

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - ICB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
BIOLÓGICAS: FISILOGIA E FARMACOLOGIA - ICB/UFMG**

IRISMARA SOUSA SILVA

**PAPEL DO RECEPTOR ATIVADO POR PROTEASES (PAR)2 NO
RECRUTAMENTO DE NEUTRÓFILOS INDUZIDO PELO FATOR
DE ATIVAÇÃO DE PLAQUETAS (PAF)**

Belo Horizonte – MG

2021

IRISMARA SOUSA SILVA

**PAPEL DO RECEPTOR ATIVADO POR PROTEASES (PAR)2 NO
RECRUTAMENTO DE NEUTRÓFILOS INDUZIDO PELO FATOR
DE ATIVAÇÃO DE PLAQUETAS (PAF)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito obrigatório para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas.

Área de concentração: Farmacologia

Orientador: Prof. Dr. André Klein

Belo Horizonte – MG

2021

043 Silva, Irismara Sousa.
Papel do Receptor Ativado por Protease (PAR)2 no recrutamento de neutrófilos induzido pelo Fator Ativador de Plaquetas (PAF) [manuscrito] / Irismara Sousa Silva. – 2021.
106 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Prof. Dr. André Klein.

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

1. Farmacologia. 2. Inflamação. 3. Neutrófilos. 4. Fator de Ativação de Plaquetas. 5. Receptor PAR-2. I. Klein, André. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 615



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA

ATA DE DEFESA DA TESE Nº 348 DE IRISMARA SOUSA SILVA

Às 09:00 horas do dia **10 de mês de setembro de 2021**, transmitida através de videoconferência do Google Meet, realizou-se a sessão pública para a defesa da Tese de **Irismara Sousa Silva**. A presidência da sessão coube ao **Prof. Dr. André Klein**, orientador. Inicialmente, o presidente fez a apresentação da Comissão Examinadora assim constituída: **Prof. Dr. Emiliano de Oliveira Barreto**, ICBS/Universidade Federal de Alagoas, **Profa. Dra. Luciola da Silva Barcelos**, ICB/Universidade Federal de Minas Gerais, **Profa. Dra. Patrícia Machado Rodrigues e Silva Martins**, IOC/Fundação Oswaldo Cruz, **Profa. Dra. Marina Gomes Miranda e Castor Romero**, ICB/Universidade Federal de Minas Gerais e **Prof. Dr. André Klein**, ICB/Universidade Federal de Minas Gerais, orientador. Em seguida, a candidata fez a apresentação do trabalho que constitui sua **Tese de Doutorado**, intitulada: "**Papel do Receptor Ativado Por Protease (PAR)2 no Recrutamento de Neutrófilos Induzido Pelo Fator Ativador de Plaquetas (PAF)**". Seguiu-se a arguição pelos examinadores e logo após, a Comissão reuniu-se, sem a presença da candidata e do público e decidiu considerar **APROVADA** a Tese de Doutorado. O resultado final foi comunicado publicamente a candidata pelo presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o presidente encerrou a sessão e lavrou a presente ata que, depois de lida, se aprovada, será assinada pela Comissão Examinadora.

Belo Horizonte, 10 de setembro de 2021.

Assinatura dos membros da banca examinadora:



Documento assinado eletronicamente por **Andre Klein, Presidente**, em 07/01/2022, às 11:14, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Marina Gomes Miranda e Castor Romero, Professora do Magistério Superior**, em 07/01/2022, às 11:15, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Emiliano de Oliveira Barreto, Usuário Externo**, em 07/01/2022, às 11:54, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Luciola da Silva Barcelos, Professora do Magistério Superior**, em 11/01/2022, às 16:56, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Patricia Machado Rodrigues e Silva Martins, Usuário Externo**, em 20/01/2022, às 16:44, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1182379** e o código CRC **1715ECD6**.

*A Deus, por ser tão compassivo, misericordioso,
paciente e cheio de amor.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a **Deus** pela minha vida, sem ele eu nada seria.

À toda **minha família**, em especial a meus pais Sandra e Cícero e minhas irmãs Caroline e Patrícia pelo amor incondicional.

Ao **meu orientador**, Prof. Dr. André Klein, que mesmo sem me conhecer, prontamente me concedeu a oportunidade de orientação. Com sua família me receberam em Belo Horizonte, atitude esta que fez total diferença neste imenso desafio. Obrigada por acreditar no meu potencial e pelos inúmeros aprendizados.

Aos **meus amigos de pós-graduação**, em especial a Aline Dias, Antônio Carlos, Wesley Fernandes e Ayslan Barra que juntamente comigo batalharam para que este trabalho fosse realizado, vocês se tornaram meus irmãos.

Aos **professores do PGFISFAR/ICB**, de uma forma bem especial a Profa. Dra. Maria de Fátima Leite, Profa. Dra. Regina Maria, Profa. Dra. Janetti Francischi e Profa. Dra. Mirian Teresa por me conceder apoio na realização deste trabalho. Aos professores: Luciano Capettini, Jacqueline Leite, Giovanni Cassali e Gustavo Meneses pelas colaborações nesta tese. Aos **professores da banca**, pela contribuição e considerações feitas para este trabalho. Muitíssimo obrigada!

Aos **demais amigos**, em especial a Simone Araújo por me ajudar com a correção e a Marissa Coelho por conferir as referências e me emprestar seu PC para que este trabalho fosse escrito. Aos demais, Andressa França, Débora Gomes, Maria Inês, Camila Brito, Emylle Pinto, Rafael Almendra, Natália Matos, Dalton Dittz, Marcone Loiola, Lucas Alves e Rodrigo Machado, longe do Piauí foram minha família em BH, cada um sabe o local especial que ocupa na minha vida!

À **Universidade Federal de Minas Gerais**, pela contribuição na minha vida acadêmica.

Ao **CNPQ, CAPES e FAPEMIG** pelo apoio financeiro.

RESUMO

No local da inflamação pulmonar contendo o fator de ativação de plaquetas (PAF), as proteases e o receptor ativado por protease (PAR)2 também estão abundantemente presentes. Apesar desta evidência, uma cooperação entre PAF e PAR2 na inflamação pulmonar ainda não foi investigada. Desse modo, o objetivo deste trabalho foi avaliar a possível cooperação entre PAFR e PAR2 mediando a inflamação pulmonar em camundongos. Inicialmente, camundongos BALB/*c* machos receberam instilação intranasal de C-PAF ou agonista de PAR2. Em alguns protocolos, os camundongos foram pré-tratados com injeção intraperitoneal com o antagonista do receptor de PAF, antagonista do receptor de PAR2, ou inibidor de proteases. O lavado broncoalveolar ou o tecido pulmonar foram coletados para quantificação do número de neutrófilos, concentração de citocinas, análise histopatológica, e mensuração das enzimas mieloperoxidase e N-Acetil-BD-glucosaminidase. Além disso, foi realizado a análise do rolamento e adesão dos leucócitos por microscopia intravital. Para estudos em cultura de células, a linhagem de células RAW 264.7 foram pré-incubadas com antagonista de PAR2 1h antes do C-PAF, em seguida foi feita análise da sinalização de Ca^{2+} intracelular, imunofluorescência para PAR2/NF- κ B (p65), co-imunoprecipitação de PAR2/PAFR, bem como, para análise da expressão do mRNA de PAR2 por PCR em tempo real. Nossos resultados demonstraram que a produção de CXCL1 e CXCL2, bem como, o recrutamento de neutrófilos mediados pelo C-PAF, pelo menos em parte, são dependentes da ativação de PAR2 nos pulmões de camundongos. Além disso, mostramos que em macrófagos, o antagonismo de PAR2 prejudica a sinalização de Ca^{2+} intracelular e a ativação de NF- κ B (p65) induzida por C-PAF. Portanto, em conjunto, esses resultados evidenciam a interação entre PAR2 e PAFR na inflamação pulmonar e na ativação do NF- κ B (p65) e mobilização intracelular de Ca^{2+} em macrófagos.

PALAVRAS-CHAVE: Inflamação, neutrófilos, fator ativador de plaquetas (PAF), receptor ativado por protease (PAR)2.

ABSTRACT

At the lung inflammation microenvironment containing platelet-activating factor (PAF), proteases and protease-activated receptor (PAR)2 are also abundantly present. Despite this evidence, a cooperation between PAF and (PAR)2 in lung inflammation has not yet been investigated. Thus, the aim of this study was to evaluate the possible cooperation between PAFR and PAR2 mediating lung inflammation in mice. Initially, male BALB/c mice received intranasal instillation of C-PAF or PAR2 agonist. In some protocols, mice were pre-treated with intraperitoneal injection with the PAF receptor antagonist, PAR2 receptor antagonist, or protease inhibitor. Bronchoalveolar lavage or lung tissue were collected for quantification of neutrophil numbers, cytokine concentration, histopathological analysis, and measurement of myeloperoxidase and N-Acetyl-BD-glucosaminidase enzymes. In addition, analysis of leukocyte rolling and adhesion was performed by intravital microscopy. For cell culture studies, RAW 264.7 cell lines were pre-incubated with PAR2 antagonist 1h before C-PAF, followed by analysis of intracellular Ca^{2+} signaling, immunofluorescence for PAR2/NF- κ B (p65), (PAR)2/PAFR co-immunoprecipitation, as well as for analysis of PAR2 mRNA expression by real-time PCR. Our results demonstrate that CXCL1 and CXCL2 production, as well as C-PAF-mediated neutrophil recruitment, at least in part, are dependent on PAR2 activation in mouse lungs. Furthermore, we showed that in macrophages, PAR2 antagonism impairs intracellular Ca^{2+} signaling and C-PAF-induced NF- κ B (p65) activation. Therefore, together, these results evidence the interaction between PAR2 and PAFR in lung inflammation and in the activation of NF- κ B (p65) and intracellular mobilization of Ca^{2+} in macrophages.

KEYWORDS: Inflammation, neutrophils, platelet-activating factor (PAF), protease activated receptor (PAR)2.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Mecanismos efetores dos neutrófilos contra microrganismos invasores.....	29
Figura 2: Estrutura química do PAF (1-O-alkil-2-acetil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfocolina).....	31
Figura 3: Via de sinalização do PAFR.....	33
Figura 4: Mecanismo de ativação do PAR2.....	37
Figura 5: Ilustração do delineamento experimental para a avaliação do recrutamento de leucócitos no BAL.....	47
Figura 6: Instilação intranasal de C-PAF induz a migração de neutrófilos para pulmão de camundongos Balb/c.....	57
Figura 7: A ativação do PAR2 induz a migração de neutrófilos para o pulmão de camundongos Balb/c.....	59
Figura 8: A inibição de proteases endógenas e o antagonismo do PAR2 reduz a migração de neutrófilos induzida por C-PAF para pulmão de camundongos Balb/c.....	61
Figura 9: O antagonismo do PAR2 reduz a inflamação pulmonar induzida por C-PAF em camundongos Balb/c.....	63
Figura 10: O antagonismo do PAR2 reduz os níveis das enzimas NAG (A) e (B) MPO induzidas por C-PAF em pulmão de camundongos Balb/c.....	64
Figura 11: O antagonismo do PAR2 reduz os níveis das quimiocinas CXCL1 e CXCL2 induzidos pelo C-PAF no BAL de camundongos Balb/c.....	66
Figura 12: O antagonismo do PAR2 diminui o rolamento e a adesão de leucócitos na microcirculação mesentérica de camundongos Balb/c.....	68
Figura 13: Co-imunoprecipitação entre PAR2/PAFR em macrófagos murinos RAW 264.7.....	70
Figura 14: O antagonismo do PAR2 reduz a sinalização de Ca ²⁺ intracelular induzida por C-PAF em células RAW 264.7.....	72

Figura 15: O estímulo com C-PAF reduz a expressão do fator de transcrição NF-KB (p65), mas não altera a expressão do PAR2 em células RAW 264.7.....	75
Figura 16: O estímulo com C-PAF aumenta a expressão do mRNA do PAR2 em células RAW 264.7.....	77
Figura 17: Possível mecanismo de interação entre PAF e PAR2 na inflamação pulmonar.....	87

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AP-1: proteína ativadora-1

ATP: trifosfato de adenosina ou adenosina trifosfato

BAL: lavado broncoalveolar

Ca²⁺: íon cálcio

CEBIO: centro de bioterismo

CEUA: comissão de ética no uso de animais

cm: centímetro

CNPq: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

CO₂: gás carbônico

DAG: diacil-glicerol

DMEM: meio de eagle modificado por dulbecco (dulbecco's modified eagle

DPOC: doença pulmonar obstrutiva crônica

ELISA: Ensaio de imunoabsorção Enzimática

ENMD1068: antagonista de PAR2

EROS: espécies reativas de oxigênio

GM-CSF: G-CSF: fator estimulante de colônias de granulócitos

GPCR: *G protein coupled receptors* – receptor transmembrânico acoplado à proteína G

H&E: hematoxilina e eosina

H₂SO₄: ácido sulfúrico

ICAM-1: molécula-1 de adesão intercelular

IL: interleucina

IP₃: inositol 1,4,5-trisfosfato

Kg: quilograma

LTB₄: leucotriena B₄

MCP-1: proteína-1 quimiotática para macrófago

mg: miligrama

mL: mililitro

mm: milímetro

MPO: Mieloperoxidase

NAG: N-Acetil-B-D-Glucosaminidase - N-acetilglicosaminidase

NETs: armadilhas extracelular de neutrófilos (*Neutrophil extracellular traps*)

NF- κ B: fator nuclear kappa B

ng: nanograma

°C: grau Celcius, escala de medida de temperatura

OD: Optical Density – Densidade ótica

PAMPs: padrões moleculares associados a patógenos

DAMPs: danos moleculares associados ao dano celular/tecidual

PAR: receptor ativado por protease (Proteinase Activated Receptor)

PBS: tampão salina fosfato (*Phosphate Buffered Saline*)

PIP2: fosfatidil Inositol 4,5-bifosfato

PLC: fosfolipase C

RNA: ácido ribonucleico

RNA_m: RNA mensageiro

TNF- α : fator de necrose tumoral alfa

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

WT: selvagem (*Wild Type*)

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO.....	17
1.1. Neutrófilos e seus mecanismos efetores na resposta inflamatória	20
1.2. Fator de Ativação de Plaquetas (PAF)	30
1.3. Receptor Ativado por Proteases (PAR) ²	35
2. OBJETIVOS	42
2.1. Objetivo Geral	42
2.2. Objetivos Específicos	42
3. METODOLOGIA.....	45
3.1. Animais.....	45
3.2. Cultivo celular	45
3.3. Análise do número de leucócitos recuperados no lavado broncoalveolar (BAL) ...	45
3.4. Avaliação do papel do PAR2 no recrutamento de leucócitos mediado pelo C- PAF.....	46
3.5. Microscopia intravital confocal (IVM) para análise do rolamento e adesão de leucócitos	47
3.6. Análise dos níveis de citocinas presentes no BAL	48
3.7. Análise histopatológica dos pulmões	49
3.8. Análise dos níveis de mieloperoxidase (MPO) e N-acetil-glucosaminidase (NAG).....	49
3.9. Ensaios de coimunoprecipitação e <i>Western Blott</i>	50
3.10. Avaliação da sinalização de Ca ²⁺ intracelular	52
3.11. Ensaios de imunofluorescência para determinação da expressão do PAR2 e do fator de transcrição NF-kB (p65)	52

3.12. Avaliação da expressão do mRNA do PAR2 por PCR quantitativo em tempo real (qPCR).....	53
3.13. Análise estatística	54
4. RESULTADOS	56
4.1. A instilação intranasal de C-PAF aumenta o número de neutrófilos recuperados no lavado broncoalveolar (BAL) de camundongos BALB/c	56
4.2. O peptídeo sintético ativador do PAR2 (SLIGRL-NH ₂) aumenta o número de neutrófilos recuperados no lavado broncoalveolar (BAL) de camundongos BALB/c...	58
4.3. O antagonista do PAFR (WEB2086) reduz o recrutamento de neutrófilos induzido pela ativação do PAR2 em pulmão de camundongos BALB/c.....	58
4.4. O antagonista do PAR2 (ENMD1068) e a inibição de proteases endógenas reduz o recrutamento de neutrófilos induzido pelo C-PAF em pulmão de camundongos BALB/c.....	60
4.5. O antagonista do PAR2 (ENMD1068) reduz as alterações histopatológicas induzidas pelo C-PAF em pulmão de camundongos BALB/c.....	62
4.6. O antagonista do PAR2 (ENMD1068) reduz a ativação de neutrófilos e macrófagos induzidas pelo C-PAF em pulmão de camundongos BALB/c	64
4.7. O antagonista do PAR2 (ENMD1068) reduz a concentração das quimiocinas CXCL1 e CXCL2 induzidas pelo C-PAF no lavado broncoalveolar (BAL) de camundongos BALB/c.....	65
4.8. O antagonista do PAR2 (ENMD1068) reduz o rolamento e a adesão de neutrófilos induzidas pelo C-PAF na microcirculação mesentérica de camundongos BALB/c	67
4.9. A estimulação simultânea com C-PAF + SLIGRL-NH ₂ aumenta a interação física entre o PAR2 e o PAFR em macrófagos	69
4.10. O antagonista do PAR2 (ENMD1068) reduz a sinalização de Ca ²⁺ induzida pelo C-PAF em macrófagos	71

4.11. O antagonista do PAR2 (ENMD1068) reduz expressão nuclear do fator de transcrição NF- κ B (p65) induzido pelo C-PAF em macrófagos	73
4.12. O C-PAF reduz a expressão do PAR2 em macrófagos	74
4.13. A expressão do RNA mensageiro do PAR2 é aumentada em macrófagos estimulados com C-PAF	76
5.DISSCUSSÃO.....	879
6. CONCLUSÃO.....	87
REFERÊNCIAS	88
ANEXOS	103

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A inflamação pulmonar compreende um mecanismo de defesa do sistema imunológico do hospedeiro a insultos que incluem patógenos, toxinas, poluentes, irritantes e alérgenos. No entanto, a inflamação não controlada é um componente crítico para uma variedade de doenças pulmonares e das vias aéreas, como síndrome do desconforto respiratório agudo, doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), asma e fibrose cística (FC)(YU *et al.*, 2008). No ambiente da inflamação pulmonar, a ativação exacerbada de células imunes residentes, liberação de mediadores pró-inflamatórios e acúmulo de neutrófilos e monócitos produzem lesão na integridade do pulmão e das vias aéreas (AGHASAFARI; GEORGE; PIDAPARTI, 2019). Dentre os mediadores inflamatórios, proteases como a tripsina, triptase de mastócitos, elastase de neutrófilos, fatores de coagulação (FVIIa e FXa), proteinase-3, catepsina G, proteases bacterianas ou derivadas de alérgenos desempenham atividade nos danos aos pulmões (REED; KITA, 2004).

Os receptores ativados por proteases (PARs, do inglês *Protease-activated receptors*) são uma família de receptores acoplados à proteína (GPCRs) ativados através da clivagem proteolítica por proteases (HOLLENBERG, MORLEY D.; COMPTON, 2002). O PAR2 é ubiquamente distribuído por todo o corpo e, particularmente expresso no trato respiratório na superfície das células do músculo liso vascular, células endoteliais e epiteliais das vias aéreas, fibroblastos traqueais, mastócitos, macrófagos alveolares, neutrófilos e eosinófilos (VERGNOLLE, NATHALIE, 2005). Proteases liberadas ou geradas nas vias aéreas durante a inflamação pulmonar induzem a ativação do PAR2, que por sua vez, leva à vasodilatação, extravasamento de proteínas plasmáticas, secreção de citocinas pró-inflamatórias e recrutamento de leucócitos (HOLLENBERG, M. D. *et al.*, 2014; RALLABHANDI *et al.*, 2008). A ativação do PAR2 ocorre através da clivagem por proteases de sítios específicos no segmento N-terminal extracelular do receptor. A

clivagem destes sítios expõe um domínio peptídico que interage com regiões conservadas na segunda alça extracelular do próprio receptor para iniciar a sinalização intracelular (POOLE *et al.*, 2013). A sinalização ocorre através da interação com múltiplos subtipos heterotriméricos da proteína G, incluindo $G\alpha_q$, $G\alpha_i$ e $G\alpha_{12/13}$. Uma vez ativados, são rapidamente dessensibilizados e internalizados após a fosforilação por GRKs, PKC ou PKA, seguida de ligação a β -arrestinas, podendo posteriormente serem degradados ou reciclados (AYOUB; AL-SENAIDY; PIN, 2012; COTTRELL *et al.*, 2003).

O fator de ativação de plaquetas (PAF, do inglês *Platelet Activating Factor*) é um potente mediador fosfolípido pró-inflamatório liberado por uma ampla variedade de células, incluindo plaquetas, basófilos, eosinófilos, mastócitos, células endoteliais, neutrófilos e macrófagos (ISHII; SHIMIZU, 2000). O PAF atua em seus receptores específicos (PAFR, *Platelet-activating factor receptor*) acoplados às subunidades $G\alpha_q$ e $G\alpha_i$ da proteína G, expresso em muitos tipos celulares como monócitos, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, e células endoteliais (BROWN *et al.*, 2006), suas ações biológicas incluem a liberação de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, quimiotaxia de leucócitos, agregação de plaquetas, vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular, estresse oxidativo, hiperreatividade das vias aéreas e broncoconstrição (CHAO; OLSON, 1993; YOST; WEYRICH; ZIMMERMAN, 2010).

Embora o PAF seja um mediador com papel central da fisiopatologia de doenças inflamatórias pulmonares como a asma, os antagonistas do PAFR, até agora, não demonstraram eficácia no uso clínico. Desse modo, devido à natureza complexa do processo inflamatório no pulmão e nas vias aéreas; novas abordagens de ensaios clínicos podem atuar em diferentes alvos da cascata inflamatória (KASPERSKA-ZAJAC, ALICJA; BRZOZA; ROGALA, 2008a). No local da inflamação pulmonar que contém PAF, proteases estão abundantemente presentes, sendo portanto, a ativação de PAR2 uma etapa importante para a progressão da inflamação (ALLARD *et al.*, 2014; COCKS;

MOFFATT, 2001). Como por exemplo, em pacientes com asma grave de difícil controle que apresentam um aumento significativo do músculo liso das vias aéreas associado à superexpressão de PAR2, bem como, altos níveis de ligantes PAR2 no BAL (AUBIER *et al.*, 2016). Além disso, camundongos *knock-out*, que não expressam o receptor (PAR2^{-/-}) mostram níveis mais baixos de hiperresponsividade e inflamação das vias aéreas comparado a camundongos selvagens (*Wild type*, WT). Ainda, a inibição funcional de PAR2 com anticorpo monoclonal anti-PAR2 (SAM-11) reduz a inflamação das vias aéreas em modelo de asma em camundongos (ASADUZZAMAN *et al.*, 2015; SCHMIDLIN *et al.*, 2002). No entanto, apesar das evidências, um papel para o PAR2 em cooperação com o PAF na inflamação pulmonar ainda não foi investigado. Neste trabalho, propomos investigar uma possível cooperação entre o PAF e o PAR2 mediando o recrutamento de neutrófilos na inflamação pulmonar em camundongos Balb/c.

1.1. Neutrófilos e o seus mecanismos efetores na resposta inflamatória

A resposta inflamatória consiste em um mecanismo de defesa do organismo vital contra estímulos por agentes infecciosos e não infecciosos (ROCK; KONO, 2008). Caracteriza-se clinicamente por cinco sinais fundamentais que incluem: *rubor* (vermelhidão), *calor* (calor), *dolor* (dor) e *tumor* (inchaço) conforme descrito por Celsus (30 AC -38 D. C.) e *functio laesa* (perda de função) conforme adicionado por Galeno (129-210 D. C.) (MEDZHITOV, 2008). A duração da resposta inflamatória pode variar de uma fase aguda a uma fase crônica. A fase aguda da inflamação é de curta duração, caracterizada por eventos de vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular, exsudação de líquidos e proteínas plasmáticas, bem como, a migração de leucócitos para o foco inflamatório (HANNOODEE; NASURUDDIN, 2020). No entanto, a inflamação persistente, seja como resultado da exposição prolongada ao agente incitante ou reação inadequada contra moléculas próprias, pode levar à fase crônica. A fase crônica caracteriza-se por ser de longa duração, associada à presença de linfócitos, macrófagos, proliferação de novos vasos sanguíneos e tecido conjuntivo (NATHAN, 2002). Portanto, apesar de ser um mecanismo de defesa essencial e inicialmente benéfico para o hospedeiro, a inflamação desregulada ou sustentada leva a condições patológicas incluindo a artrite, asma, aterosclerose, doenças autoimunes, etc.

Uma característica marcante da resposta inflamatória é o recrutamento de células imunes para os locais de inflamação. Neste contexto, os neutrófilos ou leucócitos polimorfonucleares (PMN) são células efetoras essenciais da resposta imune inata, formando a primeira linha de defesa do organismo contra patógenos. Representam o tipo de célula imunológica mais abundante na circulação, estimando-se que diariamente cerca de 5×10^{10} - 10^{11} novos neutrófilos sejam produzidos na medula óssea (KOLACZKOWSKA; KUBES, 2013). Desse modo, mecanismos, como a taxa de proliferação/diferenciação de precursores de neutrófilos na medula óssea, a saída de

neutrófilos maduros da medula óssea para a periferia e a eliminação de neutrófilos pelo sistema fagocítico regulam a homeostase de neutrófilos no sangue periférico (BUGL *et al.*, 2012). Desse modo, infecções recorrentes podem estar relacionadas mecanismos de falha nas funções que regulam o recrutamento de neutrófilos, como na síndrome da deficiência de adesão de leucócitos. Em contraste, um aumento inadequado do número de neutrófilos recrutados pode levar a um estado de inflamação exacerbada ocasionando danos graves aos tecidos e órgãos (FURZE; RANKIN, 2008; MCDONALD; KUBES, 2011).

Os receptores de quimiocinas CXCR2 e CXCR4 são responsáveis por manter os neutrófilos na medula óssea, por outro lado o G-CSF (do inglês *Granulocyte colony-stimulating fator*) induz a saída destas células da medula óssea para a circulação por um mecanismo de interferência na interação CXCR4-CXCL12 (SANZ; KUBES, 2012). O recrutamento de neutrófilos da circulação sanguínea para os locais de inflamação geralmente ocorre nas vênulas pós-capilares da microcirculação sistêmica. A partir do sangue periférico os neutrófilos podem ser rapidamente recrutados para os tecidos no caso de invasão por patógenos ou dano tecidual. Estímulos pró-inflamatórios como PAMPs (do inglês *Pathogen Associated Molecular Patterns*) ou DAMPs (do inglês *Damage-associated Molecular Patterns*) ativam células residentes a liberarem mediadores pró-inflamatórios como as citocinas interleucina (IL)-1 β e fator de necrose tumoral (TNF); quimiocinas CXCL1 e CXCL2, entre outros mediadores como o PAF, prostaglandinas, bradicinina, serotonina e histamina para iniciarem o rápido recrutamento de neutrófilos (ABDULKHALEQ *et al.*, 2018).

A diapedese dos neutrófilos é um processo constituído por diferentes etapas que incluem a captura, rolamento, adesão ao endotélio e a transmigração para fora dos vasos sanguíneos. Estes eventos dependem diretamente da ativação de moléculas de adesão presentes no endotélio da microcirculação, localizada próxima ao local da inflamação.

Células endoteliais ativadas expressam selectinas E e P, que se ligam a seus ligantes presentes na superfície dos neutrófilos, como o PSGL1 (do inglês *P-selectin glycoprotein ligand 1*) permitindo, assim, a captura dos neutrófilos que circulam no centro dos vasos sanguíneos para a superfície do endotélio, ocasionando o subsequente rolamento ao longo do vaso na direção do fluxo sanguíneo (DEJANA, 2006). Em seguida, os neutrófilos são ativados por quimiocinas, principalmente os ligantes do receptor CXCR2, que se ligam ao endotélio por meio de glicoaminoglicanos e induzem um estado de alta afinidade pelas integrinas β_2 . Desse modo, a interação entre os neutrófilos e as células endoteliais depende da ação das integrinas β_2 -LFA-1 ($\alpha_L\beta_2$ -integrina) e MAC-1 ($\alpha_M\beta_2$ -integrina) que medeiam a adesão dos neutrófilos ao endotélio. Além disso, a firme adesão dos neutrófilos ao endotélio ocorre por meio da ligação das integrinas aos seus ligantes ICAM-1 e ICAM-2 (do inglês *Intercellular Adhesion Molecule 1 and 2*) nas células endoteliais (VESTWEBER, 2015).

As quimiocinas CXCL8 (também conhecido como IL-8) em humanos e seus análogos em camundongos: CXCL1 (KC em camundongos), CXCL2 e CXCL5 atuam sinalizando através dos receptores de quimiocina CXCR2, por meio dos quais promovem a ativação e adesão dos neutrófilos ao endotélio. Além desses eventos, a interação das quimiocinas que possuem cargas positivas com moléculas de sulfatos de heparan carregadas negativamente contribuem para a produção de um gradiente eletroquímico quimiotático intravascular que favorece o direcionamento dos neutrófilos para o local da inflamação (SAWANT *et al.*, 2016). Os neutrófilos ativados e firmemente aderidos ao endotélio iniciam o processo de diapedese, que consiste na transmigração paracelular, que ocorre por meio das junções entre células endoteliais ou transcelular, por meio das células endoteliais. Neste processo, as integrinas como a PECAM-1 (do inglês *adhesion molecules platelet/endothelial cell adhesion molecule 1*)

e ESAM (do inglês *endothelial cell-selective adhesion molecule*) desempenham papel fundamental.

Ao atravessar a camada de células endoteliais, o próximo desafio dos neutrófilos consiste em atravessar a membrana basal perivascular. Estes eventos parecem envolver uma regulação positiva da integrina $\alpha\beta 1$ de maneira dependente de PECAM-1 em neutrófilos. Além disso, proteases de neutrófilos como a elastase neutrofilica e MMP9 (do inglês *matrix metalloproteinase 9*) atuam facilitando a interação dos neutrófilos com laminina na membrana basal e o subsequente recrutamento dos neutrófilos (SANZ; KUBES, 2012). No local da inflamação, em resposta a estímulos pró-inflamatórios produzidos por células residentes no tecido, os neutrófilos tornam-se completamente ativados. A total ativação dos neutrófilos caracteriza-se pela liberação de proteínas granulares, fagocitose dos patógenos, produção e liberação de NETs (do inglês *Neutrophil extracellular traps*), eventos cruciais para destruição dos patógenos invasores (MAYADAS; CULLERE; LOWELL, 2014).

Existem três principais tipos de grânulos citoplasmáticos que modulam a função dos neutrófilos: os grânulos primários ou azurófilos, secundários ou específicos e terciários ou de gelatinase. Os grânulos primários ou azurófilos são os primeiros a serem sintetizados no estágio promielocítico, onde existe uma alta atividade da enzima peroxidase devido à abundância de enzimas produtoras de oxidantes como a mieloperoxidase (MPO). Além disso, eles armazenam os mediadores tóxicos e proteolíticos, incluindo a elastase, catepsina G, proteinase 3, azurocidina e defensinas. Essas serino proteases neutrofilicas são capazes de degradar uma vasta gama de componentes da matriz extracelular como a elastina, fibronectina e colágeno tipo IV, possuindo, portanto, um papel crítico na defesa do hospedeiro (FAURSCHOU; BORREGAARD, 2003). Em contrapartida, os grânulos secundários são sintetizados no estágio de mielócitos de maturação dos neutrófilos, nestes grânulos estão contidos:

colagenase, gelatinase, lactoferrina, lisozima, lipocalina/NGAL e receptores de membrana. Os grânulos de gelatinase são formados no estágio de metamielócito e armazenam a gelatinase, catepsina, aciltransferase e colagenase. Assim, os grânulos secundários e terciários compartilham alguns componentes, no entanto, não possuem atividade peroxidase, pois não armazenam a enzima MPO (FAURSCHOU; BORREGAARD, 2003).

A atividade microbicida desencadeada pela ativação dos neutrófilos depende da degradação de vesículas no fagolisossomo ou no espaço extracelular, liberação do conteúdo dos grânulos como proteínas enzimáticas ou antimicrobianas. Inicialmente, a ativação dos neutrófilos leva à fosforilação da p47phox ou NCF1 (do inglês *neutrophil cytosolic factor 1*), que promove a migração de componentes citosólicos (p40-phox, p47-phox e p67-phox) para a membrana plasmática, onde se associam ao citocromo b558 e tornam a enzima NADPH (do inglês *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*) ativa. Na face interna da membrana do neutrófilo um complexo da enzima NADPH oxidase resulta na produção de ânions superóxido ($O_2^{\cdot-}$), que rapidamente se dismutam para formar o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). A enzima MPO contém o grupo heme nos grânulos azurófilos primários de neutrófilos, é liberada por meio da ativação celular no fagolisossomo ou no espaço extracelular. A MPO atua catalisando a reação de H_2O_2 com íons cloreto (Cl^-) para formar ácido hipocloroso (HClO), um oxidante altamente tóxico usado pelos neutrófilos para matar uma ampla gama de patógenos (Figura 1) (ARATANI, 2018).

A liberação de NETs consiste, em um outro importante mecanismo efetor dos neutrófilos para capturar microrganismos invasores. Os NETs são estruturas de filamentos da cromatina revestidos por histonas, proteases, proteínas granulares e citosólicas. Embora a maioria do DNA presente nos NETs sejam oriundos do núcleo, essas estruturas também contêm DNA mitocondrial. A NETose é o termo que define o

mecanismo pelo qual os TNEs imobilizam, neutralizam e matam as bactérias, fungos, vírus e parasitas. Para que ocorra NETose, ocorrem alterações na estrutura do núcleo, aumento da permeabilidade das membranas nucleares e granulares e inativação das histonas nos neutrófilos. Essas alterações expandem e misturam a cromatina com o conteúdo dos grânulos levando a liberação de NETs nos espaços extracelulares através da membrana plasmática permeável (Figura 1) (KRUGER *et al.*, 2015).

A fagocitose é um mecanismo essencial da resposta imune inata para a eliminação eficaz de patógenos, células mortas e restos de tecidos. Os neutrófilos fagocíticos atuam por meio do reconhecimento dos patógenos através da interação dos receptores de superfície dos neutrófilos com os receptores opsônicos presentes na superfície dos patógenos. A internalização do microrganismo/partícula ocorre por meio da formação de saliências da membrana plasmática da célula, moldadas pela ação de filamentos de actina, que circundam o material próximo. Além disso, os receptores Fc γ que incluem Fc γ RIIA (CD32) e Fc γ RIIIB (CD16) e os receptores do complemento, CR1 (CD35) e CR3 (ou integrina CD11b/CD18 se ligam as partículas alvo formando um complexo envolvendo a partícula pela membrana plasmática (RAWAT; SYEDA; SHRIVASTAVA, 2021). Quando ativados, estes receptores iniciam a ativação de vias de sinalização que remodelam os lipídios presentes na membrana das células ocasionando a reorganização do citoesqueleto de actina para estender a membrana celular ao redor da partícula e posteriormente internaliza-las no fagossomo. A fusão desses fagossomos com os grânulos intracelulares dos neutrófilos leva a maturação do fagossomo, ocasionando o processo de explosão oxidativa por meio da geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) utilizando o complexo NADPH oxidase para matar microrganismos internalizados (Figura 1) (LEE, W. L.; HARRISON; GRINSTEIN, 2003).

Em doenças que afetam as vias aéreas, os neutrófilos são responsáveis pela liberação de proteases, ROS e hipóxia grave (falta de oxigênio) que são características de

doenças como a síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA), doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), asma e fibrose cística (FC)(GROMMES; SOEHNLEIN, 2011). Neste cenário, os macrófagos alveolares residentes no pulmão fornecem a primeira linha de defesa contra microrganismos ou partículas externas que chegam às vias aéreas inferiores. Em resposta à PAMPs, DAMPs, citocinas, fatores de crescimento e outros mediadores liberados neste microambiente, os macrófagos alveolares são fenotipicamente e funcionalmente modificados para adotar diferentes perfis pró-inflamatórios, anti-inflamatório, pró-resolução e/ou regeneração dos tecidos (CHEN; ZIBOH; GIRI, 1997). Além de suas habilidades na fagocitose de micro-organismos, os macrófagos alveolares desempenham um papel importante na liberação de citocinas pró-inflamatórias como as interleucinas, IL-8, IL-1 β e fator de necrose tumoral TNF- α que atuam estimulando a migração de leucócitos para o pulmão (NIESLER *et al.*, 2014). Nesse contexto, a migração de neutrófilos para o tecido pulmonar difere dos demais tecidos devido a constituição da arquitetura anatômica do pulmão. Na circulação sistêmica, o rolamento dos neutrófilos é mediado por L-selectina e P-selectina e seus respectivos ligantes, ocorrendo nas vênulas pós-capilares. No entanto, no pulmão o diâmetro reduzido dos pequenos capilares (2 e 15 μ m) pulmonares não permite o rolamento de neutrófilos no leito microvascular ao redor do espaço entre os alvéolos. Desse modo, os neutrófilos alteram-se morfológicamente para adaptarem-se a uma forma alongada capaz de passar através dos capilares. Além disso, a velocidade do fluxo sanguíneo na rede capilar do pulmão é relativamente baixa. Em conjunto, estes fatores são responsáveis pelo aumento do tempo de trânsito dos neutrófilos através do pulmão e pelo chamado “pool marginado de neutrófilos” na microvasculatura pulmonar em condições fisiológicas (GIACALONE *et al.*, 2020). A neutrofilia das vias aéreas é uma importante característica fisiopatológica comum de muitas doenças pulmonares inflamatórias associada à progressão da doença, em alguns casos de modo

independentemente da causa inicial. A ação de mediadores como as citocinas IL -8, IL-1 β , TNF- α e leucotrieno (LT)B₄ regulam a migração de neutrófilos para as vias aéreas. Neutrófilos pulmonares ativados liberam elastase de neutrófilos e MPO que atuam conjuntamente para a inflamação dos brônquios, fibrose peribronquiolar e enfisema. Desse modo, sabe-se que a inflamação neutrofílica tem papel prejudicial em doenças pulmonares, como asma grave, DPOC, FC, pneumonia, etc (LIU, J. *et al.*, 2017). A inflamação mediada por neutrófilos é fundamental para o desenvolvimento e progressão da DPOC. Foi demonstrado que em pulmões de pacientes com DPOC que o número de neutrófilos são aumentados em comparação com fumantes assintomáticos (STĂNESCU *et al.*, 1996). Além disso, a quantidade de elastase de neutrófilos no interstício pulmonar contribui para a gravidade do enfisema humano (DAMIANO *et al.*, 1986).

Os níveis de IL-8 e MMP-9 foram encontrados elevados em amostras de escarro de pacientes com DPOC e correlacionados com a gravidade da doença (BARNES *et al.*, 2015). Na asma, uma doença inflamatória crônica das vias aéreas, os eosinófilos desempenham papel chave. No entanto, os neutrófilos também são responsáveis pela produção e liberação de citocinas e mediadores pró-inflamatórios que diretamente contribuem para a patogênese da doença (DOUWES *et al.*, 2002). Sabe-se que a liberação de citocinas de neutrófilos como o TNF- α estimula a migração de eosinófilos, o TGF- β estimula a proliferação de fibroblastos nas vias aéreas. A citocina oncostatina M (OSM), liberada pelos neutrófilos estimula a proliferação de células musculares lisas e fibroblastos na parede brônquica. Os neutrófilos produzem LTB₄ e PAF mediadores chaves para a patogênese da asma. Enzimas produzidas pelos neutrófilos, incluindo MMP-9, a elastase neutrofílica e a mieloperoxidase são os principais mediadores no remodelamento das vias aéreas asmáticas (MONTESEIRÍN, 2009). A síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA) e lesão pulmonar aguda (LPA) podem ter origem infecciosas e não infecciosas, sabe-se que o número de neutrófilos no fluido

brincoalveolar (BALF) de pacientes com SDRA/LPA encontra-se elevado, contribuindo para o dano ao tecido pulmonar causado por enzimas proteolíticas derivadas de neutrófilos como a elastase. Portanto, no microambiente de inflamação pulmonar a infiltração de neutrófilos desencadeia o estresse oxidativo, liberação de proteases e NETs, o que resulta em danos aos pulmões (GROMMES; SOEHNLEIN, 2011).

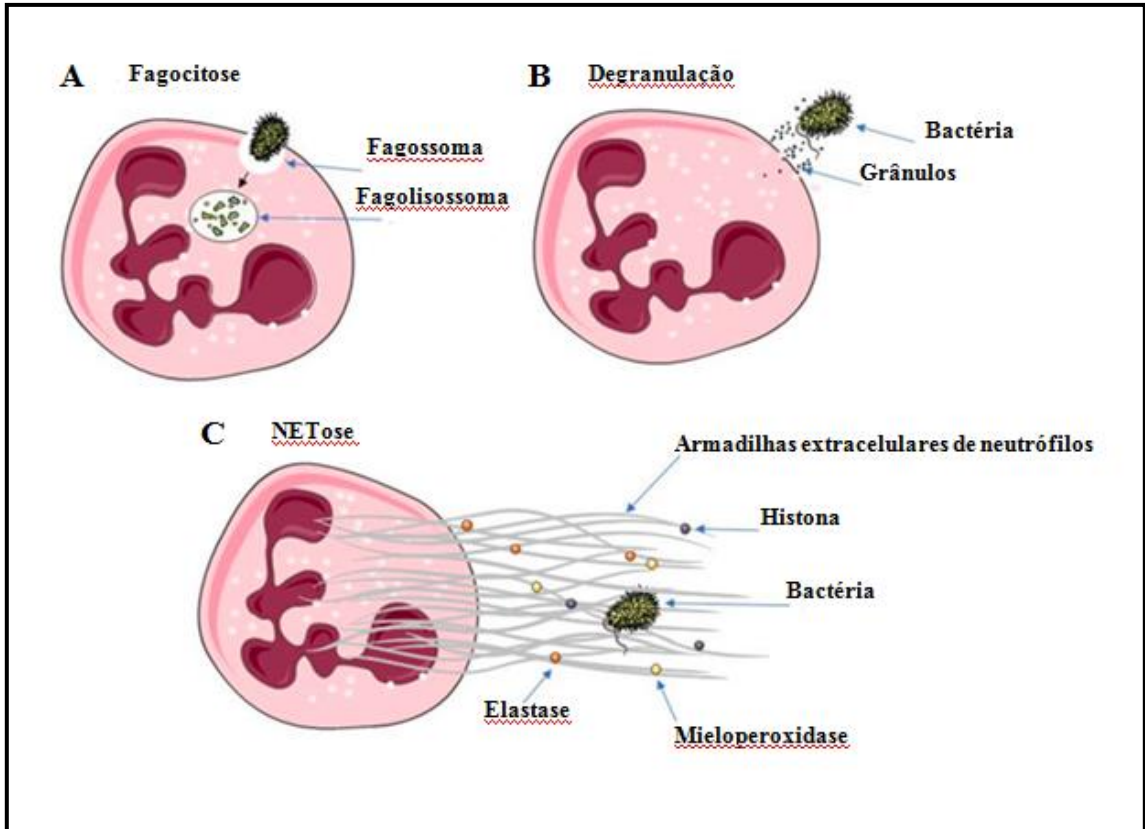


Figura 1: Mecanismos efetores dos neutrófilos contra microrganismos invasores.

(A) Durante a fagocitose, os lisossomos compondo-se de proteínas antimicrobianas se fundem com os vacúolos contendo os microorganismos internalizados (fagossomos), formando os fagolisossomas, onde ocorre a destruição dos organismos. (B) A ativação dos neutrófilos em resposta a estímulos pró-inflamatórios desencadeia a liberação de proteínas granulares. (C) Mecanismo de NETose, no qual há a liberação de NETs que são estruturas de filamentos da cromatina revestidos por histonas, proteases, proteínas granulares e citosólicas com a finalidade de imobilização, neutralização e eliminação dos microrganismos. Adaptado de (GIERLIKOWSKA *et al.*, 2021).

1.2. Fator de Ativação de Plaquetas (PAF)

Os primeiros relatos sobre o PAF na literatura ocorreram em 1966, quando o grupo de pesquisa de BARBARO e ZVAIFLER descreveram uma substância que promovia a liberação de histamina induzida por antígeno de plaquetas de coelho (BARBARO; ZVAIFLER; BARON, 1966). Anos depois, JACQUES BENVENISTE e colaboradores relataram os efeitos de um novo fator que induzia a agregação, secreção de plaquetas e liberação de histamina dependente de leucócitos a partir de plaquetas de coelho (BENVENISTE; HENSON; COCHRANE, 1972). Devido aos efeitos do PAF na agregação e ativação de plaquetas o termo fator de ativação de plaquetas (PAF) foi nomeado para referir-se a esta substância (CHIGNARD *et al.*, 1979). A estrutura química do PAF (*1-O-alkil-2-acetil-sn-glicero-3-fosfolina*) foi publicada por DEMOPOULOS e colaboradores (1979), nomeada de AcGEPC (*acetil-gliceril-éter-fosfolina*) com efeitos biológicos indistinguíveis dos efeitos do PAF gerado naturalmente a partir das plaquetas de coelho, posteriormente confirmada oficialmente através de estudos com espectrometria de massa (CUSACK, 1980; DEMOPOULOS; PINCKARD; HANAHAN, 1979; HANAHAN *et al.*, 1980). O receptor do PAF (PAFR), é um GPCR inicialmente isolado a partir de um clone de cDNA que codifica o receptor de PAF de uma biblioteca de cDNA de pulmão de cobaia através do método de clonagem de expressão em oócitos de *Xenopus Leavis* (HONDA *et al.*, 1991). Posteriormente, o cDNA para o PAFR foi clonado a partir de uma biblioteca de cDNA de leucócitos humanos, usando um fragmento do cDNA do PAFR anteriormente identificado em pulmão de cobaia (NAKAMURA *et al.*, 1991).

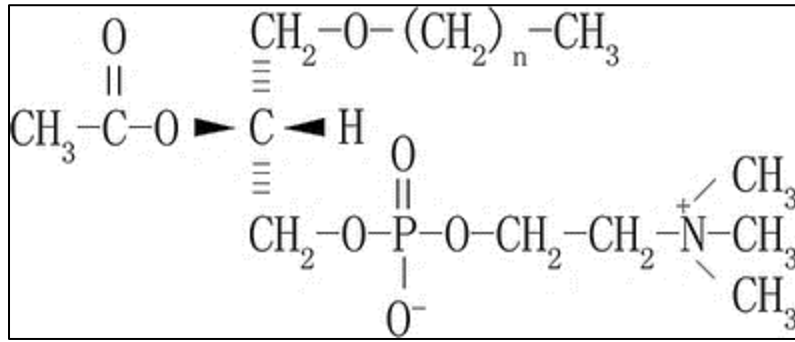


Figura 2: Estrutura química do PAF (1-O-alkil-2-acetil-sn-glicero-3-fosfocolina).

Adaptado de (LIU, Y. *et al.*, 2017).

O PAF é um mediador produzido imediatamente após estímulos celulares como inflamação mediada por agentes infecciosos ou não infecciosos, portanto, não existe de forma pré-formada no interior das células. No entanto, quando sintetizado permanece associado às células para ser posteriormente secretado por meio de vesículas de transporte. As funções fisiológicas desempenhadas pelo PAF são mantidas por meio da sua síntese enzimática que ocorre em diversos tecidos do corpo pela via denominada de síntese de novo (PRESCOTT *et al.*, 2003). Desse modo, a síntese de novo do PAF é iniciada quando o resíduo acetil é transferido para um fosfolípídeo o *alkil-liso-glicerofosfato* pela ação da enzima acetiltransferase, formando o *alkil-acetil-glicerofosfato*. Posteriormente o *alkil-liso-glicerofosfato* é hidrolisado em *alkil-acetil-glicerol* pela ação da fosfohidrolase. Por fim, a fosfocolina é adicionada pela colina fosfotransferase (CPT) formando então o PAF (*alkil-acetil-glicerofosfocolina*) (SNYDER; FITZGERALD; BLANK, 1996).

Em contrapartida, durante a inflamação, o PAF é sintetizado pela via de remodelamento. Nesta via, a ativação de células inflamatórias induz a mobilização de cálcio intracelular que ativa a enzima fosfolipase A2 (cPLA₂) dependente de cálcio. Para

a formação do PAF, inicialmente um ácido graxo é removido da posição *sn-2* da estrutura de três carbonos da molécula do fosfolípídeo fosfatidilcolina por meio da ação da enzima fosfolipase A₂, resultando na produção de liso-fosfatidilcolina. Em seguida, um grupo acetil é anexado a molécula pela enzima lisofosfatidilcolina acetiltransferase (LPCAT) formando o PAF. Portanto, os níveis do PAF são mantidos em circunstâncias fisiológicas pela via de síntese de novo, no entanto, estímulos inflamatórios estimulam a liberação de PAF pela via de remodelamento em uma variedade de células como: neutrófilos, macrófagos, células endoteliais, plaquetas, eosinófilos, mastócitos e queratinócitos (HARAYAMA *et al.*, 2008). Além disso, a geração de fosfolípidios oxidados é estruturalmente relacionada ao PAF e possuem atividades biológicas semelhantes ao PAF, dentre eles: o *1-0-alkuil-2-N-metilcarbamilsn-glicero-3-fosfocolina* (C-PAF), um análogo bioativo não metabolizável do PAF, capaz de estimular neutrófilos humanos a sintetizar PAF endógeno (TESSNER; O'FLAHERTY; WYKLE, 1989).

Uma vez produzido, o PAF pode atuar de maneira autócrina e/ou parácrina ligando-se ao seu próprio receptor o PAFR, localizado tanto na membrana plasmática quanto na membrana nuclear da célula (YOST; WEYRICH; ZIMMERMAN, 2010). O gene do PAFR está localizado no cromossomo 1 na região p35-p34 com duas regiões promotoras que regulam a expressão de dois subtipos de mRNA (mRNA 1 e 2), no entanto, uma única proteína PAFR é produzida. Fatores de transcrição como o NF- κ B, SP-1 e a citocina TGF- β 2 regulam de modo positivo a expressão celular do PAFR. Os efeitos fisiológicos do PAF ocorrem mediante sua ligação ao PAFR pode resultar na ativação das proteínas G_{αq} ou G_{αi} (Figura 3) (BROWN *et al.*, 2006; KO *et al.*, 2002). A ativação da proteína G_{αq} induz hidrólise mediada por PLC β (fosfolipase C β) de PIP₂ (fosfatidilinositol 4,5-bifosfato) para produzir IP₃ (inositol 1,2,4 trisfosfato) e DAG (diacilglicerol), levando à liberação de Ca²⁺ das reservas citoplasmáticas, ativação de PKC e a transmigração nuclear e ativação do NF- κ B e AP-1. Em contrapartida, a ativação

da proteína $G_{\alpha i}$ inibe a conversão de ATP em cAMP pela adenilato ciclase (AC), evitando assim a ativação de PKA e eventos de sinalização relacionados subsequentemente (KRAVCHENKO *et al.*, 1995).

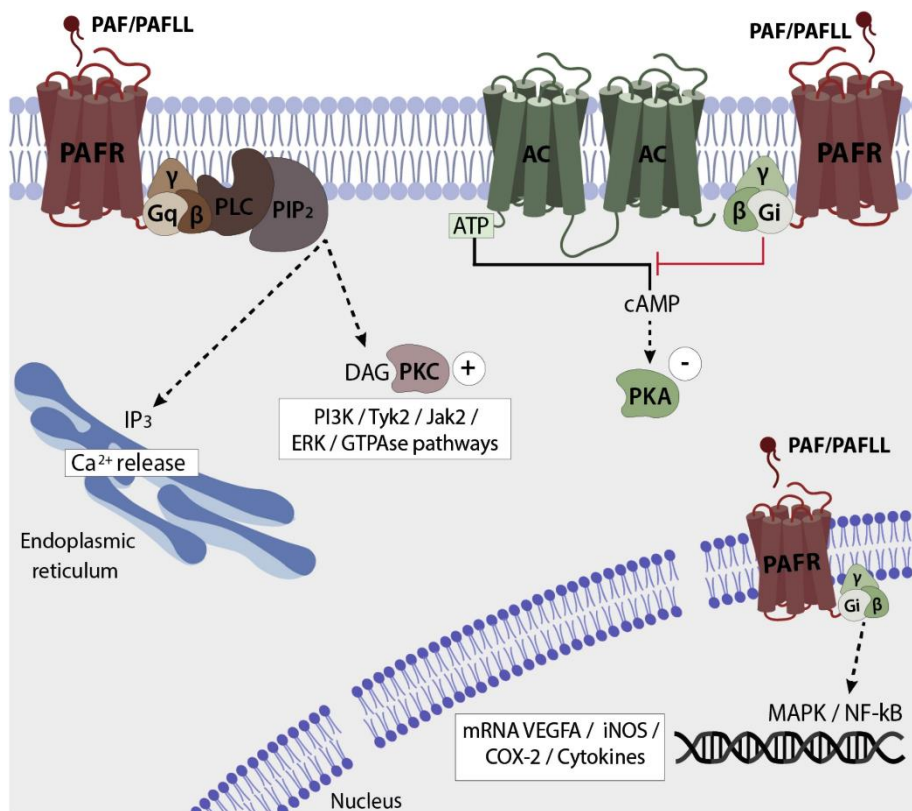


Figura 3: Via de sinalização do PAFR. O PAFR pode estar acoplado às proteínas $G_{\alpha i}$ e $G_{\alpha q}$. A proteína $G_{\alpha q}$ induz a $PLC\beta$ a hidrolisar PIP_2 em IP_3 e DAG. O IP_3 aumenta a concentração intracelular de Ca^{2+} enquanto o DAG ativa a PKC. A ativação da proteína $G_{\alpha i}$ bloqueia a conversão de ATP em cAMP pela enzima AC, inibindo a ativação da proteína PKA. No núcleo, a ativação das proteínas PAFR atua como um potente indutor da ativação do fator de transcrição NF- κ B. Modificado de (DALMASO *et al.*, 2021).

Os efeitos pró-inflamatórios do PAF no pulmão incluem a ativação macrófagos, mastócitos e células endoteliais, indução da permeabilidade vascular, vasoconstrição, ativação de plaquetas, migração de neutrófilos, monócitos e eosinófilos (UHLIG; GÖGGEL; ENGEL, 2005). Sabe-se que a inalação de PAF causa broncoconstrição, hiperreatividade das vias aéreas, diminuição da pressão arterial sistêmica e leucopenia. O PAF estimula a liberação de enzimas lisossomais, ânions superóxidos e LTB₄ em neutrófilos. Em macrófagos alveolares o PAF aumenta a produção TNF- α , IL-6, ânion superóxido e peroxidase de eosinófilos (CASTOR *et al.*, 2012). O PAFR expresso no epitélio das vias aéreas regulada positivamente a DPOC (SHUKLA *et al.*, 2014). Na asma, uma doença caracterizada por inflamação pulmonar e das vias aéreas, o PAF contribui para a broncoconstrição, hiperresponsividade brônquica e comprometimento das trocas gasosas. Apesar desses efeitos, estudos com antagonistas do PAFR não comprovaram benefícios clínicos. Sabe-se que outros mediadores inflamatórios como a proteases, histamina e leucotrienos estão fortemente envolvidos na inflamação das vias aéreas e pulmão (KASPERSKA-ZAJAC, A.; BRZOZA; ROGALA, 2008a; KASPERSKA-ZAJAC, ALICJA; BRZOZA; ROGALA, 2008b). Portanto, é possível que estudos que avaliem um possível *cross-talk* entre estes mediadores apresentem benefícios clínicos promissores.

1.3. Receptor Ativado por Proteases (PAR)2

Proteases são enzimas com atividade proteolítica que atuam catalisando a quebra de proteínas por meio da hidrólise de ligações peptídicas. Além disso, possuem diversas funções regulatórias como: progressão do ciclo celular, proliferação celular, morte celular, replicação do DNA, remodelação de tecidos, hemostasia, cicatrização de feridas e resposta imune (HEUTINCK *et al.*, 2010). A sinalização mediada por proteases ocorre por meio da ativação de receptores ativados por proteases (PARs) e/ou mecanismos independentes de receptores. Os PARs constituem uma família de receptores acoplados à proteína G, composta por quatro subtipos de receptores, nomeados de PAR1 a PAR4 de acordo com a sua ordem de descoberta (HEUBERGER; SCHUEPBACH, 2019). O PAR2 compreende um dos subtipos dos PARs, o qual pode ser clivado e irreversivelmente ativado por uma variedade de proteases endógenas, incluindo a tripsina, triptase de mastócitos, elastase de neutrófilos, proteinase-3, matriptase, acrosina, fatores de coagulação (Xa/VIIa), catepsina G e S e peptidases relacionadas às calicreínas (DÉRY *et al.*, 1998; STEFANSSON *et al.*, 2008; SUN *et al.*, 2001). No entanto, o PAR2 também pode ser ativado por proteases exógenas oriundas de bactérias, plantas, fungos e insetos. Além destes, o PAR2 pode ser ativado farmacologicamente por agonistas peptídicos sintéticos (SLIGKV-NH₂/SLIGRL-NH₂) correspondentes aos aminoácidos que compõem a região N-terminal do PAR2 exposta após clivagem por proteases, os quais podem interagir diretamente com a segunda alça extracelular do receptor e ativa-lo (KENNEDY *et al.*, 2020).

A ativação endógena do PAR2 ocorre por meio da clivagem por proteases do domínio N-terminal extracelular do receptor que expõe uma nova sequência N-terminal, que posteriormente atua como ligante ancorado (“*tethered ligand*”) interagindo com regiões conservadas localizada na segunda alça extracelular do próprio receptor, que por sua vez, promove mudanças conformacionais que alteram sua afinidade pelas proteínas

G intracelulares (COTTRELL *et al.*, 2003). Assim sendo, o PAR2 pode ativar diferentes vias de sinalização integradas as proteínas G, tais como $G_{\alpha q}$, $G_{\alpha i}$ ou $G_{\alpha 12/13}$; bem como, através das vias de sinalização relacionadas as proteínas β -arrestinas (BÖHM *et al.*, 1996; DÉRY *et al.*, 1999).

A ativação da proteína $G_{\alpha q/11}$ pelo PAR2 ativa a enzima PLC β ligada à membrana, que por sua vez, hidrolisa o fosfatidil inositol 4,5-bifosfato (PIP₂) em IP₃ e DAG. Ao ativar seu receptor IP₃R localizado no retículo endoplasmático, o IP₃ promove a mobilização dos estoques de cálcio intracelular. Por outro lado, o DAG permanece na membrana, ativando a proteína PKC que fosforila resíduos de IKK α e IKK β levando à ativação e translocação nuclear de NF- κ B, um eixo importante da sinalização mediada por PAR2 para aumentar a expressão de citocinas pró-inflamatórias e da molécula de adesão de leucócitos ICAM-1 (ROTHMEIER; RUF, 2012; SCHULTHEISS; NEUMCKE; RICHTER, 2014; SRIWAI *et al.*, 2013).

Por outro lado, a ativação da proteína $G_{\alpha 12/13}$ está relacionada com a ativação de quinases ligadas ao fator de troca de nucleotídeo guanina (Rho-quinase), envolvido na fosforilação da cadeia leve da miosina e formação de filamentos de actina-miosina do citoesqueleto (SRIWAI *et al.*, 2013). A ativação da proteína $G_{\alpha i}$ por PAR2, regula negativamente a atividade da enzima da adenilato ciclase reduzindo consequentemente a produção do mensageiro intracelular cAMP (ZHAO; METCALF; BUNNETT, 2014).

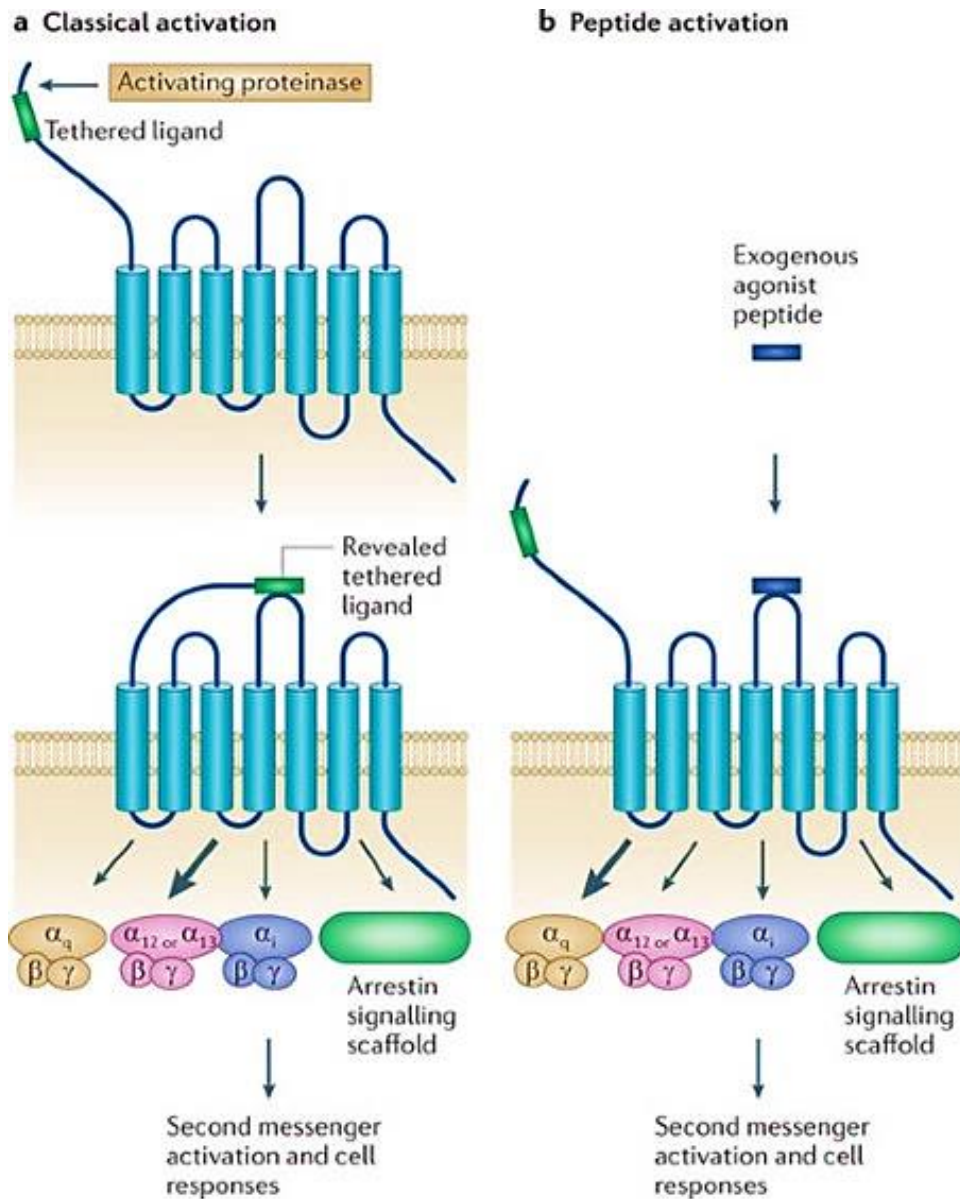


Figura 4: Mecanismo de ativação do PAR2. (A) a clivagem proteolítica por proteases revela o ligante ancorado que estimula a ativação e sinalização do PAR2. (B) peptídeos agonistas sintéticos ligam-se ao local de ativação do PAR2 para ativa-lo, por conseguinte o receptor torna-se indisponível para ativação por proteínases (RAMACHANDRAN *et al.*, 2012).

A ativação irreversível do PAR2 difere dos mecanismos clássicos de ativação dos demais GPCRs, visto que a região C-terminal citoplasmática do PAR2 é fosforilada por quinases do receptor da proteína G (GRKs), PKC ou PKA (DEFEA *et al.*, 2000; DÉRY *et al.*, 1998). A fosforilação do PAR2 induz o recrutamento de β -arrestinas, proteínas citosólicas intracelulares que interagem e regulam a atividade da sinalização de GPCRs ativados, por meio do desacoplamento entre o GPCR e a proteína G (RICKS; TREJO, 2009). Por fim, o complexo PAR2- β -arrestina 1/2 ligam-se a componentes das redes de endocitose como a Rab5, clatrina e dinamina levando a sua translocação por meio da ubiquitinação do terminal carboxila do PAR2, para posterior degradação ou reciclagem nas vesículas lisossomais (KUMAR *et al.*, 2007).

No entanto, as β -arrestinas podem recrutar quinases 1 e 2 reguladas por sinal extracelular (ERK1/2) para PAR2 localizados nos endossomos, permitindo que o receptor mesmo endocitado continue a sinalizar. Sendo, portanto, a ubiquitinação do PAR2 nos lisossomos um mecanismo importante (DEFEA *et al.*, 2000). Nesse sentido, a translocação e fosforilação da proteína ligase de ubiquitina (c-Cbl) do citosol para interagir com PAR2 na membrana plasmática e nos endossomos, importante para promover a ubiquitinação do PAR2, um evento necessário para a translocação do receptor dos endossomos iniciais para os endossomos tardios e lisossomos, onde sua degradação termina definitivamente a sinalização, mecanismos essenciais para cessar as ações pró-inflamatórias e nociceptivas desencadeadas por proteases/PAR2 (JACOB *et al.*, 2005).

Proteases de microorganismos invasores em conjunto com proteases de neutrófilos como elastase, proteinase, catepsina G, metaloproteases de matriz e proteases de mastócitos desempenham papel chave em diferentes tipos de doenças pulmonares incluindo DPOC, asma, ARDS, influenza e câncer (CHAKRABORTI *et al.*, 2017). Ao clivar e ativar os PARs, as vias de sinalização do cálcio intracelular, MAP quinases e NF- κ B são aumentadas. Nas vias aéreas os efeitos do aumento do cálcio intracelular incluem

a secreção e degranulação de mastócitos e neutrófilos e a contração do músculo liso. A ativação do NF- κ B aumenta a transcrição dos genes das integrinas, quimiocinas e citocinas, bem como a enzima ciclo-oxigenase (COX)2, levando ao aumento na produção de mediadores lipídicos essenciais para eventos inflamatórios como edema, infiltração de leucócitos, angiogênese, fibrose, aumento da produção de IgE e hiperresponsividade das vias aéreas (REED; KITA, 2004).

O PAR2 é expresso em células inflamatórias como macrófagos, mastócitos, neutrófilos, eosinófilos, células endoteliais e epiteliais (KANDEL *et al.*, 2016). Diversos estudos têm mostrado a participação do PAR2 na inflamação, principalmente no recrutamento e na ativação de leucócitos (DE FILIPPO *et al.*, 2013). Nesse sentido, foi demonstrado que a administração do peptídeo ativador do PAR2 induz o recrutamento de neutrófilos para a cavidade pleural de camundongos. Adicionalmente, a estimulação *in vitro* de células mesoteliais com o peptídeo ativador do PAR2, tripsina ou triptase aumenta a liberação da quimiocina MIP2 (LEE, Y. C. C. G. *et al.*, 2005). A ativação do PAR2 por peptídeo sintético ou triptase induzem o recrutamento de eosinófilos para a cavidade pleural de camundongos. Além disso, a migração de eosinófilos para a cavidade pleural de camundongos BALB/c induzida por eotaxina-1/CCL11 é dependente da ativação do PAR2 (MATOS *et al.*, 2013, 2014).

Nas vias aéreas e pulmões, PAR2 é expresso em células residentes epiteliais, pneumócitos tipo II, endotélio, músculo liso, fibroblastos, macrófagos, mastócitos, neutrófilos e eosinófilos (BOLTON *et al.*, 2003). Células epiteliais alveolares estimuladas com tripsina ou agonista peptídico do PAR2 aumenta a adesão de neutrófilos de maneira dependente da dose e do tempo (YAGI *et al.*, 2006). A expressão do PAR2 é aumentada no epitélio brônquico e músculo liso das vias aéreas de pacientes com asma em comparação aos indivíduos saudáveis (AUBIER *et al.*, 2016; KNIGHT *et al.*, 2001). Em camundongos *knockout* para PAR2 estimulados com ácaro de poeira doméstica o

recrutamento de leucócitos para os pulmões foi reduzido em comparação aos camundongos selvagens (LUTFI *et al.*, 2012). Por fim, em cultura de fibroblastos das vias aéreas, o estímulo do PAR2 aumenta os níveis de IL-8, G-CSF e VCAM-1 (RAMACHANDRAN *et al.*, 2012).

Evidências para um papel do PAR2 mediando uma resposta inflamatória induzida por mediadores inflamatórios lipídicos como o PAF, foram inicialmente propostos por VERGNOLLE (1999) ao demonstrar que a ativação do PAR2 aumenta a adesão e recrutamento de leucócitos para a cavidade peritoneal de camundongos de modo independente da ativação dos mastócitos, no entanto, mediados pela liberação do PAF (VERGNOLLE, N, 1999). Além disso, MELNIKOVA e colaboradores (2009) demonstraram um *crosstalk* entre PAR1, o primeiro subtipo identificado dos PARs e o PAFR, dois receptores pró-inflamatórios acoplados à proteína G, regulando a expressão da molécula de adesão celular do melanoma (MCAM/MUC18) e a metástase do melanoma (MELNIKOVA *et al.*, 2009; MELNIKOVA; VILLARES; BAR-ELI, 2008). Portanto, a realização de estudos visando a compreensão do papel destes receptores na fisiopatologia de doenças inflamatórias das vias aéreas é pertinente. Deste modo, o estudo do papel do PAR2 na produção de mediadores inflamatórios e no recrutamento de leucócitos para o foco inflamatório em resposta ao PAF, poderá contribuir para um melhor entendimento da fisiopatologia de doenças inflamatórias pulmonares.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Estudar o papel da ativação do PAR2 no recrutamento de neutrófilos e no desenvolvimento da inflamação pulmonar induzida pelo análogo sintético do PAF, carbamil-PAF (C-PAF).

2.2. Objetivos Específicos

- Avaliar a importância da ativação do PAR2 na migração de neutrófilos para o pulmão de camundongos desafiados por meio da instilação intranasal com C-PAF;
- Investigar a importância do PAR2 no rolamento, velocidade de rolamento e adesão dos leucócitos à microcirculação mesentérica de camundongos induzida pelo C-PAF;
- Investigar a importância do PAF na migração de neutrófilos para o pulmão de camundongos desafiados por meio da instilação intranasal com o peptídeo sintético ativador de PAR2 (SLIGRL-NH₂);
- Avaliar a importância da ativação do PAR2 nas alterações histopatológicas no pulmão de camundongos desafiados por meio da instilação intranasal com C-PAF;
- Analisar a importância da ativação do PAR2 para a produção de quimiocinas pró-inflamatórias no pulmão de camundongos desafiados por instilação intranasal com C-PAF;
- Avaliar a importância da ativação do PAR2 na produção das enzimas mieloperoxidase (MPO) e N-acetil-glucosaminidase (NAG) no pulmão de camundongos desafiados por instilação intranasal com C-PAF;
- Investigar o papel da ativação do PAR2 para a sinalização intracelular de Ca²⁺ induzida por C-PAF em células RAW 264.7;

- Investigar a possível interação física entre o PAR-2 e o PAFR após estímulo com seus respectivos agonistas (SLIGRL-NH₂ e C-PAF, respectivamente) em células RAW 264.7;
- Averiguar o papel da ativação do PAR2 para a expressão do fator de transcrição NF-kB (p65) induzida por C-PAF em células RAW 264.7;
- Investigar o efeito do estímulo com C-PAF para a expressão do PAR2 em células RAW 264.7;
- Investigar o efeito do estímulo com C-PAF para a expressão do RNAm do PAR2 em células RAW 264.7.

METODOLOGIA

3. METODOLOGIA

3.1. Animais

Foram utilizados camundongos BALB/c machos com idade entre 8 a 10 semanas, pesando entre 20 a 30g, fornecidos pelo Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG (CEBIO), mantidos em ciclo claro-escuro de 12 horas com livre acesso a ração e água. Todos os procedimentos utilizados foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFMG (CEUA/UFMG, certificado nº 348/2014, em anexo 1).

3.2. Cultivo celular

Células de linhagem de macrófagos de murinos RAW 264.7 (*American Type Culture Collection, Rockville, ATCC, USA*) foram cultivadas em meio de *Eagle* modificado por Dulbecco (DMEM, Gibco - Invitrogen, EUA), suplementado com 10% soro fetal bovino e 1% de penicilina/estreptomicina (Gibco - Invitrogen, EUA). As células foram mantidas a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO₂.

3.3. Análise do número de leucócitos recuperados no lavado broncoalveolar (BAL)

Para coleta do BAL os camundongos foram anestesiados com solução contendo cetamina (75 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg). O acesso aos pulmões foi realizado com auxílio de um cateter (18 G) associado a uma seringa de 1 mL contendo PBS. Posteriormente, o BAL (2 mL) foi centrifugado a velocidade de 100 G a 4°C (*Thermo Fisher Scientific Centrifuge Series, EUA*) por 5 minutos. O sobrenadante foi armazenado a -80°C para análise da concentração de citocinas. O *pellet* celular foi ressuscitado em 100 µL de PBS para contagem total e diferencial de leucócitos. A contagem total de leucócitos foi realizada em microscópio óptico com o auxílio de uma câmara de Neubauer em uma diluição de 1: 10 (20 µL da amostra + 180 µL de solução de Turk). Para a análise

diferencial dos leucócitos foram preparadas lâminas em citospin (FANEM, Brasil) coradas com May Grunwald (Dinâmica Contemporânea Ltda., Brasil) e Giemsa (QEEL-Química Especializada Erich Ltda., Brasil). A análise diferencial dos leucócitos foi realizada em microscópio óptico. Para isso, foi realizada uma contagem total de 100 leucócitos, para posterior análise diferencial de neutrófilos. Os resultados foram apresentados na forma de neutrófilos x 10^4 /mL.

3.4. Avaliação do papel do PAR2 no recrutamento de leucócitos mediado pelo C-PAF

Para avaliar o papel do PAR2 na migração de leucócitos induzida pelo C-PAF, o BAL de camundongos foi coletado 24 horas após o estímulo via intranasal (i. n.) com C-PAF (10^{-7} , 10^{-6} ou 10^{-8} M) ou com o peptídeo sintético ativador de PAR2 (SLIGRL-NH₂: 3, 10 e 30 ng/20 μ L). Posteriormente, a migração de neutrófilos induzida pelo C-PAF (10^{-7} M) foi analisada em função dos tempos de 4, 24 ou 48 horas. Em alguns experimentos, os animais foram pré-tratados por via intraperitoneal (i. p) com WEB2086 (0,05, 0,5 ou 5 mg/kg), ENMD1068 (0,05, 0,5 ou 1 mg/kg) ou aprotinina (10, 30 ou 100 ng/20 μ L, i.n.) 1h antes do estímulo com C-PAF (10^{-7} M, i. n.). O BAL foi coletado 24 horas depois (**Figura 5**). Para controle dos experimentos, alguns grupos de animais receberam apenas PBS.

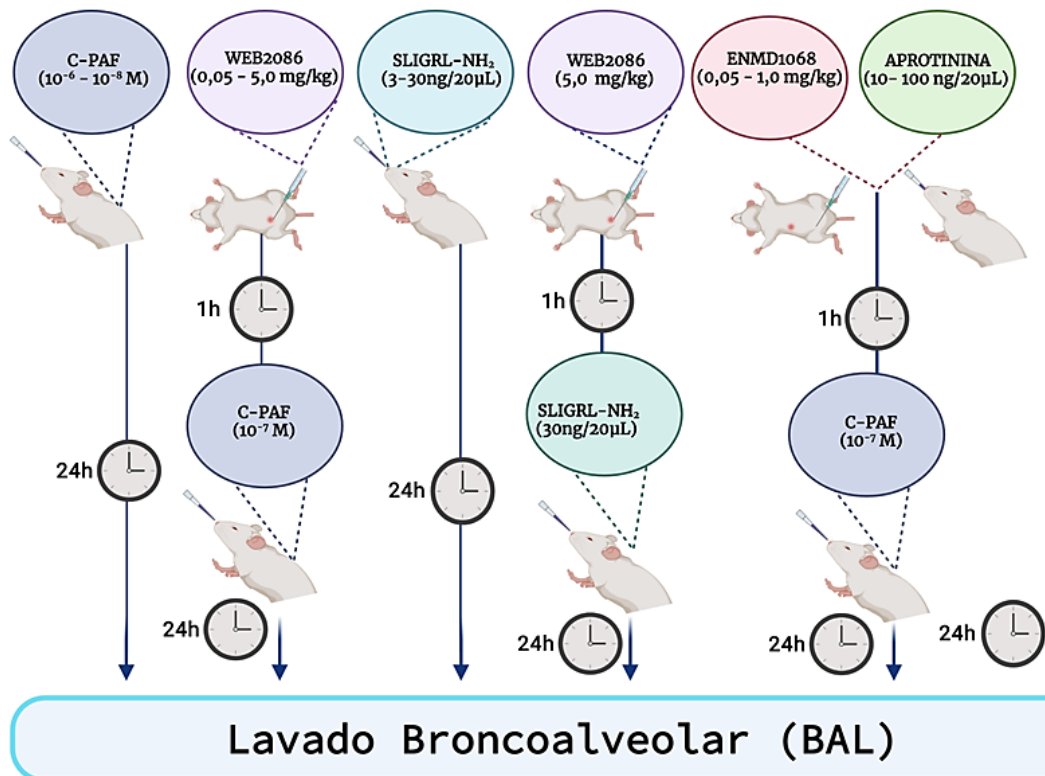


Figura 5: Ilustração do delineamento experimental para a avaliação do recrutamento de leucócitos no BAL.

3.5. Microscopia intravital confocal (IVM) para análise do rolamento e adesão de leucócitos

A microscopia intravital confocal para análise do rolamento de leucócitos, velocidade de rolamento e adesão dos leucócitos à microcirculação mesentérica foi examinada conforme descrito anteriormente (HERR *et al.*, 2015). Para isto, os camundongos foram pré-tratados com ENMD1068 (0,5 mg/kg, i. p.) 1 hora antes do desafio com C-PAF (10^{-7} M, i. n.). Após 4 h, os camundongos foram submetidos à anestesia com cetamina (75 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg, i. p.), em seguida, o tecido mesentérico foi exteriorizado por laparotomia mediana. Durante o experimento, os camundongos foram mantidos em uma posição estável em um aparato de acrílico compatível com o microscópio Nikon Eclipse Ti com confocal modelo A1R. Para exame microscópico confocal *in situ*, os camundongos foram tratados por via intravenosa (i. v.) com anti-

Ly6G/Gr-1 conjugado com o fluoróforo PE (0,2 mg/mL; eBiosciência). A intensidade de fluorescência foi monitorada por 10 min com objetiva de 20x calibrada para cada vênula. Os vasos selecionados para o estudo foram vênulas pós-capilares, o número total de leucócitos rolantes foi quantificado para cada vênula usando o programa *Velocity* (PerkinElmer), de modo que uma linha vertical (100 μm) foi desenhada através de cada vênula e todos os leucócitos que cruzaram esta linha em 3 min foram contados. A velocidade de rolamento dos leucócitos foi calculada medindo-se o tempo necessário para que um único leucócito percorresse uma distância de 100 μm . As células aderentes foram definidas como leucócitos que não se moveram por pelo menos 30 s.

3.6. Análise dos níveis das citocinas presentes no BAL

Para análise dos níveis das citocinas CXCL1 e CXCL2, os animais foram pré-tratados com ENMD1068 (0.5 mg/kg) uma hora antes da administração intranasal de C-PAF (10^{-7} M, i. n.), e o BAL foi coletado 1, 4 e 12 horas após. As concentrações das citocinas foram analisadas a partir do sobrenadante do BAL por ensaio imunoenzimático (ELISA) seguindo instruções do fabricante (DuoSet ELISA R & D Systems, EUA). Cada placa de microtitulação foi incubada por 2h à temperatura ambiente com as amostras teste, padrão e branco em duplicata. Em seguida, as placas foram lavadas três vezes com tampão de lavagem (PBS: 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8.1 mM Na_2HPO_4 , 1.5 mM KH_2PO_4 , 0.05% de Tween 20, pH 7.2). Após lavagem das placas, adicionou-se 100 μL do anticorpo de detecção por 2h à temperatura ambiente. A etapa de lavagem foi repetida, 100 μL da estreptavidina (HRP) foi adicionada aos poços e mantida por 20 minutos à temperatura ambiente. As placas foram lavadas mais uma vez, logo após, adicionou-se 100 μL do substrato a todos os poços. Após 20 minutos, a reação enzimática foi interrompida pela adição de 50 μL H_2SO_4 (1M) aos poços. A absorbância foi realizada imediatamente a 450 nm. Os resultados foram expressos em picogramas de cada citocina por mililitro (pg/mL).

3.7. Análise histopatológica dos pulmões

Para avaliação histológica, amostras de tecido pulmonar foram mantidas em solução de formol 10%, em seguida, o material foi embebido em parafina e seccionado em secções de três μm de espessura. Após os cortes, as amostras foram desparafinizadas e coradas com hematoxilina e eosina (H & E). As análises foram realizadas sob um microscópio de luz por um patologista experiente, sem conhecimento dos tratamentos previamente descritos. A inflamação pulmonar foi analisada através do somatório de pontos seguindo-se *escores* (em anexo 2) baseada no trabalho de HORVAT e colaboradores (2007) que avaliaram a inflamação das vias aéreas, vascular e parenquimatosa (HORVAT *et al.*, 2007).

3.8. Análise dos níveis de mieloperoxidase (MPO) e N-acetil-glucosaminidase (NAG)

Para avaliar a ativação dos leucócitos na inflamação pulmonar induzida por C-PAF, os níveis das enzimas MPO e NAG foram mensurados. A presença de MPO e NAG no local da inflamação representa uma medida indireta do acúmulo/ativação de neutrófilos e macrófagos, respectivamente (BRADLEY *et al.*, 1982). Para determinar os níveis de MPO, foram adicionados 25 μL do sobrenadante das amostras provenientes do processamento do tecido pulmonar a uma microplaca de 96 poços. Em seguida, adicionou-se uma mistura de 25 μL de 3,3'-5,5'-tetrametilbenzidina (TMB; Sigma Chemical Co) dissolvido em dimetilsulfóxido (Merck, Rahway, NJ) em uma concentração final de 1,6 mM à temperatura de 37 °C por 5 min. Posteriormente, adicionou-se 100 μL H_2O_2 dissolvido em tampão fosfato (0,05 M Na_3PO_4 , 0,5% HETAB, pH 5,4) em uma concentração final de 0,002% v/v por 5 min a 37 °C. Por fim, a reação

foi interrompida com a adição de 100 μL de H_2SO_4 4M e quantificada a 450 nm em espectrofotômetro (SpectraMax Plus 384, Molecular Devices, California, EUA).

Para mensurar os níveis de NAG, foram adicionados 100 μL do sobrenadante das amostras a uma microplaca de 96 poços. Em seguida, adicionou-se 100 μL de p-nitrofenil-N-acetil- β -D-glucosaminida (Sigma Chemical Co.), dissolvido em tampão citrato/fosfato (ácido cítrico 0,1 M, Na_2HPO_4 0,1 M, pH 4,5) em uma concentração final de 2,24 mM. Posteriormente, a placa foi incubada por 10 min a 37 °C. A reação foi interrompida com adição de 100 μL de tampão glicina 0,2 M (pH 10,6) e quantificada a 400 nm em um espectrofotômetro. Os resultados foram expressos como densidade óptica (OD).

3.9. Ensaios de coimunoprecipitação e western Blott

Células RAW 264.7 foram plaqueadas (1×10^6 por poço) 24 horas antes do estímulo com PBS, C-PAF (100 nM), SLIGRL-NH₂ (50 μM) ou estímulo concomitantemente com C-PAF (100 nM) + SLIGRL-NH₂ (50 μM) por 20 minutos. Após lavagem para remoção de células não aderentes, as células aderentes foram lisadas por 30 minutos em tampão RIPA (em mM: 150 NaCl, 50 Tris-HCl, 5 EDTA.2 Na 1 MgCl₂, pH 8,0; 1% Triton X-100, 1% NP-40, 1% desoxicolato de sódio, dodecilsulfato de sódio a 0,1% enriquecido com coquetel inibidor de proteases; Sigma FAST, Sigma, EUA). Para a extração de proteínas, os lisados celulares foram centrifugados por 10 min a 14.000 rpm a 4°C. O sobrenadante foi coletado e a concentração de proteínas foi medida pelo ensaio de Bradford.

Para a obtenção dos imunoprecipitados utilizou-se *beads* magnéticas (PureProteome™ *Protein A/G Mix Magnetic Beads*, Millipore, EUA). Inicialmente, 50 μL das esferas magnéticas foram incubadas com anticorpo anti-PAFR (ab104162, Abcam, Reino Unido) por 3 horas a 4°C. Após lavagem (PBS 1X contendo 0,1 % de

tween20®, pH 7.4), o complexo *beads* - anticorpo foi incubado com os lisados protéicos (100 µg de proteína por amostra) *overnight* a 4°C com agitação constante. Como controle de IgG, extratos de proteínas (100 µg) também foram imunoprecipitados com IgG de coelho normal (Santa Cruz Biotechnology, EUA). As proteínas precipitadas foram eluídas das *beads* em tampão de eluição (0,2 M de glicina-HCL, pH 2,5) e neutralizadas em tampão de neutralização (1 M tris-HCL, pH 8,5), e então transferidas para uma membrana de fluoreto de polivinilideno de 0,45 µm (PVDF; Immobilon P; Millipore, EUA). Em seguida, as membranas foram bloqueadas à temperatura ambiente com BSA a 5% em PBS enriquecido com Tween® 20 a 0,1% antes da incubação com o anticorpo primário anti-PAR2 (ab124227, Abcam, Reino Unido) e anti-PAFR (ab104162, Abcam, Reino Unido) a 4°C *overnight*. Anticorpos secundários conjugados com peroxidase (Sigma, EUA) foram adicionados por duas horas. A imunodeteção foi realizada utilizando-se quimiluminescência aprimorada (Luminata strong™ - substrato Western HRP, Merck-Millipore, EUA), as imagens foram adquiridas com o sistema ChemiDoc XRS (BioRad, EUA) e a quantificação foi realizada no software Image J.

3.10. Avaliação da sinalização de Ca²⁺ intracelular

Células RAW 264.7 foram plaqueadas ($1,5 \times 10^5$) em lamínulas de vidro (22 x 22 mm) por 24 horas. Posteriormente, as células foram incubadas por 30 minutos com ENMD-1068 (5 μ M) ou PBS. Antes da captura das imagens no microscópio confocal (Nikon C2, EUA) as células foram marcadas com uma sonda para Ca²⁺ intracelular (6 μ M) Fluo-4/AM (Invitrogen, EUA) por 15 minutos a 37°C. No momento da captura das imagens, as células foram perfundidas com tampão HEPES, em seguida, estimuladas com PBS ou C-PAF (100 nM). A sinalização de Ca²⁺ foi monitorada nestas células por excitação a 488 nm enquanto se coletava a luz emitida acima de 505 nm. A amplitude normalizada do sinal de Ca²⁺ induzido por C-PAF foi extraída com o software Image J e representada graficamente como descrito anteriormente (LEITE *et al.*, 2003). Alterações na fluorescência foram normalizadas pelos níveis basais e usadas para analisar a amplitude dos sinais de Ca²⁺ e o número de células responsivas (n=3 preparações com 30 células por grupo).

3.11. Ensaios de imunofluorescência para determinação da expressão do PAR2 e do fator de transcrição NF-kB (p65)

Células RAW 264.7 foram plaqueadas ($1,5 \times 10^5$) em lamínulas de vidro (22 x 22 mm) 24 horas antes do estímulo. As células foram pré-tratadas com ENMD-1068 (5 μ M) ou PBS por 1 hora e estimuladas com C-PAF (100 nM) durante 4 horas. As lâminas foram fixadas com paraformaldeído a 4% durante 20 minutos em temperatura ambiente. Logo após, foram permeabilizadas com Triton a 0,5% e, incubadas com tampão de bloqueio (5% de soro de cabra em 1% de BSA/PBS) por 1 hora. Em seguida, realizou-se a marcação com anticorpos primários específicos anti-PAR2 (ab124227, Abcam, Reino Unido) ou anti-NF-kB (p65) (sc-8008, Santa Cruz Biotechnology, EUA) *overnight* a 4°C. Em seguida, as amostras foram subsequentemente incubadas com anticorpos secundários

específicos para as espécies conjugadas (anti-rabbit IgG, 568 nm e anti-mouse, 488 nm, Invitrogen, EUA). Os núcleos foram marcados com DAPI (Invitrogen, EUA) durante 45 minutos à temperatura ambiente. As imagens foram adquiridas com uma ampliação de 63 vezes no microscópio confocal (Nikon C2, EUA) e analisadas no Image J (n=3 preparações por grupo). Os controles negativos incluíram células incubadas com anti-IgG normal.

3.12. Avaliação da expressão do mRNA do PAR2 por PCR quantitativo em tempo real (qPCR)

Para análise da expressão do mRNA de PAR2, o RNA foi extraído utilizando o reagente Trizol (Ludwig Biotec, BR) a partir do precipitado de células RAW 264.7. A reação de transcrição reversa foi realizada com 1 mg de RNA total usando a síntese de cDNA iScript de acordo com as instruções do fabricante (BioRad, Hercules, CA) e a expressão de RNA mensageiro relativo (mRNA) dos genes selecionados foi quantificada com RNA mensageiro relativo (mRNA). A expressão dos genes PAR2 e β -actina (Integrated DNA Technologies, BR) foi quantificada em um sistema de PCR em tempo real ABI 7500 (ThermoFisher, Waltham, MA). A quantidade relativa dos produtos de PCR gerados para cada grupo de iniciadores foi determinada baseado no valor da fração do número de ciclos em que a intensidade de fluorescência supera o nível de fluorescência atribuída, denominada de Ct (do inglês *threshold cycle*). Os Cts obtidos para os genes de interesse foram normalizados subtraindo-se o valor do Ct obtido para o gene de referência (β -actina) para cada amostra.

As sequências dos iniciadores para os genes relacionados foram:

Gene	Iniciadores	Sequência
PAR2	<i>Foward</i>	5'-ATGCGAAGTCTCAGCCTGG-3'
	<i>Reverse</i>	5'-TGGGTTTCCAATCTGCCAATAAG-3'
β -actina	<i>Foward</i>	5'-GGCTGTATTCCCCTCCATCG-3'
	<i>Reverse</i>	5'-CCAGTTGGTAACAATGCCATGT-3'

3.13. Análise estatística

Os resultados foram expressos como a Média \pm Erro Padrão da Média (SEM) comparado com os resultados dos grupos controles. Os resultados foram analisados estatisticamente utilizando o teste One Way ANOVA, seguida pelo pós-teste Newman-Keuls. Para a realização de todas as análises, utilizou-se o software GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software, EUA). Estabeleceram-se como valores significativos as diferenças com $p < 0,05$.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. A instilação intranasal de C-PAF aumenta o número de neutrófilos recuperados no lavado broncoalveolar (BAL) de camundongos BALB/c

Inicialmente, avaliou-se o efeito do C-PAF, um análogo do PAF endógeno, na resposta de migração de neutrófilos para o pulmão de camundongos. Nossos resultados demonstraram que a administração intranasal do C-PAF aumentou de forma significativa o número de neutrófilos recuperados no BAL de uma maneira dependente da concentração, quando comparado ao grupo controle PBS (**Figura 6A**). A partir deste resultado, determinou-se a concentração de C-PAF 10^{-7} M para as avaliações subsequentes.

Posteriormente, a migração de neutrófilos induzida pelo C-PAF foi analisada em função do tempo de 4, 24 e 48 horas após a sua administração por via intranasal. Nossos resultados mostraram um aumento significativo no número de neutrófilos 4 horas após o estímulo com C-PAF 10^{-7} M. O pico do número de neutrófilos recuperados no BAL foi observado 24 horas após o estímulo. No entanto, 48 horas depois, o número de neutrófilos estavam reduzidos (**Figura 6B**). Em seguida, para confirmar a seletividade do C-PAF ao receptor de PAF (PAFR), utilizou-se o WEB2086; um antagonista PAFR seletivo. Nossos resultados mostraram que C-PAF 10^{-7} M ocasionou aumento significativo no número de neutrófilos recuperados no BAL em relação ao grupo controle PBS. Como esperado, o pré-tratamento com o antagonista do PAFR reduziu significativamente o número de neutrófilos presentes no BAL de uma maneira dose dependente (**Figura 6C**).

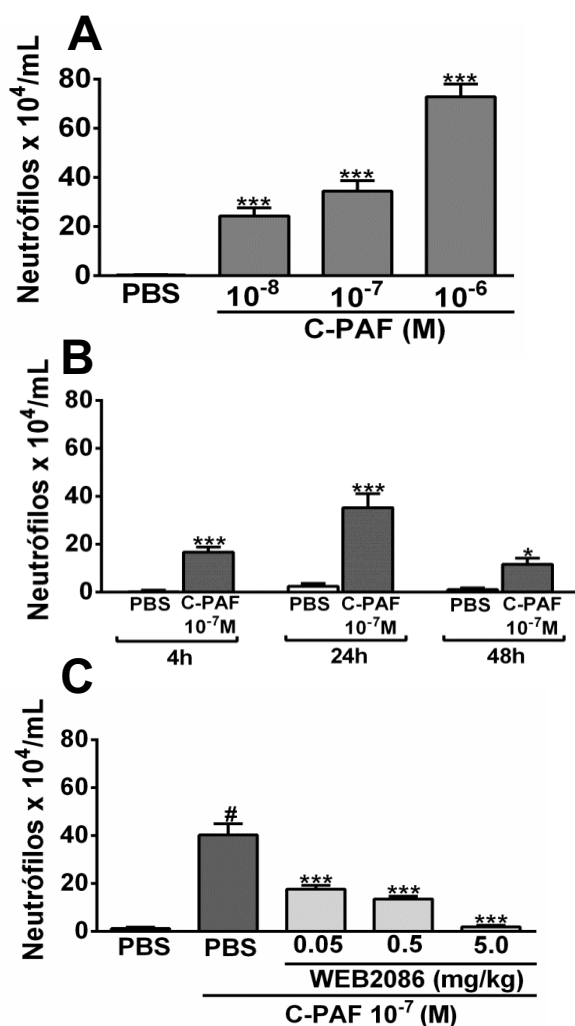


Figura 6: Instilação intranasal de C-PAF induz a migração de neutrófilos para pulmão de camundongos Balb/c. (A) Os camundongos foram tratados com PBS ou C-PAF (10⁻⁸, 10⁻⁷ e 10⁻⁶ M; i. n.), após 24h, o número de neutrófilos recuperados no BAL foi analisado. (B) O número de neutrófilos recuperados no BAL após estímulo com C-PAF (10⁻⁷ M; i. n.), foi analisada nos tempos de 4h, 24h e 48h. (C) Os camundongos foram pré-tratados com PBS ou WEB2086 (0.05, 0.5 e 1.0 mg/kg, i. p.) 1 hora antes do estímulo com C-PAF (10⁻⁷ M; i. n.), após 24h, o número de neutrófilos recuperados no BAL foi analisado. As barras representam a Média ± SEM de 4 a 6 animais por grupo. *p< 0,05 versus PBS (A), ***p< 0,001versus PBS (A e B) ou C-PAF (C) ou #p< 0,001versus PBS (ANOVA seguido do pós-teste Newman-Keuls).

4.2. O peptídeo sintético ativador do PAR2 (SLIGRL-NH₂) aumenta o número de neutrófilos recuperados no lavado broncoalveolar (BAL) de camundongos BALB/c

Para avaliar a participação do PAR2 na migração de neutrófilos para o pulmão de camundongos, foi utilizado o SLIGRL-NH₂, um peptídeo sintético ativador do PAR2. Nossos resultados mostraram que o estímulo intranasal com SLIGRL-NH₂ aumentou significativamente o número de neutrófilos recuperados no BAL, em todas as concentrações avaliadas, quando comparado ao grupo de animais controle que receberam somente PBS (**Figura 7A**).

4.3. O antagonista do PAFR (WEB2086) reduz o recrutamento de neutrófilos induzido pela ativação do PAR2 em pulmão de camundongos BALB/c

Para avaliar a participação do C-PAF na migração de neutrófilos para o pulmão de camundongos induzida pela ativação do PAR2, os camundongos foram pré-tratados com antagonista do PAFR uma hora antes da administração intranasal de SLIGRL-NH₂. Nossos resultados mostraram que o pré-tratamento com antagonista do PAFR reduziu significativamente o número de neutrófilos recuperados no BAL, quando comparado ao grupo de animais que receberam apenas administração intranasal com o peptídeo sintético ativador do PAR2 (**Figura 7B**).

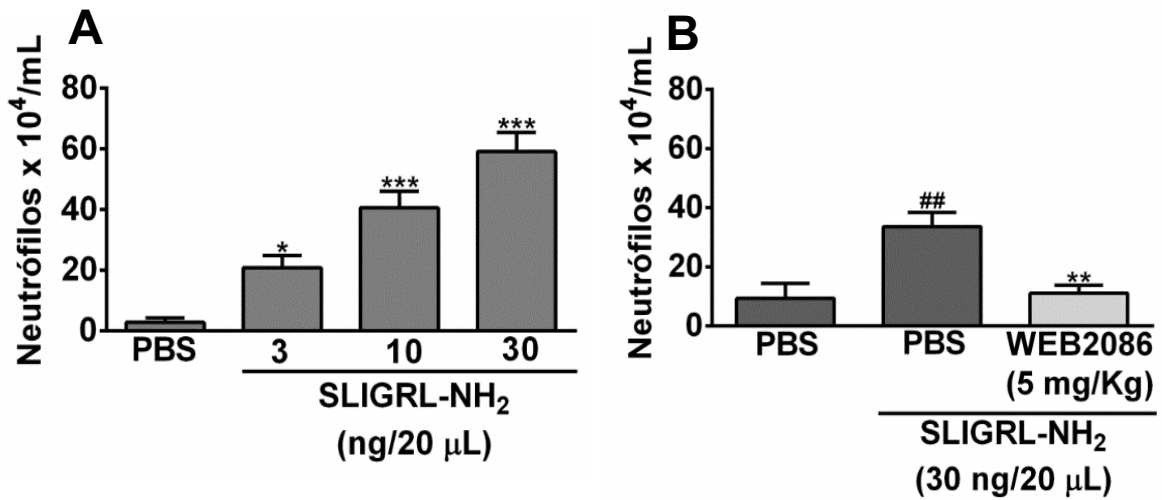


Figura 7: A ativação do PAR2 induz a migração de neutrófilos para pulmão de camundongos Balb/c. **(A)** Os camundongos foram tratados com PBS ou SLIGRL-NH₂ (3-30 ng/20 µl, i. n.), após 24h, o número de neutrófilos recuperados no BAL foi analisado. **(B)** Os camundongos foram pré-tratados com WEB2086 (5.0 mg/kg; i. p.), 1h antes do estímulo com SLIGRL-NH₂ (30 ng/20 µL, i. n.), após 24h, o número de neutrófilos recuperados no BAL foi analisado. As barras representam Média ± SEM de 4 a 6 animais por grupo. *p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001 versus PBS (A) ou SLIGRL-NH₂ (B) ou ##p<0,01 versus PBS (B) (ANOVA seguido do pós-teste Newman-Keuls).

4.4. O antagonista do PAR2 (ENMD1068) e a inibição de proteases endógenas reduz o recrutamento de neutrófilos induzido pelo C-PAF em pulmão de camundongos BALB/c

A participação do PAR2 na migração de neutrófilos induzida pelo C-PAF para o pulmão de camundongos foi avaliada. Nossos resultados mostraram que o pré-tratamento com antagonista seletivo do PAR2, ENMD1068, reduziu significativamente o número de neutrófilos presentes no BAL, após estímulo com C-PAF em todas as doses avaliadas (**Figura 8A**). Uma vez que demonstramos que o antagonismo do PAR2 reduziu a migração de neutrófilos induzida pelo C-PAF, resolvemos investigar o papel das proteases endógenas na migração de neutrófilos induzida pelo C-PAF. Desta forma, nossos resultados mostraram que o pré-tratamento com o inibidor de proteases, aprotinina, reduziu significativamente o número de neutrófilos presentes no BAL em resposta ao C-PAF em todas as doses avaliadas. Portanto, estes resultados evidenciam a participação de ativadores endógenos do PAR2 na migração de neutrófilos desencadeada pelo PAF (**Figura 8B**).

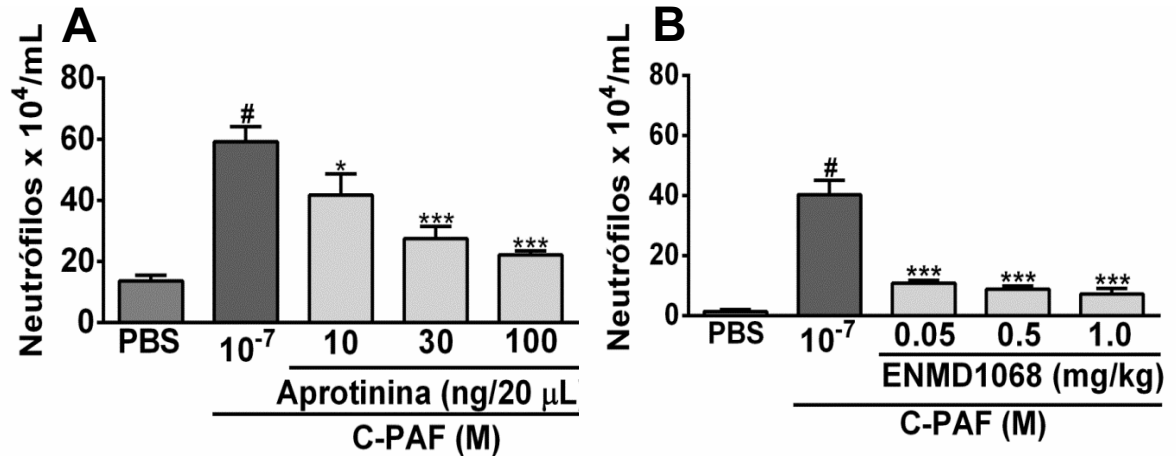


Figura 8: A inibição de proteases endógenas e o antagonismo do PAR2 reduz a migração de neutrófilos induzida por C-PAF para pulmão de camundongos Balb/c. **(A)** Os camundongos foram pré-tratados com aprotinina (10-100 ng/20 μ L; i. n.) ou **(B)** ENMD1068 (0.05-1.0 mg/kg; i. p.) 1h antes do estímulo com C-PAF (10^{-7} M; i. n.), após 24h, o número de neutrófilos recuperados no BAL foi analisado. As barras representam Média \pm SEM de 4 a 6 animais por grupo. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ versus C-PAF (A e B) ou [#] $p < 0,001$ versus PBS (A e B) (ANOVA seguido do pós-teste Newman-Keuls).

4.5. O antagonista do PAR2 (ENMD1068) reduz as alterações histopatológicas induzidas pelo C-PAF em pulmão de camundongos BALB/c

Na análise histopatológica do pulmão de camundongos, nossos resultados mostraram que a instilação intranasal com C-PAF resultou no aumento do infiltrado inflamatório misto de células no tecido pulmonar, caracterizado predominantemente pela presença de PMNs e células mononucleares em relação ao grupo controle PBS (**Figura 9 A-D**). No entanto, o pré-tratamento com antagonista do PAR2, ENMD1068, reduziu o infiltrado inflamatório induzido pelo C-PAF (Figura 9 E-F). Corroborando com estes resultados, o pré-tratamento com antagonista seletivo do PAR2, reduziu significativamente a quantificação do escore de inflamação pulmonar, comparado ao grupo estimulado apenas com C-PAF (**Figura 9G**).

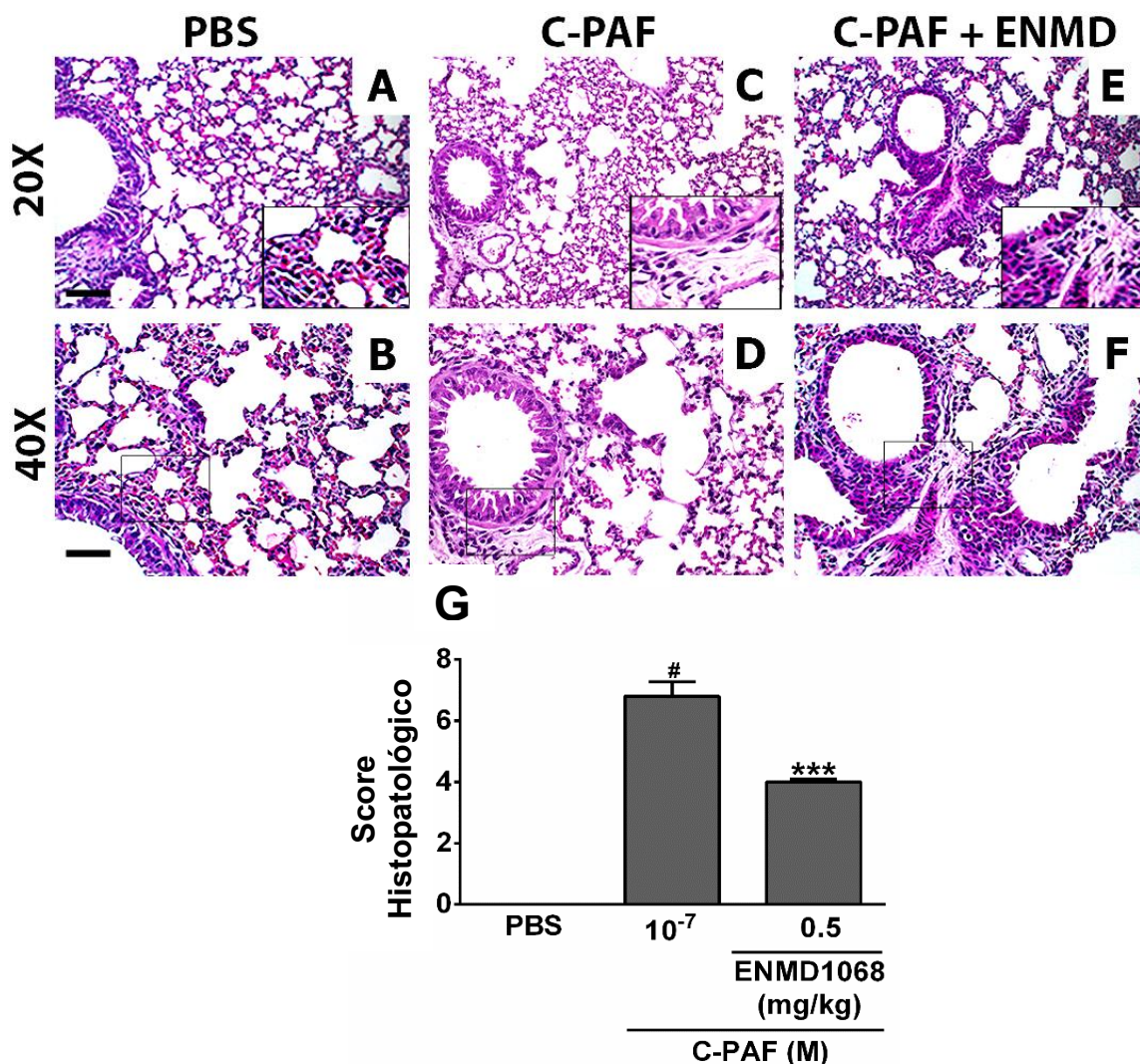


Figura 9: O antagonismo do PAR2 reduz a inflamação pulmonar induzida por C-PAF em camundongos Balb/c. (A-F) Fotomicrografias representativas dos pulmões dos camundongos coradas com hematoxilina e eosina (H & E). Análise histopatológica: painéis A e B: grupo controle PBS; Painéis C e D: grupo tratado apenas com C-PAF (10^{-7} M; i. n.); Painéis E e F: grupo pré-tratado com ENMD1068 (0.5 mg/kg, i. p.) 1 hora antes do estímulo com C-PAF (10^{-7} M; i. n.). Após 24h, os pulmões foram coletados para posterior análise histopatológica. Escalas de $20 \times (52 \mu\text{m})$ e $40 \times (50 \mu\text{m})$, respectivamente. Painel G: Inflamação pulmonar quantificada através de scores histopatológico. As barras representam Média \pm SEM de 4 a 6 animais por grupo. *** $p < 0,001$ versus C-PAF ou # $p < 0,001$ versus PBS (ANOVA seguido do pós-teste Newman-Keuls).

4.6. O antagonista do PAR2 (ENMD1068) reduz a ativação de neutrófilos e macrófagos induzidas pelo C-PAF em pulmão de camundongos BALB/c

A atividade das enzimas MPO e NAG são marcadores indiretos da ativação/acúmulo de neutrófilos e macrófagos no tecido, respectivamente. Desse modo, os níveis de MPO (**Figura 10A**) e NAG (**Figura 10B**) foram mensurados no tecido pulmonar de camundongos. Nossos resultados mostraram que o estímulo com o C-PAF aumentou significativamente os níveis de MPO e NAG comparado ao grupo de animais do grupo controle PBS, respectivamente. Corroborando com os resultados anteriores, o pré-tratamento com o antagonista do PAR2 uma hora antes do estímulo com C-PAF, reduziu significativamente os níveis de ambas as enzimas em relação ao grupo de camundongos instilados apenas com C-PAF.

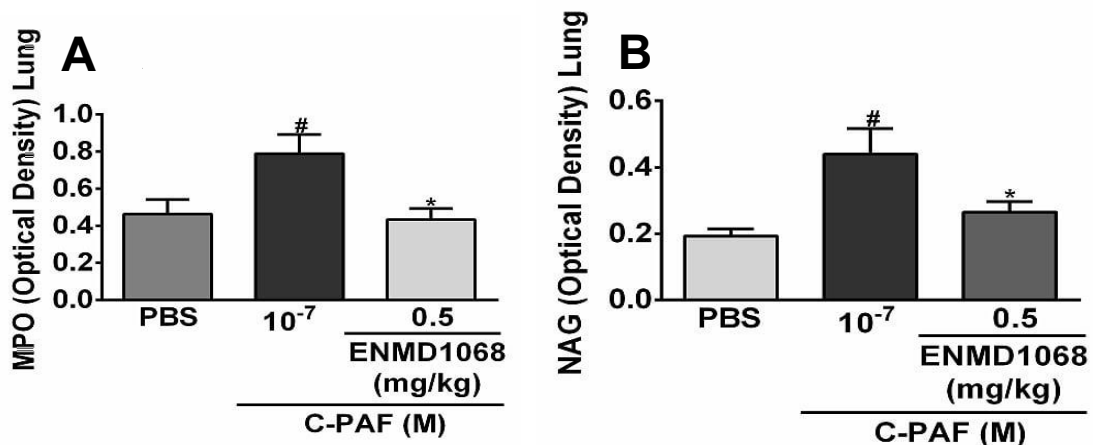


Figura 10: O antagonismo do PAR2 reduz os níveis das enzimas NAG (A) e (B) MPO induzidas por C-PAF em pulmão de camundongos Balb/c. Os animais foram pré-tratado com ENMD1068 (0.5 mg/kg, i. p.) 1 hora antes do estímulo com C-PAF (10⁻⁷ M; i. n.). Após 24h, os pulmões foram coletados, em seguida, a quantificação dos níveis das enzimas foi realizada em espectrofotômetro. As barras representam Média ± SEM de 4 a 6 animais por grupo. *p< 0,05 versus C-PAF ou #p<0,05 versus PBS (ANOVA seguido do pós-teste Newman-Keuls).

4.7. O antagonista do PAR2 (ENMD1068) reduz a concentração das quimiocinas CXCL1 e CXCL2 induzidas pelo C-PAF no lavado broncoalveolar (BAL) de camundongos BALB/c

Os níveis das quimiocinas CXCL1 e CXCL2 presentes no BAL foram avaliados 1, 4 e 12 horas após a instilação intranasal de C-PAF. Nossos resultados mostraram que após 1, 4 e 12 horas do estímulo com C-PAF, os níveis da quimiocina CXCL1 estavam significativamente elevados em comparação ou grupo controle PBS. No entanto, o pré-tratamento com antagonista do PAR2, ENMD1068, 1 hora antes do estímulo com C-PAF, reduziu significativamente os níveis de CXCL1 em todos os tempos avaliados (**Figura 11A**). Além disso, nossos resultados mostraram que após 1 e 4 horas do estímulo com C-PAF, os níveis da quimiocina CXCL2 estavam aumentados em comparação ao grupo controle PBS. Entretanto, o tratamento prévio com antagonista do PAR2 antes do estímulo com C-PAF diminuiu significativamente os níveis de CXCL2 nos tempos de 1 e 4 horas. Não foram observada diferença estatística entre os diferentes grupos para os níveis de CXCL2 após 12 horas do estímulo com C-PAF (**Figura 11B**).

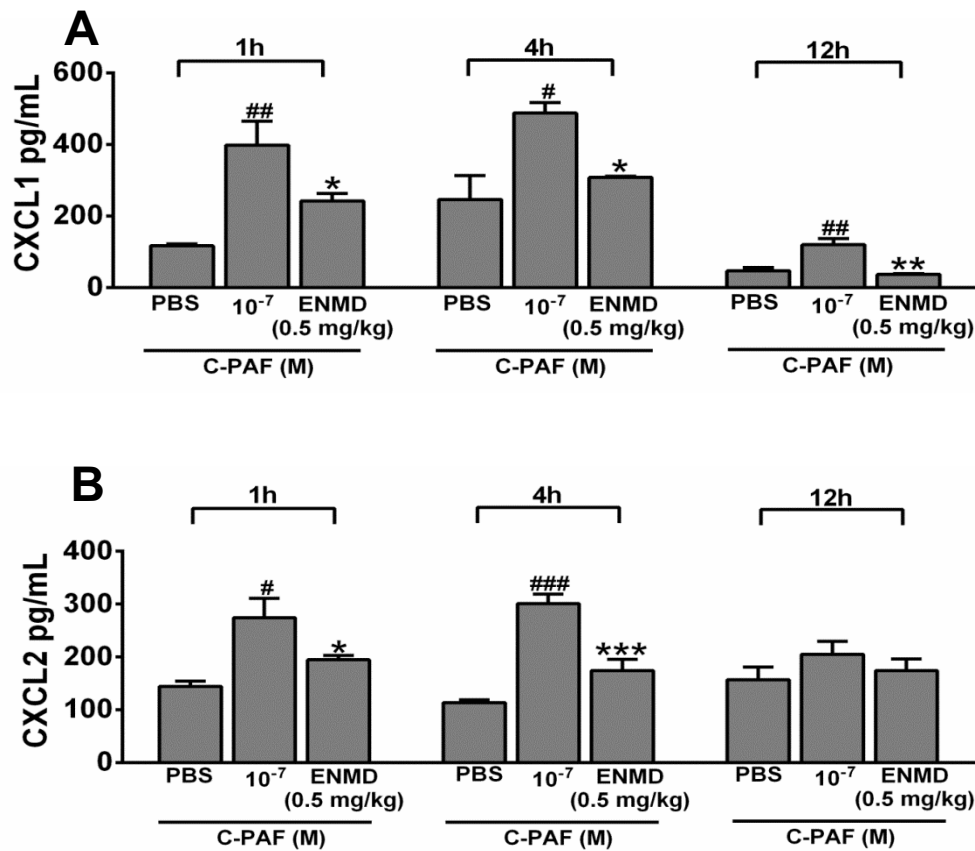


Figura 11: O antagonismo do PAR2 reduz os níveis das quimiocinas CXCL1 e CXCL2 induzidos pelo C-PAF no BAL de camundongos Balb/c. Os animais foram pré-tratados com ENMD1068 (0.5 mg/kg, i. p.) 1 hora antes do estímulo com C-PAF (10⁷ M; i. n.), o sobrenadante do BAL foi coletado após 1h, 4h e 12h. Em seguida, níveis das quimiocinas **(A)** CXCL1 e **(B)** CXCL2 foram avaliados. As barras representam a média da duplicata de cada animal \pm SEM de 4 a 6 animais por grupo. ### p <0,001, ## p <0,01 versus PBS e # p <0,05 ou *** p <0,001, ** p <0,001 e * p <0,05 versus C-PAF (ANOVA seguido do pós-teste Newman-Keuls).

4.8. O antagonista do PAR2 (ENMD1068) reduz o rolamento e a adesão de neutrófilos induzidas pelo C-PAF na microcirculação mesentérica de camundongos BALB/c

O acúmulo de neutrófilos na microcirculação mesentérica foi analisado utilizando o anticorpo de ligação anti-Ly6G/Gr-1, que reconhece a molécula Gr-1 expressa na superfície dos neutrófilos. Corroborando com os resultados obtidos na análise da migração de neutrófilos no pulmão, nossos resultados mostraram que o estímulo com C-PAF aumentou significativamente o rolamento (**Figura 12G**), a velocidade de rolamento (**Figura 12H**) e a adesão dos neutrófilos (**Figura 12I**) no endotélio da microcirculação mesentérica em comparação com o grupo de animais controle PBS. Por outro lado, o pré-tratamento com antagonista do PAR2, ENMD1068, 1 hora antes do estímulo com C-PAF, reduziu significativamente o rolamento, a velocidade de rolamento e a adesão dos neutrófilos ao endotélio visto por meio da marcação em vermelho para a molécula Gr-1 expressa em neutrófilos demonstrada nas imagens representativas da **figura 12 A-F**.

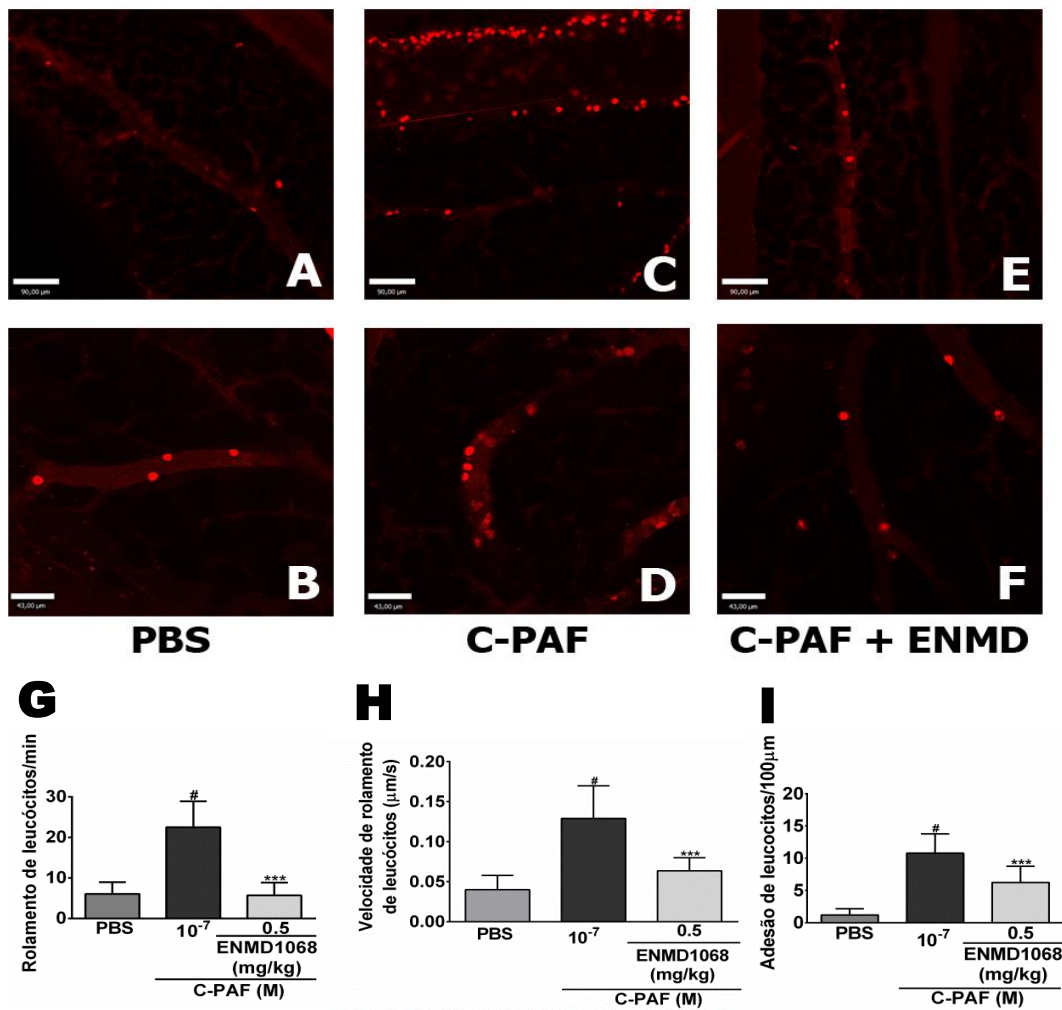


Figura 12: O antagonismo do PAR2 diminui o rolamento e a adesão de leucócitos a microcirculação mesentérica de camundongos Balb/c. (A-F) Imagens representativas da microcirculação mesentérica realizada por microscopia intravital (neutrófilos em vermelho, marcado com anticorpo anti-Ly6G/Ly6C-Gr-1; 0,2 mg/mL, i. v.). Os camundongos foram pré-tratados com ENMD1068 (0,5 mg/kg, i. p.) 1h antes da administração de C-PAF (10⁻⁷ M, i. p.), após 4h, foram os neutrófilos avaliados nas vênulas da microcirculação mesentérica por meio do rolamento (G), a velocidade de rolamento (H) e a adesão (I) dos leucócitos (Barra de escala = 90 μm e 43 μm). Os resultados são representativos de três experimentos independentes e foram expressos como MÉDIA ± SEM de 4-6 animais/grupo. ****p*<0,001 versus C-PAF e #*p*<0,001 versus PBS (ANOVA seguida do pós-teste Newman-Keuls).

4.9. A estimulação simultânea com C-PAF + SLIGRL-NH₂ aumenta a interação física entre o PAR2 e PAFR em macrófagos

Os resultados anteriores evidenciaram a importância da ativação do PAR2 para eventos de inflamação pulmonar induzida pelo PAF. Desse modo, investigamos a possibilidade de interação entre os receptores PAR2 e PAFR em macrófagos por meio do ensaio de co-imunoprecipitação. Nossos resultados mostraram que o estímulo dos macrófagos com C-PAF ou peptídeo sintético ativador do PAR2, SLIGRL-NH₂, não alterou a interação entre PAR2/PAFR comparado as células controle. Em contrapartida, a co-estimulação dos macrófagos de C-PAF + SLIGRL-NH₂ aumentou significativamente a co-imunoprecipitação entre PAR2/PAFR. Esses resultados evidenciam a expressão do PAR2 a partir de um imunoprecipitado que continha apenas a proteína PAFR, sugerindo uma interação física /colocalização/cooperação entre ambos. Como controle de experimentação, o controle positivo constituído do lisado de células não precipitadas (*input*) mostra a marcação para PAR2, enquanto, a marcação de IgG foi ausente em amostras imunoprecipitadas com IgG normal de coelho (**Figura 13**).

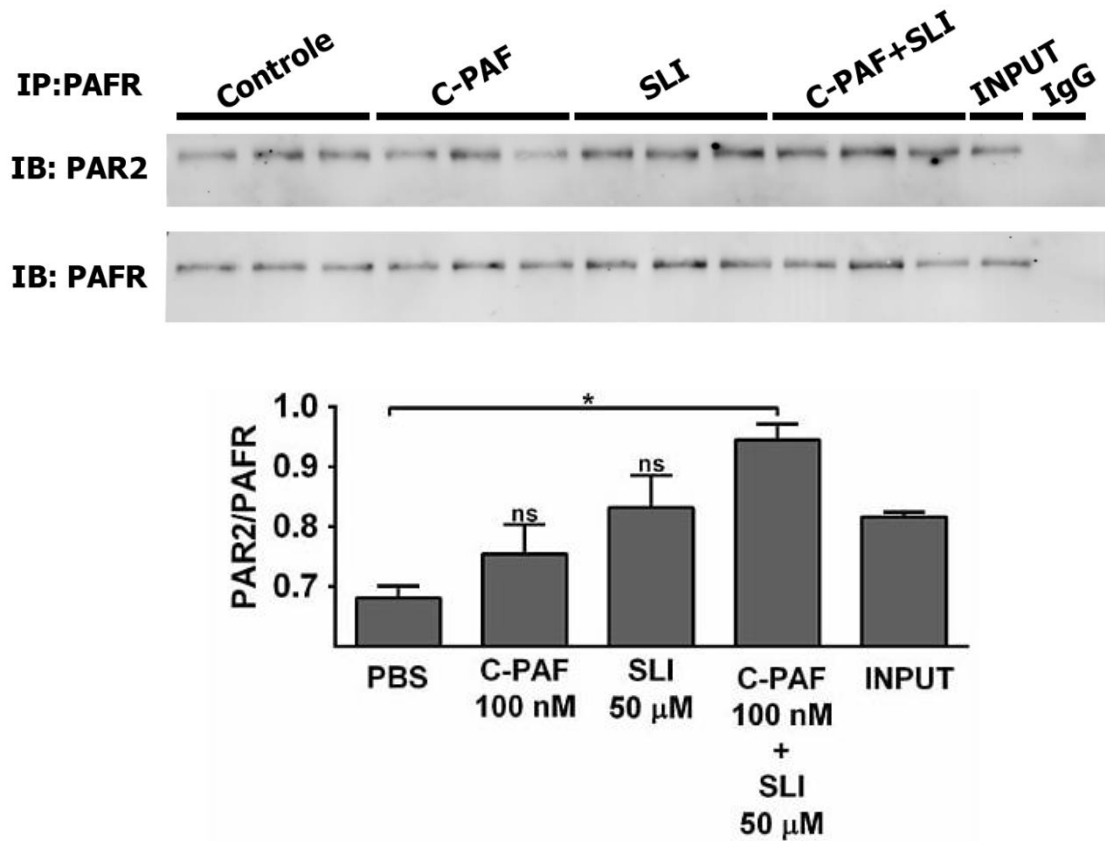


Figura 13: Co-imunoprecipitação entre PAR2/PAFR em macrófagos murinos RAW 264.7. Macrófagos em cultura foram incubadas por 20 minutos com C-PAF (100 nM), SLIGRL-NH₂ (50 μM), ou um contendo um MIX de C-PAF (100 nM) + SLIGRL-NH₂ (50 μM), antes da adição do tampão de lise RIPA. As células lisadas foram submetidas à imunoprecipitação e imunotransferência usando anticorpos anti-PAFR e anti-PAR2. A imagem representativa, bem como, o gráfico da quantificação das bandas mostram as proteínas PAR2 e PAFR imunoprecipitadas. Os experimentos foram realizados em duplicata, uma membrana foi incubada com anticorpo anti-PAR2 e a outra com anti-PAFR para controle de normalização. Os dados mostrados são representativos de três experimentos separados. Valores expressos como MÉDIA ± SEM (n=3 preparações. * $p < 0,05$ versus PBS (ANOVA seguida do pós-teste Newman-Keuls).

4.10. O antagonista do PAR2 (ENMD1068) reduz a sinalização de Ca²⁺ induzida pelo C-PAF em macrófagos

A participação do PAR2 na ativação celular induzida pelo C-PAF foi medida em macrófagos através da mobilização de Ca²⁺ intracelular em macrófagos RAW264.7. As imagens representativas da **figura 14 (A, B e C)** mostram a sinalização de Ca²⁺ em macrófagos estimulados somente com C-PAF ou tratados previamente com antagonista do PAR2, em diferentes tempos após o estímulo com C-PAF. Nossos resultados mostraram que amplitude do sinal de Ca²⁺ e o número de macrófagos responsivos estavam significativamente aumentados nas células estimuladas com C-PAF comparado aos macrófagos controle. Contudo, o tratamento prévio dos macrófagos com antagonista do PAR2 antes do estímulo com C-PAF reduziu significativamente tanto a amplitude do sinal de Ca²⁺ como a responsividade das células. Em conjunto, estes resultados fornecem evidências de que parte da liberação dos íons Ca²⁺ mediada pelo PAF envolve a ativação do PAR2 (**Figura 14D-E**).

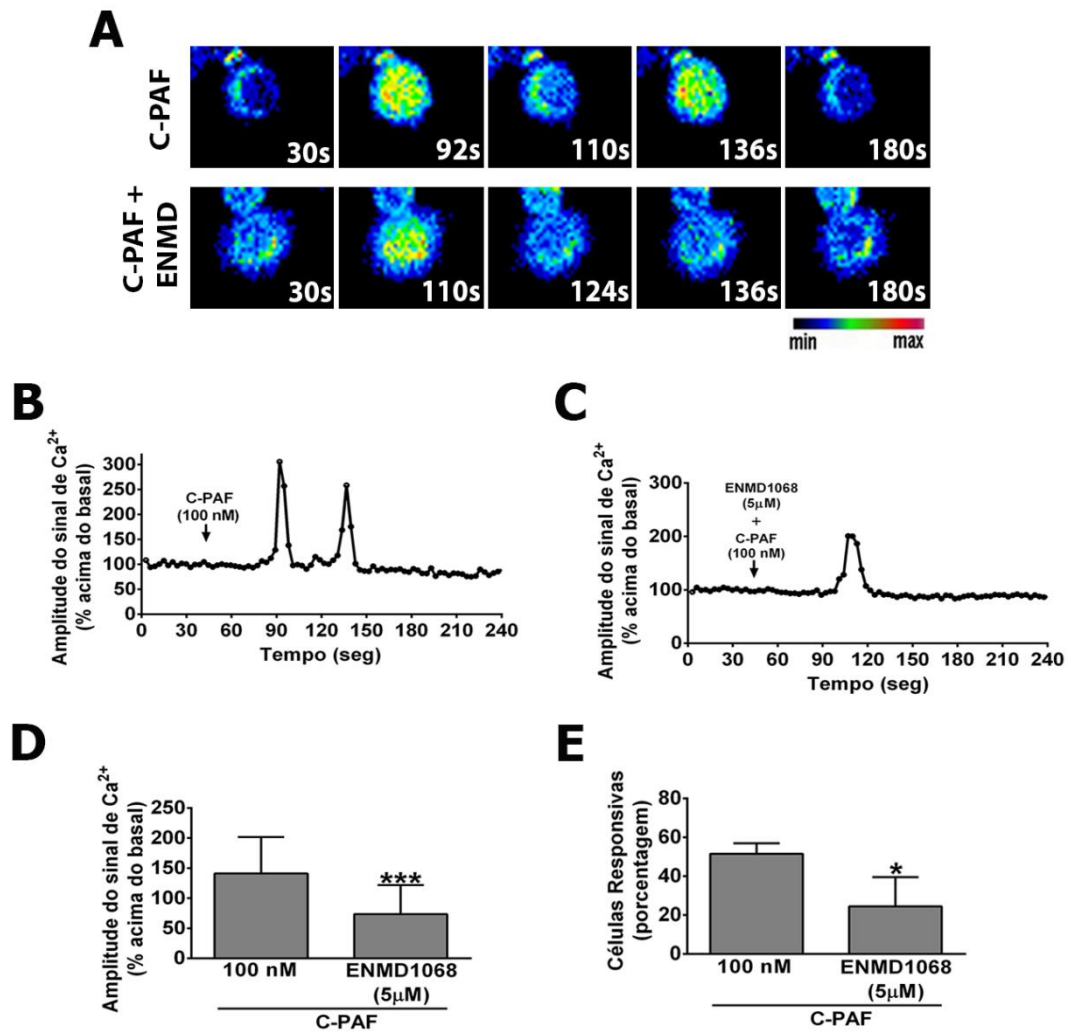


Figura 14: O antagonismo do PAR2 reduz a sinalização de Ca^{2+} intracelular induzida por C-PAF em células RAW 264.7. As células foram pré-incubadas com ENMD1068 (5 μM) 1 hora antes do estímulo com C-PAF (100 nM). **(A, B e C)** mostram a amplitude do sinal de Ca^{2+} em função do tempo de células representativas, as cores quentes da escala mostram o aumento da intensidade de fluorescência para o Ca^{2+} . **(D)** mostra a quantificação da amplitude do sinal de Ca^{2+} (% acima do basal). **(E)** mostra a quantificação da porcentagem de células responsivas (% acima do basal). As barras representam MÉDIA \pm SEM (n=3 preparações com 30 células por grupo). *** p <0,001 ou * p <0,05 versus a % do controle acima do basal (ANOVA seguida do pós-teste Newman-Keuls).

4.11. O antagonista do PAR2 (ENMD1068) reduz expressão nuclear do fator de transcrição NF- κ B (p65) induzido pelo C-PAF em macrófagos

Uma vez que o fator de transcrição NF- κ B regula a expressão de diferentes genes pró-inflamatórios e, sabendo que o PAF estimula a fosforilação, a translocação nuclear e a ativação do NF- κ B o que resulta na indução transcricional de citocinas, quimiocinas e mediadores inflamatórios, realizou-se a medida da expressão de NF- κ B (p65) em macrófagos através de imunofluorescência em presença ou ausência do antagonista do PAR2 antes do estímulo com C-PAF. Nossos resultados demonstraram que o estímulo dos macrófagos com C-PAF promoveu ativação significativa do fator de transcrição NF- κ B (p65), visto pelo aumento da intensidade de fluorescência nuclear do NF- κ B (p65) (cor verde) em comparação aos macrófagos controle, no qual a fluorescência verde está ausente no núcleo. Em contrapartida, o tratamento prévio dos macrófagos com antagonista do PAR2 antes do estímulo com C-PAF reduziu significativamente a expressão nuclear do fator de transcrição NF- κ B (p65), porém, ainda significativo em relação ao controle, evidenciando a participação do PAR2 na ativação do NF- κ B promovida pelo PAF (**Figura 15 A-B**).

4.12. O C-PAF reduz a expressão do PAR2 em macrófagos

Este trabalho evidencia a importância do PAR2 nos eventos de inflamação mediados pelo PAF. Portanto, investigamos a expressão do PAR2 em macrófagos, mediante o estímulo com C-PAF. Nossos resultados confirmaram a expressão constitutiva do PAR2 em macrófagos (**Figura 15A**). No entanto, 4 horas após o estímulo com C-PAF a expressão do PAR2 reduziu significativamente em comparação aos macrófagos do grupo controle. Além disso, nossos resultados mostraram que a expressão do PAR2 estava significativamente aumentada em macrófagos tratados previamente com antagonista do PAR2 antes do estímulo com C-PAF. Contudo, o tratamento prévio com o antagonista do PAR2-ENMD1068 não alterou expressão do PAR2 em relação as células controle (**Figura 15 A-C**).

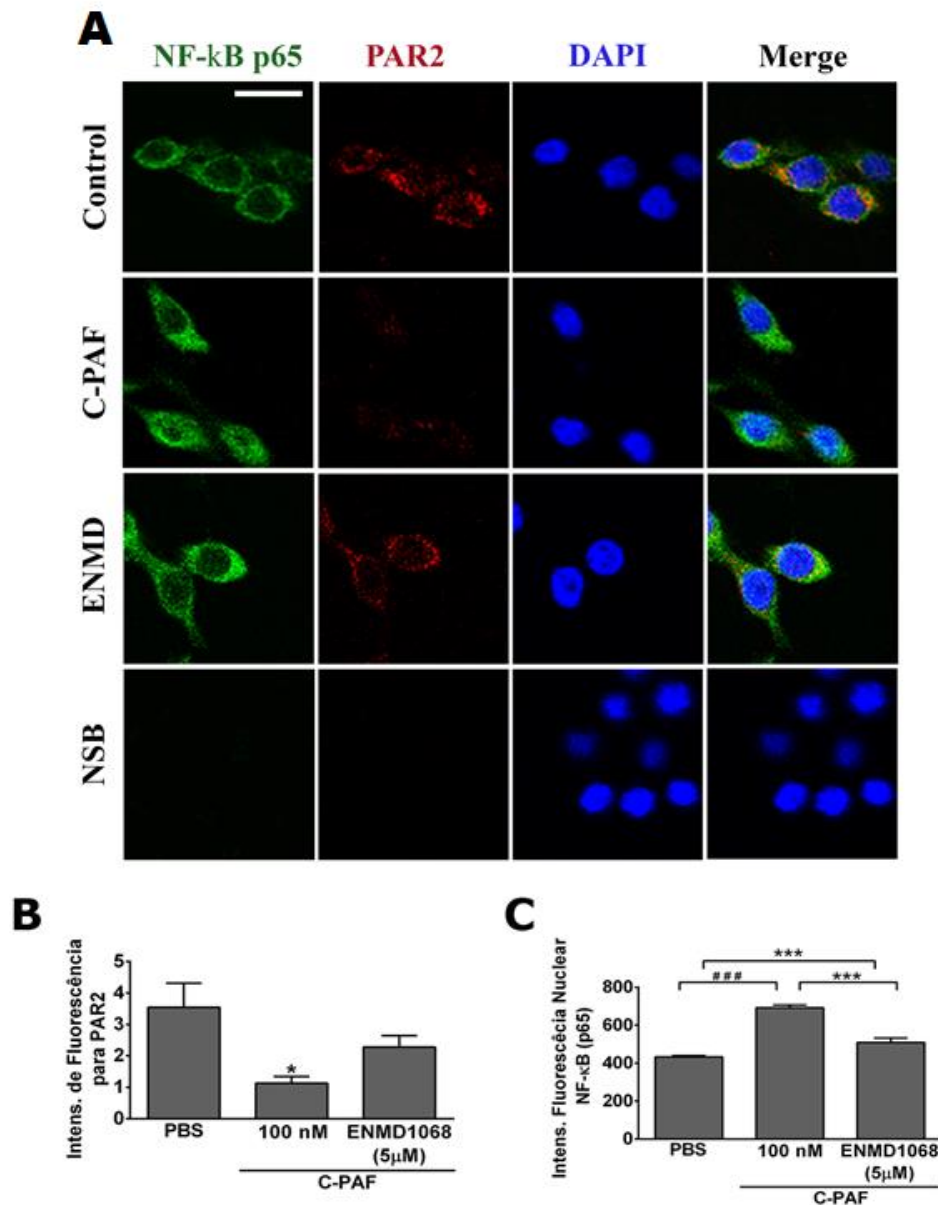


Figura 15: O estímulo com C-PAF reduz a expressão do fator de transcrição NF-κB (p65), mas não altera a expressão do PAR2 em células RAW 264.7. As células foram pré-incubadas com ENMD1068 (5 μM) 1 hora antes da estimulação com C-PAF (100 nM). Após 4h, a intensidade de fluorescência foi avaliada. **(A)** imagens representativas da expressão PAR2 (vermelho), NF-κB (p65, verde) e núcleo (DAPI, azul). **(B)** intensidade de fluorescência nuclear para NF-κB (p65) e **(C)** intensidade de fluorescência para PAR2. As barras representam a média ± SEM (n = 3 preparações diferentes). *** $p < 0,001$ versus C-PAF ou PBS (C), * $p < 0,05$ versus C-PAF (B) e # $p < 0,001$ versus PBS (C) (ANOVA seguida do pós-teste Newman-Keuls).

4.13. A expressão do RNA mensageiro do PAR2 é aumentada em macrófagos estimulados com C-PAF

Uma vez que o estímulo com C-PAF reduziu a expressão do PAR2 em macrófagos. Investigamos os efeitos do C-PAF na expressão do RNAm do PAR2 em macrófagos em diferentes tempos. Nossos resultados demonstraram que o estímulo com C-PAF aumentou significativamente a expressão do RNAm do PAR2 em todos os pontos de tempo analisados (1, 2 e 3 horas), comparado com as células controle não estimuladas. Em contrapartida, o tratamento prévio dos macrófagos com antagonista do PAR2, uma hora antes do estímulo com C-PAF, reduziu significativamente a expressão do RNAm do PAR2. Além disso, quando os macrófagos foram estimulados somente com antagonista do PAR2 a expressão do RNAm do PAR2 não foi alterada em comparação as células controle (**Figura 16**). Desse modo, sugerimos que a redução da intensidade de fluorescência da proteína PAR2 visto na figura 15B após 4 horas do estímulo com C-PAF não está relacionada com os efeitos do C-PAF na expressão do RNAm de PAR2, visto que o estímulo com C-PAF aumentou a expressão do RNAm do PAR2 após 1, 2 e 3 horas.

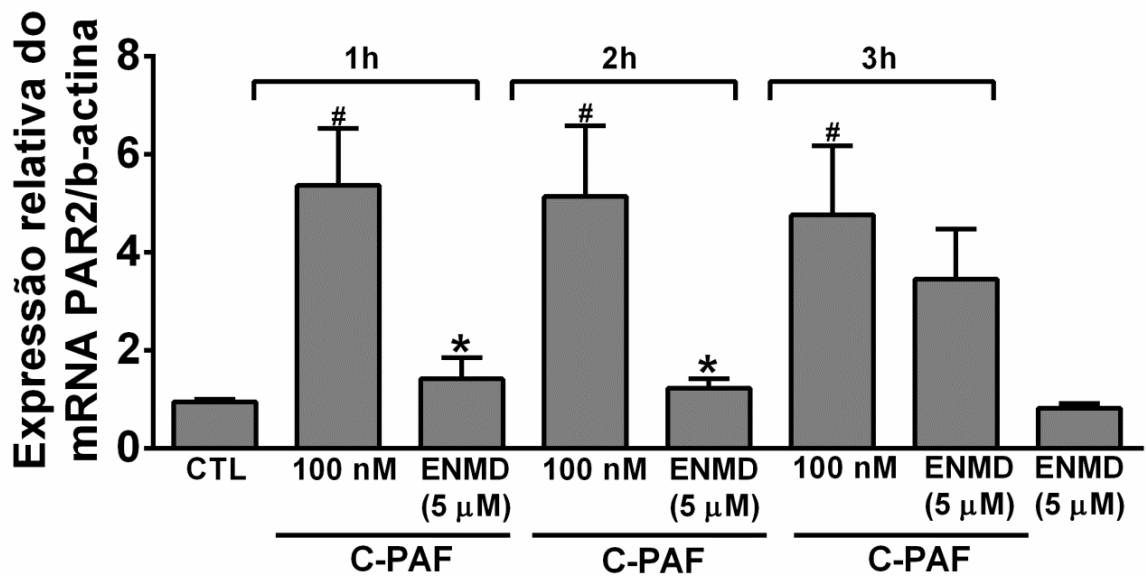


Figura 16: O estímulo com C-PAF aumenta a expressão do mRNA do PAR2 em células RAW 264.7. As células foram incubadas com C-PAF (100 nM) ou pré-incubadas com ENMD1068 (5 μM) 1 hora antes da incubação com C-PAF (100 nM). A expressão do mRNA de PAR2 foi avaliada após 1h, 2h e 3h por qPCR. Os resultados de qPCR foram calculados a partir dos valores de C_t do PAR2 e normalizados pelo controle β-actina. As barras representam a média ± SEM (n = 3 preparações diferentes). * $p < 0,05$ versus C-PAF e # $p < 0,05$ versus o controle (ANOVA seguida do pós-teste Newman-Keuls).

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

O Fator de ativação de plaquetas desempenha papel central na fisiopatologia das doenças inflamatórias do pulmão, no entanto, estratégias terapêuticas que atuam bloqueando ações do PAF na inflamação pulmonar não obtiveram sucesso clínico em humanos até o momento (KASPERSKA-ZAJAC, ALICJA; BRZOZA; ROGALA, 2008b; MEADE; HEUER, 1991). Devido à complexidade do processo inflamatório no pulmão e nas vias aéreas, as novas perspectivas terapêuticas visam abordar diferentes alvos da cascata inflamatória. Neste sentido, sabe-se que no microambiente inflamatório que contém PAF, proteases endógenas ativadoras do PAR2, também estão abundantemente presentes. Contudo, não existem evidências na literatura de cooperação entre PAF e PAR2 na inflamação pulmonar. Neste trabalho, demonstramos pela primeira vez a existência de cooperação entre PAFR e PAR2 mediando inflamação pulmonar em camundongos. Além disso, evidenciamos uma rede de interação entre PAR2/PAFR promovendo eventos de sinalização intracelular como mobilização de Ca^{2+} e ativação do fator de transcrição NF- κ B (p65) em macrófagos.

Inicialmente, para validar nosso modelo de inflamação pulmonar, investigamos a habilidade do C-PAF, um análogo do PAF endógeno no recrutamento de neutrófilos para o pulmão de camundongos. Nossos resultados mostraram que o C-PAF aumentou o número de neutrófilos presentes no BAL com um pico ocorrendo 24 horas após o estímulo. Além disso, confirmamos a ação do C-PAF via PAFR, uma vez que, o antagonista seletivo do PAFR aboliu completamente a migração de neutrófilos para o pulmão em resposta ao C-PAF. Estes resultados, portanto, estão de acordo com a literatura no qual já é bem descrito que o PAF é um potente mediador da migração de leucócitos para o foco inflamatório (BJÖRK; SMEDEGÅRD, 1983; KUIJPERS *et al.*, 1992; AU *et al.*, 2001).

Paralelamente, investigamos os efeitos do peptídeo agonista seletivo do PAR2 (SLIGRL-NH₂) no recrutamento de neutrófilos para o pulmão de camundongos. Nossos

resultados mostraram que a ativação do PAR2 pelo peptídeo agonista resultou em aumento do número de neutrófilos recuperados no BAL. No entanto, o pré-tratamento dos camundongos com antagonista do PAFR (WEB 2086) reverteu o recrutamento de neutrófilos induzido pela ativação do PAR2. Esses resultados evidenciam a participação do PAF na migração de leucócitos mediada pela ativação do PAR2 no pulmão de camundongos. Nossos dados são consistentes com estudo anterior em que o antagonista do PAFR, o WEB2086 inibiu a adesão, rolagem e o número de leucócitos polimorfonucleares extravasados para a cavidade peritoneal de ratos em resposta a ativação do PAR2 com SLIGRL-NH₂ (VERGNOLLE, N, 1999). A partir destes dados, sugere-se, portanto, que o PAF participa do recrutamento de leucócitos induzido por meio da ativação do PAR2.

Em seguida, devido ao potencial pró-inflamatório do PAF nas vias aéreas, consideramos a hipótese de um *crossstalk* entre PAFR/PAR2 na inflamação pulmonar (CHEN; ZIBOH; GIRI, 1997; LEE, W. L.; HARRISON; GRINSTEIN, 2003). Desse modo, investigamos o papel da ativação do PAR2 no recrutamento de neutrófilos mediado pelo PAF em pulmão de camundongos. Surpreendentemente, observamos que o antagonista do PAR2 aboliu a migração de neutrófilos induzida pelo PAF no pulmão de camundongos. Além disso, neste mesmo modelo, a inibição de proteases ativadoras endógenas do PAR2 com aprotinina, também reduziu o recrutamento de neutrófilos mediado por PAF em camundongos. Somado a isso, o antagonismo do PAR2 reduziu marcadamente a pontuação histopatológica da inflamação nos pulmões de camundongos instilados com PAF. Desse modo, na inflamação pulmonar mediada por PAF, sugerimos que as proteases endógenas ali liberadas levam a ativação do PAR2 que, por sua vez, alimenta positivamente a liberação de PAF. Assim, em cooperação com o PAFR, a ativação do PAR2 exerce uma regulação pró-inflamatória positiva para promover o recrutamento de neutrófilos para o pulmão. Por conseguinte, avaliamos os níveis das enzimas MPO e NAG, marcadores indiretos da presença e atividade de neutrófilos e macrófagos,

respectivamente (VENGE, 1994). Nossos resultados mostraram que o bloqueio da ativação do PAR2 reduziu os níveis de ambas as enzimas MPO e NAG induzidas pelo desafio com PAF no tecido pulmonar. Embora as funções efetoras dos neutrófilos são indispensáveis para a defesa do hospedeiro contra desafios infecciosos e não infecciosos (NG; OSTUNI; HIDALGO, 2019), a infiltração de neutrófilos contribui significativamente para o dano tecidual, entre outros através da secreção de enzimas como MPO, catepsina G e elastase, pelos neutrófilos, e ainda por sua função efetora realizando fagocitose, liberando ROS, formando NETs, bem como através da interação e modulação da função de outras células imunes como macrófagos alveolares, células dendríticas e células T (WITKO-SARSAT *et al.*, 2000; LEE, Y. M. *et al.*, 2002; KRUGER *et al.*, 2015). Desse modo, sugerimos que o antagonismo do PAR2 pode ser útil em condições nas quais o PAF desempenha um papel central no desenvolvimento e progressão da inflamação, por meio do comprometimento de eventos precoces na patogênese de doenças pulmonares, como a migração e ativação de neutrófilos.

Na migração de neutrófilos, as quimiocinas CXCL1 (proteína- α oncogene relacionado ao crescimento [GRO- α] em humanos ou quimiocina derivada de queratinócitos [KC] em camundongos e a CXCL2 (proteína inflamatória de macrófago-2 α , MIP-2 α) são as principais responsáveis por direcionarem os neutrófilos circulantes para tecidos inflamados. Ambas sinalizam via receptor CXCR2 para ativar neutrófilos circulantes e subsequentemente promover sua adesão ao endotélio (DE FILIPPO *et al.*, 2013; SAWANT *et al.*, 2016), expresso na superfície de células endoteliais, macrófagos alveolares e células epiteliais alveolares. Estas quimiocinas possuem afinidades distintas pelo receptor CXCR2, sendo que, no pulmão, a CXCL1 estimula de maneira sistemática o recrutamento dos neutrófilos circulantes para o pulmão em resposta às ações de MIP-2 (GIRBL *et al.*, 2018). Neste estudo, demonstramos que os níveis de CXCL1 e CXCL2 estão aumentados no pulmão de camundongos 1h e 4h após estímulo com PAF. Por outro lado, os níveis dessas quimiocinas foram reduzidos com o

antagonismo do PAR2, sugerindo que pelo menos nas primeiras 4 horas após o estímulo com o PAF, a migração de neutrófilos para o pulmão ocorre, em parte, através da ação destas quimiocinas, de uma maneira dependente da ativação do PAR2. Após 12 horas do estímulo com PAF os níveis de CXCL1 e CXCL2 decaem consideravelmente, em contraste ao pico da migração de neutrófilos visto 24 horas após o estímulo com PAF, sugerindo que outros agentes quimiotáticos como IL-6, TNF- α e IL1- β podem estar sendo liberadas após 12 h para manter a migração de neutrófilos subsequentes.

Consistente com nossos achados anteriores, nos quais o antagonismo do PAR2 diminuiu o recrutamento de neutrófilos induzidos por C-PAF no pulmão, demonstramos que o bloqueio da sinalização do PAR2 prejudicou o rolamento e a adesão de neutrófilos (Ly6G⁺) na microcirculação mesentérica de camundongos tratados com C-PAF; resultando, portanto, no comprometimento da transmigração dos neutrófilos dos vasos sanguíneos para o mesentério. Embora já tenha sido demonstrado que o bloqueio farmacológico ou a deleção genética do PAFR em modelo de doença aguda do enxerto contra hospedeiro prejudica o rolamento/adesão de leucócitos (CASTOR *et al.*, 2012), bem como, a produção das quimiocinas CXCL1 e CXCL2 (ROTH *et al.*, 1996; COELHO *et al.*, 2007). Este trabalho é pioneiro em demonstrar que o bloqueio do PAR2 prejudica a adesão e rolamento de neutrófilos induzida por PAF.

A interação física entre proteínas tem sido relatada na literatura como eventos comuns de cooperação entre receptores (CLANCY *et al.*, 2013). A partir dos nossos achados *in vivo* mostrando *crosstalk* entre o PAFR/PAR2 na inflamação pulmonar, buscamos investigar a possibilidade de interação desses receptores *in vitro*. Já foi demonstrado que o PAR2 interage fisicamente com o TLR4, um receptor importante na imunidade inata, em que ambos cooperam para a ativação de NF-KB (RALLABHANDI *et al.*, 2008). Por outro lado, uma cooperação entre PAR1 um receptor pertencente a mesma família do PAR2 e o PAFR foi relatada na regulação da expressão da molécula de adesão celular do melanoma

(MCAM/MUC18)(MELNIKOVA; VILLARES; BAR-ELI, 2008). A partir disso, avaliamos a possibilidade de uma possível interação entre o PAR2 e o PAFR em cultura de macrófagos por meio de ensaio de coimunoprecipitação. Nossos resultados mostraram um aumento da interação física entre PAFR/PAR2 somente quando ambos os receptores são ativados concomitantemente por seus respectivos agonistas, uma vez que, quando os macrófagos foram estimulados somente com agonista do PAFR ou do PAR2 a imunoprecipitação PAFR/PAR2 não foi alterada. Em conjunto, nossos resultados sugerem que durante a resposta inflamatória, o PAF pode estimular à liberação de proteases que ativam o PAR2 e, assim, a ativação simultânea do PAR2 e do PAFR parece favorecer esta interação física, o que possivelmente pode contribuir para aumento da sinalização pró-inflamatória envolvendo a ativação de ambos os receptores. Adicionalmente, é possível que a ativação do PAR2 por proteases endógenas possa retroalimentar positivamente a liberação de PAF favorecendo a rede de colaboração entre o PAFR/PAR2.

A ativação do receptor do PAFR promove a liberação de Ca^{2+} intracelular mediante ligação às subunidades $G_{\alpha q}$ da proteína G, que por sua vez, estimula a produção intracelular de IP_3 responsável pela liberação das reservas intracelulares de Ca^{2+} (YUE *et al.*, 1991; GARDNER; LASKIN; LASKIN, 1993; SATTAYAPRASERT *et al.*, 2005). Em nosso estudo, avaliamos se o bloqueio da ativação do PAR2 poderia influenciar na resposta de liberação de Ca^{2+} intracelular induzida pelo PAF em macrófagos. Nossos resultados mostraram que o bloqueio da ativação do PAR2 reduziu a amplitude dos sinais de Ca^{2+} intracelular, bem como a responsividade dos macrófagos ao estímulo com PAF, sugerindo um papel para o PAR2 nos eventos de sinalização intracelular de Ca^{2+} mediados pela ativação do PAFR. Para avaliar melhor esta hipótese, analisamos se o bloqueio da sinalização do PAR2 poderia alterar a expressão do fator de transcrição NF-KB (p65) induzida por PAF, que tem sua ativação sabidamente aumentada pela sinalização do PAFR (BORTHAKUR *et al.*, 2013; KO *et al.*, 2002). Nossos resultados mostram que o bloqueio da sinalização do PAR2 reduziu a ativação

do NF- κ B (p65) induzida pelo PAF em macrófagos. Sabe-se que a ativação de subunidades do NF- κ B é fundamental para a indução da transcrição e expressão de genes pró-inflamatórios (p. ex., IL-6 IL-1 ou TNF- α) (LAWRENCE, 2009; LIU, Y. *et al.*, 2017). Assim, sugerimos que durante a inflamação induzida pelo PAF, a ativação do PAR2 é importante para ativar o NF- κ B, o que regula positivamente a expressão de fatores quimiotáticos para a migração de neutrófilos, incluindo CXCL1 e CXCL2.

Até aqui nossos resultados sugerem que a ativação do PAR2 participa de eventos de inflamação mediados pelo PAF. Para compreender melhor esta cooperação, avaliamos se o estímulo com o PAF poderia alterar a expressão do PAR2 em macrófagos. Nossos resultados confirmaram que o PAR2 é expresso constitutivamente em macrófagos (DE ALMEIDA *et al.*, 2020), no entanto, curiosamente, a expressão do PAR2 foi prejudicada em macrófagos estimulados com C-PAF. Além disso, vimos que o antagonismo do PAR2 não alterou a expressão do PAR2 em células estimuladas com C-PAF. Para compreender os mecanismos subjacentes envolvidos nesta resposta, investigamos a expressão do mRNA do PAR2 em macrófagos. Os resultados mostraram que o estímulo com C-PAF aumentou a expressão do RNAm do PAR2 em todos os tempos analisados. Sabe-se que a ativação do PAR2 por proteases ou peptídeos sintéticos é seguida da fosforilação por GRKs, que recrutam proteínas β -arrestinas para promover a endocitose do receptor para reciclagem ou degradação (DEFEA *et al.*, 2000; JUNG *et al.*, 2016). Assim, sugerimos que após 4h do estímulo com o PAF, o PAR2 já tenha sido internalizado e degradado, justificando, então, a redução da fluorescência do PAR2 nos macrófagos estimulados com C-PAF.

Em conjunto, nossos resultados demonstraram que a produção das quimiocinas CXCL1 e CXCL2 e o recrutamento de neutrófilos mediados pelo PAF, pelo menos em parte, são dependentes da ativação do PAR2 em pulmão de camundongos. Além disso, demonstramos pela primeira vez uma interação física entre PAR2/PAFR em macrófagos. Adicionalmente,

mostramos que o antagonismo farmacológico do PAR2 prejudica a sinalização intracelular de cálcio e a ativação do fator de transcrição NF- κ B (p65) induzidos pelo PAF em macrófagos, evidenciando uma cooperação entre PAR2 e PAFR no controle do acúmulo de neutrófilos para o pulmão. Por fim, mostramos que a expressão do PAR2 reduz mediante estímulo com PAF, e em contrapartida, o estímulo com PAF aumenta o RNA mensageiro do PAR2 em macrófagos, sugerindo a possibilidade de ativação seguida de internalização do PAR2 em macrófagos estimulados com PAF. No entanto, mais estudos são necessários para uma melhor compreensão da complexidade dos eventos pró-inflamatórios conjuntamente mediados pela ativação do PAR2 e do PAFR nas vias aéreas.

CONCLUSÃO

6. CONCLUSÃO

Em conclusão, este trabalho demonstra pela primeira vez uma cooperação entre o PAFR/PAR2 mediando o recrutamento de neutrófilos para o pulmão de camundongos, bem como, em eventos de sinalização intracelular como a mobilização de Ca^{2+} e ativação de NF- κ B (p65) em macrófagos murinos. Embora mais estudos sejam necessários para esclarecer a complexidade dessa interação e seu significado fisiopatológico para as doenças pulmonares inflamatórias, o presente estudo propõe uma nova visão para compreensão da falha dos antagonistas do PAFR no uso clínico da asma em humanos. Tendo como base nossos resultados, sugerimos que novas abordagens farmacológicas que combinem a redução na ativação de PAF e PAR2 para o tratamento de doenças inflamatórias apresentam-se como alternativas promissoras, embora mais estudos ainda sejam necessários para confirmar esta hipótese.

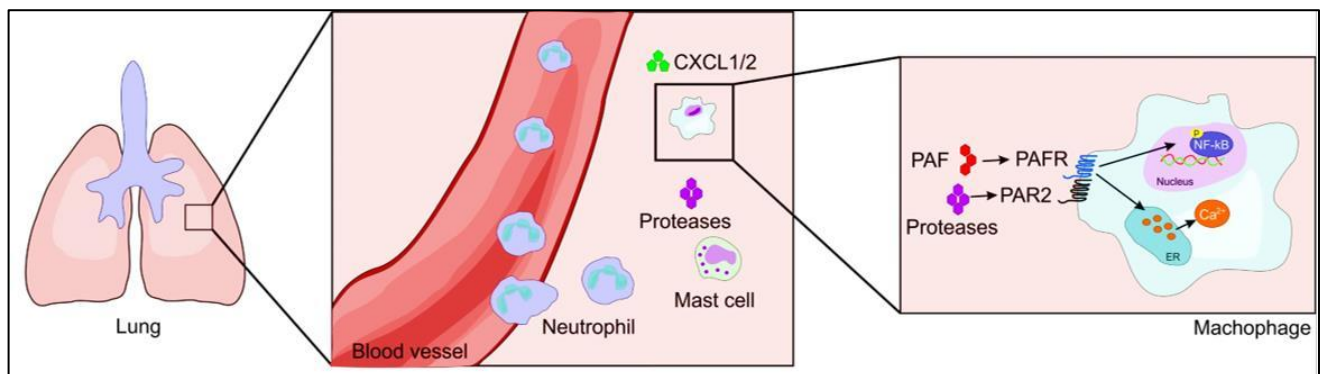


Figura 17: Possível mecanismo de interação entre PAF e PAR2 na inflamação pulmonar.

REFERÊNCIAS

ABDULKHALEQ, L. A. *et al.* The crucial roles of inflammatory mediators in inflammation: A review. *Veterinary World*, v. 11, n. 5, p. 627, 15 maio 2018. Disponível em: </pmc/articles/PMC5993766/>. Acesso em: 28 jul. 2021.

AGHASAFARI, P.; GEORGE, U.; PIDAPARTI, R. *A review of inflammatory mechanism in airway diseases. Inflammation Research*. [S.l: s.n.], , 2019

ALLARD, B. *et al.* Protease Activated Receptor-2 Expression and Function in Asthmatic Bronchial Smooth Muscle. *PLoS ONE*, v. 9, n. 2, p. e86945, 13 fev. 2014. Disponível em: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0086945>.

ARATANI, Y. Myeloperoxidase: Its role for host defense, inflammation, and neutrophil function. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 640, p. 47–52, 15 fev. 2018.

ASADUZZAMAN, M. *et al.* Functional inhibition of PAR2 alleviates allergen-induced airway hyperresponsiveness and inflammation. *Clinical and Experimental Allergy*, v. 45, n. 12, p. 1844–1855, 2015.

AU, B. TING *et al.* Blockade of PAF receptors controls interleukin-8 production by regulating the activation of neutrophil CD11/CD18. *European Journal of Pharmacology*, v. 425, n. 1, p. 65–71, 2001.

AUBIER, M. *et al.* Airway smooth muscle enlargement is associated with protease-activated receptor 2/ligand overexpression in patients with difficult-to-control severe asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v. 138, n. 3, p. 729- 739.e11, 2016.

AYOUB, M. A.; AL-SENAIDY, A.; PIN, J.-P. Receptor-G Protein Interaction Studied by Bioluminescence Resonance Energy Transfer: Lessons from Protease-Activated Receptor 1. *Frontiers in Endocrinology*, v. 3, 2012. Disponível em: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fendo.2012.00082/abstract>.

BARBARO, J. F.; ZVAIFLER, N. J.; BARON, L. S. Antigen Induced Histamine Release from

Platelets of Rabbits Producing Homologous PGA Antibody. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, v. 122, n. 4, p. 1245–1247, 8 set. 1966. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4162045/>>. Acesso em: 28 jun. 2021.

BARNES, P. J. *et al.* Chronic obstructive pulmonary disease. *Nature Reviews Disease Primers*, v. 1, 2015. Disponível em: <www.nature.com/nrdp>. Acesso em: 3 ago. 2021.

BENVENISTE, J.; HENSON, P. M.; COCHRANE, C. G. Leukocyte-dependent histamine release from rabbit platelets: The role of IgE, basophils, and a platelet-activating factor. *Journal of Experimental Medicine*, v. 136, n. 6, p. 1356–1377, 1 dez. 1972. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4118412/>>. Acesso em: 28 jun. 2021.

BJÖRK, J.; SMEDEGÅRD, G. Acute microvascular effects of PAF-acether, as studied by intravital microscopy. *European Journal of Pharmacology*, v. 96, n. 1–2, p. 87–94, 9 dez. 1983.

BÖHM, S. K. *et al.* Molecular cloning, expression and potential functions of the human proteinase-activated receptor-2. *Biochemical Journal*, v. 314, n. 3, p. 1009–1016, 15 mar. 1996. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14111111/>>. Acesso em: 9 ago. 2021.

BOLTON, S. J. *et al.* Expression of and functional responses to protease-activated receptors on human eosinophils. *Journal of Leukocyte Biology*, v. 74, n. 1, p. 60–68, jul. 2003. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1189/jlb.0702351>>.

BORTHAKUR, A. *et al.* Lactobacillus acidophilus Alleviates Platelet-Activating Factor-Induced Inflammatory Responses in Human Intestinal Epithelial Cells. *PLoS ONE*, 2013.

BRADLEY, P. P. *et al.* Measurement of cutaneous inflammation: Estimation of neutrophil content with an enzyme marker. *Journal of Investigative Dermatology*, v. 78, n. 3, p. 206–209, 1982. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6276474/>>. Acesso em: 23 ago. 2021.

BROWN, S. L. *et al.* Activation and Regulation of Platelet-Activating Factor Receptor: Role of G_i and G_q in Receptor-Mediated Chemotactic, Cytotoxic, and Cross-Regulatory Signals. *The Journal of Immunology*, v. 177, n. 5, p. 3242–3249, 1 set. 2006. Disponível em:

<<https://www.jimmunol.org/content/177/5/3242>>. Acesso em: 13 ago. 2021.

BUGL, S. *et al.* Current insights into neutrophil homeostasis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 1266, n. 1, p. 171–178, 1 ago. 2012. Disponível em: <<https://nyaspubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1749-6632.2012.06607.x>>.

Acesso em: 28 jul. 2021.

CASTOR, M. G. M. *et al.* Platelet-activating factor receptor plays a role in the pathogenesis of graft-versus-host disease by regulating leukocyte recruitment, tissue injury, and lethality. *Journal of Leukocyte Biology*, 2012.

CHAKRABORTI, S. *et al.* Role of proteases in lung disease: A brief overview. *Proteases in Human Diseases*. [S.l: s.n.], 2017. .

CHAO, W.; OLSON, M. S. *Platelet-activating factor: Receptors and signal transduction*. *Biochemical Journal*. [S.l: s.n.], 1993

CHEN, J.; ZIBOH, V.; GIRI, S. N. Up-regulation of platelet-activating factor receptors in lung and alveolar macrophages in the bleomycin-hamster model of pulmonary fibrosis. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 280, n. 3, p. 1219–1227, mar. 1997.

CHIGNARD, M. *et al.* *The role of platelet-activating factor in platelet aggregation [11]*. *Nature*. [S.l.]: Nature. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/377104/>>. Acesso em: 28 jun. 2021. , 1979

CLANCY, T. *et al.* Predicting physical interactions between protein complexes. *Molecular and Cellular Proteomics*, 2013.

COCKS, T. M.; MOFFATT, J. D. Protease-activated receptor-2 (PAR2) in the airways. 2001, [S.l: s.n.], 2001.

COELHO, F. M. *et al.* Platelet activating factor receptors drive CXC chemokine production, neutrophil influx and edema formation in the lungs of mice injected with *Tityus serrulatus* venom. *Toxicon*, 2007.

COTTRELL, G. S. *et al.* Protease-activated receptor 2: activation, signalling and function. *Biochemical Society transactions*, v. 31, n. Pt 6, p. 1191–7, dez. 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14641024>>.

CUSACK, N. J. Platelet-activating factor. *Nature*, v. 285, n. 5762, p. 193, 22 maio 1980. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7374771/>>. Acesso em: 28 jun. 2021.

DALMASO, B. *et al.* Platelet activating factor in the eye: Physiological roles, diseases and future perspectives. *Prostaglandins and Other Lipid Mediators*. [S.l.]: Elsevier. , 1 abr. 2021

DAMIANO, V. V *et al.* Immunolocalization of elastase in human emphysematous lungs. *Journal of Clinical Investigation*, v. 78, n. 2, p. 482–493, 1986.

DE ALMEIDA, A. D. *et al.* A role for mast cells and mast cell tryptase in driving neutrophil recruitment in LPS-induced lung inflammation via protease-activated receptor 2 in mice. *Inflammation Research*, v. 69, n. 10, p. 1059–1070, 1 out. 2020. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32632517/>>. Acesso em: 24 jun. 2021.

DE FILIPPO, K. *et al.* Mast cell and macrophage chemokines CXCL1/CXCL2 control the early stage of neutrophil recruitment during tissue inflammation. *Blood*, v. 121, n. 24, p. 4930–4937, 2013.

DEFEA, K. A. *et al.* β -Arrestin-dependent endocytosis of proteinase-activated receptor 2 is required for intracellular targeting of activated ERK1/2. *Journal of Cell Biology*, v. 148, n. 6, p. 1267–1281, 2000.

DEJANA, E. The transcellular railway: insights into leukocyte diapedesis. *Nature Cell Biology* 2006 8:2, v. 8, n. 2, p. 105–107, fev. 2006. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/ncb0206-105>>. Acesso em: 28 jul. 2021.

DEMOPOULOS, C. A.; PINCKARD, R. N.; HANAHAN, D. J. Platelet-activating factor. Evidence for 1-O-alkyl-2-acetyl-sn-glycerol-3-phosphorylcholine as the active component (a new class of lipid chemical mediators). *Journal of Biological Chemistry*, v. 254, n. 19, p. 9355–

9358, 10 out. 1979.

DÉRY, O. *et al.* Proteinase-activated receptors: novel mechanisms of signaling by serine proteases. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1998.274.6.C1429>, v. 274, n. 6 43-6, 1998. Disponível em: <<https://journals.physiology.org/doi/abs/10.1152/ajpcell.1998.274.6.C1429>>. Acesso em: 9 ago. 2021.

DÉRY, O. *et al.* Trafficking of proteinase-activated receptor-2 and β -arrestin-1 tagged with green fluorescent protein. β -Arrestin-dependent endocytosis of a proteinase receptor. *Journal of Biological Chemistry*, v. 274, n. 26, p. 18524–18535, 25 jun. 1999. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10373461/>>. Acesso em: 9 ago. 2021.

DOUWES, J. *et al.* *Non-eosinophilic asthma: Importance and possible mechanisms. Thorax.* [S.l.]: BMJ Publishing Group Ltd. Disponível em: <<https://thorax.bmj.com/content/57/7/643>>. Acesso em: 3 ago. 2021. , 1 jul. 2002

FAURSCHOU, M.; BORREGAARD, N. Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. *Microbes and infection*, v. 5, n. 14, p. 1317–27, nov. 2003. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1286457903002405>>.

FURZE, R. C.; RANKIN, S. M. The role of the bone marrow in neutrophil clearance under homeostatic conditions in the mouse. *The FASEB Journal*, v. 22, n. 9, p. 3111, set. 2008. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/152593561/>>. Acesso em: 28 jul. 2021.

GARDNER, C. R.; LASKIN, J. D.; LASKIN, D. L. Platelet-activating factor-induced calcium mobilization and oxidative metabolism in hepatic macrophages and endothelial cells. *Journal of Leukocyte Biology*, 1993.

GIACALONE, V. D. *et al.* Neutrophil Adaptations upon Recruitment to the Lung: New Concepts and Implications for Homeostasis and Disease. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 21, n. 3, 2020. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/327038180/>>. Acesso em: 13 ago. 2021.

GIERLIKOWSKA, B. *et al.* *Phagocytosis, Degranulation and Extracellular Traps Release by Neutrophils—The Current Knowledge, Pharmacological Modulation and Future Prospects.* *Frontiers in Pharmacology*. [S.l.]: Frontiers. , 4 maio 2021

GIRBL, T. *et al.* Distinct Compartmentalization of the Chemokines CXCL1 and CXCL2 and the Atypical Receptor ACKR1 Determine Discrete Stages of Neutrophil Diapedesis. *Immunity*, v. 49, n. 6, p. 1062- 1076.e6, 18 dez. 2018. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30446388/>>. Acesso em: 24 jun. 2021.

GROMMES, J.; SOEHNLEIN, O. Contribution of neutrophils to acute lung injury. *Molecular Medicine*, v. 17, n. 3–4, p. 293–307, mar. 2011. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21046059/>>. Acesso em: 3 ago. 2021.

HANAHAN, D. J. *et al.* Identification of platelet activating factor isolated from rabbit basophils as acetyl glyceryl ether phosphorylcholine. *Journal of Biological Chemistry*, v. 255, n. 12, p. 5514–5516, 1980. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)70658-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9258(19)70658-9)>.

HANNOODEE, S.; NASURUDDIN, D. N. Acute Inflammatory Response. *Nature*, v. 206, n. 4979, p. 20, 26 nov. 2020. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK556083/>>. Acesso em: 28 jul. 2021.

HARAYAMA, T. *et al.* Identification of a Novel Noninflammatory Biosynthetic Pathway of Platelet-activating Factor *. *Journal of Biological Chemistry*, v. 283, n. 17, p. 11097–11106, 25 abr. 2008. Disponível em: <<http://www.jbc.org/article/S0021925820619007/fulltext>>. Acesso em: 13 ago. 2021.

HERR, N. *et al.* Intravital microscopy of leukocyte-endothelial and platelet-leukocyte interactions in mesenteric veins in mice. *Journal of Visualized Experiments*, v. 2015, n. 102, p. 1–6, 2015.

HEUBERGER, D. M.; SCHUEPBACH, R. A. *Protease-activated receptors (PARs): Mechanisms of action and potential therapeutic modulators in PAR-driven inflammatory*

diseases. Thrombosis Journal. [S.l.]: BioMed Central. Disponível em: <<https://thrombosisjournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12959-019-0194-8>>. Acesso em: 9 ago. 2021. , 29 dez. 2019

HEUTINCK, K. M. *et al.* Serine proteases of the human immune system in health and disease. *Molecular Immunology*, v. 47, n. 11–12, p. 1943–1955, 1 jul. 2010.

HOLLENBERG, M. D. *et al.* *Biased signalling and proteinase-activated receptors (PARs): Targeting inflammatory disease.* *British Journal of Pharmacology.* [S.l: s.n.]. , 2014

HOLLENBERG, MORLEY D.; COMPTON, S. J. *International Union of Pharmacology. XXVIII. Proteinase-activated receptors.* *Pharmacological Reviews.* [S.l: s.n.]. , 2002

HONDA, Z. I. *et al.* Cloning by functional expression of platelet-activating factor receptor from guinea-pig lung. *Nature*, v. 349, n. 6307, p. 342–346, 1991. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/349342a0>>. Acesso em: 28 jun. 2021.

HORVAT, J. C. *et al.* Neonatal chlamydial infection induces mixed T-cell responses that drive allergic airway disease. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 2007.

ISHII, S.; SHIMIZU, T. *Platelet-activating factor (PAF) receptor and genetically engineered PAF receptor mutant mice.* *Progress in Lipid Research.* [S.l: s.n.]. , 2000

JACOB, C. *et al.* c-Cbl mediates ubiquitination, degradation, and down-regulation of human protease-activated receptor 2. *Journal of Biological Chemistry*, v. 280, n. 16, p. 16076–16087, 2005.

JUNG, S.-R. *et al.* Contributions of protein kinases and β -arrestin to termination of protease-activated receptor 2 signaling. *The Journal of General Physiology*, 2016.

KANDEL, S. H. *et al.* Proteinase-activated receptor 2 expression on peripheral blood monocytes and T-cells in patients with rheumatoid arthritis. *Egyptian Rheumatologist*, v. 38, n. 2, p. 91–98, 1 abr. 2016.

KASPERSKA-ZAJAC, A.; BRZOZA, Z.; ROGALA, B. *Platelet activating factor as a*

mediator and therapeutic approach in bronchial asthma. Inflammation. [S.l.]: Inflammation. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18193345/>>. Acesso em: 23 jun. 2021. , abr. 2008a.

KASPERSKA-ZAJAC, ALICJA; BRZOZA, Z.; ROGALA, B. Platelet-Activating Factor (PAF): A Review of its Role in Asthma and Clinical Efficacy of PAF Antagonists in the Disease Therapy. *Recent Patents on Inflammation & Allergy Drug Discovery*, v. 2, n. 1, p. 72–76, 2008b.

KENNEDY, A. J. *et al.* Protease-activated receptor-2 ligands reveal orthosteric and allosteric mechanisms of receptor inhibition. *Communications Biology* 2020 3:1, v. 3, n. 1, p. 1–13, 17 dez. 2020. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s42003-020-01504-0>>. Acesso em: 9 ago. 2021.

KNIGHT, D. A. *et al.* Protease-activated receptors in human airways: Upregulation of PAR-2 in respiratory epithelium from patients with asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v. 108, n. 5, p. 797–803, nov. 2001. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0091674901827366>>.

KO, H. M. *et al.* Nuclear factor κ B dependency of platelet-activating factor-induced angiogenesis. *Cancer Research*, 2002.

KOLACZKOWSKA, E.; KUBES, P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nature Reviews Immunology* 2013 13:3, v. 13, n. 3, p. 159–175, 25 fev. 2013. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/nri3399>>. Acesso em: 28 jul. 2021.

KRAVCHENKO, V. V. *et al.* Platelet-activating factor induces NF- κ B activation through a G protein- coupled pathway. *Journal of Biological Chemistry*. [S.l: s.n.], 1995

KRUGER, P. *et al.* Neutrophils: Between Host Defence, Immune Modulation, and Tissue Injury. *PLoS Pathogens*. [S.l.]: Public Library of Science. Disponível em: <</pmc/articles/PMC4357453/>>. Acesso em: 23 jun. 2021. , 1 mar. 2015

KUIJPERS, T. W. *et al.* Neutrophil migration across monolayers of cytokine-prestimulated endothelial cells: A role for platelet-activating factor and IL-8. *Journal of Cell Biology*, v. 117, n. 3, p. 565–572, 1992.

KUMAR, P. *et al.* Differential effects of β -arrestins on the internalization, desensitization and ERK1/2 activation downstream of protease activated receptor-2. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00010.2007>, v. 293, n. 1, jul. 2007. Disponível em: <<https://journals.physiology.org/doi/abs/10.1152/ajpcell.00010.2007>>. Acesso em: 9 ago. 2021.

LAWRENCE, T. *The nuclear factor NF-kappaB pathway in inflammation. Cold Spring Harbor perspectives in biology*. [S.l.: s.n.], 2009

LEE, W. L.; HARRISON, R. E.; GRINSTEIN, S. *Phagocytosis by neutrophils. Microbes and Infection*. [S.l.]: Elsevier Masson. , 1 nov. 2003

LEE, Y. C. C. G. *et al.* Activation of proteinase-activated receptor-2 in mesothelial cells induces pleural inflammation. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*, v. 288, n. 4 32-4, p. L734–L740, abr. 2005. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15591415/>>. Acesso em: 11 ago. 2021.

LEE, Y. M. *et al.* Platelet-activating factor induces lung inflammation and leak in rats: Hydrogen peroxide production along neutrophil-lung endothelial cell interfaces. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, v. 140, n. 5, p. 312–319, 2002.

LEITE, M. F. *et al.* Nuclear and cytosolic calcium are regulated independently. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2003.

LIU, J. *et al.* *Advanced Role of Neutrophils in Common Respiratory Diseases. Journal of Immunology Research*. [S.l.: s.n.], 2017

LIU, Y. *et al.* *Current Understanding of Platelet-Activating Factor Signaling in Central Nervous System Diseases. Molecular Neurobiology*. [S.l.]: Mol Neurobiol. Disponível em:

<<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27613281/>>. Acesso em: 13 ago. 2021. , 1 set. 2017

LUTFI, R. *et al.* The role of protease-activated receptor-2 on pulmonary neutrophils in the innate immune response to cockroach allergen. *Journal of Inflammation (United Kingdom)*, 2012.

MATOS, N. A. *et al.* Mast cell tryptase induces eosinophil recruitment in the pleural cavity of mice via proteinase-activated receptor 2. *Inflammation*, 2013.

MATOS, N. A. *et al.* Proteinase-activated receptor 2 blockade impairs CCL11- or allergen-induced eosinophil recruitment in experimental pleurisy. *European Journal of Pharmacology*, v. 740, p. 627–633, out. 2014. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0014299914004609>>.

MAYADAS, T. N.; CULLERE, X.; LOWELL, C. A. The Multifaceted Functions of Neutrophils. *Annual review of pathology*, v. 9, p. 181, 2014. Disponível em: <[/pmc/articles/PMC4277181/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2477181/)>. Acesso em: 28 jul. 2021.

MCDONALD, B.; KUBES, P. Cellular and molecular choreography of neutrophil recruitment to sites of sterile inflammation. *Journal of Molecular Medicine*, v. 89, n. 11, p. 1079–1088, nov. 2011.

MEADE, C. J.; HEUER, H. PAF antagonism as an approach to the treatment of airway hyperreactivity. 1991, [S.l: s.n.], 1991.

MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature* 2008 454:7203, v. 454, n. 7203, p. 428–435, 1 jul. 2008. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/nature07201>>. Acesso em: 28 jul. 2021.

MELNIKOVA, V. O. *et al.* Crosstalk between protease-activated receptor 1 and platelet-activating factor receptor regulates melanoma cell adhesion molecule (MCAM/MUC18) expression and melanoma metastasis. *Journal of Biological Chemistry*, 2009.

MELNIKOVA, V. O.; VILLARES, G. J.; BAR-ELI, M. *Emerging roles of PAR-1 and PAFR*

in melanoma metastasis. Cancer Microenvironment. [S.l: s.n.], 2008

MONTESEIRÍN, J. *Neutrophils and asthma. Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology.* [S.l: s.n.], 2009

NAKAMURA, M. *et al.* Molecular cloning and expression of platelet-activating factor receptor from human leukocytes. *Journal of Biological Chemistry*, v. 266, n. 30, p. 20400–20405, 25 out. 1991.

NATHAN, C. Points of control in inflammation. *Nature* 2002 420:6917, v. 420, n. 6917, p. 846–852, 26 dez. 2002. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/nature01320>>. Acesso em: 28 jul. 2021.

NG, L. G.; OSTUNI, R.; HIDALGO, A. *Heterogeneity of neutrophils. Nature Reviews Immunology.* [S.l.]: Nature Publishing Group. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41577-019-0141-8>>. Acesso em: 23 jun. 2021. , 1 abr. 2019

NIESLER, U. *et al.* Role of alveolar macrophages in the inflammatory response after trauma. *Shock*, v. 42, n. 1, p. 3–10, 2014. Disponível em: <https://journals.lww.com/shockjournal/Fulltext/2014/07000/Role_of_Alveolar_Macrophages_in_the_Inflammatory.2.aspx>. Acesso em: 13 ago. 2021.

POOLE, D. P. *et al.* Protease-activated receptor 2 (PAR2) protein and transient receptor potential vanilloid 4 (TRPV4) protein coupling is required for sustained inflammatory signaling. *Journal of Biological Chemistry*, 2013.

PRESCOTT, S. M. *et al.* Platelet-Activating Factor and Related Lipid Mediators. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.biochem.69.1.419>, v. 69, p. 419–445, 28 nov. 2003. Disponível em: <<https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.biochem.69.1.419>>. Acesso em: 13 ago. 2021.

RALLABHANDI, P. *et al.* Analysis of proteinase-activated receptor 2 and TLR4 signal

transduction: A novel paradigm for receptor cooperativity. *Journal of Biological Chemistry*, 2008.

RAMACHANDRAN, R. *et al.* Targeting proteinase-activated receptors: Therapeutic potential and challenges. *Nature Reviews Drug Discovery*. [S.l: s.n.], 2012

RAWAT, K.; SYEDA, S.; SHRIVASTAVA, A. Neutrophil-derived granule cargoes: paving the way for tumor growth and progression. *Cancer and Metastasis Reviews* 2021 40:1, v. 40, n. 1, p. 221–244, 12 jan. 2021. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s10555-020-09951-1>>. Acesso em: 28 jul. 2021.

REED, C. E.; KITA, H. *The role of protease activation of inflammation in allergic respiratory diseases*. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. [S.l: s.n.], 2004

RICKS, T. K.; TREJO, J. Phosphorylation of Protease-activated Receptor-2 Differentially Regulates Desensitization and Internalization. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 284, n. 49, p. 34444, 4 dez. 2009. Disponível em: <[pmc/articles/PMC2797212/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19444444/)>. Acesso em: 11 ago. 2021.

ROCK, K. L.; KONO, H. The inflammatory response to cell death. *Annual review of pathology*, v. 3, p. 99, 2008. Disponível em: <[pmc/articles/PMC3094097/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18844444/)>. Acesso em: 28 jul. 2021.

ROTH, M. *et al.* Platelet-activating factor exerts mitogenic activity and stimulates expression of interleukin 6 and interleukin 8 in human lung fibroblasts via binding to its functional receptor. *Journal of Experimental Medicine*, 1996.

ROTHMEIER, A. S.; RUF, W. Protease-activated receptor 2 signaling in inflammation. *Seminars in Immunopathology*, v. 34, n. 1, p. 133–149, 6 jan. 2012. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s00281-011-0289-1>>. Acesso em: 9 ago. 2021.

SANZ, M.-J.; KUBES, P. Neutrophil-active chemokines in in vivo imaging of neutrophil trafficking. *European Journal of Immunology*, v. 42, n. 2, p. 278–283, 1 fev. 2012. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/eji.201142231>>. Acesso em: 28 jul.

2021.

SATTAYAPRASERT, P. *et al.* Platelet-activating factor enhancement of calcium influx and interleukin-6 expression, but not production, in human microglia. *Journal of Neuroinflammation*, v. 2, n. 1, p. 1–8, 15 abr. 2005. Disponível em: <<http://www.jneuroinflammation.com/content/2/1/11>>. Acesso em: 24 jun. 2021.

SAWANT, K. V. *et al.* Chemokine CXCL1 mediated neutrophil recruitment: Role of glycosaminoglycan interactions. *Scientific Reports*, v. 6, n. 1, p. 1–8, 14 set. 2016. Disponível em: <www.nature.com/scientificreports>. Acesso em: 24 jun. 2021.

SCHMIDLIN, F. *et al.* Protease-Activated Receptor 2 Mediates Eosinophil Infiltration and Hyperreactivity in Allergic Inflammation of the Airway. *The Journal of Immunology*, 2002.

SCHULTHEISS, M.; NEUMCKE, B.; RICHTER, H.-P. Endogenous trypsin receptors in *Xenopus* oocytes: linkage to internal calcium stores. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS 1997 53:10*, v. 53, n. 10, p. 842–849, 25 jan. 2014. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s000180050104>>. Acesso em: 9 ago. 2021.

SHUKLA, S. D. *et al.* Airway epithelial platelet-activating factor receptor expression is markedly upregulated in chronic obstructive pulmonary disease. *International Journal of COPD*, 2014.

SNYDER, F.; FITZGERALD, V.; BLANK, M. L. Biosynthesis of Platelet-Activating Factor and Enzyme Inhibitors. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, v. 416, p. 5–10, 1996. Disponível em: <https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4899-0179-8_2>. Acesso em: 13 ago. 2021.

SRIWAI, W. *et al.* Distinctive G Protein-Dependent Signaling by Protease-Activated Receptor 2 (PAR2) in Smooth Muscle: Feedback Inhibition of RhoA by cAMP-Independent PKA. *PLoS ONE*, v. 8, n. 6, p. 66743, 18 jun. 2013. Disponível em: <[/pmc/articles/PMC3688948/](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066743)>. Acesso em: 9 ago. 2021.

STĂNESCU, D. *et al.* Airways obstruction, chronic expectoration, and rapid decline of FEV1 in smokers are associated with increased levels of sputum neutrophils. *Thorax*, v. 51, n. 3, p. 267, 1996. Disponível em: [https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1090637/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1090637/). Acesso em: 3 ago. 2021.

STEFANSSON, K. *et al.* Activation of proteinase-activated receptor-2 by human kallikrein-related peptidases. *The Journal of investigative dermatology*, v. 128, n. 1, p. 18–25, 17 jan. 2008. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17625593/>. Acesso em: 9 ago. 2021.

SUN, G. *et al.* Interaction of Mite Allergens Der P3 and Der P9 with Protease-Activated Receptor-2 Expressed by Lung Epithelial Cells. *The Journal of Immunology*, v. 167, n. 2, p. 1014–1021, 15 jul. 2001. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11441110/>. Acesso em: 9 ago. 2021.

TESSNER, T. G.; O'FLAHERTY, J. T.; WYKLE, R. L. Stimulation of platelet-activating factor synthesis by a nonmetabolizable bioactive analog of platelet-activating factor and influence of arachidonic acid metabolites. *Journal of Biological Chemistry*, v. 264, n. 9, p. 4794–4799, 1989.

UHLIG, S.; GÖGGEL, R.; ENGEL, S. Mechanisms of platelet-activating factor (PAF)-mediated responses in the lung. *Pharmacological Reports*, v. 57, n. SUPPL., p. 206–221, 2005.

VENGE, P. The monitoring of inflammation by specific cellular markers. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, v. 54, n. S219, p. 47–54, 1994.

VERGNOLLE, N. Proteinase-activated receptor-2-activating peptides induce leukocyte rolling, adhesion, and extravasation in vivo. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, v. 163, n. 9, p. 5064–9, 1 nov. 1999. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10528212>. Acesso em: 23 jun. 2021.

VERGNOLLE, NATHALIE. Protease-activated receptors and inflammatory hyperalgesia. 2005, [S.l: s.n.], 2005.

VESTWEBER, D. How leukocytes cross the vascular endothelium. *Nature Reviews Immunology* 2015 15:11, v. 15, n. 11, p. 692–704, 16 out. 2015. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/nri3908>>. Acesso em: 28 jul. 2021.

WITKO-SARSAT, V. *et al.* Neutrophils: Molecules, Functions and Pathophysiological Aspects. *Laboratory Investigation* 2000 80:5, v. 80, n. 5, p. 617–653, 1 maio 2000. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/3780067>>. Acesso em: 28 jul. 2021.

YAGI, Y. *et al.* Involvement of Rho signaling in PAR2-mediated regulation of neutrophil adhesion to lung epithelial cells. *European Journal of Pharmacology*, v. 536, n. 1–2, p. 19–27, 24 abr. 2006. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16564523/>>. Acesso em: 13 ago. 2021.

YOST, C. C.; WEYRICH, A. S.; ZIMMERMAN, G. A. *The platelet activating factor (PAF) signaling cascade in systemic inflammatory responses. Biochimie.* [S.l: s.n.], 2010

YU, J. *et al.* Inflammatory mechanisms in the lung. *Journal of Inflammation Research*, p. 1–6, 2008. Disponível em: <<http://www.dovepress.com/inflammatory-mechanisms-in-the-lung-peer-reviewed-article-JIR>>.

YUE, T. L. *et al.* Platelet-activating factor (PAF) receptor-mediated calcium mobilization and phosphoinositide turnover in neurohybrid NG108-15 cells: Studies with BN50739, a new PAF antagonist. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 1991.

ZHAO, P.; METCALF, M.; BUNNETT, N. W. *Biased signaling of protease-activated receptors. Frontiers in Endocrinology.* [S.l.]: Frontiers. , 2014

ANEXOS

1. Certificado Comissão de Ética no Uso de Animais

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
CEUA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº. 348 / 2014, relativo ao projeto intitulado “Estudo do PAR2 no recrutamento de leucócitos e na produção de mediadores inflamatórios na inflamação pulmonar experimental em camundongos”, que tem como responsável André Klein, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG), tendo sido aprovado na reunião de 14/04/2015. Este certificado espira-se em 14/04/2020.

CERTIFICATE

We hereby certify that the Protocol nº. 348 / 2014, related to the Project entitled “The role for PAR2 on leukocyte recruitment and on the production of inflammatory mediators in experimental lung inflammation in mice”, under the supervision of André Klein, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CEUA/UFMG), and was approved in 14/04/2015. This certificate expires in 14/04/2020.

Cleuza Maria de Faria Rezende
Coordenador(a) da CEUA/UFMG
Belo Horizonte, 14/04/2015.

Atenciosamente.

Sistema CEUA-UFMG
<https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/>

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br

2. Sistema de pontuação histopatológica avaliado em pulmões de camundongos

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