

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

**NATÁLIA ALVES DE MATOS**

**Estudo do papel do receptor ativado por protease 2 no  
recrutamento de leucócitos e na produção de  
mediadores inflamatórios em modelo experimental de  
asma induzido por ovalbumina em camundongos**

Belo Horizonte

2017

**NATÁLIA ALVES DE MATOS**

**Estudo do papel do receptor ativado por protease 2 no  
recrutamento de leucócitos e na produção de  
mediadores inflamatórios em modelo experimental de  
asma induzido por ovalbumina em camundongos**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como parte dos requisitos para obtenção do grau de doutor em Ciências Biológicas: Ênfase em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. André Klein

Co-orientadora: Prof. Dra. Andrea de Castro Perez

Belo Horizonte

2017

**"ESTUDO DO PAPEL DO RECEPTOR ATIVADO POR PROTEASE  
2 NO RECRUTAMENTO DE LEUCÓCITOS E NA PRODUÇÃO DE  
MEDIADORES INFLAMATÓRIOS EM MODELO EXPERIMENTAL  
DE ASMA INDUZIDO POR OVALBUMINA EM CAMUNDONGOS"**

**NATÁLIA ALVES DE MATOS**

Tese de Doutorado defendida e aprovada, no dia 27 de outubro de 2017, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores:

*Ana Letícia de Oliveira Figueiredo Alessandri*  
**PROFA. DR<sup>a</sup>. ANA LETÍCIA DE OLIVEIRA FIGUEIREDO ALESSANDRI**  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA

*Luciôla da Silva Barcelos*  
**PROFA. DR<sup>a</sup>. LUCÍOLA DA SILVA BARCELOS**  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

*Marcio de Matos Coelho*  
**PROF. DR. MÁRCIO DE MATOS COELHO**  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

*Patrícia M. de S. Machado*  
**DR<sup>a</sup>. PATRÍCIA MACHADO RODRIGUES E SILVA MARTINS**  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

*André Klein*  
**PROF. DR. ANDRÉ KLEIN**  
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, 27 de outubro de 2017**

## **Dedicatória**

**Aos meus pais, Miguel Arcanjo e Maria Ivanir, e aos meus irmãos Rogério e Plínio, por todo amor, apoio e incentivo em todos os dias da minha vida, eles que acompanharam todas as minhas realizações e sempre aplaudiram as minhas conquistas.**

***“Persistence is the shortest path to success”***

***(Charles Chaplin)***

## AGRADECIMENTOS

*A Deus, pela oportunidade de viver e me conceder diariamente saúde, força, coragem, determinação e discernimento para alcançar os objetivos almejados. A Nossa Senhora pela intercessão em minha trajetória.*

*Ao meu orientador, Prof. Dr. André Klein pela acessibilidade, conhecimentos transmitidos, orientação científica, esclarecimentos, sugestões, conselhos, simpatia, confiança e apoio que sempre me concedeu ao longo de todos esses anos de convivência. Sou infinitamente grata por me ajudar a tornar um sonho, em realidade!*

*A minha co-orientadora, Profa. Dra. Andrea de Castro Perez pelo apoio, disponibilidade e simpatia.*

*A Banca Examinadora, pela atenção dispensada na leitura desse trabalho.*

*A Profa. Dra. Janetti Nogueira de Francischi pela atenção, competência, apoio e exemplo de dedicação à ciência.*

*A Profa. MSc. Regina Turchetti Maia pela agradável companhia e auxílio nas necessidades do laboratório.*

*A todos os professores do Departamento de Fisiologia e Farmacologia que continuamente contribuem com seus ensinamentos.*

*Aos meus pais, Miguel Arcanjo e Maria Ivanir, exemplos de amor, respeito, companheirismo, trabalho, alegria, dedicação, superação e honestidade. Por toda contribuição financeira e sentimental, por me ajudarem a alcançar meu sonho, sem vocês eu não teria conseguido!*

*Ao meu namorado Wesley, meu melhor amigo e grande companheiro, por todo amor e sonhos compartilhados.*

*Aos meus irmãos Rogério e Plínio, minhas cunhadas Sabrina e Adriely, minhas sobrinhas Gabriela, Beatriz e Mariana, e meu sobrinho Nathan, por toda alegria e amor que me proporcionam, muito obrigada por todo apoio.*

*A minha querida vó Ana (in memoriam) pelo amor, risadas, torcida e constantes orações. Sinto muito sua falta!*

*A minha enorme família, minha fortaleza, pela torcida e momentos de alegria. Em especial minha afilhada Talita, minha tia Diva, meus primos Douglas e Aline, e minha amiga-irmã Larissa pelo carinho, abraço sincero e conversas.*

*A minha família da república, Kelly, Karine, Lorena, Márcia e Graça. A presença de vocês deixou minha caminhada mais fácil e mais alegre!*

*Aos meus queridos amigos do Laboratório de Inflamação e dor, Ayslan, Maria Vitória, Camilla, Karine, Aline, Irismara, Bárbara, Marcella e Taíssa pelo carinho, risadas, ensinamentos e bons momentos compartilhados.*

*A querida Flávia, pela amizade verdadeira, companheirismo, ajuda, abraços e conversas.*

*A Profa. Dra. Miriam Lopes por todo apoio e incentivo, e a toda equipe do LSAT meus queridos amigos Verlane, Ariadne, Katinha, Gabriela, Lívia, Dalton e Luciana, pelo companheirismo e carinho.*

*A todos os amigos da pós-graduação, em especial Clarice, Cristina e Gianne muito obrigada pelos momentos de carinho, ajuda e descontração.*

*A Adriana Lopes minha querida amiga e professora de inglês, pelos ensinamentos, compreensão e apoio.*

*Aos amigos do CEBIO, Dulce, Gilmar e Elmo, pela dedicação e profissionalismo no atendimento e disposição em ajudar.*

*Aos funcionários Rinaldo, Jorge e Wellington, pela presença atenciosa e necessária para a realização desse trabalho.*

*Aos secretários da pós-graduação, Cinthya e Rodner, pelo suporte técnico e conselhos indispensáveis do meio acadêmico, muito obrigada!*

*Aos nossos queridos colaboradores, Laboratório de Fisiologia Cardiovascular: Profa. Dra. Virgínia S. Lemos e Dra. Josiane Fernandes, Núcleo de Neurociências: Profa. Dra. Juliana Tavares e Dra. Onésia Cristina, Laboratório de Imunologia e Mecânica Pulmonar: Prof. Dr. Remo de Castro Russo, MSc. Lucas Rocha e MSc. Matheus Mattos, Laboratório de Patologia Comparada: Prof. Dr. Geovanni D. Cassali, Dra. Karine Damasceno e MSc. Diego Reis e Laboratório de Inflamação e dor (USP – Ribeirão Preto): Prof. Jose C. Alves-Filho, Dra. Annie Rócio e Dr. Raphael Ferreira, pelas grandes contribuições para a realização deste trabalho.*

*Ao financiamento concedido pela CAPES, Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior, e a realização de estágio supervisionado pelo Prof. Dr. Marc Pouliot da Unversidade Laval na cidade de Quebec no Canadá.*

*Ao auxílio adicional de bancada concedido pelo CNPq.*

*Aos órgãos de fomento CAPES, CNPq e Fapemig, pelo apoio financeiro.*

## RESUMO

Os receptores ativados por proteases (do inglês, *proteinase-activated receptor*, PAR) fazem parte de uma família de receptores acoplados a proteína G, que são ativados principalmente pela clivagem proteolítica de uma sequência específica de aminoácidos localizados em seu domínio N-terminal. Sua ativação vem sendo associada à regulação de diferentes fenômenos inflamatórios. PAR-2 é um receptor com potencial para regular a inflamação alérgica uma vez que está presente em uma grande variedade das células das vias aéreas como, por exemplo, células epiteliais e macrófagos alveolares. O objetivo do presente estudo foi avaliar a importância da ativação do PAR-2 na produção de mediadores inflamatórios e no recrutamento de leucócitos em modelos experimentais de asma induzidos por ovalbumina (OVA). Os protocolos experimentais foram aprovados pela comissão de ética no uso de animais (CEUA/UFMG, nº348/2014). A inflamação pulmonar alérgica foi induzida por OVA (10µg, via intranasal) em camundongos Balb/c fêmeas (8-10 semanas) previamente imunizados para o antígeno, em dois modelos experimentais diferindo entre si o número de desafios intranasais, três ou seis. Dentre o período de 30min à 72h após último desafio com o alérgeno, os camundongos foram sacrificados, sendo em seguida coletados os lavados broncoalveolares (LBA) e feita a remoção dos pulmões. Para avaliar a participação do PAR-2 na asma experimental, os camundongos imunizados foram pré-tratados com o antagonista seletivo de PAR-2, ENMD1068 (0,1–1,0 mg/ kg, via intraperitoneal) 1 hora antes da administração intranasal de OVA. O bloqueio de PAR-2 promoveu efeito considerável no controle da inflamação pulmonar alérgica em ambos os modelos de asma, reduzindo a presença de neutrófilos, eosinófilos e células mononucleares no LBA dos camundongos quando comparado aqueles desafiados com OVA e pré-tratados apenas com PBS. Especificamente no modelo de três exposições à OVA, o antagonismo do receptor reduziu a expressão proteica de PAR-2 em leucócitos alveolares, a produção de CXCL1, IL-6 e CCL5 no LBA e de IL-1β no pulmão, a permeabilidade vascular no tecido pulmonar e a população de macrófagos pulmonares com fenótipo M2, além de aumentar os níveis de IL-10 no LBA quando comparado ao grupo OVA. No modelo de seis exposições à OVA, o bloqueio de PAR-2 conduziu à redução nas atividades de peroxidase eosinofílica (EPO) e mieloperoxidase (MPO) no parênquima pulmonar, no extravasamento de proteínas para o LBA, evitou a perda da complacência pulmonar induzida pela OVA, diminuiu a resistência ao fluxo de ar basal e em reposta à provocação com metacolina, além de diminuir a produção de muco e deposição de colágeno em tecido pulmonar, quando comparados aos animais desafiados com OVA. Nossos resultados demonstram que há modulação da resposta imunológica via ativação de PAR-2 na asma experimental em camundongos BALB/c nos diferentes modelos avaliados. Além disso, o bloqueio da ação de proteases endógenas ativando PAR-2 em camundongos tratados com o antagonista seletivo desempenhou um papel importante no controle da inflamação pulmonar alérgica, sugerindo que o bloqueio de PAR-2 pode ser útil como uma nova abordagem farmacológica em relação ao tratamento de doenças respiratórias das vias aéreas.

**Palavras-chave:** PAR-2, proteases, asma experimental, ovalbumina, eosinófilos, neutrófilos, permeabilidade vascular, ENMD1068, inflamação pulmonar alérgica.



## ABSTRACT

Proteinase-activated receptors (PAR) are part of a family of G-protein-coupled receptors that are activated via proteolytic cleavage of a specific sequence of amino acids in N-terminal portion, and their activation has been implicated in the regulation of inflammation. PAR-2 has been implicated in mediating allergic airway inflammation once is expressed by many cells in the airways as well as in epithelial and alveolar macrophages. The aim of this study was to study the role of PAR-2 activation in the production of inflammatory mediators and on the recruitment of leukocytes in experimental ovalbumin (OVA)-induced asthma models. All experimental protocols were approved by local UFMG Ethics's Committee for Animal Use - certificate number 348/2014. Allergic lung inflammation was induced in sensitized BALB/c mice (female, 8-10 weeks) through the intranasal instillation of ovalbumin (OVA, 10µg) in two distinct experimental models differing in relation to the number of intranasal challenges (3 or 6 challenges). Bronchoalveolar lavage (BAL) was performed and lungs were obtained in different intervals of time, from 30 min to 72 h after challenging. To evaluate the participation of PAR-2 in experimental asthma, sensitized mice were pretreated with selective PAR-2 antagonist (ENMD1068, 0.1-1.0 mg / kg, intraperitoneal) 1 hour before intranasal instillation of OVA. The blockade of the action of PAR-2 activating endogenous proteases in PAR-2 antagonist-treated mice, played an important role on the control of allergic respiratory inflammation in both asthma's models. Overall, pretreatment with PAR-2 antagonist ENMD1068 inhibited the recruitment of neutrophils, eosinophils, mononuclear cells to LBA when compared to OVA-treated mice. After OVA instillation (3 intranasal challenge model), PAR-2 blockade reduced PAR-2 protein expression in leukocytes, CXCL1, IL-6 and CCL5 production in BAL and IL-1β releasing into the lung, vascular permeability in lung and M2 lung macrophages population. In addition, PAR-2 blockade increased IL-10 levels in BAL when compared to OVA group. Six intranasal challenge model also promotes leukocyte infiltrating into BAL in a PAR2-dependent manner. PAR-2 blockade impairs eosinophil peroxidase (EPO) and myeloperoxidase (MPO) activity at the parenchyma lung, proteins extravasation into BAL, reduces the loss of dynamic pulmonary compliance and the lung resistance in response to methacholine, as well as mucus production and collagen deposition when compared to OVA-challenged. In the present study we demonstrated a role for PAR-2 activation in the modulation of essential phenomena leading to allergic asthma in BALB/c mice both models. In addition, the blockade of the action of PAR-2 activating endogenous proteases in PAR-2 antagonist-treated mice played an important role on the control of allergic respiratory inflammation, suggesting that PAR-2 blockade may be useful as a new pharmacological approach regarding the treatment of airways allergic diseases.

**Keywords:** PAR-2, protease, experimental asthma, ovalbumin, eosinophils, neutrophils, vascular permeability, ENMD1068, allergic lung inflammation.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Mecanismo de ativação dos receptores ativados por proteases.....	22
<b>Figura 2.</b> Resumo das ações dos agonistas de PAR-2.. .....	25
<b>Figura 3.</b> Heterogeneidade da asma.. .....	32
<b>Figura 4.</b> Células do sistema immune e mediadores que participam da inflamação das vias aéreas que ocorre na asma. ....	35
<b>Figura 5.</b> Esquema representando o pré-tratamento dos camundongos com ENMD1068 em modelo de três exposições e seis exposições ao antígeno. ...	43
<b>Figura 6.</b> Cinética do recrutamento de eosinófilos em modelo de inflamação pulmonar alérgica induzido pela ovalbumina (OVA) em camundongos Balb/c.. .....	57
<b>Figura 7.</b> Leucócitos de lavado broncoalveolar corados pelo método de May Grunwald-Giemsa.. .....	58
<b>Figura 8.</b> Efeito induzido pelo antagonista de PAR-2, ENMD1068, sobre o recrutamento de eosinófilos para o LBA induzido por OVA.....	59
<b>Figura 9.</b> Efeito induzido pelo ENMD1068 sobre o recrutamento de neutrófilos para o LBA induzido por OVA em função do tempo.. .....	62
<b>Figura 10.</b> Efeito induzido pelo ENMD1068 sobre o recrutamento de eosinófilos para o LBA induzido por OVA em função do tempo.. .....	63
<b>Figura 11.</b> Efeito do pré-tratamento com ENMD1068 na produção das citocinas no LBA.....	64
<b>Figura 12.</b> Efeito do pré-tratamento com ENMD1068 na produção de IL-10 no LBA. Os níveis de citocinas foram mensurados por ELISA. Os animais foram imunizados por via i.p. com Al(OH) <sub>3</sub> + OVA (0,5 mg/mL, OVA). ....	65
<b>Figura 13.</b> Efeito induzido pelo ENMD1068 sobre a expressão de PAR-2 após administração intranasal de OVA. ....	67
<b>Figura 14.</b> Efeito do tratamento intraperitoneal com ENMD1068 no extravasamento plasmático do corante azul de Evans nos pulmões de camundongos 2 h após o desafio com OVA.. .....	69
<b>Figura 15.</b> Efeito do tratamento intraperitoneal com ENMD1068 no extravasamento plasmático do corante azul de Evans nas traqueias de camundongos 2 h após o desafio com OVA.. .....	70

<b>Figura 16.</b> Imuno-localização de PAR-2 em macrófagos alveolares após desafio com OVA..	72
<b>Figura 17.</b> Efeito do peptídeo ativador de PAR-2 no recrutamento de leucócitos para o espaço broncoalveolar de camundongos Balb/c em modelo de inflamação pulmonar alérgica.....	74
<b>Figura 18.</b> Produção de quimiocinas no lavado broncoalveolar. A concentração de citocinas foi mensurada por ELISA.....	76
<b>Figura 19.</b> Produção de citocinas no pulmão. A concentração de citocinas foi mensurada por ELISA..	77
<b>Figura 20.</b> Produção de citocinas nos linfonodos. A concentração de citocinas foi mensurada por ELISA..	78
<b>Figura 21.</b> Identificação de tipos celulares no pulmão por citometria de fluxo. Os macrófagos M2 foram identificados com base na expressão diferencial de F4/80 e do receptor de manose tipo 1 (MR) (quadrantes superiores direito)..	80
<b>Figura 22.</b> Efeito do PAR-2 na população de macrófagos pulmonares com fenótipo M2.....	81
<b>Figura 23.</b> Identificação de tipos celulares no LBA por citometria de fluxo.....	82
<b>Figura 24.</b> Efeito do PAR-2 na quantidade de macrófagos alveolares com fenótipo M2.....	83
<b>Figura 25.</b> Efeito induzido pré-tratamento com ENMD1068 sobre o recrutamento de neutrófilos para o LBA induzido por OVA em função do tempo.....	85
<b>Figura 26.</b> Efeito induzido pelo pré-tratamento com ENMD1068 sobre o recrutamento de eosinófilos para o LBA induzido por OVA em função do tempo. ....	86
<b>Figura 27.</b> Efeito induzido pelo pré-tratamento com ENMD1068 sobre o recrutamento de leucócitos para o LBA 48 h após o desafio intranasal com OVA.....	88
<b>Figura 28.</b> Determinação de proteínas totais no LBA pelo método de Bradford..	89
<b>Figura 29.</b> Análise da atividade da peroxidase eosinofílica (EPO) e mieloperoxidase (MPO) em tecido pulmonar de camundongos pré-tratados com PBS ou ENMD1068 e desafiados com OVA..	91

<b>Figura 30.</b> Parâmetros da mecânica respiratória obtidos do modelo de seis exposições ao antígeno.....	93
<b>Figura 31.</b> Análise das alterações histológicas após o pré-tratamento com antagonista de PAR-2, 48 h após o desafio com OVA em camundongos sensibilizados.....	95
<b>Figura 32.</b> Análise do escore inflamatório após o pré-tratamento com antagonista de PAR-2 em camundongos sensibilizados e desafiados com OVA.....	97
<b>Figura 33.</b> Histoquímica pela coloração de PAS (ácido periódico de Schiff)..	99
<b>Figura 34.</b> Análise da deposição de colágeno em microscopia de pulmão de camundongos sensibilizados e desafiados com OVA..	101
<b>Figura 35.</b> Expressão imunohistoquímica de CCL5 nos tecidos pulmonares de camundongos.....	103
<b>Figura 36.</b> Análise do escore de CCL5 após o pré-tratamento com antagonista de PAR-2 em camundongos sensibilizados e desafiados com OVA.....	105

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Fenótipos de asma clínicas e possíveis mecanismos associados. ...	33
<b>Tabela 2.</b> Leucócitos presentes no lavado broncoalveolar de camundongos em resposta a injeção i.p. de diferentes doses de ENMD1068 na inflamação pulmonar alérgica induzida por OVA. ....	60
<b>Tabela 3.</b> Sistema de pontuação adotada para a análise histopatológica dos pulmões de camundongos Balb/c .....	96
<b>Tabela 4.</b> Sistema de pontuação para expressão imunohistoquímica de CCL5 para pulmões de camundongos Balb/c .....	104

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA: análise de variância

APCs: células apresentadoras de antígeno imunoglobulinas (Ig) do tipo E

AREG: anfiregulina

BSA: albumina de soro bovino tipo V

CCL11: do inglês *chemokine (C-C motif) ligand 11*, eotaxina-1

CCR3: receptor para eotaxina

CEBIO: Centro de Bioterismo

CEUA: Comitê de Ética no Uso de Animais

CXCL1: do inglês *chemokine (C-X-C motif) ligand 1*, KC, homólogo murino de CXCL8

CXCL8: do inglês *C-X-C motif chemokine ligand 8*, interleucina-8

CysLts: cistenil leucotrienos

DAB: diaminobenzidina

DCs: células dendríticas

DMSO: dimetilsufóxido

DPOC: doença pulmonar obstrutiva crônica

EDTA: Ácido etilenodiamino tetra-acético

ELISA: do inglês *Enzyme Linked Immunosorbant Assay*

ENMD1068: antagonista seletivo de PAR-2

EPO: peroxidase eosinofílica

G-CSF: fator estimulador de colônias de granulócitos

GM-CSF: fator estimulador de colônia para macrófagos e granulócitos

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: peróxido de hidrogênio

H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>: ácido Sulfúrico

HE: hematoxilina-eosina

Hist: histidina

HUVEC: célula endotelial de cordão umbilical de humanos (*human umbilical vein endothelial cell*)

i.n.: intranasal

i.p.: intraperitoneal

i.v.: intravenoso

IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

ICAM-1: molécula-1 de adesão intercelular  
ICB: Instituto de Ciências Biológicas  
IFN- $\gamma$ : interferon gama  
IgE: imunoglobulina E  
IL: interleucina  
IL-10: interleucina-10  
IL-13: interleucina-13  
IL-17: interleucina-17  
IL1 $\beta$ : interleucina-1 beta  
IL-4: interleucina-4  
IL-5: interleucina-5  
IL-6: interleucina-6  
IL-8: interleucina-8, CXCL8  
LBA: lavado broncoalveolar  
LPS: lipopolissacarídeo  
LRGILS-NH<sub>2</sub>: peptídeo inativo de PAR-2  
LTB<sub>4</sub>: leucotriena B<sub>4</sub>  
LTC<sub>4</sub>: leucotriena C<sub>4</sub>  
LTD<sub>4</sub>: leucotriena D<sub>4</sub>  
MBP: proteína básica principal dos eosinófilos  
MCP-1: proteína-1 quimiotática para macrófago  
MHC: Complexo principal de histocompatibilidade  
MIP-1 $\alpha$ : proteína inflamatória de macrófago-1 $\alpha$   
MIP-2: proteína inflamatória de macrófago-2  
MMP-1: metaloproteinase de matriz tipo 1  
MMP-9: metaloproteinase-9  
MPO: mieloperoxidase  
Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>: monoidrogenofosfato de sódio  
NaCl: cloreto de sódio  
NaOH: Hidróxido de sódio  
OMS: Organização Mundial Da Saúde  
OPD: o-fenilendiamina dicloridrato  
OVA: albumina de ovo de galinha - ovalbumina  
PAF: fator ativador de plaquetas

PAR: receptores ativados por proteases (*proteinase activated receptors*)

PAS: ácido periódico de Schiff

PBP: proteína básica principal

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

PCR: proteína C reativa

PDGF: fator de crescimento derivado de plaqueta

PGE<sub>2</sub>: prostaglandina E<sub>2</sub>

pH: Potencial hidrogeniônico

PNS: Pesquisa Nacional de Saúde

PR-3: proteinase-3 de leucócitos

RANTES: do inglês *regulated upon activation, normal T-cell expressed and secreted*, quimiocina CCL5

RAPG: receptores acoplados à proteína G

ROS: espécie reativa de oxigênio

SCF: fator de célula-tronco

Ser: serina

SLIGRL-NH<sub>2</sub>: Agonista seletivo para PAR-2

SUS: Sistema único de Saúde

TGF-β: fator de transformação de crescimento beta

Th2 - linfócitos T *helper* (Th) do tipo 2

TLR: do inglês *toll like receptor*

TMB: 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina

TNF-α: fator de necrose tumoral -α

UFMG: Universidade Federal de Minas Gerais

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

VEGF: fator de crescimento do endotélio vascular



## SUMÁRIO

<b>1. REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	21
1.1 Receptores Ativados por Proteases, PAR.....	21
1.2 Receptor Ativado por Protease (PAR)-2 na asma.....	27
1.3 Dados epidemiológicos da asma .....	29
1.4 Fisiopatologia da asma .....	31
1.5 Modelo experimental de asma .....	35
<b>2. JUSTIFICATIVA</b> .....	37
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	39
3.1 Objetivo Geral .....	39
3.2 Objetivos Específicos .....	39
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	40
4.1 Animais .....	40
4.2 Contenção dos camundongos e vias de administração .....	40
4.3 Inflamação pulmonar alérgica .....	41
4.3.1 Preparo da solução de ovalbumina (OVA).....	41
4.3.2 Modelos experimentais de asma .....	41
4.3.2.1 Modelo experimental de asma induzido por três exposições à ovalbumina .....	41
4.3.2.2 Modelo experimental de asma induzido por seis exposições à ovalbumina .....	42
4.3.3 Pré-tratamento dos animais com antagonista de PAR-2 .....	42
4.3.4 Tratamento dos animais com agonista de PAR-2.....	43
4.4 Coleta do lavado broncoalveolar.....	44
4.4.1 Avaliação de leucócitos presentes no LBA .....	44
4.4.2 Determinação da expressão protéica de PAR-2 em leucócitos do LBA por Western blot .....	45

4.4.3	Localização do receptor PAR-2 em leucócitos por imunocitoquímica .....	46
4.5	Identificação de macrófagos M2 por Citometria de fluxo .....	47
4.6	Quantificação de citocinas e quimiocinas no LBA, pulmão e linfonodos dos camundongos por ELISA.....	48
4.7	Avaliação da permeabilidade vascular no pulmão e traqueia dos camundongos.....	48
4.8	Processamento do pulmão para os ensaios de MPO e EPO.....	49
4.8.1	Ensaio da atividade da MPO .....	50
4.8.2	Ensaio da atividade da Peroxidase Eosinofílica (EPO).....	51
4.9	Quantificação de proteínas totais do LBA .....	51
4.10	Análises da mecânica Pulmonar .....	51
4.10.1	Determinação da hiperreatividade brônquica .....	52
4.11	Processamento histológico, análise morfométrica e histoquímica dos pulmões .....	53
4.11.1	Imuno-histoquímica para identificação de CCL5.....	53
4.12	Análise Estatística.....	54
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>55</b>
5.1	Participação do PAR-2 no modelo experimental de asma induzido por três exposições à ovalbumina.....	55
5.1.1	Avaliação da participação do PAR-2 sobre o recrutamento de leucócitos e produção de citocinas em função do tempo na inflamação pulmonar alérgica .....	55
5.1.2	Avaliação da participação do PAR-2 na inflamação pulmonar alérgica induzida pela OVA sobre a expressão proteica de PAR-2 e a permeabilidade vascular.....	66
5.1.3	Importância da ativação de PAR-2 para o recrutamento de leucócitos, produção de citocinas e polarização fenotípica de macrófagos 48 h após o desafio com OVA em modelo de inflamação pulmonar alérgica.....	71

5.2 Participação do PAR-2 no modelo experimental de asma induzido por seis exposições à ovalbumina.....	84
5.2.1 Avaliação da participação do PAR-2 sobre o recrutamento de leucócitos em função do tempo na inflamação pulmonar alérgica.....	84
5.2.2 Efeito do tratamento com antagonista de PAR-2 sobre o recrutamento de leucócitos no LBA e avaliação das atividades enzimáticas EPO e MPO no pulmão 48 h após o desafio com OVA.....	87
5.2.3 Avaliação da participação do PAR-2 sobre os parâmetros da mecânica respiratória na inflamação pulmonar alérgica 48 horas após o desafio com antígeno.....	92
5.2.4 Análise histopatológica de pulmões obtidos de camundongos submetidos ao modelo experimental de alergia respiratória induzida por seis exposições à ovalbumina .....	94
5.2.4.1 Infiltração leucocitária no tecido pulmonar.....	94
5.2.4.2 Deposição de muco no tecido pulmonar.....	98
5.2.4.3 Deposição de colágeno no tecido pulmonar.....	100
5.2.4.4 Expressão imunohistoquímica de CCL5.....	102
<b>6. DISCUSSÃO .....</b>	<b>106</b>
6.1 Participação do PAR-2 no modelo experimental de asma induzido por três exposições à ovalbumina.....	108
6.2 Participação do PAR-2 no modelo experimental de asma induzido por seis exposições à ovalbumina.....	119
<b>7. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>127</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>128</b>
<b>9. ANEXOS .....</b>	<b>157</b>
Anexo 1: Certificado do CEUA.....	157
Anexo 2: Preparo de soluções .....	158
1. Solução de Salina tamponada (PBS).....	158
2. Solução de TBS.....	158

3. Solução de Tris-HCl 0,5 M.....	158
4. Tampão de lise .....	159
5. Tampão de amostra.....	159
6. Tampão de corrida.....	159
7. Tris-glicina (10x) .....	160
8. Tampão de transferência .....	160
9. Vermelho Ponceau 0,3% .....	160
10. Gel de poliacrilamida 10% .....	160
11. Solução de albumina bovina (BSA) .....	161
12. Solução diluidora de leucócitos (Solução de Turk) .....	161
13. Meio de cultura RPMI (pH 7,4) .....	161
14. Tampão de Lise a base de Cloreto de amônio (pH 7,4) .....	161
15. Tampão de FACS .....	162
16. Tampão de fixação .....	162
17. Anestésico a base de quetamina e xilazina de curta duração – desafio intranasal .....	162
18. Anestésico a base de quetamina e xilazina de longa duração .....	162
19. Solução de azul de Evans .....	162
20. Solução de TMB (1,6 mM) .....	162
21. H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (0,002%) .....	163
22. Técnica de inclusão em parafina para processamento histológico de pulmão .....	163
23. Técnica de coloração Hematoxilina e Eosina (HE) .....	163
24. Protocolo da coloração por P.A.S. (Ácido Periódico de Schiff) .....	164
25. Protocolo da coloração Tricômico de Gomori .....	165

# 1. REVISÃO DA LITERATURA

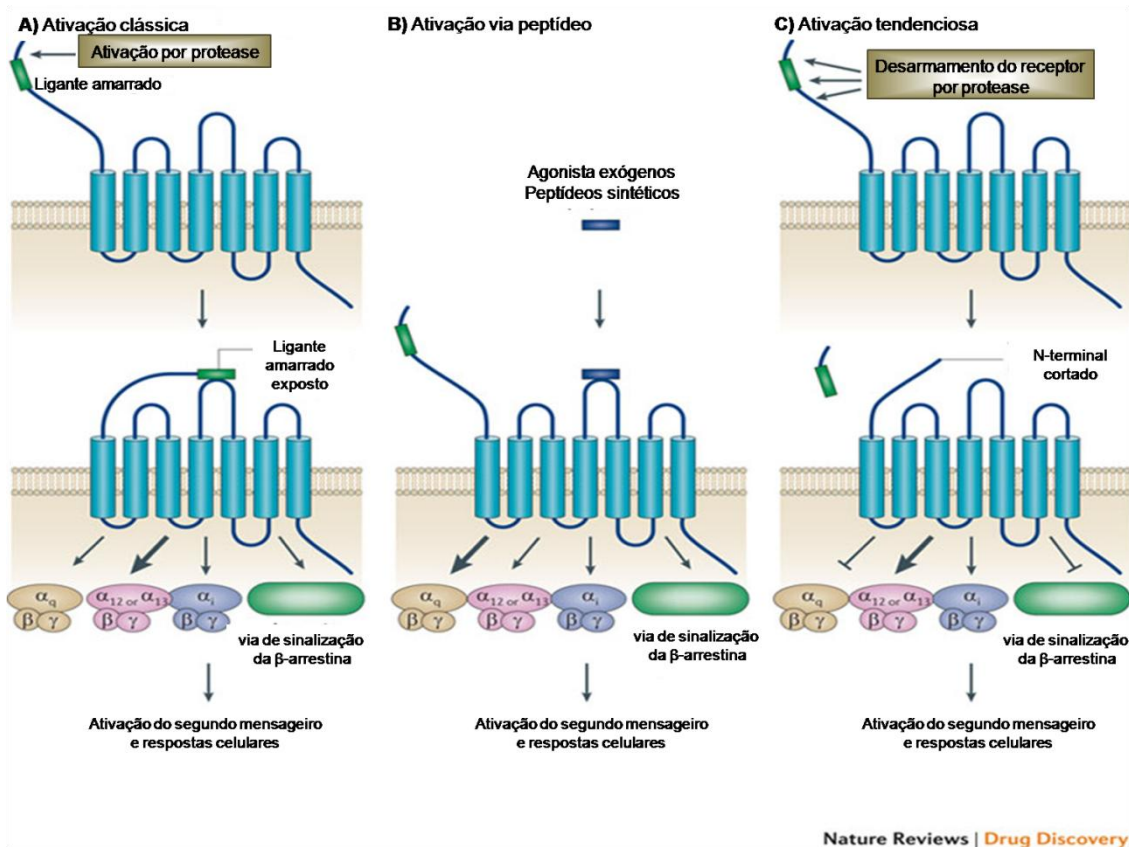
## 1.1 Receptores Ativados por Proteases, PAR

Os receptores ativados por proteases (do inglês, *proteinase-activated receptors*, PAR) são membros de uma família de receptores acoplados à proteína G (RAPG) que apresentam um mecanismo único de ativação que os distingue dos demais RAPGs. Este mecanismo envolve a clivagem proteolítica e irreversível de um fragmento específico do grupamento amino em seu domínio N-terminal extracelular localizado no próprio receptor, expondo um novo fragmento ancorado que irá agir como um ligante para o próprio receptor desencadeando os eventos subsequentes de sinalização celular, cabendo ressaltar que a ativação destes receptores é irreversível, uma vez clivado por proteases endógenas, o receptor será degradado em lisossomos (HOLLENBERG & COMPTON, 2002; VU *et al.*, 1991; OSSOVSKAYA & BUNNETT, 2004).

O mecanismo de ativação do PAR após clivagem em sítios específicos está representado esquematicamente na **Figura 1** (revisado por RAMACHANDRAN *et al.*, 2012). Deve ser destacado que diferente do que ocorre com outros RAPGs ativados por ligantes convencionais, a manutenção de um estado ativado dos PAR, ocorre independente da permanência de ocupação do receptor pelo ligante endógeno, ou seja, uma única molécula de trombina (protease endógena), por exemplo, pode ativar múltiplos receptores na superfície de uma célula (ISHII *et al.*, 1993).

Até o momento, foram descritos quatro subtipos de PAR, denominados PAR-1, PAR-2, PAR-3 e PAR-4, classificados desta forma de acordo com sua ordem de descoberta (VU *et al.*, 1991), e que são ativados principalmente pela proteólise. Cada um destes receptores possui uma sequência específica de aminoácidos no domínio N-terminal de modo que cada subtipo de PAR contém seu próprio ligante, dependendo apenas da ação proteolítica para a sua ativação. Diferentes proteases podem clivar a mesma sequência N-terminal de um mesmo subtipo de receptor e, por sua vez, diferentes subtipos de

receptores compartilham a mesma enzima como ligante (RAMACHADRAN & HOLLENBERG, 2008).



**Figura 1. Mecanismo de ativação dos receptores ativados por proteases.** **A:** ativação do PAR por clivagem proteolítica da sequência específica de aminoácidos e posterior exposição do ligante ancorado, promovendo ativação e sinalização. **B:** ativação do PAR pela ação exógena de peptídeos sintéticos (agonistas) na ausência de clivagem proteolítica. **C:** desarmamento da sinalização via PAR por ter acontecido clivagem proteolítica a jusante do sítio de ativação do receptor, tornando-o indisponível para ativação por proteases, podendo desarmar ou ativar simultaneamente outras vias de sinalização. Quando desarmados, eles podem também ser retidos na superfície celular e ficarem disponíveis para ativação via peptídeos sintéticos (modificada de RAMACHANDRAN *et al.*, 2012).

Grande parte dos ligantes endógenos dos PAR são serino-proteases (STEINHOFF *et al.*, 2005) que constituem uma classe de enzimas proteolíticas caracterizadas por um catalisador exclusivo, composto por uma tríade de serina (Ser), histidina (Hist) e aspartato (Asp), que são resíduos capazes de

hidrolisar ligações peptídicas (RINDERKNETCHT, 1986). A maioria das enzimas dessa família são endopeptidases, tendo a tripsina, quimiotripsina, elastase, catepsina G de neutrófilos, proteinase C de leucócitos e enzimas da homeostasia e da coagulação, como exemplos importantes (RAWLINGS *et al.*, 2006), sendo derivadas da circulação sanguínea (fatores de coagulação), de células inflamatórias (proteases de mastócitos e neutrófilos) e de várias outras fontes como células epiteliais, neurônios, bactérias e fungos (OSSOVSKAYA & BUNNETT, 2004; ZHANG, ZENG, HE, 2014).

De modo geral, PAR-1, 3 e 4 são ativados por trombina, tripsina ou catepsina G (OSSOVSKAYA & BUNNETT, 2004). PAR-1 também pode ser ativado por proteína C reativa e metaloproteinase de matriz tipo 1 (MMP-1) (CHEN *et al.*, 2008) enquanto que PAR-2 é resistente a trombina, porém responde à tripsina e a várias outras serino-proteases, incluindo triptase liberada de mastócitos, proteinase-3 de leucócitos (PR-3), catepsina G, como também proteases derivadas de bactéria e alérgenos (ARIZMENDI *et al.*, 2011; BOITANO *et al.*, 2011; OSSOVSKAYA & BUNNETT, 2004; COUGHLIN, 2000; CARVALHO *et al.*, 2010), além de proteases reguladoras da coagulação, fatores VIIa e Xa (KAWABATA *et al.*, 2000; HOULE *et al.*, 2005; VERGNOLLE, 2005; BARRY *et al.*, 2010).

Os membros da família PAR podem ser ativados por peptídeos sintéticos que imitam a sequência de aminoácidos onde o ligante ancorado se liga, sendo capazes de ativar o receptor mesmo na ausência de proteólise. Para o PAR-2, o local para a clivagem do receptor contém a seguinte sequência SLIGRL e SLIGKV, para murino e humano, respectivamente (NYSTEDT *et al.*, 1994), que corresponde a uma sequência hexapeptídea sintética de serina, leucina, isoleucina, glicina, arginina, leucina (SLIGRL) (SMITH-SWINTOSKY *et al.*, 1997). O uso de agonistas em diferentes modelos experimentais tem sido uma ferramenta farmacologia essencial na elucidação de ação dos PAR em fenômenos biológicos (SCARBOROUGH *et al.*, 1992; SCHMIDLIN *et al.*, 2001).

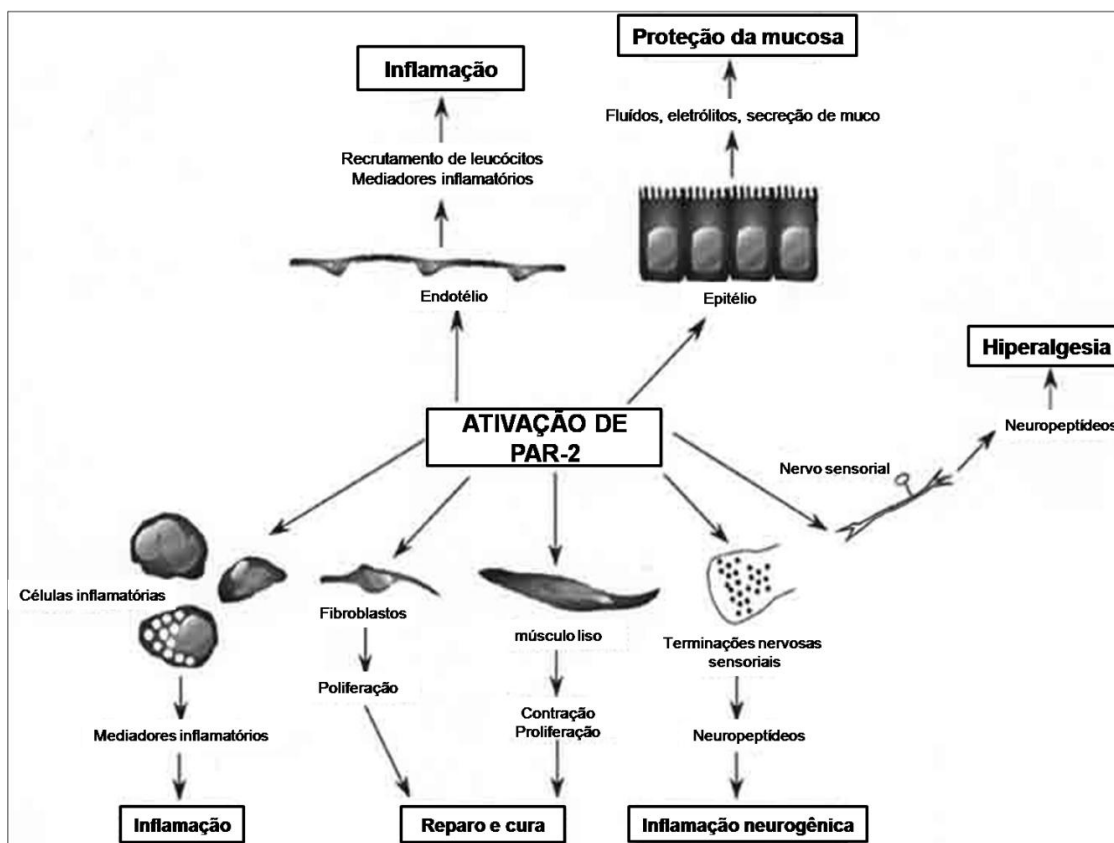
Os subtipos de PAR são expressos em plaquetas, neutrófilos, eosinófilos, mastócitos, monócitos, macrófagos e células das vias aéreas como células epiteliais, endoteliais e no músculo liso brônquico, entre outras células, onde estão envolvidos na agregação plaquetária, mobilização de cálcio

intracelular, produção de citocinas (SCHMIDLIN *et al.*, 2001; SLOFSTRA *et al.*, 2007; ASOKANANTHAN *et al.*, 2002, REED; KITA; MINN, 2004, MOFFATT *et al.*, 2004), asma, edema pulmonar e hipersensibilidade (REED; KITA; MINN, 2004; LAN *et al.*, 2002; KAWABATA & KAWAO, 2005), recrutamento *in vivo* de leucócitos (COCKS & MOFFATT, 2001; HOULE *et al.*, 2005; MATOS *et al.*, 2013, MATOS *et al.*, 2014, BRAGA *et al.*, 2010; GOMIDES *et al.*, 2012), muito embora os mecanismos envolvidos nestes processos ainda não sejam esclarecidos.

Cada receptor tem se mostrado capaz de modular diferentes processos relacionados ao desenvolvimento da resposta inflamatória. Especificamente o PAR-2, expresso em células endoteliais, células epiteliais, neurônios sensoriais, monócitos, fibroblastos da traqueia e brônquios e células inflamatórias, é capaz de desencadear respostas celulares tais como injúria tecidual, angiogênese, recrutamento celular, hiperresponsividade brônquica e percepção da dor (MACFARLANE *et al.*, 2001; COUGHLIN & CAMERER, 2003, COELHO; OSSOVSKAYA; BUNNETT, 2003; SEVIGNY *et al.* 2011; REED; KITA; MINN, 2004).

Muitos dos efeitos biológicos da ativação de PAR-2 são pró-inflamatórios, incluindo vasodilatação dependente de óxido nítrico, extravasamento de proteínas plasmáticas e secreção de citocinas pró-inflamatórias (CICALA, 2002; KAWABATA *et al.*, 1998). Além disso, agonistas de PAR-2 promovem o rolamento de leucócitos em células endoteliais (VERGNOLLE, 1999; LINDNER *et al.* 2000), inflamação neurogênica, hiperalgesia, reparo tecidual, angiogênese, efeito mucoprotetor, liberação de mediadores inflamatórios e recrutamento de eosinófilos *in vivo* (VERGNOLLE *et al.*, 1999; COELHO; OSSOVSKAYA; BUNNETT, 2003; VERGNOLLE *et al.*, 2010; RUF & ROTHMEIER, 2012; STEINHOFF *et al.*, 2000; MATOS *et al.*, 2013) **(Figura 2)**





**Figura 2. Resumo das ações dos agonistas de PAR-2.** Em síntese, o PAR-2 é expresso por células endoteliais, células epiteliais, neurônios, miócitos, fibroblastos e células inflamatórias. Os efeitos sobre estes tipos de células desencadeiam vias relacionadas com inflamação, hiperalgesia e reparação tecidual (modificada de COELHO; OSSOVSKAYA; BUNNETT, 2003).

A inibição das ações de PAR-2 pode ser obtida através do uso de antagonistas seletivos para este receptor. O ENMD1068 (*N1-3-methylbutyryl-N4-6-aminohexanoyl-piperazine*) é um antagonista derivado da substituição de um composto piperazina (KELSO *et al.*, 2005; RAMACHANDRAN & HOLLENBERG, 2008) capaz de inibir seletivamente o receptor PAR-2 em modelos experimentais *in vitro* e *in vivo*, assim como foi verificado que é capaz de atenuar o processo inflamatório em modelo animal de artrite (KELSO *et al.*, 2005).

Em nosso grupo de pesquisa, recentemente demonstramos que o mesmo composto é capaz de reduzir significativamente o recrutamento de eosinófilos induzido pelo agonista endógeno de PAR-2, a triptase de mastócitos, e pela quimiocina CCL (do inglês *C-C motif chemokine ligand*)<sup>11</sup> em pleurisia experimental, como também o recrutamento de eosinófilos induzido pela OVA em camundongos imunizados em modelo de pleurisia

alérgica (MATOS *et al.*, 2013; MATOS *et al.*, 2014). De certo modo, tais evidências contribuem para o entendimento das ações do PAR-2 na inflamação alérgica, demonstrando a importância da ativação deste receptor para que haja um infiltrado eosinofílico num cenário inflamatório que é de grande interesse e necessita de futuras investigações acerca dos mecanismos envolvidos.

O acúmulo de eosinófilos ocorre preferencialmente em locais onde ocorrem reações alérgicas e infecções parasitárias onde desempenham um papel extremamente importante na fisiopatologia da asma e outras doenças respiratórias através da liberação de uma variedade de mediadores que irão levar a congestão nasal, aumento da produção de muco das vias aéreas, hipersensibilidade e hiperresponsividade brônquica (CONROY *et al.*, 1997; HOGAN *et al.*, 2008; NAKAGOME & NAGATA, 2011), liberação de mediadores tais como cistenil leucotrienos (CysLts) como a leucotriena (LT)<sub>4</sub> que é um importante mediador pró-inflamatório, broncoconstritor e secretagogo glandular, liberação de proteína básica principal (PBP), radicais oxigênio e citocinas (MOQBEL; LEVI-SCHAFFER; KAY, 1994), que juntos contribuirão para a piora do quadro do paciente.

Entender os mecanismos envolvidos no recrutamento de eosinófilos é de extrema importância, uma vez que a migração excessiva destas células promove danos e lesões ao hospedeiro. Isto pode ser explicado pelo fato dos eosinófilos serem capazes de produzir e liberar inúmeros mediadores inflamatórios tais como, citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento como as interleucinas (IL) 4, 6, 8, 10 e 13, o fator estimulador de colônia para macrófagos e granulócitos (GM-CSF, do inglês *granulocyte macrophage-colony stimulating factor*), o fator de transformação do crescimento beta (TGF- $\beta$ , do inglês *transforming growth factor beta*) e fator de célula-tronco (SCF, do inglês *stem cell factor*), bem como mediadores lipídicos como a LTC<sub>4</sub>, o fator ativador de plaquetas (PAF, do inglês *platelet activating factor*) e a prostaglandina (PG) E<sub>2</sub> (MINAI-FLEMINGER & LEVI-SCHAFFER, 2009; PRUSSIN & METCALFE, 2006), proteína catiônica eosinofílica, neurotoxina derivada do eosinófilo, peroxidase eosinofílica, proteína básica principal que é lesiva ao epitélio brônquico e está diretamente relacionada com a fase tardia da reação alérgica e defesa contra helmintos (HOGAN *et al.*, 2008).

## 1.2 Receptor Ativado por Protease (PAR)-2 na asma

PAR-2 é um receptor com grande potencial para regular a inflamação alérgica uma vez que está presente em uma grande variedade das células das vias aéreas, assim como células epiteliais e macrófagos alveolares, bem como existe a presença de proteases capazes de ativar estes receptores neste contexto inflamatório conforme relatado no tópico anterior.

A inflamação pulmonar alérgica abrange uma resposta imune do tipo inata e adaptativa, a presença de antígeno nas vias aéreas é reconhecida pelas células apresentadoras de antígeno (APCs, do inglês *antigen-presenting cells*), posteriormente ocorre produção de anticorpos da classe das imunoglobulinas (Ig) do tipo E, e conseqüentemente a ativação e degranulação de mastócitos que então irá liberar mediadores inflamatórios e proteases, tais como a triptase que é um agonista endógeno de PAR-2 (MOLINO *et al.*, 1997a; SHAKOORY *et al.*, 2004).

Este fenômeno irá conduzir a uma resposta do tipo Th2 (mediada por linfócitos T *helper* do tipo 2) com liberação de citocinas, por exemplo, da IL-5 que promoverá o recrutamento de eosinófilos da circulação adjacente para o foco inflamatório além de sua diferenciação na medula (GREENFEDER *et al.*, 2001; KIM; DEKRUYFF; UMETSU, 2010; FACCIOLI *et al.*, 1991; FACCIOLI *et al.*, 1996), como também o aparecimento de basófilos e das citocinas IL-4 e IL-13 que também contribuirão para a progressão da doença (TUNG *et al.*, 2016).

Especificamente, a triptase de mastócitos, um dos agonistas endógenos de PAR-2, exerce um papel fundamental no desenvolvimento de doenças inflamatórias de natureza alérgica como a asma, assim, a inibição das ações da triptase pode ser considerada uma estratégia promissora para a redução dos sinais e sintomas associados à inflamação alérgica das vias respiratórias. Estudos têm demonstrado que a ativação de PAR-2 pela triptase, parece estar envolvida na hiperresponsividade das vias aéreas *in vitro* e *in vivo* (BARRIOS *et al.*, 2003, MOLINO *et al.*, 1997a), assim como ativar o PAR-2 expresso na superfície de células endoteliais e epiteliais promove aumento da produção de citocinas, de moléculas de adesão e mediadores quimioatraentes para eosinófilos e basófilos (HOLGATE, 1999).

Além disso, a ativação de PAR-2 em células epiteliais em cultura pelo peptídeo sintético SLIGRL-NH<sub>2</sub> parece estimular a liberação de GM-CSF, que promove o aumento na sobrevivência de eosinófilos *in vitro* (VLIAGOFTIS *et al.*, 2001). Já em experimentos *in vivo* o mesmo composto induz o recrutamento de eosinófilos para a cavidade pleural de camundongos Balb/c comparado ao grupo tratado com PBS (MATOS *et al.*, 2014), bem como induz aumento nos níveis de IL-13 e na expressão gênica de RNA mensageiro para TNF (fator de necrose tumoral, do inglês *tumor necrosis factor*) e de CXCL2 (do inglês *C-X-C motif chemokine ligand 2*, MIP-2) no lavado bronco-alveolar (LBA) de camundongos quando comparado ao peptídeo controle (EBELING *et al.*, 2005).

A participação do PAR-2 no recrutamento de eosinófilos também foi demonstrada por Schimidlin e col. (2002) que, utilizando o modelo experimental de inflamação alérgica induzida por ovalbumina (OVA) em animais nocautes para o receptor, observaram que, após desafio com o imunógeno houve uma redução de 73% da infiltração eosinofílica comparada aos animais *naive*, enquanto a superexpressão de PAR-2 exacerbou esta resposta em 88% quando comparado aos animais selvagens. Em contrapartida, existem resultados controversos quanto ao papel de PAR-2 na eosinofilia alérgica sugerindo que a ativação destes receptores iniba a migração de eosinófilos em resposta ao antígeno no modelo de inflamação alérgica induzida pela OVA (DE CAMPO & HENRY, 2003).

Além dos eosinófilos, os macrófagos e neutrófilos também são tipos celulares associados ao desenvolvimento da resposta alérgica e possíveis candidatos como iniciadores do processo inflamatório alérgico, mas até o momento pouco se sabe da correlação destes tipos celulares com as ações mediadas pelo PAR-2. Os macrófagos alveolares residentes ou recrutados são as células imunes mais abundantes nos compartimentos das vias aéreas, são os primeiros fagócitos residentes do trato respiratório inferior a entrar em contato com partículas inaladas (KOPF; SCHNEIDER; NOBS, 2015; MOON *et al.*, 2007), atuando em mecanismos de defesa e proteção contra os patógenos da interface externa que chegam em contato com o tecido alveolar (BALHARA & GOUNNI, 2012). Além do mais, são a maior fonte das citocinas pró-

inflamatórias IL-13 e TNF- $\alpha$  (KIM *et al.*, 2012) e apresentam marcação positiva para expressão de PAR-2 (EBELING *et al.*, 2005).

Embora a asma seja classicamente associada à eosinofilia e presença de citocinas características de uma resposta Th<sub>2</sub>, o recrutamento e a ativação de neutrófilos também ocorrem em paralelo à migração de eosinófilos em pacientes asmáticos, assim como o aumento dos níveis da enzima mieloperoxidase (MPO) no LBA (FRANGOVA *et al.*, 1996). O mesmo fato acontece na ausência de citocinas Th2 em modelo animal, pelo qual o desafio com OVA combinado com adjuvante de Freund, desvia o padrão de resposta para Th1/Th17, resultando numa inflamação pulmonar neutrofílica não responsiva aos glicocorticoides e de maior gravidade, enquanto os camundongos imunizados com OVA e Al (OH)<sub>3</sub> e desafiados com OVA desenvolvem uma inflamação convencional do tipo Th2 e eosinófilos e respondem bem aos glicocorticoides (DEJAGER *et al.*, 2015; BOGAERT *et al.*, 2011).

O padrão de inflamação não-eosinofílico ocorre em toda a escala de gravidade da asma: leve (PAVORD *et al.*, 1999), persistente (GIBSON; SIMPSON; SALTOS, 2001), refratária e severa (WENZEL *et al.*, 1999) que geralmente são casos resistentes aos glicocorticoides, medicamentos de escolha para o tratamento da asma eosinofílica (PAVORD *et al.*, 1999; GREEN *et al.*, 2002). Portanto, o PAR-2 se torna um potencial candidato para o entendimento do processo inflamatório, bem como alvo farmacológico para o controle de doenças de natureza alérgica nas quais o acúmulo de macrófagos, neutrófilos e eosinófilos desempenham um papel patológico relevante.

### **1.3 Dados epidemiológicos da asma**

As doenças crônicas que afetam as vias respiratórias e os pulmões, incluindo alergias, asma e doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), são um grande problema de saúde pública mundial. Conforme os dados apresentados pela *World Allergy Organization* (2011), a prevalência de doenças como a asma, alergia alimentar, angiodema e urticária, alergia a insetos, dermatite atópica, anafilaxia e algumas reações alérgicas a drogas, aumentaram muito

nas últimas décadas afetando 30-40% da população mundial (PAWANKAR *et al.*, 2011). Segundo *The Global Asthma Report* (2014), cerca de 334 milhões de pessoas de todas as idades sofrem de asma em todo o mundo, sendo mais freqüentes em crianças (10-14 anos) e idosos (75-79 anos).

A cada ano, 250.000 pessoas morrem de asma, em parte devido ao tratamento inadequado da doença, incluindo a dependência excessiva a medicação de alívio, em vez de medicamentos preventivos (THE GLOBAL ASTHMA REPORT, 2014). No Brasil, conforme a Pesquisa Nacional de Saúde (PNS), do Ministério da Saúde e Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), a asma atinge 6,4 milhões de pessoas acima de 18 anos sendo responsável por mais de 100 mil internações no SUS originando custos exorbitantes para a rede pública de saúde (PORTAL BRASIL, 2015).

Suas principais características incluem variável grau de obstrução do fluxo aéreo, hiperresponsividade brônquica e inflamação das vias aéreas que terá como conseqüência dificuldade respiratória ou falta de ar, tosse seca, produção de muco, chiado ou ruído no peito e ansiedade (LEMANSKE; BUSSE, 2001; IV Diretrizes Brasileiras para o manejo da asma). Comparados aos indivíduos saudáveis, os brônquios dos pacientes asmáticos são mais responsivos a exposição a diferentes desencadeadores da doença tais como frio, fumaça, ácaros, fungos, entre outros agentes que acarretam crises leves a severas, que se não forem controladas podem desenvolver obstrução irreversível das vias aéreas e óbito (MINISTÉRIO DA SAÚDE; DATASUS; PORTAL BRASIL, 2015; IV Diretrizes Brasileiras para o manejo da asma).

A asfixia é a principal causa de morte dos pacientes asmáticos de risco, seguido do tratamento medicamentoso excessivo (ex. uso freqüente de glicocorticoides sistêmicos e/ou consumo de dois ou mais frascos de broncodilatador por mês), problemas psicossociais (ex. depressão, baixo nível socioeconômico) e presença co-morbidades (doenças cardiovasculares ou psiquiátricas) (IV Diretrizes Brasileiras para o manejo da asma). Apesar de não ter cura, a doença tem tratamento e formas de controle, sendo que durante a crise o tratamento deve ser iniciado imediatamente e em casos mais graves deve ser realizada a ventilação mecânica ou internação em unidade de terapia intensiva (IV Diretrizes Brasileiras para o manejo da asma).

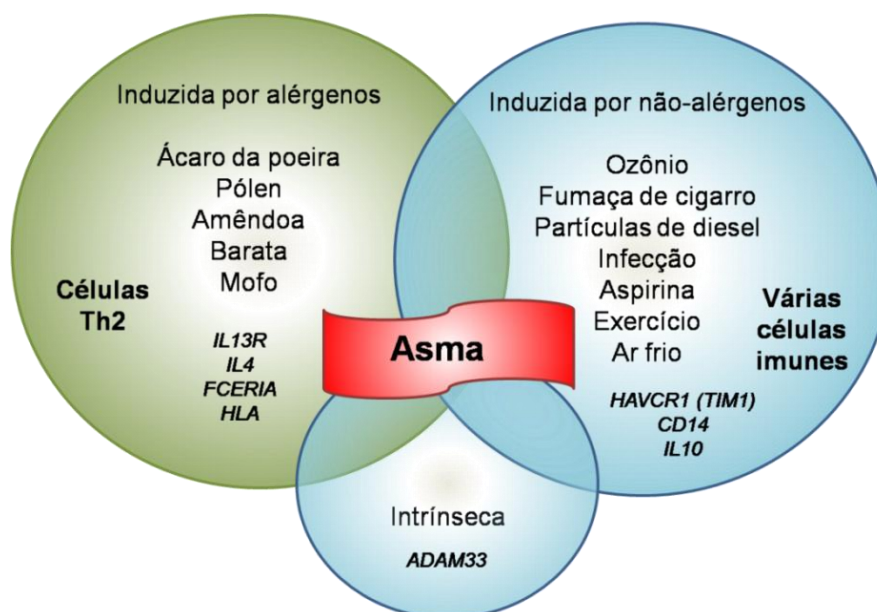
O diagnóstico de asma é fundamentado a partir da avaliação objetiva da limitação ao fluxo aéreo, espirometria, medida do pico de fluxo expiratório, e da saturação de oxigênio no sangue arterial quando possível (IV Diretrizes Brasileiras para o manejo da asma), sendo que a espirometria também servirá para monitorar a progressão da doença e as alterações resultantes do tratamento. A ocorrência da reversão completa ou parcial do fluxo limitado com a administração de um forte broncodilatador pode ser indicativa de confirmação de diagnóstico (GINA, 2016).

Ao que se refere ao tratamento, atualmente, ele é conduzido para controlar os sintomas e prevenir exacerbações, no qual é recomendado o uso de broncodiladores tais como glicocorticoides inalatórios, agonistas de receptores beta de ação prolongada e antagonistas de receptores CysLTs, sendo os primeiros citados como os medicamentos mais utilizados como manutenção, profilático e antiinflamatório, tanto em adultos como em crianças (MINISTÉRIO DA SAÚDE; DATASUS; PORTAL BRASIL, 2015). Entretanto, devido à complexidade e a grande prevalência da asma, nos últimos anos vem sendo bastante estudado os possíveis mecanismos envolvidos na doença bem como novas formas de tratamento.

#### **1.4 Fisiopatologia da asma**

A asma é uma doença crônica caracterizada pela inflamação e hiperreatividade das vias aéreas, também definida como resposta de hipersensibilidade do tipo I (ou de hipersensibilidade imediata) que é uma reação alérgica provocada por re-exposição a um tipo específico de antígeno referido como um alérgeno, com intensa resposta do tipo Th2 (COHN; ELIAS; CHUPP, 2004; JOHNSON; MATHESON; LUSTER, 2004; TAI *et al.*, 2006; HAMMAD & LAMBRECHT, 2008; PAUL & ZHU, 2010). Os sintomas característicos desta doença são episódios recorrentes de obstrução das vias aéreas, falta de ar, broncoconstrição e produção de escarros (COHN; ELIAS; CHUPP, 2004; JOHNSON; MATHESON; LUSTER, 2004; HAMMAD & LAMBRECHT, 2008).

Inúmeros fatores ambientais combinados a fatores intrínsecos e genéticos dão origem a diferentes fenótipos da asma, tais como asma alérgica que pode ser induzida por antígenos (poeira doméstica, pólen e partículas de barata), asma resistente aos glicocorticoides e asma desencadeada por fatores não alérgicos como poluição, fumaça de cigarro, obesidade e exercício físico, bem como por componentes virais e microbianos (FREW, 2003; BAUR *et al.*, 1998; REDLICH; WISNEWSKI; GORDON, 2002; KIM; DEKRUYFF; UMETSU, 2010). De todos os fenótipos da doença, a asma alérgica é a forma mais comum e que existe maior interesse de pesquisa e descoberta de novos alvos terapêuticos, muito embora os fatores que precipitam a dificuldade respiratória possam co-existir no mesmo paciente (KIM; DEKRUYFF; UMETSU, 2010) (**Figura3; tabela 1**).



**Figura 3. Heterogeneidade da asma.** A asma é uma doença crônica de origem multifatorial nos quais existem diferentes formas (alérgica, não alérgica e intrínseca). A imagem representa os fatores envolvidos no desenvolvimento da asma bem como alguns dos muitos genes relacionados. Asma alérgica frequentemente é mediada pela resposta imune do tipo Th2, enquanto que na asma não alérgica várias células do sistema imunológico podem atuar no processo inflamatório (modificada de KIM; DEKRUYFF; UMETSU, 2010).

Especificamente, os bronquíolos e alvéolos filtram cerca de 8 - 9 litros de ar todos os dias por essa razão, estão continuamente expostos a uma variedade de partículas sólidas e líquidas, alérgenos e micróbios no ar, que são captados e removidos principalmente por macrófagos residentes e células



dendríticas do pulmão (KOPF; SCHNEIDER; NOBS, 2015). A resposta do tipo Th2 é predominante quando ocorre inalação de alérgenos, resultando na infiltração de mastócitos, linfócitos, eosinófilos, neutrófilos e citocinas de perfil Th2, que juntos apresentam papel crucial na indução da inflamação das vias aéreas (MOON *et al.*, 2007).

**Tabela 1. Fenótipos de asma clínicas e possíveis mecanismos associados** (modificada de KIM; DEKRUYFF; UMETSU, 2010).

Fenótipo clínico da asma/causa	Exigência de células Th2	Mecanismos e células efetoras
<b>Alérgeno</b>	Sim	IL-4, IL-5, IL-9, IL-13, TSLP, IL-25, IL-33, IL-17?, células CD4 <sup>+</sup> , DCs, eosinófilos, mastócitos, basófilos, células T Natural Killer
<b>Infecção viral</b>	Não	IL-13? (citocina Th2?), macrófagos alveolares, células T Natural Killer (células da imunidade inata)
<b>Poluição do ar, cigarro, partículas de diesel, fumaça de cigarro</b>	Não	IL-17, stress oxidativo, pequenas partículas, neutrófilos, células T Natural Killer
<b>Aspirina</b>	Não	Leucotrienos, perda de prostaglandina E <sub>2</sub>
<b>Obesidade</b>	Não	Stress oxidativo?
<b>Asma severa, resistente a esteróides</b>	Não	IL-17, neutrófilos, células T Natural Killer ?
<b>Exercícios, ar frio</b>	Não	Transferência de calor, alteração na osmolalidade mucosa, citocinas?
<b>Intrínseca</b>	?	Hipersensibilidade da musculatura lisa?

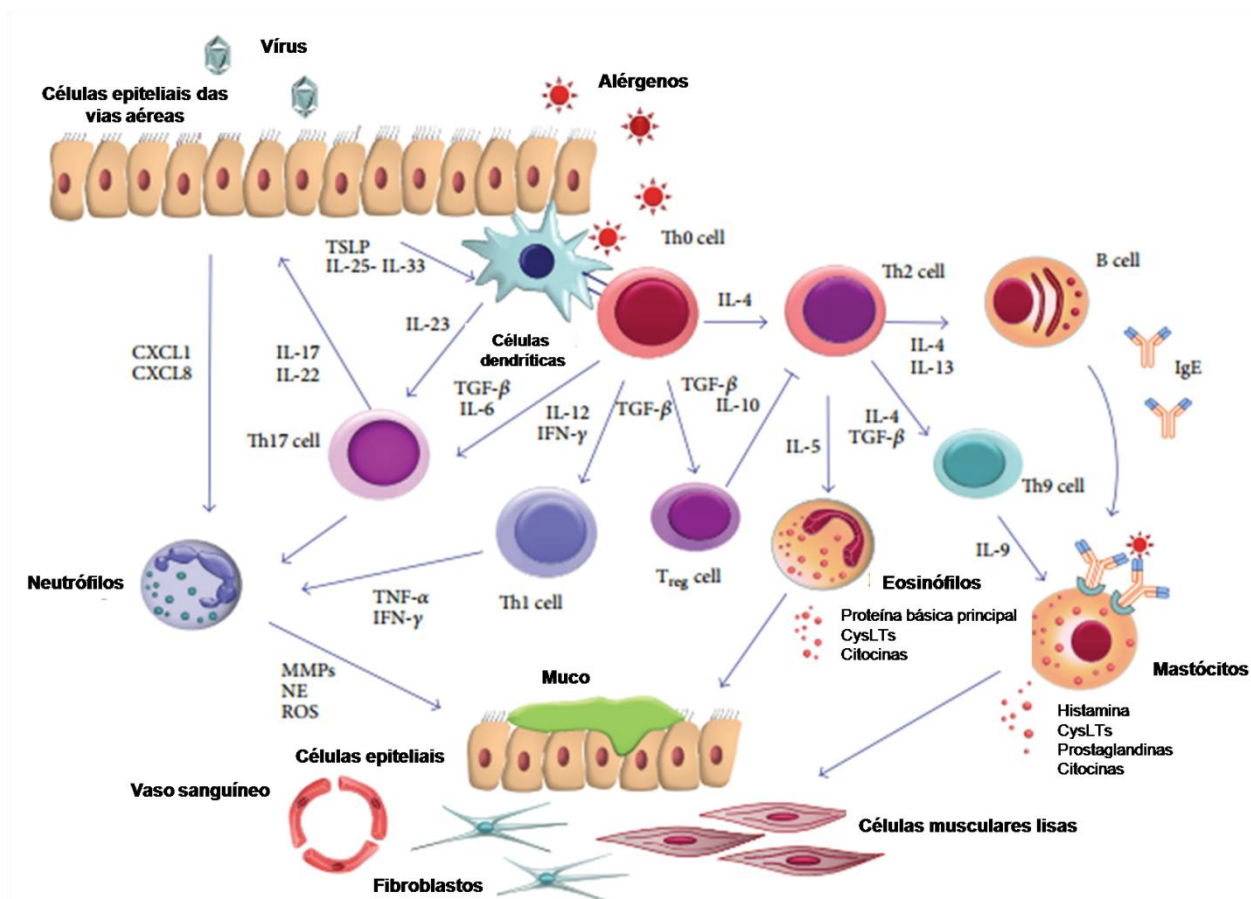
Apesar de não existir um gene específico para ocorrência de asma, a predisposição genética para desenvolver um resposta imune com a produção de IgE, conhecida como atopia, é um dos fatores determinantes mais fortes para o desenvolvimento da doença (NELSON, 2001; KARJALAINEN *et al.*, 2003; PEARCE; PEKKANEN; BEASLEY, 1999). Basicamente, a asma atópica

é caracterizada por uma inflamação eosinofílica conduzida por células dendríticas, linfócitos Th2 da imunidade adaptativa, prevalência das citocinas IL-5, IL-3, IL-4 e GM-CSF (ROBINSON *et al.*, 1992; LAMBRECHT & HAMMAD, 2015), enquanto a não-atópica ou intrínseca é conduzida por células linfóides inata e há produção de IL-5 e IL-13 causando eosinofilia e hiperreatividade brônquica (LAMBRECHT & HAMMAD, 2015; BRUSSELLE *et al.*, 2013).

Em síntese, as células dendríticas presentes no tecido reconhecem e fagocitam os antígenos provenientes do meio externo e uma vez ativadas por este processo, agem como APCs e migram em direção a zona dos linfócitos T *naïves* (Th0) ativando-os em um perfil específico (PELAIA *et al.*, 2015; LAMBRECHT & HAMMAD, 2015; BRUSSELLE *et al.*, 2013). Feito isso, o alérgeno conduzirá a diferenciação em linfócitos Th2 e conseqüente produção das citocinas IL-4 e IL-13 que irá promover a ativação de linfócitos B e conseqüente produção de anticorpos IgE como também liberação de IL-5 que induz a maturação de eosinófilos (FOSTER *et al.*, 2001; ANSEL *et al.*, 2006; PELAIA *et al.*, 2015).

As citocinas IL-10 e TGF- $\beta$  atuam principalmente nas células T reguladoras, desempenhando atividade imunossupressora. A IL-9 irá conduzir a ativação e degranulação de mastócitos, liberando seus mediadores inflamatórios (PELAIA *et al.*, 2015; LAMBRECHT & HAMMAD, 2015). Já os linfócitos Th17 irão conduzir o recrutamento de neutrófilos, além disso pode ocorrer ativação de linfócitos Th1, como resultado de infecções das vias aéreas sustentadas por vírus (PELAIA *et al.*, 2015). Na asma, os antígenos nos pulmões estimulam a cascata de citocinas e também a produção de cisteinil-leucotrienos pelos polimorfonucleares, que são potentes broncoconstritores e desecadeiam hiperresponsividade, alteração da permeabilidade vascular, produção de muco e recrutamento de eosinófilos (DAHLÉN *et al.*, 1980; SAITO *et al.*, 2004; BUSSE & KRAFT, 2005). Em conjunto, a permanência destas células e de seus mediadores inflamatórios nas vias aéreas irá afetar as funções de células epiteliais (produção de muco, hiperplasia), fibroblastos, células musculares lisas (broncoconstricção) e células endoteliais vasculares (vasodilatação, edema), que estão diretamente relacionados aos sintomas da asma crônica (PALM *et al.*, 2012). A **Figura 4** representa o mecanismo imunológico e pró-inflamatório que acontece na asma que é orquestrado pelas

células da imunidade inata e adaptativa, resultado de complexas interações entre fatores genéticos e de agentes do meio ambiente, tais como alérgenos e vírus.



**Figura 4. Células do sistema imune e mediadores que participam da inflamação das vias aéreas que ocorre na asma.** (modificada de PELAIA *et al.*, 2015).

### 1.5 Modelo experimental de asma

Os modelos animais de asma têm sido utilizados há mais de 100 anos para melhor entendimento da inflamação das vias aéreas e para a descoberta e desenvolvimento de novas drogas (KAROL, 1994). Dentre todos, os camundongos são os mais utilizados para esta finalidade, por serem de fácil manipulação e menor custo (ZOSKY & SLY, 2007), terem sua genética conhecida (DIETRICH *et al.*, 1996), ser mais fácil utilizar a tecnologia transgênica: diminuindo ou aumentando a expressão de genes (ELIAS *et al.*, 2003), realizar tratamentos com antagonistas para estudar receptores

específicos e também investigar ações sob a inflamação, remodelamento e obstrução do fluxo aéreo (ZOSKY & SLY, 2007).

Diferente dos humanos, os camundongos não desenvolvem a asma de maneira espontânea, sendo necessário induzir artificialmente uma resposta alérgica nas vias aéreas para, então, reproduzir-se os sintomas da doença (KRUG & RABE, 2008; NIALS & UDDIN, 2008). Tal fato é alcançado facilmente por inúmeros antígenos, comumente utiliza-se a ovalbumina (OVA) juntamente com adjuvante hidróxido de alumínio que é capaz de promover uma ativação mais intensa da resposta Th2, quando o sistema imune é exposto a um antígeno (DE HEER *et al.*, 2004; LAMBRECHT & HAMMAD 2015; BREWER *et al.*, 1999).

A OVA é uma proteína encontrada no ovo capaz de produzir elevadas quantidades de IgE e causar uma importante resposta pulmonar alérgica (ZOSKY & SLY, 2007), sendo os camundongos BALB/c os mais utilizados, posto que são capazes de reproduzir alguns aspectos característicos da asma em humanos (KUMAR *et al.*, 2008; ZHANG *et al.*, 1997).

Nestes camundongos, o primeiro contato do alérgeno (OVA) com a mucosa resulta na produção de níveis elevados de anticorpos específicos do tipo IgE contra o antígeno, esta resposta primária é chamada imunização, que resulta em um microambiente com a presença de citocinas Th2 (IL-4 e IL-5) no lavado broncoalveolar (KUMAR *et al.*, 2008) que, num segundo contato (desafio), ocorrerá recrutamento e ativação de eosinófilos, redução do calibre das vias aéreas por ação de agentes broncoconstritores, dentre outros fenômenos característicos da inflamação alérgica (FOSTER *et al.*, 1996). Por esta razão, utilizamos camundongos BALB/c para a realização deste estudo.

## 2. JUSTIFICATIVA

Como tentativa de avanço terapêutico, nos últimos anos, o papel dos receptores ativados por proteases (PAR) vem sendo bastante estudado quanto aos fenômenos relacionados à inflamação das vias aéreas e alergia, uma vez que estes receptores estão presentes em uma grande variedade de células das vias aéreas, como células epiteliais, endoteliais, músculo liso brônquico e macrófagos. Além disso, as serino proteases que desencadeiam resposta fisiológica através da sinalização via PAR-2 são encontradas de maneira considerável nos locais da inflamação e dano tecidual, posto que células que foram previamente ativadas, tais como mastócitos e neutrófilos, liberam, respectivamente, as proteases triptase de mastócitos e elastase neutrofílica que são conhecidas como sendo agonistas endógenos do receptor. Estas serino proteases poderão então ativar células ali presentes que expressam o receptor, por exemplo, células epiteliais e macrófagos.

Tais evidências sugerem um possível caminho para uma melhor compreensão da importância da ativação de PAR-2 em doenças inflamatórias das vias aéreas sob os parâmetros como alteração tecidual, permeabilidade vascular, mecânica respiratória, como também sob a liberação de mediadores, tais como, citocinas e quimiocinas liberadas pelos leucócitos que são importantes para o fenômeno alérgico.

Recentemente, nosso grupo de pesquisa demonstrou, em modelo de pleurisia experimental, que o recrutamento de eosinófilos induzido por triptase é dependente de sua ação proteolítica em receptores PAR-2 (MATOS *et al.*, 2013) e que a inibição da triptase endógena através do pré-tratamento com inibidor seletivo de triptase APC366, inibiu a migração de eosinófilos induzida pelo peptídeo ativador de PAR-2 SLIGRL-NH<sub>2</sub> (MATOS *et al.*, 2013) ou pela CCL11 (MATOS *et al.*, 2014). Observamos, ainda, que a migração de eosinófilos para a cavidade pleural de camundongos BALB/c *naïve* induzida por CCL11 é dependente da ativação de PAR-2, assim como a migração induzida por OVA em animais imunizados para este antígeno (MATOS *et al.*, 2014).

Deste modo, acredita-se que o estudo do PAR-2 no modelo de asma experimental possa contribuir para melhor entendimento da fisiopatologia das

doenças alérgicas, bem como para o desenvolvimento de novos alvos farmacológicos para o tratamento destas doenças, ampliando a perspectiva da utilização de antagonistas de PAR-2 como membros de um novo arsenal terapêutico no tratamento de doenças de natureza alérgica.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

Estudar a importância da ativação do receptor ativado por protease (PAR)-2 na produção de mediadores inflamatórios no recrutamento de leucócitos em modelos experimentais de asma induzido pela ovalbumina (OVA).

#### **3.2 Objetivos Específicos**

- i. Estudar a importância da ativação do PAR-2 em modelos experimentais de asma induzido por três e seis exposições intranasais à OVA;
- ii. Avaliar os efeitos do pré-tratamento com o antagonista seletivo de PAR-2, ENMD1068, no recrutamento de leucócitos para o espaço broncoalveolar e na permeabilidade vascular de camundongos desafiados com três e seis exposições à OVA;
- iii. Investigar a expressão de PAR-2 nos leucócitos presentes no lavado broncoalveolar em modelo de asma induzido por três exposições à OVA;
- iv. Avaliar se há alterações dos níveis de mediadores inflamatórios e da presença de macrófagos M2, no tecido pulmonar e no lavado broncoalveolar de camundongos desafiados com três exposições à OVA quando comparados aos pré-tratados com ENMD1068;
- v. Avaliar se há alteração na mecânica pulmonar dos camundongos desafiados com seis exposições à OVA quando comparados aos pré-tratados com ENMD1068;
- vi. Avaliar as alterações histopatológicas nos pulmões de camundongos desafiados com seis exposições à OVA e pré-tratados com ENMD1068.

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 Animais**

Foram utilizados camundongos Balb/c fêmeas, com 8 a 10 semanas, pesando entre 20 a 25 g, fornecidos pelo Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG (CEBIO). Os animais foram mantidos em ciclo claro-escuro de 12 h com livre acesso de ração e água. Todos os procedimentos utilizando animais foram aprovados pela Comissão de Ética no uso de animais da UFMG (CEUA/UFMG, certificado nº 348 / 2014, Anexo 1).

### **4.2 Contenção dos camundongos e vias de administração**

Os camundongos foram manipulados de maneira firme e gentil a fim de que se evitasse estresse desnecessário. Para uma total imobilização do camundongo, segurou-se a pele da nuca com o polegar e o indicador, virando-se a mão de maneira que ele ficasse com o abdômen voltado para cima. Posteriormente, a substância a ser utilizada foi administrada com seringas e agulhas estéreis pela via de administração desejada em cada protocolo.

As vias de administração foram intraperitoneal (i.p.), intranasal (i.n.) e intravenosa (i.v.). Imediatamente antes da sua administração, as drogas foram devidamente preparadas em capela de fluxo laminar com base nas concentrações desejadas para a realização de cada protocolo e mantidas em gelo durante todo procedimento. O grupo controle recebeu um volume igual de PBS estéril e foi injetado na mesma via de administração da droga de estudo.

Para a realização de cada protocolo experimental, todos os camundongos foram mantidos na mesma caixa para que vivenciassem as mesmas condições ambientais. Então, foram alojados no biotério do Departamento de Farmacologia durante toda a duração do experimento. Finalizado todo experimento, os animais foram submetidos ao deslocamento cervical.



### **4.3 Inflamação pulmonar alérgica**

Para mimetizar os efeitos da presença do antígeno para o desenvolvimento da inflamação pulmonar alérgica e que tem potencial para desencadear uma resposta mediada por PAR-2, utilizamos a OVA (Sigma) como alérgeno. A OVA é uma substância disponível comercialmente e bastante utilizada em pesquisas de asma, pela sua capacidade de desenvolver uma resposta alérgica nos camundongos sensibilizados.

Para a realização deste estudo, utilizamos dois modelos experimentais de inflamação pulmonar alérgica aguda, sendo o primeiro induzido por três exposições intranasais (i.n.) a OVA (KUROWSKA-STOLARSKA *et al.*, 2008) e o segundo com seis exposições i.n. do antígeno na tentativa de intensificar a resposta alérgica pelo maior contato do antígeno as vias aéreas.

#### **4.3.1 Preparo da solução de ovalbumina (OVA)**

A dose de OVA utilizada para imunização foi de 0,5 mg/ml. Dessa forma, pesou-se 5 mg de OVA, diluiu em 10 ml de solução de salina tamponada (phosphate buffered saline, PBS) estéril em capela de fluxo laminar. Posteriormente adicionou-se hidróxido de alumínio (2%, rehidragel). O volume administrado por via i.p. nos camundongos foi de 200 µL (via intraperitoneal), equivalente a 100µg de OVA. Para o desafio intranasal, foi instilado (via i.n.) 10µg (20µl) de uma solução de OVA diluída em PBS, que foi preparada a partir da diluição de uma solução estoque de OVA (2 mg/1 mL) em PBS estéril (KUROWSKA-STOLARSKA *et al.*, 2008).

#### **4.3.2 Modelos experimentais de asma**

*4.3.2.1 Modelo experimental de asma induzido por três exposições à ovalbumina*

Os camundongos foram imunizados por via i.p. com uma suspensão de 100µg de OVA (Sigma) acrescida de 2% de hidróxido de alumínio (Sigma) e PBS no dia 1 (volume administrado 200µl). Nos dias 9, 10 e 11 os camundongos foram previamente anestesiados por via i.p. com solução de cetamina 10% (Vetnil) + xilazina 2% (Kensol) (anestédico de curta duração/ver Anexo 2) (160µl/100g de peso do animal) e tratados com instilação i.n. de 10µg de OVA diluída em PBS (volume administrado 20µl) ou somente PBS (20µl) nos animais controle (KUROWSKA-STOLARSKA *et al.*, 2008) com auxílio de ponteira acoplada a pipeta. Para realização da administração intranasal, é necessário que o animal esteja sob anestesia geral, pois, neste caso é atingida a inibição dos reflexos das vias aéreas superiores fazendo com que as soluções sejam aspiradas para o pulmão.

#### *4.3.2.2 Modelo experimental de asma induzido por seis exposições à ovalbumina*

Os camundongos foram imunizados com 100µg de OVA (Sigma) i.p. acrescida de 2% de hidróxido de alumínio (Sigma) (200µl) no dia 1. Nos dias 9, 10, 11, 13, 15 e 17 os camundongos foram previamente anestesiados por via i.p. com solução de cetamina/xilazina e tratados com instilação i.n. de 10µg de OVA (20µl) ou PBS (20µl).

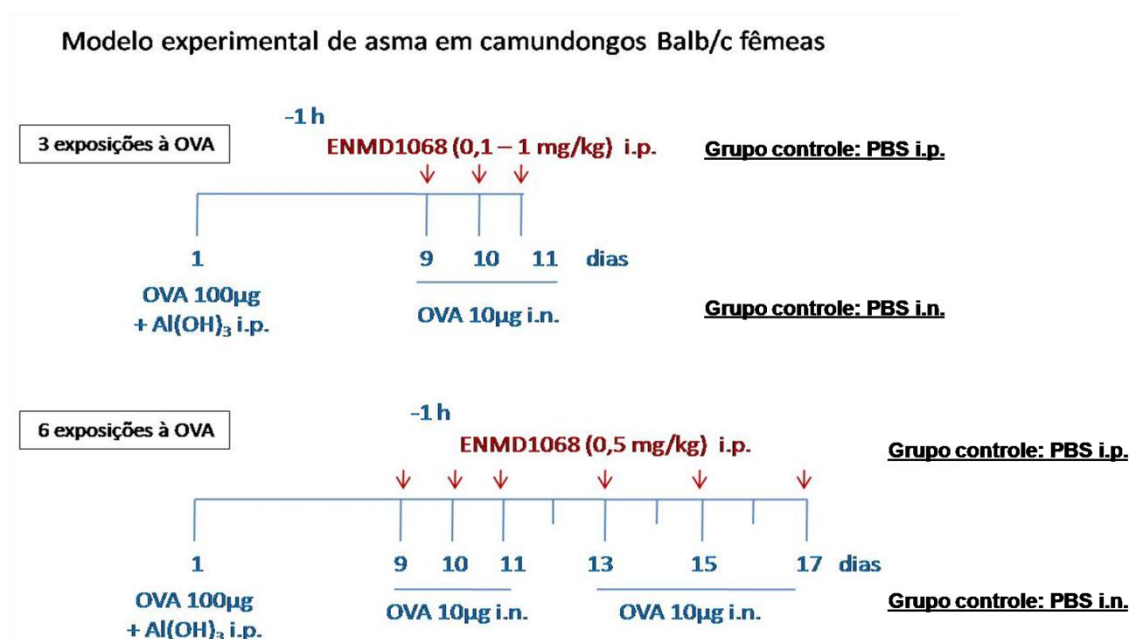
#### **4.3.3 Pré-tratamento dos animais com antagonista de PAR-2**

O antagonista seletivo de PAR-2 ENMD1068 (Tocris Bioscience) foi avaliado em relação à sua capacidade em reduzir a inflamação, analisado pelo recrutamento de leucócitos para os pulmões, produção de citocinas e quimiocinas, alteração da permeabilidade vascular, dentre outros fatores em resposta à OVA.

As doses de ENMD1068 utilizadas na curva dose resposta foram 0,1; 0,5 e 1 mg/Kg. Sendo assim, foram diluídos 5 mg de ENMD1068 em 5 mL de

PBS estéril (concentração 1mg/mL) e desta solução estoque foram preparadas alíquotas para fazer as soluções de trabalho.

Decorridos sete dias após a imunização dos camundongos, especificamente, nos dias 8, 9, 10 (no modelo de três exposições à OVA) ou nos dias 9, 10, 11, 13, 15 e 17 (no modelo de seis exposições à OVA) os camundongos foram pré-tratados por via i.p. com antagonista de PAR-2 (ENMD1068, 0.1 – 1.0 mg/kg) e 1 hora após, anestesiados e desafiados com OVA i.n. (10µg).



**Figura 5.** Esquema representando o pré-tratamento dos camundongos com ENMD1068 em modelo de três exposições (KUROWSKA-STOLARSKA *et al.*, 2008) e seis exposições ao antígeno (proposta de novo modelo experimental).

#### 4.3.4 Tratamento dos animais com agonista de PAR-2

Sob outra perspectiva, o peptídeo ativador de PAR-2 SLIGRL-NH<sub>2</sub> (Tocris Bioscience) foi utilizado em alguns experimentos para avaliar sua capacidade de induzir ou amplificar a resposta inflamatória na ausência ou presença de OVA sucessivamente. Neste caso, os camundongos foram tratados via i.n. com o peptídeo nos mesmos dias e momento em que receberam o desafio com OVA no modelo de três exposições ao antígeno.

De outro modo, utilizamos como controle de seletividade e ativação do PAR-2 o peptídeo inativo deste receptor, o LRGILS-NH<sub>2</sub> (Tocris Bioscience) que corresponde a sequência invertida do agonista.

A concentração do agonista seletivo de PAR-2 SLIGRL-NH<sub>2</sub> utilizada foi de 30 µg/animal (Matos *et al.*, 2014) administrados em um volume de 30 µL (via i.n.). Sendo assim, foram diluídos os 5 mg de SLIGRL-NH<sub>2</sub> em 1 ml de PBS estéril dos quais foram retiradas alíquotas para fazer as soluções de trabalho. O mesmo procedimento foi adotado para o preparo da solução de peptídeo controle de PAR-2 LRGILS-NH<sub>2</sub>.

#### **4.4 Coleta do lavado broncoalveolar**

A inflamação pulmonar foi avaliada de 30 min à 72 horas após o último desafio intranasal com OVA, dependendo da finalidade de cada procedimento experimental, quando então os animais foram submetidos a anestesia de longa duração com solução de cetamina 10% (1mL) + xilazina 2% (0,75 mL) via i.p. (administrou-se 20 µL/10g de peso de animal). Após inibição dos reflexos, os camundongos foram traqueostomizados com auxílio de uma catéter (18G) acoplado a uma seringa de 1 mL e os pulmões perfundidos com solução de PBS acrescida de albumina de soro bovino tipo V 3% (Calbiochem) gelado. Este líquido recolhido é denominado de lavado broncoalveolar (LBA), este procedimento foi realizado duas vezes, totalizando um volume final de 2 mL armazenados em eppendorf a 4°C (gelo).

##### **4.4.1 Avaliação de leucócitos presentes no LBA**

Para a avaliação das células presentes nas vias aéreas, o LBA foi centrifugado a 4°C na velocidade de 100 x G (Thermo Scientific™ Sorvall™ ST 16 Centrifuge Series) por 5 min. O sobrenadante foi armazenado e congelado (-70°C) para posterior dosagem de citocinas ou proteínas totais, enquanto o *pellet* que contém os leucócitos foi imediatamente ressuspensa em 0.1 ml de PBS + albumina (3%).

Os leucócitos obtidos após a centrifugação foram utilizados para realizar a contagem total e diferencial. Para isto, 20 µl da solução ressuspensa foram

colocados em um tubo contendo 180 µl da solução de Turk (ver preparo em anexo) e, em seguida, uma alíquota foi retirada e colocada em uma câmara de Neubauer para contagem total de leucócitos em microscópio óptico. Para realizar a contagem diferencial, volumes de 40 ou 500 µL foram aplicados ao suporte específico para Citospin (Fanem) com lâmina acoplada e centrifugadas a 100 rpm por 40 segundos. Após a secagem, as lâminas foram coradas com soluções de Giemsa (QEEL - Química Especializada Erich Ltda., Brasil) e May Grunwald (Dinâmica Contemporânea Ltda., Brasil) e utilizadas para realização da contagem diferencial de leucócitos em microscópio óptico com imersão em óleo, com aumento de 1.000 vezes. O número de leucócitos encontrados foi expresso na forma de células por cavidade  $\times 10^5$ .

#### **4.4.2 Determinação da expressão protéica de PAR-2 em leucócitos do LBA por Western blot**

Para avaliar a expressão de PAR-2 em leucócitos, o LBA de camundongos desafiados com OVA (10 µg) ou PBS, pré-tratados ou não com ENMD1068 (0,5 mg/kg) foram obtidos 2 e 4 h após o último desafio i.n. com o antígeno. Foram utilizados cinco animais para grupo. O LBA foi centrifugado (4°C a 1300 g) por 5 min. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuspenso e homogeneizado em 0,3 ml de tampão de lise (NaCl 150 mmol/L; Tris 50 mmol/L; EDTA.2Na 5 mmol/L; MgCl<sub>2</sub> 1 mmol/L) acrescido de 1% de Triton X-100, 0,5% de SDS e de coquetel de inibidores de proteases (SigmaFast®, Sigma).

O lisado foi centrifugado a 8000 g por 8 min, e a concentração de proteínas no sobrenadante foi determinada por espectrofotometria pelo método de Bradford. Trinta microgramas de proteínas foram separadas em gel de poliacrilamida (10%) e transferidas para membrana de nitrocelulose (Millipore®). A qualidade da transferência foi monitorada através da coloração da membrana com solução de Ponceau 0,3%. A membrana foi então lavada em água destilada e colocada em solução de bloqueio (0,1% TBS-Tween; 3% de albumina sérica bovina), a 4°C overnight. Os seguintes anticorpos primários (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) foram utilizados: anticorpo

policlonal anti-PAR-2 feito em cabra (1:1000) e anti- $\beta$ -actina feito em camundongo (1:3000). Os anticorpos secundários (Millipore®) foram: anti-camundongo feito em cabra IgG-HRP (1:8.000) e anti-cabra feito em coelho IgG-HRP (1:8000). As bandas proteicas foram detectadas por uma reação de quimioluminescência (Luminata Western HRP Substrates - Millipore®) e a intensidade das mesmas foi avaliada por análise densitométrica através do software Image J 1.4 (National Institute of Health, USA). A  $\beta$ -actina foi utilizada como controle da quantidade de proteínas aplicadas às diferentes canaletas, sendo considerado como um normalizador.

#### ***4.4.3 Localização do receptor PAR-2 em leucócitos por imunocitoquímica***

Os animais imunizados foram desafiados com OVA (10  $\mu$ g) ou PBS, pré-tratados ou não com ENMD1068 (0,5 mg/kg) e após 48 h foram realizadas a coleta do LBA e obtenção das preparações de células em citospin, conforme descrito em 4.5.1, em lâminas gelatinizadas e então fixadas em álcool 70%. Antes de iniciar o procedimento de imunocitoquímica, as lâminas foram lavadas com PBS durante 5 minutos. Para o bloqueio da peroxidase endógena todas as lâminas foram incubadas em 10 % de peróxido de hidrogênio (volume 30) para 90% de metanol durante 15 min, e repetiu-se este procedimento mais uma vez. Em seguida, as lâminas foram lavadas duas vezes com PBS durante 5 min cada.

Para o bloqueio da biotina endógena foi utilizado Ultra Block V (Thermos scientific) e, após o bloqueio, as lâminas foram incubadas com o anticorpo primário anti-PAR-2 (Santa Cruz Biotechnology) por uma hora a 37°C. Na sequência, foi aplicado o método de amplificação biotina-peroxidase com identificação a partir de anticorpo secundário e revelação polimérica (ADVANCE HRP – ready to use – Dako Cytomation). Por último, as células foram expostas ao cromógeno 3,3 – diaminobenzidina 4 HCl e contra-coradas com hematoxilina de Mayer's. Controles negativos foram obtidos pela substituição do anticorpo primário por PBS.

#### 4.5 Identificação de macrófagos M2 por Citometria de fluxo

A análise de citometria de fluxo de macrófagos foi realizada 48 horas após o último desafio intranasal com OVA. Para isto, foram utilizadas as células do lavado broncoalveolar e dos pulmões dos camundongos. Primeiramente coletou-se o LBA em tubos identificados, armazenou em gelo e posteriormente os lóbulos dos pulmões foram removidos e então colocados em uma placa para cultivo celular (12 poços) contendo 900 µl de RPMI incompleto, e em seguida foram cortados em pequenos fragmentos com o auxílio de uma tesoura e pinça (estéreis), e foram colocados num eppendorf de 2 mL (fundo chato).

Feito isto, o pulmão foi digerido em 100 µl de uma solução contendo DNase I (Sigma, 0,5 mg/mL) e Liberase TL (Roche, 0.2 mg/mL) e incubado por 45 min a 37°C com rotação de 500 rpm (BESNARD *et al.*, 2015). Após a incubação, as amostras foram homogenizadas com uma pipeta pasteur e passadas na peneira diluídas em RPMI completo. Deste modo, foi feita a lise e lavou com tampão de FACS. A suspensão de células obtida por meio da digestão dos lóbulos do pulmão e do LBA foram contadas no aparelho Couter (COULTER® Ac-T diff™ Analyzer). As concentrações foram ajustadas  $1 \times 10^6$  células para citometria de fluxo e transferidas para tubos FACS previamente identificados.

Para análise do fenótipo das populações de macrófagos pulmonares e do LBA,  $1 \times 10^6$  células foram incubadas a 4°C por 40 min com Fc Block ( $1 \mu\text{g}/1 \times 10^6$  células; BD Bioscience, San Jose, CA, USA). Posteriormente, as células foram incubadas com os anticorpos monoclonais F4/80 (BM8, eBioscience) e receptor de manose MR<sup>+</sup> (CD206, mannose receptor C type 1, MR; MR5D3, AbDSerotec) para identificar a população celular de macrófagos M2, durante 30 min a 4°C, no escuro.

Os anticorpos foram diluídos em solução de fosfato tamponado contendo 2% de SFB (Tampão FACS). Após a incubação, as células foram lavadas com 2 mL de tampão FACS e depois fixadas com solução tamponada contendo 1% de formol. A marcação com os anticorpos foi avaliada por citometria de fluxo, utilizando o citômetro FACSVerse™ (BD, San José, CA, USA) pelo qual foram adquiridos 100.000 eventos por amostra (programa Cell Quest), e as células avaliadas por tamanho (FSC), granularidade (SSC) e intensidade de

fluorescência. Todos os dados foram interpretados pelo software FCS Express V3 (De Novo Software, Los Angeles, CA).

#### **4.6 Quantificação de citocinas e quimiocinas no LBA, pulmão e linfonodos dos camundongos por ELISA**

Para coleta das amostras, os camundongos foram anestesiados, o LBA foi coletado e centrifugado a 400 x G durante 10 min e o sobrenadante recuperado. Os linfonodos axilares foram coletados em meio de cultura RPMI (ver anexo) e o sobrenadante utilizado para quantificação de citocinas. Em seguida, os animais foram perfundidos com 20 mL de salina, o lobo pulmonar inferior esquerdo coletado e imerso em 300 µL de solução PBS + EDTA 1mM, sendo que, todas as amostras foram armazenadas a -20°C.

No dia da quantificação de citocinas e quimiocinas, os pulmões foram macerados com auxílio de um homogeneizador de tecido (Polytron®, Polytrom PT 3100, USA), centrifugados a 800 g durante 15 min e o sobrenadante recuperado para realização das análises, juntamente com os sobrenadantes do LBA e linfonodos, seguindo as recomendações indicadas pelo fabricante de cada kit (ALVES-FILHO *et al.*, 2006).

Brevemente, a concentração das citocinas foi mensurada nas amostras por meio do ensaio imunoenzimático (ELISA), utilizando kits comerciais conforme as recomendações dos fabricantes para cada kit. Anticorpos ou Kits foram obtidos para IL-4, IL-10, IL-13 (eBioscience), IL-6 (BD Biosciences) e IL-1β, TNF, CCL22, CXCL1, CCL5, AREG (R & D Systems).

#### **4.7 Avaliação da permeabilidade vascular no pulmão e traqueia dos camundongos**

Nesta etapa, utilizou-se o corante azul de Evans como um marcador da permeabilidade vascular no parênquima pulmonar, devido a sua capacidade de se ligar irreversivelmente à albumina, permitindo dessa forma mensurar o extravasamento plasmático como descrito previamente por Lundberg e col.



(1983), em protocolo modificado. Basicamente, o método consiste na determinação espectrofotométrica da quantidade de azul de Evans extravasado para o tecido em estudo.

Para esse fim, os animais imunizados e desafiados com OVA, submetidos ou não ao tratamento com ENMD1068, 1 h após o último desafio i.n. com o antígeno foram anestesiados via i.p. com uma mistura de cetamina 10% (1 mL) + xilazina 2% (0,75 mL) via i.p. (administrou-se 20µL/10g de peso de animal) de longa duração. Em seguida, administrou-se 200 µL de Azul de Evans ( $C_{34}H_{24}N_6Na_4O_{14}S_4$ , Dinâmica Química Contemporânea LTDA) a 2% em solução fisiológica (0,9% de NaCl) por via intravenosa (veia caudal). Decorrido 1 h, coletou-se o pulmão e a traqueia destes camundongos após ser realizada a perfusão com 5 mL de salina fisiológica (0,9% de NaCl).

Os pulmões e traqueias removidos foram colocados em placas de Petri para secagem, por 48 horas, em estufa a 40°C. Então, determinaram-se o peso das amostras e, seguidamente foi acrescentado ao tecido 1 mL de formamida em eppendorfs previamente identificados, para extração do corante, que permaneceu por 48 h em temperatura ambiente e protegido da luz. Neste último instante, foi preparada uma solução de azul de Evans a 1000 µg/mL que foi submetida a diluições sucessivas em formamida com pipeta automática (Eppendorf®) para montagem da curva padrão concentrações variando de 10 µg/mL a 1 ng/mL de azul de Evans.

Após a preparação das diluições, pipetou-se 300 µL de cada diluição e dos extratos obtidos dos tecidos em duplicata numa placa de 96 poços devidamente identificada. Então, foi realizada a leitura da densidade óptica de cada orifício da placa, em leitor de microplaca (Thermo Scientific™ Multiskan™ GO Microplate) com filtro de 620 nm de comprimento de onda, frente a um branco de formamida e a concentração determinada através de uma curva padrão com concentrações distintas de azul de Evans. O resultado da leitura espectrofotométrica foi normalizado e expresso em µg de Azul de Evans por 100 mg de tecido seco.

#### **4.8 Processamento do pulmão para os ensaios de MPO e EPO**

Decorrida a coleta do LBA, a cavidade torácica foi aberta e os camundongos foram perfundidos com 5 mL de salina fisiológica (0,9% NaCl). O tecido pulmonar foi coletado, sendo armazenado o lado direito para quantificação das atividades enzimáticas de MPO e EPO, e o lado esquerdo do pulmão para análises histopatológicas.

Feito isso, 100 mg do pulmão direito foi homogeneizado em 1 mL de solução de extração de citocinas (NaCl 0,4 M, NaPO<sub>4</sub> 10 mM, PMSF 0,1 mM, cloreto de benzetônio 0,1 mM, EDTA 10 mM, tween 20 0,05%, BSA 0,5%, 20 Ki aprotinina) e centrifugada a 10.000 rpm por 10 min a 4°C. O sobrenadante foi estocado em eppendorfs identificados e congelado (-80°C) e o precipitado formado foi novamente homogeneizado em 0,95 mL de solução tampão 1 (NaCl 0,1 M; Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0,02 M e Na<sub>2</sub>EDTA 0,015 M; pH 4,7) e novamente centrifugado a 10.000 rpm por 10 min a 4°C.

O sobrenadante foi descartado e o precipitado formado foi submetido à lise hipotônica (1,5 mL de NaCl 0,2% seguido da adição de 1,5 mL de NaCl 1,6% +Glicose 5%) para lise de eventuais hemácias. Feito isso, a amostra foi homogeneizada e centrifugada novamente (10.000 rpm por 10 minutos a 4°C).

Para o ensaio de MPO e EPO, foi adicionado 0,8 mL de tampão 2 (Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0,05M, HETAB 0,5%; pH 5,4) e as amostras foram homogeneizadas e submetidas à lise térmica. Para isso, as amostras foram congeladas e descongeladas por três vezes em nitrogênio líquido. Terminada esta etapa, foram centrifugadas novamente e o sobrenadante armazenado em eppendorfs previamente identificados, sendo acondicionadas a -20°C para posterior análise enzimática.

#### **4.8.1 Ensaio da atividade da MPO**

O ensaio de atividade de MPO pulmonar foi conduzido adicionando 25 µL das amostras diluídas 8 vezes em tampão 2 em placa plástica de 96 poços. Em seguida, foi adicionado 25 µL do reagente 3,3'-5,5'-tetrametilbenzidina (TMB, Sigma) diluído em dimetilsulfóxido (DMSO, Merck) na concentração de 1,6 mM e a placa foi incubada a 37°C. Decorridos 5 min, foram adicionados 100 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,002% em tampão 2) e a placa foi novamente incubada (5

min a 37°C). Após a incubação, a reação foi paralisada pela adição de 100 µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1M. A leitura da densidade óptica foi determinada por espectrofotômetro (SpectraMax 190, Molecular Devices) em comprimento de onda de 450 nm.

#### **4.8.2 Ensaio da atividade da Peroxidase Eosinofílica (EPO)**

O ensaio de atividade de EPO pulmonar foi conduzido adicionando 75 µL das amostras diluídas 8 vezes em tampão 2 em placa plástica de 96 poços. Em seguida, 75 µL do substrato (OPD 0,1 mM em tampão Tris-HCl 75 mM, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 6,6 mM; pH 8) foram colocados nas amostras. A reação ocorreu por 30 minutos ao abrigo da luz e à temperatura ambiente. A reação foi, então, parada pela adição de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1M e a leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro (SpectraMax 190, Molecular Devices) em comprimento de onda de 492 nm.

#### **4.9 Quantificação de proteínas totais do LBA**

Para quantificação de proteínas totais, utilizou-se o sobrenadante obtido após centrifugação do LBA dos camundongos. Para isto, foi utilizado o kit de quantificação de proteínas DC Protein Assay (BioRad, USA) e o ensaio foi feito de acordo com as especificações do fabricante. Brevemente, em uma placa de 96 poços adicionaram-se 2 µL da curva padrão (em duplicata) e das amostras nos poços correspondentes. Feito isto, 200µL do corante previamente diluído em água Mili-Q (1:5) foi acrescentado. Após 3 minutos, a leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro (SpectraMax 190, Molecular Devices) em comprimento de onda de 595 nm. A concentração de proteínas totais foi determinada através da curva padrão de albumina sérica bovina (1µg/µL – 0,5 µg/µL), e os resultados foram expressos em µg de proteína por mL.

#### **4.10 Análises da mecânica Pulmonar**

Para esta análise, os camundongos foram anestesiados com solução de cetamina (130 mg/Kg) e xilazina (8,5 mg/Kg) em solução fisiológica por via subcutânea, a fim de manter a respiração espontânea. Os animais foram traqueostomizados, ou seja, foi feita uma pequena incisão na traqueia permitindo a entrada de um cateter de teflon (1,7 mm de diâmetro e 0,8 mL de espaço morto).

Em seguida, os animais foram colocados em um pletismógrafo conectado a um ventilador controlado por computador (Forced Pulmonary Maneuver System®, Buxco Research Systems®, Wilmington, North Carolina USA). Este espirômetro fornece, semi-automaticamente, três manobras diferentes: Lei de Boyle (FRC), volume de pressão quase-estático e uma manobra de volume de fluxo rápido (NOGUEIRA *et al.*, 2016). Dessa forma, uma frequência de respiração média de 160 inspirações/minuto foi imposta ao camundongo anestesiado por ventilação e pressão controladas até alcançarem um padrão regular de inspiração e expiração completa em cada ciclo obtido, considerando Rinx (índice de rejeição) = 0.

Durante a respiração mecânica, foi detectada a complacência dinâmica (C<sub>dyn</sub>) e a resistência pulmonar (RI) pelo teste RC de complacência e resistência. Para determinar a Capacidade Pulmonar Total (TLC), realizou-se a manobra de pressão-volume quasi-estática, pelo qual os pulmões foram inflados sob uma pressão padrão de +30 cm H<sub>2</sub>O e posteriormente expirou-se o ar lentamente até se atingir uma pressão negativa de -30 cm H<sub>2</sub>O. Nas manobras rápidas de fluxo-volume, primeiramente os pulmões foram inflados até +30 cm H<sub>2</sub>O e imediatamente, pressão foi diminuída para -30 cm H<sub>2</sub>O. A curva fluxo-volume foi registrada durante esta manobra.

#### **4.10.1 Determinação da hiperreatividade brônquica**

Para avaliar a hiper-responsividade das vias aéreas, os mesmos camundongos utilizados nas manobras anteriores (condição basal) foram desafiados via intravenosa com metacolina (1 mg / Kg) (KUNG *et al.*, 2000, JONASSON *et al.*, 2009) (*Acetyl-β-methylcholine chloride*, A-2251, Sigma-Aldrich St.Louis, MO, USA) após 20 seg, foi realizada uma nova análise da

mecânica pulmonar para se obter a resistência pulmonar (RI). Todas as manobras subótimas foram descartadas e, para cada teste realizado em cada animal, pelo menos três manobras aceitáveis foram realizadas para obter uma média confiável para todos os parâmetros numéricos.

#### **4.11 Processamento histológico, análise morfométrica e histoquímica dos pulmões**

Após a eutanásia dos animais, os pulmões foram cuidadosamente coletados com material cirúrgico apropriado, então foram rapidamente colocados a uma solução fixadora constituída por formalina 10% neutra e tamponada com fosfato de sódio monobásico e dibásico por no máximo 48 horas, em eppendorfs identificados e mantidos à temperatura ambiente.

Os pulmões foram seccionados em sentido longitudinal, processados pela técnica rotineira de inclusão em parafina e submetidos à microtomia para obtenção de secções histológicas de 4  $\mu\text{m}$ . Cada pulmão foi cortado em sua totalidade e montado em lâminas de vidro, as quais foram mantidas em estufa a 37°C, para melhor aderência dos cortes nas lâminas. Foram realizadas as colorações por hematoxilina e eosina HE, ácido periódico de *Schiff* (PAS) para mucosubstâncias e tricômico de gômori para evidenciar, sobretudo, deposição de colágeno nos alvéolos.

As análises histoquímicas foram realizadas em toda a extensão dos pulmões. Uma média foi obtida a partir da avaliação de dez imagens por animal compostas por áreas contendo bronquíolos, vasos e alvéolos. Os dados de cada animal foram arquivados, analisados e expressos como densidade integrada (intensidade) em pixels. Determinou-se a área e a intensidade da coloração em *pixels* usando o software WCIF Image J® (Media Cybernetics Manufacturing, Rockville, MD, EUA). A avaliação do score de inflamação foi realizada a partir da análise qualitativa das lâminas de HE (adaptado de HOVART *et al.*, 2007; GARCIA *et al.*, 2010)

##### **4.11.1 Imuno-histoquímica para identificação de CCL5**

Para a análise imuno-histoquímica, cortes de 4 µm foram obtidos a partir dos blocos de parafina, transferidos para lâminas gelatinizadas, e posteriormente desparafinizados e reidratados. A recuperação antigênica foi realizada em solução retrieval pH 6,0 (Antigen retrieval solution, DAKO, Carpinteria) em banho-maria a 98 °C por 20 min. O bloqueio da peroxidase foi realizado com peróxido de hidrogênio a 10% diluído em álcool metílico (3 repetições, 5 min cada) e bloqueio protéico em solução protein block (Dako, Carpinteria) (20 minutos). O anticorpo primário CCL5 (clone 53405.111, R&D Systems, Minneapolis, MN, 1:500) foi diluído em diluente de anticorpo (Dako, Carpinteria) e aplicado sobre os cortes para incubação em câmara úmida durante toda noite (*over night*) a 4°C. A amplificação antigênica das reações imuno-histoquímicas foi realizada empregando-se o sistema baseado em polímero NovoLink™ (Max polymer Detection System, Leica Biosystems, Newcastle, United Kingdom) (30 minutos cada) e a revelação com solução cromogênica de 3,3' diaminobenzidina (DAB) líquida (Leica Biosystems, Newcastle, United Kingdom).

Para avaliar a expressão de CCL5 fizemos um escore que será descrito na seção de resultados.

#### **4.12 Análise Estatística**

A construção dos gráficos e as análises estatísticas foram realizadas com auxílio do programa *Graph Pad Prism 5*. Os dados foram analisados por meio da análise de variância simples, *one-way ANOVA*, seguida pelo teste *Newman-Keuls*, que compara todos os grupos experimentais entre si, com exceção das análises de migração de 2 grupos apenas para os quais foi utilizado o teste não paramétrico, seguido pelo teste de Mann-Whitney. Os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média e comparados com os resultados dos grupos controles. Para análises do score de inflamação e CCL5, os dados foram analisados por meio da análise de variância simples, *one-way ANOVA*, seguida pelo teste de Kruskal-Wallis e pós-teste de múltiplas comparações de Dunn's. Foram consideradas estatisticamente significativas as diferenças com  $p < 0,05$ .

## 5. RESULTADOS

Como tentativa de avaliar os fenômenos iniciais e tardios conseqüentes da inflamação pulmonar alérgica decorrente da presença do antígeno nas vias aéreas, nesta seção, os resultados foram divididos em dois blocos principais, de acordo com o número de exposições ao antígeno, três ou seis, conforme descrito na seção de Material e Métodos

### 5.1 Participação do PAR-2 no modelo experimental de asma induzido por três exposições à ovalbumina

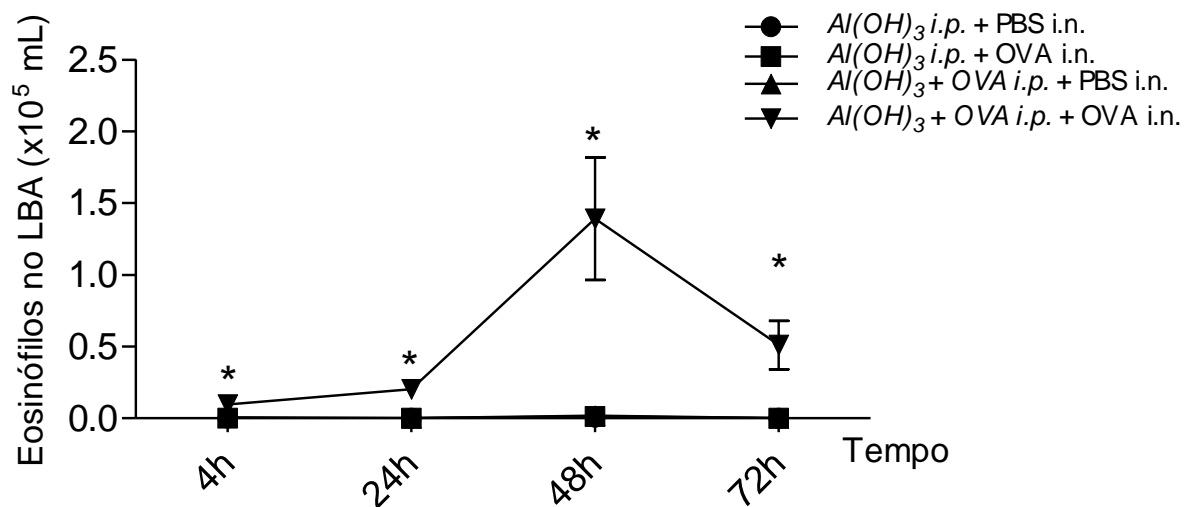
#### 5.1.1 Avaliação da participação do PAR-2 sobre o recrutamento de leucócitos e produção de citocinas em função do tempo na inflamação pulmonar alérgica

Inicialmente, foi avaliada a capacidade de um imunógeno induzir o recrutamento de eosinófilos para o espaço broncoalveolar de camundongos em função do tempo. Para isto, os camundongos foram previamente submetidos a um protocolo de imunização (KUROWSKA-STOLARSKA *et al.*, 2008) para o agente imunizante (ovalbumina, OVA) e desafiados com instilação i.n. de 10 µg de OVA, conforme descrito na seção de Material e Métodos. O número de leucócitos presentes no LBA foi avaliado 4, 24, 48 e 72 h após o último desafio. A administração i.n. de OVA induziu recrutamento de eosinófilos em todos os tempos avaliados, com pico 48 h após o desafio (**Figura 6**). Este aumento no número de eosinófilos pode ser evidenciado também através da análise histológica das lâminas coradas pelo método de May Grunwald-Giemsa (**Figura 7**). O modelo de imunização e desafio com OVA foi bastante eficaz, uma vez que os animais imunizados apenas com o adjuvante e desafiados com PBS ou OVA não tiveram migração de eosinófilos que é característico de uma resposta alérgica (**Figura 6**).

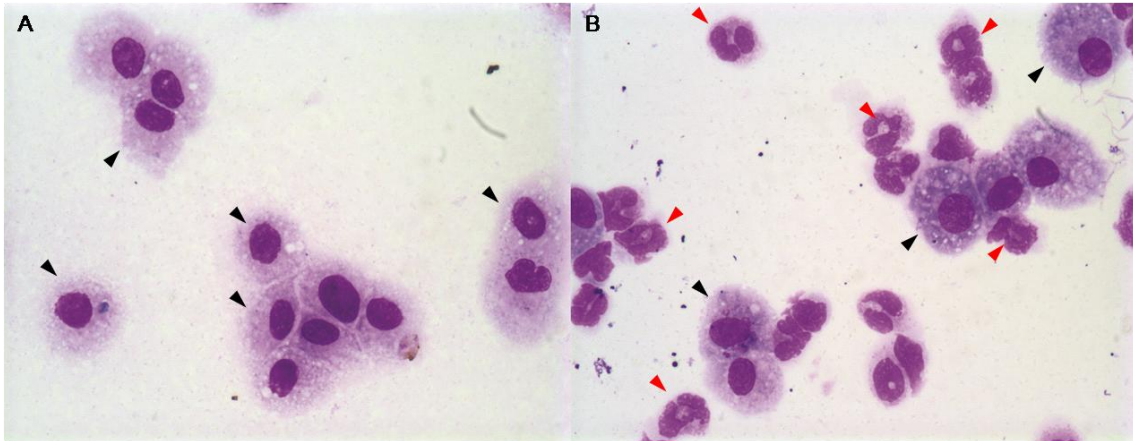
Para avaliar a participação do PAR-2 neste modelo, os camundongos imunizados foram pré-tratados por via i.p. com o antagonista seletivo de PAR-2, ENMD1068 (0,1 – 1,0 mg/ kg) 1 h antes da administração i.n. de OVA (10 µg/animal) e as células presentes no LBA avaliadas 48 horas após. O pré-

tratamento com as três doses do antagonista de PAR-2 reduziu significativamente a migração de eosinófilos induzida pela OVA, sem diferença estatística na inibição da migração entre as doses utilizadas (**Figura 8**). Contudo, a dose de 0,5 mg/kg do antagonista de PAR-2 foi escolhida para ser utilizada nos experimentos posteriores, já que inibiu 85% do recrutamento celular e foi a dose intermediária utilizada que corresponde a cerca de 11 µg por animal (**Tabela 2**).

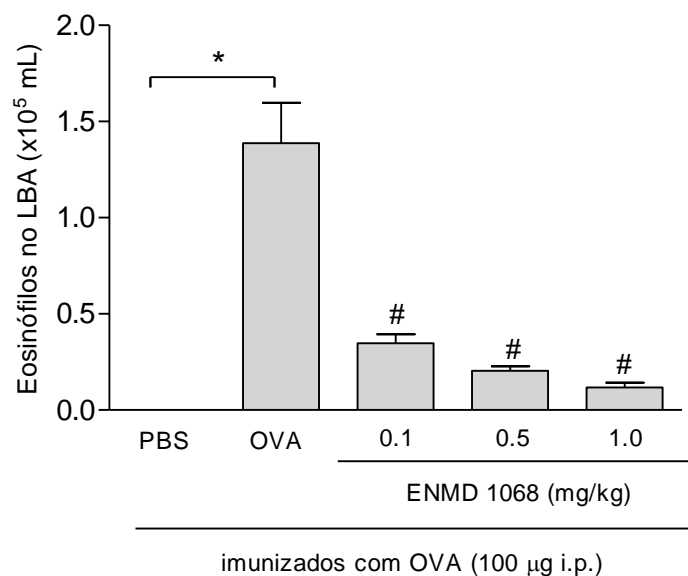




**Figura 6. Cinética do recrutamento de eosinófilos em modelo de inflamação pulmonar alérgica induzido pela ovalbumina (OVA) em camundongos Balb/c.** Os grupos representados pelos símbolos ▲ e ▼ foram imunizados com Al(OH)<sub>3</sub> + OVA (0,5 mg/ml, 100 µg/animal OVA) por via i.p. e então desafiados por via i.n. com OVA (10 µg) ou PBS. Já os grupos ● e ■ receberam apenas Al(OH)<sub>3</sub> (0,2 ml, PBS) por via i.p. e então desafiados por via i.n. com OVA (10 µg) ou PBS, não houve recrutamento de eosinófilos para estes grupos. O número de eosinófilos foi avaliado 4, 24, 48 e 72 horas após o desafio. Os símbolos representam média ± e.p.m. de 4 a 6 animais por grupo. \*p < 0,001 em relação ao grupo imunizado com Al(OH)<sub>3</sub> + OVA i.p. e desafiado com OVA i.n. .



**Figura 7. Leucócitos de lavado broncoalveolar corados pelo método de May Grunwald-Giemsa.** Os camundongos imunizados foram desafiados por via i.n. com: (A) PBS (20  $\mu$ l) ou (B) OVA (10  $\mu$ g) e os leucócitos foram avaliados 48 horas após o estímulo. A figura representa os leucócitos do LBA, sendo macrófagos (setas pretas) e eosinófilos (setas vermelhas), visualizados em microscópio óptico acoplado a um sistema de fotografia (óleo de imersão/aumento de 1000x) que foram montados em lâmina de vidro e corados pelo método de May Grunwald-Giemsa.



**Figura 8. Efeito induzido pelo antagonista de PAR-2, ENMD1068, sobre o recrutamento de eosinófilos para o LBA induzido por OVA.** Os animais foram imunizados por via i.p. com Al(OH)<sub>3</sub> + OVA (0,5 mg/ml, OVA) no dia 1 e então desafiados do dia 9-11 com OVA (10 µg/animal, via i.n.) ou PBS (20 µl, i.n.) em animais pré-tratados ou não com ENMD1068 (0,1; 0,5 ou 1 mg/Kg) 1 h antes de cada desafio. O número de eosinófilos presentes no LBA dos animais foi avaliado 48 h após o último desafio. As barras representam média ± e.p.m. de 5 a 6 animais por grupo. \*p < 0,001 em relação ao grupo controle, #p < 0,001 em relação ao grupo desafiado com OVA.

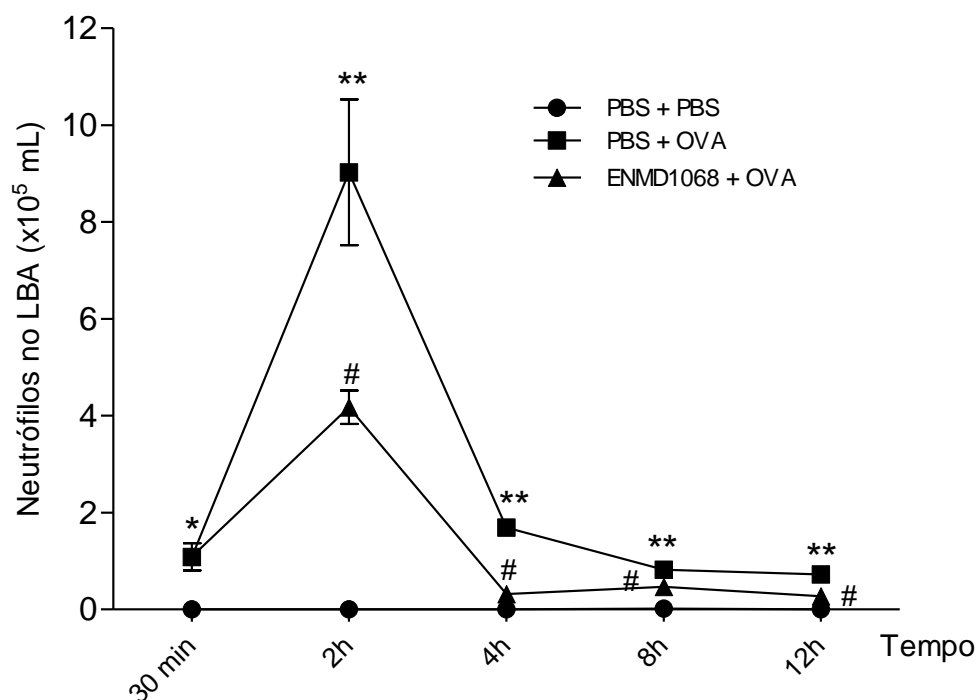
**Tabela 2.** Leucócitos presentes no lavado broncoalveolar de camundongos em resposta a injeção i.p. de diferentes doses de ENMD1068 na inflamação pulmonar alérgica induzida por OVA (10 µg i.n.).

Leucócitos	Animais imunizados (OVA 0.5 mg/ml)				
	PBS	OVA (10 µg)			
		PBS	ENMD1068 (mg/kg)		
			0.1	0.5	1
Eosinófilos	0,0 ± 0,0	1,3 ± 0,2 **	0,3 ± 0,04 <sup>##</sup>	0,2 ± 0,02 <sup>##</sup>	0,1 ± 0,02 <sup>##</sup>
Neutrófilos	0,0 ± 0,0	0,01 ± 0,01	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
Mononucleares	3,9 ± 0,4	4,4 ± 0,5	3,4 ± 0,3	3,4 ± 0,2	3,4 ± 0,3
Totais	3,9 ± 0,4	5,8 ± 0,4*	3,8 ± 0,3 <sup>#</sup>	3,6 ± 0,8 <sup>#</sup>	3,5 ± 0,3 <sup>#</sup>

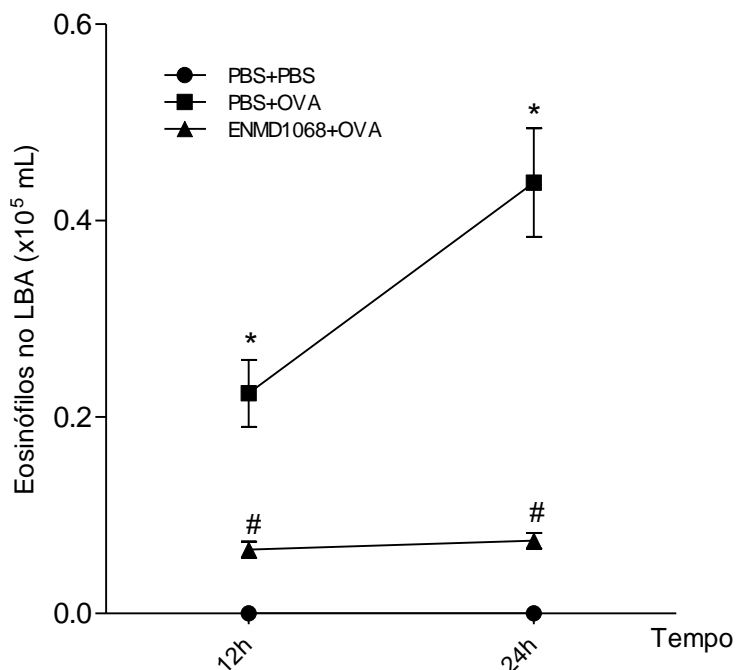
Os valores representam a média e o erro padrão da média x 10<sup>5</sup> células. \*p<0,01 \*\*p< 0,001 em relação ao grupo controle, #p<0,01 ##p<0,001 em relação ao grupo desafiado com OVA; n=5 a 6. Tempo avaliado: 48 h após o último desafio com OVA.

Posteriormente foi avaliada a capacidade da OVA em induzir o recrutamento de leucócitos para o LBA de camundongos em função do tempo, de 30 min a 24 h. Notou-se que no período de 30 min a 12 h após o desafio com OVA, ocorreu um aumento da migração de neutrófilos para o LBA, com pico em 2 h após o antígeno (**Figura 9**). O tratamento com o ENMD1068 reduziu significativamente o número de neutrófilos e eosinófilos presentes no LBA em todos os tempos avaliados (**Figura 9 e 10**).

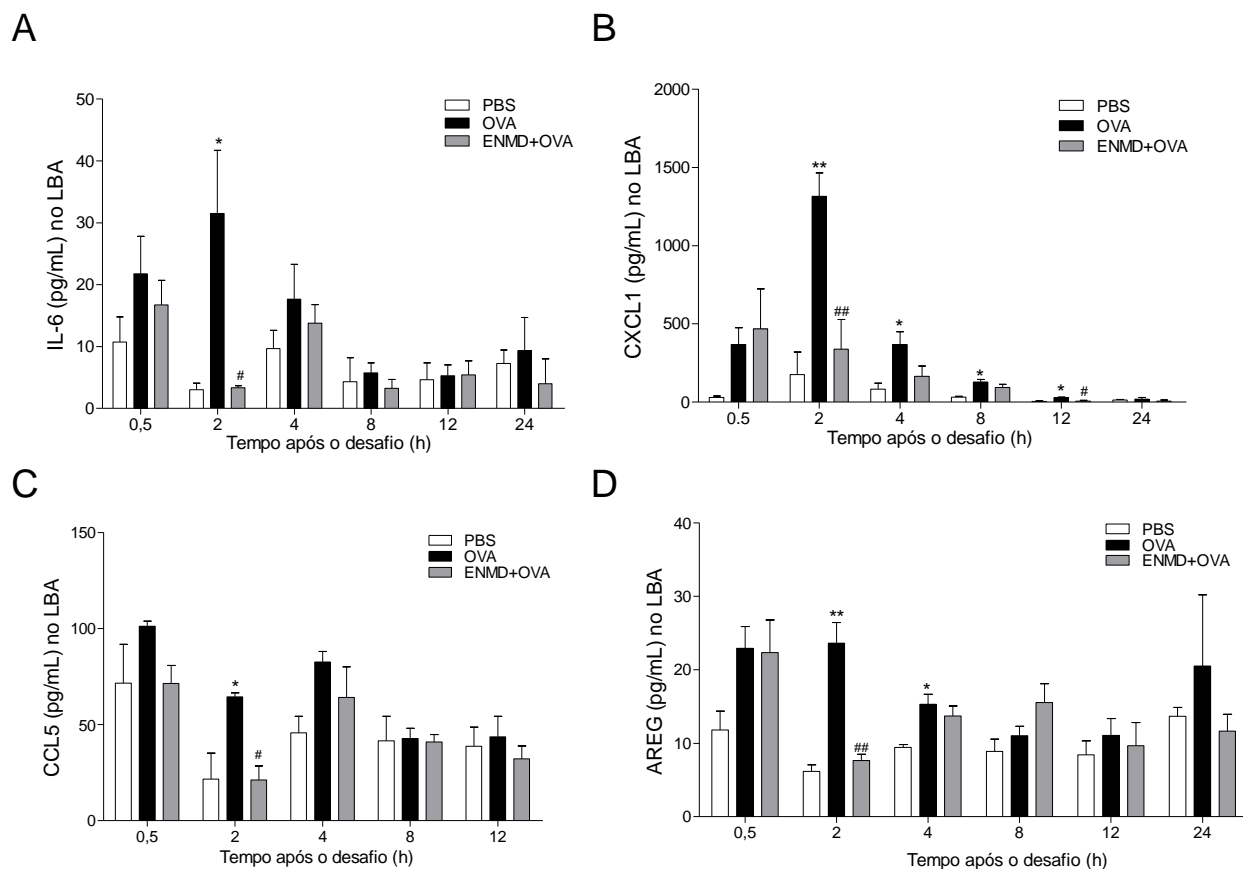
O sobrenadante, destas amostras, foi armazenado para posterior quantificação de citocinas por ELISA. Principalmente no tempo de 2 horas quando há um pico de neutrófilos conforme descrito na figura 9, a administração i.n. de OVA induziu aumento dos níveis da citocina inflamatória IL-6 (**Figura 11 A**), das quimiocinas CXCL1 (do inglês *chemokine [C-X-C motif] ligand 1*, KC) (**Figura 11 B**) e CCL5 (**Figura 11 C**), e do fator de crescimento AREG (anfiregulina) (**Figura 11 D**) quando comparados com seus respectivos controles. Neste mesmo tempo de 2h o pré-tratamento com o antagonista de PAR-2 ENMD1068 reduziu significativamente os níveis de IL-6, CXCL1, CCL5 e AREG. Já no tempo de 4 horas houve um aumento dos níveis de IL-10 no LBA dos camundongos imunizados e desafiados com OVA que foram pré-tratados com o antagonista de PAR-2 (**Figura 12**).



**Figura 9. Efeito induzido pelo ENMD1068 sobre o recrutamento de neutrófilos para o LBA induzido por OVA em função do tempo.** Os animais foram imunizados por via i.p. com  $\text{Al}(\text{OH})_3$  + OVA (0,5 mg/mL, OVA) no dia 1 e então desafiados do dia 8-10 com OVA (100  $\mu\text{g}/\text{animal}$ , via i.n.) ou PBS (20  $\mu\text{L}$ , i.n.) em animais pré-tratados ou não com ENMD1068 (0,5 mg/Kg) 1 h antes do desafio. O número de neutrófilos presentes no LBA dos animais foi avaliado 30 min a 12 h após o desafio. Os símbolos representam média  $\pm$  e.p.m. de 4 a 5 animais por grupo. \* $p < 0,01$ , \*\* $p < 0,001$  em relação ao grupo controle (PBS), # $p < 0,001$  em relação ao grupo desafiado com OVA.

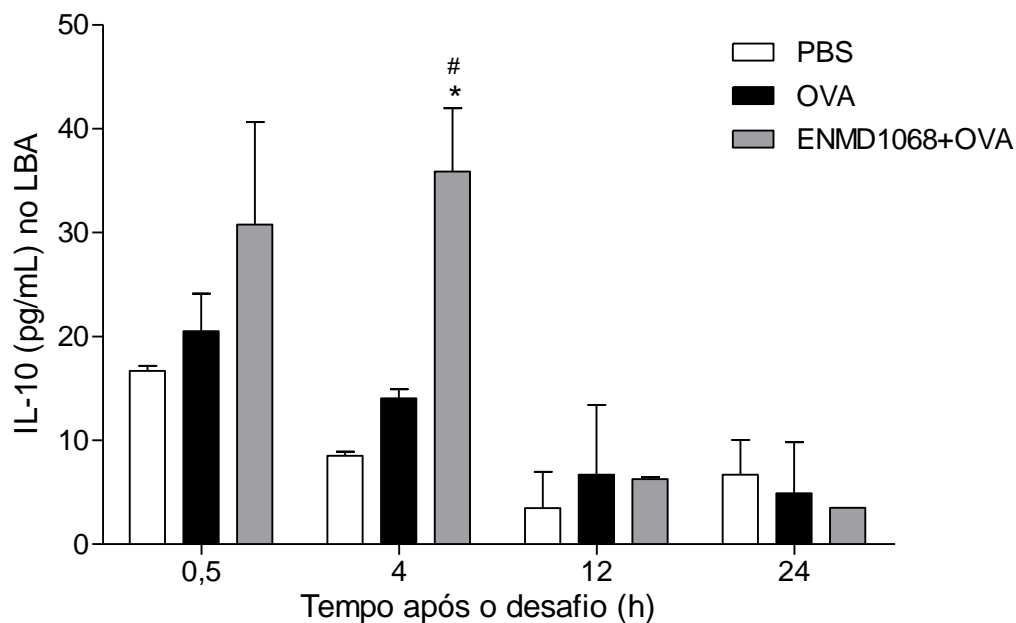


**Figura 10. Efeito induzido pelo ENMD1068 sobre o recrutamento de eosinófilos para o LBA induzido por OVA em função do tempo.** Os animais foram imunizados por via i.p. com Al (OH)<sub>3</sub> + OVA (0,5 mg/mL, OVA) no dia 1 e então desafiados do dia 9-11 com OVA (100 µg/animal, via i.n.) ou PBS (20 µl, i.n.) em animais pré-tratados ou não com ENMD1068 (0,5 mg/Kg) 1 h antes do desafio. O número de eosinófilos presentes no LBA dos animais foi avaliado 12 a 24 h após o último desafio. As barras representam média ± e.p.m. de 5 animais por grupo no tempo de 12h, e 3-4 animais no tempo de 24 h. \*p<0,001 em relação ao grupo controle, #p<0,001 em relação ao grupo desafiado com OVA.



**Figura 11. Efeito do pré-tratamento com ENMD1068 na produção das citocinas no LBA.** Os níveis de citocinas foram mensurados por ELISA. Os animais foram imunizados por via i.p. com  $Al(OH)_3$  + OVA (0,5 mg/ml, OVA) no dia 1 e então desafiados do dia 9-11 com OVA (100  $\mu$ g/animal, via i.n.) ou PBS (20  $\mu$ l, i.n.) em animais pré-tratados ou não com ENMD1068 (0,5 mg/Kg) 1 hora antes do desafio. Para a dosagem de citocinas foi coletado o sobrenadante do LBA de 30 min a 24 horas após o desafio. (A) IL-6; (B) CXCL1; (C) CCL5; (D) Areg. As barras representam média  $\pm$  e.p.m. de 4 a 5 animais por grupo. \* $p < 0,01$  \*\* $p < 0,001$  em relação ao grupo controle, # $p < 0,05$  ## $p < 0,01$  em relação ao grupo desafiado com OVA.

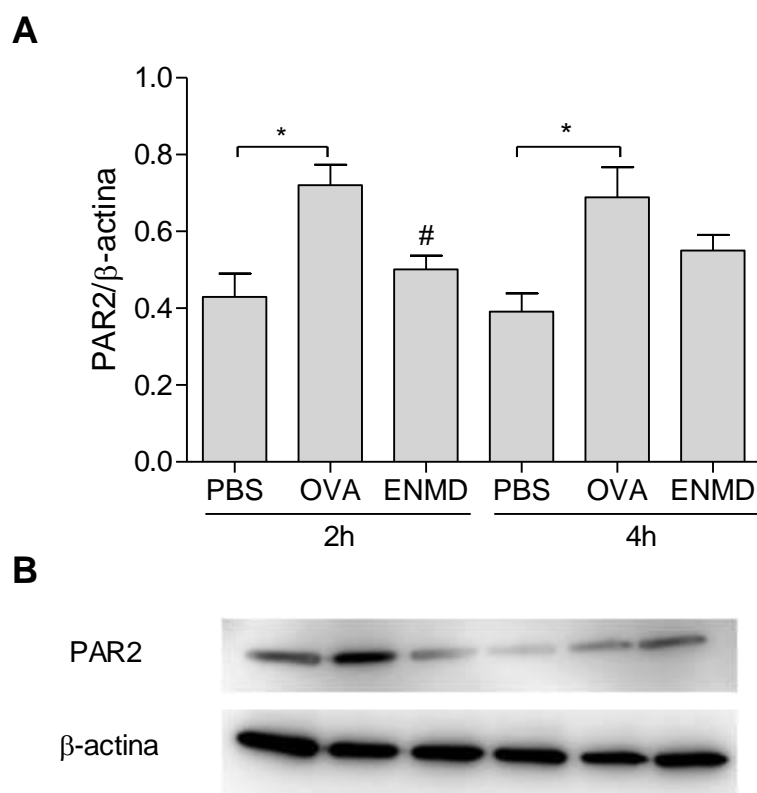




**Figura 12. Efeito do pré-tratamento com ENMD1068 na produção de IL-10 no LBA.** Os níveis de citocinas foram mensurados por ELISA. Os animais foram imunizados por via i.p. com  $\text{Al}(\text{OH})_3$  + OVA (0,5 mg/mL, OVA) no dia 1 e então desafiados do dia 9-11 com OVA (100  $\mu\text{g}/\text{animal}$ , via i.n.) ou PBS (20  $\mu\text{L}$ , i.n.) em animais pré-tratados ou não com ENMD1068 (0,5 mg/Kg) 1 h antes do desafio. Para a dosagem de citocinas foi coletado o sobrenadante do LBA de 30 min a 24 h após o último desafio. As barras representam média  $\pm$  e.p.m. de 4 a 5 animais por grupo. \* $p < 0,01$  em relação ao grupo controle, # $p < 0,05$  em relação ao grupo desafiado com OVA.

### ***5.1.2 Avaliação da participação do PAR-2 na inflamação pulmonar alérgica induzida pela OVA sobre a expressão proteica de PAR-2 e a permeabilidade vascular***

Uma vez que a ativação de PAR-2 parece ser determinante para o desenvolvimento de uma resposta inflamatória envolvendo o recrutamento de neutrófilos nas primeiras horas após o desafio com OVA, com presença de mediadores pró-inflamatórios, decidiu-se avaliar a expressão proteica do receptor em leucócitos obtidos do LBA de camundongos imunizados pré-tratados com PBS ou ENMD1068, 2 e 4 h após o último desafio com OVA. A expressão proteica de PAR-2 foi significativamente aumentada 2 e 4 h após o desafio antigênico, em relação ao grupo imunizado e desafiado com PBS. Por outro lado, o pré-tratamento com ENMD1068 reduziu significativamente a expressão deste receptor 2 h após o desafio intranasal (**Figura 13**).

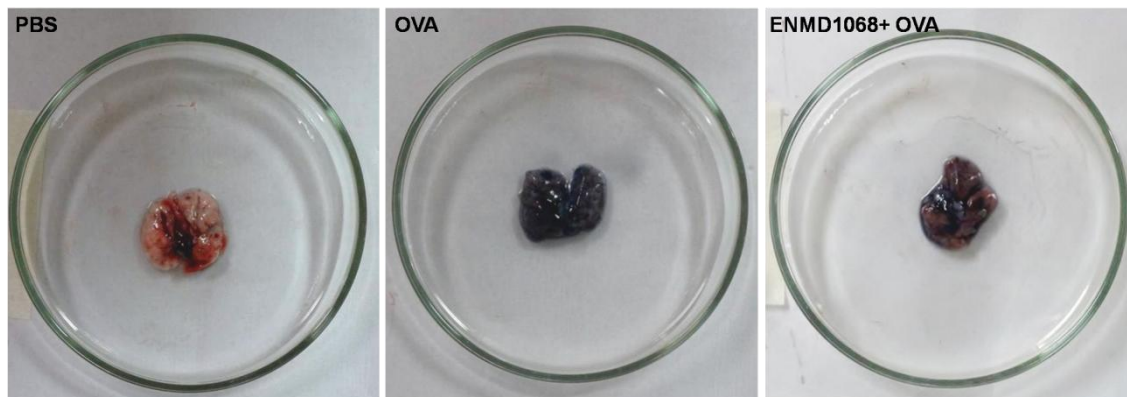
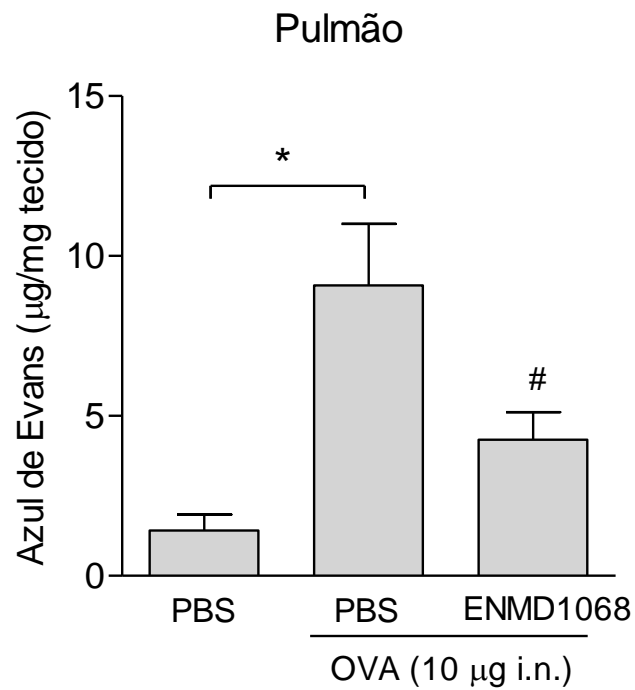


**Figura 13. Efeito induzido pelo ENMD1068 sobre a expressão de PAR-2 após administração intranasal de OVA.** (A) Os camundongos imunizados foram desafiados apenas com OVA (10  $\mu$ g) por via i.n. ou pré-tratados 1 h antes da OVA com ENMD1068 (0,5 mg/kg) por via i.p. O LBA foi coletado 2 e 4 horas após o desafio com OVA. Este gel é representativo de quatro experimentos com resultados similares. (B) Os resultados foram normalizados pela  $\beta$ -actina contida em cada amostra. \* $p < 0,05$  \*\* $p < 0,01$

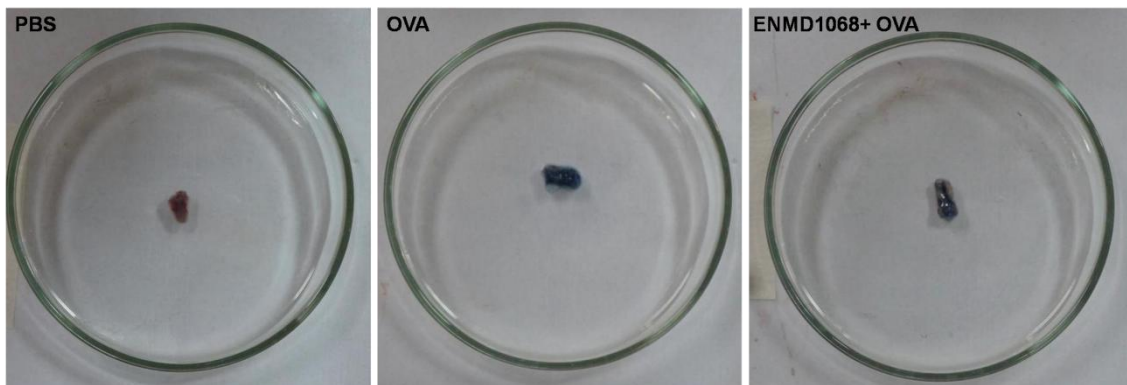
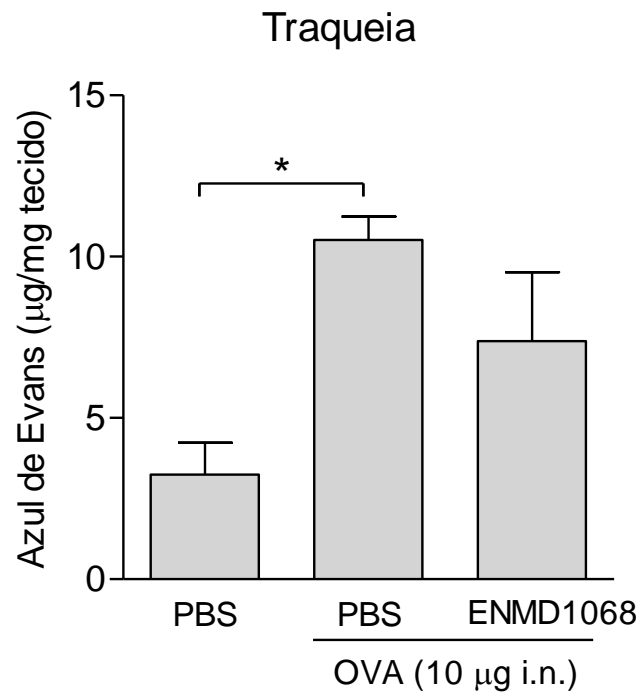
A inflamação pulmonar alérgica também é caracterizada pela alteração da permeabilidade vascular e uma das formas indiretas de avaliar este parâmetro é através da quantificação do extravasamento do corante de azul de Evans da circulação sanguínea para os tecidos. Dessa forma, 1 h após o desafio com OVA ou PBS, o azul de Evans (2%) foi injetado nos camundongos anestesiados por via i.v., decorrido 1 hora após esse procedimento os pulmões e traqueias foram removidos, correspondendo 2 horas após o último desafio i.n. com OVA (10µg). O azul de Evans foi extraído dos tecidos em formamida e o extrato obtido lido através de espectrofotometria.

Através da determinação espectrofotométrica da quantidade de azul de Evans presente das amostras, verificou-se um aumento significativo da concentração do corante nos pulmões e traqueias dos animais desafiados com OVA em relação ao grupo PBS (**Figura 14 e 15**) constatando aumento da permeabilidade vascular no grupo alérgico.

Nossos resultados também demonstram diminuição da permeabilidade vascular com redução dos níveis de azul de Evans quando há bloqueio da ação de proteases endógenas em PAR-2, uma vez que os camundongos que foram pré-tratados com ENMD1068 apresentaram uma concentração significativamente inferior do corante no parênquima pulmonar, quando comparados ao grupo que recebeu apenas o antígeno (**Figura 14**).



**Figura 14.** Efeito do tratamento intraperitoneal com ENMD1068 no extravasamento plasmático do corante azul de Evans nos pulmões de camundongos 2 h após o desafio com OVA. As barras representam média  $\pm$  e.p.m. PBS n=2; OVA n=3 e ENMD n=5. \* $p < 0,05$  em relação ao grupo controle (PBS), # $p < 0,05$  em relação ao grupo desafiado com OVA.

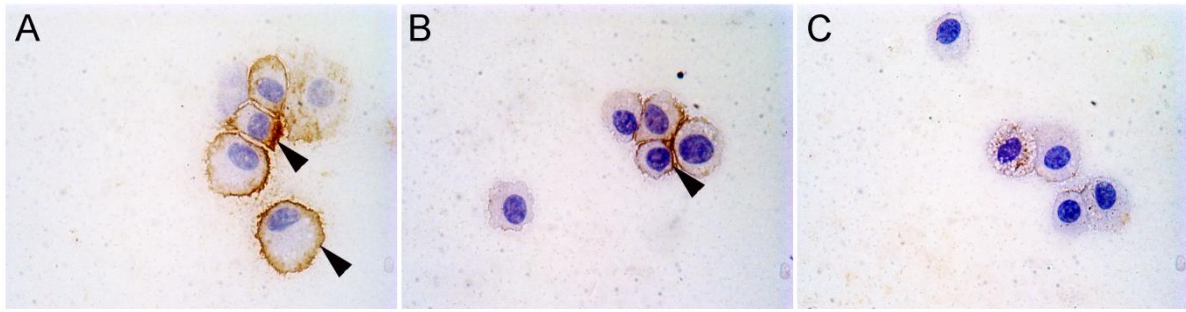


**Figura 15. Efeito do tratamento intraperitoneal com ENMD1068 no extravasamento plasmático do corante azul de Evans nas traqueias de camundongos 2 h após o desafio com OVA. As barras representam média  $\pm$  e.p.m. PBS n=4; OVA n=3 e ENMD n=3. \* $p < 0,05$  em relação ao grupo controle (PBS).**

### ***5.1.3 Importância da ativação de PAR-2 para o recrutamento de leucócitos, produção de citocinas e polarização fenotípica de macrófagos 48 h após o desafio com OVA em modelo de inflamação pulmonar alérgica***

O mecanismo pelo qual a ativação de PAR-2 induz a infiltração de eosinófilos na inflamação alérgica das vias aéreas não está bem esclarecido. No entanto, os macrófagos são grandes candidatos a contribuir para este fenômeno, uma vez que são células abundantemente encontradas na luz brônquica, expressam PAR-2 e liberam uma grande variedade de mediadores inflamatórios em resposta ao antígeno. Nessa perspectiva, experimentos foram realizados a fim de demonstrar a expressão de PAR-2 em leucócitos obtidos do LBA de camundongos desafiados com OVA, pré-tratados com antagonista de PAR-2 ou PBS. O LBA foi coletado 48 h após a administração i.n. do desafio antigênico, que representa o pico de recrutamento de eosinófilos para o LBA.

A presença e localização do PAR-2 nos leucócitos foi avaliada por imunocitoquímica utilizando anticorpo anti-PAR-2. Houve marcação de PAR-2 na membrana e no citoplasma de macrófagos alveolares de camundongos desafiados com OVA (**Figura 16, A**), como também no citoplasma dos macrófagos obtidos dos animais pré-tratados com o antagonista (**Figura 16, B**).



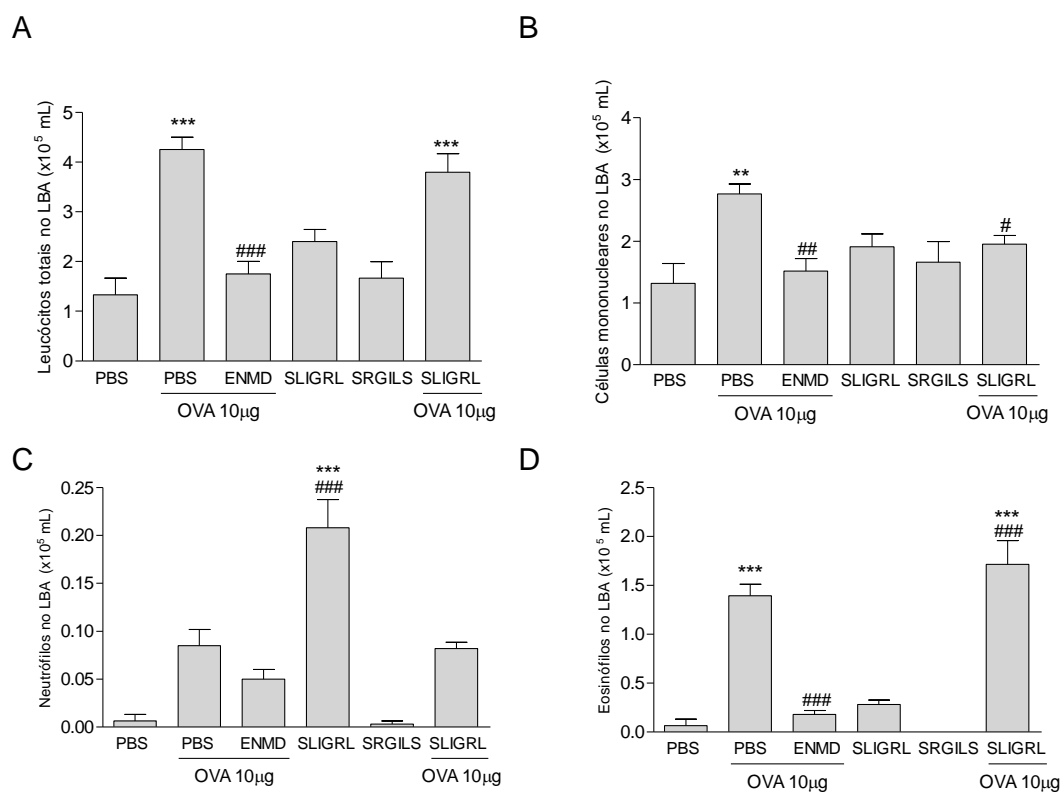
**Figura 16. Imuno-localização de PAR-2 em macrófagos alveolares após desafio com OVA.** Os camundongos imunizados foram desafiados com OVA (10  $\mu$ g) por via intranasal (**A**) ou pré-tratados 1 h antes com ENMD1068 (0,5 mg/kg) por via intraperitoneal (**B**), e as células foram coletadas 48 h após o desafio. PAR-2 foi localizado em macrófagos (setas pretas). O controle negativo foi obtido por meio da omissão do anticorpo primário (**C**). A figura é representativa de três experimentos com resultados similares.



A partir desses resultados, o próximo passo foi avaliar se a presença do peptídeo ativador de PAR-2 (SLIGRL-NH<sub>2</sub>) seria capaz de potencializar a migração de leucócitos induzida pela OVA, na tentativa de reproduzir fenômenos biológicos pelos quais a ativação de PAR-2 ocorre por diferentes estímulos, assim como o papel potencial da ativação de PAR-2 pelo peptídeo em mediar mecanismos de liberação de citocinas.

Utilizando o mesmo protocolo de imunização, demonstramos que a instilação de OVA aumentou significativamente o número total de leucócitos, basicamente células mononucleares e eosinófilos 48 h após sua última administração. Esta migração foi dependente da ativação PAR-2, uma vez que o antagonismo do receptor pelo ENMD1068 reduziu o recrutamento destes tipos celulares (**Figura 17 A, B e D**).

Nossos resultados sugerem um papel importante da ativação de PAR-2 na manutenção e progressão do processo inflamatório. O tratamento com agonista seletivo SLIGRL-NH<sub>2</sub> por via intranasal induziu recrutamento de neutrófilos 48 h após o último tratamento, que é um tempo considerado tardio para chegada destes leucócitos, sugerindo um papel importante da ativação de PAR-2 na manutenção e progressão do processo inflamatório quando há ativação direta do receptor (**Figura 17 C**). O peptídeo ativador quando administrado concomitante com a OVA por via intranasal aumentou em 41% o recrutamento de eosinófilos quando comparado aos camundongos que foram desafiados apenas com OVA (**Figura 17 D**).

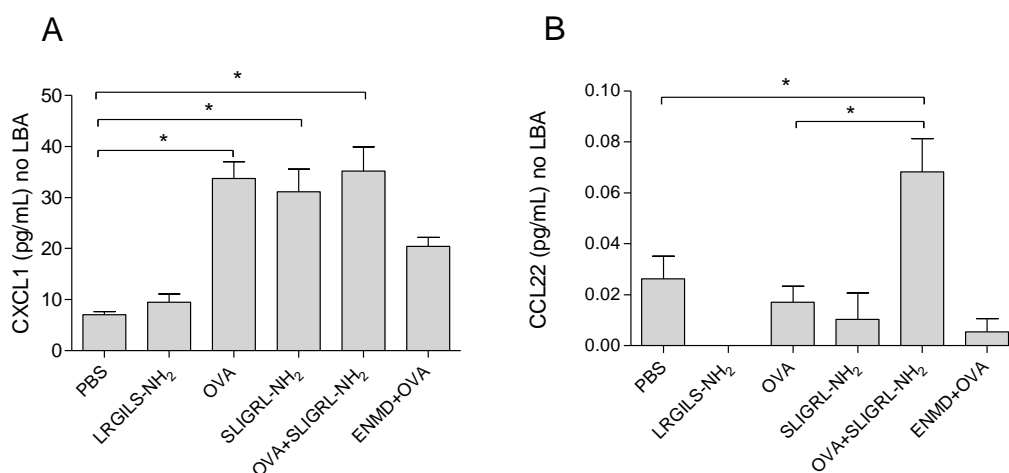


**Figura 17. Efeito do peptídeo ativador de PAR-2 no recrutamento de leucócitos para o espaço broncoalveolar de camundongos Balb/c em modelo de inflamação pulmonar alérgica.** Os animais imunizados foram desafiados por via i.n. com OVA (10  $\mu$ g) e/ou SLIGRL-NH<sub>2</sub> (30  $\mu$ g), peptídeo controle LRGILS-NH<sub>2</sub> (30  $\mu$ g) ou PBS (0,1 mL/cavidade), um grupo de camundongos foi pré-tratado com ENMD1068 (0,5 mg/kg) 1h antes da OVA. O número de leucócitos totais (**A**), células mononucleares (**B**), neutrófilos (**C**) e eosinófilos (**D**) foi avaliado 48 h após o último desafio com a OVA. As barras representam média  $\pm$  e.p.m. de 3 a 5 animais por grupo. \* $p < 0,01$  \*\* $p < 0,001$  em relação ao grupo controle tratado com PBS; # $p < 0,05$  ## $p < 0,01$  ### $p < 0,001$  em relação ao grupo controle desafiado com OVA.

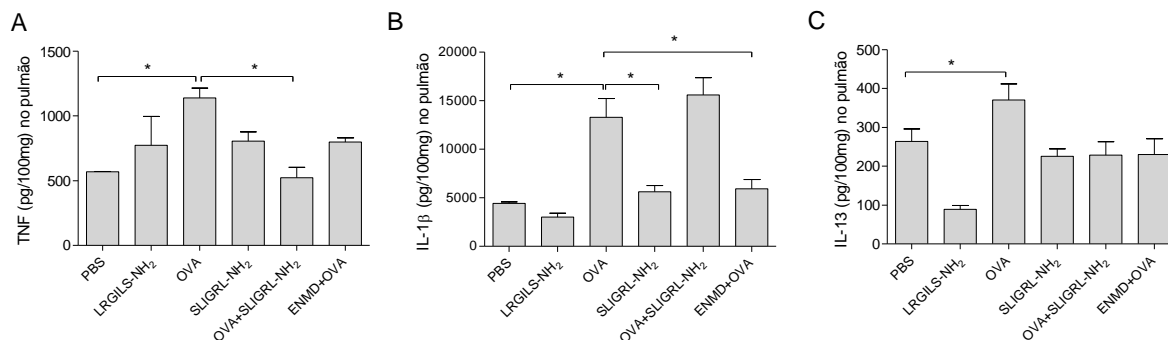
Os níveis de citocinas obtidas dos homogenatos de pulmões, dos leucócitos obtidos do LBA e dos sobrenadantes das culturas de linfonodos, estão apresentados nas **Figuras 18, 19 e 20**. Verificamos que, 48 h após o último desafio com OVA, a presença do antígeno foi capaz de aumentar os níveis de das citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$  e IL1- $\beta$  nos pulmões (**Figura 19 A, B**) e da quimiocina CXCL1 no LBA dos camundongos (**Figura 18 A**) que são citocinas quimiotáticas e importantes para o recrutamento de neutrófilos e monócitos. A administração intranasal de OVA nos animais imunizados também promoveu aumento de IL-13 no tecido pulmonar (**Figura 19 C**) quando comparado ao grupo controle (PBS), uma citocina pró-inflamatória secretada pelos linfócitos Th2 e característica de respostas do tipo alérgicas.

De maneira interessante, o tratamento com agonista de PAR-2 SLIGRL-NH<sub>2</sub> nos camundongos imunizados e desafiados com OVA promoveu aumento das citocinas IL-4, IL-13 nos linfonodos (**Figura 20 A e B**) e da quimiocina CCL22 no LBA (**Figura 18 B**) que correspondem a uma resposta de caráter alérgico. Enquanto que o pré-tratamento com o antagonista ENMD1068 inibiu 55% da produção de IL-1 $\beta$  no LBA estimulada pela OVA (**Figura 19 B**). Para as demais citocinas não houve diferença estatística entre o grupo tratado com ENMD1068 comparado ao PBS.

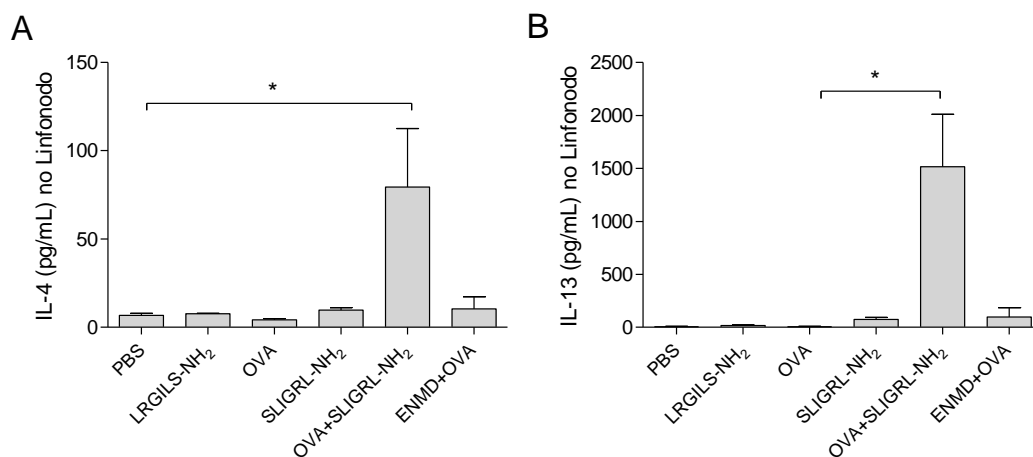
Cabe ressaltar que o peptídeo controle LRGILS-NH<sub>2</sub> comportou-se de maneira semelhante ao PBS para todas citocinas e quimiocinas analisadas, comprovando a necessidade de uma sequência específica de aminoácidos para que haja ativação e resposta desencadeada pela ativação do PAR-2.



**Figura 18. Produção de quimiocinas no lavado broncoalveolar.** A concentração de citocinas foi mensurada por ELISA. Os animais foram imunizados por via i.p. com Al(OH)<sub>3</sub> + OVA (0,5 mg/mL, OVA) no dia 1 e então desafiados do dia 9-11 com OVA (100 µg/animal, via i.n.) e/ou SLIGRL-NH<sub>2</sub> (30 µg), peptídeo controle LRGILS-NH<sub>2</sub> (30 µg) ou PBS (20 µL, i.n.) em animais pré-tratados com ENMD1068 (0.5 mg/Kg) ou PBS, 1 h antes do desafio com OVA. Para a quantificação das quimiocinas CXCL1 (**A**) e CCL22 (**B**), foi coletado o sobrenadante do LBA 48 h após o último desafio com OVA. As barras representam média ± e.p.m. de 4 a 5 animais por grupo. \* p<0,001 em relação ao grupo indicado pelo colchete.



**Figura 19. Produção de citocinas no pulmão.** A concentração de citocinas foi mensurada por ELISA. Os animais foram imunizados por via i.p. com Al (OH)<sub>3</sub> + OVA (0,5 mg/mL, OVA) no dia 1 e então desafiados do dia 9-11 com OVA (100 µg/animal, via i.n.) e/ou SLIGRL-NH<sub>2</sub> (30 µg), peptídeo controle LRGILS-NH<sub>2</sub> (30 µg) ou PBS (20 µL, i.n.) em animais pré-tratados com ENMD1068 (0.5 mg/Kg) ou PBS, 1 h antes do desafio com OVA. Para a quantificação das citocinas TNF-α (**A**), IL-1β (**B**), IL-13 (**C**), foi coletado o tecido pulmonar 48 h após o último desafio com OVA. As barras representam média ± e.p.m. de 4 a 5 animais por grupo. \* p<0,001 em relação ao grupo indicado pelo colchete.

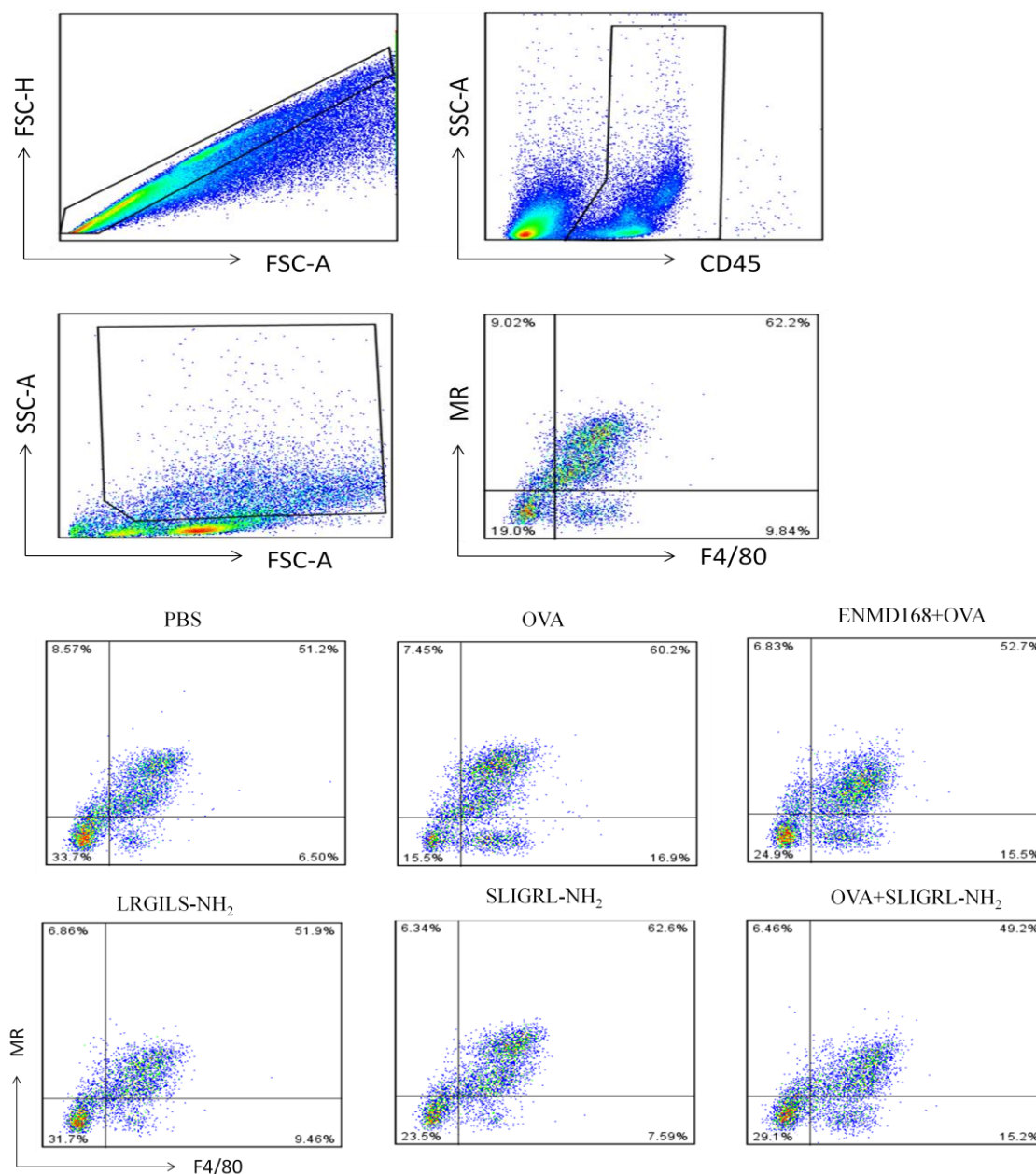


**Figura 20. Produção de citocinas nos linfonodos.** A concentração de citocinas foi mensurada por ELISA. Os animais foram imunizados por via i.p. com  $\text{Al}(\text{OH})_3$  + OVA (0,5 mg/ml, OVA) no dia 1 e então desafiados do dia 9-11 com OVA (100  $\mu\text{g}/\text{animal}$ , via i.n.) e/ou SLIGRL-NH<sub>2</sub> (30  $\mu\text{g}$ ), peptídeo controle LRGILS-NH<sub>2</sub> (30  $\mu\text{g}$ ) ou PBS (20  $\mu\text{l}$ , i.n.) em animais pré-tratados com ENMD1068 (0.5 mg/Kg) ou PBS, 1 h antes do desafio com OVA. Para a quantificação das citocinas IL-4 (**A**), IL-13 (**B**), foi coletado os linfonodos 48 h após o último desafio com OVA. As barras representam média  $\pm$  e.p.m. de 4 a 5 animais por grupo. \*  $p < 0,001$  em relação ao grupo indicado pelo colchete.

Em seguida, avaliamos a população de macrófagos no pulmão e no LBA de camundongos Balb/c 48 h após o desafio com OVA através de citometria de fluxo. As **Figuras 21** e **23** ilustram a análise representativa para avaliar a suspensão de células do pulmão após digestão e do LBA dos camundongos. Após exclusão de *doublets* e seleção por parâmetros de tamanho e granulosidade, os macrófagos foram analisados por meio da marcação positiva para F4/80 e para receptor de manose (MR, CD206) que quando positivo corresponde ao fenótipo de macrófagos M2.

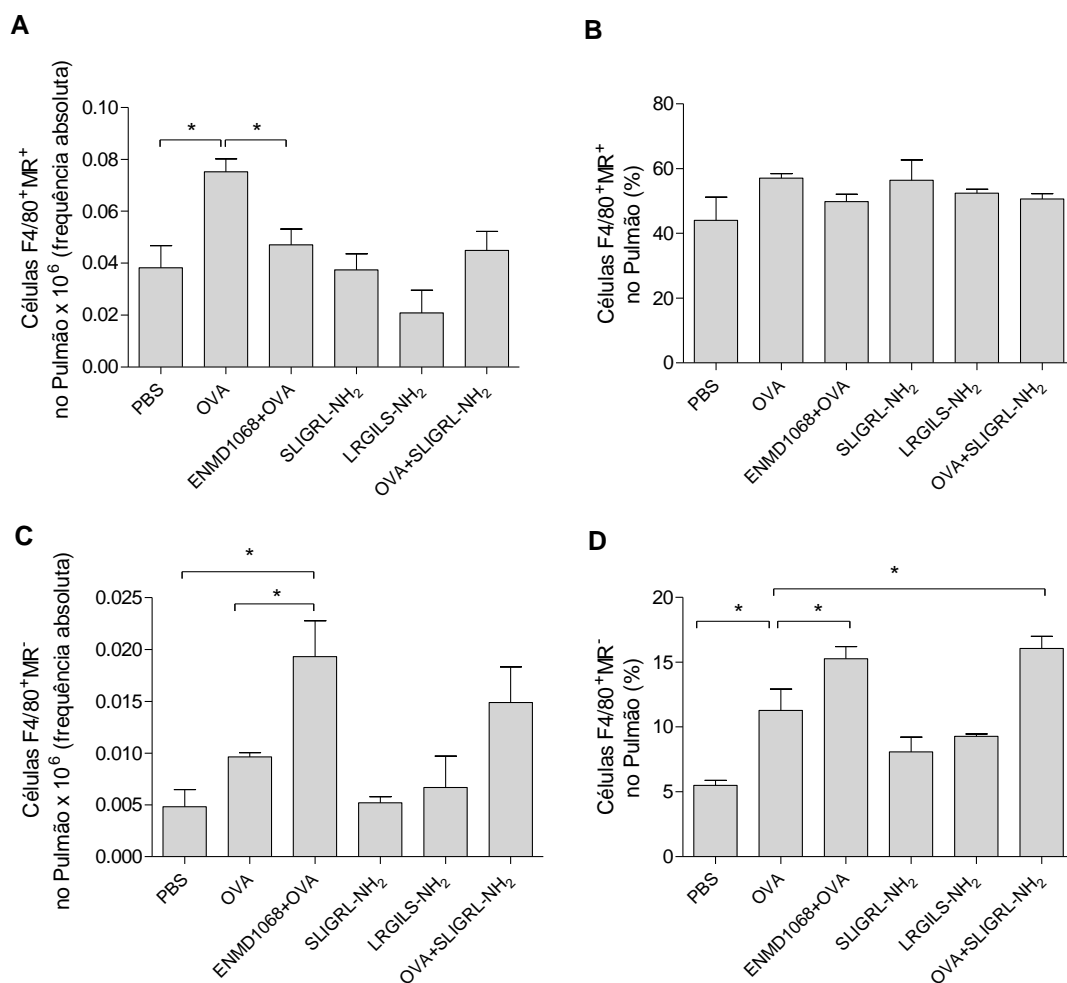
A ativação dos macrófagos do tipo M2 acontece principalmente na resposta de perfil Th2 que ocorre em respostas alérgicas. Estes macrófagos juntamente com linfócitos Th2, mastócitos, eosinófilos, basófilos e células dendríticas irão desempenhar um papel importante na manutenção e magnitude da resposta. Em nossos experimentos demonstramos que os animais desafiados com OVA apresentaram aumento do fenótipo de macrófagos M2 (F4/80+/MR+) pulmonares, que parece ser dependente da ativação de PAR-2 uma vez que o bloqueio do receptor inibiu este aumento em 37% (**Figura 22 A**). De forma contrária, o pré-tratamento com antagonista de PAR-2 ENMD1068 induziu um aumento de 101% da população de macrófagos F4/80+/MR- quando comparado ao grupo de animais desafiados com OVA e pré-tratados com PBS (**Figura 22 C**).

Já os macrófagos obtidos do LBA exibiram um perfil semelhante quanto aos fenótipos F4/80<sup>+</sup>MR<sup>+</sup> e F4/80<sup>+</sup>MR<sup>-</sup> mesmo na presença do antígeno, como também ocorreu aumento de ambas as populações na presença conjunta do peptídeo ativador de PAR-2 SLIGRL-NH<sub>2</sub> e OVA (**Figura 24 A e C**).

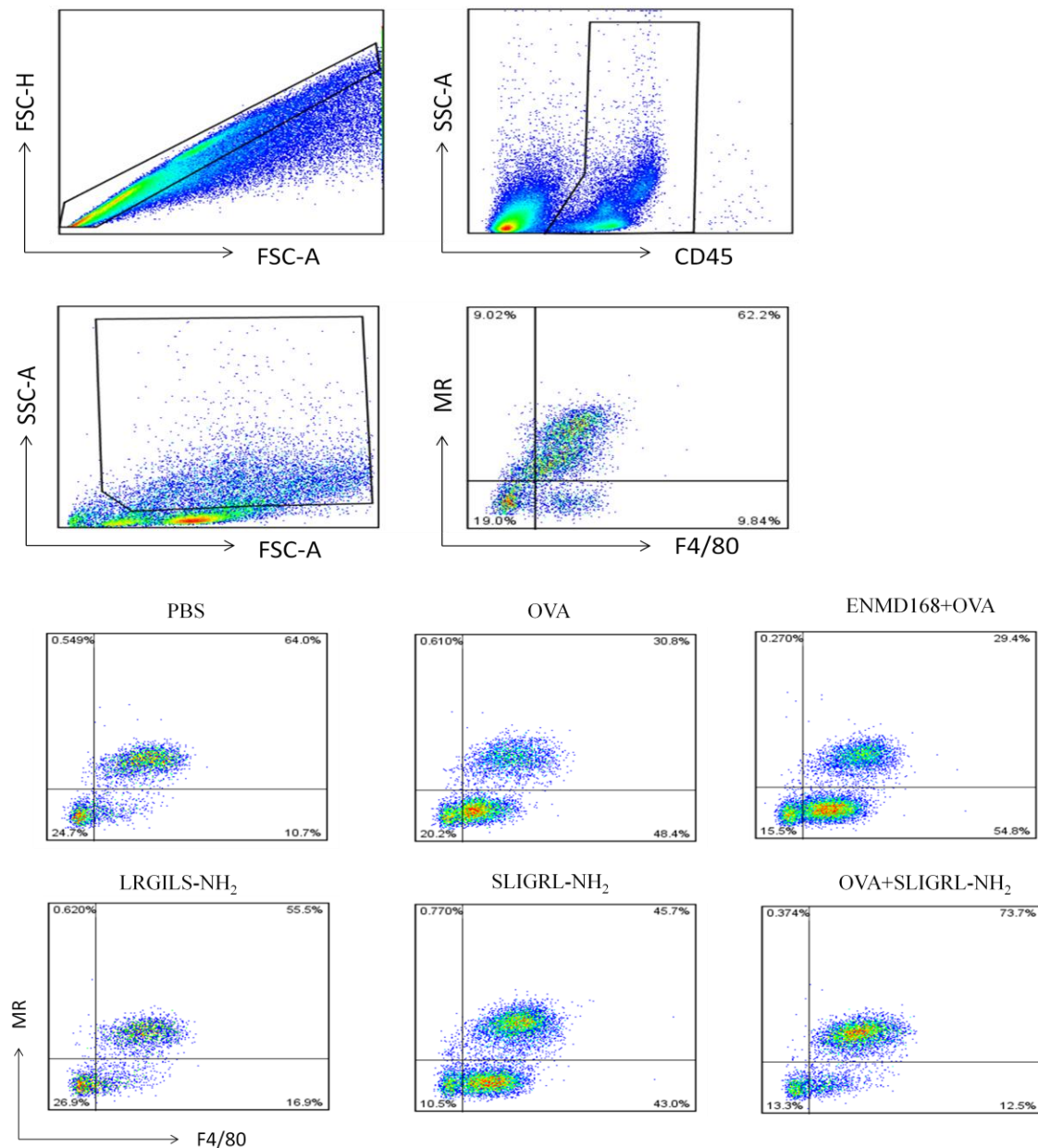


**Figura 21. Identificação de tipos celulares no pulmão por citometria de fluxo.** Os macrófagos M2 foram identificados com base na expressão diferencial de F4/80 e do receptor de manose tipo 1 (MR) (quadrantes superiores direito). Os pulmões dos camundongos foram removidos 48 h após o último desafio com OVA (10 µg), o tecido foi digerido e as células liberadas foram coradas com anticorpos específicos para células com marcação fluorescente, n = 4-5.

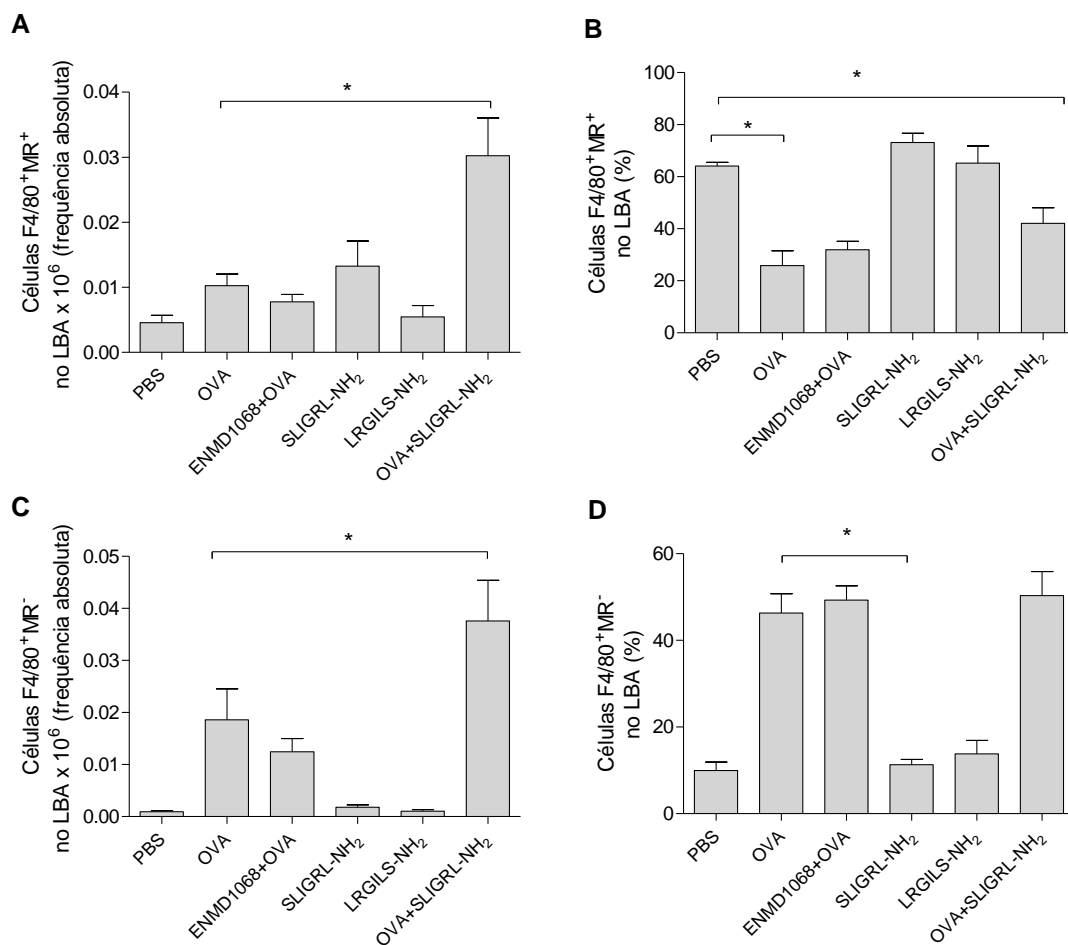




**Figura 22. Efeito do PAR-2 na população de macrófagos pulmonares com fenótipo M2.** Os macrófagos M2 F4/80<sup>+</sup>/MR<sup>+</sup> (A e B); e F4/80<sup>+</sup>/MR<sup>-</sup> (C e D) que representam outros subtipos de macrófagos foram enumerados. A, C: corresponde a frequência absoluta com os valores corrigidos quanto ao número total de leucócitos. B, D: corresponde a frequência relativa (%). \*  $p < 0,001$ ,  $n = 4-5$  camundongos / grupo.



**Figura 23. Identificação de tipos celulares no LBA por citometria de fluxo.** Os macrófagos M2 foram identificados com base na expressão diferencial de F4/80 e do receptor de manose tipo 1 (MR) (quadrantes superiores direito). O LBA de camundongos foram coletados 48 h após o último desafio com OVA (10 µg), as células liberadas foram coradas com anticorpos específicos para células com marcação fluorescente, n = 4-5.



**Figura 24. Efeito do PAR-2 na quantidade de macrófagos alveolares com fenótipo M2.** Os macrófagos M2 F4/80<sup>+</sup>/MR<sup>+</sup> (A e B); e F4/80<sup>+</sup>/MR<sup>-</sup> (C e D) que representam outros subtipos de macrófagos foram enumerados. A,C: corresponde a frequência absoluta com os valores corrigidos quanto ao número total de leucócitos. B, D: corresponde a frequência relativa (%). \* p<0,001, n = 4-5 camundongos / grupo.

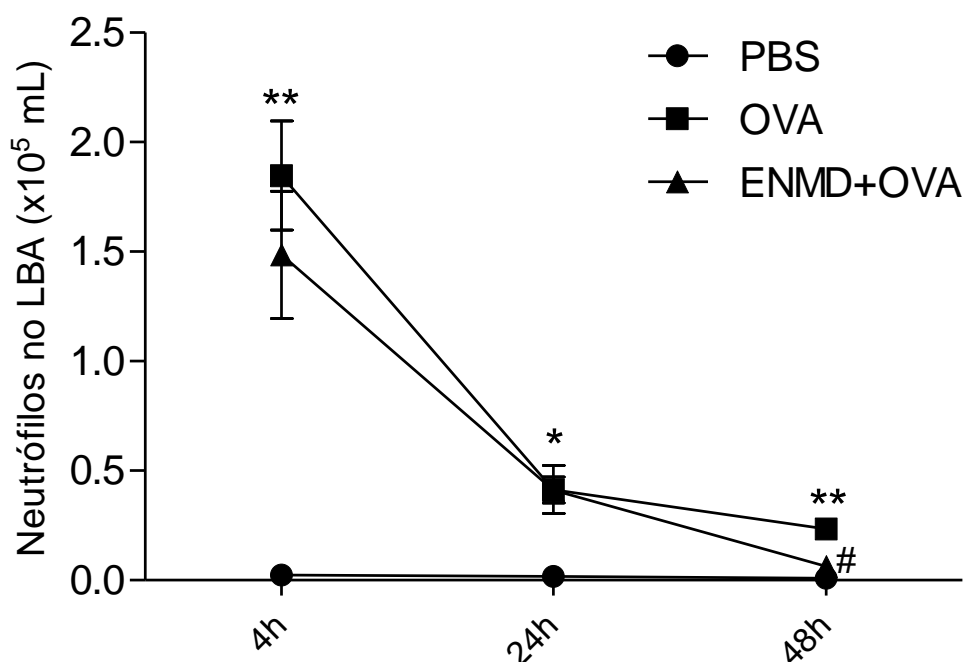
## **5.2 Participação do PAR-2 no modelo experimental de asma induzido por seis exposições à ovalbumina**

### ***5.2.1 Avaliação da participação do PAR-2 sobre o recrutamento de leucócitos em função do tempo na inflamação pulmonar alérgica***

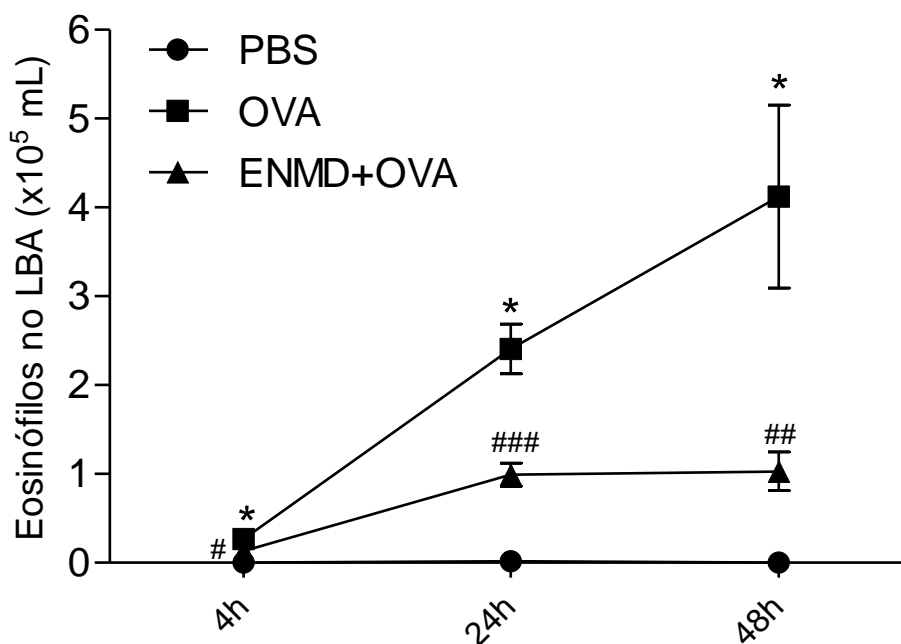
O modelo agudo de resposta inflamatória pulmonar alérgica reproduz alguns aspectos característicos da asma em humanos, porém, para avaliar alterações teciduais e a mecânica pulmonar, se torna necessário aumentar a intensidade da resposta inflamatória. Neste contexto, desenvolvemos um modelo de inflamação com maior exposição destes camundongos com o antígeno, aumentando o número de desafios com a OVA

Para isto, os camundongos foram imunizados no dia 0 e desafiados por via i.n com OVA (10 µg) ou PBS nos dias 9, 10 e 11, e continuaram recebendo o antígeno ou PBS nos dias 13, 15 e 17. Para avaliar a participação do PAR-2, de forma semelhante ao protocolo agudo, 1 h antes de cada desafio i.n. com OVA, os camundongos foram pré-tratados com ENMD1068 i.p. (0,5 mg/kg). O LBA foi coletado 4, 24 e 48 h após o último desafio.

O desafio com OVA induziu recrutamento de neutrófilos e eosinófilos nos três tempos analisados com pico de migração de 4 e 48 h após o desafio, respectivamente. O tratamento com ENMD1068 reduziu significativamente o número de neutrófilos no LBA induzido pela OVA apenas no tempo de 48 h (**Figura 25**), já em relação ao número de eosinófilos o antagonista teve efeito de redução significativa destes leucócitos nos tempos de 4, 24 e 48 h após o último desafio com OVA (**Figura 26**).



**Figura 25. Efeito induzido pré-tratamento com ENMD1068 sobre o recrutamento de neutrófilos para o LBA induzido por OVA em função do tempo.** Os animais foram imunizados por via i.p. com Al(OH)<sub>3</sub> + OVA (0,5 mg/mL, OVA) no dia 1 e então desafiados nos dias 9, 10, 11, 13, 15 e 17 com OVA (10 µg/animal, via i.n.) ou PBS (20 µL, i.n.) em animais pré-tratados com ENMD1068 (0,5 mg/Kg) ou PBS 1 h antes do desafio. O número de neutrófilos presentes no LBA dos animais foi avaliado 4, 24 e 48 h após o último desafio com OVA. As barras representam média ± e.p.m. de animais por grupo, 4h n=7-8, 24h n=5, 48h n=5-6. \*p<0,05 \*\*p<0,01 \*\*\*p<0,001 em relação ao grupo controle, #p<0,001 em relação ao grupo desafiado com OVA.

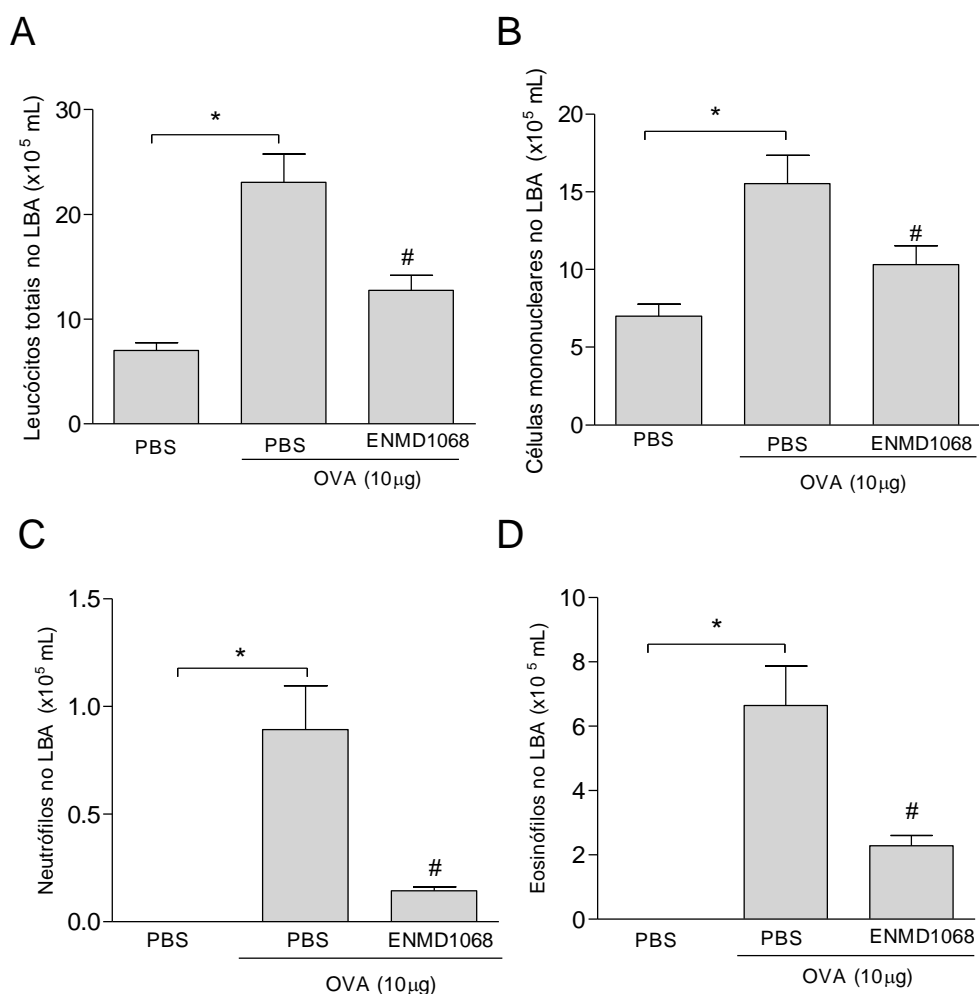


**Figura 26. Efeito induzido pelo pré-tratamento com ENMD1068 sobre o recrutamento de eosinófilos para o LBA induzido por OVA em função do tempo.** Os animais foram imunizados por via i.p. com Al(OH)<sub>3</sub> + OVA (0,5 mg/mL, OVA) no dia 1 e então desafiados nos dias 9, 10, 11, 13, 15 e 17 com OVA (10 µg/animal, via i.n.) ou PBS (20 µL, i.n.) em animais pré-tratados com ENMD1068 (0,5 mg/Kg) ou PBS 1 h antes do desafio. O número de eosinófilos presentes no LBA dos animais foi avaliado 4, 24 e 48 h após o último desafio com a OVA. As barras representam média ± e.p.m. de animais por grupo, 4h n=7-8, 24h n=5, 48h n=5-6. \*p<0,001 em relação ao grupo controle, #p<0,05, ##p<0,01 e ###p<0,001 em relação ao grupo desafiado com OVA.

### **5.2.2 Efeito do tratamento com antagonista de PAR-2 sobre o recrutamento de leucócitos no LBA e avaliação das atividades enzimáticas EPO e MPO no pulmão 48 h após o desafio com OVA**

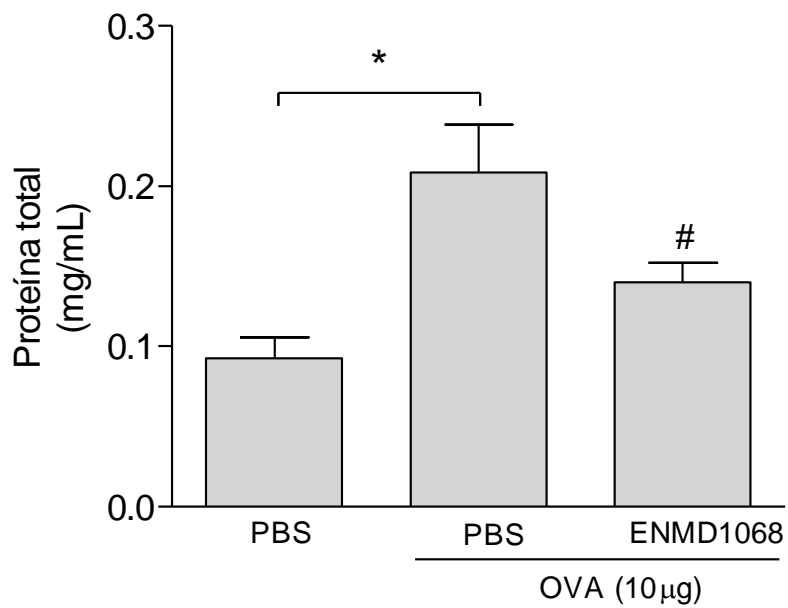
O tempo de 48 h após o desafio com OVA foi selecionado para avaliar os parâmetros inflamatórios devido à eficácia do antagonista demonstrada na seção anterior, em reduzir a migração de neutrófilos e eosinófilos para o LBA neste tempo. O desafio com a OVA induziu aumento significativo dos leucócitos totais, células mononucleares, neutrófilos e eosinófilos quando comparado aos valores obtidos dos camundongos desafiados com PBS (**Figura 27 A, B, C, D**). Os linfócitos foram contados juntamente com os macrófagos sendo representados graficamente como células mononucleares (**Figura 27 B**). O tratamento com antagonista de PAR-2 reduziu significativamente todos esses tipos celulares quando comparados aos animais tratados com PBS e desafiados com OVA.

A quantidade de proteína total presente do LBA dos animais também foi avaliada como meio indireto de avaliar a permeabilidade vascular do parênquima pulmonar. A OVA induziu extravasamento de proteínas plasmáticas para as vias aéreas como pode ser visualizado na **Figura 28**, enquanto que o antagonista de PAR-2 impediu de certa forma este fenômeno uma vez que reduziu de maneira significativa esse extravasamento.



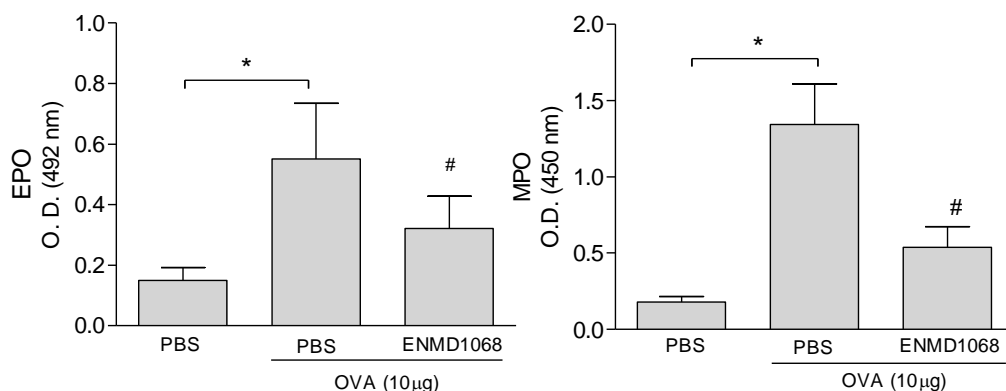
**Figura 27. Efeito induzido pelo pré-tratamento com ENMD1068 sobre o recrutamento de leucócitos para o LBA 48 h após o desafio intranasal com OVA.** Os animais foram imunizados por via i.p. com  $\text{Al}(\text{OH})_3$  + OVA (0,5 mg/mL, OVA) no dia 1 e então desafiados nos dias 9, 10, 11, 13, 15 e 17 com OVA (10 µg/animal, via i.n.) ou PBS (20 µL, i.n.) em animais pré-tratados com ENMD1068 (0,5 mg/Kg) ou PBS 1 h antes do desafio. O número de leucócitos presentes no LBA dos animais foi avaliado 48 h após o último desafio com OVA. **(A)** Leucócitos totais, **(B)** Células mononucleares, **(C)** Neutrófilos, **(D)** Eosinófilos. As barras representam média  $\pm$  e.p.m. de 6 a 8 animais por grupo. \*  $p < 0,001$  em relação ao grupo controle tratado com PBS; #  $p < 0,05$  em relação ao grupo controle desafiado com OVA.





**Figura 28. Determinação de proteínas totais no LBA pelo método de Bradford.** Os camundongos imunizados receberam os seguintes tratamentos grupo controle: PBS i.p. (100 µL) + PBS i.n. (20 µl); grupo alérgico: PBS i.p. (100 µL) + OVA i.n. (10 µg); grupo tratado: ENMD1068 i.p. (100 µL) + OVA i.n. (10 µg), e LBA coletado 48 h após o último estímulo intranasal. As barras representam média ± e.p.m. de 5 a 6 animais por grupo. \*  $p < 0,01$  em relação ao grupo controle tratado com PBS; #  $p < 0,05$  em relação ao grupo controle desafiado com OVA.

A medida da atividade das enzimas peroxidase eosinofílica (EPO) e mieloperoxidase (MPO) foi utilizada como indicativo da presença de eosinófilos e neutrófilos, respectivamente, no tecido do pulmão. Foi observado aumento destas enzimas nos pulmões dos animais desafiados com OVA (**Figura 29**), enquanto as amostras obtidas dos animais pré-tratados com o antagonista de PAR-2 tiveram reduções significativas de ambas as enzimas.



**Figura 29. Análise da atividade da peroxidase eosinofílica (EPO) e mieloperoxidase (MPO) em tecido pulmonar de camundongos pré-tratados com PBS ou ENMD1068 e desafiados com OVA.** Os animais foram imunizados por via i.p. com Al (OH)<sub>3</sub> + OVA (0,5 mg/mL, OVA) no dia 1 e então desafiados nos dias dias 9, 10, 11,13,15 e 17 com OVA (10 µg/animal, via i.n.) ou PBS (20 µL, i.n.) em animais pré-tratados com ENMD1068 (0,5 mg/Kg) ou PBS 1 h antes do desafio. Os pulmões foram removidos para as análises de EPO e MPO, 48 h após o último desafio intranasal com OVA. As barras representam média ± e.p.m. de 6 a 7 animais por grupo. \* p<0,001 em relação ao grupo controle tratado com PBS; #p<0,01 em relação ao grupo controle desafiado com OVA.

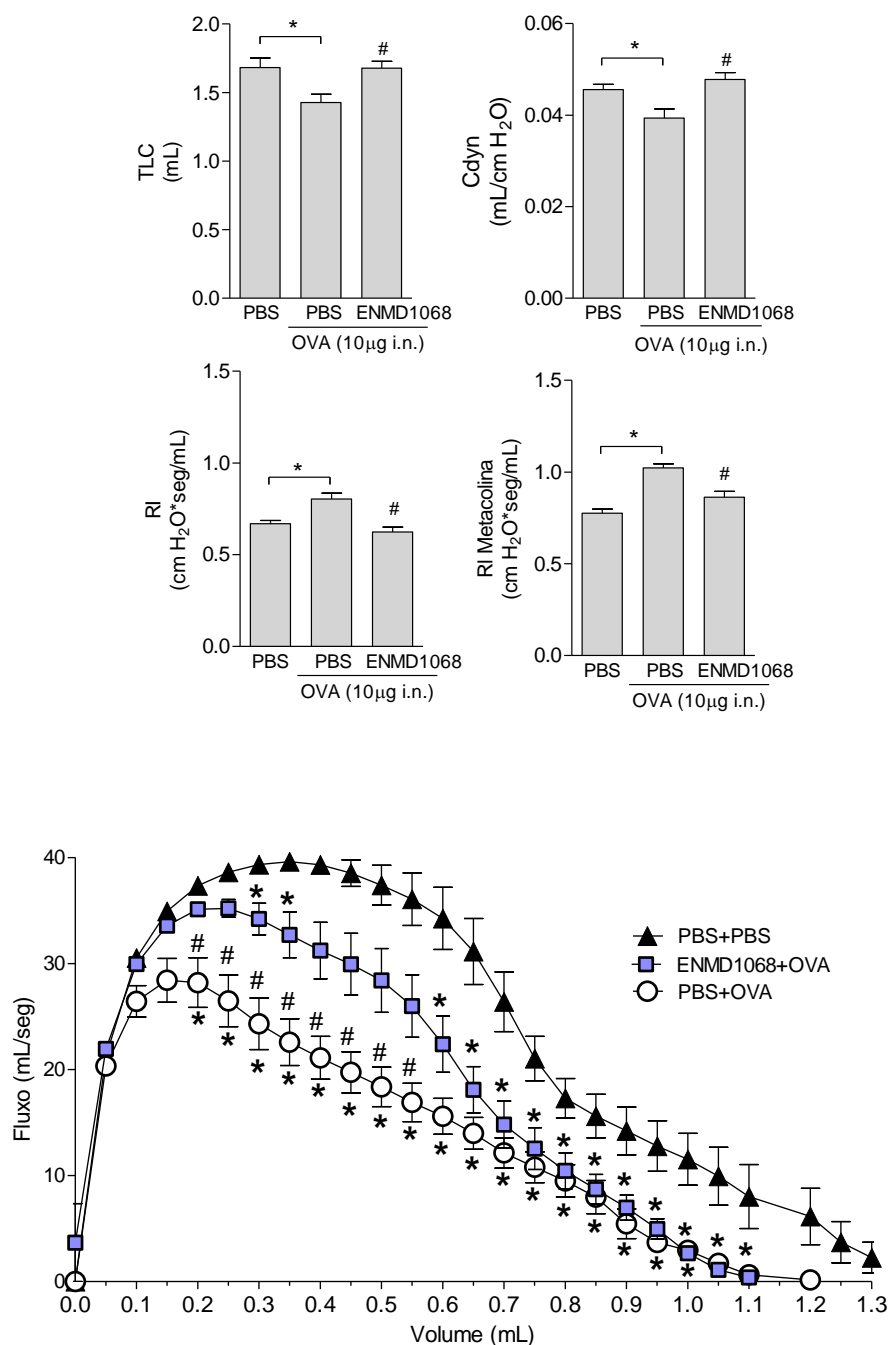
### **5.2.3 Avaliação da participação do PAR-2 sobre os parâmetros da mecânica respiratória na inflamação pulmonar alérgica 48 horas após o desafio com antígeno**

A **Figura 30** representa os testes realizados em camundongos vivos, anestesiados e traqueostomizados, para avaliação dos parâmetros da função pulmonar no modelo de alergia respiratória induzida por seis exposições com OVA i.n.

A presença do antígeno nas vias aéreas como demonstrada em dados anteriores, promove aumento do infiltrado leucocitário para o LBA, aumento da atividade das enzimas MPO e EPO teciduais e aumento da permeabilidade vascular. De uma forma geral, neste experimento, a OVA ocasionou aumento significativo da resistência ao fluxo de ar nos camundongos alérgicos que é um fator agravante da doença pulmonar.

O desafio com OVA causou redução do volume pulmonar total assim como diminuía capacidade de extensão do pulmão dos camundongos, ou seja, os pulmões destes animais se expandem com maior dificuldade que dos animais desafiados apenas com PBS. Estes dados podem ser avaliados pelos parâmetros TLC (Capacidade total pulmonar) e Cdyn (Complacência dinâmica), respectivamente (**Figura 30**). O antígeno também gerou um aumento de resistência ao fluxo de ar basal, que foi agravado na presença de metacolina (1mg/kg), um agonista de receptor muscarínico (**RI e RI Metacolina, Figura 30**), assim como aumentou a resistência ao fluxo de ar nas vias aéreas.

O tratamento com o antagonista de PAR-2, ENMD1068, em parte modula a função pulmonar nestes parâmetros analisados visto que impediu a redução da TLC e da Cdyn induzida pela exposição à OVA. Assim como, diminuiu a contração dos músculos lisos das vias aéreas em resposta à provocação com metacolina (1mg/kg), o que refletiu numa redução da resistência ao fluxo de ar representado na curva fluxo-volume (**Figura 30**).

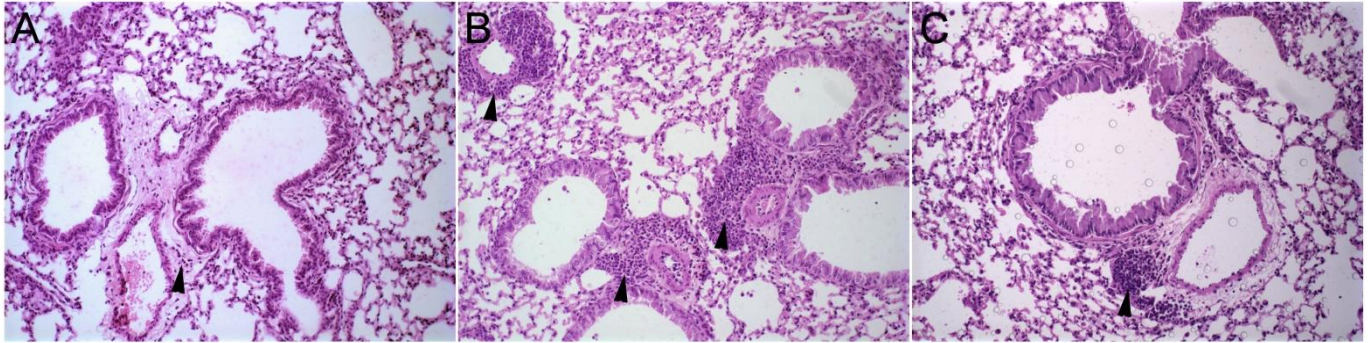


**Figura 30. Parâmetros da mecânica respiratória obtidos do modelo de seis exposições ao antígeno.** 48 h após o último desafio com OVA os camundongos do grupo controle (PBS), pré-tratados com antagonista de PAR-2 ENMD1068 (0,5 mg/kg) ou PBS, foram anestesiados e traqueostomizados, e então colocados em um plestimógrafo conectado a um ventilador controlado por computador (*Forced Pulmonary Maneuver System®*, Buxco Research Systems®, Wilmington, North Carolina USA). **TLC:** Capacidade total pulmonar, **Cdyn:** Complacência dinâmica, **RI:** Resistência ao fluxo de ar, **RI metacolina:** Teste de broncoprovocação utilizando a metacolina (1mg/Kg) e **Curva Fluxo-volume.** As barras e símbolos representam média  $\pm$  e.p.m. de 6 a 8 animais por grupo. \*  $p < 0,05$  em relação ao grupo controle tratado com PBS; #  $p < 0,05$  em relação ao grupo controle desafiado com OVA.

#### **5.2.4 Análise histopatológica de pulmões obtidos de camundongos submetidos ao modelo experimental de alergia respiratória induzida por seis exposições à ovalbumina**

##### *5.2.4.1 Infiltração leucocitária no tecido pulmonar*

Em experimentos conduzidos 48 h após o último desafio i.n. com OVA ou PBS, o tecido pulmonar dos camundongos imunizados foi analisado. A **Figura 31** mostra imagens representativas do pulmão, corado com hematoxilina e eosina, dos diferentes grupos estudados. Após análise histopatológica, observados que os animais controle apresentam apenas células residentes em região perivascular (**Figura 31 A**). O desafio com OVA levou inflamação perivascular e peribronquiolar, como evidenciado pelas setas (**Figura 31 B**). Nos animais tratados com antagonista de PAR-2 ENMD1068, foi observado um menor infiltrado celular nos pulmões em região perivascular como destacado pelas setas (**Figura 31 C**). Ao analisar os parâmetros descritos na **Tabela 3**, foi montado um escore inflamatório (**Figura 32**) e não houve redução significativa entre os grupos alérgicos e tratados com antagonista de PAR-2.



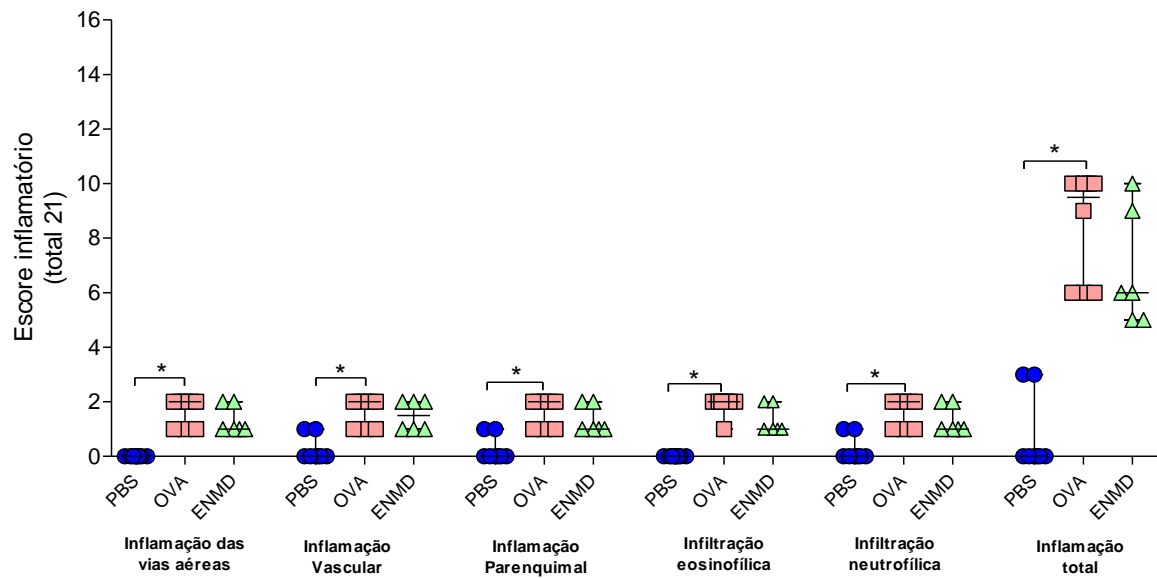
**Figura 31. Análise das alterações histológicas após o pré-tratamento com antagonista de PAR-2, 48 h após o desafio com OVA em camundongos sensibilizados.** Cortes histológicos pulmonares: PBS (A), OVA (B), tratados com ENMD1068+OVA (C). OVA aumentou a infiltração perialveolar, inflamação vascular e do parênquima em camundongos BALB/c. As pontas de seta pretas mostram infiltração de células inflamatórias em torno dos bronquíolos e vasos. n = 6-8 camundongos / grupo. Microscopia de pulmão, imagens em lente objetiva de aumento de 20x.

**Tabela 3. Sistema de pontuação adotada para a análise histopatológica dos pulmões de camundongos Balb/c**

<b>Escore</b>	<b>Descrição</b>
<b>Escore 1</b>  Inflamação das vias aéreas  Total=4	0 = Ausência de células inflamatórias em torno das vias aéreas - Ausente 1 = Pequeno número de células nas vias aéreas - Suave 2 = Algumas células nas vias respiratórias, inflamação significativa - Moderada 3 = A maior parte das vias aéreas tem inflamação - Marcado 4 = Vias aéreas está significativamente inflamada - Grave
<b>Escore 2</b>  Inflamação vascular  Total=4	0 = Ausência de células inflamatórias em torno de vasos - Ausente 1 = Alguns vasos têm um pequeno número de células - Suave 2 = Alguns vasos têm inflamação significativa - Moderado 3 = A maioria dos vasos tem alguma inflamação - Marcada 4 = A maioria dos vasos está significativamente inflamado - Grave
<b>Escore 3</b>  Inflamação parenquimal (com ampliação de 10X)  Total=5	0 = <1% afetado 1 = 1-9% afetado 2 = 10-29% afetado 3 = 30-49% afetado 4 = 50-69% afetado 5 = >70% afetado
<b>Escore 4</b>  Infiltração eosinofílica  Total=4	0 = Ausência de eosinófilos em torno das vias aéreas - Ausente 1 = Pequeno número de eosinófilos nas vias aéreas - Suave 2 = Alguns eosinófilos nas vias respiratórias, inflamação significativa - Moderada 3 = A maior parte das vias aéreas tem inflamação - Marcado 4 = Vias aéreas está significativamente inflamada - Grave
<b>Escore 5</b>  Infiltração neutrofílica  Total=4	0 = Ausência neutrófilos em torno das vias aéreas - Ausente 1 = Pequeno número de neutrófilos nas vias aéreas - Suave 2 = Alguns neutrófilos nas vias respiratórias, inflamação significativa - Moderada 3 = A maior parte das vias aéreas tem inflamação - Marcado 4 = Vias aéreas está significativamente inflamada - Grave
<b>Total Escore = Escore 1 + Escore 2 + Escore 3+ Escore 4 + Escore 5 /21</b>	

(adaptado de Hovart *et al.*, 2007; Garcia *et al.*, 2010)

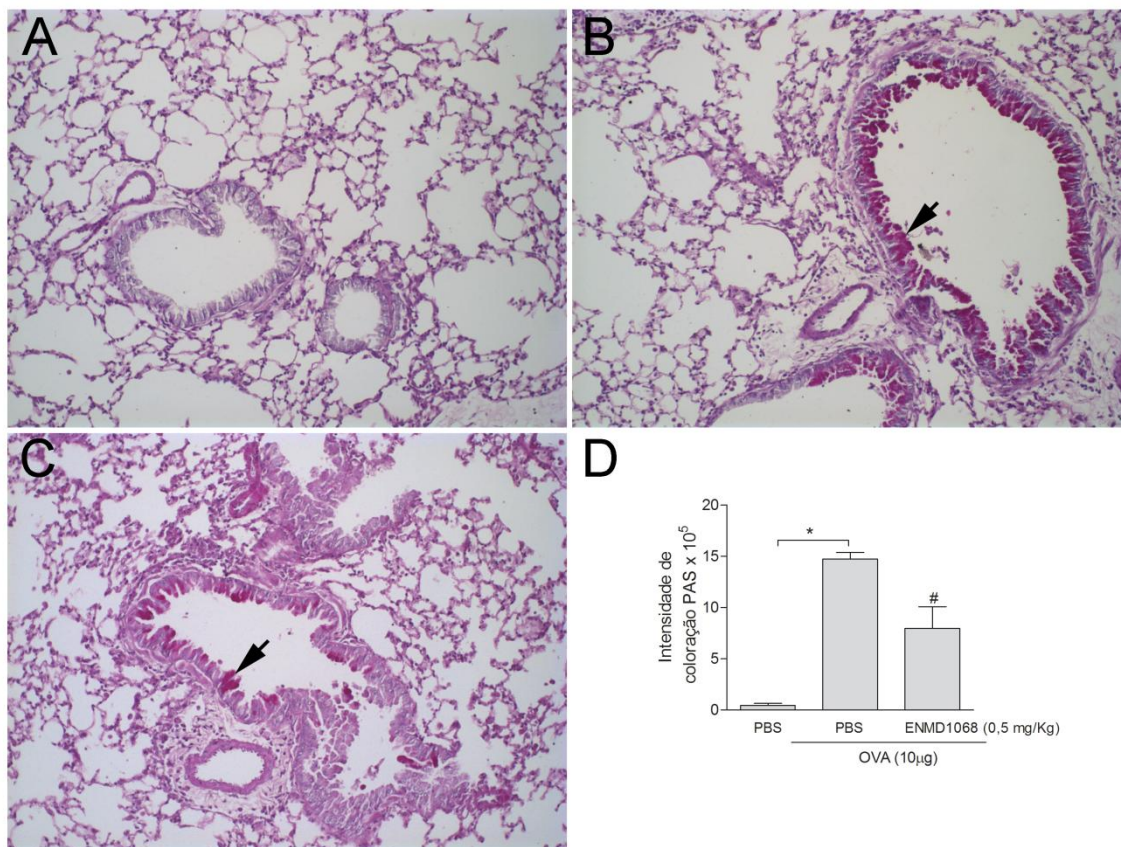




**Figura 32. Análise do escore inflamatório após o pré-tratamento com antagonista de PAR-2 em camundongos sensibilizados e desafiados com OVA.** O escore histopatológico (máximo de 21) avaliou as vias aéreas, inflamação vascular, parenquimatosa, infiltração eosinofílica e neutrofílica, de pulmões de camundongos imunizados tratados com PBS, OVA (10 µg i.n.) ou ENMD1068 (0,5 mg/Kg i.p.) +OVA (10 µg i.n.), avaliados 48 h após o último desafio com o alérgeno. n = 6-8 camundongos / grupo \* p <0,05 (teste de Kruskal-Wallis, teste de comparação múltipla de Dunn).

#### 5.2.4.2 Deposição de muco no tecido pulmonar

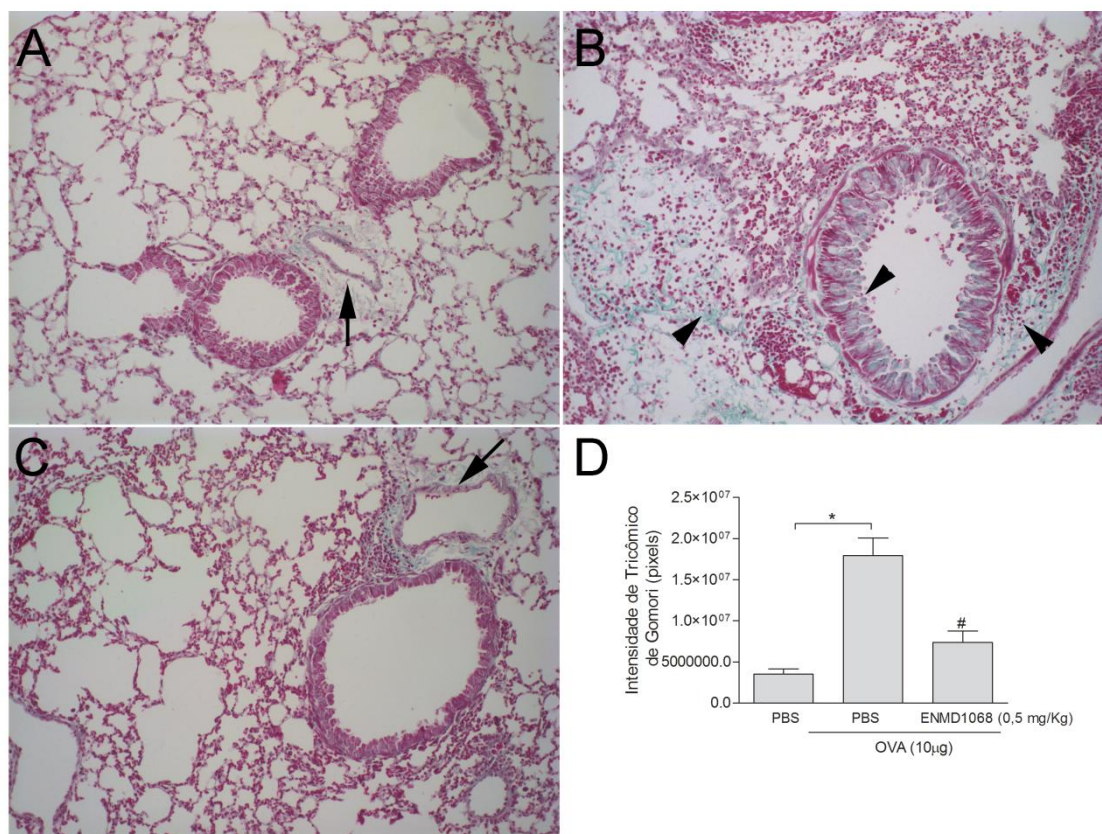
Pela coloração de PAS, os pulmões do grupo controle (PBS) não são hiper-reativos (**Figura 33 A**). Já os animais que foram desafiados com antígeno apresentaram regiões coradas fortemente pelo PAS (cor púrpura-mangenta) especificamente no epitélio brônquico (**Figura 33 B**). O grupo tratado com o antagonista de PAR-2 ENMD1068 apresentou menor produção de mucopolissacarídeo (**Figura 33 C**), confirmada pela avaliação quantitativa, pelo qual foi demonstrada significativa redução da intensidade de coloração PAS comparado ao grupo OVA (**Figura 33 D**).



**Figura 33. Histoquímica pela coloração de PAS (ácido periódico de Schiff).** Quantificação da área de coloração PAS em cortes inteiros de pulmão de camundongos tratados com PBS (A), OVA (B) e ENMD1068+OVA (C). As setas pretas indicam produção de muco no parênquima pulmonar e vesículas sendo liberadas. Avaliação morfométrica da coloração de PAS nos diferentes grupos (D).  $n = 6-7$  camundongos/grupo  $*p < 0,001$  comparado ao PBS,  $^{\#}p < 0,05$  comparado ao grupo OVA (One-way ANOVA / Newman-Keuls). Microscopia de pulmão, imagens em lente objetiva de aumento de 20x.

#### 5.2.4.3 Deposição de colágeno no tecido pulmonar

Os cortes histológicos dos pulmões dos grupos experimentais também foram corados com Tricrômico de Gomori, técnica que possibilitou evidenciar áreas com presença de fibras colágenas, bem como, a avaliação qualitativa das regiões de fibrose (coloração azulada). As amostras obtidas do grupo controle (PBS) apresentaram marcação suave em região perivascular por conta do tecido conjuntivo fibroso ali presente (**Figura 34 A**). Já os pulmões obtidos dos animais desafiados com OVA, quando comparados ao grupo PBS, tiveram um aumento da coloração em regiões com presença de fibras de colágeno, sendo estas, em sua maioria, entremeadas no parênquima pulmonar, na região perivascular e peribronquial (**Figura 34 B**), enquanto os animais pré-tratados com antagonista de PAR-2, ENMD1068, apresentaram poucas regiões coradas pelo Tricrômico de Gomori, sendo que, estas estavam parcialmente entremeadas em áreas perivasculares (**Figura 34 C**), esta redução pode ser observada também na análise quantitativa (58%) (**Figura 34 D**).

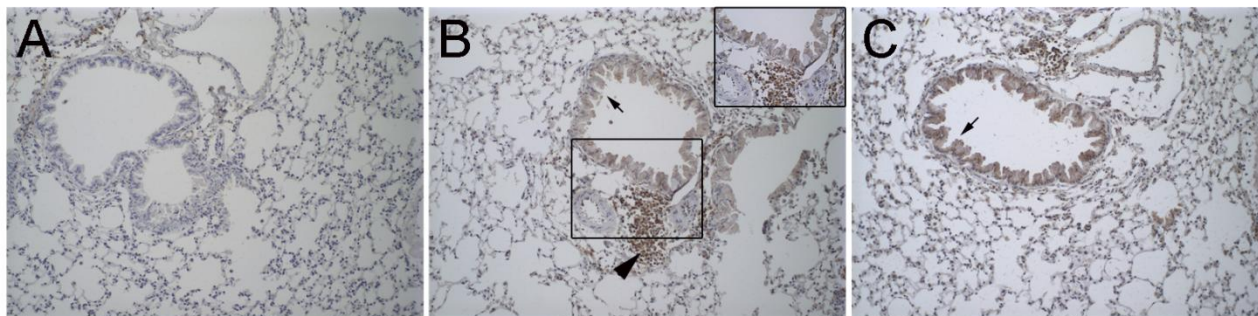


**Figura 34. Análise da deposição de colágeno em microscopia de pulmão de camundongos sensibilizados e desafiados com OVA.** Após 48 h do último desafio com OVA os pulmões foram removidos, fixados, inclusos, corados e analisados na coloração de Tricrômico de Gomori, para evidenciar a deposição de colágeno e indicativo do surgimento de fibrose. Microscopia de pulmão, imagens em lente objetiva de aumento de 20x. Grupos: (A) controle/PBS; (B) OVA; (C) ENMD1068+OVA. As pontas de setas pretas indicam a deposição de colágeno no epitélio brônquico e no parênquima pulmonar. As setas pretas indicam a deposição de colágeno nas regiões perivascular. (D) Avaliação qualitativa da coloração de Tricrômico de Gomori nos diferentes grupos.  $n = 8$  camundongos/grupo  $*p < 0,001$  comparado ao PBS,  $\#p < 0,001$  comparado ao grupo OVA (One-way ANOVA / Newman-Keuls).

#### 5.2.4.4 Expressão imunohistoquímica de CCL5

Os camundongos imunizados e tratados com PBS tiveram marcação negativa para CCL5 no epitélio brônquico e parênquima pulmonar (**Figura 35 A**). Enquanto que nos animais alérgicos desafiados com OVA houve marcação positiva (marrom) no epitélio brônquico, que também é reativo em regiões perivascular, peribronquiolar e está presente no citoplasma de linfócitos e macrófagos (**Figura 35 B**). O epitélio brônquico de camundongos pré-tratados com o antagonista de PAR-2 ENMD1068 também foram reativos para CCL5, como pode ser observado na **Figura 35 C**.

Para comparar a intensidade da expressão de CCL5 entre os diferentes grupos estudados, elaboramos um escore para a avaliação de marcação no epitélio das vias aéreas, das células inflamatórias e no parênquima, que pode ser visto na **Tabela 4**. Desta forma, a expressão de CCL5 foi significativamente maior nos animais desafiados com OVA em todos os parâmetros avaliados, quando comparados ao grupo PBS (**Figura 36**). Não houve diferença significativa entre o grupo tratado com ENMD1068 em relação ao grupo desafiado com OVA (**Figura 36**).

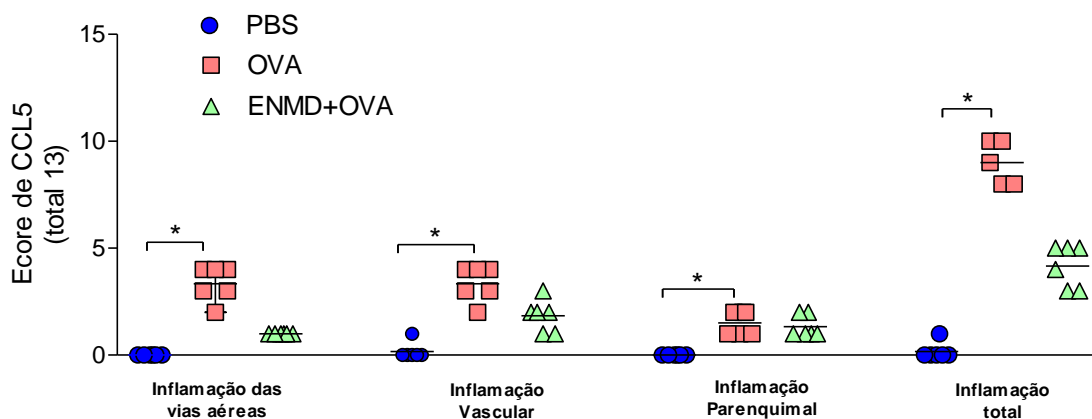


**Figura 35. Expressão imunohistoquímica de CCL5 nos tecidos pulmonares de camundongos.** Cortes histológicos pulmonares: Grupo controle: PBS (A), OVA (B), tratados com ENMD1068+OVA (C). Os animais do grupo controle apresentam leve marcação em algumas células residentes e marcação negativa em epitélio brônquico (A), enquanto os camundongos desafiados com OVA demonstraram maior número de células positivas para CCL5 (B). Marcação positiva em tecido pulmonar de camundongos tratados com antagonista de PAR-2 ENMD1068 (C). As setas pretas indicam a deposição de colágeno no epitélio brônquico. As pontas de seta preta indicam expressão de CCL5 no citoplasma de células inflamatórias. n=7 camundongos/grupo \*p<0,05 (teste de Kruskal-Wallis, teste de comparação múltipla de Dunn). Microscopia de pulmão, imagens com lente objetiva de aumento de 20x, inserção em B: aumento de 60x.

**Tabela 4. Sistema de pontuação para expressão imunohistoquímica de CCL5 para pulmões de camundongo Balb/c**

<b>Escore</b>	<b>Descrição</b>
<p><b>Escore 1</b></p> <p>Epitélio das vias aéreas</p> <p>Total=4</p>	<p>0 = Ausência de expressão no epitélio das vias aéreas - Ausente</p> <p>1 = Pouca expressão no epitélio das vias aéreas - Suave</p> <p>2 = Marcação significativa no epitélio das vias aéreas - Moderada</p> <p>3 = A maior parte das vias aéreas tem marcação - Marcado</p> <p>4 = Epitélio das vias aéreas está significativamente reativo - Grave</p>
<p><b>Escore 2</b></p> <p>Células inflamatórias</p> <p>Total=4</p>	<p>0 = Ausência de células inflamatórias com expressão - Ausente</p> <p>1 = Poucas células marcadas - Suave</p> <p>2 = Expressão significativa - Moderado</p> <p>3 = A maioria das células expressam - Marcada</p> <p>4 = Expressão muito intensa - Grave</p>
<p><b>Escore 3</b></p> <p>Parênquima</p> <p>Total=5</p>	<p>0 = &lt;1% afetado</p> <p>1 = 1-9% afetado</p> <p>2 = 10-29% afetado</p> <p>3 = 30-49% afetado</p> <p>4 = 50-69% afetado</p> <p>5 = &gt;70% afetado</p>
<p><b>Total Escore = Escore 1 + Escore 2 + Escore 3 /13</b></p>	





**Figura 36. Análise do escore de CCL5 após o pré-tratamento com antagonista de PAR-2 em camundongos sensibilizados e desafiados com OVA.** O escore histopatológico (máximo de 13) avaliou a expressão imunohistoquímica de CCL5 no epitélio das vias aéreas, células inflamatórias e parênquima pulmonar, de pulmões de camundongos imunizados tratados com PBS, OVA (10  $\mu$ g i.n.) ou ENMD1068 (0,5 mg/Kg i.p.) +OVA (10  $\mu$ g i.n.), avaliados 48 h após o último desafio com o alérgeno.

## 6. DISCUSSÃO

A asma é uma doença inflamatória pulmonar não transmissível, sendo mais comum na infância e adolescência (GINA, 2015) é caracterizada por obstrução do fluxo aéreo em consequência das alterações funcionais na capacidade de contração da musculatura lisa brônquica que ocorre em resposta a exposição a alérgenos, microorganismos patogênicos ou não, mudanças de temperatura, poluição, dentre outras (HOLGATE, 2008; GINA 2015; HANSBRO *et al.*, 2004; MASOLI *et al.*, 2004). A asma extrínseca alérgica é a forma mais comum da doença, sendo frequentemente associada com as repostas mediadas por células Th2, como eosinofilia pulmonar, hiperreatividade brônquica, produção de muco, produção de IgE, liberação de citocinas inflamatórias, e com o passar do tempo provocando mudanças estruturais e funcionais nomeadas de remodelamento pulmonar (HOLGATE, 2008; HOLGATE & DAVIES, 2009; GINA 2015; HUMBERT *et al.*, 1999).

Apesar do avanço nos estudos relacionados à patogênese da doença, a taxa de mortalidade continua elevada com aproximadamente 250.000 mortes anuais em nível mundial além disso, estima-se que existam aproximadamente 300 milhões de indivíduos asmáticos, com projeção para 2025 de cerca de 400 milhões no mundo (MASOLI *et al.*, 2004; GAN, 2014; GINA, 2015; PAWANKAR *et al.*, 2008), o que faz com que pesquisadores continuem buscando evidências mecanísticas de prevenção e controle, bem como modelos animais mais autênticos dessa doença que aflige milhões de pessoas no mundo todo.

Neste cenário, o PAR-2 vem sendo bastante estudado, uma vez que está expresso em várias células das vias aéreas como epiteliais, endoteliais, músculo liso do tecido pulmonar, epitélio nasal, assim como em células mononucleares e eosinófilos presentes no LBA ou lavado pleural (EBELING *et al.*, 2005; MATOS *et al.*, 2013; MATOS *et al.*, 2014). Recentemente, demonstramos um papel fundamental do PAR-2 no controle do recrutamento de eosinófilos em modelo de pleurisia alérgica (MATOS *et al.*, 2013; MATOS *et al.*, 2014). Neste trabalho, nosso objetivo foi estudar a importância da ativação do PAR-2 na produção de mediadores inflamatórios e no recrutamento de leucócitos no modelo experimental de asma induzido pela ovalbumina (OVA).

Além da OVA, diferentes alérgenos têm sido utilizados para a sensibilização dos animais e para o estudo das ações de PAR-2, como por exemplo, extratos de ácaros domésticos e extratos de determinadas espécies de baratas (EBELING *et al.*, 2007; BOER *et al.*, 2014; ARIZMENDI *et al.*, 2011). Ainda que a OVA não retrate um alérgeno pulmonar relevante para os humanos, é um dos antígenos mais empregados nos modelos experimentais em função da facilidade para sua obtenção, que reflete no custo, e da capacidade de induzir inflamação pulmonar alérgica em camundongos (KUNG *et al.*, 1994; LAYTON *et al.*, 2001; BAYAT *et al.*, 2009; HABRE *et al.*, 2008; WARREN *et al.*, 2017; LAFFONT, BLANQUART, GUÉRY, 2017; TANG *et al.*, 2017). A imunização por via intraperitoneal da OVA juntamente com o adjuvante hidróxido de alumínio é capaz de promover uma ativação mais intensa da resposta Th2, promovendo aumento significativo do número total de células do LBA principalmente eosinófilos, além disso, a produção de citocinas como IL-4, IL-5, IL-13 e anticorpo IgE (DE HEER *et al.*, 2004; LAMBRECHT & HAMMAD 2015; BREWER *et al.*, 1999).

Nesse estudo, camundongos Balb/c fêmeas foram previamente sensibilizadas e desafiadas com OVA via intranasal (três exposições) reproduzindo um modelo de asma agudo já descrito na literatura por Kurowska-Stolarska e colaboradores (2008) em que avaliamos parâmetros como recrutamento celular, produção de citocinas, permeabilidade vascular e outros. Também utilizamos um modelo elaborado e padronizado pelo nosso grupo de pesquisa, pelo qual estendemos a exposição ao antígeno para seis desafios intranasais e, assim, avaliamos alterações na mecânica pulmonar, hipersecreção brônquica, deposição de colágeno, dentre outras. O antagonista de PAR-2 foi avaliado em relação à sua capacidade em reduzir a inflamação para ambos os modelos, analisado pelo recrutamento de leucócitos para o LBA, produção de citocinas e quimiocinas, alteração da permeabilidade vascular, entre outros fatores em resposta à OVA. A discussão dos resultados foi dividida em dois tópicos principais levando em consideração os três ou seis desafios intranasais com a OVA.

## 6.1 Participação do PAR-2 no modelo experimental de asma induzido por três exposições à ovalbumina

Os resultados apresentados neste trabalho demonstram que a inflamação alérgica que ocorre nos camundongos Balb/c em decorrência da imunização e desafio com OVA conduz a um aumento dos parâmetros inflamatórios tais como recrutamento leucocitário, níveis de citocinas e quimiocinas no LBA, nos pulmões e linfonodos dos camundongos bem como, alteração na permeabilidade vascular, produção de muco, entre outros aqui analisados. Dado que os receptores de PAR-2 são expressos em diferentes células das vias aéreas (EBELING *et al.*, 2005; MATOS *et al.*, 2013; MATOS *et al.*, 2014), o bloqueio do receptor se torna um grande alvo para pesquisa.

Estudos publicados nas últimas décadas têm sugerido a participação de PAR-2 no desenvolvimento da inflamação alérgica. Schmidlin e colaboradores (2002), utilizando camundongos nocautes que não expressam PAR-2 demonstraram uma inibição de 73% da infiltração de eosinófilos após desafio com a OVA, assim como Boer e colaboradores (2014) que também verificaram inibição de 80% da migração de eosinófilos em resposta a poeira doméstica quando comparado aos camundongos selvagens que expressam o receptor. De outra forma, realizando um pré-tratamento com o inibidor de protease inespecífico (AEBSF) em camundongos imunizados e desafiados com OVA, foi observada uma redução da contagem total de leucócitos, eosinófilos e neutrófilos após desafio com o antígeno (SAW; KALE; ARORA, 2012) sugerindo a ação das serino-proteases endógenas para evolução da inflamação alérgica.

Resultados prévios do nosso grupo mostraram que o pré-tratamento com o antagonista de PAR-2 foi capaz de reduzir o número de eosinófilos no lavado pleural induzido tanto pela OVA (MATOS *et al.*, 2014) como também pela triptase de mastócitos, um dos ligantes endógenos do receptor (MATOS *et al.*, 2013). Estes achados somados aos demais da literatura, nos permitem presumir que o bloqueio da ativação de PAR-2 via antagonista seletivo do receptor, pode ser uma ferramenta farmacológica relevante a ser estudada

como potencial agente antiinflamatório em doenças de natureza alérgica em que estes leucócitos são relevantes, a fim de se prevenir uma possível exacerbação da doença que ocorre quando há acúmulo de eosinófilos e consequente lesões decorrentes da liberação de seus mediadores pró-inflamatórios tais como proteína catiônica eosinofílica, neurotoxina derivada do eosinófilo, peroxidase eosinofílica, proteína básica, entre outros (HOGAN *et al.*, 2008; BLANCHARD & ROTHENBERG, 2009).

No presente estudo, utilizamos um modelo experimental de asma induzido pela OVA para mimetizar os efeitos da presença do antígeno no desenvolvimento da inflamação alérgica que tem potencial para desencadear uma resposta mediada por PAR-2. O desafio com OVA seguido da coleta do LBA é uma ferramenta experimental adequada para estudar as reações fisiopatológicas da asma (DE HEER *et al.*, 2004; LAMBRECHT & HAMMAD 2015; BREWER *et al.*, 1999). Em modelos experimentais, Kurowska-Stolarska e colaboradores (2008) demonstraram que a OVA induz aumento do número total de leucócitos, eosinófilos e macrófagos para o LBA 24 h após o último desafio com o antígeno, conduzindo a uma resposta Th2 com liberação de citocinas pró-inflamatórias tais como IL-5, IL-4, IL-13. Nesse estudo, ao utilizarmos modelo semelhante ao proposto por Kurowska Stolarska e col. (2008) observamos que a administração i.n. de OVA induziu recrutamento de eosinófilos em todos os tempos avaliados dependente da imunização com o antígeno, e com pico a partir de 48 h após o desafio.

A OVA induziu um intenso recrutamento de células inflamatórias, basicamente neutrófilos e eosinófilos, para as vias aéreas, quando comparada aos animais imunizados desafiados com PBS. Observa-se que 30 min após o último desafio com o alérgeno ocorre aumento expressivo no número de neutrófilos que se mantém até 12 h, sugerindo um papel importante destas células como iniciadoras do fenômeno inflamatório. Sequencialmente, ocorre aumento de eosinófilos no LBA com pico em 48 h após o antígeno. O acúmulo de neutrófilos tem sido correlacionado a formas mais severas de asma crônica, ataques fatais de curta duração e em casos de tolerância aos glicocorticoides, apresentando sintomas como estreitamento e obstrução das vias aéreas e exacerbação da fase aguda da doença (WENZEL *et al.*, 1997; SIMPSON *et al.*,

2006 FOLEY; HAMID, 2007; FAHY, 2009; DEJAGER *et al.*, 2015). Os danos na mucosa brônquica ocasionados pelos neutrófilos frequentemente estão associados a liberação de citocinas, proteases, metabólitos de oxigênio e mediadores lipídicos (CASSATELLA, 1995).

Duas horas após o desafio com o antígeno, observou-se tanto um aumento expressivo de neutrófilos quanto elevações nas concentrações das quimiocinas inflamatórias CXCL1 (do inglês *chemokine [C-X-C motif] ligand 1*, análogo murino da CXCL8), CCL-5 e da citocina IL-6. Tal fato é justificável, uma vez que estas citocinas contribuem para a produção e o recrutamento das células de defesa para o local da inflamação. Minuciosamente, a primeira quimiocina relatada, CXCL8, é um dos principais agentes quimiotáticos dos leucócitos polimorfonucleares tais como os neutrófilos para o sítio inflamatório em doenças do trato respiratório (BORDON *et al.*, 2013; LEE *et al.*, 1995), sendo os macrófagos residentes as maiores fontes desta quimiocina (DE FILIPPO *et al.*, 2008). Também foi demonstrado em experimentos *in vitro* um aumento expressivo da liberação de CXCL8 por células epiteliais alveolares (linhagem A549) após tratamento com agonista de PAR-2 SLIGKV, sugerindo um papel importante da ativação destes receptores na modulação desta quimiocina importante para o recrutamento de neutrófilos (OSTROWSKA; SOKOLOVA; REISER, 2007). Em 1999, Nocker e colaboradores demonstraram um aumento expressivo tanto do número de neutrófilos quanto nos níveis de CXCL8, no LBA de pacientes asmáticos, 4 h após a exposição ao antígeno (ácaros de poeira doméstica e/ou pólen). Em nosso modelo experimental de asma, duas horas após o desafio intranasal com a OVA, observou-se aumento de CXCL1 que permaneceu até 24 h após a exposição ao antígeno.

A segunda quimiocina, CCL5, é produzida e liberada por linfócitos T e macrófagos (WOLPE & CERAMI, 1989; DONLON *et al.*, 1990; MIYAGISHI *et al.*, 1997). Esta quimiocina é uma das principais quimioatraentes para eosinófilos presentes no LBA de pacientes com asma alérgica (VENGE *et al.*, 1996), nos nossos experimentos, apesar de ser mensurada no LBA de camundongos imunizados e desafiados com OVA já nos tempos iniciais após o último desafio com o alérgeno, o aumento de eosinófilos foi identificado somente a partir de 12 h. Por último, a citocina IL-6 que é produzida por vários

tipos celulares do sistema imune, como macrófagos, células endoteliais, fibroblastos, células T e células B, em resposta a microorganismos invasores, age tanto na imunidade inata quanto adaptativa (BARTON, 1997), e tem sido relatado o aumento desta citocina no soro de pacientes asmáticos (YOKOYAMA *et al.*, 1995). A IL-6 juntamente com o fator estimulador de colônias de granulócitos G-CSF (do inglês *granulocyte colony stimulating factor*) estimulam a produção de neutrófilos na medula particularmente após a exposição a patógenos, denominada como granulopoiese de emergência (YAN *et al.*, 2013; PODJDA *et al.*, 1992; ROMANI *et al.*, 1996; WALKER *et al.*, 2008), e em conjunto com as demais citocinas avaliadas contribuem para o aumento do número de neutrófilos no LBA dos camundongos após a exposição ao alérgeno.

Em 2002, Schmidlin e colaboradores forneceram a primeira evidência de que o PAR-2 desempenha um papel importante na mediação da infiltração de leucócitos nas fases agudas da inflamação alérgica das vias aéreas em modelo de asma experimental, também demonstraram que a supressão de PAR-2 diminuiu acentuadamente a infiltração de eosinófilos (73% de redução), enquanto que a superexpressão exacerbou esta resposta (88% de aumento) 24 h após o desafio com OVA. Em 2012, Matsuwaki e colaboradores demonstraram que tanto o tratamento com peptídeo ativador de PAR-2, SLIGKV, quanto com proteases de extrato dos fungos *Alternaria*, induziram a produção e liberação de GM-CSF, IL-6 e CXCL8 por células epiteliais das vias aéreas de humanos, acompanhada por um aumento de cálcio intracelular, não havendo liberação das quimiocinas CCL5 e eotaxina, enquanto o tratamento com antagonista de PAR-2 reduziu a liberação de IL-6 pelas células epiteliais induzida pelo extrato fúngico (MATSUWAKI *et al.*, 2012). Recentemente, a expressão de PAR-1, 2, 3 e 4 foi demonstrada em fibroblastos removidos de pacientes com rinosinusite crônica com pólipos nasais, e o tratamento destas células com agonistas de PAR-1 e PAR-2 (Trombina e fatores de coagulação Xa) estimulou a secreção de TGF beta, fibronectina, eotaxina-1, IL-6 e CXCL8 (SHIMIZU *et al.*, 2017).

A fim de avaliar a participação do PAR-2 no modelo experimental de asma induzido por três exposições à ovalbumina, os camundongos imunizados

foram pré-tratados por via i.p. com o antagonista seletivo de PAR-2, ENMD1068 1 h antes da administração i.n. de OVA. A ativação deste receptor se faz necessária para que haja aumento do recrutamento leucocitário, uma vez que o bloqueio de sua atividade reduziu consideravelmente a migração de neutrófilos e eosinófilos inclusive durante os picos de migração, no qual o antagonista de PAR-2 inibiu o recrutamento de neutrófilos em 53% (tempo de 4 h) e de eosinófilos em 85% (tempo de 48 h). De acordo com os nossos resultados podemos sugerir que o antagonista de PAR-2 modula o recrutamento dos leucócitos em parte pela modificação do perfil de citocinas que ocorre no início do estabelecimento da inflamação, dado que ele reduz significativamente os níveis das citocinas pro-inflamatórias CXCL1, IL-6 e CCL5 em 74%, 89% e 67% respectivamente 2 h após o último desafio i.n. com a OVA, dificultando a sinalização e chegada de leucócitos neste local.

Também foi observada a redução da AREG (anfiregulina) que é um fator de crescimento epidermal (SHOYAB *et al.*, 1989; MAHTOUK *et al.*, 2005), nos camundongos pré-tratados com ENMD1068 quando comparados aos animais tratados somente com PBS. AREG pode ser produzida e liberada por eosinófilos (MATSUMOTO *et al.*, 2009), mastócitos (WANG *et al.*, 2005; OKUMURA *et al.*, 2005) e basófilos (QI *et al.*, 2010) em resposta a diferentes estímulos inflamatórios, existindo uma correlação entre AREG e o remodelamento pulmonar em doenças de origem alérgica, por ela conduzir ações como proliferação de fibroblastos primários pulmonares humanos contribuindo para fibrose (WANG *et al.*, 2005), como também aumentar a expressão do gene da mucina por células primárias epiteliais das vias aéreas em pacientes com asma brônquica contribuindo para produção de muco nos pulmões (OKUMURA *et al.*, 2005).

De modo interessante, foi verificado aumento em 155% nos níveis de IL-10, um fator inibidor de citocinas pró-inflamatórias, no LBA de camundongos tratados com ENMD1068 quando avaliado 4 h após o desafio com a OVA, que coincidiu com a redução no número de neutrófilos. Zuany-Amorim e colaboradores (1995) demonstraram que o tratamento com IL-10 via i.n. em modelo de asma reduziu a infiltração de eosinófilos e neutrófilos para o LBA de camundongos induzida pela OVA, como também reduziu os níveis de TNF- $\alpha$



quando analisados 1 e 3 h após o desafio com o antígeno. Nesse sentido, sugerimos a participação desta citocina na regulação da infiltração leucocitária para o LBA dos camundongos.

Acreditamos que esse mecanismo regulatório observado após o tratamento com o antagonista ocorra pelo fato de que neste modelo experimental, o estabelecimento de um microambiente inflamatório do tipo alérgico que envolve a presença de linfócitos B, produção de anticorpos IgE, ativação de mastócitos com conseqüente liberação de triptase, que é um agonista endógeno de PAR-2, e recrutamento de neutrófilos, que também liberam proteases endógenas: elastase neutrofílica (agonista de PAR-2), esteja sendo prejudicado pelo o bloqueio de PAR-2 nas inúmeras células presentes nas vias aéreas tais como epiteliais, endoteliais, macrófagos alveolares, mastócitos e eosinófilos, impossibilitando a ativação destas células, liberação de citocinas pró-inflamatórias e recrutamento leucocitário que são fundamentais para a manutenção do processo inflamatório.

Associado com o aumento de neutrófilos e dos níveis das citocinas pró-inflamatórias, a presença do antígeno nas vias aéreas dos camundongos também induziu aumento da expressão proteica de PAR-2 nos leucócitos obtidos do LBA 2 e 4 h após o desafio com OVA, em relação ao grupo controle (PBS). O ENMD1068 inibiu em 30% o aumento induzido 2 h após o desafio com o antígeno, sugerindo que o controle da inflamação também está relacionado com um menor número de receptores de PAR-2 nos leucócitos do LBA. Já no tempo de 4 h, não obtivemos esta mesma resposta, sugerindo que o controle do processo inflamatório pode estar correlacionado há outros fatores como, por exemplo, o aumento da citocina IL-10.

Em estudos anteriores, demonstramos que a OVA também proporciona aumento da expressão de PAR-2 nos leucócitos obtidos do lavado pleural de camundongos 24 e 48 h após o desafio com antígeno (MATOS *et al.*, 2014), entretanto é a primeira vez que é demonstrada a redução desta expressão em leucócitos obtidos do LBA de camundongos quando há bloqueio do receptor pelo antagonista de PAR-2, ENMD1068, em resposta ao antígeno neste modelo experimental de asma. Considerando a peculiaridade de ativação dos

PAR em que não é necessário a ocupação do receptor pelo ligante endógeno para mantê-lo ativo (ISHII *et al.*, 1993), este fenômeno de redução protéica observada em nossos experimentos é de grande relevância, já que a magnitude dos eventos mediados por proteases endógenas é extremamente influenciada pela concentração do receptor, ou seja uma única protease como por exemplo a triptase de mastócitos, pode ativar múltiplos receptores na superfície das células.

Sabe-se que a inflamação proveniente da presença de antígeno nas vias aéreas é capaz de induzir extravasamento microvascular promovendo exsudação plasmática (EVANS *et al.*, 1988; MISAWA & CHIBA, 1993). Uma forma simples de demonstrar o extravasamento microvascular é através da administração intravenosa do corante azul de Evans que se liga a albumina, e então acompanhar sua distribuição plasmática e difusão para os tecidos, que ocorrerá apenas sob condições patológicas, pois, em situações normais o endotélio é permeável somente a pequenas moléculas como água e eletrólitos.

Em 1992, Obata e colaboradores demonstraram o aumento dos níveis do azul de Evans em cobaias desafiadas com OVA, decorrente da ação agressora do antígeno nos vasos, na traquéia, brônquios principais e via aérea intrapulmonar, e que o bloqueio dos receptores de leucotrienos pelo antagonista ONO-1078, promovia diminuição da permeabilidade vascular nos tecidos analisados, exceto traqueia. Em nossos experimentos, demonstramos que os animais com endotélio intacto, tratados apenas com PBS, não há extravasamento do corante azul de Evans para os tecidos vascularizados como também confirmamos o aumento da permeabilidade vascular ocasionada pelo alérgeno promovendo distribuição plasmática e difusão do corante para os pulmões e traqueia de camundongos.

O bloqueio dos receptores de PAR-2, 2h após o desafio antigênico, proporcionou uma redução significativa da coloração azul nos tecidos pulmonares (53%) de animais desafiados com OVA quando comparados ao grupo alérgico que foi tratado apenas com PBS. Dado que o tratamento é sistêmico, é provável que exista diminuição da ativação do receptor no epitélio pulmonar promovendo diminuição dos mediadores da inflamação tais como

liberação de citocinas pró-inflamatórias e conseqüente recrutamento de células imunes, que em menor quantidade irão reduzir a modificação da integridade da barreira entre os tecidos e sangue representados pela parede dos capilares e vênulas, resultando em menor permeabilidade ao corante. Não houve diferença estatística entre as traqueias dos grupos pré-tratados ou não com antagonista, quando o extravasamento do corante foi avaliado 2 h após o desafio, sugerindo menor participação da ativação de PAR-2 no tecido conjuntivo.

Em nosso modelo de asma agudo, a presença do antígeno nas vias aéreas desencadeou fenômenos como aumento da permeabilidade vascular e produção de citocinas e quimiocinas que, em conjunto, contribuem para o estabelecimento do processo inflamatório. Logo nas primeiras horas após o desafio com a OVA, o recrutamento inicial de leucócitos é caracterizado por uma infiltração de neutrófilos, e 12 h após esta exposição ocorre aumento de eosinófilos e macrófagos no LBA dos camundongos. Em nosso estudo, demonstramos que o receptor de PAR-2 está expresso na membrana e no citoplasma de macrófagos alveolares dos camundongos desafiados com OVA, sugerindo os macrófagos como fortes candidatos para o entendimento das ações mediadas pela ativação de PAR-2.

O tratamento com antagonista de PAR-2, ENMD1068, reduziu expressivamente os índices de células mononucleares (45%) e de eosinófilos (84%) no LBA de camundongos quando analisados 48 h após o desafio com OVA, este controle é primordial para redução de possíveis danos ao tecido inflamado oriundo da liberação de mediadores inflamatórios. A redução de eosinófilos também foi observada no LBA de camundongos nocautes para PAR-2 expostos a ácaros de poeira doméstica quando comparados a camundongos selvagens (ASADUZZAMAN *et al.*, 2013; BOER *et al.*, 2014), bem como em camundongos pré-tratados com anticorpo monoclonal anti-PAR-2 via intranasal (ASADUZZAMAN *et al.*, 2013). Nos casos em que os animais receberam antígeno associado ao agonista SLIGRL-NH<sub>2</sub>, houve um aumento de 41% do recrutamento de eosinófilos quando comparado ao grupo OVA atestando os achados de Ebeling e col. (2005) que demonstraram que a administração conjunta de peptídeo ativador de PAR-2 e OVA foi capaz de aumentar significativamente o número de leucócitos totais e as concentrações

de IL-13 e TNF- $\alpha$  no LBA de camundongos quando comparada a administração apenas do peptídeo controle.

A ativação de PAR-2 através do agonista SLIGRL-NH<sub>2</sub> promoveu recrutamento de neutrófilos para o LBA dos camundongos 48 h após a exposição ao antígeno, sugerindo uma função importante da ativação deste receptor na manutenção e progressão do processo inflamatório, direcionando células agudas para o local. De acordo com a literatura, em modelos de inflamação pulmonar alérgica, ocorre aumento de neutrófilos logo nas primeiras horas (6-24 h) e de eosinófilos nas horas tardias (24-96 h) com conseqüente aumento na produção de TNF- $\alpha$  (ZUANY-AMORIM *et al.*, 1995) aumento de IL-4 a partir de 18 h e de IL-5 42 h após o desafio com a OVA (LOMMATZSCH *et al.*, 2006) como também, aumento de CXCL8, 4 h após contato com alérgenos de poeira ou pólen no LBA de pacientes asmáticos (NOCKER *et al.*, 1999), tais relatos reforçam a idéia de que a ativação do PAR-2 pelo peptídeo em modelo de asma contribui para chegada dos neutrófilos nas horas tardias e para a progressão da doença

Em nossos experimentos, a presença do antígeno foi capaz de aumentar os níveis da quimiocina CXCL1 e das citocinas pró-inflamatórias TNF e IL1- $\beta$  podendo ser correlacionado ao aumento da população de monócitos e macrófagos, que são fontes consideráveis destas citocinas (DE FILIPPO *et al.*, 2008; revisado por ARANGO DUQUE & DESCOTEAUX, 2014). O TNF em conjunto com IL1- $\beta$ , atua aumentando a adesão de leucócitos polimorfonucleares e mononucleares no endotélio vascular como também, induz a síntese de fatores quimiotáticos como CXCL8 que recruta neutrófilos em resposta a estímulo inflamatório (ISSEKUTZ; LOPES; ISSEKUTZ, 1992; LEE *et al.*, 1995). A OVA também conduziu a uma resposta Th2 que foi confirmada pelo aumento de IL-13 (citocina pró-inflamatória secretada pelos linfócitos Th2) e promove o crescimento de células B e regulação de IgE (MINTY *et al.*, 1993; BELLANTI *et al.*, 1998).

A ativação de PAR-2 através do tratamento por via intranasal com o peptídeo ativador de PAR-2, SLIGRL-NH<sub>2</sub>, nos camundongos imunizados contribuiu positivamente para o desencadeamento do processo inflamatório,

enquanto que o bloqueio da ação de agonistas endógenos pelo antagonista ENMD1068 promoveu efeito anti-inflamatório na asma experimental. Esta afirmação pode ser justificada pelo aumento das citocinas IL-4 e IL-13 nos linfonodos e da quimiocina CCL22 no LBA de camundongos ocorrido após administração conjunta de OVA+SLIGRL-NH<sub>2</sub>, que em conjunto direcionam ações como produção de IgE, diferenciação e migração de linfócitos Th2 na inflamação alérgica (HASHIMOTO *et al.*, 2006). Estudos demonstram que a ativação de PAR-2 pela elastase neutrofílica medeia a produção de IL-13 dependente da ativação de Ca<sup>++</sup>/ERK2 em macrófagos (YAMAGUCHI *et al.*, 2015), como também a instilação i.n. de SLIGRL-NH<sub>2</sub> promoveram aumento nos índices de TNF- $\alpha$ , IL-5 e IL-13 em camundongos desafiados com OVA (EBELING *et al.*, 2005; EBELING *et al.*, 2007).

Já o bloqueio da ativação de PAR-2, com anticorpo monoclonal anti-PAR-2, antes da sensibilização de camundongos via i.n. com ácaros de poeira doméstica reduziu os níveis de IL-4, IL-5 e IL-13 nos pulmões dos camundongos 24 h após a exposição com o antígeno (DAVIDSON *et al.*, 2013). Nos nossos experimentos, o tratamento com antagonista de PAR-2 ENMD1068 reduziu os níveis de IL-1 $\beta$  em 55% no LBA de camundongos quando analisado 48 h após o desafio com OVA, esta redução não foi observada para as demais citocinas analisadas. A IL-1 $\beta$  é uma citocina pró-inflamatória secretada principalmente por macrófagos alveolares após o contato com antígeno, sendo fundamental para a proliferação de linfócitos Th2 (LICHTMAN *et al.*, 1988), como também é necessária para ativação destes linfócitos durante a hiperresponsividade das vias aéreas induzida pela OVA em camundongos (NAKAE *et al.*, 2003). Dado que o ENMD1068 foi capaz de reduzir o número de células mononucleares incluindo monócitos e macrófagos no LBA, é possível que a redução dos níveis de IL-1 $\beta$  seja por este motivo, ou seja, diminuindo a população da principal fonte desta citocina e, conseqüentemente, os mediadores inflamatórios liberados pelos macrófagos alveolares.

Os macrófagos são derivados dos monócitos que após serem eliminados na corrente sanguínea, atravessam a parede dos vasos sanguíneos diferenciando-se em macrófagos nos diferentes tecidos (KENNEDY & ABKOWITZ, 1998). Dependendo do local de ativação que residem, os

macrófagos adquirem diferentes fenótipos como M1 (ativados pela via clássica) e M2 (ativados pela via alternativa), assim chamados em analogia ao padrão de citocinas Th1 e Th2 secretadas por linfócitos que irão direcionar a diferenciação dos macrófagos (CASSETA; CASSOL; POLI, 2011; PECHKOVSKY *et al.*, 2010). De modo geral, os macrófagos M1 apresentam atividade bactericida, produzem altos níveis de citocinas pró-inflamatórias e espécies reativas de oxigênio (BENOIT; DESNUES; MEGE, 2008), enquanto os M2 desempenham funções imuno-reguladoras, como depuração do parasita, atividade fagocítica aumentada e estão envolvidos na angiogênese e cicatrização de feridas (MARTINEZ *et al.*, 2008).

Os macrófagos M2 têm pelo menos três subconjuntos: M2a, induzido por IL-4 ou IL-13; M2b, induzido por complexos imunes e agonistas de receptores do tipo Toll (TLRs); e M2c, induzido pela citocina L-10 e glicocorticoides (MANTOVANI *et al.*, 2004; JIANG; ZHU, 2016). A ativação dos macrófagos do tipo M2 acontece principalmente na resposta de perfil Th2 que ocorre em respostas alérgicas, onde estes macrófagos juntamente com linfócitos Th2, mastócitos, eosinófilos, basófilos e células dendríticas irão desempenhar um papel importante na manutenção e magnitude da resposta. Apesar dessa subdivisão de M2 em a, b e c, em nossos experimentos utilizamos apenas marcadores para identificarmos a presença de macrófagos M2 (F4/80<sup>+</sup>MR<sup>+</sup>) no tecido pulmonar e no LBA dos camundongos desafiados com OVA ou PBS.

A presença do antígeno nas vias aéreas dos camundongos previamente imunizados induziu aumento da população dos macrófagos pulmonares para o fenótipo M2, enquanto o pré-tratamento com antagonista ENMD1068 antes do desafio com o antígeno reduziu em 37% a população de macrófagos M2 (F4/80<sup>+</sup>MR<sup>+</sup>) e aumentou (101%) a população de macrófagos (F4/80<sup>+</sup>MR<sup>-</sup>) que supostamente podem ser o subtipo M1, necessitando futuras investigações. O bloqueio de PAR-2 foi capaz de interferir na polarização dos macrófagos pulmonares o que indica um caminho para uma resposta efetora no controle da inflamação através da modulação da resposta imunológica que envolve a diminuição de macrófagos M2. Em relação aos macrófagos alveolares, não houve variações fenotípicas nos diferentes grupos analisados, talvez seja necessário a inclusão de outros marcadores para ser verificada a influência na

polarização, ou apenas pelo fato destes macrófagos serem diferentes morfológicamente por estarem continuamente expostos a partículas do meio externo.

Estudos reportados da literatura mostram que o acúmulo de M2 evolui juntamente com a cronicidade da doença e está relacionado com o remodelamento pulmonar e danos teciduais (VLAHOS; BOZINOVSKI, 2014), sendo que M2a tem sido correlacionado a desencadear um papel pró-inflamatório com liberação de IL-4 e IL-13 (JIANG; ZHU, 2016). Ao passo que a polarização aumentada dos macrófagos M1 tem demonstrado caráter antialérgico, uma vez que pacientes com asma menos severa possuem uma maior população de células M1 quando comparados aqueles com asma grave (DRAIJER *et al.*, 2013). Neste contexto, a modulação da polarização de macrófagos via bloqueio de PAR-2 representa um potencial terapêutico relevante.

Como conclusão parcial, no modelo experimental de asma induzido por três exposições à ovalbumina, a ativação do PAR-2 em diferentes células das vias aéreas desencadeia ações pró-inflamatórias distintas que, em conjunto, promovem a progressão do quadro inflamatório, promovendo acúmulo de leucócitos, produção de citocinas pró-inflamatórias, aumento da permeabilidade vascular e da expressão proteica do receptor.

## **6.2 Participação do PAR-2 no modelo experimental de asma induzido por seis exposições à ovalbumina**

Este modelo experimental teve como propósito a criação de uma resposta alérgica adequada em um menor espaço de tempo quando comparado aos modelos crônicos encontrados na literatura, em que fosse possível avaliar fenômenos como infiltração eosinofílica em maior intensidade nas vias aéreas, hipersecreção de muco e possível alteração nos parâmetros da mecânica respiratória. Nesse sentido, desenvolvemos um modelo experimental de asma agudo induzido pela OVA com maior número de

desafios intranasais em camundongos previamente sensibilizados para o antígeno. A imunização, assim como do protocolo anterior, também foi administrada por via intraperitoneal sendo acrescida de adjuvante.

Nossos resultados demonstraram que maior exposição ao antígeno acarretou maior infiltrado eosinofílico quando comparado ao modelo anterior, sendo possível avaliar a importância da ativação de PAR-2 nos parâmetros teciduais e mecânica respiratória quando há intensificação da resposta inflamatória alérgica, cumprindo com o objetivo inicial proposto. Neste modelo, 4 h após o último desafio com OVA, os eosinófilos já se encontravam aumentados em 26% no LBA quando comparados ao grupo tratado com PBS, com pico de migração em 48 h. A ativação dos receptores de PAR-2 é essencial para este fenômeno, uma vez que o bloqueio desta ação via antagonista reduziu o número de eosinófilos para o LBA dos camundongos imunizados em 50%, 58%, 94% quando avaliados respectivamente 4 h, 24 h e 48 h após o desafio com a OVA. Em relação aos neutrófilos, a OVA induziu aumento na migração para o LBA 4, 24 e 48 h após o desafio. Entretanto, o ENMD1068 reduziu este efeito unicamente no tempo de 48 h, em 73%, sendo possível que a maior intensidade do antígeno nas vias aéreas, necessite de uma maior dose do antagonista ENMD1068 para reduzir o número de neutrófilos dos tempos de 4 e 24 h, ou o acúmulo de neutrófilos nos tempos iniciais seja mais dependente de outros mediadores inflamatórios como, por exemplo, cistenil leucotrienos (CysLts).

A presença de neutrófilos no LBA de camundongos 48 h após o último desafio com a OVA, evidenciada neste modelo experimental, é considerada tardia. É provável que o número acentuado de eosinófilos já nas primeiras horas e conseqüente liberação de seus mediadores inflamatórios esteja contribuindo para a continuação do processo inflamatório e chegada de mais neutrófilos, sendo estes indicativos de cronicidade da doença. Simultaneamente, foi observado aumento considerável de linfócitos no grupo alérgico, sendo possível que sejam do tipo Th2. Destaca-se que no tempo correspondente ao pico de migração de eosinófilos também foi observado aumento dos leucócitos totais, células mononucleares e neutrófilos dependente da ativação de PAR-2.



Pressupõe-se que o antagonista conduza a redução do processo inflamatório, em parte, por reduzir a permeabilidade vascular que está aumentada nos processos inflamatórios alérgicos, dificultando, assim, a chegada dos leucócitos para as vias aéreas já que promoveu uma redução de 32% dos níveis de proteínas plasmáticas no LBA quando comparado ao grupo OVA. Possivelmente, ocorre bloqueio de PAR-2 nas células endoteliais, dificultando a diapedese das células inflamatórias bem como o extravasamento plasmático.

Estudos mostram que a ativação de PAR-2 desempenha um papel importante na indução da resposta inflamatória. A ativação de PAR-2 promove aumento na expressão de p-selectina nas células endoteliais (ZIMMERMAN *et al.*, 1994; COLLINS *et al.*, 1993; LANGER *et al.*, 1999), sabe-se que estas células expressam PAR-2 e quando ativadas há aumento intracelular de cálcio livre e ativação da fosfolipase C (MOLINO *et al.*, 1997b, VERGNOLLE, 1999). Camundongos nocautes para PAR-2 apresentaram menor rolamento e adesão de leucócitos quando comparados aos camundongos selvagens, enquanto o tratamento com peptídeo ativador em animais selvagens promoveu maior rolamento de leucócitos com diminuição média da velocidade e aumento da aderência de leucócitos nas células endoteliais quando comparados ao grupo tratado com peptídeo controle (LINDNER *et al.*, 2000). Embora em nossos experimentos não tenham sido avaliados fatores intracelulares de ativação do receptor em células endoteliais, nossos resultados são claros em demonstrar que o bloqueio da ativação de PAR-2 por via sistêmica provocou tanto a redução da infiltração leucocitária para o LBA de camundongos quanto do extravasamento plasmático, sinalizando em certo ponto para uma ação de proteases endógenas sob o receptor expresso endotélio dificultando adesão, rolamento e diapedese.

Em nosso estudo, sugerimos que a ativação de PAR-2 nas células endoteliais seja mediada endogenamente pela triptase liberada após a degranulação de mastócitos ativados, já que estas células são residentes nos tecidos e na submucosa das vias aéreas (PEARLMAN, 1999) e são essenciais ao desenvolvimento da resposta alérgica quando ativadas pela IgE (BACHERT *et al.*, 1990; CHANG *et al.*, 1990), estudos *in vitro* demonstraram que a triptase

pode clivar e ativar PAR-2 em células endoteliais, enterócitos e miócitos (MOLINO *et al.*, 1997b; CORVERA *et al.*, 1997; FOX *et al.*, 1997), sendo possível que este mesmo fenômeno ocorra em nossos experimentos.

Já no tecido pulmonar, o antígeno aumentou os índices das atividades das enzimas EPO e MPO, utilizadas como indicativo da presença de eosinófilos e neutrófilos, com redução em 41% e 60% respectivamente nos animais pré-tratados com ENMD1068. Porém, através da análise quantitativa não houve diferença estatística nos parâmetros do escore inflamatório do grupo pré-tratado com antagonista em relação aos animais alérgicos, embora seja importante ressaltar que havia predomínio de células mononucleares. Estes resultados sugerem que, além dos seus possíveis efeitos nas células do endotélio, a ativação de PAR-2 pode também ter um impacto na inflamação através de sua capacidade em controlar a chegada das células para o espaço bronco-alveolar bem como ativação das células e conseqüente liberação de suas enzimas e mediadores.

Uma vez presentes no tecido, as células inflamatórias irão contribuir para o desenvolvimento de inflamação, hiperresponsividade e obstrução das vias aéreas caracterizando a asma (LEE; GELFAND; LEE, 2001; LARCHÉ; ROBINSON; KAY, 2003). O desafio intranasal dos animais imunizados com o antígeno produziu um aumento significativo da resistência ao fluxo de ar nos camundongos alérgicos que é um fator agravante da doença pulmonar, efeito este, revertido pelo pré-tratamento dos animais com o antagonista de PAR-2, ENMD1068. O bloqueio de PAR-2 foi capaz de modular a função pulmonar visto que impediu a redução da capacidade total pulmonar e da complacência dinâmica induzida pela exposição à OVA, como também diminuiu a contração dos músculos lisos das vias aéreas em resposta à provocação com metacolina (1 mg/kg) o que refletiu numa redução da resistência ao fluxo de ar representado na curva fluxo-volume.

Recentemente, Koga e colaboradores (2013) demonstraram que o pré-tratamento com inibidor seletivo de elastase neutrofílica (Sivelestat), em modelo crônico de asma induzido por ovalbumina reduziu significativamente a hiperresponsividade das vias aéreas, quando comparado aos animais

desafiados com OVA e pré-tratados com solução salina, em resposta a metacolina. O tratamento com o inibidor também reduziu os níveis de citocinas Th2, IL-4, IL-5 e IL-13 e da quimiocina CCL11 no BAL 6 h após o último desafio com OVA (KOGA *et al.*, 2013). O antagonista de PAR-2, ENMD1068, utilizado em nossos experimentos, promoveu ações amplas em nosso modelo experimental, pois, é capaz de interferir nas diversas ações mediadas pela ativação do receptor não apenas por uma única protease endógena como elastase neutrofílica, mas, como também pela triptase liberada de mastócitos, impedindo a ativação de PAR-2 nas diferentes células das vias aéreas que o expressam.

Proteases de fungo *Alternaria alternata* aplicado a células epiteliais brônquicas humanas (16HBE14o) têm a capacidade de promover ativação de PAR-2 e aumento na concentração cálcio intracelular (BOITANO *et al.*, 2011). Em nossos experimentos, demonstramos que quando impedimos a ativação de PAR-2 pelas proteases endógenas nas diferentes células das vias aéreas, ocorreu diminuição da síntese de mucopolissacarídeos, pelas células epiteliais brônquicas, parênquima pulmonar e macrófagos, que está extremamente aumentada nos animais sensibilizados e desafiados com OVA. Em 2013, Koga e colaboradores demonstraram que o tratamento com Sivelestat reduziu o número de células positivas para PAS especificamente epitélio em animais desafiados com OVA. Neste modelo experimental de asma induzido por seis exposições á OVA, a redução da produção e liberação de muco no tecido pulmonar de camundongos observada no grupo tratado com o antagonista ENMD1068 é de grande importância, visto que o excesso de muco nas vias aéreas está correlacionado ao aumento da resistência e alterações na capacidade de contração do músculo liso brônquico (JAMES; CARROLL, 1995).

Simultaneamente com o processo inflamatório, infiltração leucocitária e produção de muco, este modelo de asma induziu deposição de colágeno, que é um indicativo de fibrose, em regiões peribronquiolar e perivascular podendo ser graduada com intensidade leve a moderada. A fibrose contribui significativamente para asma crônica sendo capaz de levar a insuficiência pulmonar e está associada à gravidade e casos resistentes à terapia (ROYCE

*et al.*, 2012). Estudos têm demonstrado a participação do PAR-2 na progressão da fibrose pulmonar. Recentemente, Soumyakrishnan e colaboradores (2014) demonstraram que o tratamento por via subcutânea com, Daidzein, uma isoflavona de soja, reduziu a expressão de PAR-2 induzida pela bleomicina em modelo experimental de fibrose pulmonar em ratos, como também do fator de crescimento de transformação beta (TGF- $\beta$ ) que é um fator pró-fibrótico (SOUMYAKRISHNAN *et al.*, 2014). Em nossos experimentos, o pré-tratamento dos animais com o antagonista de PAR-2 ENMD1068 em animais desafiados com o antígeno reduziu a produção de colágeno, avaliada pela intensidade de coloração pelo Gomori, em epitélio brônquico, bronquíolo e em células inflamatórias quando comparado ao grupo alérgico não tratado com este antagonista.

Sabe-se que a infiltração eosinofílica observada na inflamação das vias aéreas acarreta níveis aumentados do TGF- $\beta$  derivado de eosinófilos (BROIDE, 2008), uma citocina pró-fibrótica, conhecida por estimular a diferenciação de fibroblastos e a deposição de colágeno, levando a fibrose subepitelial e subsequente endurecimento das paredes traqueobrônquicas (MOORE; MURPHY; AGRAWAL, 2008). A ativação com peptídeo ativador de PAR-2, SLIGKV, em células hepáticas imortalizadas, promoveu aumento da produção de colágeno e liberação de TGF- $\beta$ , enquanto que camundongos nocaute para PAR-2 apresentaram menos fibrose hepática induzida pelo tetracloreto de carbono quando comparados aos camundongos selvagens (KNIGHT *et al.*, 2012). Além do mais, citocinas liberadas pelos macrófagos cronicamente ativados em resposta a antígenos tais como IL-13 estimulam a proliferação de fibroblastos, levando ao aumento da produção de colágeno que culmina em fibrose, característica das inflamações crônicas bem como aumentam a produção de muco pelas células epiteliais (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2012).

É de grande interesse a descoberta de vias que controlem o surgimento da fibrose pulmonar dado que é algo incapacitante e compromete a função respiratória e o bem estar do paciente. Baseado na literatura e de acordo com as evidências que encontramos com o tratamento com antagonista seletivo de PAR-2 na asma experimental: redução da deposição de colágeno e surgimento

de fibrose pulmonar nos camundongos, pressupomos que o efeito desencadeado pelo bloqueio do receptor estaria relacionado à diminuição da ativação de células endoteliais e liberação de TGF- $\beta$ , apresentando efeito anti-fibrótico, uma hipótese que merece ser melhor investigada. É possível, também, que a redução de macrófagos observada nos camundongos tratados com ENMD1068 tenha reduzido a liberação de IL-13 que promove fibrose como parte da fase de reparação tecidual dos estados inflamatórios, evitando a perda da função pulmonar que observamos em nossos resultados de mecânica.

Em concordância com resultados já demonstrados em que os animais alérgicos tiveram aumento nos níveis de CCL5 no BAL, neste modelo o antígeno induziu marcação intensa para CCL5 em epitélio brônquico, infiltrado perivascular e peribronquiolar, como também no citoplasma de células mononucleares especificamente macrófagos e linfócitos. Embora o escore inflamatório não tenha sido estatisticamente diferente entre os grupos tratados com PBS e antagonista, foi observada uma tendência de redução na intensidade de marcação no epitélio e nas células inflamatórias dos animais pré-tratados com ENMD1068, sugerimos que uma análise quantitativa levando em consideração a intensidade dada em pixels de cada imagem permitirá uma melhor comparação entre os grupos experimentais. As células epiteliais liberam diferentes mediadores, fatores quimiotáticos e citocinas como CCL5, TGF- $\beta$  e GM-CSF, contribuindo para perpetuação da lesão tecidual e formação de cicatriz (CHUNG & BARNES, 1999; SACCO *et al.*, 1992) tornando o efeito do antagonista sobre estas células uma ferramenta valiosa a ser estudada, evitando a progressão da asma alérgica.

Os mecanismos moleculares envolvidos na ativação de PAR-2 na inflamação respiratória alérgica e o controle das ações de proteases endógenas ainda necessita ser mais bem compreendido e estudado, particularmente devido às inúmeras interações entre as diferentes células das vias respiratórias. Entretanto, este estudo traz uma série de resultados que contribuem para a compreensão do papel do PAR-2, em alguns fenômenos cruciais que ocorrem na asma induzida por alérgeno tais como infiltração de eosinófilos nas vias aéreas, aumento da permeabilidade vascular,

hiperresponsividade brônquica e remodelamento pulmonar por apresentar características como hipersecreção de muco e deposição de colágeno. A ativação de PAR-2 por proteases endógenas desencadeou fenômenos pró-inflamatórios que em conjunto levam a piora de sintomas característicos da asma, reforçando o uso do antagonista no controle da inflamação pulmonar alérgica.

## 7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A relevância dos modelos experimentais aqui apresentados recai sobre a semelhança com o que acontece na doença humana e contribui para o entendimento do papel de PAR-2 em alguns fenômenos envolvendo a asma alérgica induzida por alérgeno, fornecendo uma visão sobre possíveis mecanismos bem como ajudam a identificar células e moléculas que desempenham papéis fundamentais na regulação do processo inflamatório local.

Nossos resultados demonstram que há modulação da resposta imunológica via ativação de receptores ativados por proteases (PAR) 2 na asma experimental aguda. Esta modulação envolve ações sob o recrutamento leucocitário, produção e liberação de citocinas e quimiocinas, a polarização de macrófagos com fenótipo M2, as alterações na permeabilidade vascular, a expressão protéica do receptor em leucócitos, a função e remodelamento pulmonar, a produção de muco e o surgimento de fibrose.

O bloqueio das ações de proteases ativadoras de PAR-2 desempenha um papel considerável no controle da inflamação respiratória alérgica e efeitos expressivos na redução da inflamação, remodelamento, alterações na mecânica pulmonar e a hiper-reatividade brônquica. Inferimos que no processo de inflamação alérgica, a presença do antígeno nas vias aéreas desencadeia ativação e liberação de proteases conhecidas como sendo ativadoras de PAR-2, a triptase de mastócitos e a elastase neutrofílica, via resposta imune de padrão Th2, favorecendo a ativação do receptor em diferentes células e ocasionando a progressão da doença. Sugerimos que o controle da resposta inflamatória desencadeada pelo bloqueio da ativação de PAR-2 se inicie na modulação no perfil de citocinas e quimiocinas e posteriormente no controle da expressão do receptor, ativação das células e recrutamento leucocitário.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. H. I. V. **In: Imunologia celular e molecular. 7ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012.**

ALVES-FILHO, J. C.; DE FREITAS A.; RUSSO, M.; CUNHA, F. Q. Toll-like receptor 4 signaling leads to neutrophil migration impairment in polymicrobial sepsis. **Critical Care Medicine.** v. 34, n. 2, p. 461-70, 2006.

ANSEL, K. M.; DJURETIC, I.; TANASA, B.; RAO, A. Regulation of Th2 differentiation and IL4 locus accessibility. **Annual Review of Immunology.** v. 24, p. 607-656, 2006.

ARANGO DUQUE, G.; DESCOTEAUX, A. Macrophage cytokines: involvement in immunity and infectious diseases. **Frontiers in Immunology.** v. 5, p. 491, 2014.

ARIZMENDI, N. G.; ABEL, M.; MIHARA, K.; DAVIDSON, C.; POLLEY, D.; NADEEM, A.; EL MAYS, T.; GILMORE, B. F.; WALKER, B.; GORDON, J. R.; HOLLENBERG, M. D.; VLIAGOFTIS H. Mucosal allergic sensitization to cockroach allergens is dependent on proteinase activity and proteinase-activated receptor-2 activation. **The Journal of Immunology.** v. 186, n. 5, p. 3164-72, 2011.

ARIZMENDI, N. G.; ABEL, M.; MIHARA, K.; DAVIDSON, C.; POLLEY, D.; NADEEM, A.; EL MAYS, T.; GILMORE, B. F.; WALKER, B.; GORDON, J. R.; HOLLENBERG, M. D.; VLIAGOFTIS, H. Mucosal allergic sensitization to cockroach allergens is dependent on proteinase activity and proteinase activated receptor-2 activation. **The Journal of Immunology.** v. 186, p. 3164-72, 2011.

ASOKANANTHAN, N.; GRAHAM, P. T.; FINK, J.; KNIGHT, D. A.; BAKKER, A. J.; WILLIAM, A. S.; THOMPSON, P. J.; STEWART, G. A. Activation of Protease-Activated Receptor (PAR)-1, PAR-2 and PAR-4 Stimulates IL-6, IL-8, and Prostaglandin E2 Release from Human Respiratory Epithelial Cells. **The Journal of Immunology.** v. 168, p. 3577-3585, 2002.



BACHERT, C.; PROHASKA, P.; PIPKORN, U. IgE-positive mast cells on the human nasal mucosal surface in response to allergen exposure. **Rhinology**. v. 28, p. 149-158, 1990.

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

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

BARRY, G. D.; SUEN, J. Y.; LE, G. T.; COTTERELL, A.; REID, R. C.; FAIRLIE, D. P. Novel Agonists and Antagonists for Human Protease Activated Receptor 2. **Journal of Medicinal Chemistry**. v. 53, p. 7428-7440, 2010.

BARTON, B. E. IL-6: insights into novel biological activities. **Clinical Immunology and Immunopathology**. v. 85, p. 16-20, 1997.

BAUR, X.; CHEN, Z.; LIEBERS, V. Exposure-response relationships of occupational inhalative allergens. **Clinical and Experimental Allergy**. v. 28, n. 5, p. 537-44, 1998.

BAYAT, S.; STRENGELL, S.; PORRA, L.; JANOSI, T. Z.; PETAK, F.; SUHONEN, H.; SUORTTI, P.; HANTOS, Z.; SOVIJARVI, A. R.; HABRE, W. Methacholine and ovalbumin challenges assessed by forced oscillations and synchrotron lung imaging. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**. v. 180, p. 296-303, 2009.

BELLANTI, J. A. Cytokines and allergic diseases: clinical aspects. **Allergy and Asthma Proceedings**. v. 19, n. 6, p. 337-41, 1998.

BENOIT, M.; DESNUES, B.; MEGE, J. L. Macrophage polarization in bacterial infections. **The Journal of Immunology**. v. 181, p. 3733-3739, 2008.

BESNARD, A. G.; GUABIRABA, R.; NIEDBALA, W.; PALOMO, J.; REVERCHON, F.; SHAW, T. N.; COUPER, K. N.; RYFFEL, B.; LIEW, F. Y. IL-33-mediated protection against experimental cerebral malaria is linked to

induction of type 2 innate lymphoid cells, M2 macrophages and regulatory T cells. **PLOS Pathogens**. v. 11, n. 2, p. e1004607, 2015.

BLANCHARD, C.; ROTHENBERG, M. E. Biology of the eosinophil. **Advances in Immunology**. v. 101, p. 81-121, 2009.

BOER, J. D.; VAN'T VEER, C.; STROO, I.; VAN DER MEER, A. J.; DE VOS, 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. 6, p. 618-25, 2014.

BOGAERT, P.; NAESSENS, T.; DE KOKER, S.; HENNUY, B.; HACHA, J.; SMET, M.; CATALDO, D.; DI VALENTIN, E.; PIETTE, J.; TOURNOY, K. G.; GROOTEN, J. Inflammatory signatures for eosinophilic vs. neutrophilic allergic pulmonary inflammation reveal critical regulatory checkpoints. **American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology**. v. 300, n. 5, p. L679-90, 2011.

BOITANO, S.; FLYNN, A. N.; SHERWOOD, C. L.; SCHULZ, S. M.; HOFFMAN, J.; GRUZINOVA, I.; DAINES, M. O. *Alternaria alternata* serine proteases induce lung inflammation and airway epithelial cell activation via PAR2. **American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology**. v. 300, p. L605–14, 2011.

BORDON, J.; ALIBERTI, S.; FERNANDEZ-BOTRAN, R.; URIARTE, S. M.; RANE, M. J.; DUVVURI, P.; PEYRANI, P.; MORLACCHI, L. C.; BLASI, F.; RAMIREZ, J. A. Understanding the roles of cytokines and neutrophil activity and neutrophil apoptosis in the protective versus deleterious inflammatory response in pneumonia. **International Journal of Infectious Diseases**. v. 17, p. e76–e83, 2013.

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, n. 4, p. 224-30, 2010.

BREWER, J. M.; CONACHER, M.; HUNTER, C. A.; MOHRS, M.; BROMBACHER, F.; ALEXANDER, J. Aluminium hydroxide adjuvant initiates strong antigen-specific Th2 responses in the absence of IL-4- or IL-13-mediated signaling. **The Journal of Immunology**. v. 163, n. 12, p. 6448-54, 1999.

BREWER, J. M.; CONACHER, M.; HUNTER, C. A.; MOHRS, M.; BROMBACHER, F.; ALEXANDER, J. Aluminium hydroxide adjuvant initiates strong antigen-specific Th2 responses in the absence of IL-4- or IL-13-mediated signaling. **The Journal of Immunology**. v. 163, n. 12, p. 6448-54, 1999.

BROIDE, D. H. Immunologic and inflammatory mechanisms that drive asthma progression to remodeling. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**. v. 121, p. 560–570, 2008.

BRUSSELLE, G. G.; MAES, T.; BRACKE, K. R. Eosinophils in the spotlight: Eosinophilic airway inflammation in nonallergic asthma. **Nature Medicine**. v. 19, n. 8, p. 977-9, 2013.

BUSSE, W.; KRAFT, M. Cysteinyl leukotrienes in allergic inflammation: strategic target for therapy. **Chest**. v.127, n.4, p.1312-26, 2005.

CARVALHO, R. F. S.; NILSSON, G.; HARVIMA, I. T. Increased mast cell expression of PAR-2 in skin inflammatory diseases and release of IL-8 upon PAR-2 activation. **Experimental Dermatology**. v. 19, n. 2, p. 117-22, 2010.

CASSATELLA, M. A. The production of cytokines by polymorphonuclear neutrophils. **Immunology Today**. v. 16, p. 21-26, 1995.

CASSETTA, L.; CASSOL, E.; POLI, G. Macrophage Polarization in Health and Disease. **The Scientific World Journal**. v. 11, p. 2391-2402, 2011.

CHANG, T. W.; DAVIS, F. M.; SUN, N. C.; SUN, C. R. Y.; MACGLASHAN, D. W.; HAMILTON, R. G. Monoclonal antibodies specific for human IgE-producing B cells: a potential therapeutic for IgE-mediated allergic diseases. **Biotechnology**. v. 8, p. 122-126, 1990.

CHEN, D.; CARPENTER, A.; ABRAHAMS, J.; CHAMBERS, R. C.; LECHLER, R. I.; MCVEY, J. H.; DORLING, A. Protease-activated receptor 1 activation is necessary for monocyte chemoattractant protein 1-dependent leucocyte recruitment in vivo. **The Journal of Experimental Medicine**. v. 205, p. 1739-46, 2008.

CHUNG, K. F.; BARNES, P. J. Cytokines in asthma. **Thorax**. v. 54, n. 9, p. 825-57, 1999.

CICALA, C. Protease activated receptor 2 and the cardiovascular system. **British Journal of Pharmacology**. v. 135, n.1, p. 14–20, 2002.

COCKS, T. M.; MOFFATT, J. D. Protease activated-receptors: sentries for inflammation. **Trends in Pharmacological Sciences**. v. 21, n. 3, p. 103-108, 2000.

COCKS, T. M.; MOFFATT, J. D. Protease-activated receptor-2 (PAR-2) in the airways. **Pulmonary Pharmacology and Therapeutics**. v. 14, p. 183–191, 2001.

COELHO, A. M.; OSSOVSKAYA, V.; BUNNETT, N. W. Proteinase- Activated Receptor-2: Physiological and Pathophysiological Roles. **Current medicinal chemistry. Cardiovascular and hematological agents**. v. 1, p. 61-72, 2003

COHN, L.; ELIAS, J. A.; CHUPP, G. L.; Asthma: mechanisms of disease persistence and progression. **Annual Review of Immunology**. v. 22, p. 789-815, 2004.

COLLINS, P. W.; MACEY, M. G.; CAHILL, M. R.; NEWLAND, A. C. von Willebrand factor release and P-selectin expression is stimulated by thrombin and trypsin but not IL-1 in cultured human endothelial cells. **Thrombosis and Haemostasis**. v. 70, n.2, p. 346-350, 1993.

CONROY, D. M.; HUMBLE, A. A.; RANKIN, S. M.; PALFRAMAN, R. T.; COLLINS, P. D.; JOHNSON, D. A. G.; JOSE, P. J.; WILLIAMS, T. J. The Role of the Eosinophil-selective Chemokine, Eotaxin, in Allergic and Non-allergic

Airways Inflammation. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 92, p. 183-191, 1997.

CORVERA, C. U.; DERY, O.; MCCONALOGUE, K.; BOHM, S. K.; KHITIN, L. M.; CAUGHEY, G. H.; PAYAN, D. G.; BUNNETT, N. W. Mast cell tryptase regulates colonic myocytes through proteinase-activated receptor-2. **The Journal of Clinical Investigation**. v. 100, n.6, p. 1383-1393, 1997.

COUGHLIN, S. R. Trombin signaling and protease-activated receptors. **Nature**. v. 407, 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.

DAHLÉN, S. E.; HEDQVIST, P.; HAMMARSTRÖM, S.; SAMUELSSON, B. Leukotrienes are potent constrictors of human bronchi. **Nature**. v. 288, n. 5790, p.484-6, 1980.

DATASUS. Departamento de Informática do SUS. Saúde: **Dez cuidados simples para prevenir a asma no inverno**. Disponível em: <<http://datasus.saude.gov.br/noticias/atualizacoes/657-saude-dez-cuidados-simples-para-prevenir-a-asma-no-inverno>>. Acesso em: 31 de janeiro, 2017.

DAVIDSON, C. E.; ASADUZZAMAN, M.; ARIZMENDI, N. G.; POLLEY, D.; WU, Y.; GORDON, J. R.; HOLLENBERG, M. D.; CAMERON, L.; VLIAGOFTIS, H. Proteinase-activated receptor-2 activation participates in allergic sensitization to house dust mite allergens in a murine model. **Clinical and Experimental Allergy**. v. 43, n. 11, p. 1274-85, 2013.

DE CAMPO, B. A.; HENRY, P. J. Stimulation of protease-activated receptor-2 inhibits airway eosinophilia, hyperresponsiveness and bronchoconstriction in a murine model of allergic inflammation. **British Journal of Pharmacology**. v. 144, p. 1100-1108, 2005.

DE FILIPPO, K.; HENDERSON, R. B.; LASCHINGER, M.; HOGG, N. Neutrophil Chemokines KC and Macrophage-Inflammatory Protein-2 Are Newly

Synthesized by Tissue Macrophages Using Distinct TLR Signaling Pathways. **Journal Immunology**. v. 180, n. 6, p. 4308-4315, 2008.

DE HEER, H. J.; HAMMAD, H.; SOULLIÉ, T.; HIJDRA, D.; VOS, N.; WILLART, M. A.; HOOGSTEDEN, H. C.; LAMBRECHT, B. N. Essential role of lung plasmacytoid dendritic cells in preventing asthmatic reactions to harmless inhaled antigen. **The Journal of Experimental Medicine**. v. 200, n. 1, p. 89-98, 2004.

DEJAGER, L.; DENDONCKER, K.; EGGERMONT, M.; SOUFFRIAUX, J.; VAN HAUWERMEIREN, F.; WILLART, M.; VAN WONTERGHEM, E.; NAESSENS, T.; BALLEGEER, M.; VANDEVYVER, S.; HAMMAD, H.; LAMBRECHT, B.; DE BOSSCHER, K.; GROOTEN, J.; LIBERT, C. Neutralizing TNF $\alpha$  restores glucocorticoid sensitivity in a mouse model of neutrophilic airway inflammation. **Mucosal Immunology**. v. 8, n. 6, p. 1212-25, 2015.

DIETRICH, W. F.; MILLER, J.; STEEN, R.; MERCHANT, M. A.; DAMRON-BOLES, D.; HUSAIN, Z.; DREDGE, R.; DALY, M. J.; INGALLS, K. A.; O'CONNOR, T. J. A comprehensive genetic map of the mouse genome. **Nature**. v. 380, n. 6570, p.149-52, 1996.

DONLON, T. A.; KRENSKY, A. M.; WALLACE, M. R.; COLLINS, F. S.; LOVETT, M.; CLAYBERGER, C. Localization of a human T-cell-specific gene, RANTES (D17S136E), to chromosome 17q11.2-q12. **Genomics**. v. 6, n. 3, p. 548-53, 1990.

DRAIJER, C.; ROBBE, P.; BOORSMA, C. E.; HYLKEMA, M. N.; MELGERT, B. N. Characterization of macrophage phenotypes in three murine models of housedust-mite-induced asthma. **Mediators of Inflammation**. v. 2013, p. 632049, 2013.

EBELING, C.; FORSYTHE, P.; NG, J.; GORDON, J. R.; HOLLENBERG, M. Vliagoftis, H. Proteinase-activated receptor 2 activation in the airways enhances antigen-mediated airway inflammation and airway hyperresponsiveness through different pathways. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**. v. 115, n. 3, p. 623-630, 2005.

EBELING, C.; LAM, T.; GORDON, J. R.; HOLLENBERG, M. D.; VLIAGOFTIS, H. Proteinase activated receptor2 promotes allergic sensitization to an inhaled antigen through a TNF mediated pathway. **The Journal of Immunology**. v. 179, p. 2910-2917, 2007.

ELIAS, J. A.; LEE, C. G.; ZHENG, T.; MA, B.; HOMER, R. J.; ZHU, Z. New insights into the pathogenesis of asthma. **The Journal of Clinical Investigation**. v. 111, p. 291-7, 2003.

EVANS, T. W.; ROGERS, D. F.; AURSUDKIJ, B.; CHUNG, K. F.; BARNES, P. J. Inflammatory mediators involved in antigen-induced airway microvascular leakage in guinea pigs. **The American Review of Respiratory Disease**. v. 138, n. 2, p. 395-9, 1988.

FACCIOLI, L. H.; MOKWA, V. F.; SILVA, C. L.; ROCHA, G. M.; ARAUJO, J. I.; NAHORI, M. A.; VARGAFTIG, B. B. IL-5 drives eosinophils from bone marrow to blood and tissues in a guinea-pig model of visceral larva migrans syndrome. **Mediators of Inflammation**. v. 5, n. 1, p. 24-31, 1996.

FACCIOLI, L. H.; NOURSHARGH, S.; MOQBEL, R.; WILLIAMS, F. M.; SEHMI, R.; KAY, A. B.; WILLIAMS, T. J. The accumulation of In-eosinophils induced by inflammatory mediators, in vivo. **Immunology**. v. 73, n. 2, p. 222-227, 1991.

FAHY, J. V. Eosinophilic and neutrophilic inflammation in asthma: insights from clinical studies. **Proceedings of the American Thoracic Society**. v. 6, n. 3, p. 256-9, 2009.

FIELDING, C. A.; MCLOUGHLIN, R. M.; MCLEOD, L.; COLMONT, C. S.; NAJDOVSKA, M.; GRAIL, D.; ERNST, M.; JONES, S. A.; TOPLEY, N.; JENKINS, B. J. IL-6 regulates neutrophil trafficking during acute inflammation via STAT3. **Journal of Immunology**. v. 181, n. 3, p. 2189-95, 2008.

FOLEY, S. C.; HAMID, Q. Images in allergy and immunology: neutrophils in asthma. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**. v. 119, p. 1282-1286, 2007.

FOSTER, P. S.; HOGAN, S. P.; RAMSAY, A. J.; MATTHAEI, K. I.; YOUNG, I. G. Interleukin 5 deficiency abolishes eosinophilia, airways hyperreactivity, and lung damage in a mouse asthma model. **The Journal of Experimental Medicine**. v. 183, n. 1, p. 195-201, 1996.

FOSTER, P. S.; MOULD, A. W.; YANG, M.; MACKENZIE, J.; MATTES, J.; HOGAN, S. P.; MAHALINGAM, S.; MCKENZIE, A. N.; ROTHENBERG, M. E.; YOUNG, I. G.; MATTHAEI, K. I.; WEBB, D. C. Elemental signals regulating eosinophil accumulation in the lung. **Immunological Reviews**. v.179, p.173-81, 2001.

FOX, M. T.; HARRIOTT, P.; WALKER, B.; STONE, S. R. Identification of potential activators of proteinase-activated receptor-2. **FEBS Letters**. v. 417, n.3, p. 267-269, 1997.

FRANGOVA, V.; SACCO, O.; SILVESTRI, M.; ODDERA, S.; BALBO, A.; CRIMI, E.; ROSSI, G. A. BAL neutrophilia in asthmatic patients. A by-product of eosinophil recruitment? **Chest**. v. 110, n. 5, p. 1236-42, 1996.

FREW, A. J. Advances in environmental and occupational disorders. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**. v. 11, p. S824-8, 2003.

GARCIA, C. C.; RUSSO, R. C.; GUABIRABA, R.; FAGUNDES, C. T.; POLIDORO, R. B.; TAVARES, L. P.; SALGADO, A. P.; 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, p. 1001171, 2010.

GIBSON, P. G.; SIMPSON, J. L.; SALTOS, N. Heterogeneity of airway inflammation in persistent asthma. **Chest**. v. 119, p. 1329-36, 2001.

Global Initiative for Asthma (**GINA**). Global Strategy for Asthma Management and Prevention, 2016. Disponível em: <<http://www.ginasthma.org>> Acesso em: 31 de Janeiro, 2017.

Global Initiative for Asthma (**GINA**). Global Strategy for Asthma Management and Prevention: updated 2015. Disponível em: <<http://www.ginasthma.org/>>



local/uploads/files/GINA\_Report\_2015\_Aug11.pdf> Acesso em: 16 de setembro, 2017.

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, n.5-6, p. 275-82, 2012.

GREEN, R. H.; BRIGHTLING, C. E.; WOLTMANN, G.; PARKER, D.; WARDLAW, A. J.; PAVORD, I. D. Analysis of induced sputum in adults with asthma: identification of subgroup with isolated sputum neutrophilia and poor response to inhaled corticosteroids. **Thorax**. v. 57, p. 875-9, 2002.

GREENFEDER, S.; UMLAND, S. P.; CUSS, F. M.; CHAPMAN, R. W.; EGAN, R. W. Th2 cytokines and asthma. The role of interleukin-5 in allergic eosinophilic disease. **Respiratory Research**. v. 2, n. 2, p. 71-79, 2001.

GUALDI, L. P.; PEREIRA, A. C.; MASIERO, L.; NUÑEZ, N. K.; CAO, R.; PITREZ, P. M. C. Murine models for asthma research: An updated critical analysis. **Scientia Medica**. v. 20, n. 3, p. 236-242, 2010.

HABRE, W.; ADAMICZA, A.; LELE, E.; NOVAK, T.; SLY, P. D.; PETAK, F. The involvement of histaminic and muscarinic receptors in the bronchoconstriction induced by myorelaxant administration in sensitized rabbits. **Anesthesia & Analgesia**. v. 107, p. 1899-1906, 2008.

HAMMAD, H.; LAMBRECHT, B. N. Dendritic cells and epithelial cells: linking innate and adaptive immunity in asthma. **Nature Reviews Immunology**. v. 8, n. 3, p. 193-204, 2008.

HANSBRO, P. M.; BEAGLEY, K. W.; HORVAT, J. C.; GIBSON, P. G. Role of atypical bacterial infection of the lung in predisposition/protection of asthma. **Pharmacology & Therapeutics**. v. 101, n. 3, p. 193-210, 2004.

HASHIMOTO, S.; NAKAMURA, K.; OYAMA, N.; KANEKO, F.; TSUNEMI, Y.; SAEKI, H.; TAMAKI, K. Macrophage-derived chemokine (MDC)/CCL22 produced by monocyte derived dendritic cells reflects the disease activity in

patients with atopic dermatitis. **Journal of Dermatological Science**. v. 44, n. 2, p. 93-9, 2006.

HOGAN, S. P.; ROSENBERG, H. F.; MOQBEL, R.; PHIPPS, S.; FOSTER, P. S.; LACY, P.; KAY, A. B.; ROTHENBERG, M. E. Eosinophils: Biological Properties and Role in Health and Disease. **Clinical and Experimental Allergy**. v. 38, p. 709-750, 2008.

HOLGATE, S. T. Pathogenesis of asthma. **Clinical Experimental Allergy**. v. 38, n. 6, p. 872-97, 2008.

HOLGATE, S. T. The epidemic of allergy and asthma. **Nature**. vol. 402, p.B2-4, 1999.

HOLGATE, S. T.; DAVIES, D. E. Rethinking the pathogenesis of asthma. **Immunity**. v. 31, n. 3, p. 362-7, 2009.

HOLLENBERG, M. D.; COMPTON, S. J. International Union of Pharmacology. XXVIII. Proteinase-activated receptors. **Pharmacological Reviews**. v. 54, n. 2, p. 203-217, 2002.

HORVAT, J. C.; BEAGLEY, K. W.; WADE, M. A.; PRESTON, J. A.; HANSBRO, N. G.; HICKEY, D. K.; KAIKO, G. E.; GIBSON, P. G.; FOSTER, P. S.; HANSBRO, P. M. Neonatal chlamydial infection induces mixed T-cell responses that drive allergic airway disease. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**. v. 176, n. 6, p. 556-64, 2007.

HORVAT, J. C.; BEAGLEY, K. W.; WADE, M. A.; PRESTON, J. A.; HANSBRO, N. G.; HICKEY, D. K.; KAIKO, G. E.; GIBSON, P. G.; FOSTER, P. S.; HANSBRO, P. M. Neonatal chlamydial infection induces mixed T-cell responses that drive allergic airway disease. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**. v. 176, n. 6, p. 556-64, 2007.

HOULE, S.; PAPEZ, M. D.; FERAZZINI, M.; HOLLENBERG, M. D.; VERGNOLLE, N. Neutrophils and kallikrein-kinin system in proteinase-activated receptor 4- mediated inflammation in rodents. **British Journal Pharmacology**. v. 146, n. 5, p. 670-678, 2005.

HUMBERT, M.; MENZ, G.; YING, S.; CORRIGAN, C. J.; ROBINSON, D. S.; DURHAM, S. R.; KAY, A. B. The immunopathology of extrinsic (atopic) and intrinsic (non-atopic) asthma: more similarities than differences. **Immunology Today**. v. 20, n. 11, p. 528-33, 1999.

ISHII, K.; HEIN, L.; KOBILKA, B.; COUGHLIN, S. R. Kinetics of thrombin receptor cleavage on intact cells. Relation to signaling. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 268, n. 13, p. 9780-6, 1993.

ISSEKUTZ, A. C.; LOPES, N.; ISSEKUTZ, T. B. Role of interleukin-1 and tumour necrosis factor in leukocyte recruitment to acute dermal inflammation. **Mediators of Inflammation**. v.1, n. 5, p. 347-53, 1992.

IV Diretrizes Brasileiras para o manejo da asma. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**. v. 32, p. s447-s474, 2006. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1806-37132006001100002&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1806-37132006001100002&lng=en&nrm=iso)>. Acesso em: 12 de Janeiro, 2017.

JAMES, A. L.; CARROLL, N. Theoretic effects of mucus gland discharge on airway resistance in asthma. **Chest**. v. 107, p. 110, 1995.

JIANG, Z.; ZHU, L. Update on the role of alternatively activated macrophages in asthma. **Journal of Asthma and Allergy**. v. 9, p. 101-7, 2016.

JOHNSON, V. J.; MATHESON, J. M; LUSTER, M. I. Animal models for diisocyanate asthma: answers for lingering questions. **Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology**. v. 4, n. 2, p.105-10, 2004.

JONASSON, S.; HEDENSTIERNA, G.; HEDENSTRÖM, H.; HJOBERG, J. Comparisons of effects of intravenous and inhaled methacholine on airway physiology in a murine asthma model. **Respiratory Physiology and Neurobiology**. v. 165, n. 2-3, p. 229-36, 2009.

KARJALAINEN, J.; HULKKONEN, J.; NIEMINEN, M. M.; HUHTALA, H.; AROMAA, A.; KLAUKKA, T.; HURME, M. Interleukin10 gene promoter region polymorphism is associated with eosinophil count and circulating

immunoglobulin E in adult asthma. **Clinical and Experimental Allergy**. v. 33, p. 78-83, 2003.

KAROL, M. H. Animal models of occupational asthma. **The European Respiratory Journal**. v. 7, p. 555-68, 1994.

KAWABATA, A.; KAWAO, N. Physiology and pathophysiology of proteinase-activated receptors (PARs): PARs in the respiratory system: cellular signaling and physiological/pathological roles. **Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 97, p. 20-24, 2005.

KAWABATA, A.; KURODA, R.; MINAMI, T.; KATAOKA, K.; TANEDA, M. Increased vascular permeability by a specific agonist of protease-activated receptor-2 in rat hindpaw. **British Journal of Pharmacology**. v. 125, p. 419-422, 1998.

KAWABATA, A.; MORIMOTO, N.; NISHIKAWA, H.; KURODA, R.; ODA, Y.; KAKEHI, K. Activation of protease-activated receptor 2 (PAR-2) triggers ucin secretion in the rat sublingual gland. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v. 270, n. 1, p. 298-302, 2000.

KELSO, E. B.; LOCKHART, J. C.; HEMBROUGH, T.; DUNNING, L.; PLEVIN, R.; HOLLENBERG, M. D.; SOMMERHOFF, C. P.; LEAN, J. S.; FERREL W. R. Therapeutic Promise of Proteinase-Activated Receptor-2 Antagonist in Joint Inflammation. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. v. 316, n. 3, p. 1017-1024, 2005.

KENNEDY, D. W.; ABKOWITZ, J. L. Mature monocytic cells enter tissues and engraft. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v. 95, n. 25, p.14944-9, 1998.

KIM, H. Y.; DEKRUYFF, R. H.; UMETSU, D. T. The many paths to asthma: phenotype shaped by innate and adaptive immunity. **Nature Immunology**. v. 11, n. 7, p. 577-584, 2010.

KIM, J. Y.; SOHN, J. H.; CHOI, J. M.; LEE, J. H.; HONG, C. S.; LEE, J. S.; PARK, J. W. Alveolar Macrophages Play a Key Role in Cockroach-Induced

Allergic Inflammation via TNF- $\alpha$  Pathway. **PLoS ONE**. v. 7, n. 10, p. e47971, 2012.

KNIGHT, V.; TCHONGUE, J.; LOURENSZ, D.; TIPPING, P.; SIEVERT, W. Protease-activated receptor 2 promotes experimental liver fibrosis in mice and activates human hepatic stellate cells. **Hepatology**. v. 55, n. 3, p. 879-87, 2012.

KOGA, H.; MIYAHARA, N.; FUCHIMOTO, Y.; IKEDA, G.; WASEDA, K.; ONO, K.; TANIMOTO, Y.; KATAOKA, M.; GELFAND, E. W.; TANIMOTO, M.; KANEHIRO, A. Inhibition of neutrophil elastase attenuates airway hyperresponsiveness and inflammation in a mouse model of secondary allergen challenge: neutrophil elastase inhibition attenuates allergic airway responses. **Respiratory Research**. v. 14, n. 1, p. 8, 2013.

KOPF, M.; SCHNEIDER, C.; NOBS, S. P. The development and function of lung-resident macrophages and dendritic cells. **Nature Immunology**. v. 16, p. 36-44, 2015.

KRUG, N.; RABE, K. F. Animal Models for Human Asthma: The Perspective of a Clinician. **Current Drug Targets**. v. 9, n. 6, p. 438-42, 2008.

KUMAR, R. K.; HERBERT, C.; FOSTER, P. S. The "classical" ovalbumin 10. challenge model of asthma in mice. **Current Drug Targets**. v. 9, p. 485-94, 2008.

KUNG, T. T.; CRAWLEY, Y.; LUO, B.; YOUNG, S.; KREUTNER, W.; CHAPMAN, R. W. Inhibition of pulmonary eosinophilia and airway hyperresponsiveness in allergic mice by rolipram: involvement of endogenously released corticosterone and catecholamines. **British Journal of Pharmacology**. v. 130, n. 2, p. 457-63, 2000.

KUNG, T. T.; STELTS, D.; ZURCHER, J. A.; WATNICK, A. S.; JONES, H.; MAUSER, P. J.; FERNANDEZ, X.; UMLAND, S.; KREUTNER, W.; CHAPMAN, R. W.; EGAN, R. W. Mechanisms of allergic pulmonary eosinophilia in the mouse. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**. v. 94, n. 6, p. 1217-1224, 1994.

KUROWSKA-STOLARSKA, M.; KEWIN, P.; MURPHY, G.; RUSSO, R. C.; STOLARSKI, B.; GARCIA, C. C.; KOMAI-KOMA, M.; PITMAN, N.; LI, Y.; NIEDBALA, W.; MCKENZIE, A. N.; TEIXEIRA, M. M.; LIEW, F. Y.; XU, D. IL-33 induces antigen-specific IL-5+ T cells and promotes allergic-induced airway inflammation independent of IL-4. **The Journal of Immunology**. v. 181, n. 7, p. 4780-90, 2008.

LAFFONT, S.; BLANQUART, E.; GUÉRY, J-C. Sex Differences in Asthma: A Key Role of Androgen-Signaling in Group 2 Innate Lymphoid Cells. **Frontiers in Immunology**. v. 8, p. 1069, 2017.

LAMBRECHT, B. N.; HAMMAD, H. The immunology of asthma. **Nature Immunology**. v. 16, n. 1, p. 45-56, 2015.

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, p. 239-257, 2002.

LANGER, F.; MORYS-WORTMANN, C.; KÜSTERS, B.; STORCK, J. Endothelial protease-activated receptor-2 induces tissue factor expression and von Willebrand factor release. **British Journal of Haematology**. v. 105, n. 2, p. 542-50, 1999.

LARCHÉ, M.; ROBINSON, D. S.; KAY, A. B. The role of T lymphocytes in the pathogenesis of asthma. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**. v. 111, p. 450-463, 2003.

LAYTON, G. T.; HARRIS, S. J.; BLAND, F. A.; LEE, S. R.; FEARN, S.; KALETA, J.; WOOD, M. L.; BOND, A.; WARD, G. Therapeutic effects of cysteine protease inhibition in allergic lung inflammation: inhibition of allergen-specific T lymphocyte migration. **Inflammation Research**. v. 50, n. 8, p. 400-8, 2001.

LEE, J.; CACALANO, G.; CAMERATO, T.; TOY, K.; MOORE, M. W.; WOOD, W. I. Chemokine binding and activities mediated by the mouse IL-8 receptor. **Journal of Immunology**. v. 155, n.4, p. 2158-2164, 1995.

LEE, N. A.; GELFAND, E. W.; LEE, J. J. Pulmonary T cells and eosinophils: coconspirators or independent triggers of allergic respiratory pathology? **Journal of Allergy and Clinical Immunology**. v. 107, p. 945-957, 2001.

LEMANSKE, R. F.; BUSSE, W. W. Allergic disorders. 6. Asthma. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**. v. 111, n. 2, p. S502 - S519, 2001.

LICHTMAN, A. H.; CHIN, J.; SCHMIDT, J. A.; ABBAS, A. K. Role of interleukin 1 in the activation of T lymphocytes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v. 85, n. 24, p. 9699-9703, 1988.

LINDNER, J. R.; KAHN, M. L.; COUGHLIN, S. R.; SAMBRANO, G. R.; SCHAUBLE, E.; BERNSTEIN, D.; FOY, D.; HAFEZI-MOGHADAM, A.; LEY, K. Delayed Onset of Inflammation in Protease-Activated Receptor-2-Deficient Mice<sup>1</sup>. **The Journal of Immunology**. v. 165, n. 11, p. 6504-10, 2000.

LOMMATZSCH, M.; JULIUS, P.; KUEPPER, M.; GARN, H.; BRATKE, K.; IRMSCHER, S.; LUTTMANN, W.; RENZ, H.; BRAUN, A.; VIRCHOW, J.C. The course of allergen-induced leukocyte infiltration in human and experimental asthma. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**. v. 118, n. 1, p. 91-7, 2006.

LUNDBERG, J. M.; MARTLING, C. R.; SARIA, A.; FOLKERS, K.; ROSELL, S. Cigarette smoke-induced airway oedema due to activation of capsaicin-sensitive vagal afferents and substance P release. **Neuroscience**. v. 10, n. 4, p. 1361-1368, 1983.

MACFARLANE, S. R.; SEATTER, M. J.; KANKE, T.; HUNTER, G. D.; PLEVIN, R. Proteinase-activated receptors. **Pharmacological Reviews**. v. 53, p. 245-82, 2001.

MAHTOUK, K.; HOSE, D.; RÈME, T.; DE VOS, J.; JOURDAN, M.; MOREAUX, J.; FIOL, G.; RAAB, M.; JOURDAN, E.; GRAU, V.; MOOS, M.; GOLDSCHMIDT, H.; BAUDARD, M.; ROSSI, J. F.; CREMER, F. W.; KLEIN, B. Expression of EGF-family receptors and amphiregulin in multiple myeloma. Amphiregulin is a growth factor for myeloma cells. **Oncogene**. v. 24, n. 21, p. 3512-3524, 2005.

MANTOVANI, A.; SICA, A.; SOZZANI, S.; ALLAVENA, P.; VECCHI, A.; LOCATI, M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. **Trends Immunology**. v. 25, p. 677-686, 2004.

MARTINEZ, F. O.; SICA, A.; MANTOVANI, A.; LOCATI, M. Macrophage activation and polarization. **Frontiers in Bioscience**. v. 13, p. 453-461, 2008.

MASOLI, M.; FABIAN, D.; HOLT, S.; BEASLEY, R. Program GifAG. The global burden of asthma: executive summary of the GINA Dissemination Committee report. **Allergy**. v. 59, n. 5, p. 469-78, 2004.

MATOS, N. A.; SILVA, J. F.; DAMASCENO, K. A.; CASSALI, G. D.; LEMOS, V. S.; DUARTE, I. D. G.; KLEIN, A. Proteinase-activated receptor 2 blockade impairs CCL11- or allergen-induced eosinophil recruitment in experimental pleurisy. **European Journal of Pharmacology**. v. 740, p. 627-33, 2014.

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. 1260-7, 2013.

MATSUWAKI, Y.; WADA, K.; WHITE, T.; MORIYAMA, H.; KITA, H. *Alternaria* Fungus Induces the Production of GM-CSF, Interleukin-6 and Interleukin-8 and Calcium Signaling in Human Airway Epithelium through Protease-Activated Receptor 2. **International Archives of Allergy and Immunology**. v. 158, p. 19-29, 2012.

MINAI-FLEMINGER, Y.; LEVI-SCHAFFER, FRANCESCA. Mast cells and eosinophils: the two key effector cells in allergic inflammation. **Inflammation Research**. v. 58, p. 631-638, 2009.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Asma atinge 6,4 milhões de brasileiros. Blog da saúde. Disponível em: <<http://www.blog.saude.gov.br/35040-asma-atinge-6-4-milhoes-de-brasileiros.html>>. Acesso em: 16 de Janeiro, 2015.

MINTY, A.; CHALON, P.; DEROCQ, J. M.; DUMONT, X.; GUILLEMOT, J. C.; KAGHAD, M.; LABIT, C.; LEPLATOIS, P.; LIAUZUN, P.; MILOUX, B.; MINTY,



C.; CASELLAS, P.; LOISON, G.; LUPKER, J.; SHIRE, D.; FERRARA, P.; CAPUT, D. Interleukin-13 is a new human lymphokine regulating inflammatory and immune responses. **Nature**. v. 362, n. 6417, p. 248-50, 1993.

MISAWA, M.; CHIBA, Y. Repeated antigenic challenge-induced airway hyperresponsiveness and airway inflammation in actively sensitized rats. **Japanese Journal of Pharmacol.** v. 61, n. 1, p. 41-50, 1993.

MIYAGISHI, R.; KIKUCHI, S.; TAKAYAMA, C.; INOUE, Y.; TASHIRO, K. Identification of cell types producing RANTES, MIP-1 alpha and MIP-1 beta in rat experimental autoimmune encephalomyelitis by in situ hybridization. **Journal of Neuroimmunology**. v. 77, n. 1, p. 17-26, 1997.

MOFFATT, J. D.; PAGE, C. P.; LAURENT, G. J. Shooting for PARs in lung diseases. **Current Opinion in Pharmacology**. v. 4, p. 221-229, 2004.

MOLINO, M.; BARNATHAN, E. S.; NUMEROF, R.; CLARK, J.; DREYER, A. C.; HOXIET, J. A.; SCHECHTER, N. WOOLKALIS, M.; BRASS, L. F. Interactions of Mast Cell Tryptase with Thrombin Receptors and PAR-2. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 272, n. 7, p. 4043-4049, 1997a.

MOLINO, M.; WOOLKALIS, M. J.; REAVEY-CANTWELL, J.; PRATICÓ, D.; ANDRADE-GORDON, P.; BARNATHAN, E. S.; BRASS, L. F. Endothelial cell thrombin receptors and PAR2: two protease-activated receptors located in a single cellular environment. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 272, n. 17, p. 11133-41, 1997b.

MOON, K. A.; KIM, S. Y.; KIM, T. B.; YUN, E. S.; PARK, C. S.; CHO, Y. S.; MOON, H. B.; LEE, K. Y. Allergen-induced CD11b<sup>+</sup> CD11c(int) CCR3<sup>+</sup> macrophages in the lung promote eosinophilic airway inflammation in a mouse asthma model. **International Immunology**. v. 19, n. 12, p. 1371-81, 2007.

MOORE, B.; MURPHY, R. F.; AGRAWAL, D. K. Interaction of TGF-beta with immune cells in airway disease. **Current Molecular Medicine**. v. 8, p. 427-436, 2008.

MOQBEL, R.; LEVI-SCHAFFER, F.; KAY, A. B. Cytokine generation by eosinophils. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**. v. 94, p. 1183-1188, 1994.

NAKAE, S.; KOMIYAMA, Y.; YOKOYAMA, H.; NAMBU, A.; UMEDA, M.; IWASE, M.; HOMMA, I.; SUDO, K.; HORAI, R.; ASANO, M.; IWAKURA, Y. IL-1 is required for allergen-specific Th2 cell activation and the development of airway hypersensitivity response. **International Immunology**. v.15, n. 4, p. 483-90, 2003.

NAKAGOME, K.; NAGATA, M. Pathogenesis of airway inflammation in bronchial asthma. **Auris Nasus Larynx**. v. 38, p. 555-563, 2011.

NELSON, H. S. The importance of allergens in the development of asthma and the persistence of symptoms. **Disease-a-Month**. v. 47, p. 5-15, 2001.

NIALS, A. T.; UDDIN, S. Mouse models of allergic asthma: acute and chronic allergen challenge. **Disease Models & Mechanisms**. v. 1, p. 213-20, 2008.

NOCKER, R. E.; OUT, T. A.; WELLER, F. R.; MUL, E. P.; JANSEN, H. M.; VAN DER ZEE, J. S. Influx of neutrophils into the airway lumen at 4 h after segmental allergen challenge in asthma. **International Archives of Allergy and Immunology**. v. 119, n. 1, p. 45-53, 1999.

NOGUEIRA, D. S.; GAZZINELLI-GUIMARÃES, P. H.; BARBOSA, F. S.; RESENDE, N. M.; SILVA, C. C.; DE OLIVEIRA, L. M.; AMORIM, C. C.; OLIVEIRA, F. M.; MATTOS, M. S.; KRAEMER, L. R.; CALIARI, M. V.; GAZE, S.; BUENO, L. L.; RUSSO, R. C.; FUJIWARA, R. T. Multiple Exposures to *Ascaris suum* Induce Tissue Injury and Mixed Th2/Th17 Immune Response in Mice. **PLOS Neglected Tropical Diseases**. v. 10, n. 1, p. e0004382, 2016.

NYSTEDT, S.; EMILSON, K.; WAHLESTADT, C.; SUNDELIN, J. Molecular cloning of a potential proteinase activated receptor. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v. 91, p. 9208-9212, 1994.

OBATA, T.; KOBAYASHI, T.; OKADA, Y.; NAKAGAWA, N.; TERAWAKI, T.; AISHITA, H. Effect of a peptide leukotriene antagonist, ONO-1078 on antigen-induced airway microvascular leakage in actively sensitized guinea pigs. **Life Sciences**. v. 51, n. 20, p. 1577-83, 1992.

OKUMURA, S.; SAGARA, H.; FUKUDA, T.; SAITO, H.; OKAYAMA, Y. FcepsilonRI-mediated amphiregulin production by human mast cells increases mucin gene expression in epithelial cells. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**. v. 115, p. 272–9, 2005.

OSSOVSKAYA, V. S.; BUNNETT, N. W. Protease-Activated Receptors: Contribution to Physiology and Disease. **Physiological Reviews**. v. 84, p. 579-621, 2004.

OSTROWSKA, E.; SOKOLOVA, E.; REISER, G. PAR2 activation and LPS synergistically enhance inflammatory signaling in airway epithelial cells by raising PAR expression level and interleukin8 release. **American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology**. v. 293, n. 5, p. L1208–L1218, 2007.

PALM, N. W.; ROSENSTEIN, R. K.; MEDZHITOV, R. Allergic host defences. **Nature**. v. 484, n. 7395, p. 465-472, 2012.

PAUL, W. E.; ZHU, J. How are TH2-type immune responses initiated and amplified? **Nature Review Immunology**. v. 10, p. 225–235, 2010.

PAVORD, I. D.; BRIGHTLING, C. E.; WOLTMANN, G.; WARDLAW, A. J. Non-eosinophilic corticosteroid unresponsive asthma. **Lancet**. v. 353, p. 2213-14. 1999.

PAWANKAR, R.; BAENA-CAGNANI, C. E.; BOUSQUET, J.; CANONICA, G. W.; CRUZ, A. A.; KALINER, M. A.; LANIER, B. Q.; HENLEY, K. State of world allergy report 2008: allergy and chronic respiratory diseases. **The World Allergy Organization Journal**. v.1, n,1, p. S4-17, 2008.

PAWANKAR, R.; CANONICA, G. W.; HOLGATE, S. T.; LOCKEY, R. F. **World Allergy Organization (WAO)**. White Book on Allergy. Milwaukee, United States

of America, 2011. Disponível em: <[http://www.worldallergy.org/UserFiles/file/WAO-White-Book-on-Allergy\\_web.pdf](http://www.worldallergy.org/UserFiles/file/WAO-White-Book-on-Allergy_web.pdf)>. Acesso em: 10 de Janeiro, 2017.

PEARCE, N.; PEKKANEN, J.; BEASLEY, R. How much asthma is really attributable to atopy? **Thorax**. v. 54, p. 268-272, 1999.

PEARLMAN, D. S. Pathophysiology of the inflammatory response. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**. v. 104, n. 4, p. S132-137, 1999.

PECHKOVSKY, D. V.; PRASSE, A.; KOLLERT, F.; ENGEL, K. M.; DENTLER, J.; LUTTMANN, W.; FRIEDRICH, K.; MÜLLER-QUERNHEIM, J.; ZISSEL, G. Alternatively activated alveolar macrophages in pulmonary fibrosis-mediator production and intracellular signal transduction. **Clinical Immunology**. v. 137, n. 1, p. 89-101, 2010.

PELAIA, G.; VATRELLA, A.; BUSCETI, M. T.; GALLELLI, L.; CALABRESE, C.; TERRACCIANO, R.; MASELLI, R. Cellular mechanisms underlying eosinophilic and neutrophilic airway inflammation in asthma. **Mediators of Inflammation**. v. 2015, p. 1-8, 2015.

POJDA, Z.; TANAKA, K.; AOKI, Y.; TSUBOI, A. In vivo and in vitro interaction between interleukin 6 and granulocyte colony-stimulating factor in the regulation of murine hematopoiesis. **Experimental Hematology**. v. 20, n. 7, p. 874-8, 1992.

PORTAL BRASIL. Pesquisa Nacional: Asma atinge 6,4 milhões de brasileiros. Disponível em: <<http://www.brasil.gov.br/saude/2015/01/asma-atinge-6-4-milhoes-de-brasileiros>>. Ministério da saúde. Acesso em: 13 de Janeiro, 2015.

PRUSSIN, C.; METCALFE, D. D. IgE, mast cells, basophils, and eosinophils. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**. v. 117, n. 2, p. S450-456, 2006.

QI, Y.; OPERARIO, D. J.; OBERHOLZER, C. M.; KOBIE, J. J.; LOONEY, R. J.; GEORAS, S. N.; MOSMANN, T. R. Human basophils express amphiregulin in response to T cell-derived IL-3. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**. v. 126, n. 6, p. 1260-1266.e4, 2010.

RAMACHADRAN, R.; HOLLENBERG, M. D. Proteinases and signaling: pathophysiological and therapeutic implications via PARs and more. **British Journal Pharmacology**. v.153, p. 263-282, 2008.

RAMACHANDRAN, R.; NOORBAKHSH, F.; DEFEA, K., HOLLENBERG, M. D. Targeting proteinase-activated receptors: therapeutic potential and challenges. **Nature Reviews Drug Discovery**. v. 11, n.1, p. 69-86, 2012

RAWLINGS, N. D.; MORTON, F. R.; BARRET, A. J. MEROPS: the peptidases database. **Nucleic Acids Research**. v. 1, n. 34, p. 270-272, 2006.

REDLICH, C. A.; WISNEWSKI, A. V.; GORDON, T. Mouse models of diisocyanate asthma. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**. v. 27, p. 385-390, 2002.

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

RINDERKNETCHT, H. Activation of pancreatic zymogens. Normal activation, premature intrapancreatic activation, protective mechanisms against inappropriate activation. **Digestive Diseases and Sciences**. v. 31, n. 3, p. 314-321, 1986.

ROBINSON, D. S.; HAMID, Q.; YING, S.; TSICOPOULOS, A.; BARKANS, J.; BENTLEY, A. M.; CORRIGAN, C.; DURHAM, S. R.; KAY, A. B. Predominant TH2-like bronchoalveolar T-lymphocyte population in atopic asthma. **The New England Journal of Medicine**. v. 326, n. 5, p; 298-304, 1992.

ROMANI, L.; MENCACCI, A.; CENCI, E.; SPACCAPELO, R.; TONIATTI, C.; PUCCETTI, P.; BISTONI, F.; POLI, V. Impaired neutrophil response and CD4+ T helper cell 1 development in interleukin 6-deficient mice infected with *Candida albicans*. **The Journal of Experimental Medicine**. v. 183, p. 1345-1355, 1996.

ROYCE, S. G.; CHENG, V.; SAMUEL, C. S.; TANG, M. L. The regulation of fibrosis in airway remodeling in asthma. **Molecular and Cell Endocrinology**. v. 351, n. 2, p. 167-75, 2012.

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

SACCO, O.; ROMBERGER, D.; RIZZINO, A.; BECKMANN, J. D.; RENNARD, S. I.; SPURZEM, J. R. Spontaneous production of transforming growth factor-beta 2 by primary cultures of bronchialepithelial cells. Effects on cell behavior in vitro. **The Journal of Clinical Investigation**. v. 90, n.4, p.1379-85, 1992.

SAITO, H.; MORIKAWA, H.; HOWIE, K.; CRAWFORD, L.; BAATJES, A. J.; DENBURG, E.; CYR, M. M.; DENBURG, J. A. Effects of a cysteinyl leukotriene receptor antagonist on eosinophil recruitment in experimental allergic rhinitis. **Immunology**. v. 113, v. 2, p. 246-52, 2004.

SAW, S.; KALE, S. L.; ARORA, N. Serine Protease Inhibitor Attenuates Ovalbumin Induced Inflammation in Mouse Model of Allergic Airway Disease. **Plos One**. v. 7, p. 1-9, 2012.

SCARBOROUGH, R. M.; NAUGHTON, M. A.; TENG, W.; HUNG, D. T.; ROSE, J.; VU, T. K.; WHEATON, V. I.; TURCK, C. W.; COUGHLIN, S. R. Tethered ligand agonist peptides. Structural requirements for thrombin receptor activation reveal mechanism of proteolytic unmasking of agonist function. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 267, n. 19, p. 13146-13149, 1992.

SCHMIDLIN, F.; AMADESI, S.; DABBAGH, K.; LEWIS, D. E.; KNOTT, P.; BUNNETT, N. W.; GATER, P. R.; GEPPETTI, P.; BERTRAND, C.; STEVENS, M. E. Protease-activated receptor 2 mediates eosinophil infiltration and hyperreactivity in allergic inflammation of the airway. **Journal of Immunology**. v. 169, n. 9, p. 5315-5321, 2002.

SCHMIDLIN, F.; AMADESI, S.; VIDIL, R.; TREVISANI, M.; MARTINET, N.; GAUCHEY, G.; TOGNETTO, M.; CAVALLESCO, G.; MAPP, C.; GEPPETTI, P.; BUNNETT, N. W. Expression and Function of Proteinase-activated Receptor 2 in Human Bronchial Smooth Muscle. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**. v. 164, p. 1276-1281, 2001.

SEVIGNY, L. M.; ZHANG, P.; BOHM, A.; LAZARIDES, K.; PERIDES, G.; COVIC, L.; KULIOPULOS, A. Interdicting protease-activated receptor-2-driven

inflammation with cell-penetrating peptides. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 108, n. 20, p. 8491-8496, 2011.

SHAKOORY, B.; FITZGERALD, S. M.; LEE, S. A.; CHI, D. S.; KRISHNASWAMY, G. The Role of Human Mast Cell-Derived Cytokines in Eosinophil Biology. **Journal of Interferon & Cytokine Research**. v. 24, n. 5, p. 271-281, 2004.

SHIMIZU, S.; TOJIMA, I.; TAKEZAWA, K.; MATSUMOTO, K.; KOUZAKI, H.; SHIMIZU, T. Thrombin and activated coagulation factor X stimulate the release of cytokines and fibronectin from nasal polyp fibroblasts via protease-activated receptors. **American Journal Rhinology & Allergy**. v. 31, n. 1, p. 13-18, 2017.

SHOYAB, M.; PLOWMAN, G. D.; MCDONALD, V. L.; BRADLEY, J. G.; TODARO, G. J. Structure and function of human amphiregulin: a member of the epidermal growth factor family. **Science**. v. 243, p. 1074–1076, 1989.

SIMPSON, J. L.; SCOTT, R.; BOYLE, M. J.; GIBSON, P. G. Inflammatory subtypes in asthma: assessment and identification using induced sputum. **Respirology**. v. 11, p. 54-61, 2006.

SLOFSTRA, S. H.; BIJLSMA, M. F.; GROOT, A. P.; REITSMA, P. H.; LINDHOUT, T.; TEN CATE, H.; SPEK, C. A. Protease-activated receptor-4 inhibition protects from multi organ failure in a murine model of systemic inflammation. **Blood**. v. 110, p. 3176-3182, 2007.

SMITH-SWINTOSKY, V. L.; CHEO-ISAACS, C. T.; D'ANDREA, M. R.; SANTULLI, R. J.; DARROW, A. L.; ANDRADE-GORDON, P. Protease-activated receptor-2 (PAR-2) is present in the rat hippocampus and is associated with neurodegeneration. **Journal of Neurochemistry**. v. 69, n. 5, p. 1890-6. 1997.

SOUMYAKRISHNAN, S.; DIVYA, T.; KALAYARASAN, S.; SRIRAM, N.; SUDHANDIRAN, G. Daidzein exhibits anti-fibrotic effect by reducing the expressions of Proteinase activated receptor 2 and TGF $\beta$ 1/smad mediated

inflammation and apoptosis in Bleomycin-induced experimental pulmonary fibrosis. **Biochimie**. v. 103, p. 23-36, 2014.

STEINHOFF, M.; BUDDENKOTTE, J.; SHPACOVITCH, V.; RATTENHOLL, A.; MOORMANN, C.; VERGNOLLE, N.; LUGER, T. A.; HOLLENBERG, M. D. Protease-activated receptors: Transducers of Proteinase-Mediated Signaling in Inflammation and Immune Response. **Endocrine Reviews**. v. 26, n. 1, p. 43, 2005.

STEINHOFF, M.; VERGNOLLE, N.; YOUNG, M.; TOGNETTO, M.; AMADESI, H. S.; ENESS, H. S.; TREVISANI, M.; HOLLENBERG, M. D.; WALLACE, J. L.; CAUGHEY, G. H.; MITCHELL, S. E.; WILLIAMS, L. M.; GEPPETTI, P.; MAYER, E. A.; BUNNETT, N.W. Agonists of proteinase-activated receptor 2 induce inflammation by a neurogenic mechanism. **Nature Medicine**. v. 6, n. 2, p. 151-158, 2000.

TAI, H. Y.; TAM, M. F.; CHOU, H.; PENG, H. J.; SU, S. N.; PERNG, D. W.; SHEN, H. D. Pen ch 13 allergen induces secretion of mediators and degradation of occludin protein of human lung epithelial cells. **Allergy**. v. 61, n. 3, p. 382-8, 2006.

TANG, X.; NIAN, H.; LI, X.; YANG, Y.; WANG, X.; XU, L.; SHI, H.; YANG, X.; LIU, R. Effects of the combined extracts of Herba Epimedii and Fructus Ligustrilucidi on airway remodeling in the asthmatic rats with the treatment of budesonide. **BMC Complementary Alternative Medicine**. v. 17, n. 1, p. 380, 2017.

The Asthma Network (**GAN**). The Global Asthma Report 2014. Auckland (NZ), 2014. Disponível em: <<http://www.globalasthmareport.org>> Acesso em: 12 de setembro, 2017.

The Global Asthma Report 2014. Auckland, New Zealand: Global Asthma Network, 2014. Disponível em: <[http://www.globalasthmareport.org/resources/Global\\_Asthma\\_Report\\_2014.pdf](http://www.globalasthmareport.org/resources/Global_Asthma_Report_2014.pdf)>. Acesso em: 13 de Janeiro, 2017.



TUNG, H-Y.; LANDERS, C.; LI, E.; PORTER, P.; KHERADMAND, F.; CORRY, D. B. Allergen-encoded signals that control allergic responses. **Current opinion in Allergy and Clinical Immunology**. v. 16, n. 1, p. 51-58. 2016.

VENGE, J.; LAMPINEN, M.; HÅKANSSON, L.; RAK, S.; VENGE, P. Identification of IL-5 and RANTES as the major eosinophil chemoattractants in the asthmatic lung. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**. v. 97, n. 5, p. 1110-5, 1996.

VERGNOLLE, N. Protease-activated receptors and inflammatory hyperalgesia. **Memórias 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. **Journal of Immunology**. v. 163, p. 5064-5069, 1999.

VERGNOLLE, N.; BUNNETT, N. W.; SHARKEY, K. A.; BRUSSEE, V.; COMPTON, S. J.; GRADY, E. F.; CIRINO, G.; GERARD, N.; BASBAUM, A. I.; GORDON, P. A.; HOLLENBERG, M. D.; WALLACE, J.L. Proteinase-activated receptor-2 and hyperalgesia: A novel pain pathway. **Nature Medicine**. v. 7, n. 7, p. 821-826, 2010.

VERGNOLLE, N.; HOLLENBERG, M. D.; SHARKEY, K. A.; WALLACE, J. L. Characterization of the inflammatory response to proteinase-activated receptor-2 (PAR2)-activating peptides in the rat paw. **British Journal of Pharmacology**. v. 127, n. 5, p. 1083-1090, 1999.

VLAHOS, R.; BOZINOVSKI, S. Role of alveolar macrophages in chronic obstructive pulmonary disease. **Frontiers in Immunology**. v. 5, p. 435, 2014.

VLIAGOFTIS, H.; BEFUS, A. D.; HOLLENBERG, M. D.; MOGBEL, R. Airway epithelial cells release eosinophil survival-promoting factors (GM-CSF) after stimulation of proteinase-activated receptor 2. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**. v.107, n.4, p.679-685, 2001.

VU, T. 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, p.1057-1068, 1991.

WALKER, F.; ZHANG, H. H.; MATTHEWS, V.; WEINSTOCK, J.; NICE, E. C.; ERNST, M.; ROSE-JOHN, S.; BURGESS, A. W. IL6/sIL6R complex contributes to emergency granulopoietic responses in G-CSF- and GM-CSF-deficient mice. **Blood**. v. 111, n. 8, p. 3978-85, 2008.

WANG, S. W.; OH, C. K.; CHO, S. H.; HU, G.; MARTIN, R.; DEMISSIE-SANDERS, S.; LI, K.; MOYLE, M.; YAO, Z. Amphiregulin expression in human mast cells and its effect on the primary human lung fibroblasts. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**. v. 115, n. 2, p. 287-94, 2005.

WARREN, K. J.; PAVLIK, J. A.; DEVASURE, J. M.; SWEETER, J.; DICKINSON, J.; SISSON, J. H.; POOLE, J. Sex Differences in ILC2-Specific Chemokine Release During Chronic OVA-Induced Allergic Lung Inflammation in BALB/C Mice. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**. v. 195, p. A2975, 2017.

WENZEL, S. E.; SCHWARTZ, L. B.; LANGMACK, E. L.; HALLIDAY, J. L.; TRUDEAU, J. B.; GIBBS, R. L.; CHU, H. W. Evidence that severe asthma can be divided pathologically into two inflammatory subtypes with distinct physiologic and clinical characteristics. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**. v. 160, p. 1001-8, 1999.

WENZEL, S. E.; SZEFLER, S. J.; LEUNG, D. Y.; SLOAN, S. I.; REX, M. D.; MARTIN, R. J. Bronchoscopic evaluation of severe asthma. Persistent inflammation associated with high dose glucocorticoids. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**. v. 156, p. 737-743, 1997.

WOLPE, S. D.; CERAMI, A. Macrophage inflammatory protein 1 and 2: Members of a novel superfamily of cytokines. **FASEB Journal**. v. 3, p. 2565-2573, 1989.

YAMAGUCHI, R.; YAMAMOTO, T.; SAKAMOTO, A.; ISHIMARU, Y.; NARAHARA, S.; SUGIUCHI, H.; HIROSE, E.; YAMAGUCHI, Y. Mechanism

of interleukin-13 production by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-dependent macrophages via protease-activated receptor-2. **Blood Cells, Molecules & Diseases.** v. 55, n. 1, p. 21-6, 2015.

YAN, B.; WEI, J. J.; YUAN, Y.; SUN, R.; LI, D.; LUO, J.; LIAO, S. J.; ZHOU, Y. H.; SHU, Y.; WANG, Q.; ZHANG, G. M.; FENG, Z. H. IL-6 Cooperates with G-CSF To Induce Protumor Function of Neutrophils in Bone Marrow by Enhancing STAT3 Activation. **Journal of Immunology.** v. 190, n. 11, p. 5882-5893, 2013.

YOKOYAMA, A.; KOHNO, N.; FUJINO, S.; HAMADA, H.; INOUE, Y.; FUJIOKA, S.; ISHIDA, S.; HIWADA, K. L. Circulating interleukin-6 levels in patients with bronchial asthma. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine.** v. 151, p. 1354-8, 1995.

ZAISS, D. M.; YANG, L.; SHAH, P. R.; KOBIE, J. J.; URBAN, J. F.; MOSMANN, T. R. Amphiregulin, a TH2 cytokine enhancing resistance to nematodes. **Science.** v. 314, v. 5806, p. 1746, 2006.

ZHANG, H.; ZENG, X.; HE, S. Evaluation on Potential Contributions of Protease Activated Receptors Related Mediators in Allergic Inflammation. **Mediators of Inflammation.** v. 2014, p. 1-20, 2014.

ZHANG, Y.; LAMM, W. J.; ALBERT, R. K.; CHI, E. Y.; HENDERSON, W. R. JR.; LEWIS, D. B. Influence of the route of allergen administration and genetic background on the murine allergic pulmonary response. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine.** v.155, n. 2, p. 661-9, 1997.


ZIMMERMAN, B. J.; PAULSON, J. C.; ARRHENIUS, T. S.; GAETA, F. C.; GRANGER, N. D. Thrombin receptor peptide-mediated leukocyte rolling in rat mesenteric venules: roles of P-selectin and sialyl Lewis X. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology.** v. 267, n. 3, p. H1049-H1053, 1994.

ZOSKY, G. R.; SLY, P. D. Animal models of asthma. **Clinical and Experimental Allergy.** v. 37, p. 973-88, 2007.

ZUANY-AMORIM, C.; HAILÉ, S.; LEDUC, D.; DUMAREY, C.; HUERRE, M.; VARGAFTIG, B.B.; PRETOLANI, M. Interleukin-10 inhibits antigen-induced cellular recruitment into the airways of sensitized mice. **The Journal of Clinical Investigation**. v. 95, n. 6, p. 2644-51, 1995.

## 9. ANEXOS

### Anexo 1: Certificado do CEUA

	<b>UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS</b> <b>CEUA</b> <b>COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS</b>
<b>UFMG</b>	
<b>CERTIFICADO</b>	
Certificamos que o Protocolo nº. 348 / 2014, relativo ao projeto intitulado "Estudo do PAR2 no recrutamento de leucócitos e na produção de mediadores inflamatórios na inflamação pulmonar experimental em camundongos", que tem como responsável André Klein, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG), tendo sido aprovado na reunião de 14/04/2015. Este certificado espira-se em 14/04/2020.	
<b>CERTIFICATE</b>	
We hereby certify that the Protocol nº. 348 / 2014, related to the Project entitled "The role for PAR2 on leukocyte recruitment and on the production of inflammatory mediators in experimental lung inflammation in mice", under the supervision of André Klein, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CEUA/UFMG), and was approved in 14/04/2015. This certificate expires in 14/04/2020.	
Cleuza Maria de Faria Rezende Coordenador(a) da CEUA/UFMG Belo Horizonte, 14/04/2015.	
Atenciosamente.	
Sistema CEUA-UFMG <a href="https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/">https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/</a>	
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) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592 <a href="http://www.ufmg.br/bioetica/cetea">www.ufmg.br/bioetica/cetea</a> - <a href="mailto:cetea@prpq.ufmg.br">cetea@prpq.ufmg.br</a>	

## **Anexo 2: Preparo de soluções**

### **1. Solução de Salina tamponada (PBS)**

Foi preparada uma solução de PBS pH 7,4 ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  8,1 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,84 mM, NaCl 0,14 M e KCl 2,68 mM).

Fosfato dibásico de sódio -----	1,15 g
Fosfato monobásico de potássio -----	250 mg
Cloreto de sódio -----	8,2 g
Cloreto de potássio-----	200 mg
Água destilada-----	1.000 ml

O pH foi ajustado para 7,4 com solução de ácido fosfórico 0,1 M e, em seguida, a solução foi esterilizada por autoclavação a 120°C, 2 ATM durante 20 minutos, estando assim pronta para ser utilizada.

### **2. Solução de TBS**

Foi preparada uma solução tampão de TBS pH 8,0 (Tris-HCL 100 mM, NaCl 150 mM, Tween 20).

Tris-HCl -----	1,58 g
NaCl -----	8,77 g
Tween 20 -----	500 µl
Água destilada -----	1.000 ml

O pH foi ajustado para 8,0 e a solução foi armazenada em geladeira.

### **3. Solução de Tris-HCl 0,5 M**

Tris -----	6,057 g
Água Milli-Q -----	100 ml

Corrigiu-se o pH para 6,8.

#### **4. Tampão de lise**

Foi preparada uma solução tampão de lise pH 8,0 (NaCl 150 mM, Tris 50 mM, EDTA-2Na 5 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM).

NaCl -----	0,44 g
Tris -----	0,3 g
EDTA-2Na -----	0,093g
MgCl <sub>2</sub> -----	0,05 g
Água Milli-Q -----	50 ml

Corrigiu-se o pH para 8,0 e acrescentou-se:

Nonidet P40 -----	0,5 ml
Triton X-100 -----	0,15 ml

#### **5. Tampão de amostra**

Foi preparada uma solução de tampão de amostra (2-mercaptoetanol 10%, Tris-HCl 0,125 M, glicerol 20%, SDS 10%, azul de bromofenol 0,004%).

2-mercaptoetanol -----	500 µl
Tris-HCl -----	2,5 ml
Glicerol -----	2 ml
SDS -----	2 ml
Azul de bromofenol -----	400 µl
Água destilada -----	10 ml

Após o preparo foram feitas alíquotas de 500 µl cada e congeladas a – 20°C.

#### **6. Tampão de corrida**

Foi preparada uma solução contendo:

Tris -----	15 g
Glicina -----	72 g
SDS -----	5 g

Água destilada ----- 500 ml

Após o preparo, a solução foi filtrada em Millipore 0,45  $\mu$ m.

### **7. Tris-glicina (10x)**

Tris-base ----- 30 g

Glicina ----- 140 g

Água destilada ----- 1.000 ml

### **8. Tampão de transferência**

Tris-glicina (10x) ----- 100 ml

Água destilada ----- 700 ml

Metanol ----- 200 ml

### **9. Vermelho Ponceau 0,3%**

Para coloração da membrana de nitrocelulose foi feita a solução de vermelho Ponceau contendo:

Ponceau ----- 0,3 g

Ácido acético ----- 1 ml

Água destilada ----- 100 ml

### **10. Gel de poliacrilamida 10%**

Acrilamida 30% ----- 1,67 ml

Tris-HCl ----- 1,25 ml

SDS 10% ----- 100  $\mu$ l

Água Milli-Q ----- 1,90 ml

PSA ----- 25  $\mu$ l

Temed ----- 10  $\mu$ l



### **11. Solução de albumina bovina (BSA)**

A solução de BSA 3% (p/v) foi preparada em PBS estéril e congelada à temperatura de -20°C. No dia do experimento, a solução foi retirada do congelador, colocada em repouso em temperatura ambiente, sendo utilizada após descongelamento.

### **12. Solução diluidora de leucócitos (Solução de Turk)**

A solução de Turk, utilizada para a contagem de leucócitos, obedeceu às seguintes proporções:

Violeta genciana -----	100 mg
Ácido acético glacial -----	30 ml
Água destilada -----	70 ml

O reagente violeta genciana foi adicionado sobre a solução contendo água destilada e ácido acético glacial.

### **13. Meio de cultura RPMI (pH 7,4)**

RPMI 1640 -----	1,04g
Hepes -----	0,238g
Bicarbonato de sódio -----	0,220g
Água mili-Q -----	100mL

### **14. Tampão de Lise a base de Cloreto de amônio (pH 7,4)**

Cloreto de amônio -----	4,01g
Bicarbonato de sódio -----	0,42g
EDTA dissódico -----	0,18g
Água mili-Q -----	500mL

**15. Tampão de FACS**

Soro bovino fetal ----- 2 mL  
PBS 1X ----- 100 mL

**16. Tampão de fixação**

Formaldeído 37% ----- 10mL  
PBS 1X ----- 90mL

**17. Anestésico a base de quetamina e xilazina de curta duração – desafio intranasal**

Quetamina 10% ----- 0,78 mL  
Xilazina 2% ----- 0,22 mL  
Solução de NaCL 0,9% ----- 1 mL

**18. Anestésico a base de quetamina e xilazina de longa duração**

Quetamina 10% ----- 1 mL  
Xilazina 2% ----- 0,75mL

**19. Solução de azul de Evans**

A solução de azul de Evans ( $C_{34}H_{24}N_6Na_4O_{14}S_4$ , Dinâmica), a 2% em solução fisiológica (0,9% de NaCl).

Foram injetados 100 mL desta solução via intravenosa na cauda dos camundongos.

**20. Solução de TMB (1,6 mM)**

Pesar 3,845 mg/mL em DMSO (dimetilsulfóxido) - proteger da luz e manusear em capela de solventes

### **21. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,002%)**

- Diluir 1:10 (em água destilada) a solução estoque 30% = H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3%
- Adicionar 7 uL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% em 12 mL de Tampão 2

### **22. Técnica de inclusão em parafina para processamento histológico de pulmão**

Processar os pulmões pela técnica de inclusão em parafina que consiste na passagem dos pulmões nas seguintes etapas:

1. Álcool 70% por 2h
2. Álcool 80% por 2h
3. Álcool 90% por 2h
4. Álcool absoluto usado por 2h
5. Álcool absoluto novo por 2h
6. Xilol por 40 min
7. Embebição pela parafina por 40 min

### **23. Técnica de coloração Hematoxilina e Eosina (HE)**

É a principal técnica de coloração de tecidos em histologia. Por meio desta técnica, podemos diferenciar partes basófilas (pela hematoxilina) e acidófilas, ou eosinofílicas (pela eosina), devido respectivamente a hematoxilina ter atração por substâncias ácidas componentes dos tecidos, como as proteínas, ricas em radicais de amina, como os núcleos e o retículo endoplasmático rugoso e ácidos nucléicos. Já a eosina, sendo basófila, apresentando coloração predominante pelo citoplasma, fibra de colágeno e outras estruturas compostas de substâncias com caráter básico.

#### Técnica

- 1- Desparafinar Xilol II e Xilol I: 30 min
- 2- Hidratar em ordem decrescente de álcool (absoluto II, 90°, 80°, 70°) em 3 mergulhos
- 3- Lavar em água corrente: 5 min
- 4- Hematoxilina: 1'30" a 3 min
- 5- Lavar em água corrente branda: 40 min
- 6- Eosina de Putt: 40 min
- 7- Lavar rapidamente em água corrente
- 8- Desidratar em ordem crescente de álcool (70°, 80°, 90°, absoluto I e II) em 2 mergulhos rápidos
- 9- Colocar imediatamente para secar usando ventilador

OBS: Se for necessário, pelo excesso de corantes entre as etapas 5 e 6, diferenciar em álcool acidulado (diferenciar hematoxilina) mergulhos rápidos

#### **24. Protocolo da coloração por P.A.S. (Ácido Periódico de Schiff)**

A coloração PAS é principalmente usada para estruturas contendo uma alta proporção de macromoléculas de carboidratos (glicogênio, glicoproteína, proteoglicanos), tipicamente encontrado em tecidos conjuntivos, mucos, e lâminas basais. A reação do ácido periódico seletivamente oxida os resíduos de glicose, produzindo aldeídos que reagem com o reagente de Schiff e produz uma cor púrpura-magenta.

#### Técnica

- 1- Desparafinar
- 2- Hidratar em ordem decrescente de alcoóis
- 3- Lavar em água corrente: 5 min
- 4- Lavar em água destilada: 1 mergulho
- 5- Ácido periódico: 0,5% 5 minutos
- 6- Lavar em água destilada: 2 mergulhos

- 7- Reativo de Schiff 10 min ou mais (até os cortes ficarem rosa, usar um papel branco por baixo das lâminas para ajudar na observação)
- 8- Lavar em água corrente: 10 min
- 9-Contracorar com Hematoxilina ou verde luz: 30 seg
- 10- Lavar em água corrente (20 min Hematoxilina e no Verde luz 3 mergulhos)
- 11-Desidratar em álcool etílico (70%, 80%, e 90% respectivamente) 2 mergulhos (cada)
- 12- Desidratar em álcool etílico absoluto I e II: 3 minutos
- 13- Montar

### **25. Protocolo da coloração Tricômico de Gomori**

A coloração de Tricômico de Gomori, é um método de coloração que, em um único passo, combina a coloração cromotrope 2R e coloração de fibras colágenas (verde luz) em uma solução de ácido fosfotungstico e ácido acético glacial. Identificação de fibras musculares e de colágeno.

#### Técnica

- 1- Desmarafinar
- 2- Hidratar
- Obs; Se o fixador contiver mercúrio passe para a etapa n°3, se não tiver passe para etapa n°6
- 3- Solução de lugol: 5 min
- 4- Lavar rapidamente em água corrente
- 5- Bissulfito de sódio 5% até clarear
- 6- Lavar em água corrente: 5 min
- 7- Corar pela Hematoxilina: 1'30"
- 8- Lavar em água corrente: 30 a 60 minutos
- 9- Corar pelo corante Gomori: 15 min
- 10- Lavar em água destilada rapidamente para remover o excesso
- 11- Desidratar em série crescente de álcool
- 12- Secar rapidamente com uso de ventilador
- 13- Montar

Fixador utilizado foi o formol nesse sentido, pulou-se as etapas: 3, 4 e 5.

Resultados: Fibras musculares: vermelho; Colágeno: verde e Núcleo: azul e preto.