

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
FACULDADE DE FARMÁCIA

**PARTICIPAÇÃO DO ATIVADOR DO PLASMINOGÊNIO DO TIPO  
UROQUINASE NA MIGRAÇÃO DE CÉLULAS INFLAMATÓRIAS**

Belo Horizonte

2016

BRUNO ROCHA CORDEIRO COSTA

PARTICIPAÇÃO DO ATIVADOR DO PLASMINOGÊNIO DO TIPO  
UROQUINASE NA MIGRAÇÃO DE CÉLULAS INFLAMATÓRIAS

Dissertação, como requisito parcial para obter o título de mestre em Análises Clínicas e Toxicológicas, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais

Orientadora: Profa. Dra. Lirlândia Pires de Sousa

Belo Horizonte

2016

Dedico este trabalho aos meus pais, que me apoiaram de todas as formas possíveis para que seguisse os caminhos que escolhi. Dedico também aos meus colegas de trabalho, que colaboraram na execução deste projeto e no meu aprendizado como cientista.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço à minha família, por todo apoio e incentivo durante minha vida.

Agradeço à minha mãe, Gráucia, por ter me ensinado a sonhar, ter objetivos e correr atrás deles.

Agradeço ao meu pai, 'Chatinho', por ter me ensinado o valor do trabalho duro e do esforço.

À minha irmã, Brenda, por acreditar em mim e torcer pelo meu sucesso.

À minha orientadora Landa, por ser um exemplo de competência e por todo aprendizado, conselhos e oportunidades proporcionados.

Aos colegas de laboratório Juliana, Camila, Luciana, Thaís, Luiza, Kátia, Michelle, Grazi, Fernanda, Aline, Ana Luíza e Larissa, pela excelente companhia, colaboração e disponibilidade em ajudar.

À Fernanda, que me ajudou na etapa de finalização da dissertação.

Agradeço aos colegas dos laboratórios de Biologia Molecular (Faculdade de Farmácia) e Imunofarmacologia (Instituto de Ciências Biológicas) pelo acolhimento e companheirismo. Ao pessoal do Laboratório de Vírus (ICB), especialmente ao Leonardo Camilo de Oliveira, pela colaboração e ensinamentos. À Frankinéia Assis e Ilma Marçal pelo apoio técnico.

Ao Prof. Dr. Mauro Martins Teixeira, por ter tornado a execução do projeto possível e por todo o aconselhamento científico.

Aos amigos do CEFET Mari, Guid, Ícaro, Iara, Luísa, Naiá, Kurt, Bia, e Padinha, por sempre estarem presentes, mesmo quando distantes.

Aos professores Vicente Toledo e Carlos Tagliati, que como coordenadores de curso sempre foram prestativos e me auxiliaram em todos os momentos necessários.

Aos professores do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia, pela dedicação e competência no trabalho executado. Especialmente à professora Luci Dusse, Bruno Mota e Adriana Costa, por toda ajuda e crescimento proporcionado.

Aos colegas do Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas, pela na companhia pela busca de um programa melhor.

Ao apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).

“Não é a consciência do homem que lhe determina o ser, mas, ao contrário, o seu ser social que lhe determina a consciência.”

- Karl Marx

## RESUMO

O plasminogênio (Plg) é um zimogênio que é clivado à plasmina (Pla) pelos ativadores do plasminogênio do tipo tissular (tPA) ou uroquinase (uPA). O sistema plasminogênio/plasmina (Plg/Pla) está associado a diversas atividades biológicas além da sua atividade primária, a dissolução dos coágulos de fibrina, incluindo migração celular e inflamação. Neste estudo foi investigada a capacidade do uPA de induzir migração celular *in vitro*, utilizando linhagens de fibroblastos (MEFs) e macrófagos murinos (RAW 264.7), e *in vivo* por meio da injeção de uPA na cavidade pleural de camundongos. Foram também avaliados os papéis da proteína cinase ativada por mitógenos (MAPK) ERK1/2, das proteínas de adesão focal FAK e Paxilina (Pax), da quimiocina CCL2 e seu receptor CCR2 neste processo. A utilização de animais BALB/C neste estudo foi aprovada pelo CEUA/UFMG, protocolo número 19/2011. Monocamadas de MEFs e RAW foram arranhadas e posteriormente tratadas com uPA (1µg/mL) por diferentes tempos ou pré-tratadas com U0126 (inibidor de MEK1/2) ou RS504393 (antagonista de CCR2). As células foram processadas para contagem da migração para a região da ranhura, Western Blot para análise da fosforilação de ERK1/2, FAK e Pax e ELISA para dosagem de CCL2. Camundongos BALB/c receberam injeção intrapleural de uPA (1µg) e as células presentes na cavidade pleural foram coletadas em diferentes tempos e processadas para contagem total e diferencial. O tratamento com uPA induziu migração de MEFs e RAW de forma dependente de MEK/ERK, CCL2/CCR2 e foi associado à fosforilação das cinases de adesão focal FAK e Pax. A injeção intrapleural de uPA em camundongos induziu um influxo de células mononucleares para a cavidade pleural, associado ao aumento da fosforilação de ERK1/2 e FAK e dos níveis de CCL2. O bloqueio de CCR2 impediu a migração leucocitária induzida por uPA. A análise, por citometria de fluxo, dos macrófagos recrutados após injeção de uPA demonstrou uma predominância de macrófagos M2. Em conclusão, uPA induziu a migração de macrófagos *in vitro* e *in vivo* e esses são de perfil M2.

**Palavras chave:** sistema plasminogênio/plasmina, migração celular, MEK/ERK, CCR2/CCL2, polarização macrofágica

## ABSTRACT

Plasminogen (plg) is a zymogen that is cleaved to plasmin (pla) by the tissue-type (tPA) or urokinase-type (uPA) activator. The classical function of the plg/pla system is the dissolution of fibrin clots, but it has also been shown to be important in other biological activities, such as cell recruitment and inflammation. This study investigated the uPA ability to induce cell migration *in vitro*, using fibroblasts (MEFs) and macrophages (RAW 264.7) cell lines, and *in vivo* by injecting uPA in the pleural cavity of mice. It also evaluated the role of the mitogen-activated protein kinase ERK1/2, the focal adhesion proteins FAK and Paxillin (Pax), the chemokine CCL2 and its receptor CCR2 in the process, as well as the profile of recruited cells. MEFs and RAW monolayers were scratched and then treated with uPA (1µg/ml) for different times or pre-treated with U0126 (a MEK1/2 inhibitor) or RS504393 (a CCR2 antagonist). Cells were processed to count the migration to the scratch region, to analyze the phosphorylation of ERK1/2, FAK and Pax by Western Blot and to measure CCL2 levels by ELISA. BALB/C mice received an intrapleural injection of uPA (1µg) and the cells present in the cavity were harvested at different time points and processed for total and differential count. The uPA treatment induced MEF and RAW migration dependent on MEK/ERK, CCL2/CCR2 and associated with the phosphorylation of focal adhesion kinases FAK and Pax. The intrapleural injection of uPA induced a time-dependent influx of mononuclear cells into the mice pleural cavity associated with increased phosphorylation of ERK1/2, IκB-α and FAK and raised CCL2 levels. Importantly, the inhibition of CCR2 abrogated uPA-induced leukocyte influx. Further investigation of the recruited leukocytes by using flow cytometry showed a predominance of macrophages from M2 profile. In conclusion, uPA induces migration of macrophages *in vitro* and *in vivo* and those are from M2 profile.

**Key words:** plasminogen/plasmin system, cell migration, MEK/ERK, CCL2/CCR2, macrophage polarization



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de variância
BAE	Células endoteliais aórticas bovinas
BALB/c	Linhagem de camundongos albinos BALB/c
BSA	<i>Bovine serum albumin</i> –albumina de soro bovino
CCR2	<i>Chemokine (C-C motif) receptor type 2</i> – Receptor de quimiocinas tipo 2
CCL2	<i>Chemokine (C-C motif) ligand 2</i> – Quimiocina ligante tipo 2
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
DAMPs	<i>Damage-associated molecular patterns</i> – padrões moleculares associados ao dano
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's medium</i> - Meio de Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetilsufóxido
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ENO-1	Receptor do tipo enolase 1
FAK	Cinase de adesão focal
g	Gramas
GPI	Cauda de glicosilfosfatidilinositol
GCPR	Receptor acoplado a proteína G
H2B	Histona classe 2B
HSA	Albumina de soro humano
IL-( )	Interleucina-( )
INF	Interferon
i.pl.	Intrapleural
kDa	Kilodalton
KO	<i>Knockout</i> – Camundongo com deleção de genes específicos
LPS	Lipopolissacarídeo
µL	Microlitro
M	Molar

MAMPs	<i>Microorganism associated molecular pattern</i> – padrões moleculares associado a microrganismos
MEF	<i>Murine embryonic fibroblast</i> – Fibroblasto embrionário murino
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mRNA	RNA mensageiro
NaCl	Cloreto de sódio
NaF	Fluoreto de sódio
NaVO <sub>3</sub>	Vanadato de sódio
ng	nanogramas
PAI ( )	Inibidor do ativador de plasminogênio ( )
PAR-1	<i>Protease-activated receptor 1</i> – Receptor ativado por protease tipo 1
Pax	Paxilina
PBS	<i>Phosphate-Buffered Saline</i> – Tampão fosfato salina
Pla	Plasmina
Plg	Plasminogênio
PMN	Polimorfonuclear
RAW	Linhagem de macrófagos murinos
ROS	Espécie reativa de oxigênio
rpm	Rotações por Minuto
RPMI	<i>Meio Roswell Park Memorial Institute</i>
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i> - Dodecil sulfato de sódio
suPAR	Forma solúvel do receptor de uPA
TLR	<i>Toll like receptor</i> – receptor do tipo Toll
TNF- $\alpha$	<i>Tumor Necrosis Factor alpha</i> – fator de necrose tumoral alfa
TNF- $\beta$	<i>Tumor Necrosis Factor beta</i> – fator de necrose tumoral beta
t-PA	Ativador de plasminogênio tipo tecidual
t-PAR	Receptor do ativador de plasminogênio tipo tecidual
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
u-PA	Ativador de plasminogênio tipo uroquinase
u-PAR	Receptor do ativador de plasminogênio tipo uroquinase
WB	Western Blot

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Representação esquemática da adesão e diapedese de neutrófilos.....	19
Figura 2	Série orquestrada de eventos que levam à resolução do processo inflamatório agudo.....	22
Figura 3	Representação da estrutura do plasminogênio .....	24
Figura 4	Mecanismos de ativação e inativação do sistema Plasminogênio/Plasmina	26
Figura 5	Proteólise pericelular.....	28
Figura 6	Ligantes transmembranares de uPAR .....	30
Figura 7	uPAR e ativação de quimiotaxia no processo inflamatório.....	34
Figura 8	Cascata de sinalização da via MAPK/ERK.....	37
Figura 9	Sinais da adesão focal (FAK)-Src que regulam motilidade celular e localização de adesões focais.....	41
Figura 10	Representação esquemática simplificada do papel de uPAR na migração celular e angiogênese.....	42

## SUMÁRIO

1. CONSIDERAÇÕES INICIAIS.....	14
2. INTRODUÇÃO.....	16
3. REVISÃO DA LITERATURA.....	18
3.1 Inflamação e sua resolução .....	18
3.3 Interações entre uPA/uPAR e inflamação .....	31
3.4 A Via de Sinalização das MAPKs.....	36
3.5 As proteínas de adesão focal FAK e paxilina .....	39
4. OBJETIVOS .....	43
4.2 Objetivos específicos .....	43
5. ARTIGO CIENTÍFICO DERIVADO DO PROJETO DE MESTRADO.....	44
ABSTRACT .....	45
INTRODUCTION .....	47
MATERIALS AND METHODS .....	49
Mice and Ethics.....	49
Cell culture, chemicals and antibodies.....	49
Cells treatment .....	49
In vitro wound-healing assay and chemotaxis assay .....	50
Leukocyte migration into the pleural cavity induced by uPA .....	50
Lysate preparation and Western Blot Analysis .....	51
Measurement of cytokines and chemokine.....	51
Flow cytometry for analysis of leukocyte populations and macrophage profiling.....	51
Statistical analysis.....	52
RESULTS.....	53
uPA induced fibroblast (MEF) and macrophage (RAW 264.7) migration in vitro .....	53
uPA-induced migration of MEF and RAW 264.7 was dependent on the MEK/ERK pathway.....	53
uPA increased CCL2 levels and CCR2 blockage impaired uPA-induced migration of RAW264.7.....	55
uPA induced the phosphorylation of FAK and paxillin through the MEK/ERK pathway .....	56
uPA induces leukocyte recruitment in vivo associated with the phosphorylation of ERK, I $\kappa$ B- $\alpha$ , FAK and CCL2/CCR2 axis.....	57
Macrophages recruited to the pleural cavity of mice by uPA are of an anti-inflammatory (M2) profile.....	59
DISCUSSION .....	62
ACKNOWLEDGMENTS .....	66
REFERENCES .....	67

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	72
7. PERPECTIVAS.....	74
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	75
9. ANEXOS.....	83
ANEXO A – Certificado do Comitê de Ética em Experimentação Animal .....	83
ANEXO C - Certificado de apresentação de pôster - 4 <sup>th</sup> European Congress of Inflammation .....	86
ANEXO D - Certificado de premiação na Semana do Conhecimento 2015 da Universidade Federal De Minas Gerais .....	87
ANEXO E - Certificado de apresentação de pôster – Gordon Research Conference in Plasminogen Activation & Extracellular Proteolysis.....	88

## 1. CONSIDERAÇÕES INICIAIS

O objetivo do projeto aqui apresentado foi investigar a participação do ativador do plasminogênio do tipo uroquinase na migração de células inflamatórias. O trabalho foi desenvolvido nos Laboratórios de Sinalização da Inflamação (FAFAR-UFMG) e Imunofarmacologia (ICB-UFMG), sendo parte de uma linha de pesquisa que investiga a relação entre o sistema plasminogênio e eventos inflamatórios.

O zimogênio plasminogênio (plg) é clivado à sua forma ativa plasmina (pla) por seus ativadores do tipo tissular (tPA – do inglês *tissue-type plg activator*) ou uroquinase (uPA – do inglês *urokinase-type plg activator*). Diversos trabalhos apontam diferentes funções para o sistema plg/pla além de sua função primária, a dissolução dos coágulos de fibrina resultantes da cascata de coagulação. Dentre essas funções estão a migração celular e a indução de mediadores inflamatórios (Carmeliet e Collen 1998; Fibbi, Ziche et al. 1988; Kasza e Koj 2002).

Estudos prévios do nosso grupo de pesquisa mostraram uma expressão aumentada de componentes do sistema plg/pla em um contexto inflamatório (De Sousa, Brasil et al. 2005; Sousa, Brasil et al. 2005; Sousa, Silva et al. 2005). Esses achados em conjunto com aqueles já existentes na literatura deram origem a uma linha de pesquisa liderada pela Profa. Lirlândia P. Sousa, orientadora desse trabalho. O autor da dissertação ingressou no laboratório em 2011 como voluntário em iniciação científica e desde então estuda os efeitos de diferentes componentes do sistema pla/plg em células inflamatórias e os mecanismos envolvidos. O primeiro projeto resultou em uma publicação no *Journal of Immunology*, onde foi demonstrado que plg e pla induzem a migração de células mononucleares de forma dependente do receptor ativado por protease-1 (PAR-1), da via MEK/ERK e da sinalização mediada pelo receptor CCR2 (Carmo, Costa et al. 2014).

De forma paralela à execução do projeto principal do mestrado, o autor colaborou na continuação do projeto após publicação do trabalho citado acima. Após observar a indução da migração de macrófagos por plg e pla, o grupo

investigou o perfil das células que migraram para cavidade pleural e realizou ensaios funcionais. O trabalho resultante, intitulado '*Plasmina induz reprogramação macrofágica e contribui para características da resolução da inflamação*' está em fase de submissão em uma Revista internacional. Os resultados encontrados demonstram que plg e pla induzem um fenótipo macrofágico anti-inflamatório e pró-resolutivo, o que é corroborado por marcadores moleculares específicos e da observada indução de apoptose em neutrófilos e aumento da capacidade eferocítica em macrófagos.

O projeto ora apresentado também foi iniciado no período de iniciação científica do autor, sendo que grande parte dos dados obtidos compuseram seu trabalho de conclusão do curso de graduação em biomedicina apresentado em junho de 2015. No mestrado o autor buscou elucidar os mecanismos envolvidos na migração induzida por uPA e o perfil das células recrutadas *in vivo*. Aqui é demonstrado que uPA induz a migração de fibroblastos e macrófagos murinos *in vitro* e macrófagos *in vivo* de forma dependente da via MEK/ERK 1/2, da sinalização mediada por CCL-2/CCR-2 e associado às proteínas de adesão focal FAK e paxilina. Também é demonstrado que os macrófagos recrutados por uPA *in vivo* apresentam perfil anti-inflamatório.

## 2. INTRODUÇÃO

O sistema plasminogênio/plasmina (plg/pla) é composto pelo zimogênio plasminogênio (plg), que é clivado à protease plasmina (pla) por dois diferentes ativadores, o do tipo tissular (tPA) e do tipo uroquinase (uPA). A função primária do sistema está relacionada à dissolução de coágulos de fibrina e é essencial à hemostasia (Plow, Herren et al. 1995; Carmeliet e Collen 1998). Atualmente, a função do sistema plg/pla vai além de sua função primária e diversos trabalhos na literatura demonstram sua participação em diferentes fenômenos fisiológicos e patológicos, incluindo a inflamação (Syrovets e Simmet 2004; Plow, Doeuvre et al. 2012).

O processo inflamatório se inicia com uma agressão tecidual, que induz a produção de mediadores químicos proteicos ou lipídicos, ativação endotelial e culmina com a migração de leucócitos para o local afetado, buscando uma consequente eliminação do agente indutor (Medzhitov 2008; Medzhitov 2010). A inflamação possui diferentes fases caracterizadas por marcadores moleculares, mediadores e populações celulares específicas (Alessandri, Sousa et al. 2013). A fase primária, denominada fase produtiva, é seguida de alterações finamente controladas que induzem a fase de resolução da inflamação (Serhan e Savill 2005). A ocorrência do processo resolutivo é fundamental, considerando que processos inflamatórios prolongados podem se tornar crônicos, causar lesão, perda de função e induzir doenças autoimunes (Nathan e Ding 2010). Neste contexto, é de grande interesse entender os processos e mecanismos envolvidos nas diferentes fases da inflamação.

Em um trabalho previamente publicado pelo nosso grupo de pesquisa foi demonstrado que pla induz a migração celular *in vitro* e *in vivo* de forma dependente da via MEK/ERK, CCL2/CCR2 e do receptor PAR-1 (Carmo et al., 2014). Na literatura, alguns trabalhos sugerem a participação de uPA na migração celular. Por exemplo, camundongos *knockout para* o receptor de uPA (uPAR) apresentaram acúmulo leucocitário tardio e processo resolutivo deficiente em diferentes modelos inflamatórios (Gyetko, Sud et al. 2000; Rijneveld, Levi et al. 2002; Nagai, Okada et al. 2008). Em concordância com esses achados, uPAR é mais expresso durante a ativação e diferenciação de



leucócitos (Nykjaer, Moller et al. 1994; Plesner, Ralfkiaer et al. 1994), sugerindo uma interação com a inflamação e imunidade.

Apesar de a participação de uPA na migração celular ser bem explorada na literatura, os mecanismos envolvidos no processo não são completamente esclarecidos, o que motivou a execução deste projeto. Utilizando uma abordagem direta, avaliou-se neste estudo a migração celular induzida por uPA *in vitro* e *in vivo* e os mecanismos envolvidos. Particularmente, investigou-se a participação da proteína cinase ativada por mitogénos ERK1/2, das proteínas de adesão focal FAK e Paxilina e da citocina CCL2 e seu receptor CCR2 no processo de migração celular. De forma complementar, buscou-se avaliar a população e o fenótipo das células recrutadas por uPA *in vivo*.

### 3. REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 Inflamação e sua resolução

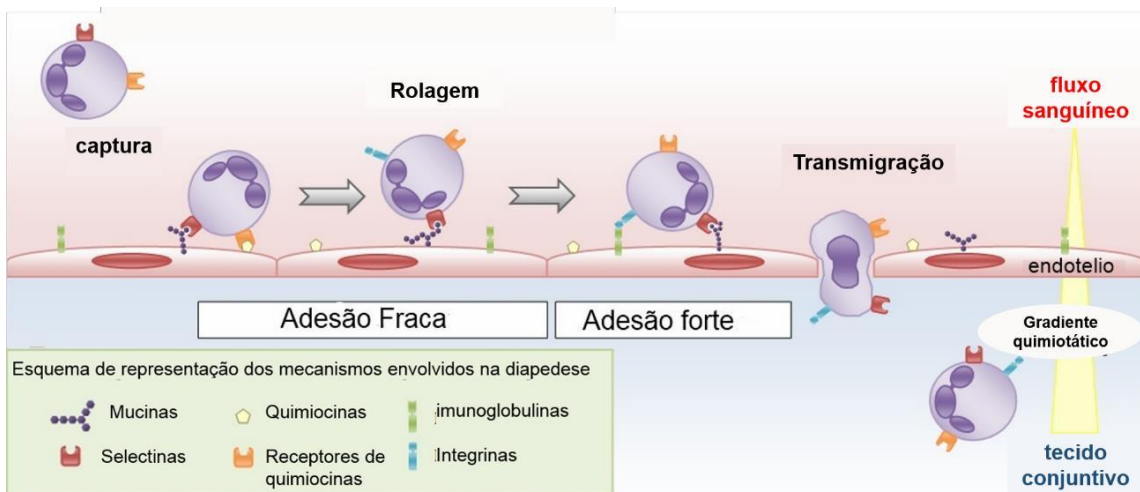
A inflamação é um fenômeno biológico em tecidos vascularizados que ocorre em resposta a agentes infecciosos ou lesões teciduais e em diversos eventos fisiológicos. No século I, Cornelius Celsus descreveu quatro eventos macroscópicos da inflamação, conhecidos como sinais cardinais, sendo eles: calor, rubor, tumor e dor (Majno 1975). O calor e rubor são causados pelo aumento de fluxo sanguíneo local, o tumor é resultado do aumento da permeabilidade da microvasculatura e do extravasamento de proteínas para o interstício e a dor acontece devido a alterações nas terminações nervosas e liberação local de mediadores químicos (Majno e Joris 2004). A perda de função dos órgãos afetados é o quinto sinal cardinal da inflamação e foi descrita por Virchow em 1858. Em 1892 Metchnikoff descobriu o processo de fagocitose e descreveu a teoria da imunidade celular, relatando a importância dos macrófagos e micrófagos (neutrófilos) na defesa do hospedeiro e na homeostasia tecidual (revisado por Medzhitov 2008; Medzhitov 2010).

O estímulo inflamatório pode ser gerado em situações de estresse, lesão celular ou por morte celular não programada por meio de DAMPs (*Damage-associated molecular patterns*), como o ácido úrico. Pode ser também gerado por moléculas presentes nos microrganismos (MAMPs, *Microorganism-associated molecular patterns*), como o LPS presente em bactérias Gram Negativas. Os *Toll Like Receptors* e inflamassomas são exemplos de sensores que detectam o estímulo e disparam cascatas de sinalização intracelulares que induzem a produção de mediadores pró-inflamatórios, que podem ser lipídicos (leucotrienos, prostaglandinas e prostaciclina) ou protéicos (enzimas, moléculas de adesão, proteases, citocinas e quimiocinas). Nos tecidos alvo, afetados pelos mediadores inflamatórios, ocorre infiltração leucocitária, primeiramente de células polimorfonucleares, seguido do recrutamento de monócitos que se diferenciam localmente em macrófagos (revisado por Medzhitov 2008; Medzhitov 2010).

A migração leucocitária depende da produção de fatores quimiotáticos que se

ligam a receptores acoplados à proteína G, ativando vias sinalizadoras que modificam o citoesqueleto. Dentre as principais citocinas/quimiocinas envolvidas no recrutamento de células inflamatórias pode-se destacar a interleucina-1 beta (IL-1 $\beta$ ), interleucina-6 (IL-6), interleucina-8 (IL-8/KC), fator de necrose tumoral (TNF), proteína quimiotática de monócitos (MCP-1/CCL2) e a proteína inflamatória de macrófagos (MIP-2/CCL3) (Rot e von Andrian 2004; Abbas, Lichtman et al. 2012).

O recrutamento de leucócitos ocorre em fenômenos fisiológicos, por exemplo, quando leucócitos circulantes senescentes migram para o baço e são destruídos. Na inflamação ocorre a produção e secreção de moléculas de adesão (como as integrinas) que permitem uma maior interação entre os leucócitos e o endotélio e a transmigração para o sítio inflamatório (Gilroy, Lawrence et al. 2004). As integrinas expressas pelos leucócitos aderem firmemente às moléculas de adesão, presentes na superfície do endotélio. Os leucócitos então rolam sobre o endotélio, cruzam a membrana basal e transmigram para o interstício (Phillipson, Heit et al. 2006). Esse último processo é conhecido como diapedese e está representado na **figura 1**.

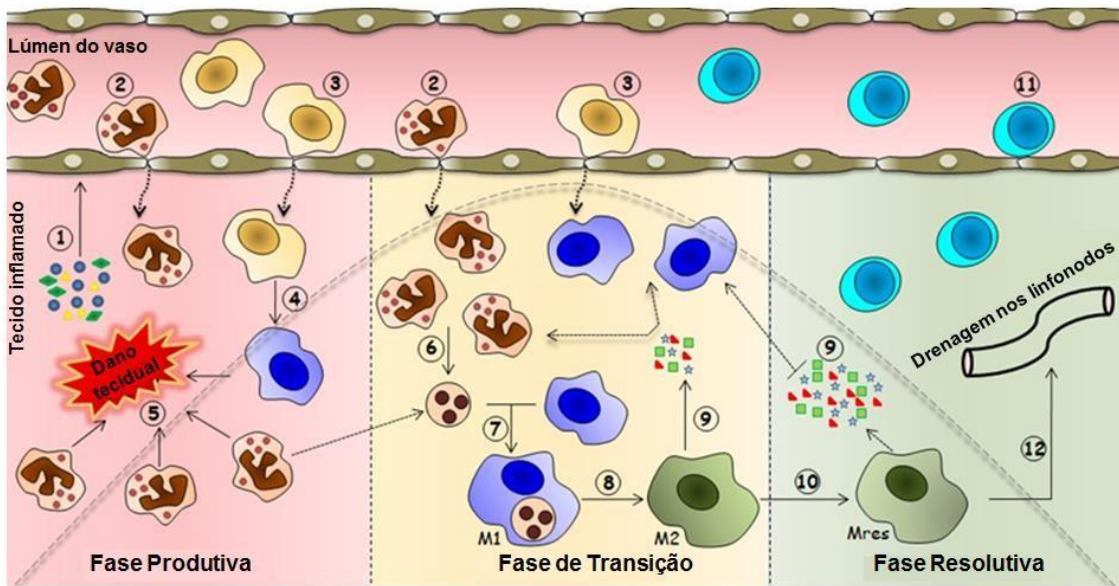


**Figura 1 - Representação esquemática da adesão e diapedese de neutrófilos.** Diante de estímulos inflamatórios, moléculas de adesão são mais expressas em neutrófilos e células endoteliais. Os neutrófilos rolam ao longo da parede endotelial vascular realizando interações fracas mediadas pelas selectinas. A partir daí, ocorre uma adesão firme dos neutrófilos com o endotélio, por meio de moléculas de adesão (ICAM-1 e VCAM) na superfície da célula endotelial e integrinas (Mac-1 e VLA) na superfície do neutrófilo. Por fim, os neutrófilos transmigram através do endotélio por meio de um processo que envolve interações complexas com moléculas juncionais do endotélio, VE-caderina, JAMs e PECAM-1. Adaptado de Yuan et al., 2012.

De modo geral, os eventos macroscópicos e microscópicos do processo inflamatório são decorrentes da liberação de moléculas solúveis, fenômenos angiogênicos e acúmulo de leucócitos. A inflamação é protetora quando auto-limitada. Por outro lado, o acúmulo excessivo de leucócitos e a permanência prolongada destas células no sítio inflamatório pode ser um dos mecanismos desencadeadores da inflamação crônica, fibrose e cicatrização excessiva (Serhan, Clish et al. 2000; Serhan, Hong et al. 2002; Medzhitov 2010; Nathan e Ding 2010; Norling e Serhan 2010; Alessandri, Sousa et al. 2013; Sousa, Alessandri et al. 2013). Quando a lesão tecidual decorrente de um processo inflamatório é leve, as células locais são substituídas por novas células durante o processo de regeneração. Por outro lado, quando o dano tecidual é extenso e duradouro, como ocorre nas inflamações crônicas, as células lesadas são substituídas com concomitante deposição de colágeno e cicatrização, processo que pode levar à perda da função do órgão (Gilroy, Lawrence et al. 2004). Para impedir que tais condições ocorram, o recrutamento de leucócitos é acoplado à liberação de fatores locais que previnem o recrutamento adicional ou excessivo de células, o que permite a resolução do processo inflamatório (Norling e Serhan 2010).

A resolução da inflamação é um processo ativo, contínuo, e finamente regulado, envolvendo a ativação de um programa endógeno que induz a produção e liberação de diferentes mediadores bioquímicos, além de modular vias sinalizadoras, o que garante o retorno da homeostasia tecidual (Sousa, Alessandri et al. 2013). A inflamação aguda é iniciada por um estímulo que induz a liberação de mediadores pró-inflamatórios, que recrutam células efetoras, normalmente PMN, para o sítio afetado. Durante o processo ocorre um balanço entre a produção de mediadores pró- e anti-inflamatórios, além de moléculas pró-resolutivas, o que limita a progressão da inflamação. Após seu acúmulo no local afetado, os neutrófilos neutralizam e eliminam estímulos inflamatórios, culminando na diminuição da síntese e no catabolismo de mediadores pró-inflamatórios. Ocorre também liberação de fatores anti-inflamatórios e pró-resolutivos que previnem a formação de edema e migração de PMN adicionais (Serhan, Brain et al. 2007; Alessandri, Sousa et al. 2013;).

A fase produtiva da inflamação culmina na remoção do agente prejudicial, enquanto a fase de resolução é caracterizada pelo encerramento do recrutamento de neutrófilos, a apoptose dos neutrófilos recrutados e a fagocitose dos corpos apoptóticos por macrófagos (eferocitose). Estes eventos levam à reprogramação de macrófagos de um fenótipo pró-inflamatório para um pró-resolutivo. O recrutamento adicional (não flogístico) de monócitos da corrente sanguínea para sítios inflamatórios é um passo crítico na inflamação aguda, permitindo o *clearance* de neutrófilos apoptóticos e a progressão ordenada do processo resolutivo (Maderna e Godson 2003; Poon, Lucas et al. 2014). Em um ambiente inflamatório, os macrófagos geralmente têm fenótipo pró-inflamatório, conhecido como M1 ou classicamente ativados e caracterizados pela expressão de marcadores moleculares de superfície, tais como (M1: Gr1<sup>+</sup> F4/80<sup>low</sup> Cd11b<sup>med</sup>). Tal fenótipo tem pouca capacidade eferocítica, mas grande capacidade de fagocitar organismos e produzir citocinas, quimiocinas, espécies reativas de oxigênio (ROS) e óxido nítrico (INOs). A avaliação das moléculas de superfície expressas e mediadores produzidos permite a identificação experimental dos diferentes fenótipos macrofágicos. No processo de resolução, macrófagos M1 são enviados para o fenótipo anti-inflamatório (M2: F480<sup>high</sup> Gr1<sup>-</sup> CD11b<sup>high</sup>) ou alternativamente ativados, que é altamente eferocítico e produtor de moléculas anti-inflamatórias, tais como IL-10 e TGF- $\beta$  e mediadores pró-resolutivos, incluindo resolvinas, protectinas e maresinas (Korns, Frasn et al. 2011, Schif-Zuck, Gross et al. 2011). Esses mediadores pró-resolutivos impedem o recrutamento adicional de PMN e promovem o recrutamento não flogístico de monócitos, de modo a amplificar a eficiência do processo de eferocitose. Macrófagos M2 mudam então para o fenótipo resolutivo (Mres: F4/80<sup>med</sup> CD11b<sup>low</sup>), que exibem eferocitose reduzida, mas produzem proteínas antifibróticas e antioxidantes que limitam danos teciduais, sendo drenados pela via linfática no fim do processo resolutivo (Ariel and Serhan 2012, Alessandri, Sousa et al. 2013). A **figura 2** demonstra os eventos que culminam na resolução da resposta inflamatória aguda.

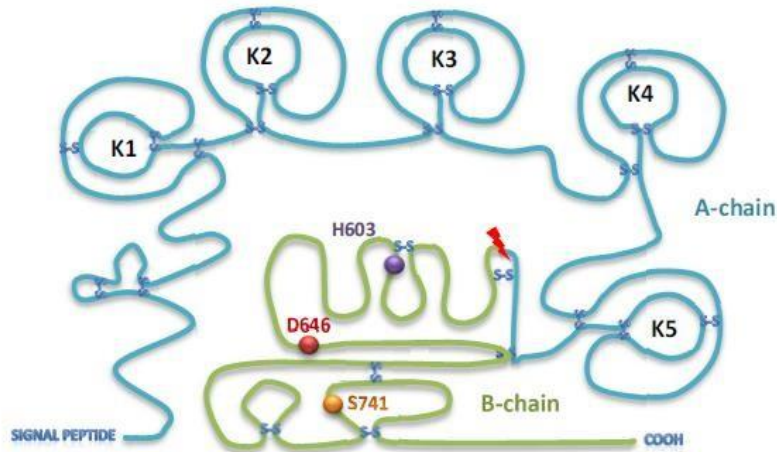


**Figura 2 - Série orquestrada de eventos que levam à resolução do processo inflamatório agudo.** A lesão tecidual estéril ou infecciosa leva ao reconhecimento de padrões moleculares (DAMPs e/ou PAMPs) pelas células residentes, os quais produzem rapidamente vários mediadores pró-inflamatórios. Na fase produtiva da inflamação, esses mediadores levam à ativação endotelial e recrutamento de leucócitos para o local inflamado. Leucócitos polimorfonucleares (PMN) são geralmente as primeiras células a serem recrutadas, seguidas de mononucleares. Essas células exercem, portanto, suas funções efetoras contra o agente responsável pela lesão. Em uma fase de transição, ocorre intensa apoptose de PMNs, seguida por eferocitose por macrófagos, que alteram, conseqüentemente, seu perfil inflamatório (M1) para anti-inflamatório (M2). Esses macrófagos liberam mediadores anti-inflamatórios e resolutivos essenciais para o início do processo de resolução. Nesse processo, macrófagos do tipo M2 tem seu perfil alterado para macrófagos do tipo resolutivo (Mres), que produzem moléculas antioxidantes e antifibróticas que levam, por fim, ao retorno da homeostase tecidual com o mínimo de lesão. Adaptado de Alessandri et al., 2013.

### 3.2 O sistema plasminogênio/plasmina

O sistema plasminogênio/plasmina, também conhecido como sistema fibrinolítico, consiste no zimogênio plasminogênio (plg) que é convertido em sua forma ativa plasmina (pla) por dois mecanismos distintos. O primeiro envolve os ativadores do plasminogênio do tipo tissular (tPA) ou do tipo uroquinase (uPA) (Plow, Herren et al. 1995). O segundo mecanismo envolve o fator doze da coagulação (FXII), calicreína e monofosfato cíclico de adenosina (cAMP) (Kluft, Trumpi-Kalshoven et al. 1979). Durante a hidrólise de ligações peptídicas, ocorre um estado de ligação transitório entre as ligações e a tríade catalítica presente nas enzimas do sistema plg/pla. A tríade catalítica é formada por serina (Ser.), histidina (Hist.) e aspartato (Asp.), e por isso as enzimas do sistema são classificadas como serina proteases (Ramachandran, Noorbakhsh et al. 2012).

O plasminogênio é produzido pelo fígado e está presente no plasma e líquidos extracelulares em concentrações elevadas, chegando até 2,4 $\mu$ M (Booth and Bachman, 2006). A estrutura do plasminogênio pode ser didaticamente dividida em duas partes: a primeira é a região amino-terminal, de cadeia pesada, composta por cinco domínios *Kringle* (domínios autônomos de proteína que se dobram em grandes laços estabilizados por 3 ligações dissulfeto). A segunda é a região carboxi-terminal, de cadeia leve, na qual está localizado o sítio catalítico (inativo no plasminogênio e ativo na plasmina) formado por três aminoácidos: histidina 603, aspartato 646 e serina 741 (**figura 3**). Os ativadores do plg apresentam alta seletividade de ligação e são capazes de promover a hidrólise de uma única ponte peptídica levando à formação da plasmina sem, contudo, desfazer a ponte dissulfeto adjacente. (Henkin, Marcotte et al. 1991; Syrovets, Lunov et al. 2012).



**Figura 3 - Representação da estrutura do plasminogênio.** O local da clivagem para a conversão do plasminogênio em plasmina está indicado com a seta e os aminoácidos do sítio catalítico estão indicados - H603, D646 e S741. Adaptado de Syrovets *et al.*, 2012.

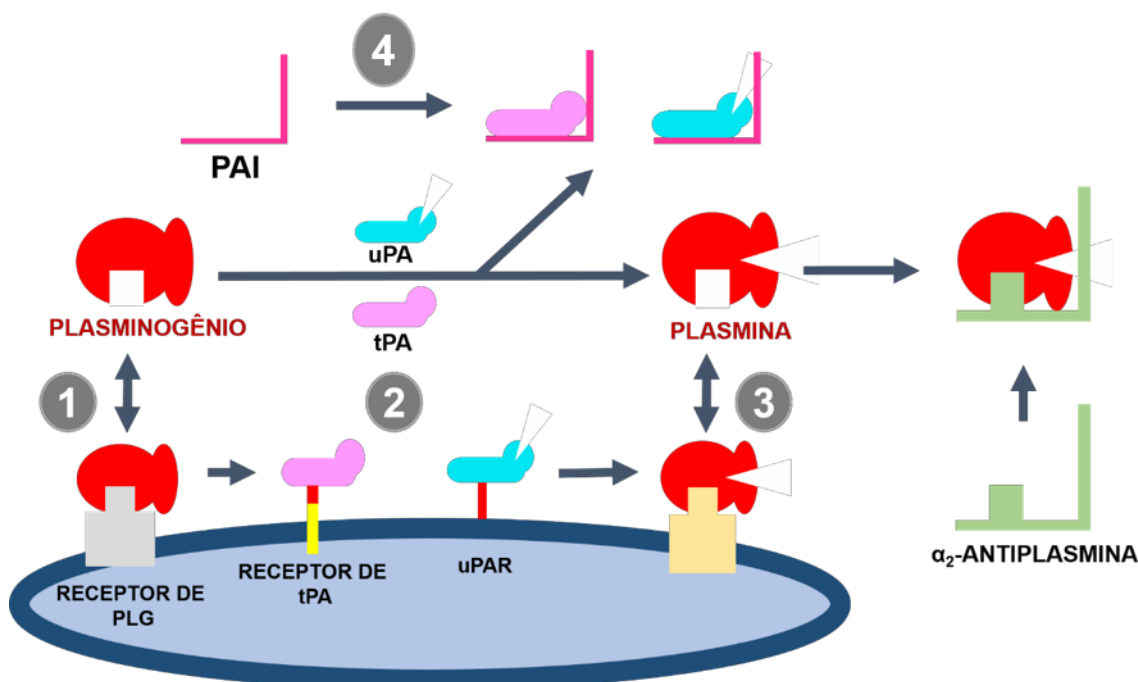
A plasmina é uma serina protease de amplo espectro, que degrada componentes estruturais da matriz extracelular (como colágeno e fibronectina) de forma direta ou indireta (ativando metaloproteinases, como a colagenase e estromelina, por exemplo) e é a principal responsável pela dissolução dos coágulos de fibrina intra e extra-vasculares (Plow, Herren *et al.* 1995; Carmeliet and Collen 1998). A degradação da matriz extracelular é importante na migração e invasão celular em processos tanto fisiológicos (angiogênese, neurogênese e cicatrização de feridas) quanto patológicos (inflamação excessiva e metástase) (Plow, Herren *et al.* 1995; Romer, Bugge *et al.* 1996; Syrovets e Simmet 2004; Castellino and Ploplis 2005; Wygrecka, Marsh *et al.* 2009; Bae, Kim *et al.* 2012; Rosenwald, Koppe *et al.* 2012).

Os receptores de superfície celular  $\alpha$ -enolase e anexina A2 são os receptores de plasminogênio mais representativos. Outros exemplos são a p11, histona H2B, PlgR-kT e gangliosídeos (Miles, Dahlberg *et al.* 1991; Hajjar 1995, Redlitz, Fowler *et al.* 1995; Laumonier, Syrovets *et al.* 2006; Wygrecka, Marsh *et al.* 2009; Das, Pluskota *et al.* 2010, Plow; Doeuvre *et al.* 2012). Os receptores citados são proteínas de superfície celular com resíduos de lisina C-terminal expostos ou gerados após clivagem, já que o sítio de ligação à lisina associada ao domínio *Kringle* do plasminogênio reconhece preferencialmente



lisinas carboxi-terminais. Sítios de ligação (receptores) para os componentes do sistema têm sido identificados em diversos tipos celulares (monócitos, linfócitos, granulócitos, fibroblastos, células endoteliais, etc) e sugere uma atividade do sistema não relacionada à sua função fibrinolítica (Plow, Doeuve et al. 2012; Miles and Parmer 2013).

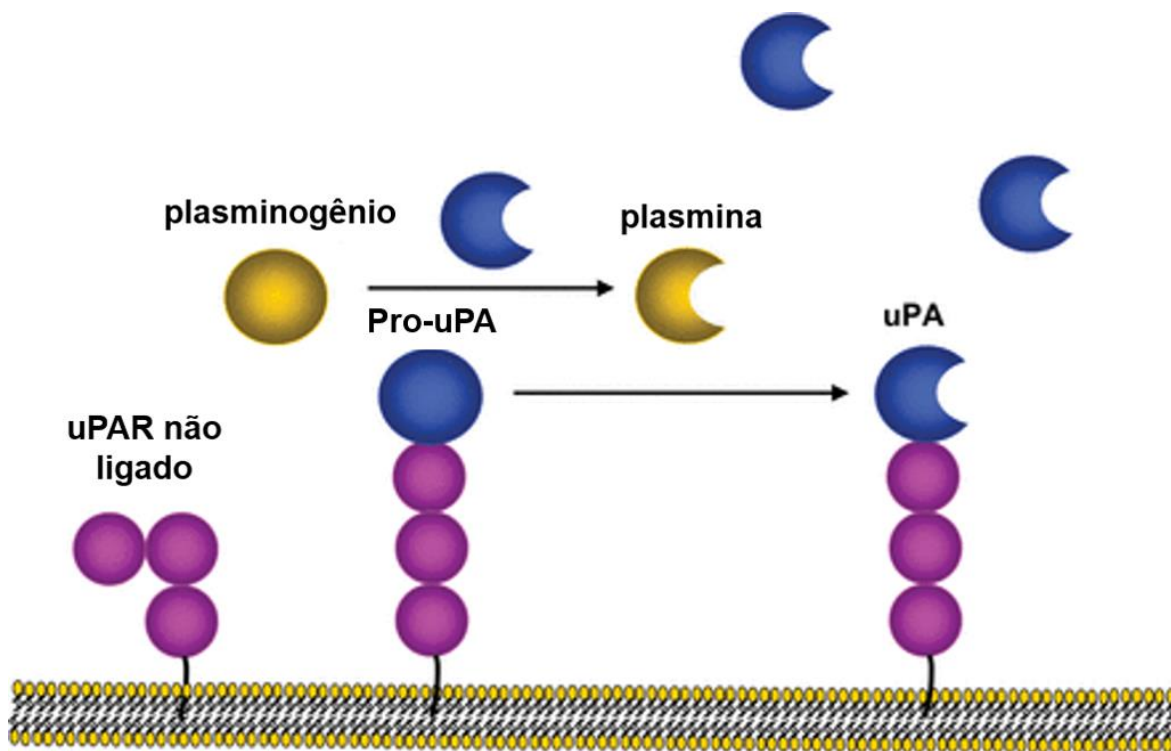
A atividade fibrinolítica do sistema Plg/Pla é finamente regulada pelos inibidores dos ativadores de plasminogênio (PAI-1 e PAI-2) e pela  $\alpha$ 2-antiplasmina. O PAI-1, principal inibidor da ativação de plasminogênio associado à fibrinólise, é sintetizado por células endoteliais e hepatócitos. O mecanismo de inibição ocorre pela ligação a tPA e uPA, dificultando a conversão do plasminogênio à plasmina (Sprengers e Kluft 1987; Margetic 2012). A  $\alpha$ 2-antiplasmina é uma glicoproteína produzida no fígado e está presente no plasma em concentrações em torno de 1 $\mu$ M. Esta exerce sua inibição quando se liga de forma irreversível à plasmina formando complexos e impedindo a ação catalítica, e/ou quando se liga de forma reversível ao plasminogênio dificultando sua adsorção à fibrina (Christensen, Bangert et al. 1996; Caulfield e Lathem 2012). O mecanismo de ação dos inibidores do sistema plg/pla é demonstrado na **figura 4**.



**Figura 4 - Mecanismos de ativação e inativação do sistema Plasminogênio/Plasmina.** A reação 1 descreve o equilíbrio entre o plasminogênio livre e o ligado à superfície celular. A alta afinidade de ligação favorece a ocupação da superfície celular pelo plasminogênio. Na reação 2 o plasminogênio ligado à célula é ativado à plasmina pelos ativadores uPA e tPA que estão ligados aos seus respectivos receptores de superfície celular (uPAR e tPAR). A ativação é consideravelmente mais eficiente quando ocorre a interação ativador-receptor. Na reação 3, a plasmina é exposta ao seu inibidor primário  $\alpha_2$ -antiplasmina, que inativa a plasmina livre mais rapidamente que a ligada. Na reação 4, PAI se liga a t-PA e uPA impedindo a conversão de plasminogênio a plasmina. Adaptado de Plow et al., 1995

O ativador de plasminogênio do tipo tissular (tPA) é liberado na circulação principalmente por células endoteliais e é ativo apenas na presença de fibrina, sendo então associado à função clássica do sistema fibrinolítico. Após se ligar à fibrina formada pela cascata da coagulação, o tPA cliva o plg presente no coágulo e gera pla localmente, que por sua vez degrada os coágulos de fibrina em produtos solúveis, o que é essencial à hemostasia (Gross, Murray et al. 2013). O ativador de plasminogênio do tipo uroquinase (uPA), foco deste estudo, é produzido por células endoteliais, monócitos e macrófagos. O gene uPA, de 6,4 kb, localizado em 10q22.2, é constituído por 11 éxons e 10 íntrons e sequências dentro da região flanqueadora 5' são indicativas de vários mecanismos de controle transcricional (Crippa 2007). Após a tradução, uPA é

secretado como um zimogênio de 52kDa, com uma única cadeia de 411 aminoácidos (pro-uPA ou scuPA, do inglês *single chain-uPA*). Pro-uPA se liga a um receptor ancorado à superfície, uPAR (receptor de uPA), e sofre uma conversão catalítica mediada por plasmina ou outras proteases, se tornando a enzima cataliticamente competente de duas cadeias (**figura 5**) (Andreasen, Kjoller et al. 1997). A serina protease resultante é altamente específica e além da proteólise pericelular, catalisa a conversão adicional do plg circulante em pla, proporcionando um mecanismo para a amplificação do potencial proteolítico pericelular e culminando na degradação de elementos da matriz, ativação de proteases latentes e à indução de fatores de crescimento (TGF- $\beta$ , FGF, VEGF, etc) (revisto por Crippa, 2007). A **figura 5** ilustra a participação de uPA no sistema plg/pla.

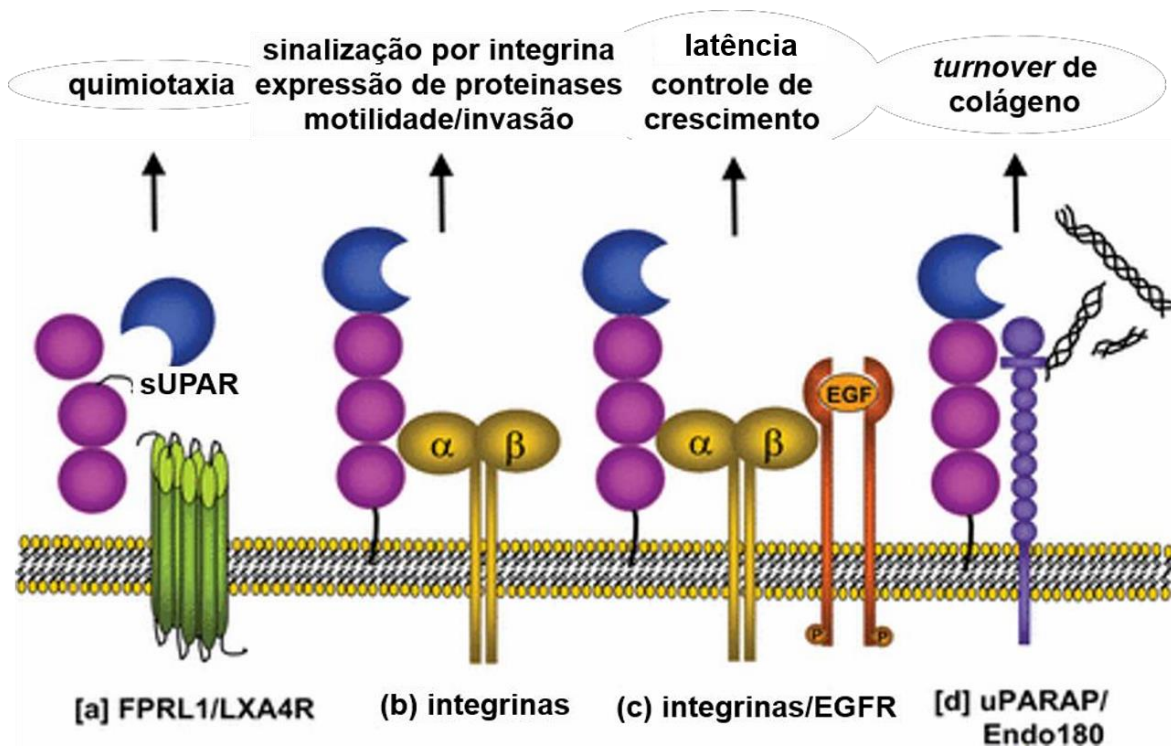


**Figura 5 - Proteólise pericelular.** O uPAR é um receptor ancorado a GPI (glicosilfosfatidilinositol) que se liga à pro-PA inativa bem como à uPA. Pro-uPA é convertido para o uPA de duas cadeias ligadas por dissulfeto pela ação de serina proteases, incluindo plasmina. Por sua vez, uPA converte o plasminogênio circulante na proteinase ativa plasmina, estimulando ainda mais a proteólise pericelular. Embora uPA exiba um grau elevado de especificidade para seu substrato, o plasminogênio é abundante e a plasmina é uma proteinase de largo espectro. Assim, através da secreção de uPA, uma célula pode ativar um grande potencial proteolítico para modificar substratos extracelulares. Adaptado de Shi e Stack, 2007.

O receptor de uPA (uPAR, também conhecido como CD87) foi identificado em 1985 e seu cDNA sequenciado em 1990 (Belin, Vassalli et al. 1985; Roldan, Cubellis et al. 1990). O sequenciamento do cDNA mostrou a ausência de uma sequência transmembranar. Assim, o uPAR é ancorado à membrana celular por uma cauda de glicosilfosfatidilinositol (GPI) que está ligada ao C-terminal, após a remoção de uma sequência sinal. A âncora de GPI confere mobilidade a uPAR ao longo da membrana celular e permite que o receptor se associe a microdomínios especializados na membrana plasmática (Ploug, Behrendt et al. 1991). O uPAR possui outros ligantes além de uPA, como o fator XII da coagulação (FXII), cininogênio de alto peso molecular (HKA), vitronectina e o inibidor dos ativadores de plasminogênio 1 (PAI-1) (Ragno 2006; Kjaergaard,

Hansen et al. 2008). Além do seu papel na formação de plasmina, uPA também induz respostas celulares por meio da ligação ao seu receptor uPAR. O fragmento amino-terminal de uPA interage com uPAR para ativar co-receptores, incluindo o receptor de formil peptídeo-2 (FPR2), EGFR e integrinas, regulando a migração, quimiotaxia e a produção de citocinas (Wei, Eble et al. 2001; de Paulis, Montuori et al. 2004; Bakken, Protack et al. 2009). A ligação de integrinas e proteínas de matriz extracelular (ECM), como fibulina 5 e vitronectina, modula a sinalização mediada por uPA/uPAR. De forma independente de uPAR, o domínio *kringle* de uPA interage com o  $\alpha_v\beta_1$ -integrina para induzir a sinalização intracelular e a migração de células (Schuliga, 2015).

Os receptores de formil peptídeo (FPR, do inglês: *Formil Peptide Receptor*) pertencem a uma classe de receptores acoplados à proteína G e são envolvidos na quimiotaxia de leucócitos (Migeotte, Communi et al. 2006). Três FPRs foram identificados e clonados: FPR1, FPRL1 (do inglês formyl peptide receptor-like 1, também conhecido como FPR2) e FPR3. A ativação FPRs pelo seus ligantes induz a migração de células (Li and Ye 2013). uPA pode clivar uPAR, formando partes solúveis que se desprendem da membrana celular. O receptor solúvel de uPA (suPAR) pode se ligar à FPR1, FPRL1/FPR2 e FPR3, atuando como um potente quimioatraente para células que expressam estes receptores (Resnati, Guttinger et al. 1996; Montuori and Ragno 2009). A proteína associada a uPAR (uPARAP, do inglês *uPAR-associated protein*, também conhecida como Endo180) é um membro da família de proteínas de receptor de manose em macrófagos, e foi demonstrado como ligante de uPAR. A eliminação sistemática de uPARAP/Endo180 destacou uma função-chave para esta proteína na endocitose de colágeno anterior à degradação lisossômica (Behrendt, Jensen et al. 2000; Engelholm, List et al. 2003). A **figura 6** demonstra uPAR em diferentes associações na membrana plasmática e os efeitos relacionados.



**Figura 6 - Ligantes transmembranares de uPAR.** (a) modificação proteolítica de uPAR, resultante da clivagem do receptor catalisada por uPA expõe um pentapeptídeo quimiotático (suPAR) que interage com o receptor de fMLP (FPR1) e funciona como um agonista quimiotático. (b) uPAR funciona como um 'ligante lateral' de integrinas, com ligação em sítios diferentes do local de interação com a matriz. Tal ligação modula a sinalização de MEK/ERK dependente de integrina para regular a expressão de proteinases, motilidade e invasão. (c) Os complexos de uPAR-integrina podem também estar envolvidos na ativação dependentes e independentes do ligante de EGFR, modulando latência tumoral e proliferação. (d) A ligação do colágeno clivado por collagenase a uPARAP/Endo180 participa na endocitose e clearance de colágeno. Adaptado de Shi e Stack, 2007.

### 3.3 Interações entre uPA/uPAR e inflamação

Quando o leucócito migra, em resposta a algum estímulo, diversos eventos ocorrem: o leucócito é recrutado para o local da lesão (quimiotaxia) e seu metabolismo é alterado (ativação). Posteriormente, o leucócito se liga a superfície endotelial (marginalização), esgueira-se através do endotélio (diapedese), reconhece o estímulo inflamatório e liga-se a ele (reconhecimento/ligação) (revisto por Medzhitov 2010). O sistema plasminogênio/plasmina desempenha um papel importante em muitas destas etapas (revisto por Schuliga 2015).

A expressão de genes que codificam fibrinogênio, PAI-1, tPA, uPA e uPAR é regulada por moléculas induzidas durante a resposta inflamatória local ou durante a resposta de fase aguda sistêmica. Moléculas pró-inflamatórias, como IFN, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 possuem diversos efeitos sobre os componentes do sistema plg/pla e promovem um aumento da atividade fibrinolítica nas células em que atuam. Por exemplo, o TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  são capazes de aumentar a expressão e secreção de uPA em células da polpa dentária humana (Kamio, Hashizume et al. 2007; Narita, Muromachi et al. 2012) e a IL-1 $\alpha$  induz a expressão de tPA em queratinócitos murinos (Lian, Yang et al. 2008). Essas moléculas são produzidas no sítio inflamatório em resposta a estímulos como lesão tecidual, formação de trombos nos vasos, deposição excessiva de fibrina no pulmão, etc., visando restabelecer a fisiologia do tecido lesado (Hasegawa, Sorensen et al. 1997; Jenkins, Seiffert et al. 1997; Kasza e Koj 2002; Wang, Zhao et al. 2013). A regulação do plasminogênio por citocinas pró-inflamatórias sugere uma intercomunicação do sistema plg/pla e a inflamação em processos celulares como migração, reparo tissular, remodelagem tecidual e fibrinólise, objetivando o equilíbrio para manutenção da homeostase tecidual (Niedbala e Stein 1991; Twining, Wilson et al. 1999; Bannach, Gutierrez et al. 2002; Kasza e Koj 2002).

Além de receptor de uPA, uPAR pode funcionar como um receptor de outros ligantes, um ligante e também como molécula de sinalização. A compreensão do seu envolvimento nos processos inflamatórios requer uma visão de uPAR em todas as suas potencialidades. Ao migrar, os leucócitos se comportam

como células cancerosas nos processos de extravasamento e invasão de tecidos. Ambos os processos são regulados pela interação de uPAR com outras moléculas específicas de leucócitos, que modulam funções invasivas e adesivas. A quimiotaxia responsável pelo recrutamento leucocitário depende de um funcionamento adequado do sistema uPA/uPAR/integrina  $\beta 2$  que proporciona interações de adesão/degradação entre leucócitos, células endoteliais e a matriz extracelular (revisto por Del Rosso, Margheri et al. 2011). De acordo, Gorrasi e colaboradores propõem que uPAR controla a migração de células através do recrutamento de FPRs e integrinas  $\beta 1$ , promovendo assim a sua co-localização na superfície celular e a ativação de vias de sinalização pró-migratórias (Gorrasi, Li Santi et al. 2014).

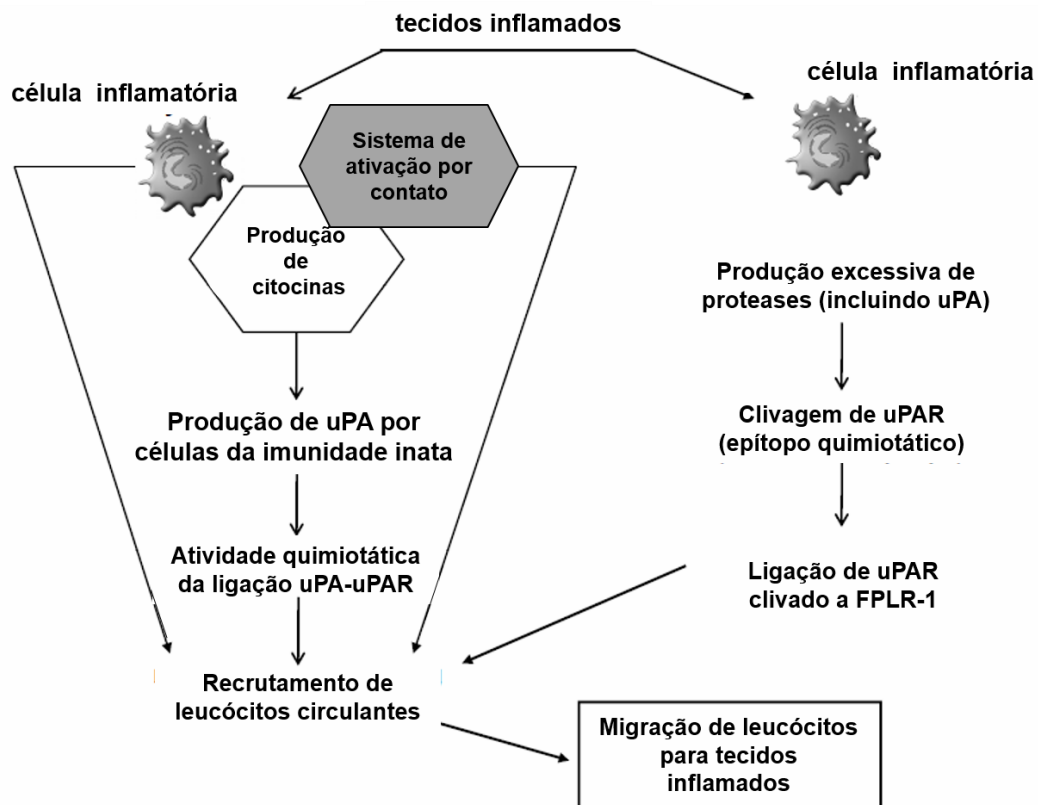
A produção de fatores quimiotáticos pode ser estimulada por componentes do sistema plg/pla. Foi demonstrado que uPA exógeno exerce atividade quimiotática, independentemente de sua atividade catalítica em células endoteliais humanas (Fibbi, Ziche et al. 1988). A atividade quimiotática de uPA foi descrita em vários tipos celulares, incluindo leucócitos, e é alvo de investigação em estudos sobre câncer (Mignatti e Rifkin 2000; Del Rosso, Cinelli et al. 2005).

A produção de uPA é aumentada em doenças inflamatórias e é particularmente bem descrita nas inflamações articulares (Del Rosso, Fibbi et al. 1999; Del Rosso, Cinelli et al. 2005; Galliera, Drago et al. 2015). Diferentes citocinas presentes no fluido sinovial de articulações afetadas pela artrite reumatóide, como os fatores estimuladores de colônia (CSF, do inglês *colony-stimulating factors*) M-CSF, G-CSF, GM-CSF e IL-3 estimulam a síntese de uPA por monócitos e macrófagos. Sob determinados estímulos (como LPS bacteriano) os monócitos produzem GM-CSF e G-CSF, iniciando um ciclo autócrino que conduz à produção aumentada de uPA. Os mesmos estímulos também induzem a secreção de IL-1 e TNF- $\alpha$  pelos monócitos que, por sua vez, induzem a produção de uPA, GM-CSF e G-CSF por sinoviócitos e condrócitos. As células residentes e inflamatórias produzem ao mesmo tempo citocinas e ativadores do plasminogênio em uma cascata de amplificação que resulta no aumento da atividade de uPA nas articulações inflamadas (Leizer, Cebon et al.



1990; Hart, Vitti et al. 1991; Del Rosso, Fibbi et al. 1999; Busso e Hamilton 2002).

O uPA produzido localmente nos tecidos inflamados pode exercer atividade quimiotática sobre os leucócitos circulantes, do mesmo modo que outras quimiocinas, e é considerado um potente fator quimioatrativo para basófilos, agindo através da exposição do epítipo quimiotático de uPAR (uPAR84-95), um ligante endógeno de FPR1, FPR2 e FPR3 (de Paulis, Montuori et al. 2004). Diversos estudos evidenciaram o papel do sistema uPA/uPAR na migração de células *in vivo* e *in vitro*. A migração de leucócitos para o sítio da lesão é diminuída em camundongos uPA<sup>-/-</sup> e uPAR<sup>-/-</sup>, dificultando a defesa do hospedeiro e resultando na propagação de bactérias que podem causar a morte dos animais no modelo de pneumonia bacteriana (Gyetko, Chen et al. 1996; Gyetko, Sud et al. 2000). A quimiotaxia de células inflamatórias estimulada por uPA *in vitro* e *in vivo* requer a ligação ao uPAR e a presença de um adaptador transmembranar capaz de transduzir o estímulo quimiotático. As metaloproteases de matriz, enzimas lisossomais e outras enzimas produzidas nos sítios inflamatórios clivam o uPAR, resultando na produção de fragmentos quimiotáticos que interagem com FPRL1/FPR2. Os fragmentos de uPAR podem se difundir a partir do sítio inflamatório e estimular o recrutamento leucocitário para o local (Resnati, Guttinger et al. 1996; Sillaber, Baghestanian et al. 1997; Rijneveld, Levi et al. 2002). A presença de células que expressam uPAR é fundamental para que o processo inflamatório ocorra. Diversos estudos demonstram que o eixo uPA-uPAR está envolvido na migração de neutrófilos, eosinófilos, monócitos/macrófagos, células endoteliais, fibroblastos, mastócitos/basófilos, linfócitos T, linfócitos B e células NK depende do. A origem de uPA quimiotático em tecidos inflamados (as principais células inflamatórias e o sistema de ativação por contato que envolve a calicreína, FXIa/FXIIa/plasmina) demonstra a estreita relação entre o sistema plg/pla, inflamação e coagulação (revisto por Del Rosso et al. 2011). A **Figura 7** ilustra os eventos envolvidos na migração leucocitária induzida por uPA.



**Figura 7 - uPAR e ativação de quimiotaxia no processo inflamatório.** As principais substâncias endógenas que exercem estímulo quimiotático nos leucócitos são produzidas nos locais de inflamação. As citocinas quimiotáticas e quimiocinas são produzidas por células inflamatórias e pelo sistema de ativação por contato dentro do microambiente inflamatório. As citocinas induzem a produção de uPA por células residentes (células sinoviais nas articulações, por exemplo) e por células do sistema imune inato. A atividade quimiotática de uPA e/ou do seu fragmento amino-terminal (ATF), não contendo o sítio catalítico, estimulam a quimiotaxia e recrutamento de leucócitos que expressam uPAR. Nos sítios inflamatórios há produção de diversas proteases, incluindo uPA, que juntamente com outras proteases (como metaloproteases e catepsinas) clivam o uPAR, expondo seu epítipo quimiotático. O uPAR clivado e solúvel (suPAR) difunde-se a partir do local de produção e liga ao FPR de leucócitos, induzindo assim sua migração para os locais de inflamação. Adaptado de Del Rosso et al., 2011.

Diversos estudos têm investigado a participação do sistema plg/pla na polarização e função macrófaga. Por exemplo, foi demonstrado que plasmina induz um fenótipo M2 em macrófagos cardíacos, o que foi associado com um estado fibrótico no órgão infiltrado (Carlson, Helterline et al. 2016). uPA também induziu um fenótipo M2/fibrótico após a migração de macrófagos para o coração (Meznarich, Malchodi et al. 2013). Em um modelo de distrofia muscular, a polarização de macrófagos do fenótipo M1 para o M2 foi associada

a um aumento na expressão de uPA (Capote, Kramerova et al. 2016). De acordo, uPAR regula a produção de citocinas e controla a polarização em macrófagos intestinais, considerando que a deficiência em uPAR leva ao aumento do fenótipo inflamatório M1 (Genua, D'Alessio et al. 2015). Por outro lado, em um modelo de acidente vascular cerebral, o tPA induziu recrutamento e polarização M1 em células da microglia (Won, Lee et al. 2015). Além disso, num modelo de lesão renal, tPA preveniu a apoptose de macrófagos M1 e promoveu sua sobrevivência, não tendo o mesmo efeito em macrófagos M2 (Lin, Jin et al. 2015). Os achados divergentes sobre os efeitos de uPA e tPA na polarização macrofágica podem ser devido às condições experimentais em cada estudo, ou mesmo mecanismos acionados por diferentes receptores. Dessa forma, outros estudos são necessários para compreender a ação dual dos ativadores do Plg na polarização de macrófagos.

Além da fenotipagem das células tratadas, estudos investigaram os efeitos do sistema plg/pla na função fagocítica de macrófagos. O Plg aumentou a captação de neutrófilos apoptóticos por macrófagos derivados de monócitos humanos *in vitro* (Rosenwald, Koppe et al. 2012). Além disso, a geração de plasmina aumentou a capacidade das células dendríticas fagocitarem micropartículas *in vivo* (Borg, Samson et al. 2015). De modo semelhante, Plg aumentou a fagocitose de timócitos apoptóticos e esferas opsonizadas por imunoglobulinas em uma linhagem celular semelhante a macrófagos (J774A.1) por meio de indução de ativação gênica (Das, Ganapathy et al. 2014). Em um modelo de inflamação intestinal, a deficiência em uPAR diminuiu a capacidade fagocítica dos macrófagos (Genua, D'Alessio et al. 2015). De modo contrário, macrófagos de camundongos uPAR<sup>-/-</sup> demonstraram maior capacidade de eferocitar neutrófilos *in vitro* e *in vivo* nos pulmões quando comparados com camundongos selvagem (Park, Liu et al. 2009).

### 3.4 A Via de Sinalização das MAPKs

A cinase regulada por sinais extracelulares ERK1/2 e as proteínas p38 e JNK são proteínas ativadas por mitógenos (MAPKs), uma família de proteínas sinalizadoras envolvidas na diferenciação celular, resposta ao estresse, apoptose e inflamação (revisado por Junntila, Li et al. 2008; revisado por Arthur e Ley 2013).

No processo de sinalização celular, a cascata de sinalização inicia com a interação entre os ligantes/agonistas e receptores específicos. Esses são ativados por fosforilação, promovendo a ativação de cinases citosólicas, como a ERK1/2. A P-ERK1/2 fosforila diversas proteínas alvo, incluindo enzimas, proteínas estruturais, reguladores de apoptose e fatores de transcrição. A ERK é ativada por duas diferentes MAPK 3-cinases (MAPKKK), membros da família Raf (Raf-1, B-Raf, e A-Raf) ou locus de progressão tumoral-2 (TPL-2), também conhecido como COT e MAP3K8. A Raf e a TPL-2 podem fosforilar e ativar as MAPK 2-cinases (MAPKK), MEK1 e MEK2, cujos únicos substratos conhecidos são a ERK1 e ERK2. A ativação de ERK, subsequente à ligação do receptor de fator de crescimento de tirosina-cinase, e dos receptores de quimiocinas é mediada pela Raf. A ligação de um agonista promove o carregamento de guanosina trifosfato (GTP) para GTPases Ras que, em seguida, recrutam a MAP 3-cinase Raf para a membrana plasmática, onde é ativada por fosforilação, com subsequente ativação de MEK1/2 e ERK1/2. Em seguida, estas proteínas transdutoras de sinal podem fosforilar fatores de transcrição que se translocam para o núcleo, se ligam ao DNA/sequências de ligação e promovem a transcrição de genes alvo pela RNA polimerase II. O fator de transcrição NF- $\kappa$ B é um dos fatores transcricionais ativados por ERK1/2 e está relacionado a respostas celulares resultantes de estímulos como estresse, citocinas, radicais livres, radiação ultravioleta, LDL oxidada, e antígenos bacterianos ou virais. Ao alterar os níveis e atividades de fatores de transcrição, as MAPK regulam a transcrição de genes importantes para o ciclo celular, como mostra a **Figura 8**. (revisado por Junntila, Li et al., 2008; revisado por Arthur e Ley, 2013).



A via das MAPKs é ativada por diversos elementos do sistema plg/pla e contribui para o aumento da proteólise extracelular (D'Alessio e Blasi 2009). Substâncias pró-inflamatórias, como LPS e TNF- $\alpha$  ativam a via ERK 1/2 e aumentam a produção de elementos do sistema, como uPA e metaloproteinases (Niedbala e Stein 1991; Cheng, Chen et al. 2009). Por outro lado, substâncias anti-inflamatórias, como os glicocorticoides, inibem elementos do sistema plg/pla e a proteólise (Pöllänen 1989; Chu, Yang et al. 2008; Kwon, Cho et al. 2011). O plasminogênio e a plasmina ativam a via da MAPK ERK1/2 e estimulam a expressão de *c-fos* e *egr-1*, dois fatores de transcrição envolvidos na indução de genes que codificam proteínas pró-inflamatórias. A ativação da via por plasminogênio leva a expressão de um dos seus receptores,  $\alpha$ -enolase ( $\alpha$ -ENO) (De Sousa, Brasil et al. 2005a; Sousa, Brasil et al. 2005b; Sousa, Silva et al. 2005; Junttila, Li et al. 2008).

A ligação entre uPA e uPAR pode desencadear a ativação de diversas vias de sinalização intracelulares incluindo as cascatas da PI3-cinase/AKT, p38MAPK e ERK1/2 (revisto por Smith e Marshall 2010). O bloqueio da interação uPA-uPAR em células epiteliais bronquiais humanas alterou a sinalização de ERK1/2, Akt e p38, atenuando assim a reparação em um modelo experimental de ferida (Stewart, Nijmeh et al. 2012). A produção de metaloproteinase de matriz 9 (MMP9) é induzida por uPA em monócitos THP-1 e é completamente inibida pelo inibidor de ERK1/2 PD98059. O inibidor de p38, SB202190, não aboliu a expressão de MMP9 induzida por uPA, demonstrando uma participação específica da via ERK 1/2 (Menshikov, Torosyan et al. 2006). O uPAR e as proteínas de choque térmico HSP70 e MRJ foram relacionados com crescimento tumoral e metástase, devido a um aumento da fosforilação de ERK 1/2 e FAK (Lin, Peng et al. 2014).

### 3.5 As proteínas de adesão focal FAK e paxilina

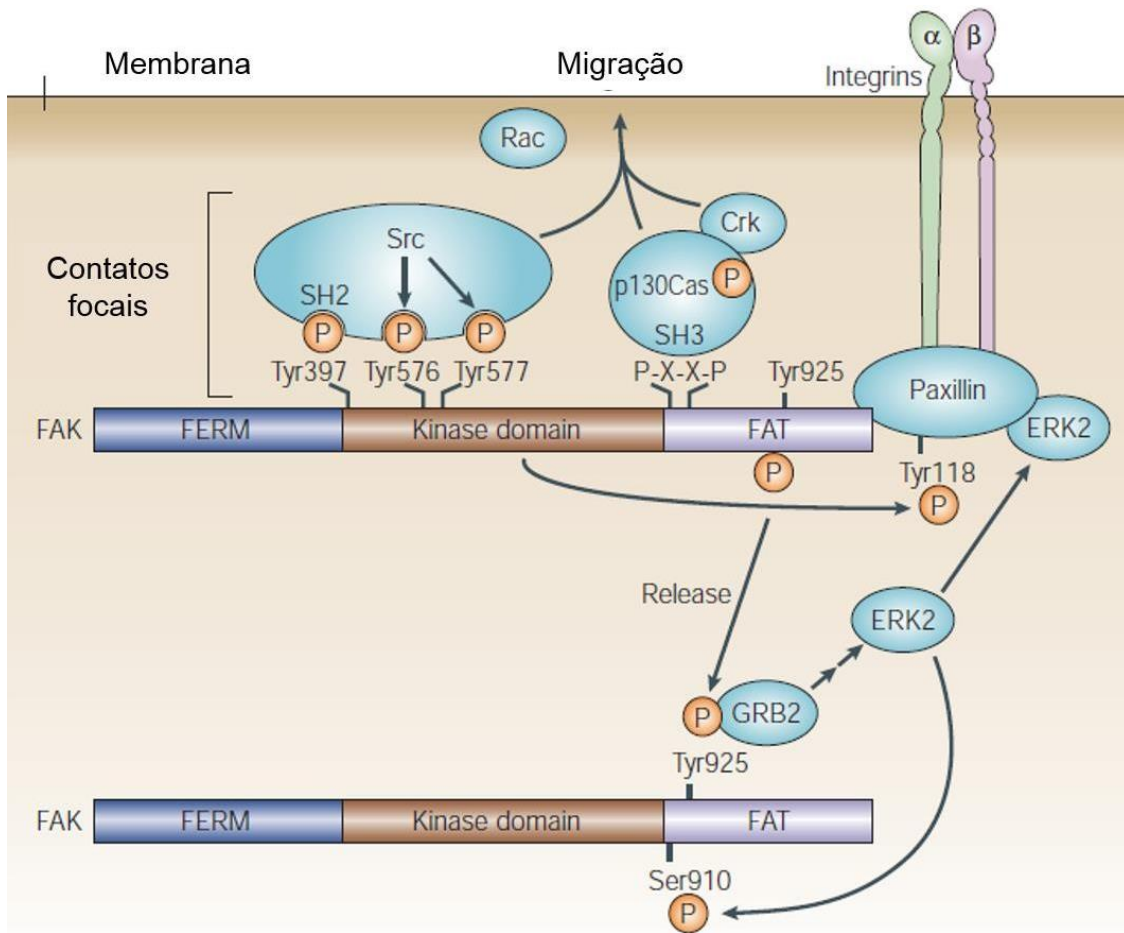
A migração celular desempenha um papel essencial em processos inflamatórios. Constitui um processo finamente regulado e dinâmico que envolve várias alterações na célula em migração, como formação de protrusões, montagem e *turnover* de adesões focais, geração de forças tracionais e cauda de retração e descolamento (Erickson 1990; Stoker e Gherardi 1991). Os receptores de adesão celular da família das integrinas são receptores de matriz extracelular e participam de todas as etapas descritas. O domínio citoplasmático das integrinas é pequeno e sua regulação da migração celular se dá por meio de ligações a várias moléculas localizadas no citoesqueleto e proteínas de adesão focal (Hynes 2002; Ridley, Schwartz et al. 2003).

Adesões focais são estruturas subcelulares que medeiam os efeitos reguladores (como os eventos de sinalização) de uma célula em resposta à matriz extracelular. Além disso, são estruturas altamente dinâmicas que crescem ou encolhem devido aos desdobramentos (*turnover*) das suas proteínas componentes (Chen, Alonso et al. 2003). A cinase de adesão focal (FAK) é uma tirosina cinase sendo uma das primeiras proteínas de adesão focal a serem identificadas e relacionadas com a migração celular. A FAK foi precocemente relacionada ao crescimento independente de ancoragem de células cancerosas e, desde então, foi estabelecido o seu papel como mediador central na sinalização por integrinas e outros componentes das vias de sinalização de outros receptores de superfície (revisito por Zhao e Guan 2011). Camundongos deficientes em FAK apresentam mobilidade celular diminuída e o número de contatos de adesão focal aumentado, prolongando sua interação com as proteínas da ECM e menos *turnover*. Uma interação mais prolongada com a ECM leva a uma menor migração celular. Tais observações indicam que a FAK pode contribuir para o *turnover* de contatos de adesão focal durante a migração celular (Ilic, Furuta et al. 1995).

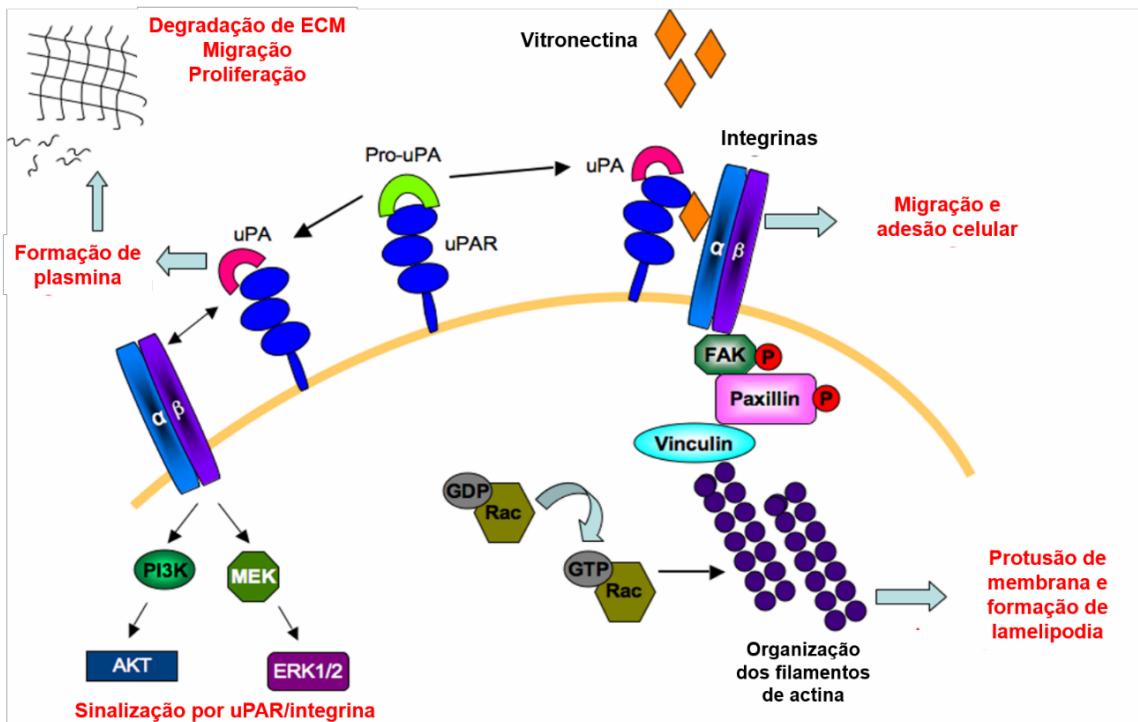
Várias vias sinalizadoras subsequentes à FAK têm sido implicadas na mediação da migração celular. Uma via particularmente bem caracterizada acontece por meio da associação e fosforilação de p130Cas pelo complexo

FAK/Src. A tirosina fosforilada p130Cas se associa às várias proteínas contendo SH2, incluindo Crk. A formação do complexo Cas/Crk desempenha um papel fundamental para regular o dobramento de membrana e migração celular. A paxilina é uma proteína 'andaime' adaptadora e um componente de complexos de adesão focais, mediando sua montagem e *turnover* e regulando assim a motilidade celular (Mitra, Hanson et al. 2005). São dispersos por toda a estrutura da paxilina locais de fosforilação de serina, tirosina e treonina, sendo também um substrato importante do complexo cinase FAK/Src e sua fosforilação em resíduos de tirosina Y31 e Y118 pode funcionar para recrutar Crk de um modo semelhante a Cas (revisto por Zhao e Guan 2011). As adesões nascentes podem maturar e se tornar complexos focais, que estão localizados principalmente na base do lamelipódio. Complexos focais são associados a F-actina e facilitam o efeito da propulsão do lamelipódio. Alguns complexos focais então evoluem para a maior forma de contato focal, a adesão focal. Adesões focais se associam aos feixes terminais de F-actina ou fibras de stress, que fornecem força contrátil às células (Shan, Yu et al. 2009). Hu e colaboradores demonstraram por meio de microscopia confocal que enquanto ambos FAK e paxilina desempenham um papel importante na modulação dinâmica das adesões focais, a montagem FAK na adesão focal leva ao acúmulo de paxilina na frente de migração celular (Hu, Lu et al. 2014). Experimentos *in vitro* utilizando células corneais humanas em modelo de cicatrização de ferida demonstraram que ERK induziu migração celular modulando a fosforilação de FAK e paxilina e levando a dinâmica de adesões focais. Experimentos de imunoprecipitação demonstraram uma co-localização entre as três proteínas e o autor sugere que o eixo ERK/FAK/pax pode também ser importante na migração de células corneais *in vivo* (Teranishi, Kimura et al. 2009). A **figura 9** representa a sinalização mediada por FAK na migração celular e formação de adesões focais, descrevendo a participação da MAPK ERK2. A **figura 10** mostra uma representação simplificada do papel de uPAR na migração celular e angiogênese e ilustra a participação de ERK 1/2 e FAK.





**Figura 9 - Sinais da adesão focal (FAK)-Src que regulam motilidade celular e localização de adesões focais.** O agrupamento de integrinas (ou outros sinais, como a cascata das MAPKKK) promove a fosforilação de FAK em Tyr397, o que cria um local de ligação para a o domínio SH2 de Src. A fosforilação de FAK em Tyr576 e Tyr577 promove a atividade catalítica máxima de FAK. FAK-Src ativos facilitam a ligação de p130Cas a FAK mediada por SH3 e a sua fosforilação subsequente. A ligação de Crk à p130Cas fosforilada facilita a ativação Rac, a formação lamellipodia e migração celular. A ligação de paxilina ao domínio de adesão ao alvo focal é importante para a localização de FAK no contato focal. A fosforilação de FAK em Tyr925 mediada por Src cria um local de ligação de SH2 para a proteína adaptadora GRB2 (do inglês *growth-factor-receptor-bound protein 2*), o que leva à ativação de Ras e da cascata de sinalização ERK-2. Os locais de ligação para GRB2 e paxilina se sobrepõe na adesão focal e FAK fosforilada em Tyr925 pode ser seletivamente liberada a partir dos contatos focais. A ativação de ERK2 promove a fosforilação da FAK na Ser910, que também está associada com a diminuição da ligação de paxilina a FAK. Dentro de contatos focais, a fosforilação de paxilina em Tyr118 mediada por FAK-Src promove a ligação de ERK2. A fosforilação de paxilina mediada por ERK-2 pode facilitar sua ligação à FAK e aumentar a ativação de FAK. Assim, pode haver um ciclo em que a fosforilação de FAK mediada por Src- e ERK2 promove a sua liberação de contatos focais e fosforilação de paxilina mediada por ERK2 promove a associação de FAK não-fosforilada com paxilina em novos locais de contato focal. Adaptado de Mitra et al., 2005.



**Figura 10 - Representação esquemática simplificada do papel de uPAR na migração celular e angiogênese.** A interação entre uPAR/Pro-uPA leva à geração de uPA ativa na superfície da célula. Este complexo liga-se à vitronectina na matriz extracelular, permitindo a interação com  $\alpha/\beta$  integrinas, componentes transmembranares. Além disso, induz uma cascata de eventos que resultam na ativação por fosforilação da cinase de adesão focal (FAK) e paxilina. Por meio do recrutamento de outras moléculas adaptadoras, como Src e o complexo p130Cas-CRK (não mostrado), Rac é ativado. Uma vez ativado, esse induz a formação de um conjunto de filamentos de actina, formando protusões na membrana e levando à motilidade celular. A formação de complexos de adesão focal permite que a adesão celular e migração ocorram. O complexo uPA/uPAR também gera a plasmina que degrada a matriz extracelular (ECM) e, em condições favoráveis, leva à migração e proliferação celular. A ligação entre uPA/uPAR e as integrinas transmembranares  $\alpha/\beta$  também ativa a via das MAPKs MEK e ERK1/2, assim como a via de sinalização da fosfatidilinositol 3-cinase (PI3K)/Akt. Deste modo, vários eventos de sinalização dependentes de uPAR regulam a adesão celular, proliferação e migração, todos processos associados à angiogênese. Adaptado de Balsara et al., 2011.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo geral

Avaliar o papel do ativador de plasminogênio do tipo uroquinase (uPA) na migração de células inflamatórias.

### 4.2 Objetivos específicos

- Avaliar a capacidade do uPA de induzir migração celular *in vitro* em culturas de fibroblastos embrionários (MEF) e macrófagos murinos (RAW 264.7).
- Investigar o envolvimento da via MEK/ERK na migração celular *in vitro* de MEF e RAW 264.7 induzida por uPA.
- Investigar o envolvimento das proteínas de adesão focal FAK e paxilina na migração *in vitro* de RAW 264.7 induzida por uPA e a participação da via MEK/ERK no processo.
- Determinar os níveis da quimiocina CCL2 em sobrenadante de cultura de células RAW 264.7 tratadas com uPA.
- Investigar o envolvimento do receptor CCR2 na migração de RAW 264.7 *in vitro* induzida por uPA.
- Avaliar a habilidade do uPA de induzir migração/recrutamento de leucócitos *in vivo*.
- Avaliar a importância do receptor CCR2 na migração induzida por uPA *in vivo*.
- Caracterizar o perfil das células recrutadas por uPA *in vivo*.
- Caracterizar o perfil fenotípico dos macrófagos (M1, M2 e/ou Mresolutivo) recrutados após injeção intrapleural de uPA.

## 5. ARTIGO CIENTÍFICO DERIVADO DO PROJETO DE MESTRADO

Segundo a resolução 01/2014, referente à alteração na formatação da dissertação/tese no Programa de Pós Graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas, a dissertação de mestrado pode ser entregue em uma versão alternativa, acompanhada de manuscrito a ser submetido à revista indexada.

O artigo apresentado a seguir será submetido para publicação na revista *Journal of Immunology* e é intitulado “*Urokinase- type plasminogen activator induces monocyte migration mediated by MEK/ERK, CCL2/CCR2 and associated with the focal adhesion proteins FAK and paxillin*”.

Aqui as figuras e respectivas legendas são apresentadas logo após serem mencionadas na sessão de resultados, de modo a facilitar a leitura do texto.

As normas para formatação e submissão do manuscrito estão disponíveis em <http://www.jimmunol.org/site/misc/authorinstructions.xhtml> e estão detalhadas nas sessões de anexos.

**Urokinase-type plasminogen activator induces monocyte migration mediated by MEK/ERK, CCL2/CCR2 and associated with the focal adhesion proteins FAK and paxillin**

Bruno R. C. Costa<sup>\*†</sup>; Juliana P. Vago<sup>\*†</sup>; Leonardo C. Oliveira<sup>‡</sup>; Luciana P. Tavares<sup>‡</sup>; Aline A. F. Carmo<sup>\*†</sup>; Katia M. Lima<sup>\*†</sup>; Bruno S. A. F. Brasil<sup>‡</sup>; Lucíola S. Barcelos<sup>‡</sup>; Cláudio A. Bonjardim<sup>‡</sup>; Mauro M. Teixeira<sup>†</sup>; Lirlândia P. Sousa<sup>\*†</sup>

\*Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas - Faculdade de Farmácia,  
†Imunofarmacologia- Departamento de Bioquímica e Imunologia, ‡Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, 31270-901 - Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.

Corresponding author: Lirlândia P. Sousa - Av. Antônio Carlos, 6627 - Pampulha, 31270-901 - Belo Horizonte, MG, Brazil. Phone: +55 31 3409 6883. FAX: +55 31 3409 2651. email: [lipsousa72@gmail.com](mailto:lipsousa72@gmail.com)

**ABSTRACT**

Plasminogen (plg) is a zymogen that is cleaved to plasmin (pla) by the tissue-type (tPA) or urokinase-type (uPA) activator. The classical function of the plg/pla system is the dissolution of fibrin clots, but it has also been shown to be important in other biological activities, such as cell recruitment and inflammation. This study investigated the uPA ability to induce cell migration *in vitro*, using fibroblasts (MEFs) and macrophages (RAW 264.7) cell lines, and *in vivo* by injecting uPA in the pleural cavity of mice. It also evaluated the role of the mitogen-activated protein kinase ERK1/2, the focal adhesion proteins FAK and Paxillin (Pax), the chemokine CCL2 and its receptor CCR2 in the process, as well as the profile of recruited cells. MEFs and RAW monolayers were scratched and then treated with uPA (1µg/ml) for different times or pre-treated with U0126 (a MEK1/2 inhibitor) or RS504393 (a CCR2 antagonist). Cells were processed to count the migration to the scratch region, to analyze the phosphorylation of ERK1/2, FAK and Pax by Western Blot and to measure CCL2 levels by ELISA. BALB/C mice received an intrapleural injection of uPA (1µg) and the cells present in

the cavity were harvested at different time points and processed for total and differential count. The uPA treatment induced MEF and RAW migration dependent on MEK/ERK, CCL2/CCR2 and associated with the phosphorylation of focal adhesion kinases FAK and Pax. The intrapleural injection of uPA induced a time-dependent influx of mononuclear cells into the mice pleural cavity associated with increased phosphorylation of ERK1/2, I $\kappa$ B- $\alpha$  and FAK and raised CCL2 levels. Importantly, the inhibition of CCR2 abrogated uPA-induced leukocyte influx. Further investigation of the recruited leukocytes by using flow cytometry showed a predominance of macrophages from M2 profile. In conclusion, uPA induces migration of macrophages *in vitro* and *in vivo* e those are from M2 profile.

**Key words:** plasminogen/plasmin system, cell migration, macrophages, MEK/ERK, CCL2/CCR2

## INTRODUCTION

The fibrinolytic activity of the plasminogen system is essential for homeostasis. The tissue (tPA) or urokinase type (uPA) plasminogen activators cleave the zymogen plasminogen (plg) into plasmin (pla), an extracellular protease. The primary function of the Plg/Pla system is the dissolution of fibrin clots and extracellular matrix degradation, this latter event is related to cell migration (1, 2). However, the identification of receptors for components of the system in several cell types (3) suggests other functions that are not dependent on its fibrinolytic activity (4). The uPA receptor (uPAR), for example, is more expressed during leukocyte differentiation and activation (5, 6). Accordingly, uPAR expression can be induced in fibroblasts and monocytic cell lines by growth factors and cytokines (7) (8), suggesting a participation of this receptor in immunity and inflammation.

The migration of leukocytes requires the production of chemoattractants, such as chemokines and lipid mediators. During migration, the leukocytes adhere to molecules exposed on the endothelial surface, roll in the endothelium and then migrate to the inflammatory site (9, 10). uPAR knockout mice showed impaired leukocyte migration in different inflammatory models, such as bacterial pneumonia (11, 12) and cerebral ischemia (13). The participation of uPA in cell migration, particularly in tumor cells, is well described (14), but the underlying mechanism remain to be fully understood.

The MEK/ERK (where ERK is extracellular-signal-regulated kinase and MEK is mitogen-activated protein kinase/ERK kinase) pathway is a signaling cascade involved in cell differentiation, stress response, apoptosis and inflammation (15, 16). The binding of uPA to uPAR can trigger the activation of several intracellular signaling pathways cascades including the MEK/ERK pathway (17). The activation of ERK by uPA has been shown to be important in wound repair (18), metalloproteinase production (19), tumor growth and metastasis (20). One of the downstream targets of ERK 1/2 is the focal adhesion kinase (FAK), which activates paxillin and control cell migration (21). uPAR–integrin binding has been shown to initiate or potentiate integrin signaling through FAK or Src kinases, downstream to activate MEK/ERK pathway (22, 23). The inhibition of FAK and Src blocks fibronectin fibrillogenesis, proliferation and the cell migration induced by uPAR– $\beta$ 1 integrin signaling, suggesting an important role of these proteins in the effects of uPA stimulation (22-25).

Inflammation is fundamental in physiological and pathological processes and is characterized by different phases, such as productive, transition and resolutive phase, each one characterized by different mediators and cell populations (26). After the accumulation of leukocytes of the productive phase of inflammation, its apoptosis and clearance are regulated by active mechanisms that occur during the resolution process (27). Such process is essential, considering that protracted inflammation can become harmful and induce chronic and autoimmune diseases (28). Considering this, allowing efficient leukocyte recruitment with minimum damage to the tissue and organ function remains a challenge in the control of inflammatory processes.

In this study, we aimed to evaluate the ability of uPA to induce cell migration *in vitro* and *in vivo* and the underlying mechanisms. Particularly, we investigated the participation of the MEK/ERK 1/2 pathway, the focal adhesion proteins FAK and paxillin, the chemokine CCL2 and its receptor CCR2 in the cell migration induced by uPA. We also characterized the profile of leukocytes recruited by uPA *in vivo*.



## **MATERIALS AND METHODS**

### ***Mice and Ethics***

All procedures described here had prior approval from the Animal Ethics Committee of Universidade Federal de Minas Gerais (CETEA/UFMG, *Protocol number: 19/2011*). Male BALB/c mice (8-10 weeks) obtained from the Bioscience Unit of *Instituto de Ciências Biológicas* were housed under standard conditions and had free access to commercial chow and water.

### ***Cell culture, chemicals and antibodies***

Mouse embryonic fibroblasts (MEFs) and mouse leukemia monocyte macrophage (RAW 264.7) cell lines were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% (v/v) heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) and antibiotics in 5% CO<sub>2</sub> at 37°C. After reaching 70-80% of confluence, cells were serum-starved in DMEM supplemented with 1% FBS for 24 h.

Rabbit anti-P-ERK1/2, anti-P- Fak and anti-P-Pax, and mouse anti-P-IκB-α and the MEK/ERK inhibitor U0126 were from Cell Signaling Technology (Beverly MA, USA). Mouse anti β-actin antibody, human plasmin (Pla), human uPA and leupeptin were from Sigma-Chemicals (St. Louis MO, USA). CCR2 antagonist RS504393 was from Tocris Bioscience (Ellisville, MO, USA). Selumetinib was from Selleck Chemicals (Houston, TX). Secondary anti-rabbit and anti-mouse peroxidase conjugate antibodies were from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, EUA).

### ***Cells treatment***

After starvation, cells ( $1 \times 10^6$ ) were incubated with uPA for 5, 10 or 20 hours. When indicated, cells were pre-incubated for 60 min with the following concentration of inhibitor prior to and throughout uPA treatment: U0126 - 15μM (MEK/ERK), Selumetinb - 15μM (MEK/ERK), Leupeptin - 25μg/ml (serine protease) and RS504393 - 10μm- (CCR2 antagonist) as previously performed (29).

### ***In vitro wound-healing assay and chemotaxis assay***

For the cell migration assay,  $5 \times 10^5$  MEFs or  $1 \times 10^6$  RAW 264.7 were seeded into 6-well plates and grown in DMEM containing 10% FBS to a nearly confluent cell monolayer. The cells were serum-starved in DMEM containing 1% FBS for 24h. The monolayers were carefully scratched using a 200  $\mu$ L pipette tip. Cellular debris were removed by washing with PBS, and then the cells were incubated with uPA 1 $\mu$ g/ml for 10 hours or were pre-treated with the MEK/ERK inhibitor U0126 (10  $\mu$ M) 30 min before the scratch. After treatment, cells were fixed in formaldehyde 10% solution for 10 min and washed three times with PBS. The cells that migrated into the scratch were observed and counted by using an Olympus IX70 microscope (200X magnification).

Cell migration induced by uPA was also analyzed by chemotaxis in triplicate using tissue culture-treated 24-well Transwell plates (Corning Incorporated, Corning, NY) with polycarbonate membranes of pore size of 5.0 $\mu$ m. RAW 264.7 were suspended in DMEM 0% FBS at a concentration of  $5 \times 10^6$  cells/ml, and 100 $\mu$ L was added to the upper compartment of each well. Chemoattractants or medium were added to the lower compartments, and cells were allowed to migrate at 37 °C for 4 hours. Polycarbonate membranes were fixed and stained with hematoxylin (Accustain; Sigma). CCL2 (50ng/mL) was used as a standard chemoattractant. In some groups cells were pre-incubated with the CCR2 antagonist RS504393 (10  $\mu$ M) or uPA was pre-incubated with the protease inhibitor leupeptin (25 $\mu$ g/ml) 60 min before the experiment. Cell counts were performed at 40X magnification.

### ***Leukocyte migration into the pleural cavity induced by uPA***

Mice received an intrapleural (i.pl.) administration of uPA (1 $\mu$ g/cavity) or PBS, as described (30, 31). Some groups received a pre-treatment with the CCR2 antagonist (RS504393 2mg/kg, i.pl.) 1 hour before uPA. Cells in the pleural cavity were harvested at different times after uPA injection or 48h after uPA + RS504393 by washing the cavity with 2ml of PBS. Total cell counts were performed in a modified Neubauer chamber using Turk's stain. Differential cell counts were performed on cyto-centrifuge preparations (Shandon III) stained with May-Grünwald-Giemsa using standard morphological criteria to identify cell types. The results are presented as the number of cells per cavity.

### ***Lysate preparation and Western Blot Analysis***

Cell lines (MEFs and RAW) and inflammatory cells harvested from the pleural cavity were washed with PBS and whole cell extracts were prepared as described (31). Protein amounts were quantified with the Bradford assay reagent from Bio-Rad (Bio-Rad, USA). Extracts (40µg) were separated by electrophoresis on a denaturing 10% polyacrylamide-SDS gel and electrotransferred to nitrocellulose membranes, as described (30, 33). Membranes were blocked overnight at 4<sup>o</sup>C with PBS containing 5% (w/v) nonfat dry milk and 0.1% Tween-20, washed three times with PBS containing 0.1% Tween-20 and then incubated with specific primary antibodies (P-ERK1/2, P-Pax, P-FAK, P-IκB-α or anti β-actin) using a dilution of 1:1000 in phosphate-buffered saline containing 5% (w/v) BSA and 0.1% Tween-20. After washing, membranes were incubated with appropriated horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (1:3000). Immunoreactive bands were visualized by using ECL detection system, as described by the manufacturer (GE Healthcare, Piscataway, NJ).

### ***Measurement of cytokines and chemokine***

The levels of the chemokine MCP-1/CCL2 was measured in frozen supernatants obtained from *in vitro* experiments or from pleural cavity washes after different time points of uPA challenge by ELISA using commercially available antibodies according to the procedures supplied by the manufacturer (R&D Systems, Minneapolis, MN).

### ***Flow cytometry for analysis of leukocyte populations and macrophage profiling***

After 24 or 48 h from uPA injection the pleural cells were recovered by washing the cavity with PBS. The populations of monocytes/macrophages (CD45<sup>+</sup> F4/80<sup>+</sup> GR1<sup>-</sup>), neutrophils (CD45<sup>+</sup> GR1<sup>+</sup> F4/80<sup>-</sup>) and lymphocytes (CD45<sup>+</sup> CD3<sup>+</sup>) were analyzed by staining 2 x 10<sup>5</sup> cells, for 30 min on ice with fluorescent monoclonal antibodies against F4/80 (PE-Cy7, eBioscience), GR1 (PE, Biolegend), CD45 (PE-Cy5, BD Biosciences, USA) and biotinylated CD3. Stained cells were acquired in BD FACSCantoII (BD Biosciences, USA) and analyzed using FlowJo software (Tree Star, Inc., USA). The cells were first selected based on size and granularity to separate lymphocyte and macrophage/neutrophil populations. From the gate in macrophage/neutrophil population, F4/80 positive cells were selected versus GR1 as presented in representative

dot plots. Numbers of each population were plotted in the graph. Gating strategy is shown in figure 6A. We also analyzed the macrophage phenotypes, based on a description of three subpopulations of macrophages, M1 (F4/80<sup>low</sup> Gr1<sup>+</sup> Cd11b<sup>med</sup>), M2 (F4/80<sup>high</sup> Gr1<sup>-</sup> Cd11b<sup>high</sup>) and Mres (F4/80<sup>med</sup> Cd11b<sup>low</sup>). Cells were stained with F4/80 (PE-Cy7, eBioscience, San Diego, CA), GR1 (BV421) and CD11b (FITC) both from BD Biosciences, San Jose, CA, for surface staining. Macrophage populations were set according to F4/80, Gr1 and CD11b expression. Gating strategy is shown in Figure 7A.

### ***Statistical analysis***

Results are presented as the mean  $\pm$  SEM. Data were analyzed by one-way ANOVA, and differences between groups were assessed using the Student-Newman-Keuls post-test. A *P* value  $< 0.05$  was considered significant. Calculations were performed using the prism 4.0 software program for Windows (GraphPad software, San Diego, CA).

## RESULTS

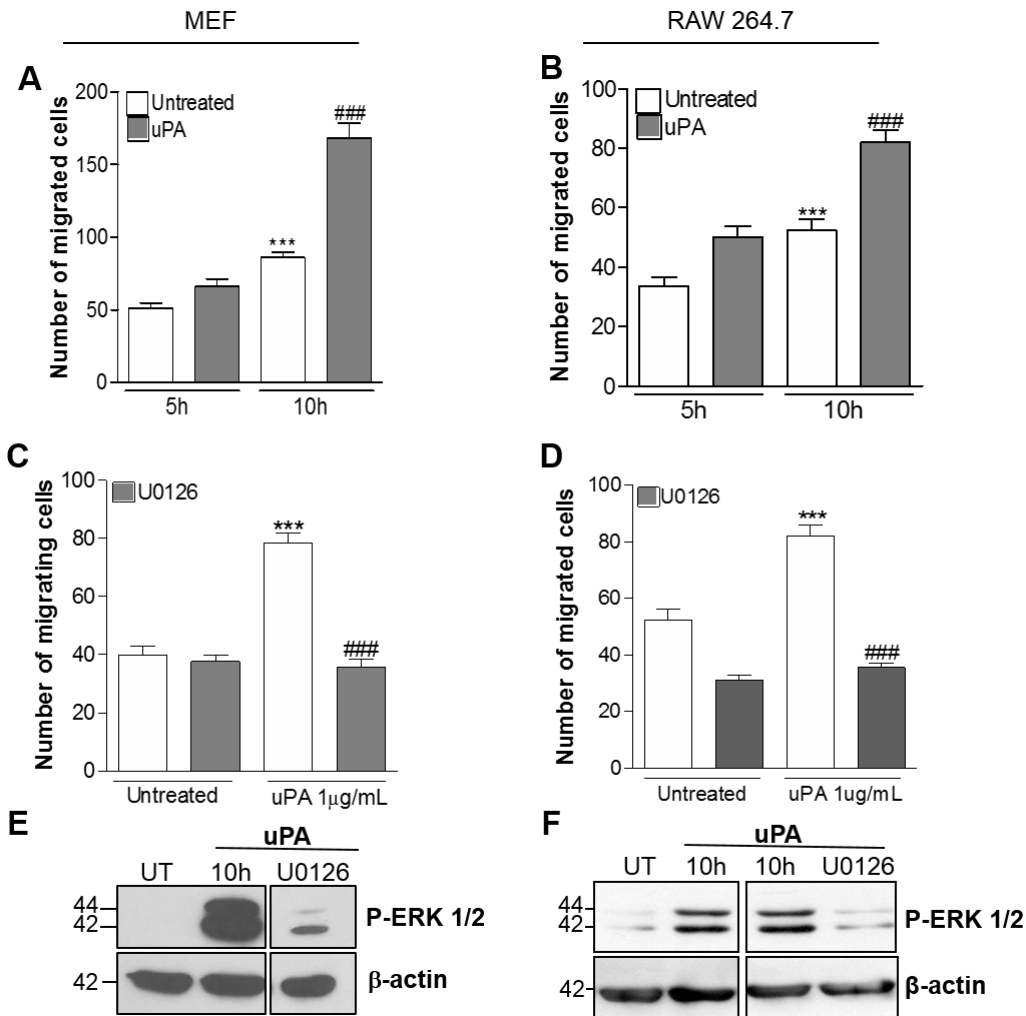
### *uPA induced fibroblast (MEF) and macrophage (RAW 264.7) migration in vitro*

At first, we checked whether uPA could induce migration by using a cell scratch assay. MEF (Fig. 1A) and RAW 264.7 (Fig. 1B) cells treated with uPA (1 $\mu$ g/mL) showed higher migration into the scratch than untreated cells. We could also observe that the induced migration occurs in a time-dependent manner, since the migration was higher at 10h, and even higher at 20h (data not shown).

Because the cell scratch assay has limitations, for instance, it can be difficult to differentiate cell migration from cell proliferation, we used a different migration assay to validate the results. Using RAW 264.7 cells in a transwell assay and CCL2 as a positive control, we also observed an increased migration when cells were kept in medium with uPA (1 $\mu$ g/mL) (medium: 2.9 $\pm$ 0.8; CCL2: 14.2 $\pm$ 3.0; uPA: 21.3 $\pm$ 4.6; results were expressed as number of migrated cells  $\pm$ SEM, in biological triplicates  $P$ <0.001 as compared medium with CCL2 or with uPA).

### *uPA-induced migration of MEF and RAW 264.7 was dependent on the MEK/ERK pathway*

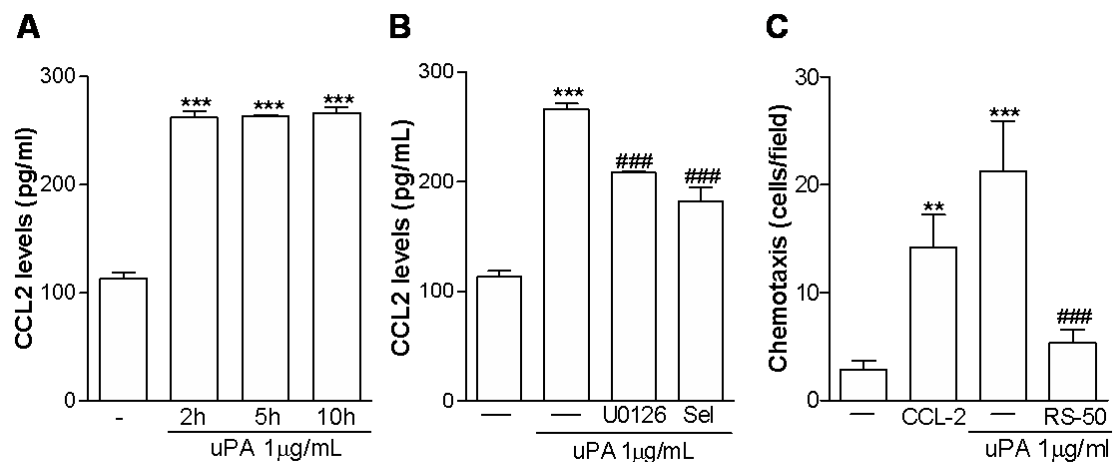
The MEK/ERK pathway is known to participate in cell migration (34). Previous studies from our group have shown that plasmin and plasminogen can induce gene expression (32, 35) and cell migration through the MEK/ERK pathway (30). To investigate the role of this pathway in the uPA-induced migration, cells were treated with the specific inhibitor U0126 prior to the cell scratch assay. The pre-treatment of the cells with U0126 impaired the uPA-induced migration of MEFs (Fig. 1C) and RAW 264.7 (Fig. 1D). Furthermore, western Bot analysis showed that uPA induced ERK phosphorylation in both cell lines, and this induction was abrogated by U0126 treatment (Fig. 1E and 1F).



**Figure 1. Migration of murine embryonic fibroblast (MEFs) and macrophages (RAW 264.7) into the scratch after uPA treatment and the effect of an MEK/ERK inhibitor.** Quiescent MEFs or RAW 264.7 on 6 wells plates were scratched by using a tip and then treated with 1 $\mu$ g/mL of uPA. After the indicated times, the cells were fixed and the migrated cells counted (A and B). Cells were pretreated with U0126 (10 $\mu$ M) 60 min. prior to scratch. After 10h of uPA treatment the cultures were processed for cell count (C, D), or for whole cell extraction for western blot analysis to detect P-ERK1/2 (10h and 20h) (E, F). Results are expressed as number of migrated cells and are shown as the mean  $\pm$  SEM of at least 3 experiments. \*\*\* $P$  < 0.001 when compared with untreated cells in each time; ### $P$  < 0.001 when compared with cells treated with uPA or pre-treated cells for 10h. Blots are representative of three independent experiments. For loading control, membranes were re-probed with anti- $\beta$ -actin.

## ***uPA increased CCL2 levels and CCR2 blockage impaired uPA-induced migration of RAW264.7***

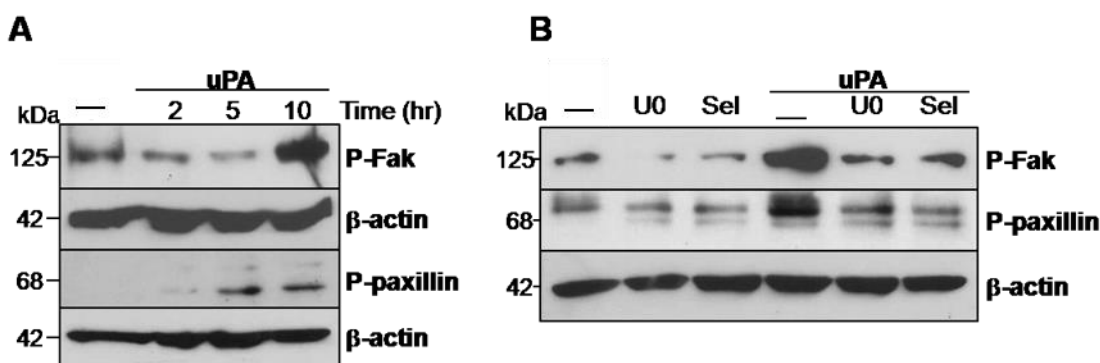
Previous *in vitro* studies show that uPA and plasmin induced the production of lipid mediators, cytokines and chemokines (36-38). The chemokine CCL2 and its receptor CCR2 are involved in the migration of mononuclear cells. To evaluate if uPA could induce CCL2 production, we performed ELISA assays in the supernatant of RAW 264.7 cells treated with uPA for different times. The uPA treatment raised CCL2 levels from early times, such as 2h after treatment (Fig. 2A). The pre-treatment of the cells with the MEK/ERK inhibitors U0126 or selumetinib impaired CCL2 production (Fig. 2B), suggesting that uPA induces CCL2 production through the MEK/ERK pathway. In order to investigate the participation of the CCL2 receptor (CCR2) in the uPA-induced migration, we performed a transwell assay using the CCR2 antagonist RS-504393. In the presence of RS-504393 there was a decreased uPA-induced RAW 264.7 migration (Fig. 2C), indicating a participation of the CCR2/CCR2 axis in the cell migration induced by uPA.



**Figure 2. Production of CCL2 by RAW 264.7 cells after uPA treatment and effect of a CCR2 selective antagonist RS504393 on the uPA-induced RAW-264.7 migration.** Quiescent RAW 264.7 cells on 24 well plates were treated with uPA 1µg/mL. After different times supernatants were processed to determine CCL2 levels by ELISA (A). Cells were pre-treated with the MEK/ERK inhibitors U0126 or selumetinib (10 µM) 60 min prior to uPA and supernatant was collected 10 h after treatment (B). Results are expressed in pg/ml and are shown as the mean ± SEM. \*\*\* $P < 0.001$  when compared with untreated cells in each time or ### $P < 0.001$  when compared uPA group  $\times$  uPA+inhibitors. Quiescent RAW 264.7 were allowed to migrate for 4h across polycarbonate membranes toward the chemoattractant uPA (1µg/ml) or CCL2 (50 ng/ml) as positive control. Some groups were pre-incubated with the CCR2 selective antagonist RS504393 (10 µM) 60 min before the assay. Five fields were counted in each membrane (C). Results are expressed as the mean ± SEM of at least three experiments, each performed in triplicate. \*\* $P < 0.01$  and \*\*\* $P < 0.001$  when compared with untreated cells; ### $P < 0.001$  when compared with cells treated with uPA.

***uPA induced the phosphorylation of FAK and paxillin through the MEK/ERK pathway***

Focal adhesion kinases are downstream targets of the MEK/ERK 1/2 cascade. The focal adhesion kinase (FAK) is a focal adhesion protein involved in cell migration. Paxillin is a cytoskeleton protein with adaptive function and is also a substrate for the kinase complex FAK/Src (21). Therefore, we investigated the association among uPA and these focal adhesion proteins in our study. The treatment of RAW 264.7 cells with uPA induced FAK and paxillin phosphorylation in a time-dependent manner (Fig. 3A). The uPA-induced phosphorylation was abrogated when cells were pre-treated with U0126 or selumetinib (Fig. 3B), indicating a participation of the MEK/ERK pathway in these process. Phosphorylation of paxillin was also increased in MEFs treated with uPA (data not shown).



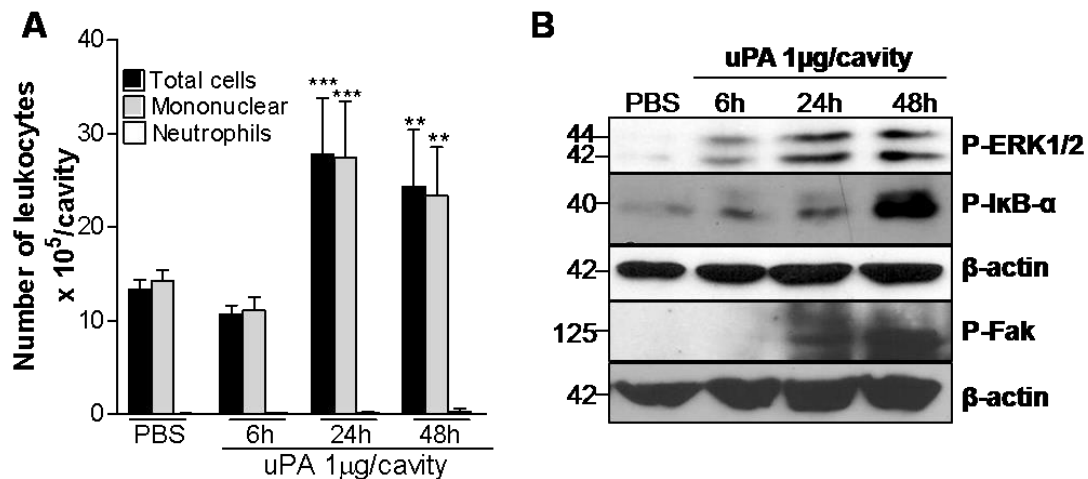
**Figure 3. Effect of the MEK/ERK inhibitors on the phosphorylated levels of FAK and paxillin after uPA treatment of RAW 264.7 cells.** Quiescent RAW 264.7 cells on 24 well plates were treated with uPA 1 $\mu$ g/mL. After the indicated times, cultures were processed for cell extraction for western blot analysis to detect P-FAK and P-Pax (A). Some groups were pre-treated with the MEK/ERK inhibitors U0126 or selumetinib (10  $\mu$ M) 60 min prior to uPA treatment. Whole cell extracts were obtained 10 h after uPA treatment (B). Blots are representative of three independent experiments. For loading control, membranes were re-probed with anti- $\beta$ -actin.



***uPA induces leukocyte recruitment in vivo associated with the phosphorylation of ERK, IκB-α, FAK and CCL2/CCR2 axis***

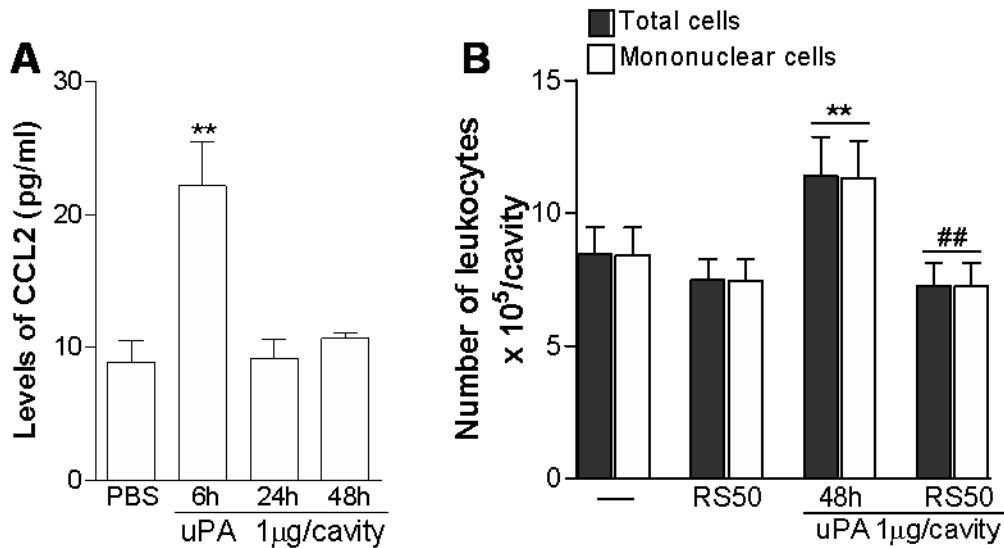
After observing the uPA ability to induce cell migration in vitro, we investigated if uPA could induce leukocyte migration in vivo by using a pleurisy model. We injected uPA (1μg) in the pleural cavity of mice and collected the cells present in the cavity after different time points. The intrapleural injection of uPA induced an influx of leukocytes into the cavity in a time dependent-manner, with increased migration of mononuclear cells at the times of 24 and 48h (Fig. 4A).

Analogous to the in vitro settings, we investigated the activation of ERK 1/2 and FAK and CCL2 production. uPA induced ERK, IκB-α and FAK phosphorylation, with maximum activation at 24 and 48h after treatment (Fig. 4B).



**Figure 4. Kinetics of leukocyte recruitment to the pleural cavity of mice after uPA injection.** BALB/C mice were challenged by i.pl. (intrapleural) injection of uPA (1μg/cavity) and the cells present in the pleural cavity were harvested at different times and processed for total and differential leukocyte counts of cytospin preparations by light microscopy (A) and western blot analysis for P-ERK1/2, P-IκB-α and P-FAK (B). Results are expressed as the number of cells per cavity and are shown as the mean ± SEM of five to six mice in each group. \*\* $P < 0.01$  or \*\*\* $P < 0.001$ , when compared with PBS-injected mice. For loading control, membranes were re-probed with anti-β-actin. Blots are representative of two independent experiments in pools of cells from at least five animals.

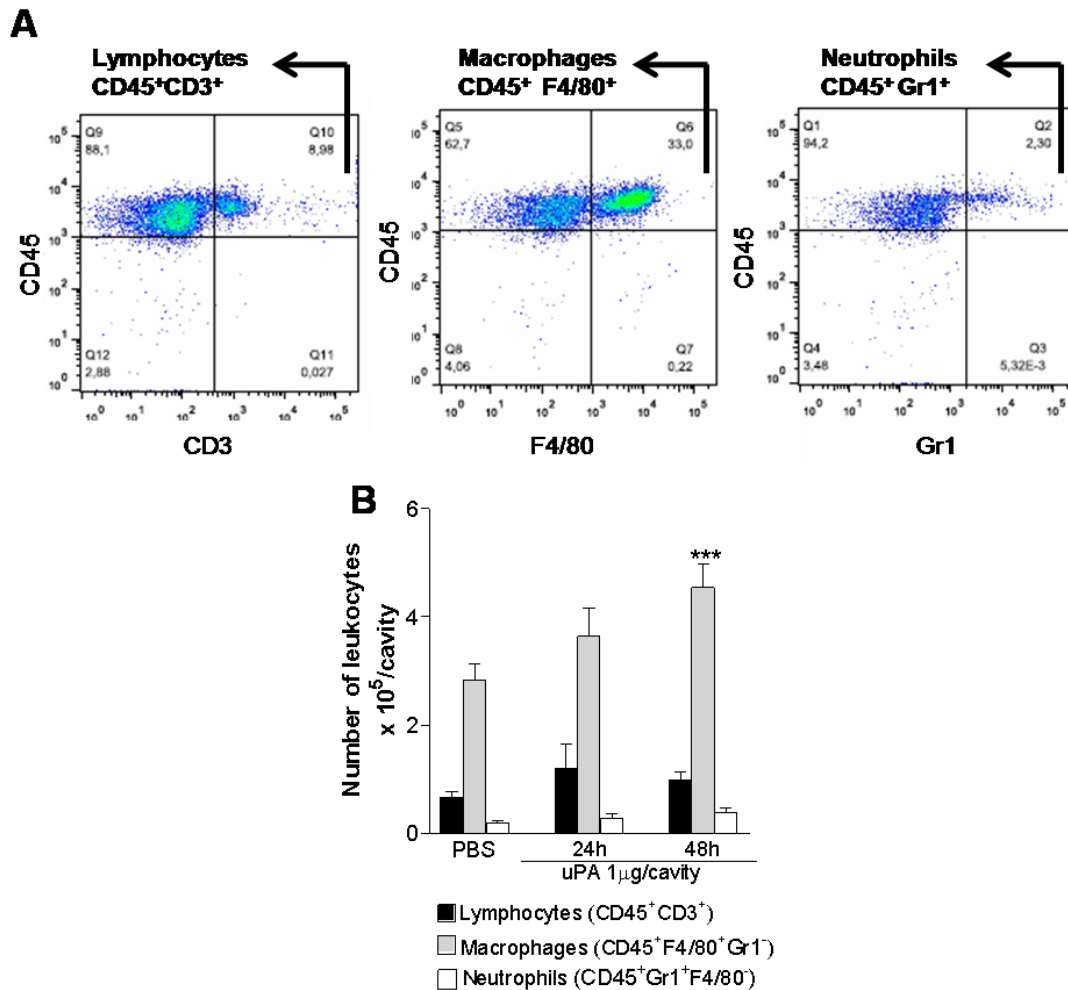
In keeping with the function of CCL2 chemokine to attract monocytes, we observed increased CCL2 levels 6h after uPA injection (Fig. 5A). Moreover, when the CCR2 antagonist RS-504393 was injected prior to uPA, the induced migration was hampered (Fig. 5B), reinforcing the participation of the CCL2/CCR2 axis in the uPA induced migration.



**Figure 5. Levels of CCL2 after uPA injection and effect of a CCR2 selective antagonist RS504393 on the uPA-induced macrophage migration *in vivo*.** Levels of CCL2 in pg/ml were measured by ELISA assay in supernatants obtained from pleural cavity washes after uPA injection (A). Mice were injected i.pl. with PBS or RS504393 (2mg/kg) and 60 min after received an i.pl. injection of uPA (1µg/cavity). The cells present in the pleural cavity were harvested 48 h after uPA injection and processed for total and differential leukocyte counts of cytopsin preparations by light microscopy (B). Results are expressed as the number of cells per cavity and are shown as the mean  $\pm$  SEM of five to six mice in each group. \*\*  $P < 0.01$  when compared with PBS-injected mice; ##  $P < 0.01$  when compared with uPA-injected mice that did not receive RS504393.

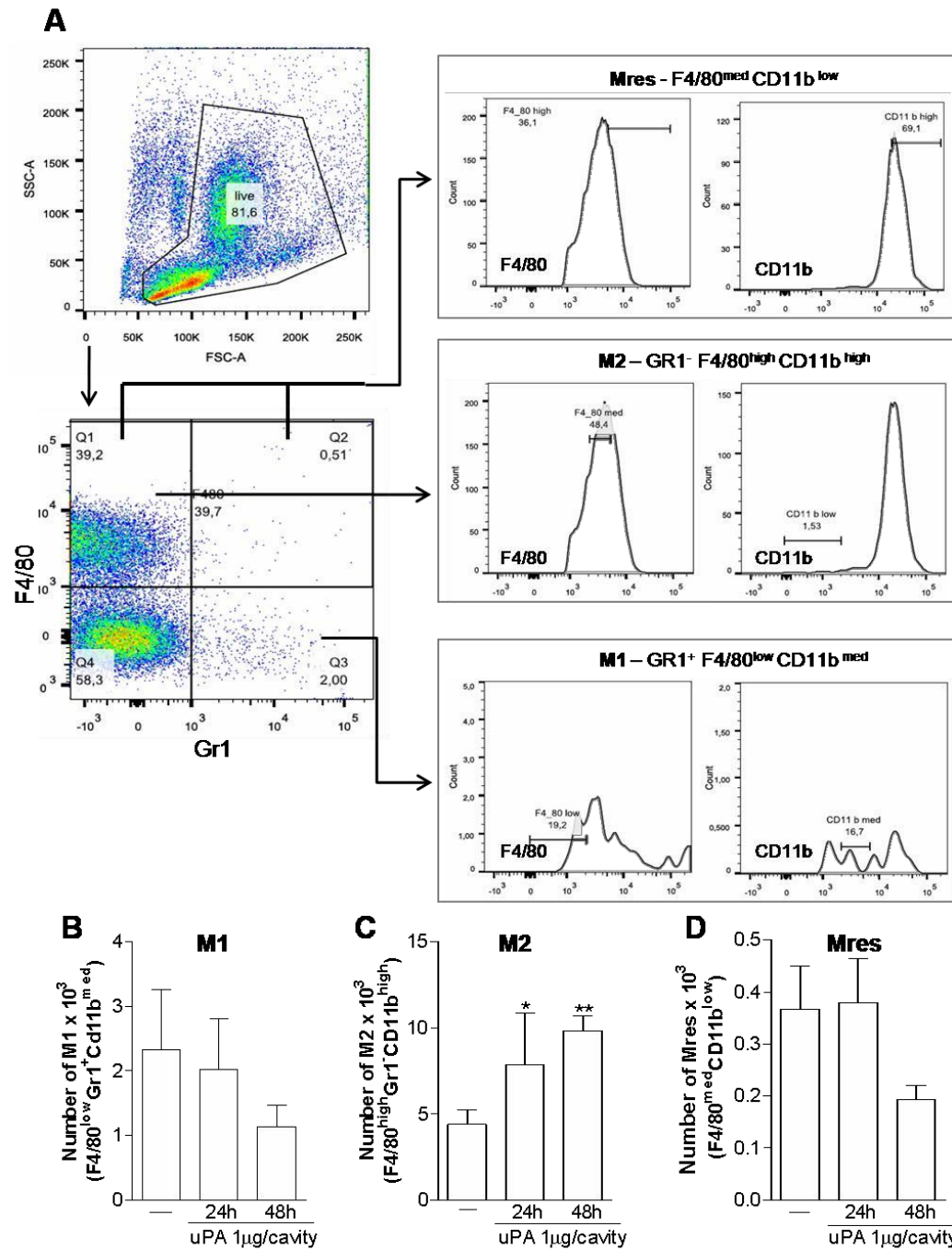
***Macrophages recruited to the pleural cavity of mice by uPA are of an anti-inflammatory (M2) profile***

We confirmed the profile of cells recruited by uPA to mice pleura by flow cytometry. In agreement with what was previously observed, flow cytometry analysis showed an increased macrophage (CD45<sup>+</sup> F4/80<sup>+</sup> Gr1<sup>-</sup>) population, without significant changes in neutrophils (CD45<sup>+</sup> Gr1<sup>+</sup> F4/80<sup>-</sup>) or lymphocyte numbers (CD45<sup>+</sup> CD3<sup>+</sup>) (Fig. 6B).



**Figure 6. Population of leukocyte recruited to the pleural cavity after injection of uPA.** BALB/c mice were challenged by an intrapleural injection of uPA (1µg/cavity) or PBS (vehicle). The cells obtained from the pleural lavage 24 and 48 h after uPA injection were analyzed by flow cytometry according to their size and granularity and expression of surface molecules F4/80, Gr1 or CD3 to determine the proportion of monocytes/macrophages, granulocytes and lymphocytes, respectively as described in (A) and (B). The results were expressed as number of cells and expressed as mean ± SEM. \*\*P<0.01 when compared with mice challenged with PBS (vehicle).

Macrophages express different phenotypes throughout the different phases of inflammation. In the productive phase, macrophages typically exhibit a pro-inflammatory phenotype (M1: F4/80<sup>low</sup> Gr1<sup>+</sup> Cd11b<sup>med</sup>). In a resolution milieu, M1 macrophages are skewed to the anti-inflammatory phenotype (M2: F480<sup>high</sup> Gr1<sup>-</sup> CD11b<sup>high</sup>), which then switch to the resolving phenotype (Mres: F4/80<sup>med</sup> CD11b<sup>low</sup>) (39). We evaluated the profile of the uPA-recruited macrophages by flow cytometry, based on the description of these three populations of macrophages (M1, M2 and Mres). The gating strategy is shown in Figure 7A. The results show that uPA did not induced significant modification in pro-inflammatory (M1) (Fig. 7B) or pro- resolving (Mres – Fig. 7D) macrophage numbers, whilst increased the number of anti-inflammatory (M2) macrophages 24 and 48 h after uPA injection (Fig. 7C).



**Figure 7. Profile of macrophages recruited to the pleural cavity after injection of uPA.** BALB/c mice were challenged by an intrapleural injection of uPA (1µg/cavity) or PBS (vehicle). The cells obtained from the pleural lavage 24 and 48 h after uPA injection were analyzed by flow cytometry according to their size and granularity and expression of surface molecules F4/80, CD11b and Gr1 as described in the gating strategy (A). The cells that migrated to the cavity were classified as M1 (Gr1<sup>+</sup> F4/80<sup>low</sup> Cd11b<sup>med</sup>) (B), M2 (Gr1<sup>-</sup> F4/80<sup>high</sup> CD11b<sup>high</sup>) (C) and Mres (F4/80<sup>med</sup> CD11b<sup>low</sup>) (D) subpopulations of macrophages. The results were expressed as number of cells and expressed as mean ± SEM. \*P < 0.05 and \*\*P < 0.01 when compared with mice challenged with PBS (vehicle); n=6.

## DISCUSSION

The participation of uPA in physiological and pathological events related to cell migration has been described, but the underlying mechanisms have not been fully elucidated yet. In this study, we investigated the uPA ability to induce cell migration using *in vitro* and *in vivo* models, aiming to detail the associated signaling events. Our major findings are as follow: 1) uPA induced *in vitro* migration of fibroblasts and macrophages through the MEK/ERK 1/2 pathway; 2) uPA induced CCL2 production by macrophages *in vitro* and the blockage of CCR2 impaired uPA-induced *in vitro* macrophage migration; 3) uPA induced the phosphorylation of the focal adhesion proteins FAK and paxillin in a MEK/ERK 1/2-dependent manner; 4) uPA induced an influx of mononuclear cells into the pleural cavity of mice, associated with ERK1/2, I $\kappa$ B- $\alpha$  and FAK phosphorylation, CCL2 production and CCR2 activation; and 6) the macrophages recruited by uPA *in vivo* presented an anti-inflammatory (M2) phenotype.

Previous studies demonstrated that uPA, independently of its proteolytic activity, induced adherence and chemotaxis of myeloid cells (40, 41), migration of human and bovine epithelial cells (42, 43) and promoted cell growth (44). Accordingly, in this work we showed that uPA induced the migration of murine fibroblasts and macrophages *in vitro*. Indeed, it has been shown that uPAR is expressed in fibroblasts and macrophages (8, 45) and an increased expression can be induced in fibroblasts and monocytic cell lines by growth factors and cytokines (46, 47).

In our experiments, we used uPA purified from human urine (Sigma). This could raise the question whether the administrated uPA induced cell migration because it is an exogenous protein, instead of having specific activity. Carmo and colleagues tested, in a similar experimental setting, the effects of human plasmin and serum-derived albumin (HSA) in the migration RAW 264.7. HSA did not induce RAW 264.7 migration, whilst human and murine plasmin greatly increased migration. Furthermore, there was no significant difference between human and murine plasmin in the induced-migration (30). We believe these findings can be extent to this work and uPA induced migration due to its specific activity on treated cells.

Different components of the plasminogen system activate the MAPK pathway. Pro-inflammatory inducers, such as LPS and TNF- $\alpha$  activate the MEK/ERK1/2 pathway

and induce the expression of uPA and metalloproteinases (48, 49). The activation of this pathway leads to downstream signaling cascades and culminate in different events, including cell migration (15). We showed that cell migration induced by uPA was impaired in the presence of the MEK/ERK 1/2 inhibitor. Furthermore, the uPA-treatment induced the phosphorylation of ERK1/2 in cultures of fibroblasts and macrophages. In agreement, ERK activation by uPA-uPAR binding lead to macrophage infiltration into the arterial wall of apolipoprotein E-deficient mice (50). ERK activation by uPA is particularly described in the mobility of tumor cells, being pointed as inductor of cell proliferation and protease expression through transcriptional activation (51). uPA also influences cytoplasmic targets of ERK, such as the myosin light-chain kinase, which regulates tumor motility in humans (17). In glioblastoma cells, uPA-induced ERK1/2 phosphorylation suppressed the expression of a pro-apoptotic protein (BIM/BCL2L1) (52). Furthermore, uPA induced the production of metalloproteinase 9 by THP-1 cells, which was absent when the cells were pre-treated with a MEK/ERK inhibitor (PD98059) (19). Altogether, these studies corroborate our findings that uPA can activate the MEK/ERK pathway, thus regulating the migration of different cell types.

Cytokine/chemokine production is a key step in leukocyte recruitment and the establishment of a proper inflammatory response. We showed here that uPA greatly induced the production of the chemokine CCL2 *in vitro* depending on the MEK/ERK pathway. In fact, there are described correlations between elevated concentrations of the components of the uPA/uPAR system and CCL2 levels. For example, there were raised concentrations of uPA, suPAR and CCL2 in the serum of uremic patients with carotid atherosclerosis (53). In addition, serum levels of suPAR and CCL2 were increased in patients with prosthetic infection caused by different bacteria (54). The positive correlations indicate that uPA might be participating in CCL2 production. Furthermore, the blockage of the CCL2 receptor, CCR2, impaired the migration of RAW 264.7 induced by uPA. CCR2 is mainly expressed in monocytes and is the target for several monocyte chemotactic proteins (MIPs), such as MCP-1/CCL2, MCP-2/CCL8, e MCP-3/CCL7. Bearing this, CCR2 plays a fundamental role in the migration of monocytes/macrophages in different inflammatory experimental models and human diseases (55). Although the participation of the CCL2/CCR2 axis in the uPA-induced migration was the focus of our study, we do not exclude the participation of other

chemoattractants and receptors in our model. Other chemokines, such as CCL3 (MIP-1 $\alpha$ ), CCL4 (MIP-1 $\beta$ ), CCL5 (RANTES) and its main receptors (CCR1 e CCR5) are also involved in the recruitment of monocytes (55) and could be involved in the uPA-induced migration of macrophages. In fact, Kawao and colleagues demonstrated an association between uPA and CCL3, which uPA knockout mice showed decreased expression of CCL3 mRNA, resulting in late bone repair in a model of femoral bone defect (56).

Several proteins regulate cell movement during the complex process of cell migration. Focal adhesion (FA) dynamics is a continuous process that coordinates FA and actin cytoskeleton involving FAK and paxillin activation (57, 58). FAK is an important mediator of integrin signaling and other receptors related to the pathogenesis of cancer and other diseases (59). Activated FAK recruits c-Src at FA sites and forms a FAK–Src signaling complex, that phosphorylates other FA signaling and adapter proteins. Paxillin is a target of FAK and is recruited early to nascent FAs at cell front, playing an essential role in FA turnover (adhesion disassembly at cell front) during cell migration (57, 60). We observed that uPA induced FAK and paxillin phosphorylation in a time-dependent manner and through the MEK/ERK 1/2 pathway. Accordingly, uPA induced the phosphorylation of FAK and paxillin in aortic endothelial cell cultures by binding to uPAR (61). Moreover, uPA and the *heat shock proteins* HSP70 and MRJ were related to tumor growth and metastasis due to ERK and FAK phosphorylation (20).

After investigating the ability of uPA to induce cell migration *in vitro* and the underlying mechanisms, we investigated if uPA could induce *in vivo* cell migration by using a pleurisy model. uPA induced an influx of macrophages into the pleural cavity of mice, with higher migration in the times of 24 and 48h. In the times points evaluated in our experimental model there was no change in the number of neutrophils, suggesting that there is no direct relation between the intrapleural injection of uPA and granulocyte recruitment. This might be due to a specific effect of uPA in monocyte recruitment, as occurred in the pleurisy model induced by plasmin (30). Another possibility is that uPA could induce an early recruitment of neutrophils in our model, which could no longer be detected 6 hours after injection. Although we did not observe granulocyte recruitment in our model, we do not exclude the participation of uPA and its receptor in such event. Indeed, uPAR knockout mice showed deficient recruitment of granulocytes in



experimental models of pulmonary infection by *Pseudomonas aeruginosa* and *Streptococcus pneumoniae* (11, 12).

In accordance with the in vitro results, uPA induced ERK, I $\kappa$ B- $\alpha$  and FAK phosphorylation, with higher activation during the peak of migration. uPA also induced CCL2 production 6 hours after the plasmin challenge and the uPA-induced migration was abrogated in the presence of RS-504393. Early production of chemokines, before the peak of leukocyte migration, is well described in animal models and certainly contributes to the chemotactic gradient and therefore, cell recruitment (62). In a pleurisy model induced by carrageenan, there was an increased CCL2 production. The ablation of the resident macrophage population in the pleural cavity did not affect CCL2 production, suggesting that a different local cell population was responsible for the chemokine production. The author suggests that resident mesothelial cells would be responsible for the increased CCL2 levels (63). Due to the similarities between the experimental models, we speculate that this cell population would also be responsible for CCL-2 production induced by uPA. The CCL2 produced under uPA stimulation would bind to CCR2 in circulating monocytes and induce its chemotaxis.

In the productive phase of inflammation, migrated macrophages usually have a pro-inflammatory phenotype (M1 - F4/80<sup>low</sup> Gr1<sup>+</sup> Cd11b<sup>med</sup>), which is skilled to phagocyte foreign bodies, but has low efferocytic capacity. In the resolution phase of inflammation, M1 macrophages are skewed to the anti-inflammatory phenotype (M2 - F480<sup>high</sup> Gr1<sup>-</sup> and CD11b<sup>high</sup>), specialized in production of anti-inflammatory and pro-resolving mediators and efferocytosis of apoptotic neutrophils. M2 macrophages then switch to the resolving phenotype (Mres - F4/80<sup>med</sup> CD11b<sup>low</sup>), producer of antifibrotic and antioxidant proteins that restrain tissue damage and fibrosis (39). Here we found that uPA increased M2 macrophage and did not change M1 or Mres numbers. Accordingly, plasmin can induce an M2 phenotype in cardiac macrophages, which was associated with a fibrotic state (64). uPA also induced a fully M2/fibrotic phenotype expressed after macrophage migration to the heart (65). In a muscular dystrophy model, macrophage polarization from M1 to M2 phenotype was associated with increased uPA expression (66). Accordingly, it was shown that uPAR regulates cytokine production and controls polarization of intestinal macrophage, considering that uPAR deficiency led to increased M1 macrophage population (67).

On the other hand, studies have shown different effects for other components of the plg system components in macrophage skewing. In a model of stroke, the tissue-type plasminogen activator (tPA) induced microglia/macrophage recruitment and M1 polarization (68). Furthermore, in a model of kidney injury, tPA prevented M1 macrophage apoptosis and promoted cell survival, not having the same effect in M2 macrophages (69). The diverging findings might be due to the experimental settings on each study or even mechanisms possibly triggered by different receptors. Further studies on the field will help to understand the divergent actions of the plg/pla system components on macrophage polarization. Elucidating the mechanisms beneath leukocyte migration and function is important to characterize the different phases of inflammation and develop new pharmacological strategies to treat inflammatory diseases. In this work, we attempted to investigate the uPA ability to induce migration and the related mechanisms. To our knowledge, this is the first study describing the steps triggered by uPA injection and the following steps that culminate in M2 macrophage accumulation in the pleural cavity of mice.

## **ACKNOWLEDGMENTS**

This work was supported by grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG, Brazil) and Pró-Reitoria de Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais-PRPq, Brazil (Programa de Auxílio à Pesquisa de Doutores Recém-Contratados), and the European Community's Seventh Framework Programme [FP7-2007-2013] under grant agreement HEALTH-F4-2011-281608. We thank Frankcinéia Assis and Ilma Marçal for technical assistance.

## REFERENCES

1. Carmeliet, P., and D. Collen. 1998. Development and disease in proteinase-deficient mice: role of the plasminogen, matrix metalloproteinase and coagulation system. *Thrombosis research* 91: 255-285.
2. Plow, E. F., T. Herren, A. Redlitz, L. A. Miles, and J. L. Hoover-Plow. 1995. The cell biology of the plasminogen system. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 9: 939-945.
3. Das, R., T. Burke, and E. F. Plow. 2007. Histone H2B as a functionally important plasminogen receptor on macrophages. *Blood* 110: 3763-3772.
4. Plow, E. F., L. Doeuve, and R. Das. 2012. So many plasminogen receptors: why? *Journal of biomedicine & biotechnology* 2012: 141806.
5. Plesner, T., E. Ralfkiaer, M. Wittrup, H. Johnsen, C. Pyke, T. L. Pedersen, N. E. Hansen, and K. Dano. 1994. Expression of the receptor for urokinase-type plasminogen activator in normal and neoplastic blood cells and hematopoietic tissue. *American journal of clinical pathology* 102: 835-841.
6. Nykjaer, A., B. Moller, R. F. Todd, 3rd, T. Christensen, P. A. Andreasen, J. Gliemann, and C. M. Petersen. 1994. Urokinase receptor. An activation antigen in human T lymphocytes. *J Immunol* 152: 505-516.
7. Sieuwerts, A. M., J. W. Martens, L. C. Dorssers, J. G. Klijn, and J. A. Foekens. 2002. Differential effects of fibroblast growth factors on expression of genes of the plasminogen activator and insulin-like growth factor systems by human breast fibroblasts. *Thrombosis and haemostasis* 87: 674-683.
8. Yoshida, E., K. Tsuchiya, M. Sugiki, H. Sumi, H. Mihara, and M. Maruyama. 1996. Modulation of the receptor for urokinase-type plasminogen activator in macrophage-like U937 cells by inflammatory mediators. *Inflammation* 20: 319-326.
9. Medzhitov, R. 2010. Inflammation 2010: new adventures of an old flame. *Cell* 140: 771-776.
10. Medzhitov, R. 2008. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature* 454: 428-435.
11. Gyetko, M. R., S. Sud, T. Kendall, J. A. Fuller, M. W. Newstead, and T. J. Standiford. 2000. Urokinase receptor-deficient mice have impaired neutrophil recruitment in response to pulmonary *Pseudomonas aeruginosa* infection. *J Immunol* 165: 1513-1519.
12. Rijneveld, A. W., M. Levi, S. Florquin, P. Speelman, P. Carmeliet, and T. van Der Poll. 2002. Urokinase receptor is necessary for adequate host defense against pneumococcal pneumonia. *J Immunol* 168: 3507-3511.
13. Nagai, N., K. Okada, N. Kawao, C. Ishida, S. Ueshima, D. Collen, and O. Matsuo. 2008. Urokinase-type plasminogen activator receptor (uPAR) augments brain damage in a murine model of ischemic stroke. *Neuroscience letters* 432: 46-49.
14. Mekkawy, A. H., M. H. Pourgholami, and D. L. Morris. 2014. Involvement of urokinase-type plasminogen activator system in cancer: an overview. *Medicinal research reviews* 34: 918-956.
15. Junttila, M. R., S. P. Li, and J. Westermarck. 2008. Phosphatase-mediated crosstalk between MAPK signaling pathways in the regulation of cell survival. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 22: 954-965.
16. Arthur, J. S., and S. C. Ley. 2013. Mitogen-activated protein kinases in innate immunity. *Nature reviews. Immunology* 13: 679-692.
17. Nguyen, D. H., D. J. Webb, A. D. Catling, Q. Song, A. Dhakephalkar, M. J. Weber, K. S. Ravichandran, and S. L. Gonias. 2000. Urokinase-type plasminogen activator stimulates the Ras/Extracellular signal-regulated kinase (ERK) signaling pathway and MCF-7 cell migration by a mechanism that requires focal adhesion kinase, Src, and Shc. Rapid dissociation of GRB2/Sps-Shc complex is associated with the transient

- phosphorylation of ERK in urokinase-treated cells. *The Journal of biological chemistry* 275: 19382-19388.
18. Stewart, C. E., H. S. Nijmeh, C. E. Brightling, and I. Sayers. 2012. uPAR regulates bronchial epithelial repair in vitro and is elevated in asthmatic epithelium. *Thorax* 67: 477-487.
  19. Menshikov, M., N. Torosyan, E. Elizarova, K. Plakida, A. Vorotnikov, Y. Parfyonova, V. Stepanova, A. Bobik, B. Berk, and V. Tkachuk. 2006. Urokinase induces matrix metalloproteinase-9/gelatinase B expression in THP-1 monocytes via ERK1/2 and cytosolic phospholipase A2 activation and eicosanoid production. *Journal of vascular research* 43: 482-490.
  20. Lin, Y., N. Peng, H. Zhuang, D. Zhang, Y. Wang, and Z. C. Hua. 2014. Heat shock proteins HSP70 and MRJ cooperatively regulate cell adhesion and migration through urokinase receptor. *BMC cancer* 14: 639.
  21. Zhao, X., and J. L. Guan. 2011. Focal adhesion kinase and its signaling pathways in cell migration and angiogenesis. *Advanced drug delivery reviews* 63: 610-615.
  22. Liu, D., J. Aguirre Ghiso, Y. Estrada, and L. Ossowski. 2002. EGFR is a transducer of the urokinase receptor initiated signal that is required for in vivo growth of a human carcinoma. *Cancer cell* 1: 445-457.
  23. Aguirre Ghiso, J. A. 2002. Inhibition of FAK signaling activated by urokinase receptor induces dormancy in human carcinoma cells in vivo. *Oncogene* 21: 2513-2524.
  24. Zhang, F., C. C. Tom, M. C. Kugler, T. T. Ching, J. A. Kreidberg, Y. Wei, and H. A. Chapman. 2003. Distinct ligand binding sites in integrin alpha3beta1 regulate matrix adhesion and cell-cell contact. *The Journal of cell biology* 163: 177-188.
  25. Monaghan-Benson, E., and P. J. McKeown-Longo. 2006. Urokinase-type plasminogen activator receptor regulates a novel pathway of fibronectin matrix assembly requiring Src-dependent transactivation of epidermal growth factor receptor. *The Journal of biological chemistry* 281: 9450-9459.
  26. Alessandri, A. L., L. P. Sousa, C. D. Lucas, A. G. Rossi, V. Pinho, and M. M. Teixeira. 2013. Resolution of inflammation: mechanisms and opportunity for drug development. *Pharmacology & therapeutics* 139: 189-212.
  27. Norling, L. V., and C. N. Serhan. 2010. Profiling in resolving inflammatory exudates identifies novel anti-inflammatory and pro-resolving mediators and signals for termination. *Journal of internal medicine* 268: 15-24.
  28. Gilroy, D. W., T. Lawrence, M. Perretti, and A. G. Rossi. 2004. Inflammatory resolution: new opportunities for drug discovery. *Nature reviews. Drug discovery* 3: 401-416.
  29. Sousa, L. P., B. S. Brasil, B. e. M. Silva, S. V. Nogueira, A. A. Andrade, P. C. Ferreira, S. M. Teixeira, K. J. Gollob, E. G. Kroon, K. Kato, and C. A. Bonjardim. 2005. Characterization of alpha-enolase as an interferon-alpha 2 alpha 1 regulated gene. *Front Biosci* 10: 2534-2547.
  30. Carmo, A. A., B. R. Costa, J. P. Vago, L. C. de Oliveira, L. P. Tavares, C. R. Nogueira, A. L. Ribeiro, C. C. Garcia, A. S. Barbosa, B. S. Brasil, L. M. Dusse, L. S. Barcelos, C. A. Bonjardim, M. M. Teixeira, and L. P. Sousa. 2014. Plasmin induces in vivo monocyte recruitment through protease-activated receptor-1-, MEK/ERK-, and CCR2-mediated signaling. *J Immunol* 193: 3654-3663.
  31. Vago, J. P., C. R. Nogueira, L. P. Tavares, F. M. Soriani, F. Lopes, R. C. Russo, V. Pinho, M. M. Teixeira, and L. P. Sousa. 2012. Annexin A1 modulates natural and glucocorticoid-induced resolution of inflammation by enhancing neutrophil apoptosis. *J Leukoc Biol* 92: 249-258.
  32. Sousa, L. P., B. M. Silva, B. S. Brasil, S. V. Nogueira, P. C. Ferreira, E. G. Kroon, K. Kato, and C. A. Bonjardim. 2005. Plasminogen/plasmin regulates alpha-enolase expression through the MEK/ERK pathway. *Biochemical and biophysical research communications* 337: 1065-1071.
  33. Sousa, L. P., A. F. Carmo, B. M. Rezende, F. Lopes, D. M. Silva, A. L. Alessandri, C. A. Bonjardim, A. G. Rossi, M. M. Teixeira, and V. Pinho. 2009. Cyclic AMP enhances

- resolution of allergic pleurisy by promoting inflammatory cell apoptosis via inhibition of PI3K/Akt and NF-kappaB. *Biochemical pharmacology* 78: 396-405.
34. Sepe, L., M. C. Ferrari, C. Cantarella, F. Fioretti, and G. Paoella. 2013. Ras activated ERK and PI3K pathways differentially affect directional movement of cultured fibroblasts. *Cell Physiol Biochem* 31: 123-142.
  35. Sousa, L. P., B. S. Brasil, M. Silva Bde, S. V. Nogueira, A. A. Andrade, P. C. Ferreira, S. M. Teixeira, K. J. Gollob, E. G. Kroon, K. Kato, and C. A. Bonjardim. 2005. Characterization of alpha-enolase as an interferon-alpha 2 alpha 1 regulated gene. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* 10: 2534-2547.
  36. Weide, I., B. Tippler, T. Syrovets, and T. Simmet. 1996. Plasmin is a specific stimulus of the 5-lipoxygenase pathway of human peripheral monocytes. *Thrombosis and haemostasis* 76: 561-568.
  37. Syrovets, T., M. Jendrach, A. Rohwedder, A. Schule, and T. Simmet. 2001. Plasmin-induced expression of cytokines and tissue factor in human monocytes involves AP-1 and IKKbeta-mediated NF-kappaB activation. *Blood* 97: 3941-3950.
  38. Syrovets, T., and T. Simmet. 2004. Novel aspects and new roles for the serine protease plasmin. *Cell Mol Life Sci* 61: 873-885.
  39. Schif-Zuck, S., N. Gross, S. Assi, R. Rostoker, C. N. Serhan, and A. Ariel. 2011. Saturated-efferocytosis generates pro-resolving CD11b low macrophages: modulation by resolvins and glucocorticoids. *European journal of immunology* 41: 366-379.
  40. Gyetko, M. R., R. F. Todd, 3rd, C. C. Wilkinson, and R. G. Sitrin. 1994. The urokinase receptor is required for human monocyte chemotaxis in vitro. *The Journal of clinical investigation* 93: 1380-1387.
  41. Waltz, D. A., R. M. Fujita, X. Yang, L. Natkin, S. Zhuo, C. J. Gerard, S. Rosenberg, and H. A. Chapman. 2000. Nonproteolytic role for the urokinase receptor in cellular migration in vivo. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 22: 316-322.
  42. Busso, N., S. K. Masur, D. Lazega, S. Waxman, and L. Ossowski. 1994. Induction of cell migration by pro-urokinase binding to its receptor: possible mechanism for signal transduction in human epithelial cells. *The Journal of cell biology* 126: 259-270.
  43. Odekon, L. E., Y. Sato, and D. B. Rifkin. 1992. Urokinase-type plasminogen activator mediates basic fibroblast growth factor-induced bovine endothelial cell migration independent of its proteolytic activity. *Journal of cellular physiology* 150: 258-263.
  44. Rabbani, S. A., A. P. Mazar, S. M. Bernier, M. Haq, I. Bolivar, J. Henkin, and D. Goltzman. 1992. Structural requirements for the growth factor activity of the amino-terminal domain of urokinase. *The Journal of biological chemistry* 267: 14151-14156.
  45. Shetty, S. 2005. Regulation of urokinase receptor mRNA stability by hnRNP C in lung epithelial cells. *Molecular and cellular biochemistry* 272: 107-118.
  46. Pyke, C., E. Ralfkiaer, E. Ronne, G. Hoyer-Hansen, L. Kirkeby, and K. Dano. 1994. Immunohistochemical detection of the receptor for urokinase plasminogen activator in human colon cancer. *Histopathology* 24: 131-138.
  47. Dublin, E., A. Hanby, N. K. Patel, R. Liebman, and D. Barnes. 2000. Immunohistochemical expression of uPA, uPAR, and PAI-1 in breast carcinoma. Fibroblastic expression has strong associations with tumor pathology. *The American journal of pathology* 157: 1219-1227.
  48. Cheng, Y. C., L. M. Chen, M. H. Chang, W. K. Chen, F. J. Tsai, C. H. Tsai, T. Y. Lai, W. W. Kuo, C. Y. Huang, and C. J. Liu. 2009. Lipopolysaccharide upregulates uPA, MMP-2 and MMP-9 via ERK1/2 signaling in H9c2 cardiomyoblast cells. *Mol Cell Biochem* 325: 15-23.
  49. Niedbala, M. J., and M. Stein. 1991. Tumor necrosis factor induction of urokinase-type plasminogen activator in human endothelial cells. *Biomed Biochim Acta* 50: 427-436.
  50. Gu, J. M., A. Johns, J. Morser, W. P. Dole, D. R. Greaves, and G. G. Deng. 2005. Urokinase plasminogen activator receptor promotes macrophage infiltration into the vascular wall of ApoE deficient mice. *Journal of cellular physiology* 204: 73-82.

51. Smith, H. W., and C. J. Marshall. 2010. Regulation of cell signalling by uPAR. *Nature reviews. Molecular cell biology* 11: 23-36.
52. Wykosky, J., J. Hu, G. G. Gomez, T. Taylor, G. R. Villa, D. Pizzo, S. R. VandenBerg, A. H. Thorne, C. C. Chen, P. S. Mischel, S. L. Gonias, W. K. Cavenee, and F. B. Furnari. 2015. A urokinase receptor-Bim signaling axis emerges during EGFR inhibitor resistance in mutant EGFR glioblastoma. *Cancer research* 75: 394-404.
53. Pawlak, K., M. Mysliwiec, and D. Pawlak. 2008. The urokinase-type plasminogen activator/its soluble receptor system is independently related to carotid atherosclerosis and associated with CC-chemokines in uraemic patients. *Thrombosis research* 122: 328-335.
54. Galliera, E., L. Drago, M. G. Marazzi, C. Romano, C. Vassena, and M. M. Corsi Romanelli. 2015. Soluble urokinase-type plasminogen activator receptor (suPAR) as new biomarker of the prosthetic joint infection: correlation with inflammatory cytokines. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 441: 23-28.
55. Shi, C., and E. G. Pamer. 2011. Monocyte recruitment during infection and inflammation. *Nature reviews. Immunology* 11: 762-774.
56. Kawao, N., Y. Tamura, Y. Horiuchi, K. Okumoto, M. Yano, K. Okada, O. Matsuo, and H. Kaji. 2015. The Tissue Fibrinolytic System Contributes to the Induction of Macrophage Function and CCL3 during Bone Repair in Mice. *PLoS one* 10: e0123982.
57. Parsons, J. T. 2003. Focal adhesion kinase: the first ten years. *Journal of cell science* 116: 1409-1416.
58. Parsons, J. T., A. R. Horwitz, and M. A. Schwartz. 2010. Cell adhesion: integrating cytoskeletal dynamics and cellular tension. *Nature reviews. Molecular cell biology* 11: 633-643.
59. McLean, G. W., N. O. Carragher, E. Avizienyte, J. Evans, V. G. Brunton, and M. C. Frame. 2005. The role of focal-adhesion kinase in cancer - a new therapeutic opportunity. *Nature reviews. Cancer* 5: 505-515.
60. Schlaepfer, D. D., and S. K. Mitra. 2004. Multiple connections link FAK to cell motility and invasion. *Current opinion in genetics & development* 14: 92-101.
61. Tang, H., D. M. Kerins, Q. Hao, T. Inagami, and D. E. Vaughan. 1998. The urokinase-type plasminogen activator receptor mediates tyrosine phosphorylation of focal adhesion proteins and activation of mitogen-activated protein kinase in cultured endothelial cells. *The Journal of biological chemistry* 273: 18268-18272.
62. Petri, B., M. Phillipson, and P. Kubes. 2008. The physiology of leukocyte recruitment: an in vivo perspective. *J Immunol* 180: 6439-6446.
63. Cailhier, J. F., M. Partolina, S. Vuthoori, S. Wu, K. Ko, S. Watson, J. Savill, J. Hughes, and R. A. Lang. 2005. Conditional macrophage ablation demonstrates that resident macrophages initiate acute peritoneal inflammation. *J Immunol* 174: 2336-2342.
64. Carlson, S., D. Helterline, L. Asbe, S. Dupras, E. Minami, S. Farris, and A. Stempien-Otero. 2016. Cardiac macrophages adopt profibrotic/M2 phenotype in infarcted hearts: Role of urokinase plasminogen activator. *Journal of molecular and cellular cardiology*.
65. Meznarich, J., L. Malchodi, D. Helterline, S. A. Ramsey, K. Bertko, T. Plummer, A. Plawman, E. Gold, and A. Stempien-Otero. 2013. Urokinase plasminogen activator induces pro-fibrotic/m2 phenotype in murine cardiac macrophages. *PLoS one* 8: e57837.
66. Capote, J., I. Kramerova, L. Martinez, S. Vetrone, E. R. Barton, H. L. Sweeney, M. C. Miceli, and M. J. Spencer. 2016. Osteopontin ablation ameliorates muscular dystrophy by shifting macrophages to a pro-regenerative phenotype. *The Journal of cell biology* 213: 275-288.
67. Genua, M., S. D'Alessio, J. Cibella, A. Gandelli, E. Sala, C. Correale, A. Spinelli, V. Arena, A. Malesci, S. Rutella, V. A. Ploplis, S. Vetrano, and S. Danese. 2015. The urokinase plasminogen activator receptor (uPAR) controls macrophage phagocytosis in intestinal inflammation. *Gut* 64: 589-600.
68. Won, S., J. K. Lee, and D. G. Stein. 2015. Recombinant tissue plasminogen activator promotes, and progesterone attenuates, microglia/macrophage M1 polarization and

- recruitment of microglia after MCAO stroke in rats. *Brain, behavior, and immunity* 49: 267-279.
69. Lin, L., Y. Jin, and K. Hu. 2015. Tissue-type plasminogen activator (tPA) promotes M1 macrophage survival through p90 ribosomal S6 kinase (RSK) and p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway. *The Journal of biological chemistry* 290: 7910-7917.

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A interpretação dos resultados obtidos no projeto permite chegar às seguintes conclusões:

- 1) O uPA induziu a migração de fibroblastos e macrófagos murinos *in vitro* de forma dependente do tempo e com envolvimento da via MEK/ERK e das proteínas de adesão focal FAK e paxilina.
- 2) O uPA induziu a produção de CCL-2 por células RAW 264.7 de forma dependente da via MEK/ERK.
- 3) Os macrófagos murinos tratados com um antagonista do receptor CCR2 não migraram quando estimulados por uPA, evidenciando a importância do eixo CCL2/CCR2 na migração induzida por uPA.
- 4) A injeção de uPA na cavidade pleural de camundongos promoveu o influxo de monócitos associado à fosforilação de MEK/ERK e à ativação de FAK.
- 5) O uPA induziu a produção de MCP-1/CCL2, quimiocina que promoveria o recrutamento de monócitos para a cavidade pleural de camundongos.
- 6) Os macrófagos recrutados por uPA *in vivo* foram de perfil M2, o qual é associado com a resolução da resposta inflamatória.

Os achados aqui descritos demonstram a capacidade do ativador de plasminogênio do tipo uroquinase em induzir migração celular e os mecanismos envolvidos, além de indicar um possível envolvimento na resolução da inflamação. Considera-se que o autor atendeu aos objetivos propostos no projeto visto que os questionamentos iniciais foram respondidos e levantaram novas questões que serão abordadas na continuação do projeto.

O trabalho intitulado 'Estudo da participação do ativador do plasminogênio do tipo uroquinase na migração de células inflamatórias' foi apresentado na XXIV Semana do Conhecimento da Universidade Federal de Minas Gerais em outubro de 2015, representando o Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas na categoria mestrado. O autor recebeu o prêmio de melhor apresentação entre Grandes Áreas de Ciências Agrárias, Ciências



Biológicas e Ciências da Saúde.

O trabalho em sua versão em inglês, intitulado '*The participation of the urokinase-type plasminogen activator on inflammatory cell migration*' foi apresentado em congressos internacionais na área de inflamação (*European Congress of Immunology*, Áustria, setembro de 2015) e sistema plasminogênio (*Gordon Research Seminar and Conference on Plasminogen Activation and Extracellular Proteolysis*, EUA, fevereiro de 2016).

O projeto resultou na elaboração do manuscrito intitulado '*Urokinase-type plasminogen activator induces leukocyte migration mediated by MEK/ERK, CCL2/CCR2 and associated with the focal adhesion proteins FAK and paxillin*', a ser submetido ao *Journal of Immunology*. Além de seu projeto principal, o autor colaborou em dois outros trabalhos do seu grupo de pesquisa, ambos resultando em manuscritos em fase de submissão: '*Plasmin induces macrophage reprogramming and contributes to features of inflammation resolution*' (*Blood* –primeira autoria do artigo compartilhada com outras duas colegas) e '*The Resolution of Acute Inflammation Induced by Cyclic AMP is Dependent on Annexin A1*' (*The Journal of Biological Chemistry*).

De modo geral, considera-se que o autor e o grupo de pesquisa no qual está inserido (Laboratório de Sinalização na Inflamação) tem contribuído de forma significativa no entendimento da participação do sistema plg/pla e seus componentes nas diferentes fases da inflamação.

## 7. PERSPECTIVAS

O trabalho apresentado demonstrou que uPA induz a migração de macrófagos de perfil anti-inflamatório (M2) para a pleura de camundongos. De modo a continuar o projeto, pretende-se elucidar os mecanismos envolvidos na migração induzida por uPA, analisar o perfil funcional das células recrutadas e estimuladas por uPA, buscando entender sua participação em eventos chave da resolução da resposta inflamatória.

Dentre os objetivos a serem alcançados na próxima fase do projeto, pode-se citar:

- Avaliar a participação de plasmina e de FPRs na migração induzida por uPA, utilizando os inibidores VLPK, PAI-1 e BOC-1 em modelos de migração *in vitro*.
- Avaliar a capacidade do uPA em induzir reprogramação de macrófagos *in vitro*.
- Avaliar a capacidade do uPA em modular a apoptose de neutrófilos *in vitro* e *in vivo*.
- Avaliar a capacidade do uPA em modular o processo de eferocitose *in vitro* e *in vivo*.
- Analisar o envolvimento da proteína AnxA1 na capacidade eferocítica de macrófagos tratados com uPA.
- Avaliar se a administração de uPA acelera o processo de resolução no modelo de pleurisia induzida por LPS.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbas, A. K., A. H. Lichtman and S. Pillai (2012). Imunologia celular e molecular. Rio de Janeiro, Elsevier.
- Alessandri, A. L., L. P. Sousa, C. D. Lucas, A. G. Rossi, V. Pinho and M. M. Teixeira (2013). "Resolution of inflammation: mechanisms and opportunity for drug development." Pharmacol Ther **139**(2): 189-212.
- Andreasen, P. A., L. Kjoller, L. Christensen and M. J. Duffy (1997). "The urokinase-type plasminogen activator system in cancer metastasis: a review." Int J Cancer **72**(1): 1-22.
- Ariel, A. and C. N. Serhan (2012). "New Lives Given by Cell Death: Macrophage Differentiation Following Their Encounter with Apoptotic Leukocytes during the Resolution of Inflammation." Front Immunol **3**: 4.
- Arthur, J. S. and S. C. Ley (2013). "Mitogen-activated protein kinases in innate immunity." Nat Rev Immunol **13**(9): 679-692.
- Bae, S., H. Kim, N. Lee, C. Won, H. R. Kim, Y. I. Hwang, Y. W. Song, J. S. Kang and W. J. Lee (2012). "α-Enolase expressed on the surfaces of monocytes and macrophages induces robust synovial inflammation in rheumatoid arthritis." J Immunol **189**(1): 365-372.
- Bakken, A. M., C. D. Protack, E. Roztocil, S. M. Nicholl and M. G. Davies (2009). "Cell migration in response to the amino-terminal fragment of urokinase requires epidermal growth factor receptor activation through an ADAM-mediated mechanism." J Vasc Surg **49**(5): 1296-1303.
- Bannach, F. G., A. Gutierrez, B. J. Fowler, T. H. Bugge, J. L. Degen, R. J. Parmer and L. A. Miles (2002). "Localization of regulatory elements mediating constitutive and cytokine-stimulated plasminogen gene expression." J Biol Chem **277**(41): 38579-38588.
- Behrendt, N., O. N. Jensen, L. H. Engelholm, E. Mortz, M. Mann and K. Dano (2000). "A urokinase receptor-associated protein with specific collagen binding properties." J Biol Chem **275**(3): 1993-2002.
- Belin, D., J. D. Vassalli, C. Combepine, F. Godeau, Y. Nagamine, E. Reich, H. P. Kocher and R. M. Duvoisin (1985). "Cloning, nucleotide sequencing and expression of cDNAs encoding mouse urokinase-type plasminogen activator." Eur J Biochem **148**(2): 225-232.
- Borg, R. J., A. L. Samson, A. E. Au, A. Scholzen, M. Fuchsberger, Y. Y. Kong, R. Freeman, N. A. Mifsud, M. Plebanski and R. L. Medcalf (2015). "Dendritic Cell-Mediated Phagocytosis but Not Immune Activation Is Enhanced by Plasmin." PLoS One **10**(7): e0131216.
- Busso, N. and J. A. Hamilton (2002). "Extravascular coagulation and the plasminogen activator/plasmin system in rheumatoid arthritis." Arthritis Rheum **46**(9): 2268-2279.
- Capote, J., I. Kramerova, L. Martinez, S. Vetrone, E. R. Barton, H. L. Sweeney, M. C. Miceli and M. J. Spencer (2016). "Osteopontin ablation ameliorates muscular dystrophy by shifting macrophages to a pro-regenerative phenotype." J Cell Biol **213**(2): 275-288.
- Carlson, S., D. Helterline, L. Asbe, S. Dupras, E. Minami, S. Farris and A. Stempien-Otero (2016). "Cardiac macrophages adopt profibrotic/M2 phenotype in infarcted hearts: Role of urokinase plasminogen activator." J Mol Cell Cardiol.

- Carmeliet, P. and D. Collen (1998). "Development and disease in proteinase-deficient mice: role of the plasminogen, matrix metalloproteinase and coagulation system." Thromb Res **91**(6): 255-285.
- Carmo, A. A., B. R. Costa, J. P. Vago, L. C. de Oliveira, L. P. Tavares, C. R. Nogueira, A. L. Ribeiro, C. C. Garcia, A. S. Barbosa, B. S. Brasil, L. M. Dusse, L. S. Barcelos, C. A. Bonjardim, M. M. Teixeira and L. P. Sousa (2014). "Plasmin induces in vivo monocyte recruitment through protease-activated receptor-1-, MEK/ERK-, and CCR2-mediated signaling." J Immunol **193**(7): 3654-3663.
- Castellino, F. J. and V. A. Ploplis (2005). "Structure and function of the plasminogen/plasmin system." Thromb Haemost **93**(4): 647-654.
- Caulfield, A. J. and W. W. Lathem (2012). "Substrates of the plasminogen activator protease of *Yersinia pestis*." Adv Exp Med Biol **954**: 253-260.
- Chen, C. S., J. L. Alonso, E. Ostuni, G. M. Whitesides and D. E. Ingber (2003). "Cell shape provides global control of focal adhesion assembly." Biochem Biophys Res Commun **307**(2): 355-361.
- Cheng, Y. C., L. M. Chen, M. H. Chang, W. K. Chen, F. J. Tsai, C. H. Tsai, T. Y. Lai, W. W. Kuo, C. Y. Huang and C. J. Liu (2009). "Lipopolysaccharide upregulates uPA, MMP-2 and MMP-9 via ERK1/2 signaling in H9c2 cardiomyoblast cells." Mol Cell Biochem **325**(1-2): 15-23.
- Christensen, U., K. Bangert and S. Thorsen (1996). "Reaction of human alpha2-antiplasmin and plasmin stopped-flow fluorescence kinetics." FEBS Lett **387**(1): 58-62.
- Chu, S. C., S. F. Yang, K. H. Lue, Y. S. Hsieh, T. J. Li and K. H. Lu (2008). "Naproxen, meloxicam and methylprednisolone inhibit urokinase plasminogen activator and inhibitor and gelatinases expression during the early stage of osteoarthritis." Clin Chim Acta **387**(1-2): 90-96.
- Crippa, M. P. (2007). "Urokinase-type plasminogen activator." Int J Biochem Cell Biol **39**(4): 690-694.
- D'Alessio, S. and F. Blasi (2009). "The urokinase receptor as an entertainer of signal transduction." Front Biosci (Landmark Ed) **14**: 4575-4587.
- Das, R., S. Ganapathy, M. Settle and E. F. Plow (2014). "Plasminogen promotes macrophage phagocytosis in mice." Blood **124**(5): 679-688.
- Das, R., E. Pluskota and E. F. Plow (2010). "Plasminogen and its receptors as regulators of cardiovascular inflammatory responses." Trends Cardiovasc Med **20**(4): 120-124.
- de Paulis, A., N. Montuori, N. Prevete, I. Fiorentino, F. W. Rossi, V. Visconte, G. Rossi, G. Marone and P. Ragno (2004). "Urokinase induces basophil chemotaxis through a urokinase receptor epitope that is an endogenous ligand for formyl peptide receptor-like 1 and -like 2." J Immunol **173**(9): 5739-5748.
- De Sousa, L. P., B. S. Brasil, B. M. Silva, M. H. Freitas, S. V. Nogueira, P. C. Ferreira, E. G. Kroon and C. A. Bonjardim (2005). "Plasminogen/plasmin regulates c-fos and egr-1 expression via the MEK/ERK pathway." Biochem Biophys Res Commun **329**(1): 237-245.
- Del Rosso, A., M. Cinelli, S. Guiducci, A. Pignone, G. Fibbi, F. Margheri, A. Gabrielli, R. Giacomelli, A. Coppini, M. Del Rosso and M. Matucci Cerinic (2005). "Deflazacort modulates the fibrinolytic pattern and reduces uPA-dependent chemoinvasion and proliferation in rheumatoid arthritis synoviocytes." Rheumatology (Oxford) **44**(10): 1255-1262.

- Del Rosso, M., G. Fibbi and M. Maticucci Cerinic (1999). "The urokinase-type plasminogen activator system and inflammatory joint diseases." Clin Exp Rheumatol **17**(4): 485-498.
- Del Rosso, M., F. Margheri, S. Serrati, A. Chilla, A. Laurenzana and G. Fibbi (2011). "The urokinase receptor system, a key regulator at the intersection between inflammation, immunity, and coagulation." Curr Pharm Des **17**(19): 1924-1943.
- Engelholm, L. H., K. List, S. Netzel-Arnett, E. Cukierman, D. J. Mitola, H. Aaronson, L. Kjoller, J. K. Larsen, K. M. Yamada, D. K. Strickland, K. Holmbeck, K. Dano, H. Birkedal-Hansen, N. Behrendt and T. H. Bugge (2003). "uPARAP/Endo180 is essential for cellular uptake of collagen and promotes fibroblast collagen adhesion." J Cell Biol **160**(7): 1009-1015.
- Erickson, C. A. (1990). "Cell migration in the embryo and adult organism." Curr Opin Cell Biol **2**(1): 67-74.
- Fibbi, G., M. Ziche, L. Morbidelli, L. Magnelli and M. Del Rosso (1988). "Interaction of urokinase with specific receptors stimulates mobilization of bovine adrenal capillary endothelial cells." Exp Cell Res **179**(2): 385-395.
- Galliera, E., L. Drago, M. G. Marazzi, C. Romano, C. Vassena and M. M. Corsi Romanelli (2015). "Soluble urokinase-type plasminogen activator receptor (suPAR) as new biomarker of the prosthetic joint infection: correlation with inflammatory cytokines." Clin Chim Acta **441**: 23-28.
- Genua, M., S. D'Alessio, J. Cibella, A. Gandelli, E. Sala, C. Correale, A. Spinelli, V. Arena, A. Malesci, S. Rutella, V. A. Ploplis, S. Vetrano and S. Danese (2015). "The urokinase plasminogen activator receptor (uPAR) controls macrophage phagocytosis in intestinal inflammation." Gut **64**(4): 589-600.
- Gilroy, D. W., T. Lawrence, M. Perretti and A. G. Rossi (2004). "Inflammatory resolution: new opportunities for drug discovery." Nat Rev Drug Discov **3**(5): 401-416.
- Gorrasi, A., A. Li Santi, G. Amodio, D. Alfano, P. Remondelli, N. Montuori and P. Ragno (2014). "The urokinase receptor takes control of cell migration by recruiting integrins and FPR1 on the cell surface." PLoS One **9**(1): e86352.
- Gross, P. L., R. K. Murray and M. R. Rand (2013). Hemostasia e trombose. Bioquímica ilustrada de Harper. H. A. Harper, R. K. Murray, D. K. Granner and V. W. Rodwell. Porto Alegre, McGraw Hill: 651 - 660.
- Gyetko, M. R., G. H. Chen, R. A. McDonald, R. Goodman, G. B. Huffnagle, C. C. Wilkinson, J. A. Fuller and G. B. Toews (1996). "Urokinase is required for the pulmonary inflammatory response to *Cryptococcus neoformans*. A murine transgenic model." J Clin Invest **97**(8): 1818-1826.
- Gyetko, M. R., S. Sud, T. Kendall, J. A. Fuller, M. W. Newstead and T. J. Standiford (2000). "Urokinase receptor-deficient mice have impaired neutrophil recruitment in response to pulmonary *Pseudomonas aeruginosa* infection." J Immunol **165**(3): 1513-1519.
- Hajjar, K. A. (1995). "Cellular receptors in the regulation of plasmin generation." Thromb Haemost **74**(1): 294-301.
- Hart, P. H., G. F. Vitti, D. R. Burgess, G. A. Whitty, K. Royston and J. A. Hamilton (1991). "Activation of human monocytes by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: increased urokinase-type plasminogen activator activity." Blood **77**(4): 841-848.
- Hasegawa, T., L. Sorensen, M. Dohi, N. V. Rao, J. R. Hoidal and B. C. Marshall (1997). "Induction of urokinase-type plasminogen activator receptor by IL-1 beta." Am J Respir Cell Mol Biol **16**(6): 683-692.

- Henkin, J., P. Marcotte and H. C. Yang (1991). "The plasminogen-plasmin system." Prog Cardiovasc Dis **34**(2): 135-164.
- Hu, Y. L., S. Lu, K. W. Szeto, J. Sun, Y. Wang, J. C. Lasheras and S. Chien (2014). "FAK and paxillin dynamics at focal adhesions in the protrusions of migrating cells." Sci Rep **4**: 6024.
- Hynes, R. O. (2002). "Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines." Cell **110**(6): 673-687.
- Ilic, D., Y. Furuta, S. Kanazawa, N. Takeda, K. Sobue, N. Nakatsuji, S. Nomura, J. Fujimoto, M. Okada and T. Yamamoto (1995). "Reduced cell motility and enhanced focal adhesion contact formation in cells from FAK-deficient mice." Nature **377**(6549): 539-544.
- Jenkins, G. R., D. Seiffert, R. J. Parmer and L. A. Miles (1997). "Regulation of plasminogen gene expression by interleukin-6." Blood **89**(7): 2394-2403.
- Junttila, M. R., S. P. Li and J. Westermarck (2008). "Phosphatase-mediated crosstalk between MAPK signaling pathways in the regulation of cell survival." FASEB J **22**(4): 954-965.
- Kamio, N., H. Hashizume, S. Nakao, K. Matsushima and H. Sugiya (2007). "IL-1beta stimulates urokinase-type plasminogen activator expression and secretion in human dental pulp cells." Biomed Res **28**(6): 315-322.
- Kasza, A. and A. Koj (2002). "Cytokines regulate plasminogen activation system in astrocytoma cells." J Physiol Pharmacol **53**(1): 95-104.
- Kjaergaard, M., L. V. Hansen, B. Jacobsen, H. Gardsvoll and M. Ploug (2008). "Structure and ligand interactions of the urokinase receptor (uPAR)." Front Biosci **13**: 5441-5461.
- Kluft, C., M. M. Trumpi-Kalshoven, A. F. Jie and E. C. Veldhuyzen-Stolk (1979). "Factor XII-dependent fibrinolysis: a double function of plasma kallikrein and the occurrence of a previously undescribed factor XII- and kallikrein-dependent plasminogen proactivator." Thromb Haemost **41**(4): 756-773.
- Korns, D., S. C. Frasch, R. Fernandez-Boyanapalli, P. M. Henson and D. L. Bratton (2011). "Modulation of macrophage efferocytosis in inflammation." Front Immunol **2**: 57.
- Kwon, K. J., K. S. Cho, S. H. Lee, J. N. Kim, S. H. Joo, J. H. Ryu, L. J. Ignarro, S. H. Han and C. Y. Shin (2011). "Regulation of tissue plasminogen activator/plasminogen activator inhibitor-1 by hydrocortisone in rat primary astrocytes." J Neurosci Res **89**(7): 1059-1069.
- Laumonier, Y., T. Syrovets, L. Burysek and T. Simmet (2006). "Identification of the annexin A2 heterotetramer as a receptor for the plasmin-induced signaling in human peripheral monocytes." Blood **107**(8): 3342-3349.
- Leizer, T., J. Cebon, J. E. Layton and J. A. Hamilton (1990). "Cytokine regulation of colony-stimulating factor production in cultured human synovial fibroblasts: I. Induction of GM-CSF and G-CSF production by interleukin-1 and tumor necrosis factor." Blood **76**(10): 1989-1996.
- Li, Y. and D. Ye (2013). "Molecular biology for formyl peptide receptors in human diseases." J Mol Med (Berl) **91**(7): 781-789.
- Lian, X., L. Yang, Q. Gao and T. Yang (2008). "IL-1alpha is a potent stimulator of keratinocyte tissue plasminogen activator expression and regulated by TGF-beta1." Arch Dermatol Res **300**(4): 185-193.

Lin, L., Y. Jin and K. Hu (2015). "Tissue-type plasminogen activator (tPA) promotes M1 macrophage survival through p90 ribosomal S6 kinase (RSK) and p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway." J Biol Chem **290**(12): 7910-7917.

Lin, Y., N. Peng, H. Zhuang, D. Zhang, Y. Wang and Z. C. Hua (2014). "Heat shock proteins HSP70 and MRJ cooperatively regulate cell adhesion and migration through urokinase receptor." BMC Cancer **14**: 639.

Maderna, P. and C. Godson (2003). "Phagocytosis of apoptotic cells and the resolution of inflammation." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease **1639**(3): 141-151.]

Majno, G. *The Healing Hand - Man and wound in the ancient world.* **Harvard University Press**, Cambridge, MA, 1975.

Majno, G., Joris I. *Cells, Tissues, and Disease.* **Oxford University Press**, Oxford, 2004.

Margetic, S. (2012). "Inflammation and haemostasis." Biochem Med (Zagreb) **22**(1): 49-62.

Medzhitov, R. (2008). "Origin and physiological roles of inflammation." Nature **454**(7203): 428-435.

Medzhitov, R. (2010). "Inflammation 2010: new adventures of an old flame." Cell **140**(6): 771-776.

Menshikov, M., N. Torosyan, E. Elizarova, K. Plakida, A. Vorotnikov, Y. Parfyonova, V. Stepanova, A. Bobik, B. Berk and V. Tkachuk (2006). "Urokinase induces matrix metalloproteinase-9/gelatinase B expression in THP-1 monocytes via ERK1/2 and cytosolic phospholipase A2 activation and eicosanoid production." J Vasc Res **43**(5): 482-490.

Mezmarich, J., L. Malchodi, D. Helterline, S. A. Ramsey, K. Bertko, T. Plummer, A. Plawman, E. Gold and A. Stempien-Otero (2013). "Urokinase plasminogen activator induces pro-fibrotic/m2 phenotype in murine cardiac macrophages." PLoS One **8**(3): e57837.

Migeotte, I., D. Communi and M. Parmentier (2006). "Formyl peptide receptors: a promiscuous subfamily of G protein-coupled receptors controlling immune responses." Cytokine Growth Factor Rev **17**(6): 501-519.

Mignatti, P. and D. B. Rifkin (2000). "Nonenzymatic interactions between proteinases and the cell surface: novel roles in normal and malignant cell physiology." Adv Cancer Res **78**: 103-157.

Miles, L. A., C. M. Dahlberg, J. Plescia, J. Felez, K. Kato and E. F. Plow (1991). "Role of cell-surface lysines in plasminogen binding to cells: identification of alpha-enolase as a candidate plasminogen receptor." Biochemistry **30**(6): 1682-1691.

Miles, L. A. and R. J. Parmer (2013). "Plasminogen receptors: the first quarter century." Semin Thromb Hemost **39**(4): 329-337.

Mitra, S. K., D. A. Hanson and D. D. Schlaepfer (2005). "Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility." Nat Rev Mol Cell Biol **6**(1): 56-68.

Montuori, N. and P. Ragno (2009). "Multiple activities of a multifaceted receptor: roles of cleaved and soluble uPAR." Front Biosci (Landmark Ed) **14**: 2494-2503.

Nagai, N., K. Okada, N. Kawao, C. Ishida, S. Ueshima, D. Collen and O. Matsuo (2008). "Urokinase-type plasminogen activator receptor (uPAR) augments brain damage in a murine model of ischemic stroke." Neurosci Lett **432**(1): 46-49.

- Narita, T., K. Muromachi, N. Kamio, S. Nakao, K. Matsushima and H. Hashizume (2012). "Tumor necrosis factor  $\alpha$  stimulates expression and secretion of urokinase plasminogen activator in human dental pulp cells." J Oral Sci **54**(4): 329-336.
- Nathan, C. and A. Ding (2010). "Nonresolving inflammation." Cell **140**(6): 871-882.
- Niedbala, M. J. and M. Stein (1991). "Tumor necrosis factor induction of urokinase-type plasminogen activator in human endothelial cells." Biomed Biochim Acta **50**(4-6): 427-436.
- Norling, L. V. and C. N. Serhan (2010). "Profiling in resolving inflammatory exudates identifies novel anti-inflammatory and pro-resolving mediators and signals for termination." J Intern Med **268**(1): 15-24.
- Nykjaer, A., B. Moller, R. F. Todd, 3rd, T. Christensen, P. A. Andreasen, J. Gliemann and C. M. Petersen (1994). "Urokinase receptor. An activation antigen in human T lymphocytes." J Immunol **152**(2): 505-516.
- Park, Y. J., G. Liu, Y. Tsuruta, E. Lorne and E. Abraham (2009). "Participation of the urokinase receptor in neutrophil efferocytosis." Blood **114**(4): 860-870.
- Phillipson, M., B. Heit, P. Colarusso, L. Liu, C. M. Ballantyne and P. Kubes (2006). "Intraluminal crawling of neutrophils to emigration sites: a molecularly distinct process from adhesion in the recruitment cascade." J Exp Med **203**(12): 2569-2575.
- Plesner, T., E. Ralfkiaer, M. Wittrup, H. Johnsen, C. Pyke, T. L. Pedersen, N. E. Hansen and K. Dano (1994). "Expression of the receptor for urokinase-type plasminogen activator in normal and neoplastic blood cells and hematopoietic tissue." Am J Clin Pathol **102**(6): 835-841.
- Ploug, M., N. Behrendt, D. Lober and K. Dano (1991). "Protein structure and membrane anchorage of the cellular receptor for urokinase-type plasminogen activator." Semin Thromb Hemost **17**(3): 183-193.
- Plow, E. F., L. Doevre and R. Das (2012). "So many plasminogen receptors: why?" J Biomed Biotechnol **2012**: 141806.
- Plow, E. F., T. Herren, A. Redlitz, L. A. Miles and J. L. Hoover-Plow (1995). "The cell biology of the plasminogen system." FASEB J **9**(10): 939-945.
- Pöllänen, J. (1989). "Down-regulation of plasmin receptors on human sarcoma cells by glucocorticoids." J Biol Chem **264**(10): 5628-5632.
- Poon, I. K., C. D. Lucas, A. G. Rossi and K. S. Ravichandran (2014). "Apoptotic cell clearance: basic biology and therapeutic potential." Nat Rev Immunol **14**(3): 166-180.
- Ragno, P. (2006). "The urokinase receptor: a ligand or a receptor? Story of a sociable molecule." Cell Mol Life Sci **63**(9): 1028-1037.
- Ramachandran, R., F. Noorbakhsh, K. Defea and M. D. Hollenberg (2012). "Targeting proteinase-activated receptors: therapeutic potential and challenges." Nat Rev Drug Discov **11**(1): 69-86.
- Redlitz, A., B. J. Fowler, E. F. Plow and L. A. Miles (1995). "The role of an enolase-related molecule in plasminogen binding to cells." Eur J Biochem **227**(1-2): 407-415.
- Resnati, M., M. Guttinger, S. Valcamonica, N. Sidenius, F. Blasi and F. Fazioli (1996). "Proteolytic cleavage of the urokinase receptor substitutes for the agonist-induced chemotactic effect." EMBO J **15**(7): 1572-1582.
- Ridley, A. J., M. A. Schwartz, K. Burridge, R. A. Firtel, M. H. Ginsberg, G. Borisy, J. T. Parsons and A. R. Horwitz (2003). "Cell migration: integrating signals from front to back." Science **302**(5651): 1704-1709.



- Rijneveld, A. W., M. Levi, S. Florquin, P. Speelman, P. Carmeliet and T. van Der Poll (2002). "Urokinase receptor is necessary for adequate host defense against pneumococcal pneumonia." J Immunol **168**(7): 3507-3511.
- Roldan, A. L., M. V. Cubellis, M. T. Masucci, N. Behrendt, L. R. Lund, K. Dano, E. Appella and F. Blasi (1990). "Cloning and expression of the receptor for human urokinase plasminogen activator, a central molecule in cell surface, plasmin dependent proteolysis." EMBO J **9**(2): 467-474.
- Romer, J., T. H. Bugge, C. Pyke, L. R. Lund, M. J. Flick, J. L. Degen and K. Dano (1996). "Impaired wound healing in mice with a disrupted plasminogen gene." Nat Med **2**(3): 287-292.
- Rosenwald, M., U. Koppe, H. Keppeler, G. Sauer, R. Hennel, A. Ernst, K. E. Blume, C. Peter, M. Herrmann, C. Belka, K. Schulze-Osthoff, S. Wesselborg and K. Lauber (2012). "Serum-derived plasminogen is activated by apoptotic cells and promotes their phagocytic clearance." J Immunol **189**(12): 5722-5728.
- Rot, A. and U. H. von Andrian (2004). "Chemokines in innate and adaptive host defense: basic chemokines grammar for immune cells." Annu Rev Immunol **22**: 891-928.
- Schif-Zuck, S., N. Gross, S. Assi, R. Rostoker, C. N. Serhan and A. Ariel (2011). "Saturated-efferocytosis generates pro-resolving CD11b low macrophages: modulation by resolvins and glucocorticoids." Eur J Immunol **41**(2): 366-379.
- Schuliga, M. (2015). "The inflammatory actions of coagulant and fibrinolytic proteases in disease." Mediators Inflamm **2015**: 437695.
- Serhan, C. N., S. D. Brain, C. D. Buckley, D. W. Gilroy, C. Haslett, L. A. O'Neill, M. Perretti, A. G. Rossi and J. L. Wallace (2007). "Resolution of inflammation: state of the art, definitions and terms." FASEB J **21**(2): 325-332.
- Serhan, C. N., C. B. Clish, J. Brannon, S. P. Colgan, N. Chiang and K. Gronert (2000). "Novel functional sets of lipid-derived mediators with antiinflammatory actions generated from omega-3 fatty acids via cyclooxygenase 2-nonsteroidal antiinflammatory drugs and transcellular processing." J Exp Med **192**(8): 1197-1204.
- Serhan, C. N., S. Hong, K. Gronert, S. P. Colgan, P. R. Devchand, G. Mirick and R. L. Moussignac (2002). "Resolvins: a family of bioactive products of omega-3 fatty acid transformation circuits initiated by aspirin treatment that counter proinflammation signals." J Exp Med **196**(8): 1025-1037.
- Serhan, C. N. and J. Savill (2005). "Resolution of inflammation: the beginning programs the end." Nat Immunol **6**(12): 1191-1197.
- Shan, Y., L. Yu, Y. Li, Y. Pan, Q. Zhang, F. Wang, J. Chen and X. Zhu (2009). "Nudel and FAK as antagonizing strength modulators of nascent adhesions through paxillin." PLoS Biol **7**(5): e1000116.
- Shi, Z. and M. S. Stack (2007). "Urinary-type plasminogen activator (uPA) and its receptor (uPAR) in squamous cell carcinoma of the oral cavity." Biochem J **407**(2): 153-159.
- Sillaber, C., M. Baghestanian, R. Hofbauer, I. Virgolini, H. C. Bankl, W. Fureder, H. Agis, M. Willheim, M. Leimer, O. Scheiner, B. R. Binder, H. P. Kiener, D. Bevec, G. Fritsch, O. Majdic, H. G. Kress, H. Gadner, K. Lechner and P. Valent (1997). "Molecular and functional characterization of the urokinase receptor on human mast cells." J Biol Chem **272**(12): 7824-7832.
- Smith, H. W. and C. J. Marshall (2010). "Regulation of cell signalling by uPAR." Nat Rev Mol Cell Biol **11**(1): 23-36.

- Sousa, L. P., A. L. Alessandri, V. Pinho and M. M. Teixeira (2013). "Pharmacological strategies to resolve acute inflammation." Curr Opin Pharmacol **13**(4): 625-631.
- Sousa, L. P., B. S. Brasil, M. Silva Bde, S. V. Nogueira, A. A. Andrade, P. C. Ferreira, S. M. Teixeira, K. J. Gollob, E. G. Kroon, K. Kato and C. A. Bonjardim (2005). "Characterization of alpha-enolase as an interferon-alpha 2 alpha 1 regulated gene." Front Biosci **10**: 2534-2547.
- Sousa, L. P., B. S. Brasil, B. e. M. Silva, S. V. Nogueira, A. A. Andrade, P. C. Ferreira, S. M. Teixeira, K. J. Gollob, E. G. Kroon, K. Kato and C. A. Bonjardim (2005). "Characterization of alpha-enolase as an interferon-alpha 2 alpha 1 regulated gene." Front Biosci **10**: 2534-2547.
- Sousa, L. P., B. M. Silva, B. S. Brasil, S. V. Nogueira, P. C. Ferreira, E. G. Kroon, K. Kato and C. A. Bonjardim (2005). "Plasminogen/plasmin regulates alpha-enolase expression through the MEK/ERK pathway." Biochem Biophys Res Commun **337**(4): 1065-1071.
- Sprengers, E. D. and C. Kluft (1987). "Plasminogen activator inhibitors." Blood **69**(2): 381-387.
- Stewart, C. E., H. S. Nijmeh, C. E. Brightling and I. Sayers (2012). "uPAR regulates bronchial epithelial repair in vitro and is elevated in asthmatic epithelium." Thorax **67**(6): 477-487.
- Stoker, M. and E. Gherardi (1991). "Regulation of cell movement: the motogenic cytokines." Biochim Biophys Acta **1072**(1): 81-102.
- Syrovets, T., O. Lunov and T. Simmet (2012). "Plasmin as a proinflammatory cell activator." J Leukoc Biol **92**(3): 509-519.
- Syrovets, T. and T. Simmet (2004). "Novel aspects and new roles for the serine protease plasmin." Cell Mol Life Sci **61**(7-8): 873-885.
- Teranishi, S., K. Kimura and T. Nishida (2009). "Role of formation of an ERK-FAK-paxillin complex in migration of human corneal epithelial cells during wound closure in vitro." Invest Ophthalmol Vis Sci **50**(12): 5646-5652.
- Twining, S. S., P. M. Wilson and C. Ngamkitidechakul (1999). "Extrahepatic synthesis of plasminogen in the human cornea is up-regulated by interleukins-1alpha and -1beta." Biochem J **339** ( Pt 3): 705-712.
- Wang, Z., Q. Zhao, Y. Han, D. Zhang, L. Zhang and D. Luo (2013). "PAI-1 and IFN- $\gamma$  in the regulation of innate immune homeostasis during sublethal yersiniosis." Blood Cells Mol Dis **50**(3): 196-201.
- Wei, Y., J. A. Eble, Z. Wang, J. A. Kreidberg and H. A. Chapman (2001). "Urokinase receptors promote beta1 integrin function through interactions with integrin alpha3beta1." Mol Biol Cell **12**(10): 2975-2986.
- Won, S., J. K. Lee and D. G. Stein (2015). "Recombinant tissue plasminogen activator promotes, and progesterone attenuates, microglia/macrophage M1 polarization and recruitment of microglia after MCAO stroke in rats." Brain Behav Immun **49**: 267-279.
- Wygrecka, M., L. M. Marsh, R. E. Morty, I. Henneke, A. Guenther, J. Lohmeyer, P. Markart and K. T. Preissner (2009). "Enolase-1 promotes plasminogen-mediated recruitment of monocytes to the acutely inflamed lung." Blood **113**(22): 5588-5598.
- Zhao, X. and J. L. Guan (2011). "Focal adhesion kinase and its signaling pathways in cell migration and angiogenesis." Adv Drug Deliv Rev **63**(8): 610-615.

## 9. ANEXOS

### ANEXO A – Certificado do Comitê de Ética em Experimentação Animal



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL  
- C E T E A -

#### CERTIFICADO

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


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

#### CERTIFICATE

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

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

Belo Horizonte, 30 de agosto de 2012.

  
Profª. **Jacqueline Isaura Alvarez-Leite**  
Coordenadora do CETEA/UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais  
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha  
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2006  
31270-901 - Belo Horizonte, MG - Brasil  
Telefone: (31) 3499-4618  
[www.ufmg.br/bioetica/cetea](http://www.ufmg.br/bioetica/cetea) - [cetea@opq.ufmg.br](mailto:cetea@opq.ufmg.br)

## ANEXO B – Regras para submissão ao *Journal of Immunology*

### General Guidelines

For the initial submission of Full-Length manuscripts:

A format-neutral manuscript may be submitted for the first round of review. Manuscripts do not need to be formatted according to *The JI* guidelines for the initial submission, except that all authors must be listed for each reference.

**NOTE:** Numbering of lines and pages, and easy-to-read figures will make the task of the reviewers and editors easier.

Please see specifications for **Cutting-Edge Manuscripts**.

For revised submissions, please follow the guidelines below:

1. A 12-point serif font, preferably Times New Roman, is required for all text, except within the **figures**. Do not use compressed type format. Double-space entire manuscript; number each line and each page. Each of the following components should begin on a separate page:
2. The *Title Page* must include the full title; a running title (not to exceed 60 characters); each author's full name as it should be published (first name, middle initial, last name) and the affiliations of all authors and their institutions, departments, or organizations (use the following symbols in this order to designate authors' affiliations: \*, †, ‡, §, ¶, ||, #, \*\*, ††, ‡‡, §§, ¶¶, || ||, ##). List the phone number, fax number, and e-mail address of the corresponding author on the title page. (See the **Submit Online** section for information about the corresponding author designation during submission and peer review.)
3. The *Abstract* must be 250 words or less for Full-Length type manuscripts. Reference citations should not be included in the *Abstract*. The species of animals or species of origin of cells used in the manuscript must be clearly stated in the *Abstract*. Please ensure that the final few sentences (50 words or less) of the *Abstract* provide a succinct summary of the main point of the paper.
4. The *Introduction*, *Materials and Methods*, *Results*, and *Discussion* sections should begin on separate pages in that order. Do not combine the *Results* and *Discussion* sections for Full-Length papers.
  - For flow cytometry experiments, authors should specify the gating strategies in the *Methods* or in the figure legend.
  - Authors are encouraged to include the Minimal Information About T cell Assays (**MIATA**) in the *Methods*, the figure legend or elsewhere as appropriate.
5. *Acknowledgments* appear immediately after the *Discussion* and before *References*.
6. *Grant support* must NOT be included in the *Acknowledgments* but should be cited as a footnote to the title. All funding sources must be disclosed and will be published as a footnote to the title; anonymous or pseudonymous funders are not permitted.
7. *References* must be numbered as they appear in the text and should refer to primary literature rather than review articles wherever possible. All authors must be listed for each reference. If citations are included in tables or in figure legends, they must be numbered according to the position of citation of the table or figure in the text. Only published papers and papers in press may be included in the *References*. In press articles, i.e., papers not yet published, must be submitted as online attachments in PDF format at the time of article submission. NOTE: Do NOT submit as attachment papers that are already published, e.g., manuscripts published ahead of print. Such papers must be incorporated into the *References* and cited with their DOI numbers and year of publication. Citations of "manuscripts in preparation," "unpublished observations," "manuscripts posted on preprint servers," and "personal communications" must appear parenthetically in the text. Manuscripts "submitted for publication" (i.e., not yet accepted) also are mentioned parenthetically in the text. Written approval by the persons cited in personal communications must accompany the manuscript unless they are also authors of the manuscript submitted to *The JI*.

### Format for references:

- **Periodicals:** Wells, A. D., M. C. Walsh, D. Sankaran, and L. A. Turka. 2000. T cell effector function and energy avoidance are quantitatively linked to cell division. *J. Immunol.* 165: 2432–2443.
  - **Books:** McIntyre, T. M., and W. Strober. 1999. Gut-associated lymphoid tissue: regulation of IgA B-cell development. In *Mucosal Immunology*, 2nd ed. P. L. Ogra, J. Mestecky, E. Lamm, W. Strober, J. Bienenstock, and J. R. McGhee, eds. Academic Press, San Diego, CA. p. 319–356.
  - **Articles published ahead of print:** Fraser, D.A., A. K. Laust, E. L. Nelson, and A. J. Tenner. 2009. C1q differentially modulates phagocytosis and cytokine responses during ingestion of apoptotic cells by human monocytes, macrophages, and dendritic cells. *J. Immunol.* doi:10.4049/jimmunol.0902232.
8. *Footnotes* should be used to designate the source of support, new or special abbreviations used, correspondence address, current address, etc. Footnotes should be numbered consecutively and will appear on the title page, but for submission are grouped together and placed on a separate page between the *References* and the *Figure Legends*.

9. *Abbreviations* that may be used without definition are provided below. Spell out nonstandard abbreviations used less than three times. Nonstandard abbreviations used three or more times must be defined in a footnote. Abbreviations and their definitions must be consistent throughout the text.

The abbreviations listed below are used without definition in articles published in *The JI*. The form may be used for both singular and plural, or made plural with "s" at the author's option. The list of standard abbreviations is published in the first issue of each volume.

10. *Tables* must be numbered with Roman numerals in order of appearance in the text. All tables must have a title. Table legends are prepared as footnotes to the table and are included with the table. Tables must be in DOC file format. Each table should be submitted as a separate file.
11. *Figure legends* must be numbered with Arabic numerals in order of appearance in the text and should include a short title after the figure number. Where possible, symbols and patterns used to distinguish data should be defined in a key placed within the graphic rather than in the figure legend. All figure legends must specify the number of times each experiment was independently performed, as well as the number of animals or replicates in each experimental group. For flow cytometry experiments, authors should specify the gating strategies in the *Methods* or in the figure legend.
12. *Figures*: At initial submission, please submit low resolution files of the smallest possible file size that will convey the needed information. Smaller files can be downloaded more quickly by reviewers and will hasten the review process. Alternately, single PDF of text plus figures may be submitted at initial submission.

At submission of a revised manuscript, high-resolution figures that meet the following specifications must be submitted. For more information, see **GUIDELINES** and **TIPS**.

- *Color*: Color figures must be in the RGB color space.
- *File Sizes*: Figure files should not exceed 10 MB (average size is about 2 MB).
- *Image Sizes*: Figures should be submitted in final print publication size (printed 1:1). Figures may be published in print as:
  - 1-column wide: 20 picas/ 3.3"/ 8.5 cm
  - 1.5 column wide: 30 picas/ 5"/ 12.7 cm
  - 2 columns wide: 41.5 picas/ 6.9"/ 17.5 cm.

The single-column format is preferred. Unless the file size is too large, multi-panel figures should be submitted as a single file.

- *Text and Lines*: Text within figures must be 6-8 points in size, except for single letter markers, which may be 12 points. Helvetica or Arial should be used for all figure text (except for the use of symbols). Line widths must be greater than one point thick or they will not be visible on the PDF version of the article.
  - *Numbering*: Figures must be numbered to enable reviewers to know the figure number for each figure.
  - *File Format*: Figures should be in **TIFF** (better for halftone art e.g., blots, photographs) **EPS** (better for line art or monochrome art, i.e., anything that involves sharply delineated lines), or **PDF** format. PowerPoint files are not suitable quality, as their resolution is too low for print. Please click [here](#) for detailed instructions on converting PowerPoint files to TIFF files.
13. *Digital Images*: All images submitted to *The Journal of Immunology* must accurately represent the original data. Original data (digital files, autoradiographs, films, etc.) for all experiments should be fully annotated, secured, and retrievable. The *original* image file (raw data file) should be kept in an unprocessed and non-compressed file *format*. For figures that are compiled into multi-figure panels, the individual image files should be kept. For additional information, see:
- <http://jcb.rupress.org/content/166/1/11.full>
  - <http://jcb.rupress.org/content/172/1/9.full>
  - **Digital Images Dos and Don'ts**

**ANEXO C - Certificado de apresentação de pôster - 4<sup>th</sup> European Congress of Inflammation**



**CONFIRMATION OF POSTER PRESENTATION**

This is to certify that the following poster was presented at the

**4<sup>th</sup> European Congress of Immunology**  
Vienna, Austria, September 6 – 9, 2015

The participation of the urokinase-type plasminogen activator on inflammatory cell migration

*Bruno R.C. Costa, J.P. Vago, A.F. Carmo, L.C. Oliveira, L.P. Tavares, K.M. Lima, A.S. Barbosa, B.F. Brasil, L.S. Barcelos, C.A. Bonjardim, M.M. Teixeira, L.P. Sousa; Belo Horizonte, Brazil*

*(Presentation number: P.B.36.18)*

For the congress office:

  
ECI 2015  
c/oWMA Kongress Ltd.  
Alser Strasse 4  
1090 Vienna

**[www.eci-vienna2015.org](http://www.eci-vienna2015.org)**

ECI 2015 c/o WMA Ltd. • Alser Str. 4 • 1090 Vienna • Austria  
f +43 1 4051383.16 • f +43 1 4078274 • [eci2015@medacad.org](mailto:eci2015@medacad.org)

**ANEXO D - Certificado de premiação na Semana do Conhecimento 2015  
da Universidade Federal De Minas Gerais**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

**CERTIFICADO DE DESTAQUE**

Certificamos que o pôster do projeto de dissertação intitulado "Estudo da Participação do Ativador de Plasminogênio do tipo Uroquinase na Migração de Células Inflamatórias", de autoria de Bruno Rocha Cordeiro Costa, foi selecionado como melhor trabalho apresentado entre Grandes Áreas de Ciências Agrárias, Ciências Biológicas e Ciências da Saúde, na Semana do Conhecimento de 2015.

Belo Horizonte, 20 de outubro de 2015.

Prof. Rodrigo Duarte  
Pró-Reitor de Pós-Graduação



**ANEXO E - Certificado de apresentação de pôster – Gordon Research  
Conference in Plasminogen Activation & Extracellular Proteolysis**



visit us on the web at <http://www.grc.org>

**Certificate of Participation**

02/20/2016

Bruno Costa  
Universidade Federal de Minas Gerais  
Faculdade de Farmácia  
Departamento de Análises Clínicas e  
Toxicológicas  
Av. Pres. Antônio Carlos, 6627,  
Pampulha  
Belo Horizonte, Minas Gerais 31270-901  
Brazil

***This is a certificate of participation for:***  
Conference: Plasminogen Activation & Extracellular  
Proteolysis  
Dates: 02/14/2016 - 02/19/2016  
Location: Four Points Sheraton / Holiday Inn Express in  
Ventura CA United States

This letter certifies your participation as a Poster Presenter at the Gordon Research Conference on Plasminogen Activation & Extracellular Proteolysis held 02/14/2016 - 02/19/2016 at Four Points Sheraton / Holiday Inn Express in Ventura CA United States.

Presented poster titled: The participation of the urokinasetype plasminogen activator on inflammatory cell migration

Nancy Ryan Gray, PhD, President and Chief Executive Officer  
Gordon Research Conferences

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Nancy Ryan Gray', is written in a cursive style.