

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular

**PAPEL DA PLASMINA NA MIGRAÇÃO DE
CÉLULAS INFLAMATÓRIAS**

Aline Alves Fortunato do Carmo

Orientadora: Profa. Dra. Lirlândia Pires de Sousa

Belo Horizonte
2014

Aline Alves Fortunato do Carmo

**PAPEL DA PLASMINA NA MIGRAÇÃO DE
CÉLULAS INFLAMATÓRIAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biologia Celular.

Orientadora: Profa. Dra. Lirlândia Pires de Sousa

Belo Horizonte
2014

FOLHA DE APROVAÇÃO

Dedicatória

Ao meu amado filho Pedro Henrique.

AGRADECIMENTOS

À Deus pelas inúmeras graças e bênçãos recebidas.

À minha orientadora, Lirlândia Pires de Sousa, a quem devo muito de minha formação. Pela acessibilidade, grande conhecimento, orientação científica, esclarecimentos e motivação. Muito obrigada pela confiança em mim depositada e por me receber em seu laboratório.

Ao Prof. Mauro Martins Teixeira por abrir as portas de seu laboratório e pelas contribuições científicas.

Ao meu filho Pedro Henrique por encher minha vida de amor e alegria.

Aos meus pais, Tarcísio e Ieda, pelo amor, companheirismo e exemplos de trabalho e dedicação.

Ao meu marido Eliton pelo amor e companheirismo. Por aguentar minhas ausências e ansiedade durante este período.

À minha sogra Nilda por cuidar do meu filho durante o tempo em que me dediquei a este trabalho com muito amor e carinho.

À minha irmã Letícia pelo amor, amizade e companheirismo.

Aos integrantes do “grupo da professora Landa”: Juliana, Bruno, Thaís, Ana, Kátia, Luíza, Luciana, Raquel, Nathália e Mayara pela ajuda na realização de experimentos, colaboração científica e convivência tão agradável neste período. A rotina de trabalho não seria a mesma sem a alegria de vocês!

À Cristiana pela ajuda e profissionalismo na realização dos experimentos de FACS.

À Alice e ao Alan por me ajudarem com as técnicas de cultivo e experimentação *in vitro*.

Aos alunos dos laboratórios de Imunofarmacologia (ICB) e Biologia Molecular (FaFar) por compartilharem comigo o ambiente de trabalho.

Às amigas da pós-graduação: Lara, Grazielle e Maria Gabriele pelo companheirismo e carinho.

Às sempre amigas da graduação: Aline Menezes, Ana Bárbara, Arianne Assis, Carla Amaral, Carla Elvira e Mariana Almeida por todo apoio, incentivo, carinho, companheirismo e compreensão.

À Cíntia e Arthur pela amizade, incentivo e compreensão.

Aos professores e funcionários do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular por contribuírem para minha formação.

À Ilma, Frank e Daniela pelo apoio técnico.

Aos funcionários dos biotérios pelo fornecimento e cuidados com os animais.

À CAPES, FAPEMIG e CNPq pelo apoio financeiro.

À Banca Examinadora, pela atenção e disposição em ler e colaborar para este trabalho.

RESUMO

O sistema Plasminogênio/Plasmina (Plg/Pla) está associado a diversas atividades biológicas além da clássica dissolução dos coágulos de fibrina. Estas ações incluem participação na migração celular, no reparo tecidual e na inflamação. Embora a capacidade da plasmina de induzir migração celular esteja bem definida, o mecanismo *in vivo* subjacente a este processo ainda não é bem conhecido. Este estudo investigou a capacidade da Pla de induzir migração celular *in vitro* e *in vivo* e o papel da proteína cinase ativada por mitógenos (MAPK) ERK1/2, do receptor ativado por protease (PAR-1) e da quimiocina CCL2 e de seu receptor CCR2 neste processo. Para tal, fibroblastos e macrófagos murinos foram tratados com Pla (2µg/mL) por diferentes tempos ou pré-tratadas com U0126 (inibidor de MEK/ERK), leupeptina (inibidor de serina protease) ou ácido tranexâmico (análogo de lisina) 1h antes e durante o tratamento com Pla. As células foram processadas para análises de migração celular ou para análise da ativação de ERK1/2 por western blot. Os experimentos *in vivo* foram conduzidos em camundongos BALB/C os quais foram desafiados por injeção intrapleural de Pla (2µg) sendo as células presentes na cavidade pleural coletadas em diferentes tempos e analisadas quanto aos tipos celulares, ativação das vias ERK1/2 e NF-κB, produção de quimiocinas e citocinas e imunofenotipagem das células por citometria de fluxo. Inibidores específicos para MEK/ERK (U0126 - 2mg/kg/i.pl.); serina protease (Leupeptina - 100µg/cavidade/i.pl.), receptor ativado por protease-1 (PAR1-SCH79797 5mg/kg/i.p.) e para o receptor de quimiocina CCR2 (RS504393 - 2mg/kg/i.pl.) foram administrados 1h antes da Pla e as células da cavidade pleural foram coletadas após 48h e processadas para contagem total e diferencial e western blot para P-ERK e P-IκBα. Os níveis pleurais de IL-1β, IL-6, TNF-α e CCL-2 foram medidos por ELISA. Plasmina induziu a migração de fibroblastos e macrófagos murinos *in vitro* de forma dependente de da via MEK/ERK, da sua atividade proteásica e do seu sítio ligante de lisina. A injeção de plasmina na cavidade pleural de camundongos induziu um influxo tempo-dependente de células mononucleares associado com o aumento da fosforilação de ERK1/2 e de IκB-α e dos níveis de CCL2 e IL-6 no exudato pleural. A inibição da atividade proteásica da plasmina, através do uso de

Leupeptina, ou a utilização do antagonista de PAR-1 (SCH79797) foram capazes de abolir o recrutamento de células mononucleares induzido pela plasmina, as fosforilações de ERK1/2 e de I κ B- α . Em concordância com os resultados obtidos *in vitro*, a inibição da via MEK/ERK aboliu o influxo de células mononucleares e a liberação de MCP-1/CCL2, ambos induzidos pela plasmina. Experimentos realizados para confirmar o envolvimento de MCP-1/CCL2 na migração celular induzida pela Plasmina, mostraram que camundongos deficientes em CCR2 (CCR2^{-/-}) são refratários ao recrutamento de mononucleares induzido por esta protease e o uso de um antagonista de CCR2 (RS504393) aboliu a migração induzida pela plasmina *in vivo* e *in vitro*. Concluimos com este estudo que a Plasmina é capaz de induzir migração de células mononucleares *in vivo* de forma dependente de PAR- 1, da ativação da via MEK/ERK/NF- κ B resultando na liberação de MCP-1/CCL2 e ativação de CCR2.

Palavras-chave: Plasminogênio/Plasmina, MAPK, MCP-1/CCL2, PAR-1 e migração celular.

ABSTRACT

The Plasminogen/Plasmin (Plg/Pla) system is associated with a variety of biological activities beyond the classical dissolution of fibrin clots, including cell migration, tissue repair and inflammation. Although the capacity of Plasmin to induce cell migration is well defined, the mechanism underlying this process *in vivo* is elusive. In this study, we investigate the capacity of Pla to induce cell migration *in vitro* and *in vivo* and the role of mitogen-activated protein kinase (MAPK) ERK1/2, protease activated receptor-1 (PAR-1) and CCL2/CCR2 axis in this process. With this purpose, murine fibroblasts and macrophages were treated with Pla (2µg/mL) at different times, or pretreated with the U0126 (MEK/ERK inhibitor), Leupeptin (serine protease inhibitor) or Tranexamic Acid (lysine analog) 1h before and during treatment with Pla. The cells were processed for analysis of cell migration or analysis of the activation of ERK1/2 by western blot. *In vivo* experiments were carried out in BALB/C mice which were challenged by intrapleural injection of Pla (2µg) and the cells present in the pleural cavity were collected at different times and analyzed for total and differential leukocyte counts, activation of ERK1/2 and NF-κB pathways, production of chemokines and cytokines and immunophenotyping by flow cytometry. Specific inhibitors for MEK/ERK (U0126- 2mg/Kg/i.pl.), serine protease (Leupeptin- 100µg/ cavity/i.pl.), protease activated receptor-1 (PAR1-SCH79797 5mg/kg/i.p.) and the chemokine receptor CCR2 (RS504393-2mg/kg/i.pl.) were administered 1 h before Pla and the cells of the pleural cavity were collected 48h after and processed for total and differential leukocyte counts and western blot for P-ERK and P-IκBα. Pleural levels of IL-1β, IL-6, TNF-α and CCL-2 were measured by ELISA. Plasmin induced migration of fibroblasts and murine macrophages *in vitro* dependent of the MEK/ERK pathway, its proteolytic activity and its lysine binding sites. The injection of plasmin in the pleural cavity of mice induced a time-dependent influx of mononuclear cells associated with increased phosphorylation of ERK1/2 and IκB-α and increased levels of CCL2 and IL-6 in the pleural exudates. The inhibition of protease activity of plasmin by using Leupeptin, or the use of PAR-1 antagonist (SCH79797) was able to abolish the recruitment of mononuclear

cells and ERK1/2 and I κ B- α phosphorylation. In agreement with the *in vitro* results, the inhibition of MEK/ERK abolished the influx of mononuclear cells and release of MCP-1/CCL2, both induced by plasmin. Experiments performed to confirm the involvement of MCP-1/CCL2 in cell migration induced by plasmin, showed that mice deficient in CCR2 (CCR2^{-/-}) are refractory to the recruitment of mononuclear cells induced by this protease and the use of a CCR2 antagonist (RS504393) abolished plasmin induced migration *in vivo* and *in vitro*. We conclude in this study that plasmin is able to induce *in vivo* migration of mononuclear cells dependently of PAR-1 activation of MEK/ERK/NF- κ B pathway resulting in the release of MCP-1/CCL2 and CCR2 activation.

Keywords: Plasminogen/Plasmin, MAPK, MCP-1/CCL2, PAR-1 and cell migration.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação da estrutura do plasminogênio.....	2
Figura 2 – Ativação do plasminogênio.....	3
Figura 3 – Mecanismos de ativação e inativação do sistema plasminogênio.....	5
Figura 4 – Representação esquemática da adesão de neutrófilos e migração transendotelial.....	8
Figura 5 – Vias de sinalização desencadeadas para ativação da MAPK ERK e seus alvos (A). Na figura (B) está sinalizado o local onde o inibidor U0126 atua para inibir a via MEK/ERK.....	13
Figura 6 – Mecanismo clássico de ativação dos receptores ativados por proteases.....	15
Figura 7 – Ensaio de ranhura em monocamada de células.....	20
Figura 8 – Ensaio de quimiotaxia.....	22
Figura 9 – Migração de fibroblastos embrionários murinos (MEF) e macrófagos murinos (RAW 264.7) após desafio com plasmina.....	30
Figura 10 – Efeito do pré-tratamento com U0126 sobre a migração de fibroblastos embrionários murinos (MEF) e macrófagos murinos (RAW 264.7) desafiados com plasmina.....	32
Figura 11 – Efeito da Leupeptina e do Ácido Tranexânico sobre a migração de fibroblastos embrionários murinos (MEF) e macrófagos murinos (RAW 264.7) induzida por plasmina.....	34
Figura 12 – Cinética do recrutamento de leucócitos para a pleura após o desafio com plasmina ou plasminogênio.....	36
Figura 13 – Perfil celular dos leucócitos que migraram para a pleura após o desafio com plasmina ou plasminogênio.....	38
Figura 14 – Níveis de citocinas e quimiocinas no lavado pleural de camundongos desafiados com plasmina.....	39

Figura 15- Efeito da Leupeptina sobre a migração de leucócitos para a pleura de camundongos desafiados com plasmina.....	40
Figura 16- Envolvimento da via MEK/ERK na migração induzida por plasmina <i>in vivo</i>	42
Figura 17- Efeito do agonista (RP19979) e do antagonista (SCH79797) de PAR-1 sobre a migração de mononucleares induzida por plasmina.....	44
Figura 18- Influxo leucocitário para a cavidade pleural após injeção de plasmina em camundongos CCR2 ^{-/-}	46
Figura 19- Efeito do antagonista de CCR2 ^{-/-} (RS504393) na migração induzida por plasmina/plasminogênio.....	47
Figura 20- Modelo proposto para a migração de células mononucleares induzida por plasmina.....	58

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA: análise de variância

Arg: arginina

Asp: aspartato

Balb/C: linhagem de camundongos

BDNF: fator neurotrófico derivado do cérebro

CEBIO: Centro de Bioterismo

CEUA: Comissão de Ética no Uso de Animais

DMEM: meio essencial líquido de Eagle modificado por Dulbecco

DMSO: dimetilsulfóxido

EACA: ácido ϵ -aminocapróico

ERK1/2: *extracellular-signal-regulated kinase* (cinase regulada por sinal extracelular).

ESAM: molécula de adesão celular ao endotélio

FGF: fator de crescimento do fibroblasto

FMLP: *formil-metionil-leucil-fenilalanina* : quimioatraente de leucócitos.

His: histidina

ICAM: molécula de adesão intercelular

IFN-(): interferon-()

I κ B- α : *nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha*

IL-(): interleucina-()

JAM: molécula de adesão juncional

JNK: *c-Jun N-terminal kinase* (cinase c-Jun NH₂-terminal)

LBS: *lysine binding sites* (sítios de ligação a lisina)

Leup: leupeptina

LFA: antígeno associado a linfócito

LPS: lipopolissacarídeo

MAC: antígeno de macrófago

MAPK: *mitogen-activated protein kinases* (proteínas cinases ativadas por mitógenos)

MCP-1/CCL2: proteína quimiotática de macrófagos - 1

MEC: matrix extracelular

MEF: fibroblastos embrionários murinos

MIP-2/CCL3: proteína inflamatória de macrófagos

NF- κ B: fator nuclear kappa B

NK: *natural killer* (células matadoras naturais)

PA: ativadores de plasminogênio

PAI: inativadores de ativadores de plasminogênio

PAR: receptores ativados por proteases

PECAM: moléculas de adesão celular plaqueta-endotélio

PI3K: *Phosphatidylinositide 3-kinase* (cinase fosfatidilinositídio 3)

Pla: plasmina

Plg: plasminogênio

RAW 264.7: Macrófagos murinos

RPM: rotações por minuto

Ser: serina

SFB: soro fetal bovino inativado

TF: fator tecidual

TGF- β : Fator de crescimento transformante beta

TNF: fator de necrose tumoral

t-PA: ativador de plasminogênio tissular / tecidual

TXA: ácido tranexâmico

u-PA: ativador de plasminogênio uroquinase

u-PA-R: receptor do ativador de plasminogênio uroquinase

Val: valina

VCAM: moléculas de adesão vascular

VEGF: fator de crescimento do endotélio vascular

VLA: *Very late antigen*: antígeno muito tardio

SUMÁRIO

1- INTRODUÇÃO.....	1
1.1- O Sistema Plasminogênio.....	1
1.2- Inflamação.....	6
1.3- Interações entre o Sistema Plasminogênio e a Inflamação.....	10
1.4- Sistema Plasminogênio e a via de sinalização das MAPK.....	11
1.5- Receptores Ativados por Proteases (PAR).....	14
2- JUSTIFICATIVA DO ESTUDO.....	16
3- OBJETIVOS.....	17
3.1- Objetivo geral.....	17
3.2- Objetivos específicos.....	17
4- MATERIAIS E MÉTODOS.....	19
4.1- Ensaios <i>in vitro</i>	19
4.1.1- Cultura de células.....	19
4.1.2- Modelo <i>in vitro</i> de migração celular: “Ensaio de Ranhura em monocamda de células”.....	19
4.1.3- Modelo <i>in vitro</i> de migração celular celular: “Ensaio de Quimiotaxia”.....	20
4.2- Ensaios <i>in vivo</i>	22
4.2.1- Animais.....	22
4.2.2- Migração de leucócitos induzida por plasmina para a cavidade pleural.....	23
4.2.3- Lavado pleural.....	23
4.3- Obtenção dos extratos protéicos.....	24
4.4- Quantificação de proteínas dos extratos proteicos.....	24
4.5- Western Blot para análise da expressão de P-ERK, P-IkB- α e β -actina.....	25
4.6- Determinação da expressão de citocinas/quimiocinas por ELISA..	26
4.7- Análise do perfil celular por citometria de fluxo.....	27
4.8- Análises estatísticas.....	28
5- RESULTADOS.....	29

5.1- Plasmina induz migração celular <i>in vitro</i> em culturas de MEF e RAW 264.7.....	29
5.2- Plasmina induz migração celular de MEF e RAW 264.7 de forma dependente da via MEK/ERK 1/2.....	31
5.3- A atividade de serina protease e os sítios de ligação a lisina são necessários para a migração <i>in vitro</i> promovida pela plasmina.....	33
5.4- Plasmina induz migração de leucócitos para a pleura de camundongos.....	35
5.5- O desafio com plasmina aumenta os níveis de IL-6 e de MCP-1/CCL2 no exudato pleura, mas não altera os níveis de IL-1 β , TNF- α e MIP-2/CXCL2 e KC CXCL1.....	39
5.6- A atividade de serina protease da plasmina é importante para a indução da migração celular <i>in vivo</i>	40
5.7- A via MEK/ERK está envolvida na migração celular <i>in vivo</i> induzida pela plasmina.....	41
5.8- O receptor ativado por protease-1 (PAR-1) está envolvido na migração celular induzida pela plasmina <i>in vivo</i>	43
5.9- O receptor CCR2 está envolvido na migração induzida pela plasmina.....	45
6- DISCUSSÃO.....	48
7- CONCLUSÃO.....	57
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	59
ANEXO.....	70
Anexo A- Certificado de aprovação do projeto pela Comissão de Ética no uso de animais da UFMG (CEUA).....	70

1- INTRODUÇÃO

1.1- O Sistema Plasminogênio

O Sistema Plasminogênio, também denominado Sistema Fibrinolítico, é constituído por várias proteínas, sendo a plasmina (Pla) a protease mais importante do sistema. (Franco, 2004; Syrovets, Lunov e Simmet, 2012). As enzimas deste sistema catalisam a hidrólise de ligações peptídicas passando por um estágio transitório de ligação a tríade catalítica formada por serina (Ser), histidina (His) e aspartato (Asp)(Ramachandran *et al.*, 2012). Devido a tal característica, estas enzimas são classificadas como serino-proteases.

O precursor da plasmina é a pró-enzima inativa plasminogênio (Plg) que é constituída por 790 aminoácidos e tem o peso molecular de 90 kDa (Henkin, Marcotte e Yang, 1991; Gross, Murray e Rand, 2013). O plasminogênio é produzido e processado no fígado com posterior liberação na corrente sanguínea, cuja concentração sérica pode chegar a 2,4 μM (Syrovets, Lunov e Simmet, 2012) (Figura 1). A estrutura do plasminogênio pode ser didaticamente dividida em duas partes: a primeira (azul na Figura 1) é a região amino-terminal, de cadeia pesada, composta por cinco domínios *Kringle*. A segunda (verde na Figura 1) é a região carboxi-terminal, de cadeia leve, na qual está localizado o sítio catalítico (inativo no plasminogênio e ativo na plasmina) formado por três aminoácidos Histidina 603, Aspartato 646 e Serina 741(Henkin, Marcotte e Yang, 1991; Syrovets, Lunov e Simmet, 2012).

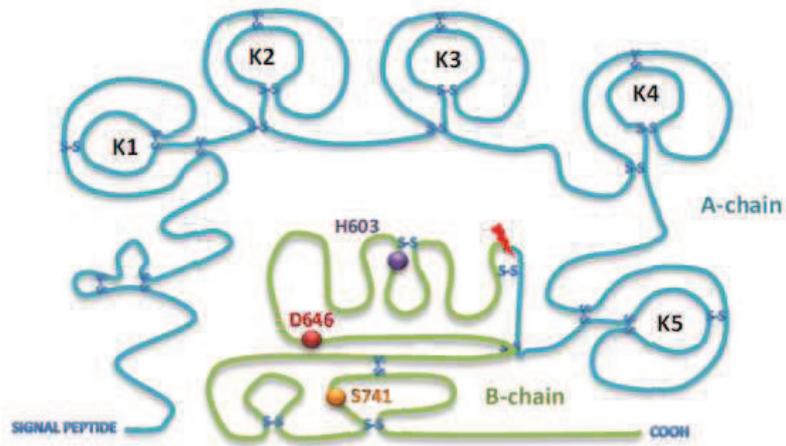


Figura 1– Representação da estrutura do plasminogênio. O local da clivagem para a conversão do plasminogênio em plasmina está marcado com a seta vermelha e os aminoácidos do sítio catalítico estão indicados - H603, D646 e S741. Adaptado de Syrovets *et al.* (2012).

A conversão do plasminogênio em plasmina é realizada por ativadores de plasminogênio (PA = *plasminogen activator*), que podem ser tecidual (t-PA) ou uroquinase (u-PA). Estes dois ativadores apresentam alta especificidade de ligação ao plasminogênio e são capazes de promover a hidrólise de uma única ponte peptídica levando à formação da plasmina (Figura 2) sem, contudo desfazer a ponte dissulfeto adjacente. O ativador de plasminogênio tecidual (t-PA) liberado na circulação, principalmente, por células endoteliais é ativo apenas na presença de fibrina. Após se ligarem à fibrina, formada pela cascata da coagulação, o t-PA cliva o plasminogênio dentro do coágulo gerando a plasmina localmente, que por sua vez degrada os coágulos de fibrina em produtos solúveis, sendo de importância fundamental na manutenção dos balanços hemostático e homeostático (Gross, Murray e Rand, 2013).

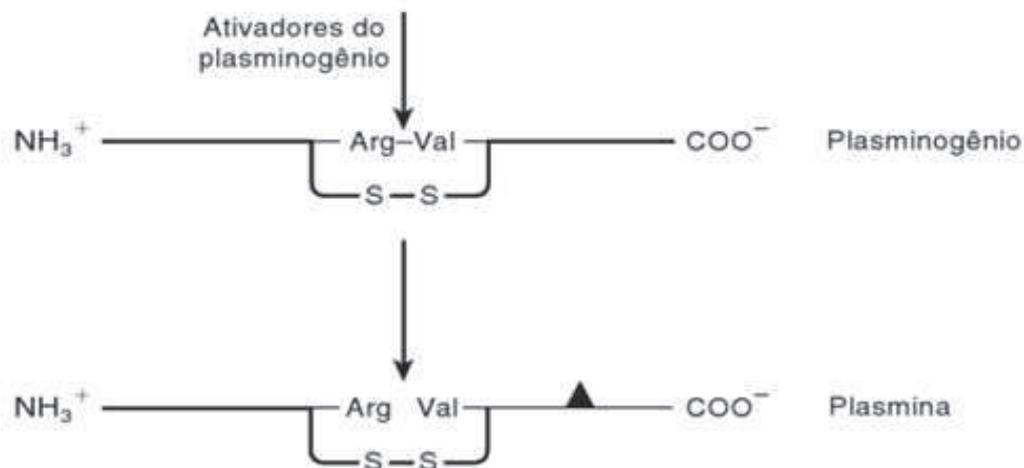


Figura 2– Ativação do plasminogênio. A mesma ligação Arg – Val é quebrada por todos os ativadores de plasminogênio dando origem à molécula de plasmina com duas cadeias. O triângulo representa o resíduo de serina do sítio ativo e as duas cadeias da plasmina permanecem unidas pela ponte dissulfeto. Adaptado de Gross, Murray e Rand, 2013.

O ativador de plasminogênio tipo uroquinase (u-PA) é produzido por células endoteliais, monócitos e macrófagos e se liga a receptores celulares específicos (u-PA-R). Tal ligação culmina no aumento da eficiência da ativação do plasminogênio à plasmina (Syrovets, Lunov e Simmet, 2012). Quando ligados aos seus receptores celulares, a plasmina também é capaz de produzir um *feedback* positivo através da modificação do u-PAR fazendo com que o u-PA se torne cataliticamente mais ativo (Lijnen, 2005). O principal papel de u-PA parece ser a indução da proteólise pericelular, através da degradação de elementos da matriz, que resulta na ativação de proteases latentes e na liberação de fatores de crescimento, incluindo o fator de crescimento transformante beta (TGF- β), fator de crescimento de fibroblasto (FGF) e fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) (Plow *et al.*, 1995; Lijnen, 2001; Jin *et al.*, 2003; Shin *et al.*, 2010).

A inibição do sistema plasminogênio pode ocorrer através da inibição dos ativadores de plasminogênio (t-PA e u-PA) exercida pelos inativadores de plasminogênio (PAI), ou pela inativação da plasmina, principalmente por α 2-antiplasmina (Figura 3) (Plow *et al.*, 1995; Lijnen, 2001; Kager *et al.*, 2013). O PAI-1, principal inibidor da ativação de plasminogênio associado à fibrinólise, é sintetizado por células endoteliais e hepatócitos. O mecanismo de inibição ocorre pela ligação a t-PA e u-PA dificultando a conversão do plasminogênio à

plasmina (Sprengers e Kluft, 1987; Margetic, 2012). A α 2-antiplasmina é uma glicoproteína produzida no fígado e está presente no plasma em concentrações em torno de $1\mu\text{M}$. Esta exerce sua inibição quando se liga de forma irreversível à plasmina formando complexos e impedindo a ação catalítica, e/ou quando se liga de forma reversível ao Plasminogênio dificultando sua adsorção à fibrina (Christensen, Bangert e Thorsen, 1996; Caulfield e Lathem, 2012).

Os receptores de plasminogênio foram identificados em diversos tipos celulares, como monócitos, linfócitos, fibroblastos, granulócitos, células endoteliais e neuronais. Estes são proteínas de superfície celular com resíduos de lisina C-terminal expostos, uma vez que o sítio de ligação à lisina associada ao domínio *Kringle* do plasminogênio possui maior afinidade às lisinas carboxi-terminal. A enolase-1 (ENO-1), anexina A2, p11, histona H2B, Plg-R_{kt} e gangliosídeos são os receptores de Plg mais representativos (Miles *et al.*, 1991; Hajjar, 1995; Redlitz *et al.*, 1995; Laumonier *et al.*, 2006; Wygrecka *et al.*, 2009; Das, Pluskota e Plow, 2010; Plow, Doeuvre e Das, 2012).

O Sistema Plasminogênio participa de uma grande variedade de processos fisiológicos devido ao elevado número de substratos da plasmina. A plasmina é a principal enzima responsável pela dissolução da fibrina intra e extravascular e pela regulação da patência vascular (Plow *et al.*, 1995; Carmeliet e Collen, 1998). Adicionalmente, a identificação de receptores de Plg/Pla em muitos tipos celulares (Herren *et al.*, 2001; Plow, Doeuvre e Das, 2012), juntamente com a capacidade da Pla em degradar componentes da matriz extracelular através da ação de metaloproteinases (por exemplo, MMP-9), mostrou o envolvimento desta protease na migração celular. De fato, a contribuição da Plasmina para a migração celular vem sendo demonstrada tanto em processos fisiológicos como embriogênese, cicatrização de feridas e angiogênese, quanto em processos patológicos como metástases e doenças inflamatórias (Plow *et al.*, 1995; Romer *et al.*, 1996; Syrovets e Simmet, 2004; Castellino e Ploplis, 2005; Wygrecka *et al.*, 2009; Bae *et al.*, 2012; Rosenwald *et al.*, 2012).

A ativação do plasminogênio a plasmina é finamente regulada devido aos múltiplos alvos e consequências da ativação deste sistema (Herren *et al.*, 2001). O mecanismo de ativação e inativação do sistema fibrinolítico é exemplificado na Figura 3.

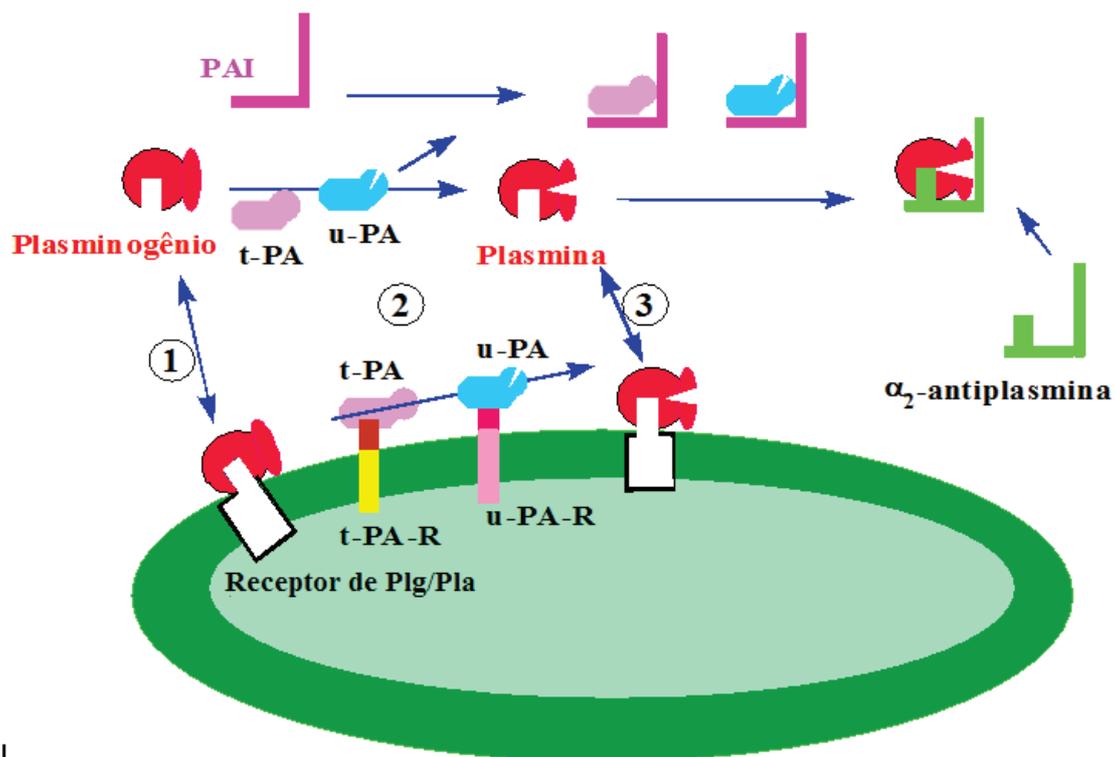


Figura 3– Mecanismos de ativação e inativação do sistema plasminogênio. A reação 1 descreve o equilíbrio entre o plasminogênio livre e o ligado à superfície celular. A afinidade da ligação entre os componentes do sistema plasminogênio e seus receptores celulares favorece substancialmente a ocupação da superfície celular pelo plasminogênio. Na reação 2, o plasminogênio ligado à célula é ativado à plasmina pelos ativadores do plasminogênio u-PA e t-PA, os quais estão associados aos seus respectivos receptores de superfície celular (u-PA-R e t-PA-R). A ativação é consideravelmente mais eficaz para os reagentes ligados à superfície celular que os não ligados. Na reação 3, a plasmina é exposta ao seu inibidor primário a α_2 -antiplasmina, que inativa plasmina livre. PAI se liga a t-PA e u-PA impedindo a atividade catalítica para a conversão do plasminogênio a plasmina. Adaptado de Plow *et al.* (1995)

1.2- Inflamação

Conceitualmente, a inflamação é uma resposta a padrões moleculares relacionados ao dano (DAMPs) e/ou direcionada a patógenos (PAMPs) desenvolvida pelos tecidos vascularizados, cujas principais características são o extravasamento de líquidos e saída de células da microcirculação adjacente ao tecido inflamado para o interstício, podendo ser aguda ou crônica (Robbins *et al.*, 1999). A resposta inflamatória aguda, iniciada após uma infecção ou dano tecidual, é caracterizada macroscopicamente pelos quatro sinais cardinais da inflamação, descritos por Cornelius Celsus no século I DC, que são: calor (gerado pelo aumento do fluxo sanguíneo local), rubor (resultante da hiperemia), tumor (ou edema/ resultante do aumento da permeabilidade da microvasculatura e do extravasamento de proteínas para o espaço intersticial) e dor (devido a alterações nas terminações nervosas e liberação de mediadores químicos). Em 1858, Rudolf Virchow acrescentou o quinto sinal: perda de função (consequência da limitação funcional devido ao edema e a dor). No final do século 19, Elie Metchnikoff deu notoriedade aos eventos microscópicos/celulares envolvidos no processo inflamatório ao introduzir o conceito de fagocitose (Medzhitov, 2010; Vago *et al.*, 2012).

A reação inflamatória é considerada protetora nos casos em que o agente desencadeador é eliminado e/ou inativado com consequente reparação do dano e restauração da homeostase tecidual. Neste evento, denominado resolução da resposta inflamatória, ocorre a liberação de inibidores do processo inflamatório, de mediadores pró-resolutivos e a participação de vias de sinalização que regulam o processo. Como exemplos de mediadores regulatórios podem ser citados: lipoxinas, resolvinas, maresinas, protectinas, melanocortinas, anexina A1 e interleucina 10 (IL-10), que levam principalmente a redução do recrutamento leucocitário, a apoptose dos leucócitos presentes no sítio da inflamação, bem como ao aumento da eferocitose (fagocitose) de corpos apoptóticos por macrófagos. A liberação destes mediadores é capaz de controlar o acúmulo excessivo de leucócitos no local. Entretanto, se a inflamação aguda não for controlada, ela pode se tornar maléfica ao portador, progredindo para inflamação crônica, cicatrização e fibrose. Nestes casos a causa fundamental do dano tecidual é o excesso de acúmulo de leucócitos nos

tecidos (Serhan *et al.*, 2000; Serhan *et al.*, 2002; Medzhitov, 2010; Nathan e Ding, 2010; Norling e Serhan, 2010; Alessandri *et al.*, 2013; Sousa *et al.*, 2013).

O recrutamento leucocitário ocorre na homeostase, como por exemplo, no tráfego de linfócitos para tecidos linfoides e outros tecidos. Durante a resposta inflamatória, um conjunto complexo de moléculas são produzidas e secretadas, permitindo a interação de leucócitos circulantes com as células endoteliais e viabilizando a sua transmigração para o sítio inflamatório (Gilroy *et al.*, 2004). Para isso, as integrinas promovem a adesão firme dos leucócitos circulantes às células endoteliais ativadas pela ligação de moléculas de adesão expostas na sua superfície. Posteriormente, os leucócitos rastejam sobre o endotélio, cruzam a membrana basal e transmigram para o interstício (Figura 4) (Phillipson *et al.*, 2006). A migração leucocitária depende da ação de diferentes fatores quimiotáticos que ativam receptores acoplados à proteína G. A ligação desses fatores quimiotáticos aos seus respectivos receptores é capaz de ativar moléculas pertencentes às vias de transdução de sinais intracelulares que são fundamentais para que a resposta inflamatória ocorra (Marinissen e Gutkind, 2001).

As quimiocinas são um subtipo de citocinas produzidas em resposta a estímulos inflamatórios, capazes de coordenar o recrutamento de leucócitos do sangue para os tecidos, através da indução de expressão de moléculas de adesão durante as diferentes etapas, e de ativar e regular a ação destas células durante as diferentes fases das respostas inata e adaptativas (Rot e Von Andrian, 2004; Yadav, Saini e Arora, 2010). As quimiocinas possuem um papel muito importante durante a inflamação, pois estão envolvidas em eventos cruciais, como a diferenciação das células imunocompetentes e a regulação dos mecanismos efetores das respostas imune e inflamatória. Algumas das principais citocinas/quimiocinas envolvidas no recrutamento de células inflamatórias são: interleucina-1 beta (IL-1 β), interleucina-6 (IL-6), interleucina-8 (IL-8/KC), fator de necrose tumoral (TNF), proteína quimiotática de monócitos (MCP-1/CCL2) e a proteína inflamatória de macrófagos (MIP-2/CCL3) (Tabela 1), dentre outras (Abbas, Lichtman e Pober, 2003; Rot e Von Andrian, 2004).

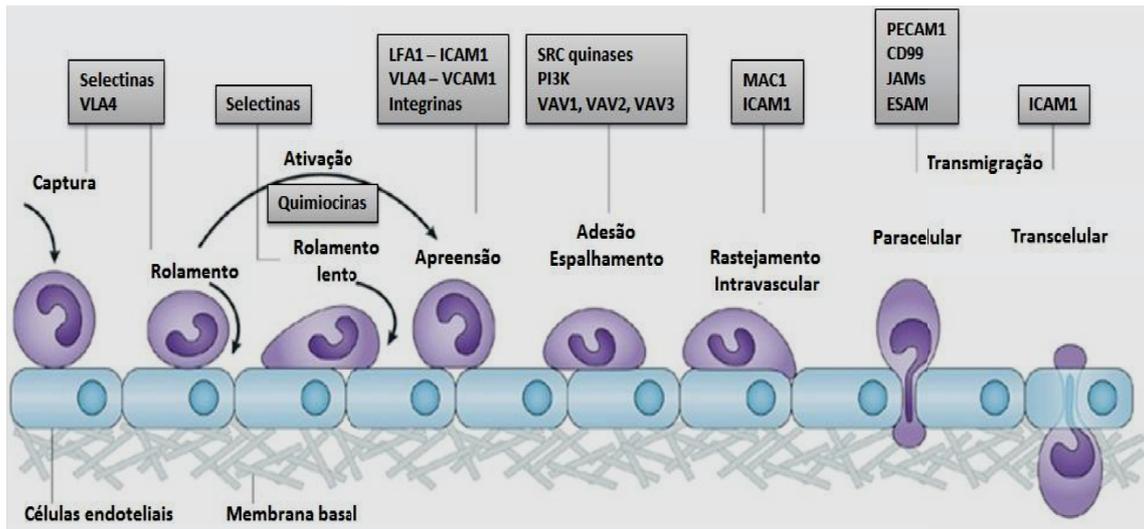


Figura 4- Representação esquemática da adesão de neutrófilos e migração transendotelial. Os passos originais são: captura, rolamento, rolamento lento (mediado por selectinas); ativação (mediada por quimiocinas); apreensão, adesão espalhamento, rastejamento intravascular (mediada por integrinas); e transmigração (paracelular ou transcelular). Moléculas-chave para cada passo estão indicadas nas caixas. ESAM – Molécula de adesão celular ao endotélio; ICAM - moléculas de adesão intercelular; JAM – Molécula de adesão juncional; LFA – Antígeno associado a linfócito; MAC - Antígeno de macrófago; PECAM - moléculas de adesão celular plaqueta-endotélio; PI3K - fosoinositídeo 3-cinase; VCAM - moléculas de adesão vascular; VLA – Antígeno muito tardio.

Adaptado de LEY *et al.* (2007)

Tabela 1- Principais citocinas/quimiocinas envolvidas na migração de células inflamatórias

Citocina / quimiocina	Local de síntese / produção	Efeito/ação
IL-1β	Fagócitos mononucleares ativados, neutrófilos, células epiteliais e endoteliais.	Em baixas concentrações, medeia a resposta inflamatória local, atuando sobre as células epiteliais e aumentando a expressão de moléculas de adesão leucocitária. Em altas concentrações ela entra na corrente sanguínea e exerce efeitos sistêmicos como febre e indução de proteínas hepáticas.
IL-6	Fagócitos mononucleares, células endoteliais, fibroblastos e linfócitos.	Exerce diversas ações sob a imunidade inata e adquirida, dentre elas, promove a síntese de proteínas de fase aguda pelos hepatócitos e estimula o crescimento e diferenciação de linfócitos.
TNF-α	Principalmente por macrófagos, mas também pode ser secretado por células T ativadas, células matadoras naturais (NK) e mastócitos.	Promove o recrutamento de leucócitos para os sítios inflamatórios através do aumento da expressão de moléculas de adesão (integrinas leucocitárias e selectinas endoteliais), estimula as células endoteliais e macrófagos a secretarem quimiocinas que também induzem o recrutamento de leucócitos e induzem a apoptose de alguns tipos celulares.
MCP1/ CCL2	É produzido por uma grande variedade de células, incluindo epiteliais, endoteliais, fibroblastos, astrócitos e monócitos.	Potente quimioatraente de monócitos, mas também pode recrutar células T de memória e células dendríticas para os sítios inflamatórios.
IL-8/KC	É uma citocina secretada por vários tipos de células, incluindo linfócitos T e macrófagos, em resposta a estímulos inflamatórios.	Atrai neutrófilos, basófilos (que no tecido se tornam mastócitos) e linfócitos T.
MIP-2	Produzida por macrófagos.	Potente quimioatraente de neutrófilos.

Fontes: Abbas, Lichtman e Pober, 2003; Yadav, Saini e Arora, 2010; Lei *et al.*, 2012; Mitroulis, Kambas e Ritis, 2013.

1.3- Interações entre o Sistema Plasminogênio e a Inflamação

Está bem estabelecido que a expressão de genes que codificam fibrinogênio, PAI-1, t-PA, u-PA e u-PA-R são regulados por moléculas induzidas durante a resposta inflamatória local e/ou durante a resposta de fase aguda sistêmica à processos como injúria tecidual, crescimento neoplásico ou infecção. Vários trabalhos têm demonstrado o papel de mediadores inflamatórios na regulação de componentes do sistema plasminogênio (Jenkins *et al.*, 1997; Herren *et al.*, 2001; Lijnen, 2001). Dentro deste contexto, moléculas pró-inflamatórias tais como IFN, TNF- α , IL-1 α , IL-1 β e IL-6 possuem efeitos sobre componentes do sistema plasminogênio e, de uma maneira geral, promovem um aumento da atividade fibrinolítica sob as células em que atuam. Como exemplo, podemos citar que TNF- α e IL-1 β são capazes de aumentar a expressão e secreção de uPA em células da polpa dentária humana (Kamio *et al.*, 2007; Narita *et al.*, 2012) e que IL-1 α induz a expressão de t-PA em queratinócitos murinos (Lian *et al.*, 2008). Estas moléculas são produzidas no sítio inflamatório em resposta a vários estímulos, tais como dano tecidual, formação de trombos nos vasos, deposição excessiva de fibrina no pulmão e outros, no sentido de tentar restabelecer a fisiologia do tecido lesado (Hasegawa *et al.*, 1997; Jenkins *et al.*, 1997; Kasza e Koj, 2002; Wang *et al.*, 2013). Além disso, estudos que apontam a regulação do próprio plasminogênio por citocinas pró-inflamatórias, sugerem que provavelmente, estes sistemas possam se intercomunicar em processos celulares como migração, reparo tissular, remodelagem tecidual e fibrinólise visando alcançar um equilíbrio para manutenção da homeostase tecidual (Niedbala e Stein, 1991; Twining, Wilson e Ngamkitidechakul, 1999; Bannach *et al.*, 2002; Kasza e Koj, 2002).

Como mencionado anteriormente, plasmina estimula a expressão de citocinas como TNF- α , IL-1 α/β , IL-6, da quimiocina MCP-1/CCL2, do fator tecidual (TF), liberação de mediadores lipídicos e indução de quimiotaxia de monócitos purificados (Weide *et al.*, 1996; Burysek, Syrovets e Simmet, 2002; Min, Jou e Joe, 2003; Schuliga *et al.*, 2013). Foi demonstrado também que o plasminogênio e plasmina foram capazes de induzir a produção de IL-1 β , TNF- α e da expressão gênica de iNOS em culturas primárias de micróglia de ratos e em uma linhagem imortalizada de células de micróglia murina (BV2) (Min, Jou

e Joe, 2003). Além disso, os níveis de IL-6 e IL-8 são aumentados em células de músculo liso das vias aéreas após estímulo com plasminogênio (Altrogge e Monard, 2000; Schuliga *et al.*, 2013). Tais relatos evidenciam a íntima relação entre o Sistema Plasminogênio e moléculas pró-inflamatórias.

Estudos têm demonstrado o papel dos receptores de plasminogênio durante a migração de leucócitos *in vivo* e *in vitro* (Ploplis *et al.*, 1998; Laumonier *et al.*, 2006; Gong *et al.*, 2008; Guo *et al.*, 2008; Lighvani *et al.*, 2011). Camundongos deficientes para o gene que codifica para o plasminogênio (Plg^{-/-}) têm um menor recrutamento de macrófagos/monócitos e linfócitos, quando comparados aos animais sem a deficiência, no modelo de peritonite induzida por tioglicolato, sem nenhum prejuízo para migração de neutrófilos (Ploplis *et al.*, 1998; Laumonier *et al.*, 2006; Gong *et al.*, 2008; Guo *et al.*, 2008; Lighvani *et al.*, 2011).

Wygrecka *et al.* (2009) demonstraram, em um modelo de injúria pulmonar aguda, que a α -enolase (um receptor de plasminogênio) é expressa na superfície de monócitos sendo importante para migração destas células. Outro estudo mostrou que a α -enolase expressa na superfície de macrófagos e monócitos induz inflamação sinovial na artrite reumatoide (Bae *et al.*, 2012).

Por outro lado, têm surgido evidências de que o Sistema Plasminogênio também pode participar do processo de resolução da inflamação aguda (Gong, Fan e Hoover-Plow, 2011; Rosenwald *et al.*, 2012; Shen *et al.*, 2012). Assim, sabendo que a resolução da inflamação é um processo ativo, que envolve eventos-chave, incluindo a apoptose de leucócitos, seu reconhecimento e eferocitose, mudança do fenótipo dos macrófagos de pró-inflamatório para um perfil pró-resolutivo, os estudos citados acima descrevem ao menos duas funções modulatórias importantes exercidas pelo sistema Plg e que tocam o processo de resolução da inflamação.

1.4- Sistema Plasminogênio e a via de sinalização das MAPKs

Dentre as proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPKs) podem ser citadas ERK1/2, p38 e JNK que integram uma família de proteínas sinalizadoras envolvidas em diferenciação celular, resposta ao estresse, apoptose e

inflamação (Figura 5) (Sousa, Brasil, *et al.*, 2005; Sousa, Silva, *et al.*, 2005; Junttila, Li e Westermarck, 2008). De Sousa e colaboradores (2005) demonstraram que Plg/Pla estimulam a expressão de *c-fos* e *egr-1*, dois fatores de transcrição envolvidos com indução de genes que codificam para proteínas pró-inflamatórias, através da ativação da MAPK ERK1/2 (De Sousa *et al.*, 2005). Além disto, os autores mostraram que a via MAPK ERK1/2 também é necessária para indução da α -enolase (α -ENO) tanto pelo plasminogênio (Sousa, Silva, *et al.*, 2005) quanto por IFN- α (Sousa, Brasil, *et al.*, 2005; Sousa, Silva, *et al.*, 2005; Junttila, Li e Westermarck, 2008).

Elementos do sistema plasminogênio utilizam a via das MAPKs para indução de outros genes que contribuirão de maneira geral para aumento da proteólise extracelular (D'alessio e Blasi, 2009). Outro fator importante é que substâncias quimiotáticas como lipopolissacarídeo (LPS) e TNF- α aumentam a expressão de elementos do sistema plasminogênio como u-PA e metaloproteinases via ERK1/2 (Niedbala e Stein, 1991; Cheng *et al.*, 2009), enquanto anti-inflamatórios como os glicocorticoides inibem vários elementos do sistema inibindo a proteólise (Pöllänen, 1989; Chu *et al.*, 2008; Kwon *et al.*, 2011). Recentemente, nosso grupo de pesquisa também demonstrou que a dexametazona (um glicocorticoide sintético) inibiu o acúmulo de neutrófilos na cavidade pleural sendo este efeito associado à inibição da fosforilação de ERK1/2 e do fator de transcrição NF- κ B (Vago *et al.*, 2012). Neste contexto, seria de extrema importância investigar *in vitro*, bem como *in vivo*, através do uso de modelos inflamatórios animais, a participação das MAPKs na migração celular induzida pela plasmina.

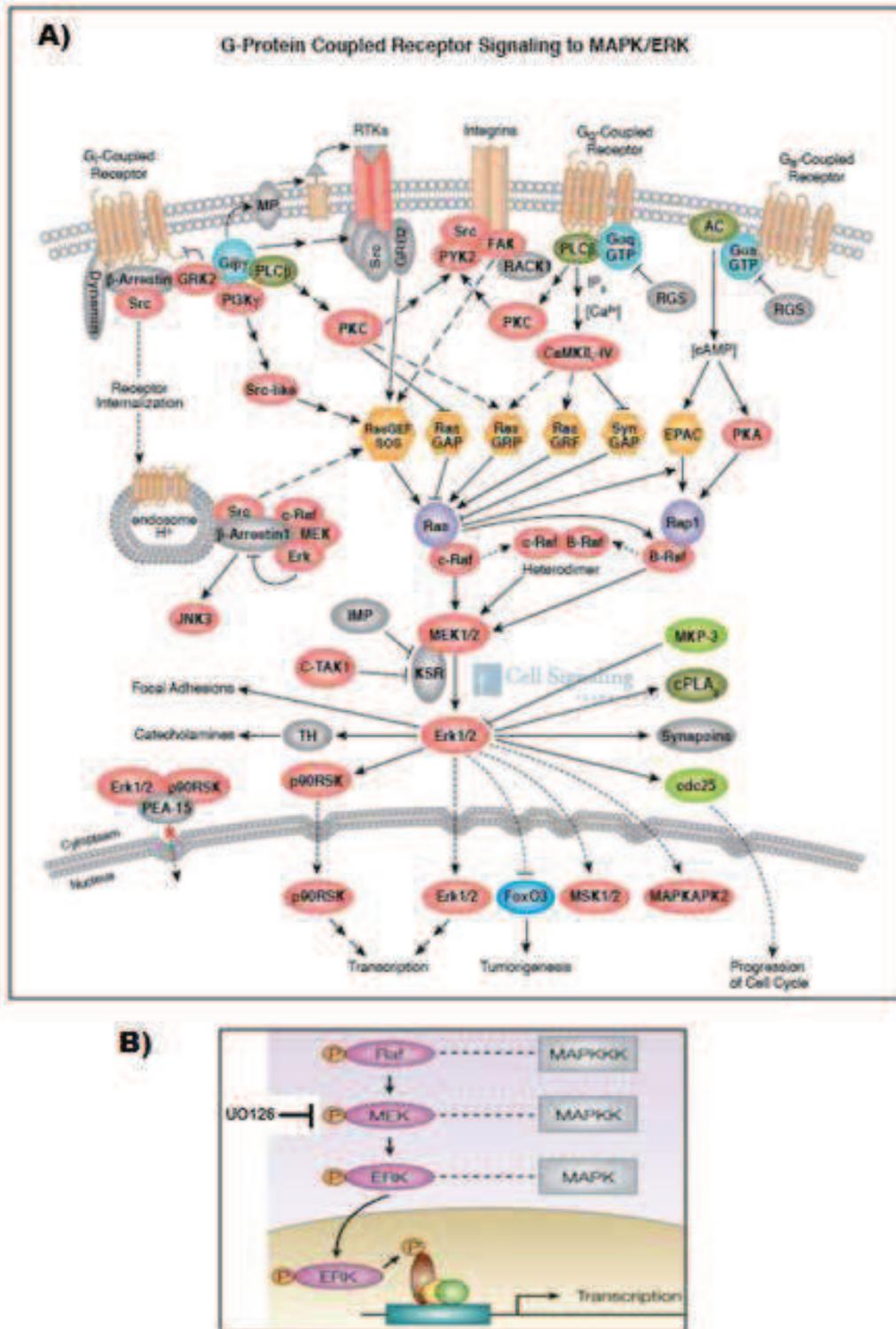


Figura 5- Vias de sinalizações desencadeadas para ativação da MAPK ERK e seus alvos (A). Na figura (B) está sinalizado o local onde o inibidor U0126 atua para inibir a via MEK/ERK.

Adaptado de: (A) Site *Cell Signaling Technology*

(<http://www.cellsignal.com/pathways/map-kinase.jsp>), (B) Kim *et al.* (2004).

1.5- Receptores Ativados por Proteases (PARs)

Os receptores ativados por proteases (PAR) são receptores metabotrópicos que atuam mediando a sinalização de várias enzimas. Esta família é constituída por quatro membros: PAR-1, PAR-2, PAR-3 e PAR-4. Estes receptores são expressos em vários tipos celulares, e possuem um mecanismo peculiar de ativação, no qual uma serino-protease (plasmina por exemplo) hidrolisa a ligação peptídica em um local específico da porção amino-terminal extracelular, viabilizando a aproximação e a interação entre a sequência ligante e o sítio de ligação no receptor. Na sequência, ocorre o recrutamento de Proteína G e outras moléculas sinalizadoras para o domínio intracelular do receptor, culminando na transdução do sinal (Figura 6). Uma vez ativado, o PAR é inativado, internalizado e degradado via lisossomal (Ramachandran *et al.*, 2012).

Já foi descrito na literatura a participação de componentes da cascata da coagulação e do Sistema Plasminogênio na ativação e transdução de sinais mediados por PARs (Hansen *et al.*, 2008; Ramachandran *et al.*, 2012). O PAR-1, por exemplo, é um receptor de trombina capaz de induzir a via MEK/ERK culminando na produção de CCL2 (Deng *et al.*, 2008). Além disso, a relação entre o sistema Plasminogênio e os PARs fica mais evidente em estudos que demonstram que a plasmina não foi capaz de ativar a via MEK/ERK em fibroblastos deficientes para o gene que codifica PAR-1 (PAR-1^{-/-}) (Pendurthi *et al.*, 2002), que esta proteína de induziu migração de células ovarianas de hamster através da ativação deste receptor (Pendurthi *et al.*, 2002; Majumdar *et al.*, 2004) e o envolvimento destes receptores com processos inflamatórios (Ramachandran, 2012; Ramachandran *et al.*, 2012).

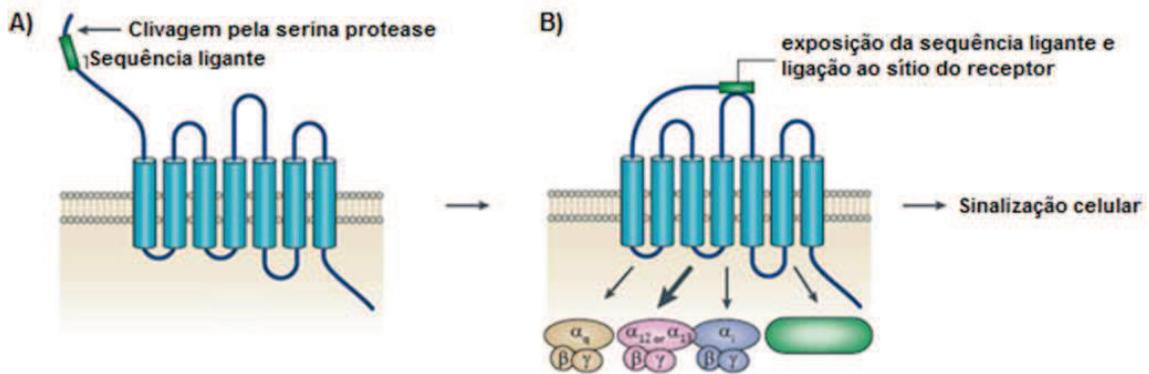


Figura 6 – Mecanismo clássico de ativação dos receptores ativados por proteases. A serino-protease reconhece seletivamente o receptor e cliva um sítio específico na porção N-terminal do receptor (A), viabilizando a interação entre a sequência ligante e o sítio do receptor (B), desencadeando a sinalização celular. Adaptado de Ramachandran *et al.* (2012).

2- JUSTIFICATIVA DO ESTUDO

Permitir um recrutamento eficiente de células com o mínimo de dano ao tecido acometido é um dos grandes desafios no controle do processo inflamatório, visto que os mediadores provenientes dos leucócitos podem levar à lesão tecidual e disfunção do órgão. Assim, existe um grande interesse em elucidar melhor os mecanismos responsáveis pelo recrutamento e eliminação dessas células do sítio inflamatório.

Pesquisadores do nosso grupo (*Sinalização na inflamação*) tem se dedicado ao estudo dos mecanismos de recrutamento e permanência leucocitária nos sítios inflamatórios. Estudos *in vitro* mostraram que o IFN- γ foi capaz de aumentar a expressão do receptor de Plg/Pla (α -enolase) na superfície de monócitos humanos com consequente aumento da proteólise celular de forma dependente da MAPK ERK1/2 (Sousa, Silva, *et al.*, 2005). Adicionalmente, trabalhos recentes mostram o envolvimento de componentes do sistema plasminogênio na migração de células inflamatórias em modelos inflamatórios murinos, bem como em doenças inflamatórias humanas (Wygrecka *et al.*, 2009; Bae *et al.*, 2012; Syrovets, Lunov e Simmet, 2012; Miles e Parmer, 2013). No entanto, o papel das quimiocinas e os mecanismos subjacentes às vias de sinalização que regulam a migração de leucócitos induzida por plasminogênio *in vivo* ainda não foram completamente elucidados.

Neste projeto, nos propusemos a estudar o papel do Sistema Plasminogênio na migração celular induzida por Plasmina. Para isso, procuramos elucidar os receptores, as vias de sinalização (focando na via das MAPKs) e as quimiocinas envolvidas na indução da migração de leucócitos para a pleura de camundongos. Assim, diante do complexo mecanismo que rege o recrutamento e a manutenção de células nos sítios inflamatórios, o estudo dos diversos fatores envolvidos no acúmulo leucocitário no sítio inflamatório é de importância fundamental para o desenvolvimento de estratégias farmacológicas que possam interferir nessas vias controlando a inflamação.

3– OBJETIVOS

3.1 - Objetivo geral

Estudar o papel da plasmina na migração de células inflamatórias, avaliando inicialmente sua capacidade de induzir migração celular de fibroblastos e macrófagos murinos *in vitro* e de leucócitos *in vivo* para a pleura de camundongos.

Mecanicamente pretendeu-se avaliar a participação da MAPK MEK/ERK1/2, do receptor ativado por protease- 1 (PAR-1) e do receptor CCR2 neste processo.

3.2- Objetivos específicos

3.2.1- Avaliar a habilidade da plasmina em induzir migração celular *in vitro* em culturas de fibroblastos embrionários murinos (MEF) e macrófagos murinos (RAW 264.7).

3.2.2- Investigar o envolvimento da via MEK/ERK na migração celular *in vitro* de MEF e RAW 264.7 induzida pela plasmina através do uso de um inibidor seletivo da via.

3.2.3- Analisar o efeito da Leupeptina (Leup) (inibidor de serina protease) e do Ácido Tranexâmico (TXA) (inibidor de sítios de ligação à lisina) na migração celular de MEF e RAW 264.7 induzida por plasmina *in vitro*.

3.2.4- Avaliar a habilidade e a cinética de migração/recrutamento de leucócitos induzida pela plasmina *in vivo*, através da injeção desta proteína na pleura de camundongos BALB/C machos.

3.2.5- Estudar o papel da MAPK ERK 1/2, através da análise da fosforilação de ERK 1/2 e do uso do inibidor específico desta via na migração de leucócitos induzida por plasmina.

3.2.6- Estudar a ativação do Fator Nuclear Kappa B (NF- κ B), através da análise da fosforilação de I κ B- α , nos leucócitos recrutados para a pleura dos animais desafiados com Plasmina. .

3.2.7- Mensurar os níveis das citocinas IL-6, IL-1 β , TNF- α e das quimiocinas MIP-2/CXCL2, KC/CXCL-1 e MCP-1/CCL2 no sobrenadante do lavado pleural de camundongos desafiados com Plasmina.

3.2.8- Analisar o efeito da Leupeptina (inibidor de serina protease) na pleurisia induzida por Plasmina.

3.2.9- Verificar a participação do receptor ativado por protease-1 (PAR-1) na migração celular induzida por Plasmina através da utilização de um agonista (RP19979) e de um antagonista deste receptor (SCH79797).

3.2.10- Estudar o envolvimento do receptor CCR2 na migração celular *in vivo* induzida por plasmina através da utilização de camundongos deficientes para o gene que codifica CCR2 (CCR2^{-/-}) e pela utilização de um antagonista de CCR2 (RS504393).

4- MATERIAIS E MÉTODOS

4.1– Ensaios *in vitro*

4.1.1- Cultura de células

Fibroblastos embrionários murinos (MEF) ou macrófagos murinos (RAW 264.7) foram cultivados em meio essencial mínimo de Engle modificado por Dulbecco (DMEM), suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino inativado (SFB) (*Cultilab*), e antibióticos penicilina (100UI/mL) e gentamicina (100µg/m) à temperatura de 37°C, em estufa incubadora umidificada (*Thermo Scientific*) contendo 95% de ar e 5% de CO₂.

4.1.2- Modelo *in vitro* de migração celular: “Ensaio de Ranhura em monocamada de células”

O ensaio de ranhura em monocamada de células foi realizado como descrito por Liang *et al.* (2007). Neste ensaio 1×10^6 fibroblastos embrionários murinos (MEF) ou macrófagos murinos (linhagem RAW 264.7) foram cultivados em placas de seis poços (*NUNC*), em meio DMEM, suplementado com 10% de SFB, com os antibióticos penicilina (100UI/mL) e gentamicina (100µg/mL) até 80% de confluência quando então foram carenciados com 1% SFB por 12 horas. As monocamadas de células foram riscadas com auxílio de uma ponteira estéril de 200µl, sendo os debris celulares descartados após lavagem com PBS 1X. Na sequência, estas monocamadas foram tratadas com plasmina (2µg/mL) (*Sigma*) ou expostas a meio livre de SFB por 5, 10 ou 20h (Figura 7).

Em alguns experimentos as células foram previamente incubadas, antes da adição de plasmina, por 30 minutos com inibidor de MEK/ERK U0126 (15µM) (*Cell Signaling Technology*), durante 30 min. ou com o inibidor de serina protease Leupeptina (25µg/mL) ou ainda com o inibidor de sítio de ligação a lisina Ácido Tranexâmico (0.1M) ambos por 1 hora (ambos produzidos pela *Sigma-Chemicals*), com posterior incubação por 10h à

temperatura de 37°C, em estufa incubadora umidificada (Thermo Scientific) contendo 95% de ar e 5% de CO₂, como descrito em (De Sousa *et al.*, 2005).

Após o tempo determinado, o meio foi descartado e as células foram fixadas com solução de formol a 3,7% por 20 minutos e na sequência esta solução foi substituída por PBS 1X para a realização da análise microscópica. Foram contadas as células que migraram para área da ranhura, ao microscópio óptico no aumento de 40X.

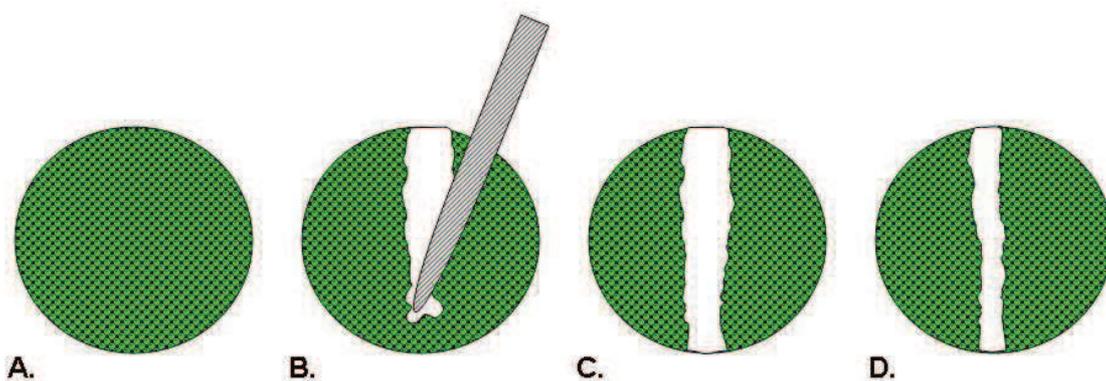


Figura 7- Ensaio de ranhura. As células são cultivadas até a confluência adequada (A) e com o auxílio de uma ponteira de pipeta uma região é arranhada (B) com completa remoção da monocamada (C). Após lavagem e realização dos tratamentos/desafios em tempos determinados, as células que migraram para a região anteriormente raspada são contadas (D) com o auxílio de um microscópio óptico. Adaptado de *Hulkower et al.* (2011).

4.1.3- Modelo *in vitro* de migração celular: “Ensaio de Quimiotaxia”

Utilizamos neste ensaio, macrófagos murinos (RAW264.7) cultivados nas condições acima descritas até uma confluência de cerca de 80%. O meio de cultivo DMEM + antibióticos + 10%SFB foi substituído por DMEM + antibióticos sem SFB por 12h. Ao término deste tempo, as células das culturas foram dissociadas com o auxílio de um *cell scraper*, ressuspensas em DMEM sem SFB e a quantidade de células obtida foi determinada em contagem na câmara de Neubauer. Foi realizada uma diluição de forma que os 100µL a serem aplicados nos *inserts* contivessem 5×10^5 células. Foram utilizadas placas de 24 poços (*Corning Incorporated*) com membranas de policarbonato com poros de 5,0µm (Figura 8).

Em alguns dos experimentos foram utilizados como grupos: 1- DMEM sem SFB (controle negativo); 2- MCP-1/JE (50ng/mL) (controle positivo) (*Sigma*); 3- Plasmina (2µg/mL), 4- U0126 (15µM); 5- Leupeptina (25µg/mL); 6- Ácido Tranexâmico (0.1M); 7- U0126 (15µM) + Plasmina (2µg/mL); 8- Leupeptina (25µg/mL) + Plasmina (2µg/mL); e 9- Ácido tranexânico (0.1M) + Plasmina (2µg/mL).

Foram pipetados 650µL das soluções quimiotáticas ou testes em cada poço, em quadruplicada, com posterior inserção do *insert* e pipetagem, no interior do *insert*, da solução contendo 5×10^5 células (Figura 8). As placas foram incubadas na estufa sob as mesmas condições de cultivo das células por 4 horas. Ao término do tempo de 4h, os *inserts* foram retirados do contato com as soluções quimiotáticas ou testes, o meio contendo células foi aspirado de seus interiores com posterior lavagem com PBS 1X e limpeza da parte interna das membranas com hastes flexíveis com pontas de algodão. Cada *insert* teve suas células fixadas pela imersão em metanol por 10 minutos com posterior secagem. A coloração das células foi realizada pela imersão dos *inserts* no panótico 3 do kit Panótico Rápido (*LB Laborclin*) por 3 minutos. Ao término do tempo de coloração os *inserts* foram lavados com água destilada e as membranas retiradas e montadas nas lâminas de microscopia. A contagem das células que migraram foi realizada ao microscópio óptico no aumento de 40X com a contagem de cinco campos por membrana.

Também foram realizados experimentos utilizando como grupos: 1- DMEM sem SFB; 2- Plasmina (2µg/mL); e 3- RS504393 (10µM) (*Tocris Bioscience*) + Plasmina (2µg/mL). Todos os demais procedimentos foram idênticos aos anteriormente descritos para este tipo de ensaio.

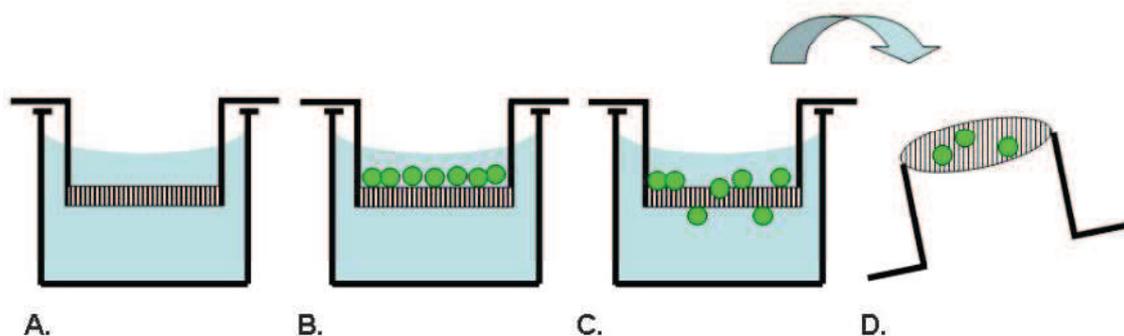


Figura 8– Ensaio de quimiotaxia. Uma membrana é utilizada para separar dois compartimentos em um poço (A). Os quimioatraentes/testes são adicionados ao poço (compartimento inferior) e as células são adicionadas no interior do *insert* (compartimento superior) (B) e migram através da membrana (C). A migração celular é medida pela contagem do número de células do lado inferior da membrana (D) Adaptado de Hulkower (2011).

4.2. Ensaio *in vivo*

4.2.1- Animais

Todos os procedimentos foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais (CETEA/UFMG), sob o número de protocolo 19/2011 (Anexo A). Foram utilizados camundongos BALB/C machos, com idade entre 8 e 10 semanas, provenientes do Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG (CEBIO-ICB/UFMG). Estes animais foram mantidos em condições padronizadas (luminosidade e temperatura) e com livre acesso a água e ração.

Também foram utilizados neste trabalho camundongos C57BL/6 machos deficientes para o gene que codifica o receptor CCR2 ($CCR2^{-/-}$), com idade entre 8 e 10 semanas. Eles foram cedidos pelo Dr. Fernando Cunha (USP- Ribeirão Preto) criados no biotério do Laboratório de Imunofarmacologia/ICB a partir da geração feita por Kuziel (Kuziel *et al.*, 1997).

4.2.2- Migração de leucócitos induzida por plasmina para a cavidade pleural

Na determinação da cinética de recrutamento de leucócitos para a cavidade pleural, camundongos BALB/C receberam uma injeção intrapleural (i.pl.) de PBS ou de plasmina (2µg/cavidade) como descrito em Sousa *et al.* (2009) e Vago *et al.* (2012). As células presentes na cavidade pleural foram coletadas em diferentes intervalos de tempo (6, 24 e 48h) através da realização do lavado pleural utilizando 2mL de PBS 1X. Alguns grupos receberam um pré-tratamento com inibidores específicos: U0126 (2mg/kg/i.pl.) (*Cell Signaling Technology*), Leupeptina (100µg/cavidade/i.pl.) (*Sigma-Chemicals*), RS504393 (2mg/kg/i.pl.) e SCH79797 (5mg/kg/i.p.) (*Tocris Bioscience*), 1 hora antes da injeção de Plasmina (2µg/cavidade). Foram realizados também experimentos injetando-se RP19979 (50µg/cavidade/i.pl.) (*GenScript*), o qual foi gentilmente cedido pelo Dr. André Klein (Universidade Federal de Minas Gerais). As doses dos inibidores foram escolhidas de acordo com os dados anteriores apresentados na literatura (Gong *et al.*, 2008; Souto *et al.*, 2011; Gobbetti *et al.*, 2012) ou a partir de experimentos de dose-resposta *in vivo* (U0126 - dados não mostrados).

4.2.3- Lavado pleural

Em todos os ensaios *in vivo*, acima citados, procedeu-se a lavagem da pleura 2 vezes com 1mL (cada lavagem) de PBS contendo EDTA (1mM). Este lavado foi centrifugado a 1.200RPM, por 5 minutos, a 4°C em centrífuga (*Thermo Scientific*). Os sobrenadantes foram congelados e posteriormente utilizados para ensaios de ELISA. O sedimento celular foi ressuspenso em 200µl de solução a 3% (p/v) de albumina sérica bovina (BSA) (*Sigma-Aldrich*) em PBS 1X. Alíquotas destas células foram diluídas 10 vezes em solução de lise de hemácias (*Solução de Turk - IMBRALAB*) e procedeu-se à realização da contagem total de células utilizando câmara de Neubauer. A partir dos resultados da contagem total, foram produzidas lâminas para contagem diferencial de células por cito-centrifugação de cerca de 50 mil células, ressuspenso em 100µL da solução de BSA, a 450rpm por 5 minutos a temperatura ambiente em cito centrífuga (Shandon III). Após a secagem, estas

lâminas foram coradas com May-Grumwald-Giemsa utilizando o kit Panótico Rápido (*LB Laborclin*). As análises e contagens dos diferentes tipos celulares: mononucleares (macrófagos, monócitos e linfócitos), neutrófilos e eosinófilos, foram realizadas segundo critérios morfológicos padronizados para identificar os tipos celulares (Carvalho e Silva, 1988; Franco, 2004; Zago, Falcão e Pasquini, 2004) no aumento de 100 vezes do microscópio ótico e através de três contagens em campos aleatórios totalizando 100 células em cada contagem.

Ao restante das soluções de células (não utilizadas para a confecção das lâminas para contagem diferencial) foram adicionados 1mL de PBS 1X com posterior centrifugação a 1.200RPM, por 5 minutos, a 4°C em centrífuga (*Thermo Scientific*). Os sobrenadantes foram descartados e os *pellets* de células obtidos foram utilizados para obtenção de extratos celulares.

4.3- Obtenção dos extratos proteicos

Ao término dos experimentos *in vitro* e *in vivo* as células cultivadas ou obtidas no lavado da cavidade pleural foram lisadas pela adição de 500µL ou 100µL de solução de lise, respectivamente, (0,5% p/v de NP-40, 100mM de Tris/HCl pH 8,0, 10% de glicerol, 0,2 mM de EDTA, 1mM de NaVO₃, 1mM de DTT, 1mM de PMSF, 200mM de NaCl, 25 mM de NaF, leupeptina e aprotinina), e deixadas em banho de gelo por 15 minutos. Posteriormente, o lisado foi centrifugado a 12.000RPM em microcentrífuga por 15 minutos a 4°C, sendo o sobrenadante aliqotado e guardado à -20°C até o momento de uso.

4.4- Quantificação de proteínas dos extratos proteicos

Foi utilizado o kit *Bio-Rad Protein Assay* (*Bio-Rad Laboratories*) baseado no método de Bradford para dosagem das proteínas totais obtidas das células dos experimentos *in vitro* e *in vivo*. Estes ensaios foram feitos em placas de 96 poços (*NUNC*) específicas para testes colorimétricos. Para tal foram

adicionados 2 μ L de cada amostra à 200 μ L do corante diluído 5 vezes em água destilada, em duplicatas. Paralelamente foram construídas curvas padrão através da diluição de uma solução padrão de BSA. Após 5 minutos de incubação, a leitura foi feita em espectrofotômetro (*Spectra Max 190, Molecular Devices*) no comprimento de onda de 595nm. As absorbâncias das amostras foram comparadas com as absorbâncias das curvas padrão construídas e as concentrações dos extratos foram calculadas e expressas em mg/mL.

4.5- Western Blot para análise da expressão de P-ERK 1/2, P-I κ B- α e β -actina.

Para a realização do ensaio de Western Blot foram aliqüotados 40 μ g dos extratos obtidos, com posterior desnaturamento das proteínas pela mistura com LB5X (10% SDS, 10% β -mercaptoetanol, 40% glicerol, 0.05% azul de bromofenol, 0.25M Tris/HCl pH 6,8) e a exposição a 100°C durante 5 minutos em banho seco (*LGC biotechnology*). Os fracionamentos das proteínas ocorreram em géis de 10% de poliacrilamida/SDS com subsequente transferência para membranas de nitrocelulose (*HybondTM ECLTM, GE Healthcare*). Posteriormente, as membranas foram bloqueadas com PBS-*Tween* 0,1% contendo 5% de leite em pó desnatado por, no mínimo, 1 hora e lavadas com PBS-*Tween*. Estas membranas foram incubadas com os anticorpos de interesse a temperatura de 4°C por uma noite. Os anticorpos utilizados no presente projeto foram anti-P-ERK1/2, anti-P-I κ B- α (1:1000) (ambos *Cell Signaling Technology*), anti- β -actina (1:5000) (*Sigma-Aldrich*) e anticorpos secundários conjugados à peroxidase (1:3000) (*Santa Cruz Biotechnology*).

Após novas lavagens com PBS/*Tween* e incubações, durante 1 hora, à temperatura ambiente, com os respectivos anticorpos secundários (1:3000) ligados à peroxidase, as membranas foram incubadas em solução reveladora *ECL-Plus (GE Healthcare)*, expostas contra filme de raios-X (*Hyperfilm ECL, GE Healthcare*) e reveladas utilizando-se revelador e fixador (*Kodak*), de acordo com indicações do fabricante.

4.6- Determinação da expressão de citocinas/quimiocinas por ELISA

Os níveis de MCP-1/CCL2, IL-1 β , TNF- α , IL-6, KC/CXCL-1 e MIP-2/CXCL-2 foram dosados nos sobrenadantes congelados, obtidos a partir da primeira centrifugação das células do lavado pleural, pela utilização de kits de ELISA murino da R&D Systems (*DuoSet*). Na realização dos ensaios, cada um dos anticorpos de captura foi diluído em PBS 1X e pipetado nas placas de 96 poços. Na sequência, as placas foram vedadas e incubadas a 4°C em geladeira por 18-24 horas. Ao término da sensibilização, as placas foram lavadas com solução de PBS-Tween 0,1% e bloqueadas por 2 horas com solução a 1% de BSA em PBS 1X, sob agitação. Posteriormente, procederam-se novas lavagens com PBS-Tween 0,1% e, paralelamente, foram preparadas as diluições seriadas das curvas padrão para cada análise. Foram pipetados os padrões, os brancos (ambos em duplicata) e as amostras (em triplicata) em cada placa que, na sequência, foram vedadas e incubadas, novamente a 4°C em geladeira por 18-24 horas. Após outras lavagens, os anticorpos de detecção (diluídos em 0,1% de BSA/PBS) foram adicionados às placas e estas foram incubadas por 2 horas à temperatura ambiente. Novamente as placas foram lavadas e as detecções foram realizadas pela adição de estreptavidina conjugada à peroxidase (*HRP-Streptavidin Pharmingen* - 1:4000) em cada poço com posterior incubação a temperatura ambiente, por 30 minutos, sob agitação. As revelações ocorreram após novas lavagens e adição do substrato OPD (*o-phenylenediamine dihydrochloride*) (*Sigma*). Após cerca de 20 minutos as reações foram interrompidas com H₂SO₄ (1M). As leituras foram realizadas no espectrofotômetro (*Spectra Max 190, Molecular Devices*) no comprimento de onda de 490nm. As colorações obtidas pelas reações foram diretamente proporcionais às concentrações das citocinas/quimiocinas nas amostras analisadas. As absorbâncias obtidas pela leitura foram comparadas as curvas padrões contendo concentrações conhecidas de cada citocina/quimiocina analisadas fornecidas pelo kit.

4.7- Análise do perfil celular por citometria de fluxo

Após 48h do desafio com plasminogênio, plasmina ou PBS (veículo) foi realizado o lavado pleural (anteriormente descrito) e a solução obtida foi centrifugada a 1.500 RPM por 10 minutos a 4°C em centrífuga (*Thermo Scientific*). Os sobrenadantes foram congelados para os ensaios de ELISA descritos na sessão anterior.

Foi realizada a lise hipotônica das hemácias presentes no sedimento celular, com posterior centrifugação a 1.200RPM, por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* obtido foi ressuspenso em 200µL de PBS. Na sequência, foi realizada a contagem total de células viáveis em câmara de Neubauer e utilização de Azul de Tripán. As populações de monócitos/macrófagos (F4/80⁺ / GR1^{+/-}), neutrófilos (GR1⁺ / F4/80⁻) e linfócitos (CD3⁺), foram analisadas pelo plaqueamento de aproximadamente 200.000 células/poço em placas de fundo em “U”. Foram adicionados, em cada poço, 40 µL de anticorpos monoclonais fluorescentes, F4/80 (PE-Cy7, eBioscience), GR1 (PE, Biolegend), CD45 (PE-Cy5, BD Biosciences, USA) e CD3 biotinilado, para marcação de superfície, inclusive os controles negativos (controle de isotipo) previamente preparados e posterior incubação por 30 minutos a 4°C. Ao término do tempo, foram pipetados 150 µL/poço de PBS 1X gelado. Na sequência, as placas foram centrifugadas durante 8 minutos, a 1.300RPM, a 4°C. Ao final desta etapa as placas foram “flicadas”. Nos poços que continham anticorpo biotinilado foram acrescentados 20µL de solução de Streptavidina-APC. Após a marcação, as células foram lavadas para a remoção de anticorpos não ligados, ressuspensas em PBS e fixadas com paraformaldeído 4% em PBS/Azida 0.1%.

As células marcadas foram adquiridas no citômetro FACScanto II (*BD Biosciences, USA*), considerando 40 a 50 mil eventos. Os dados adquiridos foram analisados no programa FlowJo (*Tree Star Company*) e a calibração do aparelho foi realizada com células não marcadas no dia da aquisição bem como a marcação dos *gates* contendo as diferentes populações leucocitárias.

As populações analisadas foram selecionadas através da delimitação de *gates* em que as células em estudo situam-se de acordo com o seu tamanho e granulosidade, separando linfócitos de macrófagos e neutrófilos. No *gate*

contendo as populações de macrófagos e neutrófilos foram separadas as células positivas para F4/80 das positivas para GR1.

4.8- Análises estatísticas

Os dados obtidos foram analisados estatisticamente por análise de variância (*One-way ANOVA*), seguida do teste Newman-Keuls, e os resultados com apenas dois grupos foram avaliados pelo Teste t de Student.

As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas se $P < 0.05$. Os resultados são apresentados como média \pm EPM (Erro padrão da média). As análises estatísticas e os gráficos foram realizados utilizando-se o *software GraphPad Prism 5.0*.

5. – RESULTADOS

5.1- Plasmina induz migração celular *in vitro* em culturas de fibroblastos embrionários murinos (MEF) e de macrófagos murinos (RAW 264.7).

Experimentos com culturas de células MEF e RAW 264.7 submetidas ao ensaio de ranhura e posteriormente tratadas com plasmina (2 μ g/mL) demonstraram que esta proteína foi capaz de induzir maior migração celular para a região cuja monocamada foi removida, quando comparada com as células não tratadas com Pla. Também foi demonstrado que esta migração é tempo dependente, uma vez que, quanto maior o tempo de exposição das células ao tratamento com plasmina, maior também foi a quantidade de células que migraram (Figura 9 A, B, C e D).

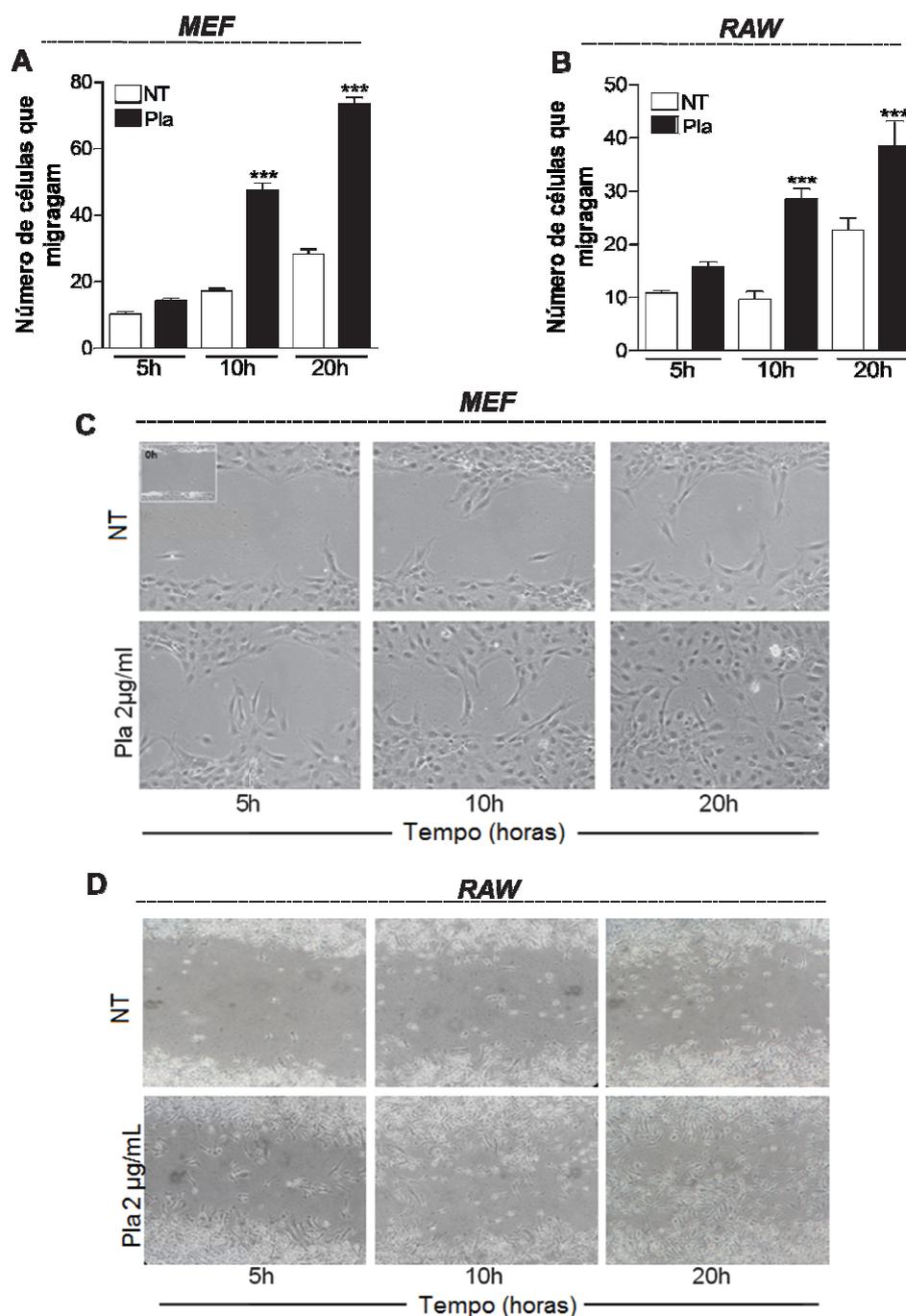


Figura 9– Migração de fibroblastos embrionários murinos (MEF) e macrófagos murinos (RAW 264.7) após desafio com plasmina. Culturas de MEF e RAW 264.7 foram submetidas ao ensaio de ranhura, no qual suas monocamadas foram riscadas com auxílio de uma ponteira de 200µL. Em seguida, um grupo foi tratado com plasmina (2µg/mL) e o outro permaneceu sem tratamento. Após os tempos indicados (5, 10 e 20h), as monocamadas foram fixadas e as células que migraram para a região anteriormente arranhada foram contadas (A), (B), (C) e (D). Os resultados são expressos como número de células que migraram e estão apresentados como a média \pm EPM de pelo menos 3 experimentos. ***, $P < 0,001$ quando comparado com as culturas não tratadas, em cada tempo.

5.2- Plasmina induz migração celular de MEF e RAW 264.7 de forma dependente da via MEK/ERK 1/2

Em estudos anteriores do nosso grupo de pesquisa, foi demonstrado que plasmina e o plasminogênio são capazes de ativar a via MEK/ERK, sendo esta via envolvida na expressão gênica de fatores de transcrição induzidos por estes agonistas, em fibroblastos e monócitos humanos (De Sousa *et al.*, 2005; Sousa, Brasil, *et al.*, 2005; Sousa, Silva, *et al.*, 2005). Também já é bem estabelecida na literatura a participação da via MEK/ERK na migração celular (Sepe *et al.*, 2013). Assim, buscou-se avaliar se a via MEK/ERK também estaria envolvida na migração celular induzida pela plasmina. Para isso, foi utilizado o pré-tratamento com um inibidor de MEK/ERK, denominado U0126 (15 μ M). Tais experimentos demonstraram que o U0126 foi capaz de abolir a migração induzida pela plasmina em culturas de MEF e RAW 264.7, evidenciando o envolvimento da via MEK/ERK1/2 na migração celular induzida pela Plasmina (Figura 10 A e B).

Paralelamente foram realizadas análises de Western Blot que mostraram a indução, pela plasmina, da fosforilação de ERK e que este efeito foi inibido pelo pré-tratamento com o U0126 (Figura 10 C e D). Tais achados sugerem que a via MEK/ERK possui um papel importante na migração celular de MEF e RAW 264.7 promovida pela plasmina.

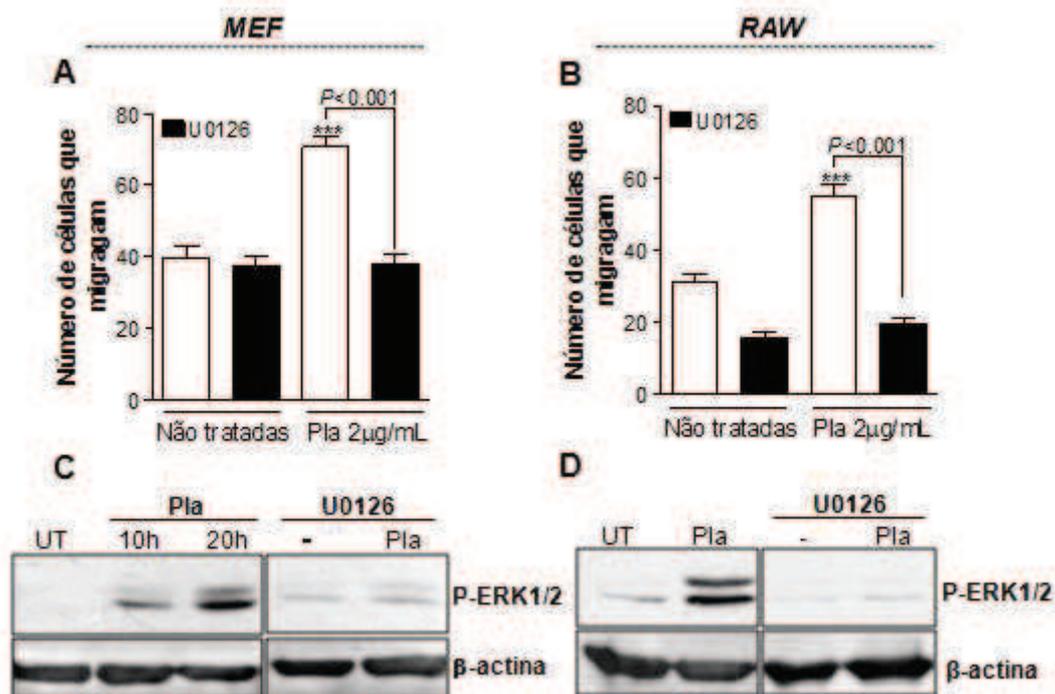


Figura 10– Efeito do pré-tratamento com U0126 na migração de fibroblastos embrionários murinos (MEF) e macrófagos murinos (RAW 264.7) desafiados com plasmina. Culturas de MEF e RAW foram pré-tratadas com U0126 (15 μM) ou não receberam o pré-tratamento. Após 1h as monocamadas de células foram submetidas ao ensaio de ranhura. Em seguida um grupo foi desafiado com plasmina (2 μg/mL) e o outro permanece sem tratamento. Após 10h de incubação as culturas foram processadas para a contagem das células que migraram para a região raspada (A) e (B). Os resultados são expressos como número de células que migraram e estão apresentados como a média ± EPM de pelo menos 3 experimentos. ***, $P < 0,001$ quando comparado com as culturas não tratadas. Paralelamente, foram realizadas extrações de proteínas totais para a análise por Western Blot de P-ERK 1/2 (C) e (D). As autorradiografias apresentadas são representativas de três experimentos independentes.

5.3- A atividade de serina protease e os sítios de ligação à lisina são necessários para a migração *in vitro* promovida pela Plasmina

Sabendo que a atividade proteolítica da plasmina é importante em vários processos, incluindo migração celular (Syrovets, Lunov e Simmet, 2012) e que o plasminogênio e a plasmina podem se ligar às células, fibrina e outras proteínas da matriz extracelular através de seus sítios de ligação à lisina (LBS- do inglês *Lisine Binding sites*) presentes nos domínios *Kringle* destas proteínas (Plow *et al.*, 1995; Castellino e Ploplis, 2005; Syrovets, Lunov e Simmet, 2012), resolvemos investigar a importância destes fatores na migração celular *in vitro* induzida pela plasmina. Para isso, foram utilizados os tratamentos com o inibidor de serina protease, leupeptina (25µg/mL), com o análogo de lisina, ácido tranexâmico (0.1M) e com o inibidor de MEK/ERK, (U0126, 15µM – usado aqui como controle da inibição). Utilizando os tratamentos no ensaio de ranhura, pode-se perceber que estes foram capazes de reduzir, significativamente, a migração de MEF e RAW 264.7 para a região arranhada (Figura 11 A e B) e de inibir a fosforilação de ERK 1/2 em ambos os tipos celulares. A Figura 11C é um western blot representativo de P-ERK1/2 obtido com culturas de RAW 264.7.

Embora o ensaio de ranhura em monocamada celular seja muito utilizado para avaliar migração celular, o procedimento possui algumas limitações, como por exemplo, não nos permite diferenciar com exatidão migração de proliferação celular e falta um gradiente quimiotático. Desta forma, nosso próximo passo foi validar os resultados anteriormente obtidos utilizando ensaio de quimiotaxia para os mesmos grupos descritos acima. Como pode ser observado na Figura 11D, os experimentos de quimiotaxia e de ranhura apresentaram resultados similares.

A partir dos resultados obtidos pode-se inferir que a atividade de serina protease, os sítios de ligação à lisina e a via MEK/ERK 1/2 são importantes na migração celular *in vitro* induzida pela plasmina.

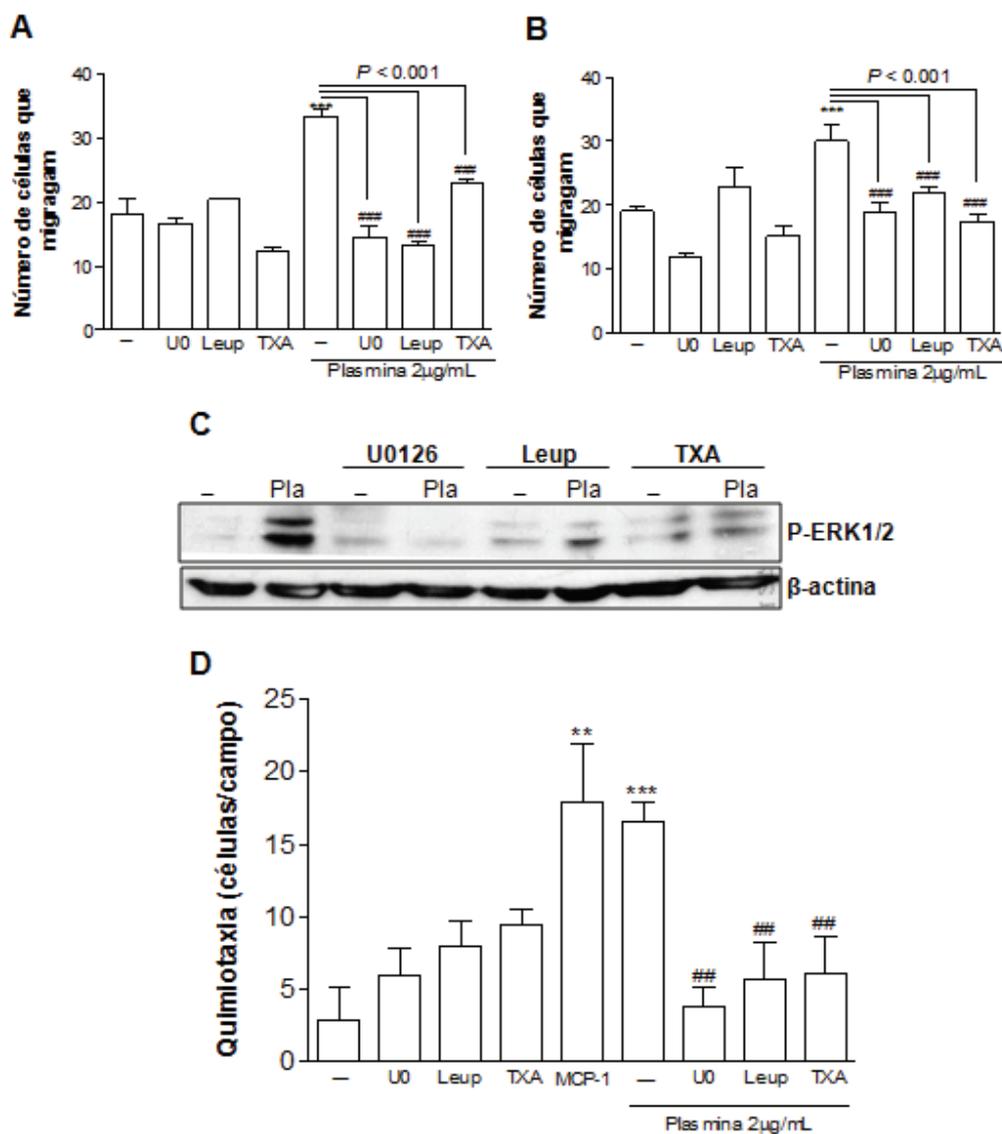


Figura 11- Efeito da Leupeptina e do Ácido Tranexâmico na migração de fibroblastos e macrófagos murinos induzida por plasmina. Culturas de MEF ou RAW foram cultivadas em placas de 6 poços e submetidas ao ensaio de ranhura. Em seguida, um grupo permaneceu sem tratamento, outros foram tratados com plasmina (2µg/mL), plasmina (2µg/mL) pré-incubada com Leupeptina (25µg/mL), plasmina (2µg/mL) pré-incubada com Ácido Tranexâmico (0.1M), durante 1 hora a 37°C ou foram pré-tratados com U0126 (15µM). Após incubação de 10h a 37°C, as culturas foram processadas para a contagem das células que migraram para a região arranhada: MEFs (A) e RAW 264.7 (B). Culturas de RAW 264.7 também foram processadas para a extração de proteínas totais com posterior análise de P-ERK 1/2 por Western Blot (C). A autorradiografia apresentada é representativa de dois experimentos independentes. Ensaio de quimiotaxia (D) foram executados utilizando células RAW com grupos idênticos aos descritos acima, sendo que as células foram incubadas durante 4 horas a 37°C para migrar, através de membranas de polycarbonato, em direção a um gradiente quimiotático constituído da Pla (2µg/mL) ou da quimiocina MCP-1 (50ng/mL-controle positivo). Cinco campos foram contados. Todos os resultados foram expressos como número de células que migraram e estão apresentados como a média ± EPM de pelo menos 3 experimentos. **, $P < 0,01$ ou ***, $P < 0,001$ quando comparado as células não tratadas e ##, $P < 0,01$ ou ###, $P < 0,001$ quando comparado a células tratadas com plasmina.

5.4- Plasmina induz migração de leucócitos para a pleura de camundongos

Para avaliar a habilidade da plasmina de induzir migração de leucócitos, bem como avaliar a cinética deste influxo leucocitário *in vivo*, foram realizados experimentos nos quais camundongos BALB/C receberam injeção intrapleural de plasmina (2µg/cavidade). O desafio com plasmina foi capaz de promover o influxo celular para a cavidade, de forma tempo-dependente, com aumento significativo de número de células em 24 e 48h (Figura 12A).

Em consonância com publicações anteriores de estudos que utilizaram o modelo de inflamação intraperitoneal com tioglicolato em camundongos deficientes para o gene que codifica plasminogênio (Ploplis *et al.*, 1998; Gong *et al.*, 2008), observando as contagens de mononucleares e comparando-as aos perfis das contagens totais, pode-se inferir que essa migração induzida pela plasmina foi praticamente exclusiva de mononucleares (Figura 12A), não havendo, portanto, recrutamento de neutrófilos para a cavidade pleural nos tempos analisados.

Para investigar o *status* de ativação da via MAPK ERK1/2 e de NF-κB nos leucócitos recrutados pela plasmina, obtivemos extratos proteicos de células provenientes do estudo cinético e procedemos às análises de Western Blot para avaliação da fosforilação de ERK 1/2 e de IκB-α. O envolvimento da via MEK/ERK foi determinado por via direta (fosforilação de ERK1/2). O envolvimento de NF-κB foi inferido pela fosforilação de seu inibidor (IκB-α), que uma vez fosforilado libera NF-κB para se dirigir ao núcleo e promover a transcrição gênica. Corroborando os achados *in vitro*, observou-se que a plasmina foi capaz de induzir a fosforilação de ERK1/2 e de IκB-α, também de forma tempo dependente, sugerindo a participação dessas vias de sinalização no processo migratório induzido por esta protease (Figura 12B).

Para verificar se o plasminogênio, precursor da plasmina, também seria capaz de induzir influxo leucocitário *in vivo*, foram realizados experimentos nos quais camundongos BALB/C receberam injeção intrapleural de plasminogênio (2µg/cavidade). Este desafio foi capaz de promover o influxo celular para a cavidade com aumento significativo de número de células em 48h (Figura 12C).

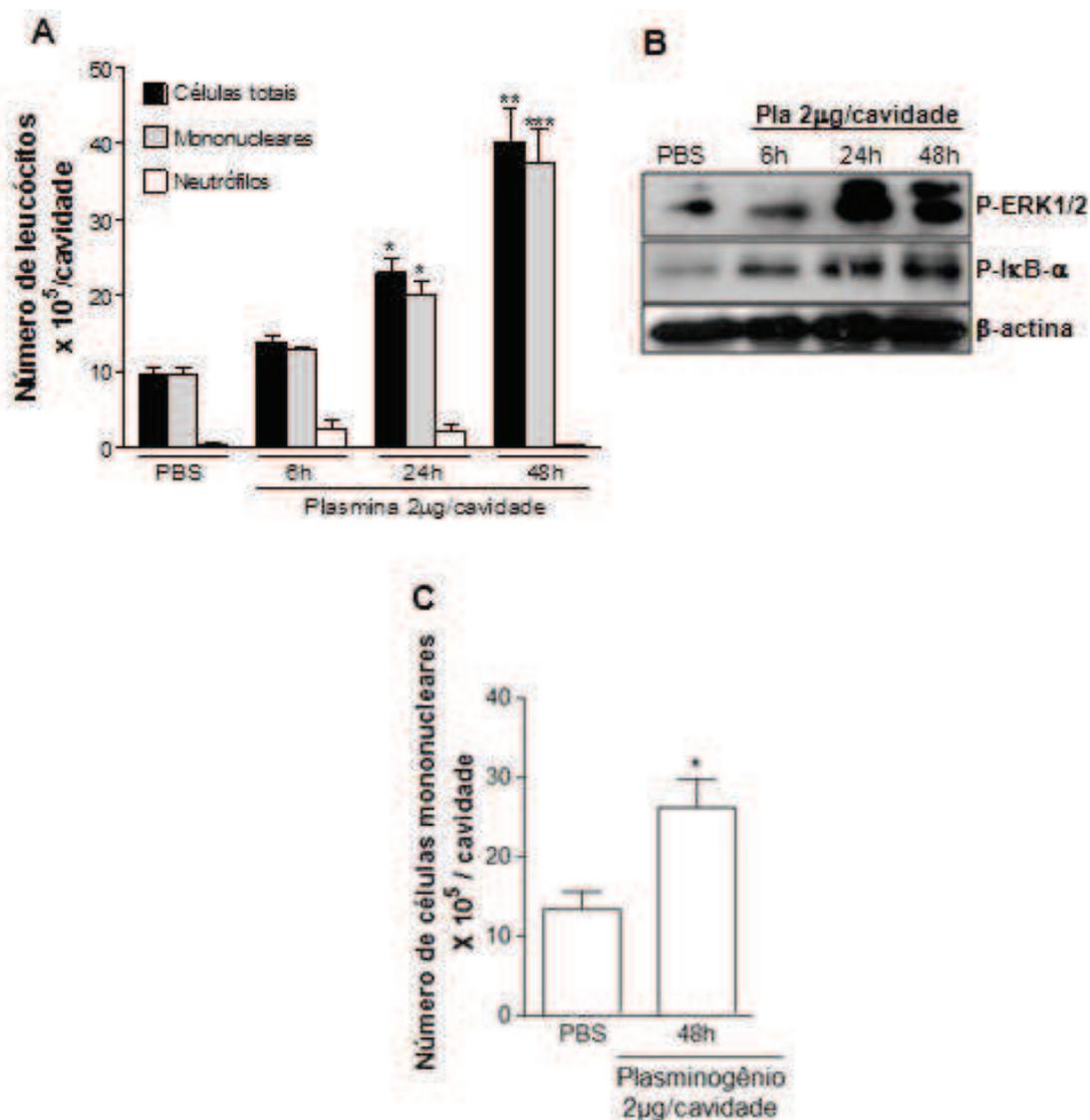


Figura 12– Cinética do recrutamento de leucócitos para a pleura após o desafio com plasmina ou plasminogênio. Camundongos BALB/C foram desafiados pela via intrapleurar com uma injeção de plasmina (2µg/cavidade) ou PBS (veículo). As células que migraram para a cavidade foram coletadas em diferentes tempos após a injeção (6, 24 e 48h) e processadas para contagem total e diferencial de leucócitos (A). Estas células também foram processadas para a extração de proteínas totais com posterior análise de P-ERK 1/2 e P-IκB-α por Western Blot (B). A autorradiografia apresentada é representativa de dois experimentos independentes. Camundongos BALB/C foram desafiados pela via intrapleurar com uma injeção de plasminogênio (2µg/cavidade) ou PBS (veículo). As células que migraram para a cavidade foram coletadas após 48h e processadas para contagem total e diferencial de leucócitos (C). Os resultados foram expressos em número de células por cavidade e mostrados como média ± EPM. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$, quando comparados com os camundongos desafiados com PBS (veículo).

Com o objetivo de elucidar melhor o tipo de leucócitos recrutados, após 48h do desafio com plasmina ou plasminogênio, foram realizadas experimentos de citometria de fluxo utilizando-se os marcadores de superfície: F4/80, que caracterizam monócitos/macrófagos, GR1 que caracterizam neutrófilos, além das marcações para a população de leucócitos totais (CD45) e linfócitos (CD3). Nestas análises houve um aumento estatisticamente significativo na porcentagem de monócitos/macrófagos (células F4/80 positivas) recrutados pela plasmina e pelo plasminogênio, quando comparados à injeção do veículo (PBS) (Figura 13 A e B). De acordo com os dados obtidos pela microscopia (Figura 12A), a injeção de plasmina ou plasminogênio não induz aumento significativo na população de linfócitos (células CD3 positivas) ou de granulócitos (GR1 positivas) (dado não apresentado).

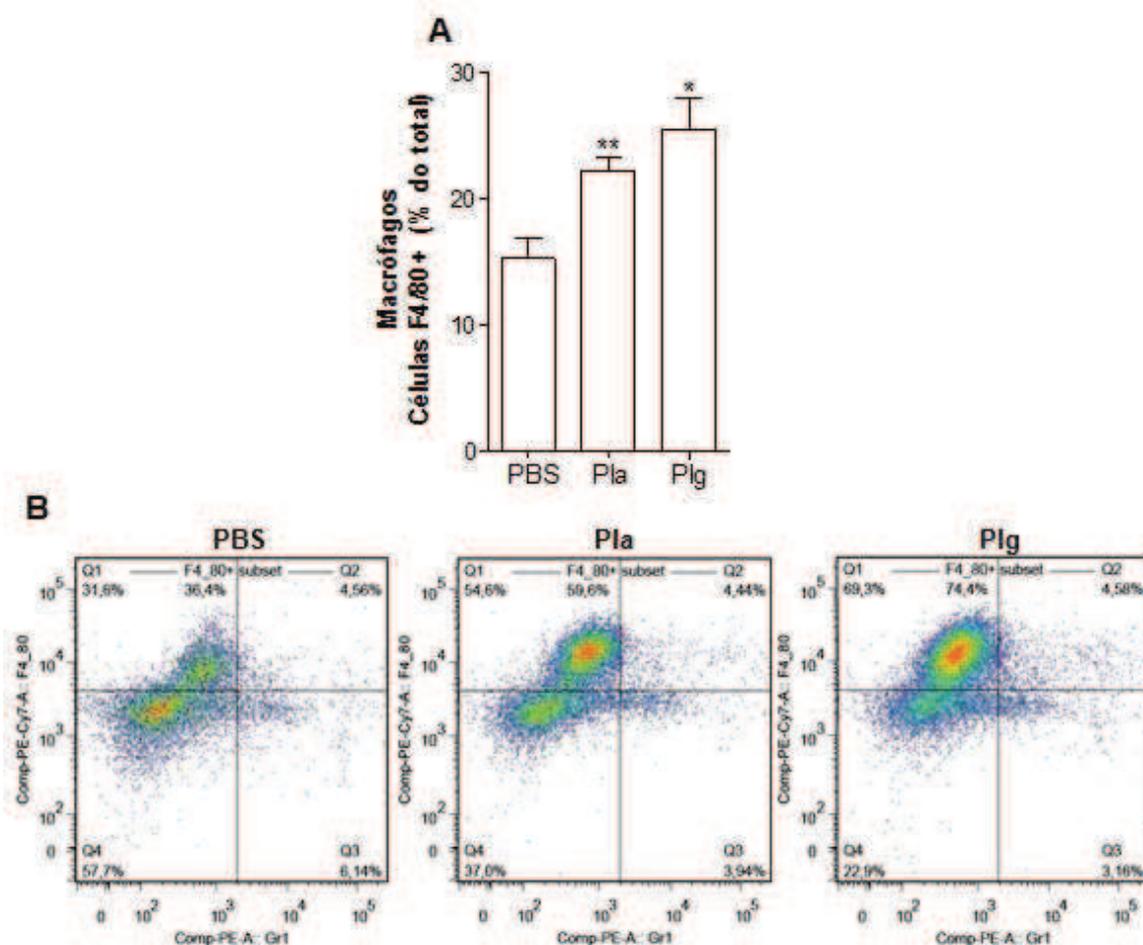


Figura 13– Perfil celular dos leucócitos que migraram para a pleura após o desafio com plasmina ou plasminogênio. Camundongos BALB/C foram desafiados pela via intrapleurar com uma injeção de plasmina (2 μ g/cavidade) ou plasminogênio (2 μ g/cavidade) ou PBS (veículo). As células que migraram para a cavidade foram coletadas após 48h e processadas para análise do perfil celular por citometria de fluxo. Porcentagem de macrófagos no lavado pleural (células F4/80+) (A) e perfil de expressão dos marcadores F4/80 e Gr1 (B). Os resultados foram expressos em porcentagem do total de células por cavidade e mostrados como média \pm EPM. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$, quando comparados com os camundongos desafiados com PBS (veículo).

5.5- O desafio com plasmina aumenta os níveis de IL-6 e de MCP-1/CCL-2 no exudato pleural, mas não altera os níveis de IL-1 β , TNF- α , MIP-2/CXCL2 e KC/CXCL-1.

Estudos anteriores conduzidos *in vitro* demonstraram que a plasmina foi capaz de ativar monócitos, desencadear a liberação de mediadores lipídicos, citocinas e quimiocinas (Weide *et al.*, 1996; Syrovets *et al.*, 2001; Burysek, Syrovets e Simmet, 2002). Com base nestas informações e devido à importância de citocinas e quimiocinas na migração de células inflamatórias, investigamos os níveis pleurais das citocinas IL-1 β , IL-6 e TNF- α , e das quimiocinas MCP-1/CCL2, KC/CXCL-1 e MIP-2/CXCL-2, às quais estão envolvidas na migração de leucócitos. Para a realização dos ELISA foram utilizados os sobrenadantes das células obtidas nos experimentos de cinética de recrutamento induzida pela plasmina. Pela análise do gráfico pode-se observar que a plasmina foi capaz de induzir a elevação dos níveis de IL-6 e de MCP-1/CCL2, mas não alterou os níveis pleurais de TNF- α , IL-1 β , MIP-2/CXCL2 e KC/CXCL-1 nos tempos estudados (Figura 14).

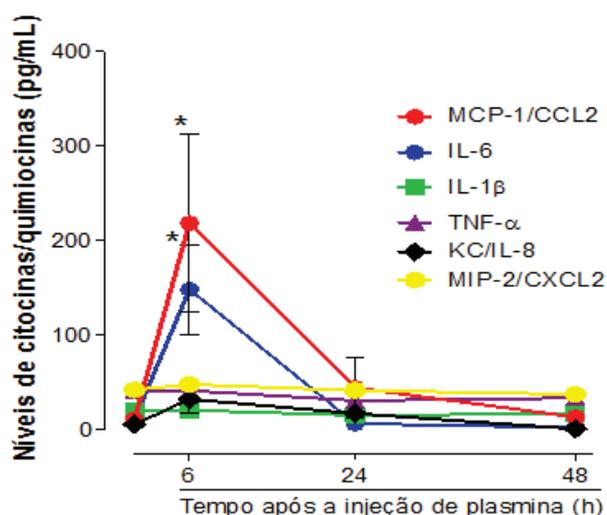


Figura 14– Níveis de citocinas e quimiocinas no lavado pleural de camundongos desafiados com plasmina Camundongos BALB/C foram desafiados pela injeção de plasmina (2 μ g/cavidade) ou PBS (veículo), via intrapleural. As células que migraram para a cavidade foram coletadas em diferentes tempos após a injeção (6, 24 e 48h) e os sobrenadantes obtidos foram utilizados para análises por ELISA dos níveis pleurais de MCP-1/CCL2, IL-6, IL-1 β , TNF- α , KC/CXCL-1 e MIP-2/CXCL-2. Os resultados estão expressos como níveis de citocinas em pg/mL e são apresentados como média \pm EPM. *, $P < 0.05$ quando comparados aos camundongos injetados com PBS.

5.6- A atividade de serina protease da plasmina é importante para a indução da migração celular *in vivo*

A partir dos resultados obtidos *in vitro* (Figura 11) e com o objetivo de analisar se a atividade de serina protease da plasmina seria importante para a indução do influxo celular *in vivo*, foram executados experimentos utilizando o pré-tratamento com o inibidor de serino-protease Leupeptina (100 μ g/cavidade) 1h antes da injeção de plasmina (2 μ g/cavidade). Pela análise do gráfico obtido (Figura 15) pode-se observar que a Leupeptina foi capaz de inibir o influxo leucocitário promovido pela plasmina, reduzindo a níveis comparáveis aos dos grupos controle.

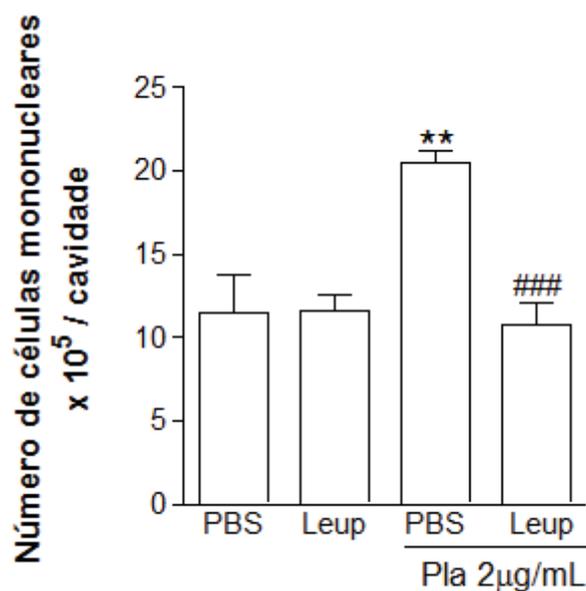


Figura- 15- Efeito da Leupeptina na migração de leucócitos para a pleura de camundongos desafiados com plasmina. Camundongos BALB/C foram pré-tratados pela injeção de leupeptina (100 μ g/cavidade) ou PBS (veículo), via intrapleurar por 1h. Posteriormente foram desafiados pela injeção de plasmina (2 μ g/cavidade, i.pl.) ou PBS. As células que migraram para esta cavidade foram coletadas após 24h e processadas para contagem de leucócitos. Os resultados das contagens foram expressos em número de células por cavidade e mostrados como média \pm EPM. **, $P < 0.001$, quando comparados com os camundongos injetados com PBS e ###, $P < 0.001$, quando comparados com os camundongos pré-tratados com PBS e desafiados com plasmina.

5.7- A via MEK/ERK está envolvida na migração celular *in vivo* induzida pela plasmina

Uma vez que a via MEK/ERK mostrou-se ativada em concomitância com o influxo de células mononucleares para a pleura de camundongos, e por conhecermos a importância desta via para migração de macrófagos murinos (Sawatzky *et al.*, 2006), nosso próximo objetivo foi avaliar a importância de tal via na migração *in vivo*, induzida pela plasmina. Para tanto, os animais foram pré-tratados com o inibidor de MEK/ERK, U0126 (2mg/kg/i.pl.) antes da injeção de plasmina. Pode-se observar um aumento do influxo de mononucleares induzido pelo tratamento com plasmina e a inibição desse mesmo influxo no grupo pré-tratado com o U0126, (Figura 16A).

Também foram realizados ensaios de Western Blot para a análise da fosforilação de ERK e I κ B- α . Em tais experimentos pode-se observar a indução, exercida pela plasmina, da fosforilação destas proteínas e o pré-tratamento com o U0126 sendo capaz de inibir a fosforilação, confirmando a participação da via da MAPK MEK/ERK na indução da migração celular (Figura 16B).

Quando os níveis de MCP-1/CCL-2 foram dosados, por ELISA, nos sobrenadantes de experimentos realizados após 6h da injeção com plasmina, observou-se que a plasmina foi capaz de aumentar os níveis desta quimiocina (como demonstrado em experimentos anteriores - Figura 14) e que o pré-tratamento com U0126 foi capaz de abolir este efeito (Figura 16C). Tomados em conjunto, os dados sugerem a participação da via MEK/ERK na indução da expressão de CCL2, um mecanismo já mostrado para trombina (Deng *et al.*, 2008).

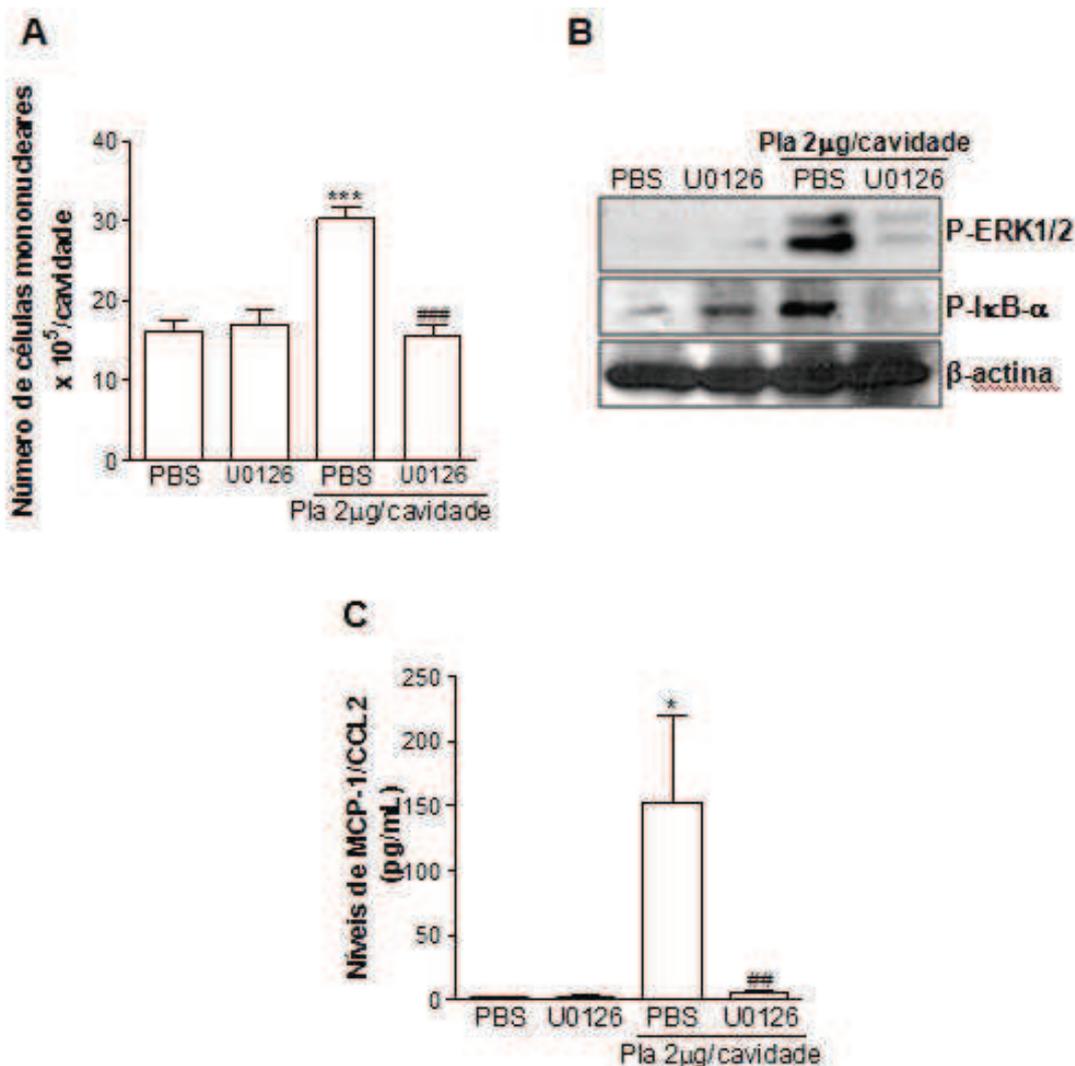


Figura 16- Envolvimento da via MEK/ERK na migração induzida por plasmina *in vivo*. Camundongos BALB/C foram pré-tratados pela injeção de U0126 (2mg/kg/i.pl.) ou PBS (veículo) por 1h. Posteriormente foram desafiados pela injeção de plasmina (2µg/cavidade, i.pl.) ou PBS. As células que migraram para a cavidade pleural foram coletadas após 24h e processadas para contagem de leucócitos (A), para a realização do ensaio de Western Blot com o objetivo de analisar P-ERK1/2 e P-IκB-α (B) e para a dosagem de MCP-1/CCL-2 por ELISA, sendo que neste último o tempo de desafio foi de 6h (C). Os resultados das contagens foram expressos em número de células por cavidade e mostrados como média ± EPM. *, $P < 0.05$ ***, $P < 0.001$, quando comparados com os camundongos injetados com PBS e ###, $P < 0.001$, quando comparados com os camundongos pré-tratados com PBS e desafiados com plasmina.

5.8- O receptor ativado por protease-1 (PAR-1) está envolvido na migração celular induzida pela plasmina *in vivo*

Sabendo que a atividade de serina protease da plasmina é necessária para a migração celular *in vitro* (Figura 11) e *in vivo* (Gong *et al.*, 2008) e que PAR-1 está envolvido em algumas atividades exercidas pelo plasminogênio/plasmina (Pendurthi *et al.*, 2002; Majumdar *et al.*, 2004; Mitchell *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2007), procedeu-se à realização de experimentos para investigar se PAR-1 estava envolvido na migração de leucócitos induzida por plasmina *in vivo*. A administração intrapleural do agonista seletivo de PAR-1, RP19979 (50µg/cavidade), produziu efeitos semelhantes ao da plasmina, isto é, promovendo um influxo de células mononucleares para a cavidade pleural dos camundongos (Figura 17A). Também foram executados experimentos utilizando o pré-tratamento de animais com o antagonista de PAR-1, SCH79797 (5mg/kg/i.p.), antes do desafio com plasmina (2µg/cavidade), com posterior contagem de células e realização de Western Blot. Tais experimentos mostraram que a inibição de PAR-1 impediu o influxo de células mononucleares e a fosforilação de ERK 1/2 e IκB-α induzidos pela plasmina (Figura 17 B e C).

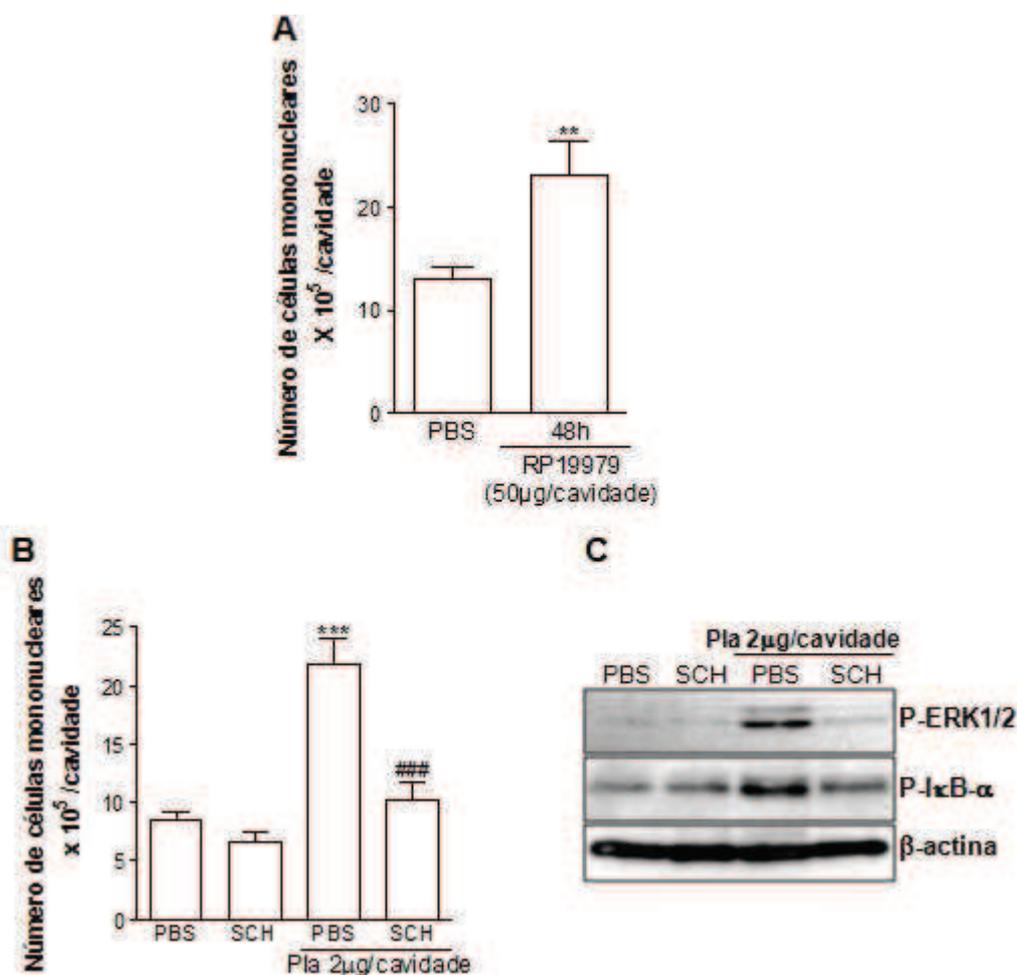


Figura 17– Efeito do agonista (RP19979) e do antagonista (SCH79797) de PAR-1, sobre a migração de mononucleares induzida por plasmina. Camundongos BALB/C receberam a injeção de RP19979 (50µg/cavidade) via intrapleurar. Após 48h as células que migraram para a cavidade foram coletadas e processadas para contagem de leucócitos (A). Camundongos BALB/C foram pré-tratados com SCH79797 (5mg/Kg/i.p.) ou PBS, durante 1h. Posteriormente foram desafiados pela injeção de plasmina (2µg/cavidade/i.pl.) ou PBS. As células que migraram para esta cavidade foram coletadas após 24h e processadas para contagem de mononucleares (B) e para a realização do ensaio de Western Blot com o objetivo de analisar P-ERK1/2 e P-IκB-α (C). Os resultados das contagens foram expressos em número de células por cavidade e mostrados como média ± EPM. **, $P < 0.01$, ***, $P < 0.001$, quando comparados com os camundongos injetados com PBS e ###, $P < 0.001$, quando comparados com os camundongos pré-tratados com PBS e desafiados com plasmina.

5.9- O Receptor CCR2 está envolvido na migração induzida pela plasmina

A partir dos resultados anteriormente obtidos, nos quais a plasmina promoveu aumento nos níveis de MCP-1/CCL2 e sabendo que esta quimiocina é um quimioatraente de monócitos e linfócitos atuando no receptor CCR2 (Kuziel *et al.*, 1997), foram realizados experimentos com camundongos deficientes para o gene que codifica CCR2 (CCR2^{-/-}). A injeção de plasmina (2µg/cavidade) na pleura dos animais CCR2^{-/-} não foi capaz de provocar influxo significativo de células para a cavidade pleural quando comparado aos animais selvagens (WT) (Figura 18A).

Como o receptor CCR2 também está envolvido no egresso de monócitos da medula óssea para a corrente sanguínea (Serbina e Pamer, 2006) buscamos determinar o número de monócitos circulantes no sangue destes camundongos CCR2^{-/-}, uma vez que uma menor contagem sanguínea poderia implicar em um menor recrutamento destas células para o sítio inflamatório. Assim como no trabalho de Warmington *et al.* (1996), não foi verificada monocitopenia, avaliada por contagem de esfregaços sanguíneos, nos animais CCR2^{-/-}, tanto no estado basal quanto após a injeção de plasmina (Figura 18 B). No entanto, Serbina *et al.* (2006) descreveram que há uma diminuição de uma população específica de monócitos (CD11b⁺ e Ly6C^{hi}) nestes animais, por isso, buscamos validar o dado da importância de CCR2 para o recrutamento de mononucleares, induzido pela plasmina, utilizando um inibidor farmacológico de CCR2.

Desta forma, com o intuito de reforçar o dado obtido com os animais CCR2^{-/-}, foram executados experimentos utilizando o pré-tratamento com o antagonista do receptor CCR2, RS504393. No ensaio de quimiotaxia foram realizados o pré-tratamentos das células com o RS504393 (10µM) e posterior desafio com plasmina (2µg/mL). Nos ensaios de pleurisia os camundongos receberam uma injeção de RS504393 (2mg/kg/i.pl.) 1h antes do desafio com plasmina (2µg/cavidade). Observou-se que o antagonista de CCR2 inibiu a migração induzida pela plasmina/plasminogênio, em ambos os modelos (Figura 19 A e B), sugerindo que CCL2/CCR2 possui um papel importante na migração de células mononucleares induzida por esta protease.

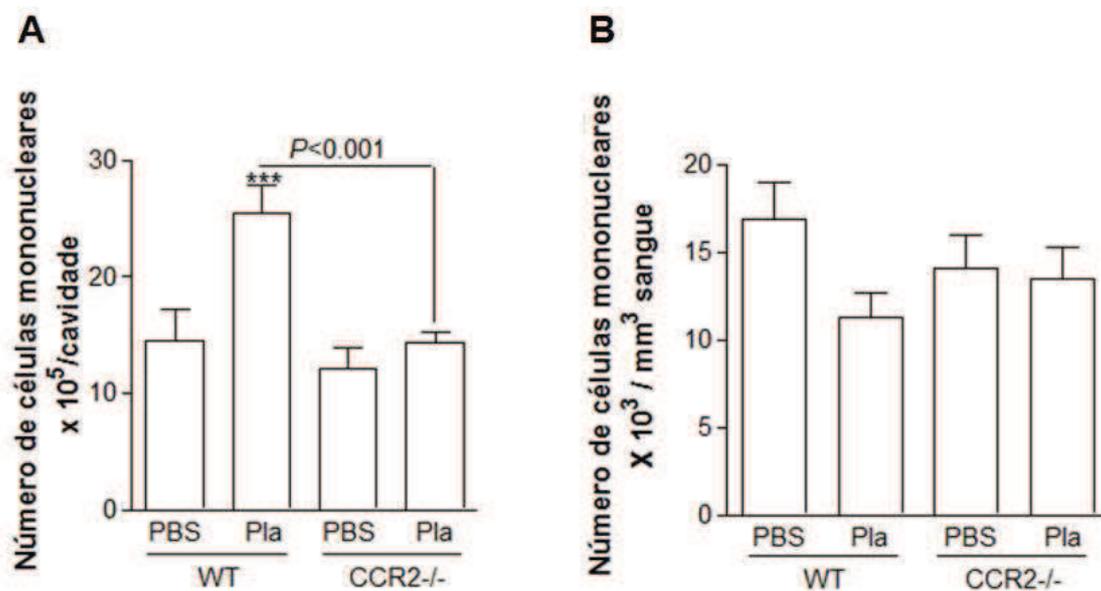


Figura 18– Influxo leucocitário para a cavidade pleural após injeção de plasmina em camundongos CCR2^{-/-}. Camundongos selvagens e CCR2^{-/-} foram desafiados com injeções de plasmina (2µg/cavidade/i.pl.) ou PBS. As células que migraram para esta cavidade foram coletadas após 24h e processadas para contagem de mononucleares (A). Também foram coletadas amostras de sangue periférico para a realização de contagem de leucócitos (B). Os resultados das contagens foram expressos em número de células por cavidade e mostrados como média ± EPM. ***, $P < 0.001$.

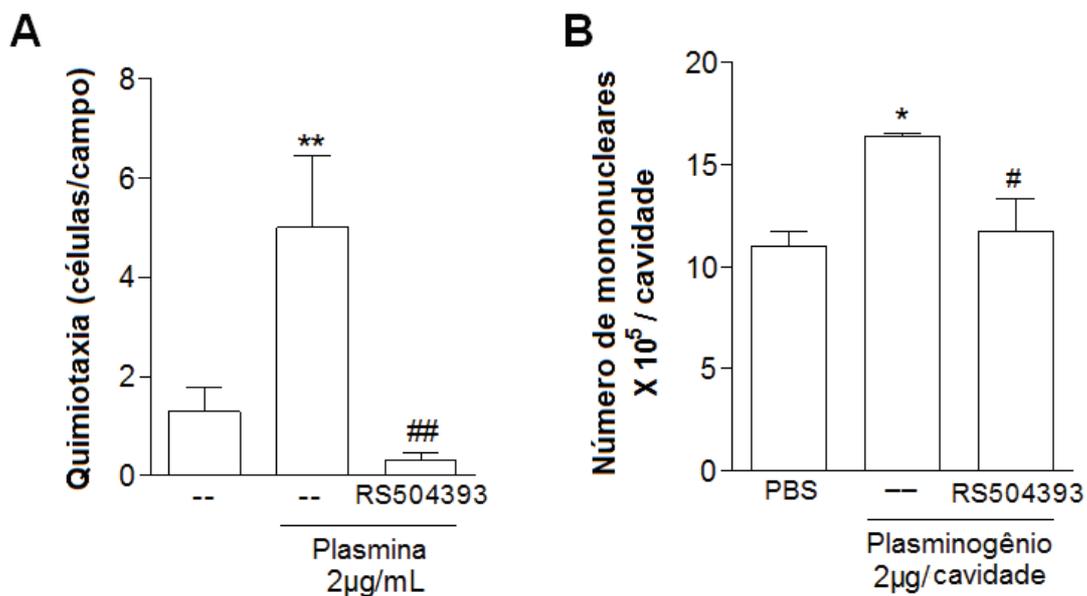


Figura 19– Efeito do antagonista de CCR2^{-/-}(RS504393) na migração induzida por plasmina/plasminogênio. Células da linhagem RAW foram submetidas ao ensaio de quimiotaxia no qual foram pré-tratadas com RS504393 (10µM) por 1h. Ao término deste tempo, elas foram incubadas durante 4 horas a 37°C, e permitidas migrar através de membranas de policarbonato em direção a um gradiente quimiotático constituído da Pla (2µg/mL) ou da quimiocina MCP-1 (50ng/mL-controle positivo). Cinco campos foram contados para realização das médias (A). Camundongos BALB/C foram pré-tratados com RS504393 (2mg/kg/i.pl.) por 1h com posterior desafio com plasminogênio (2µg/cavidade), via intrapleural. Após 48h as células que migraram para a cavidade foram coletadas e processadas para contagem de leucócitos (B). Todos os resultados foram expressos como a média ± EPM de pelo menos 3 experimentos. *, $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$ quando comparado às células não tratadas e ##, $P < 0,05$ # e $P < 0,01$ quando comparado a células tratadas com plasmina ou plasminogênio.

6- DISCUSSÃO

A participação do Sistema Plasminogênio em eventos fisiológicos e patológicos relacionados com a migração celular já foi descrita. Entretanto, os mecanismos/vias de transdução de sinais envolvidos na migração induzida pela plasmina ainda não foram totalmente elucidados em modelos *in vivo*. No presente estudo, foram realizados ensaios utilizando modelos *in vitro* e *in vivo* visando esclarecer os efeitos exercidos pela plasmina sobre a migração de células (MEF e RAW 264.7) e de leucócitos para a cavidade pleural de camundongos, bem como os mecanismos de sinalização celular envolvidos neste processo.

A plasmina possui habilidade de induzir a movimentação de vários tipos celulares (Syrovets *et al.*, 1997; Tarui *et al.*, 2002; Majumdar *et al.*, 2004). Nossos resultados mostraram que a migração *in vitro* de fibroblastos e macrófagos murinos induzida pela plasmina foi diretamente proporcional ao tempo, isto é, quanto maior o período de exposição/incubação com esta proteína, maior a quantidade de células que migraram. A migração de fibroblastos é um evento crucial para a cicatrização de feridas. Após uma lesão cutânea vários eventos interativos são iniciados tais como inflamação, angiogênese, formação de tecido, contração e remodelagem tecidual (Clark, 1989). Durante esta resposta inflamatória ocorre formação de coágulos sanguíneos e invasão leucocitária na região ferida através da migração pela matriz extracelular (MEC). Subsequentemente os fibroblastos também migram para a região lesionada devido às alterações bioquímicas da matriz extracelular resultantes da degradação da fibrina, com posterior substituição do coágulo sanguíneo por colágeno (Clark, 1989). Assim, vários eventos relacionados ao crescimento e à reparação tecidual requerem a migração de fibroblastos, e a cicatrização de feridas cutâneas é apenas mais um exemplo do papel fisiológico fundamental exercido pela plasmina.

Mesmo não investigando neste trabalho a migração de fibroblastos *in vivo*, os resultados obtidos dos experimentos *in vitro* fornecem fortes evidências de que a plasmina tem uma participação importante neste processo *in vivo*.

Confirmando nossa ideia, um estudo recente de Shen e colaboradores (Shen *et al.*, 2012) mostrou que o plasminogênio é um importante regulador pró-inflamatório capaz de acelerar a cicatrização de feridas agudas em camundongos diabéticos. De fato, a importância de componentes do sistema plasminogênio para a cicatrização de feridas foi previamente demonstrada em camundongos deficientes para o gene que codifica o plasminogênio. Neste caso, foi demonstrado que feridas cirurgicamente produzidas em camundongos $Plg^{-/-}$ demoram um tempo maior para cicatrizarem e apresentam uma menor taxa de migração de queratinócitos para a região, quando comparados aos grupos controle ($Plg^{+/+}$) (Romer *et al.*, 1996). Estes camundongos apresentam lesões/ulcerações inflamatórias no trato gastrointestinal, pulmões e órgãos reprodutores que evoluem para perda de função e consequente óbito dos animais, os quais dificilmente ultrapassam 30 semanas de vida (Rønø *et al.*, 2013). Humanos com deficiência de plasminogênio também apresentam uma redução significativa da velocidade/capacidade de cicatrização, principalmente em regiões mucosas (Schuster, Hügle e Tefs, 2007; Mehta e Shapiro, 2008; Rønø *et al.*, 2013).

Durante a migração celular é necessário que ocorra ativação de vias de transdução de sinais celulares específicas para tal. Embora as vias de sinalização induzidas pela plasmina já tenham sido demonstradas em estudos *in vitro* (Burysek, Syrovets e Simmet, 2002; Pendurthi *et al.*, 2002; Sousa, Brasil, *et al.*, 2005; Sousa, Silva, *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2007; Li, Syrovets e Simmet, 2012), as vias regulatórias que medeiam à migração *in vivo* ainda não foram elucidadas detalhadamente. Já foi descrito que o plasminogênio ou plasmina são capazes de promover a ativação de ERK1/2 em fibroblastos (Pendurthi *et al.*, 2002; De Sousa *et al.*, 2005; Sousa, Brasil, *et al.*, 2005; Sousa, Silva, *et al.*, 2005), monócitos (Li *et al.*, 2007) e em células dendríticas (Li, Syrovets e Simmet, 2012). De Sousa e colaboradores (2005) demonstraram que plasminogênio/plasmina estimulam a via de MEK/ERK, conduzindo à expressão dos fatores de transcrição c-fos e egr-1, que por sua vez promovem a expressão da α -enolase (Sousa, Brasil, *et al.*, 2005; Sousa, Silva, *et al.*, 2005), um importante receptor de plasminogênio que participa do recrutamento de monócitos *in vivo* (Wygrecka *et al.*, 2009). No presente estudo, mostramos que a ativação da via MEK/ERK é imprescindível para os efeitos

induzidos pela plasmina, uma vez que um inibidor específico de MEK/ERK (U0126) suprime a migração induzida por plasmina *in vitro* (fibroblastos e macrófagos) e *in vivo* (células mononucleares). Outros resultados que corroboram nossa afirmação são o aumento da fosforilação de ERK1/2 proporcionalmente ao aumento do influxo de mononucleares para a pleura de camundongos.

Outros estudos demonstraram a habilidade da plasmina de ativar NF- κ B em monócitos humanos, macrófagos e células dendríticas *in vitro* e promover a translocação nuclear das proteínas NF- κ B/Rel subsequentemente à fosforilação (degradação) de I κ B- α (Syrovets *et al.*, 2001; Burysek, Syrovets e Simmet, 2002; Li *et al.*, 2007; Li, Syrovets e Simmet, 2012). Esta ativação de NF- κ B está envolvida na expressão/liberação de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 α/β e TNF- α) e do fator tecidual (TF) por monócitos humanos induzidos com plasmina (Syrovets *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2007). Em nosso modelo *in vivo*, de forma semelhante ao perfil de fosforilação de ERK1/2, a plasmina também foi capaz de induzir a ativação de NF- κ B concomitantemente ao recrutamento de células mononucleares. O tratamento com U0126 também impediu a fosforilação de I κ B- α induzida pela plasmina, evidenciando que a ativação de NF- κ B é subsequente à ativação de ERK1/2 em nosso modelo.

No tempo de 6 horas após o desafio com plasmina houve aumento dos níveis de IL-6 e MCP-1/CCL2, sendo este o intervalo de tempo que precede o recrutamento de células mononucleares para a cavidade pleural. Em contraste com estudos *in vitro* que utilizaram monócitos humanos (Syrovets *et al.*, 2001), nossos resultados mostraram que os níveis de TNF- α , IL-1 β , KC/CXCL1 e MIP-2/CXCL-2 não foram alterados no sobrenadante recolhido da cavidade pleural após a injeção de plasmina nos tempos aqui analisados (6, 24 e 48h). Existe a possibilidade de que estas citocinas/quimiocinas, produzidas após o desafio com Plasmina, não sejam detectáveis em nossas condições/tempos experimentais ou de que elas não sejam produzidas *in vivo*. Cabe ressaltar que células dendríticas, derivadas de monócitos, desafiadas com plasmina não produzem estas citocinas pró-inflamatórias (Li, Syrovets e Simmet, 2012).

Cailhier e colaboradores (2005) mostraram que a ablação de macrófagos residentes da pleura, em um modelo de pleurisia induzida por

carragenina, resulta em efeito pronunciado na produção de várias citocinas e quimiocinas, tais como CXCL-2, TNF- α , IL-6 e IL-10. Contudo, a redução dos níveis de KC e MCP-1 não foram tão intensas após a ablação dos macrófagos, sugerindo a existência de outra fonte dessas quimiocinas, que não os macrófagos residentes, tais como as células mesoteliais no caso da produção *in vivo* de MCP-1, com subsequente recrutamento de células mononucleares (Cailhier *et al.*, 2006). Embora não tenham sido realizados experimentos para identificar a população de células responsáveis pela produção das citocinas detectadas em nosso modelo, acreditamos que os resultados obtidos da pleurisia induzida pela carragenina possam ser extrapolados para o nosso trabalho (pleurisia induzida pela plasmina), levando à conclusão de que os macrófagos residentes são responsáveis pela produção de IL-6 e as células mesoteliais pela liberação de MCP-1 (Cailhier *et al.*, 2006).

Estudos anteriores mostraram que a plasmina ativa macrófagos através do heterotetrâmero Anexina A2 (composto de anexina A2 e S100A10) ativando vias de sinalização que conduzem à produção de IL-6 (Li *et al.*, 2007). De fato, IL-6 é capaz de induzir neutrofilia e ativação de neutrófilos (Ulich, Del Castillo e Guo, 1989). No entanto, no presente trabalho nós não observamos um aumento de neutrófilos, provavelmente devido à falta de quimioatraentes para estes granulócitos como MIP-2/CXCL2 e KC/CXCL1. A migração de leucócitos circulantes para os locais de lesão ou inflamação é uma etapa fundamental da imunidade inata e adaptativa. Para alcançar este objetivo, existem vários mecanismos finamente coordenados pelos quais os leucócitos circulantes tornam-se capazes de atravessar a parede vascular e migrar para os locais de lesão ou infecção (Petri, Phillipson e Kubes, 2008). A administração de Pla no músculo cremaster de camundongos, na mesma dose utilizada no presente trabalho (2 μ g), provocou uma adesão firme com subsequente transmigração de leucócitos para este tecido (Reichel *et al.*, 2011). Com o objetivo de entender melhor como a injeção de plasmina induz migração de leucócitos, foi utilizado um modelo *in vivo* no qual plasmina humana foi injetada na cavidade pleural de camundongos e como resultado houve um recrutamento significativo de leucócitos. O número total de leucócitos (assim como o número de células mononucleares) aumentou de uma forma tempo-dependente, entretanto o número de neutrófilos (e proteínas quimiotáticas para estas células) não foi

significativamente alterado após a injeção de plasmina. Tal achado sugere que neste modelo ocorre um recrutamento específico de células mononucleares, pelo menos nos tempos aqui avaliados.

Estes dados estão em consonância com outros que utilizaram o modelo de migração de células induzida por tioglicolato para a cavidade peritoneal, utilizando camundongos deficientes para o gene que codifica o plasminogênio (Plg^{-/-}) (Ploplis *et al.*, 1998; Gong *et al.*, 2008). Estes animais apresentaram redução do recrutamento de linfócitos, monócitos e macrófagos, enquanto o recrutamento de neutrófilos permanece semelhante aos animais WT (Ploplis *et al.*, 1998). Aliado a este dado *in vivo*, experimentos *in vitro* conduzidos por Syrovets *et al.* (1997) mostraram que a plasmina é capaz de ser altamente quimiotática para monócitos, induzindo polimerização de actina similares aos efeitos induzidos por FMLP, sem, no entanto, exercer efeito quimiotático em neutrófilos (Syrovets *et al.*, 1997), tais evidências reforçam a ideia do recrutamento específico de mononucleares.

Contrariamente a estes resultados, um estudo onde se verificou a resposta inflamatória dirigida a biomateriais implantados na cavidade peritoneal demonstraram uma redução no recrutamento de neutrófilos e macrófagos no lavado peritoneal de camundongos Plg^{-/-}. Esta diferença nos resultados provavelmente se deve à natureza do estímulo utilizado para promover o recrutamento celular (antígeno X implante), sugerindo que a influência do plasminogênio/plasmina na migração de leucócitos possa ser estímulo específica (Hoover-Plow *et al.*, 2008).

Já foi demonstrado que vários receptores de Plg participam na migração induzida pela plasmina *in vivo* e *in vitro* (Laumonier *et al.*, 2006; Das, Burke e Plow, 2007; Wygrecka *et al.*, 2009; O'connell *et al.*, 2010; Lighvani *et al.*, 2011). Estes receptores compartilham duas propriedades: possuem um resíduo de lisina na porção carboxi-terminal, propiciando a ligação ao Plg, e não são proteínas transmembrana, mas tornam-se expressos na superfície da célula por vias ainda indeterminadas (Das, Pluskota e Plow, 2010). A ligação do plasminogênio a receptores nas superfícies das células, através dos seus sítios de ligação a lisina (SLL) aumenta a sua ativação à plasmina, pois a protege da inativação pela α 2-antiplasmina e direciona sua atividade proteolítica para substratos específicos (Plow *et al.*, 1995; Castellino e Ploplis, 2005). Neste

estudo, apesar de não ter sido investigada detalhadamente a relevância de qualquer receptor de Plg/Pla específico para a migração celular induzida pela plasmina, nós mostramos que a migração de macrófagos foi prejudicada pelo pré-tratamento com TXA, um análogo de lisina que compete pela ligação do sítio SLL presente no domínio Kringle da plasmina, aos resíduos de lisina carboxi-terminais presentes na superfície das células. De fato, análogos de lisina tais como o TXA e o ácido ϵ -aminocapróico (EACA) já foram descritos como inibidores eficientes da atividade da plasmina e da migração (Ploplis *et al.*, 1998) evidenciando o papel fundamental para os receptores de plasminogênio na migração induzida pela plasmina.

A necessidade da atividade de protease para a migração celular induzida por plasmina parece ser um mecanismo comum para diferentes tipos celulares (Syrovets, Lunov e Simmet, 2012). Da mesma forma que a necessidade de SLL, a atividade proteásica da plasmina também é fundamental para induzir a migração de células *in vitro* e *in vivo*, como mostrado no presente estudo, usando um inibidor de serina protease (leupeptina) e um inibidor de PAR-1 (SCH79797). Dados da literatura mostram que, na presença de um análogo de lisina, a plasmina é incapaz de clivar, e conseqüentemente, ativar PAR-1, sugerindo que a interação da plasmina com a superfície celular é necessária para a ativação de PAR-1 (Altrogge e Monard, 2000; Mitchell *et al.*, 2006). Neste contexto, pode-se especular que o PAR-1 seja um co-receptor de Plg/Pla, e pode ser necessário para a ação da plasmina. No presente estudo, não foi explorado em qual receptor contendo SLL a plasmina estaria se ligando para promover a ativação de PAR-1. Receptores como α -enolase, histona H2B ou Plg-R (KT) são candidatos em potencial e já tiveram descritos seus envolvimento com a migração de monócitos *in vivo* (Das, Burke e Plow, 2007; Wygrecka *et al.*, 2009; Lighvani *et al.*, 2011).

Já é conhecida a capacidade da plasmina em ativar PAR-1 por proteólise, processo este que está envolvido em vários efeitos induzidos pela plasmina, tais como sinalização anti-apoptótica em monócitos (Mitchell *et al.*, 2006), indução da expressão gênica de *Cyr61* em fibroblastos (Pendurthi *et al.*, 2002), indução da migração de células CHO (células ovarianas de hamster chinês) (Majumdar *et al.*, 2004), indução da expressão de IL-8, liberação de

prostaglandina E2 (Kamio *et al.*, 2008) e promoção da transição de célula epitelial para mesenquimal na fibrose intersticial renal (Zhang *et al.*, 2007). No presente estudo, foi demonstrado que a inibição de PAR-1 compromete a migração de células mononucleares induzida pela plasmina e também leva à inibição de ERK1/2 e de NF- κ B. Pendurthi e colaboradores (2002) mostraram que fibroblastos deficientes para o gene que codifica PAR-1 (PAR-1^{-/-}) não respondem à indução de ERK1/2 exercida pela plasmina, fato este que sugere um mecanismo de indução de ERK dependente de PAR-1. Também foi demonstrado que a plasmina induz MER/ERK através de PAR-1 na fibrose intersticial renal (Zhang *et al.*, 2007) e que a ativação de PAR-1 é necessária para o recrutamento de leucócitos dependente de CCL2 *in vivo* (Chen *et al.*, 2008). Desta forma, os estudos mencionados acima dão suporte aos nossos resultados, reforçando que a plasmina induz migração de mononucleares de forma dependente da ativação de PAR-1. Embora não tenhamos analisado aqui, a importância da ativação dos outros PARs para a migração de monócitos induzida por Plasmina é importante ressaltar que macrófagos e monócitos expressam PAR-1, PAR-2 e PAR-3 e não expressam PAR4 (Colognato *et al.*, 2003). Como os dados da literatura apontam que a plasmina é capaz de ativar PAR-1, focamos nossos estudos neste receptor. No entanto, estudos adicionais serão necessários para verificar o efeito de outros PARs, como por exemplo, PAR-2, na migração de monócitos induzida por plasmina.

A expressão de citocinas e quimiocinas é regulada primariamente durante a transcrição. Assim, a expressão de CCL2 em resposta ao estímulo por trombina pode ocorrer via MEK/ERK (Deng *et al.*, 2008) e o gene que codifica a quimiocina CCL2 é um alvo conhecido de NF- κ B (Thompson e Van Eldik, 2009). Por outro lado, Burysek e colaboradores (2002) demonstraram que a expressão de CCL2, induzida pela plasmina *in vitro*, não requer a via de sinalização de MEK/ERK. Neste estudo os autores utilizaram o inibidor U0126 na dose de 1 μ M. Embora nós não tenhamos mensurado a produção de CCL2 *in vitro*, em nossos experimentos com fibroblastos ou macrófagos murinos, foi utilizada uma dose de 15 μ M de U0126, que é menor que a dose comumente utilizada na literatura (Sousa *et al.*, 2005), sendo esta capaz de inibir a ativação de ERK1/2, sugerindo que a dose utilizada no estudo de Burysek *et al.* (2002) tenha sido insuficiente para a inibição de ERK e consequentemente da

produção de CCL2. Em nossos experimentos *in vivo*, a injeção intrapleural de plasmina induziu aumento nos níveis de CCL2 que foram sensíveis à inibição da via MEK/ERK com U0126 na dose de 2mg/kg/i.pl.

O receptor CCR2 é expresso principalmente em monócitos, e é o alvo de ligação de um grupo de proteínas quimiotáticas de monócitos (MCP), incluindo as quimiocinas MCP-1/CCL2, MCP-2/CCL8, e MCP-3/CCL7, desempenhando um papel fundamental na migração de monócitos/macrófagos, em diferentes modelos experimentais e de doenças (Mitchell *et al.*, 2006). Em nossas condições experimentais, os camundongos CCR2^{-/-} não responderam à injeção intrapleural de plasmina e o uso de um antagonista de CCR2 inibiu a migração de macrófagos induzida pela plasmina, evidenciando a importância de CCL2/CCR2 no modelo de recrutamento celular. Corroborando nossos resultados, foi demonstrado que, após estímulo inflamatório, camundongos Plg^{-/-} apresentam níveis de expressão de CCL2 50% menor em comparação aos camundongos Plg^{+/+}, tal achado sugere que estas diferenças nos níveis de CCL2 podem contribuir para o menor recrutamento de macrófagos e linfócitos nos camundongos Plg^{-/-} após estímulo inflamatório (Busuttill *et al.*, 2004). Estes dados reforçam a ideia de que a liberação de CCL2 é relevante para o recrutamento de células mononucleares induzido pela plasmina. Além disso, foi demonstrado que a plasmina também cliva a lisina 104 de CCL2 aumentando a sua potência quimiotática (Yao e Tsirka, 2011), e que esta clivagem de CCL2 provavelmente é uma etapa indispensável para a ativação total desta quimiocina *in vivo*. (Yao e Tsirka, 2012). Assim, a secreção de CCL2 induzida pela plasmina e o aumento de sua potência parecem ser importantes na regulação da migração de leucócitos em nosso modelo *in vivo*.

Embora nós tenhamos nos concentrado no estudo do papel de CCL2/CCR2 e em demonstrar a clara importância deste eixo em nosso modelo, não podemos excluir a possibilidade do envolvimento de outras citocinas e quimiocinas neste processo. De fato, outras quimiocinas como CCL3 (MIP-1 α), CCL4 (MIP-1 β), CCL5 (RANTES) e seus principais receptores (CCR1 e CCR5) também estão envolvidos no recrutamento de macrófagos (Civatte *et al.*, 2005), entretanto o papel destas quimiocinas não foi investigado em nosso modelo experimental.

Tomados em conjunto, nossos dados mostram que plasmina induz à migração celular através da ativação de PAR-1 desencadeando a ativação de MEK/ERK/NF- κ B, o que culmina com a liberação de CCL2 e IL-6 na cavidade pleural de camundongos. Além disso, este estudo fornece evidências de que o eixo CCL2/CCR2 contribui para a migração induzida pela plasmina de células mononucleares para os locais de inflamação.

7- CONCLUSÃO

Reunindo os dados obtidos no presente estudo podemos concluir que:

1) Plasmina é capaz de induzir migração celular de fibroblastos e macrófagos murinos através da via MEK/ERK.

2) A inibição da atividade de serina protease ou dos sítios de ligação à lisina foi capaz de impedir a migração celular induzida pela plasmina, demonstrando a necessidade da atividade proteolítica desta protease e dos sítios de ligação à lisina.

3) A injeção de plasmina na cavidade pleural de camundongos promove o influxo de células mononucleares associado com a ativação das vias de ERK1/2 e de NF- κ B e consequente aumento dos níveis de CCL2 e IL-6 no exudato pleural.

4) A inibição de PAR-1 ou de MEK/ERK1/2 impediu a migração de células mononucleares induzida pela plasmina, bem como inibiu a ativação de ERK1/2 e NF- κ B e a liberação de CCL2.

5) Camundongos CCR2^{-/-} não são responsivos à migração de leucócitos induzida pela plasmina e um antagonista de CCR2 abole migração celular em placas transwell, reforçando o papel do eixo CCL2/CCR2 neste processo.

Em conclusão, por meio deste estudo nós fornecemos evidências de que a plasmina é um mediador de migração celular *in vivo* por um mecanismo dependente de ativação de PAR-1→MEK/ERK→NF- κ B, levando a produção/secreção de MCP-1/CCL2 que se liga a CCR2 promovendo o recrutamento de células mononucleares para a cavidade pleural de camundongos (Figura 20).

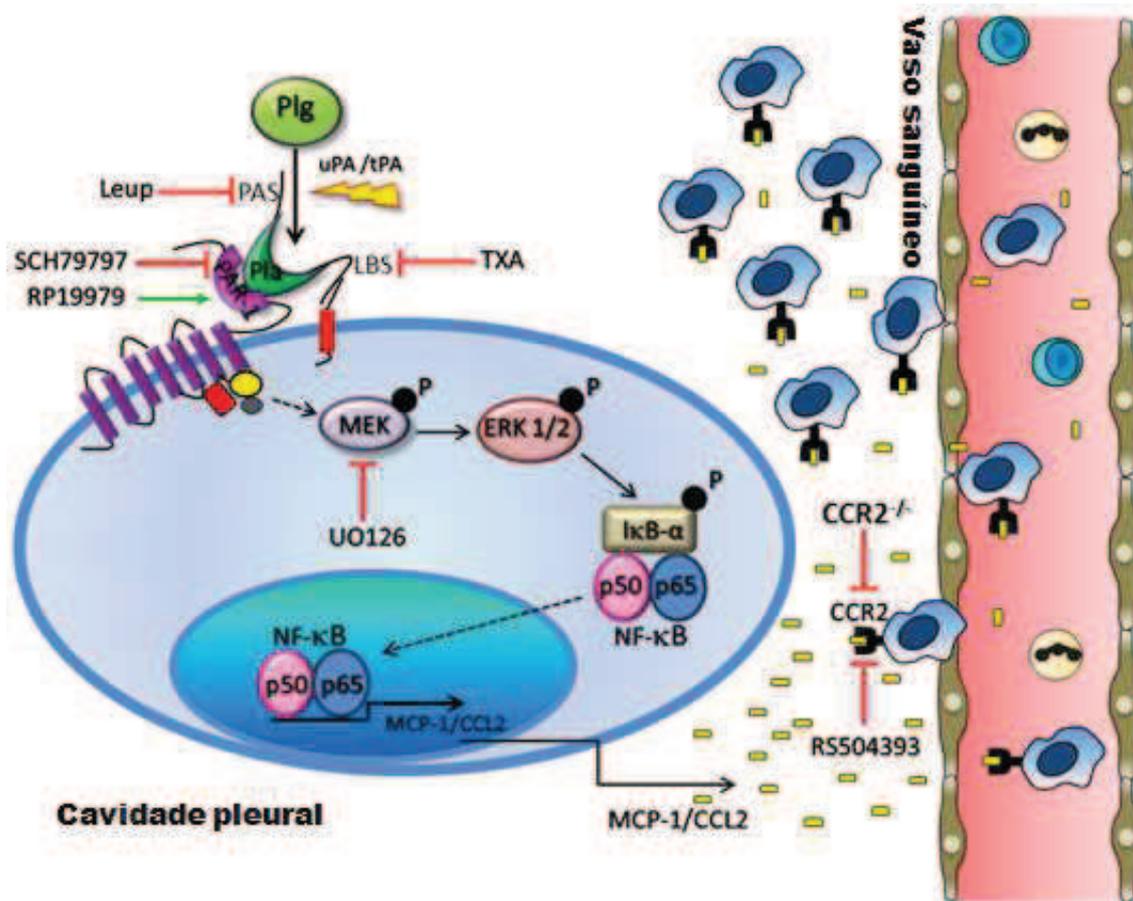


Figura 20- Modelo proposto para a migração de células mononucleares induzida por plasmina. O plasminogênio (Plg) é ativado à plasmina (Pla) por seus ativadores fisiológicos (u-PA e t-PA). Pla se liga aos seus receptores via os sítios de ligação à lisina (do inglês - *lisine binding sites*-LBS) e requer atividade de serina protease (PAS- do inglês- *protease activate sites*). Em seguida, Pla ativa PAR-1 (um receptor ativado por proteases acoplado a proteína G) e induz a ativação/fosforilação da via MEK/ERK1/2 que, após ativada, estimula a produção CCL2 através do fator de transcrição NF-κB. Após secretada, a quimiocina MCP-1/CCL2 se liga ao receptor MCP-1/CCL2 CCR2 e promove o influxo de células mononucleares para a cavidade pelural.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; POBER, J. S. Citocinas. In: (Ed.). *Imunologia Celular e Molecular*. 4ª. Rio de Janeiro: Revinter, 2003. cap. 11º, p.235 - 269.

ALESSANDRI, A. L. et al. Resolution of inflammation: mechanisms and opportunity for drug development. *Pharmacol Ther*, v. 139, n. 2, p. 189-212, Aug 2013. ISSN 1879-016X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23583354> >.

ALTROGGE, L. M.; MONARD, D. An assay for high-sensitivity detection of thrombin activity and determination of proteases activating or inactivating protease-activated receptors. *Anal Biochem*, v. 277, n. 1, p. 33-45, Jan 2000. ISSN 0003-2697. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10610687> >.

BAE, S. et al. α -Enolase expressed on the surfaces of monocytes and macrophages induces robust synovial inflammation in rheumatoid arthritis. *J Immunol*, v. 189, n. 1, p. 365-72, Jul 2012. ISSN 1550-6606. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22623332> >.

BANNACH, F. G. et al. Localization of regulatory elements mediating constitutive and cytokine-stimulated plasminogen gene expression. *J Biol Chem*, v. 277, n. 41, p. 38579-88, Oct 2002. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12149246> >.

BURYSEK, L.; SYROVETS, T.; SIMMET, T. The serine protease plasmin triggers expression of MCP-1 and CD40 in human primary monocytes via activation of p38 MAPK and janus kinase (JAK)/STAT signaling pathways. *J Biol Chem*, v. 277, n. 36, p. 33509-17, Sep 2002. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12093796> >.

BUSUTTIL, S. J. et al. A central role for plasminogen in the inflammatory response to biomaterials. *J Thromb Haemost*, v. 2, n. 10, p. 1798-805, Oct 2004. ISSN 1538-7933. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15456492> >.

CAILHIER, J. F. et al. Resident pleural macrophages are key orchestrators of neutrophil recruitment in pleural inflammation. *Am J Respir Crit Care Med*, v. 173, n. 5, p. 540-7, Mar 2006. ISSN 1073-449X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16357332> >.

CARMELIET, P.; COLLEN, D. Development and disease in proteinase-deficient mice: role of the plasminogen, matrix metalloproteinase and coagulation system. *Thromb Res*, v. 91, n. 6, p. 255-85, Sep 1998. ISSN 0049-3848. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9772009> >.

CARVALHO, M. D. G.; SILVA, M. B. S. *Hematologia: técnicas laboratoriais e interpretação*. Belo Horizonte: Imprensa Universitária - Universidade Federal de Minas Gerais, 1988. 139p.

CASTELLINO, F. J.; PLOPLIS, V. A. Structure and function of the plasminogen/plasmin system. *Thromb Haemost*, v. 93, n. 4, p. 647-54, Apr 2005. ISSN 0340-6245. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15841308> >.

CAULFIELD, A. J.; LATHAM, W. W. Substrates of the plasminogen activator protease of *Yersinia pestis*. *Adv Exp Med Biol*, v. 954, p. 253-60, 2012. ISSN 0065-2598. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22782771> >.

CHEN, D. et al. Protease-activated receptor 1 activation is necessary for monocyte chemoattractant protein 1-dependent leukocyte recruitment in vivo. *J Exp Med*, v. 205, n. 8, p. 1739-46, Aug 2008. ISSN 1540-9538. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18606855> >.

CHENG, Y. C. et al. Lipopolysaccharide upregulates uPA, MMP-2 and MMP-9 via ERK1/2 signaling in H9c2 cardiomyoblast cells. *Mol Cell Biochem*, v. 325, n. 1-2, p. 15-23, May 2009. ISSN 1573-4919. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19184369> >.

CHRISTENSEN, U.; BANGERT, K.; THORSEN, S. Reaction of human alpha2-antiplasmin and plasmin stopped-flow fluorescence kinetics. *FEBS Lett*, v. 387, n. 1, p. 58-62, May 1996. ISSN 0014-5793. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8654567> >.

CHU, S. C. et al. Naproxen, meloxicam and methylprednisolone inhibit urokinase plasminogen activator and inhibitor and gelatinases expression during the early stage of osteoarthritis. *Clin Chim Acta*, v. 387, n. 1-2, p. 90-6, Jan 2008. ISSN 0009-8981. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17963739> >.

CIVATTE, M. et al. Expression of the beta chemokines CCL3, CCL4, CCL5 and their receptors in idiopathic inflammatory myopathies. *Neuropathol Appl Neurobiol*, v. 31, n. 1, p. 70-9, Feb 2005. ISSN 0305-1846. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15634233> >.

CLARK, R. A. Wound repair. *Curr Opin Cell Biol*, v. 1, n. 5, p. 1000-8, Oct 1989. ISSN 0955-0674. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2697286> >.

COLOGNATO, R. et al. Differential expression and regulation of protease-activated receptors in human peripheral monocytes and monocyte-derived antigen-presenting cells. *Blood*, v. 102, n. 7, p. 2645-52, Oct 2003. ISSN 0006-4971. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12805069> >.

D'ALESSIO, S.; BLASI, F. The urokinase receptor as an entertainer of signal transduction. *Front Biosci (Landmark Ed)*, v. 14, p. 4575-87, 2009. ISSN 1093-4715. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19273372> >.

DAS, R.; BURKE, T.; PLOW, E. F. Histone H2B as a functionally important plasminogen receptor on macrophages. *Blood*, v. 110, n. 10, p. 3763-72, Nov 2007.

ISSN 0006-4971. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17690254> >.

DAS, R.; PLUSKOTA, E.; PLOW, E. F. Plasminogen and its receptors as regulators of cardiovascular inflammatory responses. *Trends Cardiovasc Med*, v. 20, n. 4, p. 120-4, May 2010. ISSN 1873-2615. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21335281> >.

DE SOUSA, L. P. et al. Plasminogen/plasmin regulates c-fos and egr-1 expression via the MEK/ERK pathway. *Biochem Biophys Res Commun*, v. 329, n. 1, p. 237-45, Apr 2005. ISSN 0006-291X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15721299> >.

DENG, X. et al. Thrombin induces fibroblast CCL2/JE production and release via coupling of PAR1 to Gα₁₂ and cooperation between ERK1/2 and Rho kinase signaling pathways. *Mol Biol Cell*, v. 19, n. 6, p. 2520-33, Jun 2008. ISSN 1939-4586. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18353977> >.

FRANCO, R. F. Fisiologia da coagulação do sangue e da fibrinólise. In: ATHENEU (Ed.). *Hematologia: fundamentos e prática*. 1ª. São Paulo: Zago, Marco Antônio Falcão, Roberto Passetto Pasquini, Ricardo, 2004. cap. 65, p.739 - 748.

GILROY, D. W. et al. Inflammatory resolution: new opportunities for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov*, v. 3, n. 5, p. 401-16, May 2004. ISSN 1474-1776. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15136788> >.

GOBBETTI, T. et al. Serine protease inhibition reduces post-ischemic granulocyte recruitment in mouse intestine. *Am J Pathol*, v. 180, n. 1, p. 141-52, Jan 2012. ISSN 1525-2191. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22067907> >.

GONG, Y.; FAN, Y.; HOOVER-PLOW, J. Plasminogen regulates stromal cell-derived factor-1/CXCR4-mediated hematopoietic stem cell mobilization by activation of matrix metalloproteinase-9. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, v. 31, n. 9, p. 2035-43, Sep 2011. ISSN 1524-4636. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21719761> >.

GONG, Y. et al. Inflammatory macrophage migration requires MMP-9 activation by plasminogen in mice. *J Clin Invest*, v. 118, n. 9, p. 3012-24, Sep 2008. ISSN 0021-9738. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18677407> >.

GROSS, P. L.; MURRAY, R. K.; RAND, M. R. Hemostasia e trombose. In: HARPER, H. A.; MURRAY, R. K., *et al* (Ed.). *Bioquímica ilustrada de Harper*. 29. Porto Alegre: McGraw Hill, 2013. cap. 51, p.651 - 660. ISBN 9788580552805.

GUO, Y. et al. Protective effects of plasmin(ogen) in a mouse model of *Staphylococcus aureus*-induced arthritis. *Arthritis Rheum*, v. 58, n. 3, p. 764-72, Mar 2008. ISSN 0004-3591. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18311818> >.

HAJJAR, K. A. Cellular receptors in the regulation of plasmin generation. *Thromb Haemost*, v. 74, n. 1, p. 294-301, Jul 1995. ISSN 0340-6245. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8578475> >.

HANSEN, K. K. et al. Proteinases, proteinase-activated receptors (PARs) and the pathophysiology of cancer and diseases of the cardiovascular, musculoskeletal, nervous and gastrointestinal systems. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, v. 377, n. 4-6, p. 377-92, Jun 2008. ISSN 0028-1298. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17952408> >.

HASEGAWA, T. et al. Induction of urokinase-type plasminogen activator receptor by IL-1 beta. *Am J Respir Cell Mol Biol*, v. 16, n. 6, p. 683-92, Jun 1997. ISSN 1044-1549. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9191470> >.

HENKIN, J.; MARCOTTE, P.; YANG, H. C. The plasminogen-plasmin system. *Prog Cardiovasc Dis*, v. 34, n. 2, p. 135-64, 1991 Sep-Oct 1991. ISSN 0033-0620. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1832499> >.

HERREN, T. et al. Regulation of plasminogen binding to neutrophils. *Blood*, v. 97, n. 4, p. 1070-8, Feb 2001. ISSN 0006-4971. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11159539> >.

HOOVER-PLOW, J. L. et al. Strain and model dependent differences in inflammatory cell recruitment in mice. *Inflamm Res*, v. 57, n. 10, p. 457-63, Oct 2008. ISSN 1023-3830. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18827970> >.

JENKINS, G. R. et al. Regulation of plasminogen gene expression by interleukin-6. *Blood*, v. 89, n. 7, p. 2394-403, Apr 1997. ISSN 0006-4971. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9116283> >.

JIN, T. et al. Urokinase, a constitutive component of the inflamed synovial fluid, induces arthritis. *Arthritis Res Ther*, v. 5, n. 1, p. R9-R17, 2003. ISSN 1478-6362. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12716448> >.

JUNTILA, M. R.; LI, S. P.; WESTERMARCK, J. Phosphatase-mediated crosstalk between MAPK signaling pathways in the regulation of cell survival. *FASEB J*, v. 22, n. 4, p. 954-65, Apr 2008. ISSN 1530-6860. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18039929> >.

KAGER, L. M. et al. Endogenous α 2-antiplasmin is protective during severe gram-negative sepsis (melioidosis). *Am J Respir Crit Care Med*, v. 188, n. 8, p. 967-75, Oct 2013. ISSN 1535-4970. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23992406> >.

KAMIO, N. et al. IL-1beta stimulates urokinase-type plasminogen activator expression and secretion in human dental pulp cells. *Biomed Res*, v. 28, n. 6, p.

315-22, Dec 2007. ISSN 1880-313X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18202522> >.

_____. Plasmin is involved in inflammation via protease-activated receptor-1 activation in human dental pulp. *Biochem Pharmacol*, v. 75, n. 10, p. 1974-80, May 2008. ISSN 1873-2968. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18384756> >.

KASZA, A.; KOJ, A. Cytokines regulate plasminogen activation system in astrocytoma cells. *J Physiol Pharmacol*, v. 53, n. 1, p. 95-104, Mar 2002. ISSN 0867-5910. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11939722> >.

KUZIEL, W. A. et al. Severe reduction in leukocyte adhesion and monocyte extravasation in mice deficient in CC chemokine receptor 2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 94, n. 22, p. 12053-8, Oct 1997. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9342361> >.

KWON, K. J. et al. Regulation of tissue plasminogen activator/plasminogen activator inhibitor-1 by hydrocortisone in rat primary astrocytes. *J Neurosci Res*, v. 89, n. 7, p. 1059-69, Jul 2011. ISSN 1097-4547. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21412817> >.

LAUMONNIER, Y. et al. Identification of the annexin A2 heterotetramer as a receptor for the plasmin-induced signaling in human peripheral monocytes. *Blood*, v. 107, n. 8, p. 3342-9, Apr 2006. ISSN 0006-4971. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16373665> >.

LEI, X. et al. Different microvascular permeability responses elicited by the CXC chemokines MIP-2 and KC during leukocyte recruitment: role of LSP1. *Biochem Biophys Res Commun*, v. 423, n. 3, p. 484-9, Jul 2012. ISSN 1090-2104. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22683630> >.

LI, Q. et al. Plasmin triggers cytokine induction in human monocyte-derived macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, v. 27, n. 6, p. 1383-9, Jun 2007. ISSN 1524-4636. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17413040> >.

LI, X.; SYROVETS, T.; SIMMET, T. The serine protease plasmin triggers expression of the CC-chemokine ligand 20 in dendritic cells via Akt/NF- κ B-dependent pathways. *J Biomed Biotechnol*, v. 2012, p. 186710, 2012. ISSN 1110-7251. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23118497> >.

LIAN, X. et al. IL-1 α is a potent stimulator of keratinocyte tissue plasminogen activator expression and regulated by TGF- β 1. *Arch Dermatol Res*, v. 300, n. 4, p. 185-93, Apr 2008. ISSN 0340-3696. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18204848> >.

LIGHVANI, S. et al. Regulation of macrophage migration by a novel plasminogen receptor Plg-R KT. *Blood*, v. 118, n. 20, p. 5622-30, Nov 2011. ISSN 1528-0020. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21940822> >.

LIJNEN, H. R. Elements of the fibrinolytic system. *Ann N Y Acad Sci*, v. 936, p. 226-36, 2001. ISSN 0077-8923. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11460480> >.

_____. Pleiotropic functions of plasminogen activator inhibitor-1. *J Thromb Haemost*, v. 3, n. 1, p. 35-45, Jan 2005. ISSN 1538-7933. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15634264> >.

MAJUMDAR, M. et al. Plasmin-induced migration requires signaling through protease-activated receptor 1 and integrin alpha(9)beta(1). *J Biol Chem*, v. 279, n. 36, p. 37528-34, Sep 2004. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15247268> >.

MARGETIC, S. Inflammation and haemostasis. *Biochem Med (Zagreb)*, v. 22, n. 1, p. 49-62, 2012. ISSN 1330-0962. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22384519> >.

MARINISSEN, M. J.; GUTKIND, J. S. G-protein-coupled receptors and signaling networks: emerging paradigms. *Trends Pharmacol Sci*, v. 22, n. 7, p. 368-76, Jul 2001. ISSN 0165-6147. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11431032> >.

MEDZHITOV, R. Inflammation 2010: new adventures of an old flame. *Cell*, v. 140, n. 6, p. 771-6, Mar 2010. ISSN 1097-4172. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20303867> >.

MEHTA, R.; SHAPIRO, A. D. Plasminogen deficiency. *Haemophilia*, v. 14, n. 6, p. 1261-8, Nov 2008. ISSN 1365-2516. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19141167> >.

MILES, L. A. et al. Role of cell-surface lysines in plasminogen binding to cells: identification of alpha-enolase as a candidate plasminogen receptor. *Biochemistry*, v. 30, n. 6, p. 1682-91, Feb 1991. ISSN 0006-2960. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1847072> >.

MILES, L. A.; PARMER, R. J. Plasminogen receptors: the first quarter century. *Semin Thromb Hemost*, v. 39, n. 4, p. 329-37, Jun 2013. ISSN 1098-9064. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23532575> >.

MIN, K. J.; JOU, I.; JOE, E. Plasminogen-induced IL-1beta and TNF-alpha production in microglia is regulated by reactive oxygen species. *Biochem Biophys Res Commun*, v. 312, n. 4, p. 969-74, Dec 2003. ISSN 0006-291X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14651966> >.

MITCHELL, J. W. et al. Plasminogen inhibits TNFalpha-induced apoptosis in monocytes. *Blood*, v. 107, n. 11, p. 4383-90, Jun 2006. ISSN 0006-4971. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16478887> >.

MITROULIS, I.; KAMBAS, K.; RITIS, K. Neutrophils, IL-1 β , and gout: is there a link? *Semin Immunopathol*, v. 35, n. 4, p. 501-12, Jul 2013. ISSN 1863-2300. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23344781> >.

NARITA, T. et al. Tumor necrosis factor α stimulates expression and secretion of urokinase plasminogen activator in human dental pulp cells. *J Oral Sci*, v. 54, n. 4, p. 329-36, 2012. ISSN 1880-4926. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23221158> >.

NATHAN, C.; DING, A. Nonresolving inflammation. *Cell*, v. 140, n. 6, p. 871-82, Mar 2010. ISSN 1097-4172. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20303877> >.

NIEDEBALA, M. J.; STEIN, M. Tumor necrosis factor induction of urokinase-type plasminogen activator in human endothelial cells. *Biomed Biochim Acta*, v. 50, n. 4-6, p. 427-36, 1991. ISSN 0232-766X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1801706> >.

NORLING, L. V.; SERHAN, C. N. Profiling in resolving inflammatory exudates identifies novel anti-inflammatory and pro-resolving mediators and signals for termination. *J Intern Med*, v. 268, n. 1, p. 15-24, Jul 2010. ISSN 1365-2796. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20497301> >.

O'CONNELL, P. A. et al. S100A10 regulates plasminogen-dependent macrophage invasion. *Blood*, v. 116, n. 7, p. 1136-46, Aug 2010. ISSN 1528-0020. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20424186> >.

PENDURTHI, U. R. et al. Plasmin induces Cyr61 gene expression in fibroblasts via protease-activated receptor-1 and p44/42 mitogen-activated protein kinase-dependent signaling pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, v. 22, n. 9, p. 1421-6, Sep 2002. ISSN 1524-4636. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12231560> >.

PETRI, B.; PHILLIPSON, M.; KUBES, P. The physiology of leukocyte recruitment: an in vivo perspective. *J Immunol*, v. 180, n. 10, p. 6439-46, May 2008. ISSN 0022-1767. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18453558> >.

PHILLIPSON, M. et al. Intraluminal crawling of neutrophils to emigration sites: a molecularly distinct process from adhesion in the recruitment cascade. *J Exp Med*, v. 203, n. 12, p. 2569-75, Nov 2006. ISSN 0022-1007. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17116736> >.

PLOPLIS, V. A. et al. Plasminogen deficiency differentially affects recruitment of inflammatory cell populations in mice. *Blood*, v. 91, n. 6, p. 2005-9, Mar 1998. ISSN 0006-4971. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9490683> >.

PLOW, E. F.; DOEUVRE, L.; DAS, R. So many plasminogen receptors: why? *J Biomed Biotechnol*, v. 2012, p. 141806, 2012. ISSN 1110-7251. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23118495> >.

PLOW, E. F. et al. The cell biology of the plasminogen system. *FASEB J*, v. 9, n. 10, p. 939-45, Jul 1995. ISSN 0892-6638. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7615163> >.

PÖLLÄNEN, J. Down-regulation of plasmin receptors on human sarcoma cells by glucocorticoids. *J Biol Chem*, v. 264, n. 10, p. 5628-32, Apr 1989. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2538425> >.

RAMACHANDRAN, R. Developing PAR1 antagonists: minding the endothelial gap. *Discov Med*, v. 13, n. 73, p. 425-31, Jun 2012. ISSN 1944-7930. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22742648> >.

RAMACHANDRAN, R. et al. Targeting proteinase-activated receptors: therapeutic potential and challenges. *Nat Rev Drug Discov*, v. 11, n. 1, p. 69-86, Jan 2012. ISSN 1474-1784. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22212680> >.

REDLITZ, A. et al. The role of an enolase-related molecule in plasminogen binding to cells. *Eur J Biochem*, v. 227, n. 1-2, p. 407-15, Jan 1995. ISSN 0014-2956. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7851415> >.

REICHEL, C. A. et al. Plasmin inhibitors prevent leukocyte accumulation and remodeling events in the postischemic microvasculature. *PLoS One*, v. 6, n. 2, p. e17229, 2011. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21364954> >.

ROBBINS, S. L. et al. *Pathologic basis of disease*. 6th. Philadelphia: W.B. Saunders, 1999. 1425p.

ROMER, J. et al. Impaired wound healing in mice with a disrupted plasminogen gene. *Nat Med*, v. 2, n. 3, p. 287-92, Mar 1996. ISSN 1078-8956. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8612226> >.

ROSENWALD, M. et al. Serum-derived plasminogen is activated by apoptotic cells and promotes their phagocytic clearance. *J Immunol*, v. 189, n. 12, p. 5722-8, Dec 2012. ISSN 1550-6606. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23150713> >.

ROT, A.; VON ANDRIAN, U. H. Chemokines in innate and adaptive host defense: basic chemokine grammar for immune cells. *Annu Rev Immunol*, v. 22, p. 891-928, 2004. ISSN 0732-0582. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15032599> >.

RØNØ, B. et al. Gender affects skin wound healing in plasminogen deficient mice. *PLoS One*, v. 8, n. 3, p. e59942, 2013. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23527289> >.

SAWATZKY, D. A. et al. The involvement of the apoptosis-modulating proteins ERK 1/2, Bcl-xL and Bax in the resolution of acute inflammation in vivo. *Am J Pathol*, v. 168, n. 1, p. 33-41, Jan 2006. ISSN 0002-9440. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16400007> >.

SCHULIGA, M. et al. Plasminogen-stimulated inflammatory cytokine production by airway smooth muscle cells is regulated by annexin A2. *Am J Respir Cell Mol Biol*, v. 49, n. 5, p. 751-8, Nov 2013. ISSN 1535-4989. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23721211> >.

SCHUSTER, V.; HÜGLE, B.; TEFS, K. Plasminogen deficiency. *J Thromb Haemost*, v. 5, n. 12, p. 2315-22, Dec 2007. ISSN 1538-7933. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17900274> >.

SEPE, L. et al. Ras Activated ERK and PI3K Pathways Differentially Affect Directional Movement of Cultured Fibroblasts. *Cell Physiol Biochem*, v. 31, n. 1, p. 123-42, 2013. ISSN 1421-9778. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23363700> >.

SERBINA, N. V.; PAMER, E. G. Monocyte emigration from bone marrow during bacterial infection requires signals mediated by chemokine receptor CCR2. *Nat Immunol*, v. 7, n. 3, p. 311-7, Mar 2006. ISSN 1529-2908. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16462739> >.

SERHAN, C. N. et al. Novel functional sets of lipid-derived mediators with antiinflammatory actions generated from omega-3 fatty acids via cyclooxygenase 2-nonsteroidal antiinflammatory drugs and transcellular processing. *J Exp Med*, v. 192, n. 8, p. 1197-204, Oct 2000. ISSN 0022-1007. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11034610> >.

_____. Resolvins: a family of bioactive products of omega-3 fatty acid transformation circuits initiated by aspirin treatment that counter proinflammation signals. *J Exp Med*, v. 196, n. 8, p. 1025-37, Oct 2002. ISSN 0022-1007. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12391014> >.

SHEN, Y. et al. Plasminogen is a key proinflammatory regulator that accelerates the healing of acute and diabetic wounds. *Blood*, v. 119, n. 24, p. 5879-87, Jun 2012. ISSN 1528-0020. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22563086> >.

SHIN, S. M. et al. Urokinase-type plasminogen activator induces BV-2 microglial cell migration through activation of matrix metalloproteinase-9. *Neurochem Res*, v. 35, n. 7, p. 976-85, Jul 2010. ISSN 1573-6903. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20177776> >.

SOUSA, L. P. et al. Pharmacological strategies to resolve acute inflammation. *Curr Opin Pharmacol*, v. 13, n. 4, p. 625-31, Aug 2013. ISSN 1471-4973. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23578762> >.

_____. Characterization of alpha-enolase as an interferon-alpha 2 alpha 1 regulated gene. *Front Biosci*, v. 10, p. 2534-47, 2005. ISSN 1093-4715. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15970516> >.

_____. Plasminogen/plasmin regulates alpha-enolase expression through the MEK/ERK pathway. *Biochem Biophys Res Commun*, v. 337, n. 4, p. 1065-71, Dec 2005. ISSN 0006-291X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16225843> >.

SOUTO, F. O. et al. Essential role of CCR2 in neutrophil tissue infiltration and multiple organ dysfunction in sepsis. *Am J Respir Crit Care Med*, v. 183, n. 2, p. 234-42, Jan 2011. ISSN 1535-4970. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20732989> >.

SPRENGERS, E. D.; KLUFT, C. Plasminogen activator inhibitors. *Blood*, v. 69, n. 2, p. 381-7, Feb 1987. ISSN 0006-4971. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3099859> >.

SYROVETS, T. et al. Plasmin-induced expression of cytokines and tissue factor in human monocytes involves AP-1 and IKKbeta-mediated NF-kappaB activation. *Blood*, v. 97, n. 12, p. 3941-50, Jun 2001. ISSN 0006-4971. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11389038> >.

SYROVETS, T.; LUNOV, O.; SIMMET, T. Plasmin as a proinflammatory cell activator. *J Leukoc Biol*, v. 92, n. 3, p. 509-19, Sep 2012. ISSN 1938-3673. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22561604> >.

SYROVETS, T.; SIMMET, T. Novel aspects and new roles for the serine protease plasmin. *Cell Mol Life Sci*, v. 61, n. 7-8, p. 873-85, Apr 2004. ISSN 1420-682X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15095009> >.

SYROVETS, T. et al. Plasmin is a potent and specific chemoattractant for human peripheral monocytes acting via a cyclic guanosine monophosphate-dependent pathway. *Blood*, v. 89, n. 12, p. 4574-83, Jun 1997. ISSN 0006-4971. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9192782> >.

TARUI, T. et al. Plasmin-induced migration of endothelial cells. A potential target for the anti-angiogenic action of angiostatin. *J Biol Chem*, v. 277, n. 37, p. 33564-70, Sep 2002. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12087108> >.

THOMPSON, W. L.; VAN ELDIK, L. J. Inflammatory cytokines stimulate the chemokines CCL2/MCP-1 and CCL7/MCP-3 through NFkB and MAPK dependent pathways in rat astrocytes [corrected]. *Brain Res*, v. 1287, p. 47-57, Sep 2009. ISSN 1872-6240. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19577550> >.

TWINING, S. S.; WILSON, P. M.; NGAMKITIDECHAKUL, C. Extrahepatic synthesis of plasminogen in the human cornea is up-regulated by interleukins-

1alpha and -1beta. *Biochem J*, v. 339 (Pt 3), p. 705-12, May 1999. ISSN 0264-6021. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10215610> >.

ULICH, T. R.; DEL CASTILLO, J.; GUO, K. Z. In vivo hematologic effects of recombinant interleukin-6 on hematopoiesis and circulating numbers of RBCs and WBCs. *Blood*, v. 73, n. 1, p. 108-10, Jan 1989. ISSN 0006-4971. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2783370> >.

VAGO, J. P. et al. Annexin A1 modulates natural and glucocorticoid-induced resolution of inflammation by enhancing neutrophil apoptosis. *J Leukoc Biol*, v. 92, n. 2, p. 249-58, Aug 2012. ISSN 1938-3673. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22493082> >.

WANG, Z. et al. PAI-1 and IFN- γ in the regulation of innate immune homeostasis during sublethal yersiniosis. *Blood Cells Mol Dis*, v. 50, n. 3, p. 196-201, Mar 2013. ISSN 1096-0961. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23218129> >.

WEIDE, I. et al. Plasmin is a specific stimulus of the 5-lipoxygenase pathway of human peripheral monocytes. *Thromb Haemost*, v. 76, n. 4, p. 561-8, Oct 1996. ISSN 0340-6245. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8902997> >.

WYGRECKA, M. et al. Enolase-1 promotes plasminogen-mediated recruitment of monocytes to the acutely inflamed lung. *Blood*, v. 113, n. 22, p. 5588-98, May 2009. ISSN 1528-0020. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19182206> >.

YADAV, A.; SAINI, V.; ARORA, S. MCP-1: chemoattractant with a role beyond immunity: a review. *Clin Chim Acta*, v. 411, n. 21-22, p. 1570-9, Nov 2010. ISSN 1873-3492. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20633546> >.

YAO, Y.; TSIRKA, S. E. Truncation of monocyte chemoattractant protein 1 by plasmin promotes blood-brain barrier disruption. *J Cell Sci*, v. 124, n. Pt 9, p. 1486-95, May 2011. ISSN 1477-9137. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21486949> >.

_____. The CCL2-CCR2 system affects the progression and clearance of intracerebral hemorrhage. *Glia*, v. 60, n. 6, p. 908-18, May 2012. ISSN 1098-1136. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22419223> >.

ZAGO, M. A.; FALCÃO, R. P.; PASQUINI, R. *Hematologia: fundamentos e prática*. 1ª. São Paulo: 2004. 1081.

ZHANG, G. et al. Plasmin(ogen) promotes renal interstitial fibrosis by promoting epithelial-to-mesenchymal transition: role of plasmin-activated signals. *J Am Soc Nephrol*, v. 18, n. 3, p. 846-59, Mar 2007. ISSN 1046-6673. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17267741> >.

ANEXO

ANEXO A – Certificados do Comitê de Ética Experimental



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
- CETEA -

CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo CEUA nº 19/2011**, relativo ao projeto intitulado **"PAPEL DO SISTEMA PLASMINOGÊNIO NA MIGRAÇÃO DE CÉLULAS INFLAMATÓRIAS"**, que tem como responsável(is) **Lirlândia Pires de Sousa**, está(ão) de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo **Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)**, tendo sido aprovado na reunião de **14/03/2012**.

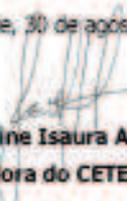
Este certificado expira-se em **14/03/2017**.

CERTIFICATE

We hereby certify that the **Protocol CEUA nº 19/2011**, related to the project entitled **"ROLE OF PLASMINOGEN SYSTEM IN INFLAMATORY CELL MIGRATION"**, under the supervisors of **Lirlândia Pires de Sousa**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)**, and was approved in **March 14, 2012**.

This certificate expires in **March 14, 2017**.

Belo Horizonte, 30 de agosto de 2012.


Prof^ª. **Jacqueline Isaura Alvarez-Leite**
Coordenadora do CETEA/UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 8827 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2006
31270-901 - Belo Horizonte, MG - Brasil
Telefone: (31) 3498-4618
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@comg.ufmg.br