

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

AYSLAN BARRA

O PAPEL DO RECEPTOR ATIVADO POR PROTEASE (PAR)2 NA
RESPOSTA EFETORA DE MACRÓFAGOS MURINOS
ESTIMULADOS COM LPS

BELO HORIZONTE
Fevereiro de 2021

AYSLAN BARRA

**O PAPEL DO RECEPTOR ATIVADO POR PROTEASE (PAR)2 NA
RESPOSTA EFETORA DE MACRÓFAGOS MURINOS
ESTIMULADOS COM LPS**

Tese de doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito para a obtenção do grau de Doutor em Ciências Biológicas: Ênfase em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. André Klein

043

Barra, Ayslan.

O papel do Receptor Ativado por Protease (PAR)2 na resposta efetora de macrófagos murinos estimulados com LPS [manuscrito] / Ayslan Barra. - 2021. 90 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Prof. Dr. André Klein. Co-orientador: Prof. Dr. Luciano dos Santos Aggum Capettini.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia.

1. Fisiologia e Farmacologia. 2. Receptor PAR-2. 3. Receptor 4 Toll-Like. 4. Macrófagos. 5. Serina Proteases. 6. Inflamação. I. Klein, André. II. Capettini, Luciano dos Santos Aggum. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 612:615



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

FOLHA DE APROVAÇÃO DA TESE DE DOUTORADO Nº 332 DE AYSLAN BARRA

"O papel do Receptor Ativado por Protease (PAR)2 na resposta efetora de macrófagos murinos estimulados com LPS"

AYSLAN BARRA

Tese de Doutorado defendida e aprovada, no dia **26 de fevereiro de 2021**, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores:

Prof. Dr. Alfredo Menendez, USherbrooke - Canadá

Profa. Dra. Bagnólia Araújo Costa, DCFA/UFPB

Prof. Dr. Aristóbolo Mendes da Silva, ICB/UFMG

Profa. Dra. Juliana Carvalho Tavares, ICB/UFMG

Prof. Dr. Luciano dos Santos Aggum Capettini, ICB/UFMG - Coorientador

Prof. Dr. André Klein, ICB/UFMG - Orientador

Belo Horizonte, 26 de fevereiro de 2021.

Assinatura dos membros da banca examinadora:



Documento assinado eletronicamente por **Andre Klein, Professor do Magistério Superior**, em 02/03/2021, às 15:50, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Aristobolo Mendes da Silva, Professor do Magistério Superior**, em 02/03/2021, às 18:16, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Juliana Carvalho Tavares, Professora do Magistério Superior**, em 02/03/2021, às 21:26, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Luciano dos Santos Aggum Capettini, Professor do Magistério Superior**, em 03/03/2021, às 21:09, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0552046** e o código CRC **C14B91E9**.

Referência: Processo nº 23072.205638/2021-20

SEI nº 0552046

Dedicatória

Á minha Mãe e minha Irmã,
meus alicerces!

“As oportunidades normalmente se apresentam disfarçadas de trabalho árduo, e é por isso que muitos não as reconhecem” (ANN LANDERS)

Agradecimentos

Primeiramente agradeço a Deus por concluir este trabalho com louvor, superando todas as dificuldades que se apresentaram no caminho.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais pelo suporte financeiro na compra de insumos e reagentes para a pesquisa.

À coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pela concessão da Bolsa de estudos e dos recursos financeiros indispensáveis para a realização do trabalho.

Ao professor e orientador André Klein, pela oportunidade de trabalhar em um ambiente acolhedor e desafiador, por acreditar em meu potencial sem hesitar. André foi mais que um orientar em todos esses anos, mas uma figura humana presente, um amigo, um conselheiro e referência profissional.

À professora Míriam Teresa Paz Lopes pelo apoio irrestrito ao uso de reagentes e equipamentos indispensáveis ao desenvolvimento do trabalho, em especial a Técnica Luciana pelo suporte no preparo de reagentes.

À professora Janetti Nogueira de Francischi e Regina Maria de Marco Turchetti Maia por seus ensinamentos, lições e momentos agradáveis compartilhados no Laboratório.

Aos professores Evanguedes Kalapothakis, Leda Quércia Vieira, Gustavo Batista de Menezes, Jaqueline Isaura Alvarez Leite e Luciana Andrade de Oliveira, estendendo aos seus respectivos orientandos por disponibilizar o uso de equipamentos e reagentes, contribuindo para a execução dos experimentos.

Ao Professor Luciano dos Santos Aggum Capettini pela atenção e pronta disponibilidade em contribuir por meio de equipamentos e reagentes triviais para o sucesso desse trabalho.

À professora Maria de Fátima Leite, por abrir as portas de seu laboratório e oferecer todo o suporte aos experimentos de sinalização de cálcio.

Aos amigos de laboratório e do programa de Pós-graduação pelo convívio diário e auxílio na execução dos experimentos, em especial a Amanda, Karine, Maria Vitória, Aline, Íris, Wesley, Rodrigo, Thaís, Leonardo, Cecília e Madaline.

À Professora Priscila de Faria Pinto e sua aluna Danielle Marconato da Universidade Federal de Juiz de Fora por disponibilizar o uso do microscópio de fluorescência.

Ao Programa de Pós-graduação em Fisiologia e Farmacologia pela oportunidade e apoio em prol do crescimento científico e pessoal dos alunos; minha admiração e sentimento de gratidão serão eternos.

Aos Bioteristas Rinaldo e Wellington pelo cuidado e qualidade no manejo dos animais utilizados nos experimentos.

Lista de Figuras

Figura 1. Peptídeo agonista de PAR2 (SLIGRL-NH ₂) modula a fagocitose de partículas de zimosano induzida por LPS em macrófagos peritoneais murinos.....	41
Figura 2. Peptídeo agonista de PAR2 (SLIGRL-NH ₂) aumenta a produção de NO e expressão de <i>iNOS</i> induzida por LPS em macrófagos peritoneais murinos.	42
Figura 3. Peptídeo agonista de PAR2 (SLIGRL-NH ₂) potencializa a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) em macrófagos peritoneais murinos.	44
Figura 4. Peptídeo agonista de PAR2 (SLIGRL-NH ₂) potencializa a produção de citocinas pró-inflamatórias em macrófagos peritoneais murinos.....	45
Figura 5. Peptídeo agonista de PAR2 (SLIGRL-NH ₂) não interfere na viabilidade celular em macrófagos peritoneais murinos.....	46
Figura 6. Peptídeo agonista de PAR2 (SLIGRL-NH ₂) aumenta a expressão de PAR2 e TLR4 em macrófagos peritoneais murinos.....	47
Figura 7. Imunomarcagem de PAR2 e TLR4 em macrófagos peritoneais murinos estimulados com peptídeo agonista de PAR2 (SLIGRL-NH ₂).	48
Figura 8. Peptídeo agonista de PAR2 (SLIGRL-NH ₂) aumenta a colocalização e imunoprecipitação de PAR2 e TLR4 em macrófagos peritoneais murinos.	50
Figura 9. A inibição da síntese proteica ou transcrição de mRNA reduz o aumento da expressão de PAR2 induzida por agonista de PAR2 (SLIGRL-NH ₂) em macrófagos peritoneais murinos.	52
Figura 10. Peptídeo agonista de PAR2 (SLIGRL-NH ₂) potencializa a expressão do fator de transcrição NFκB induzida por LPS em macrófagos peritoneais murinos.....	54
Figura 11. Peptídeo agonista de PAR2 (SLIGRL-NH ₂) potencializa a degradação do inibidor do NFκB (IκBα) induzida por LPS em macrófagos peritoneais murinos.	55
Figura 12. Peptídeo agonista de PAR2 (SLIGRL-NH ₂) promove a ativação de MAP quinase p38 em macrófagos peritoneais murinos.....	56
Figura 13. Peptídeo agonista de PAR2 (SLIGRL-NH ₂) prolonga o tempo de liberação de cálcio intracelular induzida por LPS em macrófagos peritoneais murinos.....	58
Figura 14. Coquetel inibidor de proteases reduz a liberação de cálcio induzida por LPS em macrófagos peritoneais murinos.....	60
Figura 15. O peptídeo fragmento de PAR2 não interfere na liberação de cálcio induzida por LPS em macrófagos peritoneais murinos.....	62

Lista de Abreviaturas e Siglas

CD14 - *Cluster of Differentiation 14*

CD36 - *Cluster of Differentiation 36*

CEUA - Comitê de Ética no Uso de Animais da UFMG

DHE - Dihidroetídio

DMEM – *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*

DMSO - Dimetilsulfóxido

ELISA - Ensaio imunoenzimático

ERO - Espécies Reativas de Oxigênio

Fator VIIa - Fator VII ativado

Fator Xa - Fator X ativado

GM-CSF - *Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor*

HEPES – *(4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid*

i.p. - intraperitoneal

IFN- γ - Interferon do tipo gamma

IL- Interleucina

I κ B α – Inibidor da subunidade β do fator de transcrição NF κ B

LPS - Lipopolissacarídeo

M - molar (Mol/Litro)

MD2 - *Myeloid Differentiation Factor*

mg/kg - miligramas por quilo

MTT - 3-(4,5 dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio

MYD88 – *Myeloid Differentiation Factor 88*

NF κ B - *Nuclear Factor Kappa B*

NO – Óxido Nítrico

PAMP – *Pathogen-Associated Molecular Patterns* – Padrões Moleculares Associados a Patógenos

PAR- Protease Activated Receptor - Receptor Ativado por Protease

PBS - Tampão fosfato salina

RRP - Receptores de Reconhecimento de Padrão

SLIGRL-NH₂ - Peptídeo sintético ativador de PAR2

SNC - Sistema Nervoso Central

MCP-1 – *Monocyte Chemoattractant Protein -1*

TGF-β – Transforming Growth Factor β

TIR - Toll – *Interleukin Receptor I*

TLR4 – Toll Like Receptor 4 - Receptor do tipo *Toll 4*

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

TRAF - *Tumor Necrosis Factor Receptor-Associated Factor*

UFMG - Universidade Federal de Minas Gerais

v/v - volume sobre volume

Resumo

A resposta efetora de macrófagos inicia-se com o reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (PAMP) por receptores de reconhecimento de padrões expressos nos macrófagos. O receptor do tipo Toll (TLR)4 é um exemplo de PAMP cujo ligante é o lipopolissacarídeo (LPS), molécula oriunda de bactérias gram-negativas capaz de desencadear uma potente resposta antimicrobiana e pró-inflamatória nos macrófagos. Por outro lado, durante uma lesão tecidual ou infecção, proteases geradas por células e/ou secretadas por microorganismos contribuem para amplificar a resposta inflamatória. O principal mecanismo ocorre através de receptores acoplados à proteína G denominados Receptores Ativados por Protease (PAR) que desempenham funções relacionadas à coagulação, câncer, dor, inflamação, entre outras. PAR2 é o subtipo mais expresso em macrófagos e embora esse receptor funcione como um sensor inato, ainda pouco se sabe sobre a sua participação nas funções efetoras nos macrófagos. Dessa maneira, o objetivo deste trabalho foi investigar o papel de PAR2 nas respostas efetoras de macrófagos induzidas por LPS. Para isso, macrófagos obtidos da cavidade peritoneal de camundongos C57BL/6 foram estimulados com o agonista sintético de PAR2 (SLIGRL-NH₂, 30µM), LPS (100 ng/mL) ou ambos, sendo em seguida avaliadas a sua atividade fagocítica, produção de óxido nítrico (NO), espécies reativas de oxigênio (EROS) e das citocinas TNF, IL-1β, MCP-1, IL-6 e IL-10. Avaliamos ainda, a expressão de PAR2, TLR4 e da enzima óxido nítrico induzível (*iNOS*), a interação física entre PAR2 e TLR4, as vias de sinalização envolvidas nesse fenômeno, os mecanismos cálcio-dependentes envolvidos e a contribuição das proteases endógenas e de um fragmento de PAR2, obtido após clivagem de sua porção extracelular, nos efeitos pró-inflamatórios dos macrófagos peritoneais estimulados com LPS. Em alguns experimentos, os macrófagos foram pré-incubados com inibidor de síntese proteica (cicloheximida, 20µg/mL) ou inibidor da transcrição gênica (actinomicina D, 5µg/mL) antes do estímulo com SLIGRL-NH₂, LPS ou ambos e antes da avaliação da expressão de PAR2 e TLR4. A coativação de PAR2 e TLR4 potencializou as funções efetoras dos macrófagos como a fagocitose, a produção de NO, a expressão de *iNOS*, EROS e citocinas pró-inflamatórias. Além disso, a ativação de PAR2 e/ou TLR4 aumentou a expressão de ambos receptores, sendo esse mecanismo dependente da transcrição gênica e da síntese *de novo* destes receptores; e a coincubação com o agonista de PAR2 e LPS aumentou significativamente a colocalização e a interação física entre PAR2 e TLR4, confirmando uma cooperação entre esses receptores nas funções efetoras dos macrófagos. O pré-tratamento com coquetel inibidor de proteases reduziu a liberação de cálcio induzida por LPS, sugerindo que possíveis proteases liberadas pelos macrófagos poderiam, de forma autócrina, promover a ativação de PAR2, enquanto o fragmento

de PAR2 não modificou os níveis intracelulares de cálcio, confirmando que o sinergismo PAR2-TLR4 depende da produção de um fragmento ativo. Por fim, demonstramos que os mecanismos envolvidos na potencialização do repertório de ativação dos macrófagos mediados por PAR2-TLR4 são dependentes da via do fator de transcrição NFκB e do prolongamento do tempo de liberação do cálcio intracelular, sem, no entanto, interferir na fosforilação da via da MAP quinase p38. Como conclusão, este trabalho demonstra que PAR2 e TLR4 desempenham um papel importante para potencializar as funções efetoras dos macrófagos, fornecendo ainda, evidências para a compreensão do funcionamento dessas células em um microambiente infeccioso ou inflamatório em que as proteases estão presentes.

PALAVRAS-CHAVE: PAR2, TLR4, Macrófagos, serinoproteases, Inflamação

Abstract

The macrophage effector response begins with the recognition of pathogen-associated molecular patterns (PAMP) by pattern recognition receptors expressed on macrophages. The Toll-like receptor (TLR) 4 is an example of PAMP whose ligand is the lipopolysaccharide (LPS), a molecule derived from gram-negative bacteria capable of triggering a potent antimicrobial and pro-inflammatory response in macrophages. On the other hand, during tissue injury or infection, proteases generated by cells and / or secreted by microorganisms contribute to amplify the inflammatory response. The main mechanism occurs through receptors coupled to protein G called Protease Activated Receptors (PAR) that perform functions related to coagulation, cancer, pain, inflammation, among others. PAR2 is the most expressed subtype in macrophages and although this receptor functions as an innate sensor, little is known about its participation in the effector functions in macrophages. Thus, the objective of this work was to investigate the role of PAR2 in the effector responses of macrophages induced by LPS. For this, macrophages obtained from the peritoneal cavity of C57BL / 6 mice were stimulated with the synthetic agonist of PAR2 (SLIGRL-NH₂, 30μM), LPS (100ng / mL) or both, and their phagocytic activity, nitric oxide production (NO), reactive oxygen species (EROS) and cytokines TNF, IL-1β, MCP-1, IL-6 and IL-10 were evaluated. We also evaluated the expression of PAR2, TLR4 and the inducible nitric oxide enzyme (iNOS), the physical interaction between PAR2 and TLR4, the signaling pathways involved in this phenomenon, the calcium-dependent mechanisms involved and the contribution of endogenous proteases and a PAR2 fragment, obtained after cleavage of its extracellular portion, on the pro-inflammatory effects of peritoneal macrophages stimulated with LPS. In some experiments, macrophages were pre-incubated with protein synthesis inhibitor (cycloheximide, 20μg / mL) or gene transcription inhibitor (actinomycin D, 5μg / mL) before SLIGRL-NH₂, LPS or both and before expression evaluation of PAR2 and TLR4. The coactivation of PAR2 and TLR4 enhanced macrophage effector functions such as phagocytosis, NO production, iNOS expression, EROS and pro-inflammatory cytokines. In addition, activation of PAR2 and / or TLR4 increased the expression of both receptors, this mechanism being dependent on gene transcription and *de novo* synthesis of these receptors, and the coincubation with the PAR2 and LPS agonist significantly increased colocalization and physical interaction between PAR2 and TLR4, confirming a cooperation between these receptors in the effector functions of macrophages. Pretreatment with protease inhibitor cocktail reduced LPS-induced calcium release, suggesting that possible proteases released by macrophages could autocrinally promote the activation of PAR2, while the PAR2 fragment did not change intracellular calcium levels, confirming that the PAR2-TLR4 synergism depends on the production of an active fragment. At last, we demonstrate that the

mechanisms involved in enhancing the activation repertoire of macrophages mediated by PAR2-TLR4, are dependent on the transcription factor NF κ B pathway and on the prolongation of the intracellular calcium release time, without, however, interfering with phosphorylation of via MAP kinase p38. In conclusion, this work demonstrates that PAR2 and TLR4 play an important role to enhance the effector functions of macrophages, providing further evidence for understanding the functioning of these cells in an infectious or inflammatory microenvironment in which proteases are present.

KEYWORDS: PAR2, TLR4, Macrophages, serinoproteases, Inflammation

Sumário

Agradecimentos	2
Lista de Figuras	4
Lista de Abreviaturas e Siglas	5
Resumo	7
Abstract	9
Sumário	11
1.Revisão da Literatura	13
1.1 Introdução	13
1.2 Macrófagos e a Resposta Inata.....	14
1.2.1 Origem, distribuição e heterogeneidade tecidual dos macrófagos	14
1.2.2 Macrófagos peritoneais	15
1.2.3 O Papel do Receptor do tipo Toll 4 nos macrófagos.....	16
1.2.4 Polarização dos macrófagos e respostas efetoras	18
1.3 Proteases e Inflamação	21
1.3.1 Receptores Ativados por Proteases (PAR).....	21
1.3.2 Importância de PAR2 para a inflamação.....	24
2. Justificativa	26
3. Objetivos	28
3.1 Objetivo Geral.....	28
3.2 Objetivos específicos.....	28
4. Metodologia	30
4.1 Animais	30
4.2 Obtenção, coleta e cultivo dos macrófagos peritoneais	30
4.3 Avaliação da Atividade Fagocítica em macrófagos peritoneais.....	31
4.4 Ensaio para dosagem de Óxido Nítrico (NO)	32
4.5 Ensaio para dosagem de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs).....	32
4.6 Ensaio para dosagem de Citocinas	33
4.7 Avaliação da viabilidade celular na cultura de macrófagos	34
4.8 Avaliação da liberação de cálcio intracelular	34
4.9 Avaliação da expressão de <i>iNOS</i> , PAR2, TLR4, p65 NFκB e MAP quinase p38 por <i>Western Blotting</i>	35
4.10 Avaliação de interação proteica entre TLR4 e PAR2 por Coimunoprecipitação	36

4.11 Imunolocalização de <i>iNOS</i> , PAR2, TLR4, p65 NFκB, IκBα por microscopia de fluorescência	37
4.12 Análise da colocalização de TLR4 e PAR2 por imunofluorescência.....	38
4.13 Análise estatística.....	39
5. Resultados	40
5.1 Peptídeo agonista de PAR2 (SLIGRL-NH ₂) aumenta a fagocitose de partículas de zimosano induzida por LPS em macrófagos peritoneais murinos.....	40
5.2 Peptídeo agonista de PAR2 (SLIGRL-NH ₂) aumenta a produção de NO e a expressão de <i>iNOS</i> induzida por LPS em macrófagos peritoneais murinos	40
5.3 Peptídeo agonista de PAR2 (SLIGRL-NH ₂) aumenta a produção de EROs induzida por LPS em macrófagos peritoneais murinos.....	43
5.4 Peptídeo agonista de PAR2 (SLIGRL-NH ₂) aumenta a produção de citocinas pró-inflamatórias induzida por LPS em macrófagos peritoneais murinos.....	43
5.5 Avaliação da viabilidade celular dos macrófagos peritoneais após estímulo com LPS, SLIGRL-NH ₂ ou ambos	43
5.6 Peptídeo agonista de PAR2 (SLIGRL-NH ₂) ou LPS aumenta a expressão de PAR2 e TLR4 em macrófagos peritoneais murinos.	46
5.7 Peptídeo agonista de PAR2 (SLIGRL-NH ₂) ou LPS aumenta a interação física entre PAR2 e TLR4 em macrófagos peritoneais murinos.....	49
5.8 A expressão aumentada de PAR2 e TLR4 em macrófagos peritoneais murinos induzido pelo peptídeo agonista de PAR2 (SLIGRL-NH ₂) ou LPS é dependente da inibição da síntese proteica e/ou transcrição gênica.	51
5.9 Peptídeo agonista de PAR2 (SLIGRL-NH ₂) aumenta a expressão de p65 NFκB induzida por LPS em macrófagos peritoneais murinos.....	52
5.10 Peptídeo agonista de PAR2 (SLIGRL-NH ₂) aumenta a fosforilação de P38 Map quinase em macrófagos peritoneais murinos.....	56
5.11 Peptídeo agonista de PAR2 (SLIGRL-NH ₂) prolonga o tempo de liberação de cálcio intracelular induzido por LPS em macrófagos peritoneais murinos.	57
5.12 O bloqueio da ação de proteases extracelulares reduz a liberação de cálcio intracelular induzido por LPS em macrófagos peritoneais murinos.....	58
5.13 Fragmento peptídico gerado após clivagem de PAR2 (SLIGRL-NH ₂) não interfere na liberação de cálcio intracelular induzido por LPS em macrófagos peritoneais murinos.....	60
6. Discussão	62
7. Conclusão	71
Anexo	72
8. Referências Bibliográficas	73

1.Revisão da Literatura

1.1 Introdução

Há mais de um século, o zoologista Élie Metchnikoff observou em organismos invertebrados marinhos a capacidade que algumas células têm de englobar partículas estranhas como mecanismo de defesa frente a um estímulo nocivo (revisado por Gordon *et al.*, 2017). Suas observações contribuíram para o surgimento da teoria dos fagócitos, cujo termo deriva do grego (“*Phagos*” significa “comer” e “*cytos*” significa “célula”) postulando que em organismos multicelulares, fagócitos seriam capazes de internalizar partículas estranhas não apenas para a obtenção de nutrientes, mas com o propósito de eliminá-los. O pioneirismo dos estudos de Metchnikoff no campo da biologia dos fagócitos forneceu muitas informações valiosas para a compreensão das respostas imunes mediadas por células, sobretudo na caracterização das funções homeostática e antimicrobiana dos macrófagos (revisado por Gordon, 2016).

Com o avanço do conhecimento, os macrófagos foram sendo caracterizados como células imunes heterogêneas que apresentam um amplo repertório de funções efetoras envolvidas na defesa do hospedeiro, na remoção de células apoptóticas e reparo celular (revisado por Gordon & Martinez-Palmares 2017; Moghaddan *et al.*, 2018). Essa versatilidade de funções apresentadas pelos macrófagos aliada a sua ampla distribuição tecidual confere a essas células um papel de destaque no desenvolvimento e evolução de condições patológicas, como a inflamação, diabetes, obesidade e câncer (Hoeffel & Guinhoux, 2018; Moghaddan *et al.*, 2018). Certas funções tecido-específicas dos macrófagos são direcionadas em função da presença de moléculas no microambiente celular, capazes de reprogramar essas células para exercer um determinado perfil funcional, fenotípico e metabólico (Okabe & Medzhitov, 2016; Orecchioni *et al.*, 2019). Dentre essas moléculas, as proteases são enzimas proteolíticas presentes em condições inflamatórias que podem modular as funções dos macrófagos atuando sobre Receptores Ativados por Protease (PAR)2 expressos nessas células (Pontarollo *et al.*, 2019). Embora a importância das proteases na inflamação já tenha sido descrita, vale ressaltar que as ações de PAR2 sobre a função efetora dos

macrófagos e suas consequências para a resposta inata ainda é pouco explorada. Dessa maneira, compreender a dinâmica de ativação dessas células poderá fornecer evidências para futuras abordagens terapêuticas nas quais os macrófagos são componentes essenciais.

1.2 Macrófagos e a Resposta Inata

1.2.1 Origem, distribuição e heterogeneidade tecidual dos macrófagos

Macrófagos, monócitos, células dendríticas e os osteoclastos pertencem ao Sistema Fagocítico Mononuclear cuja classificação baseia-se na semelhança entre a origem, morfologia e função que essas células desempenham no organismo (Hume *et al.*, 2019). Os macrófagos são divididos basicamente em duas subpopulações: Macrófagos residentes tecido-específicas, com elevado grau de especialização; e macrófagos derivados dos monócitos que migram para determinados locais em situações fisiológicas ou patológicas, onde há dano tecidual, inflamação ou infecção (revisado por Moghaddan *et al.*, 2018; Hoeffel & Guinhoux, 2018).

Durante o período embrionário, o saco vitelínico e o fígado fetal são os principais locais envolvidos na gênese de células progenitoras que se diferenciam em um precursor eritromieloide e se distribuem por todos os tecidos, constituindo os macrófagos residentes (revisado por Guinhoux & Guillians, 2016; Hoeffel & Guinhoux, 2018). Até os estágios iniciais de desenvolvimento do indivíduo, a fonte de macrófagos residentes é obtida por meio desses órgãos. Já na fase adulta, em certos tecidos como fígado, cérebro, peritônio, baço, pulmão, entre outros, a população de macrófagos residentes se mantém por mecanismos de autorenovação celular. Porém, outra fonte de obtenção dos macrófagos advém da medula óssea, nas quais células-tronco pluripotentes se diferenciam em um precursor mielóide dando origem aos monócitos e as células dendríticas (revisado por Zhao *et al.*, 2018). Os monócitos circulantes no sangue, por sua vez, podem migrar para os tecidos-avos, onde reabastecem as populações de macrófagos residentes e contribuem para a homeostase tecidual (revisado por Guinhoux & Guillians, 2016; Zhao *et al.*, 2018).

Em um contexto patológico, os monócitos também podem ser recrutados até os tecidos em resposta a uma lesão, infecção ou inflamação, onde se diferenciam em

macrófagos com o objetivo de combater patógenos invasores, reparar dano tecidual e restaurar o equilíbrio inicial (revisado por Wynn & Vannella, 2016; Peiseler & Kubes, 2018). As particularidades de cada microambiente do organismo é o que vai influenciar no grau de diferenciação fenotípica e funcional dos macrófagos. Assim, podemos citar os macrófagos alveolares, macrófagos peritoneais, macrófagos do fígado (células de kupffer), macrófagos do SNC (microglia), macrófagos dos ossos (osteoclastos), entre outros (revisado por Zhao *et al.*, 2018). Essas populações desempenham funções tecidos-específicas que visam à manutenção da homeostase tecidual como, por exemplo, o remodelamento ósseo (osteoclastos), reciclagem de ferro das hemácias no baço (macrófagos polpa vermelha), remoção de células apoptóticas, debris celulares, eliminação de patógenos invasores e reparo tecidual (revisado por Moghaddan *et al.*, 2018; Winn *et al.*, 2020).

Essa versatilidade e heterogeneidade dos macrófagos desperta um grande interesse na investigação da biologia e funcionamento dessas células frente a determinados estímulos presente no microambiente. Uma das maneiras práticas empregadas quando se deseja avaliar aspectos morfológicos, fenotípicos e funcionais dos macrófagos consiste na obtenção e cultivo *in vitro* dessas células.

1.2.2 Macrófagos peritoneais

O cultivo de macrófagos peritoneais é amplamente utilizado nos estudos *in vitro* sobre a biologia celular, o desenvolvimento e resposta inflamatória dessas células (revisado por Wang *et al.*, 2013). A cavidade peritoneal tem a vantagem de permitir a recuperação de grande quantidade de células, além do fácil acesso na aplicação dos estímulos e na coleta de células. Muitos agentes que causam uma inflamação estéril são utilizados para aumentar o recrutamento e quantidade de células na cavidade peritoneal. O Tioglicolato é um desses agentes, que ao ser injetado no peritônio do animal fornece uma boa fonte de macrófagos primários após três dias do estímulo (Li *et al.*, 1997).

As subpopulações de macrófagos presentes na cavidade peritoneal diferem em dois tipos com base no tamanho celular: Os macrófagos pequenos (SPMs, do inglês *small peritoneal macrophages*) e os macrófagos volumosos (LPMs, do inglês *large peritoneal macrophages*). Os SPMs são as principais populações de células que migram para o peritônio em resposta a um estímulo infeccioso ou inflamatório (Cassado *et al.*,

2015). São células que expressam fenotipicamente baixos níveis de F4/80 e altos níveis do complexo principal de histocompatibilidade (MHC, do inglês *Major histocompatibility Complex*) (MHC) de classe II. Em contrapartida, os LPMs representam a população predominante de macrófagos residentes do peritônio no estado fisiológico e se caracterizam pela presença de citoplasma e vacúolos abundantes (Cassado *et al.*, 2015). Os LPMs expressam altos níveis de F4/80 e baixos níveis de MHC de classe II (Cassado *et al.*, 2015; Zadjia *et al.*, 2020).

Os macrófagos residentes ou derivados dos monócitos circulantes atuam como células sentinelas nos tecidos, localizando-se em locais estratégicos, de maior proximidade com microorganismos invasores (Epelman *et al.*, 2014). Ao reconhecer esses patógenos, os macrófagos ativam mecanismos efetores inatos que visam eliminar o patógeno invasor (revisado por Wynn *et al.*, 2013; Iwasaki & medzhitov, 2015). Os macrófagos ativados secretam uma série de moléculas solúveis responsáveis pela amplificação das ações inflamatórias e antimicrobianas nos tecidos-alvo (revisado por Moghaddan *et al.*, 2018). A dinâmica de eventos que se sucedem após a ativação é caracterizado pela vasodilatação, recrutamento de neutrófilos para o sítio inflamatório/infeccioso e produção de mediadores, visando à eliminação do agente nocivo (físico, químico ou biológico), o reparo tecidual e o retorno da homeostase (Medzhitov, 2010).

1.2.3 O Papel do Receptor do tipo Toll 4 nos macrófagos

A etapa inicial de uma resposta inflamatória e antimicrobiana pelos macrófagos começa pela detecção de estímulos infecciosos ou oriundos de dano tecidual, através de “sensores” ou receptores presentes na superfície celular (Tartey & Takeuchi, 2017). Uma variedade de receptores de reconhecimento de padrões (PRRs, do inglês *pattern recognition receptors*) foi descrita na literatura, incluindo os *NOD-like receptors* (NOD), receptores de lecitina tipo C e os clássicos *Toll like Receptors* (TLRs, do inglês Toll-like receptor) (Sato & Akira, 2016). A principal função dos RPRs é identificar Padrões Moleculares Associados a Patógenos (PAMPs, do inglês *Pathogen-Associated Molecular Patterns*), isto é, moléculas altamente conservadas, de origem microbiana e reconhecidas pelo sistema imune do hospedeiro com certo grau de especificidade (Takeuchi & Akira, 2010). Os PRRs também são capazes de reconhecer

moléculas derivados do hospedeiro e relacionadas a dano tecidual (DAMPs, do inglês *Damage-Associated Molecular Patterns*) (revisado por Roh & Sohn, 2018).

Os TLRs são glicoproteínas transmembranares conservadas evolutivamente que reconhecem diferentes produtos microbianos como lipopolissacarídeo (LPS), lipopeptídeos, RNA de fita dupla, DNA CpG não metilado e flagelina (Tartey & Takeuchi, 2017). São expressos em uma variedade de tipos celulares, com destaque para células epiteliais e macrófagos (Sato & Akira, 2016). TLR4, um membro da família dos TLRs é ativado por Lipopolissacarídeo (LPS), um PAMP de bactérias gram-negativas como *Escherichia coli* (Rosadini & Kagan, 2017), mas também por outros produtos endógenos e exógenos como Proteína F do vírus sincicial respiratório, proteínas de choque térmico, fibrinogênio, surfactante A, defensina-2, elastase neutrofílica (Erridge, 2010; Kusmish *et al.*, 2017).

O mecanismo de ativação do TLR4 inicia com o transporte do LPS pela sua proteína de ligação (LBP, do inglês, *Lipopolysaccharide Binding Protein*) até o receptor tirosino quinase que juntamente com o acoplamento do complexo CD14/MD2 (proteína de diferenciação mielóide-2) formam o heterotetrâmero necessário para induzir a dimerização do receptor (Hailman *et al.*, 1994; Rosadini & Kagan, 2017). O passo seguinte da sinalização intracelular depende da aproximação do domínio citoplasmático de resistência ao receptor de interleucina-1 (TIR) com o TLR4, facilitando o recrutamento de proteínas adaptadoras e quinases. As proteínas adaptadoras direcionam a resposta celular em duas vias principais: Uma dependente do fator de diferenciação mielóide 88 (MyD88) e outra independente desse fator (Sato & Akira, 2016).

A via dependente do MyD88, uma vez ativada, se liga ao adaptador do tipo MyD (Mal/TIR) e quinases associadas ao domínio TIR formando um complexo de proteínas que culmina com a ativação da família de IKK, um complexo proteico trimérico formado pelas subunidades catalíticas IKK β , IKK α e NEMO (IKK γ) (Dossang *et al.*, 2016). A subunidade IKK β é ativada pelo complexo proteico da cascata de sinalização, que por sua vez fosforila a proteína I κ B α , um inibidor citosólico do fator de transcrição NF κ B (Fator nuclear Kappa B). Isso acarretará na poliubiquitinação do I κ B α , levando a sua degradação pelo sistema ubiquitina-proteassomo, permitindo a translocação do fator de transcrição NF κ B para o núcleo celular (Mitchell *et al.*, 2016). No núcleo, o NF κ B promove a síntese de inúmeros mediadores pró-inflamatórios e

imunomoduladores (Mitchell *et al.*, 2016; Rosadini & Kagan, 2017). Por outro lado, o acoplamento do domínio TIR pela ligação do LPS ao receptor do TLR4, também irá ativar uma via independente de MyD88, por meio do adaptador indutor de interferon contendo o domínio TIR (TRIF) (Rosadini & Kagan, 2017). Esse domínio se liga à molécula adaptadora relacionada ao TRIF (TRAM) que em seguida ativa o fator associado ao receptor TNF (TRAF)3 (Rosadini & Kagan, 2017). As proteínas da família TRAF associam com o inibidor IKK ϵ que fosforila o fator regulador de interferon-3 (IRF-3), promovendo a translocação desse fator de transcrição para o núcleo da célula (Mitchell *et al.*, 2016) A sinalização dessa via culmina com a ativação de respostas antivirais, anti-inflamatórias e anti-apoptóticas (Tarassishin *et al.*, 2013).

1.2.4 Polarização dos macrófagos e respostas efetoras

Determinados estímulos no microambiente celular ou tecido-específicos direcionam os macrófagos, dentro do espectro de ativação, para dois fenótipos principais: Macrófagos classicamente ativados (M1) ou macrófagos alternativamente ativados (M2) (revisado por Shapouri-Moghaddam *et al.*, 2018; Orecchioni *et al.*, 2019). Os macrófagos polarizam para um fenótipo pró-inflamatório (M1) na presença de LPS bacteriano apenas ou juntamente com citocinas secretadas por Linfócitos CD4+ (Th1) como GM-CSF, IFN- γ . Como consequência, os macrófagos M1 produzem elevadas concentrações de citocinas pró-inflamatórias como Fator de Necrose Tumoral (TNF), interleucina (IL)-1 β , IL-6, IL-12, IL-23 e baixos níveis de IL-10, além de gerar quantidades maiores de óxido nítrico (NO) e espécies reativas de oxigênio (EROs) (Shapouri-Moghaddam *et al.*, 2018;). Todas essas moléculas secretadas irão levar a um aumento das funções antimicrobianas, inflamatórias e de apresentação de antígenos pelos macrófagos (Akira *et al.*, 2006; Shapouri-Moghaddam *et al.*, 2018). Por outro lado, linfócitos CD4+ (Th2) secretam IL-4, IL-13 e IL-10 que polarizam os macrófagos para um perfil fenotípico mais anti-inflamatório (M2) (Shapouri-Moghaddam *et al.*, 2018; Orecchioni *et al.*, 2019). Esses macrófagos M2 suprimem a resposta inflamatória, se opondo aos efeitos produzidos pelos macrófagos M1, através da produção de citocinas como IL-10, TGF- β e aumento da capacidade fagocítica de células apoptóticas (Watanabe *et al.*, 2019). Os macrófagos M2 também estão envolvidos nas respostas antiparasitárias, antialérgicas, pró-angiogênicas e de reparo e remodelamento tecidual (Martinez & Gordon, 2014; Hume, 2015).

Os macrófagos polarizados para M1 vão exercer diversas funções dentro do repertório de ativação que incluem a fagocitose de micro-organismos, a produção de citocinas, quimiocinas, prostaglandinas, NO e EROs (Shapouri-Moghaddam *et al.*, 2018). A fagocitose é definida como a capacidade de algumas células de internalizar partículas maiores que $0.5\mu\text{M}$ (Rosales & Uribe-Querol, 2017). Esse fenômeno biológico realizado inicialmente por organismos unicelulares tinha como propósito a obtenção de nutrientes (revisado por Gordon, 2016). No entanto, a fagocitose evoluiu de maneira a contribuir para a homeostase tecidual e a proteção contra patógenos invasores em organismos multicelulares (Gordon, 2016).

Vários tipos celulares detêm a capacidade de internalização de partículas. Os queratinócitos, as células epiteliais e os fibroblastos são alguns exemplos de células não especializadas em fagocitar partículas com certa limitação. Já os macrófagos fazem parte dos fagócitos profissionais que incluem os osteoclastos, os neutrófilos, os eosinófilos e as células dendríticas (Hume *et al.*, 2019). Esse grupo diferencia dos demais tipos celulares pelo grau de especialização no reconhecimento, captura e ingestão de partículas estranhas, micro-organismos invasores e células apoptóticas (Hume *et al.*, 2019; Gordon & Plüddemann, 2019).

A fagocitose nos macrófagos tem dois propósitos principais: Um fisiológico e um papel imunológico. O fisiológico refere-se à função dos macrófagos na captura e remoção de debris celulares, células senescentes e partículas estranhas (Rosales & Uribe-Querol, 2017). Um exemplo disso ocorre diariamente com a fagocitose de eritrócitos sanguíneos no baço, fígado e pulmão e que favorece a reciclagem de ferro e a manutenção da homeostase tecidual (Winn, *et al.*, 2020). Por outro lado, a fagocitose desempenha um importante papel na defesa inata do hospedeiro por meio da captura e eliminação de patógenos invasores. Além disso, os macrófagos contribuem para o desenvolvimento de uma resposta adaptativa, onde ocorre o processamento e apresentação dos antígenos infecciosos nos linfonodos (Gordon, 2016; Hirayama *et al.*, 2018).

O fenômeno fagocítico nos macrófagos inicia com o reconhecimento de estruturas presentes na partícula estranha ou no micro-organismo alvo por meio de receptores fagocíticos (Freeman & Grinstein, 2014). Esses são classificados de acordo com as características do ligante, podendo reconhecer PAMPs, partículas opsonizadas e

corpos apoptóticos (Pauwels *et al.*, 2017) No grupo dos PAMPs, os principais receptores envolvidos são os receptores de manose, SR (*Scavenger Receptor A*), CD14, CD36, MARCO e dectina-1. Constituintes da parede celular de fungos do gênero *Saccharomyces sp* como β -glucanas (zimosano) é um exemplo de PAMP que se liga em receptores de dectina-1 nos macrófagos, promovendo a internalização da partícula fúngica (Sigola *et al.*, 2016). Os TLRs, apesar de não estar diretamente relacionado à fagocitose atuam estimulando a ingestão de partículas em colaboração com outros receptores fagocíticos (Iwasaki & medzhitov, 2015).

Após o reconhecimento da partícula fagocitada por receptores fagocíticos, algumas vias de sinalização nos macrófagos são ativadas à jusante e promovem a reorganização do citoesqueleto celular e o englobamento da partícula, com destaque para a via das GTPases e Rhoquinasas (Fao & Finnemann, 2015; Rosales & Uribe-Querol, 2017). O processo de internalização inicia com a projeção de pseudópodes pelos macrófagos e a extensão da membrana plasmática em torno da partícula fagocitada. Esse fenômeno envolve a polimerização de filamentos de actina que delimitam o corpo estranho dentro de um vacúolo denominado fagossomo. O fagossomo recém-formado sofre um processo de maturação ao se fundir com vesículas provenientes do retículo endoplasmático e do complexo de golgi, como os lisossomos, formando o fagolisossomo (Rosales & Uribe-Querol, 2017). A composição vesicular do fagolisossomo apresenta níveis de pH mais ácidos e de enzimas hidrolíticas como catepsinas, lisozimas, proteases, entre outras que permitem a degradação do patógeno ou partícula internalizada (Pawels *et al.*, 2017). Além disso, os fragmentos antigênicos oriundos dos patógenos são processados e expostos na membrana externa dos macrófagos e apresentados nos linfonodos, iniciando assim, uma resposta imune adaptativa (Iwasaki & medzhitov, 2015).

Outras funções microbicidas desempenhadas pelos macrófagos envolvem a produção e liberação de produtos do metabolismo oxidativo que tem ação citotóxica contra patógenos invasores (Weigert *et al.*, 2017). PAMPs como o LPS estimulam a síntese de espécies reativas de oxigênio (EROs) nos macrófagos principalmente através da via da NADPH oxidase (Forrester *et al.*, 2018). As EROs são intermediários oxidantes instáveis que modificam proteínas e lipídios por meio de reações redox e causam dano direto à moléculas estruturais do patógeno invasor (Radi, 2018). Quimicamente, as principais EROs, em ordem de capacidade oxidante, são

representadas pelo óxido nítrico, peróxido de hidrogênio, íon superóxido e peroxinitrito (MacMicking *et al.*, 1997; Radi, 2018).

O óxido nítrico (NO) é outra molécula secretada por macrófagos que tem inúmeras funções no organismo (Lee *et al.*, 2017). O NO reage com íon superóxido para formar o peroxinitrito, molécula instável com elevada capacidade oxidante sobre compostos lipídicos e protéicos (Radi, 2018). Quando os macrófagos são estimulados com LPS, a maquinaria bioquímica responsável pela produção de NO é ativada, sendo a enzima responsável pela síntese de NO denominada de *óxido nítrico sintase (NOS)* (Lee *et al.*, 2017). Até o momento, três isoformas de NOS foram caracterizadas e clonadas, sendo a isoforma II da *óxido nítrico sintase induzível (iNOS)* a principal enzima responsável pela produção de óxido nítrico nos macrófagos após estímulo inflamatório (Xue *et al.*, 2018), embora não seja a única isoforma expressa nessas células.

Na presença de estímulos microbianos como o LPS, os macrófagos produzem grande variedade de citocinas pró-inflamatórias incluindo TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-12, MCP-1, IL-23, entre outras (Shapouri-Moghaddam *et al.*, 2018). Essas moléculas secretadas pelos macrófagos possuem uma ampla gama de funções como o recrutamento de neutrófilos e outras células para o sítio inflamatório, ativação e polarização de macrófagos, aumento da expressão de moléculas de adesão, metaloproteinases e outros mediadores inflamatórios fundamentais para a amplificação da resposta inflamatória e antimicrobiana (Fujiwara & Kobayashi, 2005; Atri *et al.*, 2018).

1.3 Proteases e Inflamação

1.3.1 Receptores Ativados por Proteases (PAR)

A resposta inflamatória por estímulos infecciosos desencadeia a secreção de uma série de moléculas biologicamente ativas de natureza proteolítica pelas células imunes (Eftekhari *et al.*, 2018). Macrófagos, mastócitos e neutrófilos liberam proteases contidas em vesículas secretórias com destaque para as serino proteases (Ramachandram *et al.*, 2016). Historicamente, tais moléculas foram caracterizadas biologicamente por suas funções proteolíticas extracelulares. No entanto, no início da década de 90, essa visão simplista das ações das proteases foi expandida, através da demonstração da capacidade

dessas enzimas de atuar sobre uma classe de receptores metabotrópicos presentes na superfície celular denominados de Receptores Ativados por Proteases (PAR, do inglês *Protease-Activated Receptor*) (Macfarlane *et al.*, 2001; Hamilton & Trejo, 2017).

Os Receptores Ativados por Proteases (PARs, do inglês “*Protease Activated Receptor*”) são classificados em 4 subtipos: PAR1, PAR2, PAR3 e PAR4 (Alexander *et al.*, 2013; Hollenberg & Compton., 2002) em função da ordem cronológica de descoberta. Dentre esses subtipos, PAR1 foi o primeiro receptor clonado e caracterizado como sendo alvo das ações proteolíticas da trombina sobre a coagulação do sangue (Vu *et al.*, 1991). Posteriormente, outros subtipos foram sendo elucidados como PAR2 (Nystedt *et al.*, 1994,) PAR3 (Ishihara *et al.*, 1997) e PAR4 (Kahn *et al.*, 1998, Xu *et al.*, 1998). Os PARs são distribuídos de maneira ampla no organismo, com destaque para o trato gastrintestinal, respiratório, endotélio vascular, como também em células imunes: monócitos, macrófagos, neutrófilos (Steinhoff *et al.*, 2005; Ossovskaya and Bunnett, 2004; Colognato *et al.*, 2003) e por isso, há grande interesse na investigação do papel desses receptores em várias condições fisiopatológicas. PAR1 e PAR4 são os subtipos com maior importância na hemostasia e desordens cardiovasculares (Coughlin *et al.*, 2000; Leger *et al.*, 2006; Nieman *et al.*, 2016), enquanto PAR3 parece atuar como cofator da ativação de PAR4 por trombina, tendo papel na coagulação sanguínea (Nakanishi-Matsui *et al.*, 2000). Já PAR2 e PAR4 são expressos em células imunes e estão envolvidos em respostas inflamatórias como o recrutamento e ativação de leucócitos (Braga *et al.*, 2013, Gomides *et al.*, 2012; Vergnolle *et al.*, 2002) e na nocicepção e hiperalgisia (Bunnet *et al.*, 2004; Bao *et al.*, 2014).

PAR2 demonstra ser o subtipo mais relevante em resposta a um estímulo de natureza inflamatória ou infecciosa e são alvos de proteases extracelulares endógenas ou exógenas (Schmidlin *et al.*, 2002; Steinhoff *et al.*, 2005; Matos *et al.*, 2013; 2014). Os principais ligantes endógenos deste receptor, são secretados em uma condição inflamatória por neutrófilos (grânulos citoplasmáticos, proteinase-3, catepsina G, elastase), mastócitos (triptase), macrófagos (metaloproteinases) ou após dano celular (fator VIIa, Xa, tripsina, trombina) (Corvera *et al.*, 1997; Steinhoff *et al.*, 2005; Ramachandran *et al.*, 2008; Cattaruzza *et al.*, 2014). As proteases exógenas, por sua vez, são derivadas de patógenos invasores como, por exemplo, a elastase de *Pseudomonas aeruginosa* (Dulon *et al.*, 2005), gingipain de *Porphyromonas gingivalis* (Lourbakos *et al.*, 1998), *Treponema denticola* (Holzhausen *et al.*, 2006), *Serratia*

marcescens (Kida *et al.*, 2007), *Aspergillus fumigatus* (Morreti *et al.*, 2008), vírus da Influenza (Khoufache *et al.*, 2009) e até alérgenos derivados de ácaros como Der P2 e Der P9 (Sun *et al.*, 2001). Assim, em certas condições em que há dano celular, inflamação ou infecção, inúmeras proteases presentes no microambiente ou secretadas por patógenos invasores são capazes de atuar sobre PAR2 e desencadear respostas efetoras locais.

O mecanismo pelo qual essas proteases ativam o PAR2 ocorre por meio da clivagem proteolítica e irreversível da porção aminoterminal extracelular em um ponto específico do receptor, gerando uma sequência peptídica remanescente que atua como um ligante ancorado, interagindo intramolecularmente com o sítio de ligação do receptor, desencadeando a sua ativação (Adams *et al.*, 2011; Hollenberg *et al.*, 2014). A sinalização via PAR2 ocorre por acoplamento com proteínas G_q , G_i , $G_{12/13}$ ou diretamente com β -arrestinas-2 (Adams *et al.*, 2011). A transdução de sinal ocorre por ativação de vias intracelulares como das Rho quinases, MAP quinases, do fator de transcrição NF κ B e liberação cálcio (Rothmeier & Ruf, 2012). Os eventos celulares resultantes promovem um aumento da motilidade celular, expressão gênica e secreção de mediadores (McCoy *et al.*, 2010; Gieseler *et al.*, 2013; Ramachandran *et al.*, 2009). Após a ativação do receptor por clivagem proteolítica, em geral, ocorre o término da resposta por regulação negativa, e o receptor é internalizado em vesículas endocíticas. Os receptores endocitados podem ser reciclados e transportados de volta à membrana plasmática ou ser degradados no interior de lisossomos (Déry *et al.*, 1999; Ricks & Trejo., 2009; Stalheim *et al.*, 2005).

Embora a ativação de PAR2 por enzimas proteolíticas endógenas seja fisiologicamente mais relevante, alguns peptídeos sintéticos, baseados na sequência de aminoácidos ligantes foram desenvolvidos e ativam o receptor por um mecanismo não proteolítico (Hollenberg *et al.*, 2014). Os peptídeos sintéticos ligantes de PAR2 podem ser agonistas ou antagonistas do receptor e apresentam graus variados de potência e seletividade (Yau *et al.*, 2016). Nos estudos *in vitro* e *in vivo* é empregado peptídeos de elevada seletividade para PAR2, como, por exemplo, o agonista de PAR2 (SLIGRL-NH₂, Ser-Leu-Ile-Gly-Arg-Leu) e o antagonista (ENMD1068). Essas moléculas são ferramentas farmacológicas muito úteis na investigação da modulação do PAR2 em diferentes contextos fisiopatológicos (Barry *et al.*, 2010).

1.3.2 Importância de PAR2 para a inflamação

O PAR2 é amplamente expresso no organismo, tendo maior importância em sítios anatômicos nos quais as proteases estão presentes, como por exemplo, o trato respiratório, gastrointestinal e locais inflamados (Adams *et al.*, 2011; Ramachandran *et al.*, 2016). Em inúmeras condições inflamatórias, PAR2 contribui para o desenvolvimento e progressão de doenças como asma, artrite, colite, aterosclerose, entre outras (Coelho *et al.*, 2003; Assaduzzaman *et al.*, 2017; Mc Culloch *et al.*, 2018; Posma *et al.*, 2019). Células imunes como neutrófilos, eosinófilos e macrófagos contribuem significativamente para a evolução dessas condições patológicas, onde PAR2 funciona como um sensor imune, capaz de detectar proteases extracelulares e induzir uma resposta inflamatória e antimicrobiana (Colognato *et al.*, 2003; Schpacovitch *et al.*, 2008).

Os primeiros estudos descreveram a importância de PAR2 no recrutamento e adesão de leucócitos *in vivo* (Vergnolle, 1999). Em neutrófilos, por exemplo, a ativação de PAR2 aumenta a liberação intracelular de cálcio e promove alterações na motilidade celular, liberação de citocinas e grânulos citoplasmáticos (Howells *et al.*, 1997; Ramachandran *et al.*, 2011). Feld e colaboradores demonstraram que a secreção de INF γ , uma citocina antiviral, por neutrófilos é dependente de PAR2 (Feld *et al.*, 2013). Além disso, neutrófilos secretam proteinase-3, uma enzima capaz de clivar e ativar PAR2. Em um trabalho recente do nosso grupo, Almeida e colaboradores demonstrou que PAR2 é importante para o recrutamento de neutrófilos em modelo de inflamação pulmonar aguda induzida por LPS (Almeida *et al.* 2020), confirmando a importância desse receptor na dinâmica da resposta inflamatória. Já em eosinófilos, PAR2 promove a degranulação e geração de EROs e contribui para a progressão de doenças alérgicas pulmonares (Bolton *et al.*, 2003). Esses achados corroboram dados obtidos do nosso grupo de pesquisa, na qual o bloqueio prévio de PAR2 com o peptídeo sintético ENMD1068 reduz o recrutamento de eosinófilos em um modelo de inflamação pulmonar induzido por ovalbumina (Mattos *et al.*, 2020 Submetido).

Monócitos e macrófagos são células que exercem um papel essencial no desenvolvimento e resolução da resposta inata. Em monócitos, a ativação de PAR2 promove a liberação de cálcio intracelular e liberação de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β , IL-6 e IL-8 (Gleeson *et al.*, 2014). Já em macrófagos, PAR2 parece atuar

de maneira oposta, direcionado tais células para um perfil pró ou anti-inflamatório de acordo com o fenotípico celular. Estudos prévios envolvendo macrófagos derivados da medula óssea demonstraram o sinergismo de ação entre os receptores TLR4 e PAR2 sobre a produção de mediadores inflamatórios por uma via dependente da ativação do fator de transcrição NFκB (Rallabhandi *et al.*, 2008). Por outro lado, Nhu e colaboradores demonstraram que elevadas concentrações de agonista de PAR2 é capaz de promover um efeito anti-inflamatório em macrófagos peritoneais pré-estimulados com LPS (Nhu *et al.*, 2011). Outros achados demonstram que a ativação de PAR2 em macrófagos humanos polarizados para um fenótipo M1 é capaz de reduzir a produção de TNF induzida por LPS (Steven *et al.*, 2013). Em contrapartida, macrófagos polarizados para um fenótipo M2 e pré-estimulados com LPS apresentam uma maior produção de TNF quando são coincubados com o agonista de PAR2 (Steven *et al.*, 2013). Diante desses achados, PAR2 parece atuar de forma dual, com predomínio de ações próinflamatórias em condições de baixa estimulação. No entanto em situações de hiperestimulação, PAR2 parece atuar de maneira resolutiva, com predomínio de ações anti-inflamatórias. Esses dados demonstram a complexidade do papel de PAR2 na biologia dos macrófagos que parece ser influenciado por fatores fenotípicos e do microambiente celular. Dessa maneira, não está muito bem esclarecido o papel que PAR2 desempenham sobre o repertório de funções dos macrófagos e que reflete diretamente na fisiopatologia de doenças nas quais essas células têm relevância clínica.

2. Justificativa

Os macrófagos são células heterogêneas, com ampla distribuição e função tecidual. Atuam como células sentinelas tecido-específicas com repertório de atuação amplo e influenciado por moléculas presentes no microambiente celular. Essa versatilidade apresentada pelos macrófagos tem consequências diretas sobre o desenvolvimento e evolução de várias condições patológicas como câncer, resposta imune e inflamatória (Murray, 2017; Shapouri-Moghaddam *et al.*, 2018).

A ativação do repertório de funções efetoras dos macrófagos inicia através do reconhecimento de moléculas oriundas de patógenos ou dano tecidual. O TLR4 é um receptor expresso nos macrófagos que funciona como um sensor imune ao se ligar ao LPS e ativar vias antimicrobianas. Além disso, o microambiente infeccioso e inflamatório é marcado pela presença de proteases exógenas ou endógenas como tripsina, triptase, trombina, catepsina G, elastase e metaloproteinases que são capazes de modular as funções dos macrófagos via ativação de PAR2 (Almeida *et al.*, 2020). Vários trabalhos na literatura correlacionam PAR2 ao desenvolvimento de uma resposta inata, atuando como “sensor” na detecção de moléculas oriundas de patógenos clinicamente importantes. Por exemplo, algumas proteases secretadas por *porphiromonas gengivalis* e *citrobacter rodentium* são capazes de ativar PAR2 e causar periodontite e colite, respectivamente (Holzhausen *et al.*, 2006; Hansen *et al.*, 2005). Em outros casos, proteases oriundas de *Pseudomonas aeruginosa* ou vírus *influenza* permitem a sua evasão das respostas inatas do hospedeiro por um mecanismo de desarme ou alteração da função de PAR2, aumentando assim a sua sobrevivência no hospedeiro (Dulon *et al.*, 2005; Khoufaxe *et al.*, 2009).

Demonstramos recentemente que PAR2 e TLR4 participam no desenvolvimento da resposta inflamatória pulmonar (Almeida *et al.*, 2020), o que reforça dados anteriores da literatura que descrevem a cooperação entre estes receptores na modulação da resposta inata (Almeida *et al.*, 2020, Lohman *et al.*, 2012; Zuo *et al.*, 2015; Chen *et al.*, 2018). Além disso, uma das características de PAR2 é formar homo ou heterodímeros (Lin *et al.*, 2013) e embora já seja descrito que PAR2 e TLR4 parecem interagir fisicamente (Rallabhandi *et al.*, 2008, Nhu *et al.*, 2007; Bucci *et al.*, 2012) pouco se sabe por quais mecanismos ambos receptores interferem na função celular. Embora PAR2 e TLR4 sejam expressos nos macrófagos, compartilhando do mesmo ambiente inflamatório, ainda não está muito bem compreendidos em quais funções efetoras e por quais mecanismos intracelulares estes receptores interagem para modular a dinâmica da resposta inata dos macrófagos.

Assim, a investigação do papel de PAR2 na resposta inata/inflamatória mediada por macrófagos deverá contribuir para ampliar o conhecimento acerca da função dessas células em condições fisiopatológicas de natureza inflamatória como, por exemplo, na aterosclerose, câncer, diabetes, doenças neurodegenerativas, bem como nas respostas antimicrobianas. Novas evidências obtidas deste estudo poderá demonstrar a importância de proteases endógenas e exógenas sobre a função dos macrófagos via PAR2, contribuindo para caracterizar um possível alvo farmacológico no tratamento de doenças nos quais os macrófagos são células-chave.

3. Objetivos

3.1 Objetivo Geral

Investigar a contribuição do PAR2 sobre o repertório de ativação de macrófagos peritoneais obtidos de camundongos C57/BL6 em resposta ao LPS.

3.2 Objetivos específicos

1) Avaliar a importância de PAR2 na fagocitose, produção de NO, EROS e expressão da enzima *iNOS* em macrófagos peritoneais de camundongos C57/BL6 estimulados com LPS;

2) Avaliar o efeito da ativação de PAR2 sobre a produção de citocinas pró e anti-inflamatórias em macrófagos peritoneais de camundongos C57/BL6 estimulados com LPS;

3) Avaliar o efeito da ativação de PAR2 sobre a expressão de TLR4 e PAR2 em macrófagos peritoneais de camundongos C57/BL6 estimulados com LPS;

4) Avaliar uma possível interação física entre TLR4 e PAR2 em macrófagos peritoneais de camundongos C57/BL6 estimulados com LPS e/ou peptídeo agonista de PAR2;

5) Avaliar a capacidade de ativação de PAR2 e TLR4 por meio da liberação de cálcio intracelular em macrófagos peritoneais estimulados com LPS e/ou peptídeo agonista de PAR2;

6) Avaliar a capacidade de ativação de PAR2 e TLR4 por meio da liberação de cálcio intracelular em macrófagos peritoneais estimulados com LPS e/ou peptídeo fragmento de PAR2;

7) Avaliar a capacidade de ativação de PAR2 e TLR4 por meio da liberação de cálcio intracelular em macrófagos peritoneais pré-incubados com coquetel inibidor de proteases e estimulados com LPS;

8) Avaliar o efeito da ativação de PAR2 sobre a expressão de moléculas de sinalização p65 NF κ B, I κ B α , MAP quinase p38 em macrófagos peritoneais de camundongos C57/BL6 estimulados com LPS.

4. Metodologia

4.1 Animais

Para todos os experimentos foram utilizados camundongos da linhagem C57BL/6 fêmeas em torno de oito semanas, obtidos pelo Biotério Central da UFMG e mantidos no biotério da Farmacologia no ICB, com temperatura e umidade controlada, ciclo claro-escuro de 12h, ração e água *ad libitum*. A certificação para o uso dos animais foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEUA), nº 150/2017.

4.2 Obtenção, coleta e cultivo dos macrófagos peritoneais

Para obtenção da cultura primária de macrófagos, os camundongos foram injetados com 2 mL de solução de tioglicolato 3% (Caldo Tioglicolato® Meio, Acumedia) por via intraperitoneal, e após três dias, os animais foram sacrificados com uma solução contendo quetamina (120 mg/kg, Vetecia®) e xilazina (20 mg/kg, König) por via intramuscular. Imediatamente após, os animais foram fixados em um suporte de madeira para o procedimento da coleta de células. Em seguida, em condições assépticas, injetou-se 5 mL de tampão fosfato-salino estéril (PBS, NaCl 137 mM; KCl 2.7 mM; 10 mM Na₂HPO₄; 1.8 mM KH₂PO₄; pH 7,2) estéril na cavidade peritoneal dos animais que foi gentilmente massageada para permitir a distribuição homogênea dos macrófagos. Após a coleta do lavado peritoneal, a amostra foi rapidamente centrifugada à 100G por quatro minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o pellet formado contendo as células foi ressuspenso em 1 mL de meio de cultura *Dulbecco Eagle Modified Medium* (DMEM, Cultilab®) contendo 5% de soro fetal bovino (SFB) (Cultilab®), ampicilina (100 mg/L, Sigma-Aldrich), estreptomicina (100 mg/L, Sigma-Aldrich) e anfotericina B (5 mg/L, Sigma-Aldrich) sendo o pH final, corrigido para 7,4 e filtrado em membrana de 0,22 µm (Merck Millipore®). Posteriormente foi realizada a contagem e avaliação da viabilidade celular em câmara de Neubauer, utilizando o ensaio de exclusão com o azul de tripan (0,4%, Sigma-Aldrich). Esse cromóforo penetra em células inviáveis nas quais há dano na membrana celular, corando as proteínas do citosol de azul, enquanto as células viáveis não se coram. Em todos os experimentos, a

viabilidade celular obtida foi superior a 96%. As células obtidas foram utilizadas nos experimentos *in vitro* com os respectivos estímulos.

4.3 Avaliação da Atividade Fagocítica em macrófagos peritoneais

No primeiro experimento, os macrófagos foram avaliados quanto à capacidade de fagocitar partículas de zimosano *in vitro*. Em uma placa de 24 poços contendo lamínulas circulares de 13 mm, foram aliqüotados $7,5 \times 10^4$ células por poço. Os macrófagos foram mantidos em meio de cultura DMEM completo suplementado com 5% soro fetal bovino (Gibco®) por três horas em estufa de cultivo celular a 37°C e 5% de saturação de CO₂, a fim de promover a aderência dos macrófagos na superfície da lamínula. Transcorrido esse intervalo, cada poço foi lavado três vezes com solução de PBS estéril. Nos primeiros experimentos, os macrófagos aderidos foram estimulados com lipopolissacarídeo, um componente presente na parede celular de bactéria gram negativa que ativa TLR4 (LPS, 100 ng/mL, sorotipo O111:B4; Sigma-Aldrich) por 45 minutos em presença ou não do peptídeo sintético agonista seletivo para PAR2 formado por uma sequência de 6 aminoácidos (SLIGRL-NH₂, 30 μM). Após a incubação na presença dos respectivos estímulos, as células foram novamente lavadas três vezes com PBS e então incubadas com zimosano, uma β-glucana derivada da parede celular do fungo *Saccharomyces cerevisiae*, conjugado com Isotiocianato de Fluoresceína (FITC) (Thermofisher™) na proporção de 10 partículas/célula, durante 30 minutos. Para a etapa seguinte, repetiu-se a lavagem das células para a remoção das partículas extracelulares de zimosano que não foram fagocitadas. As lamínulas contendo os macrófagos foram removidas, fixadas em solução de paraformaldeído a 4% por 10 minutos e posteriormente as células foram novamente lavadas três vezes com PBS por 5 minutos cada. O passo seguinte, as células foram colocadas em contato com faloidina (1:200) conjugada com fluorocromo Alexa Fluor 594 (Thermofisher™) por 30 minutos. Por fim, as lamínulas foram imersas em meio de montagem com DAPI (*Fluoroshield*™, Sigma) em lâminas retangulares e suas extremidades foram seladas com base de esmalte. As imagens das células foram obtidas em microscópio de fluorescência Zeiss, modelo HBO 100. AX10, objetiva com aumento de 40x e com excitação no comprimento de 358, 488 ou 594 nm. A intensidade de fluorescência emitida foi analisada e corrigida com base no tamanho de cada célula, sendo definida pelo campo

claro e a marcação nuclear. A atividade fagocítica dos macrófagos foi mensurada através do cálculo do Índice de Fagocitose (IF) (Fuentes *et al.*, 2011) avaliado como o produto da média do número de partículas de zimosano fagocitada por macrófago (MNP) pela porcentagem de células fagocíticas (PCF).

4.4 Ensaio para dosagem de Óxido Nítrico (NO)

A avaliação da produção de óxido nítrico foi mensurada indiretamente através da medida de nitrito no sobrenadante da cultura de macrófagos utilizando como método a Reação de Griess, uma técnica colorimétrica na qual a quantidade de nitrato pode ser mensurada espectrofotometricamente através de uma reação de diazotização com nitrito da amostra (Green *et al.*, 1982). Para a realização dessa técnica, 8×10^5 células foram plaqueadas em uma placa de 24 poços, aguardou-se três horas para a aderência das células e posteriormente as células foram tratadas com LPS (100 ng/mL), SLIGRL-NH₂ (30 μM) ou ambos por um tempo de 24 horas em presença dos estímulos. Transcorrido esse intervalo, uma alíquota de 50 μL do sobrenadante correspondente ao poço de cada estímulo foi adicionada, em duplicata, para uma microplaca de fundo chato, seguido da adição de 25 μL de 0,2% (p/v) de N-naftiletilenodiamino (Sigma-Aldrich) e de 25 μL de 2% (p/v) de sulfanilamida (Sigma-Aldrich) em 5% (v/v) de ácido fosfórico (Sigma-Aldrich). Aguardou-se 10 minutos para a formação de uma coloração avermelhada, indicativo da presença de nitrito, e, em seguida, foi feita a leitura da placa em leitor de microplacas (Shimadzu®, Japão) no comprimento de onda de 540 nm. Uma curva padrão de nitrito de sódio (Sigma-Aldrich) foi construída nas concentrações de 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125 e 1,56 (μM) como referência, para determinar a concentração de óxido nítrico de cada amostra pelos valores de absorbância obtidos.

4.5 Ensaio para dosagem de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs)

Para avaliar a produção de EROs, 8×10^5 células/por poço foram plaqueadas em uma microplaca branca de 96 poços (Nunc™, ThermoFisher) contendo 100 μL de DMEM sem vermelho de fenol suplementado com 5% de SFB. Após três horas, as células não aderentes foram removidas pela lavagem da placa com 100 μL de PBS 1x e então, os macrófagos aderidos foram tratados com LPS (100 ng/mL), SLIGRL-NH₂ (30 μM) ou ambos por 24 horas. Após o tempo de estímulo, foi adicionado em cada

poço, 20 µL de luminol (*5-amino-2,3-dihydro-1,4-phthalazinedione*) a 0.6mM (Sigma-Aldrich) e o volume final de todos os poços foi acertado com RPMI para 200 uL. A produção de EROs foi medida por quimioluminescência após a reação com o luminol durante 120 minutos, com intervalo de 2 minutos entre as medidas, utilizando-se luminômetro (*LumiCount Microplate Luminometer*). A intensidade de luminosidade emitida foi expressa em unidades relativas de luz.

A localização das espécies reativas de oxigênio produzidas pelos macrófagos foi imunomarcada com Dihidroetídio (DHE, 1:200, ThermoFisher), sonda que emite fluorescência na faixa de 594 nm quando reage com EROS produzidos pelas células. Assim, após a incubação de $7,5 \times 10^4$ células por poço durante 24 horas na presença dos respectivos estímulos, conforme descrito acima, os macrófagos foram fixados em paraformaldeído a 4% por 10 minutos, lavados com PBS (três vezes de 5 minutos cada) e incubados por 1 hora. Ao final dessa etapa, as lamínulas foram lavadas com PBS novamente, incubadas com meio de montagem contendo DAPI (Sigma-Aldrich). Por fim, as extremidades das lamínulas foram seladas em lâminas retangulares com base de esmalte. A análise das imagens foi feita em microscópio de fluorescência, com objetiva de 40x e ao menos 100 células foram mensuradas. A intensidade de fluorescência emitida foi analisada e corrigida com base no tamanho de cada célula, sendo definida pelo campo claro e a marcação nuclear. A quantificação das imagens foi realizada através do software Image J (NIH; Bethesda, MD).

4.6 Ensaio para dosagem de Citocinas

Os macrófagos foram plaqueados na proporção de 8×10^5 células/poço em uma placa de 24 poços e, após a adesão, foram estimulados com LPS (100 ng/mL), SLIGRL-NH₂ (30µM) ou ambos por 6 horas. Transcorrido esse período, o sobrenadante da cultura foi coletado em duplicata e utilizado para a dosagem das citocinas IL-1β, IL-6, MCP-1, TNF e IL-10 através de ensaio imunoenzimático (ELISA), seguindo as recomendações do fabricante (RD System).

4.7 Avaliação da viabilidade celular na cultura de macrófagos

Os macrófagos foram plaqueados na proporção de 4×10^5 células/poço em uma placa de 96 poços e, após a adesão, foram estimulados com LPS (100ng/mL), SLIGRL-NH₂ (30μM) ou ambos por 24 horas. Em cada tempo analisado, o sobrenadante da placa foi descartado e os macrófagos aderidos foram incubados com o MTT, brometo de (3-(4,5 dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio, 5μM, Sigma) por 4 horas em estufa de CO₂ 5% a 37 °C. O MTT é metabolizado em mitocôndria de células viáveis, formando cristais insolúveis de coloração azul. Transcorrido esse tempo, a solução de MTT foi removida e adicionou-se DMSO em todos os poços (*LabSynth*) para a solubilização dos cristais visualizados nos poços viáveis. A placa foi inserida no leitor de Elisa, a fim de medir a absorbância em 570 nm que é proporcional ao número de células viáveis na cultura.

4.8 Avaliação da liberação de cálcio intracelular

Em uma placa de 6 poços contendo lamínulas de 22μM x 22μM, 1×10^6 células foram plaqueadas e incubadas por 3 horas em 1mL de DMEM, 5% SFB e as células não aderentes foram removidas com PBS. Os macrófagos remanescentes foram incubados com a sonda fluorescente para cálcio intracelular Fluo-4N/AM (6μM, Invitrogen) em 1mL de DMEM, 5% SFB por 20 minutos (Guimarães *et al.*, 2017).

Transcorrido esse tempo, as lamínulas foram transferidas individualmente para uma câmara de perfusão contendo 1mL de solução tampão HEPES e as imagens foram analisadas no microscópio confocal (Zeiss LSM 510) em objetiva de 63x. As células foram excitadas com laser de Kr-Ar no comprimento de 488nm. Os macrófagos foram estimulados 50s após o início do registro com LPS (100ng/mL), SLIGRL-NH₂ (30μM) ou ambos. Em alguns experimentos os macrófagos foram pré-incubados por 15 minutos com coquetel inibidor de protease (1μM) antes da estimulação com LPS (100ng/mL).

Em outro ensaio, nós também avaliamos a liberação de cálcio pelo estímulo dos macrófagos com LPS (100ng/mL), peptídeo fragmento de PAR2 (30μM) ou ambos. A liberação intracelular de Ca²⁺ foi registrada com periodicidade de 5 segundos durante 15 minutos no microscópio confocal (Zeiss LSM 510) em objetiva de 63x, sendo o

aumento do cálcio intracelular mensurado pelas variações na fluorescência celular. Essas alterações foram normalizadas pela fluorescência inicial (linha de base) e foi expressa como fluorescência registrada/fluorescência de base x 100%. Ao menos 100 células individuais de cada grupo experimental foram analisadas utilizando o *software ImageJ*.

4.9 Avaliação da expressão de *iNOS*, PAR2, TLR4, p65 NFκB e MAP quinase p38 por Western Blotting

Para a análise da expressão proteica, 6×10^6 células foram plaqueadas e incubadas por 3 horas em 1mL de DMEM completo e 5% SFB. Em seguida, os poços foram lavados com PBS e os macrófagos aderentes foram estimulados ou não com LPS (100ng/mL), SLIGRL-NH₂ (30μM) ou ambos por 6 horas. Após o período de incubação, os macrófagos foram removidos da placa com um *cell scraper* (Jetbiofil®) e 150μL de PBS gelado e em seguida submetidos à centrifugação por 1 minuto a 14000 rpm. O pellet contendo o lisado de macrófagos foi diluído em 150μL de tampão de lise (NaCl 150 mmol/L; Tris 50mmol/L; EDTA₂Na 5mmol/L; MgCl₂ 1 mmol/L) acrescido de 0,3% de Triton X-100, 0,5% de SDS e de coquetel de inibidor de cisteíno, aspártico, serino e metaloproteases (SigmaFast™, Sigma-Aldrich). As amostras foram então submetidos ao um processo de resfriamento e agitação (em um vórtex) por ciclos repetitivos a cada 3 minutos durante 1 hora, a fim de extrair as proteínas do lisado celular. Após essa etapa, a amostra foi novamente centrifugada a 14000rpm por 20 minutos e o sobrenadante foi aliquoteado e congelado a -80°C para posterior análise. No dia do experimento, a amostra foi descongelada e a quantidade de proteína foi mensurada pelo método de Lowry e colaboradores (Lowry *et al.*, 1951). Após a dosagem proteica, as amostras foram diluídas em tampão de amostra da amostra (0.25M tris HCl, pH=6.8, 3% Glicerol, 1% SDS, 0.6% β-mercaptoetanol, 0.25% Azul de Bromofenol) e fervidas a 100°C por 5 minutos. No passo seguinte, 60μg de proteína de cada amostra foi aplicado em gel de separação de poliacrilamida (SDS-PAGE, Sigma-Aldrich) a 10% e imersa em tampão de corrida (0.025M Tris HCl, Glicina 0.192M e SDS 0,1%; pH=8.5). A separação das bandas proteicas no gel de poliacrilamida perdurou por 90 minutos, aplicando-se 100V no equipamento. Em seguida, as bandas proteicas separadas presentes no gel foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose com poro de 0,45μm (Millipore, USA) em tampão de transferência

[0.025M Tris HCl, 0.192M Glicina, SDS 0,1%, metanol 20% (v/v); pH=8.3] e durante 100 minutos, com voltagem de 100V.

Após essa etapa, a membrana foi mergulhada em solução de Ponceau 0,3% para avaliação da qualidade da transferência e visualização das bandas de proteínas. Em seguida, a membrana foi lavada com água destilada por 5 minutos e imersa em solução de bloqueio (3% de albumina e 0,1% de Tween-20, em TBS). Após o bloqueio, a membrana foi incubada com os anticorpos primários específicos, diluído em solução de bloqueio, por 16 horas e a 4°C. Os anticorpos utilizados nessa etapa foram o anti-PAR2 (1:1000; monoclonal produzido em coelho; Abcam), anti-TLR4 (1:1000; monoclonal produzido em camundongo; Santa Cruz Biotechnology), anti-*iNOS* (1:1000; monoclonal produzido em camundongo; Santa Cruz Biotechnology), Anti-NF- κ B p65 (1:1000; monoclonal produzido em coelho; Abcam), anti-p38 MAPK (1:1000; monoclonal produzido em coelho; Santa Cruz Biotechnology), anti-p-p38 MAPK (fosforilada) (1:1000; monoclonal produzido em camundongo; Santa Cruz Biotechnology), anti- β -actina (1:1000; monoclonal produzido em camundongo; Santa Cruz Biotechnology). Em seguida, a membrana foi lavada com TBS contendo 0,3% de Tween 20 (TBS-T) por três vezes, durante 5 minutos cada.

A membrana foi então incubada por 2 horas na presença do anticorpo secundário conjugado à peroxidase (HRP) (1:1000, IgG-HRP; Sigma-Aldrich) diluído em 1% de albumina em TBS-T. Transcorrido esse intervalo, a membrana foi novamente lavada em TBS-T por 3 ciclos de 5 minutos cada. A revelação das bandas de proteínas foi detectada por uma reação de quimioluminescência (Clarity™ Western ECL Substrate – Biorad®) e a intensidade das mesmas foi avaliada por análise densitométrica através do *software ImageJ*.

4.10 Avaliação de interação proteica entre TLR4 e PAR2 por Coimunoprecipitação

O PAR2 é descrito na literatura como um receptor passível de interagir com proteínas de superfície celular, formando heterodímeros (Gieseler *et al.*, 2015). A fim de avaliarmos uma possível interação física entre o receptor TLR4 e PAR2, nós realizamos um experimento de coimunoprecipitação utilizando *beads* magnéticas de *Protein A/G*

(*UltraLink® Resin*, Thermofisher). Para isso, 6×10^6 células/poço foram plaqueadas e incubadas por 3 horas em 1mL de DMEM completo e 5% SFB numa placa de 6 poços. Após a aderência celular, os poços foram lavados com PBS e os macrófagos foram estimulados ou não com LPS (100ng/mL), SLIGRL-NH₂ (30μM) ou ambos por 15 minutos. Em seguida as células foram lisadas com *cell scraper* (Jetbiofil®) e homogeneizadas com tampão de lise isento de Ditiotretitol e SDS. No tampão foi adicionado o coquetel de inibidor de proteases (SigmaFast™) e o lisado de células foi centrifugado a 14000 rpm por 20 minutos para obtenção da fração proteica. Em seguida a amostra de proteínas foi quantificada e uma alíquota de 200 μg de proteína foi adicionada em um tubo de fundo côncavo contendo 5 μL de anticorpo anti-TLR4, mantidos sobe agitação constante durante 16 horas e a 4°C.

As *beads* magnéticas de *Protein A/G* foram lavadas três vezes com PBS utilizando um suporte de tubos contendo um ímã (rack magnético). Em seguida, 20 μL das *beads* foram adicionadas ao complexo formado entre a proteína da amostra e o anticorpo, sendo mantidos sobe agitação na geladeira por 16 horas. Transcorrido esse intervalo, foi adicionado 100 μL do tampão de imunoprecipitação (TRIS 25mM; NaCl 150 mM; pH 7,2) e a amostra foi colocado durante 1 minuto no rack magnético. Logo depois, o sobrenadante foi descartado e 100 μL de tampão de eluição (Glicina 0,2M; pH 3,0) foi adicionado às *beads* com o objetivo de desligar a ligação do complexo proteína-anticorpo. Os tubos foram homogeneizados e em seguida foi adicionado 15 μL de tampão de neutralização (TRIS 1M; pH 9,0) em cada um. As amostras foram novamente colocadas no rack magnético e após um minuto o sobrenadante foi aliquotado para aplicação em gel de policacrilamina a 10%. A separação das bandas de interesse, a transferência em membrana de nitrocelulose, a marcação com anticorpos específicos para PAR2 e a detecção foram realizados conforme a descrição pelo método de *Western Blotting* mencionado anteriormente.

4.11 Imunolocalização de *iNOS*, PAR2, TLR4, p65 NFκB, IκBα por microscopia de fluorescência

$7,5 \times 10^3$ células/poço foram plaqueadas em uma placa de 24 poços contendo lamínulas circulares de 13 mm. Essas células foram mantidas em meio de cultura DMEM completo (500μL) suplementado com 5% SFB por 3 horas em estufa de cultivo celular a 37°C e 5% de saturação de CO₂. As células não aderentes foram removidas por

lavagem da placa com PBS 3X. Após três horas, as células não aderentes foram removidas pela lavagem da placa com PBS. Em seguida as células foram tratadas com LPS (100 ng/mL), SLIGRL-NH₂ (30 µM) ou ambos por 6 horas. Transcorrido o tempo de estímulo, as lamínulas foram lavadas com PBS e em seguida foram fixadas em paraformaldeído 4% por 10 minutos, repetindo a lavagem com PBS (3 vezes de 5 minutos cada). Depois as células foram permeabilizadas com 0,1% de Triton x-100 por 15 minutos e após a lavagem, bloqueadas com solução de PBS-Tween (Albumina sérica bovina 5% + 0,05% Tween em PBS) por 1 hora.

Transcorrido o tempo, as células foram incubadas em temperatura ambiente com os anticorpos primários durante 4 horas ou overnight a 4°C com os anticorpos primários específicos: anti-TLR4 (monoclonal produzido em camundongo, Santa Cruz Biotechnology), anti-PAR2 (monoclonal produzido em coelho, Abcam), anti-IκBα (policlonal produzido em coelho, Santa Cruz), anti-NF-κB p65 (monoclonal produzido em coelho; Abcam) todos diluídos na proporção de 1:200 em PBS-Tween durante 1 hora. As lamínulas foram novamente lavadas três vezes por 5 minutos cada e incubadas por 3 horas, protegido da luz, com os anticorpos secundários conjugados com fluoróforo (anti-rabbit IgG, 488nm e anti-mouse IgG, 647nm) ambos 1:400 diluído em PBS-Tween.

Na próxima etapa, as lamínulas foram novamente lavadas por três vezes de 5 minutos cada e então imersas utilizando meio de montagem com DAPI (Sigma-Aldrich) em lâminas retangulares, sendo as extremidades seladas com base de esmalte. As imagens foram analisadas em microscópio de Fluorescência com objetiva de 40x e comprimento de onda na faixa de 488 ou 647nm. A intensidade de fluorescência emitida foi analisada e corrigida com base no tamanho de cada célula, sendo definida pelo campo claro e a marcação nuclear. Ao menos 100 células foram analisadas em cada experimento, utilizado o *software Image J* (NIH; Bethesda, MD).

4.12 Análise da colocalização de TLR4 e PAR2 por imunofluorescência

7,5x10³ células/poço foram plaqueadas em uma placa de 24 poços contendo lamínulas circulares de 13 mm. Após todas as etapas descritas anteriormente, os macrófagos foram incubados com LPS (100 ng/mL), SLIGRL-NH₂ (30 µM) ou ambos por 4 horas e a análise da colocalização de TLR4 e PAR2 foi avaliada conforme o item

sobre imunofluorescência mencionado acima. As imagens foram obtidas em microscópio confocal Leica TCS SPC5 II com objetiva de aumento de 63x.

As imagens foram analisadas no software *Image J* com o *plugin* COLOC2, uma modificação do JACOP do *software* FIJI. A colocalização foi mensurada por meio do coeficiente de correlação de Manders (MCC) cuja aferição oferece uma melhor colocalização, devido a sua independência da proporção entre os dois sinais das duas marcações. O MCC ainda tem a vantagem sobre o Coeficiente de correlação de Pearson de prover as 2 frações: O MCC1: A fração do sinal de 'A' que sobrepõe com o sinal 'B' e o MCC2: A fração do sinal de 'B' que sobrepõe com o sinal 'A'.

4.13 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média e comparados com os resultados dos seus respectivos controles. Com o auxílio do *software* *GraphPad Prism 7* (San Diego, CA) foram realizadas a análise dos resultados por *One Way* ANOVA, seguida pelo pós teste Bonferroni ou Tukey, adotando como significância estatística os valores com $p < 0,05$.

5. Resultados

5.1 Peptídeo agonista de PAR2 (SLIGRL-NH₂) aumenta a fagocitose de partículas de zimosano induzida por LPS em macrófagos peritoneais murinos

As ações pró-inflamatórias das serino proteases secretadas num contexto infeccioso ou inflamatório já foi relatado na literatura (Shpacovitch *et al.*, 2008). No entanto, o papel da ativação de PAR2 sobre as funções efetoras dos macrófagos, incluindo a fagocitose, ainda não foi investigada. Assim, inicialmente, nós avaliamos a participação de PAR2 na fagocitose dos macrófagos peritoneais. Como já é bem descrito na literatura, o LPS é capaz de aumentar significativamente a atividade fagocítica dos macrófagos peritoneais (Sigola *et al.*, 2016). Aqui nós observamos que a incubação dos macrófagos peritoneais com LPS (100 ng/mL) aumentou a fagocitose, sendo que esse efeito foi potencializado na presença do agonista sintético seletivo para PAR2 (SLIGRL-NH₂, 30 µM) (Figura 1A). Corroborando esses resultados, nós também observamos que a coincubação dos macrófagos peritoneais com LPS (100 ng/mL) e SLIGRL-NH₂ (30 µM) aumentou o número de partículas de zimosano fagocitadas por célula quando comparado com a incubação de cada estímulo individualmente (Figura 1B). Uma imagem representativa dos macrófagos sob os respectivos estímulos é apresentada na Figura 1C. Esses resultados demonstram pela primeira vez o envolvimento de PAR2 no fenômeno fagocítico induzido por LPS nos macrófagos.

5.2 Peptídeo agonista de PAR2 (SLIGRL-NH₂) aumenta a produção de NO e a expressão de *iNOS* induzida por LPS em macrófagos peritoneais murinos

Em nossos resultados, nós demonstramos que a produção de óxido nítrico aumenta sinergicamente quando os macrófagos são coincubados, durante 24 horas, com LPS (100 ng/mL) e SLIGRL-NH₂ (30 µM) em comparação as células incubadas com cada estímulo isoladamente (Figura 2A). Além disso, a coincubação por 24 horas com os estímulos citados acima foi capaz de aumentar a expressão proteica da enzima *iNOS* nos macrófagos quando comparado com os demais estímulos isoladamente (Figura 2B). A avaliação da expressão de *iNOS* foi demonstrado também por meio da análise da imunomarcção em microscopia de fluorescência (Figura 2C). Como podemos

observar, a coincubação com LPS (100 ng/mL) e SLIGRL-NH₂ (30 μM) foi capaz de aumentar a expressão dessa enzima após 24 horas sob os respectivos estímulos. A Figura 2D é representativa do aumento da expressão da *iNOS* nos macrófagos sob os diferentes estímulos.

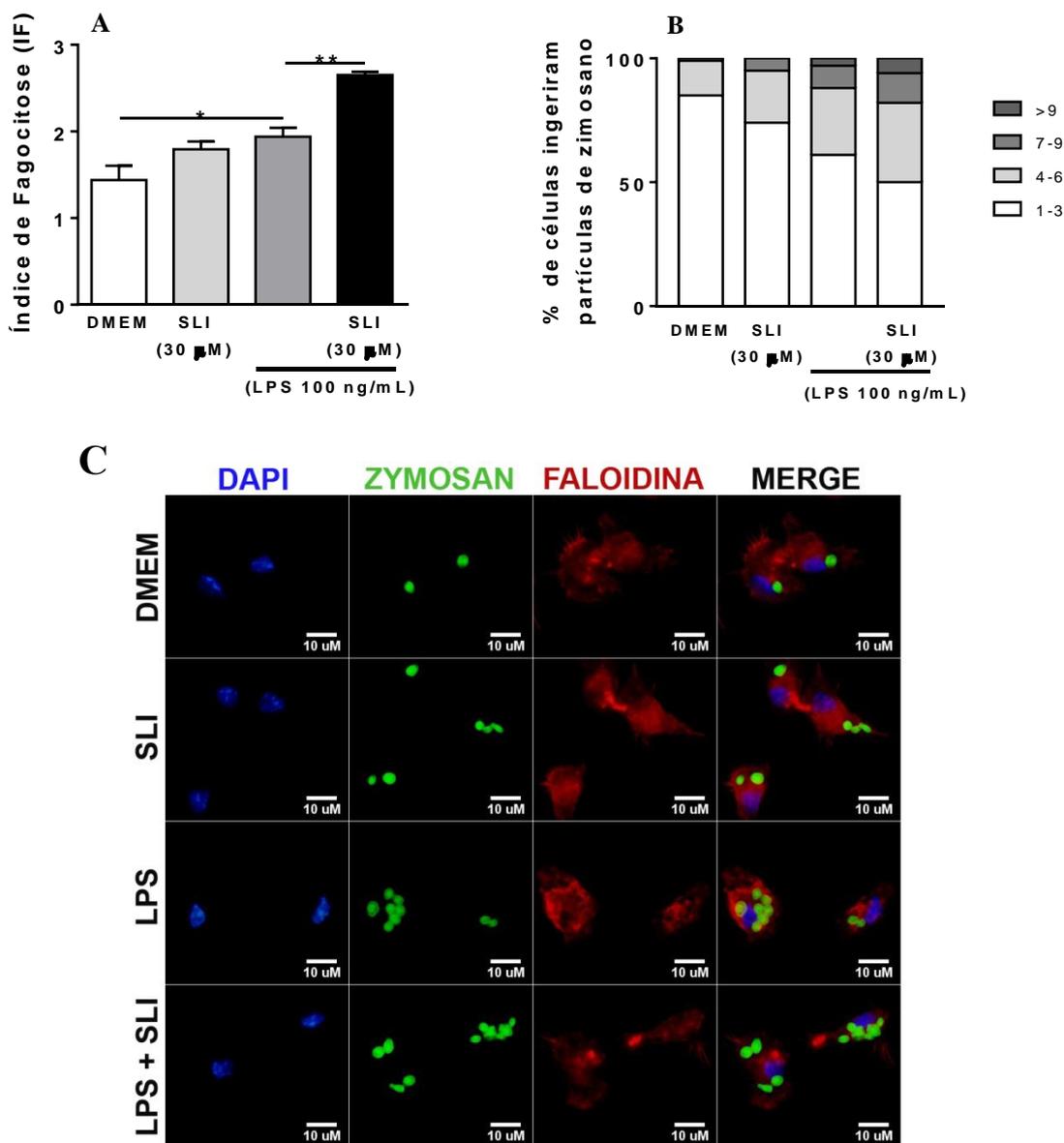


Figura 1. Peptídeo agonista de PAR2 (SLIGRL-NH₂) modula a fagocitose de partículas de zimosano induzida por LPS em macrófagos peritoneais murinos.

Macrófagos peritoneais murinos (5×10^4 células/poço) foram pré-incubados ou não (DMEM) com LPS (100 ng/mL), SLIGRL-NH₂ (SLI, 30μM) ou ambos 1 hora antes da adição de zimosano conjugado com FITC (10 partículas por macrófago, verde), e o índice de fagocitose (IF, A), calculado como o produto da média do número de partículas fagocitadas pela porcentagem de células fagocíticas/100, e a porcentagem de células que fagocitaram, avaliados 1 hora após a incubação com DMEM, SLIGRL-NH₂ ou LPS (B). Os macrófagos foram fixados em paraformaldeído e incubados com faloidina conjugada com TRITC (1:200, para marcação de actina, em vermelho) e com DAPI (1μg/mL, para marcação dos núcleos em azul) e as imagens da fagocitose analisadas em microscópio de fluorescência. Em C, uma imagem representativa da fagocitose captada por imunofluorescência. Os resultados são expressos como a média \pm erro padrão da média de 4 poços por grupo e são representativos de 3 diferentes e independentes experimentos. Nas imagens as escalas representam 10μm. *P<0.05 and **P<0.01.

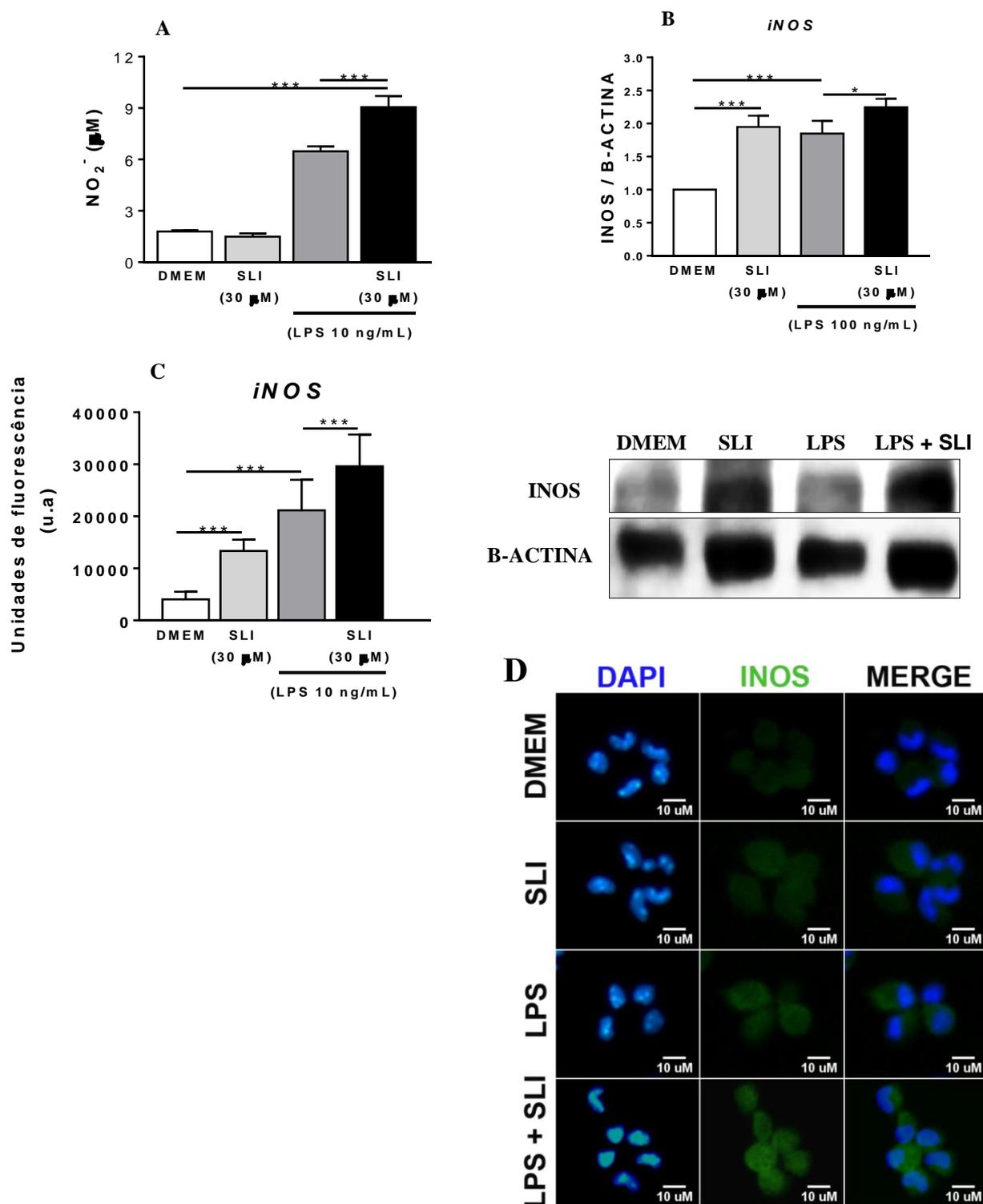


Figura 2. Peptídeo agonista de PAR2 (SLIGRL-NH₂) aumenta a produção de NO e expressão de *iNOS* induzida por LPS em macrófagos peritoneais murinos.

Macrófagos peritoneais murinos (4×10^5 células/poço) foram pré-incubados ou não (DMEM) com LPS (100 ng/mL), SLIGRL-NH₂ (SLI, 30µM) ou ambos por 24 horas, e então avaliou-se a produção de óxido nítrico (NO) no sobrenadante das culturas pela reação de Griess em ensaio colorimétrico (A), e a expressão da enzima óxido nítrico *sintase* induzível (*iNOS*) por *western blotting* à partir do lisado celular, sendo os resultados normalizados pela expressão de β -actina (B), e através de imunofluorescência utilizando anticorpo anti-*iNOS* (1:100, verde) e DAPI (1µg/mL, azul) (C, D). A fluorescência foi corrigida pelo tamanho de cada célula e ao menos 5 campos de cada lâmina foram fotografados para análise posterior. Os resultados foram expressos como a média \pm erro padrão da média de 4 poços por grupo e são representativos de 3 diferentes e independentes experimentos. Nas imagens as escalas representam 10µm. *P<0.05 e ***P<0.001.

5.3 Peptídeo agonista de PAR2 (SLIGRL-NH₂) aumenta a produção de EROs induzida por LPS em macrófagos peritoneais murinos

Outras moléculas produzidas por macrófagos ativados são as espécies reativas de oxigênio que possuem elevado potencial de causar dano a moléculas presentes em patógenos invasores. Aqui nós avaliamos a produção total de EROs, 24 horas após os estímulos com LPS (100 ng/mL), SLIGRL-NH₂ (30 μM) ou ambos. A coincubação com LPS (100 ng/mL) e SLIGRL-NH₂ (30 μM) foi capaz de aumentar a produção de EROs após 24 horas na presença dos estímulos (Figura 3A). A produção total de EROs também foi avaliada por imunomarcação com DHE, molécula que reage com EROs e produz fluorescência detectada em microscopia confocal. Nossos resultados demonstram que nos macrófagos coincubados com LPS (100 ng/mL) e SLIGRL-NH₂ (30 μM), a imunomarcação com DHE após 24 horas de estímulo é maior quando comparado aos demais grupos (Figura 3B). Uma imagem representativa da marcação com DHE sob os respectivos estímulos é demonstrada na Figura 3C.

5.4 Peptídeo agonista de PAR2 (SLIGRL-NH₂) aumenta a produção de citocinas pró-inflamatórias induzida por LPS em macrófagos peritoneais murinos

Macrófagos secretam uma variedade de moléculas bioativas quando estimulados por produtos microbianos. As citocinas são proteínas com amplas funções no repertório da resposta imune dos macrófagos. Na avaliação do perfil de citocinas, nossos resultados demonstram que a coincubação dos macrófagos peritoneais com LPS (100 ng/mL) e SLIGRL-NH₂ (30 μM) aumentou de maneira sinérgica a produção de TNF (figura 4A), IL-6 (figura 4B), IL-1β (figura 4C) e MCP-1 (figura 4D). No entanto, não interferiu na produção de IL-10 (figura 4E).

5.5 Avaliação da viabilidade celular dos macrófagos peritoneais após estímulo com LPS, SLIGRL-NH₂ ou ambos

Com o objetivo de avaliarmos se a incubação dos macrófagos com o agonista de PAR2 e/ou LPS nas concentrações testadas poderiam causar danos diretos e morte celular, nós avaliamos a viabilidade dos macrófagos frente a tais estímulos. Os macrófagos foram incubados com LPS (100 ng/mL), SLIGRL-NH₂ (30 μM) ou ambos estímulos por 24 horas. Em nenhum grupo experimental, as concentrações utilizadas

foram capazes de alterar significativamente a viabilidade celular quando comparado ao controle sem estímulo (figura 5).

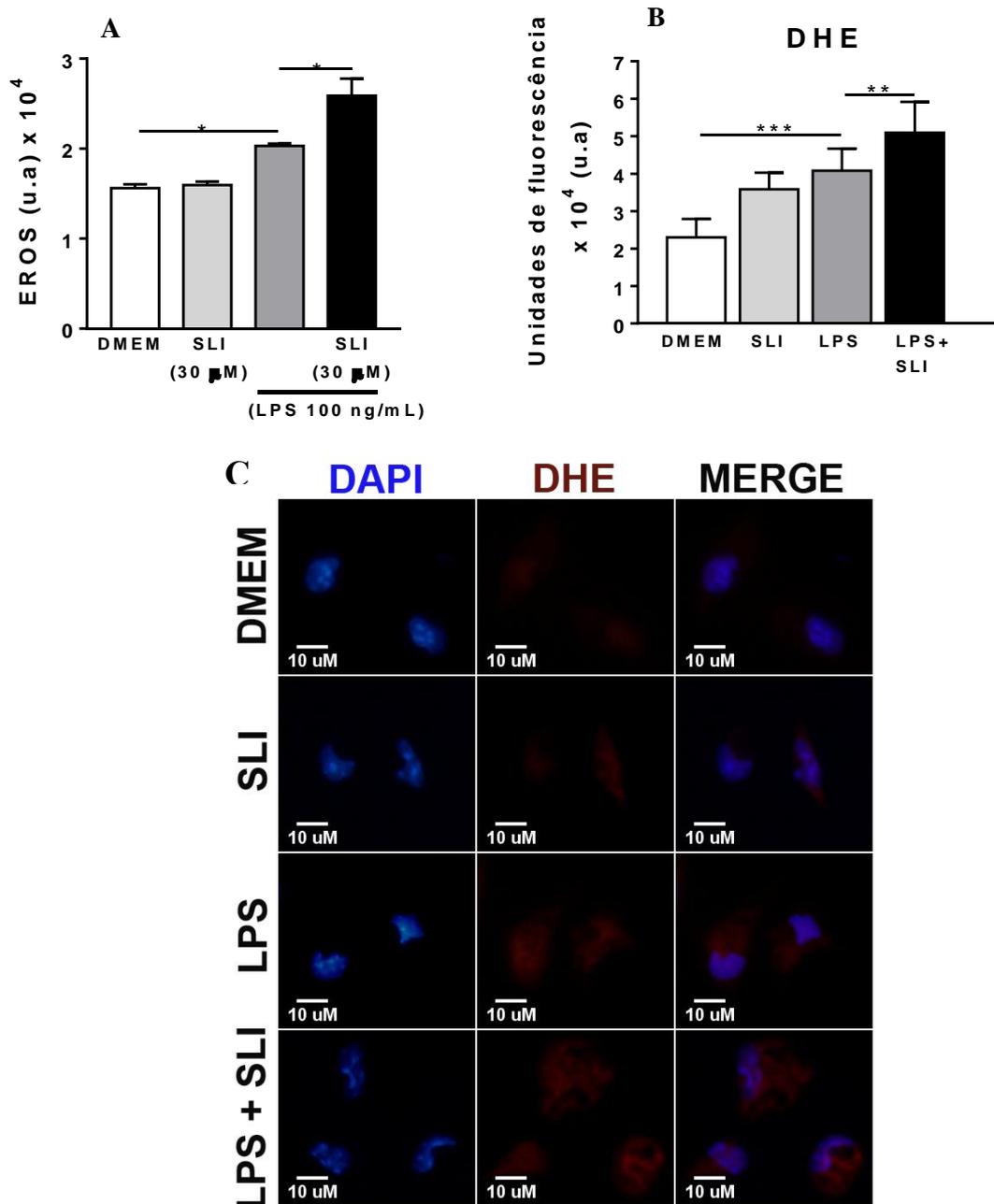


Figura 3. Peptídeo agonista de PAR2 (SLIGRL-NH₂) potencializa a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) em macrófagos peritoneais murinos.

Macrófagos peritoneais murinos (4×10^5 células/poço) foram pré-incubados ou não (DMEM) com LPS (100 ng/mL), SLIGRL-NH₂ (SLI, 30μM) ou ambos por 24 horas, seguido da incubação com DCFH-DA (10μM) por 4 horas. Diacetato diclorofluoresceína (DCF) foi utilizado como marcador direto da produção de EROs e mensurado como unidades arbitrárias (A). Para a imunofluorescência, os macrófagos foram fixados em paraformaldeído a 4% e procedeu-se com a marcação de dihidroetídio (1:200, vermelho), um marcador da produção de EROs total e do núcleo com DAPI (1μg/mL, azul) em B e C. A fluorescência foi corrigida pelo tamanho de cada célula e ao menos 5 campos de cada lâmina foram fotografados para análise posterior. Os resultados foram expressos como a média ± erro padrão da média de 4 poços por grupo e são representativos de 3 diferentes e independentes experimentos. Nas imagens as escalas representam 10μm. *P<0.05; **P<0.01 e ***P<0.001.

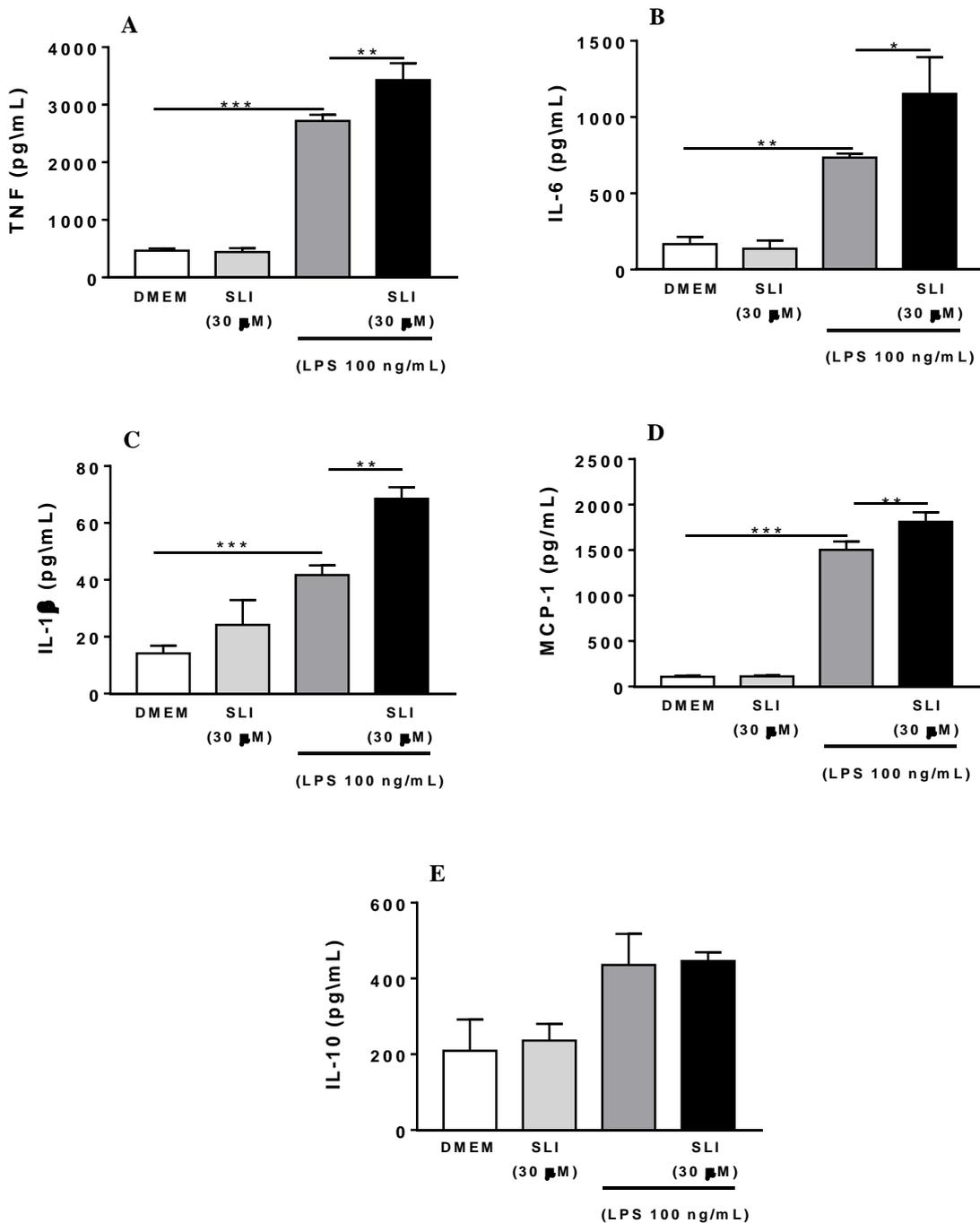


Figura 4. Peptídeo agonista de PAR2 (SLIGRL-NH₂) potencializa a produção de citocinas pró-inflamatórias em macrófagos peritoneais murinos.

Macrófagos peritoneais murinos (4×10^5 células/poço) foram pré-incubados ou não (DMEM) com LPS (100 ng/mL), SLIGRL-NH₂ (SLI, 30 μM) ou ambos por 6 horas. Após os tratamentos, os sobrenadantes da cultura celular foram analisados para a produção de IL-1β (A), IL-6 (B), MCP-1 (C) e IL-10 (D) por ensaio imunoenzimático (ELISA). Os resultados foram expressos como a média ± erro padrão da média de 4 poços por grupo e são representativos de 3 diferentes e independentes experimentos. *P<0.05; **P<0.01 e ***P<0.001.

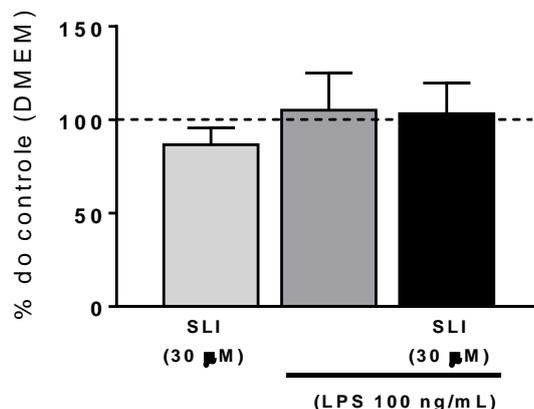


Figura 5. Peptídeo agonista de PAR2 (SLIGRL-NH₂) não interfere na viabilidade celular em macrófagos peritoneais murinos.

Macrófagos peritoneais murinos (4×10^5 células/poço) foram pré-incubados ou não (DMEM) com LPS (100 ng/mL), SLIGRL-NH₂ (SLI, 30 μM) ou ambos por 24 horas, e então foi avaliada a viabilidade celular. As células foram incubadas com MTT (5 μM) e após 4 horas, os cristais insolúveis (produto da metabolização de células viáveis) foram solubilizados em DMSO e a realizou-se a leitura da absorbância em 570 nm no espectrofotômetro. Os resultados foram expressos como a média \pm erro padrão da média de 4 poços por grupo e são representativos de 3 diferentes e independentes experimentos.

5.6 Peptídeo agonista de PAR2 (SLIGRL-NH₂) ou LPS aumenta a expressão de PAR2 e TLR4 em macrófagos peritoneais murinos.

A densidade de receptores na superfície celular nos diz muito sobre a dinâmica e influência de determinado estímulo sobre uma função biológica, caracterizando muitas vezes uma possível associação entre eles na célula. Aqui nós incubamos os macrófagos peritoneais em presença do LPS (100 ng/mL), SLIGRL-NH₂ (30 μM) ou ambos os estímulos por 6 horas, e, em seguida avaliamos a expressão dos receptores de PAR2 e TLR4 nos macrófagos por *western Blotting* e imunofluorescência. Nossos resultados demonstraram que a incubação com SLIGRL-NH₂ foi capaz de aumentar a expressão de PAR2 (figura 6A e figura 7A), como também da expressão de TLR4 (figura 6B e 7C). Da mesma maneira, o estímulo com LPS aumentou a expressão de PAR2 (figura 6A e 7A) e TLR4 (figura 6B e 7C). No entanto, a coincubação não foi capaz de aumentar a expressão desses receptores em comparação aos estímulos sozinhos (figuras 6A, 6B, 7A e 7C). Uma imagem representativa da expressão de PAR2 e TLR4 na presença dos respectivos estímulos é demonstrada, respectivamente, na figura 7B e figura 7D.

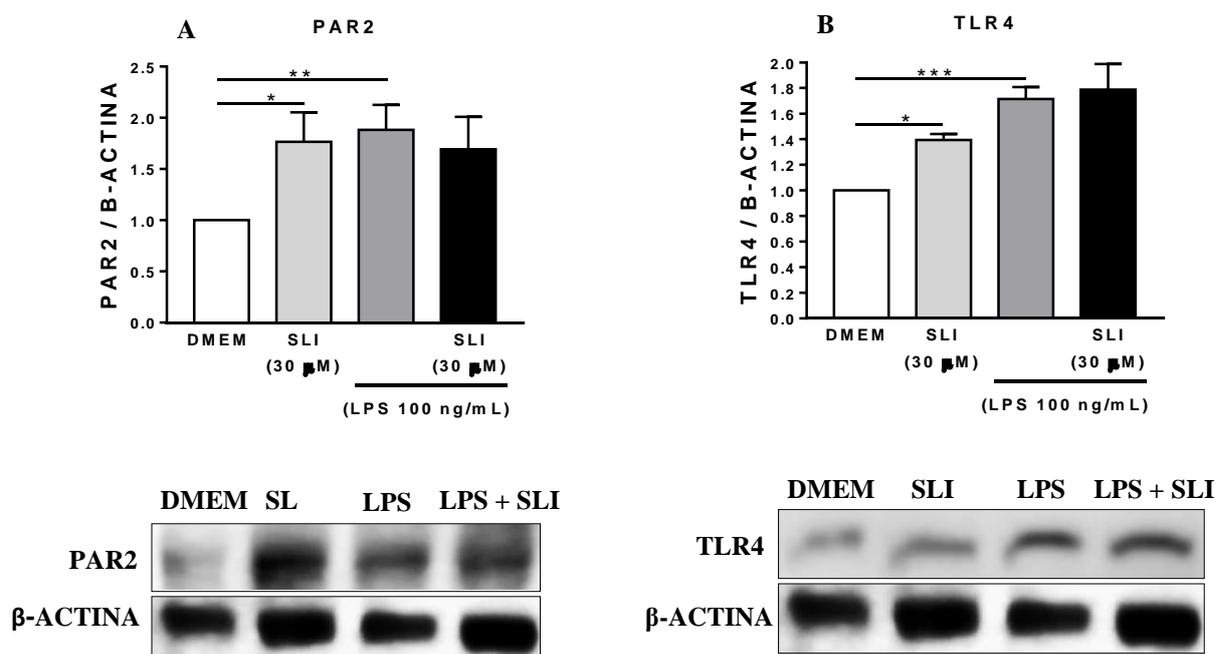


Figura 6. Peptídeo agonista de PAR2 (SLIGRL-NH₂) aumenta a expressão de PAR2 e TLR4 em macrófagos peritoneais murinos.

Macrófagos peritoneais murinos (4×10^5 células/poço) foram incubados ou não (DMEM) com LPS (100 ng/mL), SLIGRL-NH₂ (SLI, 30 μ M) ou ambos por 6 horas, e então foi avaliada a expressão de PAR2 (A) e TLR4 (B) por *Western Blotting*, e os resultados normalizados pela expressão de β -actina. Os resultados foram expressos como a média \pm erro padrão da média de 4 poços por grupo e são representativos de 3 diferentes e independentes experimentos. *P<0.05; **P<0.01 e ***P<0.001.

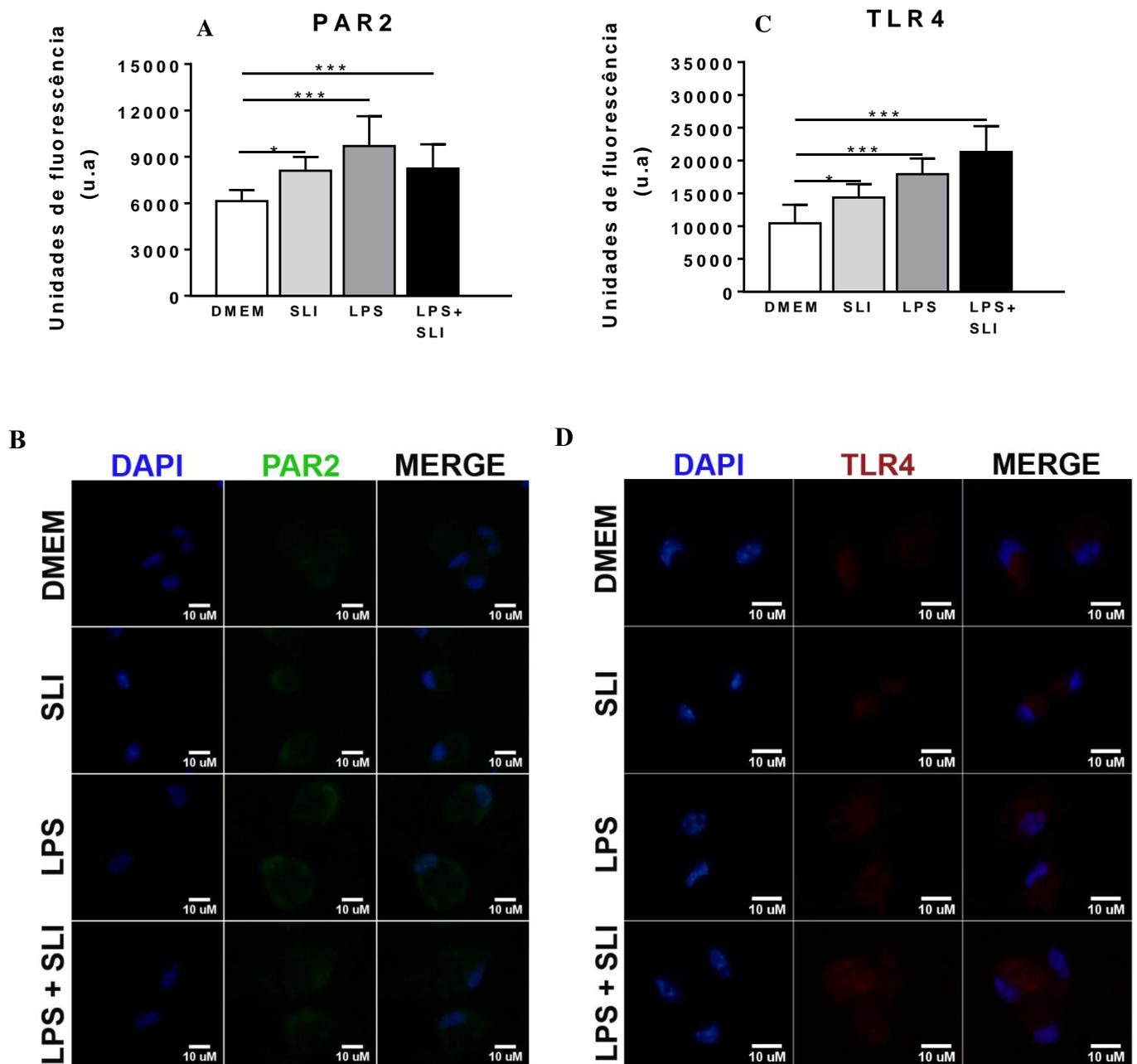


Figura 7. Imunomarcacão de PAR2 e TLR4 em macrófagos peritoneais murinos estimulados com peptídeo agonista de PAR2 (SLIGRL-NH₂).

Macrófagos peritoneais murinos (4×10^5 células/poço) foram incubados ou não (DMEM) com LPS (100 ng/mL), SLIGRL-NH₂ (SLI, 30 μ M) ou ambos por 6 horas, e então foi avaliada a expressão de PAR2 (A,B) e TLR4 (C,D) por imunofluorescência. A fluorescência foi corrigida pelo tamanho de cada célula e ao menos 5 campos de cada lâmina foram fotografados para análise posterior. Para a imunofluorescência, os macrófagos foram fixados em paraformaldeído a 4% e então os macrófagos foram incubados com anticorpo anti-PAR2 (verde) e anti-TLR4 (vermelho) e do núcleo com DAPI 1 μ g/mL (azul). Os resultados foram expressos como a média \pm erro padrão da média de 4 poços por grupo e são representativos de 3 diferentes e independentes experimentos. Nas imagens as escalas representam 10 μ m. *P<0.05 e ***P<0.001.

5.7 Peptídeo agonista de PAR2 (SLIGRL-NH₂) ou LPS aumenta a interação física entre PAR2 e TLR4 em macrófagos peritoneais murinos.

Na literatura é descrito a interação física dos PARs com outros receptores, formando homo ou heterodímeros. As consequências funcionais dessas interações não estão muito bem esclarecidas, no entanto, parecem direcionar os receptores envolvidos para um sinergismo de ações. Em nosso estudo, nós investigamos se os receptores de PAR2 e TLR4 poderiam interagir fisicamente, corroborando a cooperação existente entre esses receptores nas respostas efetoras dos macrófagos. Nós verificamos que a incubação na presença de LPS (100 ng/mL) ou SLIGRL-NH₂ (30 µM) por 30 minutos promoveu um aumento da colocalização desses receptores na membrana celular dos macrófagos, obtida por meio da análise de correlação de Manders (Figura 8A). A evidência para uma possível colocalização se deve ao aumento da marcação em amarelo, resultado da sobreposição das marcações fluorescentes de PAR2 (FITC) e TLR4 (TRITC) como observado na Figura 8B. Para corroborar que PAR2 e TLR4 estão interagindo fisicamente, realizou-se o ensaio de coimunoprecipitação e foi observado que os estímulos com LPS (100 ng/mL) ou SLIGRL-NH₂ (30 µM) por 30 minutos promoveu um aumento da interação física entre eles (Figura 8C). Além disso, o nível de interação foi aumentado na presença de ambos os estímulos quando comparado aos grupos estimulados com apenas um deles (Figura 8C).

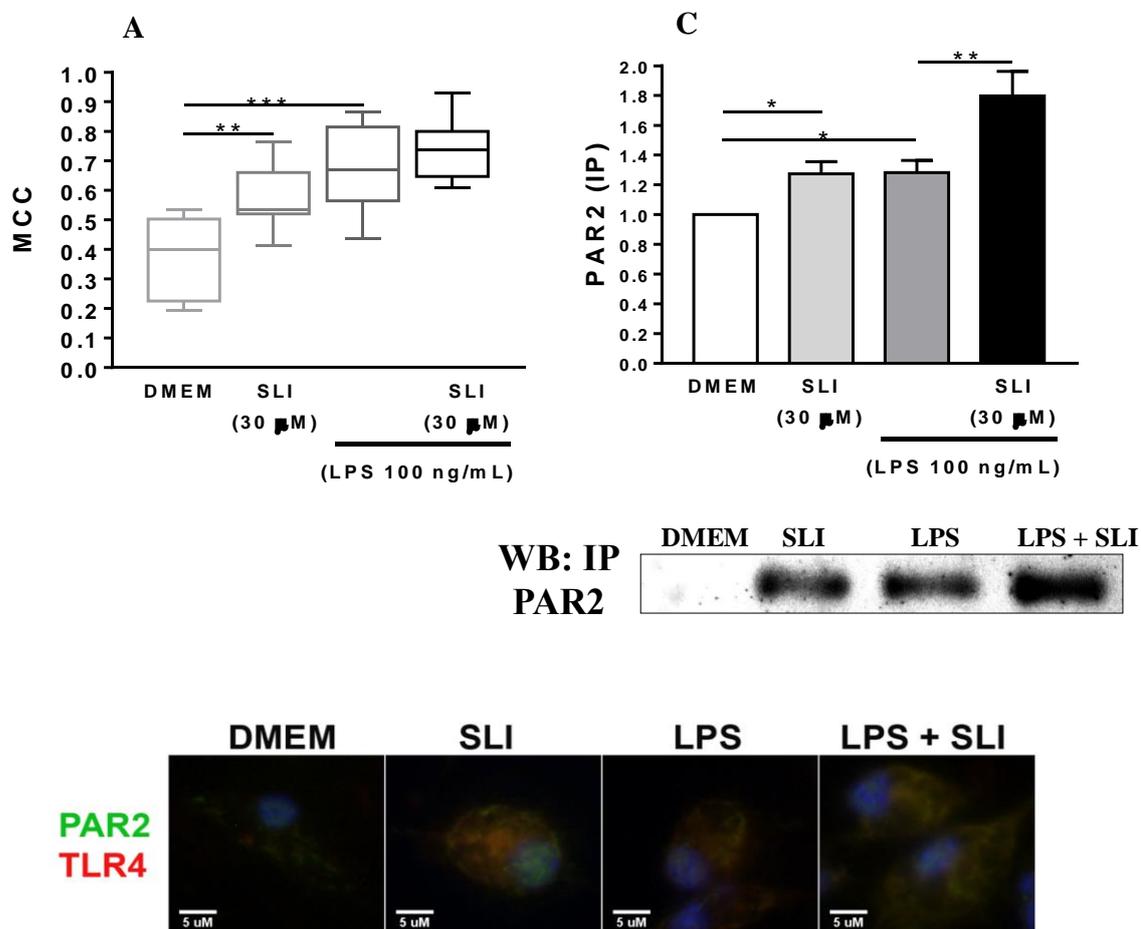


Figura 8. Peptídeo agonista de PAR2 (SLIGRL-NH₂) aumenta a colocalização e imunoprecipitação de PAR2 e TLR4 em macrófagos peritoneais murinos.

Macrófagos peritoneais murinos (1×10^5 células/poço) foram pré-incubados ou não (DMEM) com LPS (100 ng/mL), SLIGRL-NH₂ (SLI, 30 μ M) ou ambos por 30 minutos, e então foi avaliada a colocalização de PAR2 e TLR4 por imunofluorescência (A). O resultado foi expresso como a média \pm EPM do coeficiente de correlação de Manders (M2) de 4 experimentos independentes que representa a proporção de sinal da marcação verde (Alexa Fluor-488, anti-PAR2) que colocaliza com a marcação vermelha (Alexa Fluor-633, anti-TLR4) em macrófagos peritoneais murinos independente da intensidade de marcação. Costes 'p-value'= 1.00. Os macrófagos foram fixados em paraformaldeído a 4% e procedeu-se com a marcação de PAR2 (verde) ou marcação de TLR4 (vermelho) e do núcleo com DAPI 1 μ g/mL (azul). A fluorescência foi corrigida pelo tamanho de cada célula e ao menos 5 campos de cada lâmina foram fotografados para análise posterior. A confirmação da colocalização de PAR2 e TLR4 foi realizada por imunoprecipitação de TLR4, seguida de *Western Blotting* e marcação das respectivas bandas (B e C). Os resultados foram normalizados pelos níveis de proteína do controle (DMEM) e foram expressos como a média \pm erro padrão da média de 4 poços por grupo e são representativos de 3 diferentes e independentes experimentos. Nas imagens as escalas representam 5 μ m. *P<0.05; **P<0.01 e ***P<0.001.

5.8 A expressão aumentada de PAR2 e TLR4 em macrófagos peritoneais murinos induzido pelo peptídeo agonista de PAR2 (SLIGRL-NH₂) ou LPS é dependente da inibição da síntese proteica e/ou transcrição gênica.

O aumento da expressão de PAR2 e TLR4, observado com os macrófagos peritoneais em presença do LPS (100 ng/mL), SLIGRL-NH₂ (30 µM) ou ambos os estímulos, poderia ser dependente da síntese de novos receptores ou da transcrição gênica. Desta forma, para investigar um possível mecanismo de ação envolvendo a síntese de novo ou a transcrição gênica, Os macrófagos foram incubados previamente por quatro horas com ciclohexemida, um inibidor da síntese proteica, ou actinomicida D, um inibidor da transcrição gênica. Nós observamos que o aumento da expressão de PAR2 induzido por SLIGRL-NH₂ parece ser dependente da síntese de novos receptores e também da indução da transcrição gênica (Figura 9A). De maneira semelhante, o aumento da expressão de PAR2 induzido por LPS é dependente também da síntese proteica e envolve a transcrição gênica (Figura 9A). De forma semelhante, ao que ocorre com a incubação apenas com SLIGRL-NH₂, na presença de ambos os estímulos, o aumento da expressão de PAR2 parece ser dependente tanto da síntese de novos receptores, quando da transcrição gênica (Figura 9A). Uma imagem representativa da expressão de PAR2 na presença desses inibidores e dos respectivos estímulos é ilustrada na Figura 9B.

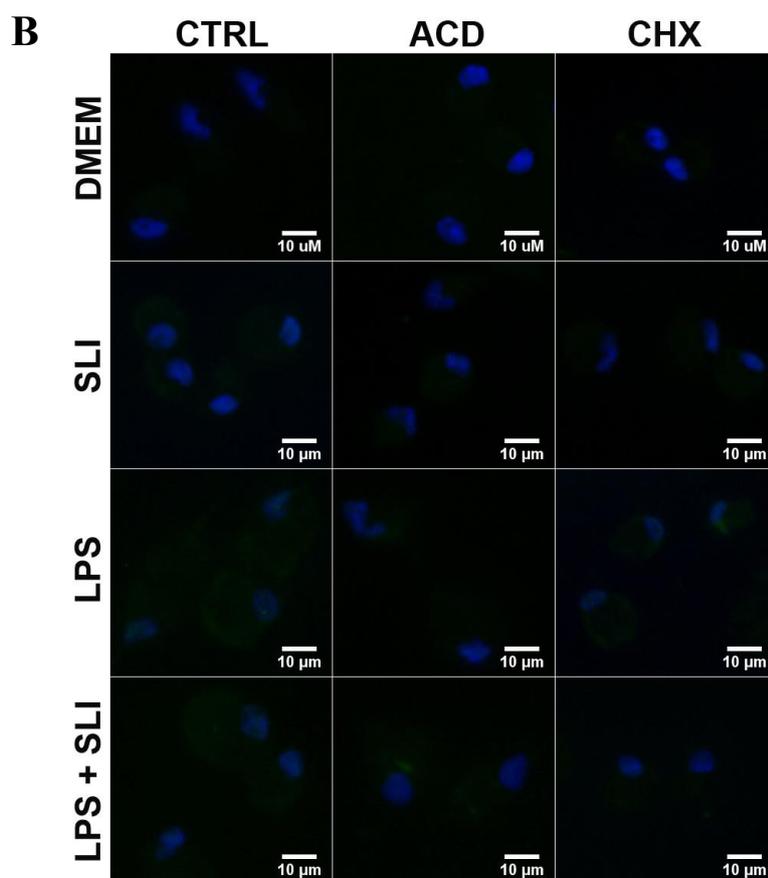
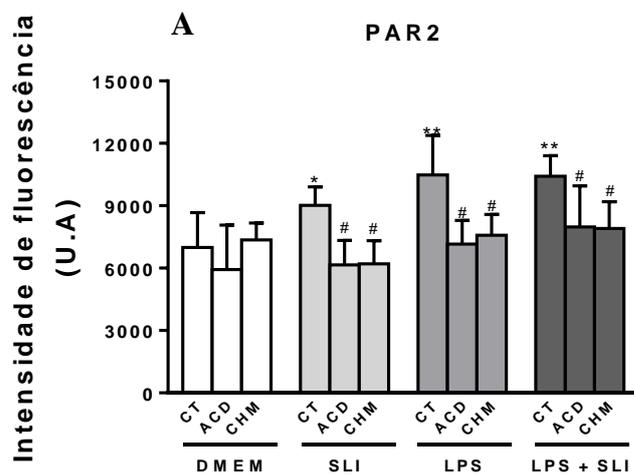


Figura 9. A inibição da síntese proteica ou transcrição de mRNA reduz o aumento da expressão de PAR2 induzida por agonista de PAR2 (SLIGRL-NH₂) em macrófagos peritoneais murinos.

Macrófagos peritoneais murinos (1×10^5 células/poço) foram pré-incubados com o DMEM (controle, CT), actinomicina D (ACD, 5 μ g/mL) ou cicloheximida (CHM, 20 μ g/mL) por 4 horas e então incubados ou não (DMEM) com LPS (100 ng/mL), SLIGRL-NH₂ (SLI, 30 μ M) ou ambos por 6 horas, e então a expressão de PAR2 foi por avaliada por imunofluorescência. Os macrófagos foram fixados em paraformaldeído a 4% e, em seguida, realizou-se a imunomarcagem de PAR2 (anticorpo anti-PAR2, verde) e do núcleo com DAPI 1 μ g/mL (azul). A fluorescência foi corrigida pelo tamanho de cada célula e ao menos 5 campos de cada lâmina foram fotografados para análise posterior. Os resultados foram expressos como a média \pm erro padrão da média de 4 poços por grupo e são representativos de 3 diferentes e independentes experimentos. Nas imagens as escalas representam 10 μ m. *P<0.01 e **P<0.001, comparado ao controle DMEM; #P<0.001 comparado ao controle do respectivo tratamento.

5.9 Peptídeo agonista de PAR2 (SLIGRL-NH₂) aumenta a expressão de p65 NFκB induzida por LPS em macrófagos peritoneais murinos.

Com a demonstração da cooperatividade entre PAR2 e TLR4 nas diversas funções efetoras dos macrófagos, nós buscamos investigar os possíveis mecanismos intracelulares envolvidos nessa interação. O fator de transcrição NFκB, é uma proteína expressa nos macrófagos e sua importância na transcrição de inúmeros genes inflamatórios está muito bem descrita na literatura. Dessa maneira, nós demonstramos que a coincubação na presença de LPS (100 ng/mL) e SLIGRL-NH₂ (30μM) por 6 horas foi capaz de aumentar sinergicamente a expressão da subunidade p65 do NFκB (Figura 10 A). Esse resultado foi confirmado também pelo ensaio de imunofluorescência, cuja intensidade da marcação nuclear da subunidade p65 do NFκB é maior no grupo que foi tratado com ambos os estímulos (Figura 10 B). Um imagem representativa do aumento da intensidade da fluorescência nuclear, como consequência da translocação da subunidade p65 do NFκB, é ilustrada na figura 10 C. Para corroborar a importância dessa via de sinalização na resposta inflamatória dos macrófagos mediadas pelo LPS e SLIGRL-NH₂ nós avaliamos também a expressão de IκB-α, um inibidor do complexo NFκB que é degradado, permitindo a translocação da subunidade p65 para o núcleo. Nós observamos por imunofluorescência, uma redução da expressão do IκB-α em todos os grupos experimentais quando comparado ao grupo DMEM (Figura 11A). Além disso, a coincubação na presença de LPS (100 ng/mL) e SLIGRL-NH₂ (30μM) por 6 horas foi capaz de reduzir, de maneira significativa, a expressão de IκB-α em comparação aos estímulos individuais (Figura 11A). Uma imagem representativa da expressão de IκB-α sob os diferentes estímulos é ilustrada na figura 11B.

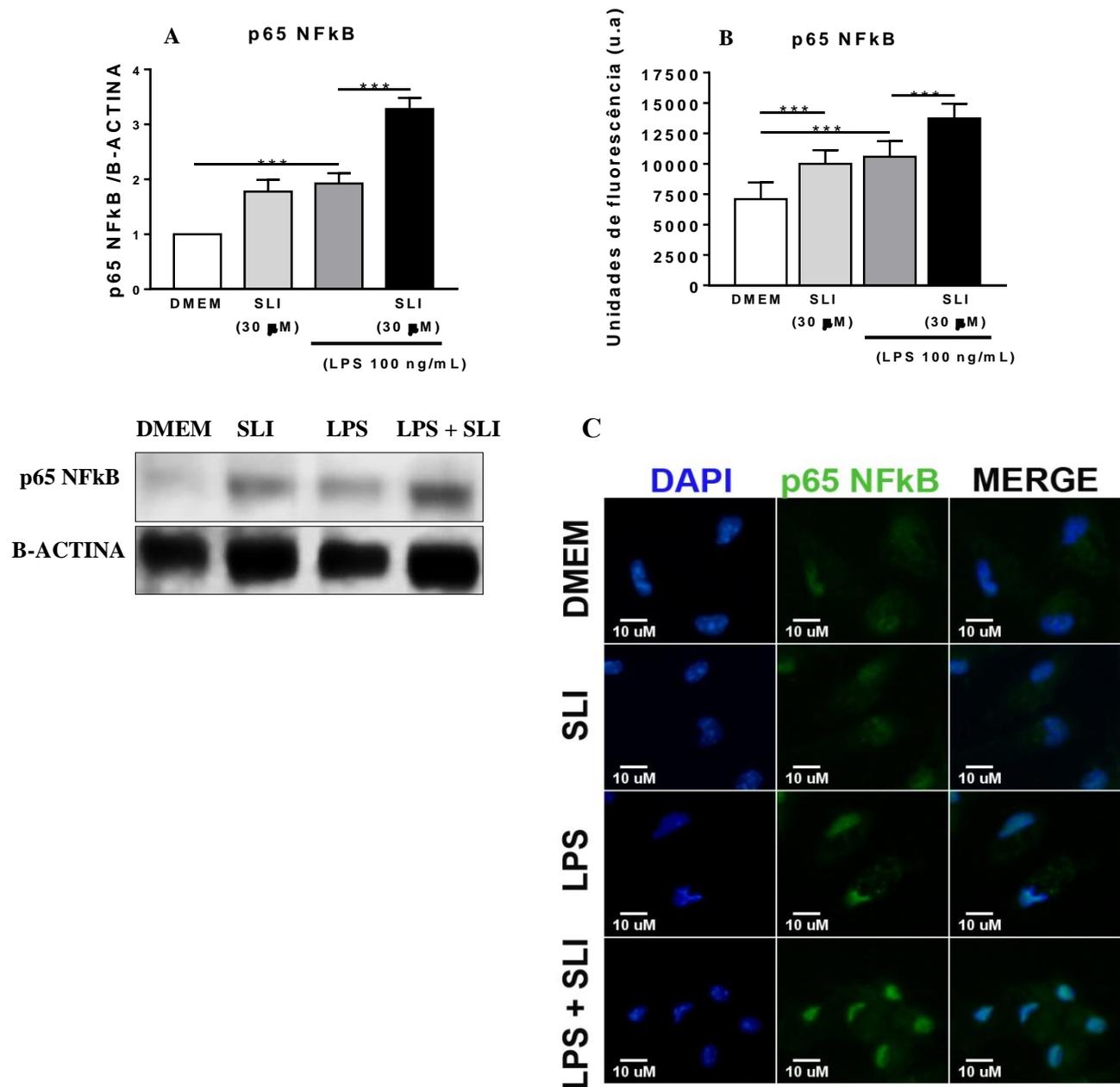


Figura 10. Peptídeo agonista de PAR2 (SLIGRL-NH₂) potencializa a expressão do fator de transcrição NFkB induzida por LPS em macrófagos peritoneais murinos.

Macrófagos peritoneais murinos (6×10^6 células/poço) foram pré-incubados ou não (DMEM) com LPS (100 ng/mL), SLIGRL-NH₂ (SLI, 30 μ M) ou ambos por 6 horas e então foi avaliada a expressão do fator de transcrição NF-kB por western blotting (A) e a sua translocação para o núcleo celular por imunofluorescência em (B,C). Os resultados da expressão de NF-kB (anti-NF-kB, 1:500) foram normalizados pela expressão de β -actina (anti- β -actina, 1.1000). Para a imunofluorescência, 4×10^5 células/poço foram fixados em paraformaldeído a 4% e em seguida, o NFkB foi marcado (1:100, verde) e o núcleo com DAPI (1 μ g/mL, azul). A fluorescência foi corrigida pelo tamanho de cada célula e ao menos 5 campos de cada lâmina foram fotografados para análise posterior. Os resultados foram expressos como a média \pm erro padrão da média de 4 poços por grupo e são representativos de 3 diferentes e independentes experimentos. Nas imagens as escalas representam 10 μ m. *P<0.05 e **P<0.01

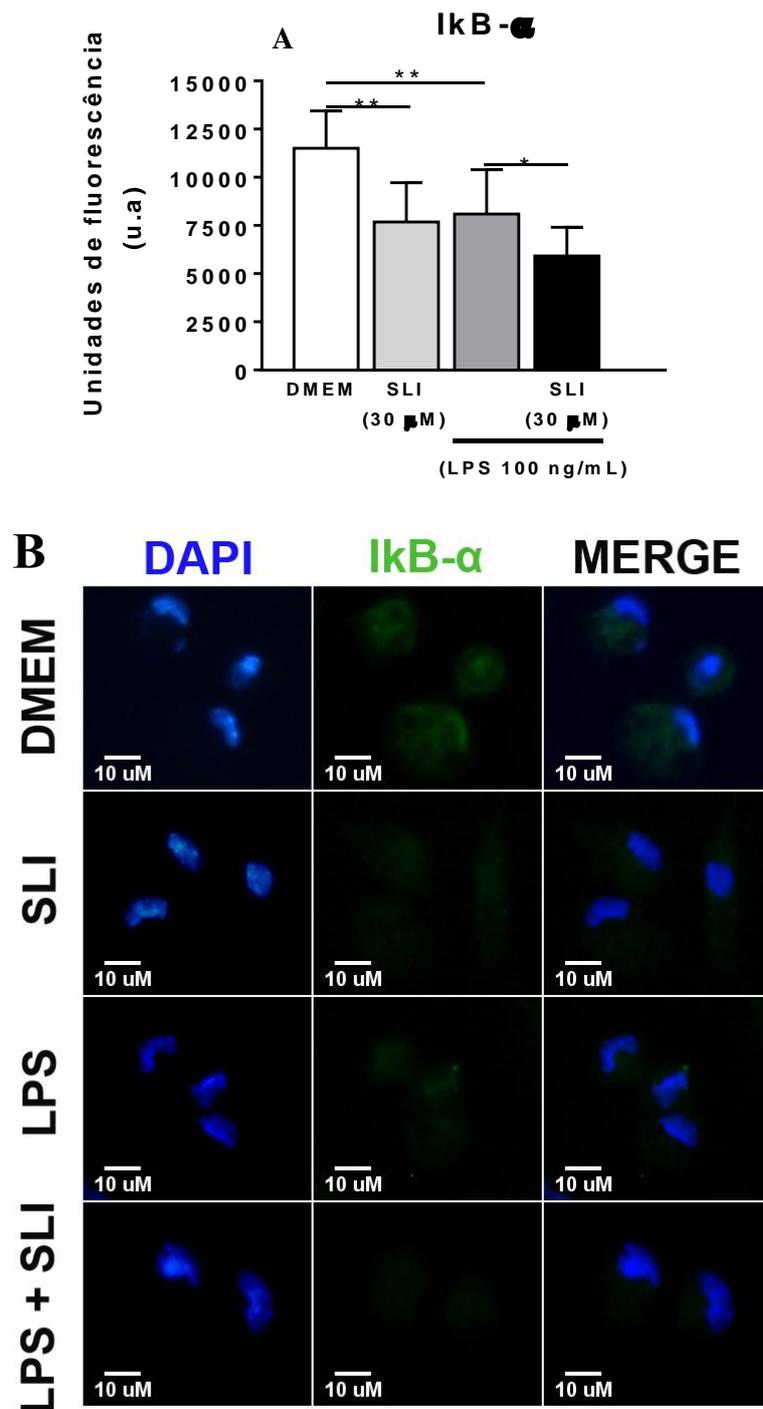


Figura 11. Peptídeo agonista de PAR2 (SLIGRL-NH₂) potencializa a degradação do inibidor do NFκB (IκBα) induzida por LPS em macrófagos peritoneais murinos.

Macrófagos peritoneais murinos (4×10^5 células/poço) foram pré-incubados ou não (DMEM) com LPS (100 ng/mL), SLIGRL-NH₂ (SLI, 30μM) ou ambos por 6 horas e então foi avaliada a expressão do inibidor da translocação do NFκ-B (IκBα) por imunofluorescência em (A,B). Os macrófagos foram fixados em paraformaldeído a 4% e em seguida foi marcado o IκBα (1:100, verde) e o núcleo com DAPI (1μg/mL, azul). A fluorescência foi corrigida pelo tamanho de cada célula e ao menos 5 campos de cada lâmina foram fotografados para análise posterior. Os resultados foram expressos como a média ± erro padrão da média de 4 poços por grupo e são representativos de 3 diferentes e independentes experimentos. Nas imagens as escalas representam 10μm. ***P<0.001.

5.10 Peptídeo agonista de PAR2 (SLIGRL-NH₂) aumenta a fosforilação de P38 Map quinase em macrófagos peritoneais murinos.

A via de sinalização das MAP quinases está relacionada à síntese de mediadores pró-inflamatórios nos macrófagos, e a fosforilação da proteína p38 da via das MAP quinases ocorre em consequência do aumento de cálcio intracelular, culminando com a ativação de quinases e fosforilação da p38. A fim de observar se essa via poderia estar contribuindo para o sinergismo de ação entre o TLR4 e PAR2, nós incubamos os macrófagos com LPS (100ng/mL), SLIGRL-NH₂ (30μM) ou ambos por 6 horas. Nossos resultados demonstraram que a ativação de PAR2 aumenta a fosforilação de p38 (Figura 12). No entanto, nos demais grupos analisados, não houve diferença significativa em comparação ao controle sem estímulo (Figura 12).

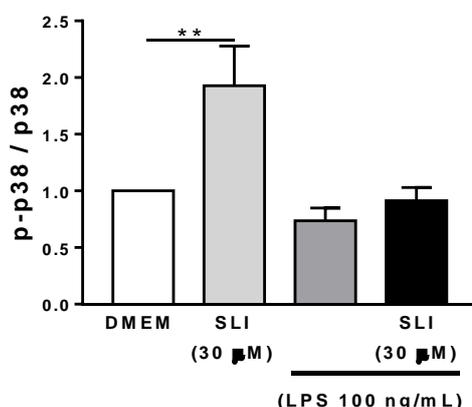


Figura 12. Peptídeo agonista de PAR2 (SLIGRL-NH₂) promove a ativação de MAP quinase p38 em macrófagos peritoneais murinos.

Macrófagos peritoneais murinos (6×10^6 células/poço) foram pré-incubados ou não (DMEM) com LPS (100 ng/mL), SLIGRL-NH₂ (SLI, 30μM) ou ambos por 6 horas e então foi avaliada a fosforilação do p38 da via das MAPquinases por *western blotting*. Os valores de p38 fosforilados foram normalizados pelos níveis de p38 total. Os resultados foram expressos como a média \pm erro padrão da média de 4 poços por grupo e são representativos de 3 diferentes e independentes experimentos. **P<0.01.

5.11 Peptídeo agonista de PAR2 (SLIGRL-NH₂) prolonga o tempo de liberação de cálcio intracelular induzido por LPS em macrófagos peritoneais murinos.

A ativação de PAR2 ou TLR4 provoca o aumento das concentrações de cálcio intracelular que por sua vez irá ativar uma série de enzimas e vias de sinalização à jusante. Dessa forma nós investigamos se a potencialização das ações de PAR2 sobre as funções dos macrófagos induzidas por LPS poderiam ser mediadas, em parte, pela liberação de cálcio. Nós demonstramos que os macrófagos coincubados com LPS (100 ng/mL) e SLIGRL-NH₂ (30µM) apresentaram maior porcentagem de células responsivas à liberação de cálcio quando comparado com os estímulos isolados (Figura 13A). Além disso, a coincubação na presença de LPS (100 ng/mL) e SLIGRL-NH₂ (30 µM) promoveu um aumento do tempo de liberação de cálcio intracelular em comparação aos demais tratamentos (Figura 13B). Em relação à amplitude de liberação de cálcio, a coincubação com LPS (100 ng /mL) e SLIGRL-NH₂ (30 µM) não apresentou diferença significativa em relação aos macrófagos que foram incubados somente com SLIGRL-NH₂ (30µM) (Figura 13C). Um gráfico representativo da dinâmica temporal e intensidade de liberação de cálcio na presença dos respectivos estímulos é mostrado na Figura 13D. Uma imagem representativa da intensidade de fluorescência emitida por uma célula que reflete a liberação de cálcio pode ser demonstrada na Figura 13E sob os respectivos estímulos.

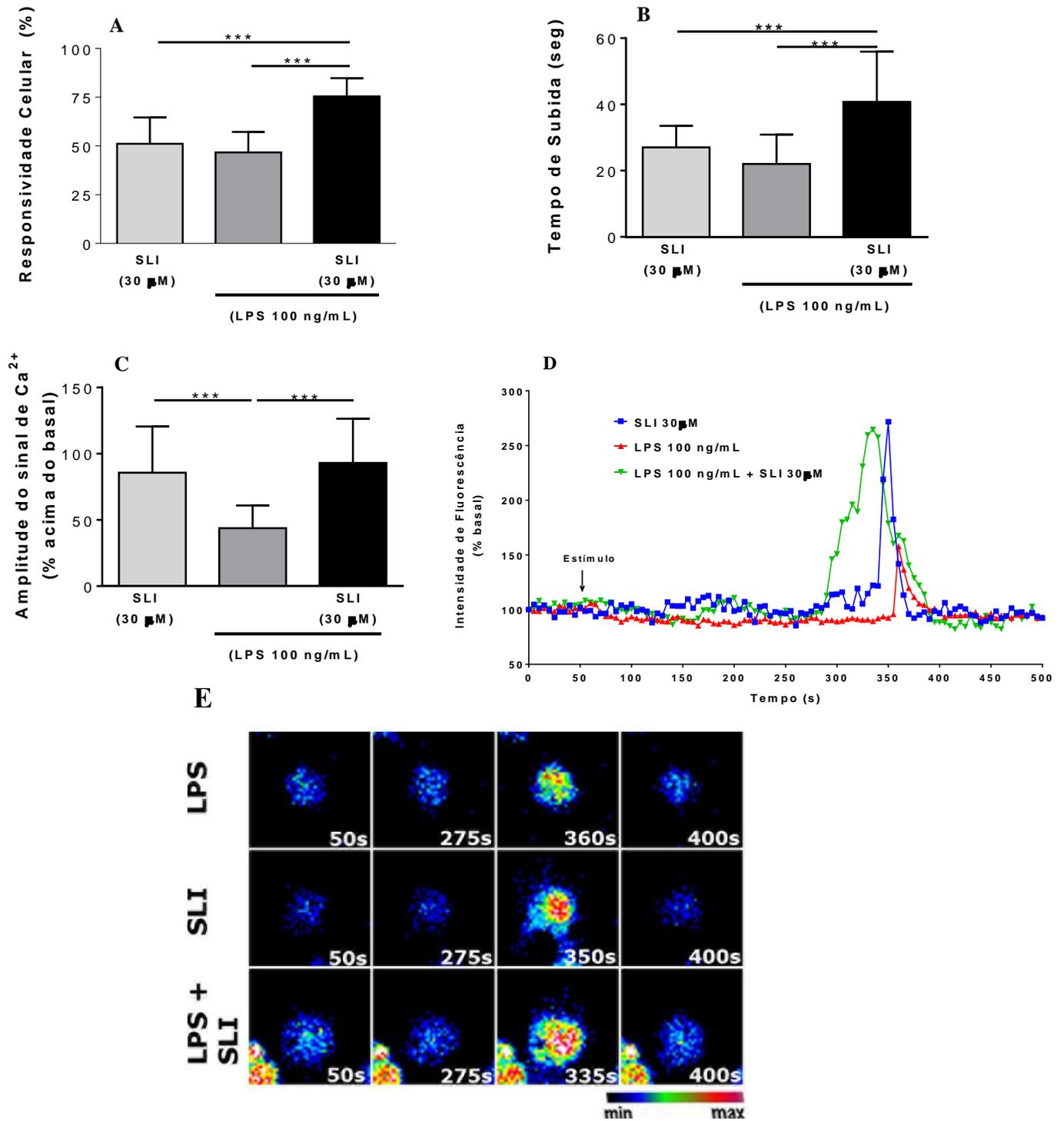


Figura 13. Peptídeo agonista de PAR2 (SLIGRL-NH₂) prolonga o tempo de liberação de cálcio intracelular induzida por LPS em macrófagos peritoneais murinos.

Macrófagos peritoneais murinos (1×10^6 células/poço) foram pré-incubados com a sonda fluorescente de cálcio citoplasmático (Fluo-4N, 6 μ M) por 20 minutos, seguido da adição ou não de LPS (100 ng/mL) ou SLIGRL-NH₂ (SLI, 30 μ M) ou ambos. Os registros da liberação de cálcio foram obtidos durante 500s, com início em 50s em microscópio confocal. A: porcentagem de células responsivas; B: tempo de elevação do pico; C: amplitude da resposta de liberação; D: gráfico representativo da amplitude de liberação de cálcio; E: Imagem representativa da intensidade de fluorescência da liberação de cálcio. Os resultados foram expressos como a média \pm erro padrão da média de 3 poços por grupo e são representativos de 3 diferentes e independentes experimentos. ***P<0.001.

5.12 O bloqueio da ação de proteases extracelulares reduz a liberação de cálcio intracelular induzido por LPS em macrófagos peritoneais murinos.

No ambiente inflamatório, diversas moléculas bioativas estão presentes, como por exemplo, serinoproteases secretadas pelas células imunes ou oriundas de micro-organismos invasores. Assim, nós investigamos o papel de proteases endógenas produzidas pelos macrófagos poderiam atuar sobre o receptor de PAR2 e amplificar o sinal inflamatório induzido por LPS. Nós observamos que o bloqueio prévio com coquetel inibidor de proteases 30 minutos antes do estímulo com LPS (100 ng/mL) reduziu a porcentagem de células responsivas à liberação intracelular de cálcio em comparação as células incubadas apenas com LPS (Figura 14A). No entanto, não houve diferença entre os dois grupos em relação ao tempo de subida, parâmetro que reflete o tempo de liberação do cálcio (Figura 14B). Já a amplitude do sinal de cálcio intracelular foi reduzida nas células previamente incubadas com o inibidor de proteases antes do da adição do LPS (Figura 14C). Um gráfico representativo da intensidade de liberação de cálcio na presença dos respectivos estímulos é mostrado na Figura 14D. A Figura 14E demonstra a intensidade de fluorescência emitida por uma célula sob os respectivos estímulos, onde os macrófagos previamente incubados com o inibidor de proteases exibem um nível reduzido na liberação de cálcio intracelular quando comparado às células estimuladas apenas com LPS.

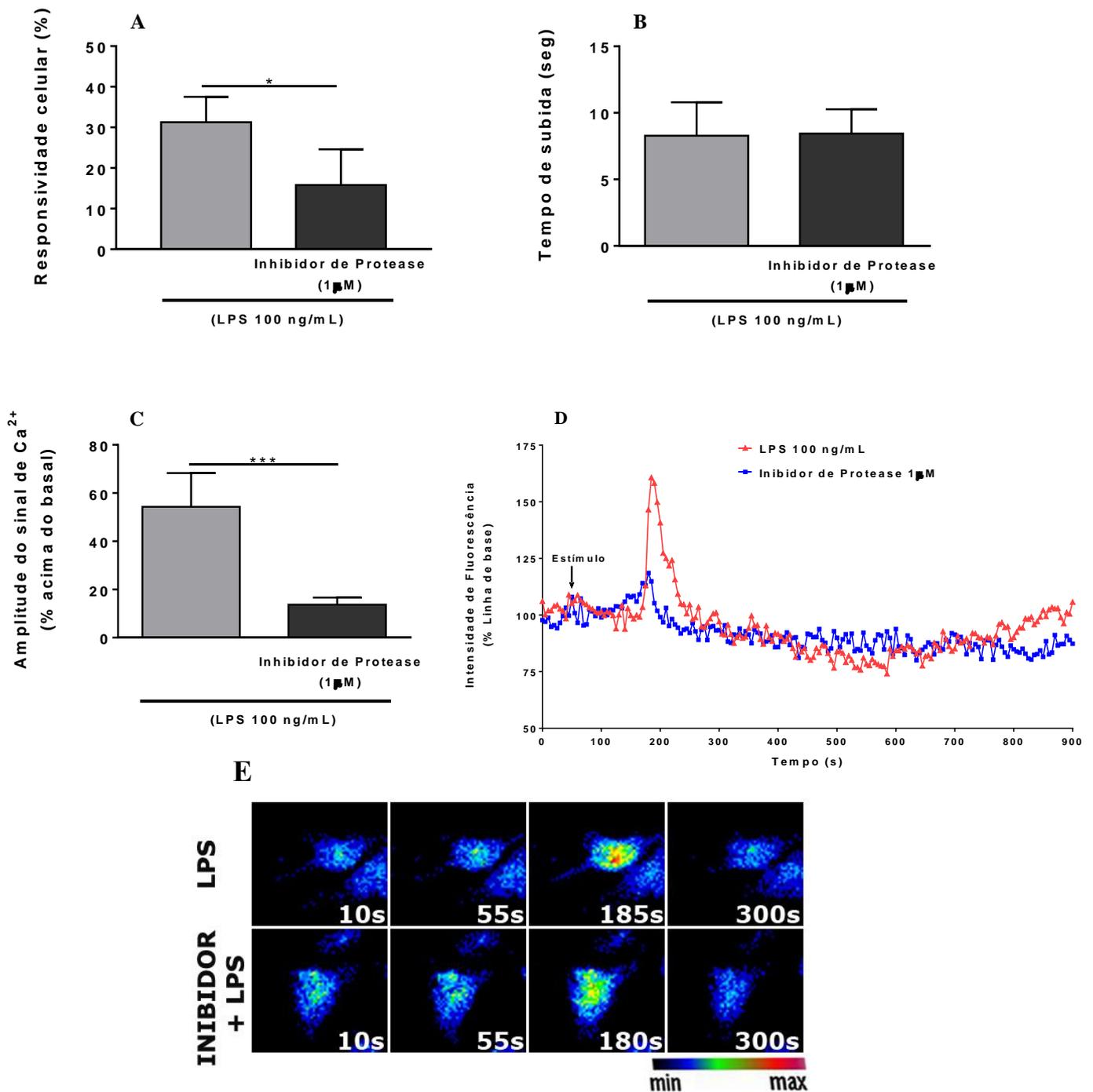


Figura 14. Coquetel inibidor de proteases reduz a liberação de cálcio induzida por LPS em macrófagos peritoneais murinos.

Macrófagos peritoneais murinos (1×10^6 células/poço) foram pré-incubados com a sonda fluorescente de cálcio citoplasmático (Fluo-4N, $6 \mu\text{M}$) por 20 minutos, seguido da incubação com coquetel inibidor de protease ($1 \mu\text{M}$) por 15 minutos antes da adição de LPS (100 ng/mL). Os registros da liberação de cálcio foram obtidos durante 500s, com início em 50s, após a adição do LPS, em microscópio confocal. A: Porcentagem de células responsivas; B: tempo de elevação do pico; C: amplitude da resposta de liberação; D: gráfico representativo da amplitude de liberação de cálcio; E: Imagem representativa da intensidade de fluorescência da liberação de cálcio. Os resultados foram expressos como a média \pm erro padrão da média de 3 poços por grupo e são representativos de 3 diferentes e independentes experimentos. * $P < 0.05$ e *** $P < 0.001$.

5.13 Fragmento peptídico gerado após clivagem de PAR2 (SLIGRL-NH₂) não interfere na liberação de cálcio intracelular induzido por LPS em macrófagos peritoneais murinos.

O receptor de PAR2 é clivado por serinoproteases presentes no microambiente inflamatório que geram um fragmento oriundo da porção N-terminal. Na literatura não há relato se essa sequência peptídica gerada é capaz de se ligar e ativar o receptor de TLR4. Dessa maneira, nós investigamos se os macrófagos incubados com a sequência peptídica gerada após clivagem do receptor de PAR2 poderiam desencadear a liberação intracelular de cálcio. Nós observamos que os macrófagos incubados com o fragmento de PAR2 (30 μ M) na presença ou não de LPS (100 ng/mL) não apresentaram efeito sobre a responsividade celular (Figura 15A), nem interferiu no tempo de subida (Figura 15B) e, tampouco, alterou a amplitude do sinal de cálcio intracelular induzido por LPS (Figura 15C). Um gráfico representativo da intensidade de liberação de cálcio na presença do fragmento de PAR2, LPS ou ambos os estímulos são mostrado na Figura 15D. A intensidade de fluorescência emitida por uma célula representativa sob os respectivos estímulos é demonstrada na Figura 15E.

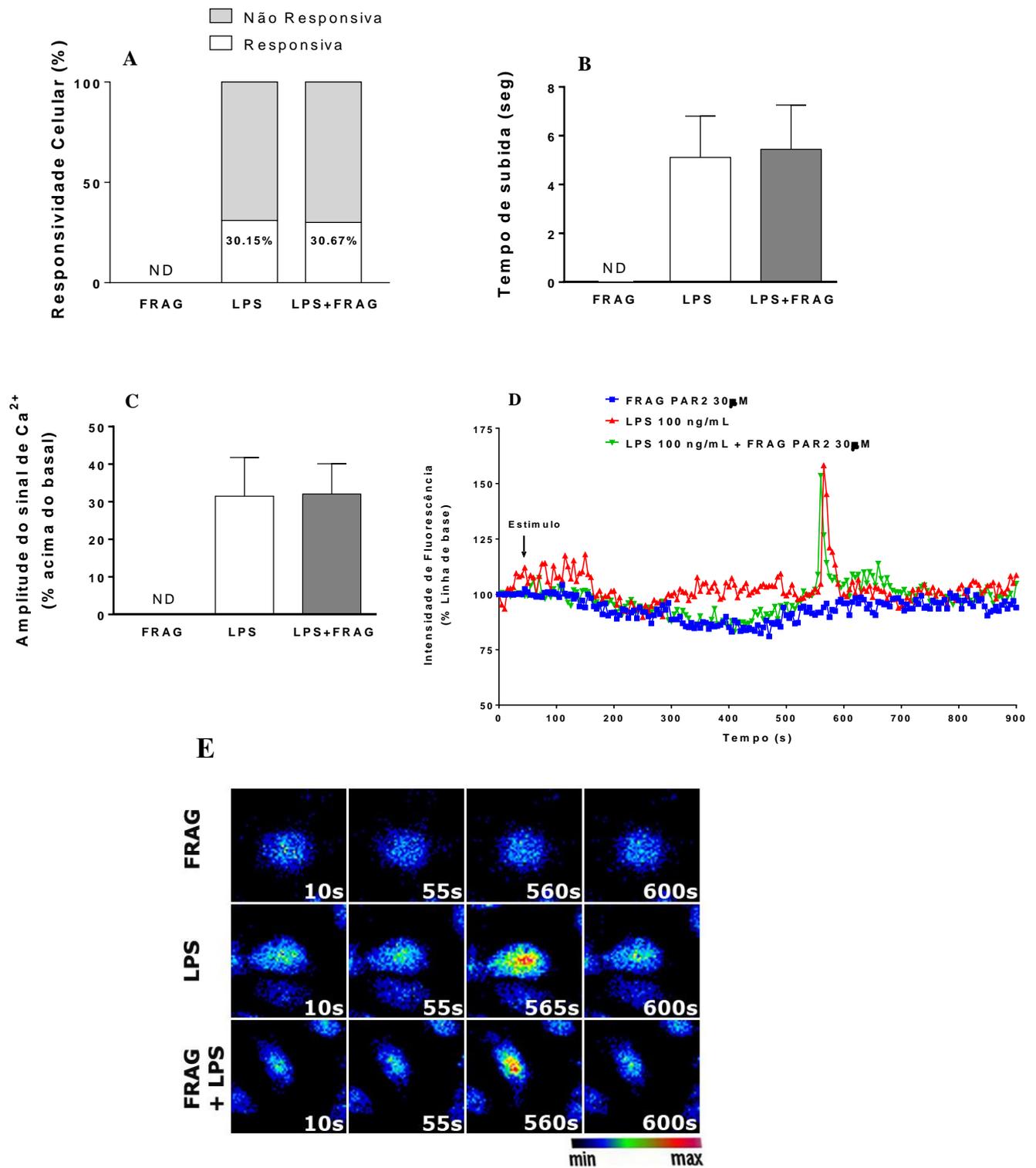


Figura 15. O peptídeo fragmento de PAR2 não interfere na liberação de cálcio induzida por LPS em macrófagos peritoneais murinos.

Macrófagos peritoneais murinos (1×10^6 células/poço) foram pré-incubados com a sonda fluorescente de cálcio citoplasmático (Fluo-4N, $6 \mu\text{M}$) por 20 minutos, seguido da adição do peptídeo gerado após clivagem de PAR2 (FRAG, $30 \mu\text{M}$) ou LPS (100 ng/mL) ou ambos. Os registros da liberação de cálcio foram obtidos durante 500s, com início em 50s, após a adição dos estímulos, em microscópio confocal. A: Porcentagem de células responsivas; B: tempo de elevação do pico; C: amplitude da resposta de liberação; D: gráfico representativo da amplitude de liberação de cálcio; E: Imagem representativa da intensidade de fluorescência da liberação de cálcio. Os resultados foram expressos como a média \pm erro padrão da média de 3 poços por grupo e são representativos de 3 diferentes e independentes experimentos.

6. Discussão

Os macrófagos são células heterogêneas, distribuído de forma ampla nos tecidos e caracterizado pela versatilidade de ações fisiopatológicas. Um dos fenômenos mais estudados dedica-se em investigar o papel dos macrófagos na resposta imune inata e adaptativa com base no repertório de ativação dessas células. Algumas funções como a fagocitose, a produção de espécies reativas de oxigênio e mediadores inflamatórios tem implicações ao desenvolvimento e progressão de inúmeras patologias como câncer, diabetes, aterosclerose e doenças crônicas. No contexto inflamatório, um dos mediadores ainda pouco estudados e com ações diretas sobre os macrófagos são as proteases, em especial, as serino proteases como triptase, tripsina, elastase, e catepsina G. Essas moléculas são secretadas por células imunes ou patógenos invasores e tem sido descritas como potenciais moléculas ativadoras de PARs no ambiente inflamatório. Dessa maneira, os PARs funcionariam como sensores imunes capazes de amplificar as respostas efetoras dos macrófagos frente a um estímulo infeccioso.

Um dos principais mecanismos desempenhados pelos macrófagos e que atuam como primeira linha de defesa do organismo contra patógenos invasores é a fagocitose. Nesse fenômeno, vários receptores são considerados fagocíticos por promover o englobamento e eliminação de partículas estranhas, debris celulares e células apoptóticas pelos macrófagos. O TLR4, embora não seja classificado como um receptor fagocítico, é capaz de aumentar a captura de partículas oriundas de patógenos, como o zimosano (Sigola *et al.*, 2016). Assim, inúmeras moléculas secretadas por microorganismos são capazes de ativar a fagocitose atuando sobre determinados receptores presentes na membrana dos macrófagos (Rosales & Uribe-Querol, 2016). Neste trabalho nós demonstramos que a ativação de PAR2 potencializou a capacidade fagocítica dos macrófagos induzida pelo LPS. O efeito do LPS sobre a captura de partículas de zimosano nos macrófagos já é bem descrita na literatura (Sigola *et al.*, 2016), na qual o TLR4 é capaz de ativar vias de sinalização relacionadas ao rearranjo dos filamentos de actina (Iwasaki & Medzhitov, 2015). Nós observamos também que a média do número de partículas fagocitadas pelos macrófagos foi aumentada quando PAR2 e TLR4 foram coativados. Apesar de alguns trabalhos na literatura já terem descrito o papel de PAR2 no fenômeno fagocítico em queratinócitos (Sharlow *et al.*, 2000), na depuração de bactérias como *P. aeruginosa* por macrófagos e neutrófilos

(Moraes *et al.*, 2007) e na fagocitose de *S.aureus* por macrófagos humanos (Shpacovitch *et al.*, 2011), este trabalho descreve pela primeira vez a cooperação de PAR2 na fagocitose induzida por LPS em macrófagos. A fagocitose é um mecanismo biológico marcado pelo rearranjo dos filamentos de actina e miosina do citoesqueleto celular permitindo o englobamento, internalização e depuração da partícula estranha ou microorganismo invasor. Uma das hipóteses que sustentam nosso resultado é o fato de PAR2 ser um receptor metabotrópico acoplado à proteína G_{12/13} que desencadeia a ativação das Rho GTPases, via de sinalização envolvida no fenômeno fagocítico (Rothmeier & Ruf, 2011). Além disso, proteases secretadas ou geradas em resposta a um dano tecidual, infecção ou condição inflamatória podem atuar sobre a atividade fagocítica dos macrófagos tendo como alvo o PAR2 (Macfarlane, 2001).

A ativação dos macrófagos por produtos microbianos como o LPS desencadeia a síntese e secreção de diversos mediadores com funções antimicrobianas e pró-inflamatórias. O óxido nítrico é um desses mediadores que é produzido pelos macrófagos e atua como substrato na geração de peroxinitrito, uma espécie reativa de oxigênio com potente atividade citotóxica e citostática. O mecanismo antimicrobiano ocorre por meio de reações de nitração em proteínas estruturais vitais à sobrevivência e replicação dos patógenos no hospedeiro (Bogdan, 2009; Forman & Torres, 2001). Neste trabalho demonstramos que a produção de óxido nítrico induzida por LPS é aumentada na presença do peptídeo agonista de PAR2. Isso sugere que proteases presentes no microambiente inflamatório poderiam potencializar a produção de NO induzido por LPS. De fato, a capacidade de proteases exógenas de modular a função de PAR2, como a trombina, já foi descrita (Mihara *et al.*, 2016). Dados demonstram que a trombina aumenta a expressão da enzima óxido nítrico *sintase* induzível (*iNOS*) em macrófagos alveolares (Lin *et al.*, 2011). Para corroborar esse resultado, nos demonstramos que a expressão da *iNOS* que é responsável pela produção de óxido nítrico foi aumentada quando os macrófagos são coincubados com LPS e agonista de PAR2. Esses dados foram confirmados por Rallabhandi e colaboradores, demonstrando que parte do efeito induzido pelo LPS sobre a produção de NO e a expressão de *iNOS* em macrófagos, é dependente da ativação de PAR2 (Rallabhandi *et al.*, 2008). Dessa maneira, PAR2 e TLR4 parecem interagir de modo a potencializar a produção de NO nos macrófagos.

Micro-organismos e componentes bacterianos como o LPS estimulam também a síntese de uma variedade de intermediários do metabolismo oxidativo como o íon

superóxido, o peroxinitrito e o peróxido de hidrogênio (Radi *et al.*, 2018). Essas moléculas apresentam alta capacidade de causar dano direto a componentes estruturais presentes em patógenos, inviabilizando a sua replicação e sobrevivência no hospedeiro (Ferrer-Sueta *et al.*, 2018). Em uma situação onde ocorre injúria tecidual, inflamação e infecção, proteases atuando sobre PAR2 produzem espécies reativas de oxigênio, como por exemplo, em células endoteliais e em epiteliais bronquiais humanas (Banfi, *et al.*, 2008, Kim *et al.*, 2019). Neste trabalho demonstramos que a ativação de PAR2 aumenta a produção total de espécies reativas de oxigênio induzida por LPS, confirmando a existência de uma cooperatividade entre PAR2 e TLR4 na ativação da maquinaria oxidativa dos macrófagos.

Os macrófagos ativados secretam moléculas proteicas bioativas com amplas ações na resposta imune inata, denominadas de citocinas. O LPS é um forte indutor da produção de citocinas pró-inflamatórias nos macrófagos, contribuindo, assim, para a ampliação das respostas efectoras e antimicrobianas (Rossol *et al.*, 2011), assim como produtos microbianos, proteases presentes no microambiente inflamatório também podem atuar sobre PAR2 e desencadear a liberação de citocinas. Por exemplo, em células epiteliais bronquiais, o bloqueio de PAR2 foi capaz de reduzir a produção de IL-8 e IL-6 (Bailo *et al.*, 2020). Em outro estudo, Nhu e colaboradores demonstraram que em células mucosas epiteliais humanas a ativação de PAR2 promove um aumento da expressão de citocinas como IL-6, MCP-1, TNF, IL-8 (Nhu *et al.*, 2010). Já em uma linhagem de macrófagos imortalizadas como a Raw 264.7, a incubação com o fator de coagulação Xa, um ativador de PAR2, aumentou a produção de IL-6, IL-8, TNF e INF- γ (Zuo *et al.*, 2015). Esses dados foram corroborados por Chen e colaboradores, onde a ativação de PAR2 em macrófagos Raw 264.7 ou derivados da medula óssea promoveu um aumento da expressão gênica de citocinas inflamatórias como IL-1 β , IL-6, MCP-1 e TNF (Chen *et al.*, 2018). Neste trabalho demonstramos que a ativação de PAR2 nos macrófagos peritoneais potencializou a produção das citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β , IL-6, TNF e MCP-1 induzidas por LPS, embora não tenha interferido na produção da IL-10. A IL-1 β tem ações predominantes sobre a ativação de células imuno-competentes como macrófagos e neutrófilos, entre outras células, levando à amplificação da produção de outros mediadores na dinâmica inflamatória (Dinarello, 2018). Rallabhandi e colaboradores demonstraram que em macrófagos nocautes para TLR4, a ativação de PAR2 promoveu uma menor expressão gênica de IL-1 β ,

confirmando que esses receptores interagem de alguma forma para potencializar a resposta inflamatória (Rallabhandi *et al.*, 2008). Já TNF e IL-6 são secretadas pelos macrófagos e suas ações predominantes são: ativar as células imunes, aumentar a migração celular, expressão de fatores de adesão e produção de outros mediadores inflamatórios (Parameswaran & Patial, 2010; Yao *et al.*, 2014). A MCP-1 é outra citocina essencial na dinâmica inflamatória por promove o recrutamento de neutrófilos para o sítio infeccioso (Bianconi *et al.*, 2018). Dessa maneira, nós demonstramos a participação de PAR2 como um receptor envolvido diretamente nas respostas efetoras dos macrófagos induzidas pelo LPS, sugerindo que há, de fato, uma cooperatividade entre PAR2 e TLR4 na ativação de vias de sinalização pró-inflamatórias. Estes resultados do papel de PAR2-TLR4 na amplificação da resposta inflamatória por macrófagos foram validados por meio do ensaio de viabilidade celular. Avaliando o potencial citotóxico dos estímulos utilizados, nós observamos que a incubação dos macrófagos com LPS e ou com o agonista de PAR2 não interferiu na viabilidade celular, confirmando que os efeitos observados não estão relacionados a mecanismos apoptóticos nos macrófagos.

Uma vez confirmado a participação de PAR2 e TLR4 no repertório de ação dos macrófagos, o próximo passo foi investigar o perfil de expressão de PAR2 e TLR4 nessas células. Nós demonstramos que a ativação de PAR2 aumentou a sua expressão nos macrófagos peritoneais. Além disso, neste trabalho constatamos que as células incubadas com LPS também apresentaram uma maior expressão de PAR2. Na literatura, há relatos da ativação de PAR2 aumentando a expressão do próprio receptor em células mononucleares (Steven *et al.*, 2013; Matos *et al.*, 2013), e recentemente, o nosso grupo de pesquisa demonstrou que a instilação intranasal de LPS é capaz de aumentar a expressão de PAR2 em pulmões de camundongos (Almeida *et al.*, 2020). Em outros trabalhos, Zhou e colaboradores demonstraram que o estímulo com LPS aumentou a expressão de PAR2 em células monocíticas (Zhou *et al.*, 2011), o que também foi observado em células endoteliais (Chao *et al.*, 2017). Por outro lado, em nossos resultados, os macrófagos estimulados com agonista de PAR2 ou LPS foram capazes de aumentar a expressão de TLR4. Em estudos recentes, a incubação com LPS foi capaz de aumentar a expressão de TLR4 em linhagens de monócitos humanos (THP-1) ou em macrófagos murinos Raw 264.7 (Wan *et al.*, 2017, Fang *et al.*, 2017), confirmando a importância do PAR2 e TLR4 na função do macrófago. É possível que a incapacidade

da coincubação com LPS e agonista de PAR2 em aumentar a expressão de TLR4 e PAR2 deva-se ao estado de ativação dos macrófagos utilizados em nosso estudo, uma vez que eles já se apresentam primados pelo tioglicolato, ou mesmo deva-se à necessidade no ajuste das concentrações dos ligantes envolvidos. De qualquer forma, mais estudos são necessários para estabelecer uma correlação entre a ativação de PAR2 e LPS quanto à expressão tanto de PAR2 como de TLR4.

Como descrito por alguns autores, os PARs têm como característica molecular, após ativação, de formar homo ou heterodímeros na superfície celular (Lin *et al.*, 2013; Gieseler *et al.*, 2013). Dessa maneira nós investigamos se PAR2 e TLR4 poderiam interagir fisicamente, o que poderia corroborar a hipótese de cooperação entre estes receptores na resposta inflamatória promovida pelos macrófagos. Alguns trabalhos já descreveram que a ativação de PAR2 promove uma maior interação física desse receptor com o TLR4 em aorta de camundongos (Bucci *et al.*, 2012) e células HEK 293T (Rallabhandi *et al.*, 2008), no entanto ainda não existem relatos sobre uma possível cooperação física envolvendo estes receptores em macrófagos. O nosso trabalho confirma que a ativação de PAR2 ou TLR4 é capaz de aumentar significativamente a interação física entre esses receptores em macrófagos peritoneais murinos primados pelo tioglicolato, e demonstramos pela primeira vez que a coincubação destes macrófagos com o agonista de PAR2 e LPS aumentou de forma significativa essa interação física. As consequências para essa maior interação física ao nível de mecanismo de sinalização celular ainda não está muito claro, no entanto, a análise das imagens da expressão simultânea de PAR2 e TLR4 demonstra que a ativação de PAR2 e/ou TLR4 promove uma maior colocalização desses receptores.

Após demonstrarmos que a expressão de PAR2 é aumentada em decorrência da ativação de PAR2 e TLR4, nós investigamos se essa regulação poderia ocorrer ao nível de transcrição gênica, síntese proteica ou reciclagem de receptores contidos em vesículas endocíticas. Uma característica do PAR2 após ativação é tornar-se inativo, não sendo, portanto, capaz de responder a novos estímulos. Como resultado, o receptor é internalizado em vesículas endocíticas e degradado nos lisossomos (Ramachandran *et al.*, 2011; Ricks e Trejo, 2009). No entanto, alguns estímulos externos são capazes de promover um aumento da expressão desse receptor na superfície celular e esse fenômeno pode ocorrer por reciclagem de receptores endocíticos ou síntese de novas proteínas (Steinhoff *et al.*, 2005). Em um estudo, St-Onge e colaboradores demonstrou

que a incubação de granulócitos com bactéria opsonizada, aumentou a expressão de PAR2 por um mecanismo envolvendo a reciclagem desse receptor para a superfície celular e sem requerer a síntese *de novo* (St-Onge *et al.*, 2010). Nossos resultados sugerem que o aumento da expressão de PAR2 pelo SLIGRL-NH₂ é dependente da transcrição de novos receptores, bem como também da síntese proteica, portanto envolve a síntese *de novo*, e não parece ocorrer por reciclagem de receptores já pré-formados. De maneira semelhante, O estímulo com LPS ou a coincubação aumentou a expressão de PAR2 de maneira dependente de ambos os mecanismos, confirmando que o aumento da expressão de PAR2 pelos estímulos utilizados ocorre por mecanismos que dependem da transcrição gênica e síntese de novos receptores para a membrana plasmática.

Tendo demonstrado a cooperação entre TLR4 e PAR2 na resposta dos macrófagos, nós buscamos investigar por quais mecanismos intracelulares ambos receptores poderiam contribuir para a potencialização das respostas efetoras. Nós primeiramente investigamos se a interação entre os receptores poderiam ativar a via de sinalização do fator de transcrição NFκB, via responsável por induzir a síntese de vários mediadores inflamatórios. O NFκB é um complexo proteico ligado por inibidores como IκBα. Este ao ser ativado é degradado pelo complexo ubiquitina proteasoma, deixando a subunidade p65 livre para translocar até o núcleo celular onde irá ocorrer a transcrição gênica (Liu *et al.*, 2017; Dorrington & Fraser, 2019). O papel do TLR4 na ativação de vias inflamatórias nos macrófagos já está bem descrito, sobretudo envolvendo a via do NFκB (Kawai & Akira, 2007). De maneira semelhante, a ativação de PAR2 pode desencadear a sinalização do NFκB e consequentemente aumentar a produção de mediadores inflamatórios (Rothmeier *et al.*, 2012; Yan *et al.*, 2020). Neste trabalho demonstramos que a coincubação com ambos os estímulos foi capaz de aumentar significativamente a expressão da subunidade p65 do NFκB em comparação aos controles. Esse resultado foi confirmado através do aumento da imunomarcação da subunidade p65 do NFκB no núcleo celular, quando ambos os receptores foram estimulados. Dados da literatura corroboram nossos dados ao afirmam que em células HEK 293T, a ativação de PAR2 e TLR4 potencializam a sinalização da via do NFκB (Rallabhandi *et al.*, 2008), no entanto não existem relatos na literatura para esse mecanismo em macrófagos peritoneais. Para confirmar a participação dessa via nos macrófagos peritoneais, nós quantificamos a expressão de IκBα e observamos que nos

macrófagos coestimulados com o agonista sintético de PAR2 (SLIGRL-NH₂) e LPS, houve uma redução significativa nos níveis desse inibidor. Diante desses resultados nós confirmamos a participação da via do NFκB nas funções efetoras dos macrófagos.

Em seguida, nós avaliamos também se a via de sinalização das MAP quinases poderia contribuir para a cooperatividade entre TLR4 e PAR2 em nossos experimentos. Estudos anteriores demonstram que a ativação de PAR2 pode aumentar a ativação de vias de fosforilação como ERK, MAP quinases p38 e JNK. Essas vias desencadeiam a ativação do fator de transcrição AP-1, responsável pela síntese de moléculas inflamatórias nos macrófagos (Heuberger & Schuepbach, 2019). Da mesma forma, a ativação de TLR4 também ativa a via das MAP quinases, o que poderia explicar o sinergismo de efeito observado nos macrófagos (Bian *et al.*, 2017). Nós observamos que a ativação de PAR2 aumentou a fosforilação da p38, no entanto, o estímulo com LPS ou a coestimulação com os respectivos agonistas não apresentaram diferença significativa no padrão de fosforilação da p38 em comparação ao controle. Embora a ativação de TLR4 desencadeie a ativação da via das MAP quinases, sobretudo a via do p38, em nossos experimentos não houve diferença significativa, sugerindo o envolvimento desta via. Desta forma, é possível que os nossos resultados sejam justificados pelo delineamento experimental, relacionadas ao intervalo de tempo avaliado e pelo tempo utilizado para o estímulo. Assim, os níveis de fosforilação da p38 retornariam aos níveis basais, por regulação negativa, após o período de estímulo com o LPS. Portanto, nós podemos afirmar que a via das MAP quinases p38 parece não contribuir para o efeito sinérgico nas funções nos macrófagos.

Outro mecanismo que poderia estar relacionado ao sinergismo de ações entre TLR4 e PAR2 envolve o aumento da liberação intracelular de cálcio na célula. O cálcio é uma molécula-chave na ativação de diversos mecanismos celulares, como apoptose, secreção de mediadores e transcrição gênica (Karlstad *et al.*, 2012). A ativação de PAR2 por agonistas endógenos como triptase ou peptídeos sintéticos como SLIGRL-NH₂ desencadeia o aumento intracelular de cálcio na célula (Al-Ani *et al.*, 2002; Rothmeier & Ruf 2011). Nós investigamos a capacidade da ativação de PAR2 em aumentar, de maneira sinérgica, a liberação de cálcio induzida por LPS. PAR2 é um receptor metabotrópico acoplado a proteína G_q que ao ser ativado desencadeia a liberação intracelular de cálcio por um mecanismo que envolve a ativação de fosfolipase C e formação de IP₃ (Rothmeier & Ruf 2011). Nossos resultados demonstraram que a

coincubação do agonista de PAR2 e TLR4 aumentou significativamente o número de células responsivas, como também prolongou o tempo de liberação intracelular de cálcio na célula, sem, no entanto, interferir na amplitude de sinal. O prolongamento da liberação de cálcio poderia aumentar a disponibilidade de íon na célula, potencializando o efeito sobre a liberação de mediadores inflamatórios e ativação de vias de sinalização à jusante. Conforme observado por MacFarlane e colaboradores, a ativação de PAR2 desencadeia um aumento do cálcio citosólico e consequentemente da ativação da via do NFκB, demonstrando que o pré-tratamento com um quelante de cálcio (BAPTA-AM), não interferiu na fosforilação da ERK ou MAP quinases p38 induzidas por tripsina em queratinócitos humanos (MacFarlane *et al.*, 2005). Dessa maneira, o aumento de cálcio na célula está relacionado ao aumento da ativação da via do NFκB.

Em seguida nós investigamos se as proteases secretadas pelos macrófagos induzidas pelo LPS poderiam ativar PAR2 por um mecanismo autócrino. Na literatura há relatos da liberação de algumas proteases pelos macrófagos como metaloproteases de matrix (MMP) 9 e 12 (Newby, 2016). Estudos prévios evidenciam que PAR2 pode ser ativado por MMP-9 (Vliagoftis *et al.*, 2000) ou MMP-12 (Zang *et al.*, 2016). Assim, em nossos resultados, o pré-tratamento com coquetel inibidor de proteases reduziu a porcentagem de células responsivas à liberação de cálcio quando estimuladas com LPS, bem como também foi capaz de reduzir a amplitude do sinal de liberação, sugerindo que os macrófagos podem potencializar a resposta inflamatória induzida pelo LPS por meio da liberação de proteases, que atuando sobre PAR2, contribuiriam para o sinergismo das funções efetoras.

Outra hipótese abordada na interação entre PAR2 e TLR4 foi investigar se a sequência polipeptídica liberada após a clivagem extracelular de PA2 poderia ativar diretamente o receptor de TLR4. Esse fenômeno poderia justificar o efeito sinérgico observado sobre a resposta efetora dos macrófagos. Na literatura, já é descrito que diversas moléculas endógenas geradas em resposta a um dano tecidual ou infecção são capazes de ativar diretamente o receptor de TLR4, como, por exemplo, proteína de choque térmico, fibrinogênio, entre outras substâncias (Erridge, 2010). Nós observamos que a incubação dos macrófagos com o fragmento inativo de PAR2 foi incapaz de promover um aumento do cálcio intracelular, bem como de promover uma resposta induzida pelo LPS sobre esse íon. Isso demonstra que os efeitos observados nos

macrófagos não são atribuídos ao fragmento peptídico liberado da clivagem de PAR2, mas sim, ocorre pela ativação do receptor pelo seu ligante.

7. Conclusão

Nossos resultados demonstram a importância de uma coparticipação de PAR2 no repertório de ativação dos macrófagos induzida pelo LPS, envolvendo uma interação entre PAR2 e TLR4 tanto a nível extracelular como a nível intracelular, de maneira a potencializar as respostas efetoras dos macrófagos incluindo a fagocitose, a produção de espécies reativas de oxigênio (NO, EROs) e citocinas pró-inflamatórias, por um mecanismo dependente da via de sinalização do fator de transcrição NFκB e do cálcio intracelular.

Anexo

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Protocolo CEUA: 150/2017

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

Finalidade: Pesquisa

Pesquisador responsável: Andre Klein

Unidade: Instituto de Ciências Biológicas

Departamento: Departamento de Farmacologia

Situação atual: **Decisão Final - Aprovado**

Aprovado na reunião do dia 26/02/2018. Validade: 26/02/2018 à 25/02/2023

Belo Horizonte, 28/02/2018.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG

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

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

8. Referências Bibliográficas

ADAMS, Mark N.; RAMACHANDRAN, Rithwik; YAU, Mei-Kwan; SUEN, Jacky Y.; FAIRLIE, David P.; HOLLENBERG, Morley D.; HOOPER, John D.. Structure, function and pathophysiology of protease activated receptors. **Pharmacology & Therapeutics**, [S.L.], v. 130, n. 3, p. 248-282, jun. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pharmthera.2011.01.003>.

AKIRA, Shizuo; UEMATSU, Satoshi; TAKEUCHI, Osamu. Pathogen Recognition and Innate Immunity. **Cell**, [S.L.], v. 124, n. 4, p. 783-801, fev. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.015>.

AL-ANI, Bahjat; WIJESURIYA, Suranga J.; HOLLENBERG, Morley D.. Proteinase-Activated Receptor 2: differential activation of the receptor by tethered ligand and soluble peptide analogs. **Journal Of Pharmacology And Experimental Therapeutics**, [S.L.], v. 302, n. 3, p. 1046-1054, 1 set. 2002. American Society for Pharmacology & Experimental Therapeutics (ASPET). <http://dx.doi.org/10.1124/jpet.302.3.1046>.

ALEXANDER, Stephen P.H.; BENSON, Helen E.; FACCENDA, Elena; PAWSON, Adam J.; SHARMAN, Joanna L.; MCGRATH, John C.; CATTERALL, William A.; SPEDDING, Michael; PETERS, John A.; HARMAR, Anthony J.. The Concise Guide to PHARMACOLOGY 2013/14: overview. **British Journal Of Pharmacology**, [S.L.], v. 170, n. 8, p. 1449-1458, dez. 2013. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/bph.12444>.

ALMEIDA, Aline Dias de; SILVA, Irismara Sousa; FERNANDES-BRAGA, Wesley; LIMAFILHO, Antônio Carlos Melo; FLORENTINO, R Odrigo Machado; BARRA, Ayslan; ANDRADE, Luciana de Oliveira; LEITE, M. Fátima; CASSALI, Geovanni Dantas; KLEIN, André. A role for mast cells and mast cell tryptase in driving neutrophil recruitment in LPS-induced lung inflammation via protease-activated receptor 2 in mice. **Inflammation Research**, [S.L.], v. 69, n. 10, p. 1059-1070, 6 jul. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00011-020-01376-4>.

ASADUZZAMAN, M.; DAVIDSON, C.; NAHIRNEY, D.; FITEIH, Y.; PUTTAGUNTA, L.; VLIAGOFTIS, H.. Proteinase-activated receptor-2 blockade inhibits changes seen in a chronic murine asthma model. **Allergy**, [S.L.], v. 73, n. 2, p. 416-420, 11 out. 2017. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/all.13313>.

ATRI, Chiraz; GUERFALI, Fatma; LAOUINI, Dhafer. Role of Human Macrophage Polarization in Inflammation during Infectious Diseases. **International Journal Of Molecular Sciences**, [S.L.], v. 19, n. 6, p. 1-15, 19 jun. 2018. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms19061801>.

BANFI, C.; BRIOSCHI, M.; BARBIERI, S. S.; ELIGINI, S.; BARCELLA, S.; TREMOLI, E.; COLLI, S.; MUSSONI, L.. Mitochondrial reactive oxygen species: a common pathway for par1- and par2-mediated tissue factor induction in human endothelial cells. **Journal Of Thrombosis And Haemostasis**, [S.L.], v. 7, n. 1, p. 206-216, jan. 2009. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1538-7836.2008.03204.x>.

BAO, Yanju; GAO, Yebo; YANG, Liping; KONG, Xiangying; ZHENG, Honggang; HOU, Wei; HUA, Baojin. New insights into protease-activated receptor 4 signaling pathways in the pathogenesis of inflammation and neuropathic pain: a literature review. **Channels**, [S.L.], v. 9, n. 1, p. 5-13, 2 jan. 2015. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.4161/19336950.2014.995001>.

BARRY, Grant D.; SUEN, Jacky Y.; LE, Giang T.; COTTERELL, Adam; REID, Robert C.; FAIRLIE, David P.. Novel Agonists and Antagonists for Human Protease Activated Receptor 2. **Journal Of Medicinal Chemistry**, [S.L.], v. 53, n. 20, p. 7428-7440, 28 out. 2010. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/jm100984y>.

BIAN, Hongjun; LI, Feifei; WANG, Wenwen; ZHAO, Qi; GAO, Shanshan; MA, Jincai; LI, Xiao; REN, Wanhua; QIN, Chengyong; QI, Jianni. MAPK/p38 regulation of cytoskeleton rearrangement accelerates induction of macrophage activation by TLR4, but not TLR3. **International Journal Of Molecular Medicine**, [S.L.], v. 40, n. 5, p. 1495-1503, 19 set. 2017. Spandidos Publications. <http://dx.doi.org/10.3892/ijmm.2017.3143>.

BIANCONI, Vanessa; SAHEBKAR, Amirhossein; ATKIN, Stephen L.; PIRRO, Matteo. The regulation and importance of monocyte chemoattractant protein-1. **Current Opinion In Hematology**, [S.L.], v. 25, n. 1, p. 44-51, jan. 2018. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1097/moh.0000000000000389>.

BOGDAN, Christian. Nitric oxide synthase in innate and adaptive immunity: an update. **Trends In Immunology**, [s.l.], v. 36, n. 3, p.161-178, mar. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.it.2015.01.003>.

BOLTON, Sarah J.; MCNULTY, Clare A.; THOMAS, Rebecca J.; HEWITT, Colin R. A.; WARDLAW, Andrew J.. Expression of and functional responses to protease-activated receptors on human eosinophils. **Journal Of Leukocyte Biology**, [S.L.], v. 74, n. 1, p. 60-68, 22 maio 2003. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1189/jlb.0702351>.

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**, [S.L.], v. 86, n. 4, p. 224-230, 2010. S. Karger AG. <http://dx.doi.org/10.1159/000319751>.

BUCCI, M; VELLECCO, V; HARRINGTON, L; BRANCALEONE, V; ROVIEZZO, F; RASO, G Mattace; A IANARO.; LUNGARELLA, G; PALMA, R de; MELI, R. Cross-talk between toll-like receptor 4 (TLR4) and proteinase-activated receptor 2 (PAR2) is involved in vascular function. **British Journal Of Pharmacology**, [S.L.], v. 168, n. 2, p. 411-420, 20 dez. 2012. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1476-5381.2012.02205.x>.

CASSADO, Alexandra dos Anjos; LIMA, Maria Regina Dâ€™Impã©Rio; BORTOLUCI, Karina Ramalho. Revisiting Mouse Peritoneal Macrophages: heterogeneity, development, and function. **Frontiers In Immunology**, [S.L.], v. 6, p. 1-9, 19 maio 2015. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2015.00225>.

CATTARUZZA, F; AMADESI, S; CARLSSON, J F; MURPHY, J e; LYO, V; KIRKWOOD, K; COTTRELL, G s; BOGYO, M; KNECHT, W; BUNNETT, N W. Serine proteases and protease-activated receptor 2 mediate the proinflammatory and algescic actions of diverse

stimulants. **British Journal Of Pharmacology**, [S.L.], v. 171, n. 16, p. 3814-3826, 25 jul. 2014. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/bph.12738>.

CHAO, Hung-Hsing; CHEN, Po-Yuan; HAO, Wen-Rui; CHIANG, Wei-Ping; CHENG, Tzu-Hurng; LOH, Shih-Hurng; LEUNG, Yuk-Man; LIU, Ju-Chi; CHEN, Jin-Jer; SUNG, Li-Chin. Lipopolysaccharide pretreatment increases protease-activated receptor-2 expression and monocyte chemoattractant protein-1 secretion in vascular endothelial cells. **Journal Of Biomedical Science**, [S.L.], v. 24, n. 1, p. 1-12, 15 nov. 2017. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s12929-017-0393-1>.

CHEN, Liang; GAO, Beiyao; ZHANG, Yadong; LU, Hanyu; LI, Xiaobo; PAN, Luanfeng; YIN, Lianhua; ZHI, Xiuling. PAR2 promotes M1 macrophage polarization and inflammation via FOXO1 pathway. **Journal Of Cellular Biochemistry**, [S.L.], v. 120, n. 6, p. 9799-9809, 14 dez. 2018. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/jcb.28260>.

COELHO, Anne-Marie; OSSOVSKAYA, Valeria; BUNNETT, Nigel. Proteinase-Activated Receptor-2: physiological and pathophysiological roles. **Current Medicinal Chemistry-Cardiovascular & Hematological Agents**, [S.L.], v. 1, n. 1, p. 61-72, 1 mar. 2003. Bentham Science Publishers Ltd.. <http://dx.doi.org/10.2174/1568016033356715>.

COLOGNATO, Renato; SLUPSKY, Joseph R.; JENDRACH, Marina; BURYSEK, Ladislav; SYROVETS, Tatiana; SIMMET, Thomas. Differential expression and regulation of protease-activated receptors in human peripheral monocytes and monocyte-derived antigen-presenting cells. **Blood**, [S.L.], v. 102, n. 7, p. 2645-2652, 1 out. 2003. American Society of Hematology. <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2002-08-2497>.

CORVERA, C; DÉRY, O; MCCONALOGUE, K; BÖHM, S K; KHITIN, L M; CAUGHEY, G H; PAYAN, D G; BUNNETT, N W. Mast cell tryptase regulates rat colonic myocytes through proteinase-activated receptor 2. **Journal Of Clinical Investigation**, [S.L.], v. 100, n. 6, p. 1383-1393, 15 set. 1997. American Society for Clinical Investigation. <http://dx.doi.org/10.1172/jci119658>.

COUGHLIN, Shaun R. Thrombin signalling and protease-activated receptors. **Nature**, [s.l.], v. 407, n. 6801, p.258-264, set. 2000. Springer Nature America, Inc. <http://dx.doi.org/10.1038/35025229>.

DÉRY, Olivier; THOMA, Mark S.; WONG, Helen; GRADY, Eileen F.; BUNNETT, Nigel W.. Trafficking of Proteinase-activated Receptor-2 and β -Arrestin-1 Tagged with Green Fluorescent Protein. **Journal Of Biological Chemistry**, [S.L.], v. 274, n. 26, p. 18524-18535, jun. 1999. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.274.26.18524>.

DINARELLO, Charles A.. Overview of the IL-1 family in innate inflammation and acquired immunity. **Immunological Reviews**, [S.L.], v. 281, n. 1, p. 8-27, 16 dez. 2017. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/imr.12621>.

DORRINGTON, Michael G.; FRASER, Iain D. C.. NF- κ B Signaling in Macrophages: dynamics, crosstalk, and signal integration. **Frontiers In Immunology**, [S.L.], v. 10, p. 1-12, 9 abr. 2019. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2019.00705>.

DOSSANG, Anthony C. G.; MOTSHWENE, Precious G.; YANG, Yang; SYMMONS, Martyn F.; BRYANT, Clare E.; BORMAN, Satty; GEORGE, Julie; WEBER, Alexander N. R.; GAY, Nicholas J.. The N-terminal loop of IRAK-4 death domain regulates ordered assembly of the Myddosome signalling scaffold. **Scientific Reports**, [S.L.], v. 6, n. 1, p. 269-277, 23 nov. 2016. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/srep37267>.

DULON, Sophie; LEDUC, Dominique; COTTRELL, Graeme S.; D'ALAYER, Jacques; HANSEN, Kristina K.; BUNNETT, Nigel W.; HOLLENBERG, Morley D.; PIDARD, Dominique; CHIGNARD, Michel. Pseudomonas aeruginosa Elastase Disables Proteinase-Activated Receptor 2 in Respiratory Epithelial Cells. **American Journal Of Respiratory Cell And Molecular Biology**, [S.L.], v. 32, n. 5, p. 411-419, maio 2005. American Thoracic Society. <http://dx.doi.org/10.1165/rcmb.2004-0274oc>.

EFTEKHARI, Rahil; LIMA, Stacy G. de; LIU, Yu; MIHARA, Koichiro; SAIFEDDINE, Mahmoud; NOORBAKHS, Farshid; SCARISBRICK, Isobel A.; HOLLENBERG, Morley D.. Microenvironment proteinases, proteinase-activated receptor regulation, cancer and inflammation. **Biological Chemistry**, [S.L.], v. 399, n. 9, p. 1023-1039, 25 set. 2018. Walter de Gruyter GmbH. <http://dx.doi.org/10.1515/hsz-2018-0001>

EPELMAN, Slava; LAVINE, Kory J.; RANDOLPH, Gwendalyn J.. Origin and Functions of Tissue Macrophages. **Immunity**, [S.L.], v. 41, n. 1, p. 21-35, jul. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2014.06.013>.

ERRIDGE, Clett. Endogenous ligands of TLR2 and TLR4: agonists or assistants?. **Journal Of Leukocyte Biology**, [S.L.], v. 87, n. 6, p. 989-999, 23 fev. 2010. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1189/jlb.1209775>.

FANG, Weishan; BI, Decheng; ZHENG, Ruijin; CAI, Nan; XU, Hong; ZHOU, Rui; LU, Jun; WAN, Min; XU, Xu. Identification and activation of TLR4-mediated signalling pathways by alginate-derived guluronate oligosaccharide in RAW264.7 macrophages. **Scientific Reports**, [S.L.], v. 7, n. 1, p. 1-13, 10 maio 2017. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-01868-0>.

FELD, Micha; SHPACOVITCH, Victoria; EHRHARDT, Christina; FASTRICH, Michaela; GOERGE, Tobias; LUDWIG, Stephan; STEINHOFF, Martin. Proteinase-Activated Receptor-2 Agonist Activates Anti-Influenza Mechanisms and Modulates IFN γ -Induced Antiviral Pathways in Human Neutrophils. **Biomed Research International**, [S.L.], v. 2013, p. 1-10, 2013. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/879080>.

FERRER-SUETA, Gerardo; CAMPOLO, Nicolás; TRUJILLO, Madia; BARTESAGHI, Silvina; CARBALLAL, Sebastián; ROMERO, Natalia; ALVAREZ, Beatriz; RADI, Rafael. Biochemistry of Peroxynitrite and Protein Tyrosine Nitration. **Chemical Reviews**, [S.L.], v. 118, n. 3, p. 1338-1408, 5 fev. 2018. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00568>.

FORMAN, Henry Jay; TORRES, Martine. Reactive Oxygen Species and Cell Signaling. **American Journal Of Respiratory And Critical Care Medicine**, [s.l.], v. 166, n. 12, p.4-8, 15 dez. 2002. American Thoracic Society. <http://dx.doi.org/10.1164/rccm.2206007>.
FORRESTER, Steven J.; KIKUCHI, Daniel S.; HERNANDES, Marina S.; XU, Qian; GRIENGLING, Kathy K.. Reactive Oxygen Species in Metabolic and Inflammatory

Signaling. **Circulation Research**, [S.L.], v. 122, n. 6, p. 877-902, 16 mar. 2018. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1161/circresaha.117.311401>.

FREEMAN, Spencer A.; GRINSTEIN, Sergio. Phagocytosis: receptors, signal integration, and the cytoskeleton. **Immunological Reviews**, [S.L.], v. 262, n. 1, p. 193-215, 15 out. 2014. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/imr.12212>.

FUENTES, Ana-Lucía; MILLIS, Leonard; VAPENIK, Jacqueline; SIGOLA, Lynette. Lipopolysaccharide-mediated enhancement of zymosan phagocytosis by RAW 264.7 macrophages is independent of opsonins, laminarin, mannan, and complement receptor 3. **Journal Of Surgical Research**, [S.L.], v. 189, n. 2, p. 304-312, jun. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jss.2014.03.024>.

FUJIWARA, Nagatoshi; KOBAYASHI, Kazuo. Macrophages in Inflammation. **Current Drug Target -Inflammation& Allergy**, [S.L.], v. 4, n. 3, p. 281-286, 1 jun. 2005. Bentham Science Publishers Ltd.. <http://dx.doi.org/10.2174/1568010054022024>.

GIESELER, Frank; UNGEFROREN, Hendrik; SETTMACHER, Utz; HOLLENBERG, Morley D; KAUFMANN, Roland. Proteinase-activated receptors (PARs) – focus on receptor-receptor-interactions and their physiological and pathophysiological impact. **Cell Communication And Signaling**, [S.L.], v. 11, n. 1, p. 1-26, 2013. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/1478-811x-11-86>.

GINHOUX, Florent; GUILLIAMS, Martin. Tissue-Resident Macrophage Ontogeny and Homeostasis. **Immunity**, [s. l], v. 44, n. 3, p. 439-449, mar. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2016.02.024>.

GLEESON, E. M.; O'DONNELL, J. S.; HAMS, E.; AINLE, F. N.; KENNY, B.-A.; FALLON, P. G.; PRESTON, R. J. S.. Activated factor X signaling via protease-activated receptor 2 suppresses pro-inflammatory cytokine production from lipopolysaccharide-stimulated myeloid cells. **Haematologica**, [S.L.], v. 99, n. 1, p. 185-193, 19 jul. 2013. Ferrata Storti Foundation (Haematologica). <http://dx.doi.org/10.3324/haematol.2013.086918>.

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**, [S.L.], v. 89, n. 5-6, p. 275-282, 2012. S. Karger AG. <http://dx.doi.org/10.1159/000337378>.

GORDON, Siamon. Phagocytosis: an immunobiologic process. **Immunity**, [S.L.], v. 44, n. 3, p. 463-475, mar. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2016.02.026>.

GORDON, Siamon. Phagocytosis: the legacy of metchnikoff. **Cell**, [S.L.], v. 166, n. 5, p. 1065-1068, ago. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2016.08.017>.

GORDON, Siamon; MARTINEZ-POMARES, Luisa. Physiological roles of macrophages. **Pflügers Archiv - European Journal Of Physiology**, [S.L.], v. 469, n. 3-4, p. 365-374, 9 fev. 2017. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00424-017-1945-7>.

GORDON, Siamon; PLÜDDEMANN, Annette; ESTRADA, Fernando Martinez. Macrophage heterogeneity in tissues: phenotypic diversity and functions. **Immunological Reviews**, [s.l.], v. 262, n. 1, p.36-55, 15 out. 2014. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/imr.12223>.

GREEN, Laura C.; WAGNER, David A.; GLOGOWSKI, Joseph; SKIPPER, Paul L.; WISHNOK, John S.; TANNENBAUM, Steven R.. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. **Analytical Biochemistry**, [S.L.], v. 126, n. 1, p. 131-138, out. 1982. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697\(82\)90118-x](http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697(82)90118-x).

GUIMARÃES, Erika; MACHADO, Rodrigo; FONSECA, Matheus de Castro; FRANÇA, Andressa; CARVALHO, Clarissa; SILVA, Ana Cândida Araújo e; ALMEIDA, Brígida; CASSINI, Puebla; HISSA, Bárbara; DRUMOND, Luciana; GONÇALVES, Carlos; FERNANDES, Gabriel; BROT, Marina; MORAES, Márcio; BARCELOS, Lucíola; ORTEGA, José Miguel; OLIVEIRA, André; LEITE, Maria Fátima. Inositol 1, 4, 5-trisphosphate-dependent nuclear calcium signals regulate angiogenesis and cell motility in triple negative breast cancer. **Plos One**, [S.L.], v. 12, n. 4, p. 1-22, 4 abr. 2017. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0175041>.

HAILMAN, E; LICHENSTEIN, H s; WURFEL, M M; MILLER, D s; A JOHNSON, D; KELLEY, M; A BUSSE, L; ZUKOWSKI, M M; WRIGHT, S D. Lipopolysaccharide (LPS)-binding protein accelerates the binding of LPS to CD14. **Journal Of Experimental Medicine**, [S.L.], v. 179, n. 1, p. 269-277, 1 jan. 1994. Rockefeller University Press. <http://dx.doi.org/10.1084/jem.179.1.269>.

HAMILTON, Justin R.; TREJO, Joann. Challenges and Opportunities in Protease-Activated Receptor Drug Development. **Annual Review Of Pharmacology And Toxicology**, [S.L.], v. 57, n. 1, p. 349-373, 6 jan. 2017. Annual Reviews. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-011613-140016>.

HANSEN, K. K.; SHERMAN, P. M.; CELLARS, L.; ANDRADE-GORDON, P.; PAN, Z.; BARUCH, A.; WALLACE, J. L.; HOLLENBERG, M. D.; VERGNOLLE, N.. A major role for proteolytic activity and proteinase-activated receptor-2 in the pathogenesis of infectious colitis. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [S.L.], v. 102, n. 23, p. 8363-8368, 26 maio 2005. Proceedings of the National Academy of Sciences. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0409535102>.

HEUBERGER, Dorothea M.; SCHUEPBACH, Reto A.. Protease-activated receptors (PARs): mechanisms of action and potential therapeutic modulators in par-driven inflammatory diseases. **Thrombosis Journal**, [S.L.], v. 17, n. 1, p. 1-24, 29 mar. 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s12959-019-0194-8>.

HIRAYAMA, Daisuke; IIDA, Tomoya; NAKASE, Hiroshi. The Phagocytic Function of Macrophage-Enforcing Innate Immunity and Tissue Homeostasis. **International Journal Of Molecular Sciences**, [S.L.], v. 19, n. 1, p. 1-14, 29 dez. 2017. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms19010092>.

HOEFFEL, Guillaume; GINHOUX, Florent. Fetal monocytes and the origins of tissue-resident macrophages. **Cellular Immunology**, [S.L.], v. 330, p. 5-15, ago. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cellimm.2018.01.001>.

HOLLENBERG, M D; MIHARA, K; POLLEY, D; SUEN, J y; A HAN,; FAIRLIE, D P; RAMACHANDRAN, R. Biased signalling and proteinase-activated receptors (PARs): targeting inflammatory disease. **British Journal Of Pharmacology**, [S.L.], v. 171, n. 5, p. 1180-1194, 27 fev. 2014. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/bph.12544>.

HOLLENBERG, M. D.; COMPTON, S. J. International Union of Pharmacology. XXVIII. Proteinase-Activated Receptors. **Pharmacological Reviews**, [s.l.], v. 54, n. 2, p.203-217, 1 jun. 2002. American Society for Pharmacology & Experimental Therapeutics (ASPET). <http://dx.doi.org/10.1124/pr.54.2.203>.

HOLZHAUSEN, Marinella; SPOLIDORIO, Luis Carlos; ELLEN, Richard P.; JOBIN, Marie-Claude; STEINHOFF, Martin; ANDRADE-GORDON, Patricia; VERGNOLLE, Nathalie. Protease-Activated Receptor-2 Activation. **The American Journal Of Pathology**, [S.L.], v. 168, n. 4, p. 1189-1199, abr. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.2353/ajpath.2006.050658>.

HUME, David A.. The Many Alternative Faces of Macrophage Activation. **Frontiers In Immunology**, [S.L.], v. 6, p. 1-10, 22 jul. 2015. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2015.00370>

HUME, David A.; IRVINE, Katharine M.; PRIDANS, Clare. The Mononuclear Phagocyte System: the relationship between monocytes and macrophages. **Trends In Immunology**, [S.L.], v. 40, n. 2, p. 98-112, fev. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.it.2018.11.007>.

ISHIHARA, Hiroaki; CONNOLLY, Andrew J.; ZENG, Dewan; KAHN, Mark L.; ZHENG, Yao Wu; TIMMONS, Courtney; TRAM, Tracy; COUGHLIN, Shaun R.. Protease-activated receptor 3 is a second thrombin receptor in humans. **Nature**, [S.L.], v. 386, n. 6624, p. 502-506, abr. 1997. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/386502a0>.

IWASAKI, Akiko; MEDZHITOV, Ruslan. Control of adaptive immunity by the innate immune system. **Nature Immunology**, [S.L.], v. 16, n. 4, p. 343-353, 19 mar. 2015. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/ni.3123>.

KAHN, Mark L.; ZHENG, Yao-Wu; HUANG, Wei; BIGORNIA, Violeta; ZENG, Dewan; MOFF, Stephen; FARESE, Robert V.; TAM, Carmen; COUGHLIN, Shaun R.. A dual thrombin receptor system for platelet activation. **Nature**, [S.L.], v. 394, n. 6694, p. 690-694, ago. 1998. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/29325>.

KARLSTAD, Jordan; SUN, Yuyang; SINGH, Brij B.. Ca²⁺ Signaling: an outlook on the characterization of ca²⁺ channels and their importance in cellular functions. **Advances In Experimental Medicine And Biology**, [S.L.], p. 143-157, 2012. Springer Netherlands. http://dx.doi.org/10.1007/978-94-007-2888-2_6.

KAWAI, Taro; AKIRA, Shizuo. Signaling to NF-κB by Toll-like receptors. **Trends In Molecular Medicine**, [S.L.], v. 13, n. 11, p. 460-469, nov. 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molmed.2007.09.002>.

KHOUFACHE, Khaled; LÉBOUDER, Fanny; MORELLO, Eric; LAURENT, Fabrice; RIFFAULT, Sabine; ANDRADE-GORDON, Patricia; BOULLIER, Severine; ROUSSET, Perrine; VERGNOLLE, Nathalie; RITEAU, Béatrice. Protective Role for Protease-Activated Receptor-2 against Influenza Virus Pathogenesis via an IFN-γ-Dependent Pathway. **The**

Journal Of Immunology, [S.L.], v. 182, n. 12, p. 7795-7802, 3 jun. 2009. The American Association of Immunologists. <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.0803743>.

KIDA, Yutaka; INOUE, Hiroyoshi; SHIMIZU, Takashi; KUWANO, Koichi. Serratia marcescens Serralyisin Induces Inflammatory Responses through Protease-Activated Receptor 2. **Infection And Immunity**, [S.L.], v. 75, n. 1, p. 164-174, 16 out. 2006. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/iai.01239-06>.

KIM, Ha-Jung; LEE, Seung-Hwa; JEONG, Sekyoo; HONG, Soo-Jong. Protease-Activated Receptors 2-Antagonist Suppresses Asthma by Inhibiting Reactive Oxygen Species-Thymic Stromal Lymphopoietin Inflammation and Epithelial Tight Junction Degradation. **Allergy, Asthma & Immunology Research**, [S.L.], v. 11, n. 4, p. 560-571, 2019. The Korean Academy of Asthma, Allergy and Clinical Immunology and The Korean Academy of Pediatric Al. <http://dx.doi.org/10.4168/aair.2019.11.4.560>.

KUZMICH, Nikolay; SIVAK, Konstantin; CHUBAREV, Vladimir; POROZOV, Yuri; SAVATEEVA-LYUBIMOVA, Tatiana; PERI, Francesco. TLR4 Signaling Pathway Modulators as Potential Therapeutics in Inflammation and Sepsis. **Vaccines**, [S.L.], v. 5, n. 4, p. 5-34, 4 out. 2017. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/vaccines5040034>.

LEE, Martin; REY, Kevin; BESLER, Katrina; WANG, Christine; CHOY, Jonathan. Immunobiology of Nitric Oxide and Regulation of Inducible Nitric Oxide Synthase. **Results And Problems In Cell Differentiation**, [S.L.], p. 181-207, 2017. Springer International Publishing. http://dx.doi.org/10.1007/978-3-319-54090-0_8.

LEGER, Andrew J.; JACQUES, Suzanne L.; BADAR, Jehangir; KANEIDER, Nicole C.; DERIAN, Claudia K.; ANDRADE-GORDON, Patricia; COVIC, Lidija; KULIOPULOS, Athan. Blocking the Protease-Activated Receptor 1-4 Heterodimer in Platelet-Mediated Thrombosis. **Circulation**, [S.L.], v. 113, n. 9, p. 1244-1254, 7 mar. 2006. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1161/circulationaha.105.587758>.

LI, Yong Ming; BAVIELLO, George; VLASSARA, Helen; MITSUHASHI, Tomoko. Glycation products in aged thioglycollate medium enhance the elicitation of peritoneal macrophages. **Journal Of Immunological Methods**, [S.L.], v. 201, n. 2, p. 183-188, fev. 1997. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0022-1759\(96\)00224-4](http://dx.doi.org/10.1016/s0022-1759(96)00224-4).

LIN, Chen-Chun; SHIH, Chung-Huang; YANG, You-Lan; BIEN, Mauo-Ying; LIN, Chien-Huang; YU, Ming-Chih; SURESHBABU, Munisamy; CHEN, Bing-Chang. Thrombin induces inducible nitric oxide synthase expression via the MAPK, MSK1, and NF- κ B signaling pathways in alveolar macrophages. **European Journal Of Pharmacology**, [S.L.], v. 672, n. 1-3, p. 180-187, dez. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2011.10.005>.

LIN, Huilan; LIU, Allen P.; SMITH, Thomas H.; TREJO, Joann. Cofactoring and Dimerization of Proteinase-Activated Receptors. **Pharmacological Reviews**, [S.L.], v. 65, n. 4, p. 1198-1213, 24 set. 2013. American Society for Pharmacology & Experimental Therapeutics (ASPET). <http://dx.doi.org/10.1124/pr.111.004747>.

LIU, Ting; ZHANG, Lingyun; JOO, Donghyun; SUN, Shao-Cong. NF- κ B signaling in inflammation. **Signal Transduction And Targeted Therapy**, [S.L.], v. 2, n. 1, p. 1-9, 14 jul. 2017. Springer Science and Business Media LLC.

LOHMAN, Rink-Jan; COTTERELL, Adam J.; BARRY, Grant D.; LIU, Ligong; SUEN, Jacky Y.; VESEY, David A.; FAIRLIE, David P.. An antagonist of human protease activated receptor-2 attenuates PAR2 signaling, macrophage activation, mast cell degranulation, and collagen-induced arthritis in rats. **The FASEB Journal**, [S.L.], v. 26, n. 7, p. 2877-2887, 30 mar. 2012. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1096/fj.11-201004>.

LOURBAKOS, Afrodite; CHINNI, Carla; THOMPSON, Philip; POTEPA, Jan; TRAVIS, James; MACKIE, Eleanor J; PIKE, Robert N. Cleavage and activation of proteinase-activated receptor-2 on human neutrophils by gingipain-R from *Porphyromonas gingivalis*. **FEBS Letters**, [S.L.], v. 435, n. 1, p. 45-48, 11 set. 1998. Wiley. [http://dx.doi.org/10.1016/s0014-5793\(98\)01036-9](http://dx.doi.org/10.1016/s0014-5793(98)01036-9).

LOWRY, O. H; ROSEBROUGH, N. J; FARR, A. L; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of biological chemistry**, v.193, n. 1, 265–275, nov.1951.

MACFARLANE, S. R; SEATTER, M. J; KANKE, Toru; HUNTER, G.D & Plevin, R. Proteinase-activated receptors. **Pharmacological Reviews**, [s.l.], v. 53, n. 2, p.245–282. 2001.

MACFARLANE, Scott R; SLOSS, Callum M; CAMERON, Pamela; KANKE, Toru; MCKENZIE, Roderick C; PLEVIN, Robin. The role of intracellular Ca²⁺ in the regulation of proteinase-activated receptor-2 mediated nuclear factor kappa B signalling in keratinocytes. **British Journal Of Pharmacology**, [S.L.], v. 145, n. 4, p. 535-544, jun. 2005. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.bjp.0706204>.

MACMICKING, John; XIE, Qiao-wen; NATHAN, Carl. NITRIC OXIDE AND MACROPHAGE FUNCTION. **Annual Review Of Immunology**, [s.l.], v. 15, n. 1, p.323-350, abr. 1997. Annual Reviews. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.immunol.15.1.323>.

MAO, Yingyu; FINNEMANN, Silvia C. Regulation of phagocytosis by Rho GTPases. **Small Gtpases**, [S.L.], v. 6, n. 2, p. 89-99, 3 abr. 2015. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.4161/21541248.2014.989785>.

MARTINEZ, Fernando O.; GORDON, Siamon. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. **F1000Prime Reports**, [S.L.], v. 6, p. 1-13, 3 mar. 2014. Faculty Opinions Ltd. <http://dx.doi.org/10.12703/p6-13>.

MATOS, Natália A.; SILVA, Josiane F.; DAMASCENO, Karine A.; CASSALI, Geovanni D.; LEMOS, Virginia S.; DUARTE, Igor D.G.; KLEIN, André. Proteinase-activated receptor 2 blockade impairs CCL11- or allergen-induced eosinophil recruitment in experimental pleurisy. **European Journal Of Pharmacology**, [S.L.], v. 740, p. 627-633, out. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2014.06.018>.

MATOS, Natália A.; SILVA, Josiane F.; MATSUI, Tamires C.; DAMASCENO, Karine A.; DUARTE, Igor D. G.; LEMOS, Virginia S.; CASSALI, Geovanni D.; KLEIN, André. Mast Cell Tryptase Induces Eosinophil Recruitment in the Pleural Cavity of Mice via Proteinase-Activated Receptor 2. **Inflammation**, [S.L.], v. 36, n. 6, p. 1260-1267, 9 jun. 2013. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s10753-013-9664-5>.

MCCOY, K. L.; TRAYNELIS, S. F.; HEPLER, J. R. PAR1 and PAR2 Couple to Overlapping and Distinct Sets of G Proteins and Linked Signaling Pathways to Differentially Regulate Cell Physiology. **Molecular Pharmacology**, [s.l.], v. 77, n. 6, p.1005-1015, 9 mar. 2010. American Society for Pharmacology & Experimental Therapeutics (ASPET). <http://dx.doi.org/10.1124/mol.109.062018>.

MCCULLOCH, Kendal; MCGRATH, Sarah; HUESA, Carmen; DUNNING, Lynette; LITHERLAND, Gary; CRILLY, Anne; HULTIN, Leif; FERRELL, William R.; LOCKHART, John C.; GOODYEAR, Carl S.. Rheumatic Disease: protease-activated receptor-2 in synovial joint pathobiology. **Frontiers In Endocrinology**, [S.L.], v. 9, p. 1-7, 23 maio 2018. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fendo.2018.00257>.

MEDZHITOV, Ruslan. Inflammation 2010: new adventures of an old flame. **Cell**, [S.L.], v. 140, n. 6, p. 771-776, mar. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2010.03.006>

MIHARA, Koichiro; RAMACHANDRAN, Rithwik; SAIFEDDINE, Mahmoud; HANSEN, Kristina K.; RENAUX, Bernard; POLLEY, Danny; GIBSON, Stacy; VANDERBOOR, Christina; HOLLENBERG, Morley D.. Thrombin-Mediated Direct Activation of Proteinase-Activated Receptor-2: another target for thrombin signaling. **Molecular Pharmacology**, [S.L.], v. 89, n. 5, p. 606-614, 8 mar. 2016. American Society for Pharmacology & Experimental Therapeutics (ASPET). <http://dx.doi.org/10.1124/mol.115.102723>.

MITCHELL, Simon; VARGAS, Jesse; HOFFMANN, Alexander. Signaling via the NFκB system. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine**, [S.L.], v. 8, n. 3, p. 227-241, 16 mar. 2016. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/wsbm.1331>.

MORAES, Theo J.; MARTIN, Raiza; PLUMB, Jonathan D.; VACHON, Eric; CAMERON, Cheryl M.; DANESH, Ali; KELVIN, David J.; RUF, Wolfram; DOWNEY, Gregory P.. Role of PAR2 in murine pulmonary pseudomonas infection. **American Journal Of Physiology-Lung Cellular And Molecular Physiology**, [S.L.], v. 294, n. 2, p. 368-377, fev. 2008. American Physiological Society. <http://dx.doi.org/10.1152/ajplung.00036.2007>.

MORETTI, S; BELLOCCHIO, S; BONIFAZI, P; BOZZA, S; ZELANTE, T; BISTONI, F; ROMANI, L. The contribution of PARs to inflammation and immunity to fungi. **Mucosal Immunology**, [S.L.], v. 1, n. 2, p. 156-168, 9 jan. 2008. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/mi.2007.13>.

MROZKOVA, P.; PALECEK, J.; SPICAROVA, D.. The Role of Protease-Activated Receptor Type 2 in Nociceptive Signaling and Pain. **Physiological Research**, [S.L.], p. 357-367, 14 jun. 2016. Institute of Physiology of the Czech Academy of Sciences. <http://dx.doi.org/10.33549/physiolres.933269>.

MURRAY, Peter J.. Macrophage Polarization. **Annual Review Of Physiology**, [S.L.], v. 79, n. 1, p. 541-566, 10 fev. 2017. Annual Reviews. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-physiol-022516-034339>.

NAKANISHI-MATSUI, Mayumi; ZHENG, Yao-Wu; SULCINER, David J.; WEISS, Ethan J.; LUDEMAN, Matthew J.; COUGHLIN, Shaun R.. PAR3 is a cofactor for PAR4 activation by thrombin. **Nature**, [S.L.], v. 404, n. 6778, p. 609-613, abr. 2000. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/35007085>.

NEWBY, Andrew C.. Metalloproteinase production from macrophages - a perfect storm leading to atherosclerotic plaque rupture and myocardial infarction. **Experimental Physiology**, [S.L.], v. 101, n. 11, p. 1327-1337, 5 maio 2016. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1113/ep085567>.

NHU, Q M; SHIREY, K; TEIJARO, J R; FARBER, D L; NETZEL-ARNETT, S; ANTALIS, T M; A FASANO,; VOGEL, S N. Novel signaling interactions between proteinase-activated receptor 2 and Toll-like receptors in vitro and in vivo. **Mucosal Immunology**, [S.L.], v. 3, n. 1, p. 29-39, 28 out. 2009. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/mi.2009.120>.

NHU, Quan M; SHIREY, Kari Ann; PENNINI, Meghan e; STILTZ, Jennifer; VOGEL, Stefanie N. Proteinase-activated receptor 2 activation promotes an anti-inflammatory and alternatively activated phenotype in LPS-stimulated murine macrophages. **Innate Immunity**, [S.L.], v. 18, n. 2, p. 193-203, 14 jan. 2011. SAGE Publications. <http://dx.doi.org/10.1177/1753425910395044>.

NIEMAN, M. T..Protease-activated receptors in hemostasis. **Blood**, [s.l.], v. 128, n. 2, p.169-177, 28 abr. 2016.American Society of Hematology.<http://dx.doi.org/10.1182/blood-2015-11-636472>.

NYSTEDT, S.; EMILSSON, K.; WAHLESTEDT, C.; SUNDELIN, J.. Molecular cloning of a potential proteinase activated receptor. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [S.L.], v. 91, n. 20, p. 9208-9212, 27 set. 1994. Proceedings of the National Academy of Sciences. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.91.20.9208>.

OKABE, Yasutaka; MEDZHITOV, Ruslan. Tissue biology perspective on macrophages. **Nature Immunology**, [S.L.], v. 17, n. 1, p. 9-17, 17 dez. 2015. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/ni.3320>.

ORECCHIONI, Marco; GHOSHEH, Yanal; PRAMOD, Akula Bala; LEY, Klaus. Corrigendum: macrophage polarization. **Frontiers In Immunology**, [S.L.], v. 11, p. 1-14, 25 fev. 2020. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2020.00234>.

OSSOVSKAYA, Valeria S.; BUNNETT, Nigel W.. Protease-Activated Receptors: Contribution to Physiology and Disease. **Physiological Reviews**, [s.l.], v. 84, n. 2, p.579-621, abr. 2004.American Physiological Society.<http://dx.doi.org/10.1152/physrev.00028.2003>.

PARAMESWARAN, Narayanan; PATIAL, Sonika. Tumor Necrosis Factor- α Signaling in Macrophages. **Critical Reviews™ In Eukaryotic Gene Expression**, [S.L.], v. 20, n. 2, p. 87-103, 2010. Begell House. <http://dx.doi.org/10.1615/critreueukargeneexpr.v20.i2.10>.

PAUWELS, Anne-Marie; TROST, Matthias; BEYAERT, Rudi; HOFFMANN, Eik. Patterns, Receptors, and Signals: regulation of phagosome maturation. **Trends In Immunology**, [S.L.], v. 38, n. 6, p. 407-422, jun. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.it.2017.03.006>.

PEISELER, Moritz; KUBES, Paul. Macrophages play an essential role in trauma-induced sterile inflammation and tissue repair. **European Journal Of Trauma And Emergency Surgery**, [S.L.], v. 44, n. 3, p. 335-349, 17 abr. 2018. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00068-018-0956-1>.

PONTAROLLO, Giulia; MANN, Amrit; BRANDÃO, Inês; MALINARICH, Frano; SCHÖPF, Marie; REINHARDT, Christoph. Protease-activated receptor signaling in intestinal permeability regulation. **The Febs Journal**, [S.L.], v. 287, n. 4, p. 645-658, 23 set. 2019. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/febs.15055>.

POSMA, Jens J.; GROVER, Steven P.; HISADA, Yohei; OWENS, A. Phillip; ANTONIAK, Silvio; SPRONK, Henri M.; MACKMAN, Nigel. Roles of Coagulation Proteases and PARs (Protease-Activated Receptors) in Mouse Models of Inflammatory Diseases. **Arteriosclerosis, Thrombosis, And Vascular Biology**, [S.L.], v. 39, n. 1, p. 13-24, jan. 2019. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1161/atvbaha.118.311655>.

RADI, Rafael. Oxygen radicals, nitric oxide, and peroxynitrite: redox pathways in molecular medicine. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [S.L.], v. 115, n. 23, p. 5839-5848, 25 maio 2018. Proceedings of the National Academy of Sciences. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1804932115>.

RALLABHANDI, Prasad; NHU, Quan M.; TOSHCHAKOV, Vladimir Y.; PIAO, Wenji; MEDVEDEV, Andrei E.; HOLLENBERG, Morley D.; FASANO, Alessio; VOGEL, Stefanie N.. Analysis of Proteinase-activated Receptor 2 and TLR4 Signal Transduction. **Journal Of Biological Chemistry**, [S.L.], v. 283, n. 36, p. 24314-24325, set. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.m804800200>.

RAMACHANDRAN, R; HOLLENBERG, M D. Proteinases and signalling: pathophysiological and therapeutic implications via PARs and more. **British Journal Of Pharmacology**, [s.l.], v. 153, n. 1, p.263-282, 29 jan. 2009. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.bjp.0707507>.

RAMACHANDRAN, Rithwik; ALTIER, Christophe; OIKONOMOPOULOU, Katerina; HOLLENBERG, Morley D.. Proteinases, Their Extracellular Targets, and Inflammatory Signaling. **Pharmacological Reviews**, [S.L.], v. 68, n. 4, p. 1110-1142, 27 set. 2016. American Society for Pharmacology & Experimental Therapeutics (ASPET). <http://dx.doi.org/10.1124/pr.115.010991>.

RAMACHANDRAN, Rithwik; MIHARA, Koichiro; CHUNG, Hyunjae; RENAUX, Bernard; LAU, Chang S.; MURUVE, Daniel A.; DEFEA, Kathryn A.; BOUVIER, Michel; HOLLENBERG, Morley D.. Neutrophil Elastase Acts as a Biased Agonist for Proteinase-activated Receptor-2 (PAR2). **Journal Of Biological Chemistry**, [S.L.], v. 286, n. 28, p. 24638-24648, jul. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.m110.201988>.

RAMACHANDRAN, Rithwik; MIHARA, Koichiro; MATHUR, Maneesh; ROCHDI, Moulay Driss; BOUVIER, Michel; DEFEA, Kathryn; HOLLENBERG, Morley D.. Agonist-Biased Signaling via Proteinase Activated Receptor-2: differential activation of calcium and mitogen-activated protein kinase pathways. **Molecular Pharmacology**, [S.L.], v. 76, n. 4, p. 791-801, 15 jul. 2009. American Society for Pharmacology & Experimental Therapeutics (ASPET). <http://dx.doi.org/10.1124/mol.109.055509>.

RICKS, Tiffany K.; TREJO, Joann. Phosphorylation of Protease-activated Receptor-2 Differentially Regulates Desensitization and Internalization. **Journal Of Biological Chemistry**, [s.l.], v. 284, n. 49, p.34444-34457, 8 out. 2009. American Society for Biochemistry & Molecular Biology (ASBMB). <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.m109.048942>.

ROH, Jong Seong; SOHN, Dong Hyun. Damage-Associated Molecular Patterns in Inflammatory Diseases. **Immune Network**, [S.L.], v. 18, n. 4, p. 1-14, 2018. The Korean Association of Immunobiologists. <http://dx.doi.org/10.4110/in.2018.18.e27>.

ROSADINI, Charles V; KAGAN, Jonathan C. Early innate immune responses to bacterial LPS. **Current Opinion In Immunology**, [s.l.], v. 44, p.14-19, fev. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.coi.2016.10.005>.

ROSSOL, Manuela; HEINE, Holger; MEUSCH, Undine; QUANDT, Dagmar; KLEIN, Carina; SWEET, Matthew J.; HAUSCHILDT, Sunna. LPS-induced Cytokine Production in Human Monocytes and Macrophages. **Critical Reviews™ In Immunology**, [S.L.], v. 31, n. 5, p. 379-446, 2011. Begell House. <http://dx.doi.org/10.1615/critrevimmunol.v31.i5.20>.

ROTHMEIER, Andrea S.; RUF, Wolfram. Protease-activated receptor 2 signaling in inflammation. **Seminars In Immunopathology**, [S.L.], v. 34, n. 1, p. 133-149, 6 out. 2011. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00281-011-0289-1>.

SATOH, Takashi; AKIRA, Shizuo. Toll-Like Receptor Signaling and Its Inducible Proteins. **Myeloid Cells In Health And Disease**, [S.L.], p. 447-453, 1 jan. 2017. American Society of Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/microbiolspec.mchd-0040-2016>.

SCHMIDLIN, Fabien; AMADESI, Silvia; DABBAGH, Karim; LEWIS, David E.; KNOTT, Patrick; BUNNETT, Nigel W.; GATER, Paul R.; GEPPETTI, Pierangelo; BERTRAND, Claude; STEVENS, Mary E.. Protease-Activated Receptor 2 Mediates Eosinophil Infiltration and Hyperreactivity in Allergic Inflammation of the Airway. **The Journal Of Immunology**, [S.L.], v. 169, n. 9, p. 5315-5321, 1 nov. 2002. The American Association of Immunologists. <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.169.9.5315>.

SHAPOURI-MOGHADDAM, Abbas; MOHAMMADIAN, Saeed; VAZINI, Hossein; TAGHADOSI, Mahdi; ESMAEILI, Seyed-Alireza; MARDANI, Fatemeh; SEIFI, Bitia; MOHAMMADI, Asadollah; AFSHARI, Jalil T.; SAHEBKAR, Amirhossein. Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. **Journal Of Cellular Physiology**, [S.L.], v. 233, n. 9, p. 6425-6440, 1 mar. 2018. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/jcp.26429>.

SHARLOW, E R; PAINE, C. S; BABIARZ, L; EISINGER, M; SHAPIRO, S; SEIBERG, M. The protease-activated receptor-2 upregulates keratinocyte phagocytosis. **Journal of Cell Science**, [s.l.], v.113, n.17, p.3093-3101, aug. 2000.

SHPACOVITCH, V.; FELD, M.; HOLLENBERG, M. D.; LUGER, T. A.; STEINHOFF, M.. Role of protease-activated receptors in inflammatory responses, innate and adaptive immunity. **Journal Of Leukocyte Biology**, [S.L.], v. 83, n. 6, p. 1309-1322, 19 mar. 2008. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1189/jlb.0108001>.

SIGOLA, Lynette B.; FUENTES, Ana-Lucía; MILLIS, Leonard M.; VAPENIK, Jacqueline; MURIRA, Armstrong. Effects of Toll-like receptor ligands on RAW 264.7 macrophage morphology and zymosan phagocytosis. **Tissue And Cell**, [S.L.], v. 48, n. 4, p. 389-396, ago. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tice.2016.04.002>.

STALHEIM, Lisa; DING, Yu; GULLAPALLI, Anuradha; PAING, May M.; WOLFE, Breann L.; MORRIS, Dionne R.; TREJO, Joann. Multiple Independent Functions of Arrestins in the

Regulation of Protease-Activated Receptor-2 Signaling and Trafficking. **Molecular Pharmacology**, [S.L.], v. 67, n. 1, p. 78-87, 8 out. 2004. American Society for Pharmacology & Experimental Therapeutics (ASPET). <http://dx.doi.org/10.1124/mol.104.006072>.

STEINHOFF, Martin; BUDDENKOTTE, Jörg; SHPACOVITCH, Victoria; RATTENHOLL, Anke; MOORMANN, Corinna; VERGNOLLE, Nathalie; LUGER, Thomas A.; HOLLENBERG, Morley D.. Proteinase-Activated Receptors: transducers of proteinase-mediated signaling in inflammation and immune response. **Endocrine Reviews**, [S.L.], v. 26, n. 1, p. 1-43, fev. 2005. The Endocrine Society. <http://dx.doi.org/10.1210/er.2003-0025>.

STEVEN, Rachael; CRILLY, Anne; LOCKHART, John C; FERRELL, William R; MCINNES, Iain B. Proteinase-activated receptor-2 modulates human macrophage differentiation and effector function. **Innate Immunity**, [S.L.], v. 19, n. 6, p. 663-672, 19 abr. 2013. SAGE Publications. <http://dx.doi.org/10.1177/1753425913479984>.

ST-ONGE, Mireille; LAGARDE, Ste'phanie; LAFLAMME, Cynthia; ROLLET-LABELLE, Emmanuelle; MAROIS, Louis; NACCACHE, Paul H.; POULIOT, Marc. Proteinase-activated receptor-2 up-regulation by Fc γ -receptor activation in human neutrophils. **The FASEB Journal**, [S.L.], v. 24, n. 6, p. 2116-2125, 12 fev. 2010. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1096/fj.09-146167>.

SUN, Guo; STACEY, Martin A.; SCHMIDT, Matthias; MORI, Luca; MATTOLI, Sabrina. Interaction of Mite Allergens Der P3 and Der P9 with Protease-Activated Receptor-2 Expressed by Lung Epithelial Cells. **The Journal Of Immunology**, [S.L.], v. 167, n. 2, p. 1014-1021, 15 jul. 2001. The American Association of Immunologists. <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.167.2.1014>.

TAKEUCHI, Osamu; AKIRA, Shizuo. Pattern Recognition Receptors and Inflammation. **Cell**, [S.L.], v. 140, n. 6, p. 805-820, mar. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.022>.

TARASSISHIN, Leonid; BAUMAN, Avital; SUH, Hyeon-Sook; LEE, Sunhee C.. Anti-Viral and Anti-Inflammatory Mechanisms of the Innate Immune Transcription Factor Interferon Regulatory Factor 3: relevance to human CNS diseases. **Journal Of Neuroimmune Pharmacology**, [S.L.], v. 8, n. 1, p. 132-144, 10 jun. 2012. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s11481-012-9360-5>.

TARTEY, Sarang; TAKEUCHI, Osamu. Pathogen recognition and Toll-like receptor targeted therapeutics in innate immune cells. **International Reviews Of Immunology**, [S.L.], v. 36, n. 2, p. 57-73, 6 jan. 2017. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/08830185.2016.1261318>.

URIBE-QUEROL, Eileen; ROSALES, Carlos. Control of Phagocytosis by Microbial Pathogens. **Frontiers In Immunology**, [s.l.], v. 8, n. 1368, p.1-23, 24 out. 2017. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2017.01368>.

VERGNOLLE, Nathalie. Proteinase-Activated Receptor-2-Activating Peptides Induce Leukocyte Rolling, Adhesion, and Extravasation In Vivo. **Journal of immunology** v. 163, n. 9, p. 5064-5069, 1 nov 1999.

VERGNOLLE, Nathalie; DERIAN, Claudia K.; D'ANDREA, Michael R.; STEINHOFF, Martin; ANDRADE-GORDON, Patricia. Characterization of Thrombin-Induced Leukocyte Rolling and Adherence: a potential proinflammatory role for proteinase-activated receptor-4. **The Journal Of Immunology**, [S.L.], v. 169, n. 3, p. 1467-1473, 1 ago. 2002. The American Association of Immunologists. <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.169.3.1467>.

VLIAGOFTIS, Harissios; SCHWINGSHACKL, Andreas; MILNE, Craig D.; DUSZYK, Marek; HOLLENBERG, Morley D; WALLACE, John L.; BEFUS, A.Dean; MOQBEL, Redwan. Proteinase-activated receptor-2-mediated matrix metalloproteinase-9 release from airway epithelial cells. **Journal Of Allergy And Clinical Immunology**, [S.L.], v. 106, n. 3, p. 537-545, set. 2000. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1067/mai.2000.109058>.

VU, Thien-Khai H.; HUNG, David T.; WHEATON, Virginia I.; COUGHLIN, Shaun R.. Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation. **Cell**, [S.L.], v. 64, n. 6, p. 1057-1068, mar. 1991. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674\(91\)90261-v](http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674(91)90261-v).

WAN, Jian; SHAN, Yi; FAN, Yibo; FAN, Conghui; CHEN, Song; SUN, Jie; ZHU, Lili; QIN, Long; YU, Mengjin; LIN, Zhaofen. NF- κ B inhibition attenuates LPS-induced TLR4 activation in monocyte cells. **Molecular Medicine Reports**, [S.L.], v. 14, n. 5, p. 4505-4510, 12 out. 2016. Spandidos Publications. <http://dx.doi.org/10.3892/mmr.2016.5825>.

WANG, Changqi; YU, Xiao; CAO, Qi; WANG, Ya; ZHENG, Guoping; TAN, Thian Kui; ZHAO, Hong; ZHAO, Ye; WANG, Yiping; HARRIS, David Ch. Characterization of murine macrophages from bone marrow, spleen and peritoneum. **Bmc Immunology**, [S.L.], v. 14, n. 1, p. 1-10, 5 fev. 2013. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2172-14-6>.

WATANABE, Satoshi; ALEXANDER, Michael; MISHARIN, Alexander V.; BUDINGER, G.R. Scott. The role of macrophages in the resolution of inflammation. **Journal Of Clinical Investigation**, [S.L.], v. 129, n. 7, p. 2619-2628, 20 maio 2019. American Society for Clinical Investigation. <http://dx.doi.org/10.1172/jci124615>.

WEIGERT, Andreas; VON KNETHEN, Andreas; FUHRMANN, Dominik; DEHNE, Nathalie; BRÜNE, Bernhard. Redox-signals and macrophage biology. **Molecular Aspects Of Medicine**, [S.L.], v. 63, p. 70-87, out. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mam.2018.01.003>.

WINN, Nathan C.; VOLK, Katrina M.; HASTY, Alyssa H.. Regulation of tissue iron homeostasis: the macrophage H^+ ferrostat. **Jci Insight**, [S.L.], v. 5, n. 2, p. 1-14, 30 jan. 2020. American Society for Clinical Investigation. <http://dx.doi.org/10.1172/jci.insight.132964>.

WYNN, Thomas A.; CHAWLA, Ajay; POLLARD, Jeffrey W.. Macrophage biology in development, homeostasis and disease. **Nature**, [S.L.], v. 496, n. 7446, p. 445-455, abr. 2013. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nature12034>.

WYNN, Thomas A.; VANNELLA, Kevin M.. Macrophages in Tissue Repair, Regeneration, and Fibrosis. **Immunity**, [S.L.], v. 44, n. 3, p. 450-462, mar. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2016.02.015>.

XU, W.-F.; ANDERSEN, H.; WHITMORE, T. E.; PRESNELL, S. R.; YEE, D. P.; CHING, A.; GILBERT, T.; DAVIE, E. W.; FOSTER, D. C.. Cloning and characterization of human protease-activated receptor 4. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [S.L.], v. 95, n. 12, p. 6642-6646, 9 jun. 1998. Proceedings of the National Academy of Sciences. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.95.12.6642>.

XUE, Qingjie; YAN, Yingchun; ZHANG, Ruihua; XIONG, Huabao. Regulation of iNOS on Immune Cells and Its Role in Diseases. **International Journal Of Molecular Sciences**, [S.L.], v. 19, n. 12, p. 1-13, 29 nov. 2018. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms19123805>.

YAN, Shichang; DING, Huimin; PENG, Junyang; WANG, Xinqiang; PANG, Chenglong; WEI, Juncheng; WEI, Jianjun; CHEN, Hui. Down-regulation of protease-activated receptor 2 ameliorated osteoarthritis in rats through regulation of MAPK/NF-κB signaling pathway in vivo and in vitro. **Bioscience Reports**, [S.L.], v. 40, n. 3, p. 1-16, mar. 2020. Portland Press Ltd.. <http://dx.doi.org/10.1042/bsr20192620>.

YAO, Xin; HUANG, Jiaqi; ZHONG, Haihong; SHEN, Nan; FAGGIONI, Raffaella; FUNG, Michael; YAO, Yihong. Targeting interleukin-6 in inflammatory autoimmune diseases and cancers. **Pharmacology & Therapeutics**, [S.L.], v. 141, n. 2, p. 125-139, fev. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pharmthera.2013.09.004>.

YAU, Mei-Kwan; LIM, Junxian; LIU, Ligong; FAIRLIE, David P.. Protease activated receptor 2 (PAR2) modulators: a patent review (2010-2015). **Expert Opinion On Therapeutic Patents**, [S.L.], v. 26, n. 4, p. 471-483, 3 mar. 2016. Informa Healthcare. <http://dx.doi.org/10.1517/13543776.2016.1154540>.

ZAJD, Cheryl M.; ZIEMBA, Alexis M.; MIRALLES, Grace M.; NGUYEN, Terry; FEUSTEL, Paul J.; DUNN, Stanley M.; GILBERT, Ryan J.; LENNARTZ, Michelle R.. Bone Marrow-Derived and Elicited Peritoneal Macrophages Are Not Created Equal: the questions asked dictate the cell type used. **Frontiers In Immunology**, [S.L.], v. 11, p. 1-19, 21 fev. 2020. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2020.00269>.

ZANG, Na; ZHUANG, Jianguo; DENG, Yu; YANG, Zhimei; YE, Zhixu; XIE, Xiaohong; REN, Luo; FU, Zhou; LUO, Zhengxiu; XU, Fadi. Pulmonary C Fibers Modulate MMP-12 Production via PAR2 and Are Involved in the Long-Term Airway Inflammation and Airway Hyperresponsiveness Induced by Respiratory Syncytial Virus Infection. **Journal Of Virology**, [S.L.], v. 90, n. 5, p. 2536-2543, 16 dez. 2015. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/jvi.02534-15>.

ZHAO, Yang; ZOU, Weilong; DU, Junfeng; ZHAO, Yong. The origins and homeostasis of monocytes and tissue-resident macrophages in physiological situation. **Journal Of Cellular Physiology**, [S.L.], v. 233, n. 10, p. 6425-6439, 17 abr. 2018. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/jcp.26461>.

ZHOU, Baocheng; ZHOU, Hong; LING, Shucui; GUO, Donglin; YAN, Yihong; ZHOU, Fang; WU, Ying. Activation of PAR2 or/and TLR4 promotes SW620 cell proliferation and migration via phosphorylation of ERK1/2. **Oncology Reports**, [S.L.], v. 25, n. 2, p. 503-511, 1 fev. 2011. Spandidos Publications. <http://dx.doi.org/10.3892/or.2010.1077>.

