 9,00   | 9,38 $\pm$ 7,93   | 0,669                                |
| % Células NK (total)                                   | 4,03 $\pm$ 2,58   | 4,17 $\pm$ 4,00   | 0,560                                |
| % Células NK CD56 <sup>bright</sup> (CD56++)           | 19,69 $\pm$ 11,07 | 16,08 $\pm$ 8,93  | 0,417                                |
| % NK CD56 <sup>bright</sup> que produzem TNF- $\alpha$ | 36,61 $\pm$ 21,55 | 36,01 $\pm$ 20,81 | 0,950                                |
| % NK CD56 <sup>bright</sup> que produzem IFN- $\gamma$ | 45,80 $\pm$ 28,61 | 43,47 $\pm$ 31,56 | 0,852                                |
| % Células NK CD56 <sup>dim</sup> (CD56+)               | 80,20 $\pm$ 11,05 | 83,86 $\pm$ 9,04  | 0,382                                |
| % NK CD56 <sup>dim</sup> que produzem TNF $\alpha$     | 36,43 $\pm$ 23,77 | 43,56 $\pm$ 25,39 | 0,339                                |
| % NK CD56 <sup>dim</sup> que produzem IFN- $\gamma$    | 50,17 $\pm$ 29,76 | 45,69 $\pm$ 33,38 | 0,739                                |

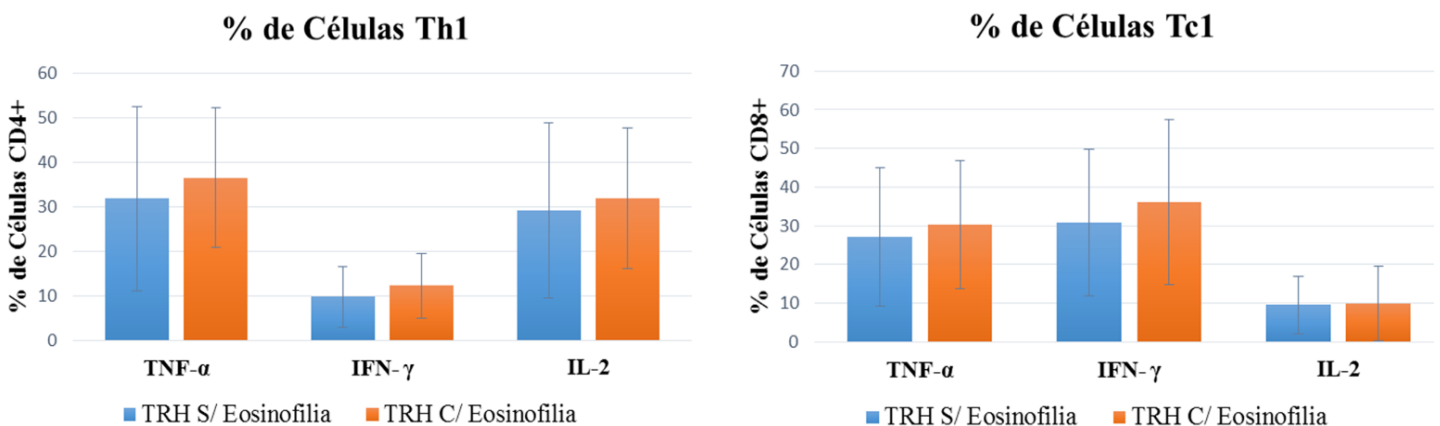
### 6.3.1. Percentagem das subpopulações de Células-T: Th/c 17 e Th/c1

Como podemos visualizar na **Figura 25**, apesar de não se verificar diferenças significativas entre os dois grupos nas percentagens de células Th17, nota-se uma grande tendência ( $p$  value= 0,05) para um **aumento** destas no caso do grupo com eosinofilia. No caso das Tc17, podemos observar que essa tendência é bastante menor.



**Figura 25.** Gráfico que representa as percentagens das células Th17 e Tc17. Em nenhum dos casos se verificou significância estatística ( $p < 0,05$ ). Contudo, no caso das Th17 o valor está muito próximo da significância ( $p=0,05$ ).

Tal como observamos na **Figura 26**, não se verificaram diferenças significativas nas percentagens de células Th1 e Tc1, apesar de se verificar uma ligeira tendência para um aumento destas no grupo com eosinofilia, principalmente das citocinas TNF- $\alpha$  e IFN $\gamma$ .



**Figura 26.** Gráfico que representa as percentagens das células Th1 e Tc1. Em nenhum dos casos se verificou significância estatística ( $p < 0,05$ ).

## **Discussão**

---



## 7 – Discussão

Os eosinófilos parecem ter um importante papel em diversas respostas imunitárias, associadas a processos inflamatórios e alérgicos [51]. O aumento do recrutamento destas células para o SP, devido à produção de citocinas (IL-5, IL-3 e GM-CSF) pelas células Th2 e à ação de quimiocinas como a RANTES e os vários tipos de eotaxinas (CCL11, CCL24 e CCL26), está na origem de fenómenos como a eosinofilia reativa periférica [70]. Esta eosinofilia caracteriza-se por um aumento de eosinófilos superior a 500 células/ $\mu$ L ou a 10% do total de leucócitos e surge muitas vezes associada à rejeição celular aguda de órgãos sólidos, nomeadamente no caso do transplante hepático [55,104].

Recentemente, tem sido relatado que a ocorrência de eosinofilia periférica associada ao aparecimento de diferentes patologias gastrointestinais de cariz alérgico e inflamatório, acompanhado de uma elevação dos níveis de IgE total, em crianças após transplante hepático, estará, possivelmente, associada à disfunção crónica do enxerto hepático nestas crianças [40,109–113]. No entanto, os mecanismos pelos quais esta eosinofilia periférica surge, e as consequências da ativação destes eosinófilos em circulação e o seu impacto na disfunção do enxerto hepático estão ainda por esclarecer [13].

Neste estudo, foram analisadas amostras de sangue periférico de crianças/jovens submetidas a transplante hepático, divididas em dois grupos segundo a presença ou ausência de eosinofilia periférica persistente. No grupo de doentes que apresentavam eosinofilia periférica (grupo TRH C/Eosinofilia) verificou-se **um aumento da expressão de CD123 (recetor da citocina IL-3, IL-3R $\alpha$ )** na membrana dos eosinófilos (**Tabela 5, Figura 14**). Tal facto sugere que estes se encontram mais ativados, podendo estar a aumentar a expressão de CD123 de forma a manter esse estado de ativação, através da potenciação da capacidade para ligar a IL-3 [77,136–139]. Esta é uma das citocinas envolvidas na ativação e sobrevivência dos eosinófilos em doenças atópicas, como a asma alérgica e as desordens gastrointestinais eosinofílicas, que são, normalmente, acompanhadas por um aumento de eosinófilos em circulação e nos tecidos inflamados [140,141]. De facto, o estudo de Esnault *et.al.* revelou que eosinófilos periféricos de doentes com alergia, em cultura, ativados com citocina IL-3, mostraram um aumento gradual da expressão do CD123, ao longo do tempo [142]. Adicionalmente, foi também observado que eosinófilos isolados do lavado bronquealveolar de doentes com asma

alérgica, após 48h de estímulo com alérgénio aéreo, mostravam maior expressão de CD123 do que eosinófilos isolados do SP dos mesmos doentes e sujeitos ao mesmo estímulo alérgico durante 48h. Tal evidência mostra que à medida que os eosinófilos migram para os tecidos inflamados expressam mais CD123, para poderem manter-se ativados através da ligação da IL-3 ao seu recetor, o que promove a ativação de vias de transdução que culminam na síntese de várias proteínas efetoras eosinofílicas, nomeadamente através da via da cinase ribossomal S6 de 90kDa/proteína ribossomal S6 (P90S6K/RPS6) [142]. Este pode ser um dos fenómenos que estará a acontecer nos eosinófilos periféricos das crianças transplantadas que apresentam eosinofilia, isto é, os eosinófilos poderão estar a migrar para os tecidos e por isso estarão a aumentar a expressão de CD123. No entanto, seria necessário verificar se estes eosinófilos em circulação estão a expressar CCR3 que liga às eotaxinas, que, como já foi referido, estão implicadas no recrutamento dos eosinófilos para os tecidos inflamados.

Uma vez que a ocorrência de eosinofilia periférica em crianças, após transplante hepático, está associada ao aparecimento de várias desordens eosinofílicas gastrointestinais e alergias alimentares, neste projeto foram estudadas outras células imunitárias que, geralmente, estão também envolvidas em processos alérgicos e inflamatórios, nomeadamente os basófilos, as pDC, as mDC, os monócitos e os neutrófilos. Após o estudo destas células, observou-se, então, que no grupo TRH C/Eosinofilia houve **um aumento da IgE ligada ao seu recetor de alta-afinidade (FcεRI)** em basófilos, pDC, mDC e na população de monócitos IgE+ (**Tabela 5 e Figura 16**). Todas estas populações leucocitárias são capazes de ligar a IgE em circulação, visto que expressam na sua superfície o recetor FcεRI [143,144]. Assim, quando se dá uma elevação dos níveis de IgE na circulação, existe um aumento da ligação desta ao seu recetor, tal como foi demonstrado por Dehlink e os seus colaboradores, num estudo realizado em crianças, onde foi estudada a relação entre os níveis séricos de IgE e a expressão dos recetores de IgE (FcεRI e FcεRII/CD23) nas células imunitárias periféricas que expressam estes recetores e a IgE ligada a essas mesmas células [145]. De facto, no nosso estudo, apesar de não ter sido possível aceder aos dados de IgE sérico em todos os doentes, foi observado que, em média, os doentes com eosinofilia apresentam valores mais elevados de IgE sérico ( $263 \pm 352$  UI/mL) do que os doentes sem eosinofilia ( $73 \pm 39$  UI/mL). Vários estudos têm referido que, após transplante hepático, surgem muitas vezes alergias alimentares e outras patologias associadas como desordens gastrointestinais eosinofílicas, com elevação dos níveis de IgE em resposta à presença desses alérgénios [146,147]. Segundo o estudo de Topal *et al.*, que

comparou adultos e crianças submetidos a transplante hepático, o aparecimento de doenças atópicas e, sobretudo, de alergias alimentares *de novo* após transplante, surgem maioritariamente em crianças [148].

A estas evidências têm-se juntado outras, as quais referem que o uso do imunossupressor TAC como terapia imunossupressora após transplante hepático estará associado ao aumento dos níveis séricos de IgE e do número de eosinófilos no SP (caraterísticas recorrentes de um processo de inflamação alérgica) e também ao aparecimento de alergias alimentares *de novo* [39,42,149]. Tal evidência, parece dever-se ao facto do imunossupressor TAC inibir o metabolismo (redução da produção de adenosina trifosfato (ATP) mitocondrial) nas células da mucosa do intestino, necessário à manutenção da integridade da barreira intestinal. Tal conduz ao aumento da permeabilidade intestinal, permitindo a penetração de possíveis alergénios que alastram para a circulação sanguínea e desencadeiam uma elevação dos níveis de IgE [150]. Este poderá ser um possível mecanismo responsável pelo aumento dos níveis de IgE observados nos doentes do grupo TRH C/ Eosinofilia. Todavia, no nosso estudo não foram analisados os níveis, nem a especificidade da IgE específica para um determinado antigénio, nem nos foi possível aceder á informação da presença de possíveis alergénios alimentares, pelo que se torna difícil relacionar estas evidências com o nosso estudo.

Curiosamente, um estudo realizado por Bruyne *et.al.* em que comparou os efeitos da utilização do TAC como imunossupressor em doentes submetidos a transplante hepático e transplante renal, revelou que este fenómeno apenas ocorre em doentes submetidos a transplante hepático [151]. Contudo, os mecanismos subjacentes a essa evidência estão ainda por esclarecer. De facto, visualizando os nossos resultados referentes à terapia imunossupressora aplicada aos doentes participantes neste estudo (**Tabela 3**), verificou-se que quase a totalidade dos doentes incluídos no grupo TRH C/Eosinofilia, estavam medicados apenas com TAC (n=14, 82,4%), sendo que dois dos restantes três doentes estavam medicados com TAC combinado com outros tipos de imunossupressores (n=2, 11,6%). Já no grupo TRH S/ Eosinofilia, apenas cerca de metade dos doentes estavam a ser medicados apenas com TAC (n=18, 51,4%) e 8 com TAC combinado com outros imunossupressores (n=8, 22,1%). No entanto, tal como foi demonstrado no estudo de Cardet *et al.*, realizado em doentes pediátricos transplantados hepáticos com alergias alimentares *de novo*, quando se adiciona outro tipo de imunossupressor (por exemplo, o ácido micofenólico) ao TAC, dá-se uma redução dos níveis de IgE específico para um determinado alergénio alimentar em circulação [152].

Os basófilos localizam-se sobretudo na circulação ou nos tecidos inflamados e desempenham um importante papel em doenças alérgicas e na imunidade inata, sendo um dos principais intervenientes devido à libertação de histamina e outros mediadores inflamatórios, através da sua desgranulação. Este fenómeno é um sinal da atividade dos basófilos durante um processo alérgico e é sobretudo desencadeado pela ligação da IgE ao seu recetor FcεRI, que apresenta a clássica estrutura tetramérica ( $\alpha\beta\gamma_2$ ) nestas células [153]. Quando se dá a ligação cruzada, com antígeno associado, do IgE ao recetor FcεRI, em que o antígeno se liga a dois complexos IgE-FcεRI que se encontram próximos, na membrana do basófilo, dá-se a ativação deste recetor. Esta ativação dá-se através da fosforilação de estruturas com propriedades de tirosina cinase localizadas nas subunidades  $\beta$  e  $\gamma$  deste recetor, que conduz por sua vez à ativação de várias proteínas tirosina cinases, que ativam proteínas adaptadoras localizadas na membrana do basófilo e desencadeiam o início de três das maiores cascatas de sinalização: a via da fosfolipase C  $\gamma$  (PLC $\gamma$ ); a via das MAP cinases (MAPKs) e a via do fosfatidilinositol-3,5-trifosfato (PI3K). A ativação destas vias de sinalização culmina na desgranulação do basófilo (libertação de histamina e mediadores inflamatórios), na ativação de fatores de transcrição responsáveis pela expressão de citocinas e quimiocinas, sobretudo da IL-4 e a IL-13, e na geração de ácido araquidónico, precursor de mediadores lipídicos, como leucotrienos (LTB<sub>4</sub> e LTC<sub>4</sub>) e prostaglandinas (PGD<sub>2</sub>) [revisto em 49,154]. Através da sua desgranulação, os basófilos libertam vários mediadores capazes de estimular o recrutamento e ativação de várias outras células imunitárias que vão contribuir para o processo inflamatório, nomeadamente os eosinófilos. Estes expressam à sua superfície recetores para vários mediadores lipídicos, nomeadamente para o LTB<sub>4</sub>, LTC<sub>4</sub> e para a PGD<sub>2</sub> que são capazes de ativá-los e promover a sua migração [ revisto em 155]. Além disso a IL-4 e sobretudo a IL-13, produzidas também por basófilos ativados, durante o processo inflamatório recorrente de doenças atópicas, são capazes de estimular as células dos tecidos inflamados a produzir os vários tipos de eotaxinas, quimiocinas que têm como principal função o recrutamento de eosinófilos para os tecidos inflamados [156,157]. Aliás, um recente estudo de Laurence *et al.*, em modelos animais de dermatite atópica, revelou que através da produção de IL-4, os basófilos facilitam a entrada dos eosinófilos em circulação para os tecidos, devido ao estímulo das células endoteliais para expressarem células de adesão como a VCAM-1 [158]. Desta forma, os basófilos poderão estar a contribuir para a ativação e recrutamento/migração de eosinófilos que se encontram em circulação para os tecidos. No



entanto, trata-se apenas de uma hipótese, visto que não foram analisados os níveis de IL-4 e IL-13, de LTB4 e PGD2 e dos vários tipos de eotaxinas (CCL11, CCL24 e CCL26).

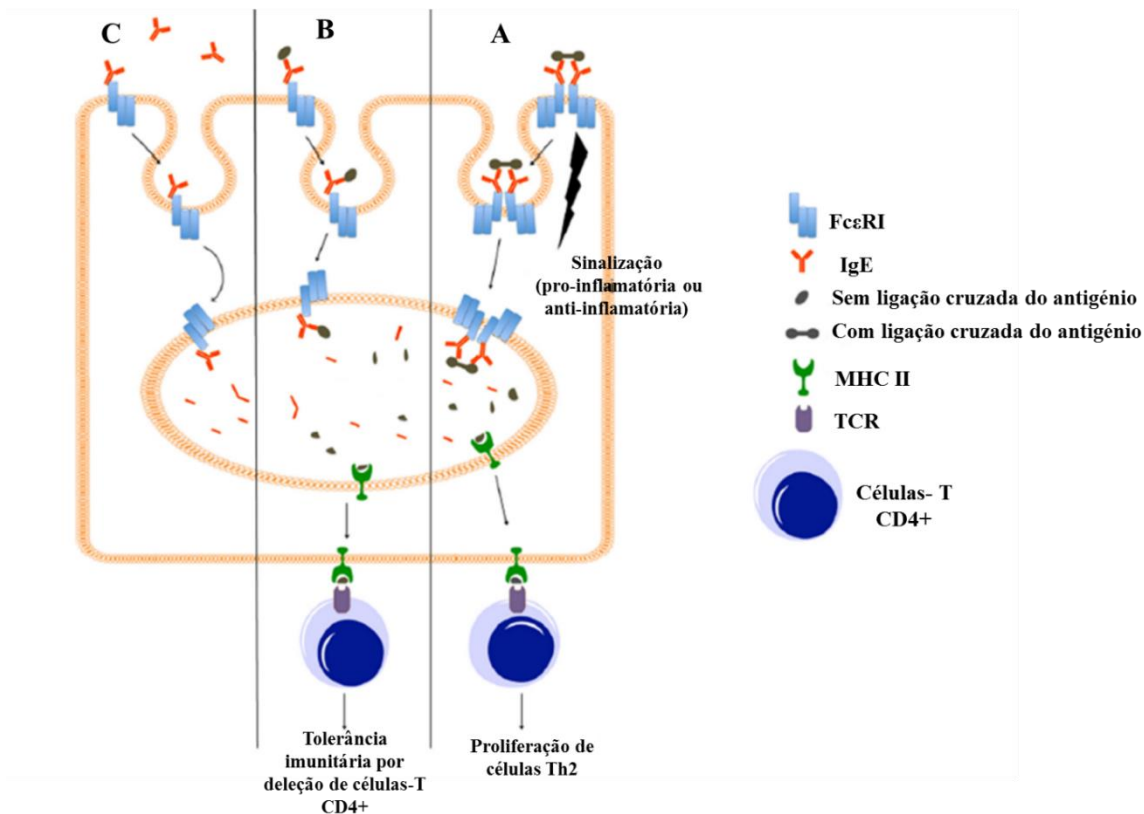
As DCs são APC especializadas, que estão estrategicamente localizadas na pele, mucosas e também na circulação, de forma a desempenhar a sua função de reconhecimento e captura de antígenos estranhos ao organismo (por exemplo alérgenos aéreos ou alimentares) e agentes patogênicos, induzindo respostas imunes através da ativação de células T efetoras ou tolerância imunitária através da ativação de células T reguladoras [159,160]. Nos humanos, as DCs dividem-se em duas principais subpopulações segundo a expressão dos marcadores CD123 e CD11c. As pDC possuem o fenótipo CD11c<sup>-low</sup>, CD123<sup>high</sup>, localizam-se essencialmente nos órgãos linfóides e no SP, desempenhando um importante papel na imunidade inata antiviral e na autoimunidade. As mDC possuem o fenótipo CD11c<sup>high</sup>, CD123<sup>low</sup> e localizam-se no SP ou nos tecidos, incluindo as células de Langerhans da epiderme e as células intersticiais ou das mucosas e desempenham um papel decisivo na indução da inflamação alérgica [159]. Evidências têm revelado que, tanto as mDC como as pDC estão envolvidas no processo inflamatório gerado em várias doenças alérgicas, participando no reconhecimento e processamento do alérgeno e na apresentação deste a células T *naïve*, induzindo uma resposta mediada por células Th2 ou tolerância imunitária através da indução de células T reguladoras [161,162]. Adicionalmente, estudos têm demonstrado a expressão constitutiva do recetor FcεRI, com uma estrutura trimérica ( $\alpha 2$ ), em pDC e mDC, tanto em adultos como em crianças)[144,163,164]. No entanto, segundo o estudo de Frischmeyer *et.al.*, as mDC expressam cerca de duas vezes mais este recetor do que as pDC [165], o que vai ao encontro dos nossos resultados.

Tal como já foi observado noutros estudos, durante o processo inflamatório gerado em doentes com doenças alérgicas atópicas como asma ou alergia alimentar, a expressão do recetor FcεRI aumenta nas DCs (tanto nas pDC como nas mDC), estando esse aumento de expressão correlacionado com o aumento da concentração de IgE sérico [144,165–168]. Esta evidência vai ao encontro dos nossos resultados, visto que foi observado, nos doentes com eosinofilia, um aumento da ligação da IgE ao seu recetor de alta-afinidade que estará correlacionado com um aumento da expressão deste recetor na membrana destas células, em resposta a uma elevação da IgE em circulação. Segundo, Sharquie *et al.*, quando se dá a ligação da IgE associado a um antígeno ao recetor FcεRI da membrana das DCs, sobretudo nas mDC, dá-se um aumento da capacidade de reconhecimento, captação e processamento do antígeno por estas células, o que resulta na indução da polarização de células Th2, após apresentação do antígeno a células Th *naïve* e libertação de citocinas

inflamatórias [169]. Além disso, segundo o estudo de Maurer *et al.*, antigénios captados pelas APC (como as DCs e os monócitos) sem a presença de IgE, representa cerca de 100 a 1000 vezes uma menor eficiência deste processo [170]. No caso das pDC, estudos como o de Gill *et al.*, defendem que a ligação cruzada da IgE ao recetor FcεRI contribui para a supressão da atividade antiviral das pDC, o que conduz a um aumento do risco de infeções virais que contribuem para uma exacerbação do processo inflamatório gerado em doenças atópicas de carácter alérgico [171]. Em contrapartida, estudos mais recentes, como o de Platzer *et al.*, têm revelado que a ativação de DCs mediada pela ligação de IgE ao recetor FcεRI, num processo inflamatório, parece promover também um papel regulatório das DCs, contribuindo também para a homeostase imunitária durante este processo [172]. Assim, apesar do pouco conhecimento que existe acerca das vias de sinalização desencadeadas após a ativação do recetor FcεRI nas DCs, considera-se a ativação de vias de estimulação pro-inflamatória ou vias de supressão/anti-inflamatórias. Uma das principais vias pro-inflamatórias é a via que culmina na ativação do fator nuclear kappa B (NF-κB), que induz a transcrição de mediadores pro-inflamatórios, resultando na produção de várias citocinas inflamatórias como o TNF-α e a IL-6, em ambas as subpopulações [173,174], e da quimiocina CCL28, no caso das mDC em particular, que é responsável pelo recrutamento de células T e B e de eosinófilos [175]. Outras evidências defendem o efeito anti-inflamatório e supressor mediado pela via de sinalização do recetor FcεRI, que consiste na indução da produção de mediadores anti-inflamatórios como a IL-10, que atua de forma autocrina nas DCs, regulando negativamente a produção de TNF-α por estas células [173,174]. Além disso, a via de sinalização do recetor FcεRI, parece interferir também com as vias ativadas pelos TLR 4, 7 e 9 não só nas pDC, mas também nas mDC [172,174]. Desta forma, tais evidências mostram que as DCs tanto podem promover a inflamação periférica, através da indução da produção de mediadores pro-inflamatórios e recrutamento de outras células envolvidas no processo inflamatório, como podem atuar como células anti-inflamatórias através da produção de citocinas anti-inflamatórias e da supressão de vias de sinalização ativadas por TLR. No entanto, como não foram estudados a presença e os níveis destes mediadores no nosso estudo, nem quantificadas e avaliadas as células Th2 não conseguimos saber quais as vias que estão mais ativadas e que podem estar a atuar em favor da elevação dos eosinófilos no caso dos nossos doentes.

É de salientar que a forma como a IgE liga ao seu recetor FcεRI na membrana das DCs e noutras APC como os monócitos, está associada a diferentes mecanismos ativados por este recetor (**Figura 27**). Se a ligação do IgE, associado a um antigénio, for

multivalente (com ligação cruzada), tal como se verifica nas vias descritas anteriormente, quando a DCs apresentam o antígeno processado a células T *naïve*, dá-se a ativação de vias de sinalização pro-inflamatórias ou anti-inflamatórias (dependendo do microambiente de citocinas, dos tecidos onde residem e das células vizinhas), que culmina em ambos os casos na proliferação de células T CD4<sup>+</sup> efectoras específicas para o antígeno, que podem ser do tipo Th2 tal como Sharquie *et al.* demonstraram no seu estudo [169] (**Figura 27, (A)**). Se existir uma ligação monovalente (sem ligação cruzada) de IgE, com antígeno associado, ao seu recetor FcεRI, o antígeno processado, após a internalização do complexo IgE+ antígeno – FcεRI na DC, é apresentado a células T *naïve* conduzindo à proliferação de células T CD4<sup>+</sup>, contudo esta é uma proliferação celular transiente, pois quando as células T CD4<sup>+</sup> específicas para o antígeno reconhecem o antígeno entram em apoptose, gerando tolerância imunitária por deleção de células T CD4<sup>+</sup> específicas (**Figura 27, (B)**). Este mecanismo pode surgir muitas vezes quando há sinalização mediada por IgE endógena e não específica, produzida em elevadas concentrações por tecidos que sofreram dano, devido a infeções por parasitas, por exemplo, que conduzem a graves danos teciduais em vários órgãos [176] ou após cirurgias ou queimaduras [177,178]. Esta IgE associa-se a antígenos próprios derivados de danos teciduais e através de uma ligação monovalente (sem ligação cruzada) ao recetor FcεRI, uma vez que este IgE não liga com tanta afinidade ao recetor, produz a proliferação de célula T CD4<sup>+</sup> reativas específicas para os antígenos próprios, que rapidamente são destruídas, conduzindo a uma tolerância imunitária por deleção destas células Th específicas, prevenindo o aumento desses danos teciduais. Por outro lado, quando não existe um antígeno associado à IgE em circulação que se liga ao seu recetor FcεRI nas APC (**Figura 27, (C)**), estas desempenham tarefas de remoção desta IgE extracelular através da incorporação do complexo IgE-FcεRI internalizado em vesículas lisossomais, promovendo a degradação intracelular dessas moléculas de IgE [179].



**Figura 27. Papel do receptor FcεRI em Células dendríticas (DCs) e monócitos que ligam IgE, adaptado de [188].**  
**Legenda:** (A). **Vias de sinalização pro-inflamatória ou anti-inflamatória.** O receptor FcεRI transmite a sinalização intracelular após ligação cruzada do IgE com o antígeno, que resulta na produção de citocinas e quimiocinas com potencial pro- e anti-inflamatório. A ligação cruzada do IgE ligado ao antígeno ao seu receptor promove a internalização deste complexo para os lisossomos intracelulares, onde os antígenos são processados e depois expostos através de moléculas MHC II na membrana celular para serem apresentados a células T CD4+ *naíve*. O resultado funcional desta apresentação ainda é pouco clara, no entanto, considera-se o desenvolvimento de células Th2 efetoras. (B). **Tolerância imunitária por deleção de células-T CD4+.** O IgE ligado ao antígeno liga-se ao receptor FcεRI, sem ligação cruzada, sendo o complexo internalizado e digerido nos lisossomos intracelulares e apresentado através de moléculas do MHC II a células T CD4+ específicas para o antígeno, que ao reconhecerem o antígeno entram em apoptose, resultando no desenvolvimento de tolerância imunitária. (C). **Remoção do IgE extracelular.** Os receptores FcεRI membranares das DCs e dos monócitos que ligam IgE, capturam IgE extracelular, que é internalizado em lisossomos intracelulares, resultando na degradação intracelular destas moléculas de IgE.

Os monócitos são células efetoras imunitárias, que se localizam sobretudo na circulação sanguínea e para além de apresentarem capacidade fagocítica, desempenham, tal como as DCs, funções de APC, reconhecendo e processando antígenos que são depois apresentados a células T. Estas células expressam vários tipos de receptores de citocinas e quimiocinas, bem como moléculas de adesão, que permite a ativação destes e a sua migração e entrada do SP para os tecidos, onde se diferenciam em macrófagos ou DCs. Nos tecidos podem integrar um processo inflamatório ou desempenhar funções de homeostase, uma vez que após a sua ativação, os monócitos são capazes de produzir vários tipos de citocinas e quimiocinas inflamatórias (IL-1, IL-2, IL-6 e TNF- $\alpha$ ) ou anti-inflamatórias (IL-4 e IL-10) [180]. Visto que os monócitos do SP desempenham vários tipos de funções diferentes na resposta imunitária, esta população parece ser bastante

heterogénea. Assim, neste estudo, foram estudadas três populações de monócitos do SP, tendo por base a expressão das moléculas CD16 e CD14: os monócitos clássicos (CD16-/CD14+); monócitos intermédios (CD16+/CD14+) e monócitos não – clássicos (CD16+/CD14-), tal como está representado no *dot plot* da **Figura 10, (D)**. Curiosamente, os nossos resultados revelaram apenas alterações significativas na população de monócitos clássicos (CD16-/CD14-), que constitui cerca de 90% do total de monócitos no SP. Esta é referida como sendo a população mais eficaz na produção de citocinas pró-inflamatórias e possui uma forte capacidade fagocítica, que consiste no reconhecimento, ingestão e destruição (através da produção de espécies reativas de oxigénio) de agentes patogénicos que invadem o organismo [181,182]. Dentro desta subpopulação conseguimos identificar três populações com fenótipo distinto: a população IgE+, a população CD15+ e a população CD15-. A população CD15- parece ser uma população intermédia, uma vez que parece estar a perder a expressão de CD15, mas também não expressa o recetor FcεRI. O CD15 corresponde a uma molécula de adesão celular, que permite mediar o processo de fagocitose e quimiotaxia, e por isso a sua expressão torna-se importante nos monócitos clássicos, que têm uma grande atividade fagocítica [183]. Assim, a população de monócitos que não expressam CD15 parece ser uma subpopulação de monócitos clássicos com menor capacidade fagocítica.

A população de monócitos clássicos IgE+ é uma população especial que expressa o recetor FcεRI ( $\alpha\gamma 2$ ) e por esse motivo consegue ligar IgE extracelular [184,185]. No nosso estudo, como já foi referido, verificou-se no grupo de doentes transplantados com eosinofilia, o **aumento da IgE ligado ao seu recetor FcεRI** nesta população de monócitos IgE+. Á semelhança do que acontece com os basófilos e as DCs, como a concentração de IgE em circulação também está aumentada neste grupo de doentes, a tendência é para que esta IgE se ligue ao seu recetor de alta-afinidade, localizado na membrana destas células. De facto, segundo alguns estudos como o de Cheng *et.al.*, a expressão do recetor FcεRI nestes monócitos aumenta conforme o aumento da concentração de IgE na circulação, e por isso, essa expressão é potenciada em monócitos do SP de doentes atópicos e alérgicos e com desordens hipereosinofílicas [186], o que vai ao encontro dos nossos resultados.

Esta população de monócitos IgE+ trata-se de uma população especial de monócitos, que consiste em menos de 5% do total de monócitos do SP e que pode diferenciar-se em DCs, adquirindo rapidamente características funcionais e estruturais das DCs, o que contribui para o *pool* de DCs que expressam o FcεRI do SP [186,187]. Por

esse motivo, os mecanismos desencadeados pela ligação de IgE ao seu recetor FcεRI nesta população de monócitos são idênticos aos observados nas DCs (**Figura 27**), promovendo igualmente a potenciação da capacidade de apresentação de antígeno destas células; a ativação de vias de sinalização pro- ou anti-inflamatórias e proliferação de células T CD4+ (nomeadamente Th2) em doenças atópicas e alérgicas; a tolerância imunológica por deleção de células T CD4+ e a remoção da IgE da circulação [revisão em 188]. Adicionalmente, segundo o estudo de Pyle *et.al.*, no caso particular dos monócitos que expressam FcεRI, também tem sido referido que a ligação cruzada de IgE ao seu recetor, nestas células, influencia negativamente a função destes monócitos, através do bloqueio da fagocitose (mecanismo primário utilizado por estas células num processo inflamatório), em indivíduos com elevadas concentrações de IgE sérica [189]. Além disso, este estudo realça o facto da ativação mediada pela ligação cruzada de IgE, conduzir à geração de um processo pro-inflamatório mediado por monócitos, através da expressão de citocinas pro-inflamatórias como o TNF-α e a IL-6, quando os níveis de IgE sérica são elevados. Desta forma, os nossos resultados sugerem que esta população de monócitos, após ativação pela ligação do IgE ao seu recetor, promove o aumento da inflamação periférica, através da produção de diversos mediadores inflamatórios.

Tal como podemos observar na **Tabela 9**, apesar de todos os monócitos expressarem HLA-DR, esta molécula está altamente expressa na membrana de monócitos intermédios (CD16+/CD14+), que é referida como tendo uma forte capacidade como APC [190]. Por outro lado, a população de monócitos clássicos parece ser a população onde a expressão desta molécula é menor, tal como já tinha sido descrito no estudo de Abeles e seus colaboradores [191]. Contudo, verificou-se que em todas as subpopulações de monócitos clássicos estudadas, houve um **aumento da expressão de HLA-DR** nos doentes transplantados com eosinofilia, apesar de esse aumento apenas ser estatisticamente significativo na população CD15+ (**Figura 17**). O HLA-DR é uma molécula pertencente ao MHC de classe II e tem como principal função nos monócitos, auxiliá-los a desempenhar a sua função de APC, quando apresentam o antígeno processado aos linfócitos T. Assim, parece que a população de monócitos clássicos, de doentes transplantados com eosinofilia, se encontra num estado mais ativo, tendo uma maior capacidade para atuar como APC.

Os neutrófilos, pertencem ao grupo dos granulócitos e, tal como os monócitos/macrófagos, são células fagocitárias, sendo umas das primeiras células a ser recrutadas do SP para os locais de inflamação, para integrar as respostas de imunidade

inata. Assim, nos locais de inflamação, os neutrófilos fagocitam e eliminam os agentes patogénicos causadores da inflamação, através de uma série de mecanismos citotóxicos microbicidas [192]. Relativamente à avaliação destas células neste estudo, foi observado um **aumento da expressão de CD16** nos doentes do grupo TRH C/ Eosinofilia (**Figura 15**). A molécula CD16 corresponde a um recetor Fc *gamma* tipo III (FcγRIII) de baixa-afinidade para o IgG e é representado por dois genes semelhantes, o CD16A (FcγRIII A) e o CD16B (FcγRIII B). No caso dos neutrófilos, é expresso o CD16B, que consiste numa forma monomérica ancorada a glicosilfosfatidilinositol (GPI), tendo a capacidade de ligar a IgG (sobretudo IgG1 e IgG2) na sua forma de complexo imune ou anticorpo livre. Após a ligação da IgG, o FcγRIII B inicia uma cascata de sinalização que conduz a uma série de respostas diversas. Estas incluem respostas de citotoxicidade mediadas por células dependentes de anticorpo (ADCC), fagocitose, desgranulação (libertação de enzimas e mediadores inflamatórias para combater o antigénio) e proliferação e recrutamento de outras células imunes, contribuindo para o processo inflamatório [193]. Assim, segundo os nossos resultados, os neutrófilos dos doentes transplantados com eosinofilia, apresentam maior capacidade para reconhecer e fagocitar antigénios opsonizados.

As células B desempenham um importante papel na imunidade humoral, particularmente na ação direta contra agentes patogénicos infecciosos extracelulares, através da produção de anticorpos que vão combater o agente patogénico. Estas células surgem na MO e permanecem nesse local nos seus primeiros estágios de desenvolvimento. Depois são libertadas no SP (células B imaturas/transicionais e células B *naïve*), local onde podem encontrar antigénios estranhos ao organismo, e rumam até aos tecidos linfóides periféricos. Nestes tecidos, as células B vão continuar a sua maturação e diferenciação nos centros germinais, dando origem a dois tipos de células B maduras: as células B memória (CD27+ e CD27-) e os plasmoblastos/plasmócitos, que são depois libertados no SP [194,195].

Neste estudo, foi observado um **aumento no número absoluto de linfócitos B em circulação e de células B *naïve***, no grupo TRH C/Eosinofilia. Todavia, na percentagem destas células não se verificaram alterações significativas entre os dois grupos. Tal facto pode ser explicado pelo aumento estatisticamente significativo do número absoluto de leucócitos totais, observado no grupo TRH C/Eosinofilia. Adicionalmente, verificou-se um **aumento da percentagem de células B memória que expressam IgA** (apesar de termos um valor estatisticamente significativo apenas nas células B memória CD27+, existe também uma tendência para esse aumento na

população total de células B memória e na subpopulação CD27-) e **também da percentagem de plasmoblastos que expressam IgA**. A IgA é uma das Igs mais abundantes no organismo humano e localiza-se sobretudo nas superfícies das mucosas (trato gastrointestinal, vias respiratórias, etc.) e nas secreções (saliva, lágrimas, etc.). A sua principal função é promover a proteção imunitária, sendo um dos componentes da defesa de primeira linha contra agentes patogénicos e alergénios que invadem as mucosas, que são locais mais suscetíveis a este tipo de invasão [196]. De facto, no estudo de Henriques *et.al.*, em doentes alérgicos, com níveis séricos de IgE total aumentados, já se tinha observado o aumento destas células [197]. Desta forma, os nossos resultados sugerem que os doentes do grupo TRH C/Eosinofilia necessitam aumentar o número de células produtoras de IgA, de forma a restabelecer a integridade das mucosas, que poderão ter estado em contacto com um potencial alergénio, visto que nestes doentes também se verifica um aumento dos níveis sérios de IgE.

Ainda dentro das subpopulações de células B, **um incremento quer da percentagem, quer do valor absoluto de plasmoblastos** foi observado também no grupo TRH C/Eosinofilia. Logo, estes resultados sugerem que um aumento de eosinófilos estará associado a um aumento de plasmoblastos. De facto, segundo o estudo de Chu *et al.*, realizado em ratinhos imunizados, os eosinófilos da MO ativados promovem a sobrevivência de plasmoblastos na MO, através da produção de IL-6 e de APRIL [124]. Além disso, visto que se verifica o aumento da concentração da IgE sérica e da IgE ligada ao seu recetor de alta-afinidade nos doentes com eosinofilia, provavelmente também teremos um aumento de plasmoblastos que expressam IgE, apesar de não terem sido analisados. Assim, este aumento de plasmoblastos nestes doentes parece surgir em consequência de um processo reativo associado ao incremento dos níveis de IgE.

Apesar de não terem sido observadas diferenças significativas nas células T (imunidade celular adquirida), entre os dois grupos em estudo (TRH S/Eosinofilia e TRH C/ Eosinofilia), notou-se uma **grande tendência ( $p=0,05$ ) para o aumento da percentagem de células Th17 (produtoras de IL-17)** no grupo TRH C/Eosinofilia. Na verdade, os estudos de Wakashin *et.al* e de Dias *et al.*, já tinham demonstrado que através da produção da IL-17A, as células Th17 promovem o recrutamento e a ativação de eosinófilos do SP, em situações de inflamação eosinofílica [100,101]. Além disso, segundo alguns estudos, como o de Fábrega *et.al.* e o de Afshari *et.al.*, o incremento de células Th17 e da sua citocina IL-17A, ao nível do SP, em doentes submetidos a transplante hepático está associado à ocorrência de disfunção e RCA do enxerto



[198,199]. Considerando estas evidências e a forte tendência, verificada no nosso estudo, para um aumento da porcentagem de células Th17, nos doentes submetidos a transplante com eosinofilia, podemos prever que estes doentes parecem ter uma tendência para passar por episódios de RCA.

Desta forma, no nosso estudo, a presença de eosinofilia periférica em crianças que foram submetidas a transplante hepático, parece estar associada a um processo alérgico/inflamatório mediado por uma elevação dos níveis de IgE, envolvendo várias células associadas a uma imunidade inata: os basófilos, as pDC e mDC, os monócitos clássicos (sobretudo a população de monócitos IgE+) e os neutrófilos. Adicionalmente, o aumento da porcentagem de células B memória e plasmoblastos a expressar IgA mostrou existir um claro envolvimento das células B nesta desordem eosinofílica, em crianças transplantadas. Em relação às células T, embora não tenham verificado grandes alterações, foi observada uma tendência para um aumento das células Th17 nas crianças transplantadas com eosinofilia.

Assim, de uma forma geral, o mecanismo associado à ocorrência desta eosinofilia periférica, em crianças submetidas a transplante hepático, parece envolver várias células do nosso sistema imune que poderão estar a contribuir para a manutenção de um processo inflamatório periférico que, potencialmente poderá estender-se aos tecidos inflamados, nomeadamente ao enxerto hepático.



## **Conclusão**

---



## 8- Conclusão

Neste estudo, a presença de eosinofilia periférica em crianças que foram submetidas a transplante hepático, parece estar associada a um processo alérgico/inflamatório mediado por uma elevação dos níveis séricos de IgE, que se traduziu, no aumento da IgE ligada ao seu receptor de alta-afinidade em todas as células que o expressam, nomeadamente os basófilos, pDC, mDC e numa pequena subpopulação de monócitos clássicos. Esta ligação IgE/FC $\epsilon$ RI parece induzir alterações fenotípicas, que parecem estar associadas a ganhos de função, o que pode ser um sinal de ativação periférica das células da imunidade inata. Adicionalmente, também foram observadas alterações na imunidade adquirida, sobretudo ao nível das células B memória e dos plasmoblastos, com um aumento destas a expressar IgA, e um aumento das células Th17.

Concluindo, as várias células imunitárias envolvidas no mecanismo inerente à ocorrência desta eosinofilia periférica, em crianças submetidas a transplante hepático, poderão estar a contribuir para um ambiente mais proinflamatório periférico que, potencialmente poderá alcançar tecidos inflamados, nomeadamente o enxerto hepático. Estas células, que se encontram em circulação são recrutadas para os locais de inflamação, como o tecido do enxerto, favorecendo a infiltração leucocitária e a libertação de mediadores pro-inflamatórios, que podem contribuir para o dano do tecido do enxerto e consequente disfunção deste.

Como perspetivas futuras, seria interessante proceder à análise de vários mediadores inflamatórios no soro destas crianças, nomeadamente da histamina, das quimiocinas RANTES e os vários tipos de eotaxina (CCL11, CCL24 e CCL26), das citocinas IL-3, IL-5, IL-4 e IL-13 e os mediadores lipídicos LTB<sub>4</sub>, LTC<sub>4</sub> e PGD<sub>2</sub>. Também seria relevante realizar o estudo de biópsias hepáticas destes doentes, de forma a verificar a presença de infiltração leucocitária, principalmente de eosinófilos.

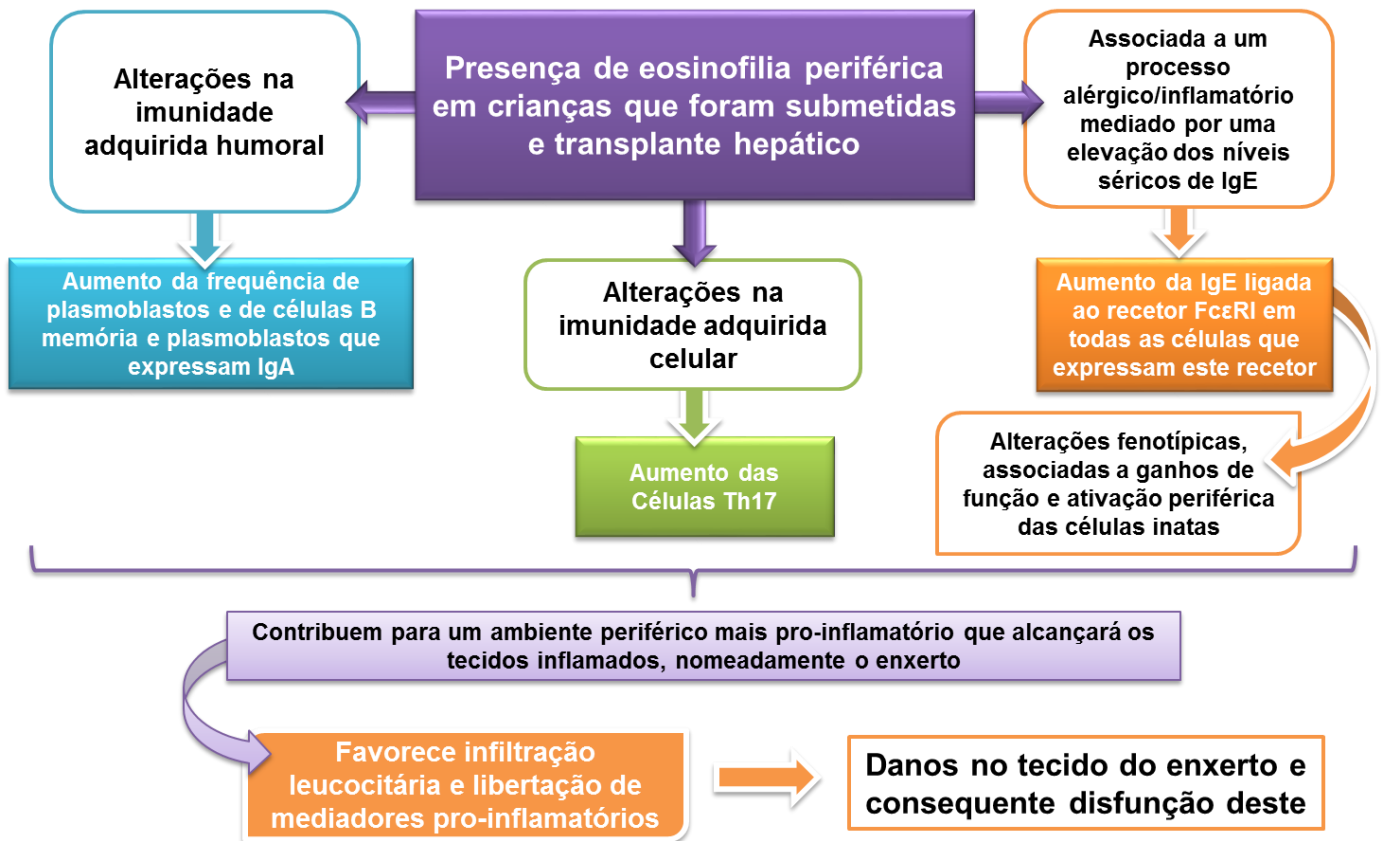


Figura 28. Esquema que resume as principais conclusões do estudo realizado.

# **Bibliografia**

---





## 9- Bibliografia

1. Spada M, Riva S, Maggiore G, Cintorino D, Gridelli B. Pediatric liver transplantation. *World J Gastroenterol*. 2009;15(6):648–74.
2. Squires RH, Ng V, Romero R, Ekong U, Hardikar W, Emre S, Mazariegos G V. Evaluation of the pediatric patient for liver transplantation: 2014 practice guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases, American Society of Transplantation and the North American Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatol. *Hepatology*. 2014;60(1):362–98.
3. Ingulli E. Mechanism of cellular rejection in transplantation. *Pediatr Nephrol*. 2010;25(1):61–74.
4. Roopenian D, Choi EY, Brown A. The immunogenomics of minor histocompatibility antigens. *Immunol Rev*. 2002;190(2):86–94.
5. Adams DH, Neuberger JM. Patterns of graft rejection following liver transplantation. *J Hepatol*. 1990;10(1):113–9.
6. Della-Guardia B, Almeida MD, Meira-Filho SP, Torres MA, Venco F, Afonso RC, Ferraz-Neto BH. Antibody-mediated rejection: hyperacute rejection reality in liver transplantation? A case report. *Transplant Proc*. 2008;40(3):870–1.
7. Taner T, Stegall MD, Heimbach JK. Antibody-mediated rejection in liver transplantation: current controversies and future directions. *Liver Transpl*. 2014;20(5):514–27.
8. Neil DAH, Hübscher SG. Current views on rejection pathology in liver transplantation. *Transpl Int*. 2010;23(10):971–83.
9. Ali JM, Bolton EM, Bradley JA, Pettigrew GJ. Allorecognition pathways in transplant rejection and tolerance. *Transplantation*. 2013;96(8):681–8.
10. Herrera OB, Golshayan D, Tibbott R, Ochoa FS, James MJ, Marelli-Berg FM, Lechler RI. A Novel Pathway of Alloantigen Presentation by Dendritic Cells. *J Immunol*. 2004;173(8):4828–37.
11. Paiva A, Pereira S V, Ballesteros R, Freitas A, Perdigoto R, Mota O, Ferrão J,

- Tomé L, Furtado E, Cipriano MA, Geraldés B, Oliveira FJ, Furtado AL, Regateiro FJ. Cytokine-producing T lymphocytes as a marker of prognosis and rejection episodes in orthotopic liver transplantation. *Transplant Proc.* 2001;33(1-2):1528–30.
12. Abraham SC, Freese DK, Ishitani MB, Krasinskas AM, Wu T-T. Significance of central perivenulitis in pediatric liver transplantation. *Am J Surg Pathol.* 2008;32(10):1479–88.
  13. Nagral A, Ben-Ari Z, Dhillon AP, Burroughs AK. Eosinophils in acute cellular rejection in liver allografts. *Liver Transpl Surg.* 1998;4(5):355–62.
  14. Groen PC, Kephart GM, Gleich GJ, Ludwig J. The eosinophil as an effector cell of the immune response during hepatic allograft rejection. *Hepatology.* 1994;20(3):654–62.
  15. Foster PF, Bhattacharyya A, Sankary HN, Coleman J, Ashmann M WJ. Eosinophil cationic protein's role in human hepatic allograft rejection. *Hepatology.* 1991;13(6):1117–25.
  16. Foster PF, Sankary HN, Hart M, Ashmann M, Williams JW. Blood and graft eosinophilia as predictors of rejection in human liver transplantation. *Transplantation.* 1989;47(1):72–4.
  17. Nagral A, Quaglia A, Sabin C., Dhillon A., Bearcroft C., Millar A, Davies S., Mistry P., Davidson B., Rolles K, Burroughs A. Blood and graft eosinophils in acute cellular rejection of liver allografts. *Transplant Proc.* 2001;33(4):2588–93.
  18. O'Leary JG, Michelle Shiller S, Bellamy C, Nalesnik MA, Kaneku H, Jennings LW, Isse K, Terasaki PI, Klintmalm GB, Demetris AJ. Acute liver allograft antibody-mediated rejection: an inter-institutional study of significant histopathological features. *Liver Transpl.* 2014;20(10):1244–55.
  19. Freese DK, Snover DC, Sharp HL, Gross CR, Savick SK, Payne WD. Chronic rejection after liver transplantation: a study of clinical, histopathological and immunological features. *Hepatology.* 1991;13(5):882–91.
  20. Waaga AM, Gasser M, Laskowski I, Tilney NL. Mechanisms of chronic rejection. *Curr Opin Immunol.* 2000;12(5):517–21.
  21. Akbulut S, Yilmaz M, Yilmaz S. Graft-versus-host disease after liver transplantation: a comprehensive literature review. *World J Gastroenterol.* 2012;18(37):5240–8.

22. Chaib E, Silva FD, Figueira ERR, Lima FR, Andraus W, D'Albuquerque LAC. Graft-versus-host disease after liver transplantation. *Clin (São Paulo, Brazil)*. 2011;66(6):1115–8.
23. Schaffer J V. The changing face of graft-versus-host disease. *Semin Cutan Med Surg*. 2006;25(4):190–200.
24. Choudhary NS, Saigal S, Shukla R, Kotecha H, Saraf N, Soin AS. Current status of immunosuppression in liver transplantation. *J Clin Exp Hepatol*. 2013;3(2):150–8.
25. Nguyen C, Shapiro R. New immunosuppressive agents in pediatric transplantation. *Clin (São Paulo, Brazil)*. 2014;69(Suppl 1):8–16.
26. Coutinho AE, Chapman KE. The anti-inflammatory and immunosuppressive effects of glucocorticoids, recent developments and mechanistic insights. *Mol Cell Endocrinol*. 2011;335(1):2–13.
27. Williams CR, Gooch JL. Calcineurin inhibitors and immunosuppression - a tale of two isoforms. *Expert Rev Mol Med*. 2012;14(e14):1–10.
28. Liu JI, Farmer JD Jr, Lane WS, Friedman J, Weissman I SS. Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes. - PubMed - NCBI. *Cell*. 1991;66(4):807–15.
29. Maltzman JS, Koretzky GA. Azathioprine: old drug, new actions. *J Clin Invest*. 2003;111(8):1122–4.
30. Allison AC. Mechanisms of action of mycophenolate mofetil. *Lupus*. 2005;14 Suppl 1:s2–8.
31. Sintchak MD, Fleming MA, Futer O, Raybuck SA, Chambers SP, Caron PR, Murcko MA, Wilson KP, Allison AC, Hovi T, Watts RWE, Webster ADB, Allison AC, Hovi T, Watts RWE, Webster ADB, Allison AC, Eugui EM, Andrews SC, Guest JR, Antonino LC, Straub K, Wu JC, Blundell TL, Johnson LN, Bork P, Gellerich J, Groth H, Hooft R, Martin F, Brunger AT, Carr SF, Papp E, Wu JC, Natsumeda Y, Carson M, Collart FR, Hubermann E, Collart FR, Hubermann E, Collart FR, Chubb CB, Mirkin BL, Huberman E, Cooney D, Hamel E, Cohen M, Kang GJ, Dalal M, Marquez V, Crabtree GW, Henderson JF, Dayton JS, Lindsten R, Thompson CB, Mitchell BS, Fleming MA, Chambers SP, Connelly PR, Nimmegern E, Fox T, Bruzzese FJ, Hoe ST, Fulghum JR, Livingston DJ, Stuver CM, Sintchak MD, Wilson KP, Thomson JA, Franklin TJ, Cook JM, Giblett ER,

Anderson JE, Cohen F, Meuwissen HJ, Gosio B, Hager PW, Collart FR, Huberman E, Mitchell BS, Harrison W, Shearer MM, Trotter J, Hedstrom L, Wang CC, Hodges SD, Fung E, McKay DJ, Renaux BS, Snyder FF, Holm L, Sander C, Holmes EW, Pehlke DM, Kelley WN, Huete-Perez JA, Wu JC, Whitby FG, Wang CC, Jackson RCB, Weber G, Harris HP, Kabsch W, Sander C, Konno Y, Natsumeda Y, Nagai M, Yamaji Y, Ohno S, Suzuki K, Weber G, Lee HJ, Pawlak K, Nguyen BT, Robins RK, Sadee W, Lightfoot T, Synder FF, Link JO, Straub K, Makara GM, Keseru GM, Kajtar-Peredy M, Anderson WK, Morrison JF, Nagai M, Natsumeda Y, Konno Y, Hoffman R, Irino S, Weber G, Nagai M, Natsumeda Y, Weber G, Nakamura H, Natsumeda Y, Nagai M, Takahara J, Irino S, Weber G, Natsumeda Y, Ikegami T, Murayama K, Weber G, Natsumeda Y, Ohno S, Kawasaki H, Konno Y, Weber G, Suzuki K, Natsumeda Y, Carr SF, Nijkamp HJJ, Haan PG, Rashchian A, Thornton CG, Heidecker G, Read RJ, Rice LM, Brunger AT, Senda M, Natsumeda Y, Shaw LM, Sollinger HW, Halloran P, Morris RE, Yatscoff RW, Ransom J, Tsina I, Keown P, Holt DW, Lieberman R, Jaklitsch A, Potter J, Snyder FF, Henderson JF, Cook DA, Sollinger HW, Spector T, Jones TE, Miller RL, Wang W, Papov VV, Minakawa N, Matsuda A, Biemann K, Hedstrom L, Weber G, Wolfenden R, Kati WM, Wu Y-D, Lai DKW, Houk KN, Xiang B, Taylor JC, Markham GD. Structure and mechanism of inosine monophosphate dehydrogenase in complex with the immunosuppressant mycophenolic acid. *Cell*. 1996;85(6):921–30.

32. Sehgal SN, Vezina C, Kudelski A, Sehgal SN, Sehgal SN, Baker H, Vezina C, White PS, Swindells DCN, Paiva NL, Demain AL, Roberts MF, McAlpine JB, Swanson SJ, Jackson M, Sehgal SN, Sehgal SN, Molnar-Kimber K, Ocain TD, Al. E, Liu J, Albers MW, Wandless TJ, Al. E, McCaffrey PG, Perrino BA, Soderling TR, Al. E, Brown EJ, Albers MW, Shin TB, Al. E, Chen Y, Chen H, Rhoads AE, Al. E, Sabers CJ, Williams JM, Wiederrecht G, Al. E, Sabatini DM, Erdjument-Bromage H, Lui M, Al. E, Parrot LA, Templeton DJ, Jefferies HBJ, Fumagalli S, Dennis PB, Al. E, Jefferies HBJ, Reinhard C, Kozma SC, Al. E, Javier AF, Bata-Csorgo Z, Ellis CN, Al. E, Feuerstein N, Firestein R, Aiyar N, Al. E, Lai JH, Tan H, Beretta L, Gingras A, Svitkin YV, Al. E, Brunn GJ, Hudson CC, Sekulic A, Al. E, Nourse J, Firpo E, Flanagan WM, Al. E, Flanagan WM, Crabtree GR, Heitman J, Movva NR, Hiestand PC, Al. E, Koltin Y, Faucette L, Bergsma DJ, Al. E, Baker H, Sidorowicz A, Sehgal SN, Al. E, Douros J, Suffness M, Eng CP, Sehgal SN, Vezina C, Dumont FJ, Staruch MJ, Koprak SL, Al. E, Kay JE, Kromwel L, Doe SEA, Al. E, Kahan BD, Gibbons S, Tejpal N, Al. E, Sawada S, Suzuki G, Kawase Y, Al. E, Kay JE, Benzie CR, Goodier MR, Al. E, June CH, Ledbetter JA, Gillespie MA, Al. E, Lin CS, Boltz RC, Siekerka JJ, Al. E, Bierer BE, Somers PK, Wandless TJ, Al. E, Terada N, Lucas JJ, Szepesi A, Al. E, Sehgal SN, Bansbach CC, Li X, Zheng X, Zand M, Al. E, Bertagnolli MM, Yang L, Herrmann SH, Al. E, Almawi WY, Assi JW, Chudzik DM, Strehlau J, Maslinski W, Chae D, Al. E, Li XC, Zeng XX, Strom TB, Aagaard-Tillery KM, Jelinek D, Kim HS, Raskova J, Degiannis D, Al. E, Ferraresso M, Tian L, Ghobrial R, Al. E, Akselband Y, Harding MW, Nelson PA, Gregory CR, Pratt RE, Huie P, Al. E, Marx S, Jayaraman T, Go LO, Al. E, Cao W, Mohacsi P, Shorthouse R, Al. E, Kahan BD, Gibbons S, Tejpal N, Al. E, Stepkowski S, Napoli K, Wang M, Al. E, Kahan BD, Kramer WG, Dumont FJ, Melino MR, Staruch MJ, Al. E, Hatfield SM, Mynderse JS, Roehm NW, Chen H, Qi S, Xu D, Al. E, Chen H, Qi S, Xu D, Al. E, DiJoseph J, Fluhler E, Armsrong J, Al. E, Granger DK, Cromwell JW, Chen SC, Al. E, Fryer J, Yatscoff RW, Pascoe

- EA, Al. E, Stepkowski S, Tian L, Napoli K, Al. E, Stepkowski S, Napoli K, Wang M, Al. E, Carlson RP, Baeder WL, Caccese RG, Al. E, Billingham ME, Gregory CR, Huang X, Pratt RE, Al. E, Gallo R, Padurean A, Jayaraman T, Al. E, Sousa JE, Costa MA, Alexandre CA, Al. E, Ikonen TS, Gummert JF, Hayase M, Al. E, Whiting PH, Adam BJ, Woo J, Al. E, DiJoseph JF, Sharma RN, Chang JY, DiJoseph JF, Mihatsch MJ, Sehgal SN, Burdmann EA, Andoh TF, Franceschini N, Al. E, DiJoseph JF, Sehgal SN, Almond PS, Moss A, Nakhleh RE, Al. E, Granger DK, Cromwell JW, Chen SC, Al. E, Wang J, Zheng B, Day P, Al. E, Lyson T, Ermel LD, Belshaw PJ, Al. E. Sirolimus: its discovery, biological properties, and mechanism of action. *Transplant Proc.* 2003;35(3 Suppl):7S – 14S.
33. Ganschow R, Pollok J-M, Jankofsky M, Junge G. The role of everolimus in liver transplantation. *Clin Exp Gastroenterol.* 2014;7:329–43.
34. Ganschow R, Broering DC, Stuerenburg I, Rogiers X, Hellwege HH, Burdelski M. First experience with basiliximab in pediatric liver graft recipients. *Pediatr Transplant.* 2001;5(5):353–8.
35. Green M, Mazariegos G V. Persistent detection of Epstein-Barr virus DNA after pediatric liver transplantation: Unclear risks and uncertain responses. *Liver Transplant.* 2008;14(8):1077–80.
36. Kawano Y, Mizuta K, Sanada Y, Urahashi T, Ihara Y, Okada N, Yamada N, Sasanuma H, Sakuma Y, Taniai N, Yoshida H, Kawarasaki H, Yasuda Y, Uchida E, Krampe K, Briem-Richter A, Fischer L, Al. E, Gane E, Saliba F, Valdecasas GJ, Al. E, Kotton CN, Kumar D, Caliendo AM, Al. E, Bruminhent J, Razonable RR, Saitoh A, Sakamoto S, Fukuda A, Al. E, Lautenschlager I, Bowman JS, Green M, Scantlebury VP, Al. E, Kotton CN, Kumar D, Caliendo AM, Al. E. Risk factors of cytomegalovirus infection after pediatric liver transplantation. *Transplant Proc.* 2014;46(10):3543–7.
37. Hori T, Ogura Y, Okamoto S, Nakajima A, Kami K, Iwasaki J, Yonekawa Y, Ogawa K, Oike F, Takada Y, Egawa H, Nguyen JH, Uemoto S. Herpes simplex virus hepatitis after pediatric liver transplantation. *Transpl Infect Dis.* 2010;12(4):353–7.
38. Shigeta T, Imadome K, Sakamoto S, Fukuda A, Kakiuchi T, Matsuno N, Tanaka H, Nakazawa A, Kasahara M, Paya CV, Fung JJ, Nalesnik MA, Al. E, Fernandez MC, Bes D, Davila M De, Al. E, Smets F, Sokal EM, Busuttill RW, Klintmalm GB, Hurwitz M, Desai DM, Cox KL, Al. E, Kerkar N, Morotti RA, Madan RP, Al. E, Stevens SJ, Verschuuren EA, Pronk I, Al. E, Lee TC, Savoldo B, Rooney CM, Al. E, Yokoyama S, Kasahara M, Fukuda A, Al. E, Yokoyama S, Kasahara M, Fukuda A, Al. E. Epstein-Barr virus infection after pediatric living-related liver transplantation--management and risk factors. *Transplant Proc.* 2010;42(10):4178–80.

39. Granot E, Yakobovich E, Bardenstein R. Tacrolimus immunosuppression - an association with asymptomatic eosinophilia and elevated total and specific IgE levels. *Pediatr Transplant*. 2006;10(6):690–3.
40. Lee JH, Park HY, Choe YH, Lee S-K, Lee S II. The development of eosinophilic colitis after liver transplantation in children. *Pediatr Transplant*. 2007;11(5):518–23.
41. Saeed SA, Integlia MJ, Pleskow RG, Calenda KA, Rohrer RJ, Dayal Y, Grand RJ. Tacrolimus-associated eosinophilic gastroenterocolitis in pediatric liver transplant recipients: Role of potential food allergies in pathogenesis. *Pediatr Transplant*. 2006;10(6):730–5.
42. Lebel MJ, Chapdelaine H, Paradis L, Des Roches A, Alvarez F. Increase in de novo food allergies after pediatric liver transplantation: Tacrolimus vs. cyclosporine immunosuppression. *Pediatr Transplant*. 2014;18(7):733–9.
43. Matsukura A, Kita Y, Harihara Y, Tanaka H, Ito M, Kawarasaki H, Kubota K, Takayama T, Hashizume K, Makuuchi M. Does peripheral blood eosinophilia predict allograft rejection in living-related liver transplantation? *Transplant Proc*. 1999;31(7):2729–30.
44. Acharya KR, Ackerman SJ. Eosinophil granule proteins: form and function. *J Biol Chem*. 2014;289(25):17406–15.
45. Hogan SP, Rosenberg HF, Moqbel R, Phipps S, Foster PS, Lacy P, Kay AB, Rothenberg ME. Eosinophils: Biological properties and role in health and disease. *Clin Exp Allergy*. 2008;38(5):709–50.
46. Rosenberg HF, Dyer KD, Foster PS. Eosinophils: changing perspectives in health and disease. *Nat Rev Immunol*. 2013;13(1):9–22.
47. Jones TW. The Blood-Corpuscle Considered in Its Different Phases of Development in the Animal Series. Memoir III. Comparison between the Blood-Corpuscle of the Vertebrata and That of the Invertebrata. *Philos Trans R Soc London*. 1846;136:103–6.
48. Ehrlich P. Beiträge zur Kenntnis der granulierenden Bindegewebszellen und der eosinophilen. *Arch Anat Physiol*. 1879;166–9.
49. Voehringer D. Regulation and Function of Basophil, Eosinophil, and Mast Cell Responses. In: *The Th2 Type Immune Response in Health and Disease*. New York, NY; 2016. p. 1–12.

50. McNagny K, Graf T. Making Eosinophils Through Subtle Shifts in Transcription Factor Expression. *J Exp Med*. 2002;195(11):43–7.
51. Kita H. Eosinophils: multifaceted biological properties and roles in health and disease. *Immunol Rev*. 2011;242(1):161–77.
52. Brigden M, Graydon C. Eosinophilia detected by automated blood cell counting in ambulatory North American outpatients: Incidence and clinical significance. *Arch Pathol Lab Med*. 1997;121(9):963–7.
53. Tefferi A, Patnaik MM, Pardanani A. Eosinophilia: secondary, clonal and idiopathic. *Br J Haematol*. 2006;133(5):468–92.
54. Valent P, Klion AD, Horny H-P, Roufosse F, Gotlib J, Weller PF, Hellmann A, Metzgeroth G, Leiferman KM, Arock M, Butterfield JH, Sperr WR, Sotlar K, Vandenberghe P, Haferlach T, Simon H-U, Reiter A, Gleich GJ. Contemporary consensus proposal on criteria and classification of eosinophilic disorders and related syndromes. *J Allergy Clin Immunol*. 2012;130(3):607–12.
55. Gotlib J. World Health Organization-defined eosinophilic disorders: 2015 update on diagnosis, risk stratification, and management. *Am J Hematol*. 2015;90(11):1077–89.
56. Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, Brunning RD, Borowitz MJ, Porwit A, Harris NL, Le Beau MM, Hellström-Lindberg E, Tefferi A, Bloomfield CD. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood*. 2009;114(5):937–51.
57. Valent P. Pathogenesis, classification, and therapy of eosinophilia and eosinophil disorders. *Blood Rev*. 2009;23(4):157–65.
58. Tefferi A, Vardiman JW. Classification and diagnosis of myeloproliferative neoplasms: the 2008 World Health Organization criteria and point-of-care diagnostic algorithms. *Leukemia*. 2008;22(1):14–22.
59. Celestin J, Frieri M. Eosinophilic disorders in various diseases. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2012;12(1):18–24.
60. Klion AD, Nutman TB. The role of eosinophils in host defense against helminth parasites. *J Allergy Clin Immunol*. 2004;113(1):30–7.

61. Woolnough K, Wardlaw AJ. Eosinophilia in Pulmonary Disorders. *Immunol Allergy Clin North Am.* 2015;35(3):477–92.
62. Jacobsen EA, Ochkur SI, Pero RS, Taranova AG, Protheroe CA, Colbert DC, Lee NA, Lee JJ. Allergic pulmonary inflammation in mice is dependent on eosinophil-induced recruitment of effector T cells. *J Exp Med.* 2008;205(3):699–710.
63. Furuta GT. Eosinophilic esophagitis: update on clinicopathological manifestations and pathophysiology. *Curr Opin Gastroenterol.* 2011;27(4):383–8.
64. Mockenhaupt M. Severe drug-induced skin reactions: clinical pattern, diagnostics and therapy. *J Dtsch Dermatol Ges.* 2009;7(2):142–60.
65. Phillips EJ, Chung W-H, Mockenhaupt M, Roujeau J-C, Mallal SA. Drug hypersensitivity: pharmacogenetics and clinical syndromes. *J Allergy Clin Immunol.* 2011;127(3 Suppl):S60–6.
66. Pichler WJ, Beeler A, Keller M, Lerch M, Posadas S, Schmid D, Spanou Z, Zawodniak A, Gerber B. Pharmacological interaction of drugs with immune receptors: the p-i concept. *Allergol Int.* 2006;55(1):17–25.
67. Williams KW, Milner JD, Freeman AF. Eosinophilia Associated with Disorders of Immune Deficiency or Immune Dysregulation. *Immunol Allergy Clin North Am.* 2015;35(3):523–44.
68. Simon D, Simon HU. Eosinophilic disorders. *J Allergy Clin Immunol.* 2007;119(6):1291–300.
69. Jacobsohn DA, Schechter T, Seshadri R, Thormann K, Duerst R, Kletzel M. Eosinophilia correlates with the presence or development of chronic graft-versus-host disease in children. *Transplantation.* 2004;77(7):1096–100.
70. Travers J, Rothenberg ME. Eosinophils in mucosal immune responses. *Mucosal Immunol.* 2015;8(3):464–75.
71. Collins PD, Marleau S, Griffiths-Johnson DA, Jose PJ, Williams TJ. Cooperation between interleukin-5 and the chemokine eotaxin to induce eosinophil accumulation in vivo. *J Exp Med.* 1995;182(4):1169–74.
72. Farahi N, Singh NR, Heard S, Loutsios C, Summers C, Solanki CK, Solanki K, Balan KK, Ruparelia P, Peters AM, Condliffe AM, Chilvers ER. Use of 111-



- Indium-labeled autologous eosinophils to establish the in vivo kinetics of human eosinophils in healthy subjects. *Blood*. 2012;120(19):4068–71.
73. Mishra A, Hogan SP, Lee JJ, Foster PS, Rothenberg ME. Fundamental signals that regulate eosinophil homing to the gastrointestinal tract. *J Clin Invest*. 1999;103(12):1719–27.
  74. Waddell A, Ahrens R, Steinbrecher K, Donovan B, Rothenberg ME, Munitz A, Hogan SP. Colonic eosinophilic inflammation in experimental colitis is mediated by Ly6C(high) CCR2(+) inflammatory monocyte/macrophage-derived CCL11. *J Immunol*. 2011;186(10):5993–6003.
  75. Ahrens R, Waddell A, Seidu L, Blanchard C, Carey R, Forbes E, Lampinen M, Wilson T, Cohen E, Stringer K, Ballard E, Munitz A, Xu H, Lee N, Lee JJ, Rothenberg ME, Denson L, Hogan SP. Intestinal macrophage/epithelial cell-derived CCL11/eotaxin-1 mediates eosinophil recruitment and function in pediatric ulcerative colitis. *J Immunol*. 2008;181(10):7390–9.
  76. Mould AW, Matthaei KI, Young IG, Foster PS. Relationship between interleukin-5 and eotaxin in regulating blood and tissue eosinophilia in mice. *J Clin Invest*. 1997;99(5):1064–71.
  77. Shen Z-J, Malter JS. Determinants of eosinophil survival and apoptotic cell death. *Apoptosis*. 2015;20(2):224–34.
  78. Nussbaum JC, Van Dyken SJ, von Moltke J, Cheng LE, Mohapatra A, Molofsky AB, Thornton EE, Krummel MF, Chawla A, Liang H-E, Locksley RM. Type 2 innate lymphoid cells control eosinophil homeostasis. *Nature*. 2013;502(7470):245–8.
  79. Blanchard C, Rothenberg ME. Biology of the eosinophil. *Adv Immunol*. 2009;101:81–121.
  80. Rothenberg M, Owen W, Silberstein D, Soberman R, Austen K, Stevens R. Eosinophils cocultured with endothelial cells have increased survival and functional properties. *Science* (80- ). 1987;237(4815):645–7.
  81. Vadas M, Lopez A, Gamble J, Khew-Goodall Y, Smith W, Bernard C, Cockerill G, Cockerill P, Shannon F, Sun Q, Korpelainen E, van den Heuvel C, Hercus T. Cytokines and allergy. *J Allergy Clin Immunol*. 1994;94(6):1289–93.
  82. Bochner BS, Schleimer RP. The role of adhesion molecules in human eosinophil and basophil recruitment. *J Allergy Clin Immunol*. 1994;94(3 Pt 1):427–38.

83. Zimmermann N, Hershey GK, Foster PS, Rothenberg ME. Chemokines in asthma: cooperative interaction between chemokines and IL-13. *J Allergy Clin Immunol*. 2003;111(2):227–42.
84. Tager AM, Dufour JH, Goodarzi K, Bercury SD, von Andrian UH, Luster AD. BLTR mediates leukotriene B(4)-induced chemotaxis and adhesion and plays a dominant role in eosinophil accumulation in a murine model of peritonitis. *J Exp Med*. 2000;192(3):439–46.
85. Rosenberg HF, Phipps S, Foster PS. Eosinophil trafficking in allergy and asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2007;119(6):1303–10.
86. Blanchard C, Wang N, Stringer KF, Mishra A, Fulkerson PC, Abonia JP, Jameson SC, Kirby C, Konikoff MR, Collins MH, Cohen MB, Akers R, Hogan SP, Assa'ad AH, Putnam PE, Aronow BJ, Rothenberg ME. Eotaxin-3 and a uniquely conserved gene-expression profile in eosinophilic esophagitis. *J Clin Invest*. 2006;116(2):536–47.
87. Goenka S, Kaplan MH. Transcriptional regulation by STAT6. *Immunol Res*. 2011;50(1):87–96.
88. Blanchard C, Mingler MK, McBride M, Putnam PE, Collins MH, Chang G, Stringer K, Abonia JP, Molkentin JD, Rothenberg ME. Periostin facilitates eosinophil tissue infiltration in allergic lung and esophageal responses. *Mucosal Immunol*. 2008;1(4):289–96.
89. Parulekar AD, Atik MA, Hanania NA. Periostin, a novel biomarker of TH2-driven asthma. *Curr Opin Pulm Med*. 2014;20(1):60–5.
90. Ziegler SF, Roan F, Bell BD, Stoklasek TA, Kitajima M, Han H. The biology of thymic stromal lymphopoietin (TSLP). *Adv Pharmacol*. 2013;66:129–55.
91. Blanchard C, Mingler MK, Vicario M, Abonia JP, Wu YY, Lu TX, Collins MH, Putnam PE, Wells SI, Rothenberg ME. IL-13 involvement in eosinophilic esophagitis: transcriptome analysis and reversibility with glucocorticoids. *J Allergy Clin Immunol*. 2007;120(6):1292–300.
92. Pope SM, Fulkerson PC, Blanchard C, Akei HS, Nikolaidis NM, Zimmermann N, Molkentin JD, Rothenberg ME. Identification of a cooperative mechanism involving interleukin-13 and eotaxin-2 in experimental allergic lung inflammation. *J Biol Chem*. 2005;280(14):13952–61.

93. Gauvreau GM, El-Gammal AI, O'Byrne PM. Allergen-induced airway responses. *Eur Respir J*. 2015;46(3):819–31.
94. Elishmereni M, Alenius HT, Bradding P, Mizrahi S, Shikotra A, Minai-Fleminger Y, Mankuta D, Eliashar R, Zabcchi G, Levi-Schaffer F. Physical interactions between mast cells and eosinophils: a novel mechanism enhancing eosinophil survival in vitro. *Allergy*. 2011;66(3):376–85.
95. Elishmereni M, Bachelet I, Ben-Efraim AHN, Mankuta D, Levi-Schaffer F. Interacting mast cells and eosinophils acquire an enhanced activation state in vitro. *Allergy Eur J Allergy Clin Immunol*. 2013;68(2):171–9.
96. Stone KD, Prussin C, Metcalfe DD. IgE, Mast Cells, Basophils and Eosinophils. *J Allergy Clin Immunol*. 2011;125:1–16.
97. Nagase H, Okugawa S, Ota Y, Yamaguchi M, Tomizawa H, Matsushima K, Ohta K, Yamamoto K, Hirai K. Expression and function of Toll-like receptors in eosinophils: activation by Toll-like receptor 7 ligand. *J Immunol*. 2003;171(8):3977–82.
98. Muraki M, Gleich GJ, Kita H. Antigen-specific IgG and IgA, but not IgE, activate the effector functions of eosinophils in the presence of antigen. *Int Arch Allergy Immunol*. 2011;154(2):119–27.
99. Gounni AS, Lamkhioued B, Ochiai K, Tanaka Y, Delaporte E, Capron A, Kinet JP, Capron M. High-affinity IgE receptor on eosinophils is involved in defence against parasites. *Nature*. 1994;367(6459):183–6.
100. Wakashin H, Hirose K, Maezawa Y, Kagami S, Suto A, Watanabe N, Saito Y, Hatano M, Tokuhisa T, Iwakura Y, Puccetti P, Iwamoto I, Nakajima H. IL-23 and Th17 Cells Enhance Th2-Cell-mediated Eosinophilic Airway Inflammation in Mice. *Am J Respir Crit Care Med*. 2008;178(10):1023–32.
101. Dias PM, Banerjee G. The role of Th17/IL-17 on eosinophilic inflammation. *J Autoimmun*. 2013;40:9–20.
102. Kaplan MH. Th9 cells: differentiation and disease. *Immunol Rev*. 2013;252(1):104–15.
103. Hoppenot D, Malakauskas K, Lavinskienė S, Bajoriūnienė I, Kalinauskaitė V, Sakalauskas R. Peripheral blood Th9 cells and eosinophil apoptosis in asthma patients. *Medicina (Kaunas)*. 2015;51(1):10–7.

104. Sanada Y, Ushijima K, Mizuta K, Urahashi T, Ihara Y, Wakiya T, Okada N, Yamada N, Egami S, Hishikawa S, Otomo S, Sakamoto K, Yasuda Y, Kawarasaki H. Prediction of acute cellular rejection by peripheral blood eosinophilia in pediatric living donor liver transplantation. *Transplant Proc.* 2012;44(5):1341–5.
105. Rodríguez-Perálvarez M, Germani G, Tsochatzis E, Rolando N, Luong TV, Dhillon AP, Thorburn D, O’Beirne J, Patch D, Burroughs AK. Predicting severity and clinical course of acute rejection after liver transplantation using blood eosinophil count. *Transpl Int.* 2012;25(5):555–63.
106. Barnes EJ, Abdel-Rehim MM, Goulis Y, Abou Ragab M, Davies S, Dhillon A, Davidson B, Rolles K, Burroughs A. Applications and limitations of blood eosinophilia for the diagnosis of acute cellular rejection in liver transplantation. *Am J Transplant.* 2003;3(4):432–8.
107. Wang G-Y, Li H, Liu W, Zhang J, Zhu H-B, Wang G-S, Zhang Q, Yang Y, Chen G-H. Elevated blood eosinophil count is a valuable biomarker for predicting late acute cellular rejection after liver transplantation. *Transplant Proc.* 2013;45(3):1198–200.
108. Kishi Y, Sugawara Y, Tamura S, Kaneko J, Akamatsu N, Togashi J, Makuuchi M. Is blood eosinophilia an effective predictor of acute rejection in living donor liver transplantation? *Transpl Int.* 2005;18(10):1147–51.
109. Parashette KR, Zeytinoglu M, Kernek K, Molleston JP, Subbarao G. Clinical, endoscopic, and histologic features of eosinophilic inflammation of the gastrointestinal tract in pediatric liver transplant patients. *Pediatr Transplant.* 2013;17(8):737–43.
110. Ozbek OY, Ozcay F, Avci Z, Haberal A, Haberal M. Food allergy after liver transplantation in children: a prospective study. *Pediatr Allergy Immunol.* 2009;20(8):741–7.
111. Noble C, Francis L, Withers GW, Ee LC, Lewindon PJ. Audit of eosinophilic oesophagitis in children post-liver transplant. *Pediatr Transplant.* 2009;13(7):827–30.
112. Romero R, Abramowsky CR, Pillen T, Smallwood GA, Heffron TG. Peripheral eosinophilia and eosinophilic gastroenteritis after pediatric liver transplantation. *Pediatr Transplant.* 2003;7(6):484–8.
113. Dhawan A, Seemayer TA, Pinsinski C, Gross TG, Shaw BW, Mack DR. Posttransplant eosinophilic gastroenteritis in children. *Liver Transpl Surg.* 1997;3(6):591–3.

114. Catal F, Topal E, Selimoglu MA, Karabiber H, Baskıran A, Senbaba E, Varol I, Yılmaz S. Acquired IgE-mediated food allergy after liver transplantation in children. *Allergol Immunopathol (Madr)*. 2015;43(4):392–7.
115. Rothenberg ME, Hogan SP. The eosinophil. *Annu Rev Immunol*. 2006;24:147–74.
116. Shamri R, Xenakis JJ, Spencer LA. Eosinophils in innate immunity: an evolving story. *Cell Tissue Res*. 2011;343(1):57–83.
117. Aceves SS, Broide DH. Airway fibrosis and angiogenesis due to eosinophil trafficking in chronic asthma. *Curr Mol Med*. 2008;8(5):350–8.
118. Yang D, Chen Q, Su SB, Zhang P, Kurosaka K, Caspi RR, Michalek SM, Rosenberg HF, Zhang N, Oppenheim JJ. Eosinophil-derived neurotoxin acts as an alarmin to activate the TLR2-MyD88 signal pathway in dendritic cells and enhances Th2 immune responses. *J Exp Med*. 2008;205(1):79–90.
119. Mattes J, Yang M, Mahalingam S, Kuehr J, Webb DC, Simson L, Hogan SP, Koskinen A, McKenzie ANJ, Dent LA, Rothenberg ME, Matthaei KI, Young IG, Foster PS. Intrinsic defect in T cell production of interleukin (IL)-13 in the absence of both IL-5 and eotaxin precludes the development of eosinophilia and airways hyperreactivity in experimental asthma. *J Exp Med*. 2002;195(11):1433–44.
120. Odemuyiwa SO, Ghahary A, Li Y, Puttagunta L, Lee JE, Musat-Marcu S, Ghahary A, Moqbel R. Cutting edge: human eosinophils regulate T cell subset selection through indoleamine 2,3-dioxygenase. *J Immunol*. 2004;173(10):5909–13.
121. Wang Y-H, Angkasekwinai P, Lu N, Voo KS, Arima K, Hanabuchi S, Hippe A, Corrigan CJ, Dong C, Homey B, Yao Z, Ying S, Huston DP, Liu Y-J. IL-25 augments type 2 immune responses by enhancing the expansion and functions of TSLP-DC-activated Th2 memory cells. *J Exp Med*. 2007;204(8):1837–47.
122. Spencer LA, Weller PF. Eosinophils and Th2 immunity: contemporary insights. *Immunol Cell Biol*. 2010;88(3):250–6.
123. Wang H-B, Weller PF. Pivotal advance: eosinophils mediate early alum adjuvant-elicited B cell priming and IgM production. *J Leukoc Biol*. 2008;83(4):817–21.
124. Chu VT, Berek C. Immunization induces activation of bone marrow eosinophils required for plasma cell survival. *Eur J Immunol*. 2012;42(1):130–7.

125. Wong TW, Doyle AD, Lee JJ, Jelinek DF. Eosinophils regulate peripheral B cell numbers in both mice and humans. *J Immunol*. 2014;192(8):3548–58.
126. Akuthota P, Wang HB, Spencer LA, Weller PF. Immunoregulatory roles of eosinophils: a new look at a familiar cell. *Clin Exp Allergy*. 2008;38(8):1254–63.
127. Lotfi R, Lotze MT. Eosinophils induce DC maturation, regulating immunity. *J Leukoc Biol*. 2008;83(3):456–60.
128. Piliponsky AM, Pickholtz D, Gleich GJ, Levi-Schaffer F. Human eosinophils induce histamine release from antigen-activated rat peritoneal mast cells: a possible role for mast cells in late-phase allergic reactions. *J Allergy Clin Immunol*. 2001;107(6):993–1000.
129. Patella V, de Crescenzo G, Marino I, Genovese A, Adt M, Gleich GJ, Marone G. Eosinophil granule proteins are selective activators of human heart mast cells. *Int Arch Allergy Immunol*. 1997;113(1-3):200–2.
130. Zeiger RS, Colten HR. Histaminase release from human eosinophils. *J Immunol*. 1977;118(2):540–3.
131. Piliponsky AM, Gleich GJ, Bar I, Levi-Schaffer F. Effects of eosinophils on mast cells: a new pathway for the perpetuation of allergic inflammation. *Mol Immunol*. 2002;38(16-18):1369.
132. Bullock ED, Johnson EM. Nerve growth factor induces the expression of certain cytokine genes and bcl-2 in mast cells. Potential role in survival promotion. *J Biol Chem*. 1996;271(44):27500–8.
133. Shenoy NG, Gleich GJ, Thomas LL. Eosinophil major basic protein stimulates neutrophil superoxide production by a class IA phosphoinositide 3-kinase and protein kinase C-zeta-dependent pathway. *J Immunol*. 2003;171(7):3734–41.
134. Page SM, Gleich GJ, Roebuck KA, Thomas LL. Stimulation of neutrophil interleukin-8 production by eosinophil granule major basic protein. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1999;21(2):230–7.
135. Wu D, Molofsky AB, Liang H-E, Ricardo-Gonzalez RR, Jouihan HA, Bando JK, Chawla A, Locksley RM. Eosinophils sustain adipose alternatively activated macrophages associated with glucose homeostasis. *Science*. 2011;332(6026):243–7.

136. Munitz A, Bachelet I, Eliashar R, Khodoun M, Finkelman FD, Rothenberg ME, Levi-Schaffer F. CD48 is an allergen and IL-3-induced activation molecule on eosinophils. *J Immunol.* 2006;177(1):77–83.
137. Kelly EAB, Liu LY, Esnault S, Quinchia Johnson BH, Jarjour NN. Potent synergistic effect of IL-3 and TNF on matrix metalloproteinase 9 generation by human eosinophils. *Cytokine.* 2012;58(2):199–206.
138. Esnault S, Kelly EA, Johansson MW, Liu LY, Han S-T, Akhtar M, Sandbo N, Mosher DF, Denlinger LC, Mathur SK, Malter JS, Jarjour NN. Semaphorin 7A is expressed on airway eosinophils and upregulated by IL-5 family cytokines. *Clin Immunol.* 2014;150(1):90–100.
139. Gregory B, Kirchem A, Phipps S, Gevaert P, Pridgeon C, Rankin SM RD. Differential regulation of human eosinophil IL-3, IL-5, and GM-CSF receptor alpha-chain expression by cytokines: expression. IL-3, IL-5, and GM-CSF down-regulate IL-5 receptor alpha expression with loss of IL-5 responsiveness, but up-regulate IL-3 receptor. *J Immunol.* 2003;170(11):5359–66.
140. Johansson M, Bove M, Bergquist H, Olsson M, Fornwall S, Hassel K, Wold AE, Wennerås C. Distinctive blood eosinophilic phenotypes and cytokine patterns in eosinophilic esophagitis, inflammatory bowel disease and airway allergy. *J Innate Immun.* 2011;3(6):594–604.
141. Patil SP, Wisnivesky JP, Busse PJ, Halm EA, Li X-M. Detection of immunological biomarkers correlated with asthma control and quality of life measurements in sera from chronic asthmatic patients. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2011;106(3):205–13.
142. Esnault S, Kelly EAB, Shen Z-J, Johansson MW, Malter JS, Jarjour NN. IL-3 Maintains Activation of the p90S6K/RPS6 Pathway and Increases Translation in Human Eosinophils. *J Immunol.* 2015;195(6):2529–39.
143. Sihra BS, Kon OM, Grant JA, Kay AB. Expression of high-affinity IgE receptors (F $\epsilon$ psilonRI) on peripheral blood basophils, monocytes, and eosinophils in atopic and nonatopic subjects: Relationship to total serum IgE concentrations. *J Allergy Clin Immunol.* 1997;99(5):699–706.
144. Vasudev M, Cheung DS, Pincsak H, Li S-H, Yan K, Simpson P, Dasu T, Grayson MH, Sigurs N, Aljassim F, Kjellman B, Robinson P, Sigurbergsson F, Sigurs N, Gustafsson P, Bjarnason R, Lundberg F, Schmidt S, Escobar G, Ragins A, Li S, Prager L, Masaquel A, Johnston S, Pattemore P, Sanderson G, Smith S, Campbell M, Grayson M, Cheung D, Rohlfing M, Kitchens R, Spiegel D, Cheung D,

- Ehlenbach S, Kitchens T, Riley D, Grayson M, Chen X, Leach D, Hunter D, Sanfelippo D, Buell E, Cheung D, Ehlenbach S, Kitchens R, Riley D, Thomas L, Khan S, Grayson M, Rissoan M, Duhon T, Bridon J, Bendriss-Vermare N, Peronne C, Cao W, Bover L, Cao W, Bover L, Cho M, Wen X, Hanabuchi S, Cao W, Rosen D, Ito T, Bover L, Bao M, Kirsche H, Niederfuhr A, Deutschle T, Fuchs C, Riechelmann H, Lundberg K, Greiff L, Borrebaeck C, Lindstedt M, Patterson S, Donaghy H, Amjadi P, Gazzard B, Gotch F, Foster B, Metcalfe D, Prussin C, Subrata L, Bizzantino J, Mamessier E, Bosco A, McKenna K, Silver E, Yin-DeClue H, Schechtman K, Grayson M, Bacharier L, Saini S, Jr DM, Adelman D, Jardieu P, Togias A, Prussin C, Griffith D, Boesel K, Lin H, Foster B, Dehlink E, Baker A, Yen E, Nurko S, Fiebiger E, Grayson M, Schroeder J, Bieneman A, Chichester K, Hamilton R, Xiao H, Thompson H, Metcalfe D, Kinet J, Jurgens M, Wollenberg A, Hanau D, Salle H de la, Bieber T. Expression of High-Affinity IgE Receptor on Human Peripheral Blood Dendritic Cells in Children. *PLoS One*. 2012;7(2):e32556.
145. Dehlink E, Baker AH, Yen E, Nurko S, Fiebiger E. Relationships between levels of serum IgE, cell-bound IgE, and IgE-receptors on peripheral blood cells in a pediatric population. *PLoS One*. 2010;5(8):e12204.
146. Noble C, Peake J, Lewindon PJ. Increase in de novo allergies after paediatric liver transplantation: The Brisbane experience. *Pediatr Transplant*. 2011;15(5):451–4.
147. Lee Y, Lee YM, Kim MJ, Lee SK, Choe YH. Long-term follow-up of de novo allergy in pediatric liver transplantation - 10 yr experience of a single center. *Pediatr Transplant*. 2013;17(3):251–5.
148. Topal E, Catal F, Selimoglu MA, Karabiber H, Klc T, Baskran A, Senbaba E, Ylmaz S. Acquired atopic disease after liver transplantation in children; similarities to and differences from adults: a preliminary study. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2014;26(9):1055–9.
149. Maarof G, Krzysiek R, Décline J-L, Cohen J, Habes D, Jacquemin E. Management of post-liver transplant-associated IgE-mediated food allergy in children. *J Allergy Clin Immunol*. 2011;127(5):1296–8.
150. Gabe SM, Bjarnason I, Tolou-Ghamari Z, Tredger JM, Johnson PG, Barclay GR, Williams R, Silk DB. The effect of tacrolimus (FK506) on intestinal barrier function and cellular energy production in humans. *Gastroenterology*. 1998;115(1):67–74.
151. De Bruyne R, Dullaers M, Van Biervliet S, Vande Velde S, Raes A, Gevaert P, Van Winckel M. Post-transplant food allergy in children is associated with liver and not with renal transplantation: a monocentric comparative study. *Eur J Pediatr*. 2013;172(8):1069–75.



152. Cardet J-C, Boyce JA, Lacaille F, Laurent J, Bousquet J, Nowak-Wegrzyn AH, Sicherer SH, Conover-Walker MK, Wood RA, Lykavieris P, Frauger E, Habes D, Bernard O, Debray D, Gabe SM, Bjarnason I, Tolou-Ghamari Z, Tredger JM, Johnson PG, Barclay GR, Al. E, Eiwegger T, Gruber S, Geiger C, Mayer E, Dehlink E, Bannert C, Al. E, Maarof G, Krzysiek R, Décline JL, Cohen J, Habes D, Jacquemin E, Rothenberg ME, Burks AW, Tang M, Sicherer S, Muraro A, Eigenmann PA, Ebisawa M, Al. E, Legendre C, Caillat-Zucman S, Samuel D, Morelon S, Bismuth H, Bach JF, Al. E, Savage JH, Kaeding AJ, Matsui EC, Wood RA, Savage JH, Matsui EC, Skripak JM, Wood RA, Prabhakaran K, Lau HT, Wise B, Schwarz K, Colombani PM, Granot E, Yakobovich E, Bardenstein R, Ozdemir O, Arrey-Mensah A, Sorensen RU, Levy Y, Davidovits M, Cleper R, Shapiro R. Addition of mycophenolate mofetil to tacrolimus is associated with decreases in food-specific IgE levels in a pediatric patient with liver transplantation-associated food allergy. *J Allergy Clin Immunol Pract.* 2013;1(1):104–6.
153. Hoffmann HJ, Santos AF, Mayorga C, Nopp A, Eberlein B, Ferrer M, Rouzaire P, Ebo DG, Sabato V, Sanz ML, Pecaric-Petkovic T, Patil SU, Hausmann O V., Shreffler WG, Korosec P, Knol EF. The clinical utility of basophil activation testing in diagnosis and monitoring of allergic disease. *Allergy.* 2015;70(11):1393–405.
154. Kawakami T, Galli SJ. Regulation of mast-cell and basophil function and survival by IgE. *Nat Rev Immunol.* 2002;2(10):773–86.
155. Luna-Gomes T, Bozza PT, Bandeira-Melo C. Eosinophil recruitment and activation: the role of lipid mediators. *Front Pharmacol.* 2013;4(27):1–8.
156. Neilsen C V, Bryce PJ. Interleukin-13 directly promotes oesophagus production of CCL11 and CCL24 and the migration of eosinophils. *Clin Exp Allergy.* 2010;40(3):427–34.
157. Blanchard C, Durual S, Estienne M, Emami S, Vasseur S, Cuber J-C. Eotaxin-3/CCL26 gene expression in intestinal epithelial cells is up-regulated by interleukin-4 and interleukin-13 via the signal transducer and activator of transcription 6. *Int J Biochem Cell Biol.* 2005;37(12):2559–73.
158. Cheng LE, Sullivan BM, Retana LE, Allen CDC, Liang H-E, Locksley RM. IgE-activated basophils regulate eosinophil tissue entry by modulating endothelial function. *J Exp Med.* 2015;212(4):513–24.
159. Schuurhuis DH, Fu N, Ossendorp F, Melief CJM. Ins and outs of dendritic cells. *Int Arch Allergy Immunol.* 2006;140(1):53–72.

160. Gregori S. Dendritic cells in networks of immunological tolerance. *Tissue Antigens*. 2011;77(2):89–99.
161. Novak N, Bieber T. The role of dendritic cell subtypes in the pathophysiology of atopic dermatitis. *J Am Acad Dermatol*. 2005;53(2):S171–6.
162. Dubois B, Joubert G, Gomez de Agüero M, Gouanvic M, Goubier A, Kaiserlian D. Sequential role of plasmacytoid dendritic cells and regulatory T cells in oral tolerance. *Gastroenterology*. 2009;137(3):1019–28.
163. Novak N, Allam J-P, Hagemann T, Jenneck C, Laffer S, Valenta R, Kochan J, Bieber T. Characterization of FcepsilonRI-bearing CD123 blood dendritic cell antigen-2 plasmacytoid dendritic cells in atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol*. 2004;114(2):364–70.
164. Holloway JA, Holgate ST, Semper AE. Expression of the high-affinity IgE receptor on peripheral blood dendritic cells: differential binding of IgE in atopic asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2001;107(6):1009–18.
165. Frischmeyer-Guerrero PA, Guerrero AL, Chichester KL, Bieneman AP, Hamilton RA, Wood RA, Schroeder JT. Dendritic cell and T cell responses in children with food allergy. *Clin Exp Allergy*. 2011;41(1):61–71.
166. Stoll P, Bähker A, Ulrich M, Bratke K, Garbe K, Christian Virchow J, Lommatzsch M. The dendritic cell high-affinity IgE receptor is overexpressed in both asthma and severe COPD. *Clin Exp Allergy*. 2016;46(4):575–83.
167. Novak N, Tepel C, Koch S, Brix K, Bieber T, Kraft S. Evidence for a differential expression of the FcepsilonRIgamma chain in dendritic cells of atopic and nonatopic donors. *J Clin Invest*. 2003;111(7):1047–56.
168. Foster B, Metcalfe DD, Prussin C. Human dendritic cell 1 and dendritic cell 2 subsets express FcepsilonRI: correlation with serum IgE and allergic asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2003;112(6):1132–8.
169. Sharquie IK, Al-Ghouleh A, Fitton P, Clark MR, Armour KL, Sewell HF, Shakib F, Ghaemmaghani AM. An investigation into IgE-facilitated allergen recognition and presentation by human dendritic cells. *BMC Immunol*. 2013;14:54.
170. Maurer D, Ebner C, Reininger B, Fiebiger E, Kraft D, Kinet JP, Stingl G. The high affinity IgE receptor (Fc epsilon RI) mediates IgE-dependent allergen presentation. *J Immunol*. 1995;154(12):6285–90.

171. Gill MA, Bajwa G, George TA, Dong CC, Dougherty II, Jiang N, Gan VN, Gruchalla RS. Counterregulation between the FcεRI pathway and antiviral responses in human plasmacytoid dendritic cells. *J Immunol*. 2010;184(11):5999–6006.
172. Platzner B, Baker K, Vera MP, Singer K, Panduro M, Lexmond WS, Turner D, Vargas SO, Kinet J-P, Maurer D, Baron RM, Blumberg RS, Fiebiger E. Dendritic cell-bound IgE functions to restrain allergic inflammation at mucosal sites. *Mucosal Immunol*. 2015;8(3):516–32.
173. Le T, Tversky J, Chichester KL, Bieneman AP, Huang S-K, Wood RA, Schroeder JT. Interferons modulate FcεRI-dependent production of autoregulatory IL-10 by circulating human monocytoïd dendritic cells. *J Allergy Clin Immunol*. 2009;123(1):217–23.
174. Schroeder JT, Chichester KL, Bieneman AP. Toll-like receptor 9 suppression in plasmacytoid dendritic cells after IgE-dependent activation is mediated by autocrine TNF-α. *J Allergy Clin Immunol*. 2008;121(2):486–91.
175. Khan SH, Grayson MH. Cross-linking IgE augments human conventional dendritic cell production of CC chemokine ligand 28. *J Allergy Clin Immunol*. 2010;125(1):265–7.
176. Anthony RM, Rutitzky LI, Urban JF, Stadecker MJ, Gause WC, Gause WC. Protective immune mechanisms in helminth infection. *Nat Rev Immunol*. 2007;7(12):975–87.
177. Gleich GJ, Dunnette SL, Volenec FJ, Mani MM. Quantification of serum IgE in patients with burns. *Clin Allergy*. 1979;9(2):133–9.
178. Szczeklik A, Jawieñ J. Immunoglobulin E in acute phase response to surgical stress. *Clin Exp Allergy*. 1996;26(3):303–7.
179. Greer AM, Wu N, Putnam AL, Woodruff PG, Wolters P, Kinet J-P, Shin J-S. Serum IgE clearance is facilitated by human FcεRI internalization. *J Clin Invest*. 2014;124(3):1187–98.
180. Shi C, Pamer EG. Monocyte recruitment during infection and inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2011;11(11):762–74.
181. Ziegler-Heitbrock L, Hofer TPJ. Toward a refined definition of monocyte subsets. *Front Immunol*. 2013;4:23.

182. Ziegler-Heitbrock HW, Ströbel M, Kieper D, Fingerle G, Schlunck T, Petersmann I, Ellwart J, Blumenstein M, Haas JG. Differential expression of cytokines in human blood monocyte subpopulations. *Blood*. 1992;79(2):503–11.
183. Wong KL, Yeap WH, Tai JJY, Ong SM, Dang TM, Wong SC. The three human monocyte subsets: implications for health and disease. *Immunol Res*. 2012 Sep;53(1-3):41–57.
184. Katoh N, Kraft S, Wessendorf JH, Bieber T. The high-affinity IgE receptor (FcεRI) blocks apoptosis in normal human monocytes. *J Clin Invest*. 2000;105(2):183–90.
185. Maurer D, Fiebiger E, Reininger B, Wolff-Winiski B, Jouvin MH, Kilgus O, Kinet JP, Stingl G. Expression of functional high affinity immunoglobulin E receptors (Fc εRI) on monocytes of atopic individuals. *J Exp Med*. 1994;179(2):745–50.
186. Cheng YX, Foster B, Holland SM, Klion AD, Nutman TB, Casale TB, Metcalfe DD, Prussin C. CD2 identifies a monocyte subpopulation with immunoglobulin E-dependent, high-level expression of Fc εRI. *Clin Exp Allergy*. 2006;36(11):1436–45.
187. Pucchio T Di, Lapenta C, Santini SM, Logozzi M, Parlato S, Belardelli F. CD2+/CD14+ monocytes rapidly differentiate into CD83+ dendritic cells. *Eur J Immunol*. 2003;33(2):358–67.
188. Shin J-S, Greer AM. The role of FcεRI expressed in dendritic cells and monocytes. *Cell Mol Life Sci*. 2015;72(12):2349–60.
189. Pyle DM, Yang VS, Gruchalla RS, Farrar JD, Gill MA. IgE cross-linking critically impairs human monocyte function by blocking phagocytosis. *J Allergy Clin Immunol*. 2013 Feb;131(2):491–500.
190. Hijdra D, Vorselaars ADM, Grutters JC, Claessen AME, Rijkers GT. Phenotypic characterization of human intermediate monocytes. *Front Immunol*. 2013;4:339.
191. Abeles RD, McPhail MJ, Sowter D, Antoniadou CG, Vergis N, Vijay GKM, Xystrakis E, Khamri W, Shawcross DL, Ma Y, Wendon JA, Vergani D. CD14, CD16 and HLA-DR reliably identifies human monocytes and their subsets in the context of pathologically reduced HLA-DR expression by CD14hi/CD16neg monocytes: Expansion of CD14hi/CD16pos and contraction of CD14lo/CD16pos monocytes in acute liver fail. *Cytom Part A*. 2012;81A(10):823–34.

192. Mayadas TN, Cullere X, Lowell CA. The multifaceted functions of neutrophils. *Annu Rev Pathol.* 2014;9:181–218.
193. Fossati G, Moots RJ, Bucknall RC, Edwards SW. Differential role of neutrophil Fcγ receptor IIIB (CD16) in phagocytosis, bacterial killing, and responses to immune complexes. *Arthritis Rheum.* 2002;46(5):1351–61.
194. Perez-Andres M, Paiva B, Nieto WG, Caraux A, Schmitz A, Almeida J, Vogt RF, Marti GE, Rawstron AC, Van Zelm MC, Van Dongen JJM, Johnsen HE, Klein B, Orfao A, Primary Health Care Group of Salamanca for the Study of MBL. Human peripheral blood B-cell compartments: a crossroad in B-cell traffic. *Cytometry B Clin Cytom.* 2010;78 Suppl 1:S47–60.
195. Duchamp M, Sterlin D, Diabate A, Uring-Lambert B, Guérin-El Khourouj V, Le Mauff B, Monnier D, Malcus C, Labalette M, Picard C. B-cell subpopulations in children: National reference values. *Immunity, Inflamm Dis.* 2014;2(3):131–40.
196. Woof JM, Kerr MA. The function of immunoglobulin A in immunity. *J Pathol.* 2006;208(2):270–82.
197. Henriques A, Nunes R, Loureiro G, Martinho A, Pais M, Segorbe-Luís A, Trindade H, Pereira C, Paiva A. Alterations on peripheral blood B cell subsets induced by allergic rhinitis. *Inflamm Res.* 2015;64(3-4):145–9.
198. Fábrega E, López-Hoyos M, San Segundo D, Casafont F, Pons-Romero F. Changes in the serum levels of interleukin-17/interleukin-23 during acute rejection in liver transplantation. *Liver Transpl.* 2009;15(6):629–33.
199. Afshari A, Yaghobi R, Karimi MH, Darbooe M, Azarpira N. Interleukin-17 gene expression and serum levels in acute rejected and non-rejected liver transplant patients. *Iran J Immunol.* 2014;11(1):29–39.
200. Abbas, A. K., Lichtman, A. H., and Pillai S. *Cellular and Molecular Immunology.* 7th ed. Philadelphia: Elsevier/Saunders; 2012. 545 p.
201. Kobashigawa JA, Patel JK. Immunosuppression for heart transplantation: where are we now? *Nat Clin Pract Cardiovasc Med.* 2006;3(4):203–12.