

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE

Viviane Passos de Souza

**INVESTIGAÇÃO DO PAPEL DAS PLAQUETAS NA RESPOSTA IMUNE ALÉRGICA
PULMONAR E SISTÊMICA EM MODELO MURINO**

Juiz de Fora
2025

VIVIANE PASSOS DE SOUZA

**INVESTIGAÇÃO DO PAPEL DAS PLAQUETAS NA RESPOSTA IMUNE
ALÉRGICA PULMONAR E SISTÊMICA EM MODELO MURINO**

Dissertação apresentada à banca examinadora
como requisito final para a obtenção do
Mestrado em Saúde pelo Programa de Pós-
Graduação em Saúde pela Universidade
Federal de Juiz de Fora.

Orientadora: Flávia Márcia de Castro e Silva

Co-orientador: Eugênio Damaceno Hottz

Juiz de Fora

2025



UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA



ATA DE DEFESA DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE PÓS-GRADUAÇÃO
STRICTO SENSU

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE

Nº PPG: 22/2025

Formato da Defesa: () presencial () virtual (X) híbrido

Ata da sessão (X) pública () privada referente à defesa da (X) dissertação () tese intitulada *Avaliação do papel das plaquetas no desenvolvimento do processo alérgico nos órgãos linfóides secundários e na inflamação alérgica pulmonar em um modelo experimental murino, para fins de obtenção do título de (X) mestr(a) () doutor(a) em Saúde, área de concentração Pesquisa em Experimentação Animal, pelo(a) discente VIVIANE PASSOS DE SOUZA (matrícula 120200019 - início do curso em 15/02/2025), sob orientação da Profa. Dra. Flavia Marcia de Castro e Silva e coorientação do Prof. Dr. Eugenio Damaceno Hottz.*

Aos 15 (quinze) dias do mês de agosto do ano de 2025, às 13h30min, de forma híbrida na Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), reuniu-se a Banca examinadora da (X) dissertação () tese em epígrafe, aprovada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação, conforme a seguinte composição:

Titulação Prof(a) Dr(a) / Dr(a)	Nome	Na qualidade de:	Vínculo Institucional
Profa. Dra.	Flavia Marcia de Castro e Silva	Orientadora	Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Prof. Dr.	Eugenio Damaceno Hottz	Coorientador	Universidade Federal de Juiz de Fora
Profa. Dra.	Jacy Gameiro	Membro titular interno	Universidade Federal de Juiz de Fora
Prof. Dr.	Erick Esteves de Oliveira	Membro titular externo	Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Profa. Dra.	Elena Victoria Montes Cobos	Membro titular externo	Universidade Federal do Rio de Janeiro
Profa. Dra.	Alessa Sin Singer Brugiolo	Suplente interno	Universidade Federal de Juiz de Fora
Profa. Dra.	Wanessa Araújo Carvalho	Suplente externo	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

*Na qualidade de (opções a serem escolhidas):

- Membro titular interno
- Membro titular externo
- Membro titular externo e Coorientador(a)
- Orientador(a) e Presidente da Banca
- Suplente interno
- Suplente externo
- Orientador(a)
- Coorientador(a)

*Obs: Conforme §2º do art. 54 do Regulamento Geral da Pós-graduação stricto sensu, aprovado pela Resolução CSPP/UFJF nº 28, de 7 de junho de 2023, "estando o(a) orientador(a) impedido(a) de compor a banca, a presidência deverá ser designada pelo Colegiado".

AValiação da Banca Examinadora

15/09/2025, 08:50

SEMUFJF - 2531545 - PROPP 01.2: Ata de defesa c/ aprovação condicional

Tendo o(a) senhor(a) Presidente declarado aberta a sessão, mediante o prévio exame do referido trabalho por parte de cada membro da Banca, o(a) discente procedeu à apresentação de seu Trabalho de Conclusão de Curso de Pós-graduação Stricto sensu e foi submetido(a) à arguição pela Banca Examinadora que, em seguida, deliberou sobre o seguinte resultado:

(X) APROVADO

() REPROVADO, conforme parecer circunstanciado, registrado no campo Observações desta Ata e/ou em documento anexo, elaborado pela Banca Examinadora

() APROVADO CONDICIONALMENTE, sendo consenso da banca de que esta ata é provisória e condicional

Novo título da Dissertação/Tese (só preencher no caso de mudança de título):

Investigação do papel das plaquetas na resposta imune alérgica pulmonar e sistêmica em modelo murino

Observações da Banca Examinadora caso haja necessidade de anotações gerais sobre a dissertação/tese e sobre a defesa, as quais a banca julgue pertinentes

Banca de defesa realizada de forma híbrida de acordo com a Portaria nº 53 PROPP/UFJF. Todos os membros da banca e o discente participaram da sessão de Defesa e a acompanharam na sua integralidade

Descrição de todas as condicionalidades para a aprovação (só preencher no caso de Aprovação Condicional):

Nada mais havendo a tratar, o(a) senhor(a) Presidente declarou encerrada a sessão de Defesa, sendo a presente Ata lavrada e assinada pelos(as) senhores(as) membros da Banca Examinadora e pelo(a) discente, atestando ciência do que nela consta.

INFORMAÇÕES

Para fazer jus ao título de mestre(a)/doutor(a), a versão final da dissertação/tese, considerada Aprovada, devidamente conferida pela Secretaria do Programa de Pós-graduação, deverá ser tramitada para a PROPP, em Processo de Homologação de Dissertação/Tese, dentro do prazo de 60 ou 90 dias, para discentes aprovados condicionalmente, a partir da data da defesa. Após o envio dos exemplares definitivos, o processo deverá receber homologação e, então, ser encaminhado à CDARA.

Se as condições descritas nesta ata não forem atestadamente atendidas dentro do prazo de 90 dias, a aprovação condicional será convertida em reprovação.

Esta Ata de Defesa é um documento padronizado pela Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa. Observações excepcionais feitas pela Banca Examinadora poderão ser registradas no campo disponível acima ou em documento anexo, desde que assinadas pelo(a) Presidente(a).

Esta Ata de Defesa somente poderá ser utilizada como comprovante de titulação se apresentada junto à Certidão da Coordenadoria de Assuntos e Registros Acadêmicos da UFJF (CDARA) atestando que o processo de confecção e registro do diploma está em andamento.



Documento assinado eletronicamente por Eugenio Damasceno Hottz, Professor(a), em 15/08/2025, às 16:42, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Elena Victoria Montes Cobos, Usuário Externo, em 15/08/2025, às 16:42, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Erick Esteves de Oliveira, Usuário Externo, em 15/08/2025, às 16:44, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Viviane Passos de Souza, Usuário Externo, em 16/08/2025, às 13:45, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Flavia Marcia de Castro e Silva, Usuário Externo, em 18/08/2025, às 11:15, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

15/09/2025, 08:50

SEI/UFJF - 2531545 - PROPP 01.2: Ata de defesa c/ aprovação condicional



Documento assinado eletronicamente por Jacy Gameiro, Professor(a), em 20/08/2025, às 16:47, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no Portal do SEI-UFJF (www2.ufjf.br/SEI) através do ícone Conferência de Documentos, informando o código verificador 2531545 e o código CRC 0884426D.

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Souza, Viviane Passos de.

Investigação do papel das plaquetas na resposta imune alérgica pulmonar e sistêmica em modelo murino / Viviane Passos de Souza. -- 2025.

117 f. : il.

Orientador: Flávia Márcia de Castro e Silva

Coorientador: Eugênio Damaceno Hottz

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Saúde, 2025.

1. Asma. 2. Plaquetas. 3. Eosinofilia. 4. Imunidade humoral. 5. Centros germinativos. I. Silva, Flávia Márcia de Castro e, orient. II. Hottz, Eugênio Damaceno, coorient. III. Título.

Dedico este trabalho aos meus pais, por todo o amor, apoio e força ao longo da minha jornada.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus pela oportunidade de concluir mais esta etapa, por me dar forças e por colocar em meu caminho pessoas especiais que sempre estiveram ao meu lado.

Dentre essas pessoas, minha eterna gratidão aos meus pais, Fabiana e Luiz Carlos. Mais do que um vínculo de sangue, agradeço por tudo o que representam na minha vida: amor, acolhimento e apoio incondicional. Sempre estiveram presentes, me ouviram e me incentivaram. Não sei se teria conseguido chegar até aqui sem vocês. Ao meu irmão João Pedro, que, mesmo ainda não compreendendo tudo isso, enche meu coração de alegria e faz minha jornada ser mais bonita. Amo muito vocês.

Ao meu namorado, Walasi, que chegou em meio à turbulência do mestrado e, mesmo assim, sempre teve paciência para me ouvir (e muito), me aconselhar e trazer leveza aos meus dias. Obrigada por me apoiar, por estar ao meu lado e por torcer por mim. Você é muito importante para mim.

À minha orientadora, Flávia, e ao meu coorientador, Eugênio, pela oportunidade de fazer parte deste projeto que tanto gostei. Foi um período de muito aprendizado, tanto profissional quanto pessoal. Agradeço pela bagagem que levo comigo.

À Laura, que esteve comigo em todos os momentos do mestrado, ensinando e me ajudando. Serei sempre grata por tudo.

Às minhas amigas Ana Paula, Letícia e Maria Clara, que, mesmo não fazendo parte do mesmo grupo de pesquisa, se tornaram parte essencial da minha rotina. A convivência com vocês tornou tudo mais leve e agradável. Levarei essa amizade para a vida.

Ao Erick, que certamente contribuiu imensamente para meu crescimento na vida acadêmica. Desde a iniciação científica, você foi uma inspiração, e sei que é para muitos outros também.

A todos os colegas do LIB e do LIT, especialmente ao César, à Dani e à Paula, obrigada pela parceria, ajuda e contribuição com o projeto.

Aos técnicos Lucas e Priscila, do IMUNOCET, obrigada pela ajuda no laboratório e pelas risadas compartilhadas.

Aos professores Gilson e Henrique, pela parceria e por abrirem as portas do IMUNOCET para mim. Esse laboratório ficará guardado no meu coração com muito carinho.

Aos técnicos Bárbara e Rogério, do LIP, por toda a paciência, disponibilidade e ajuda em tudo que precisei ao longo dessa jornada.

Aos técnicos do CBR, em especial ao Pedro, obrigada pela atenção e cuidado com os animais.

À Embrapa, principalmente à Wanessa, agradeço pelo uso do citômetro e pela ajuda com a operação.

À equipe do Laboratório de Citometria de Fluxo da Unidade Docente Assistencial de Patologia Geral, do Hospital Universitário Pedro Ernesto, agradeço especialmente ao Vinícius, por toda a ajuda e apoio durante o uso do citômetro.

E, por fim, à equipe do Serviço de Laboratório do Hospital Universitário Pedro Ernesto, em especial à Silvana, pela contribuição com as análises hematológicas e pela atenção de sempre.

Resumo

A asma alérgica é uma doença inflamatória crônica das vias aéreas, caracterizada por resposta imune de perfil Th2, com eosinofilia e alta produção de IgE. Evidências recentes indicam que, além da função clássica na hemostasia, as plaquetas também participam de processos inflamatórios e imunológicos, interagindo com leucócitos e modulando a resposta adaptativa. No entanto, seu papel na asma alérgica ainda não é totalmente compreendido. Este trabalho teve como objetivo investigar o papel das plaquetas no desenvolvimento do processo alérgico nos órgãos linfoides secundários e na inflamação alérgica pulmonar em um modelo experimental murino. Para isso, foram utilizados camundongos fêmeas Balb/c, sensibilizadas e desafiadas com ovalbumina e tratados com anti-CD41 para depleção de plaquetas. Durante a resposta imune da alergia pulmonar, observou-se aumento de IL-5, CCL11 e PF4, além de eosinofilia local e sistêmica. Nessa condição, foi detectado aumento na formação de agregados entre plaquetas e leucócitos, especialmente com eosinófilos, macrófagos alveolares e linfócitos B. Com a depleção parcial de plaquetas pelo tratamento com anti-CD41, houve redução de PF4 no plasma, do infiltrado eosinofílico e menor formação de agregados plaqueta-leucócito no pulmão. Em concordância, também foi observada redução de linfócitos Th2 nos linfonodos mediastinais. O tratamento também levou a alterações nas subpopulações de linfócitos B IgG1⁺ e IgE⁺ nos órgãos linfoides periféricos dependente da fase do protocolo. Apesar disso, os níveis séricos dos anticorpos produzidos por essas subpopulações de LB não foram alterados, mas sua qualidade funcional foi afetada, com redução da avidéz e prejuízo na formação de folículos linfoides secundários no baço. Esses resultados demonstram que as plaquetas exercem participação ativa na alergia pulmonar, modulando diferentes aspectos da resposta imune, com impacto variável a depender da fase da inflamação.

Palavras-chave: asma; plaquetas; eosinofilia; imunidade humoral; centros germinativos.

Abstract

Allergic asthma is a chronic inflammatory disease of the airways, characterized by a Th2-skewed immune response, eosinophilia, and elevated IgE production. Recent evidence indicates that, beyond their classical role in hemostasis, platelets also participate in inflammatory and immunological processes by interacting with leukocytes and modulating the adaptive immune response. However, their role in allergic asthma remains incompletely understood. This study aimed to investigate the contribution of platelets to the development of allergic processes in secondary lymphoid organs and pulmonary allergic inflammation using a murine experimental model. Female Balb/c mice were sensitized and challenged with ovalbumin and treated with anti-CD41 to induce platelet depletion. During pulmonary allergic responses, increased levels of IL-5, CCL11, and PF4 were observed, along with both local and systemic eosinophilia. Under these conditions, enhanced formation of platelet–leukocyte aggregates was detected, particularly with eosinophils, alveolar macrophages, and B lymphocytes. Partial platelet depletion by anti-CD41 treatment led to reduced plasma PF4, decreased eosinophilic infiltration, and lower formation of platelet–leukocyte aggregates in the lungs. Consistently, a reduction in Th2 lymphocytes was also observed in mediastinal lymph nodes. The treatment further induced changes in IgG1⁺ and IgE⁺ B cell subpopulations in peripheral lymphoid organs, depending on the protocol phase. Nevertheless, serum levels of antibodies produced by these B cell subsets were not altered; instead, their functional quality was impaired, as evidenced by reduced avidity and diminished formation of secondary lymphoid follicles in the spleen. Altogether, these findings demonstrate that platelets actively contribute to pulmonary allergy by modulating distinct aspects of the immune response, with variable impact depending on the phase of inflammation.

Keywords: asthma; platelets; eosinophilia; humoral immunity; germinal centers

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Imagem representativa da resposta imune na alergia pulmonar.....	17
Figura 2: Características das plaquetas ativadas.....	21
Figura 3: Visão geral da ativação plaquetária, recrutamento pulmonar, interações com leucócitos e secreção na alergia pulmonar.....	23
Figura 4: Delineamento experimental do protocolo de indução de alergia pulmonar experimental induzida por OVA.....	30
Figura 5: Fluxograma dos procedimentos realizados na Etapa 1.....	31
Figura 6: Delineamento experimental do tratamento com anti-CD41 em camundongos submetidos ao modelo experimental de alergia pulmonar induzida por OVA.....	32
Figura 7: Delineamento experimental do tratamento com anti-CD41 em camundongos submetidos às etapas de sensibilização com OVA.....	33
Figura 8: Fluxograma dos procedimentos realizados na Etapa 2.....	34
Figura 9: Confirmação da indução da alergia pulmonar.....	47
Figura 10: Contagem de células e ativação plaquetária.....	49
Figura 11: Avaliação de leucócitos CD45 ⁺ e agregados com CD41 ⁺	51
Figura 12: Avaliação de eosinófilos Siglec-F ⁺ CD11b ⁺ e macrófagos alveolares Siglec-F ⁺ CD11b ⁺ e formação de agregados com CD41 ⁺	53
Figura 13: Avaliação de leucócitos CD45 ⁺ LD ⁻ agregados ou não à plaquetas CD41 ⁺ com a presença de IgE em suas superfícies.....	55
Figura 14: Avaliação de Linfócitos B CD19 ⁺ agregados com CD41 ⁺ e suas subpopulações.	57
Figura 15: Depleção plaquetária em animais sensibilizados com OVA.....	59
Figura 16: Depleção plaquetária em animais sensibilizados e desafiados com OVA.. ..	61
Figura 17: Discriminação das populações de leucócitos no parênquima e na vasculatura pulmonar.	63
Figura 18: Número de eosinófilos em diferentes compartimentos de animais tratados com anti-CD41.	65
Figura 19: Avaliação da população Siglec-F ⁺ CD11b ⁺ e agregados Siglec-F ⁺ CD11b ⁺ CD41 ⁺ no pulmão de animais sensibilizados e desafiados com OVA.	67

Figura 20: Avaliação da população Siglec-F ⁺ CD11b ⁻ e agregados Siglec-F ⁺ CD11b ⁻ CD41 ⁺ no pulmão de animais sensibilizados e desafiados com OVA.	69
Figura 21: Avaliação da população GATA3 ⁺ CD4 ⁺ no linfonodo mediastinal de animais sensibilizados e desafiados com OVA.	71
Figura 22: Avaliação das populações CD19 ⁺ IgG1 ⁺ e CD19 ⁺ IgE ⁺ no linfonodo mediastinal de animais sensibilizados e desafiados com OVA.	74
Figura 23: Avaliação de linfócitos T CXCR5 ⁺ PD1 ⁺ no linfonodo mediastinal de animais sensibilizados com OVA.	76
Figura 24: Avaliação de subpopulações de LB CD19 ⁺	78
Figura 25: Níveis séricos de IgG1 e IgE específicos à OVA.	80
Figura 26: Avidéz de anticorpos específicos à OVA.	81
Figura 27: Formação de folículos linfoides.	83
Figura 27: Resumo gráfico dos principais achados experimentais.	94

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Grupos experimentais utilizados no protocolo de asma induzida por OVA, de acordo com os procedimentos adotados.....	28
Tabela 2: Grupos experimentais utilizados no protocolo do tratamento com anti-CD41, de acordo com os procedimentos adotados.....	28
Tabela 3: Grupos experimentais utilizados no protocolo de asma induzida por OVA e tratamento com anti-CD41, de acordo com os procedimentos adotados.....	29
Tabela 4: Tabela 3: Grupos experimentais utilizados no protocolo de asma induzida por OVA e tratamento com anti-CD41, de acordo com os procedimentos adotados.....	29
Tabela 5: Painel de fluorocromos utilizados na marcação celular por Citometria de Fluxo (Etapa1).....	43
Tabela 6: Painel de fluorocromos utilizados na marcação celular por Citometria de Fluxo (Etapa2).....	44

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ACK** – *Ammonium-Chloride-Potassium buffer* / Tampão de lise
- ACD** – *Acid Citrate Dextrose* / Dextrose de Citrato Ácido
- ADP** – *AdenosineDiphosphate* / Difosfato de adenosina
- ATP** – *AdenosineTriphosphate* / Trifosfato de adenosina
- CCL** – *C-C MotifChemokineLigand* / Ligante da quimiocina do motivo C-C
- CCR**– *C-C MotifChemokine Receptor* / Receptor de quimiocina do motivo C-C
- CD40** – *Cluster* de diferenciação
- CD62P** – P-selectina
- COX-1** – Ciclooxygenase-1
- CXCL**– *C-X-C MotifChemokineLigand* / Ligante da quimiocina do motivo C-X-C
- CXCR5**– *C-X-C MotifChemokine Receptor*/ Receptor de quimiocina do motivo C-X-C
- DAMPs** – *Damage-associated molecular patterns* / Padrões moleculares associados a dano
- DC** – *DendriticCells* / Células dendríticas
- ECP** – *EosinophilCationic Protein* / Proteína catiônica de eosinófilos
- EDN** – *Eosinophil-derivedNeurotoxin* / Neurotoxina derivada de eosinófilos
- ELISA** – *Enzyme-LinkedImmunsorbentAssay* / Ensaio imunoenzimático
- EETs** – *EosinophilExtracellularTraps* / Armadilhas extracelulares de eosinófilos
- EPO** – *Eosinophil Peroxidase* / Peroxidase eosinofílica
- FcεRI** – *Fcepsilon Receptor I* / Receptor I para porção Fc da IgE
- GINA** – *Global Initiative for Asthma* / Iniciativa Global para Asma
- ICOS** – *Inducible T-cellCOStimulator* / Coestimulador Indutível de Células T
- IFN-γ** –Interferon-gama
- Ig** –Imunoglobulina
- IL** – Interleucina
- ILC2s** – *InnateLymphoidCellstype 2* / Células linfoides inatas tipo 2
- MA** – Macrófago alveolar
- MHC-II** – *Major Histocompatibility Complex Class II* / Complexo principal de histocompatibilidade classe II
- MPB** – *Major Basic Protein* / Proteína básica principal
- NF-κB** – *Nuclear Factor kappa B* / Fator nuclear kappa B
- NLRP3** – *NOD-, LRR- andpyrindomain-containing protein 3* / Proteína contendo

domínio NLRP3

NO – *Nitric Oxide* / Óxido nítrico

OVA –Ovalbumina

PAF – *Platelet-Activating Factor* / Fator ativador de plaquetas

PAMPs – *Pathogen-associated molecular patterns* / Padrões moleculares associados a patógenos

P2Y1 – *Purinergic Receptor P2Y1* / Receptor purinérgico P2Y1

PBST –PBS com Tween

PBS – *PhosphateBuffered Saline* / Solução salina tamponada com fosfato

PD-1 – Programmed Death-1 / Morte Celular Programada 1

PDGF – *Platelet-Derived Growth Factor* / Fator de crescimento derivado de plaquetas

PDW – *PlateletDistributionWidth* / Largura de distribuição plaquetária

PF4 – *Platelet Factor 4* / Fator plaquetário 4

P-LCC – *Platelet Large Cell Count* / Contagem de plaquetas grandes

P-LCR – *Platelet Large CellRatio* / Razão de plaquetas grandes

PPRs – *PatternRecognitionReceptors* / Receptores de reconhecimento de padrões

PSGL-1 – *P-SelectinGlycoprotein Ligand-1* / Ligante 1 da glicoproteína da P-selectina

RPMI – *Roswell Park Memorial InstituteMedium* / Meio de cultura RPMI

SFB – Soro fetal bovino

T_{FH} – *T FollicularHelper* / Linfócito T folicular auxiliar

T_H – *T helper* / Linfócito T auxiliar

TLRs – *Toll-like Receptors* / Receptores do tipo Toll

TNF – *Tumor Necrosis Factor* / Fator de necrose tumoral

TNF-α – *Tumor Necrosis Factor alpha* / Fator de necrose tumoral alfa

TSLP – ThymicStromalLymphopoietin / Linfopoietina do estroma tímico

TXA2 – Thromboxane A2 / Tromboxano A2

VCAM-1 – *Vascular CellAdhesionMolecule 1* / Molécula de adesão celular vascular 1

Sumário

1.	INTRODUÇÃO.....	12
1.1.	Asma	12
1.2.	Plaquetas e seu papel na asma	19
2.	OBJETIVO GERAL.....	26
2.1.	Objetivos específicos:.....	26
3.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	27
3.1.	Animais	27
3.2.	Grupos Experimentais	27
3.3.	Indução do modelo de alergia pulmonar experimental e tratamento com anti-CD41:	30
3.4.	Obtenção de material biológico	35
3.5.	Coleta e processamento do sangue	35
3.6.	Coleta e processamento do pulmão	36
3.7.	Coleta e processamento dos linfonodos mediastinais	36
3.8.	Coleta e processamento do baço	36
3.9.	Coleta e processamento da medula óssea.....	37
3.10.	Esfregaço sanguíneo.....	37
3.11.	Contagem de plaquetas.....	37
3.12.	ELISA de anticorpos específicos à OVA e de citocinas.....	38
3.13.	Cálculo da medida de avidéz.....	39
3.14.	Histologia para contagem de eosinófilos no pulmão.....	40
3.15.	Imunohistoquímica do baço	40
3.16.	Contagem de células da medula óssea.....	41
3.17.	Citometria de fluxo de sangue, órgãos linfoides e pulmão	41
3.18.	Análise estatística.....	45
4.	RESULTADOS	46

4.1.	Modelo de alergia pulmonar e contagem de plaquetas	46
4.1.1.	Indução da alergia pulmonar com OVA causa eosinofilia em diferentes compartimentos e maior produção de IL-5 e CCL11	46
4.1.2.	Alergia pulmonar aumenta o valor de plaquetas no sangue e no pulmão e causa maior ativação plaquetária no sangue	48
4.1.3.	Alergia pulmonar favorece o aumento da formação de agregados plaquetas-leucócitos no pulmão, mas não no baço	50
4.1.4.	Alergia pulmonar promove maior formação de agregados plaquetas-eosinófilos e plaquetas-macrófagos alveolares no pulmão	52
4.1.5.	Alergia pulmonar promove maior expressão de IgE na interação plaquetas-leucócitos.....	54
4.1.6.	Alergia pulmonar gera alterações nas subpopulações de linfócitos B	56
4.2.	Avaliação do papel das plaquetas no modelo de asma.....	58
4.2.1.	Depleção de plaquetas	58
4.2.1.1.	Depleção plaquetária com anti-CD41 promove redução da contagem de plaquetas e de parâmetros associados em animais sensibilizados com OVA	58
4.2.1.2.	Depleção plaquetária com anti-CD41 promove alterações em parâmetros plaquetários de animais sensibilizados e desafiados com OVA.....	60
4.2.2.	Tratamento com anti-CD41 reduz a formação de agregados plaquetas-leucócitos no parênquima pulmonar de animais alérgicos	62
4.2.3.	Efeitos do tratamento com anti-CD41 sobre a eosinofilia sistêmica e local..	64
4.2.3.1.	Depleção plaquetária com anti-CD41 causa redução na produção de eosinófilos na medula óssea e no infiltrado eosinofílico pulmonar dependente da fase do tratamento	64
4.2.3.2.	Tratamento com anti-CD41 acarreta redução de agregados plaquetas-eosinófilos pulmonares intra e extravasculares em animais com alergia pulmonar ..	66
4.2.3.3.	Tratamento com anti-CD41 ocasiona redução de agregados plaquetas-macrófagos alveolares em animais com alergia pulmonar.....	68

4.2.4. Depleção plaquetária com anti-CD41 causa redução da população de linfócitos de perfil Th2 (GATA3 ⁺) no linfonodo mediastinal de animais com alergia pulmonar	70
4.2.5. Tratamento com anti-CD41 na fase de sensibilização causa aumento de agregados plaquetas-linfócitos B IgE ⁺ no linfonodo mediastinal de animais com alergia pulmonar.....	72
4.2.6. Efeito nas populações de linfócitos T foliculares (CXCR5 ⁺ PD1 ⁺) e B (CD19 ⁺) no baço na fase da sensibilização com OVA	75
4.2.6.1. Depleção plaquetária com anti-CD41 não gera alterações na população de linfócitos T CXCR5 ⁺ PD1 ⁺ no baço de animais sensibilizados com OVA.....	75
4.2.6.2. Depleção plaquetária com anti-CD41 causa redução da população de Linfócitos B IgG1 ⁺ e de seus agregados com plaquetas no baço de animais sensibilizados com OVA.....	77
4.2.7. Efeito na produção de anticorpos específicos e na sua força de ligação	79
4.2.7.1. Tratamento com anti-CD41 não promove alterações nos níveis séricos de IgG1 e IgE específicos à OVA de animais sensibilizados com OVA e alérgicos.....	79
4.2.7.2. Tratamento com anti-CD41 induz a redução da avidéz de anticorpos específicos à OVA em animais sensibilizados com OVA e alérgicos.....	81
4.2.7.3. Tratamento com anti-CD41 causa redução de folículos linfoides maduros no baço de animais com alergia pulmonar	82
5. DISCUSSÃO	84
6. CONCLUSÃO	95
7. REFERÊNCIAS	96
ANEXOS.....	108

1. INTRODUÇÃO

1.1. Asma

A asma é uma doença heterogênea, caracterizada por inflamação crônica no pulmão, que afeta todas as faixas etárias. Clinicamente, apresenta sintomas com graus variados de sibilância, tosse e dispneia, os quais são consequências da obstrução do fluxo aéreo, da hiperresponsividade brônquica e do remodelamento tecidual nas vias aéreas inferiores (CHUNG *et al.*, 2022). De acordo com o *Global Initiative for Asthma* (GINA), a asma afeta em torno de 300 milhões de pessoas em todo o mundo e é responsável por cerca de 1.000 mortes diariamente (GINA, 2025). Apesar de alguns dados obtidos entre 1990 e 2019 demonstrarem que a incidência e a mortalidade por asma tiveram uma queda em determinadas localidades, a prevalência da doença continua expressiva, principalmente em países com elevado índice sociodemográfico. Ao passo que países com baixo índice apresentam maior mortalidade padronizada por idade (AARON *et al.*, 2018; CAO *et al.*, 2022). A doença apresenta uma alta taxa de morbidade, afetando consideravelmente a qualidade de vida do indivíduo e sobrecarregando os sistemas de saúde (COSTA *et al.*, 2024). No Brasil, o impacto da asma alcança de forma preocupante os gastos em saúde, sendo a 4ª principal causa de internação no país, com quase 300 mil registros por ano. Em 2021, dados apontaram um custo anual de R\$ 537 milhões para os cofres públicos (PRADO *et al.*, 2024).

Devido à heterogeneidade da asma, a doença pode ser classificada pela idade de início dos sintomas (precoce ou tardio), pela presença ou ausência de sensibilização alérgica (atópica ou não atópica), pelo nível de controle dos sintomas (controlado, parcialmente controlado e não controlado), além da coocorrência de outras condições de saúde que são consideradas exacerbadoras dos sintomas ou mesmo contribuem diretamente para a patogênese da doença, como obesidade, rinossinusite e depressão (JIA *et al.*, 2022). É recomendado que adultos, adolescentes e crianças com mais de 5 anos com diagnóstico de asma façam tratamento contendo corticosteroide inalatório de forma regular ou quando necessário, com o objetivo de controlar os sintomas e prevenir crises (LEVY *et al.*, 2023).

O conjunto de características já mencionadas faz com que a asma possa ser dividida em endótipos e fenótipos. Os fenótipos dizem respeito às características clínicas variáveis, como sintomas e gravidade, englobando as formas alérgica, não alérgica, ocupacional e grave, e podendo estar relacionadas ao estilo de vida e/ou fatores genéticos (KURUVILLA; LEE, 2019). Já os endótipos, referem-se aos mecanismos pelos quais a doença se desenvolve, sendo sua classificação importante para uma melhor compreensão da patogênese da asma. Entre os principais endótipos, destacam-se o tipo 2 (T2)-alto e o T2-baixo (AKAR-GHIBRIL *et al.*, 2020). O T2-alto é caracterizado por inflamação predominantemente eosinofílica e níveis séricos elevados da imunoglobulina E (IgE), estando associado ao fenótipo de asma alérgica (AKAR-GHIBRIL *et al.*, 2020; RICCIARDOLO *et al.*, 2021). O endótipo T2-baixo, por sua vez, é definido por uma resposta inflamatória caracterizada, em alguns casos, pelo aumento do recrutamento de neutrófilos para os pulmões, sendo geralmente de início tardio (JI; LI, 2023; RICCIARDOLO *et al.*, 2021). Esse tipo de resposta pode levar à não responsividade ao uso de glicocorticoides, agravando as condições clínicas dos pacientes e representando um desafio terapêutico relevante (MARSHALL; HASANI; MOOKHERJEE, 2021).

A asma alérgica é o fenótipo mais comum e com os mecanismos imunológicos melhor compreendidos, estando frequentemente associada a fatores genéticos e ambientais. É caracterizada por uma resposta imunológica de perfil Th2, com níveis elevados das citocinas interleucina (IL)-4, IL-5 e IL-13, além de aumento da IgE e de eosinofilia, em resposta a estímulos ubíquos alergênicos, como pólen, ácaros e pêlos de animais (MALAYA *et al.*, 2025). O trato respiratório, a pele e o intestino atuam como barreiras entre o ambiente e o hospedeiro, funcionando como mecanismos de defesa iniciais. Os epitélios apresentam características específicas com o intuito de exercer função de proteção contra patógenos e alérgenos, sendo importante destacar sua interação com células do sistema imune, que contribui para o desenvolvimento e a manutenção da tolerância imunológica (BERNI CANANI *et al.*, 2024; IZQUIERDO *et al.*, 2022).

O epitélio das vias aéreas forma uma barreira contínua e autolimpante, resistente a agentes biológicos, químicos ou físicos (GON; HASHIMOTO, 2018). No entanto, aeroalérgenos têm a capacidade de danificá-la em indivíduos suscetíveis, pois muitas de suas proteínas apresentam domínios funcionais com atividade enzimática, afetando diretamente a integridade epitelial (AKDIS, 2021). Após esse

insulto, o epitélio sinaliza para células estromais e hematopoiéticas vizinhas, recrutando células imunes e iniciando a resposta inflamatória (BERNI CANANI *et al.*, 2024; DUCHESNE; OKOYE; LACY, 2022). Contudo, não é apenas o insulto ambiental que explica o desenvolvimento da asma. Estudos genéticos têm mostrado que polimorfismos em genes, como ORMDL3/GSDMB, estão associados à suscetibilidade ao desenvolvimento da asma, atuando especialmente na regulação da resposta imune e na integridade do epitélio das vias aéreas (NTONTSI *et al.*, 2021). A partir da perspectiva epigenética, evidências emergentes indicam que metilação do DNA, modificações em histonas e expressão de microRNAs podem alterar a função epitelial ao longo da vida (Fiuza *et al.*, 2021). Além disso, estudos recentes mostram que padrões específicos de metilação no epitélio nasal ou brônquico estão correlacionados com asma ou atopia em crianças e adolescentes, sugerindo um papel funcional direto da epigenética no desenvolvimento da doença (LIMA; ALHAMWE, 2023).

O contato entre o epitélio e o alérgeno, que geralmente é inócuo a indivíduos não acometidos pela doença, leva, por meio dos receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), à secreção de alarminas, como as citocinas linfopoietina estromal tímica (TSLP), IL-25 e IL-33 (HELLINGS; STEELANT, 2020). Estruturas moleculares derivadas do alérgeno podem se ligar nos receptores do tipo Toll (TLRs) expressos nas células do sistema imune (ESTEVEZ; DU, 2017). A resposta pode ser iniciada tanto pela interação direta do alérgeno quanto pela detecção de padrões moleculares associados ao dano (DAMPs) liberados por células lesionadas, cuja presença indica perda da integridade homeostática (FREY *et al.*, 2020). Essas alarminas ativam células linfoides inatas do tipo 2 (ILC2s) e células dendríticas (DCs). As ILC2s são células da imunidade inata que, quando ativadas, produzem grandes quantidades das citocinas IL-4, IL-5 e IL-13, as quais amplificam a inflamação atuando em células B, eosinófilos, mastócitos e macrófagos, além de contribuírem com a polarização dos linfócitos T ativados para o perfil Th2 (ASGHAR PASHA; YANG, 2021; MATSUYAMA *et al.*, 2024). A IL-13, por sua vez, promove a diferenciação exacerbada de células caliciformes, aumentando a produção de muco e contribuindo para a obstrução das vias aéreas, fenômeno característico da asma (HELLINGS; STEELANT, 2020).

Em conjunto, as citocinas epiteliais e as derivadas das ILC2s contribuem para a ativação das células apresentadoras de antígenos, como as células

dendríticas(DUCHESNE*et al.*, 2022; SCHUIJS*et al.*, 2019). Com localização privilegiada na mucosa pulmonar, essas células interagem com os alérgenos por meio de receptores do tipo Toll, o que potencializa o processo de fagocitose e o subsequente processamento antigênico para posterior apresentação aos linfócitos T virgens(MORIANOS; SEMITEKOLOU, 2020; XUAN *et al.*, 2024). Após a ativação, as DCs passam por um processo de maturação, que envolve o aumento da expressão de moléculas coestimulatórias, como *cluster differentiation*(CD) 40Le CD80/86, bem como do complexo de histocompatibilidade principal II (MHC-II) associado ao antígeno. Paralelamente, inicia-se o processo de migração dessas células, via eixo ligante de quimiocina 21 e seu receptor de quimiocina C-C tipo 7 (CCL21/CCR7), em direção aos órgãos linfoides periféricos, onde ocorre a apresentação antigênica aos linfócitos T virgens. Assim é estabelecido um elo entre as imunidades inata e adaptativa (KUBO *et al.*, 2024; XIANG*et al.*, 2024).

Uma vez feita a apresentação de antígenos aos linfócitos T CD4⁺ virgens, ocorre a diferenciação em linfócitos T foliculares (LT_{FH}) e em linfócitos T auxiliares do tipo 2 (LTh2) (KUBO *et al.*, 2024). Os LT_{FH} são caracterizados pela expressão dos receptores de quimiocina do motivo C-X-C(CXCR)5, do coestimulador indutível de células T(ICOS) e da proteína de morte celular programada1 (PD-1)e pelo fator de transcrição Bcl6 (GOWTHAMAN*et al.*, 2019). No centro germinativo (CG), esses linfócitos interagem com os linfócitos B e são essenciais por fornecerem estímulos, como moléculas coestimulatórias e IL-4, para que essas células realizem a troca de isótopo de anticorpo, inicialmente de IgM para IgG1 e, posteriormente, de IgG1 para IgE de alta afinidade(ASRAT *et al.*, 2020; GOWTHAMAN; CHEN; EISENBARTH, 2020). A IgE é essencial nas respostas de hipersensibilidade imediata, sendo seu receptor de alta afinidade, o FcεRI, expresso em células como mastócitos e basófilos, que são sensibilizados após o contato inicial com o alérgeno (MCDONNELLE*et al.*, 2022). Em exposições subsequentes, durante a fase de desafios, a ligação do alérgeno às moléculas de IgE, já ligadas nos receptores na superfície dos mastócitos e os basófilos, provoca a degranulação dessas células, com a liberação de mediadores inflamatórios e lipídicos, como histamina, prostaglandinas e leucotrienos, que promovem vasoconstrição e hiperresponsividade das vias aéreas(GOWTHAMAN; CHEN; EISENBARTH, 2020; HAMMAD; LAMBRECHT, 2021). Além disso, no pulmão, também pode ocorrer rápida troca de isótopo para IgE, graças aos linfócitos B IgG1⁺, que são documentados como células

de memória específicas precursoras dessa imunoglobulina de alta afinidade (HOEHN, 2023; HOOFF *et al.*, 2020).

Após a polarização nos linfonodos drenantes, os LTh2 efetores migram para a periferia e desempenham suas funções secretando várias citocinas, dentre elas IL-4, IL-5 e IL-13 (SEUMOISet *al.*, 2020). Particularmente, a IL-5 é responsável por aumentar a produção de eosinófilos na medula óssea e promover a ativação dessas células na periferia (ANTOSZet *al.*, 2024). Quando maduros, esses leucócitos são liberados na corrente sanguínea e expressam altos níveis de CCR3 e IL-5R α (CD125)(VAN HULSTet *al.*, 2020), sendo assim fortemente influenciados pela quimiocina eotaxina-1/CCL11 e pela própria IL-5, ambas elevadas na asma (WU *et al.*, 2022). Além disso, seus grânulos citoplasmáticos contêm um repertório único de mediadores, como a peroxidase de eosinófilos (EPO), a proteína básica principal (MBP), a proteína catiônica de eosinófilos (ECP) e a neurotoxina derivada de eosinófilos (EDN), que apresentam potentes efeitos citotóxicos, neurotóxicos e participam na formação de radicais livres, induzindo inflamação e/ou dano tecidual (SHENet *al.*, 2023). Os eosinófilos também são capazes de liberar armadilhas extracelulares de DNA, denominadas EETs (*eosinophilextracellulartraps*), semelhantes a teias, que estão associadas à progressão da asma por aumentarem os níveis de citocinas epiteliais e interagirem com o sistema nervoso periférico (CHOI *et al.*, 2020; LU *et al.*, 2021).

Outro tipo celular fundamental neste contexto são os macrófagos alveolares (MA), células residentes do pulmão com função de defesa, reparo tecidual e depuração do surfactante. Esses macrófagos são responsáveis pela eferocitose, que contribui para o bloqueio das respostas inflamatórias e imunológicas nos alvéolos por meio da remoção de células apoptóticas (TEE *et al.*, 2023). Em indivíduos asmáticos, observa-se um aumento na produção de IL-10 e óxido nítrico (NO) pelos MA, o que sugere um papel regulador dessas células no controle da inflamação. No entanto, apesar dessa resposta compensatória, os MA de pessoas com asma parecem apresentar disfunção e menor eficiência na mediação da resposta anti-inflamatória quando comparados aos de indivíduos saudáveis (BALHARA; GOUNNI, 2012). Além disso, durante a alergia pulmonar ocorre disfunção alveolar grave, que pode acarretar na morte dos MA, agravando o quadro inflamatório pela redução da eliminação de células apoptóticas(FEO-LUCASet *al.*, 2023; MIKLet *al.*, 2021).O processo de desenvolvimento da inflamação alérgica está resumido na Figura 1.

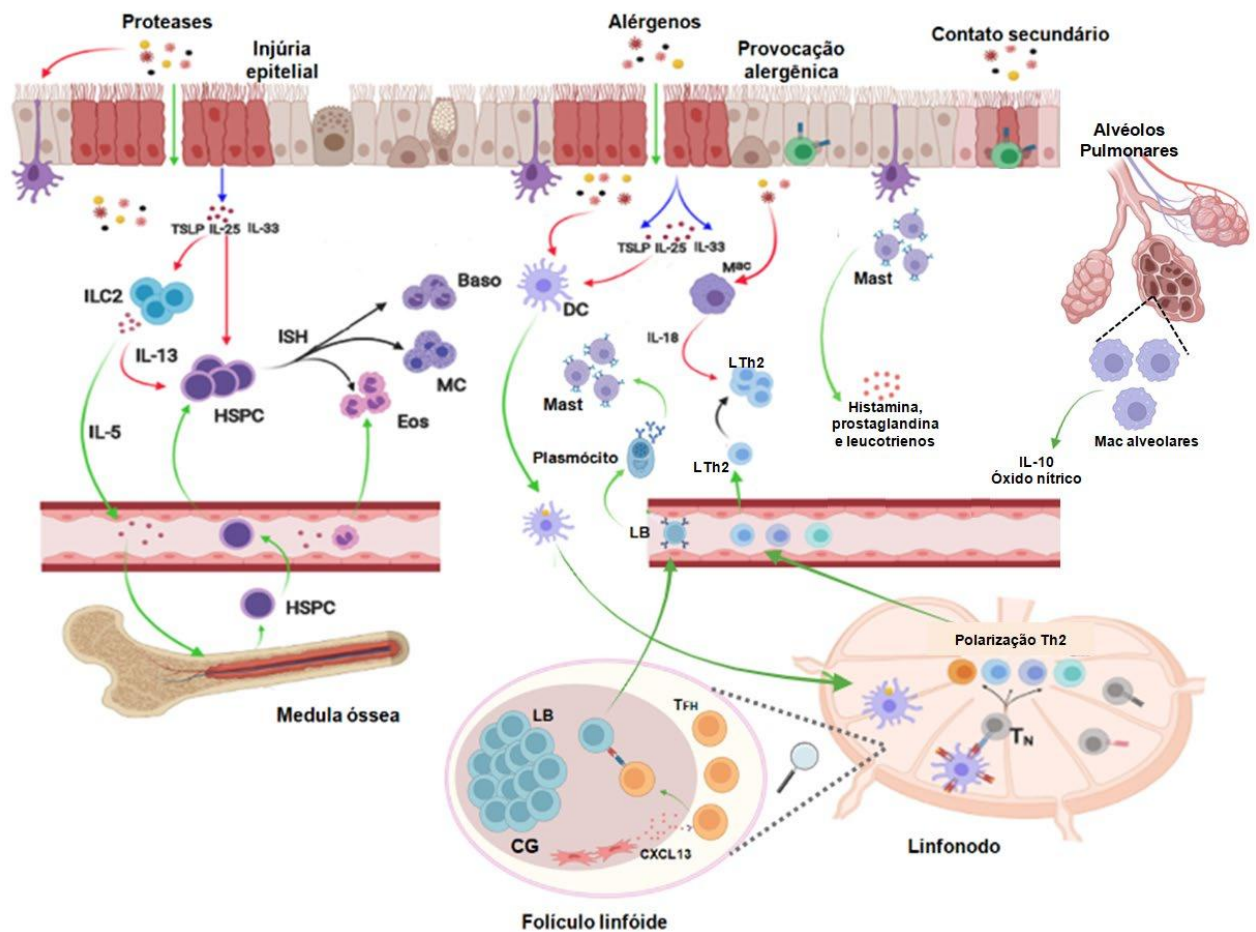


Figura 1: Imagem representativa da resposta imune na asma pulmonar. Proteases presentes nos alérgenos causam danos ao epitélio pulmonar. DAMPs liberados, juntamente com os próprios alérgenos, são reconhecidos pelas células epiteliais por meio de receptores do tipo Toll, levando à liberação de TSLP, IL-25 e IL-33. Essas alarminas ativam células linfoides inatas do tipo 2 (ILC2), que liberam citocinas como IL-5 e IL-13, além de recrutar outras populações de células imunes produtoras de citocinas do tipo 2 (T2). A IL-5 atua na diferenciação de eosinófilos na medula óssea, promovendo eosinofilia periférica e nas vias aéreas. Além disso, TSLP e IL-33 induzem hematopoiese in situ de células-tronco hematopoiéticas (HSPC), já presentes na mucosa ou recrutadas da circulação. As citocinas epiteliais também ativam células dendríticas (DCs), que processam os alérgenos e os apresentam aos linfócitos T virgens nos linfonodos. Esse reconhecimento leva à geração de linfócitos T efetores (TE) e foliculares (TFH). Em contatos subsequentes com o antígeno, os TE, no caso LTh2, sofrem rápida proliferação e secretam citocinas como IL-4, IL-5 e IL-13, intensificando a resposta Th2. Os TFH migram para o centro germinativo (CG) via eixo CXCL13–CXCR5, onde interagem com linfócitos B (LB) e promovem a troca de classe de imunoglobulina. Após a formação de LB IgE⁺, mastócitos e basófilos são sensibilizados com essa imunoglobulina e, em exposições subsequentes ao alérgeno, sofrem degranação e liberam mediadores inflamatórios. Macrófagos alveolares, células pulmonares residentes, liberam IL-10 e óxido nítrico que contribuem para o controle da inflamação (GOWTHAMAN *et al.*, 2020; CAMIOLLO *et al.*, 2021). Imagem adaptada de Camiolo (2021). Elaborada no BioRender.

Mesmo sendo o tipo de asma melhor esclarecido, os mecanismos que participam do desenvolvimento da asma alérgica de perfil Th2-alto ainda não são totalmente compreendidos. Desde os anos 1990, já se observa que pacientes asmáticos exibem níveis sanguíneos elevados do Fator Plaquetário 4 (PF4/CXCL4), citocina liberada quando as plaquetas se encontram ativadas (YAMAMOTO *et al.*, 1993). A partir disso, diversos estudos buscaram elucidar o envolvimento dessas células na patogênese da asma, como o de Kowal e colaboradores, que verificaram que pacientes asmáticos desafiados intrabronquialmente com extrato de *Dermatophagoides pteronyssinus* apresentaram aumento nos níveis de marcadores de ativação plaquetária, como fator plaquetário 4 (PF4) e P-selectina (CD62P) solúvel (KOWAL *et al.*, 2006). Em estudo com modelo murino, Takeda e colaboradores (2016) evidenciaram que as plaquetas expressam, de forma constitutiva, a IL-33, e que sua depleção, via injeção intraperitoneal de anticorpo monoclonal anti-CD41, foi capaz de reduzir o infiltrado eosinofílico nas vias aéreas (TAKEDA *et al.*, 2016). Embora as evidências científicas apontem diversos mecanismos relacionando plaquetas e asma, ainda falta esclarecer de forma aprofundada sua função na doença. Claramente, a asma é uma condição complexa, com a participação de diversos tipos celulares em seu desenvolvimento, o que evidencia as várias lacunas a serem preenchidas sobre as interações entre plaquetas e células do sistema imune.

1.2. Plaquetas e seu papel na asma

As plaquetas são células anucleadas que medem de 2 a 5µm, são muito abundantes no sangue e originadas a partir de megacariócitos em estágio de ploidia de 8N a 32N (KROUPENOVA *et al.*, 2018; SUN *et al.*, 2021). A medula óssea é o principal local conhecido para a geração de plaquetas, mas já foi demonstrado que no pulmão também ocorre biogênese plaquetária, representando um pool razoável dessas células (ASQUITH *et al.*, 2024). Na estrutura plaquetária, destacam-se os grânulos alfa e densos, fornecidos pelos megacariócitos, que possuem conteúdos específicos e desempenham diferentes funções. Enquanto os grânulos alfa apresentam fibrinogênio, fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), trombospondina e PF4, os grânulos densos são compostos por serotonina, ADP (difosfato de adenosina), ATP (trifosfato de adenosina) e cálcio. Diversos componentes são capazes de ativar as plaquetas, como colágeno, adenosina difosfato (ADP), epinefrina, fator de ativação plaquetária (PAF) e tromboxano (GREMMEL; FRELINGER; MICHELSON, 2016). O maior agonista plaquetário conhecido é a trombina, formada no fígado como zimogênio e capaz de ativar plaquetas quando se encontra na forma ativa (VAN DER MEIJDEN; HEEMSKERK, 2019). Durante a ativação plaquetária, ocorre fusão das membranas granulares com a membrana plasmática e liberação dos seus conteúdos para o meio extracelular. Além disso, as plaquetas passam de um formato ovoide para um formato com pseudópodos, graças à extensa membrana celular que permanece invaginada durante a inatividade. Esse novo formato, em conjunto com glicoproteínas de membrana, garante melhor adesão das plaquetas às superfícies e a outras células (JURK; KEHREL, 2023). Também é importante mencionar a expressão de proteínas que ocorrem exclusivamente após a ativação, como fibrocistina L, CD109 e CD62P sendo esta última frequentemente utilizada como marcador de ativação plaquetária (GREMMEL; FRELINGER; MICHELSON, 2016).

Quando as plaquetas não estão ativadas, ou seja, em repouso, não interagem com a parede vascular livre de danos. Devido ao seu grande número na corrente sanguínea e à sua ampla gama de receptores, as plaquetas conseguem avaliar continuamente o ambiente e identificar eventuais lesões (STARK; MASSBERG, 2021). No instante em que essas células recebem sinal por meio da ligação a receptores, inicia-se uma cascata de sinalização intrínseca que gera sua ativação e

a secreção do conteúdo de seus grânulos. Ao serem secretados, esses componentes intensificam a sinalização da ativação plaquetária, além de ativar e recrutar plaquetas circulantes em repouso (ESTEVEZ; DU, 2017). A expressão do complexo glicoproteico IIb/IIIa na membrana de plaquetas (GPIIb/IIIa), formado pela heterodimerização das integrinas α IIb (CD41) e β 3 (CD61), passa a ter alta afinidade pelo fibrinogênio após a ativação (DURRANT; VAN DEN BOSCH; HERS, 2017). Tudo o que foi mencionado facilita a formação de coágulos, que servem como reservatórios de citocinas e fatores de crescimento liberados conforme as plaquetas ativadas degranulam. Além disso, há também a participação de outros mediadores, como fibrina, fibroblastos e queratinócitos que, juntamente com as plaquetas e outras células, como macrófagos, contribuem para a estabilização do coágulo e o processo de reparo (OPNEJA; KAPOOR; STAVROU, 2019). Apesar de seus papéis mais conhecidos, coagulação e hemostasia, as plaquetas também desempenham funções em diferentes contextos, bem como interagem com células do sistema imunológico (ŁUKASIK; MAKOWSKI; MAKOWSKA, 2018).

Vale destacar que as plaquetas possuem receptores da imunidade inata e, devido a isso, podem reconhecer, se ligar e eliminar patógenos por encapsulamento e liberação de peptídeos antimicrobianos, sendo a detecção de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) por essas células uma estratégia eficiente de defesa do hospedeiro, garantindo uma resposta rápida a infecções (MAOUIA *et al.*, 2020). Além disso, a eliminação do agente invasor pode ser mediada pelas plaquetas de forma indireta, por meio da ativação de macrófagos e neutrófilos (GUO; RONDINA, 2019). As plaquetas possuem, inclusive, receptores para citocinas como IL-1 β e fator de necrose tumoral (TNF), capazes de induzir sua ativação, além de possuir em seu citoplasma o inflamassoma NLRP3, que leva à clivagem e liberação de IL-1 β e IL-18 (GUO; RONDINA, 2019). Uma vez ativadas, as plaquetas conseguem se agregar aos leucócitos por meio das interações P-selectina e Ligante 1 da Glicoproteína P-selectina (PSGL-1) ou CD40/CD40L, evidenciando seu papel como efetoras tanto da imunidade inata quanto da adaptativa (DIB *et al.*, 2020; QIAN *et al.*, 2020). O conjunto dessas características referentes às plaquetas estão representadas na Figura 2.

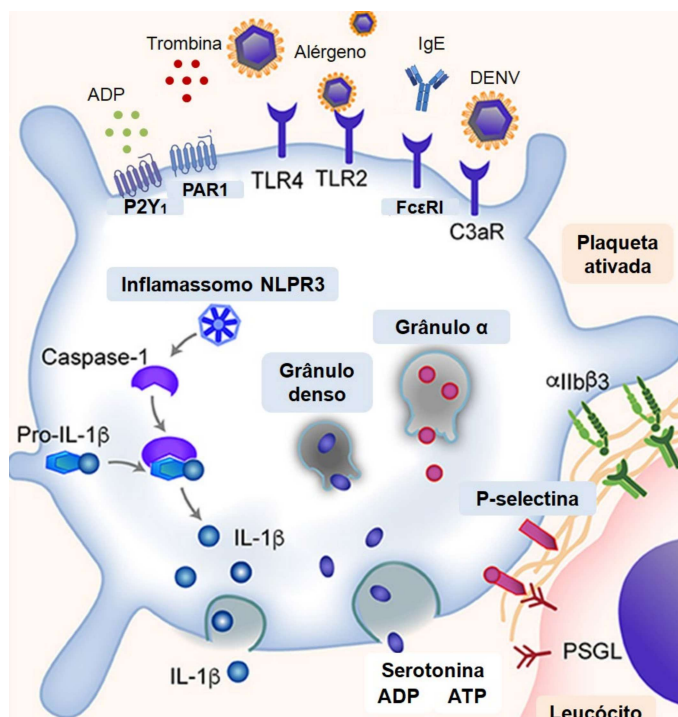


Figura 2: Características das plaquetas ativadas. As plaquetas são células sentinelas e efetoras essenciais no desenvolvimento da alergia pulmonar. Podem ser ativadas diretamente pelo alérgeno, via receptores do tipo Toll, ou por outros agonistas, como a trombina. Uma vez ativadas, mudam sua conformação, liberam o conteúdo de seus grânulos e passam a expressar P-selectina. A expressão de P-selectina permite a interação célula-célula com leucócitos, facilitando a migração dessas células para o pulmão e a formação do infiltrado inflamatório característico da asma. A ativação das plaquetas também pode induzir a via do inflamassoma NLRP3, culminando na produção e liberação de IL-1β, citocina importante na resposta inflamatória (GUO; RONDINA, 2019; VAN DER MEIJDEN; HEEMSKERK, 2019). Imagem adaptada de GUO, 2019. Elaborada no BioRender.

No contexto de respostas alérgicas, as plaquetas apresentam outras características, como maior poder adesivo a outras células, capacidade de migração transendotelial e favorecimento do infiltrado inflamatório (PITCHFORD *et al.*, 2019). Em um estudo, foi demonstrado que ao sensibilizar e desafiar camundongos com extrato de ácaro da poeira doméstica (HDM), ocorreu a chegada de plaquetas ao local de exposição ao alérgeno (SHAH *et al.*, 2021). Isso acontece graças à P-selectina liberada dos grânulos α, que possibilita tanto sua agregação com leucócitos quanto a interação com o endotélio, e cujos níveis estão aumentados no sangue de pessoas asmáticas durante a exacerbação da doença (GRANAIA *et al.*, 2023; JOHANSSON *et al.*, 2020). Em modelo experimental de alergia pulmonar induzida por ovalbumina (OVA), foi demonstrado que o receptor purinérgico P2Y1 em plaquetas é ativado durante a resposta e, como consequência, há maior formação de agregados plaquetas-leucócitos e aumento do infiltrado inflamatório no

pulmão devido à sua capacidade de estimular a expressão de P-selectina (AMISONet *et al.*, 2015). Outro estudo mostrou que plaquetas podem ser ativadas diretamente pelo alérgeno via TRL e apresentam aumento da expressão de CD40L. Além do mais, esse marcador nas plaquetas está intimamente relacionado ao desenvolvimento da asma, já que sua deficiência não proporcionou o aumento nos níveis séricos de IgE específica, no infiltrado inflamatório e nas expressões de IL-4 e IL-13 no pulmão (TIANet *et al.*, 2015). Como já mencionado anteriormente, as plaquetas expressam IL-33, uma citocina produzida por células epiteliais de importância para o início da resposta alérgica (TAKEDAet *et al.*, 2016), o que reforça a relevância dessas células desde o início da resposta.

Para que haja o infiltrado inflamatório no pulmão, etapas sequenciais precisam ocorrer para permitir a chegada das células ao tecido pulmonar, incluindo adesão e rolamento (JANUSKEVICIUSet *et al.*, 2019). Como já mencionado anteriormente, as plaquetas contribuem para o recrutamento de leucócitos ao pulmão, incluindo eosinófilos e linfócitos T, por meio da interação direta com essas células (JOHANSSON *et al.*, 2012). Quando ativados, os eosinófilos passam a expressar β 1-integrina em sua superfície, a qual se liga à molécula de adesão celular vascular-1 (VCAM-1) presente no endotélio (DATTOLI *et al.*, 2018). Essa integrina está mais expressa em eosinófilos de indivíduos asmáticos, e foi demonstrado que isso ocorre, principalmente, nas células que estão ligadas à P-selectina, por meio da interação via PSGL-1 (JOHANSSON; MOSHER, 2011). Para além do contato direto, as plaquetas são grandes produtoras de CCL5/RANTES, uma quimiocina potente para o recrutamento de eosinófilos e linfócitos T, reforçando seu papel essencial na formação do característico infiltrado inflamatório observado na asma (GRUBAet *et al.*, 2023; LUOet *et al.*, 2021).

As plaquetas podem estar agregadas a outros leucócitos envolvidos no desenvolvimento da asma Th2-alta, como as ILC2s, que apresentam maior produção de citocinas e capacidade de proliferação após estímulos alergênicos (ORIMOet *et al.*, 2022). Além disso, as plaquetas são encontradas colocalizadas com DCs nas vias aéreas de camundongos alérgicos, por meio da interação CD40–CD40L, contato importante para a sensibilização a alérgenos (AMISONet *et al.*, 2018).

A participação das plaquetas na alergia pulmonar também interfere na imunidade humoral. De forma indireta, a liberação de PF4 contribui para o desenvolvimento de linfócitos B (LB) na medula óssea (FIELDet *et al.*, 2017). De

maneira mais direta, as plaquetas interagem com os LB por meio da via CD40-CD40L, e estimulam a formação de centros germinativos em cooperação com LT CD4⁺ (ELZEY *et al.*, 2005; ZHENG *et al.*, 2013). Além disso, uma revisão recente apontou que em doenças imunoinflamatórias (como lúpus), agregações entre plaquetas e linfócitos B podem estar associadas a maior frequência de células B de memória, indicando impacto na memória imunológica (SCHERLINGER *et al.*, 2023). Ainda, as plaquetas expressam o receptor de alta afinidade para IgE (FcεRI), que se encontra aumentado durante a alergia e parece ser essencial para sua migração ao pulmão (PITCHFORD *et al.*, 2008). Essas múltiplas funções das plaquetas na alergia pulmonar estão resumidas na Figura 3.

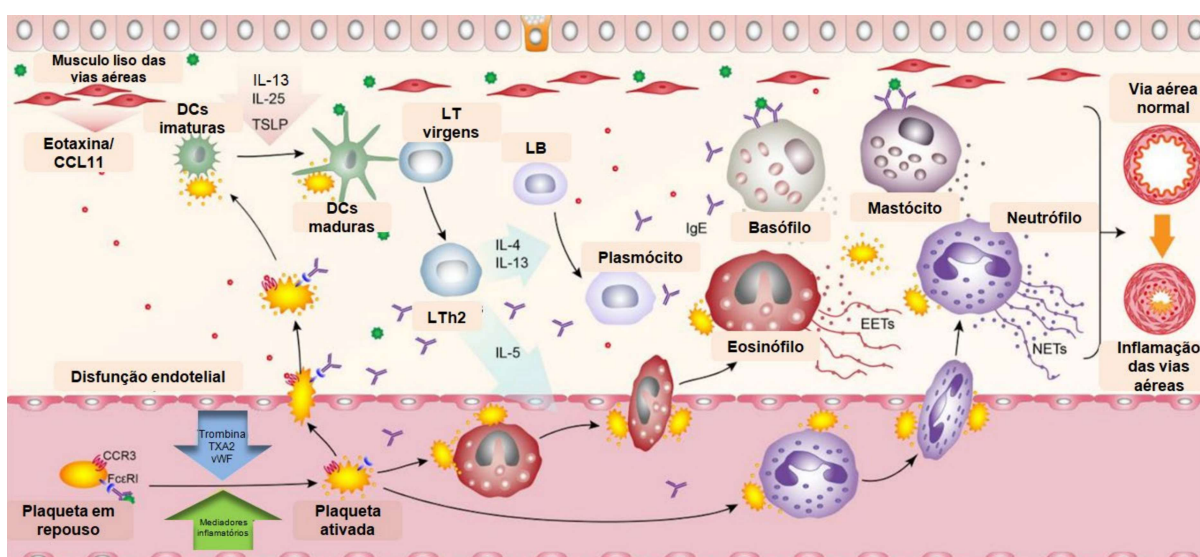


Figura 3: Visão geral da ativação plaquetária, recrutamento pulmonar, interações com leucócitos e secreção na alergia pulmonar. A resposta imunológica se inicia após o contato do alérgeno com as vias aéreas. Com a disfunção endotelial e a presença de mediadores inflamatórios, as plaquetas são ativadas e recrutadas para o pulmão de maneira dependente de FcεRI e CCR3. Após a migração, ligam-se às células dendríticas (DCs) e secretam mediadores que promovem a maturação dessas células. Plaquetas circulantes ativadas também interagem com eosinófilos e neutrófilos, favorecendo a entrada desses leucócitos no tecido pulmonar, onde desempenham suas funções, como a formação de EETs e NETs, respectivamente (YUE *et al.*, 2022). Imagem adaptada de YUE, 2022.

Para responder determinadas perguntas, estudos em humanos e em modelos, como os *in vitro*, são limitados, e a utilização de modelos animais se torna fundamental por permitir a investigação de mecanismos patológicos e a avaliação de novas terapias (MUKHERJEE *et al.*, 2022). Entre os modelos animais disponíveis, o camundongo é amplamente escolhido devido à sua genética bem caracterizada, curto ciclo de vida, possibilidade de manutenção em ambiente controlado e

capacidade de ser manipulado geneticamente (MASOPUST; SIVULA; JAMESON, 2017). Especificamente, o camundongo BALB/c é muito utilizado para o estudo da alergia pulmonar, pois apresenta uma resposta imune Th2 característica, com produção de IgE e eosinofilia semelhante à observada em humanos (AKKOC *et al.*, 2022; WOODROW *et al.*, 2023). Ainda, permite a avaliação da resposta imune em diferentes estágios da doença, desde a indução da sensibilização até a manifestação da asma após os desafios (RADHOUANI; STARKL, 2024). Somado a isso, a escolha de fêmeas para esse modelo pode ser uma estratégia, por representar o sexo mais acometido pela doença na fase adulta (MIYASAKA *et al.*, 2022). Selecionar o agente alergênico também é uma etapa de suma importância para o andamento do estudo. A OVA é uma proteína encontrada na clara de ovo de galinha, altamente imunogênica e comumente empregada como alérgeno para induzir uma resposta alérgica em camundongos (CARROLL *et al.*, 2023; CASARO *et al.*, 2019).

Associado ao modelo de alergia pulmonar em camundongos BALB/c, diversas são as formas de investigar os mecanismos envolvidos no desenvolvimento da doença relacionados às plaquetas. Tratamentos com antiplaquetários diminuem a ativação dessas células, impactando diretamente o desempenho de suas funções, como é o caso da aspirina, que inibe a COX-1 plaquetária e, conseqüentemente, suprime a produção de TXA2 (CRESCENTE *et al.*, 2019). No entanto, essa inibição leva ao aumento da produção de leucotrienos, o que pode estimular ainda mais a contração do músculo liso das vias aéreas, aumentar a permeabilidade vascular e intensificar o recrutamento de leucócitos (GODSON, 2020; KYTIKOVA *et al.*, 2019). Outro exemplo é o clopidogrel, um pró-fármaco que inibe o receptor P2Y1, também expresso em outras células, como os leucócitos (KUSZYNSKI; LAUVER, 2022). Dessa forma, embora esses fármacos inibam a ativação e agregação plaquetária, podem agravar a asma por outros mecanismos. Uma alternativa mais específica é o uso de anticorpos monoclonais direcionados a proteínas expressas em plaquetas (MORODOMI *et al.*, 2020). Diversos estudos já empregaram o anticorpo anti-CD41 em modelo murino de alergia pulmonar, visando promover a depleção plaquetária e avaliar as alterações imunológicas associadas, como níveis de citocinas e o infiltrado inflamatório (KARTA *et al.*, 2019; TAKEDA *et al.*, 2016). Assim, essa abordagem permite investigar os mecanismos pelos quais as plaquetas participam da resposta alérgica pulmonar. Embora o corpo de pesquisas sobre a atuação das plaquetas na

asma venha se expandindo, os mecanismos específicos que envolvem essas células na patogênese da doença ainda não estão completamente elucidados. Nesse contexto, o presente estudo propõe investigar o papel das plaquetas no desenvolvimento do processo alérgico nos órgãos linfoides secundários e na inflamação alérgica pulmonar nas fases de sensibilizações e desafios em um modelo experimental murino.

2. OBJETIVO GERAL

Investigar o papel das plaquetas no desenvolvimento do processo alérgico nos órgãos linfoides secundários e na inflamação alérgica pulmonar nas fases de sensibilizações e desafios em um modelo experimental murino.

2.1.Objetivos específicos:

- Investigar alterações na contagem de plaquetas e sua ativação no sangue e no pulmão em modelo experimental de alergia pulmonar;
- Analisar a formação de agregados entre plaquetas e leucócitos em diferentes tecidos no contexto da inflamação alérgica;
- Identificar a formação de agregados plaquetas-leucócitos intra e extravascular no pulmão em modelo de alergia pulmonar após depleção plaquetária;
- Avaliar os efeitos da depleção plaquetária na resposta Th2 associada à alergia pulmonar;
- Investigar a influência da depleção plaquetária no desenvolvimento e nos mecanismos efetores da resposta humoral.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Animais

Foram utilizados camundongos fêmeas da linhagem BALB/c, de 4 a 6 semanas de idade, provenientes do Centro de Biologia da Reprodução da Universidade Federal de Juiz de Fora (CBR-UFJF). Esses animais foram mantidos no setor de experimentação do CBR, em gaiolas-padrão e em estante climatizada, com 12h de ciclo claro e escuro. Todos os procedimentos realizados estão de acordo com a Comissão de Ética em experimentação animal e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFJF) da Pró-reitoria de Pesquisa da UFJF, sob o número 35/2022.

Para a realização do protocolo de asma com depleção de plaquetas, camundongos BALB/c fêmeas, de 4 a 6 semanas de idade, foram obtidos do Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos da Fundação Oswaldo Cruz (ICTB-Fiocruz). Os animais foram mantidos no biotério do Departamento de Microbiologia da Universidade Estadual do Rio de Janeiro (UERJ), onde ficaram em estantes ventiladas com 12h de ciclo claro e escuro. Os procedimentos foram feitos de acordo com as normas e comitê de ética aprovado pela CEUA/UERJ, sob o número 041/2024.

3.2. Grupos Experimentais

A primeira etapa deste projeto (Etapa 1) foi destinada para avaliar a presença de plaquetas e formação de agregados com leucócitos durante a alergia pulmonar, os animais foram divididos em 2 grupos experimentais, de acordo com os procedimentos adotados. Grupo controle (CN), não submetido ao protocolo de alergia pulmonar. Grupo alérgico (OVA), eutanasiado 24h após o último desafio com ovalbumina (Tab. 1).

Tabela 1: Grupos experimentais utilizados no protocolo de asma induzida por OVA, de acordo com os procedimentos adotados

Grupos	Indução do modelo de alergia pulmonar experimental
CN	-
OVA	+

Grupo controle (CN), Grupo alérgico (OVA). Eutanásia 24h após o último desafio com OVA.

Na Etapa 2, para avaliar a depleção plaquetária em modelo de alergia pulmonar, foram realizados três experimentos em momentos distintos. Primeiramente, para avaliar a eficácia do tratamento com anti-CD41, os animais foram divididos em dois grupos experimentais. Grupo controle (CN), não submetido a nenhum procedimento. Grupo Anti-CD41, não submetido a nenhuma etapa do protocolo da alergia pulmonar e tratado com anti-CD41 (Tab. 2).

Tabela 2: Grupos experimentais utilizados no protocolo do tratamento com anti-CD41, de acordo com os procedimentos adotados.

Grupos	Sensibilizações e desafios com OVA	Apenas sensibilizações com OVA	Tratamento com anti-CD41	Controle de isótipo
CN	-	-	-	-
Anti-CD41	-	-	+	-

Grupo controle (CN), Grupo apenas tratado com anti-CD41 (Anti-CD41). Eutanásia 24h após tratamento.

Para avaliar a depleção plaquetária através do tratamento com anti-CD41 durante a alergia pulmonar, os animais foram divididos em quatro grupos experimentais. Grupo controle (CN), não submetido a nenhum procedimento. Grupo alérgico (OVA), tratado com controle de isótipo (anti-IgG1 κ) 24h antes e após o primeiro desafio com OVA, e eutanasiado 24h após o último desafio com ovalbumina. Grupo alérgico tratado nos desafios (OVA-DT), tratado com anti-CD41 24h antes e após o primeiro desafio com OVA e eutanasiado após último desafio. Grupo alérgico tratado nas sensibilizações (OVA-ST), tratado com anti-CD41 24h antes de cada sensibilização e eutanasiado após último desafio (Tab. 3).

Tabela 3: Grupos experimentais utilizados no protocolo de asma induzida por OVA e tratamento com anti-CD41, de acordo com os procedimentos adotados.

Grupos	Sensibilizações e desafios com OVA	Tratamento com anti-CD41	Controle de isótipo
CN	-	-	-
OVA	+	-	+
OVA-DT	+	+	-
OVA-ST	+	+	-

Grupo controle (CN), Grupo alérgico (OVA), Grupo alérgico tratado nos desafios (OVA-DT), Grupo alérgico tratado nas sensibilizações (OVA-ST). Eutanásia 24h após o último desafio com OVA.

Para avaliar a depleção plaquetária através do tratamento com anti-CD41 na fase de sensibilização, os animais foram divididos em dois grupos experimentais. Grupo sensibilizado (SENS), tratado com controle de isótipo (anti-IgG1 κ) 24h antes cada sensibilização e eutanasiado após a última. Grupo sensibilizado tratado (SENS-T), tratado com anti-CD41 24h antes cada sensibilização e eutanasiado após a última (Tab. 4).

Tabela 4: Tabela 3: Grupos experimentais utilizados no protocolo de asma induzida por OVA e tratamento com anti-CD41, de acordo com os procedimentos adotados.

Grupos	Apenas sensibilizações com OVA	Tratamento com anti-CD41	Controle de isótipo
CN	-	-	-
SENS	+	-	+
SENS-T	+	+	-

Grupo sensibilizado (SENS), Grupo sensibilizado tratado (SENS-T). Eutanásia 24h após a última sensibilização com OVA.

3.3. Indução do modelo de alergia pulmonar experimental e tratamento com anti-CD41:

A indução de alergia pulmonar experimental por OVA foi realizada por meio de duas sensibilizações, correspondendo aos dias 0 e 7 do protocolo. Para isso, foi feita a imunização nos animais com injeção intraperitoneal (i.p.) contendo 10µg de OVA (Grade V, Sigma-Aldrich Corp, EUA) e 1mg de adjuvante hidróxido de alumínio (Sigma-Aldrich Corp, EUA). Nos dias 14, 15 e 16 do protocolo, os animais foram desafiados através da administração intranasal de OVA a 0,25% em tampão fosfato salino (PBS) resultando em um total de 25µl. A eutanásia e a coleta das amostras foram realizadas 24h após o último desafio, como demonstrado na Figura 4.

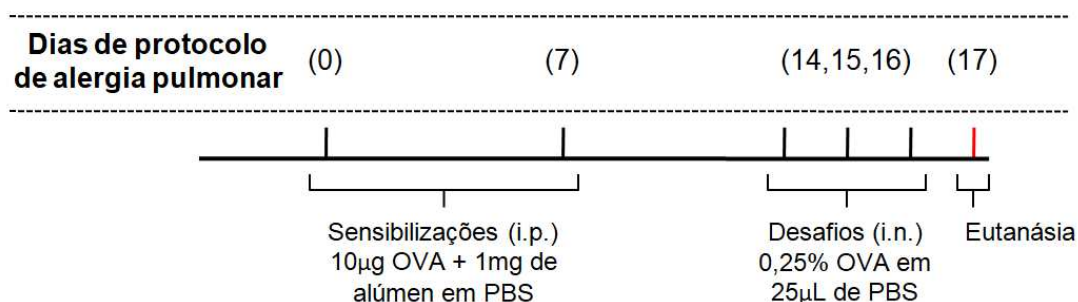


Figura 4: Delineamento experimental do protocolo de indução de alergia pulmonar experimental induzida por OVA. As sensibilizações foram realizadas através de injeção intraperitoneal com 10µg de ovalbumina em hidróxido de alumínio no grupo OVA. Desafios com 0,25% de ovalbumina contendo PBS, através de administração intranasal, foram realizados no mesmo grupo experimental. A eutanásia ocorreu 24h após o último desafio com o alérgeno.

Após a eutanásia na Etapa 1, o sangue foi coletado e uma pequena alíquota foi destinada para contagem total e diferencial de leucócitos através de esfregaço sanguíneo. A medula óssea foi destinada à citocentrifugação para contagem de leucócitos após coloração com panótipo rápido. O lobo pulmonar esquerdo foi destinado para análise histológica, com contagem de eosinófilos na coloração Sirius Red. Os demais lobos pulmonares, sangue e baço foram utilizados para obtenção do macerado, em que foi avaliada, por citometria de fluxo (CF), ativação plaquetária ou presença de agregados plaquetas-leucócitos. Em outros animais, os lobos pulmonares, exceto o esquerdo, foram destinados à extração do homogenato para dosagem de citocina (Fig. 5).

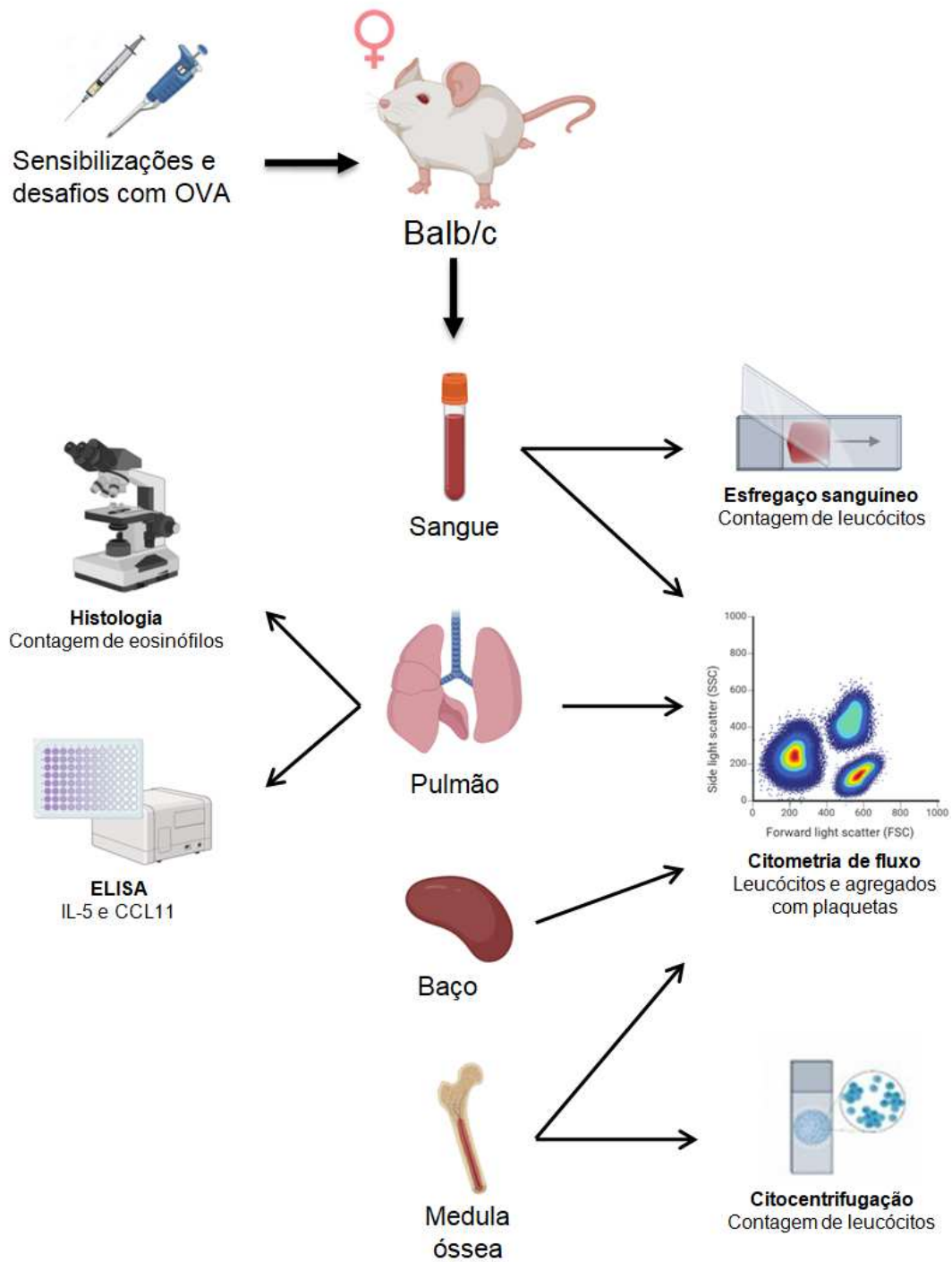


Figura 5: Fluxograma dos procedimentos realizados na Etapa 1. Camundongos fêmeas Balb/c foram induzidos à alergia pulmonar ou apenas sensibilizados com OVA. Sangue, pulmão, baço e medula óssea foram coletados para diferentes análises

Para avaliação do tratamento com anti-CD41 no modelo de alergia pulmonar, os animais dos grupos: OVA-DT, OVA-ST e SENS-T receberam 0,5mg/kg de anti-CD41, em volume de 100µl, através da via plexo retro-orbital em duas aplicações: 24h antes e após o primeiro desafio (Fig. 6) ou 24h antes das sensibilizações (Fig.7). Já os animais dos grupos OVA e SENS, receberam controle de isótipo IgG1κ na mesma concentração e momentos dos grupos OVA-DT e SENS-T, respectivamente. Os animais foram eutanasiados 24h após a última sensibilização ou desafio com OVA. As figura 6 e 7 mostram os delineamentos experimentais associados ao tratamento com anti-CD41.

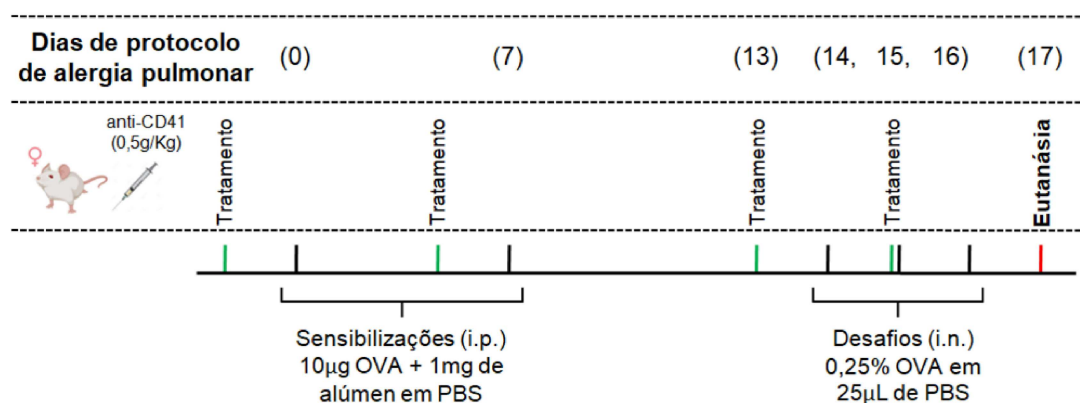


Figura 6: Delineamento experimental do tratamento com anti-CD41 em camundongos submetidos ao modelo experimental de alergia pulmonar induzida por OVA. O tratamento foi realizado por via retro-orbital nos grupos OVA-DT, OVA-ST, contendo 100ul de solução com 0,5mg/Kg de anti-CD41 em cada aplicação. O controle de isótipo foi realizado também por via retro-orbital nos grupos OVA-DT, contendo 100ul de solução com 0,5mg/Kg de IgG1κ em cada aplicação. A eutanásia foi realizada 24h após o último desafio com OVA.

Após a eutanásia desse experimento da Etapa 2, foi coletado o sangue para contagem de plaquetas e dosagem de citocina e de anticorpos. A medula óssea foi destinada à citocentrifugação para contagem de leucócitos após coloração com panótipo rápido. O lobo pulmonar esquerdo foi utilizado para análise histológica, com contagem de eosinófilos na coloração Sirius Red. Os demais lobos pulmonares e o linfonodo mediastinal foram coletados e macerados para análise de agregados plaquetas-leucócitos por CF. Os baços foram destinados à técnica de imunohistoquímica (Fig. 8).

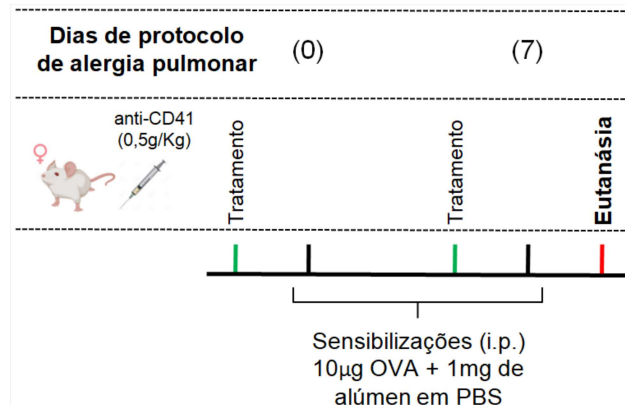


Figura 7: Delineamento experimental do tratamento com anti-CD41 em camundongos submetidos às etapas de sensibilização com OVA. O tratamento foi realizado por viaretro-orbital no grupo SENS-T, contendo 100ul de solução com 0,5mg/Kg de anti-CD41 em cada aplicação. O controle de isótipo foi realizado também por via retro-orbital no grupo SENS, contendo 100ul de solução com 0,5mg/Kg de IgG1κ em cada aplicação. A eutanásia foi realizada 24h após a última sensibilização com OVA.

Após a eutanásia desse experimento da Etapa 2, foi coletado o sangue para contagem de plaquetas e dosagem de citocina e de anticorpos. A medula óssea foi destinada à citocentrifugação para contagem de leucócitos após coloração com panótipo rápido e citometria de fluxo. O pulmão e o baço foram coletados e macerados para análise de agregados plaquetas-leucócitos por CF.(Fig. 8).

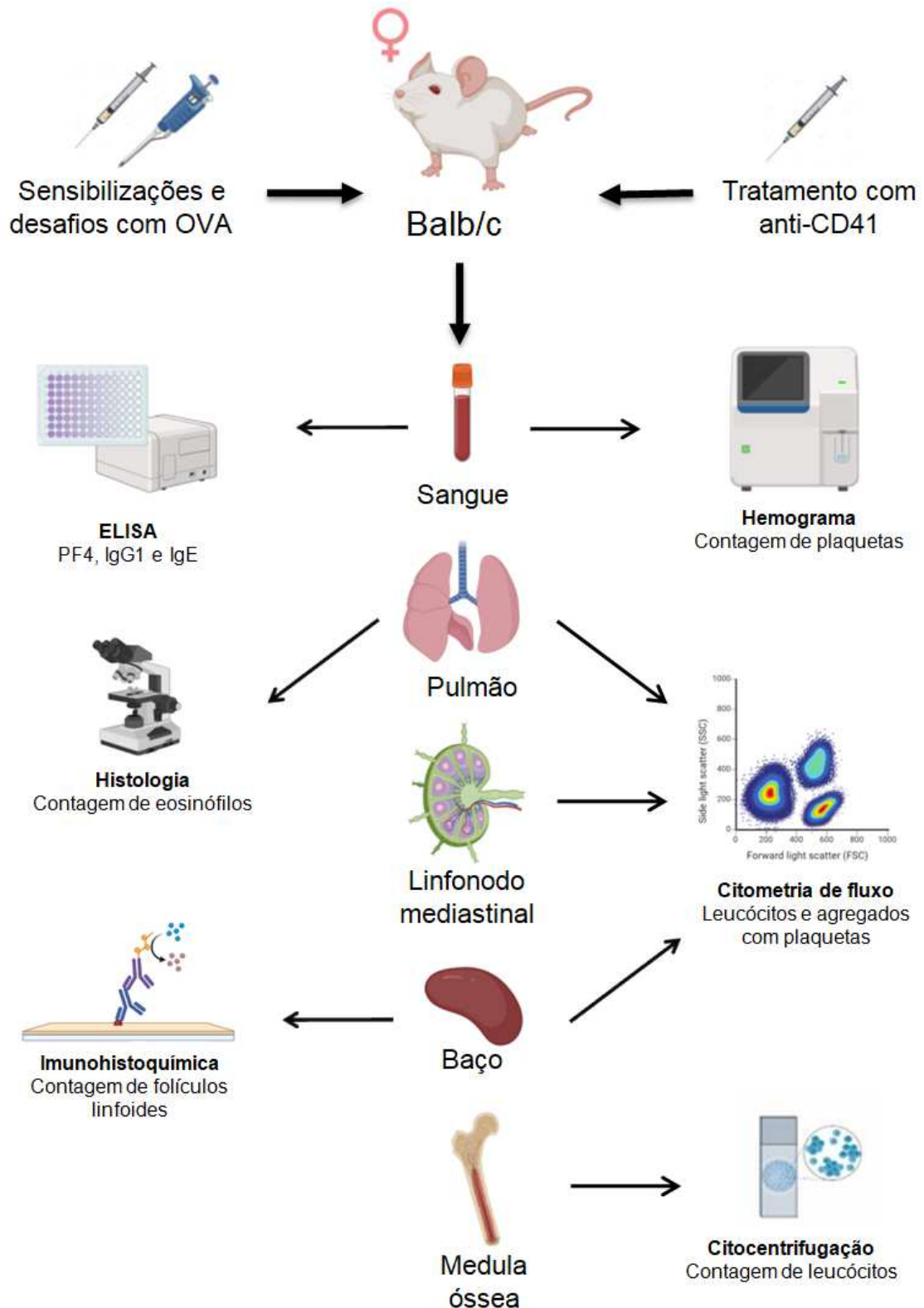


Figura 8: Fluxograma dos procedimentos realizados na Etapa 2. Camundongos fêmeas Balb/c foram induzidos à alergia pulmonar ou apenas sensibilizados com OVA, e tratados com anti-CD41. Sangue, pulmão, linfonodo mediastinal, baço e medula óssea foram coletados para diferentes análises

3.4.Obtenção de material biológico

Para a primeira etapa, as amostras biológicas foram obtidas 24h após o último desafio com OVA. Os animais foram eutanasiados através de dose letal de solução de cetamina (90mg/kg, Syntec, Brasil) e xilasina (10mg/kg, Ugener União, Brasil) por via intraperitoneal. Já para a segunda etapa, as amostras foram obtidas às 24h após o último desafio ou sensibilização com OVA. A eutanásia foi realizada por meio de inalação de isoflurano em câmara de eutanásia, seguida de confirmação de morte por meio da verificação da ausência de batimentos cardíacos e percepção de sinais. As amostras foram armazenadas individualmente e mantidas de acordo com os protocolos das respectivas análises realizadas detalhadas nas próximas sessões.

3.5.Coleta e processamento do sangue

Na etapa 1, após a anestesia, o sangue foi coletado por punção cardíaca utilizando seringas de 1mL contendo 150µL da solução anticoagulante ACD (Acid Citrate Dextrose). Uma pequena fração do sangue foi utilizada para a realização de esfregaço sanguíneo. O volume restante foi destinado à análise por CF em sangue total. Para isso, as amostras foram cuidadosamente manipuladas e incubadas com tampão FACS Lysing (BD Biosciences), permitindo a lise dos eritrócitos e fixação celular. Em seguida, foram realizadas lavagens, resultando na suspensão celular utilizada para marcação de superfície para CF, conforme descrito em 3.16.

Na etapa 2, o sangue também foi obtido por punção cardíaca, desta vez com seringas previamente rinsadas com EDTA a 10%. Uma alíquota de 200µL foi utilizada para a contagem de plaquetas em analisador hematológico (BC 6200 Mindray, China). O volume restante foi centrifugado a 7.500 x g por 2 minutos à temperatura ambiente (Centrífuga 5410, Eppendorf, Alemanha) para obtenção do plasma. As alíquotas de plasma foram armazenadas a -80 °C para posterior dosagem de citocina.

3.6.Coleta e processamento do pulmão

Após abertura da caixa torácica por incisão longitudinal, o tecido pulmonar foi lavado por perfusão com 10mL de PBS gelado, apenas na Etapa1. Em ambas as etapas experimentais, o lobo esquerdo foi coletado e fixado por 24h em solução de paraformaldeído a 4%, sendo posteriormente transferido para álcool 70% e etapas sequenciais de desidratação com álcool e xilol para, por fim, serem incluídos em blocos de parafina. Para a dosagem de citocinas, o tecido pulmonar foi homogeneizado em 1mL de PBS (*PhosphateBuffered Saline*) contendo inibidores de proteases (0,1mM fluoreto de fenilmetilsulfonil, 0,1mM cloreto de benzetônio, 10mM EDTA, 2µL de aprotinina A) e 0,05% de Tween 20, proporcionalmente a cada 100mg de tecido. As amostras foram centrifugadas a $440 \times g$ por 15 minutos a 4°C (CR 312, Thermo Electron Corporation, EUA), e os sobrenadantes foram armazenados a -20°C até a realização das dosagens de citocinas. Já o tecido pulmonardestinado à CF foi mantido em meio RPMI (*Roswell Park Memorial InstituteMedium*) gelado e suplementado até o momento do processamento, como descrito em 3.16.

3.7.Coleta e processamento dos linfonodos mediastinais

Após a abertura da cavidade torácica, os linfonodos mediastinais foram cuidadosamente removidos com o auxílio de pinça anatômica. Os tecidos foram mantidos em meio RPMI gelado e suplementado até o momento do processamento, como descrito em 3.16.

3.8.Coleta e processamento do baço

Após incisão abdominal, o baço foi exposto e removido cuidadosamente. Para as análises de imunohistoquímica, os órgãos foram fixados em solução de paraformaldeído a 4% por 24h e, em seguida, transferido para álcool 70% e posteriores etapas sequenciais de desidratação com álcool e xilol para, por fim, serem incluídos em blocos de parafina. Já os destinados à CF foram mantidos em meio RPMI gelado e suplementado até o momento do processamento, como descrito em 3.16.

3.9.Coleta e processamento da medula óssea

A medula óssea foi obtida a partir dos fêmures dos camundongos por meio de flushing. Após a eutanásia, os fêmures foram removidos, limpos e, em seguida, lavados internamente com meio RPMI contendo 3% de SFB, utilizando uma seringa com agulha introduzida pelas extremidades dos ossos, a fim de extrair a medula para fora da cavidade óssea. As amostras coletadas foram então centrifugadas, e os precipitados celulares ressuspensos em 2mL de tampão de lise ACK (*Ammonium-Chloride-Potassium buffer*) por 2 minutos. Após esse período, foram realizadas duas lavagens com tampão FACS (PBS1x contendo 2% de SFB), com posterior obtenção da suspensão celular final e contagem do número total de células em câmara de Neubauer.

3.10.Esfregaço sanguíneo

Para a avaliação dos leucócitos circulantes, especialmente eosinófilos, foram realizados esfregaços sanguíneos. Uma gota de sangue total foi coletada e imediatamente depositada sobre uma lâmina de vidro limpa. Em seguida, utilizando outra lâmina posicionada em um ângulo de aproximadamente 30°, realizou-se a extensão da amostra, formando uma monocamada celular. Os esfregaços foram deixados à temperatura ambiente até completa secagem e, posteriormente, corados com Panótipo rápido (Laborclin Ltda, Pinhais, Brasil). Após a coloração, as lâminas foram analisadas em microscópio óptico (Hallbergmoos, Alemanha) em aumento de 400X. A contagem diferencial foi realizada por leitura de 100 leucócitos por lâmina, em campos bem distribuídos, com o resultado expresso em percentual de eosinófilos.

3.11.Contagem de plaquetas

Na Etapa 1, a contagem de plaquetas no sangue pelo método de Brecher&Cronkite(RAMIREZ-UBILLUS *et al.*, 2020) foi realizada em câmara de Neubauer, utilizando 1µL de sangue total diluído em solução composta por oxalato de amônio a 1% e azul de metileno. Após incubação por 3 minutos, tempo necessário para a lise parcial dos eritrócitos e o adequado assentamento das plaquetas, a contagem foi realizada em microscópio óptico (Hallbergmoos,

Alemanha) com aumento de 400x. Os resultados foram expressos em número de plaquetas por milímetro cúbico (mm³).

Na Etapa 2, uma alíquota do sangue coletado foi destinada à análise em contador hematológico automatizado (BC 6200 Mindray, China), com o objetivo principal de quantificar o número de plaquetas. Além dessa contagem, foram obtidos parâmetros adicionais relacionados a essas células, como o volume plaquetário médio (MPV) e o percentual de plaquetas grandes (P-LCR). O equipamento também forneceu dados referentes à contagem diferencial de leucócitos, incluindo o percentual de eosinófilos e outras subpopulações leucocitárias.

3.12.ELISA de anticorpos específicos à OVA e de citocinas

A produção de IgE e IgG1 específicas anti-OVA foi avaliada por ELISA indireto. As placas de 96 poços foram sensibilizadas com 50µL/poço de OVA (0,1mg/mL; Grade V; Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, EUA) diluída em tampão carbonato e incubadas a 4 °C por 18 h. Em seguida, foram lavadas com PBST (PBS + 0,05% Tween 20) e bloqueadas com solução de albumina bovina (BSA) a 4% em PBS por 1h em temperatura ambiente. Após nova lavagem com PBST, foram adicionadas as amostras de plasma com diluições específicas para cada experimento: no grupo de animais apenas sensibilizados, as amostras foram diluídas em 1:20 para IgE e 1:1000 para IgG1; já no grupo de animais sensibilizados e desafiados, foram utilizadas diluições de 1:200 para IgE e 1:10.000 para IgG1. As placas foram novamente incubadas a 4°C por 18h. Na sequência, foram adicionados os anticorpos primários produzidos em rato contra a imunoglobulina de interesse, seguidos pelo anticorpo secundário anti-rato conjugado à estreptavidina-HRP. As incubações ocorreram em temperatura ambiente, por 2h e 1h, respectivamente, com lavagens intermediárias e finais com PBST. A reação enzimática foi revelada com substrato contendo ácido cítrico 0,1 M, citrato de sódio 0,1 M, OPD (O-phenylenediaminedihydrochloride) e H₂O₂ a 10%. Após o tempo de reação, foi adicionado H₂SO₄ 4 N para interromper o processo. As leituras foram realizadas em leitor de microplacas (SPECTRAMAX 190, Molecular Devices, EUA) a 490 nm, e os resultados foram expressos em densidade óptica (DO).

O homogeneizado do tecido pulmonar (etapa 1) foi utilizado para dosagens de IL-5 (kit BD OptEIA, BD Biosciences, EUA) e CCL11 (R&D Systems, Minneapolis,

MN, EUA), enquanto o plasma (etapa 2) foi utilizado para dosagem de CXCL4/PF4 (R&D Systems). Os ensaios foram realizados de acordo com as instruções dos fabricantes. Para isso, as placas foram sensibilizadas com o anticorpo de captura fornecido nos kits e incubadas a 4°C por 18h. Após lavagens com PBST, realizou-se o bloqueio dos sítios inespecíficos por 1h em temperatura ambiente. As amostras e as diluições da curva padrão foram adicionadas de acordo com cada protocolo. Para o kit BD OptEIA, adicionou-se em seguida o complexo anticorpo de detecção biotinilado e estreptavidina, com incubação de 2h. Para os kits da R&D Systems, o anticorpo de detecção foi incubado por 2h, seguido de lavagens e adição de estreptavidina por 1h. Após nova lavagem, foi adicionado o substrato TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina), e a reação foi interrompida com H₂SO₄ 1M. As leituras foram realizadas a 450nm em leitor de microplacas (SPECTRAMAX 190, Molecular Devices, EUA), com os resultados expressos em pg/mL.

3.13.Cálculo da medida de avides

A avides dos anticorpos específicos à OVA foi determinada com base na resistência das interações antígeno-anticorpo à ação de ureia, um agente caotrópico utilizado para romper ligações de baixa afinidade. Após a incubação das amostras no ELISA indireto para IgG1 e IgE, o protocolo foi acrescido de uma etapa de exposição à ureia.

No experimento com animais apenas sensibilizados, as concentrações de ureia utilizadas foram de 4M para IgG1 e 5M para IgE. Já no experimento que incluiu sensibilizações e desafios, foram utilizadas 3M para IgG1 e 3,5M para IgE. Em todos os casos, a incubação com ureia foi realizada por 20 minutos em temperatura ambiente, imediatamente após a incubação das amostras nas placas previamente sensibilizadas com OVA. Após esse período, a ureia foi completamente removida por lavagem com PBST, e o protocolo seguiu normalmente conforme descrito na seção 3.11, com adição dos anticorpos, revelação com OPD e leitura a 490nm.

As placas foram montadas em quadruplicata, sendo dois poços incubados com ureia e dois sem essa etapa. Dessa forma, foi possível obter os valores de absorbância total e residual (na presença do agente caotrópico), utilizados para o cálculo da medida de avides. A medida de avides foi expressa em porcentagem, de acordo com a fórmula:

$$\text{Medida de Avidéz (\%)} = (\text{Absorbância residual} / \text{Absorbância total}) \times 100$$

3.14.Histologia para contagem de eosinófilos no pulmão

Após obtenção do lobo pulmonar esquerdo incluído em parafina, foram realizados cortes semi-seriados com espessura de 5µm, que, após desparafinização e reidratação em banhos de xilol e álcool em série, foram corados com o corante Direct Red 80 (Sigma-Aldrich) por 1h e 30 minutos.

Na etapa 1, foram analisados 30 campos em região peribroncovascular, com auxílio de um retículo Olympus (10 mm/10), sob aumento de 1000×, e os resultados foram expressos em número de eosinófilos por 100µm². Já na etapa 2, foram analisados 10 campos, também na região peribroncovascular e com aumento de 1000×, porém sem o uso do retículo, e a contagem foi expressa em número de eosinófilos por campo.

3.15.Imunohistoquímica do baço

Após a obtenção do baço e sua inclusão em parafina, foram realizados cortes semi-seriados com espessura de 4µm. As lâminas foram submetidas à desparafinização e reidratação por meio de banhos sequenciais em xilol e álcool em concentrações decrescentes. A recuperação antigênica foi realizada em tampão Tris, incubado overnight a 60 °C. Em seguida, após lavagens em PBS 1X, procedeu-se ao bloqueio da peroxidase endógena, seguido do bloqueio de proteínas inespecíficas, conforme as instruções do kit de imunohistoquímica Novolink Max Polymer Detection System (LeicaBiosystems).

As lâminas foram então incubadas com anticorpo primário anti-B220 (e-Bioscience), overnight a 4°C. Após lavagens com PBS, as lâminas foram incubadas com o anticorpo secundário (GoatAnti-Rat IgG (H+L), Thermo Scientific), por 1h a 37°C. A detecção foi realizada utilizando o cromógeno DAB (3,3'-diaminobenzidina), até a observação da reação enzimática. As lâminas foram então lavadas em água corrente, contra-coradas com hematoxilina por 2 minutos, lavadas novamente e desidratadas com banhos e álcool absoluto e xilol, respectivamente.

A análise foi realizada em microscópio óptico (ECLIPSE 80i, Nikon), permitindo a visualização dos folículos linfóides por meio da marcação com anti-

B220. Folículos linfóides primários foram definidos como estruturas arredondadas com marcação positiva, porém sem evidência de estrutura condizente com o centro germinativo, enquanto os folículos linfóides secundários foram definidos tanto com marcação positiva para B220 quanto com a formação da estrutura condizente com o centro germinativo (Stebegget *al.* 2018; WANG *et al.*, 2024).

A contagem dos folículos primários e secundários foi realizada em três campos por tecido, com aumento de 200×. Os resultados foram expressos como número médio de folículos por campo. A delimitação dos folículos secundários e o cálculo de sua área foram realizados utilizando ferramentas do programa (Prime Cam Pro). A área média dos folículos linfóides secundários foi expressa em μm^2 , sendo calculada pela fórmula:

Área média = Σ (área dos folículos secundários) / número de folículos secundários

3.16. Contagem de células da medula óssea

Após a obtenção da suspensão celular da medula óssea, todas as amostras passaram pelo processo de contagem de células na câmara de Neubauer (com azul de Trypan). Um volume de 100 μL da suspensão celular, contendo aproximadamente 1×10^6 células, foram citocentrifugadas a 20 x g por 5 minutos à T[°]A (Fanem 248, São Paulo, Brasil). Posteriormente as lâminas foram coradas com Panótipo rápido (Laborclin Ltda, Pinhais, Brasil). De acordo com critérios morfológicos e com a coloração diferenciada apresentada pelos grânulos eosinofílicos, foram contados 200 leucócitos no total para avaliação do percentual de eosinófilos com auxílio de microscópio ótico Zeiss (Hallbergmoos, Alemanha) em aumento de 400X.

3.17. Citometria de fluxo de sangue, órgãos linfóides e pulmão

Para a análise por CF, os lobos pulmonares, exceto o esquerdo, o baço e os linfonodos mediastinais foram removidos e acondicionados em meio de cultura RPMI até o momento do processamento. O sangue e a medula óssea foram processados para obtenção da suspensão celular conforme descrito nos itens 3.4 e 3.8, respectivamente. Os órgãos foram macerados com meio RPMI suplementado com SFB, utilizando um cellstrainer de 70 μm .

O tecido pulmonar passou por digestão enzimática antes da maceração, que consistiu na incubação do tecido, previamente picado, em 1,5mL da solução de digestão, sob agitação a 180rpm em shake, a 37°C, por 30 minutos. Após esse período, foi realizada a maceração conforme já descrito. Em seguida, as amostras foram centrifugadas, e o precipitado foi ressuspensionado em 2mL de tampão de hemólise ACK por 2 minutos. As células foram então lavadas duas vezes com tampão FACS (PBS 1x com 2% de SFB) e, ao final das lavagens, ressuspensionadas em 500µL do mesmo tampão.

A contagem celular foi realizada em câmara de Neubauer. Em seguida, foram plaqueadas 2×10^6 células por poço em placa de fundo em U. Quando não foi possível alcançar essa quantidade, utilizou-se o maior número de células disponível nas amostras. Após o plaqueamento, as células foram incubadas com o reagente FVS (FixableViabilityStain – BD Horizon™) por 30 minutos em alguns painéis, permitindo a discriminação entre células viáveis e mortas. Após a lavagem do reagente de viabilidade, as amostras foram incubadas com os anticorpos conjugados com fluorocromos para marcação extracelular, conforme descrito nos Quadros X e Y, por 30 minutos, seguidos de fixação com PF4 a 2% por 20 minutos. Para a marcação intracelular, foi realizada permeabilização com Triton X-100 a 0,1% após a fixação da marcação de superfície, seguida da incubação com o anticorpo intracelular de interesse (Quadros X e Y) e nova fixação com PF4 a 2%.

A estimativa de plaquetas no pulmão, foi realizada a partir da razão entre os eventos CD41⁺ e CD45⁺ dentro da população de células viáveis obtida por CF. Essa razão foi multiplicada pelo valor absoluto de células, provenientes da concentração total de células da suspensão pulmonar, determinada por contagem em câmara de Neubauer. O valor final representa o número de plaquetas (totais ou livres) no pulmão, obtido através da seguinte fórmula:

$$\text{Nº de plaquetas} = [\text{CD41}^+ (\text{total ou livre}) / \text{CD45}^+] \times \text{Valor absoluto de células}$$

Tabela 5: Paineis de fluorocromos utilizados na marcação celular por Citometria de Fluxo (Etapa1)

Painel(Etapa1)	Marcador	Fluorocromo	Clone
Plaquetas	Viabilidade	APC-H7	-
	CD45	FITC	30-F11
	CD41	BV421	MWRg-30
	CD62P	PE	Psel.KO2.3
	CD16/62	Fc-block	
Eosinófilos, MA e agregados	CD45	FITC	30-F11
	Siglec-F	AF647	E50-2440
	CD11b	BV510	M1/70
	CD41	BV421	MWRg-30
	CD16/62	Fc-block	
Linfócitos B e agregados	Viabilidade	APC-H7	-
	CD45	FITC	30-F11
	CD19	PE	EBio 1D3
	IgG1	APC	A85-1
	IgE	BV510	R35-72
	CD41	BV421	MWRg-30
	CD16/62	Fc-block	

Tabela 6: Pannel de fluorocromos utilizados na marcação celular por Citometria de Fluxo (Etapa2)

Painel(Etapa2)	Marcador	Fluorocromo	Clone
Eosinófilos, MA e agregados	CD45iv	FITC	30-F11
	CD45t	PERCP	30-F11
	Siglec-F	AF647	E50-2440
	CD11b	BV510	M1/70
	CD41	BV421	MWRg-30
	CD16/62	Fc-block	
Linfócitos Th2	CD45iv	FITC	30-F11
	CD45t	PERCP	30-F11
	CD4	AF647	RM4-5
	GATA3	BV421	L50-823
	CD41	PE	MWRg-30
	CD16/62	Fc-block	
Linfócitos Tfh	Viabilidade	APC-H7	-
	CD45	PERCP	30-F11
	CD3	FITC	145-2C11
	CD4	AF647	RM4-5
	CXCR5/CD185	BV421	2G8
	PD1	BV510	J43
	CD41	PE	MWRg-30
	CD16/62	Fc-block	
Linfócitos B e agregados *Não utilizado no baço	Viabilidade	APC-H7	-
	CD45iv *	FITC	30-F11
	CD45t	PERCP	30-F11
	CD19	PE	EBio 1D3

	IgG1	APC	A85-1
	IgE	BV510	R35-72
	CD41	BV421	MWRg-30
	CD16/62	Fc-block	

3.18. Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism 10.0 (GraphPad Software, EUA). Inicialmente, as variáveis numéricas foram submetidas ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk para avaliar a distribuição gaussiana dos dados. Quando os dados apresentaram distribuição normal, foram aplicados testes paramétricos: teste *t* de Student não pareado para comparações entre dois grupos e ANOVA one-way seguida do pós-teste de Sidak. Para dados com distribuição não normal, foram utilizados testes não paramétricos: teste de Mann-Whitney para comparação entre dois grupos e ANOVA de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn para três ou mais grupos. O nível de significância adotado foi de $p \leq 0,05$. Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM).

4. RESULTADOS

4.1. Modelo de alergia pulmonar e contagem de plaquetas

4.1.1. Indução da alergia pulmonar com OVA causa eosinofilia em diferentes compartimentos e maior produção de IL-5 e CCL11

Para verificar o papel das plaquetas na asma, foi realizada a indução do modelo de alergia pulmonar através de desafios e sensibilizações com ovalbumina (OVA). Inicialmente, avaliou-se a presença de eosinofilia sistêmica e local, bem como a concentração de citocinas típicas da resposta Th2 para verificar a eficácia da indução do modelo utilizado, visto que em doenças inflamatórias pulmonares, como a asma alérgica, é comum observar aumento da eosinofilia tanto em tecidos quanto na circulação (MACCHIA *et al.*, 2023).

A contagem de eosinófilos foi realizada na medula óssea e no sangue periférico, evidenciando aumento significativo no percentual dessas células no grupo OVA em comparação ao grupo controle (CN) (Fig. 9A, 9B). De forma semelhante, no pulmão, o grupo OVA apresentou um aumento expressivo na contagem de eosinófilos em relação ao CN (Fig. 9C), indicando a indução do processo inflamatório alérgico local.

As análises das citocinas características da resposta Th2 revelaram concentrações significativamente elevadas de IL-5 e da quimiocina CCL11 (eotaxina) no grupo OVA, quando comparado ao grupo CN (Fig. 9E, 9F). A Figura 9D ilustra uma imagem representativa da presença de eosinófilos corados com Sirius Red no parênquima pulmonar.

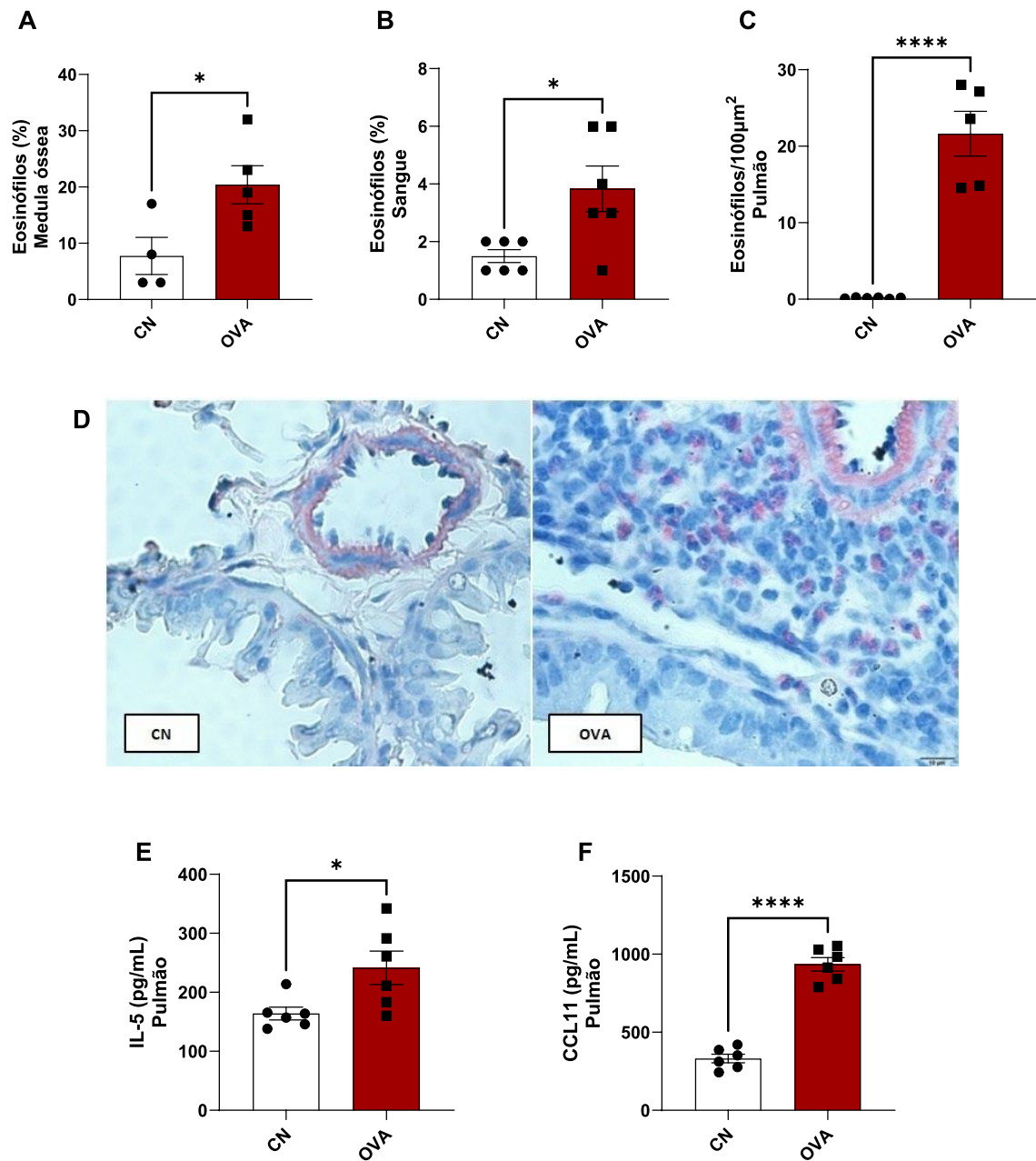


Figura 9: Confirmação da indução da alergia pulmonar. Percentual de eosinófilos na medula óssea (A) e no sangue (B), ambos corados com panótipo rápido. Contagem de eosinófilos no tecido pulmonar corados com SíriusRed (C) e imagem representativa de cada grupo (D). Níveis de IL-5 (E) e CCL11(F) no homogenato do pulmão. Os dados foram analisados através de teste *t* de Student, **p* < 0,05, ****p* < 0,001, *****p* < 0,0001, e expressos como média +/- EPM, ns – não significativo. n = 4-6.

4.1.2. Alergia pulmonar aumenta o valor de plaquetas no sangue e no pulmão e causa maior ativação plaquetária no sangue

Como já foi documentado, há aumento na contagem sanguínea de plaquetas durante exacerbações da asma (SAGMEN, 2020). Dessa forma, realizou-se a avaliação quantitativa de plaquetas no sangue total, utilizando o método de BrecherCronkite (RAMIREZ-UBILLUS *et al.*, 2020), bem como sua ativação através da expressão da molécula de adesão P-selectina (CD62P) por CF. No pulmão, o número de plaquetas foi obtido através da razão entre plaquetas e leucócitos. As análises das estratégias de *gating* para seleção das populações estão representadas nas Figuras 10A para o sangue e 10B para o pulmão.

Com base nos dados obtidos, verificou-se que o grupo OVA apresentou aumento significativo na contagem de plaquetas no sangue em comparação ao grupo CN (Fig. 10D), bem como maior frequência dessas células ativadas (Fig. 10E) sem que houvesse alteração na concentração de leucócitos totais nesse compartimento (Fig. 10C). Já no pulmão, observou-se maior valor absoluto de leucócitos totais (Fig. 10F) e de plaquetas totais (Fig. 10G), mas não de plaquetas livres (Fig. 10H). Em relação a ativação de plaquetas no pulmão, decidiu-se não realizar essa análise pelo viés do processo de digestão do tecido para obtenção da suspensão celular, processo que poderia interferir no resultado.

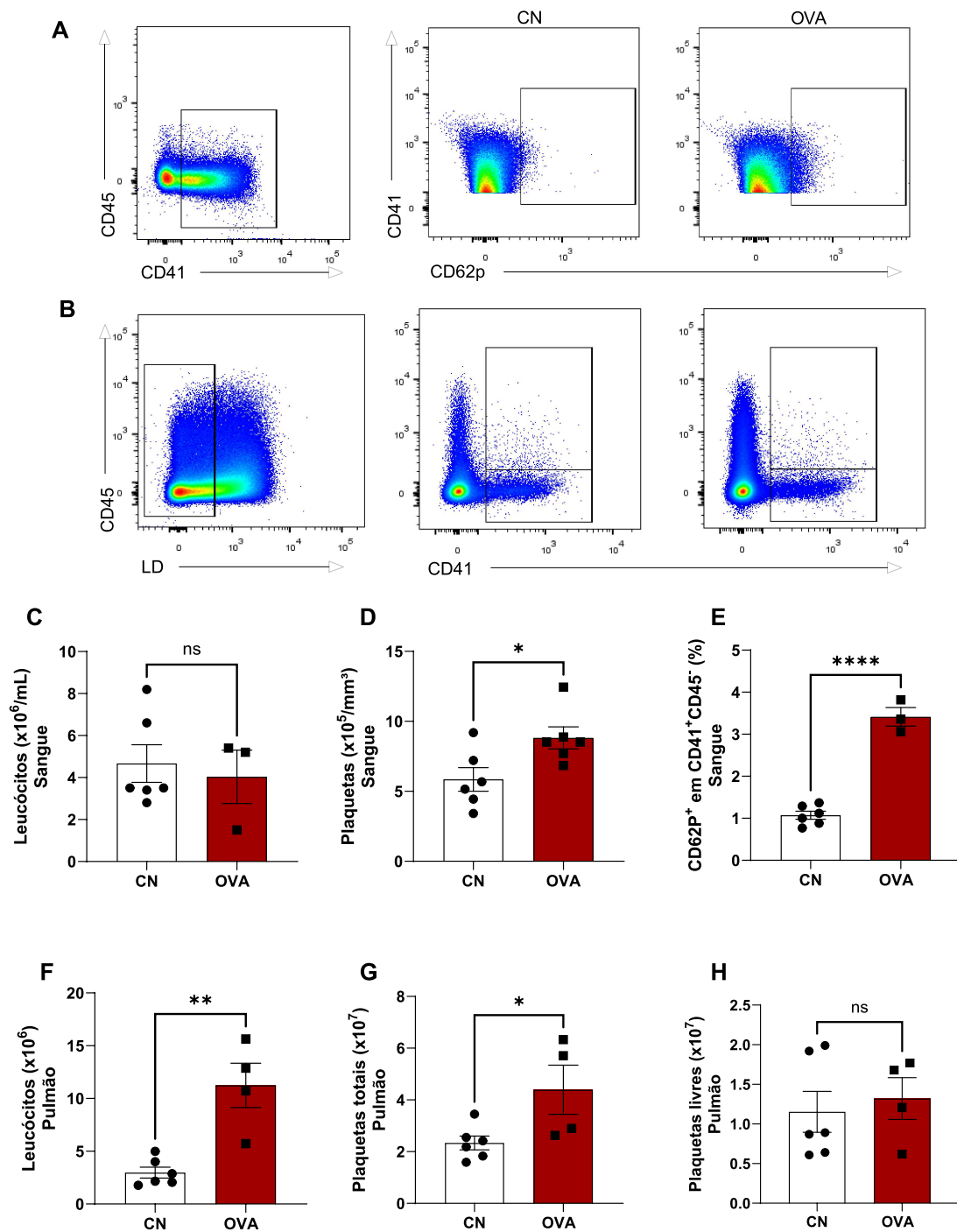


Figura 10: Contagem de células e ativação plaquetária. Estratégias de *gating* para população duplo positiva CD41⁺CD62P⁺ para ativação plaquetária no sangue a partir de eventos CD41⁺CD45⁺ (A), e para plaquetas totais e livres no pulmão a partir de células vivas (B). Concentração de leucócitos (C), contagem de plaquetas (D) e ativação plaquetária pela expressão de CD62P (E) no sangue total. Valores absolutos de leucócitos (F), plaquetas totais (G) e plaquetas livres (H) no pulmão. Os dados foram analisados através de teste *t* de Student, **p* < 0,05, ***p* < 0,01, *****p* < 0,0001, e expressos como média +/- EPM, ns – não significativo. n = 4-6.

4.1.3. Alergia pulmonar favorece o aumento da formação de agregados plaquetas-leucócitos no pulmão, mas não no baço

Com o intuito de verificar se as plaquetas estavam formando agregados com leucócitos no contexto da alergia pulmonar experimental, foi realizada a técnica de CF no sangue, baço e pulmão. As populações de leucócitos foram identificadas pelo marcador pan-leucocitário CD45, expresso na membrana das células da linhagem hematopoiética, e as plaquetas pela expressão da proteína CD41, também conhecida como GPIIb (glicoproteína IIb), expressa na superfície de plaquetas e megacariócitos, sendo considerada a dupla positividade ($CD45^+CD41^+$) como indicativa da formação de agregados plaqueta-leucócito (EICHHORN *et al.*, 2023). Na figura 11A, observa-se a estratégia de *gating* para seleção da população $CD45^+CD41^+$ no pulmão, também representativa para o baço.

Através dos dados obtidos, observou-se que não houve alteração na frequência de leucócitos totais (Fig. 11B) e de agregados plaquetas-leucócitos (Fig. 11D) no pulmão no grupo OVA quando comparado ao CN. Como nesse órgão ocorre intenso infiltrado inflamatório na alergia aumentando seu valor absoluto de células, fez-se necessário realizar os cálculos dos seus respectivos valores absolutos a partir das frequências obtidas por CF. Sendo assim, foi possível verificar aumento significativo de leucócitos totais (Fig. 11C), bem como de agregados com plaquetas (Fig. 11E) no grupo OVA. Já no baço, não houve alteração no número celular entre os grupos OVA e CN (Fig. 11F). Logo, as análises de frequência das populações nesse órgão são representativas. Observou-se redução significativa na frequência de leucócitos totais ($CD45^+$) no grupo OVA em comparação ao CN (Fig. 11G). Por outro lado, a formação de agregados $CD45^+CD41^+$ não apresentou alteração significativa (Fig. 11H).

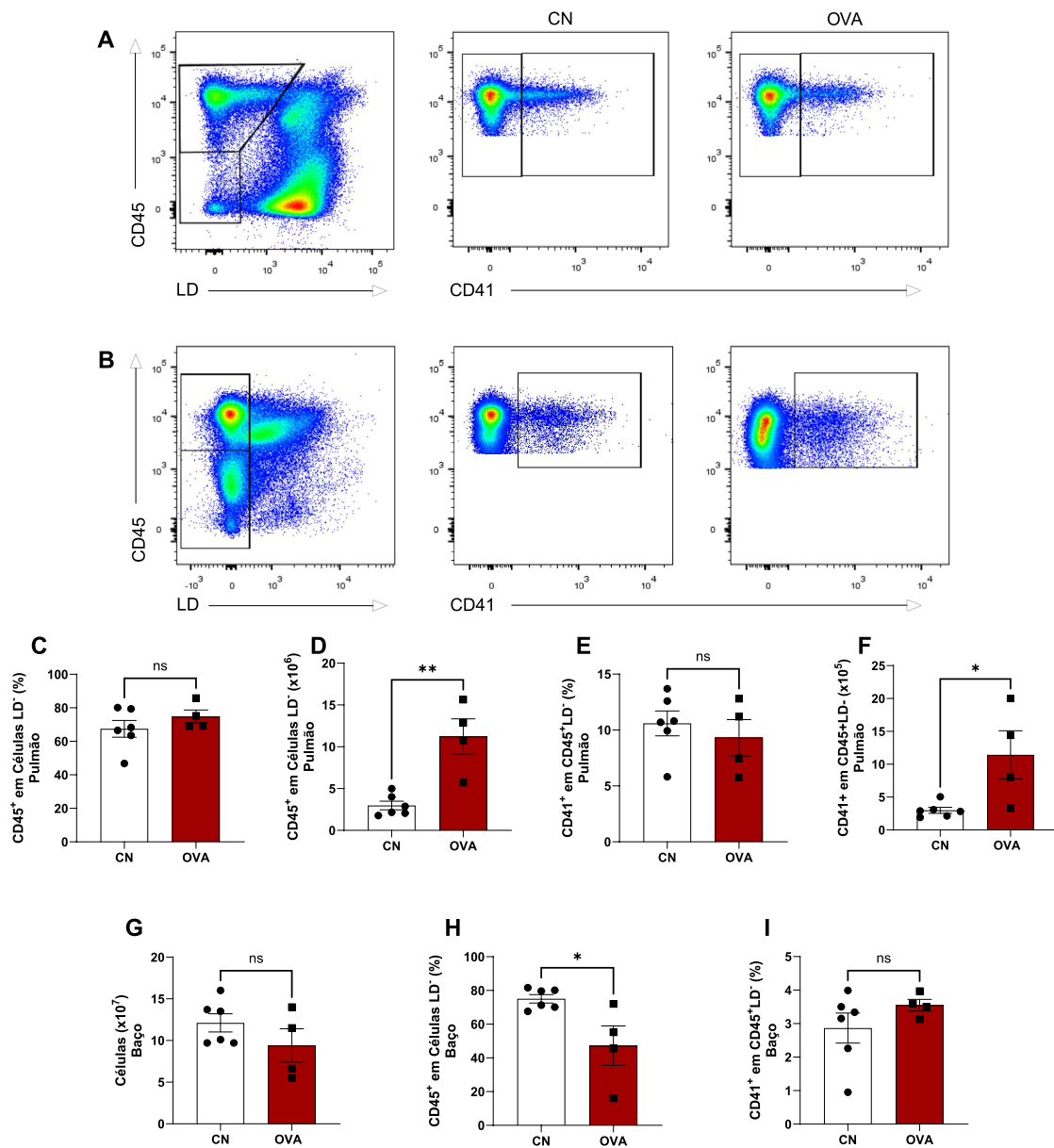


Figura 11: Avaliação de leucócitos CD45⁺ e agregados com CD41⁺. Estratégias de *gating* para seleção da população CD45⁺CD41⁺ no pulmão (A) e no baço (B) a partir da população CD45⁺LD⁻. Frequência (C) e valor absoluto (D) de leucócitos totais (CD45⁺) no pulmão. Frequência (E) e valor absoluto (F) de agregados CD45⁺CD41⁺ no pulmão. Valor absoluto de células (G) e frequências de leucócitos totais (H) e de agregados CD45⁺CD41⁺ (I) no baço. Os dados foram analisados através de teste *t* de Student, **p* < 0,05, ***p* < 0,01, e expressos como média +/- EPM, ns - não significativo. n = 4-6.

4.1.4. Alergia pulmonar promove maior formação de agregados plaquetas-eosinófilos e plaquetas-macrófagos alveolares no pulmão

Diante da eosinofilia observada em diferentes compartimentos, avaliou-se a frequência de eosinófilos (Siglec-F⁺CD11b⁺) e a formação de agregados com plaquetas (Siglec-F⁺CD11b⁺CD41⁺) no pulmão. A seleção das populações foi realizada conforme representada na Figura 12A, sequência das estratégias de *gating* mostradas na sessão anterior(4.1.3).

Através dos dados obtidos, observou-se maiores frequência (Fig.12B) e valor absoluto (Fig. 12C) de eosinófilos no grupo OVA em comparação ao grupo controle (CN). A frequência de eosinófilos formando agregados com plaquetas não apresentou alteração significativa(Fig.12D), mas houve aumento significativo pela análise em valores absolutos dessa população (Fig. 12E).

Além dos eosinófilos, os macrófagos alveolares, identificados como Siglec-F⁺CD11b⁻, também foram analisados por seu papel na homeostase e na resposta pulmonar (TEE *et al.*, 2023). Houve redução significativa dessa população no grupo OVA em termos de frequência (Fig. 12F) e aumento na análise de valor absoluto (Fig. 12G), porém com aumento na formação de agregados com plaquetas (Siglec-F⁺CD11b⁻CD41⁺) comparados ao grupo CN nas duas formas de análise (Fig.12H, 12I).

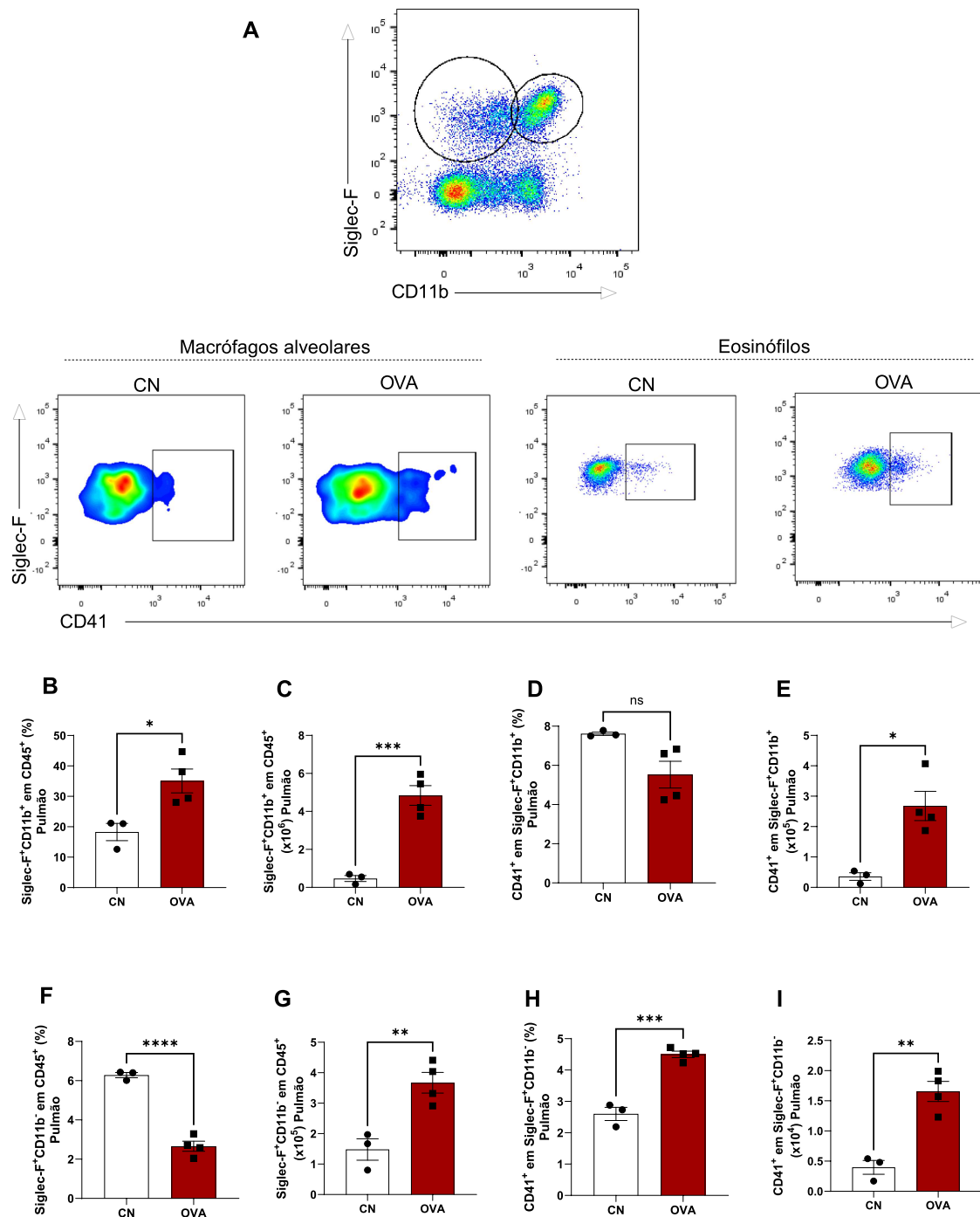


Figura 12: Avaliação de eosinófilos Siglec-F⁺CD11b⁺ e macrófagos alveolares Siglec-F⁺CD11b⁺ e formação de agregados com CD41⁺. Estratégias de *gating* para seleção das populações de eosinófilos (Siglec-F⁺CD11b⁺) e macrófagos alveolares (Siglec-F⁺CD11b⁻) e os agregados Siglec-F⁺CD11b⁺CD41⁺ e Siglec-F⁺CD11b⁻CD41⁺, respectivamente (A). Frequências (B,D) e valores absolutos (C,E) de Siglec-F⁺CD11b⁺ na população de CD45⁺ e de agregados Siglec-F⁺CD11b⁺CD41⁺ na população de eosinófilos do pulmão, respectivamente. Frequências (F,H) e valores absolutos (G,I) de Siglec-F⁺CD11b⁻ na população de CD45⁺ e de agregados Siglec-F⁺CD11b⁻CD41⁺ na população de macrófagos alveolares, respectivamente. Os dados foram analisados através de teste *t* de Student, **p* < 0,05, ***p* < 0,01, ****p* < 0,001, *****p* < 0,0001, e expressos como média +/- EPM, ns – não significativo. *n* = 3-5.

4.1.5. Alergia pulmonar promove aumento de IgE na interação plaquetas-leucócitos

Como foi visto anteriormente, a formação de agregados plaquetas-leucócitos ocorre em diferentes compartimentos. Como na asma ocorre níveis aumentados de IgE (RICCIARDOLO et al., 2021) e plaquetas apresentam seu receptor de alta afinidade (PITCHFORD et al., 2008), decidiu-se analisar a presença de IgE na superfície de agregados leucócitos-plaquetas ($CD45^+CD41^+$), assim como em leucócitos livres de plaquetas ($CD45^+CD41^-$). Na Figura 13A, pode-se observar as estratégias de *gating* pelos quais essas populações foram selecionadas.

Ao avaliar os dados obtidos, verificou-se aumento da frequência de células apresentando IgE em suas superfícies na população de agregados leucócitos-plaquetas (Fig. 13B) e também a intensidade de fluorescência (MFI) dessa imunoglobulina na mesma população de análise (Fig. 13C). Já na população de leucócitos livres de plaquetas, observou-se aumento da frequência de células com a presença de IgE em suas superfícies (Fig. 13D), mas com redução da expressão desse marcador (MFI) (Fig. 13E) na população de interesse.

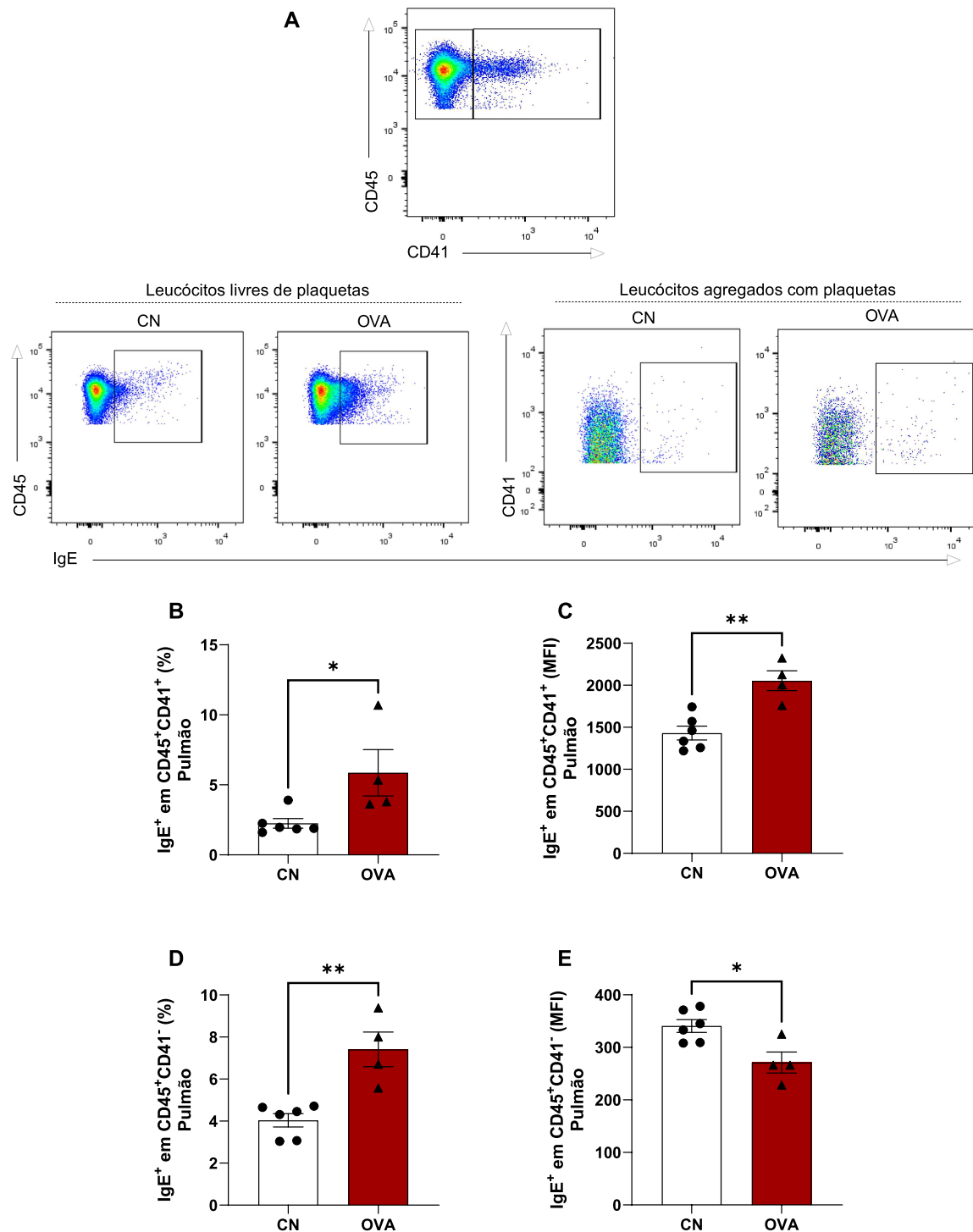
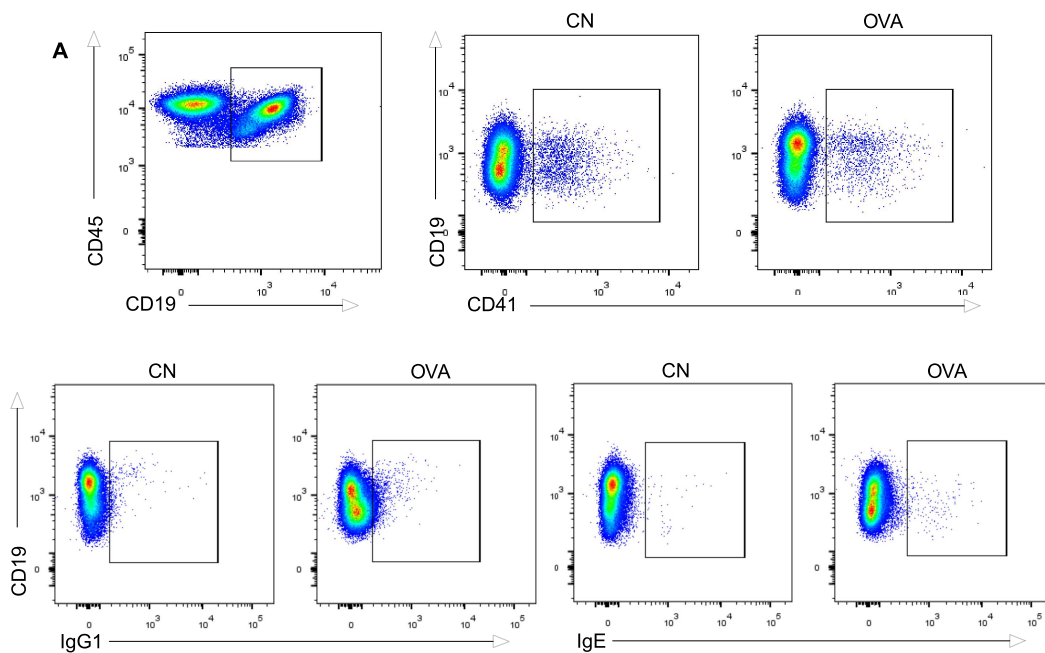


Figura 13: Avaliação de leucócitos CD45⁺LD⁻ agregados ou não à plaquetas CD41⁺ com a presença de IgE em suas superfícies. Estratégias de *gating* para seleção das populações de leucócitos negativos para plaquetas (CD45⁺CD41⁻) e agregados com plaquetas (CD45⁺CD41⁺) ambas com IgE na superfície celular (A). Frequência (B) e MFI (C) de agregados plaquetas-leucócitos com IgE na população de CD45⁺CD41⁺. Frequência (D) e MFI (E) de leucócitos livre de plaquetas expressando IgE na população de CD45⁺CD41⁻. Os dados foram analisados através de teste *t* de Student, **p* < 0,05, ***p* < 0,01, e expressos como média +/- EPM, ns - não significativo. n = 4-6.

4.1.6. Alergia pulmonar gera alterações nas subpopulações de linfócitos B

Como os agregados plaquetas-leucócitos apresentam maior expressão de IgE e devido à forte participação dos linfócitos B (LB) na resposta alérgica pulmonar (SATITSUKSANO *et al.*, 2023), avaliou-se a população $CD19^+$, com foco nas populações de LB IgE^+ e $IgG1^+$, além da formação de agregados com plaquetas. Na Figura 14A, pode-se observar a estratégia de seleção dessas populações.

Através dos dados obtidos, observou-se que não houve alteração na frequência da população de $CD19^+$ no baço (Fig. 14B) e no pulmão (Fig. 14F) ao comparar os grupos CN e OVA, bem como na formação de agregados com plaquetas (Fig. 14C, 14G). Contudo, análises mais específicas revelaram alterações importantes: no baço, houve aumento significativo nas frequências de $CD19^+IgG1^+$ (Fig. 14D) e $CD19^+IgE^+$ (Fig. 14E) e, no pulmão, observou-se um aumento da frequência de $CD19^+IgG1^+$ (Fig. 14H) e uma redução de $CD19^+IgE^+$ (Fig. 14I). Não foi possível analisar a formação de agregados $CD41^+$ com as populações de $CD19^+IgG1^+$ e $CD19^+IgE^+$, provavelmente pela baixa frequência dessas células nos compartimentos em questão e/ou pela quantidade insuficiente de eventos adquiridos no citômetro.



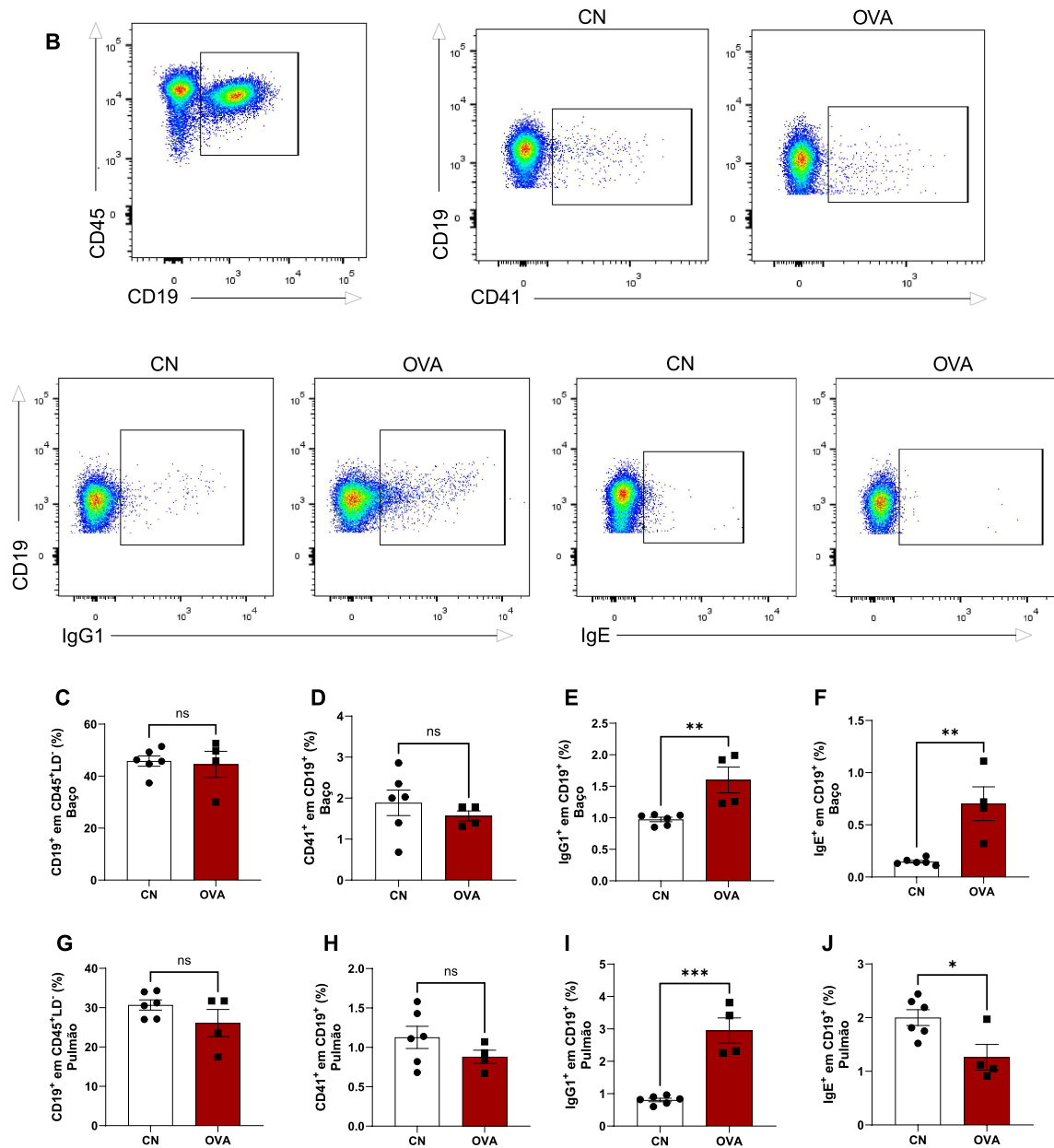


Figura 14: Avaliação de Linfócitos B CD19⁺ agregados com CD41⁺ e suas subpopulações. Estratégias de *gating* para seleção das populações de linfócitos B CD19⁺ agregados com CD41, expressando IgG1 ou IgE no baço (A) e no pulmão (B). Frequências da população CD19⁺ na população de CD45⁺LD⁻ do baço (C) e do pulmão (G). Frequências de agregados CD19⁺CD41⁺ na população de CD19⁺ do baço (D) e do pulmão (H). Frequências de LB IgG1⁺ (E, I) e IgE⁺ (F, J) na população de CD19⁺ do baço e do pulmão, respectivamente. Os dados foram analisados através de teste de Student, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, e expressos como média $\pm$ EPM, ns – não significativo. $n = 4-6$.

4.2.Avaliação do papel das plaquetas no modelo de asma

4.2.1. Depleção de plaquetas

Com o objetivo de investigar o papel das plaquetas na resposta imune durante a asma alérgica experimental, os animais foram tratados com o anticorpo anti-CD41 para promover sua depleção. Inicialmente, a eficácia desse tratamento foi avaliada por análises hematológicas, incluindo contagem de plaquetas, percentual do volume sanguíneo ocupado por plaquetas (PCT), volume plaquetário médio (MPV), percentual de plaquetas grandes (P-LCR) e níveis séricos de PF4. Outros parâmetros hematológicos estão nos Anexos I e II.

4.2.1.1. Depleção plaquetária com anti-CD41 promove redução da contagem de plaquetas e de parâmetros associados em animais sensibilizados com OVA

Para confirmar a depleção temporária de plaquetas, os níveis plaquetários foram avaliados 24h após a administração do anti-CD41, ponto escolhido por anteceder as sensibilizações e os desafios com OVA. Os resultados demonstraram uma redução significativa na contagem de plaquetas, indicando que o protocolo foi eficaz em promover a depleção antes do contato com o alérgeno (Fig. 15A).

Após a última sensibilização, as plaquetas foram novamente quantificadas, correspondendo a 48h após tratamento. Observou-se redução significativa no número de plaquetas (Fig. 15B) e no PCT (Fig. 15C) no grupo SENS-T, em comparação ao grupo SENS. Além da quantidade de plaquetas, foi avaliado o tamanho dessas células, parâmetro que pode indicar alterações funcionais induzidas pelo tratamento. Houve aumento significativo do MPV no grupo SENS-T em relação ao grupo SENS (Fig. 15D), com tendência de aumento do P-LCR (Fig. 15E). Por fim, avaliou-se a ativação plaquetária por meio da dosagem de PF4, quimiocina armazenada em grânulos α , e seus níveis plasmáticos não diferiram significativamente entre SENS e SENS-T (Fig. 15F).

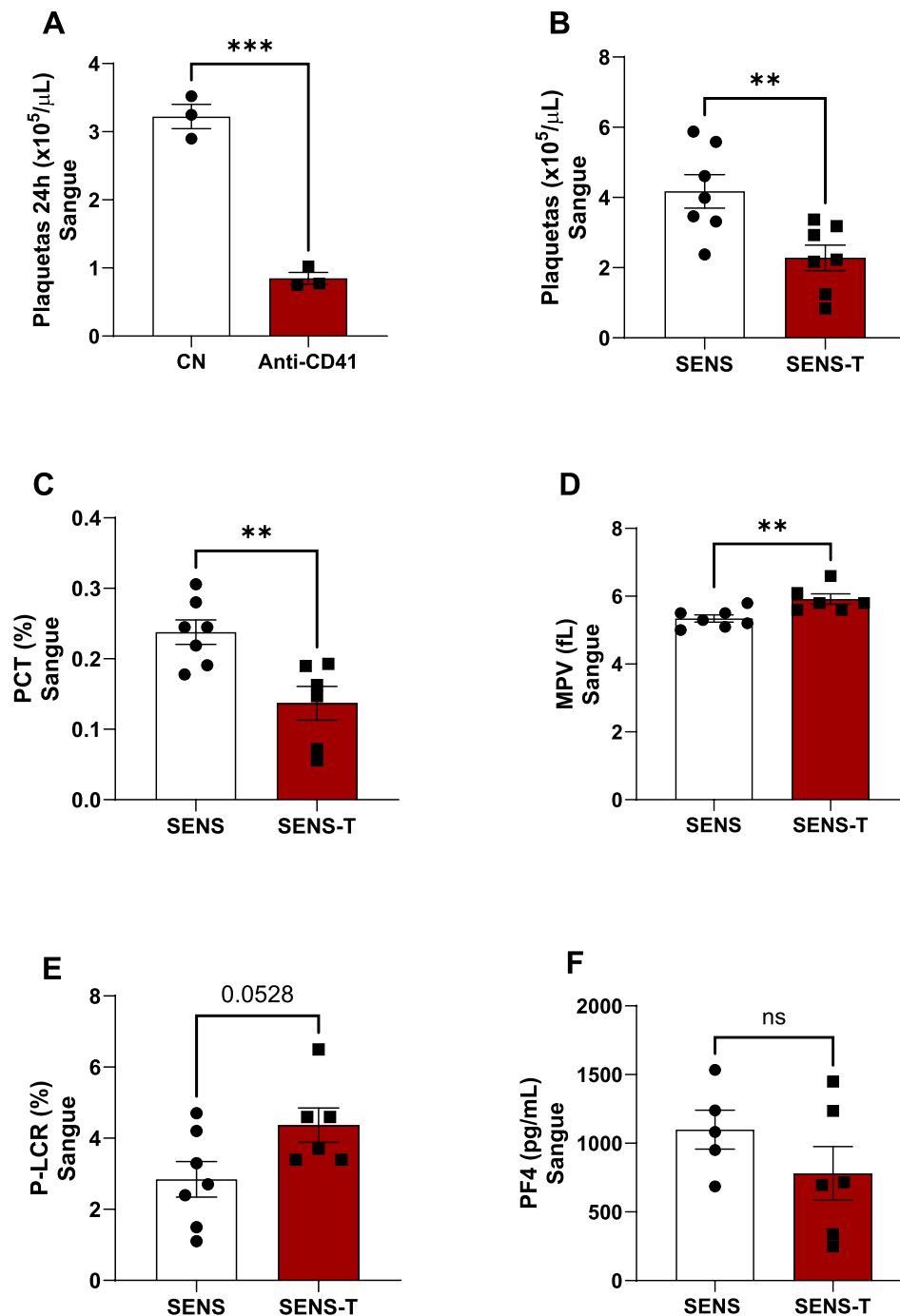


Figura 15: Depleção plaquetária em animais sensibilizados com OVA. Contagem de plaquetas no sangue 24h após tratamento com anti-CD41 (A) e 48h após segunda aplicação do tratamento com anti-CD41 em animais sensibilizados com OVA (B). Valores de PCT (C), MPV (D) e P-LCR (E), e níveis de PF4 (F) no sangue 48h após segunda aplicação do tratamento com anti-CD41 em animais sensibilizados com OVA. Os dados foram analisados através de teste *t* de Student, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, e expressos como média $\pm$ EPM, ns – não significativo. $n = 3-7$.

4.2.1.2. Depleção plaquetária com anti-CD41 promove alterações em parâmetros plaquetários de animais sensibilizados e desafiados com OVA

As análises anteriores também foram realizadas em animais submetidos ao protocolo completo de indução da asma, com o tratamento com anti-CD41 administrado de duas formas distintas: 24h antes de cada sensibilização (OVA-ST) ou 24h antes e após o primeiro desafio com OVA (OVA-DT), com as análises realizadas 24h após o último desafio. Com esses dados, observou-se aumento significativo tanto na contagem de plaquetas (Fig. 16A) quanto nos valores de PCT (Fig. 16B) nos grupos alérgicos, sem que o tratamento com anti-CD41 promovesse alterações nesses parâmetros no ponto de análise. Em relação ao tamanho das plaquetas não houve diferença significativa nas análises de MPV (Fig. 16C) e P-LCR (Fig. 16D) entre o grupo OVA e o CN, mas foi seguido de aumento no grupo alérgico tratado na fase de desafio (OVA-DT). De modo contrário, os níveis de PF4 apresentaram aumento na alergia (OVA), seguido de redução no grupo OVA-DT (Fig. 16E).

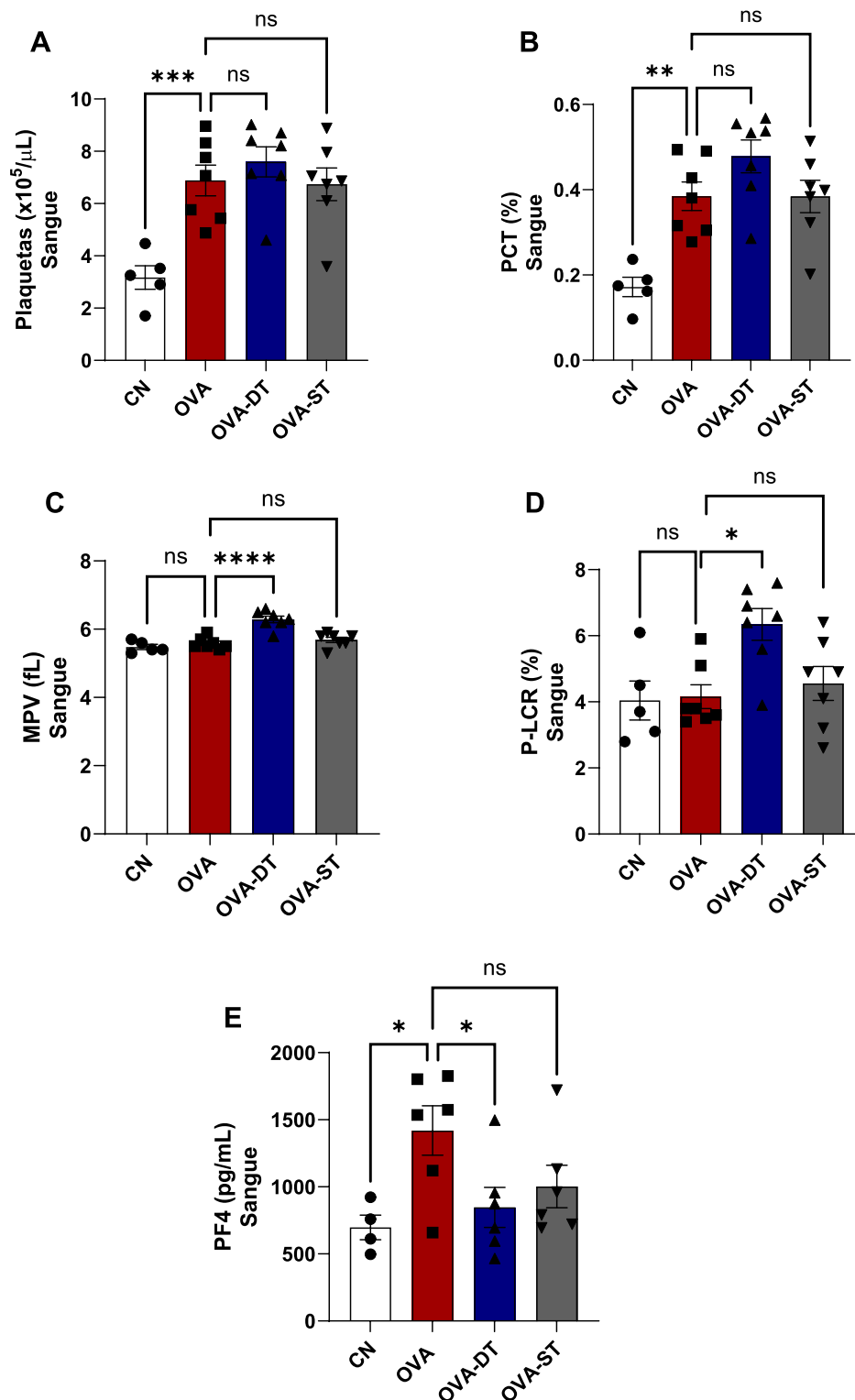
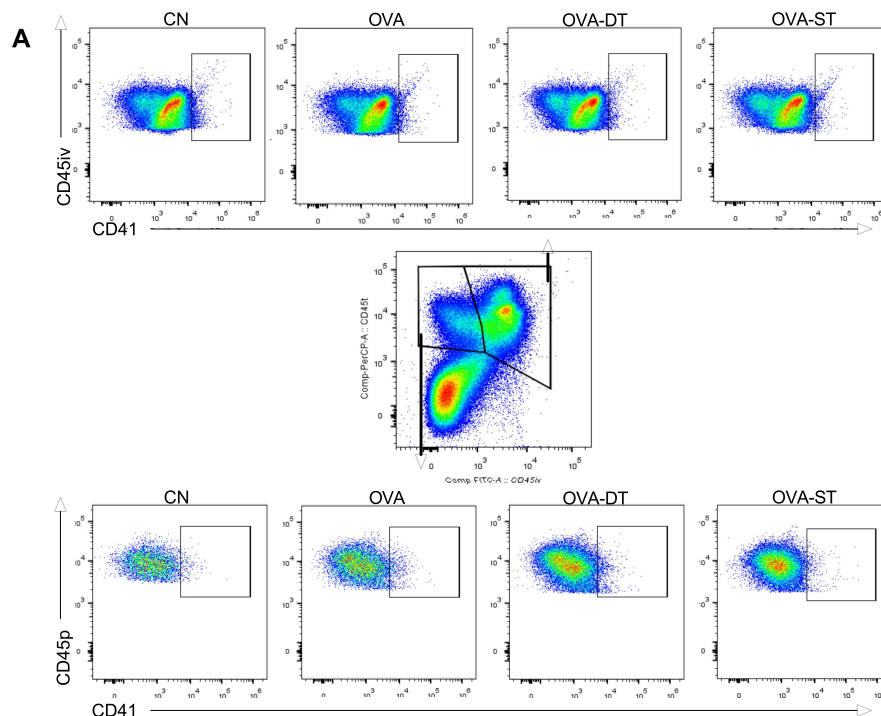


Figura 16: Depleção plaquetária em animais sensibilizados e desafiados com OVA. Contagem de plaquetas 24h após último desafio com OVA (A). Valores de PCT (B), MPV (C) e P-LCR (D), e níveis de PF4 (E) 24h após último desafio com OVA. Os dados foram analisados por ANOVA, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$, e expressos como média $\pm$ EPM, ns - não significativo. $n = 5-7$.

4.2.2. Tratamento com anti-CD41 reduz a formação de agregados plaquetas-leucócitos no parênquima pulmonar de animais alérgicos

Para discriminar os leucócitos do parênquima pulmonar daqueles presentes na vasculatura, utilizou-se a estratégia de administração de dois anticorpos anti-CD45 com fluorocromos e modos de aplicação distintos: o CD45iv, administrado por via retro-orbital dois minutos antes da eutanásia, marcando leucócitos presentes na circulação pulmonar; e o CD45t, aplicado diretamente na suspensão celular obtida após o processamento do pulmão. Com isso, foi possível diferenciar a população de leucócitos no parênquima (CD45p⁺), obtida pela subtração de CD45iv da CD45t, das populações localizadas na vasculatura (Fig. 17A).

No pulmão, houve aumento do percentual da população CD45⁺ no parênquima (Fig. 17B) e redução na vasculatura (Fig. 17E), sem alterações significativas nos grupos tratados. Porém, ao analisar os valores absolutos dessas populações, observou-se aumento de leucócitos no grupo OVA nos dois compartimentos, seguido de redução no grupo alérgico tratado durante os desafios (OVA-DT) (Fig. 17C, 17F). Em relação à formação de agregados plaquetas-leucócitos, observou-se redução em termos de frequência nos grupos tratados (OVA-DT e OVS-ST) apenas no parênquima pulmonar (Fig. 17D, 17G).



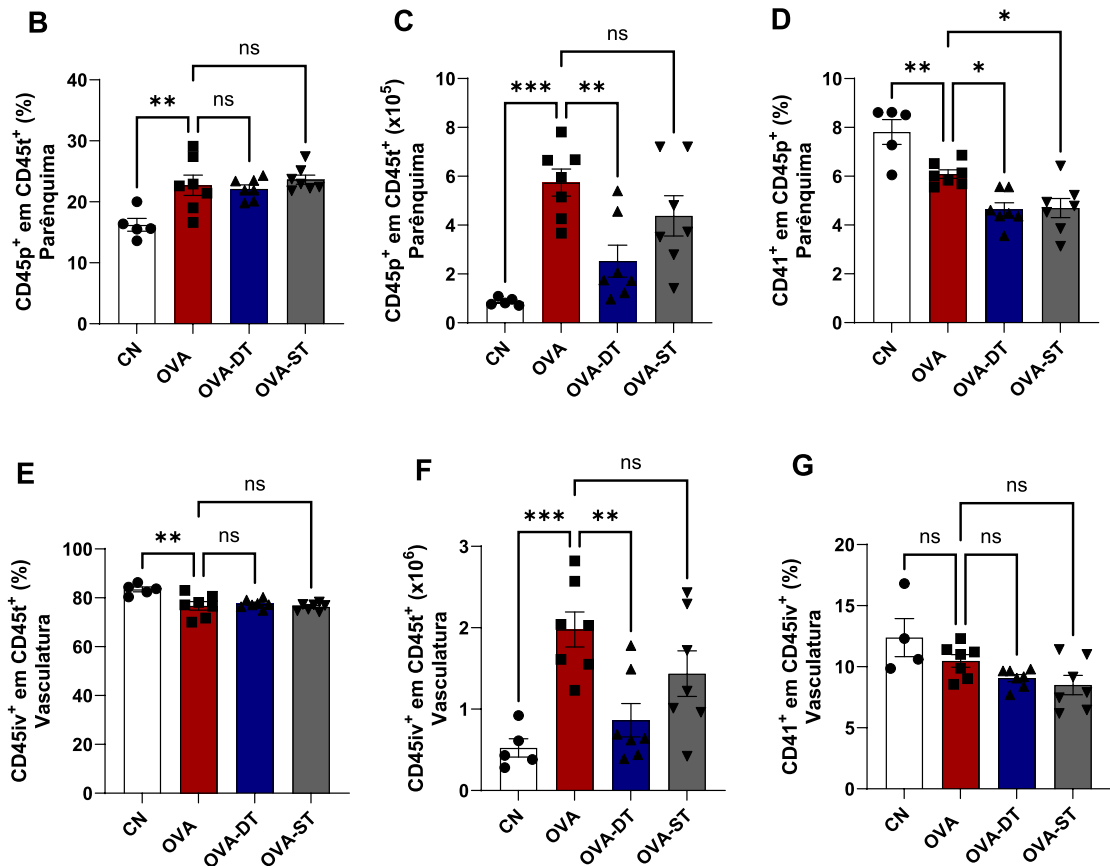


Figura 17: Discriminação das populações de leucócitos no parênquima e na vascularura pulmonar. Estratégia de *gating* da separação dos leucócitos do parênquima pulmonar (CD45p⁺) daqueles presentes na vascularura (CD45p⁺CD45iv⁺) e formação de agregados com CD41⁺ (A). Frequência (B) e valor absoluto (C) de leucócitos (CD45⁺), e frequência de agregados com CD41⁺ (D) no parênquima pulmonar. Frequência (E) e valor absoluto (F) de leucócitos, e frequência de agregados com CD41⁺ (G) na vascularura pulmonar. Os dados foram analisados através por ANOVA, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, e expressos como média $\pm$ EPM, ns - não significativo. n = 5-7.

4.2.3. Efeitos do tratamento com anti-CD41 sobre a eosinofilia sistêmica e local

A partir dos dados obtidos até o momento, decidiu-se avaliar se o tratamento com anti-CD41 estaria afetando a produção de células na medula óssea, particularmente de eosinófilos. Nos dados de valor absoluto de células, observou-se redução desse parâmetro na medula óssea de animais apenas sensibilizados e tratados (Fig. 18A), enquanto, em animais sensibilizados e desafiados, houve alteração apenas no grupo OVA-ST, com aumento significativo quando comparado ao OVA (Fig. 18D). Além disso, avaliou-se a eosinofilia sistêmica e local.

4.2.3.1. Depleção plaquetária com anti-CD41 causa redução na produção de eosinófilos na medula óssea e no infiltrado eosinofílico pulmonar dependente da fase do tratamento

Ao avaliar os efeitos do tratamento com anti-CD41 sobre a inflamação eosinofílica nos três compartimentos, observou-se que o percentual de eosinófilos permaneceu inalterado na medula óssea (Fig. 18B) e no sangue (Fig. 18C) ao comparar os grupos SENS e SENS-T. Já nos animais sensibilizados e desafiados com OVA, houve aumento significativo de eosinófilos tanto na medula óssea (Fig. 18E) quanto no sangue (Fig. 18F) em comparação ao grupo CN. Entre os grupos alérgicos tratados, observou-se redução no grupo OVA-DT na medula óssea (Fig. 18E) e no grupo OVA-ST no sangue (Fig. 18F), ambos em comparação ao grupo OVA. Somado a isso, a contagem de eosinófilos no tecido pulmonar mostrou aumento dessas células no grupo OVA quando comparado ao CN, seguida de redução pelo tratamento realizados nas fases de desafios (OVA-DT) (Fig. 18G). Na figura 18H, pode-se observar a alteração no infiltrado eosinofílico pulmonar devido ao tratamento com anti-CD41.

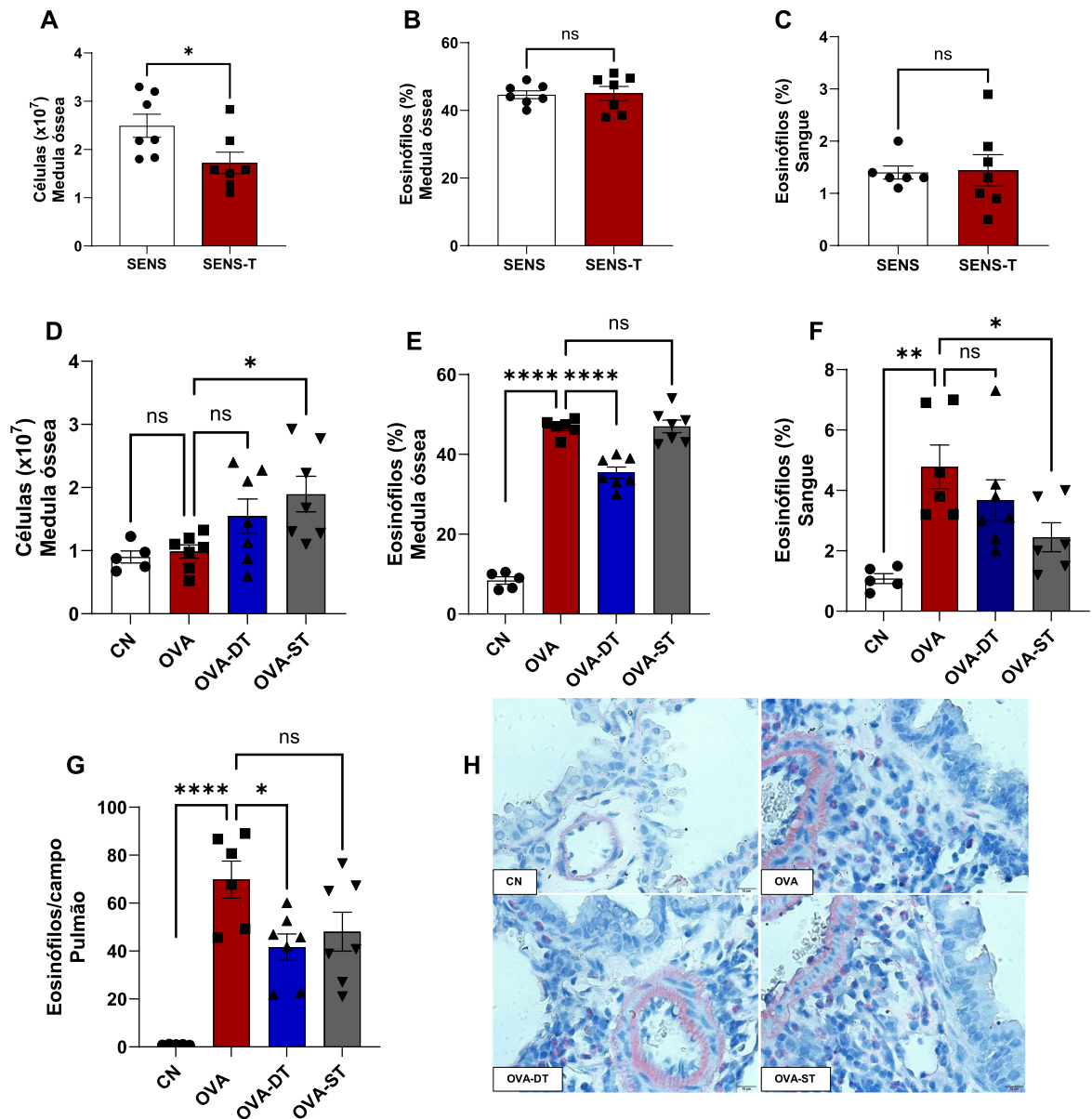


Figura 18: Número de eosinófilos em diferentes compartimentos de animais tratados com anti-CD41. Contagem de células na medula óssea em animais apenas sensibilizados (A) e sensibilizados e desafiados com OVA (D). Percentual de eosinófilos na medula óssea (B) e no sangue (C) de animais sensibilizados com OVA. Frequência de eosinófilos na medula óssea (E) e no sangue (F) de animais sensibilizados e desafiados com OVA. Contagem de eosinófilos no tecido pulmonar pela coloração Sirius-Red (G) e imagem representativa de cada grupo experimental H). As comparações entre dois grupos foram feitas pelo teste *t* de Student, e entre mais de dois grupos por ANOVA. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,0001$, e expressos como média $\pm$ EPM, ns - não significativo. $n = 5-7$.

4.2.3.2. Tratamento com anti-CD41 acarreta redução de agregados plaquetas-eosinófilos pulmonares intra e extravasculares em animais com alergia pulmonar

Como houve alteração na contagem de eosinófilos em diferentes compartimentos, o próximo passo foi verificar se o tratamento com anti-CD41 afetaria a formação de agregados plaquetas com essas células, representados pela população Siglec-F⁺CD11b⁺CD41⁺. Além disso, através da marcação com anti-CD45iv (intravenoso), pôde-se distinguir agregados plaquetas-eosinófilos da vasculatura e do parênquima. Na Figura 19A, pode-se verificar as estratégias de seleção dessas populações.

Na análise por CF, os resultados encontrados foram semelhantes nos compartimentos parenquimatoso (Fig. 19B, 19C) e vascular (Fig. 19F, 19G). Em ambos, verificou-se aumento na frequência de células Siglec-F⁺CD11b⁺ no grupo OVA em comparação ao CN, sem ocorrer alterações com o tratamento em termos percentuais (Fig. 19B, 19F), mas com redução do valor absoluto dessas células no grupo tratado durante os desafios (OVA-DT) (Fig. 19C, 19G). Já nas análises de agregados com CD41, o grupo OVA não apresentou diferença significativa comparado ao CN na frequência dessa população no parênquima (Fig. 18D) e na vasculatura (Fig. 19H), mas com redução nos grupos tratados. No valor absoluto de agregados, houve aumento significativo durante a alergia (OVA), seguido de redução consequente do tratamento nos dois compartimentos (Fig. 19E, 19I).

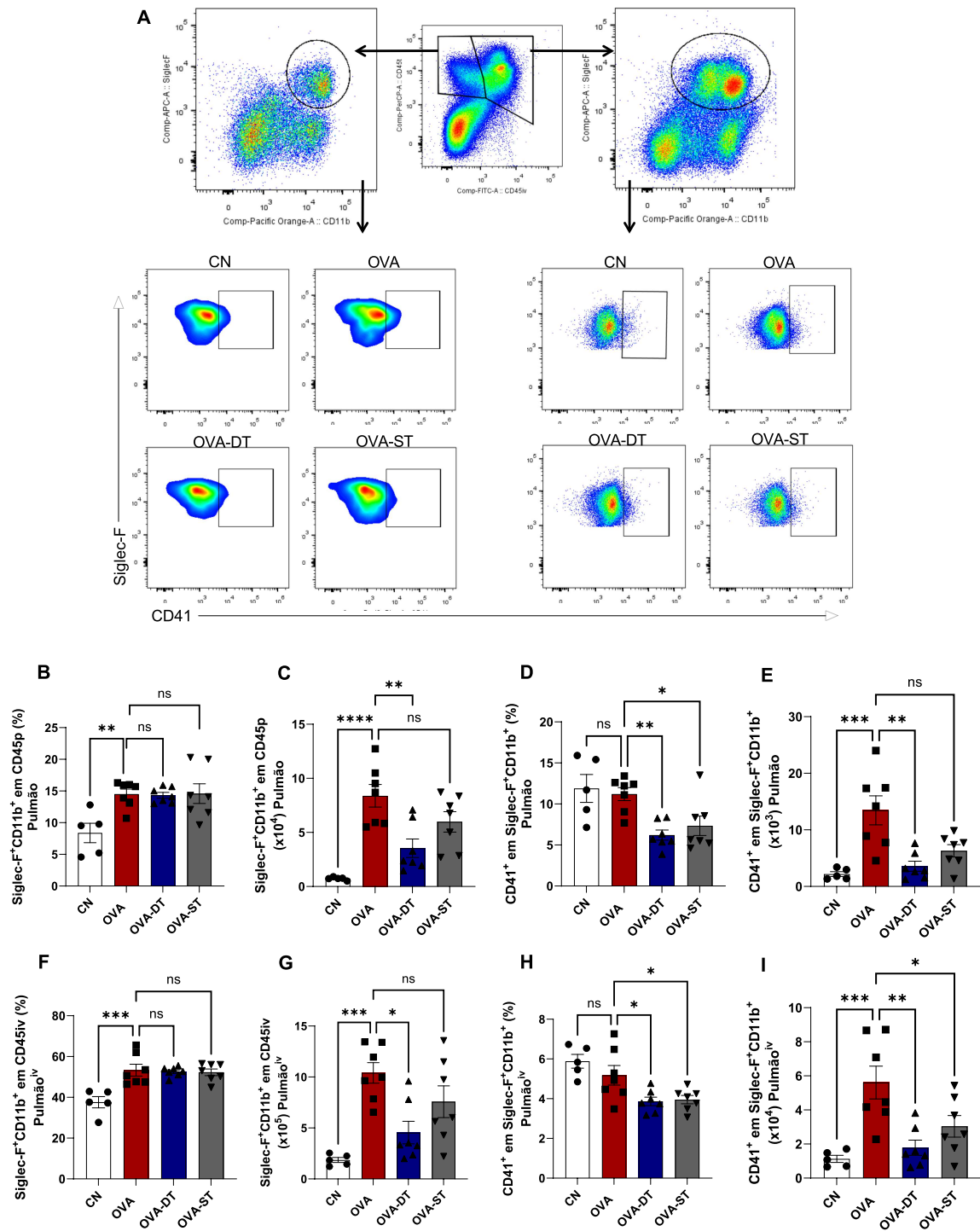


Figura 19: Avaliação da população Siglec-F⁺CD11b⁺ e agregados Siglec-F⁺CD11b⁺CD41⁺ no pulmão de animais sensibilizados e desafiados com OVA. Estratégias de *gating* para seleção das populações Siglec-F⁺CD11b⁺ e agregados com CD41⁺ intra e extravasculares (A). Frequências (B,D) e valores absolutos (C,E) de Siglec-F⁺CD11b⁺ na população total de leucócitos no parênquima (CD45^p) e agregados com CD41⁺, respectivamente. Frequências (F,H) e valores absolutos (G,I) de células Siglec-F⁺CD11b⁺ na população total de leucócitos na vasculatura (CD45^{iv}) e agregados com CD41⁺, respectivamente. Os dados foram analisados por ANOVA, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$, e expressos como média $\pm$ EPM, ns - não significativo. $n = 5-7$.

4.2.3.3. Tratamento com anti-CD41 ocasiona redução de agregados plaquetas-macrófagos alveolares em animais com alergia pulmonar

Considerando a localização tecidual e os dados obtidos, a população Siglec-F⁺CD11b⁻, representativa de macrófagos alveolares, também foi avaliada em animais tratados com anti-CD41. A estratégia de seleção das populações foi detalhada na Figura 20A. A partir dos dados obtidos, observou-se aumento dessa população no grupo OVA em comparação ao grupo CN tanto na análise de frequência (Fig. 20B) quanto de valores absolutos (Fig. 20C), seguido de redução nos grupos tratados com anti-CD41 quando comparados ao grupo OVA. No entanto, não foram observadas diferenças na formação de agregados com plaquetas nas comparações realizadas em termos de frequência (Fig. 20D), mas houve aumento em OVA e redução com o tratamento (OVA-DT e OVA-ST) após realização do cálculo dos valores absolutos de agregados (Fig. 20E).

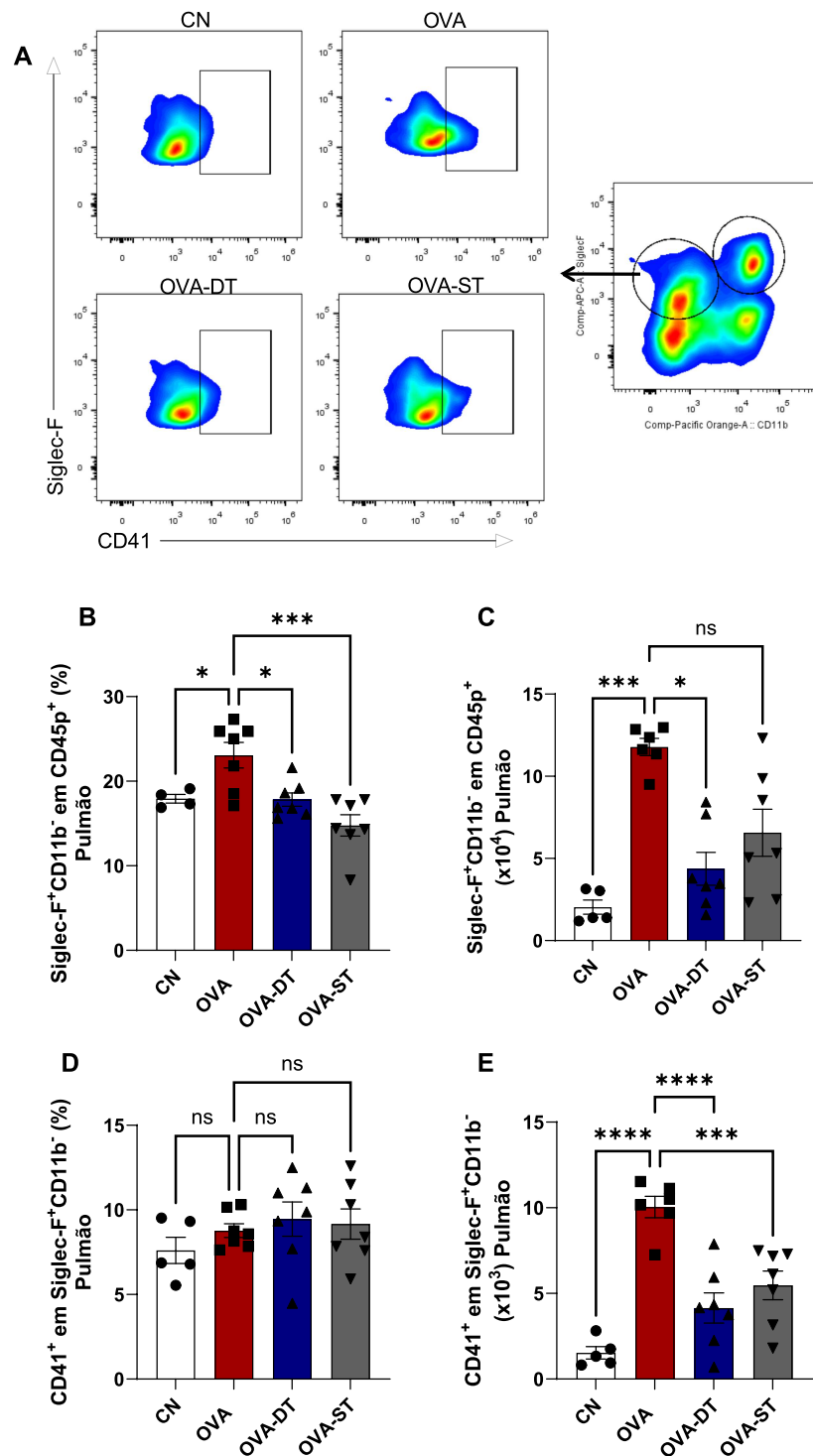


Figura 20: Avaliação da população Siglec-F⁺CD11b⁻ e agregados Siglec-F⁺CD11b⁻CD41⁺ no pulmão de animais sensibilizados e desafiados com OVA. Estratégias de *gating* para seleção das populações Siglec-F⁺CD11b⁻ e de agregados com CD41 (A). Frequência (B) e valor absoluto (C) de células Siglec-F⁺CD11b⁻ na população total de leucócitos no parênquima pulmonar (CD45p⁺). Frequência (D) e valor absoluto (E) de agregados com CD41⁺ na população Siglec-F⁺CD11b⁻ (C). Os dados foram analisados através por ANOVA, **p* < 0,05, ****p* < 0,001, *****p* < 0,0001, e expressos como média +/- EPM, ns - não significativo. n = 5-7.

4.2.4. Depleção plaquetária com anti-CD41 causa redução da população de linfócitos de perfil Th2 (GATA3⁺) no linfonodo mediastinal de animais com alergia pulmonar

Como demonstrado em sessões anteriores, os animais alérgicos apresentaram eosinofilia em diferentes compartimentos, característica típica da resposta imune do tipo Th2-alta (MALAYA *et al.*, 2025). Considerando isso, foi investigada a polarização de linfócitos T CD4⁺ para o perfil Th2 por meio da marcação intracelular de GATA3, um fator de transcrição característico desse subtipo, em células dos linfonodos mediastinais por CF. A estratégia de *gating* está representada na Figura 21A.

Na análise de leucócitos totais nos linfonodos mediastinais, observou-se aumento do seu valor absoluto no grupo alérgico (OVA) em relação ao CN, mas esse aumento se manteve nos grupos tratados com anti-CD41 (OVA-DT e OVA-ST), ou seja, o tratamento não reduziu esse parâmetro (Fig. 21B). Apesar do aumento de leucócitos totais no grupo alérgico, a manutenção dessa celularidade nos grupos tratados permite afirmar que a análise por frequência foi suficiente para detectar os efeitos do tratamento sobre a polarização Th2, sem necessidade de conversão para valores absolutos nesse caso. Sendo assim, as frequências de linfócitos T CD4⁺ dentro dos leucócitos (CD45⁺), não apresentaram diferenças significativas entre os grupos tratados e o grupo OVA (Fig. 21C). Por outro lado, ao avaliar a frequência de células CD4⁺GATA3⁺, representativas do subtipo Th2, foi possível observar redução significativa dessa população nos grupos tratados (OVA-DT e OVA-ST), tanto na análise relativa à população CD4⁺ (Fig. 21D) quanto ao total de CD45⁺ (Fig. 21E).

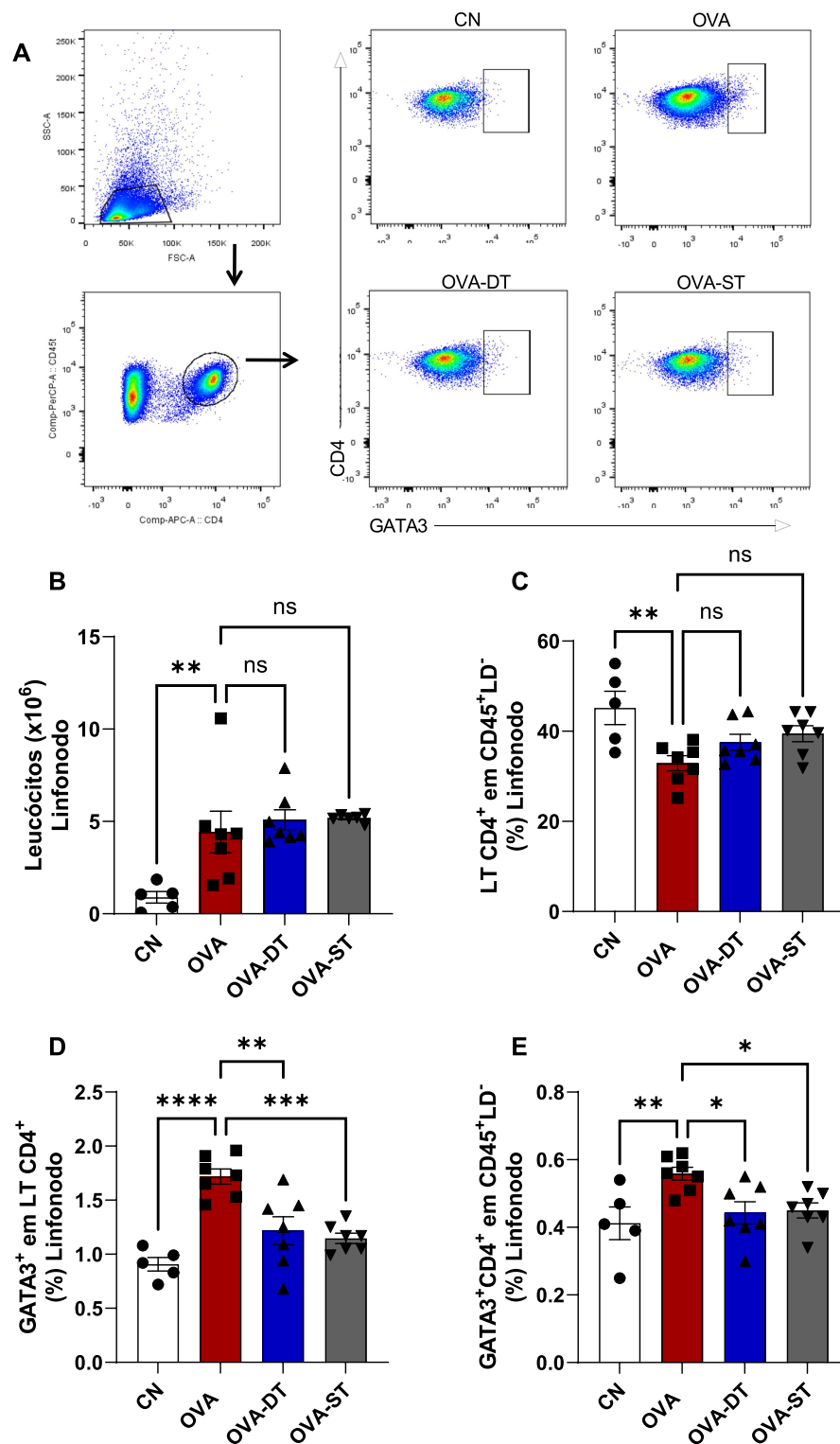
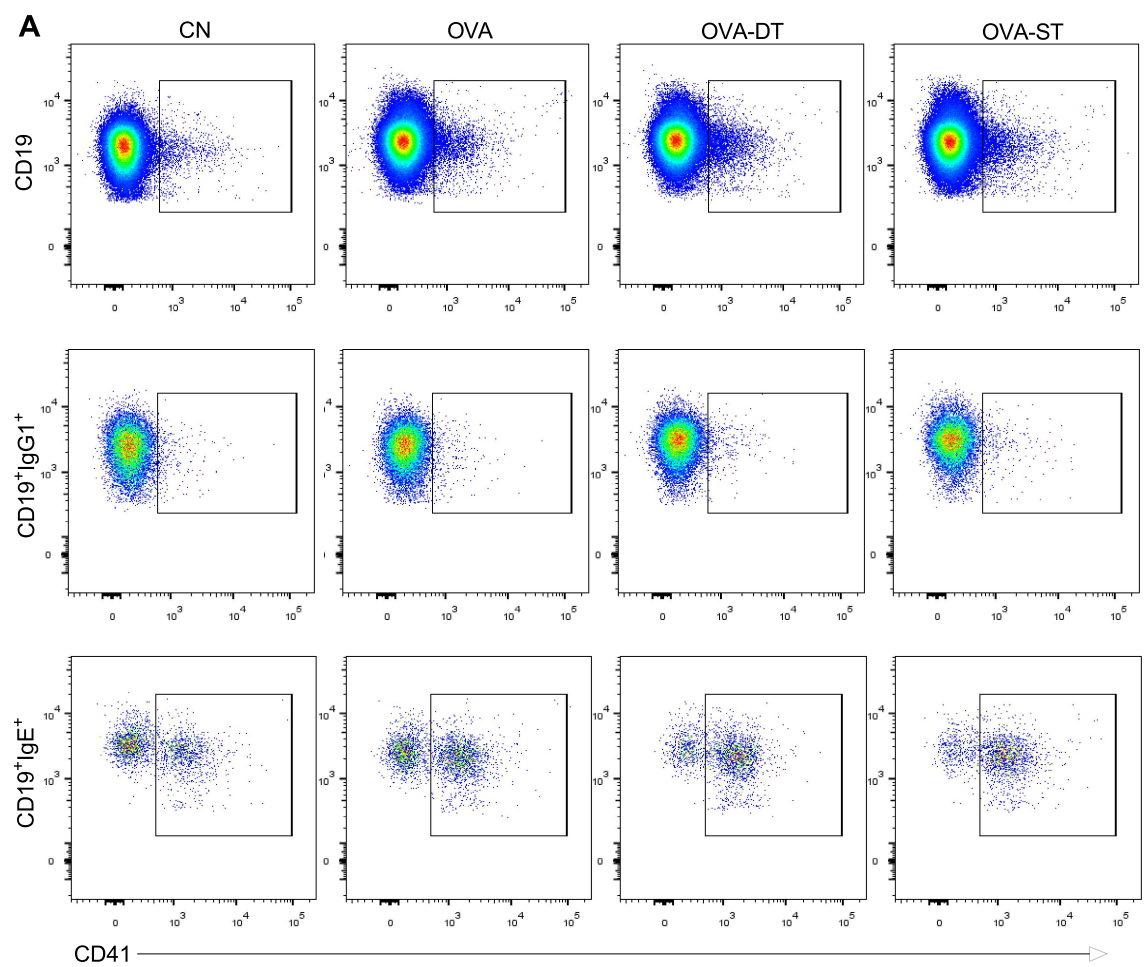


Figura 21: Avaliação da população GATA3⁺CD4⁺ no linfonodo mediastinal de animais sensibilizados e desafiados com OVA. Estratégia de *gating* para seleção das populações GATA3⁺CD4⁺ (A). Valor absoluto de leucócitos totais do linfonodo (B). Frequência de linfócitos T CD4⁺ na população de leucócitos totais (C). Frequências de linfócitos T CD4⁺GATA3⁺ na população de linfócitos CD4⁺ (D) e na população de leucócitos totais (E). Os dados foram analisados por ANOVA, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$, e expressos como média $\pm$ EPM, ns - não significativo. $n = 5-7$.

4.2.5. Tratamento com anti-CD41 na fase de sensibilização causa aumento de agregados plaquetas-linfócitos B IgE⁺ no linfonodo mediastinal de animais com alergia pulmonar

Diante dos dados obtidos que demonstraram alterações em subpopulações de linfócitos B com expressão de IgE e IgG1 durante a alergia, buscou-se avaliar essas populações no contexto da depleção plaquetária. Para isso, analisou-se os linfonodos mediastinais de animais sensibilizados e desafiados com OVA (OVA, OVA-DT e OVA-ST) de acordo com as estratégias de *gating* para essas populações (Fig. 22A).

Através dos dados obtidos, observou-se aumento da frequência de linfócitos B (CD19⁺) no grupo OVA em relação ao CN, com tendência de redução no grupo tratado com anti-CD41 nas fases de sensibilizações (OVA-ST) (Fig. 22B). Na formação de agregados CD19⁺CD41⁺, não houve diferenças relevantes entre os grupos analisados (Fig. 22C). Houve aumento de CD19⁺IgG1⁺ no grupo OVA, sem mudanças significativas observadas com o tratamento (Fig. 22D), mas a formação de agregados CD19⁺IgG1⁺CD41⁺ apresentou redução em OVA comparado ao CN, também sem diferenças após o tratamento (Fig. 22E). Já CD19⁺IgE⁺ aumentou em OVA com redução significativa em OVA-ST e tendência de queda em OVA-DT (Fig. 22F), enquanto seus agregados com plaquetas aumentaram significativamente em OVA-ST (Fig. 22F).



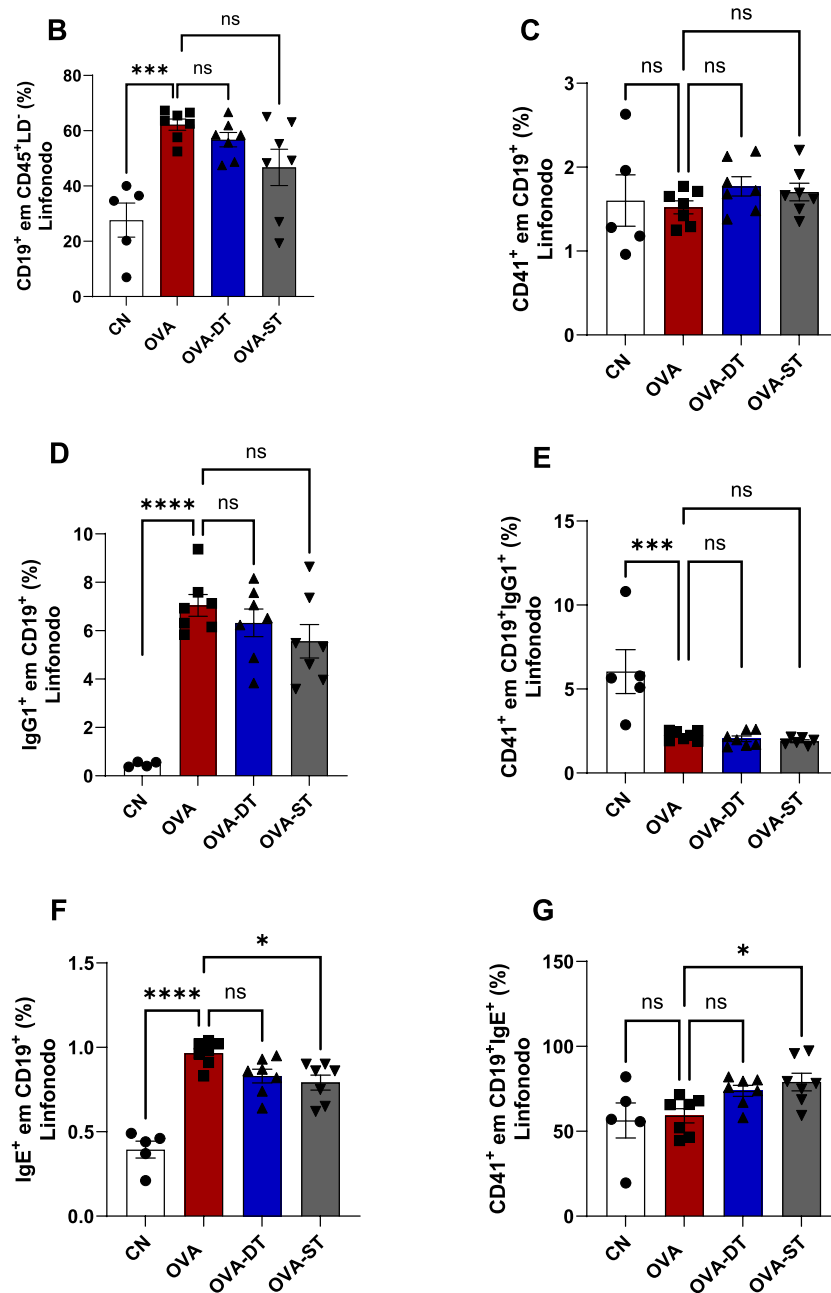


Figura 22: Avaliação das populações CD19⁺IgG1⁺ e CD19⁺IgE⁺ no linfonodo mediastinal de animais sensibilizados e desafiados com OVA Estratégia de *gating* para seleção das populações de CD19⁺ e agregados com CD41⁺ (A). Frequência de linfócitos B CD19⁺ na população de leucócitos totais (CD45⁺) (B) e frequência de agregados CD19⁺CD41⁺ na população de CD19⁺ (C). Frequência de linfócitos B CD19⁺IgG1⁺ na população de CD19⁺ total (D) e frequência de agregados CD19⁺IgG1⁺CD41⁺ na população de CD19⁺IgG1⁺ (E). Frequência de linfócitos B CD19⁺IgE⁺ na população de CD19⁺ total (F) e frequência de agregados CD19⁺IgE⁺CD41⁺ na população de CD19⁺IgE⁺ (G). Os dados foram analisados por ANOVA, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$, e expressos como média $\pm$ EPM, ns - não significativo. $n = 5-7$.

4.2.6. Efeito nas populações de linfócitos T foliculares (CXCR5⁺PD1⁺) e B (CD19⁺) no baço na fase da sensibilização com OVA

Tendo em vista todas as alterações observadas nos grupos alérgicos, incluindo as populações de linfócitos B, mostrou-se pertinente avaliar se o tratamento com anti-CD41 causaria alguma interferência na montagem da resposta adaptativa e humoral em órgãos linfoides periféricos. Visto isso, realizou-se análises no baço de animais apenas sensibilizados com OVA, sem completar o protocolo com a fase de desafios.

4.2.6.1. Depleção plaquetária com anti-CD41 não gera alterações na população de linfócitos T CXCR5⁺PD1⁺ no baço de animais sensibilizados com OVA

Considerando a contribuição dos Linfócitos T (LT) no desenvolvimento na resposta humoral antígeno-específica, avaliou-se a frequência de LT auxiliares (LTh, CD3⁺CD4⁺), bem como de linfócitos T foliculares (LT_{FH}, CXCR5⁺PD1⁺), que são cruciais para fornecer estímulos para a troca de classe e aumento da afinidade dos anticorpos (FENGET *et al.*, 2022). Na figura 23A, pode-se observar as estratégias utilizadas para seleção dessas populações.

No baço de animais apenas sensibilizados, observou-se redução no valor absoluto de leucócitos no baço de animais tratados com anti-CD41 (Fig. 23B). Já nas populações analisadas, não houve diferenças significativas na frequência total de LTh (CD3⁺CD4⁺) entre os grupos SENS e SENS-T (Fig. 23C), tampouco na formação de agregados entre plaquetas e essas células (CD3⁺CD4⁺CD41⁺) (Fig. 23D). Da mesma forma, as frequências de células T_{FH} (CXCR5⁺PD1⁺), analisadas dentro das populações CD3⁺CD4⁺ (Fig. 23E) e CD45⁺ (Fig. 23F), também não apresentaram diferenças significativas entre os grupos avaliados.

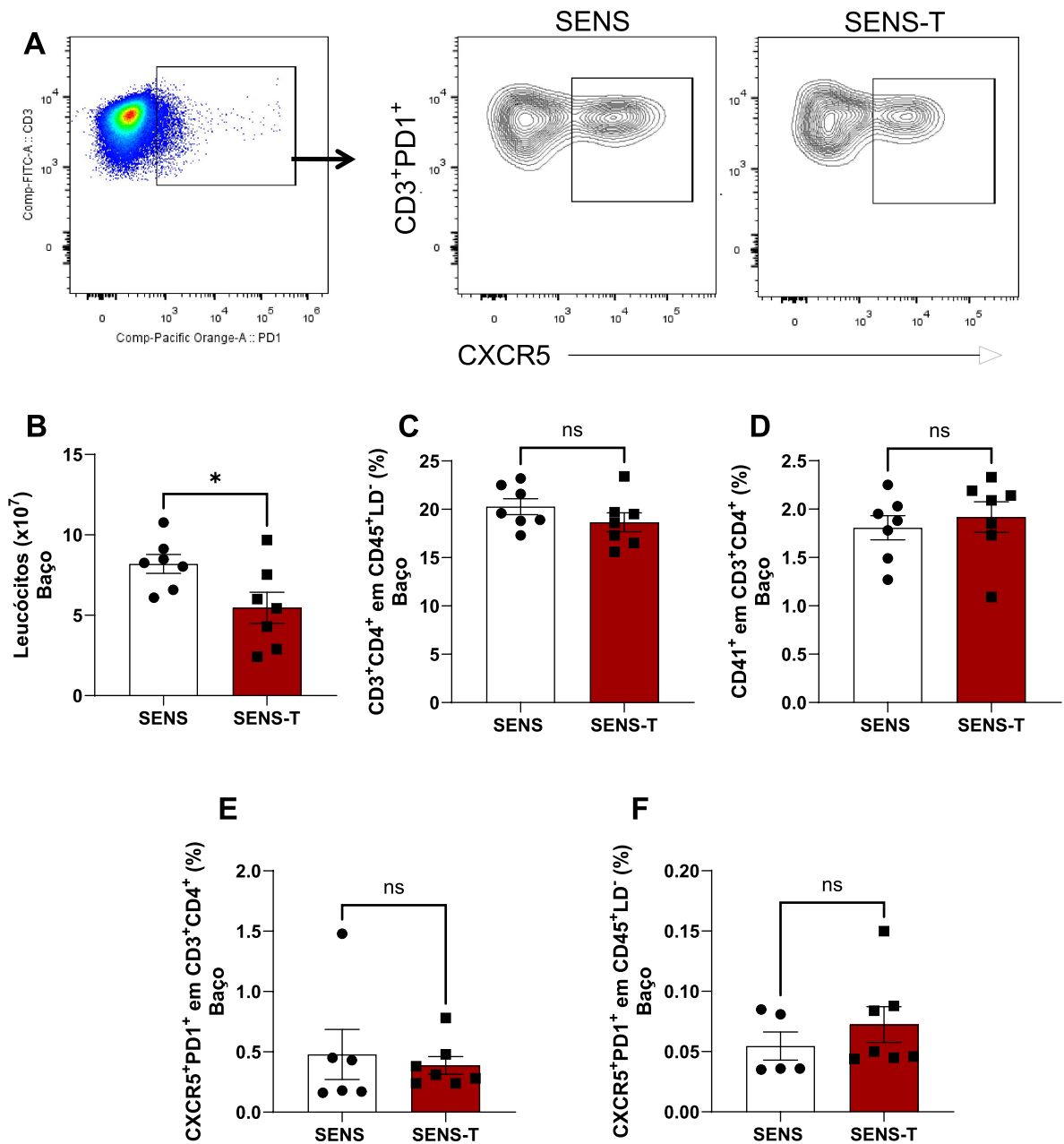
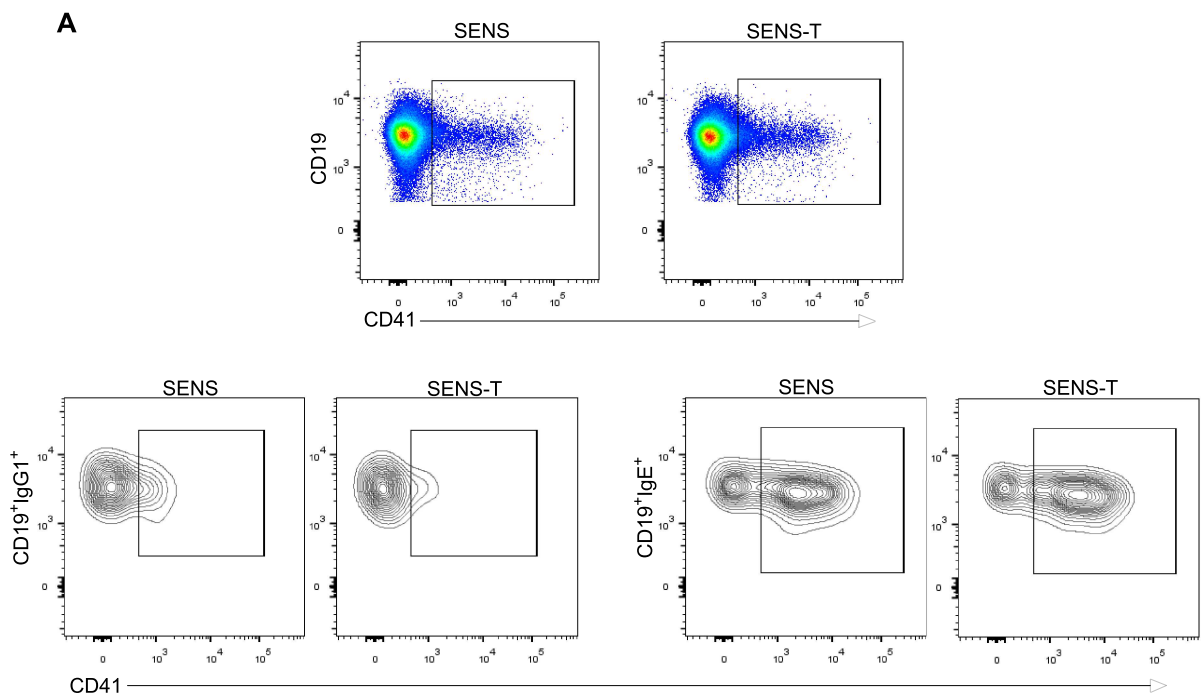


Figura 23: Avaliação de linfócitos T CXCR5⁺PD1⁺ no linfonodo mediastinal de animais sensibilizados com OVA. Estratégias de *gating* para seleção das populações de LT CXCR5⁺PD1⁺ e de agregados com CD41 (A). Valor absoluto de leucócitos totais no baço (B). Frequências de linfócitos Th (CD3⁺CD4⁺ na população de leucócitos totais (CD45⁺) (C) e de agregados CD3⁺CD4⁺CD41⁺ na população de LTh (D). Frequências de linfócitos T CXCR5⁺PD1⁺ na população CD3⁺CD4⁺ (E) e na população CD45⁺ (F). Os dados foram analisados através de teste *t* de Student, **p* < 0,05, e expressos como média +/- EPM, ns - não significativo. n = 7.

4.2.6.2. Depleção plaquetária com anti-CD41 causa redução da população de Linfócitos B IgG1⁺ e de seus agregados com plaquetas no baço de animais sensibilizados com OVA

No baço, observou-se aumento significativo da frequência total de linfócitos B (LB, CD19⁺) no grupo SENS-T em comparação ao SENS (Fig. 24B), sem alteração na formação de agregados com plaquetas (CD19⁺CD41⁺) (Fig. 24C). Apesar do aumento da população CD19⁺, houve redução significativa na frequência da subpopulação CD19⁺IgG1⁺ no grupo SENS-T (Fig. 24D), bem como na formação de agregados dessa subpopulação com plaquetas (CD19⁺IgG1⁺CD41⁺) (Figura 24E). Por outro lado, não foram observadas alterações nos linfócitos B expressando IgE (CD19⁺IgE⁺) (Fig. 24F), nem nos agregados formados com plaquetas (Fig. 24G). Na Figura 24A pode-se observar as estratégias utilizadas para seleção das populações.



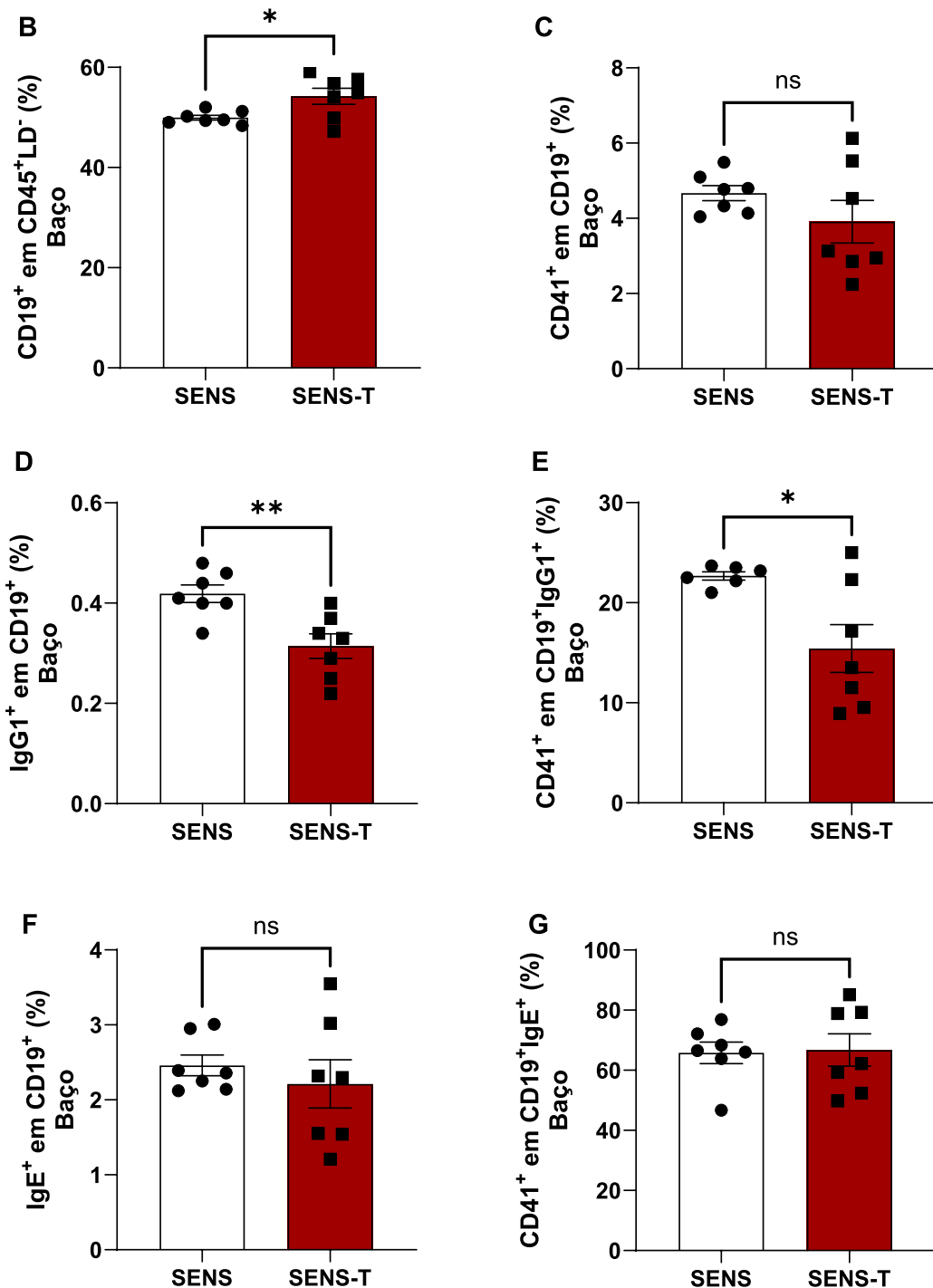


Figura 24: Avaliação de subpopulações de LB CD19⁺. Estratégia de *gating* para seleção das subpopulações de LB CD19⁺ e agregados com CD41⁺ (A). Frequências de LB CD19⁺ na população total de leucócitos (CD45⁺) (B) e de agregados CD19⁺CD41⁺ na população de LB (C). Frequências da população de CD19⁺IgG1⁺ na população total de LB (CD19⁺) (D) e de agregados CD19⁺IgG1⁺CD41⁺ na população de CD19⁺IgG1⁺ (E). Frequências da população de CD19⁺IgE⁺ na população total de LB (CD19⁺) (F) e de agregados CD19⁺IgE⁺CD41⁺ na população de CD19⁺IgE⁺ (G). Os dados foram analisados através de teste *t* de Student, **p* < 0,05, ***p* < 0,01, e expressos como média +/- EPM, ns - não significativo. n = 7.

4.2.7. Efeito na produção de anticorpos específicos e na sua força de ligação

Considerando que a IgE envolvida nas respostas alérgicas é uma imunoglobulina de alta afinidade por ser produzida nos centros germinativos, a avaliação da IgG1 também se torna relevante, uma vez que essa classe precede a troca de isótipo para IgE (GOWTHAMAN *et al.*, 2020). Além disso, o cálculo da medida de avidéz e a análise de folículos linfoides se somam a essa avaliação, por representarem a força de ligação dos anticorpos produzidos, bem como o local de troca de classe (ASRAT *et al.*, 2020).

4.2.7.1. Tratamento com anti-CD41 não promove alterações nos níveis séricos de IgG1 e IgE específicos à OVA de animais sensibilizados com OVA e alérgicos

Na avaliação dos níveis séricos de anticorpos específicos nos grupos SENS e SENS-T, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas nas absorvâncias de IgG1 (Fig. 25A) e IgE (Fig. 25B). Por outro lado, nos animais sensibilizados e desafiados com OVA, foi detectado aumento desse parâmetro na análise de ambas as imunoglobulinas em relação ao grupo CN. No entanto, esse aumento ocorreu independentemente do tratamento com anti-CD41, ou seja, a administração de anti-CD41 não resultou em redução dos níveis séricos durante a fase alérgica (Fig. 25C, 25D).

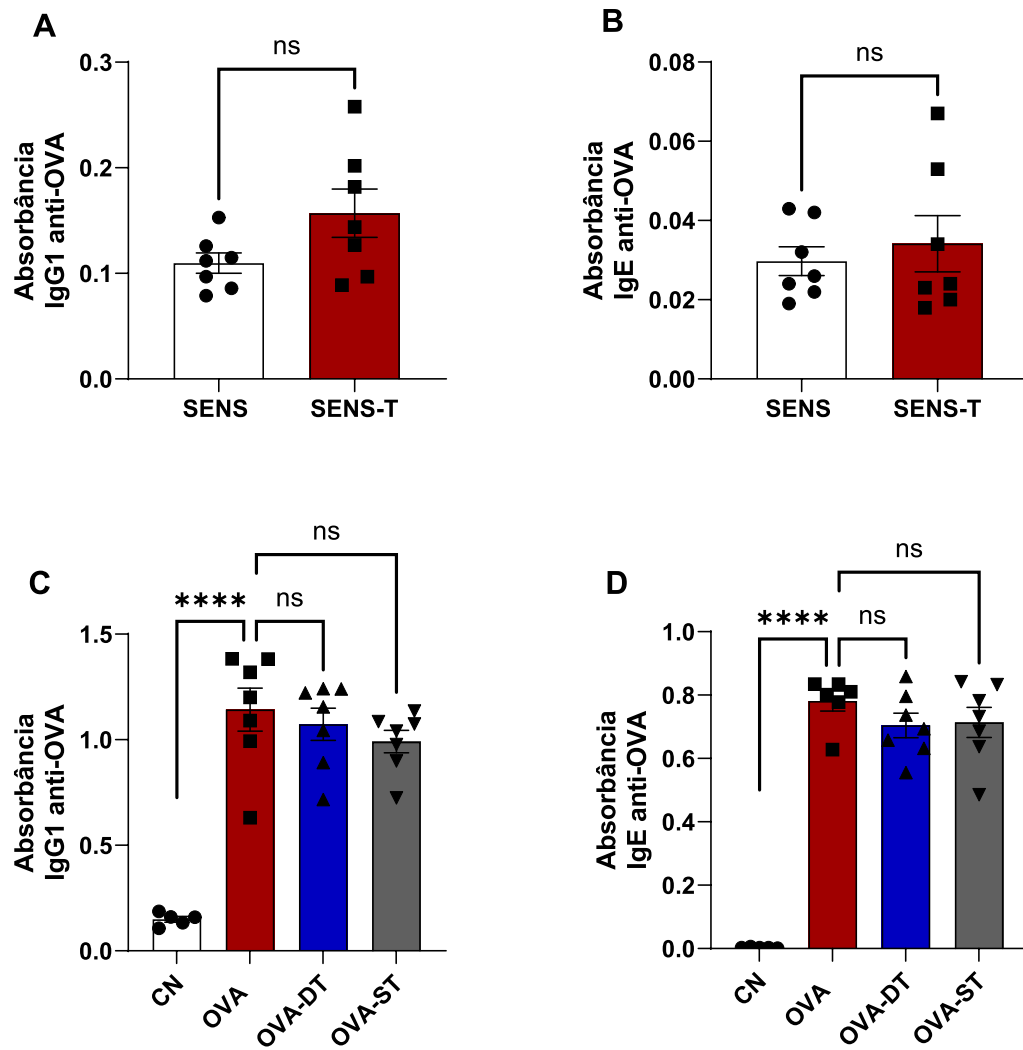


Figura 25: Níveis séricos de IgG1 e IgE específicos à OVA. Absorbância de IgG1 (A) e IgE (B) no plasma de animais sensibilizados com OVA e tratados com anti-CD41. Absorbância de IgG1 (C) e IgE (D) no plasma de animais sensibilizados e desafiados com OVA e tratados com anti-CD41. As comparações entre dois grupos foram feitas pelo teste *t* de Student, e entre mais de dois grupos por ANOVA. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$, e expressos como média $\pm$ EPM, ns - não significativo. $n = 5-7$.

4.2.7.2. Tratamento com anti-CD41 induz a redução da avidéz de anticorpos específicos à OVA em animais sensibilizados com OVA e alérgicos

Diante da ausência de alteração nos níveis dos anticorpos analisados nos grupos tratados com anti-CD41, buscou-se verificar se o tratamento teria interferido na qualidade desses anticorpos, por meio da análise da avidéz, ou seja, a força de ligação do anticorpo com seu antígeno (BACHMANN *et al.*, 2025). Essa análise foi conduzida por meio do cálculo da medida de avidéz.

Nos animais apenas sensibilizados com OVA, observou-se que o tratamento com anti-CD41 resultou em redução significativa da avidéz apenas dos anticorpos IgG1 específicos à OVA (Fig. 26A), sem alterações na avidéz de IgE (Fig. 26B). Já nos animais sensibilizados e desafiados com OVA, foi detectada redução significativa na avidéz tanto de IgG1 (Fig. 26C) quanto de IgE (Fig. 26D) nos grupos tratados (OVA-DT e OVA-ST), quando comparados ao grupo alérgico não tratado (OVA).

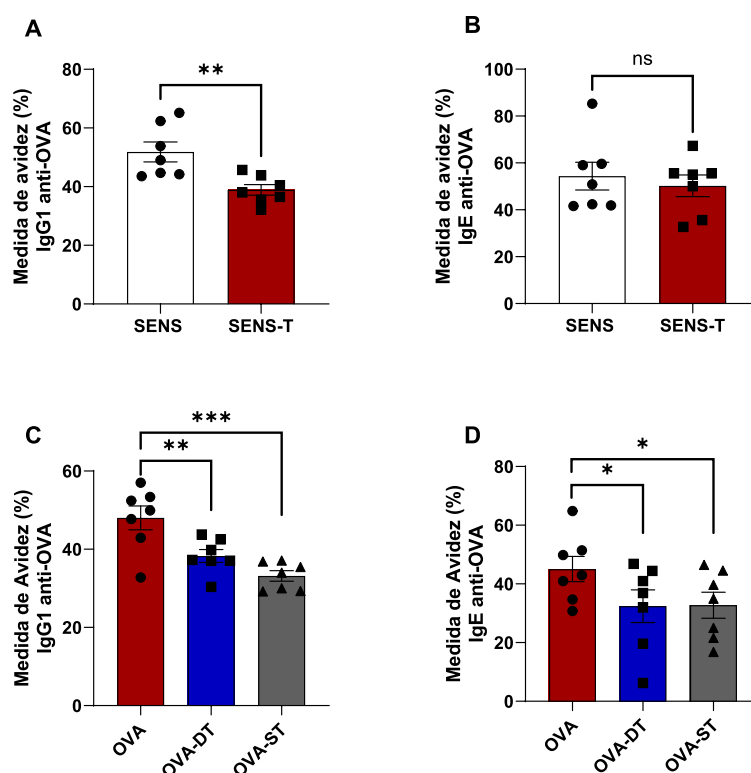


Figura 26: Avidéz de anticorpos específicos à OVA. Medida de avidéz de IgG1 (A) e IgE (B) no plasma de animais sensibilizados com OVA e tratados com anti-CD41. Medida de avidéz de IgG1 (C) e IgE (D) no plasma de animais sensibilizados e desafiados com OVA e tratados com anti-CD41. As comparações entre dois grupos foram feitas pelo teste *t* de Student, e entre mais de dois grupos por ANOVA. **p* < 0,05, ***p* < 0,01, ****p* < 0,001, *****p* < 0,0001, e expressos como média +/- EPM, ns - não significativo. *n* = 7.

4.2.7.3. Tratamento com anti-CD41 causa redução de folículos linfóides maduros no baço de animais com alergia pulmonar

Diante da ausência de alterações nos níveis séricos de IgG1 e IgE, mas com evidências de redução em sua avidéz, levantou-se a hipótese de que o tratamento com anti-CD41 poderia ter influenciado na formação dos folículos linfóides, estruturas onde podem se encontrar centros germinativos, que são responsáveis pela maturação de afinidade dos linfócitos B (STEBEGG *et al.*, 2018). Para isso, foi realizada análise morfológica do baço por imunohistoquímica com marcação para B220, permitindo a distinção e quantificação de folículos linfóides primários e secundários (maduros), além da estimativa da área deste último.

A partir dos dados obtidos, observou-se aumento na contagem de folículos primários nos grupos OVA-DT e OVA-ST em comparação ao grupo OVA (Fig. 27A), enquanto a contagem de folículos secundários apresentou redução significativa nesses mesmos grupos (Fig. 27B). Apesar dessa alteração na frequência, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas na área dos folículos secundários entre os grupos experimentais (Figura 27C). Na Figura 27D, encontra-se a imagem representativa na marcação B220 em cada grupo experimental, bem como a delimitação das estruturas consideradas folículos maduros para contagem e cálculo da área.

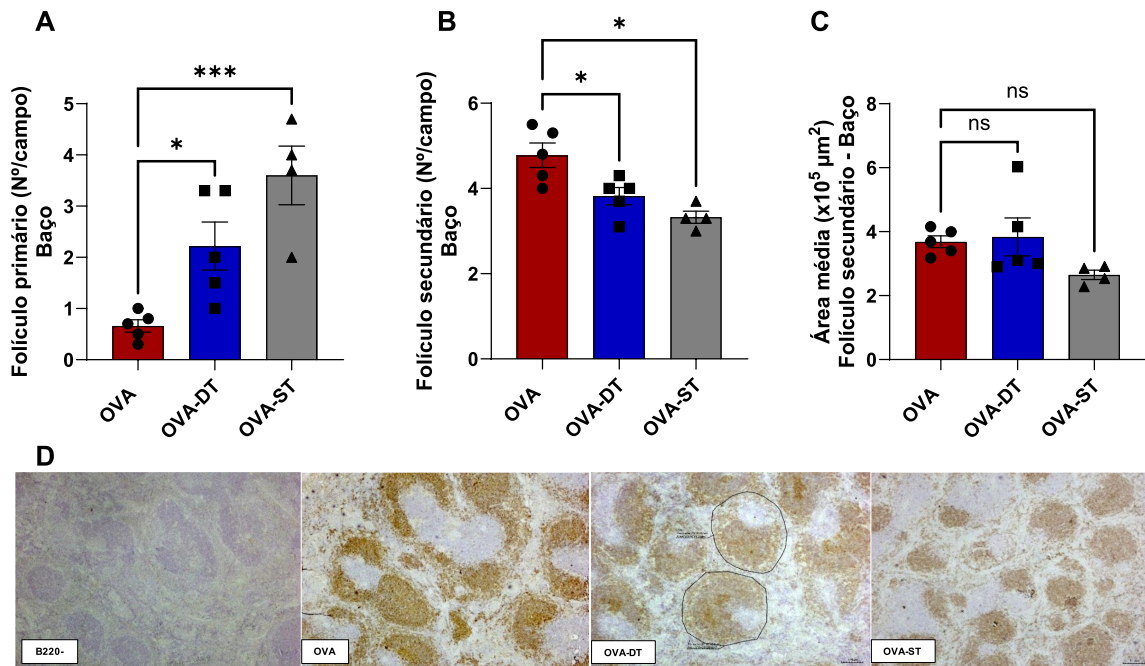


Figura 27: Formação de folículos linfoides. Contagem de estruturas equivalentes aos folículos linfoides primários (A) e secundários (B) pela marcação com anti-B220. Cálculo da área média das estruturas equivalentes aos folículos linfoides secundários (C). Imagem representativa dos órgãos linfoides primários e secundários em corte histológico do baço com marcação para B220 em cada grupo experimental no aumento 20x (D). Os dados foram analisados através da Análise de Variância (ANOVA), * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$, e expressos como média $\pm$ EPM, ns - não significativo. $n = 4-5$.

5. DISCUSSÃO

Para detalhar o que foi feito neste estudo, dividiu-se os dados em 2 etapas conforme o desenvolvimento dos respectivos protocolos e análises. Enquanto na primeira etapa foi avaliada a formação de agregados plaquetas-leucócitos em modelo de alergia pulmonar, na segunda etapa foi avaliada de forma mais aprofundada os mecanismos pelos quais as plaquetas participam da resposta imune durante a asma, através da depleção de plaquetas com anti-CD41.

Entre as células mais importantes na fisiopatologia da asma alérgica estão os eosinófilos, cuja presença aumentada na medula, no sangue e principalmente no pulmão é um dos principais marcadores de inflamação de perfil Th2 (ANTOSZ *et al.*, 2024; VAN HULST *et al.*, 2020). Os dados mostraram que os animais sensibilizados e desafiados com ovalbumina (OVA) apresentaram um aumento significativo de eosinófilos em todos os compartimentos, ou seja, houve eosinofilia local e sistêmica. Esse resultado está de acordo com o que se espera de um modelo Th2-alto, no qual a infiltração de eosinófilos no tecido pulmonar é uma das principais características da inflamação alérgica (ANTOSZ *et al.*, 2024; VAN HULST *Et al.*, 2020). Também foram observados aumentos nos níveis de IL-5 e CCL11 (eotaxina-1) no pulmão, dois mediadores que atuam diretamente na ativação e recrutamento de eosinófilos (SHEN *et al.*, 2023; WU *et al.*, 2022). Enquanto a IL-5 atua principalmente na diferenciação e liberação dessas células a partir da medula óssea, a CCL11 se liga ao receptor CCR3, guiando a migração dos eosinófilos para o pulmão (WU *et al.*, 2022). Então, nossos achados reforçam que o modelo utilizado reproduz adequadamente a inflamação alérgica do tipo Th2, assegurando a validação dos próximos achados.

Confirmada a indução da asma, o próximo passo foi verificar possíveis alterações na contagem de plaquetas, bem como seu status de ativação no modelo utilizado. Foi observado aumento na contagem dessas células isoladas no sangue de animais alérgicos, o que foi acompanhado por maior ativação plaquetária, evidenciada pelo aumento de plaquetas expressando CD62P (P-selectina). Somado a isso, o pulmão também apresentou aumento de plaquetas totais, não podendo ser evidenciado o status de ativação nesse compartimento pelo viés da etapa de digestão do tecido pulmonar. Esses dados se alinham com estudos que apontam que pacientes asmáticos podem apresentar plaquetas circulantes em maior

quantidade e com perfil mais ativado, especialmente durante as exacerbações (JOHANSSON *et al.*, 2020; KOWAL *et al.*, 2006). E em modelo murino de asma, também já foi demonstrado que há migração de plaquetas para o pulmão, e que sua ativação pode ser induzida por diversos estímulos inflamatórios (TAKEDA *et al.*, 2016).

A formação de agregados entre plaquetas e leucócitos já foi bastante descrita em diferentes contextos inflamatórios e com importante papel na modulação da migração celular e na ativação de leucócitos (LUO *et al.*, 2021). Plaquetas interagem com leucócitos que são recrutados para os pulmões, como eosinófilos, facilitando a entrada dessas células (RIFFO-VASQUEZ *et al.*, 2016). Neste estudo, os agregados CD41⁺CD45⁺, ou seja, plaquetas com qualquer leucócito, se mostraram aumentados no pulmão como esperado, o que pode explicar o não aumento de plaquetas livres durante a alergia no ponto analisado. A literatura já sugere que esses agregados são seletivos e podem acontecer mais em contextos de ativação celular, ou em certos perfis inflamatórios (COGNASSE *et al.*, 2022; MANDEL *et al.*, 2022). Por exemplo, eosinófilos ativados expressam mais PSGL-1 e integrinas, o que facilita essa interação com plaquetas, enquanto células em repouso têm menos afinidade por esse tipo de contato (GRUBA *et al.*, 2023; JOHANSSON *et al.*, 2012).

As próximas análises foram afinadas para tipos celulares mais específicos, que têm papel importante na asma Th2-alta. Os primeiros dados chamaram atenção para uma divergência interessante: no pulmão, o grupo alérgico apresentou aumento de eosinófilos, como já esperado, mas, por outro lado, a frequência de agregados entre plaquetas e eosinófilos (CD41⁺Siglec-F⁺CD11b⁺) não apresentou alteração. Embora isso possa parecer contraditório num primeiro momento, é importante lembrar que a formação desses agregados depende não só da presença das duas células, mas também de fatores como ativação, expressão de moléculas de adesão e sinalização inflamatória local (JOHANSSON; MOSHER, 2011; JOHANSSON *et al.*, 2020). Além disso, devido ao intenso infiltrado inflamatório pulmonar, fez-se necessário analisar o valor absoluto celular. Sendo assim, observou-se aumento dessas populações por essa análise, que é o dado mais pertinente se tratando da resposta alérgica local. Um estudo *in vitro* demonstrou que RANTES plaquetário ativa eosinófilos e, como consequência, ocorre a elevada produção de espécies reativas do oxigênio (Chihara *et al.*, 1998). Observações clínicas mostraram que eosinófilos

participam na patogênese da aterosclerose por meio da formação de EETs, que ocorre principalmente por sua interação com plaquetas (MARX *et al.*, 2019).

Na análise de populações celulares agregadas no pulmão, foram investigados os macrófagos alveolares (Siglec-F⁺CD11b⁻), células residentes do pulmão, que possuem papel essencial na manutenção da homeostase e no controle da inflamação (LAMKIOUED; GOUNNI, 2023; WOO; JEONG; CHUNG, 2021). A análise dessa população revelou aumento de seu valor absoluto, bem como na formação de agregados com plaquetas, o que abre espaço para investigar se essas interações causam alguma modulação nesses macrófagos.

A IgE ligada à superfície de mastócitos e basófilos são importantes indutores da resposta alérgica (KUBO, 2018). Assim como essas células, as plaquetas possuem o receptor de alta afinidade para IgE, o FcεRI (PITCHFORD *et al.*, 2008). Como foi visto neste estudo, o complexo leucócitos totais agregados com plaquetas expressam mais IgE do que aqueles leucócitos sem interação direta com plaquetas. Tal fato interessante despertou perguntas, apesar de não terem sido investigadas neste estudo: quais seriam as células agregadas expressando IgE, tais como mastócitos sensibilizados, eosinófilos, plaquetas, e qual seria a contribuição da formação de agregados plaquetas com essas células para a inflamação alérgica.

Esses primeiros achados reforçam que a formação de agregados entre plaquetas e leucócitos na asma não é um processo uniforme, mas algo que depende fortemente do tipo celular envolvido e do microambiente tecidual. Cada compartimento mostrou responder de formas diferentes, o que torna a análise mais rica e ao mesmo tempo desafiadora. Além disso, o fato das interações estarem ocorrendo com diferentes tipos de leucócitos, sugere que as plaquetas podem influenciar a resposta imune de diferentes formas, desde o recrutamento de células inflamatórias até a formação de agregados de células com IgE. Isso destaca a importância de continuar investigando essas interações com maior profundidade. Por isso, a próxima etapa deste estudo foi focada na depleção de plaquetas com anti-CD41, que é uma abordagem fundamental para tentar entender melhor os mecanismos que realmente dependem da presença das plaquetas.

Um dos primeiros pontos avaliados na segunda etapa foi se o tratamento com anti-CD41 foi realmente eficaz para promover a depleção de plaquetas. No sangue periférico, os dados mostraram que a depleção foi efetiva até 48h após a aplicação do anticorpo, o que também foi relatado por outros autores. Enquanto Takeda e

colaboradores (2016) observaram redução nesse mesmo intervalo, também utilizando anti-CD41 como tratamento, Amison e colaboradores (2018) encontraram redução em até 24h após administração de anti-glicoproteína (CD42b), ambos seguidos de um restabelecimento progressivo dos níveis após os respectivos períodos informados (AMISON *et al.*, 2018; TAKEDA *et al.*, 2016). No entanto, no presente estudo, após os desafios com OVA, essa redução não foi observada nos grupos alérgicos e tratados, podendo isso decorrer de um efeito compensatório da medula óssea que intensifica a produção de plaquetas em resposta à inflamação alérgica e ao tratamento com anti-CD41. Em modelo murino de inflamação aguda induzida por administração exógena de IL-6, verificou-se trombopoiese reativa seguida por aumento da contagem de plaquetas (KASER *et al.*, 2001). Além disso, em camundongos knockout para trombopoietina (TPO) ou para seu receptor c-Mpl, constatou-se uma redução significativa na contagem de plaquetas, evidenciando que a via TPO/c-Mpl é absolutamente fundamental na regulação da hematopoiese plaquetária (HACEIN-BEY-ABINA *et al.*, 2020). Em paralelo, estudos em humanos mostram que, em casos de trombocitopenia induzida por quimioterapia, há elevação compensatória dos níveis de TPO plasmática (HU *et al.*, 2025).

Mesmo que a contagem total de plaquetas tenha se normalizado ao final do protocolo completo da asma, observamos alterações em parâmetros que indicam mudanças nessas células. Especificamente, os grupos tratados durante os desafios (OVA-DT) apresentaram aumento no volume plaquetário médio (MPV) e no percentual de plaquetas grandes (P-LCR). Esse achado é compatível à liberação de plaquetas jovens, que costumam ser maiores por derivarem de megacariócitos mais ativados e de alta ploidia (HEAZLEWOOD *et al.*, 2023). Essas plaquetas jovens também têm maior conteúdo de RNA e costumam ser mais reativas funcionalmente (BUTTARELLO *et al.*, 2020; KORNILUK *et al.*, 2019). Apesar dessas características somadas à contagem normal de plaquetas, os dados deste estudo mostraram redução nos níveis de PF4 no plasma dos animais do grupo OVA-DT. Como o PF4 é armazenado nos grânulos alfa (herdados dos megacariócitos) e liberado durante a ativação plaquetária (AMBROSIO; DI PIETRO, 2019), sua queda pode refletir, hipoteticamente, um menor conteúdo granular por plaqueta como já foi relatado ocorrer nos grânulos δ (densos) (DUPUIS *et al.*, 2020), ou ainda uma menor ativação funcional dessas células. Estudos em humanos mostraram que pacientes asmáticos apresentam níveis elevados de PF4 e de MPV durante crises (DUMAN ŞENOL *et*

al., 2022; KOWAL *et al.*, 2006), o que torna esses parâmetros relevantes para entender o papel das plaquetas na inflamação. Sendo assim, o aumento de MPV e P-LCR, junto com a redução de PF4, pode indicar a presença de plaquetas jovens, liberadas rapidamente após a depleção e o desafio alérgico, mas com menor conteúdo de grânulos ou menor capacidade de ativação naquele momento.

Como o pulmão é um órgão bastante vascularizado, um desafio importante na análise é saber exatamente onde as células e agregados estão localizados: se ainda nos vasos ou já infiltrados no parênquima. Por isso, um diferencial deste trabalho foi o uso da marcação intravascular com anti-CD45 conjugado (CD45iv). Essa técnica descrita por outros autores permite discriminar os leucócitos que estão circulando nos vasos daqueles que migraram para o tecido pulmonar, sendo especialmente útil em estudos de inflamação, como na asma (ANDERSON *et al.*, 2014; VAZQUEZ *et al.*, 2023). Com essa estratégia, conseguimos separar os compartimentos e observar o aumento real de leucócitos totais no parênquima pulmonar durante a alergia pulmonar, devido à elevada infiltração de leucócitos (JIANG *et al.*, 2022). A formação de agregados plaquetas-leucócitos (CD41⁺CD45⁺) estava aumentada em termos absolutos nos grupos alérgicos nos dois compartimentos (intra e extravascular), seguido de redução provocada pelo tratamento nas fases de desafios. No entanto, como o infiltrado inflamatório da asma Th2-alta não é formado por uma população única de leucócitos, é importante elucidar quais dessas populações estão sendo mais impactadas por essa interferência. Assim, o próximo passo foi avaliar especificamente essas células e sua interação com plaquetas.

No nosso estudo, durante a alergia pulmonar ocorreu eosinofilia expressiva na medula óssea, no sangue e no pulmão, o que já era esperado no tipo de modelo utilizado. O interessante foi observar que o tratamento com anti-CD41 interferiu nesse processo, especialmente na formação do infiltrado de eosinófilos no tecido pulmonar. Esses achados estão de acordo com a literatura, onde encontraram redução de eosinófilos no lavado broncoalveolar (BAL) de camundongos alérgicos tratados com anti-CD41 (AMISON *et al.*, 2018; TAKEDA *et al.*, 2016). Nos dados obtidos por CF, houve valores de eosinófilos significativamente maiores no tecido pulmonar durante a alergia, enquanto o tratamento durante os desafios provocou redução. Esses dados vão ao encontro da análise histológica, que mostrou menor infiltração eosinofílica em animais tratados com anti-CD41 nessa fase do protocolo. Do ponto de vista funcional, a redução dos agregados plaquetas-eosinófilos (Siglec-

F⁺CD11b⁺CD41⁺) nos grupos tratados também reforça essa hipótese. Já se sabe que as plaquetas atuam no recrutamento e ativação de eosinófilos, seja por meio da liberação de quimiocinas como CCL5 ou pela interação via P-selectina com PSGL-1 nos eosinófilos, o que facilita sua adesão ao endotélio e a migração transendotelial (JOHANSSON *et al.*, 2012; PITCHFORD *et al.*, 2019).

Na medula óssea, os eosinófilos foram significativamente reduzidos apenas nos animais alérgicos tratados nos desafios, o que pode ser explicado pelo momento mais recente da depleção plaquetária. Já com o tratamento realizado durante as sensibilizações, o grupo alérgico não apresentou diferenças nessa fase final, o que sugere que a medula teve tempo suficiente para se recuperar da trombocitopenia. Esses dados mostram que o tratamento com anti-CD41 não afeta apenas a chegada de eosinófilos no pulmão, mas também em alguma etapa da produção dessas células na medula, sendo necessária a realização de mais estudos para elucidar tais mecanismos. Uma das possibilidades seria a redução da sobrevivência de eosinófilos na ausência de plaquetas, já que plaquetas reduzem a apoptose dessas células via fator estimulador de colônias de granulócitos-macrófagos (RAIDEN *et al.* 2003).

Referente à população de macrófagos alveolares, seus dados vão de acordo com os obtidos anteriormente, com aumento tanto dessa população celular, quanto de seus agregados com plaquetas. No entanto, nas análises de ambas as populações se observou redução com o tratamento com anti-CD41. Apesar de ser uma célula residente e não sofrer interferência de processos migratórios, a diminuição de sua população pode estar relacionada à interferência da depleção plaquetária sobre o ambiente pulmonar, já que plaquetas liberam mediadores, como PF4, que auxiliam na sobrevivência e na função de macrófagos (CASARI *et al.*, 2023; KAPUR; SEMPLE, 2021).

Diante das alterações observadas na população de eosinófilos e de seus agregados com plaquetas no tecido pulmonar, era esperado que outras etapas da resposta Th2-alta também pudessem estar sendo impactadas. Nesse cenário, também fez sentido realizar análises para os linfócitos T auxiliares, em especial aqueles com perfil Th2, já que essas células são essenciais para orquestrar a inflamação alérgica, principalmente por meio da secreção de citocinas como IL-4, IL-5 e IL-13 (JI; LI, 2023). Foi considerado avaliar o desenvolvimento da resposta alérgica nos linfonodos mediastinais, responsáveis pela drenagem dos pulmões,

especialmente nos desafios (TRIVEDI; REED, 2023). Nesse local, a frequência do subtipo Th2, marcado pela expressão do fator de transcrição GATA3, foi possível detectar um aumento importante nos animais alérgicos, com redução significativa nos tratados. Esses dados sugerem que a depleção de plaquetas interfere na polarização Th2 mesmo com a redução da frequência geral de linfócitos T CD4⁺. Essa interferência pode estar associada ao papel das plaquetas na ativação e modulação de células T. O trabalho de Min e colaboradores (2022) mostrou que plaquetas ativadas liberam mediadores, como TGF- β e PF4, capazes de influenciar diretamente a diferenciação de linfócitos T CD4⁺, favorecendo a polarização para o perfil Th2 nos linfonodos, mas não no baço (MIN *et al.*, 2022). Além disso, em modelos murinos de asma, já foi demonstrado que a depleção de plaquetas por anti-CD41 reduz significativamente os níveis de IL-4 e IL-13 nos pulmões após desafio com alérgeno, reforçando a ideia de que essas células são participantes ativas da resposta Th2 (LIU *et al.*, 2019).

Como já foi mencionado anteriormente, os linfócitos B são células de suma importância no desenvolvimento da alergia pulmonar e análises referentes às suas subpopulações nos principais órgãos linfoides periféricos devem receber a devida atenção. Os dados obtidos mostraram redução significativa em linfócitos B CD19⁺IgE⁺ nos linfonodos mediastinais, porém não afetou a população de CD19⁺IgG1⁺, mostrando que a trombocitopenia induzida na fase de sensibilização impacta na montagem da resposta imune adaptativa humoral que repercute até mesmo ao final do protocolo de alergia pulmonar. Com isso, uma etapa do presente estudo foi avaliar se as plaquetas teriam algum papel na troca de isótipo durante a montagem da resposta humoral no baço, correspondendo a fase de sensibilização com o alérgeno. Em contraste com os dados do linfonodo mediastinal de animais alérgicos, houve redução de CD19⁺IgG1⁺, mas não de CD19⁺IgE⁺ no baço de animais somente sensibilizados. Esse achado pode refletir uma interferência do tratamento com anti-CD41 nos processos de troca de classe e maturação dos linfócitos B, uma vez que a formação de IgG1 é um passo anterior à produção de IgE de alta afinidade. Logo, a frequência de CD19⁺IgE⁺ ter se mantido neste grupo levanta a hipótese da troca de classe ocorrer fora dos centros germinativos (ASRAT *et al.*, 2020; GOWTHAMAN; CHEN; EISENBARTH, 2020).

Somando todos esses achados, há um indicativo consistente de que as plaquetas participam da formação e manutenção de linfócitos B produtores de

anticorpos, seja por meio de contatos diretos, como as interações CD40-CD40L, ou pela liberação de fatores solúveis, como o PF4. Essa hipótese se torna ainda mais relevante ao considerarmos que a troca de classe, a maturação e a geração de anticorpos de alta afinidade dependem não só do estímulo antigênico, mas também da presença de células de apoio no microambiente dos centros germinativos (HABERMAN *et al.*, 2019). Continuando com as análises da imunidade humoral, investigamos os níveis séricos de anticorpos específicos à OVA, bem como sua avidéz. Na literatura, estudos mostram que intervenções que afetam a ativação plaquetária são capazes de interferir na produção de anticorpos. Por exemplo, o estudo de Amison e colaboradores (2018) demonstrou que o tratamento com anti-CD42b reduziu os níveis séricos de IgE total (AMISON *et al.*, 2018). Já Tian e colaboradores (2015), ao utilizarem camundongos deficientes em CD154 (CD40L), relataram uma redução significativa nos níveis de IgE específica após indução de asma (TIAN *et al.*, 2015). No nosso caso, no entanto, os níveis de IgE e IgG1 específicas à OVA não foram afetados significativamente pelo tratamento com anti-CD41 em nenhum dos grupos alérgicos. Esses dados sugerem que, mesmo com a depleção parcial de plaquetas durante fases importantes da resposta alérgica, a produção de anticorpos ainda ocorreu. Contudo, o que chamou atenção foi a redução da avidéz dos anticorpos em animais alérgicos tratados, tanto para IgE quanto para IgG1, mas apenas de IgG1 em animais apenas sensibilizados. Isso indica que, embora a produção de imunoglobulinas específicas tenha sido preservada em termos quantitativos, sua qualidade foi comprometida. Como a avidéz sofre influência da seleção de células B nos centros germinativos (KIM *et al.*, 2022; MERKENSCHLAGER *et al.*, 2025), essa alteração reforça a hipótese de que as plaquetas possam estar envolvidas de forma mais relevante no desenvolvimento dos folículos linfóides secundários.

Diante da redução da avidéz dos anticorpos específicos à OVA nos grupos tratados, especialmente após os desafios com o alérgeno, levantou-se a hipótese de que o tratamento com anti-CD41 poderia estar interferindo na formação dos folículos linfóides. Isso porque, como discutido anteriormente, plaquetas podem modular a resposta adaptativa humoral tanto por interações diretas com linfócitos B quanto por meio da liberação de mediadores como o PF4, cuja queda também foi observada nos grupos tratados. Dessa forma, para investigar se a menor avidéz estaria associada a um prejuízo estrutural na montagem da resposta humoral adaptativa,

avaliamos histologicamente os centros germinativos no baço por imunohistoquímica. Os dados revelaram que o tratamento com anti-CD41 em animais alérgicos promoveu um aumento do número de folículos linfoides imaturos concomitantemente à redução de folículos linfoides secundários, onde se encontram os centros germinativos ativos (SONG; MATTHIAS, 2018; STEBEGG *et al.*, 2018). Por outro lado, não foram observadas diferenças significativas na área ocupada por esses folículos entre os grupos analisados. Isso indica que, embora a estrutura dos folículos secundários que conseguiram se formar tenha sido mantida, a quantidade que se formou foi menor. Ou seja, o tratamento parece não afetar o “tamanho” dos folículos secundários, mas sim sua ocorrência. Nossos dados não revelam os mecanismos exatos, mas indicam que o prejuízo na qualidade dos anticorpos e na formação dos folículos linfoides pode estar interligado, e que as plaquetas desempenham um papel importante na montagem da resposta humoral durante a alergia pulmonar.

Apesar dos achados relevantes observados neste estudo, algumas lacunas experimentais ainda permanecem e devem ser abordadas em investigações futuras. A análise das populações de linfócitos B e Th2 diretamente no tecido pulmonar, semelhante ao que foi realizado nos linfonodos, traria informações importantes sobre o recrutamento e a ativação dessas células no sítio inflamatório. A avaliação de citocinas de perfil Th2, como IL-4, IL-5 e IL-13, poderia se somar à compreensão da resposta inflamatória. Além disso, a investigação de possíveis efeitos da depleção plaquetária sobre outras populações celulares envolvidas na alergia pulmonar, como células T reguladoras (Tregs) ou ILC2 são de interesse para enriquecer o conhecimento sobre a participação das plaquetas na doença.

Em conjunto, observamos a formação de agregados entre plaquetas e leucócitos durante a inflamação, tanto no pulmão quanto nos órgãos linfoides. Só que, quando as plaquetas foram parcialmente removidas com o tratamento, ficou mais claro o quanto elas realmente interferem na resposta alérgica, em que sua presença ou ausência impactou de formas distintas os eosinófilos, macrófagos e linfócitos B e T. A influência na formação do infiltrado inflamatório pulmonar, a queda da avidéz, o menor número de folículos linfoides secundários e os baixos níveis de PF4 nos grupos tratados ajudam a reforçar essa ideia. Isso mostra que, apesar de não serem as células mais conhecidas da asma, as plaquetas possuem um papel importante. Elas interagem com várias células e essas interações parecem variar

dependendo do momento da resposta, o que ficou claro ao comparar os diferentes tempos de tratamento. Por isso, entender melhor quando e como elas atuam pode ser um caminho para pensar em estratégias que ajudem a controlar melhor a inflamação alérgica.

Dessa forma, os achados deste trabalho abrem novas possibilidades para entender melhor a asma alérgica também no contexto clínico. Por ser uma doença heterogênea e que muitas vezes coexiste com outras condições, como obesidade, rinite, doenças cardiovasculares ou até câncer, o tratamento nem sempre é simples, já que diferentes mecanismos podem estar envolvidos em cada paciente (LISTYOKO *et al.*, 2024). Nesse sentido, investigar o papel das plaquetas na inflamação ajuda a ampliar o olhar sobre novos alvos terapêuticos e sugere que estratégias voltadas para modular sua ativação ou interação com células do sistema imune possam, no futuro, contribuir para um controle mais individualizado da doença. Assim, além de gerar conhecimento básico, este estudo também traz reflexões que podem retornar para a comunidade, incentivando a busca por abordagens terapêuticas mais eficazes.

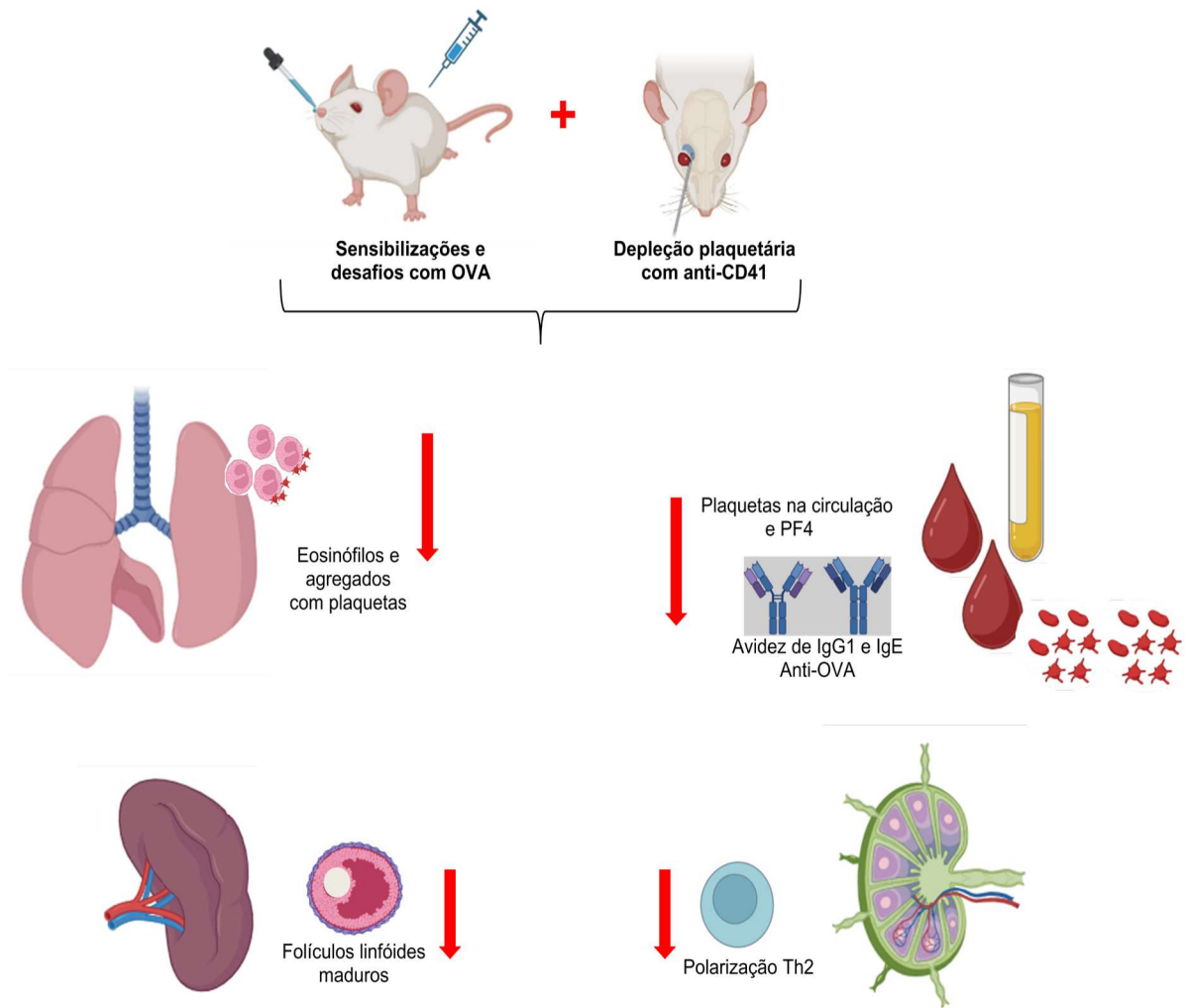


Figura 28: Resumo gráfico dos principais achados experimentais. A depleção plaquetária com anti-CD41 no modelo murino de alergia pulmonar induzida por OVA resultou em: menor quantidade de plaquetas circulantes na fase de sensibilização, redução dos níveis de PF4, queda da afinidade dos anticorpos IgG1 e IgE específicos, redução da formação de agregados com eosinófilos no pulmão e da infiltração eosinofílica pulmonar e prejuízo na polarização Th2 nos linfonodos mediastinais e na formação de folículos linfóides maduros no baço. Esses achados reforçam o papel das plaquetas em diferentes etapas da resposta imune na alergia pulmonar. Imagem criada com BioRender.

6. CONCLUSÃO

Tendo em vista os resultados apresentados, conclui-se que as plaquetas exercem papéis relevantes e variados no contexto da alergia pulmonar, atuando em diferentes etapas da resposta inflamatória. A formação de agregados com eosinófilos, macrófagos e leucócitos expressando IgE, observada já na primeira etapa, reforça sua atuação nessa resposta. A depleção plaquetária permitiu identificar impactos importantes sobre a infiltração de eosinófilos, polarização Th2 e qualidade da resposta humoral, especialmente em aspectos funcionais como a avidéz dos anticorpos específicos.

De modo geral, os resultados indicam que as plaquetas atuam na modulação e na qualidade da resposta alérgica, bem como em sua intensidade. O impacto do tratamento com anti-CD41 também parece variar de acordo com a fase da inflamação e com os tipos de células envolvidas, o que mostra que o papel das plaquetas é bem específico e que pode mudar conforme o contexto.

7. REFERÊNCIAS

- AARON, S. D. *et al.* Underdiagnosis and overdiagnosis of asthma. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, v. 198, n. 8, p. 1012–1020, 15 Oct. 2018.
- AKAR-GHIBRIL, N. *et al.* Allergic Endotypes and Phenotypes of Asthma. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice*, v. 8, n. 2, p. 429–440, Feb. 2020.
- AKDIS, C. Does the epithelial barrier hypothesis explain the increase in allergy, auto immunity and other chronic conditions? *Nature Reviews. Immunology*, v. 21, p. 739–751, 2021.
- AKKOC, T. *et al.* Mouse models of asthma: characteristics, limitations and future perspectives on clinical translation. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, v. 1376, p. 119–133, 2022.
- AMBROSIO, A. L.; DI PIETRO, S. M. Mechanism of platelet α -granule biogenesis: study of cargo transport and the VPS33B-VPS16B complex in a model system. *Blood Advances*, v. 3, n. 17, p. 2617–2626, 10 Sep. 2019.
- AMISON, R. T. *et al.* RhoA signaling through platelet P2Y₁ receptor controls leukocyte recruitment in allergic mice. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v. 135, n. 2, p. 528–538, Feb. 2015.
- AMISON, R. T. *et al.* Platelets play a central role in sensitization to allergen. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, v. 59, n. 1, p. 96–103, Jul. 2018.
- ANDERSON, K. G. *et al.* Intravascular staining for discrimination of vascular and tissue leukocytes. *Nature Protocols*, v. 9, n. 1, p. 209–222, 2 Jan. 2014.
- ANGÉNIEUX, C. *et al.* Time-Dependent Decay of mRNA and Ribosomal RNA during Platelet Aging and Its Correlation with Translation Activity. *Plos One*, v. 11, n. 1, p. e0148064, 25 Jan. 2016.
- ANTOSZ, K. *et al.* Insight into IL-5 as a Potential Target for the Treatment of Allergic Diseases. *Biomedicines*, v. 12, n. 7, 10 Jul. 2024.
- ASGHAR PASHA, M.; YANG, Q. Innate Lymphoid Cells in Airway Inflammation. *Lung Inflammation in Health and Disease*, v. 1, p. 183–191, 1 Apr. 2021.
- ASQUITH, N. L. *et al.* The bone marrow is the primary site of thrombopoiesis. *Blood*, v. 143, n. 3, p. 272–278, 18 Jan. 2024.
- ASRAT, S. *et al.* Chronic allergen exposure drives accumulation of long-lived IgE plasma cells in the bone marrow, giving rise to serological memory. *Science Immunology*, v. 5, n. 43, 10 Jan. 2020.
- BACHMANN, M. F. *et al.* On the role of antibody affinity and avidity in the IgE-mediated allergic response. *Allergy*, v. 80, n. 1, p. 37–46, Jan. 2025.

BALHARA, J.; GOUNNI, A. S. The alveolar macrophages in asthma: a double-edged sword. *Mucosal Immunology*, v. 5, n. 6, p. 605–609, Nov. 2012.

BERNI CANANI, R. *et al.* Skin, gut, and lung barrier: Physiological interface and target of intervention for preventing and treating allergic diseases. *Allergy*, v. 79, n. 6, p. 1485–1500, Jun. 2024.

BRYNJOLFSSON, S. F. *et al.* Long-lived plasma cells in human bone marrow can be either CD19+ or CD19–.pdf. *Blood Advances*, v. 1, n. 13, p. 835–838, 10 Apr. 2017.

BUSHRA, S. M. R.; NURUL, A. A. Murine Models of Allergic Asthma: Methodological Insights into Allergen Sensitization and Challenge Protocols. *Biomedical Research and Therapy*, v. 12, n. 4, p. 7320–7334, 30 Apr. 2025.

BUTTARELLO, M. *et al.* Reticulated platelets and immature platelet fraction: Clinical applications and method limitations. *International Journal of Laboratory Hematology*, v. 42, n. 4, p. 363–370, Aug. 2020.

CAMIOLO, M. J. *et al.* Immune responses and exacerbations in severe asthma. *Current Opinion in Immunology*, v. 72, p. 34–42, Oct. 2021.

CAO, Y. *et al.* Global trends in the incidence and mortality of asthma from 1990 to 2019: An age-period-cohort analysis using the global burden of disease study 2019. *Frontiers in public health*, v. 10, p. 1036674, 22 Nov. 2022.

CARROLL, O. R. *et al.* Advances in respiratory physiology in mouse models of experimental asthma. *Frontiers in physiology*, v. 14, p. 1099719, 16 Mar. 2023.

CASARI, M. *et al.* Macrophages and platelets in liver fibrosis and hepatocellular carcinoma. *Frontiers in Immunology*, v. 14, p. 1277808, 5 Dec. 2023.

CASARO, M. *et al.* OVA-Induced Allergic Airway Inflammation Mouse Model. *Methods in Molecular Biology*, v. 1916, p. 297–301, 2019.

CHIHARA, J. *et al.* Priming effect of RANTES on eosinophil oxidative metabolism. *European Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v. 53, p. 1178–1182, Dec. 1998.

CHOI, Y. *et al.* Eosinophil extracellular traps activate type 2 innate lymphoid cells through stimulating airway epithelium in severe asthma. *Allergy*, v. 75, n. 1, p. 95–103, Jan. 2020.

CHOW, Y.-H. *et al.* Intravascular Leukocyte Labeling Refines the Distribution of Myeloid Cells in the Lung in Models of Allergen-induced Airway Inflammation. v. 7, n. 12, p. 853–860, 1 Dec. 2023.

CHUNG, K. F. *et al.* Characteristics, phenotypes, mechanisms and management of severe asthma. *Chinese Medical Journal*, v. 135, n. 10, p. 1141–1155, 20 May 2022.

COGNASSE, F. *et al.* Platelets as key factors in inflammation: focus on CD40L/CD40. *Frontiers in Immunology*, v. 13, p. 825892, 3 Feb. 2022.

COSTA, I. G. M. *et al.* 118 Perfil epidemiológico de Morbidade Hospitalar por Asma no Brasil, entre 2019 e 2023 - Estudo Ecológico entre 2019 e 2023.pdf. Brazilian Journal of Implantology and Health Sciences, v. 6, n. 7, p. 1480–1496, 2024.

CRESCENTE, M. *et al.* Eicosanoids in platelets and the effect of their modulation by aspirin in the cardiovascular system (and beyond). British Journal of Pharmacology, v. 176, n. 8, p. 988–999, Apr. 2019.

DATTOLI, S. D. *et al.* DS-70, a novel and potent $\alpha 4$ integrin antagonist, is an effective treatment for experimental allergic conjunctivitis in guinea pigs. British Journal of Pharmacology, v. 175, n. 20, p. 3891–3910, Oct. 2018.

DIB, P. R. B. *et al.* Innate immune receptors in platelets and platelet-leukocyte interactions. Journal of Leukocyte Biology, v. 108, n. 4, p. 1157–1182, Oct. 2020.

DUCHESNE, M.; OKOYE, I.; LACY, P. Epithelial cell alarmin cytokines: Frontline mediators of the asthma inflammatory response. Frontiers in Immunology, v. 13, p. 975914, 14 Oct. 2022.

DUMAN ŞENOL, H. *et al.* Which has an influence on mean platelet volume: allergic rhinitis or asthma? Journal of Psychology Research, v. 9, n. 3, p. 223–227, 1 Sep. 2022.

DUPUIS, A. *et al.* Platelet δ -Storage Pool Disease: An Update. Journal of clinical medicine, v. 9, n. 8, 4 Aug. 2020.

DURRANT, T. N.; VAN DEN BOSCH, M. T.; HERS, I. Integrin $\alpha \text{IIb}\beta 3$ outside-in signaling. Blood, v. 130, n. 14, p. 1607–1619, 5 Oct. 2017.

EICHHORN, T. *et al.* Expression of Tissue Factor and Platelet/Leukocyte Markers on Extracellular Vesicles Reflect Platelet-Leukocyte Interaction in Severe COVID-19. International Journal of Molecular Sciences, v. 24, n. 23, 28 Nov. 2023.

EICHWALD, T.; TALBOT, S. Aching to defend: spleen innervation drives humoral immunity. Trends in Immunology, v. 45, n. 8, p. 574–576, Aug. 2024.

ELZEY, B. D. *et al.* Cooperation between platelet-derived CD154 and CD4+ T cells for enhanced germinal center formation. Journal of Leukocyte Biology, v. 78, n. 1, p. 80–84, Jul. 2005.

ESTEVEZ, B.; DU, X. New concepts and mechanisms of platelet activation signaling. Physiology, v. 32, n. 2, p. 162–177, Mar. 2017.

FENG, H.; ZHAO, Z.; DONG, C. Adapting to the world: The determination and plasticity of T follicular helper cells. The Journal of Allergy and Clinical Immunology, v. 150, n. 5, p. 981–989, Nov. 2022.

FEO-LUCAS, L. *et al.* Airway allergy causes alveolar macrophage death, profound alveolar disorganization and surfactant dysfunction. Frontiers in Immunology, v. 14, p. 1125984, 10 May 2023.

FIELD, D. J. *et al.* Platelet factor 4 increases bone marrow B cell development and differentiation. *Immunologic Research*, v. 65, n. 5, p. 1089–1094, Oct. 2017.

FIUZA, B. S. D. *et al.* Understanding asthma and allergies by the lens of biodiversity and epigenetic changes. *Frontiers in Immunology*, v. 12, 01 Mar. 2021.

FREY, A. *et al.* More than just a barrier: the immune functions of the airway epithelium in asthma pathogenesis. *Frontiers in Immunology*, v. 11, p. 761, 28 Apr. 2020.

GAVITT, T. D. *et al.* A GATA3 targeting nucleic acid nanocapsule for in vivo gene regulation in asthma. *ACS Nano*, v. 15, n. 7, p. 11192–11201, 27 Jul. 2021.

GINA. Global Strategy for Asthma Management and Prevention. <https://ginasthma.org/2025-gina-strategy-report/>, Ago 2025.

GODSON, C. Balancing the effect of leukotrienes in asthma. *The New England Journal of Medicine*, v. 382, n. 15, p. 1472–1475, 9 Apr. 2020.

GON, Y.; HASHIMOTO, S. Role of airway epithelial barrier dysfunction in pathogenesis of asthma. *Allergology International*, v. 67, p. 12–17, 2018.

GOWTHAMAN, U.; CHEN, J. S.; EISENBARTH, S. C. Regulation of IgE by T follicular helper cells. *Journal of Leukocyte Biology*, v. 107, n. 3, p. 409–418, Mar. 2020.

GOWTHAMAN, U. *et al.* Identification of a T follicular helper cell subset that drives anaphylactic IgE. *Science*, v. 365, n. 6456, 30 Aug. 2019.

GRANAIA, M. *et al.* Impact of P-selectin e PSGL-1 Axis on Platelet-Endothelium-Leukocyte Interactions in Fatal COVID-19 . *Laboratory Investigation*, v. 103, n. 100179, 2023.

GREMMEL, T.; FRELINGER, A. L.; MICHELSON, A. D. Platelet Physiology. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, v. 42, n. 3, p. 191–204, Apr. 2016.

GRUBA, S. *et al.* Platelet response to allergens, CXCL10, and CXCL5 in the context of asthma. *ACS Bio & Med Chem Au*, v. 3, n. 1, p. 87–96, 15 Feb. 2023.

GUO, L.; RONDINA, M. T. The era of thromboinflammation: platelets are dynamic sensors and effector cells during infectious diseases. *Frontiers in Immunology*, v. 10, p. 2204, 13 Sep. 2019.

HABERMAN, A. M. *et al.* Germinal center B cell initiation, GC maturation, and the coevolution of its stromal cell niches. *Immunological Reviews*, v. 288, n. 1, p. 10–27, Mar. 2019.

HACEIN-BEY-ABINA, S. *et al.* Erythropoietin is a major regulator of thrombopoiesis in thrombopoietin-dependent and -independent contexts. *Experimental Hematology*, v. 88, p. 15–27, 2020. doi:10.1016/j.exphem.2020.07.006.

HAMMAD, H.; LAMBRECHT, B. N. The basic immunology of asthma. *Cell*, v. 184, n. 6, p. 1469–1485, 18 Mar. 2021.

HEAZLEWOOD, S. Y. *et al.* High ploidy large cytoplasmic megakaryocytes are hematopoietic stem cells regulators and essential for platelet production. *Nature Communications*, v. 14, n. 1, p. 2099, 13 Apr. 2023.

HELLINGS, P. W.; STEELANT, B. Epithelial barriers in allergy and asthma. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v. 145, n. 6, p. 1499–1509, Jun. 2020.

HOEHN, K. Scripts for “CD23+IgG1+ memory B cells are poised to switch to pathogenic IgE production in food allergy.” Zenodo, 2023.

HOOFF, I. *et al.* Allergen-specific IgG+ memory B cells are temporally linked to IgE memory responses. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v. 146, n. 1, p. 180–191, Jul. 2020.

HU, H. *et al.* Observation on the efficacy of TPO receptor agonists and platelet transfusion in chemotherapy-induced thrombocytopenia in malignant tumors. *World Journal of Surgical Oncology*, vol.23, n. 13. 2025.

IZQUIERDO, E. *et al.* Epithelial Barrier: Protector and Trigger of Allergic Disorders. *Journal of Investigational Allergology & Clinical Immunology*, v. 32, n. 2, p. 81–96, 19 Apr. 2022.

JANUSKEVICIUS, A. *et al.* The Enhanced Adhesion of Eosinophils Is Associated with Their Prolonged Viability and Pro-Proliferative Effect in Asthma. *Journal of clinical medicine*, v. 8, n. 9, 22 Aug. 2019.

JIANG, Y. *et al.* Identification of potential biomarkers and immune infiltration characteristics in severe asthma. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*, v. 36, p. 3946320221114194, 2022.

JIA, G. *et al.* Discerning asthma endotypes through comorbidity mapping. *Nature Communications*, v. 13, n. 1, p. 6712, 7 Nov. 2022.

JI, T.; LI, H. T-helper cells and their cytokines in pathogenesis and treatment of asthma. *Frontiers in Immunology*, v. 14, p. 1149203, 12 Jun. 2023.

JOHANSSON, M. W.; MOSHER, D. F. Activation of beta1 integrins on blood eosinophils by P-selectin. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, v. 45, n. 4, p. 889–897, Oct. 2011.

JOHANSSON, M. W. *et al.* Platelet activation, P-selectin, and eosinophil $\beta 1$ -integrin activation in asthma. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, v. 185, n. 5, p. 498–507, 1 Mar. 2012.

JOHANSSON, M. W. *et al.* Plasma P-Selectin Is Inversely Associated with Lung Function and Corticosteroid Responsiveness in Asthma. *International Archives of Allergy and Immunology*, v. 181, n. 11, p. 879–887, 10 Aug. 2020.

JURK, K.; E KEHREL, B. Platelets: Physiology and Biochemistry. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, v. 5, p. 794–803, 12 Dec. 2023.

KASER, U. *et al.* Interleukin-6 stimulates thrombopoiesis through thrombopoietin: role in inflammatory thrombocytosis. *Blood*, v. 98, n. 9, p. 2720-2725, Nov. 2001.

KAPUR, R.; SEMPLE, J. W. Platelets instruct T reg cells and macrophages in the resolution of lung inflammation. *The Journal of Experimental Medicine*, v. 218, n. 7, 5 Jul. 2021.

KARTA, M. R. *et al.* Platelets attach to lung type 2 innate lymphoid cells (ILC2s) expressing P-selectin glycoprotein ligand 1 and influence ILC2 function. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v. 144, n. 4, p. 1112- 1115.e8, Oct. 2019.

KIM, W. *et al.* Germinal centre-driven maturation of B cell response to mRNA vaccination. *Nature*, v. 604, n. 7904, p. 141–145, Apr. 2022.

KOJOK, K. *et al.* CD40L Priming of Platelets via NF- κ B Activation is CD40- and TAK1-Dependent. *Journal of the American Heart Association*, v. 7, n. 23, p. e03677, 4 Dec. 2018.

KORNILUK, A. *et al.* Mean platelet volume (MPV): new perspectives for an old marker in the course and prognosis of inflammatory conditions. *Mediators of Inflammation*, v. 2019, p. 9213074, 17 Apr. 2019.

KOUPENOVA, M. *et al.* Circulating platelets as mediators of immunity, inflammation, and thrombosis. *Circulation Research*, v. 122, n. 2, p. 337–351, 19 Jan. 2018.

KOWAL, K. *et al.* Platelet activation in allergic asthma patients during allergen challenge with *Dermatophagoides pteronyssinus*. *Clinical and Experimental Allergy*, v. 36, n. 4, p. 426–432, Apr. 2006.

KUBO, M. Mast cells and basophils in allergic inflammation. *Current Opinion in Immunology*, v. 54, p. 74–79, Oct. 2018.

KUBO, M.; HARADA, Y.; SASAKI, T. The role of dendritic cells in the instruction of helper T cells in the allergic march. *International Immunology*, v. 36, n. 11, p. 559–566, 26 Oct. 2024.

KURUVILLA, M. E.; LEE, F. E.-H.; LEE, G. B. Understanding asthma phenotypes, endotypes, and mechanisms of disease. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*, v. 56, n. 2, p. 219–233, Apr. 2019.

KUSZYNSKI, D. S.; LAUVER, D. A. Pleiotropic effects of clopidogrel. *Purinergic Signalling*, v. 18, n. 3, p. 253–265, Sep. 2022.

KYTIKOVA, O. *et al.* Pro-Resolving Lipid Mediators in the Pathophysiology of Asthma. *Medicina (Kaunas, Lithuania)*, v. 55, n. 6, 18 Jun. 2019.

LAMKIOUED, B.; GOUNNI, A. S. CX3CR1+ alveolar macrophages: A new player in lung eosinophil homeostasis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, v. 207, n. 11, p. 1413–1415, 1 Jun. 2023.

LAVANDOSKI, P. *et al.* Eotaxin-1/CCL11 promotes cellular senescence in human-derived fibroblasts through pro-oxidant and pro-inflammatory pathways. *Frontiers in Immunology*, v. 14, p. 1243537, 4 Oct. 2023.

LEVY, M. L. *et al.* Key recommendations for primary care from the 2022 Global Initiative for Asthma (GINA) update. *NPJ primary care respiratory medicine*, v. 33, n. 1, p. 7, 8 Feb. 2023.

LIMA, D. S.; ALHAMWE, B. A. Epigenetics, hypersensitivity and asthma: what do we know so far?. *Clínica e Pesquisa em Pediatria*, 2023.

LISTYOKO, A.S. *et al.* Exploring the association between asthma and chronic comorbidities: impact on clinical outcomes. *Frontiers in Medicine*, Lausanne, v. 11, e1305638, 26 Jan. 2024.

LIU, T. *et al.* Cysteinyl leukotriene receptor 2 drives lung immunopathology through a platelet and high mobility box 1-dependent mechanism. *Mucosal Immunology*, v. 12, n. 3, p. 679–690, May 2019.

LU, Y. *et al.* Eosinophil extracellular traps drive asthma progression through neuro-immune signals. *Nature Cell Biology*, v. 23, n. 10, p. 1060–1072, 6 Oct. 2021.

ŁUKASIK, Z. M.; MAKOWSKI, M.; MAKOWSKA, J. S. From blood coagulation to innate and adaptive immunity: the role of platelets in the physiology and pathology of autoimmune disorders. *Rheumatology International*, v. 38, n. 6, p. 959–974, Jun. 2018.

LUO, L. *et al.* Platelets, not an insignificant player in development of allergic asthma. *Cells*, v. 10, n. 8, 10 Aug. 2021.

MACCHIA, I. *et al.* Eosinophils as potential biomarkers in respiratory viral infections. *Frontiers in Immunology*, v. 14, p. 1170035, 6 Jul. 2023.

MALAYA, E. *et al.* Th2-High Severe Asthma with Hypereosinophilia in the Spectrum of Type 2 Inflammatory Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 26, n. 11, 2 Jun. 2025.

MANDEL, J. *et al.* Beyond hemostasis: platelet innate immune interactions and thromboinflammation. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 23, n. 7, 31 Mar. 2022.

MAOUIA, A. *et al.* The immune nature of platelets revisited. *Transfusion Medicine Reviews*, v. 34, n. 4, p. 209–220, Oct. 2020.

MARSHALL, C. L.; HASANI, K.; MOOKHERJEE, N. Immunobiology of Steroid-Unresponsive Severe Asthma. *Frontiers in Allergy*, v. 2, p. 718267, 27 Aug. 2021.

MARX, C. *et al.* Eosinophil-platelet interactions promote atherosclerosis and stabilize thrombosis with eosinophil extracellular traps. *Blood*, v. 134, n. 21, p. 1859–1872, 21 Nov. 2019.

MASOPUST, D.; SIVULA, C. P.; JAMESON, S. C. Of mice, dirty mice, and men: using mice to understand human immunology. *Journal of Immunology*, v. 199, n. 2, p. 383–388, 15 Jul. 2017.

MATSUDA, A. Platelets: pivotal player in primary sensitization to allergen? *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, v. 59, n. 1, p. 7–8, Jul. 2018.

MATSUYAMA, T. *et al.* TNF superfamily and ILC2 activation in asthma. *Biomolecules*, v. 14, n. 3, 29 Feb. 2024.

MCDONNELL, J. M. *et al.* IgE, IgE Receptors and Anti-IgE Biologics: Protein Structures and Mechanisms of Action. *Annual Review of Immunology*, 3 Feb. 2022.

MEI, H. E. *et al.* A unique population of IgG-expressing plasma cells lacking CD19 is enriched in human bone marrow. *Blood*, v. 125, n. 11, p. 1739–1748, 12 Mar. 2015.

MERKENSCHLAGER, J. *et al.* Regulated somatic hypermutation enhances antibody affinity maturation. *Nature*, v. 641, n. 8062, p. 495–502, May 2025.

MIKI, H. *et al.* Clearance of apoptotic cells by lung alveolar macrophages prevents development of house dust mite-induced asthmatic lung inflammation. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v. 147, n. 3, p. 1087–1092.e3, Mar. 2021.

MIN, Y. *et al.* Platelets fine-tune effector responses of naïve CD4⁺ T cells via platelet factor 4-regulated transforming growth factor β signaling. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 79, n. 5, p. 247, 18 Apr. 2022.

MIYASAKA, T. *et al.* Sex plays a multifaceted role in asthma pathogenesis. *Biomolecules*, v. 12, n. 5, 29 Apr. 2022.

MORIANOS, I.; SEMITEKOLOU, M. Dendritic cells: critical regulators of allergic asthma. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 21, n. 21, 26 Oct. 2020.

MORODOMI, Y. *et al.* Mechanisms of anti-GPIIb α antibody-induced thrombocytopenia in mice. *Blood*, v. 135, n. 25, p. 2292–2301, 18 Jun. 2020.

MUKHERJEE, P. *et al.* Role of animal models in biomedical research: a review. *Laboratory animal research*, v. 38, n. 1, p. 18, 1 Jul. 2022.

NTONTSI, P. *et al.* Genetics and Epigenetics in Asthma. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 22, n. 5, p. 2412, 27 Feb. 2021.

OPNEJA, A.; KAPOOR, S.; STAVROU, E. X. Contribution of platelets, the coagulation and fibrinolytic systems to cutaneous wound healing. *Thrombosis Research*, v. 179, p. 56–63, Jul. 2019.

ORIMO, K. *et al.* Direct platelet adhesion potentiates group 2 innate lymphoid cell functions. *Allergy*, v. 77, n. 3, p. 843–855, Mar. 2022.

PELAIA, C. *et al.* Interleukin-5 in the Pathophysiology of Severe Asthma. *Frontiers in physiology*, v. 10, p. 1514, 17 Dec. 2019.

PITCHFORD, S. *et al.* Pharmacological strategies for targeting platelet activation in asthma. *Current Opinion in Pharmacology*, v. 46, p. 55–64, Jun. 2019.

PITCHFORD, S. C. *et al.* Allergen induces the migration of platelets to lung tissue in allergic asthma. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, v. 177, n. 6, p. 604–612, 15 Mar. 2008.

PRADO, C. A. *et al.* Características Epidemiológicas da ASMA no Brasil. *Brazilian Journal of Implantology and Health Sciences*, v. 6, n. 8, p. 2366–2379, 2024.

QIAN, H. *et al.* Associations of Platelet Count with Inflammation and Response to Anti-TNF- α Therapy in Patients with Ankylosing Spondylitis. *Frontiers in pharmacology*, v. 11, p. 559593, 6 Nov. 2020.

RADHOUANI, M.; STARKL, P. Adjuvant-independent airway sensitization and infection mouse models leading to allergic asthma. *Frontiers in Allergy*, v. 5, p. 1423938, 2 Aug. 2024.

RAMIREZ-UBILLUS, G. C. *et al.* Validation of a new method for estimating low platelet counts: G&S method. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, 2020.

RICCIARDOLO, F. L. M. *et al.* Characterization of T2-Low and T2-High Asthma Phenotypes in Real-Life. *Biomedicines*, v. 9, n. 11, 13 Nov. 2021.

RIFFO-VASQUEZ, Y. *et al.* A Non-Anticoagulant Fraction of Heparin Inhibits Leukocyte Diapedesis into the Lung by an Effect on Platelets. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, v. 55, n. 4, p. 554–563, Oct. 2016.

ROSSAINT, J. *et al.* Platelets orchestrate the resolution of pulmonary inflammation in mice by T reg cell repositioning and macrophage education. *The Journal of Experimental Medicine*, v. 218, n. 7, 5 Jul. 2021.

SAGMEN, S. B. The evaluation of neutrophil-to-lymphocyte ratio and platelet-to-lymphocyte ratio in asthma control. *Revue Française d'Allergologie*, v. 60, n. 1, p. 20–23, 2020.

SALZMANN, M. *et al.* Genetic platelet depletion is superior in platelet transfusion compared to current models. *Haematologica*, v. 105, n. 6, p. 1738–1749, Jun. 2020.

SATITSUKSANO, P. *et al.* B cells: The many facets of B cells in allergic diseases. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v. 152, n. 3, p. 567–581, Sep. 2023.

SCHERLINGER, M. *et al.* The role of platelets in immune-mediated inflammatory diseases. *Nature Reviews. Immunology*, v. 23, n. 8, p. 495–510, Aug. 2023.

SCHUIJS, M. J.; HAMMAD, H.; LAMBRECHT, B. N. Professional and “Amateur” Antigen-Presenting Cells In Type 2 Immunity. *Trends in Immunology*, v. 40, n. 1, p. 22–34, Jan. 2019.

SEUMOIS, G. *et al.* Single-cell transcriptomic analysis of allergen-specific T cells in allergy and asthma. *Science Immunology*, v. 5, n. 48, 12 Jun. 2020.

SHAH, S. A. *et al.* Platelets Independently Recruit into Asthmatic Lungs and Models of Allergic Inflammation via CCR3. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, v. 64, n. 5, p. 557–568, May 2021.

SHEN, K. *et al.* Eosinophil extracellular traps in asthma: implications for pathogenesis and therapy. *Respiratory Research*, v. 24, n. 1, p. 231, 26 Sep. 2023.

SONG, S.; MATTHIAS, P. D. The transcriptional regulation of germinal center formation. *Frontiers in Immunology*, v. 9, p. 2026, 5 Sep. 2018.

STARK, K.; MASSBERG, S. Interplay between inflammation and thrombosis in cardiovascular pathology. *Nature Reviews. Cardiology*, v. 18, n. 9, p. 666–682, Sep. 2021.

STEBEGG, M. *et al.* Regulation of the germinal center response. *Frontiers in Immunology*, v. 9, p. 2469, 25 Oct. 2018.

SUN, S. *et al.* Single-cell analysis of ploidy and the transcriptome reveals functional and spatial divergency in murine megakaryopoiesis. *Blood*, v. 138, n. 14, p. 1211–1224, 7 Oct. 2021.

TAKEDA, T. *et al.* Platelets constitutively express IL-33 protein and modulate eosinophilic airway inflammation. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v. 138, n. 5, p. 1395–1403.e6, Nov. 2016.

TEE, J. H. *et al.* Isthmin-1 attenuates allergic Asthma by stimulating adiponectin expression and alveolar macrophage efferocytosis in mice. *Respiratory Research*, v. 24, n. 1, p. 269, 6 Nov. 2023.

TIAN, J. *et al.* Platelets promote allergic asthma through the expression of CD154. *Cellular & Molecular Immunology*, v. 12, n. 6, p. 700–707, Nov. 2015.

TIAN, Y. *et al.* Platelets and diseases: signal transduction and advances in targeted therapy. *Signal transduction and targeted therapy*, v. 10, n. 1, p. 159, 16 May 2025.

TRIVEDI, A.; REED, H. O. The lymphatic vasculature in lung function and respiratory disease. *Frontiers in medicine*, v. 10, p. 1118583, 14 Mar. 2023.

VAN DER MEIJDEN, P. E. J.; HEEMSKERK, J. W. M. Platelet biology and functions: new concepts and clinical perspectives. *Nature Reviews. Cardiology*, v. 16, n. 3, p. 166–179, Mar. 2019.

VAN HULST, G. *et al.* Eosinophildiversity in asthma. *Biochemical Pharmacology*, v. 179, p. 113963, Sep. 2020.

VAZQUEZ, J. *et al.* Deciphering decidual leukocyte traffic with serial intravascular staining. *Frontiers in Immunology*, v. 14, p. 1332943, 2023.

WANG, Y. *et al.* CD30 influences germinal center B-cell dynamics and the expansion of IgG1-switched B cells. *Cellular & Molecular Immunology*, v. 21, n. 12, p. 1410–1425, Dec. 2024.

WOODROW, J. S. *et al.* Asthma: the use of animal models and their translational utility. *Cells*, v. 12, n. 7, 5 Apr. 2023.

WOO, Y. D.; JEONG, D.; CHUNG, D. H. Development and functions of alveolar macrophages. *Molecules and Cells*, v. 44, n. 5, p. 292–300, 31 May 2021.

WU, Z. *et al.* Study effect of probiotics and prebiotics on treatment of OVA-LPS-induced of allergic asthma inflammation and pneumonia by regulating the TLR4/NF- κ B signaling pathway. *Journal of Translational Medicine*, v. 20, n. 1, p. 130, 16 Mar. 2022.

XIANG, J. *et al.* TFEB regulates dendritic cell antigen presentation to modulate immune balance in asthma. *Respiratory Research*, v. 25, n. 1, p. 182, 25 Apr. 2024.

XUAN, S. *et al.* The implication of dendritic cells in lung diseases: Immunological role of toll-like receptor 4. *Genes & diseases*, v. 11, n. 6, p. 101007, Nov. 2024.

YAMAMOTO, H. *et al.* The evidence of platelet activation in bronchial asthma. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v. 91, n. 1 Pt 1, p. 79–87, Jan. 1993.

YANG, X. Y. *et al.* The role of macrophages in asthma-related fibrosis and remodelling. *Pharmacology & Therapeutics*, v. 269, p. 108820, May 2025.

YUE, M. *et al.* Emerging roles of platelets in allergic asthma. *Frontiers in Immunology*, v. 13, p. 846055, 1 Apr. 2022.

ZHENG, Y. *et al.* Critical role for mouse marginal zone B cells in pf4/heparin antibody production. *Blood*, v. 120, n. 21, p. 1175–1175, 25 Apr. 2013.

ANEXOS

Anexo I: Tabela com dados leucocitários do hemograma de todos os grupos experimentais 24h após último desafio ou sensibilização com OVA.

Parâmetro	CN (n=5)	OVA (n=7)	OVA-DT (n=7)	OVA-ST (n=7)	SENS (n=7)	SENS-T (n=7)
Leucócitos, $\times 10^3/\mu\text{L}$	2,99 (2,12-3,64)	3,65 (3,03-4,78)	3,25 (2,02-4,59)	3,07 (2,42-3,51)	2,34 (1,77-3,46)	1,36 (1,05-1,75)**
Linfócitos, $\times 10^3/\mu\text{L}$	2,18 (1,96-2,41)	2,21 (1,41-2,72)	2,03 (1,25-3,03)	1,76 (1,38-2,08)	1,41 (0,19-2,17)	0,88 (0,07-2,13)
Linfócitos, %	76,97(66,1-92,5)	60,57(46,5-77,6)**	62,98 (55,3-71,2)	58,04 (53,5-61,9)	74,4 (67,9-80,4)	48,11 (5,5-81,0)
Neutrófilos, $\times 10^2/\mu\text{L}$	5,56 (1,2-8,8)	6,60 (4,4-7,9)	6,08 (6,08-8,50)	6,61 (4,9-9,4)	5,55 (3,5-9,5)	3,9 (2,2-5,7)
Neutrófilos, %	17,56 (5,6-26,1)	18,45 (13,7-26,1)	18,90 (17,6-20,0)	18,98 (11,7-24,1)	24,02 (17,0-36,9)	31,11 (16,6-44,5)
Eosinófilos, $\times 10^2/\mu\text{L}$	0,32 (0,1-0,5)	1,54 (1,00-3,30)*	1,24 (0,4-2,4)	0,65 (0,3-1,3)	2,48 (0,4-4,0)	2,57 (1,0-5,0)
Eosinófilos, %	1,08 (0,6-1,5)	4,78 (3,2-7,0)**	3,68 (2,0-7,3)	2,45 (1,2-4,0)**	1,4 (1,1-2,0)	1,44 (0,5-2,9)
Monócitos, $\times 10^2/\mu\text{L}$	2,15 (0,3-4,7)	6,21 (1,7-9,4)*	4,81 (1,6-8,8)	6,1 (4,2-8,2)	0,8 (0,2-1,8)	2,42 (0,2-6,1)
Monócitos, %	6,57 (1,2-12,9)	16,72 (5,3-22,7)*	14,45 (5,7-23,2)	20,74 (13,3-26,4)	3,4 (1,2-6,3)	18,97 (1,5-48,3)
Basófilos, $\times 10/\mu\text{L}$	0,2 (0,0-1,0)	0,57 (0,0-2,0)	0,14 (0,0-1,0)	0,42 (0,0-1,0)	0,28 (0-1)	0 (0-0)
Basófilos, %	0,08 (0,0-0,2)	0,12 (0,0-0,2)	0,1 (0,0-0,4)	0,12 (0,0-0,3)	0,13 (0-0,3)	0,03 (0-0,1)

Os dados estão expressos como média (mínimo–máximo) por grupo. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ – OVA vs. CN; OVA-DT e OVA-ST vs. OVA; SENS-T vs. SENS.

Anexo II: Tabela com dados plaquetários do hemograma de todos os grupos experimentais 24h após último desafio ou sensibilização com OVA.

Parâmetro	CN (n=5)	OVA (n=7)	OVA-DT (n=7)	OVA-ST (n=7)	SENS (n=7)	SENS-T (n=7)
Plaquetas, $\times 10^5/\mu\text{L}$	3,16 (1,70-4,47)	6,88 (4,88-8,96)***	7,59 (4,60-9,02)	6,73 (3,59-8,88)	4,17 (2,38-5,88)	2,28 (0,84-3,37)**
MPV, fL	5,48 (5,3-5,7)	5,58 (5,4-5,9)	6,28 (5,8-6,6)***	5,68 (5,3-5,9)	5,34 (5,0-5,8)	5,91 (5,6-6,6)**
PDW, %	14,98 (14,8-15,3)	14,95 (14,7-15,3)	15,07 (14,8-15,5)	14,98 (14,6-15,3)	14,74 (14,4-15,0)	14,80 (14,7-14,9)
PCT, %	0,17 (0,09-0,23)	0,38 (0,27-0,49)**	0,47 (0,28-0,56)	0,38 (0,20-0,51)	0,23 (0,17-0,30)	0,13 (0,05-0,19)**
IPF, %	1,16 (0,6-1,7)	0,37 (0,2-0,6)**	0,41 (0,4-0,5)	0,33 (0,3-0,4)	0,72 (0,6-1,0)	0,96 (0,7-1,1)*
P-LCC, $\times 10^{10}/\text{L}$	1,18 (1,0-1,3)	2,85 (2,1-4,9)	5,2 (2,8-8,1)	3,14 (1,5-4,4)	1,1 (0,4-1,6)	1,06 (0,6-1,5)
P-LCR, %	4,04 (2,8-6,1)	4,15 (3,4-5,9)	6,34 (3,9-7,6)*	4,55 (2,6-6,4)	2,84 (1,1-4,7)	4,36 (3,4-6,5)

Os dados estão expressos como média (mínimo–máximo) por grupo. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ – OVA vs. CN; OVA-DT e OVA-ST vs. OVA; SENS-T vs. SENS. MPV: volume plaquetário médio (meanplatelet volume); PDW: amplitude de distribuição plaquetária (plateletdistributionwidth); PCT: procalcitonina; IPF: fração de plaquetas imaturas (immatureplateletfraction); P-LCC: contagem absoluta de plaquetas grandes (plateletlargecellcount); P-LCR: percentual de plaquetas grandes (plateletlargecellratio).