

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA

ALINE DIAS DE ALMEIDA

**PAPEL DO RECEPTOR ATIVADO POR PROTEASE (PAR)2 E DE
PROTEASES ENDÓGENAS ATIVADORAS DE PAR2 NO
RECRUTAMENTO DE NEUTRÓFILOS INDUZIDO POR LPS EM
PULMÃO DE CAMUNDONGOS C57BL/6**

Belo Horizonte

2019

ALINE DIAS DE ALMEIDA

**PAPEL DO RECEPTOR ATIVADO POR PROTEASE (PAR)2 E DE
PROTEASES ENDÓGENAS ATIVADORAS DE PAR2 NO
RECRUTAMENTO DE NEUTRÓFILOS INDUZIDO POR LPS EM
PULMÃO DE CAMUNDONGOS C57BL/6**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do grau de mestre em Ciências Biológicas.

Área de concentração: Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. André Klein.

Belo Horizonte

2019

**"PAPEL DO RECEPTOR ATIVADO POR PROTEASE (PAR)2 E
DE PROTEASES ENDÓGENAS ATIVADORAS DE PAR2 NO
RECRUTAMENTO DE NEUTRÓFILOS INDUZIDO POR LPS EM
PULMÃO DE CAMUNDONGOS C57BL/6"**

ALINE DIAS DE ALMEIDA

Dissertação de Mestrado defendida e aprovada, no dia **08 de julho de 2019**, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores:


PROFA. DRA. MARIA DE FÁTIMA MARTINS HORTA
ICB/UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS


PROFA. DRA. MARINA GOMES MIRANDA E CASTOR ROMERO
ICB/UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS


PROF. DR. ANDRÉ KLEIN
ICB/UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ORIENTADOR

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Fisiologia e Farmacologia
Instituto de Ciências Biológicas - Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Belo Horizonte, 08 de julho de 2019

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Gonçalo (*in memoriam*) e Geralda, ao meu irmão Alex e ao Bruno por todo amor e incentivo a cada conquista.

“Uma vida sem desafios não vale a pena ser vivida”.

(Sócrates)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me permitir realizar esse estudo com fé, saúde e determinação.

Ao meu orientador, André Klein, pela dedicação, conselhos, orientação científica, sugestões, esclarecimentos, pela oportunidade e confiança na realização desse trabalho.

Aos meus pais, Gonçalo e Geralda, pelo amor incondicional, exemplo de honestidade, dedicação e apoio em todas as minhas conquistas. E ao meu irmão pelo seu companheirismo.

A minha querida amiga Irismara, pelo carinho, compartilhamento de idéias, pela confiança, apoio em minhas decisões, pelo incentivo e por estar sempre presente em momentos de alegria e dificuldades.

Ao Bruno, por todo amor, apoio e por incentivar as minhas realizações.

Aos amigos Ayslan e Natália, pelos bons momentos no laboratório e por todos os ensinamentos.

Aos amigos Antônio e Wesley, pelo apoio na realização desse trabalho, incentivo, pelos momentos de entretenimento e por sempre estarem dispostos a ajudar.

A Banca Examinadora, pela contribuição para o aprimoramento desse trabalho e atenção dispensada em sua leitura.

Aos amigos da pós-graduação: Lucas, Katinha, Andressa, Marcone, Rodrigo, Bárbara, Flávia, Emylle e Natália Muradas pelos momentos de carinho, força e distração.

A professora Regina Maria De Marco T. Maia, pelos valiosos conselhos, apoio, disponibilidade e exemplo de dedicação ao trabalho.

Ao professor Luciano dos Santos Aggum Capettini, pela atenção e disposição em compartilhar seus conhecimentos.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia, pelos conhecimentos transmitidos.

Aos funcionários desse programa de pós-graduação e aos responsáveis pelos biotérios, em especial ao Rinaldo por sua presença e simpatia.

Aos professores Geovanni Dantas Cassali, Maria de Fátima Leite e Jacqueline Isaura Alvarez Leite pelas colaborações para a realização deste trabalho.

A CAPES, CNPq e FAPEMIG, pelo apoio financeiro.

RESUMO

A imunidade inata é a primeira linha de defesa contra patógenos estimulada pelo reconhecimento de estruturas moleculares características de microorganismos tais como o lipopolissacarídeo (LPS). Os receptores ativados por protease (PARs) fazem parte de uma família de receptores metabotrópicos ativados por serino proteases através da clivagem proteolítica em sua porção N-terminal, denominados PAR1-4. Dentre esses, PAR2 é expresso tanto em leucócitos quanto em células residentes dos pulmões e, sua ativação tem sido relacionada com o desenvolvimento da inflamação e recrutamento celular, porém, ainda não está bem esclarecido o envolvimento da ativação de PAR2 por seus agonistas endógenos na resposta inflamatória induzida pelo LPS. O objetivo desse trabalho foi então avaliar o papel de PAR2 e das proteases endógenas no recrutamento de neutrófilos para o pulmão de camundongos C57BL/6 em resposta à instilação intranasal (i.n.) de LPS. Os protocolos experimentais foram aprovados pelo comitê de ética animal (CEUA/UFMG, 150/2017). Os resultados mostram que a administração i.n. de LPS ou triptase induziram o aumento do número de neutrófilos recuperados no lavado broncoalveolar (BAL) após um período de 4h, e que o pré-tratamento com injeção intraperitoneal (i.p.) do antagonista de PAR2 (ENMD-1068) ou com instilação i.n. do inibidor de proteases (aprotinina) 1h antes do estímulo com LPS reduziram a presença dessas células no BAL. Em contrapartida, o pré-tratamento com ENMD-1068 também aumentou o número de neutrófilos no sangue periférico dos animais. O antagonista de PAR2 diminuiu os níveis da quimiocina CXCL1 mensurada no sobrenadante do BAL obtido no intervalo de 4h após o tratamento i.n. com LPS. Além disso, a análise histopatológica em pulmões de camundongos corados com hematoxilina-eosina demonstrou que o ENMD-1068 reduziu a inflamação pulmonar induzida pelo LPS. Ademais, a expressão de PAR2 estava aumentada nos pulmões de camundongos 4h após a administração i.n. de LPS em comparação ao grupo controle. A depleção de mastócitos provocada pelo pré-tratamento com o composto 48/80 reduziu o número de neutrófilos no BAL dos animais tratados pela via i.n. com LPS. A amplitude dos sinais de cálcio e o número de células responsivas ao LPS foram reduzidos em células RAW 264.7 pré-incubadas com ENMD-1068 durante 40 min. antes do estímulo com LPS ou que foram tratadas com LPS na presença do coquetel de inibidores de proteases. Em conclusão, nossos resultados sugerem um papel de PAR2 e da triptase de mastócitos no recrutamento de neutrófilos para os pulmões de camundongos induzido por LPS.

PALAVRAS-CHAVE: PAR2, proteases, triptase, recrutamento de neutrófilos, inflamação pulmonar.

ABSTRACT

Innate immunity is the first line of defense against pathogens triggered by the recognition of molecular structures present in the microorganisms like LPS. Proteinase-activated receptors (PARs) are part of a family of metabotropic receptors activated by serine proteases through proteolytic cleavage in their N-terminal portion named PAR 1-4. Among these, PAR2 is expressed in leukocytes and resident lung cells and its activation has been related to the development of inflammation and cell recruitment, however, the involvement of PAR2 activation by its endogenous agonists in inflammatory response induced by LPS is not well understood. The aim of this work was to evaluate the role of PAR2 and endogenous proteases in neutrophils recruitment to the lung of C57BL/6 mice in response to intranasal (i.n.) instillation of LPS. The experimental protocols were approved by the animal ethics committee (CEUA/UFMG, 150/2017). The results show that intranasal administration of LPS or mast cell (MC) tryptase induced an increase in the number of neutrophils recovered in bronchoalveolar lavage (BAL) 4h later, and pre-treatment with intraperitoneal injection of PAR2 antagonist (ENMD-1068) or with intranasal instillation of protease inhibitor (aprotinin) 1h prior to stimulus with LPS reduced the presence of these cells in BAL. In contrast, pre-treatment with ENMD-1068 increased the number of neutrophils in peripheral blood of animals. PAR2 antagonist also decreased the production of CXCL1 chemokine measured in supernatants of BAL obtained 4h after LPS instillation. Moreover, histopathological analysis in mouse lungs stained with hematoxylin and eosin showed that ENMD-1068 treatment reduced pulmonary inflammation induced by LPS. In addition, PAR2 expression was increased in lungs of mice 4h after LPS stimulation when compared to PBS-instilled mice. Mast cell depletion by pretreatment with compound 48/80 reduced the number of neutrophils recovered in BAL of animals treated by intranasal instillation with LPS. The amplitude of calcium signals and the number of responsive cells to LPS were reduced in RAW 264.7 cells preincubated with ENMD-1068 during 40 min. before stimulus with LPS or treated with LPS in the presence of protease inhibitors cocktail. In conclusion, our results suggest a role for PAR2 and MC tryptase on neutrophil recruitment into the lung of mice induced by LPS.

KEYWORDS: PAR2, proteases, tryptase, neutrophil recruitment, pulmonary inflammation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Domínios estruturais e funcionais dos PARs.....	22
Figura 2. Esquema representativo do tratamento farmacológico para análise dos leucócitos presentes em lavado broncoalveolar.....	31
Figura 3. Esquema representativo para depleção de mastócitos em camundongos utilizando o composto 48/80 e posterior indução da inflamação pulmonar com LPS.....	32
Figura 4. Esquema representativo do pré-tratamento dos camundongos com ENMD-1068 e indução da inflamação pulmonar com LPS para análise dos níveis de CXCL1 em lavado broncoalveolar.....	34
Figura 5. Neutrófilos presentes em lavado broncoalveolar obtido de camundongos tratados pela via intranasal com LPS.....	38
Figura 6. Efeito do inibidor de proteases sobre o número de neutrófilos presentes no lavado broncoalveolar de camundongos durante a inflamação induzida por LPS.....	40
Figura 7. Efeito do antagonista de PAR2 sobre o número de neutrófilos presentes no lavado broncoalveolar de camundongos durante a inflamação pulmonar induzida pelo LPS.....	41
Figura 8. Efeito do antagonista de PAR2 sobre o número de neutrófilos presentes em sangue periférico durante a inflamação pulmonar induzida pelo LPS.....	43
Figura 9. Efeito do antagonista de PAR2 sobre os níveis da quimiocina CXCL1 em lavado broncoalveolar de camundongos durante a inflamação pulmonar induzida pelo LPS.....	44
Figura 10. Efeito do antagonista de PAR2 sobre a inflamação pulmonar induzida por LPS.....	46
Figura 11. Expressão de PAR2 em pulmão de camundongos após instilação intranasal de LPS.....	47
Figura 12. Sinalização de Ca ²⁺ em células RAW 264.7 estimuladas com LPS.....	49

Figura 13. Efeito do antagonista de PAR2 na sinalização de Ca ²⁺ em células RAW 264.7 estimuladas com LPS.....	50
Figura 14. Efeito da presença do coquetel de inibidores de proteases na sinalização de Ca ²⁺ em células RAW 264.7 estimuladas com LPS.....	52
Figura 15. Análise de neutrófilos presentes em lavado broncoalveolar de camundongos tratados com triptase.....	53
Figura 16. Efeito da depleção de mastócitos sobre o número de neutrófilos presentes em lavado broncoalveolar de camundongos durante a inflamação pulmonar induzida por LPS.....	55
Figura 17. Esquema representativo do envolvimento de PAR2 e das proteases endógenas no recrutamento de neutrófilos durante a inflamação pulmonar induzida por LPS.....	65

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AP-1: proteína ativadora-1
- Asp: aspartato
- BAL: lavado broncoalveolar
- BSA: albumina de soro bovino tipo V
- CD14: *cluster of differentiation 14*
- CEBIO: centro de bioterismo
- CEUA: comissão de ética no uso de animais
- CO₂: gás carbônico
- DMEM: meio de eagle modificado por dulbecco (*dulbecco's modified eagle medium*)
- ELISA: ensaio de imunoabsorção ligado à enzima (*enzyme-linked immunosorbent assay*)
- ENMD-1068: antagonista de PAR2
- G-CSF: fator estimulante de colônias de granulócitos
- H₂SO₄: ácido sulfúrico
- HAT: protease semelhante à tripsina das vias aéreas humanas (*human airway trypsin-like protease*)
- HEK293: células renais embrionárias humanas (*human embryonic kidney cells*)
- His: histidina
- ICAM-1: molécula-1 de adesão intercelular
- IL-1: interleucina-1
- IL-6: interleucina-6
- IL-8: interleucina-8
- IRF3: fator regulador de interferon 3 (*interferon regulatory factor 3*)
- LBP: proteína ligadora de lipopolissacarídeo (*LPS-binding protein*)
- LPS: lipopolissacarídeo
- LTB₄: leucotriena B₄
- Mac-1: antígeno macrofágico-1 (*macrophage antigen-1*)
- MCP-1: proteína-1 quimiotática para macrófago
- MD-2: proteína mielóide diferenciadora 2
- mMCP-6: protease de mastócitos de camundongo (*mouse mast cell protease-6*)

NF- κ B: fator de transcrição nuclear kappa B

PAMPs: padrões moleculares associados a patógenos (*pathogen-associated molecular patterns*)

PAR: receptor ativado por protease (*Proteinase Activated Receptor*)

PBS: solução de salina tamponada (*Phosphate buffered saline*)

RNAm: RNA mensageiro

Ser: serina

TLR: Receptor semelhante ao Toll (*Toll-like receptor*)

TNF- α : fator de necrose tumoral alfa

VCAM-1: molécula-1 de adesão de célula vascular

VLA-4: *very late antigen 4*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 Resposta imune inata	17
1.2 Participação de proteases e dos receptores ativados por proteases no desenvolvimento da inflamação	20
2 JUSTIFICATIVA	27
3 OBJETIVO GERAL	28
3.1 Objetivos específicos	28
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	29
4.1 Animais.....	29
4.2 Cultivo de macrófagos.....	29
4.3 Drogas e reagentes.....	29
4.4 Estudo do recrutamento de leucócitos em lavado broncoalveolar	30
4.4.1 Coleta do lavado broncoalveolar	30
4.4.2 Contagem total e diferencial de leucócitos	30
4.4.3 Pré-tratamentos dos animais com antagonista de PAR2 ou com inibidor de proteases e indução da inflamação pulmonar por instilação intranasal de LPS ou triptase de mastócitos.....	31
4.4.4 Depleção da população de mastócitos pulmonares e avaliação do recrutamento de leucócitos induzido pela instilação intranasal de LPS	32
4.5 Avaliação do pré-tratamento com antagonista de PAR2 sobre o número de leucócitos em sangue periférico de camundongos durante a inflamação pulmonar induzida por LPS	33
4.6 Avaliação do pré-tratamento com antagonista de PAR2 sobre os níveis de CXCL1 em lavado broncoalveolar de camundongos durante a inflamação pulmonar induzida por LPS	33

4.7 Determinação da expressão protéica de PAR2 por <i>Western blot</i> em pulmão de camundongos durante a inflamação induzida por LPS	34
4.8 Avaliação do pré-tratamento com antagonista de PAR2 sobre a inflamação pulmonar induzida pelo LPS.....	35
4.9 Avaliação da sinalização de cálcio intracelular em células RAW 264.7	37
4.10 Análise Estatística	37
5 RESULTADOS	38
5.1 Análises do número de neutrófilos presentes em lavado broncoalveolar obtido de camundongos tratados pela via intranasal com LPS	38
5.2 Efeito do inibidor de proteases aprotinina sobre o número de neutrófilos presentes em lavado broncoalveolar induzidos pelo tratamento intranasal com LPS	39
5.3 Efeito do antagonista de PAR2 ENMD-1068 sobre o recrutamento de neutrófilos para as vias aéreas de camundongos induzido pelo LPS	41
5.4 Efeito do antagonista de PAR2 sobre os níveis da quimiocina CXCL1 mensurados no lavado broncoalveolar de camundongos durante a inflamação pulmonar induzida por LPS	44
5.5 Efeito do pré-tratamento com antagonista de PAR2 sobre a inflamação pulmonar induzida pelo LPS.....	45
5.6 Avaliação da expressão de PAR2 em pulmão de camundongos estimulados pela via intranasal com LPS.....	47
5.7 Efeito do antagonista de PAR2 na sinalização de cálcio intracelular em células RAW 264.7 estimuladas por LPS.....	48
5.8 Efeito do coquetel de inibidores de proteases na sinalização de cálcio intracelular em células RAW 264.7 estimuladas por LPS	51
5.9 Efeito do tratamento intranasal com triptase de mastócitos sobre o número de neutrófilos presentes em lavado broncoalveolar de camundongos.....	53
5.10 Efeito da depleção de mastócitos com composto 48/80 sobre o número de neutrófilos presentes em lavado broncoalveolar de camundongos estimulados pela via intranasal com LPS.....	54

6 DISCUSSÃO	56
7 CONCLUSÃO	65
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66
ANEXOS	84
Anexo A – Certificado de aprovação do projeto pela Comissão de Ética no uso de animais da UFMG (CEUA)	84

1 INTRODUÇÃO

1.1 Resposta imune inata

O sistema imunológico é caracterizado pela competência em reconhecer determinadas estruturas moleculares ou antígenos estranhos ao hospedeiro (não próprios) e desenvolver uma resposta efetora para destruir ou inativar o estímulo agressor (JANEWAY; MEDZHITOV, 2002). A imunidade conferida pelo sistema imunológico pode ser dividida em imunidade inata e imunidade adaptativa. As principais características que definem a resposta imune adaptativa são a especificidade para diferentes antígenos e a capacidade de memória que permite ao hospedeiro montar uma resposta imune mais rápida e eficiente após a exposição subsequente ao agente patogênico (WARRINGTON et al., 2011). Por outro lado, a resposta imune inata proporciona a primeira linha de defesa do hospedeiro contra microorganismos, sendo ativada imediatamente após o estímulo agressor. Essa resposta é representada por barreiras físicas e químicas (epitélio, agentes antimicrobianos produzidos nas superfícies epiteliais e muco), células especializadas (neutrófilos, macrófagos e células dendríticas), além de proteínas sanguíneas (membros do sistema complemento e outros mediadores da inflamação), que são componentes já existentes no hospedeiro independentemente de contato prévio com o patógeno e que respondem essencialmente da mesma maneira a infecções repetidas (MEDZHITOV; JANEWAY, 2000; YATIM; LAKKIS, 2015).

Os mecanismos desencadeados pela resposta imune inata incluem a fagocitose, a liberação de diversos mediadores inflamatórios e a ativação de proteínas do sistema complemento (CRUVINEL et al., 2010). Esses eventos podem ocorrer após o reconhecimento de estruturas altamente conservadas encontradas em microorganismos denominadas PAMPs (padrões moleculares associados à patógenos, do inglês *pathogen-associated molecular patterns*), tais como, lipopolissacarídeos (LPS), peptidoglicanos, resíduos de manose e ácidos teicoicos (JANEWAY, 1989; MEDZHITOV; JANEWAY, 2000). Dentre os ativadores da imunidade inata, o LPS é um estímulo altamente potente. Essa endotoxina é derivada da membrana celular externa de bactérias Gram-negativas, sendo liberada quando o microorganismo se multiplica ou quando é

fagocitado e degradado pelas células de defesa (TUIN et al., 2006; FREUDENBERG et al., 2008). O uso de LPS em diferentes modelos experimentais tem permitido grandes avanços na compreensão dos mecanismos de defesa da imunidade inata frente às invasões por microorganismos.

Os PAMPs podem interagir com diferentes receptores de reconhecimento de padrões, dentre eles, os receptores semelhantes ao Toll (do inglês *toll-like receptors* - TLRs) são os mais bem caracterizados (KAWASAKI; KAWAI, 2014). Os TLRs pertencem a uma família de proteínas transmembrânicas do tipo I, compostos por uma porção extracelular rica em repetições de leucina que é responsável pelo reconhecimento dos PAMPs e uma porção citoplasmática semelhante à dos receptores de interleucina (IL)-1 (AKIRA; TAKEDA, 2004; KAWAI; AKIRA, 2011). A família TLR compreende dez representantes em humanos (TLR1-TLR10) e doze em camundongos (TLR1-TLR9, TLR11-TLR13) (KAWAI; AKIRA, 2009). Esses receptores podem estar localizados tanto na superfície celular quanto em compartimentos intracelulares reconhecendo diferentes estruturas de microorganismos tais como LPS, zimosan, RNA de fita dupla e flagelina (O'NEILL; GOLENBOCK; BOWIE, 2013).

O TLR4 é ativado pelo LPS induzindo a liberação de produtos pro-inflamatórios importantes para a resposta imune inata contra microorganismos (POLTORAK et al., 1998; KUZMICH et al., 2017). Esse reconhecimento é mediado por uma série de interações com a proteína ligadora de lipopolissacarídeo (LBP), CD14 (do inglês *cluster of differentiation 14*) e ainda com a proteína mielóide diferenciadora 2 (MD-2) (MARTIN, 2000; LU; YEH; OHASHI, 2008). O LBP é uma proteína solúvel que se liga ao LPS, favorecendo a associação deste ao CD14. Em seguida, o CD14 facilita a transferência do LPS para o complexo formado entre o TLR4 e a proteína MD-2 (WRIGHT et al., 1989; WRIGHT et al., 1990; PARK et al., 2009). A estimulação de TLR4 desencadeia vias de sinalização que ativam fatores de transcrição tais como a proteína ativadora-1 (AP-1), o fator regulador de interferon 3 (IRF3) e o fator de transcrição nuclear kappa B (NF-κB), promovendo a produção de diversos mediadores inflamatórios (KAWASAKI; KAWAI, 2014).

O reconhecimento do LPS e microorganismos por células do sistema imune inato tais como os macrófagos, neutrófilos e mastócitos é essencial para o desenvolvimento de uma resposta protetora eficaz (FREUDENBERG et al., 2001; BEUTLER et al., 2003; MATSUGUCHI, 2012). Os macrófagos são células residentes do tecido e sua ativação pelo LPS é capaz de provocar a produção de citocinas pró-inflamatórias como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), IL-1 β , IL-6 e a IL-8 (AGARWAL et al., 1995; TANG et al., 2017). Os mastócitos estão situados em locais próximos a vasos sanguíneos e também imediatamente abaixo de superfícies epiteliais expostas ao meio ambiente externo como trato gastrointestinal e vias aéreas (GALLI et al., 2005; ABRAHAM; JOHN, 2010). Essas células podem responder rapidamente à invasão por bactérias devido à presença de mediadores pré-formados em grânulos citoplasmáticos tais como histamina, proteases e TNF- α (ABRAHAM; JOHN, 2010; MATSUGUCHI, 2012). Além disso, também podem ser liberados mediadores inflamatórios produzidos após a ativação dos mastócitos como o leucotrieno (LT) B₄, e as citocinas IL-1, IL-6 e TNF- α (MALAVIYA; ABRAHAM, 2000; SUPAJATURA et al., 2002).

Os neutrófilos são os leucócitos mais abundantes presentes no sangue periférico e compreendem uma das primeiras linhas de defesa do organismo contra microorganismos invasores (DE OLIVEIRA; ROSOWSKI; HUTTENLOCHER, 2016). Essas células são formadas no interior da medula óssea, onde o fator estimulante de colônias de granulócitos (G-CSF) atua como fator predominante regulando seu ciclo de vida, aumentando a proliferação, diferenciação e sua mobilização (METCALF, 1987; BORREGAARD, 2010). Em ausência de inflamação, os neutrófilos encontram-se restritos aos vasos sanguíneos, sendo rapidamente recrutados para o tecido extravascular influenciados por vários fatores quimiotáticos tais como a IL-8, LTB₄ e por proteínas do complemento (C5a) em resposta ao agente agressor (KOBAYASHI, 2008; SAMUELSSON, 1983; EHRENGRUBER; GEISER; DERANLEAU, 1994). Durante a inflamação, o LPS pode exercer efeito diretamente sobre os neutrófilos modulando sua sobrevivência e a expressão de moléculas de adesão bem como induzindo a liberação de IL-8 (HACHIYA et al., 1995; SABROE et al., 2003; DICK et al., 2009; PRINCE et al., 2011).

A fim de eliminar os microorganismos invasores, os neutrófilos produzem diferentes substâncias tóxicas, incluindo proteases tais como a elastase, proteinase-3 e catepsina G além de espécies reativas de oxigênio (KOBAYASHI; DELEO, 2009; AMULIC et al., 2012). Esses produtos liberados contra o agente patogênico também podem gerar efeitos potencialmente deletérios no hospedeiro. Dessa forma, a persistência do neutrófilo no sítio inflamatório e sua ativação exacerbada podem induzir o dano tecidual, sendo determinante para a progressão da doença de natureza inflamatória (KORKMAZ et al., 2010).

1.2 Participação de proteases e dos receptores ativados por proteases no desenvolvimento da inflamação

As proteases, também conhecidas como peptidases, proteinases ou enzimas proteolíticas, referem-se a enzimas cuja função é hidrolisar ligações peptídicas de proteínas, desempenhando atividades essenciais em todos os organismos vivos, compreendendo cerca de 2% do genoma humano (BARRETT; MCDONALD, 1986; RANI; RANA; DATT, 2012). De acordo com a natureza química do sítio catalítico, as proteases podem ser agrupadas em aspártico, metalo, cisteíno, serino ou treonino proteases (PUENTE et al., 2003; RANI; RANA; DATT, 2012). O mecanismo de ação das serino-proteases depende de uma tríade de resíduos de aspartato (Asp), histidina (His) e serina (Ser) em seu sítio catalítico, favorecendo a reatividade na hidrólise de ligações peptídicas (BLOW; BIRKTOFT; HARTLEY, 1969). Mais de um terço de todas as enzimas proteolíticas conhecidas são serino-proteases, tais como, tripsina, elastase, trombina, proteases plasmáticas de coagulação, catepsina G e triptase (BOND; BUTLER, 1987; EL AMIRI; SOUALMIA, 2017).

As proteases participam de vários processos fisiológicos tais como proliferação celular, coagulação sanguínea, apoptose, resposta imune e inflamação (OSSOVSKAYA; BUNNETT, 2004; RAMACHANDRAN; HOLLENBERG, 2008; LÓPEZ-OTÍN; BOND, 2008; BOND, 2019). Diversas serino proteases são produzidas por diferentes tipos celulares desempenhando papel relevante no ambiente inflamatório através da ativação dos PARs (Receptores ativados por protease, do inglês *Proteinase Activated Receptors*)

(RAMACHANDRAN; HOLLENBERG, 2008; ZHAO; METCALF; BUNNETT, 2014). Dentre o conjunto de respostas inflamatórias mediadas por esses receptores, pode-se citar o recrutamento de eosinófilos para a cavidade pleural de camundongos induzido pela triptase de mastócitos (MATOS et al., 2013), a ativação de eosinófilos em resposta a tripsina (MIIKE; MCWILLIAM; KITA, 2001), a produção de IL-8 por células epiteliais brônquicas humanas estimuladas por elastase neutrofílica (LEE et al., 2018), bem como o recrutamento de neutrófilos para a cavidade pleural de camundongos induzido pela tripsina (GOMIDES et al., 2012).

Os PARs foram recentemente identificados como um novo subconjunto dos receptores acoplados à proteína G, com sete domínios transmembranares e ativados por proteólise pelas serino proteases. Essas enzimas clivam o domínio amino-terminal extracelular desses receptores expondo um novo fragmento que funciona como um agonista aprisionado, o qual se liga a regiões conservadas na segunda alça extracelular do receptor clivado. Dessa forma, é iniciado o processo de ativação celular e desencadeados vários caminhos de transdução de sinal (VU et al., 1991; OSSOVSKAYA; BUNNETT, 2004). Deve ser ressaltado que a ativação desses receptores é irreversível, uma vez clivado por serino proteases, são internalizados e degradados em lisossomos (ROTHMEIER; RUF, 2012). O mecanismo de ativação dos PARs está demonstrado na **figura 1**.

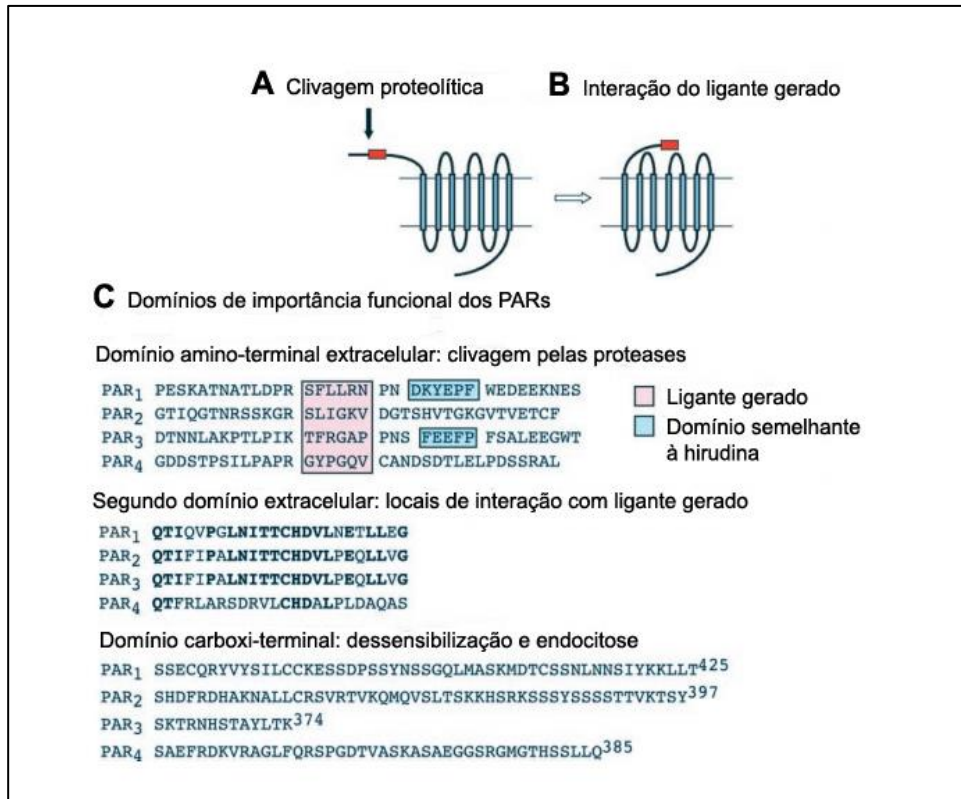


Figura 1. Domínios estruturais e funcionais dos PARs. A e B: mecanismo de clivagem do domínio amino terminal do receptor e posterior interação do ligante gerado com domínios de ligação extracelular. C: domínios de importância funcional de cada receptor na porção amino-terminal, no segundo domínio extracelular e na porção carboxi-terminal. As regiões marcadas em rosa referem-se às sequências de aminoácidos características dos ligantes formados após a clivagem proteolítica de cada PAR. Em destaque na cor azul, domínios de ligação presentes em PAR1 e PAR3 que facilitam a ligação e proteólise pela trombina. Adaptado de Ossovskaya e Bunnett (2004).

De acordo com a ordem de suas descobertas, os PARs foram denominados em PAR1 a PAR4 (ZHAO; METCALF; BUNNETT, 2014). Distintamente dos outros PARs, PAR2 é resistente a trombina, mas pode ser ativado por várias proteases incluindo: tripsina, elastase neutrofílica, fatores de coagulação Xa e VIIa, triptase de mastócitos além de proteases derivadas de microorganismos (CAMERER; HUANG; COUGHLIN, 2000; VERGNOLLE, 2005; FAGUNDES et al., 2011; RAMACHANDRAN et al., 2011; BAGHER et al., 2018). Uma das características moleculares que distinguem os PARs é a sequência do ligando resultante da ação proteolítica. Com exceção de PAR3, peptídeos sintéticos curtos que imitam esses fragmentos amino-terminais recém revelados podem ativar seletivamente os PARs sem a necessidade de proteólise (RAMACHANDRAN; HOLLENBERG, 2008; ADAMS, 2011), como por exemplo, a sequência de aminoácidos referente à clivagem de PAR2 em

humanos e camundongos (SLIGKV-NH₂ e SLIGRL-NH₂, respectivamente) (HOLLENBERG et al., 2014; JIANG et al., 2017). Uma vez ativado, PAR2 desencadeia sinalização intracelular mediada por G $\alpha_{q/11}$, G α_i e G $\alpha_{12/13}$ bem como por mecanismos independentes de proteína G através de sua interação com beta-arrestinas (ROTHMEIER; RUF, 2012).

Os PARs estão presentes em diversas células e tecidos, incluindo as vias aéreas, pele, trato gastrointestinal, rins, cérebro, sistema nervoso, vasculatura e células imunes (STEINHOFF et al., 2005; ADAMS et al., 2011). Dessa forma, desempenham papéis fisiológicos e patológicos importantes, tais como ativação plaquetária, regulação da motilidade e secreção intestinal, analgesia, angiogênese, reparação tecidual, resposta inflamatória, hiperresponsividade das vias aéreas e progressão do câncer (VU et al., 1991; COUGHLIN; CAMERER, 2003; VERGNOLLE, 2005; ANNAHÁZI et al., 2012; WOJTUKIEWICZ et al., 2015; ASADUZZAMAN et al., 2015; ISERMANN, 2017; SHI et al., 2018). Dessa forma, os PARs são considerados alvos farmacológicos atrativos e o desenvolvimento de antagonistas seletivos tem sido de interesse para o uso terapêutico (RAMACHANDRAN; HOLLENBERG, 2008).

Entre os PARs, PAR2 tem sido o mais extensivamente estudado no contexto da inflamação. Isso se deve ao fato de várias condições inflamatórias estarem associadas, pelo menos em parte, à ativação desse receptor, incluindo a inflamação neurogênica, do sistema gastrointestinal, das articulações, da pele e do sistema respiratório (SEELIGER et al., 2003; HYUN et al., 2008; ROTHMEIER; RUF, 2012; MCCULLOCH et al., 2018; SHI et al., 2018). Nesse cenário, dentre outras ações, tem sido demonstrada a participação de PAR2 na migração de leucócitos da microcirculação adjacente para o tecido inflamado, promovendo o desenvolvimento da inflamação. A ativação de PAR2 foi relacionada com a progressão da colite com base em observações de que a atividade da mieloperoxidase, espessura do intestino bem como rolamento e adesão de leucócitos foram significativamente menores em camundongos deficientes em PAR2 (HYUN et al., 2008). Em modelo de dermatite de contato, foi demonstrado que PAR2 induz o extravasamento de plasma, a regulação positiva de moléculas de adesão celular e também o rolamento e adesão leucocitária (SEELIGER et al., 2003). Além disso, em modelo de inflamação

alérgica das vias aéreas o bloqueio de PAR2 foi capaz de prevenir a hiperresponsividade das vias aéreas, reduzir o recrutamento de leucócitos bem como citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias em pulmões de camundongos (ASADUZZAMAN et al., 2015).

Nos pulmões, PAR2 é expresso em grande variedade de células que migram para as vias aéreas ou residentes, tais como epitélio, pneumócitos tipo II, endotélio, músculo liso, fibroblastos, macrófagos, mastócitos, neutrófilos, bem como em eosinófilos (D'ANDREA et al., 1998; LAN; STEWART; HENRY, 2002; BOLTON et al., 2003). Dessa forma, sua ativação está envolvida no desenvolvimento de doenças pulmonares (REED; KITA, 2004; ROTHMEIER; RUF, 2012). De fato, amostras de biópsia demonstraram que PAR2 é mais expresso no epitélio brônquico e músculo liso das vias aéreas de pacientes com asma quando comparado com indivíduos saudáveis (KNIGHT et al., 2001; AUBIER et al., 2016). Além disso, vários trabalhos evidenciaram que a expressão de PAR2 em diferentes tipos celulares favorece o recrutamento celular para as vias aéreas. Em modelo de inflamação pulmonar alérgica induzida por ácaro de poeira doméstica, camundongos *knockout* para PAR2 tiveram reduzido recrutamento de leucócitos para os pulmões quando comparado com os camundongos selvagens (DE BOER et al., 2013). Estudo realizado em cultura de fibroblastos das vias aéreas sugeriu que PAR2 atua na estimulação da produção de IL-8 e do G-CSF bem como no aumento da expressão da molécula-1 de adesão de célula vascular (VCAM-1) (RAMACHANDRAN; MORICE; COMPTON, 2006). O pré-tratamento de células epiteliais alveolares com tripsina ou agonista peptídico de PAR2 aumentou a adesão de neutrófilos de maneira dependente da dose e do tempo (YAGI et al., 2006).

Várias células presentes nas vias aéreas como macrófagos, mastócitos, neutrófilos e células epiteliais são importantes fontes de proteases ativadoras de PAR2 (CHURG et al., 2003; BENARAFÁ; PRIEBE; REMOLD-O'DONNELL, 2007; WELDON et al., 2014; WANG et al., 2016). A triptase é uma abundante protease endógena ativadora de PAR2 estocada em grânulos secretórios de mastócitos (HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ et al., 2012), capaz de induzir o acúmulo de células inflamatórias em tecido extravascular (HUANG et al., 1998). Sua presença nas vias aéreas e ativação de PAR2 tem sido alvo de várias

pesquisas relacionadas à inflamação e alergia. Em modelo de asma, a inibição da triptase diminuiu a infiltração de eosinófilos, liberação de muco e o edema nas vias aéreas de camundongos (OH et al., 2002). Também foi demonstrado que a ativação de PAR2 pela triptase parece estar envolvida na hiperresponsividade das vias aéreas (BARRIOS et al., 1998; BARRIOS; JAROSINSKI; WRIGHT, 2003). Além disso, em pacientes asmáticos, o remodelamento tecidual foi associado à expressão aumentada de PAR2 e triptase nos pulmões (AUBIER et al., 2016). No entanto, mais estudos são necessários para entender o papel da triptase na ativação de PAR2 nas vias aéreas.

A ativação de PAR2 está amplamente envolvida na resposta imune inata em ambientes ricos em proteases endógenas (triptase, tripsina, fatores de coagulação Xa e VIIa) e expostos a proteases liberadas por microorganismos como, por exemplo, no trato gastrointestinal e nas vias aéreas (SHPACOVITCH et al., 2008; RALLABHANDI et al., 2008; AUBIER et al., 2016). Dessa forma, PAR2 tem sido associado à resposta inflamatória contra infecções. Em camundongos, a ativação de PAR2 contribuiu para a resposta do hospedeiro contra a periodontite causada por *Porphyromonas gingivalis*, promovendo a liberação de IL-1 β e o recrutamento de células inflamatórias (HOLZHAUSEN et al., 2006). Além disso, foi demonstrado que proteases derivadas da *P. gingivalis* induziram a expressão do peptídeo antimicrobiano β -defensina 2 em células epiteliais de gengivais humanas (CHUNG et al., 2004). A presença de PAR2 também parece ser importante para o desenvolvimento da colite infecciosa induzida por *Citrobacter rodentium* (HANSEN et al., 2005), e camundongos que não expressavam PAR2 tiveram sua capacidade de eliminação bacteriana reduzida na infecção provocada por administração intratraqueal de *Pseudomonas aeruginosa* (MORAES et al., 2008).

Existem algumas evidências na literatura sugerindo que PAR2 e TLR4 cooperam para o aumento da resposta inflamatória. Desta forma, a ativação simultânea de PAR2 e TLR4 com agonista peptídico sintético ativador de PAR2 e LPS intensificou a ativação do fator de transcrição NF- κ B e a produção de IL-6 em células endoteliais (CHI et al., 2001). Também foi demonstrado que PAR2 e TLR4 cooperam funcionalmente para a ativação de NF- κ B e interagem fisicamente após estímulo com agonista peptídico de PAR2 em células

HEK293 transfectadas com ambos receptores (RALLABHANDI et al., 2008). Esses resultados foram confirmados em outro estudo onde o tratamento de células epiteliais do pulmão e do cólon com LPS na presença do agonista peptídico de PAR2 aumentou a expressão de RNAm para IL-8 (NHU et al., 2010). Além disso, o edema de pata induzido pelo agonista peptídico de PAR2 foi significativamente diminuído em camundongos que não expressavam TLR4 (NHU et al., 2010). Recentemente, foi demonstrada a colaboração entre PAR2 e TLR4 para a homeostase vascular (BUCCI et al., 2013). Diante da ampla expressão de PAR2 reportada nas vias aéreas e das evidências de sua interação com o receptor TLR4, são geradas expectativas de que a ativação de PAR2 por proteases endógenas possa exercer papel importante durante a inflamação pulmonar induzida por microorganismos.

2 JUSTIFICATIVA

A imunidade inata é a primeira linha de defesa contra patógenos e envolve a participação de diferentes tipos celulares capazes de reconhecer estruturas presentes em microorganismos, tais como o LPS, e contribuir para o desenvolvimento da resposta inflamatória. Nesse processo, o recrutamento de neutrófilos para o tecido extravascular é um importante mecanismo para a eliminação do agente agressor, porém, a persistência dessas células no sítio inflamatório e ativação excessiva podem gerar dano tecidual e desencadear os sinais clínicos de diversas patologias. Alguns trabalhos da literatura têm demonstrado o efeito pró-inflamatório de agonistas e proteases ativadoras de PAR2 induzindo a ativação e o recrutamento de leucócitos a partir da microcirculação adjacente ao tecido inflamado. Também tem sido sugerida a cooperação entre PAR2 e TLR4 para a amplificação da resposta inflamatória. No entanto, o envolvimento de PAR2 e das proteases endógenas na resposta inflamatória das vias aéreas induzida pelo LPS ainda não está bem esclarecido. Neste trabalho, avaliamos a contribuição de PAR2 e de proteases endógenas na modulação do recrutamento de neutrófilos induzido pela instilação intranasal de LPS em camundongos C57BL/6.

3 OBJETIVO GERAL

Avaliar o papel de PAR2 e de proteases endógenas no recrutamento de neutrófilos induzido pela instilação intranasal de LPS em camundongos C57BL/6.

3.1 Objetivos específicos

1. Avaliar a importância de serino proteases endógenas sobre o número de neutrófilos presentes no lavado broncoalveolar de camundongos tratados por instilação intranasal com LPS;
2. Avaliar o impacto do pré-tratamento com o antagonista de PAR2 o ENMD-1068 sobre o número de neutrófilos presentes em lavado broncoalveolar e sangue periférico bem como na inflamação pulmonar induzida pela instilação intranasal de LPS em camundongos;
3. Avaliar a importância de PAR2 para a produção da quimiocina CXCL1 durante a inflamação pulmonar induzida pelo LPS em camundongos, e na sinalização de cálcio em células RAW 264.7 estimuladas com LPS;
4. Avaliar a capacidade do LPS em induzir a expressão de PAR2 em pulmão de camundongos;
5. Avaliar a capacidade da protease endógena triptase em promover aumento no número de neutrófilos recuperados no lavado broncoalveolar de camundongos, e a importância dos mastócitos neste processo.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizados camundongos C57BL/6 fêmeas, com 8 a 10 semanas de idade, pesando entre 18 a 23 g. Os animais foram fornecidos pelo Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG (CEBIO) e mantidos em ciclo claro-escuro de 12 horas com livre acesso a ração e água. Todos os procedimentos utilizados foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFMG (CEUA/UFMG, certificado nº 150/2017).

4.2 Cultivo de macrófagos

Células da linhagem de macrófagos murinos (RAW 264.7) foram cultivadas em garrafas de cultura contendo meio de eagle modificado por dulbecco (DMEM, Gibco-Invitrogen, EUA), suplementado com 10% soro fetal bovino e 1% de penicilina/estreptomicina (Gibco-Invitrogen, EUA). As células foram mantidas à 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO₂. Foram realizadas passagens sucessivas semanais após atingirem confluência de 80%.

4.3 Drogas e reagentes

O Lipopolissacarídeo (LPS) de *Escherichia coli* 0111:B4, aprotinina, composto 48/80, anticorpos IgG anti-camundongo e anti-coelho foram obtidos da Sigma Aldrich (Missouri, EUA). Triptase de mastócitos de pulmão humano e *protease inhibitor cocktail set I* foram adquiridos da Calbiochem (Merk, Nova Jersey, EUA). O antagonista de PAR2 ENMD-1068 foi adquirido da Enzo Life Sciences (Califórnia, EUA). O Fluo-4/AM foi obtido da Invitrogen (Califórnia, EUA). O Anticorpo anti-PAR2 foi fornecido pela Abcam (Cambridge, UK). O Anticorpo anti- β -actina foi obtido da Santa Cruz Biotechnology (Califórnia, EUA). Todas as drogas foram dissolvidas em solução de salina tamponada (PBS, pH 7,4).

4.4 Estudo do recrutamento de leucócitos em lavado broncoalveolar

4.4.1 Coleta do lavado broncoalveolar

Para obtenção do lavado broncoalveolar (BAL), os camundongos receberam pela via intraperitoneal (i.p.) 20 μ L de solução anestésica contendo quetamina 10% (1 mL) + xilazina 2% (0,75 mL) a cada 10 g de peso animal. O acesso aos pulmões foi possível com auxílio de um cateter (18G) associado a uma seringa de 1 mL. Posteriormente, um volume total de 2 mL de PBS foi utilizado para perfusão e aspiração dos pulmões. O BAL coletado foi centrifugado em velocidade de 100 G a 4°C (Thermo Fisher Scientific Centrifuge Series) durante 5 minutos. O sobrenadante foi armazenado a -80°C para análise de citocinas. O sedimento celular foi ressuscitado em 100 μ L de BSA (3%) para contagem total e diferencial de leucócitos.

4.4.2 Contagem total e diferencial de leucócitos

Para contagem total, as células foram diluídas em solução de Turk e analisadas em microscópio óptico com o auxílio de uma câmara de Neubauer. Para análise diferencial dos leucócitos, 40-50 μ L da amostra foram adicionados em um Cytospin (Fanem), 100 rpm por 40 segundos abastecido com lâminas de vidro. As células foram posteriormente coradas com May Grunwald (Dinâmica Contemporânea Ltda., Brasil) e Giemsa (QEEL- Química Especializada Erich Ltda., Brasil). A análise diferencial foi realizada em microscópio óptico (100 células totais) utilizando critérios morfológicos padrões para identificar os tipos celulares, e os números absolutos dessas células foram calculados a partir da contagem total. Os resultados foram expressos na forma de leucócitos x 10^4 /mL.

4.4.3 Pré-tratamentos dos animais com antagonista de PAR2 ou com inibidor de proteases e indução da inflamação pulmonar por instilação intranasal de LPS ou triptase de mastócitos

Para avaliação do infiltrado de leucócitos presentes nos pulmões dos camundongos, os animais foram anestesiados pela via intraperitoneal com solução de quetamina (75 mg/kg) + xilazina (10 mg/kg) em salina (0,9% Cloreto de Sódio, NaCl). Em seguida, foram tratados pela via intranasal (i.n.) com PBS (20 μ L), LPS (1, 10 ou 100 ng/20 μ L) ou triptase de mastócitos (30, 100 ou 300 ng/20 μ L). Após quatro horas, o BAL foi obtido para análise do acúmulo de células inflamatórias (**Figura 2**).

Em alguns experimentos, foram avaliadas as participações de PAR2 e das proteases endógenas na migração de leucócitos induzida pelo LPS nos pulmões dos camundongos. Os animais foram submetidos ao pré-tratamento com antagonista seletivo de PAR2 ENMD-1068 (0,05; 0,5 ou 1,0 mg/Kg, 100 μ L i.p.) ou inibidor de proteases aprotinina (10, 30 ou 100 ng/20 μ L, i.n.). Os grupos controles receberam PBS. Após uma hora, foi realizado o estímulo com LPS (10 ng/20 μ L, i.n.) ou PBS (20 μ L, i.n.). Seguido o intervalo de quatro horas, o BAL foi obtido para contagem celular (**Figura 2**).

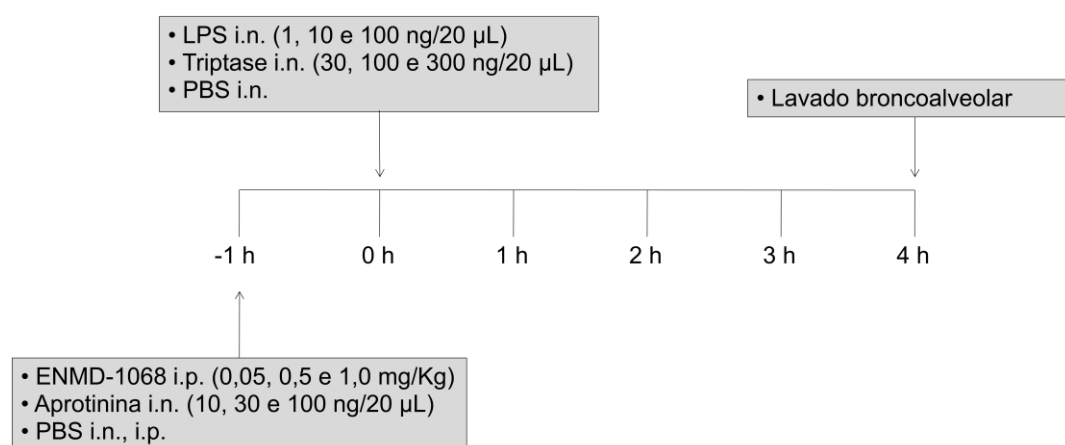


Figura 2: Esquema representativo do tratamento farmacológico para análise dos leucócitos presentes em lavado broncoalveolar.

4.4.4 Depleção da população de mastócitos pulmonares e avaliação do recrutamento de leucócitos induzido pela instilação intranasal de LPS

Para análise da participação da triptase na migração de neutrófilos induzida por LPS em pulmão de camundongos, foi realizada a depleção dos mastócitos baseada nas metodologias de Di rosa, Giroud e Willoughby (1971) e Ramos et al. (2003) com modificações. Os animais foram pré-tratados com injeções de 100 μ L de PBS ou composto 48/80 pela via i.p. durante quatro dias com intervalos de doze horas (0,6 mg/kg no primeiro dia; 1,0 mg/kg no segundo dia; 1,2 mg/kg no terceiro dia; 1,2 e 2,4 mg/kg no quarto dia). No quinto dia de tratamento, doze horas após a última administração, os camundongos receberam PBS (20 μ L, i.n.) ou LPS (10 ng/20 μ L, i.n.). Após quatro horas, o BAL foi coletado para análise total e diferencial de leucócitos (**Figura 3**).

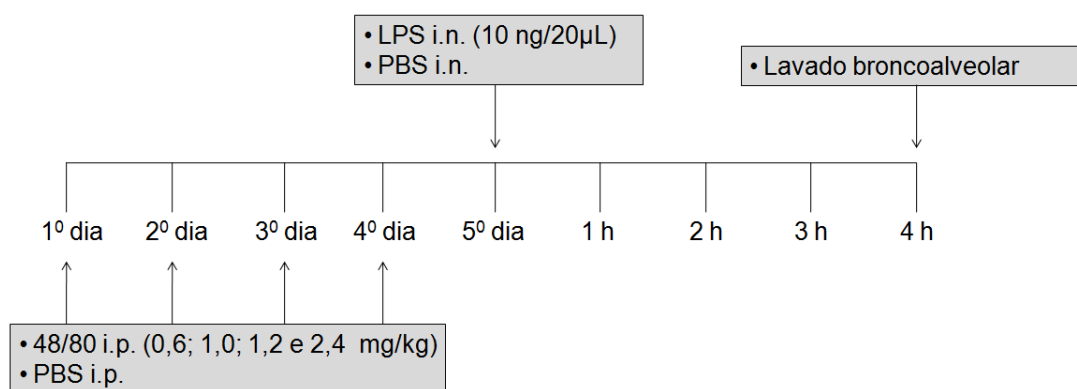


Figura 3: Esquema representativo para depleção de mastócitos em camundongos utilizando o composto 48/80 e posterior indução da inflamação pulmonar com LPS.

4.5 Avaliação do pré-tratamento com antagonista de PAR2 sobre o número de leucócitos em sangue periférico de camundongos durante a inflamação pulmonar induzida por LPS

A fim de determinar a participação de PAR2 no recrutamento de leucócitos para os pulmões de camundongos durante a inflamação induzida por LPS, os animais foram pré-tratados com ENMD-1068 (0,5 mg/Kg, 100 µL i.p.) ou PBS (100 µL, i.p.) uma hora antes da administração de LPS (10 ng/20 µL, i.n.) ou PBS (20 µL, i.n.). Após intervalo de quatro horas, os camundongos foram anestesiados e suas caudas mergulhadas em água morna para coleta do sangue periférico utilizando uma agulha de 23G. O sangue foi diluído em solução de Turk para a contagem total de células e a contagem diferencial dos leucócitos efetuada em lâminas de esfregaços sanguíneos coradas conforme descrito previamente em 4.4.2.

4.6 Avaliação do pré-tratamento com antagonista de PAR2 sobre os níveis de CXCL1 em lavado broncoalveolar de camundongos durante a inflamação pulmonar induzida por LPS

Para análise dos níveis da quimiocina CXCL1 presentes no BAL, os animais foram tratados com ENMD-1068 (0,5 mg/Kg, 100 µL i.p.) ou PBS (100 µL i.p.) uma hora antes do estímulo com LPS (10 ng/20 µL, i.n.) ou PBS (20 µL, i.n.). O sobrenadante foi então obtido a partir do BAL, conforme explicado anteriormente, nos tempos de 1, 2 e 4 horas após a instilação intranasal com LPS (**Figura 4**). As concentrações de CXCL1 foram medidas pela técnica de ensaio imunoenzimático (ELISA) de acordo com as instruções do fabricante de ELISA DuoSet kit (R & D Systems, EUA). O anticorpo primário (100 µL) foi incubado (*overnight*) em placa de microtitulação à temperatura de 4°C. Em seguida, as placas foram lavadas três vezes com tampão de lavagem (PBS + 0,05% Tween 20, pH 7,2). Foram adicionados 300 µL do tampão de bloqueio (PBS + 1% BSA, pH 7.2) e, após uma hora, a lavagem foi repetida. As placas foram então incubadas por 2 horas à temperatura ambiente com 100 µL das amostras teste, padrão e branco em duplicata. Após nova lavagem, foi adicionado 100 µL do anticorpo de detecção por 2 horas à temperatura

ambiente. Em seguida à lavagem, 100 μL da estreptavidina foi adicionada aos poços e mantida por 20 minutos à temperatura ambiente. Logo depois, as placas foram lavadas mais uma vez e, 100 μL do substrato foram adicionados a todos os poços. Após 20 minutos, a reação enzimática foi interrompida com 50 μL de H_2SO_4 (1M) e a densidade óptica de cada poço avaliada imediatamente pelo leitor de microplaca (MULTISKAN GO – ThermoScientific, EUA) à 450 nm. Os resultados foram expressos em picogramas da citocina por mililitro (pg/mL).

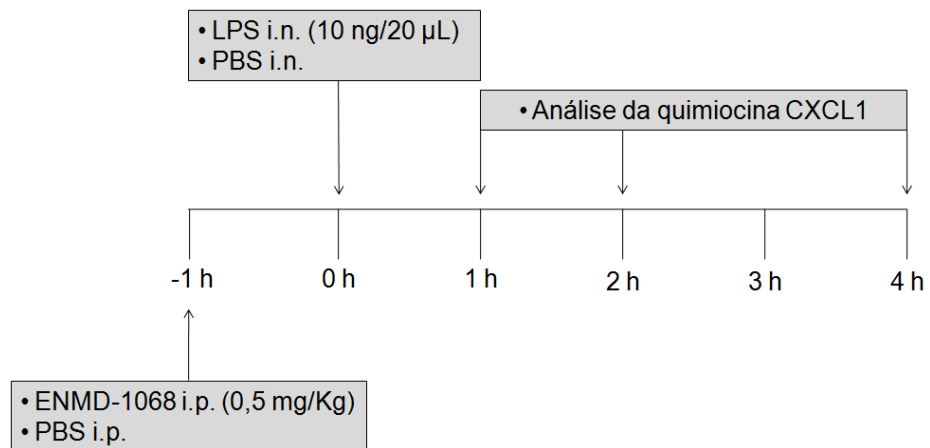


Figura 4: Esquema representativo do pré-tratamento dos camundongos com ENMD-1068 e indução da inflamação pulmonar com LPS para análise dos níveis de CXCL1 em lavado broncoalveolar.

4.7 Determinação da expressão protéica de PAR2 por *Western blot* em pulmão de camundongos durante a inflamação induzida por LPS

Para avaliar o efeito da administração de LPS sobre a expressão de PAR2 em pulmão de camundongos, os animais foram estimulados com LPS (10 ng/20 μL , i.n.) ou PBS (20 μL i.n.). Após quatro horas, os pulmões foram removidos e mantidos à -80°C . Para a extração de proteína total, o homogenato de tecido pulmonar foi preparado utilizando um tampão de lise (NaCl 100mM; Tris-base 50mM; EDTA $2\text{Na}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 5mM; $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7\cdot 10\text{H}_2\text{O}$ 50mM; MgCl_2 1mM; Nanidet P-40 1%; Triton 0,3%; Deoxycholate Sodium 0,5%; NaF 20mM) contendo inibidores de proteases. Após 15 min em gelo, o homogenado de tecido foi centrifugado por 10 min a 13.000 rpm, 4°C . O sobrenadante foi coletado e, em seguida, a concentração de proteína foi medida pelo ensaio de Bradford. A amostra de proteína foi desnaturada durante 5 min a 95°C . Para *western blotting*, a mesma quantidade de proteína

(30 µg) foi submetida à eletroforese em SDS-PAGE a 10% e transferida para uma membrana de fluoreto de polivinilideno 0,45 µm. As membranas foram bloqueadas com solução de BSA 5% durante 2 horas à temperatura ambiente, seguida de incubação com anti-PAR2 (ab124227) e anti-β-actina (SC47778) *overnight* a 4°C. Posteriormente, as membranas foram incubadas durante 2 horas em temperatura ambiente com anticorpos secundários anti-camundongo e anti-coelho. Os sinais de quimioluminescência foram coletados usando *Clarity™ Western ECL Substrate* (BIO-RAD, Hercules, California, EUA) e quantificados através do *software Image J* (1.6.0_20 v, *National Institute of Health*, EUA). β-actina foi utilizada como controle.

4.8 Avaliação do pré-tratamento com antagonista de PAR2 sobre a inflamação pulmonar induzida pelo LPS

Para as avaliações histopatológicas dos pulmões, os animais foram pré-tratados com ENMD-1068 (0,5 mg/Kg, 100 µL i.p.) ou PBS (100 µL i.p.) uma hora antes do estímulo com LPS (10 ng/20 µL, i.n.) ou PBS (20 µL i.n.). Após quatro horas, os pulmões foram removidos e mantidos em solução de formol 10%. Em seguida, o tecido foi desidratado gradualmente em etanol, embebido em parafina e seccionado em tiras finas de três micrômetros de espessura. Após os cortes, as amostras foram desparafinizadas e coradas com hematoxilina e eosina (H & E). As análises foram realizadas sob um microscópio de luz por um patologista experiente, sem conhecimento dos tratamentos previamente descritos. A avaliação dos *score* de inflamação foi realizada a partir da análise qualitativa das lâminas H&E, com total de 15 pontos, baseado nos trabalhos de Horvat et al. (2007) e Garcia et al. (2010) que analisam a inflamação das vias aéreas, vascular, parenquimatosa e o infiltrado de neutrófilos (0 ausente, 1 leve, 2 moderado, 3 marcado e 4 grave) conforme demonstrado na **tabela 1**.

Tabela 1: Sistema de pontuação histopatológica avaliada em pulmões de camundongos.

	Score 1	Score 2	Score 3	Score 4
	Inflamação das vias aéreas	Inflamação vascular	Inflamação do parênquima	Infiltrado de neutrófilos
0 ausente	Ausência de células inflamatórias ao redor das vias aéreas	Ausência de células inflamatórias ao redor dos vasos	< 1%	Ausência de neutrófilos ao redor das vias aéreas
1 leve	Poucas células inflamatórias em algumas regiões das vias aéreas	Poucas células inflamatórias ao redor de alguns vasos	1-30%	Poucos neutrófilos ao redor das vias aéreas
2 Moderado	Inflamação moderada em algumas regiões das vias aéreas	Inflamação moderada ao redor de alguns vasos	30-60%	Moderado número de neutrófilos ao redor das vias aéreas
3 Marcado	Inflamação presente na maioria das regiões das vias aéreas	Inflamação ao redor da maioria dos vasos	>60%	Muitos neutrófilos ao redor das vias aéreas
4 Grave	Inflamação significativa na maioria das regiões das vias aéreas	Inflamação significativa ao redor da maioria dos vasos	–	Expressivo infiltrado de neutrófilos ao redor das vias aéreas

A pontuação total da análise histopatológica de cada animal foi realizada pela soma dos valores dos Scores (Score 1 + Score 2 + Score 3 + Score 4).

4.9 Avaliação da sinalização de cálcio intracelular em células RAW 264.7

Células RAW 264.7 foram plaqueadas (5×10^5 células por poço) em placas para cultura de células (6 poços) contendo lamínulas de vidro (22 x 22 mm) 24 horas antes da captura de imagens. As células foram então incubadas durante 40 minutos com ENMD-1068 (5 μ M) ou PBS e marcadas com uma sonda para Ca^{2+} intracelular (5 μ M) Fluo-4/AM (Invitrogen, Eugene, OR) durante 15 minutos a 37°C em DMEM. Uma vez transferidas para uma câmara de perfusão personalizada presente no microscópio confocal (Nikon C2, Nova York, EUA), as células foram então perfundidas com tampão HEPES (SCHLOSSER; BURGSTAHLER; NATHANSON, 1996), tratadas com coquetel de inibidores de proteases (*Protease Inhibitor Cocktail Set I*, 1x diluído) ou PBS e estimuladas com LPS (1, 3 ou 10 μ g/mL). A sinalização de Ca^{2+} foi monitorada nestas células por excitação a 488 nm enquanto se coletava luz emitida acima de 505 nm. A amplitude normalizada dos sinais de Ca^{2+} induzidos por LPS foram extraídas com o *software Image J* e representadas graficamente como descrito anteriormente (LEITE et al., 2003). Alterações na fluorescência foram normalizadas pelos níveis basais e usadas para analisar a amplitude dos sinais de Ca^{2+} e a porcentagem de células que responderam ao LPS.

4.10 Análise Estatística

Os resultados foram analisados utilizando o GraphPad Prism 5.0 e expressos como média \pm erro padrão da média. As diferenças entre os grupos experimentais foram avaliadas quanto à significância usando a análise de variância simples, one-way ANOVA, seguida pelo teste Newman-Keuls ou pelo teste t de Student. Foram consideradas estatisticamente significativas as diferenças com $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Análises do número de neutrófilos presentes em lavado broncoalveolar obtido de camundongos tratados pela via intranasal com LPS

A análise inicial deste estudo foi realizada com o objetivo de determinar a concentração de LPS capaz de induzir o acúmulo de neutrófilos, avaliados em lavado broncoalveolar de camundongos C57BL/6, no modelo e condições experimentais em que foram submetidos.

Os animais foram estimulados por instilação intranasal com diferentes concentrações de LPS e o lavado broncoalveolar obtido após intervalo de quatro horas para a contagem celular. Conforme demonstrado na **figura 5**, a administração de LPS 1 ng não foi capaz de aumentar o número dos neutrófilos recuperados no BAL. Por outro lado, os tratamentos com 10 e 100 ng induziram o aumento do número de neutrófilos no BAL, quando comparado com o grupo tratado com PBS. O estímulo com LPS 10 ng também aumentou o número de células totais e mononucleares (**Tabela 2**). Dessa forma, foi padronizado o uso de LPS 10 ng para os próximos experimentos de indução da inflamação pulmonar.

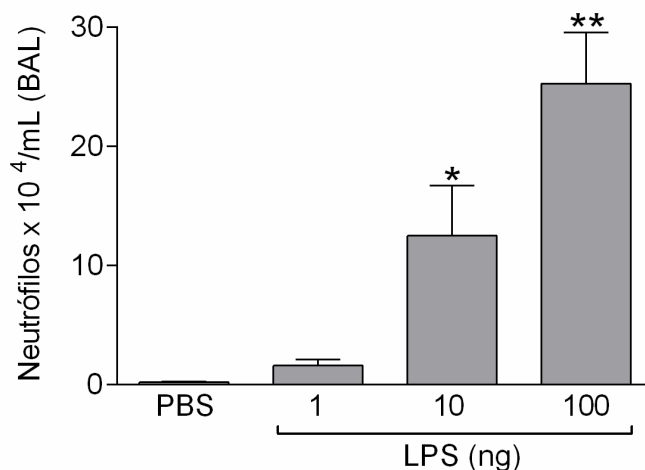


Figura 5. Neutrófilos presentes em lavado broncoalveolar obtido de camundongos tratados pela via intranasal com LPS. Os camundongos foram estimulados pela via intranasal com LPS (1, 10 ou 100 ng/animal) ou PBS (20 μ L/animal). Após quatro horas, o lavado broncoalveolar foi obtido para a contagem celular. As barras representam média \pm e.p.m. de 5 a 6 animais por grupo. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,001$ quando comparado com o grupo PBS.

Tabela 2. Leucócitos presentes em lavado broncoalveolar obtido de camundongos tratados pela via intranasal com LPS.

Células	PBS	LPS i.n. (ng)		
		1	10	100
Totais	12,5 ± 1,0	15,6 ± 1,6	42,5 ± 11,5*	43,5 ± 6,4*
Neutrófilos	0,2 ± 0,05	1,6 ± 0,5	12,5 ± 4,2*	25,3 ± 4,3**
Mononucleares	12,1 ± 1,0	13,9 ± 1,2	29,8 ± 7,1*	18,0 ± 2,4

Os valores representam a média e o erro padrão da média x 10⁴ células. *p< 0,05 e **p< 0,001 quando comparado com o grupo PBS. n=5 a 6.

5.2 Efeito do inibidor de proteases aprotinina sobre o número de neutrófilos presentes em lavado broncoalveolar induzidos pelo tratamento intranasal com LPS

Considerando que as proteases endógenas contribuem para o desenvolvimento da resposta inflamatória, foi analisada a participação dessas enzimas presentes no microambiente pulmonar para o acúmulo de neutrófilos em lavado broncoalveolar induzido pela administração intranasal de LPS. Para isso, os animais receberam tratamento intranasal com aprotinina (10, 30 ou 100 ng), um inibidor de serino proteases, seguido pelo estímulo com LPS (10 ng). Conforme demonstrado na **figura 6**, todos os tratamentos com aprotinina utilizados foram capazes de diminuir o número de neutrófilos presentes no BAL, quando comparado com os animais que foram pré-tratados com PBS e estimulados com LPS. Além disso, a aprotinina também diminuiu o número de células totais e mononucleares (**Tabela 3**).

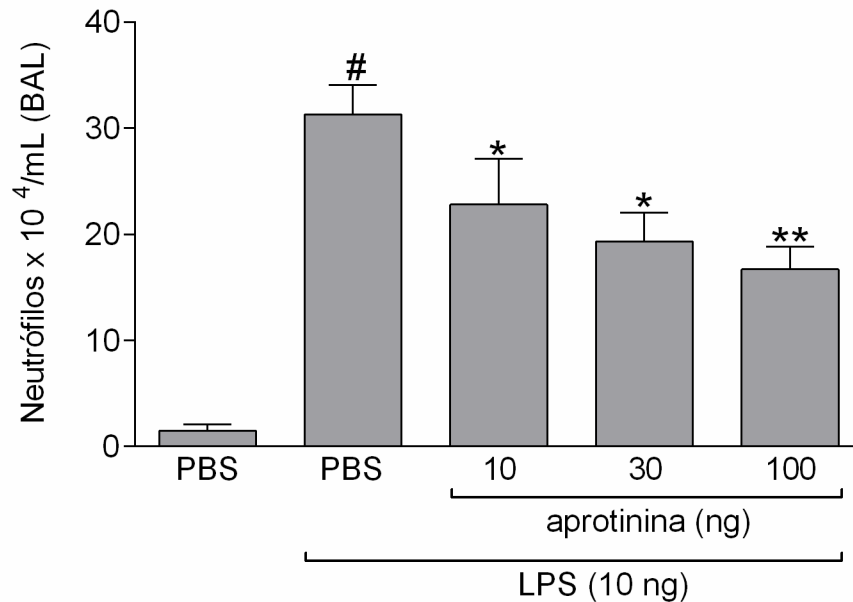


Figura 6. Efeito do inibidor de proteases sobre o número de neutrófilos presentes no lavado broncoalveolar de camundongos durante a inflamação induzida por LPS. Os camundongos foram pré-tratados com aprotinina (10, 30 ou 100 ng/animal, i.n.) ou PBS (20 µL/animal, i.n.) 1 hora antes da administração de LPS (10 ng/animal, i.n.) ou PBS (20 µL/animal, i.n.). Após quatro horas, o lavado broncoalveolar foi obtido para a contagem celular. As barras representam média ± e.p.m. de 5 a 6 animais por grupo. #p< 0,001 quando comparado com o grupo PBS+PBS; *p< 0,05 e **p< 0,01 quando comparado com o grupo PBS+LPS.

Tabela 3. Efeito do pré-tratamento com aprotinina sobre o número de leucócitos presentes no lavado broncoalveolar de camundongos durante a inflamação pulmonar induzida por LPS.

Células	LPS i.n. (10 ng)				
	PBS+PBS	PBS	aprotinina i.n. (ng)		
			10	30	100
Totais	4,8 ± 0,6	42,3 ± 3,2 [#]	32,6 ± 4,6 [*]	23,1 ± 2,4 ^{***}	21,5 ± 2,1 ^{***}
Neutrófilos	1,5 ± 0,6	31,3 ± 2,8 [#]	22,8 ± 4,3 [*]	19,3 ± 2,7 [*]	16,7 ± 2,1 ^{**}
Mononucleares	3,2 ± 0,3	10,9 ± 1,0 [#]	6,4 ± 1,2 ^{**}	3,8 ± 0,5 ^{***}	4,8 ± 0,9 ^{***}

Os valores representam a média e o erro padrão da média x 10⁴ células. #p< 0,001 quando comparado com o grupo controle PBS+PBS; *p< 0,05, **p< 0,01 e ***p< 0,001 quando comparado com o grupo tratado com PBS+LPS. n=5 a 6.

5.3 Efeito do antagonista de PAR2 ENMD-1068 sobre o recrutamento de neutrófilos para as vias aéreas de camundongos induzido pelo LPS

Uma vez que várias células das vias aéreas liberam proteases ativadoras de PAR2, tais como a triptase, decidimos avaliar o efeito do antagonista desse receptor sobre o número de neutrófilos presentes no BAL de camundongos tratados com LPS. Os animais foram então pré-tratados pela via intraperitoneal com diferentes doses do antagonista seletivo de PAR2 ENMD-1068 (0,05; 0,5 ou 1,0 mg/Kg) antes da administração intranasal de LPS (10 ng). As doses de ENMD-1068 utilizadas foram capazes de diminuir em mais de 80% o número de neutrófilos recuperados no BAL dos camundongos estimulados com LPS (**Figura 7**), e também reduziu o número de células totais e mononucleares (**Tabela 4**).

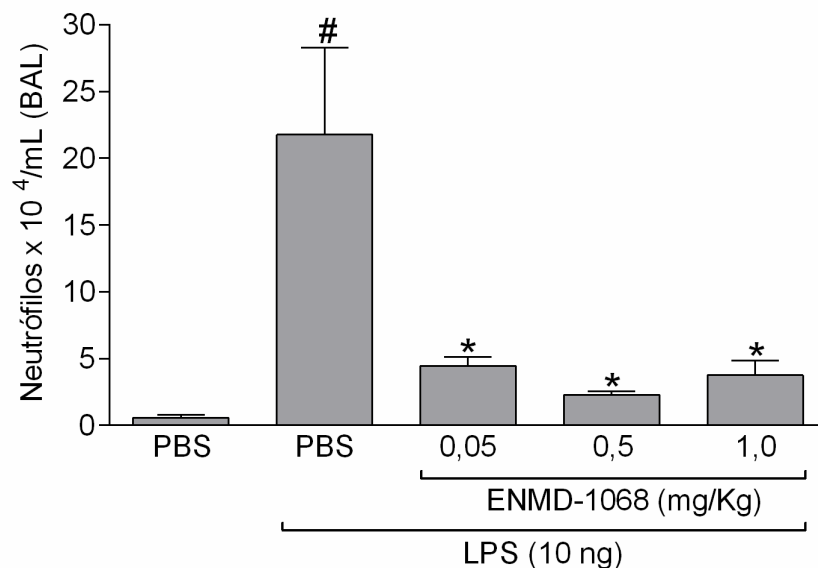


Figura 7. Efeito do antagonista de PAR2 sobre o número de neutrófilos presentes no lavado broncoalveolar de camundongos durante a inflamação pulmonar induzida pelo LPS. Os camundongos foram pré-tratados com diferentes doses de ENMD-1068 (0,05; 0,5 ou 1,0 mg/Kg, 100 μ L i.p.) ou PBS (100 μ L i.p.) 1 hora antes da administração de LPS (10 ng/animal, i.n.) ou PBS (20 μ L/animal, i.n.). Após quatro horas, o lavado broncoalveolar foi obtido para a contagem celular. As barras representam média \pm e.p.m. de 5 a 6 animais por grupo. [#]p < 0,001 quando comparado com o grupo PBS+PBS; ^{*}p < 0,001 quando comparado com o grupo PBS+LPS.

Tabela 4. Efeito do pré-tratamento com ENMD-1068 sobre o número de leucócitos presentes no lavado broncoalveolar de camundongos durante a inflamação pulmonar induzida por LPS.

Células	LPS i.n. (10 ng)				
	PBS+PBS	PBS	ENMD-1068 i.p. (mg/Kg)		
			0,05	0,5	1,0
Totais	17,7 ± 2,0	62,2 ± 8,9 [#]	32,9 ± 3,9 ^{**}	24,3 ± 1,6 ^{**}	21,9 ± 2,5 ^{**}
Neutrófilos	0,6 ± 0,2	21,7 ± 6,5 [#]	4,4 ± 0,6 ^{**}	2,2 ± 0,3 ^{**}	3,7 ± 1,1 ^{**}
Mononucleares	16,9 ± 1,7	40,5 ± 2,4 [#]	28,4 ± 3,5 [*]	21,8 ± 1,5 ^{**}	18,1 ± 1,5 ^{**}

Os valores representam a média e o erro padrão da média x 10⁴ células. [#]p < 0,001 quando comparado com o grupo controle PBS+PBS; ^{*}p < 0,01 e ^{**}p < 0,001 quando comparado com o grupo tratado com PBS+LPS. n=5 a 6.

O sangue periférico também foi analisado nas mesmas condições anteriores. A dose intermediária de ENMD-1068 (0,5 mg/Kg) foi utilizada com o objetivo de avaliar se o antagonista de PAR2 estaria promovendo a redução do recrutamento de neutrófilos dos vasos sanguíneos para o tecido extravascular. Em contraste ao resultado obtido em lavado broncoalveolar, o pré-tratamento com ENMD-1068 provocou um aumento do número de neutrófilos no sangue periférico dos camundongos tratados pela via intranasal com LPS, quando comparado com o grupo pré-tratado com PBS e estimulado com LPS (**Figura 8**). Esse efeito também foi observado em células totais e mononucleares (**Tabela 5**).

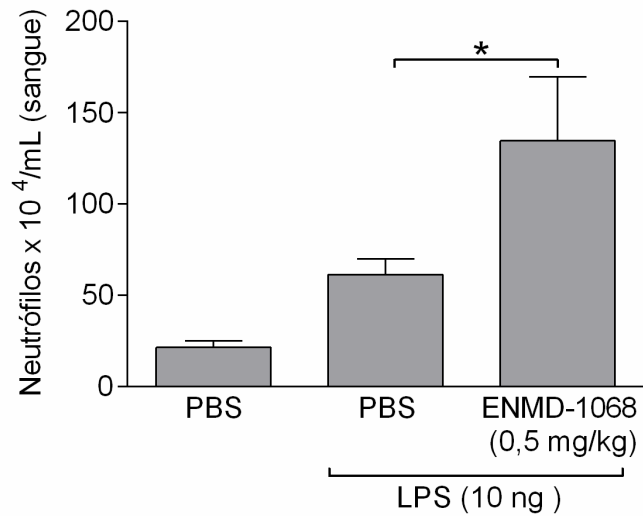


Figura 8. Efeito do antagonista de PAR2 sobre o número de neutrófilos presentes em sangue periférico durante a inflamação pulmonar induzida pelo LPS. Os camundongos foram pré-tratados com ENMD-1068 (0,5 mg/Kg, 100 μ L i.p.) ou PBS (100 μ L i.p.) 1 hora antes da administração de LPS (10 ng/animal, i.n.) ou PBS (20 μ L/animal, i.n.). Após quatro horas, o sangue periférico foi colhido para contagem celular. As barras representam média \pm e.p.m. de 4 a 5 animais por grupo, * $p < 0,05$.

Tabela 5. Efeito do pré-tratamento com ENMD-1068 sobre o número de leucócitos presentes no sangue periférico de camundongos durante a inflamação pulmonar induzida por LPS.

Células	LPS i.n. (10 ng)		
	PBS+PBS	PBS	ENMD-1068 i.p. (mg/Kg)
			0,5
Totais	158 \pm 11,6	196 \pm 24,4	416 \pm 86,1**
Neutrófilos	21,5 \pm 3,4	61,2 \pm 8,6	134,5 \pm 34,9*
Mononucleares	129,9 \pm 6,1	134 \pm 19,4	272,4 \pm 49,8**

Os valores representam a média e o erro padrão da média x 10⁴ células. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ quando comparado com o grupo tratado com PBS+LPS. n=4 a 5.

5.4 Efeito do antagonista de PAR2 sobre os níveis da quimiocina CXCL1 mensurados no lavado broncoalveolar de camundongos durante a inflamação pulmonar induzida por LPS

Os resultados anteriores demonstraram que o antagonista de PAR2 foi efetivo em diminuir o número de neutrófilos presentes no BAL de camundongos tratados com LPS. Dessa forma, foi avaliado se o ENMD-1068 poderia alterar a liberação de CXCL1, uma importante quimiocina envolvida no recrutamento de neutrófilos, durante a resposta inflamatória pulmonar induzida pelo LPS. Os animais foram pré-tratados com ENMD-1068 (0,5 mg/Kg) antes do estímulo intranasal com LPS (10 ng), em seguida, o lavado broncoalveolar foi colhido após intervalos de 1, 2 ou 4 horas. Conforme demonstrado na **figura 9**, houve aumento dos níveis de CXCL1 no BAL nos intervalos avaliados de 2 e 4 horas após estímulo com LPS quando comparado com o grupo PBS, além disso, o pré-tratamento com ENMD-1068 reduziu em 88% a liberação dessa quimiocina analisada no período de 4 horas (PBS 1h, $52 \pm 7,4$; LPS 1h, $47,9 \pm 7,9$; ENMD-1068 1h, $55 \pm 6,8$; PBS 2h, 114 ± 41 ; LPS 2h, $661 \pm 237^{\#}$; ENMD-1068 2h, 375 ± 168 ; PBS 4h, $56,1 \pm 14$; LPS 4h, $882 \pm 122^{##}$; ENMD-1068 4h, $106 \pm 60,8^*$ pg/mL, $^{\#}p < 0,01$ e $^{##}p < 0,001$ quando comparado com o grupo PBS+PBS, $^*p < 0,001$ quando comparado com o grupo PBS+LPS).

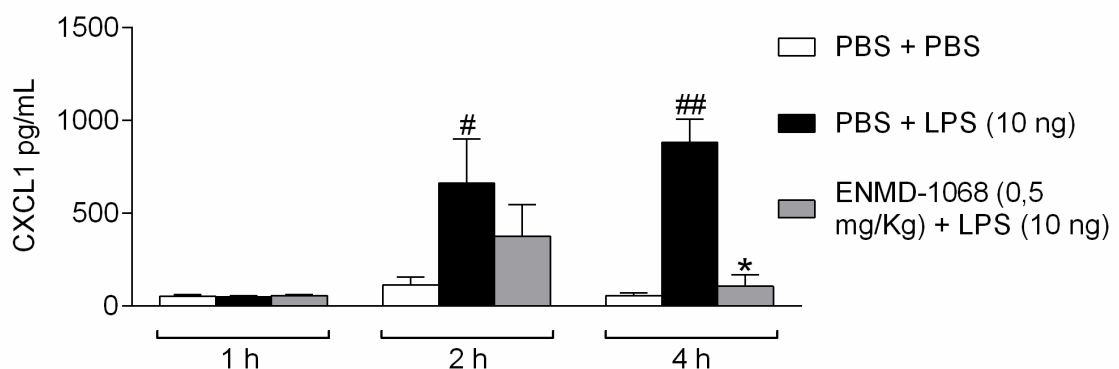


Figura 9. Efeito do antagonista de PAR2 sobre os níveis da quimiocina CXCL1 em lavado broncoalveolar de camundongos durante a inflamação pulmonar induzida pelo LPS. Os camundongos foram pré-tratados com ENMD-1068 (0,5 mg/Kg, 100 μ L i.p.) ou PBS (100 μ L i.p.) 1 hora antes da instilação intranasal de LPS (10 ng/animal) ou PBS (20 μ L/animal). O BAL foi obtido nos intervalos de 1, 2 e 4 horas após a administração de LPS e os níveis de CXCL1 avaliados em seu sobrenadante. As barras representam média \pm e.p.m. de 3 a 4 animais por grupo. $^{\#}p < 0,01$ e $^{##}p < 0,001$ quando comparados com o grupo PBS+PBS; $^*p < 0,001$ quando comparado com o grupo PBS+LPS.

5.5 Efeito do pré-tratamento com antagonista de PAR2 sobre a inflamação pulmonar induzida pelo LPS

Foi avaliado o efeito do pré-tratamento com antagonista de PAR2 no tecido pulmonar de camundongos durante a inflamação induzida por LPS. Conforme demonstrado nas imagens representativas dos pulmões (**Figura 10 A**), a administração intranasal de LPS aumentou o infiltrado de células inflamatórias no tecido pulmonar, com predominância de neutrófilos e macrófagos, quando comparado com o grupo tratado somente com PBS. O pré-tratamento com o antagonista de PAR2 foi capaz de reduzir esse infiltrado celular induzido pelo LPS (**Figura 10 A**). Esses resultados foram confirmados através da análise dos parâmetros descritos na **tabela 1**, nos quais o antagonista de PAR2 provocou redução de células inflamatórias ao redor das vias aéreas e dos vasos sanguíneos bem como no parênquima dos pulmões de camundongos induzidos pelo LPS (PBS, $0,8 \pm 0,8$; LPS, $8,2 \pm 0,2^{\#}$; ENMD-1068, $5,6 \pm 0,9^*$, $\#p < 0,001$ quando comparado com o grupo PBS+PBS e $*p < 0,05$ quando comparado com o grupo PBS+LPS, **Fig. 10 B**).

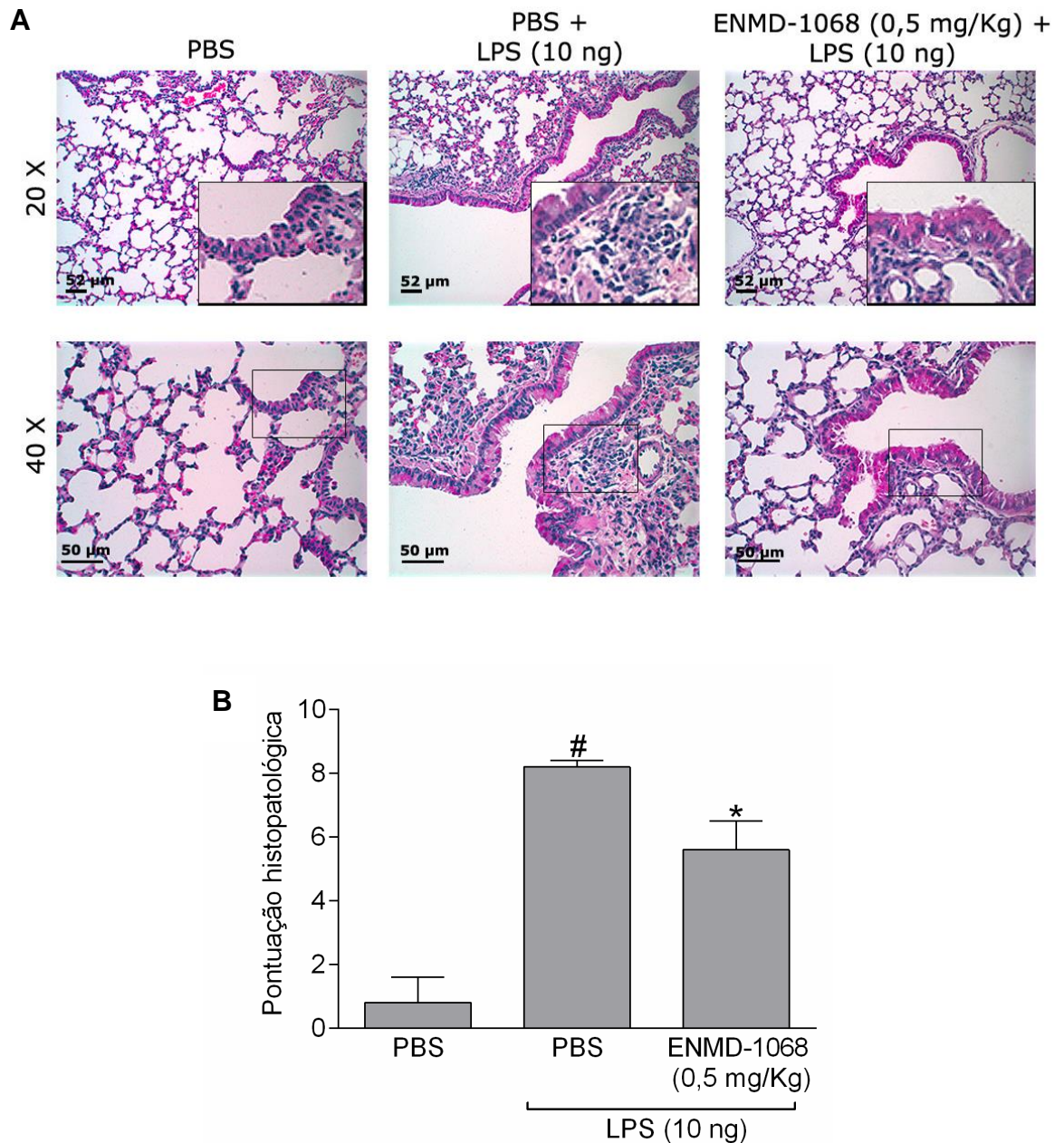


Figura 10. Efeito do antagonista de PAR2 sobre a inflamação pulmonar induzida por LPS. Os camundongos foram pré-tratados com ENMD-1068 (0,5 mg/Kg, 100 μ L i.p.) ou PBS (100 μ L i.p.) 1 hora antes da instilação intranasal de LPS (10 ng/animal) ou PBS (20 μ L/animal). Os pulmões foram coletados quatro horas após a administração de LPS para as análises histopatológicas. **A)** Fotomicrografias dos pulmões corados com hematoxilina e eosina obtidas em objetivas de 20x (painéis superiores) e 40x (painéis inferiores), as barras de escala representam 52 e 50 μ m. **B)** scores histopatológicos. As barras representam média \pm e.p.m. de 5 animais por grupo. # p < 0,001 quando comparado com o grupo PBS+PBS e * p < 0,05 quando comparado com o grupo PBS+LPS.

5.6 Avaliação da expressão de PAR2 em pulmão de camundongos estimulados pela via intranasal com LPS

Para confirmar a importância de PAR2 na inflamação pulmonar induzida pelo LPS, decidimos avaliar a expressão desse receptor em pulmão de camundongos. Os animais foram tratados pela via intranasal com PBS ou LPS (10 ng) e, após quatro horas, os pulmões foram removidos para análise da expressão de PAR2. Conforme observado nas **figuras 11 A e B**, a expressão protéica de PAR2 é aumentada após o tratamento com LPS (PBS, $0,14 \pm 0,04$; LPS, $0,29 \pm 0,03^*$, $*p < 0,05$).

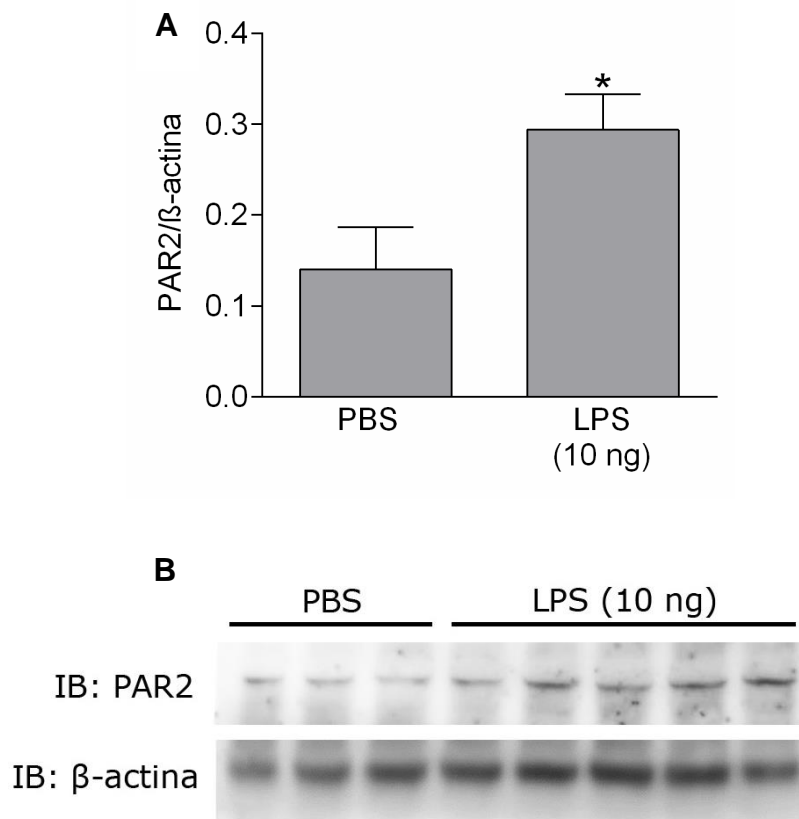
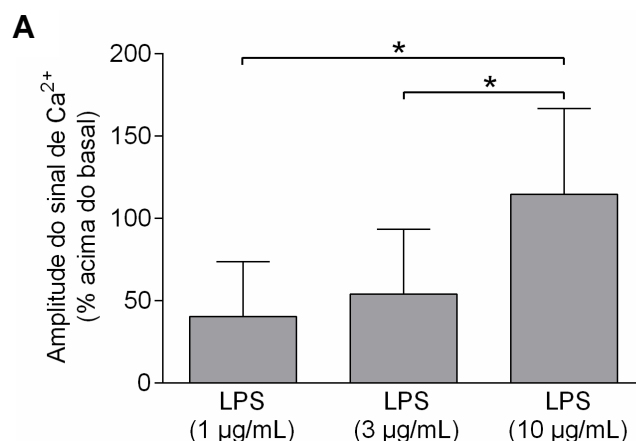


Figura 11. Expressão de PAR2 em pulmão de camundongos após instilação intranasal de LPS. Os camundongos receberam administração intranasal de LPS (10 ng/animal) ou PBS (20 μ L/animal). Após quatro horas, os pulmões foram removidos para análise da expressão protéica de PAR2 por *Western blot*. **A)** Análise quantitativa da expressão de PAR2. **B)** Gel representativo da expressão de PAR2 e β -actina. Os resultados foram normalizados pela β -actina e a análise estatística foi realizada através do Student t-test, $*p < 0,05$.

5.7 Efeito do antagonista de PAR2 na sinalização de cálcio intracelular em células RAW 264.7 estimuladas por LPS

Os macrófagos são células residentes nos pulmões de camundongos e consideradas fundamentais para o desenvolvimento da resposta inflamatória. Uma vez que os resultados anteriores demonstraram a participação de PAR2 na inflamação pulmonar induzida por LPS, analisamos o efeito do antagonista de PAR2 na ativação de macrófagos, avaliada pela sinalização intracelular de cálcio.

A análise inicial foi realizada para determinar a concentração de LPS (1, 3 ou 10 $\mu\text{g/mL}$) a ser utilizada na ativação das células RAW 264.7. Conforme demonstrado na **figura 12 A**, a concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$ foi capaz de aumentar a amplitude do sinal de cálcio quando comparado com as outras concentrações utilizadas (LPS 1 $\mu\text{g/mL}$, $40,3 \pm 9,5$; LPS 3 $\mu\text{g/mL}$, $53,9 \pm 8,2$; LPS 10 $\mu\text{g/mL}$, $114,6 \pm 5,3$ % de aumento na fluorescência do fluo-4, $*p < 0,001$ quando comparado com as células estimuladas com LPS 1 e 3 $\mu\text{g/mL}$). Porém, não houve diferença na porcentagem de células responsivas ao LPS entre as concentrações avaliadas (LPS 1 $\mu\text{g/mL}$, $6,8 \pm 0,1$; LPS 3 $\mu\text{g/mL}$, $9,7 \pm 7,1$; LPS 10 $\mu\text{g/mL}$, $27,4 \pm 2,8$ %, **Fig. 12 B**). Dessa forma, foi padronizada a concentração de LPS 10 $\mu\text{g/mL}$ para os próximos experimentos.



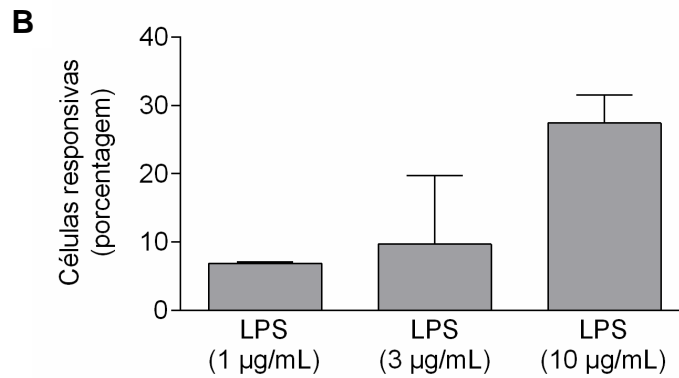


Figura 12. Sinalização de Ca^{2+} em células RAW 264.7 estimuladas com LPS. As células RAW 264.7 foram tratadas com Fluo-4/AM (6 μM) durante 15 min. e estimuladas com diferentes concentrações de LPS (1, 3 ou 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$). **A)** Amplitude do sinal de cálcio em células RAW 264.7, * $p < 0,001$. **B)** Porcentagem de células responsivas à estimulação por LPS. $n=3$ preparações com média de 100 células em cada análise.

Para avaliar o efeito do antagonista de PAR2 na sinalização intracelular de cálcio induzida pelo LPS, as células foram incubadas durante 40 min. com ENMD-1068 (5 μM) ou PBS, em seguida, foi realizado o estímulo com LPS (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) para análise da fluorescência. A pré-incubação das células RAW 264.7 com antagonista de PAR2 prejudicou a mobilização de cálcio induzida pelo LPS (**Figuras 13 A e B**). Além disso, o ENMD-1068 diminuiu a amplitude dos sinais de fluorescência estimulados pelo LPS quando comparado com as células pré-incubadas com PBS (PBS+LPS: $90,7 \pm 5,2$ e ENMD-1068+LPS: $64 \pm 4,6\%$ de aumento na fluorescência do fluo-4, $p < 0,001$, **Fig. 13 C**), bem como reduziu a porcentagem de células responsivas ao LPS (PBS+LPS: $28,4 \pm 1,9$ e ENMD-1068+LPS: $6,3 \pm 2,9\%$, $p < 0,01$, **Fig. 13 D**).

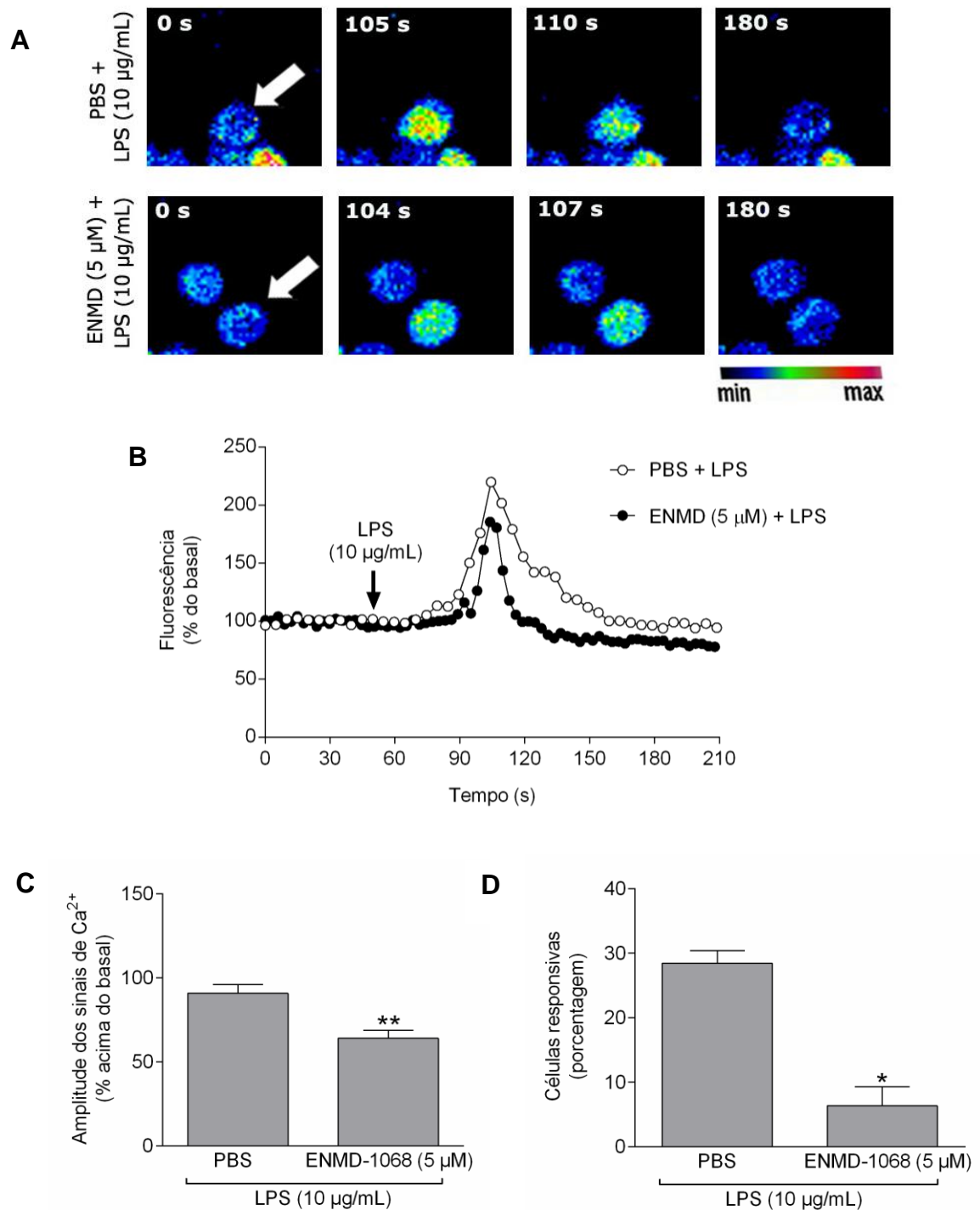


Figura 13. Efeito do antagonista de PAR2 na sinalização de Ca^{2+} em células RAW 264.7 estimuladas com LPS. A) Fotomicrografias da fluorescência emitida por 2 células RAW 264.7 representativas (setas brancas), tratadas com Fluo-4/AM ($6 \mu\text{M}$) e pré-incubadas por 40 min. com PBS seguido pela estimulação com LPS ($10 \mu\text{g/mL}$, painel superior) ou com ENMD-1068 ($5 \mu\text{M}$) seguido pela estimulação com LPS ($10 \mu\text{g/mL}$, painel inferior), e **B)** alterações da fluorescência em função do tempo nas células RAW 264.7 representativas pré-incubadas com PBS ou ENMD-1068 ($5 \mu\text{M}$) e estimuladas com LPS ($10 \mu\text{g/mL}$, indicado pela seta preta). **C)** Amplitude do sinal de Ca^{2+} em células RAW 264.7 foi reduzida nas células pré-incubadas com ENMD-1068 ($5 \mu\text{M}$). **D)** Percentual de células respondendo à estimulação com LPS. * $p < 0,01$ e ** $p < 0,001$, $n = 3$ preparações com média de 100 células em cada análise. A análise estatística foi realizada através do Student t-test.

5.8 Efeito do coquetel de inibidores de proteases na sinalização de cálcio intracelular em células RAW 264.7 estimuladas por LPS

Uma vez que o antagonista de PAR2 foi capaz de diminuir a ativação dos macrófagos, decidimos avaliar a participação das proteases liberadas por essas células na sinalização intracelular de cálcio durante o estímulo com LPS. As células RAW 264.7 foram tratadas com LPS (10 µg/mL) na presença de PBS ou do coquetel de inibidores de proteases (*protease inhibitor cocktail set I*) para análise da fluorescência. A presença do coquetel de inibidores de proteases prejudicou a mobilização de cálcio (**Figura 14 A e B**), diminuiu a amplitude dos sinais de fluorescência (PBS+LPS: $105,9 \pm 7,9$ e Inibidor+LPS: $53,22 \pm 6,8\%$ de aumento na fluorescência do fluo-4, $p < 0,001$, **Fig. 14 C**), bem como reduziu a porcentagem de células responsivas (PBS+LPS: $29,6 \pm 2,3$ e Inibidor+LPS: $8,1 \pm 3,8\%$, $p < 0,01$, **Fig. 14 D**) induzidos pelo LPS, quando comparado com as células estimuladas na presença de PBS.

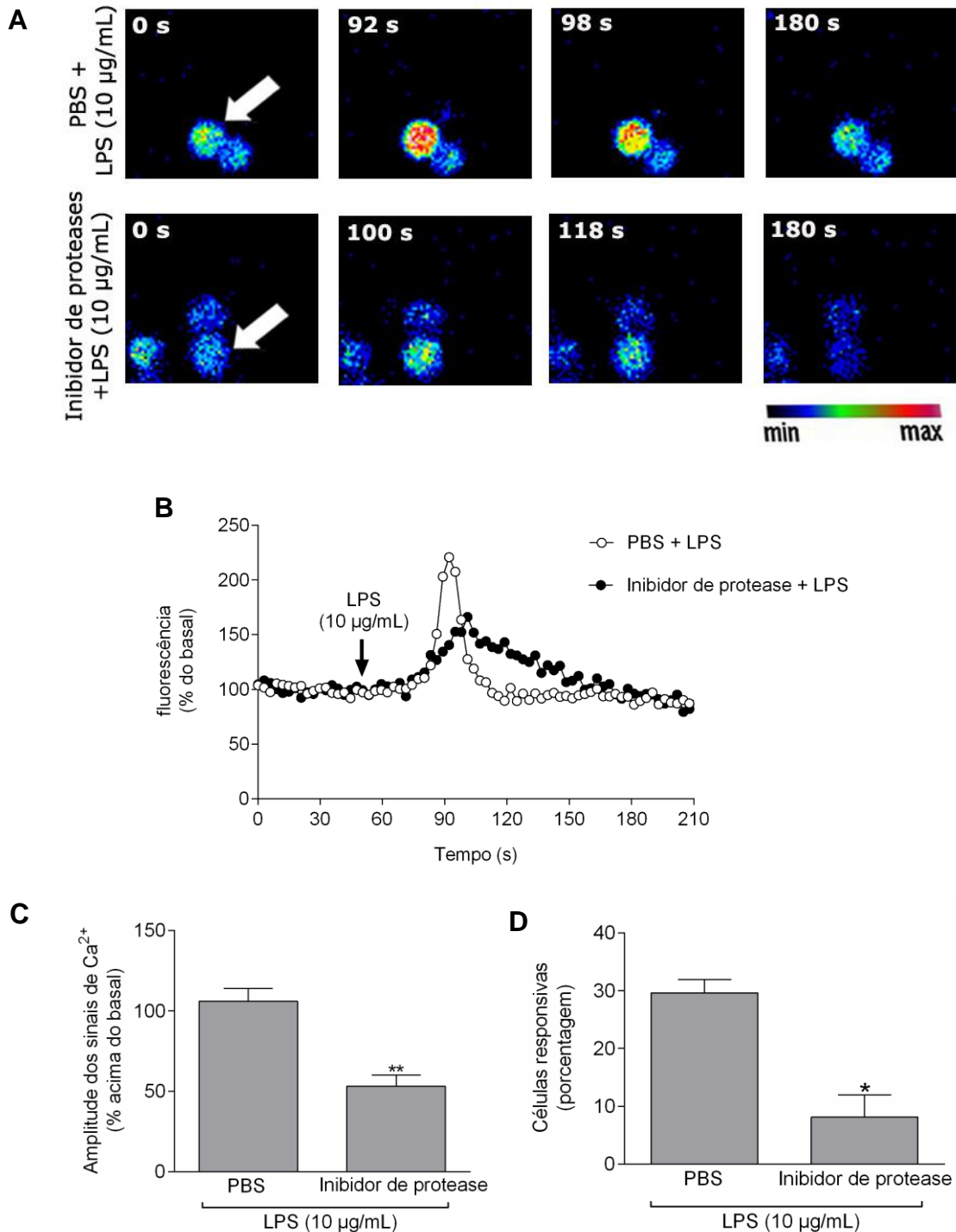


Figura 14. Efeito da presença do coquetel de inibidores de proteases na sinalização de Ca^{2+} em células RAW 264.7 estimuladas com LPS. A) Fotomicrografias da fluorescência emitida por 2 células RAW 264.7 representativas (setas brancas), tratadas com Fluo-4/AM (6 μM) e estimuladas com LPS (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) na presença de PBS (painel superior) ou do coquetel de inibidores de proteases (painel inferior), e **B)** alterações da fluorescência em função do tempo nas células RAW 264.7 representativas estimuladas com LPS (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, indicado pela seta preta) na presença de PBS ou do coquetel de inibidores de proteases. **C)** Amplitude do sinal de Ca^{2+} em células RAW 264.7 foi reduzida em células estimuladas com LPS na presença do coquetel de inibidores de proteases. **D)** Percentual de células respondendo à estimulação com LPS. * $p < 0,01$ e ** $p < 0,001$, $n = 3$ preparações com média de 100 células em cada análise. A análise estatística foi realizada através do Student t-test.

5.9 Efeito do tratamento intranasal com triptase de mastócitos sobre o número de neutrófilos presentes em lavado broncoalveolar de camundongos

A triptase é uma serino-protease liberada dos mastócitos, importante agente ativador de PAR2 e tem sido associada à inflamação pulmonar. Uma vez que foi demonstrada a importância de PAR2 e das proteases endógenas no recrutamento de neutrófilos durante a inflamação pulmonar induzida pelo LPS, investigamos a capacidade da triptase em provocar o aumento do número de neutrófilos em lavado broncoalveolar. Foi realizada a instilação intranasal com triptase de mastócitos (30, 100 ou 300 ng) e, após intervalo de 4 horas, o lavado broncoalveolar foi obtido. Como demonstrado na **figura 15**, os tratamentos com 100 e 300 ng de triptase induziram o acúmulo de neutrófilos em lavado broncoalveolar, quando comparado com o grupo controle tratado com PBS. O estímulo com a triptase também aumentou o número de células totais e mononucleares (**Tabela 6**).

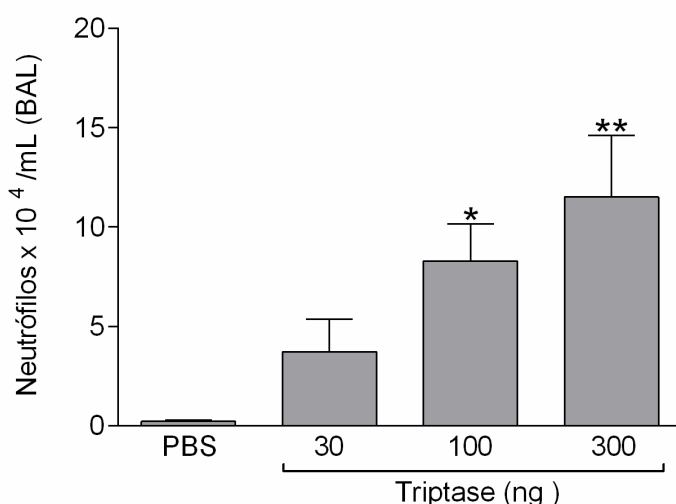


Figura 15. Análise de neutrófilos presentes em lavado broncoalveolar de camundongos tratados com triptase. Os animais receberam tratamento com triptase (30, 100 ou 300 ng/animal) ou PBS (20 µL/animal) por instilação intranasal. Após quatro horas, o lavado broncoalveolar foi obtido para a contagem celular. As barras representam média ± e.p.m de 5 animais por grupo, * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ quando comparado com o grupo PBS.

Tabela 6. Leucócitos presentes em lavado broncoalveolar de camundongos tratados pela via intranasal com triptase.

Células	PBS	Triptase i.n. (ng)		
		30	100	300
Totais	15,5 ± 2,1	58,2 ± 9,7*	68,2 ± 15*	69,5 ± 14,4*
Neutrófilos	0,22 ± 0,05	3,7 ± 1,6	8,2 ± 1,8*	11,5 ± 3,1**
Mononucleares	15,2 ± 2,1	50,1 ± 7,3*	58,4 ± 12*	57,7 ± 11,6*

Os valores representam a média e o erro padrão da média x 10⁴ células. *p< 0,05 e **p< 0,01 quando comparado com o grupo tratado com PBS. n=5.

5.10 Efeito da depleção de mastócitos com composto 48/80 sobre o número de neutrófilos presentes em lavado broncoalveolar de camundongos estimulados pela via intranasal com LPS

Tendo em vista que a instilação intranasal de triptase é capaz de induzir o aumento do número de neutrófilos presentes em lavado broncoalveolar, analisamos sua participação na inflamação pulmonar induzida pelo LPS. Dessa forma, foi realizada a depleção dos mastócitos pelo pré-tratamento com o composto 48/80 e posterior estímulo intranasal com LPS. Conforme demonstrado na **figura 16 e tabela 7**, os animais que foram pré-tratados com o composto 48/80 tiveram redução do número de neutrófilos e células totais presentes no lavado broncoalveolar após a administração de LPS, quando comparados com os animais que foram pré-tratados com PBS e estimulados com LPS.

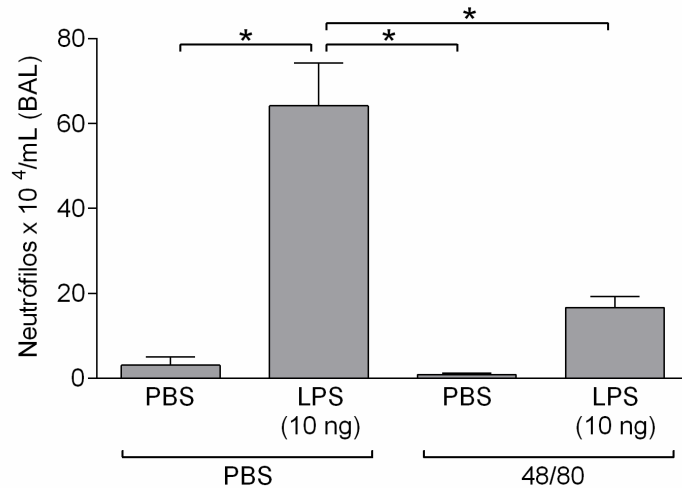


Figura 16. Efeito da depleção de mastócitos sobre o número de neutrófilos presentes em lavado broncoalveolar de camundongos durante a inflamação pulmonar induzida por LPS. Os animais foram pré-tratados durante quatro dias por administração intraperitoneal a cada doze horas com 100 μ L de doses crescentes do composto 48/80 (0,6 mg/kg no primeiro dia; 1,0 mg/kg no segundo dia; 1,2 mg/kg no terceiro dia; 1,2 e 2,4 mg/kg no quarto dia) ou PBS. No quinto dia, foi realizado estímulo intranasal com LPS (10 ng/animal) ou PBS (20 μ L/animal) e o lavado broncoalveolar obtido após o período de quatro horas. As barras representam média \pm e.p.m de 3 a 6 animais por grupo, * p < 0,001.

Tabela 7. Leucócitos presentes em lavado broncoalveolar de camundongos em resposta ao pré-tratamento com composto 48/80 e estímulo intranasal com LPS.

Células	PBS		48/80 (0,6; 1,0; 1,2 e 2,4 mg/kg)	
	PBS	LPS (10 ng)	PBS	LPS (10 ng)
Totais	23,7 \pm 5,2	95,2 \pm 10,8 ^{##}	26,2 \pm 2,6*	39,0 \pm 2,0*
Neutrófilos	3,09 \pm 1,9	64,1 \pm 10,1 ^{##}	0,8 \pm 0,3*	16,6 \pm 2,6*
Mononucleares	17,5 \pm 3,5	31 \pm 2,0 [#]	21,2 \pm 2,0	22,4 \pm 1,5

Os valores representam a média e o erro padrão da média x 10⁴ células. ^{##} p < 0,001 e [#] p < 0,01 quando comparado com o grupo pré-tratado com PBS e estimulado com PBS; * p < 0,001 quando comparado com o grupo pré-tratado com PBS e estimulado com LPS. n=3 a 6.

6 DISCUSSÃO

O recrutamento de neutrófilos a partir da microcirculação adjacente ao tecido inflamado constitui um evento fundamental da imunidade inata contra o agente agressor. Por outro lado, a persistência dessas células nos tecidos extravasculares também está relacionada ao dano tecidual e desenvolvimento de doenças inflamatórias devido à liberação de agentes antimicrobianos tais como espécies reativas de oxigênio, serino proteases e mieloperoxidase (WEISS, 1989; KRUGER et al., 2015). Nas vias aéreas, o influxo sustentado de neutrófilos está diretamente relacionado com a inflamação pulmonar aguda e sua forma mais grave denominada Síndrome da angústia respiratória, bem como patologias crônicas incluindo a Doença pulmonar obstrutiva crônica, contribuindo para o desenvolvimento de sintomas clínicos (GROMMES; SOEHNLEIN, 2011; KRUGER et al., 2015). Portanto, acredita-se que o conhecimento dos mecanismos envolvidos na migração de neutrófilos dos vasos sanguíneos para o tecido inflamado possa contribuir para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas no tratamento de doenças inflamatórias que visem à redução deste recrutamento celular.

Na literatura existem poucos relatos acerca do envolvimento entre PAR e LPS na inflamação pulmonar. Estudos *in vitro* utilizando células epiteliais das vias aéreas demonstraram que a co-estimulação com agonista peptídico de PAR2 e LPS aumenta a sinalização inflamatória quando comparado com a estimulação por cada agente separadamente (OSTROWSKA; SOKOLOVA; REISER, 2007; NHU et al., 2010), e que a sinalização de PAR2 parece ser dependente da presença de TLR4 em neutrófilos de camundongos (MORETTI et al., 2008). Além disso, Rallabhandi et al. (2008) sugeriram que PAR2 e TLR4 interagem tanto fisicamente na presença de agonista peptídico de PAR2, quanto a nível intracelular para a ativação de NF- κ B. Em modelo de edema de pata, o receptor TLR4 também contribuiu para a inflamação induzida por PAR2 (NHU et al., 2010). Dessa forma, tendo em vista a ampla expressão de PAR2 nos pulmões e seu envolvimento na resposta inflamatória, avaliamos neste trabalho o papel de PAR2 e das proteases endógenas na migração de neutrófilos induzida por LPS nas vias aéreas.

Inicialmente, avaliamos o recrutamento de neutrófilos em modelo de inflamação pulmonar induzida por instilação intranasal de LPS. A indução da inflamação *in vivo* é uma importante ferramenta para avaliar simultaneamente o envolvimento de células e mediadores na migração de células inflamatórias (KNAPP, 2009). Nos pulmões, a resposta inflamatória induzida pelo LPS envolve a expressão coordenada de citocinas, quimiocinas e moléculas de adesão que direcionam o recrutamento de neutrófilos e células mononucleares através das barreiras endoteliais e epiteliais em direção ao foco inflamatório nas primeiras horas após o estímulo (LI; MIYASAKA; ISSEKUTZ, 1998; MARTIN, 2000; MIZGERD, 2002). Nossos resultados mostram que a instilação intranasal de LPS promoveu um aumento no número de neutrófilos recuperados no lavado broncoalveolar de camundongos e corroboram com o estudo de Knapp et al. (2006) que demonstraram o acúmulo de neutrófilos bem como a liberação de TNF- α e CXCL1 em pulmão de camundongos utilizando o mesmo modelo.

A participação de proteases no desenvolvimento da inflamação pulmonar tem se tornado uma área de grande interesse, tendo em vista que, há várias evidências do aumento da atividade de proteases nas vias aéreas durante diferentes patologias. Foi demonstrado que a HAT (protease semelhante à tripsina das vias aéreas humanas, do inglês *human airway trypsin-like protease*) está presente no escarro de pacientes com bronquite crônica e foi capaz de estimular a proliferação de fibroblastos (MATSUSHIMA et al., 2006), e que os mastócitos nas vias aéreas de pacientes asmáticos são cruciais para o desenvolvimento da inflamação (PESCI et al., 1993). Em modelo de inflamação pulmonar aguda induzida por bactérias, o aumento do número de leucócitos no BAL e da permeabilidade alveolar foram associados com o acréscimo na atividade da elastase de neutrófilos no pulmão (HAGIO et al., 2008). No entanto, embora existam estudos que demonstram o envolvimento de proteases em várias patologias, seu papel na resposta imune inata não está bem esclarecido. Em nosso estudo, o pré-tratamento intranasal com aprotinina, um inibidor não seletivo de serino proteases, reduziu o número de neutrófilos e de células mononucleares presentes em lavado broncoalveolar induzidos pela instilação de LPS, sugerindo que nesse modelo o recrutamento de neutrófilos e mononucleares nas vias aéreas pode ser, pelo menos em parte, dependente

da liberação local de proteases. Esse resultado está de acordo com Gomides et al. (2012) que demonstraram que o pré-tratamento com injeção local de aprotinina inibiu significativamente o recrutamento de neutrófilos induzido pela carragenina para a cavidade pleural de camundongos.

Esses resultados iniciais corroboram com outros trabalhos de nosso grupo que apresentam o papel das proteases endógenas na indução do recrutamento de leucócitos para o tecido extravascular em diferentes modelos inflamatórios. Dessa forma, Braga et al. (2010) demonstraram que as serino proteases participam do recrutamento de eosinófilos induzido pela eotaxina-1 e que a ativação de PAR4 desempenha papel importante na regulação desse processo. Também foi demonstrado que o pré-tratamento de camundongos BALB/c com o antagonista de PAR4 tcY-NH₂ inibiu o recrutamento de neutrófilos para a cavidade pleural induzido por carragenina e tripsina (GOMIDES et al., 2012), e que o tratamento com antagonista de PAR2 ENMD-1068 foi eficaz em reduzir o recrutamento de eosinófilos induzido pela triptase para a cavidade pleural de camundongos (MATOS et al., 2013). Esses estudos demonstram também a importância dos PARs na mediação da resposta induzida pelas proteases, modulando a migração de leucócitos.

Nos últimos anos, vários trabalhos na literatura têm avaliado o envolvimento de PAR2 no recrutamento e ativação de neutrófilos. Nesse sentido, o agonista peptídico de PAR2 foi capaz de ativar e induzir mudanças morfológicas em neutrófilos (HOWELLS et al., 1997), aumentar a expressão de Mac-1 (antígeno macrofágico-1) e VLA-4 (do inglês *very late antigen 4*), bem como induzir a liberação IL-1 β e IL-8 por essas células (SHPACOVITCH et al., 2004). Além disso, a tripsina e o agonista peptídico de PAR2 estimularam o aumento na motilidade de neutrófilos (SHPACOVITCH et al., 2004). Quando analisado o efeito da ativação de PAR2 nas vias aéreas, Su et al. (2005) demonstraram que seu agonista induziu o aumento da permeabilidade vascular e do número de neutrófilos em lavado broncoalveolar. Embora o efeito pró-inflamatório da ativação de PAR2 tenha sido confirmado em estudos anteriores, seu envolvimento na inflamação pulmonar durante a infecção microbiana ainda não está esclarecido. Em nosso estudo, o pré-tratamento com antagonista de PAR2 ENMD-1068 diminuiu o número de neutrófilos e de células mononucleares recuperados do lavado broncoalveolar, sugerindo que as proteases liberadas

pela instilação intranasal de LPS podem induzir a resposta inflamatória, pelo menos em parte, através da ativação de PAR2. A redução bastante expressiva do número de neutrófilos recuperados no BAL mediada pelo tratamento com antagonista de PAR2 pode ser explicada pela baixa concentração de LPS presente em nossos experimentos, em comparação com as concentrações maiores de LPS utilizadas *in vivo* na literatura (JOH; GU; KIM, 2012; HU et al., 2017).

Uma vez que, em ausência de inflamação os neutrófilos encontram-se restritos aos vasos sanguíneos, sendo recrutados para o foco inflamatório quando ocorre a invasão pelo agente agressor (KOBAYASHI; DELEO, 2009) e que o tratamento intraperitoneal com ENMD-1068 diminuiu o número de neutrófilos induzido pelo LPS em lavado broncoalveolar, avaliamos simultaneamente o efeito desse antagonista no sangue periférico. Nossos resultados demonstram que o tratamento sistêmico com antagonista de PAR2 aumentou o número de neutrófilos bem como de células mononucleares circulantes, confirmando que o mesmo atua inibindo a transmigração celular nas vias aéreas da microcirculação para o tecido extravascular. Esse efeito mediado pelo antagonista de PAR2 possivelmente envolve moléculas de adesão, uma vez que, a redução da expressão protéica da molécula-1 de adesão intercelular (ICAM-1) e VCAM-1 foram relacionadas à deficiência de PAR2 (HYUN et al., 2008) e que o agonista peptídico de PAR2 aumenta o rolamento e a adesão de leucócitos em vênulas mesentéricas de rato, bem como o recrutamento dessas células para a cavidade peritoneal (VERGNOLLE, 1999).

O recrutamento de neutrófilos para o foco inflamatório é um processo complexo envolvendo a ação de estímulos quimiotáticos que os direcionam para o local afetado. Entre os mediadores com atividade quimiotática, a IL-8 (CXCL8) e seu homólogo em camundongos a CXCL1 desempenham papéis importantes na migração e ativação de neutrófilos atuando através da interação com receptores acoplados a proteína G (BAGGIOLINI; CLARK-LCWISB, 1992; BOZIC et al., 1994; KOBAYASHI, 2008; DE FILIPPO et al., 2013). Uma vez que, a quimiocina CXCL1 induz o recrutamento de neutrófilos e nossos resultados sugerem que a ativação de PAR2 atua modulando esse processo, decidimos investigar a participação desse receptor na liberação de CXCL1

durante a inflamação pulmonar provocada pelo LPS. Quando a produção de CXCL1 é avaliada após o intervalo de 4 horas, o antagonista de PAR2 reduziu em 88% a liberação dessa quimiocina induzida pelo LPS. Esse resultado sugere que a diminuição do recrutamento de neutrófilos mediado pelo antagonista de PAR2 ocorreu em parte através da inibição da produção de CXCL1 entre o período de 2 a 4 horas após o estímulo com LPS. Além disso, a diminuição da migração de neutrófilos, que são importantes células produtoras de CXCL1, também pode estar contribuindo para a grande redução dos níveis dessa quimiocina no intervalo de 4 horas. Esses resultados corroboram com dados da literatura que demonstraram que em células epiteliais das vias aéreas a ativação de PAR2 resultou na produção de IL-8 e, além disso, o tratamento simultâneo com LPS e o agonista peptídico de PAR2 aumentaram a expressão de IL-8 quando comparado com o resultado de cada estímulo individualmente (OSTROWSKA; SOKOLOVA; REISER, 2007; NHU et al., 2010), indicando a cooperação da resposta mediada pelos dois agonistas para a amplificação da inflamação.

Nossos resultados sugerem a importância das proteases endógenas para o recrutamento de neutrófilos induzido pelo LPS nas vias aéreas através da ativação de PAR2, e que esse evento possivelmente envolve um somatório de fatores que incluem alteração de moléculas de adesão e liberação da quimiocina CXCL1. Além disso, avaliamos por análise histopatológica o efeito do antagonista de PAR2, onde comprovamos os resultados anteriores demonstrando que o antagonismo desse receptor além de diminuir o número de neutrófilos em lavado broncoalveolar também reduziu seu infiltrado no tecido bem como a inflamação pulmonar.

A fim de confirmar a importância de PAR2 para a resposta inflamatória induzida pelo LPS nas vias aéreas, avaliamos a expressão protéica desse receptor em pulmão de camundongos. Nossos resultados demonstraram que PAR2 é expresso nas vias aéreas de forma constitutiva, porém, essa expressão é aumentada quatro horas após a instilação intranasal de LPS. A expressão constitutiva de PAR2 está de acordo com estudos que demonstraram que esse receptor está presente no estado pré-formado em grânulos de neutrófilos podendo ser prontamente mobilizados para a superfície celular após o estímulo (ST-ONGE et al., 2010) bem como na membrana

plasmática de células epiteliais das vias aéreas (OSTROWSKA; SOKOLOVA; REISER, 2007). Em outros trabalhos, a exposição ao LPS resultou em aumento dos níveis de expressão protéica bem como do RNAm referente a PAR2 em diferentes tipos celulares (NYSTEDT; RAMAKRISHNAN; SUNDELIN, 1996; OSTROWSKA; SOKOLOVA; REISER, 2007; CHAO et al., 2017), corroborando nossos resultados. Dessa forma, demonstramos que o LPS exerce um efeito regulatório sobre a expressão de PAR2 em células das vias aéreas, porém, são necessários outros experimentos para avaliar os mecanismos pelos quais o LPS induz o aumento da expressão desse receptor.

Os macrófagos são células sentinelas da imunidade inata com função importante no reconhecimento de microorganismos invasores, propagação da resposta inflamatória e eliminação do agente agressor. Quando ativados pelo LPS liberam mediadores inflamatórios importantes no recrutamento de neutrófilos como as citocinas TNF- α , IL-1 β e a CXCL1 (STRIETER; BELPERIO; KEANE, 2002; ROSSOL et al., 2011; HEROLD; MAYER; LOHMEYER, 2011; DE FILIPPO et al., 2013). Uma vez que demonstramos a importância de PAR2 para a inflamação pulmonar induzida pelo LPS nas vias aéreas, analisamos essa relação na ativação de macrófagos através da sinalização de cálcio. Em nossos experimentos, o LPS estimulou a liberação de cálcio intracelular nas células RAW 264.7 em todas as concentrações utilizadas baseadas em estudo anterior (MARTIN et al., 2005). Por outro lado, a pré-incubação com antagonista de PAR2 ENMD-1068 reduziu a amplitude do sinal de cálcio bem como o número de células responsivas estimuladas pelo LPS, confirmando assim a ativação de PAR2 em resposta ao LPS, e sua modulação por seu antagonista ENMD-1068. O efeito seletivo do ENMD-1068 *in vitro* foi demonstrado anteriormente onde o mesmo foi capaz de inibir completamente a sinalização de cálcio induzida pelo agonista peptídico de PAR2 e pela tripsina (KELSO et al., 2005). Tendo em vista que a sinalização de PAR2 mediada por proteína G leva à ativação da fosfolipase C, formação de trifosfato de inositol e diacilglicerol bem como a mobilização de cálcio (ROTHMEIER; RUF, 2012), sugerimos que a sinalização de cálcio em macrófagos induzida pelo LPS é mediada, pelo menos em parte, por intermédio da ativação de PAR2.

Alguns trabalhos da literatura demonstram que os macrófagos expressam proteases com potencial para ativação de PAR2 tais como a HAT (BERTRAM

et al., 2012; MENOUE et al., 2017), metaloproteinases (LAGENTE et al., 2005; NEWBY, 2008; LI; TAI, 2013) e catepsinas (SHAPIRO, 1999; ELMARIAH; REDDY; LERNER, 2014), dessa forma, avaliamos a influência dessas proteases durante o estímulo com LPS para a sinalização de cálcio em cultura de células RAW 264.7. Demonstramos que a presença do coquetel de inibidores de proteases reduziu a amplitude do sinal de cálcio e o número de células responsivas de maneira semelhante ao ENMD-1068. Dessa forma, sugerimos que o LPS estimula a liberação de proteases dos macrófagos que então podem ativar PAR2 de forma autócrina ou em células próximas, modulando a ativação celular.

Nossos resultados demonstraram a importância das proteases endógenas na ativação de PAR2 tanto para a migração de neutrófilos nas vias aéreas quanto para a ativação de macrófagos durante a estimulação pelo LPS, sugerindo papel importante das proteases para o desenvolvimento da resposta imune inata. Diante disso, o próximo passo foi investigar uma protease que poderia estar envolvida na inflamação pulmonar induzida pelo LPS. A triptase é uma forte candidata para contribuir neste fenômeno, pois, é secretada dos grânulos de mastócitos presentes nas vias aéreas, sendo capaz de ativar PAR2 em diferentes células tais como fibroblastos de pulmão (BAGHER et al., 2018), células musculares lisas das vias aéreas (BERGER et al., 2001), células endoteliais (SHPACOVITCH et al., 2002) e queratinócitos (STEINHOFF et al., 1999). Porém, o efeito da ativação de PAR2 pela triptase *in vivo* ainda não está bem esclarecido.

Em nosso estudo, a instilação intranasal de triptase induziu o aumento do número de neutrófilos bem como de mononucleares em lavado broncoalveolar em 4 horas após o estímulo, sugerindo que essa protease está envolvida na resposta imune inata. Esses resultados estão de acordo com a literatura na qual foi descrito que a triptase induziu o recrutamento de leucócitos para a cavidade pleural de camundongos no mesmo intervalo após o estímulo (MATOS et al., 2013), bem como o aumento de neutrófilos em lavado broncoalveolar obtido de camundongos (HUANG et al., 2001). Além disso, a injeção intraperitoneal de uma das triptases expressas em mastócitos de camundongos (mMCP-6, do inglês *mouse mast cell protease 6*) induziu um aumento significativo do número de neutrófilos na cavidade peritoneal de

camundongos (HUANG et al., 1998). A capacidade da triptase em induzir o recrutamento de leucócitos pode ser explicada em parte por resultados anteriores, onde foi demonstrado que o sobrenadante de células endoteliais tratadas com triptase induziu um aumento na migração de neutrófilos *in vitro* de maneira dependente da ação de IL-8 (COMPTON et al., 2000). Além disso, a triptase também aumentou a produção de proteína-1 quimiotática para macrófago (MCP-1) e IL-8 em células endoteliais (KINOSHITA et al., 2005).

Os mastócitos são bem conhecidos por desempenharem um papel central na patogênese de doenças alérgicas através da liberação de diversos mediadores inflamatórios (AMIN, 2012). Por outro lado, há uma quantidade crescente de evidências sugerindo que os mastócitos também desempenham papel crítico na defesa do hospedeiro contra bactérias (MATSUGUCHI, 2012). Nesse sentido, estudos iniciais demonstraram que camundongos deficientes em mastócitos apresentaram aumento da mortalidade durante peritonite bacteriana quando comparados com o grupo controle (MALAVIYA et al., 1996; ECHTENACHER; MANNEL; HÜLTNER, 1996). Porém, a participação dos mastócitos na resposta inflamatória das vias aéreas induzida por microorganismos ainda não está bem esclarecida. Em nosso trabalho, a depleção de mastócitos utilizando o composto 48/80 reduziu o número de neutrófilos, mas não o de células mononucleares presentes em lavado broncoalveolar, sugerindo que a triptase liberada dos grânulos de mastócitos é importante para o recrutamento de neutrófilos induzido pelo LPS nas vias aéreas. Resultado similar foi demonstrado em modelo de inflamação pulmonar, no qual os camundongos deficientes em mastócitos tiveram prejudicada eliminação de bactérias nos pulmões, quando comparado com o grupo controle, que foi diretamente relacionada com o reduzido influxo de neutrófilos nas vias aéreas (MALAVIYA et al., 1996). Em seguida, Huang et al. (2001) demonstraram que a triptase beta 1 deve estar em sua forma enzimaticamente ativa para aumentar a capacidade de eliminação de bactérias quando instilada nas vias aéreas de camundongos deficientes em mastócitos.

Vários estudos têm sugerido que a exposição direta ao LPS não é capaz de induzir a liberação de grânulos dos mastócitos (MATSUGUCHI, 2012; KRYSTEL-WHITTEMORE; DILEEPAN; WOOD, 2016), porém, foi demonstrado que a invasão por microorganismos nocivos bem como substâncias endógenas

pró-inflamatórias liberadas durante infecções tais como subprodutos da ativação dos componentes do sistema complemento C5a e C3a são capazes de induzir a degranulação dessas células (WOOLHISER; BROCKOW; METCALFE, 2004; OSKERITZIAN et al., 2005; SIEBENHAAR et al., 2007). Dessa forma, nossos resultados sugerem que os mastócitos são fontes de proteases, tais como a triptase, que são liberadas dos grânulos de mastócitos por fatores solúveis presentes no microambiente inflamatório induzido pelo LPS.

7 CONCLUSÃO

Nossos resultados sugerem que o receptor PAR2 é ativado pelas proteases endógenas presentes nas vias aéreas durante a inflamação pulmonar induzida pelo LPS. Essa ativação de PAR2 promove o recrutamento de neutrófilos, pelo menos em parte, por intermédio da liberação da quimiocina CXCL1 nas vias aéreas. A importância de PAR2 para a inflamação induzida pelo LPS foi confirmada pelo aumento da expressão desse receptor no tecido pulmonar de camundongos. Os resultados *in vitro* indicaram que as proteases liberadas pelos macrófagos ativam PAR2 nessas células, contribuindo para a sinalização intracelular de cálcio durante o estímulo com LPS. Ainda demonstramos que a triptase é uma importante protease envolvida na resposta imune inata e que a depleção de mastócitos reduziu o recrutamento de neutrófilos para as vias aéreas induzidos pelo LPS. Em conjunto, esses resultados sugerem um papel de PAR2 e das proteases endógenas na modulação do recrutamento de neutrófilos para as vias aéreas e conseqüentemente na inflamação pulmonar e que a triptase é uma importante protease envolvida nesse processo.

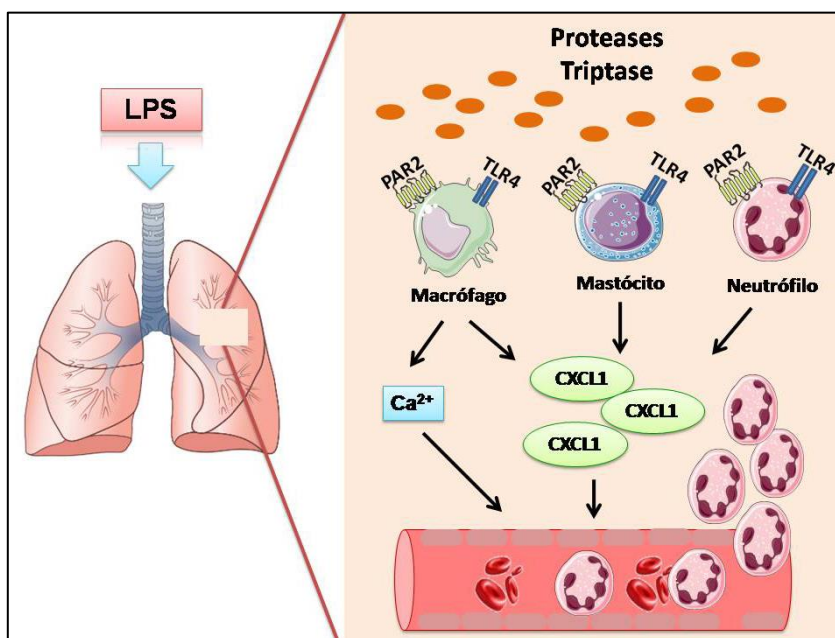


Figura 17. Esquema representativo do envolvimento de PAR2 e das proteases endógenas no recrutamento de neutrófilos durante a inflamação pulmonar induzida por LPS.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHAM, S. N.; JOHN, A. L. S. Mast cell-orchestrated immunity to pathogens. **Nature Reviews Immunology**, v. 10, n. 6, p. 440-452, 2010.

ADAMS, M. N.; RAMACHANDRAN, R.; YAU, M. K.; SUEN, J. Y.; FAIRLIE, D. P.; HOLLENBERG, M. D.; HOOPER, J. D. Structure, function and pathophysiology of protease activated receptors. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 130, n. 3, p. 248-282, 2011.

AGARWAL, S.; PIESCO, N. P.; JOHNS, L. P.; RICCELLI, A. E. Differential expression of IL-1 β , TNF- α , IL-6, and IL-8 in human monocytes in response to lipopolysaccharides from different microbes. **Journal of Dental Research**, v. 74, n. 4, p. 1057-1065, 1995.

AKIRA, S.; TAKEDA, K. Toll-like receptor signalling. **Nature Reviews Immunology**, v. 4, n. 7, p. 499-511, 2004.

AMIN, K. The role of mast cells in allergic inflammation. **Respiratory Medicine**, v. 106, n. 1, p. 9-14, 2012.

AMULIC, B.; CAZALET, C.; HAYES, G. L.; METZLER, K. D.; ZYCHLINSKY, A. Neutrophil function: from mechanisms to disease. **Annual Review of Immunology**, v. 30, p. 459–489, 2012.

ANNAHÁZI, A.; DABEK, M.; GECSE, K.; SALVADOR-CARTIER, C.; POLIZZI, A.; ROSZTÓCZY, A.; RÓKA, R.; THEODOROU, V.; WITTMANN, T.; BUENO, L.; EUTAMENE, H. Proteinase-activated receptor-4 evoked colorectal analgesia in mice: an endogenously activated feed-back loop in visceral inflammatory pain. **Neurogastroenterology and Motility**, v. 24, n. 1, p. 76-e13, 2012.

ASADUZZAMAN, M.; NADEEM, A.; ARIZMENDI, N.; DAVIDSON, C.; NICHOLS, H. L.; ABEL, M.; IONESCU, L. I.; PUTTAGUNTA, L.; THEBAUD, B.; GORDON, J.; DEFEA, K.; HOLLENBERG, M. D.; VLIAGOFTIS, H. Functional inhibition of PAR2 alleviates allergen-induced airway hyperresponsiveness and inflammation. **Clinical & Experimental Allergy**, v. 45, n. 12, p. 1844-1855, 2015.

AUBIER, M.; THABUT, G.; HAMIDI, F.; GUILLOU, N.; BRARD, J.; DOMBRET, M. C.; BORENSZTAJN, K.; AITILALNE, B.; POIRIER, I.; ROLAND-NICAISE, P.; TAILLE, C.; PRETOLANI, M. Airway smooth muscle enlargement is associated with protease-activated receptor 2/ligand overexpression in patients

with difficult-to-control severe asthma. **Journal of allergy and Clinical Immunology**, v. 138, n. 3, p. 729-739, 2016.

BAGGIOLINI, M.; CLARK-LCWISB, I. Interleukin-8, a chemotactic and inflammatory cytokine. **FEBS Letters**, v. 307, n. 1, p. 97-101, 1992.

BAGHER, M.; LARSSON-CALLERFELT, A. K.; ROSMARK, O.; HALLGREN, O.; BJERMER, L.; WESTERGREN-THORSSON, G. Mast cells and mast cell tryptase enhance migration of human lung fibroblasts through protease-activated receptor 2. **Cell Communication and Signaling**, v. 16, n. 1, p. 1-13, 2018.

BARRETT, A. J.; MCDONALD, J. K. Nomenclature: protease, proteinase and peptidase. **Biochemical Journal**, v. 237, n. 3, p. 935, 1986.

BARRIOS, V. E.; JAROSINSKI, M. A.; WRIGHT, C. D. Proteinase-activated receptor-2 mediates hyperresponsiveness in isolated guinea pig bronchi. **Biochemical Pharmacology**, v. 66, n. 3, p. 519-525, 2003.

BARRIOS, V. E.; MIDDLETON, S. C.; KASHEM, M. A.; HAVILL, A. M.; TOOMBS, C. F.; WRIGHT, C. D. Tryptase mediates hyperresponsiveness in isolated guinea pig bronchi. **Life Sciences**, v. 63, n. 26, p. 2295-2303, 1998.

BENARAF, C.; PRIEBE, G. P.; REMOLD-O'DONNELL, E. The neutrophil serine protease inhibitor serpinb1 preserves lung defense functions in *Pseudomonas aeruginosa* infection. **Journal of Experimental Medicine**, v. 204, n. 8, p. 1901-1909, 2007.

BERGER, P.; PERNG, D. W.; THABREW, H.; COMPTON, S. J.; CAIRNS, J. A.; MCEUEN, A. R.; MARTHAN, R.; DE LARA, J. M. T.; WALLS, A. F. Tryptase and agonists of PAR-2 induce the proliferation of human airway smooth muscle cells. **Journal of Applied Physiology**, v. 91, n. 3, p. 1372-1379, 2001.

BERTRAM, S.; HEURICH, A.; LAVENDER, H.; GIERER, S.; DANISCH, S.; PERIN, P.; LUCAS, J. M.; NELSON, P. S.; POHLMANN, S.; SOILLEUX, E. J. Influenza and SARS-coronavirus activating proteases TMPRSS2 and HAT are expressed at multiple sites in human respiratory and gastrointestinal tracts. **PLoS ONE**, v. 7, n. 4, 2012.

BEUTLER, B.; HOEBE, K.; DU, X.; ULEVITCH, R. J. How we detect microbes and respond to them: the Toll-like receptors and their transducers. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 74, n. 4, p. 479-485, 2003.

BLOW, D. M.; BIRKTOFT, J. J.; HARTLEY, B. S. Role of a buried acid group in the mechanism of action of chymotrypsin. **Nature**, v. 221, n. 5178, p. 337-340, 1969.

BOLTON, S. J.; MCNULTY, C. A.; THOMAS, R. J.; HEWITT, C. R. A. Expression of and functional responses to protease-activated receptors on human eosinophils. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 74, n. 1, p. 60-68, 2003.

BOND, J. S. Proteases: History, discovery, and roles in health and disease. **Journal of Biological Chemistry**, v. 294, n. 5, p. 1643-1651, 2019.

BOND, J. S.; BUTLER, P. E. Intracellular proteases. **Annual Review of Biochemistry**, v. 56, n. 1, p. 333-364, 1987.

BORREGAARD, N. Neutrophils, from marrow to microbes. **Immunity Review**, v. 33, n. 5, p. 657-670, 2010.

BOZIC, C. R.; GERARD, N. P.; VON UEXKULL-GULDENBAND, C.; KOLAKOWSKI, L. F.; CONKLYN, M. J.; BRESLOW, R.; SHOWELL, H. J.; GERARD, C. The murine interleukin 8 type B receptor homologue and its ligands. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 47, p. 29355-29358, 1994.

BRAGA, A. D.; MIRANDA, J. P.; FERREIRA, G. M.; BILHEIRO, R. P.; DUARTE, I. D.; FRANCISCHI, J. N.; KLEIN, A. Blockade of proteinase-activated receptor-4 inhibits the eosinophil recruitment induced by eotaxin-1 in the pleural cavity of mice. **Pharmacology**, v. 86, p. 224-230, 2010.

BUCCI, M.; VELLECCO, V.; HARRINGTON, L.; BRANCALEONE, V.; ROVIEZZO, F.; MATTACE RASO, G.; IANARO, A.; LUNGARELLA, G.; DE PALMA, R.; MELI, R.; CIRINO, G. Cross-talk between toll-like receptor 4 (TLR4) and proteinase-activated receptor 2 (PAR2) is involved in vascular function. **British Journal of Pharmacology**, v. 168, p. 411-420, 2013.

CAMERER, E.; HUANG, W.; COUGHLIN, S. R. Tissue factor- and factor X-dependent activation of protease-activated receptor 2 by factor VIIa. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, n. 10, p. 5255-5260, 2000.

CHAO, H. H.; CHEN, P. Y.; HAO, W. R.; CHIANG, W. P.; CHENG, T. H.; LOH, S. H.; LEUNG, Y. M.; LIU, J. C.; CHEN, J. J.; SUNG, L. C. Lipopolysaccharide pretreatment increases protease-activated receptor-2 expression and monocyte chemoattractant protein-1 secretion in vascular endothelial cells. **Journal of Biomedical Science**, v. 24, n. 85, 2017.

CHI, L.; LI, Y.; STEHNO-BITTEL, L.; GAO, J.; MORRISON, D. C.; STECHSCHULTE, D. J.; DILEEPAN, K. N. Interleukin-6 production by endothelial cells via stimulation of protease-activated receptors is amplified by endotoxin and tumor necrosis factor-alpha. **Journal of Interferon & Cytokine Research**, v. 21, n. 4, p. 231-240, 2001.

CHUNG, W. O.; HANSEN, S. R.; RAO, D.; DALE, B. A. Protease-activated receptor signaling increases epithelial antimicrobial peptide expression. **The Journal of Immunology**, v. 173, p. 5165-5170, 2004.

CHURG, A.; WANG, R. D.; TAI, H.; WANG, X.; XIE, C.; DAI, J.; SHAPIRO, S. D.; WRIGHT, J. L. Macrophage metalloelastase mediates acute cigarette smoke-induced inflammation via tumor necrosis factor- α release. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 167, n. 8, p. 1083-1089, 2003.

COMPTON, S. J.; CAIRNS, J. A.; HOLGATE, S. T.; WALLS, A. F. Human mast cell tryptase stimulates the release of an IL-8-dependent neutrophil chemotactic activity from human umbilical vein endothelial cells (HUVEC). **Clinical and Experimental Immunology**, v. 121, p. 31-36, 2000.

COUGHLIN, S. R. Thrombin signalling and protease-activated receptors. **Nature**, v. 407, n. 6801, p. 258-264, 2000.

COUGHLIN, S. R.; CAMERER, E. PARTICipation in inflammation. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 111, n.1, p 25-27, 2003.

CRUVINEL, W. M.; MESQUITA, D.; ARAÚJO, J. A. P.; CATELAN, T. T. T.; SOUZA, A. W. S.; SILVA, N. P.; ANDRADE, L. E. C. Immune system - part I. Fundamentals of innate immunity with emphasis on molecular and cellular mechanisms of inflammatory response. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 50, n. 4, p. 434-461, 2010.

D'ANDREA, M. R.; DERIAN, C. K.; LETURCQ, D.; BAKER, S. M.; BRUNMARK, A.; LING, P.; DARROW, A. L.; SANTULLI, R. J.; BRASS, L. F.; ANDRADE-GORDON, P. Characterization of protease-activated receptor-2 immunoreactivity in normal human tissues. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 46, n. 2, p. 157-164, 1998.

DE BOER, J. D.; VAN'T VEER, C.; STROO, I.; VAN DER MEER, A. J.; DEVOS, A. F.; VAN DER ZEE, J. S.; ROELOFS, J. J. T. H.; VAN DER POLL, T. Protease-activated receptor-2 deficient mice have reduced house dust mite-

evoked allergic lung inflammation. **Innate Immunity**, v. 20, n. 6, p. 618-625, 2013.

DE FILIPPO, K.; DUDECK, A.; HASENBERG, M.; NYE, E.; VAN ROOIJEN, N.; HARTMANN, K.; GUNZER, M.; ROERS, A.; HOGG, N. Mast cell and macrophage chemokines CXCL1/CXCL2 control the early stage of neutrophil recruitment during tissue inflammation. **BLOOD**, v. 121, n. 24, p. 4930-4937, 2013.

DE OLIVEIRA, S.; ROSOWSKI, E. E.; HUTTENLOCHER, A. Neutrophil migration in infection and wound repair: going forward in reverse. **Nature Reviews Immunology**, v. 16, n. 6, p. 378-391, 2016.

DI ROSA, M.; GIROUD, J. P.; WILLOUGHBY, D. A. Studies on the mediators of the acute inflammatory response induced in rats in different sites by carrageenan and turpentine. **The Journal of Pathology**, v. 104, n. 1, p. 15-29, 1971.

DICK, E. P.; PRINCE, L. R.; PRESTWICH, E. C.; RENSHAW, S. A.; WHYTE, M. K. B.; SABROE, I. Pathways regulating lipopolysaccharide-induced neutrophil survival revealed by lentiviral transduction of primary human neutrophils. **Immunology**, v. 127, n. 2, p. 249-255, 2009.

ECHTENACHER, B.; MANNEL, D. N.; HÜLTNER, L. Critical protective role of mast cells in a model of acute septic peritonitis. **Nature**, v. 381, n. 6577, p. 75-77, 1996.

EHRENGRUBER, M. U.; GEISER, T.; DERANLEAU, D. A. Activation of human neutrophils by C3a and C5A comparison of the effects on shape changes, chemotaxis, secretion, and respiratory burst. **FEBS Letters**, v. 346, p. 181-184, 1994.

EL AMIRI, C.; SOUALMIA, F. Serine protease inhibitors to treat inflammation: a patent review (2011-2016). **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v. 28, n. 2, p. 93-110, 2017.

ELMARIAH, S. B.; REDDY, V. B.; LERNER, E. A. Cathepsin S signals via PAR2 and generates a novel tethered ligand receptor agonist. **PLoS ONE**, v. 9, n. 6, 2014.

FAGUNDES, J. A. G.; MONOO, L. D.; ALVES, V. T. E.; PANNUTI, C. M.; CORTELLI, S. C.; CORTELLI, J. R.; HOLZHAUSEN, M. Porphyromonas gingivalis is associated with protease-activated receptor-2 upregulation in

chronic periodontitis. **Journal of Periodontology**, v. 82, n. 11, p. 1596-1601, 2011.

FREUDENBERG, M. A.; MERLIN, T.; GUMENSCHMEIMER, M.; KALIS, C.; LANDMANN, R.; GALANOS, C. Role of lipopolysaccharide susceptibility in the innate immune response to *Salmonella typhimurium* infection: LPS, a primary target for recognition of gram-negative bacteria. **Microbes and Infection**, v. 3, p. 1213-1222, 2001.

FREUDENBERG, M. A.; TCHAPCHET, S.; KECK, S.; FEJER, G.; HUBER, M.; SCHUTZE, N.; BEUTLER, B.; GALANOS, C. Lipopolysaccharide sensing an important factor in the innate immune response to gram-negative bacterial infections: benefits and hazards of LPS hypersensitivity. **Immunobiology**, v. 213, p. 193-203, 2008.

GALLI, S. J.; KALESNIKOFF, J.; GRIMBALDESTON, M. A.; PILIPONSKY, A. M.; WILLIAMS, C. M. M.; TSAI, M. Mast cells as “tunable” effector and immunoregulatory cells: recent advances. **Annual Review of Immunology**, v. 23, n. 1, p. 749-786, 2005.

GARCIA, C. C.; RUSSO, R. C.; GUABIRABA, R.; FAGUNDES, C. T.; POLIDORO, R. B.; TAVARES, L. P.; SALGADO, A. P. C.; CASSALI, G. D.; SOUSA, L. P.; MACHADO, A. V.; TEIXEIRA, M. M. Platelet-activating factor receptor plays a role in lung injury and death caused by influenza A in mice. **PLoS Pathogens**, v. 6, n. 11, 2010.

GOMIDES, L. F.; DUARTE, I. D.; FERREIRA, R. G.; PEREZ, A. C.; FRANCISCHI, J. N.; KLEIN, A. Proteinase-activated receptor-4 plays a major role in the recruitment of neutrophils induced by trypsin or carrageenan during pleurisy in mice. **Pharmacology**, v. 89, p. 275-282, 2012.

GROMMES, J.; SOEHNLEIN, O. Contribution of neutrophils to acute lung injury. **Molecular Medicine**, v. 17, n. 3-4, p. 293-307, 2011.

HACHIYA, O.; TAKEDA, Y.; MIYATA, H.; WATANABE, H.; YAMASHITA, T.; SENDO, F. Inhibition by bacterial lipopolysaccharide of spontaneous and TNF- α -induced human neutrophil apoptosis in vitro. **Microbiology and Immunology**, v. 39, n. 9, p. 715-723, 1995.

HAGIO, T.; KISHIKAWA, K.; KAWABATA, K.; TASAKA, S.; HASHIMOTO, S.; HASEGAWA, N.; ISHIZAKA, A. Inhibition of neutrophil elastase reduces lung injury and bacterial count in hamsters. **Pulmonary Pharmacology & Therapeutics**, v. 21, n. 6, p. 884-891, 2008.

HANSEN, K. K.; SHERMAN, P. M.; CELLARS, L.; ANDRADE-GORDON, P.; PAN, Z.; BARUCH, A.; WALLACE, J. L.; HOLLENBERG, M. D.; VERGNOLLE, N. A major role for proteolytic activity and proteinase-activated receptor-2 in the pathogenesis of infectious colitis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, n. 23, p. 8363-8368, 2005.

HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ, L.; SANZ, C.; GARCÍA-SOLAESA, V.; PADRÓN, J.; GARCÍA-SÁNCHEZ, A.; DÁVILA, I.; ISIDORO-GARCÍA, M.; LORENTE, F. Tryptase: Genetic and functional considerations. **Allergologia et Immunopathologia**, v. 40, n. 6, p. 385-389, 2012.

HEROLD, S.; MAYER, K.; LOHMEYER, J. Acute lung injury: how macrophages orchestrate resolution of inflammation and tissue repair. **Frontiers in Immunology**, v. 2, 2011.

HOLLENBERG, M. D.; MIHARA, K.; POLLEY, D.; SUEN, J. Y.; HAN, A.; FAIRLIE, D. P.; RAMACHANDRAN, R. Biased signalling and proteinase-activated receptors (PARs): targeting inflammatory disease. **British Journal of Pharmacology**, v. 171, p. 1180-1194, 2014.

HOLZHAUSEN, M.; SPOLIDORIO, L. C.; ELLEN, R. P.; JOBIN, M. C.; STEINHOFF, M.; ANDRADE-GORDON, P.; VERGNOLLE, N. Protease-activated receptor-2 activation a major role in the pathogenesis of *Porphyromonas gingivalis* infection. **American Journal of Pathology**, v. 168, n. 4, p. 1189-1199, 2006.

HOWELLS, G. L.; MACEY, M. G.; CHINNI, C.; HOU, L.; FOX, M. T.; HARRIOTT, P.; STONE, S. R. Proteinase-activated receptor-2: expression by human neutrophils. **Journal of Cell Science**, v. 110, p. 881-887, 1997.

HU, X.; TIAN, Y.; QU, S.; CAO, Y.; LI, S.; ZHANG, W.; ZHANG, Z.; ZHANG, N.; FU, Y. Protective effect of TM6 on LPS-induced acute lung injury in mice. **Scientific Reports**, v. 7, 2017.

HUANG, C.; DE SANCTIS, G. T.; O'BRIEN, P. J.; MIZGERD, J. P.; FRIEND, D. S.; DRAZEN, J. M.; BRASS, L. F.; STEVENS, R. L. Evaluation of the substrate specificity of human mast cell tryptase β 1 and demonstration of its importance in bacterial infections of the lung. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 28, p. 26276-26284, 2001.

HUANG, C.; FRIEND, D. S.; QIU, W. T.; WONG, G. W.; MORALES, G.; HUNT, J.; STEVENS, R. L. Induction of a selective and persistent extravasation of neutrophils into the peritoneal cavity by tryptase mouse mast cell protease 6. **The Journal of Immunology**, v. 160, p. 1910-1919, 1998.

HYUN, E.; ANDRADE-GORDON, P.; STEINHOFF, M.; VERGNOLLE, N. Protease-activated receptor-2 activation: a major actor in intestinal inflammation. **Gut**, v. 57, n. 9, p. 1222-1229, 2008.

ISERMANN, B. Homeostatic effects of coagulation protease-dependent signaling and protease activated receptors. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 15, n. 7, p. 1273-1284, 2017.

JANEWAY, C. A. Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. **Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology**, v. 54, p. 1-13, 1989.

JANEWAY, C. A.; MEDZHITOV, R. Innate immune recognition. **Annual Review of Immunology**, v. 20, p. 197-216, 2002.

JIANG, Y.; YAU, M. K.; KOK, W. M.; LIM, J.; WU, K. C.; LIU, L.; HILL, T. A.; SUEN, J. Y.; FAIRLIE, D. P. Biased signaling by peptide agonists of protease activated receptor 2. **ACS Chemical Biology**, v. 12, n. 5, p. 1217-1226, 2017.

JOH, E. H.; GU, W.; KIM, D. H. Echinocystic acid ameliorates lung inflammation in mice and alveolar macrophages by inhibiting the binding of LPS to TLR4 in NF- κ B and MAPK pathways. **Biochemical Pharmacology**, v. 84, p. 331-340, 2012.

KAWAI, T.; AKIRA, S. The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition. **International Immunology**, v. 21, n. 4, p. 317-337, 2009.

KAWAI, T.; AKIRA, S. Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. **Immunity**, v. 34, n. 5, p. 637-650, 2011.

KAWASAKI, T.; KAWAI, T. Toll-like receptor signaling pathways. **Frontiers in Immunology**, v. 5, 2014.

KELSO, E. B.; LOCKHART, J. C.; HEMBROUGH, T.; DUNNING, L.; PLEVIN, R.; HOLLENBERG, M. D.; SOMMERHOFF, C. P.; MCLEAN, J. S.; FERRELL, W. R. Therapeutic promise of proteinase-activated receptor-2 antagonism in joint inflammation. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 316, n. 3, p. 1017-1024, 2005.

KINOSHITA, M.; OKADA, M.; HARA, M.; FURUKAWA, Y.; MATSUMORI, A. Mast cell tryptase in mast cell granules enhances MCP-1 and interleukin-8 production in human endothelial cells. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 25, n. 9, p. 1858-1863, 2005.

KNAPP, S. LPS and bacterial lung inflammation models. **Drug Discovery Today: Disease Models**, v. 6, n. 4, p. 113-118, 2009.

KNAPP, S.; FLORQUIN, S.; GOLENBOCK, D. T.; POLL, T. V. D. Pulmonary lipopolysaccharide (LPS)-binding protein inhibits the LPS-induced lung inflammation in vivo. **The Journal of Immunology**, v. 176, p. 3189-3195, 2006.

KNIGHT, D. A.; LIM, S.; SCAFFIDI, A. K.; ROCHE, N.; CHUNG, K. F.; STEWART, G. A.; THOMPSON P. J. Protease-activated receptors in human airways: upregulation of PAR-2 in respiratory epithelium from patients with asthma. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 108, n. 5, p. 797-803, 2001.

KOBAYASHI, S. D.; DELEO, F. R. Role of neutrophils in innate immunity: a systems biology-level approach. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine**, v. 1, n. 3, p. 309-333, 2009.

KOBAYASHI, Y. The role of chemokines in neutrophil biology. **Frontiers in Bioscience**, v. 13, p. 2400-2407, 2008.

KORKMAZ, B.; HORWITZ, M. S.; JENNE, D. E.; GAUTHIER, F. Neutrophil elastase, proteinase 3, and cathepsin G as therapeutic targets in human diseases. **Pharmacological Reviews**, v. 62, p. 726-759, 2010.

KRUGER, P.; SAFFARZADEH, M.; WEBER, A. N. R.; RIEBER, N.; RADSAK, M.; BERNUTH, H. V.; BENARAF, C.; ROOS, D.; SKOKOWA, J.; HARTL, D. Neutrophils: between host defence, immune modulation, and tissue injury. **PLOS Pathogens**, v. 11, n. 3, 2015.

KRYSTEL-WHITTEMORE, M.; DILEEPAN, K. N.; WOOD, J. G. Mast cell: a multi-functional master cell. **Frontiers in Immunology**, v. 6, 2016.

KUZMICH, N. N.; SIVAK, K. V.; CHUBAREV, V. N.; POROZOV, Y. B.; SAVATEEVA-LYUBIMOVA, T. N.; PERI, F. TLR4 signaling pathway modulators as potential therapeutics in inflammation and sepsis. **Vaccines**, v. 5, n. 4, 2017.

LAGENTE, V.; MANOURY, B.; NÉAN, S.; LE QUÉMENT, C.; MARTIN-CHOULY, C.; BOICHOT, E. Role of matrix metalloproteinases in the development of airway inflammation and remodeling. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 38, p. 1521-1530, 2005.

LAN, R. S.; STEWART, G. A.; HENRY, P. J. Role of protease-activated receptors in airway function: a target for therapeutic intervention? **Pharmacology & Therapeutics**, v. 95, n. 3, p. 239-257, 2002.

LEE, K. H.; LEE, J.; JEONG, J.; WOO, J.; LEE, C. H.; YOO, C. G. Cigarette smoke extract enhances neutrophil elastase-induced IL-8 production via proteinase-activated receptor-2 upregulation in human bronchial epithelial cells. **Experimental & Molecular Medicine**, v. 50, n. 7, 2018.

LEITE, M. F.; THROWER, E. C.; ECHEVARRIA, W.; KOULEN, P.; HIRATA, K.; BENNETT, A. M.; EHRLICH, B. E.; NATHANSON, M. H. Nuclear and cytosolic calcium are regulated independently. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 5, p. 2975-2980, 2003.

LI, X. C.; MIYASAKA, M.; ISSEKUTZ, T. B. Blood monocyte migration to acute lung inflammation involves both CD11/CD18 and very late activation antigen-4-dependent and independent pathways. **Journal of Immunology**, v. 161, p. 6258-6264, 1998.

LI, X.; TAI, H. H. Thromboxane A₂ receptor-mediated release of matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) induces expression of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) by activation of protease-activated receptor 2 (PAR2) in A549 human lung adenocarcinoma cells. **Molecular Carcinogenesis**, v. 53, n. 8, p. 659-666, 2013.

LÓPEZ-OTÍN, C.; BOND, J. S. Proteases: Multifunctional enzymes in life and disease. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 45, p. 30433-30437, 2008.

LU, Y. C.; YEH, W. C.; OHASHI, P. S. LPS/TLR4 signal transduction pathway. **Cytokine**, v. 42, n. 2, p. 145-151, 2008.

MALAVIYA, R.; ABRAHAM, S. N. Role of mast cell leukotrienes in neutrophil recruitment and bacterial clearance in infectious peritonitis. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 67, n. 6, p. 841-846, 2000.

MALAVIYA, R.; IKEDA, T.; ROSS, E.; ABRAHAM, S. N. Mast cell modulation of neutrophil influx and bacterial clearance at sites of infection through TNF- α . **Nature**, v. 381, n. 6577, p. 77-80, 1996.

MARTIN, L.; PINGLE, S. C.; HALLAM, D. M.; RYBAK, L. P.; RAMKUMAR, V. Activation of the adenosine A₃ receptor in RAW 264.7 cells inhibits lipopolysaccharide-stimulated tumor necrosis factor- α release by reducing calcium-dependent activation of nuclear factor- κ B and extracellular signal-

regulated kinase $\frac{1}{2}$. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 316, n. 1, p. 71-78, 2005.

MARTIN, T. R. Recognition of bacterial endotoxin in the lungs. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 23, n. 2, p. 128-132, 2000.

MATOS, N. A.; SILVA, J. F.; MATSUI, T. C.; DAMASCENO, K. A.; DUARTE, I. D. G.; LEMOS, V. S.; CASSALI, G. D.; KLEIN, A. Mast cell tryptase induces eosinophil recruitment in the pleural cavity of mice via proteinase-activated receptor 2. **Inflammation**, v. 36, n. 6, p. 1260-1267, 2013.

MATSUGUCHI, T. Mast cells as critical effectors of host immune defense against Gram-negative bacteria. **Current Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 10, p. 1432-1442, 2012.

MATSUSHIMA, R.; TAKAHASHI, A.; NAKAYA, Y.; MAEZAWA, H.; MIKI, M.; NAKAMURA, Y.; OHGUSHI, F.; YASUOKA, S. Human airway trypsin-like protease stimulates human bronchial fibroblast proliferation in a protease-activated receptor-2-dependent pathway. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 290, p. L385-L395, 2006.

MCCULLOCH, K.; MCGRATH, S.; HUESA, C.; DUNNING, L.; LITHERLAND, G.; CRILLY, A.; HULTIN, L.; FERRELL, W. R.; LOCKHART, J. C.; GOODYEAR, C. S. Rheumatic disease: protease-activated receptor-2 in synovial joint pathobiology. **Frontiers in Endocrinology**, v. 9, n. 257, 2018.

MEDZHITOV, R.; JANEWAY, C. Innate immunity. **The New England Journal of Medicine**, v. 343, n. 5, p. 338-344, 2000.

MENOU, A.; DUITMAN, J.; FLAJOLET, P.; SALLENAVE, J. M.; MAILLEUX, A. A.; CRESTANI, B. Human airway trypsin-like protease, a serine protease involved in respiratory diseases. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 312, n. 5, p. L657-L668, 2017.

METCALF, D. The role of the colony-stimulating factors in resistance to acute infections. **Immunology and Cell Biology**, v. 65, n. 1, p. 35-43, 1987.

MIIKE, S.; MCWILLIAM, A. S.; KITA, H. Trypsin induces activation and inflammatory mediator release from human eosinophils through protease-activated receptor-2. **The Journal of Immunology**, v. 167, p. 6615-6622, 2001.

MIZGERD, J. P. Molecular mechanisms of neutrophil recruitment elicited by bacteria in the lungs. **Seminars in Immunology**, v. 14, n. 2, p. 123-132, 2002.

MORAES, T. J.; MARTIN, R.; PLUMB, J. D.; VACHON, E.; CAMERON, C. M.; DANESH, A.; KELVIN, D. J.; RUF, W.; DOWNEY, G. P. Role of PAR2 in murine pulmonary pseudomonas infection. **American Journal of Physiology Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 294, p. L368-L377, 2008.

MORETTI, S.; BELLOCCHIO, S.; BONIFAZI, P.; BOZZA, S.; ZELANTE, T.; BISTONI, F.; ROMANI, L. The contribution of PARs to inflammation and immunity to fungi. **Mucosal Immunology**, v. 1, n. 2, p. 156-168, 2008.

NEWBY, A. C. Metalloproteinase expression in monocytes and macrophages and its relationship to atherosclerotic plaque instability. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 28, n. 12, p. 2108-2114, 2008.

NHU, Q. M.; SHIREY, K.; TEIJARO, J. R.; FARBER, D. L.; NETZEL-ARNETT, S.; ANTALIS, T. M.; FASANO, A.; VOGEL, S. N. Novel signaling interactions between proteinase-activated receptor 2 and Toll-like receptors in vitro and in vivo. **Mucosal Immunology**, v. 3, n. 1, p. 29-39, 2010.

NYSTEDT, S.; RAMAKRISHNAN, V.; SUNDELIN, J. The proteinase-activated receptor 2 is induced by inflammatory mediators in human endothelial cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 25, p. 14910-14915, 1996.

O'NEILL, L. A. J.; GOLENBOCK, D.; BOWIE, A. G. The history of toll-like receptors - redefining innate immunity. **Nature Reviews Immunology**, v. 13, n. 6, p. 453-460, 2013.

OH, S. W.; PAE, C. I.; LEE, D. K.; JONES, F.; CHIANG, G. K. S.; KIM, H. O.; MOON, S. H.; CAO, B.; OGBU, C.; JEONG, K. W.; KOZU, G.; NAKANISHI, H.; KAHN, M.; CHI, E. Y.; HENDERSON, W. R. Trypsin inhibition blocks airway inflammation in a mouse asthma model. **Journal of Immunology**, v. 168, p. 1992-2000, 2002.

OSKERITZIAN, C. A.; ZHAO, W.; MIN, H. K.; XIA, H. Z.; POZEZ, A.; KIEV, J.; SCHWARTZ, L. B. Surface CD88 functionally distinguishes the MC_{TC} from the MC_T type of human lung mast cell. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 115, n. 6, p. 1162-1168, 2005.

OSSOVSKAYA, V. S.; BUNNETT, N. W. Protease-activated receptors: contribution to physiology and disease. **Physiological Reviews**, v. 84, n. 2, p. 579-621, 2004.

OSTROWSKA, E.; SOKOLOVA, E.; REISER, G. PAR-2 activation and LPS synergistically enhance inflammatory signaling in airway epithelial cells by

raising PAR expression level and interleukin-8 release. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 293, n. 5, L1208-L1218, 2007.

PARK, B. S.; SONG, D. H.; KIM, H. M.; CHOI, B. S.; LEE, H.; LEE, J. O. The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4–MD-2 complex. **Nature**, v. 458, n. 7242, p. 1191-1195, 2009.

PESCI, A.; FORESI, A.; BERTORELLI, G.; CHETTA, A.; OLIVERI, D. Histochemical characteristics and degranulation of mast cells in epithelium and lamina propria of bronchial biopsies from asthmatic and normal subjects. **American review of respiratory disease**, v. 147, p. 684-689, 1993.

POLTORAK, A.; HE, X.; SMIRNOVA, I.; LIU, M. Y.; HUFFEL, C. V.; DU, X.; BIRDWELL, D.; ALEJOS, E.; SILVA, M.; GALANOS, C.; FREUDENBERG, M.; RICCIARDI-CASTAGNOLI, P.; LAYTON, B.; BEUTLER, B. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in TLR4 Gene. **Science**, v. 282, n. 5396, p. 2085-2088, 1998.

PRINCE, L. R.; WHYTE, M. K.; SABROE, I.; PARKER, L. C. The role of TLRs in neutrophil activation. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 11, n. 4, p. 397-403, 2011.

PUENTE, X. S.; SÁNCHEZ, L. M.; OVERALL, C. M.; LÓPEZ-OTÍN, C. Human and mouse proteases: a comparative genomic approach. **Nature Reviews Genetics**, v. 4, n. 7, p. 544-558, 2003.

RALLABHANDI, P.; NHU, Q. M.; TOSHCHAKOV, V. Y.; PIAO, W.; MEDVEDEV, A. E.; HOLLENBERG, M. D.; FASANO, A.; VOGEL, S. N. Analysis of proteinase-activated receptor 2 and TLR4 signal transduction a novel paradigm for receptor cooperativity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 36, p. 24314-24325, 2008.

RAMACHANDRAN, R.; HOLLENBERG, M. D. Proteinases and signalling: pathophysiological and therapeutic implications via PARs and more. **British Journal of Pharmacology**, v. 153, p. S263-S282, 2008.

RAMACHANDRAN, R.; MIHARA, K.; CHUNG, H.; RENAUX, B.; LAU, C. S.; MURUVE, D. A.; DEFEA, K. A.; BOUVIER, M.; HOLLENBERG, M. D. Neutrophil elastase acts as a biased agonist for proteinase-activated receptor-2 (PAR2). **The Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 28, p. 24638 -24648, 2011.

RAMACHANDRAN, R.; MORICE, A. H.; COMPTON, S. J. Proteinase-activated receptor 2 agonists upregulate granulocyte colony-stimulating factor, IL-8, and VCAM-1 expression in human bronchial fibroblasts. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 35, n. 1, p. 133-141, 2006.

RAMOS, C. D.; HELUY-NETO, N. E.; RIBEIRO, R. A.; FERREIRA, S. H.; CUNHA, F. Q. Neutrophil migration induced by IL-8-activated mast cells is mediated by CINC-1. **Cytokine**, v. 21, n. 5, p. 214-223, 2003.

RANI, K.; RANA, R.; DATT, S. Review on latest overview of proteases. **International Journal of Current Life Sciences**, v. 2, n.1, p. 12-18, 2012.

REED, C. E.; KITA, H. The role of protease activation of inflammation in allergic respiratory diseases. **Journal of allergy and Clinical Immunology**, v. 114, n. 5, p. 997-1008, 2004.

ROSSOL, M.; HEINE, H.; MEUSCH, U.; QUANDT, D.; KLEIN, C.; SWEET, M. J.; HAUSCHILDT, S. LPS-induced cytokine production in human monocytes and macrophages. **Critical Reviews in Immunology**, v. 31, n. 5, p. 379-446, 2011.

ROTHMEIER, A. S.; RUF, W. Protease-activated receptor 2 signaling in inflammation. **Seminars in Immunopathology**, v. 34, n. 1, p. 133-149, 2012.

SABROE, I.; PRINCE, L.R.; JONES, E. C.; HORSBURGH, M. J.; FOSTER, S. J.; VOGEL, S. N.; DOWER, S. K.; WHYTE, M. K. B. Selective roles for toll-like receptor (TLR)2 and TLR4 in the regulation of neutrophil activation and life span. **Journal of Immunology**, v. 170, p. 5268-5275, 2003.

SAMUELSSON, B. Leukotrienes: mediators of immediate hypersensitivity reactions and inflammation. **Science, New Series**, v. 220, n. 4597, p. 568-575, 1983.

SCHLOSSER, S. F.; BURGSTHALER, A. D.; NATHANSON, M. H. Isolated rat hepatocytes can signal to other hepatocytes and bile duct cells by release of nucleotides. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 93, p. 9948-9953, 1996.

SEELIGER, S.; DERIAN, C. K.; VERGNOLLE, N.; BUNNETT, N. W.; NAWROTH, R.; SCHMELZ, M.; WEID, P. Y. V. D.; BUDDENKOTTE, J.; SUNDERKOTTER, C.; METZE, D.; ANDRADE-GORDON, P.; HARMS, E.; VESTWEBER, D.; LUGER, T. A.; STEINHOFF, M. Proinflammatory role of proteinase-activated receptor-2 in humans and mice during cutaneous inflammation *in vivo*. **The FASEB Journal**, v. 17, n. 13, p. 1871-1885, 2003.

SHAPIRO, S. D. The macrophage in chronic obstructive pulmonary disease. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 160, p. S29-S32, 1999.

SHI, M.; WANG, L.; ZHOU, J.; JI, S.; WANG, N.; TONG, L.; BI, J.; SONG, Y.; HU, J.; CHEN, X. Direct factor Xa inhibition attenuates acute lung injury progression via modulation of the PAR-2/NF- κ B signaling pathway. **American Journal of Translational Research**, v. 10, n. 8, p. 2335-2349, 2018.

SHPACOVITCH, V. M.; BRZOSKA, T.; BUDDENKOTTE, J.; STROH, C.; SOMMERHOFF, C. P.; ANSEL, J. C.; SCHULZE-OSTHOFF, K.; BUNNETT, N. W.; LUGER, T. A.; STEINHOFF, M. Agonists of proteinase-activated receptor 2 induce cytokine release and activation of nuclear transcription factor κ B in human dermal microvascular endothelial cells. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 118, n. 2, p. 380-385, 2002.

SHPACOVITCH, V. M.; VARGA, G.; STREY, A.; GUNZER, M.; MOOREN, F.; BUDDENKOTTE, J.; VERGNOLLE, N.; SOMMERHOFF, C. P.; GRABBE, S.; GERKE, V.; HOMEY, B.; HOLLENBERG, M.; LUGER, T. A.; STEINHOFF, M. Agonists of proteinase-activated receptor-2 modulate human neutrophil cytokine secretion, expression of cell adhesion molecules, and migration within 3-D collagen lattices. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 76, n. 2, p. 388-398, 2004.

SHPACOVITCH, V.; FELD, M.; HOLLENBERG, M. D.; LUGER, T. A.; STEINHOFF, M. Role of protease-activated receptors in inflammatory responses, innate and adaptive immunity. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 83, n. 6, p. 1309-1322, 2008.

SIEBENHAAR, F.; SYSKA, W.; WELLER, K.; MAGERL, M.; ZUBERBIER, T.; METZ, M.; MAURER, M. Control of *Pseudomonas aeruginosa* skin infections in mice is mast cell-dependent. **The American Journal of Pathology**, v. 170, n. 6, p. 1910-1916, 2007.

STEINHOFF, M.; BUDDENKOTTE, J.; SHPACOVITCH, V.; RATTENHOLL, A.; MOORMANN, C.; VERGNOLLE, N.; LUGER, T. A.; HOLLENBERG, M. D. Proteinase-activated receptors: transducers of proteinase-mediated signaling in inflammation and immune response. **Endocrine Reviews**, v. 26, n. 1, p. 1-43, 2005.

STEINHOFF, M.; CORVERA, C. U.; THOMA, M. S.; KONG, W.; MCALPINE, B. E.; CAUGHEY, G. H.; ANSEL, J. C.; BUNNETT, N. W. Proteinase-activated receptor-2 in human skin: tissue distribution and activation of keratinocytes by mast cell tryptase. **Experimental Dermatology**, v. 8, p. 282-294, 1999.

ST-ONGE, M.; LAGARDE, S.; LAFLAMME, C.; ROLLET-LABELLE, E.; MAROIS, L.; NACCACHE, P. H.; POULIOT, M. Proteinase-activated receptor-2 up-regulation by Fcy-receptor activation in human neutrophils. **The FASEB Journal**, v. 24, n. 6, p. 2116-2125, 2010.

STRIETER, R. M.; BELPERIO, J. A.; KEANE, M. P. Cytokines in innate host defense in the lung. **Journal of Clinical Investigation**, v. 109, p. 699-705, 2002.

SU, X.; CAMERER, E.; HAMILTON, J. R.; COUGHLIN, S. R.; MATTHAY, M. A. Protease-activated receptor-2 activation induces acute lung inflammation by neuropeptide-dependent mechanisms. **The Journal of Immunology**, v. 175, p. 2598-2605, 2005.

SUPAJATURA, V.; USHIO, H.; NAKAO, A.; AKIRA, S.; OKUMURA, K.; RA, C.; OGAWA, H. Differential responses of mast cell Toll-like receptors 2 and 4 in allergy and innate immunity. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 109, n. 10, p. 1351-1359, 2002.

TANG, B.; LI, X.; REN, Y.; WANG, J.; XU, D.; HANG, Y.; ZHOU, T.; LI, F.; WANG, L. MicroRNA-29a regulates lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammatory responses in murine macrophages through the Akt1/ NF- κ B pathway. **Experimental Cell Research**, v. 360, n. 2, p. 74-80, 2017.

TUIN, A.; HUIZINGA-VAN DER VLAG, A.; VAN LOENEN-WEEMAES, A. M. M. A.; MEIJER, D. K. F.; POELSTRA, K. On the role and fate of LPS-dephosphorylating activity in the rat liver. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 290, n. 2, p. G377-G385, 2006.

VERGNOLLE, N. Clinical relevance of proteinase activated receptors (PARs) in the gut. **Gut**, v. 54, n. 6, p. 867-874, 2005.

VERGNOLLE, N. Protease-activated receptors and inflammatory hyperalgesia. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, p. 173-176, 2005.

VERGNOLLE, N. Proteinase-activated receptor-2-activating peptides induce leukocyte rolling, adhesion, and extravasation *in vivo*. **The Journal of Immunology**, v. 163, p. 5064-5069, 1999.

VU, T. K. H.; HUNG, D. T.; WHEATON, V. I.; COUGHLIN, S. R. Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation. **Cell**, v. 64, n. 6, p. 1057-1068, 1991.

WANG, G.; BAINES, K. J.; FU, J. J.; WOOD, L. G.; SIMPSON, J. L.; MCDONALD, V. M.; COWAN, D. C.; TAYLOR, D. R.; COWAN, J. O.; GIBSON, P. G. Sputum mast cell subtypes relate to eosinophilia and corticosteroid response in asthma. **European Respiratory Journal**, v. 47, n. 4, p. 1123-1133, 2016.

WARRINGTON, R.; WATSON, W.; KIM, H. L.; ANTONETTI, F. R. An introduction to immunology and immunopathology. **Allergy, Asthma & Clinical Immunology**, v. 7, n.1, 2011.

WEISS, S. J. Tissue destruction by neutrophils. **New England Journal of Medicine**, v. 320, n. 6, p. 365-376, 1989.

WELDON, S.; MCNALLY, P.; MCAULEY, D. F.; OGLESBY, I. K.; WOHLFORD-LENANE, C. L.; BARTLETT, J. A.; SCOTT, C. J.; MCELVANEY, N. G.; GREENE, C. M.; MCCRAY, P. B.; TAGGART, C. C. miR-31 dysregulation in cystic fibrosis airways contributes to increased pulmonary cathepsin S production. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 190, n. 2, p. 165-174, 2014.

WOJTUKIEWICZ, M. Z.; HEMPEL, D.; SIERKO, E.; TUCKER, S. C.; HONN, K. V. Protease-activated receptors (PARs)—biology and role in cancer invasion and metastasis. **Cancer Metastasis Reviews**, v. 34, p. 775-796, 2015.

WOOLHISER, M. R.; BROCKOW, K.; METCALFE, D. D. Activation of human mast cells by aggregated IgG through FcγRI: additive effects of C3a. **Clinical Immunology**, v. 110, n. 2, p. 172-180, 2004.

WRIGHT, H. L.; MOOTS, R. J.; BUCKNALL, R. C.; EDWARDS, S. W. Neutrophil function in inflammation and inflammatory diseases. **Rheumatology**, v. 49, n. 9, p. 1618-1631, 2010.

WRIGHT, S. D.; RAMOS, R. A.; TOBIAS, P. S.; ULEVITCH, R. J.; MATHISON, J. C. CD 14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. **Science**, v. 249, n. 4975, p. 1431-1433, 1990.

WRIGHT, S. D.; TOBIAS, P. S.; ULEVITCH, R. J.; RAMOS, R. A. Lipopolysaccharide (LPS) binding protein opsonizes LPS-bearing particles for recognition by a novel receptor on macrophages. **Journal of Experimental Medicine**, v. 170, n. 4, p. 1231-1241, 1989.

YAGI, Y.; OTANI, H.; ANDO, S.; OSHIRO, A.; KAWAI, K.; NISHIKAWA, H.; ARAKI, H.; FUKUHARA, S.; INAGAKI, C. Involvement of Rho signaling in

PAR2-mediated regulation of neutrophil adhesion to lung epithelial cells. **European Journal of Pharmacology**, v. 536, p. 19-27, 2006.

YATIM, K. M.; LAKKIS, F. G. A brief journey through the immune system. **Clinical journal of the American Society of Nephrology**, v. 10, n. 7, p. 1274-1281, 2015.

ZHAO, P.; METCALF, M.; BUNNETT, N. W. Biased signaling of protease-activated receptors. **Frontiers in Endocrinology**, v. 5, n. 67, p. 1-16, 2014.

ANEXOS

Anexo A – Certificado de aprovação do projeto pela Comissão de Ética no uso de animais da UFMG (CEUA)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Prezado(a):

Esta é uma mensagem automática do sistema Solicite CEUA que indica mudança na situação de uma solicitação.

Protocolo CEUA: 150/2017

Título do projeto: Estudo da cooperação entre o receptor do tipo Toll (TLR)4 e os receptores ativados por protease (PAR)2 e 4 na ativação de neutrófilos e macrófagos

Finalidade: Pesquisa

Pesquisador responsável: Andre Klein

Unidade: Instituto de Ciências Biológicas

Departamento: Departamento de Farmacologia

Situação atual: **Decisão Final - Aprovado**

Aprovado na reunião do dia 26/02/2018. Validade: 26/02/2018 à 25/02/2023
Belo Horizonte, 28/02/2018.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG

https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
Telefone: (31) 3409-4516
www.ufmg.br/bioetica/ceua - cetea@prpg.ufmg.br