

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ANÁLISES CLÍNICAS E  
TOXICOLÓGICAS**

**ANA LUÍZA DE CASTRO RIBEIRO**

**O SISTEMA PLASMINOGÊNIO/PLASMINA NA RESOLUÇÃO  
DA INFLAMAÇÃO AGUDA**

Belo Horizonte – MG

2015

ANA LUIZA DE CASTRO RIBEIRO

## **O SISTEMA PLASMINOGÊNIO/PLASMINA NA RESOLUÇÃO DA INFLAMAÇÃO AGUDA**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Análises Clínicas e Toxicológicas

Área de concentração: Análises Clínicas

Orientadora: Profa. Dra. Lirlândia Pires de Sousa - UFMG

Co-orientadora: Dra. Cristiana Couto Garcia

Belo Horizonte - MG

2015

R484s Ribeiro, Ana Luiza de Castro.  
O sistema plasminogênio/plasmina na resolução da inflamação aguda / Ana Luiza de Castro Ribeiro. – 2015.  
80 f. : il.

Orientadora: Lirlândia Pires de Sousa.  
Coorientadora: Cristiana Couto Garcia.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas.

1. Inflamação – Teses. 2. Plasminogênio – Teses. 3. Macrófagos – Teses. I. Sousa, Lirlândia Pires de. II. Garcia, Cristiana Couto. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. IV. Título.

CDD:616.0473



## FOLHA DE APROVAÇÃO

### O Sistema Plasminogênio/Plasmina na Resolução da Inflamação Aguda

#### ANA LUÍZA DE CASTRO RIBEIRO

Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS, como requisito para obtenção do grau de Mestre em ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS, área de concentração ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS.

Aprovada em 23 de abril de 2015, pela banca constituída pelos membros:

  
Prof(a). Lirlândia Pires de Sousa - Orientadora  
UFMG

  
Prof(a). Cristiana Couto Garcia - Coorientadora  
Instituto Oswaldo Cruz - Fiocruz

  
Prof(a). Luci Maria Sant' Ana Dusse  
UFMG

  
Prof(a). Luciola da Silva Barcelos  
UFMG

Belo Horizonte, 23 de abril de 2015.

## **AGRADECIMENTOS**

À Prof<sup>a</sup>, Dr<sup>a</sup>. Lirlândia Pires de Sousa, pela excelente orientação, paciência e por ser exemplo de vida e profissionalismo para seus alunos.

À Dr<sup>a</sup>. Cristiana Couto Garcia, por ter sido uma co-orientadora sempre solícita e disposta a me ensinar.

À Prof<sup>a</sup>, Dr<sup>a</sup>. Ana Paula Sales Moura Fernandes, pela disponibilidade do laboratório de Biologia Molecular.

Ao Prof. Dr. Mauro Teixeira, por abrir as portas de seu laboratório de Imunofarmacologia e pela contribuição tanto material, quanto científica.

Ao Prof. Dr. Gustavo Menezes e à Prof<sup>a</sup>, Dr<sup>a</sup> Vanessa Pinho, por terem aberto as portas de seu laboratório para que eu pudesse desenvolver meu trabalho.

Ao coordenador do Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas, Prof. Dr. Vicente Toledo, e à funcionária da Secretaria de Pós Graduação, Ângela.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), por viabilizar a execução deste trabalho.

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

À Aline Alves Fortunato Carmo, por ter me acolhido tão bem e pelos preciosos auxílios para a execução deste trabalho.

À Kátia Maciel Lima, por ter sido o meu braço direito e o meu porto seguro durante esta caminhada.

À Mylena Ortiz, por ter me dado a honra de ser sua orientadora na Iniciação Científica.

À Renata Rocha, pela amizade e por ter ficado horas e horas pronta para me ajudar.

Aos colegas de laboratório, Juliana Vago, Luciana Tavares, Nathália Pietrani, Thaís de Caux, Grazielle Letícia, Fernanda Carneiro, Luíza Perucci, Michelle Adriane e Bruno Rocha pela amizade e companheirismo.

Aos colegas do laboratório de Imunofarmacologia, Izabela Galvão, Ana Letícia, Leandro Bastos, Daiane Boff, Bruno Valiate, e todos os demais, por terem sido tão solícitos e pacientes.

À Frankinéia Assis e Ilma Marçal pelo apoio técnico.

Ao meu pai, que hoje está ao lado de Deus, por ter me dado a vida e todo o seu amor e por ter me permitido trilhar esse caminho.

À minha mãe, pela minha vida e pelo seu enorme amor e amizade.

Às minhas irmãs e minha afilhada Teresa, pelo amor que me faz mais forte.

Ao meu namorado, Vinícius, por ser meu amigo e meu amor, e por me fazer acreditar que sou capaz de realizar meus sonhos.

Aos familiares e amigos, pela torcida e carinho de sempre.

À Deus, por me dar forças para continuar seguindo em frente e por ser a base de tudo.

À todas as pessoas, que de alguma forma, contribuíram para a realização deste sonho.

## RESUMO

A inflamação é um processo fisiológico que leva a alterações no tecido e pode ser induzido por agentes infecciosos ou lesões estéreis. O reconhecimento do agente lesivo por células residentes induz a produção de mediadores inflamatórios, os quais atuam no endotélio e promovem o aumento da permeabilidade vascular e recrutamento de leucócitos que, por sua vez, liberam mais mediadores pró-inflamatórios. Uma resposta inflamatória persistente pode levar a doenças crônicas ou autoimunes, de forma que é essencial a ativação de um processo anti-inflamatório, seguido de resolução, para que ocorra o retorno à homeostase tecidual. A resolução envolve o catabolismo de mediadores pró-inflamatórios, liberação de mediadores pró-resolutivos, aumento da apoptose de leucócitos e da capacidade fagocítica de corpos apoptóticos por macrófagos, processo denominado eferocitose. Diversos estudos demonstraram a capacidade dos macrófagos de adotar diferentes fenótipos e desempenhar funções importantes na progressão e resolução de doenças inflamatórias. A resposta inflamatória pode ser regulada por diversos mediadores/moléculas, como os componentes do sistema plasminogênio/plasmina (Plg/Pla) que, além de atuar na fibrinólise, desempenham papel importante na migração das células inflamatórias. Embora a capacidade da plasmina de induzir a migração de macrófagos seja bem conhecida, os perfis das células recrutadas são pouco estudados. O objetivo do presente estudo foi investigar a capacidade de Plg/Pla em induzir a migração de leucócitos para a cavidade pleural de camundongos e o perfil das células recrutadas, além de avaliar se Plg/Pla aumentam a capacidade eferocítica de macrófagos e aceleram a resolução da pleurisia induzida por LPS. Também foi analisada por western blot a expressão de anexina A1, uma proteína pró-resolutiva importante para eferocitose, em macrófagos estimulados por Plg/Pla. Além disso, foi analisada a expressão de proteínas do sistema Plg/Pla durante a pleurisia induzida por LPS. A injeção de Plg/Pla induziu um influxo tempo-dependente de células mononucleares, principalmente, macrófagos, para a cavidade pleural de camundongos, sem um aumento significativo no número de neutrófilos e linfócitos. Análises por citometria de fluxo mostraram que estas células são principalmente macrófagos de perfil anti-inflamatório (M2) e resolutivo (Mres), sem alterações no número de macrófagos com perfil pró-inflamatório (M1). Além disso, Plg/Pla aumentaram a capacidade

eferocítica de macrófagos murinos, tanto peritoneais como derivados de medula óssea. Um possível mecanismo para o aumento da eferocitose induzida por Plg/Pla foi evidenciado pela maior expressão de anexina A1 em macrófagos *in vivo* e *in vitro*. Durante a pleurisia induzida por LPS, houve aumento da expressão do Plg e do seu receptor  $\alpha$ -enolase, em consonância com os tempos de resolução da inflamação. Embora o pré ou pós-tratamento com Plg/Pla não tenha acelerado a resolução da pleurisia induzida por LPS, o Plg aumenta o número de células mononucleares na cavidade, o que merece ser investigado. Os resultados mostram que Plg/Pla atuam em pontos chave do processo de resolução (reprogramação macrofágica e eferocitose), o que pode contribuir para o processo de resolução eficiente, com conseqüente retorno à homeostase tecidual.

**Palavras-chave:** Inflamação, resolução da inflamação, sistema plasminogênio, eferocitose, reprogramação macrofágica

## ABSTRACT

Inflammation is a physiological process that leads to changes in the tissue induced by infectious agents or sterile lesions. The recognition of the harmful agent by resident macrophages leads to increased vascular permeability, leukocyte recruitment and release of pro-inflammatory mediators. A persistent inflammatory response can lead to chronic or autoimmune diseases. Thus, the occurrence of an anti-inflammatory process following of resolution to return to tissue homeostasis is essential. The resolution leads to catabolism of proinflammatory mediators, release of proresolving mediators, increased apoptosis of leukocytes and phagocytic capacity of apoptotic bodies by macrophages, a process named efferocytosis. Several studies demonstrate the ability of macrophages to adopt different phenotypes and play important roles in the progression and resolution of the disease. The inflammatory response can be regulated by several factors, such as the components of the plasminogen/plasmin system (Plg/Pla) which, besides acting in fibrinolysis, play an important role in cell migration. While the ability of the plasmin to induce the migration of cells is well known, the cellular profiles are poorly studied. This study investigated the ability of Plg/Pla in inducing leukocyte migration into the pleural cavity of mice and the profile of recruited cells, beyond to evaluated if Plg/Pla increase the efferocytic ability of macrophages and accelerate the resolution of LPS-induced pleurisy. It was also analyzed by Western blot the expression of annexin A1, which acts as a bridge molecule on recognition of phosphatidylserines present in the apoptotic bodies. In addition, we analyzed the expression of plasminogen system proteins during LPS-induced pleurisy. Injection of Plg/Pla induced a time-dependent influx of mononuclear cells, mainly macrophages, in the pleural cavity of mice without a significant increase in the number of neutrophils and lymphocytes. Analysis by flow cytometry showed that these cells are mainly macrophages of anti-inflammatory (M2) and resolving (Mres) profiles without changes in the number of macrophages with pro-inflammatory profile (M1). Furthermore, Plg/Pla increased the efferocytic capacity of both murine peritoneal macrophages and macrophage derived from bone marrow. A possible mechanism was evidenced by the increased expression of annexin A1 after Plg/Pla stimulation in vivo and in vitro. During LPS-induced pleurisy, there was increased expression of  $\alpha$ -enolase and Plg in concordance with resolution times. Although the pre or post-treatment with Plg/Pla does not accelerate the resolution of

pleurisy, Plg increases the number of mononuclear cells into the pleural cavity, what deserves to be further investigated. The results show that Plg/Pla acts in key points of inflammation resolution (macrophage skew and efferocytosis), which can contribute to the efficient resolution process and consequent return to tissue homeostasis.

**Keywords:** Inflammation, resolution of inflammation, plasminogen system, plasmin.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Série orquestrada de eventos que levam à resolução do processo inflamatório agudo. ....	22
FIGURA 2: Diferentes passos envolvidos na eliminação de células apoptóticas. ....	24
FIGURA 3: Possíveis alvos farmacológicos para desligar a inflamação aguda.....	25
FIGURA 4: Mecanismos de ativação e inativação do Sistema Plasminogênio. ....	30
FIGURA 5: Análise de populações de macrófagos por citometria de fluxo - Estratégia de <i>gates</i> .....	41
FIGURA 6: Isolamento de células mononucleares e neutrófilos humanos .....	44
FIGURA 7: Efeito da injeção intrapleural de Plasminogênio ou Plasmina na migração de leucócitos para cavidade pleural de camundongos. ....	50
FIGURA 8: Perfil dos macrófagos recrutados para cavidade pleural após a injeção de Plasmina ou Plasminogênio. ....	51
FIGURA 9: Expressão de genes envolvidos na assinatura gênica de macrófagos M1 e M2, em células obtidas do lavado pleural de camundongos estimulados com Pla .....	52
FIGURA 10: Efeito da Plasmina e do Plasminogênio na capacidade eferocítica de macrófagos.....	53
FIGURA 11: Efeito da Plasmina na capacidade eferocítica de macrófagos derivados de medula óssea em ensaio de fluorescência.....	54
FIGURA 12: Níveis da proteína AnxA1 em extratos celulares recuperados da pleura de animais após a injeção com Plg/Pla. ....	56
FIGURA 13: Efeito da plasmina na expressão de AnxA1 em células RAW 264.7. ...	56
FIGURA 14: Cinética de pleurisia induzida por LPS em camundongos e expressão de componentes do Sistema Plasminogênio.....	58
FIGURA 15: Efeito da administração de plasmina após a injeção intrapleural de LPS.....	59
FIGURA 16: Efeito do pré-tratamento com Plasmina na resolução de pleurisia induzida por LPS em camundongos.....	60

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALXR	Receptor de lipoxina A4
ANOVA	Análise de variância
AnxA1	Anexina A1
Arg1	Arginase 1
BALB/c	Linhagem de camundongos albinos BALB/c
BMDM	<i>Bone marrow – derived macrophages</i> – Macrófagos derivados de medula óssea
BSA	<i>Bovine serum albumin</i> – albumina de soro bovino
CCR-2	<i>Chemokine (C-C motif) receptor type 2</i> – Receptor de quimiocinas tipo 2
CCL-2	<i>Chemokine (C-C motif) ligand 2</i> – Quimiocina ligante tipo 2
CD206	<i>Macrophage mannose receptor</i> – Receptor de manose em macrófagos
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CFSE	<i>Carboxyfluorescein succinimidyl ester</i> - Carboxifluoresceína succinimidil éster
DAMP	<i>Damage-associated molecular patterns</i> – padrões moleculares associados ao dano
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's médium</i> - Meio de Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetilsufóxido
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ENO-1	Receptor do tipo enolase 1
EUA	Estados Unidos da América
FIZZ-1	<i>Hypoxia-induced mitogenic fator</i> – Fator mitogênico induzido por hipóxia
g	gramas
HCl	Ácido clorídrico
HPSC	<i>Human pluripotent stem cell</i> – Células-tronco pluripotentes humanas
H2B	Histona classe 2B
iNOS	<i>Inducible nitric oxide synthase</i> – sintase indutível do óxido nítrico

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
mL	Mililitro
mM	Milimolar
MMP-9	Metaloproteinase-9
Mres	Macrófago resolutivo
mRNA	RNA mensageiro
M1	Macrófago tipo 1
M2	Macrófago tipo 2
MØ	Macrófagos
NaCl	Cloreto de sódio
NaF	Fluoreto de sódio
NaVO <sub>3</sub>	Vanadato de sódio
ng	nanogramas
NO	Óxido nítrico
PAI ( )	Inibidor do ativador de plasminogênio ( )
PAMP	<i>Pathogen associated molecular pattern</i> – padrão molecular associado a patógenos
PAR-1	<i>Protease-activated receptor 1</i> – Receptor ativado por protease tipo 1
PBS	<i>Phosphate-Buffered Saline</i> – Tampão fosfato salina
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> – Reação em cadeia da polimerase
Pla	Plasmina
Plg	Plasminogênio
PlgKO	Camundongo com deleção do gene de plasminogênio
PlgR-KT	Receptor de plasminogênio tipo KT
PMN	Polimorfonuclear
PMSF	<i>Phenylmethylsulphonyl fluoride</i> – fenilmetilsulfonilfluoreto

p11	Proteína 11
RAW	Linhagem de macrófagos murinos
ROS	Espécie reativa de oxigênio
rpm	Rotações por Minuto
RPMI	Meio <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i> - Dodecil sulfato de sódio
TGF	<i>Transforming growth factor</i> – fator de crescimento transformante
LTh	Célula T auxiliar
TLR	<i>Toll like receptor</i> – receptor do tipo Toll
TNF- $\alpha$	<i>Necrosis Factor alpha</i> – fator de necrose tumoral alfa
TNF- $\beta$	<i>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
V	Volts

## LISTA DE SÍMBOLOS

$\alpha$	Alfa
$\beta$	Beta
$\varepsilon$	Épsilon
$\gamma$	Gama
$^{\circ}\text{C}$	Grau centígrado
$\mu$	Micro
%	Porcentagem

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E RELEVÂNCIA .....	17
2 REVISÃO DA LITERATURA .....	19
2.1 Resposta inflamatória.....	19
2.2 Resolução da Resposta Inflamatória.....	20
2.3 O papel dos macrófagos na progressão e resolução da resposta inflamatória. .....	26
2.4 Sistema Plasminogênio/Plasmina .....	28
2.5 Evidências do envolvimento do Sistema Plasminogênio/Plasmina na resolução da inflamação .....	31
3 JUSTIFICATIVA DO ESTUDO .....	35
4 OBJETIVOS .....	36
4.1 Objetivo Geral .....	36
4.2 Objetivos Específicos .....	36
5 MATERIAIS E MÉTODOS.....	37
5.1 Animais .....	37
5.2 Migração de leucócitos induzida por plasmina para a cavidade pleural de camundongos e modelo de pleurisia induzida por LPS.....	37
5.3 Tratamentos dos animais .....	37
5.4 Lavado Pleural .....	38
5.4.1 Análise da população de macrófagos por citometria de fluxo .....	39
5.4.2 Obtenção dos extratos proteicos.....	41
5.4.3 Quantificação de proteínas dos extratos proteicos .....	42
5.4.4 Western Blot para análise da expressão de AnxA1 e dos componentes do Sistema Plasminogênio/Plasmina .....	42
5.5 Ensaio de eferocitose por microscopia óptica .....	43
5.5.1 Isolamento e tratamento de macrófagos peritoneais murinos.....	43
5.5.2 Isolamento de neutrófilos e indução de apoptose .....	43
5.5.3 Co-cultura de macrófagos e neutrófilos apoptóticos .....	45
5.6 Ensaio de eferocitose por microscopia de fluorescência.....	45
5.6.1 Isolamento de BMDM (Macrófagos murinos derivados de medula óssea) 45	
5.6.2 Isolamento de neutrófilos, indução de apoptose e marcação com CFSE. 46	
5.6.3 Co-cultura de BMDM e neutrófilos apoptóticos marcados .....	46
5.6.4 Marcação celular com F4/80 e DAPI.....	46

5.6.5	Análise por microscopia de fluorescência .....	47
5.7	Cultura de células.....	47
5.7.1	Indução da reprogramação de macrófagos <i>in vitro</i> .....	47
5.7.2	Avaliação da expressão de AnxA1 por Western Blot em extrato de células RAW estimuladas por Plg e Pla .....	48
5.8	Análises estatísticas .....	48
6	RESULTADOS .....	50
6.1	Plasmina e Plasminogênio induzem o recrutamento de células mononucleares para a cavidade pleural de camundongos.....	50
6.2	A análise por citometria de fluxo das células mononucleares recrutadas por Plg/Pla mostra que essas são principalmente macrófagos de perfil anti-inflamatório e resolutivo.....	51
6.3	A Pla induz aumento na expressão dos marcadores de macrófagos M2, CD206 e Arginase-1, sem alterar a expressão de iNOS, um marcador de macrófagos de perfil M1 .....	52
6.4	Plg e Pla aumentam a capacidade eferocítica de macrófagos peritoneais murinos .....	53
6.5	Plasmina aumenta a capacidade eferocítica de macrófagos murinos isolados de medula óssea (BMDMs).....	54
6.6	O recrutamento de células para a cavidade pleural após injeção de Plg/Pla é acompanhado pelo aumento da expressão de AnxA1 .....	55
6.7	O tratamento de células RAW 264.7 com plasmina aumenta a expressão de AnxA1.....	56
6.8	A resolução natural da pleurisia induzida por LPS é acompanhada pelo aumento de células mononucleares e maior expressão de $\alpha$ -enolase e plasminogênio.....	57
6.9	A injeção de Plg/Pla, em animais com processo inflamatório estabelecido, não altera o curso da inflamação aguda .....	58
6.10	O pré-tratamento de camundongos com plasmina não acelera o processo de resolução da pleurisia induzida por LPS .....	59
7	DISCUSSÃO .....	61
8	CONCLUSÕES .....	69
9	PERSPECTIVAS .....	70
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	71
	ANEXO A – Certificado do Comitê de Ética em Experimentação Animal.....	79
	ANEXO B - Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos .....	80

## 1 INTRODUÇÃO E RELEVÂNCIA

A resposta tecidual a uma lesão, seja ela estéril ou causada por patógeno, é denominada inflamação, um processo caracterizado principalmente pela liberação de mediadores inflamatórios, alterações vasculares e migração de leucócitos para o local inflamado. Um processo inflamatório não controlado e persistente pode ser causa de doença inflamatória crônica, sistêmica ou autoimune, com eventual perda de função do órgão afetado. Portanto, é essencial que sejam ativados mecanismos anti-inflamatórios e pró-resolutivos para que a homeostase tecidual seja restabelecida. A resolução da inflamação é um processo ativo e altamente regulado, que requer a ativação de um programa endógeno que envolve o catabolismo de mediadores pró-inflamatórios, ativação de moléculas pró-resolutivas e apoptose de leucócitos polimorfonucleares seguida de fagocitose (eferocitose) por macrófagos. Diversos estudos têm mostrado a capacidade dos macrófagos de adotar diferentes fenótipos, frente a uma variedade de estímulos. Os macrófagos têm papel central em regular a inflamação local, atuando inicialmente na instalação do processo inflamatório como a primeira linha de defesa frente às lesões (infecciosas ou estéreis) e, posteriormente, na resolução da inflamação promovendo o restabelecimento da homeostasia tecidual.

O Sistema Plasminogênio/Plasmina (Plg/Pla) tem um papel fundamental na manutenção da patência vascular através da degradação dos coágulos de fibrina pela enzima ativa, a plasmina (Pla). A identificação de receptores de Plg/Pla em muitos tipos celulares, como em macrófagos, juntamente com a habilidade da plasmina em degradar proteínas da matriz extracelular, sugeriu a participação desta protease na migração celular, sendo este um evento importante tanto em processos fisiológicos (embriogênese, cicatrização de feridas e angiogênese) quanto patológicos (crescimento e disseminação de tumores e doenças inflamatórias).

Nos últimos anos, o conhecimento dos mecanismos de ação de moléculas indutoras da resolução tem permitido um melhor entendimento desta fase da inflamação e fez surgir novas abordagens no desenvolvimento de estratégias farmacológicas para tratar a inflamação de maneira diferente das que conhecemos atualmente, as quais inibem a fase produtiva da inflamação. Estudos recentes, incluindo do nosso grupo de pesquisa, mostraram um envolvimento de componentes do sistema Plg/Pla em

alguns pontos chave da resolução do processo inflamatório, como na migração de células mononucleares e no processo de reparo tecidual como a cicatrização de feridas. No entanto, não é conhecido o perfil fenotípico das células mononucleares recrutadas por Plg e Pla nem o papel desses componentes na resolução da inflamação.

No presente estudo, buscou-se estudar a participação do sistema Plg/Pla em alguns eventos importantes para o processo de resolução da inflamação aguda, utilizando um modelo inflamatório de auto-resolução em camundongos. Dessa forma, diante do complexo mecanismo envolvido no recrutamento celular e na manutenção de células em sítios inflamatórios, o estudo dos diversos fatores envolvidos no acúmulo de células nesses sítios, bem como o perfil das células presentes, poderão contribuir para a identificação de indutores mais eficazes de resolução e definir vias moleculares envolvidas no processo. Além disso, poderá sinalizar se esses processos são passíveis de modulação por meio do desenvolvimento de novos fármacos.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Resposta inflamatória

A inflamação é uma resposta biológica complexa a estímulos nocivos, tais como organismos patogênicos ou lesão tecidual estéril, no qual várias células e mediadores químicos participam para neutralizar o elemento prejudicial e iniciar o processo de cura com restabelecimento da homeostasia tecidual. O processo inflamatório é caracterizado pelos sinais cardinais descritos no século I por Cornelius Celsus, sendo eles, calor (associado com o aumento fluxo sanguíneo e hipertermia - aumento da temperatura corporal), rubor (vermelhidão, devido à hiperemia), tumor (inchaço, causado por aumento da permeabilidade microvascular e extravasamento de proteínas para o espaço intersticial), e dor (em parte devido a alterações nas terminações nervosas). Além desses sinais, pode haver a perda de função do órgão, descrita por Rudolf Virchow no século XIX, associada à disfunção celular envolvida neste processo. Esses sinais cardinais estão intimamente relacionados a eventos vasculares e celulares que ocorrem no sítio da lesão, como liberação de moléculas solúveis pró-inflamatórias pelas células do tecido inflamado, bem como pelos leucócitos recrutados, vasodilatação decorrente da ação desses mediadores e lesão tecidual (Cotran *et al.*, 1999; Medzhitov, 2010; Sousa *et al.*, 2013).

O processo inflamatório se inicia com o reconhecimento de padrões moleculares por receptores da imunidade inata como os Toll Like Receptors (TLRs) e os inflamassomas. Esses padrões podem estar presentes em células residentes dos tecidos, sendo esses relacionados a lesões (DAMPs, do inglês- *Damage-associated molecular patterns*) e liberados como resultado do estresse e lesão celular ou por morte celular não fisiológica, como por exemplo, o ácido úrico. Além disso, há também o reconhecimento de padrões relacionados a patógenos (PAMPs, do inglês- *Pathogen-associated molecular patterns*), como endotoxina bacteriana e ácidos nucléicos virais. A partir desse reconhecimento, cascatas de sinalização são ativadas dentro das células, levando à produção de substâncias pró-inflamatórias como os mediadores lipídicos: leucotrienos, prostaglandinas e prostaciclina, bem como mediadores proteicos: enzimas, citocinas, quimiocinas, moléculas de adesão e proteases. A ação desses mediadores inflamatórios leva ao aumento de

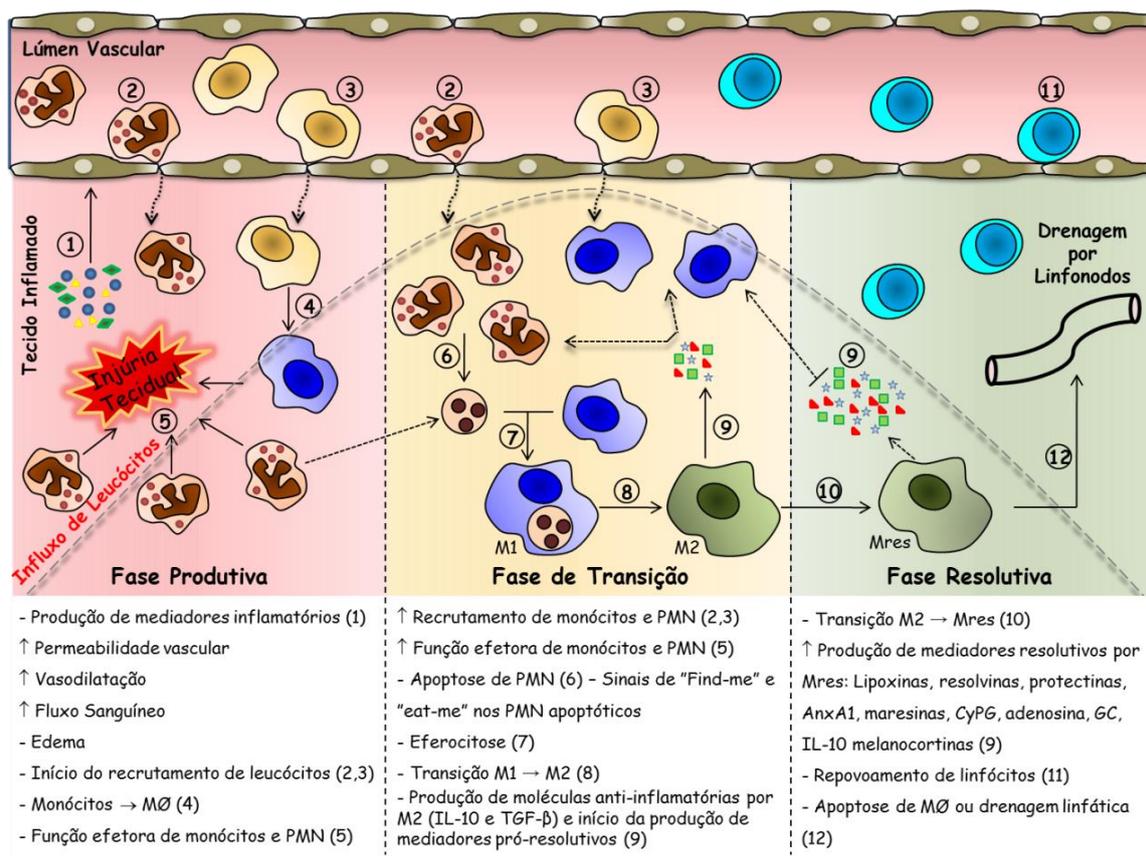
permeabilidade vascular, ativação de células endoteliais e como consequência, ocorre recrutamento leucocitário para o local da lesão. Esses leucócitos, principalmente os polimorfonucleares (PMN), que são frequentemente os primeiros a serem recrutados, são então ativados, de forma que possam exercer suas atividades efetoras com eliminação do estímulo nocivo, seja ele de natureza infecciosa ou não. Outras células como os monócitos são também recrutadas para o sítio inflamatório e contribuem não somente para remoção do estímulo, bem como para a transição e início do processo resolutivo (Savill, 1997; Gilroy *et al.*, 2004; Norling & Serhan, 2010; Isobe *et al.*, 2012; Alessandri *et al.*, 2013).

## **2.2 Resolução da Resposta Inflamatória**

A resposta inflamatória é um mecanismo complexo de defesa do organismo frente à ação de patógenos ou lesões estéreis, essencial para a eliminação do estímulo nocivo. Porém, um processo inflamatório persistente e intenso ou mal resolvido pode levar a doenças autoimunes e crônicas, bem como fibrose e lesões permanentes no tecido. Desta forma, é imprescindível que ocorram eventos que levem a um estado de anti-inflamação, com posterior resolução do processo inflamatório e retorno à homeostasia tecidual (Medzhitov, 2010; Norling *et al.*, 2010; Sousa *et al.*, 2013). Na fase produtiva da inflamação, mediadores atuam promovendo vasodilatação e consequente aumento do fluxo sanguíneo local, além de modificar a permeabilidade do endotélio. Estes eventos são acompanhados por hiperemia e exsudação de proteínas plasmáticas e de líquidos (edema). As células endoteliais também são ativadas e expressam moléculas de adesão celular (selectinas e integrinas) e apresentam mediadores quimioatrativos, que permitem a captura e extravasamento de leucócitos.

Leucócitos polimorfonucleares são as primeiras células que migram para os tecidos inflamados, seguidos por células mononucleares. Com a progressão da resposta inflamatória, há intenso influxo de leucócitos para o tecido inflamado. Estas células podem ser ativadas e se tornarem uma fonte importante de uma variedade de mediadores, incluindo fatores de crescimento, citocinas, quimiocinas, mediadores lipídicos e espécies reativas de oxigênio (ROS), o que permitirá que os leucócitos exerçam as suas funções efetoras nos tecidos. Na fase de transição da inflamação,

apesar do intenso acúmulo de PMNs, sob a ação de sinais pró-resolutivos (mediadores pró-resolutivos e modulação dos agentes modificadores da sobrevivência celular) inicia-se a apoptose, seguida de fagocitose por macrófagos teciduais (eferocitose). Este processo envolve vários sinais que levam à atração, ligação e remoção de células apoptóticas por macrófagos. Durante a eferocitose, macrófagos mudam seu fenótipo de M1 para M2. Macrófagos M2 (ou M2 like) são altamente eferocíticos e produzem moléculas anti-inflamatórias (tais como a IL-10 e TGF- $\beta$ ) e mediadores pró-resolutivos. Tais mediadores têm o potencial para inibir o recrutamento adicional de PMN, intensificar a migração de monócitos e amplificar a eferocitose. Os macrófagos M2 se modificam para macrófagos resolutivos (Mres), os quais apresentam capacidade fagocítica reduzida, mas, no entanto, produzem proteínas anti-fibróticas e antioxidantes que limitam a lesão tecidual e fibrose. Tais eventos pavimentam o caminho para a fase de resolução da inflamação. O aumento da produção de citocinas anti-inflamatórias, de mediadores pró-resolutivos e anti-fibróticos por macrófagos resolutivos (Mres), repovoamento por linfócitos e apoptose de macrófagos ou drenagem destas células para os linfonodos locais encerram o processo inflamatório e restauram a homeostase do tecido (Alessandri *et al.*, 2013) A **Figura 1** descreve essa série de eventos que conduzem a uma resposta resolutiva eficiente.



**FIGURA 1 - 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.

Fonte: Adaptado de Alessandri *et al.* (2013)

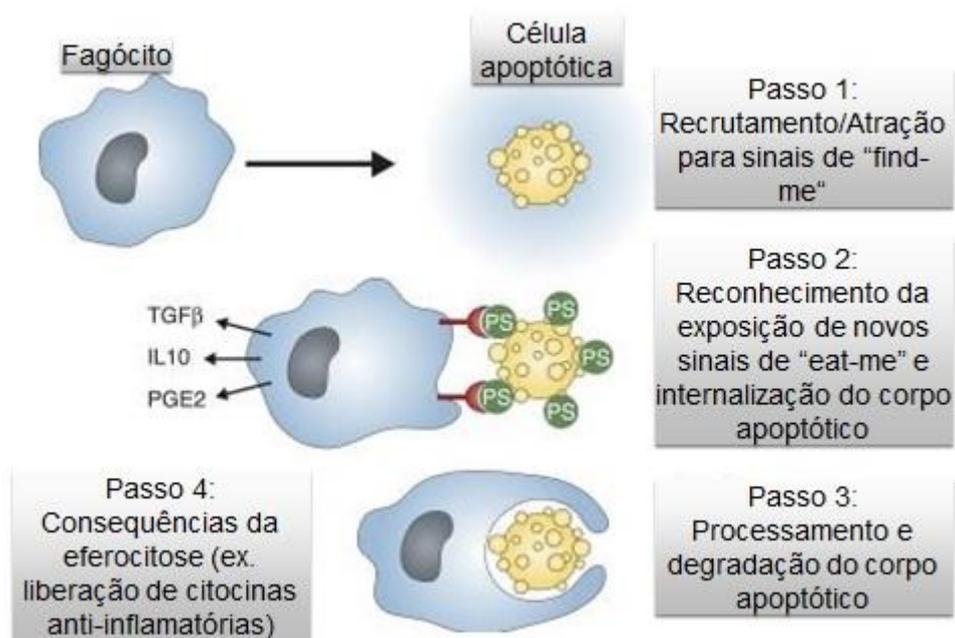
Essa resposta imune inicial é benéfica e culmina no controle e destruição de patógenos e corpos estranhos. Depois da eliminação do agente responsável pela injúria, o recrutamento de leucócitos cessa e as células já recrutadas são eliminadas (Poon *et al.* 2014). Os eventos que conduzem à resolução da resposta inflamatória

para retorno da homeostase tecidual são caracterizados por produção de inibidores da inflamação e de mediadores pró-resolutivos como, lipoxinas, resolvinas, maresinas, protectinas, melanocortinas, anexina A1 e interleucina 10 (IL- 10), os quais atuam promovendo diminuição do recrutamento de PMN, apoptose dos leucócitos presentes no sítio da inflamação, aumento de eferocitose de corpos apoptóticos por macrófagos, bem como o recrutamento não inflamatório de macrófagos, o que amplifica o *clearance* dos corpos apoptóticos (Gilroy *et al.*, 2004; Norling & Serhan, 2010; Alessandri *et al.*, 2013; Sousa *et al.*, 2013).

A detecção e eliminação de células apoptóticas por eferocitose (**Figura 2**) é importante para a manutenção da homeostasia tecidual e promove uma resposta anti-inflamatória, bem como tolerância imunológica. Esse evento tem grande importância, por exemplo, na resposta imune a tumores. Se por um lado, o reconhecimento e eliminação de células tumorais apoptóticas pode promover uma resposta imunogênica e imunidade antitumoral, defeitos no *clearance* de corpos apoptóticos estão relacionados a diversas doenças inflamatórias e autoimunes (Poon *et al.*, 2014).

Vários sinais no ambiente inflamatório, incluindo aqueles vindos de células em processo de morte, podem influenciar a eficácia eferocítica por agirem como inibidores imediatos ou indutores desta, ou ainda por alterarem a programação de fenótipos de macrófagos através de efeitos em longo prazo (Korns *et al.*, 2011). Moléculas como anexina A1 (AnxA1), uma proteína de 37-kDa que se liga a fosfolípidos de membrana de forma dependente de cálcio, parecem favorecer o processo de eferocitose, aumentando o *clearance* de células apoptóticas (Dalli *et al.*, 2011; Vago *et al.*, 2012). Scannel *et al.* (2007) demonstraram que AnxA1 e seus derivados peptídicos são liberados de células apoptóticas e promovem a eferocitose por macrófagos e, dessa forma, podem contribuir para resolução da inflamação. A AnxA1 também age em outros pontos-chave do processo resolutivo, como a prevenção do extravasamento transendotelial de PMN, além da indução da apoptose dos PMNs que já migraram para o tecido, bem como a diminuição da liberação de citocinas pró-inflamatórias e aumento da citocina anti-inflamatória IL-10 (Perretti & D'aquisito, 2009; Sousa *et al.*, 2013; Perez *et al.*, 2014). Já foi demonstrado que a AnxA1 atua como uma molécula-ponte para o reconhecimento dos fosfolípidos de membrana expostos nas células apoptóticas por macrófagos,

através do receptor ALX (ALXR) presente nessas células (Scannel *et al.*, 2007, McArthur *et al.*, 2010).

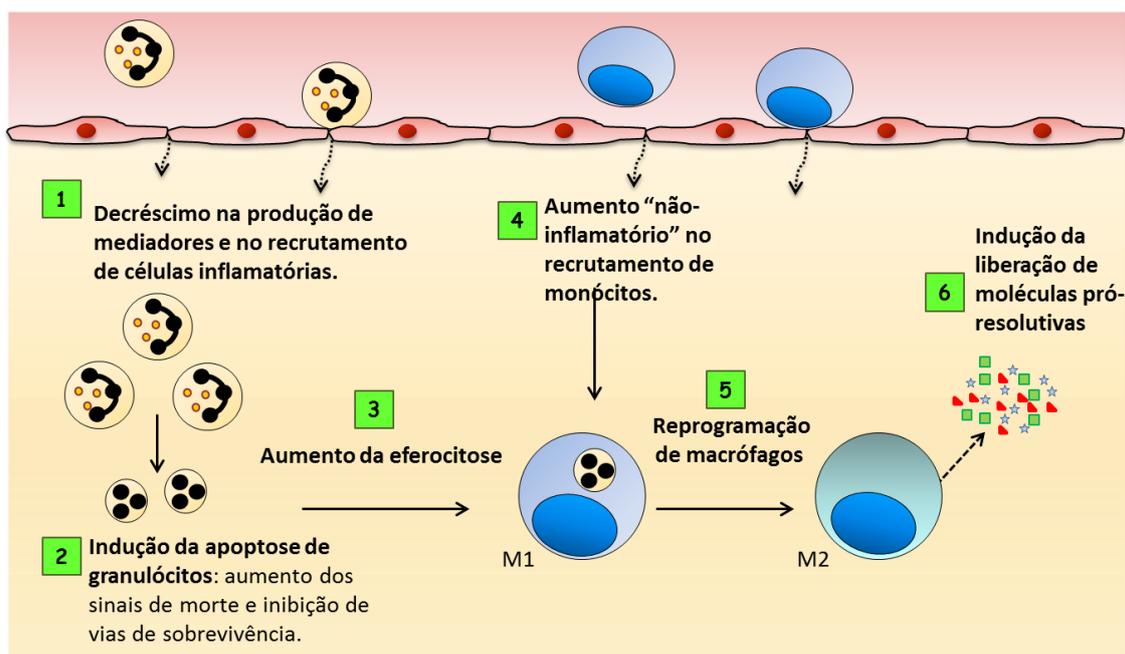


**FIGURA 2- Diferentes passos envolvidos na eliminação de células apoptóticas.** Os sinais de "find-me" (como baixos níveis de nucleotídeos ATP e UTP, fractalcina, lisofosfatidilcolina ou esfingosina 1-fosfato) liberados pelas células apoptóticas ajudam a atrair fagócitos para as proximidades das células que estão sofrendo apoptose. Os fagócitos utilizam os receptores de fagocitose em sua superfície que reconhecem os sinais de "eat-me" das células apoptóticas. O acoplamento dos receptores (ligados ao reconhecimento da fosfatidilserina) estimula a liberação de citocinas anti-inflamatórias, tais como TGF-  $\beta$ , IL-10 e prostaglandina E2 (PGE2). A sinalização intracelular induzida dentro do fagócito pelas interações ligante-receptor conduz a rearranjos do citoesqueleto e internalização da célula em apoptose. O fagócito internaliza os corpos apoptóticos por uma série de passos, e a digestão apropriada parece ser importante para a absorção continuada de outras células apoptóticas pelos fagócitos.

Fonte: Adaptado de Ravichandran, 2010

Embora o conhecimento e caracterização de moléculas com propriedades pró-resolutivas, como as citadas anteriormente, tenha tido um avanço considerável desde a introdução do conceito de resolução (Senhan *et al.*, 2007), provavelmente vários mediadores pró-resolutivos endógenos ainda permanecem desconhecidos. Agonistas da resolução poderiam atuar inibindo o recrutamento exagerado de PMN para o sítio da lesão, bem como reduzindo a liberação de mediadores pró-

inflamatórios por essas células. Além disso, poderiam induzir a apoptose de PMNs de forma a evitar formas de morte celular que levam ao extravasamento de material citoplasmático tóxico para os tecidos. O aumento de eventos de eferocitose poderia ocorrer indiretamente pela indução de apoptose de PMNs, bem como pelo aumento da expressão de proteínas relacionadas ao processo eferocítico. Da mesma forma, um aumento no recrutamento de monócitos para o local inflamado, além de uma reprogramação macrofágica *in situ* de macrófagos pró-inflamatórios para macrófagos com características anti-inflamatórias e resolutivas poderia acelerar o processo de resolução. Algumas moléculas liberadas por macrófagos resolutivos como, por exemplo, Lipoxinas agem em todos os pontos descritos para induzir a resolução da inflamação (Sousa et al., 2013). A **Figura 3** descreve os possíveis alvos de atuação dos agonistas endógenos ou exógenos que promovem a resolução da inflamação.



**FIGURA 3 - Possíveis alvos farmacológicos para desligar a inflamação aguda.** Alguns pontos no processo de resolução (números em verde) podem ser explorados terapeuticamente.

Fonte: Adaptado de Sousa *et al.* (2013)

A ação conjunta de células fagocíticas, como neutrófilos, monócitos e macrófagos, é crucial para a eliminação efetiva do agente nocivo responsável pela lesão, mas também de restos celulares presentes no sítio da inflamação, de forma a restaurar a

homeostase tecidual. Os neutrófilos são células de vida curta, recrutadas no início da resposta inflamatória, que utilizam vários mecanismos para eliminação do agente nocivo, alguns dos quais são potencialmente prejudiciais ao hospedeiro. Por outro lado, os macrófagos podem ser caracterizados em diversas subpopulações com características funcionais e fenotípicas distintas, com papéis fisiológicos não completamente definidos, mas que podem ter diferentes funções durante a homeostase, inflamação e sua resolução (Soehnlein & Lindbon, 2010).

### **2.3 O papel dos macrófagos na progressão e resolução da resposta inflamatória.**

Os macrófagos são células que compõem o sistema fagocitário mononuclear junto com as células dendríticas e representam a primeira linha de defesa frente às lesões nos tecidos, onde estão localizados como células residentes, como por exemplo, as células de Kupffer no fígado e Langerhans na pele (Labonte *et al.*, 2013, Davies *et al.*, 2013). Os macrófagos são programados transcricionalmente pela ativação por DAMPs, PAMPs e mudanças no microambiente tecidual e são essenciais para a manutenção da homeostasia, tendo papel central na regulação da inflamação local (Lichtnekert *et al.* 2013). Diversos estudos têm mostrado a capacidade dos macrófagos de adotar diferentes fenótipos, em resposta a uma variedade de estímulos, quando desempenham funções chave, tanto na progressão, quanto na resolução de processos inflamatórios (Labonte *et al.*, 2013; Lichtnekert *et al.* 2013; Canton, 2014). De acordo com o estímulo, vias de sinalização são ativadas nessas células, de forma a direcioná-las para diferentes fenótipos, processo denominado de polarização macrofágica. Esses diferentes fenótipos podem ser protetores durante a homeostasia ou doenças, bem como podem aumentar a patogenicidade e levar a progressão/cronificação de doenças (Labonte *et al.*, 2013; Canton, 2014).

Durante o início da inflamação, macrófagos apresentam um perfil pró-inflamatório com produção de citocinas e quimiocinas que induzem o recrutamento de leucócitos para o local da lesão. No entanto, estas células podem promover lesão tecidual como efeito secundário. Por outro lado, durante a fase de transição para o processo de resolução e no processo resolutivo em si, os macrófagos promovem um retorno à homeostase por meio da remoção de células apoptóticas e debris celulares, da produção de citocinas anti-inflamatórias e de mediadores pró-resolutivos.

Contribuem, ainda, com diversas etapas do processo de cicatrização tecidual como, por exemplo, a angiogênese (Soehnlein & Lindbon, 2010; Korn *et al.*, 2011).

A fagocitose de células apoptóticas por macrófagos (eferocitose) é um processo crítico para o programa de resolução. Um defeito no *clearance* de células apoptóticas pode levar a necrose secundária dessas células, com liberação de conteúdo extracelular para o microambiente tecidual e posterior ativação de eventos inflamatórios prejudiciais ao tecido. Esse defeito está associado a muitas doenças inflamatórias autoimunes e crônicas (Duffin *et al.*, 2010; Nathan e Ding, 2010; Poon *et al.*, 2014). Além disso, ensaios *in vitro* e *in vivo* demonstram que os fagócitos que eferocitam granulócitos apoptóticos alteram seu fenótipo para um fenótipo mais pró-resolutivo, o que modula a resposta inflamatória (Revisto por Ariel & Serhan, 2012, Sousa *et al.*, 2013).

O eixo de polarização M1/M2 foi originalmente nomeado devido à relação com a polarização Th1/Th2 de respostas imunes. Esse tipo de classificação se refere à ativação de macrófagos pelas vias clássica ou alternativa, respectivamente (Labonte *et al.*, 2013). No entanto, esses conceitos de fenótipos macrofágicos usualmente utilizados, como M1, M2 e Mres são simplificados, visto que os macrófagos possuem uma plasticidade evidente, com marcadores e funções prontamente responsivas a sinais externos, o que dita a existência de diversos fenótipos frente a estímulos distintos (Korn *et al.*, 2011). Aderindo-se a este modelo, os macrófagos teciduais residentes são classificados como 'M2-like', com papel fundamentalmente relacionado ao desenvolvimento e manutenção da homeostase e resolução da inflamação (Davies *et al.*, 2013). Estudos sugerem que a ativação da via clássica é estimulada por produtos microbianos ligantes de receptores do tipo Toll (TLRs) e fatores associados à resposta Th1, como IFN- $\gamma$ , LPS e TNF- $\alpha$ , o que resulta em macrófagos do tipo M1. Os macrófagos M1 são caracterizados por alta atividade fagocítica, essencial para eliminação do agente nocivo e apresentação de antígenos, mas possuem baixa capacidade eferocítica; alta produção de IL-12 e IL-23 e espécies reativas de oxigênio (ROS), além de outras citocinas envolvidas no processo inflamatório, como TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-6 (Frankenberger *et al.*, 1996; Geissmann *et al.*, 2003; Auffray *et al.*, 2007; Labonte *et al.*, 2013; Lichtnekert *et al.*, 2013). Além disso, os macrófagos do tipo M1 não induzem rapidamente a produção

de arginase, o que resulta na produção de óxido nítrico, utilizado por essas células para inativar e matar patógenos (Briken & Mosser, 2011).

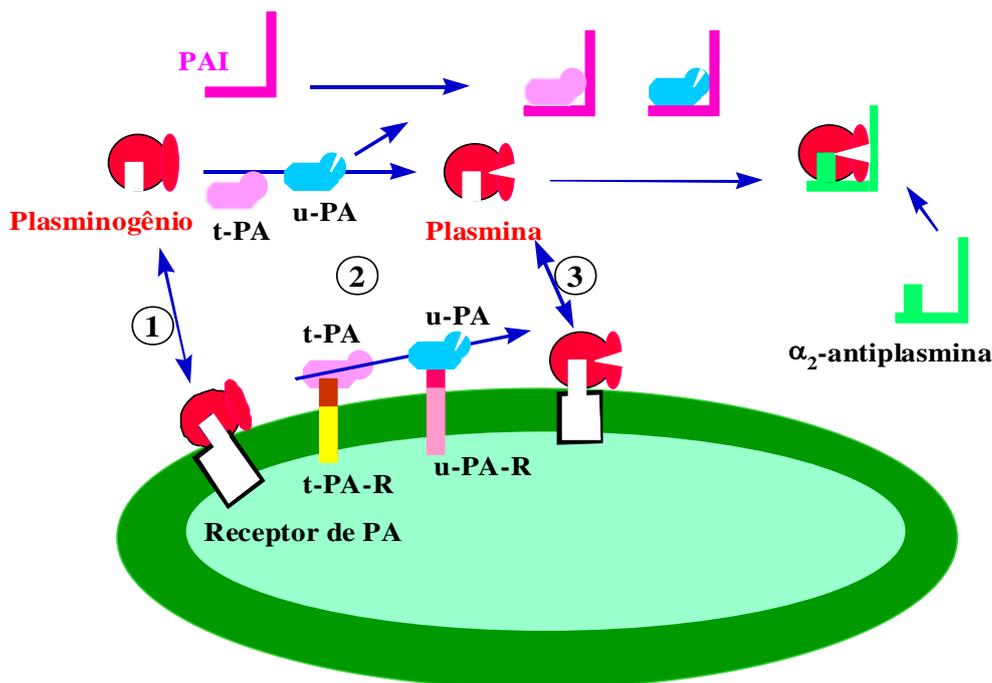
Os macrófagos ativados pela via alternativa (M2) são conhecidos por seu perfil anti-inflamatório e por serem capazes de promover remodelamento tecidual. Possuem alta capacidade de eferocitose, além de induzirem a expressão de moléculas de superfície, como Dectina-1 e receptor de manose (CD206), dentre outros, e promoverem a liberação de substâncias com características anti-inflamatórias, como IL-10 e TGF- $\beta$ , e moléculas pró-resolutivas. Os macrófagos do tipo M2 desempenham várias funções que diferem do processo inflamatório agudo, incluindo resolução da inflamação, citoproteção, promoção de angiogênese, regeneração tecidual, remodelamento e reabsorção de matriz. Estudos genéticos mostram diversas assinaturas da ativação alternativa para M2, incluindo arginase-1 (arg-1), uma enzima que inibe a produção de óxido nítrico e permite, então, a produção de ornitina, molécula precursora de hidroxiprolina e poliaminas, além de CD206 (receptor de manose) (Gordon & Taylor, 2005; Soehnlein & Lindbon, 2010; Korn *et al.*, 2011; Ariel & Serhan, 2012; Labonte *et al.*, 2013; Briken & Mosser, 2011). Em um estágio mais tardio do processo, os macrófagos M2 se modificam para macrófagos resolutivos (Mres), que têm capacidade fagocítica reduzida, mas produzem proteínas anti-fibróticas e antioxidantes, o que limita a lesão tecidual e fibrose (Ariel & Serhan, 2011). Portanto, macrófagos resolutivos são aqueles que apresentam atividade citoprotetora e funções de regeneração tecidual (Lichtnekert *et al.* 2013). Esses macrófagos diferem quanto ao perfil de expressão de citocinas e quimiocinas e são induzidos por sinais incluindo IL-10, hormônios glicocorticóides, moléculas associadas à lesão celular, apoptose e imunocomplexos. São normalmente importantes na resolução por prevenirem lesão tecidual e promoverem o reestabelecimento da homeostase (Alessandri *et al.*, 2013; Lichtnekert *et al.* 2013).

## **2.4 Sistema Plasminogênio/Plasmina**

O sistema plasminogênio/plasmina inclui uma pró-enzima inativa, o plasminogênio (Plg), zimógeno da serina protease plasmina (Pla), sintetizado no fígado e presente em altas concentrações (~ 2 $\mu$ M) no plasma e fluidos extracelulares (Syrovets *et al.*, 2012). A conversão proteolítica do zimógeno plasminogênio (Plg) à plasmina ativa

(Plá) é um mecanismo usado extensivamente para a geração de atividade proteolítica extracelular de forma a contribuir primariamente para a degradação dos coágulos de fibrina e também para a degradação de matriz extracelular e remodelamento do tecido conjuntivo. A degradação da fibrina é essencial para prevenir a oclusão parcial ou total da luz do vaso sanguíneo, de forma a evitar eventos trombóticos no organismo. A atividade proteolítica de matriz celular facilita a migração e invasão celular em processos patológicos, como na inflamação e metástase e em processos fisiológicos, como na angiogênese, formação de nervos e cicatrização de feridas (Rosenwald et al., 2012, Wygrecka et al., 2012; Syrovets et al., 2012).

A conversão do plasminogênio em plasmina é exercida pelos dois ativadores fisiológicos de Plg: ativador de Plg tipo tecidual (t-PA) e ativador de Plg tipo uroquinase (u-PA), sendo que a ativação pelo primeiro leva principalmente à lise de coágulos de fibrina no sangue, enquanto uPA está envolvido na conversão do Plg na superfície celular, juntamente com seu receptor u-PAR, em processos como a migração celular e tumorigênese (Rosenwald et al., 2012; Díaz-Ramos et al., 2012). A atividade de plasmina é rigorosamente controlada pelos inibidores de ativadores de plasminogênio (PAI-1 e PAI-2), e pela  $\alpha$ 2-antiplasmina (**Figura 4**).



**FIGURA 4 - Mecanismos de ativação e inativação do Sistema Plasminogênio.** A reação 1 mostra equilíbrio entre o plasminogênio livre e ligado à superfície celular. A afinidade da ligação favorece substancialmente a ocupação da superfície celular pelo plasminogênio. Na reação 2, o plasminogênio ligado à célula é ativado à plasmina pelos ativadores do plasminogênio u-PA e t-PA, os quais estão associados aos seus respectivos receptores de superfície celular (u-PAR e t-PAR). A ativação é substancialmente mais eficiente para os reagentes ligados à superfície celular que aqueles não ligados. Na reação 3, a plasmina é exposta ao seu inibidor primário, a  $\alpha_2$ -antiplasmina, o qual inativa a plasmina livre muito mais rapidamente que a ligada. O inibidor do ativador de Plg (PAI) se liga ao t-PA ou u-PA e impede a conversão de plasminogênio à plasmina.

Fonte: Adaptado de Plow *et al.* (1995).

Os sítios de ligação para Plg, t-PA e u-PA foram identificados em uma variedade de tipos celulares, incluindo monócitos, linfócitos, granulócitos, fibroblastos e células endoteliais. Esses sítios incluem receptores do tipo enolase-1 (ENO-1), anexina A2, p11, histona H2B e gangliosídeos. Esses receptores são proteínas de superfície celular com resíduos de lisina C-terminal expostos, ou gerados após clivagem. O sítio de ligação à lisina associada ao domínio “Kringle” do Plg reconhece preferencialmente essas lisinas carboxi-terminais. (Revisto por: Plow, Doeuvre, Das, 2012; Miles & Parmer, 2013).

## 2.5 Evidências do envolvimento do Sistema Plasminogênio/Plasmina na resolução da inflamação

Além do papel já bem estabelecido na degradação de coágulos de fibrina, o sistema Plg/Pla também está envolvido na fase produtiva de respostas inflamatórias. Estudos mostraram que a expressão de genes que codificam fibrinogênio, PAI-1, t-PA, u-PA, u-PAR e  $\alpha$ -enolase são regulados por moléculas induzidas durante a resposta inflamatória local e/ou durante a resposta de fase aguda sistêmica em processos como injúria tecidual, crescimento neoplásico ou infecção (Jenkins *et al.*, 1997; Herren *et al.*, 2001; Lijnen, 2001, Sousa *et al.*, 2005a,b). As moléculas pró-inflamatórias tais como IFNs, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 possuem atividade regulatória sobre vários componentes do sistema Plg/Pla e, de uma maneira geral, promovem um aumento da atividade fibrinolítica das células em que atuam (Sousa *et al.*, 2005). Estas moléculas são produzidas no sítio inflamatório em resposta a vários estímulos, como dano tecidual, formação de trombos nos vasos, deposição excessiva de fibrina no pulmão e outros órgãos (Hasegawa *et al.*, 1997; Jenkins *et al.*, 1997; Kasza *et al.*, 2002). Além disso, estudos que apontam a regulação do próprio plasminogênio por citocinas pró-inflamatórias (Jenkins *et al.*, 1997; Bannach *et al.*, 2002), sugerem que, provavelmente, os sistemas inflamatório e Plg/Pla possam se intercomunicar em processos celulares como migração, inflamação, remodelagem tecidual e fibrinólise, resultando na homeostase tecidual.

Estudos utilizando camundongos deficientes em Plg (Plg<sup>-/-</sup> ou *knockout* - KO) sugerem uma função do sistema Plg/Pla na mediação da migração de células inflamatórias para os locais de lesão tecidual (Ploplis *et al.*, 1998; Gong *et al.*, 2008; Guo *et al.*, 2011). As primeiras evidências da participação do sistema Plg/Pla na migração de leucócitos vieram de experimentos utilizando um modelo de inflamação induzida por injeção intraperitoneal de tioglicolato. Os animais Plg KO apresentam uma deficiência na migração de células mononucleares, após estímulo inflamatório, sem nenhum prejuízo para migração de neutrófilos (Ploplis *et al.*, 1998). Recentemente, nosso grupo de pesquisa demonstrou que a injeção intrapleural de plasmina é capaz de promover o recrutamento de células mononucleares de forma dependente do receptor ativado por protease (PAR)-1, da ligação do Plg à superfície celular e da produção da quimiocina CCL2 (Carmo *et al.*, 2014). No entanto, ainda

não se sabe quais as características dos monócitos recrutados, isto é, se essas células possuem perfil de ativação clássica M1, alternativa M2 ou resolutive Mres.

Se, por um lado, o sistema Plg/Pla está envolvido na ativação de proteínas sinalizadoras intracelulares como NF- $\kappa$ B (fator nuclear kappa B) e MAPKs (proteínas cinases ativadas por mitógenos) com consequente estimulação da produção de mediadores inflamatórios (Syrovets *et al.*, 2012), por outro lado, têm surgido evidências de que esse sistema participa também no processo resolutive da inflamação aguda (Gong *et al.*, 2008; Rosenwald *et al.*, 2012; Shen *et al.*, 2013; Das *et al.*, 2014, Carmo *et al.*, 2014). Gong *et al.* (2008) mostraram que a ativação de plasminogênio é necessária para o recrutamento de macrófagos, mas não de neutrófilos, em uma via dependente de metaloproteinase-9 (MMP-9). Em outro estudo, esses mesmos pesquisadores demonstraram possíveis mecanismos pelos quais o sistema Plg/Pla regula a mobilização de células-tronco, com foco na proteólise e transdução de sinal durante a saída de células progenitoras hematopoiéticas (*human Progenitor Stem Cells*, hPSCs) de seu nicho da medula óssea. Dessa forma, esses pesquisadores propuseram que o sistema Plg/Pla está envolvido na mobilização de células estaminais, sob condições patológicas, importantes para o processo de reparo tecidual (Gong *et al.*, 2011). Além disso, Stewart *et al.* (2013) mostraram que Plg estimula a proliferação de células musculares lisas nas vias aéreas, mediada por uPA e Anexina A2 (receptor de Plg), envolvendo múltiplas vias de sinalização ativadas por plasmina. Das e colaboradores (2014) mostraram um papel fundamental do sistema Plg na indução da fagocitose, utilizando modelos diferentes. Em um deles, esse grupo analisou a fagocitose de hemácias opsonizadas por IgG e eferocitose de timócitos apoptóticos por macrófagos murinos em ensaios *in vitro*. Além disso, esses pesquisadores avaliaram a eferocitose de timócitos apoptóticos em ensaios *in vivo* utilizando camundongos selvagens (WT) e deficientes (KO) para o gene que codifica Plg. Neste estudo foi evidenciado que os animais Plg KO eferocitaram menos corpos apoptóticos quando comparados aos animais sem a deficiência. Foi demonstrada, também, uma diminuição da expressão da molécula pró-eferocítica AnxA1 nos animais Plg KO, o que nos sugere um possível envolvimento de AnxA1 no processo de fagocitose induzido por Plg/Pla.

Estudos envolvendo receptores de Plg evidenciaram a relação destes com eventos relacionados ao processo resolutivo da inflamação. Díaz-Ramos *et al.* (2012) conduziram uma análise das múltiplas funções de  $\alpha$ -enolase, o primeiro receptor de Plg identificado, e o seu papel em várias doenças. Esses pesquisadores mostraram que esse receptor é expresso na superfície de miócitos e que inibidores da ligação do Plg bloqueiam a regeneração óssea em camundongos. Wygrecka *et al.* (2009) mostraram que esse mesmo receptor promove o recrutamento de monócitos mediado por Plg em um modelo de inflamação pulmonar aguda. Outro estudo, realizado por Miles *et al.* (2012), identificou PlgR-kT como um novo receptor de Plg por meio de estudos de proteômica e observou que esse receptor está envolvido na ativação do Plg, na migração de células e recrutamento de macrófagos, células importantes no processo de resolução. Outro estudo mostra que Plg/PIa também induzem a migração de monócitos, através da ativação de PAR-1, da via MEK/ERK, e produção de CCL2 (Carmo *et al.*, 2014) e, sabe-se que, o recrutamento de monócitos é importante para o reparo tecidual (Willenborg *et al.*, 2012). Como já discutido anteriormente, a eferocitose é fundamental para o retorno e manutenção da homeostase após um processo inflamatório, prevenindo assim a ocorrência de inflamação crônica e autoimunidade. Rosenwald *et al.* (2012), mostraram que o Plg aumenta a eferocitose com contribuição crucial de sua atividade proteolítica, sugerindo que uma desregulação no sistema fibrinolítico poderia levar a um atraso no *clearance* de células apoptóticas e, conseqüentemente, no processo de resolução da inflamação. Também já foi demonstrado que uPAR está envolvido no processo de eferocitose (D'Mello *et al.* 2009).

Em síntese, o processo inflamatório é uma resposta fisiológica do organismo frente a agentes lesivos de natureza diversa, onde o recrutamento celular e produção de substâncias pró-inflamatórias culmina na eliminação das lesões. Porém, esse processo deve ser limitado, de forma que a homeostasia tecidual seja restabelecida após a eliminação desses agentes, com um mínimo de lesão para o tecido. Assim, após a fase produtiva da inflamação segue-se a fase de resolução onde são produzidas moléculas de natureza lipídica ou proteica que agem como agonistas da resolução podendo atuar em eventos que conduzem à resolução. A resolução da inflamação é um processo ativo, que envolve eventos-chave, incluindo a apoptose de leucócitos, seu reconhecimento e eferocitose por fagócitos e mudança do

fenótipo de macrófagos de perfil pró-inflamatório para um perfil pró-resolutivo. Os trabalhos anteriormente citados descrevem, portanto, ao menos duas funções modulatórias importantes exercidas pelo sistema Plg relacionadas ao processo de resolução, como a migração de células mononucleares (Gong *et al.*, 2008; Carmo *et al.*, 2014) e a indução de fagocitose e eferocitose (Rosenwald *et al.*, 2012; Das *et al.*, 2014).

### 3 JUSTIFICATIVA DO ESTUDO

Pelo exposto, percebe-se que existem algumas evidências da participação do sistema Plg/Pla em eventos que levam à resolução do processo inflamatório. No entanto, dado a característica do sistema Plg/Pla em induzir expressão/liberação de diversos mediadores inflamatórios e os estudos anteriores focados mais na natureza pró-inflamatória destas proteases, faz-se necessário a realização de estudos que possam avaliar se este sistema também pode participar do processo endógeno da anti-inflamação/resolução. Desta forma, o presente trabalho poderá ajudar a entender um pouco da inter-relação entre o sistema hemostático e o processo inflamatório.

Nos últimos anos, o conhecimento dos mecanismos de ação de moléculas indutoras da resolução, tem permitido um melhor entendimento dessa fase da inflamação e fez surgir novas possibilidades no desenvolvimento de estratégias farmacológicas para tratar a inflamação, com potencial diferente daquelas atualmente conhecidas, que visam inibir a fase produtiva do processo inflamatório. A proposta do presente estudo foi, portanto, esclarecer a importância do sistema Plg/Pla na resolução da inflamação aguda utilizando um modelo inflamatório de auto-resolução em camundongos e sistemas *in vitro* de avaliação de eferocitose e da polarização macrofágica induzida por Plg/Pla.

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo Geral

Analisar o perfil fenotípico e funcional das células mononucleares recrutadas e estimuladas com Plg/Pla e estudar o papel destas proteases em eventos-chave da resolução da resposta inflamatória, como a eferocitose e a diminuição do acúmulo de neutrófilos, utilizando um modelo murino de pleurisia induzida por LPS.

### 4.2 Objetivos Específicos

- Caracterizar o perfil fenotípico dos macrófagos (M1, M2 e/ou Mresolutivo) recrutados após injeção intrapleural de Plg ou Pla por meio de citometria de fluxo.
- Avaliar a capacidade de Plg/Pla em induzir reprogramação de macrófagos *in vitro* e *in vivo*.
- Avaliar a capacidade de Plg/Pla em modular o processo de eferocitose *in vitro*.
- Analisar o envolvimento da proteína AnxA1 na capacidade eferocítica de macrófagos tratados com Plg ou Pla.
- Analisar a expressão de Plg e do seu receptor  $\alpha$ -enolase durante a pleurisia induzida por LPS em diferentes fases (produtiva ou resolutive) da inflamação.
- Avaliar se a administração de Plg ou Pla acelera o processo de resolução na inflamação induzida por LPS.

## **5 MATERIAIS E MÉTODOS**

Todos os procedimentos descritos neste projeto foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais pelo protocolo CEUA/UFMG, número19/2012 (ANEXO A) e pela Comissão de Ética em Pesquisa envolvendo Seres Humanos (Protocolo COEP: 0319.0.203.000-11).

### **5.1 Animais**

Foram utilizados camundongos BALB/C machos, com idade entre 8 e 10 semanas, provenientes do Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG (CEBIO-ICB/UFMG). Os animais foram mantidos em condições padronizadas (luminosidade e temperatura) e com livre acesso à água e ração.

### **5.2 Migração de leucócitos induzida por plasmina para a cavidade pleural de camundongos e modelo de pleurisia induzida por LPS**

Para a determinação da cinética de recrutamento de leucócitos para a cavidade pleural, camundongos BALB/C receberam uma injeção intrapleural (i.pl.) de PBS, Plg ou Pla (2µg/cavidade) como descrito por Carmo *et al.* (2014). No modelo murino de pleurisia induzida por LPS, os camundongos receberam 250ng/cavidade de LPS ou PBS para o grupo controle. As células presentes na cavidade pleural foram coletadas em diferentes intervalos de tempo, após injeção de Plg ou Pla (3h, 6h, 24h e 48h) ou após injeção de LPS (8h, 24h, 48h, 72h) por meio da realização do lavado pleural

### **5.3 Tratamentos dos animais**

Para avaliar a capacidade de Plg e Pla em acelerar o processo de resolução do processo inflamatório foram utilizadas duas estratégias experimentais diferentes. Na primeira, Plg ou Pla (2µg/cavidade) foram injetados nos animais após o estabelecimento do processo inflamatório, isto é, os animais foram primeiro desafiados com LPS (250ng/cavidade) para induzir um acúmulo de neutrófilos na

cavidade e, após 4h de indução, foram feitas injeções locais de Plg ou Pla (2µg, i.pl.) e o lavado pleural foi realizado 8h depois da injeção de LPS. Na segunda estratégia, a injeção de Plg e Pla (2µg, i.pl.) ocorreu 48h antes do estabelecimento da pleurisia induzida por LPS (250ng/cavidade), para avaliação se os macrófagos estimulados por Plg e Pla tinham a capacidade de acelerar o processo resolutivo da inflamação aguda.

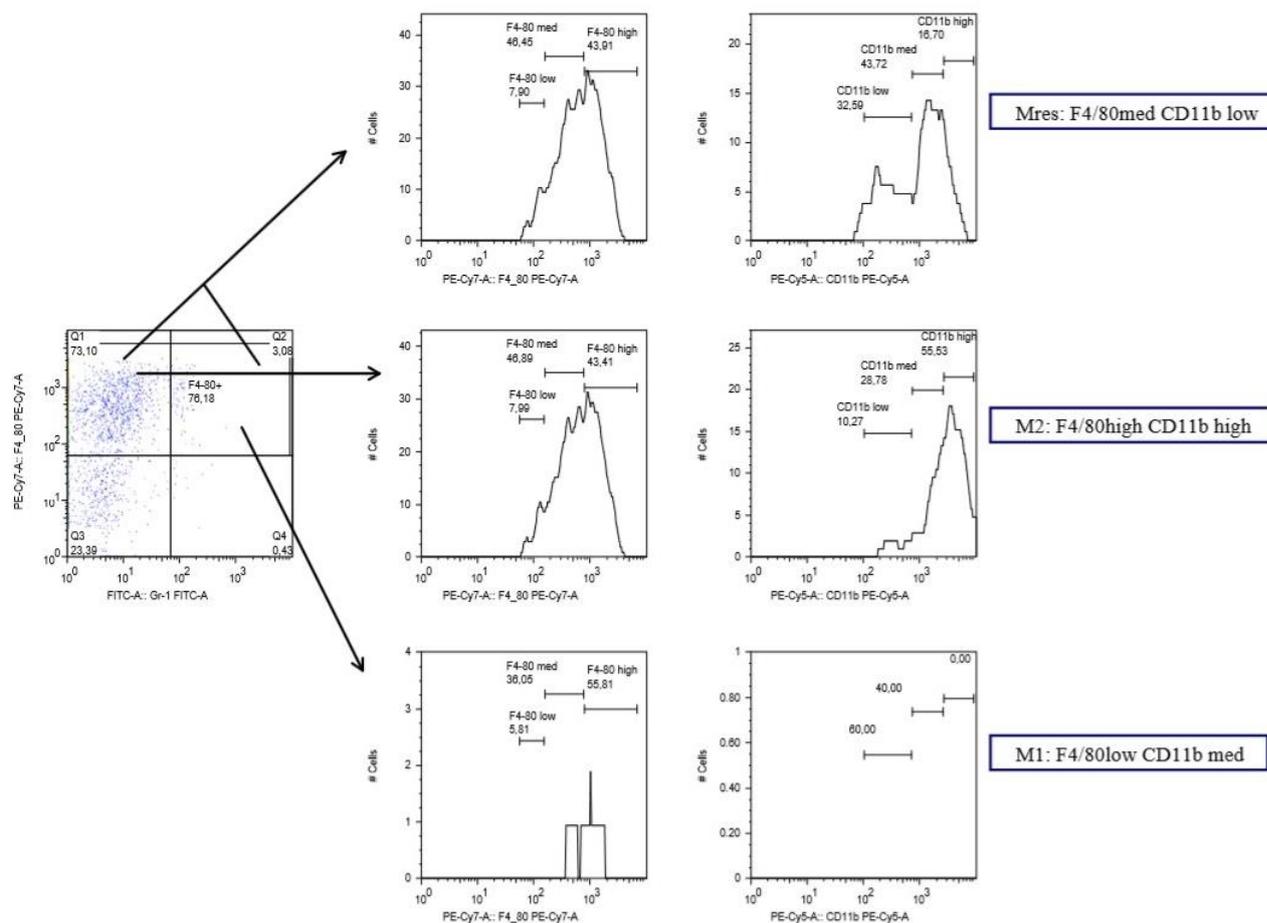
#### 5.4 Lavado Pleural

Em todos os ensaios *in vivo* anteriormente citados, foi realizada a lavagem da cavidade pleural por duas vezes com 1mL de PBS contendo EDTA (1mM). Este lavado foi centrifugado a 1.200RPM, por 5 minutos, a 4°C em centrífuga (Thermo Scientific). O sobrenadante foi descartado e o sedimento celular foi ressuspensionado em 200 µL de solução a 3% (p/v) de albumina sérica bovina (BSA) (Sigma-Aldrich) em PBS 1X. Alíquotas destas células foram diluídas 10 vezes em solução de lise de hemácias (Solução de Turk - IMBRALAB) e procedeu-se à realização da contagem total de células utilizando câmara de Neubauer. A partir dos resultados da contagem total, foram preparadas lâminas para contagem diferencial de células por citocentrifugação de cerca de 70 mil células, ressuspensas em 100µL da solução de BSA, a 450rpm por 5 minutos a temperatura ambiente em cito centrífuga (Shandon III). Após a secagem, estas lâminas foram coradas com May-Grumwald-Giemsa utilizando o kit Panótico Rápido (LB Laborclin). As análises e contagens dos diferentes tipos celulares: mononucleares (macrófagos, monócitos e linfócitos), neutrófilos e eosinófilos, foram realizadas segundo critérios morfológicos padronizados para identificar os tipos celulares (Carvalho e Silva, 1988; Franco, 2004) no aumento de 100 vezes do microscópio ótico. A contagem das células em campos aleatórios, totalizando 100 células em cada contagem, foi realizada em triplicata. Ao restante das soluções de células (não utilizadas para a confecção das lâminas para contagem diferencial) foram adicionados 400 µL de PBS 1X com posterior centrifugação a 1.200RPM, por 5 minutos, a 4°C em centrífuga (Thermo Scientific). Os sobrenadantes foram descartados e os *pellets* de células foram utilizados para obtenção de extratos celulares.

#### **5.4.1 Análise da população de macrófagos por citometria de fluxo**

Com base em uma descrição recente de três populações de macrófagos, M1 ( $Gr1^+ F4/80^{low} Cd11b^{med}$ ), M2 ( $Gr1^- F4/80^{high} Cd11b^{high}$ ) e Mres ( $F4/80^{med} Cd11b^{low}$ ) (Schif-Zuck *et al.*, 2012; Ariel & Serhan, 2012), foi feita a avaliação dessas populações por citometria de fluxo. As células presentes na cavidade pleural foram recuperadas, através de lavado pleural com PBS 1X estéril, 48 horas após administração de Plg, Pla ou PBS. A suspensão de células obtida foi centrifugada a 1.200 RPM por 5 minutos a 4°C em centrífuga (Thermo Scientific). Foi realizada a lise hipotônica das hemácias presentes no sedimento celular, com posterior centrifugação a 1.200 RPM, por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o pellet obtido foi ressuspensionado em 200µL de PBS/BSA 3% p/v. Na sequência, foi realizada a contagem total de células viáveis em câmara de Neubauer com utilização de Azul de Tripán. As populações de monócitos/macrófagos ( $F4/80^+/GR1^{+/-}$ ), neutrófilos ( $GR1^+ / F4/80^-$ ), foram analisadas por citometria de fluxo. Brevemente, após plaqueamento de aproximadamente 200.000 células/poço em placas de fundo em “U”, foram adicionados, em cada poço, 40 µL da mistura de anticorpos monoclonais fluorescentes devidamente diluídos, sendo eles, F4/80 (PE-Cy7, eBioscience), GR1 (PE, Biolegend), CD11b (PE-Cy5), para marcação de superfície. Foram incluídos poços para os controles negativos, controle de isotipo e controle sem marcação, e controles positivos para cada fluorescência (PE – F4/80; PECy5 – CD11b; PECy7 – F4/80). Todas as amostras foram incubadas por 30 minutos a 4°C e protegidas da luz. Ao término da incubação, foram pipetados 150 µL/poço de PBS 1X gelado. Na sequência, as placas foram centrifugadas durante 8 minutos, a 1.300RPM, a 4°C. Ao final desta etapa as placas foram “flicadas” e a etapa de lavagem foi repetida. Foram acrescentados 20µL de solução de Streptavidina-APC. Após a incubação, as células foram lavadas duas vezes para a remoção de anticorpos não ligados, ressuspensionadas em PBS e fixadas com paraformaldeído 4% em PBS/Azida 0.1%. As células marcadas, não marcadas e controles de isotipo e de marcações simples foram adquiridas no citômetro FACScanto II (BD Biosciences, USA). Os dados adquiridos foram analisados no programa FlowJo (Tree Star Company). As populações analisadas foram selecionadas por meio da delimitação de gates (**Figura 5**) nos quais as células em estudo situavam-se de acordo com o tamanho e granulosidade, o que permitiu distinguir linfócitos (agranulócitos) de macrófagos e

neutrófilos (granulócitos). No *gate* contendo as populações de macrófagos e neutrófilos foram separadas em quatro quadrantes:  $F4/80^+GR1^-$ ,  $F4/80^+GR1^+$ ,  $F4/80^-GR1^+$ ,  $F4/80^-GR1^-$ . Neutrófilos foram identificados por serem  $F4/80^-GR1^+$ . As células  $F4/80^+GR1^-$  foram posteriormente separadas em  $F4/80^{low}$ ,  $F4/80^{med}$  e  $F4/80^{high}$  e a população  $F4/80^{high}$  foi posteriormente analisada quanto à expressão de CD11b, sendo distribuídas em populações  $CD11b^{low}$ ,  $CD11b^{med}$ ,  $CD11b^{high}$ , definindo a população de M2 como ( $Gr1^- F4/80^{high} Cd11b^{high}$ ). As células do quadrante  $F4/80^+GR1^+$  foram posteriormente separadas em  $F4/80^{low}$ ,  $F4/80^{med}$  e  $F4/80^{high}$  e a população  $F4/80^{low}$  foi posteriormente analisada quanto à expressão de CD11b, sendo dividida nas populações  $CD11b^{low}$ ,  $CD11b^{med}$ ,  $CD11b^{high}$ , definindo a população de M1 como ( $Gr1^+ F4/80^{low} Cd11b^{med}$ ). As células  $F4/80^+$ , independente da expressão de Gr1, foram posteriormente separadas em  $F4/80^{low}$ ,  $F4/80^{med}$  e  $F4/80^{high}$  e a população  $F4/80^{med}$  foi posteriormente analisada quanto à expressão de CD11b, sendo dividida nas populações  $CD11b^{low}$ ,  $CD11b^{med}$ ,  $CD11b^{high}$ , definindo a população de Mres como ( $F4/80^{med} Cd11b^{low}$ ). As subpopulações celulares foram expressas em porcentagem do total de eventos adquiridos e posteriormente calculadas em número de células, a partir da contagem total de células.



**FIGURA 5 – Estratégia de *gates* para análise de populações de macrófagos por citometria de fluxo.** As células obtidas do lavado pleural de camundongos 48h após a injeção de Plg/Pla foram analisadas por citometria de fluxo de acordo com o seu tamanho e granulosidade e a expressão das moléculas de superfície F4/80, Gr1 e CD11b.

#### **5.4.2 Obtenção dos extratos proteicos**

Ao término dos experimentos as células obtidas no lavado da cavidade pleural foram lisadas pela adição de 100 $\mu$ L de solução de lise (0,5% p/v de NP-40, 100mM de Tris/HCl pH 8,0, 10% de glicerol, 0,2 mM de EDTA, 1mM de NaVO<sub>3</sub>, 1mM de DTT, 1mM de PMSF, 200mM de NaCl, 25 mM de NaF, leupeptina e aprotinina), e deixadas em banho de gelo por 15 minutos. Posteriormente, o lisado foi centrifugado a 10.000 R.P.M por 15 minutos a 4°C, sendo o sobrenadante aliqotado e mantido a -20°C até o momento de uso.

### **5.4.3 Quantificação de proteínas dos extratos proteicos**

Foi utilizado o kit Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad Laboratories) baseado no método de Bradford para dosagem das proteínas totais obtidas das células dos experimentos *in vitro* e *in vivo*. Estes ensaios foram feitos em placas de 96 poços específicas para testes colorimétricos. Para tal foram adicionados 2 $\mu$ L de cada amostra à 200 $\mu$ L do corante diluído 5 vezes em água destilada, em duplicata. Paralelamente foram construídas curvas padrão por meio da diluição de uma solução padrão de BSA. Após 5 minutos de incubação, a leitura foi feita em espectrofotômetro (Spectra Max 190, Molecular Devices) no comprimento de onda de 595nm. Os valores das absorbâncias das amostras foram interceptados na curva padrão para o cálculo da concentração proteica, expressa em mg/mL.

### **5.4.4 Western Blot para análise da expressão de AnxA1 e dos componentes do Sistema Plasminogênio/Plasmina**

As células recuperadas da cavidade pleural foram lisadas como descrito anteriormente e as proteínas totais das células foram quantificadas utilizando o kit Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad Laboratories). Os extratos proteicos totais (50  $\mu$ g) foram desnaturados em banho seco (LGC biotechnology), após a mistura da amostra com tampão LB5X (10% SDS, 10%  $\beta$ -mercaptoetanol, 40% glicerol, 0.05% azul de bromofenol, 0.250M Tris/HCl pH 6,8) a 100°C por 5 minutos. Em seguida, os extratos foram fracionados em gel de 10% de poliacrilamida/SDS e submetidos à eletroforese a uma tensão de 100 V. Ao final da corrida, os extratos proteicos foram transferidos para membrana de nitrocelulose (Hybond ECL, GEHealthcare) previamente equilibrada em tampão de transferência. Posteriormente à transferência, as membranas foram bloqueadas com PBS-Tween 0,1% contendo 5% de leite em pó desnatado, lavadas com PBS-Tween, e incubadas com o anticorpo de interesse a 4°C por uma noite. Os anticorpos utilizados foram anti- $\alpha$ -enolase (diluição 1:1000) (Santa Cruz Biotechnology), anti-Plg (1:1000) (Santa Cruz Biotechnology), e anti-AnxA1 (Invitrogen) (1:3000), anti- $\beta$ -actina (1:5000) (Sigma-Aldrich) e anticorpos secundários conjugados à peroxidase (1:3000) (Santa Cruz Biotechnology). Após nova lavagem com PBS/Tween e incubação durante 1 hora à temperatura ambiente, com o anticorpo secundário respectivo ligado à peroxidase,

as membranas foram incubadas em solução reveladora “ECL-Plus” (GE Healthcare,), expostas contra filme de raio X (Hyperfilm ECL,) e reveladas utilizando-se revelador e fixador (Kodak), seguindo as recomendações do fabricante.

## **5.5 Ensaio de eferocitose por microscopia óptica**

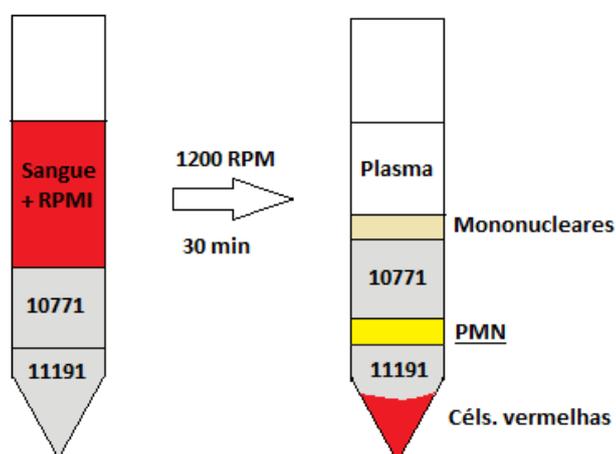
### **5.5.1 Isolamento e tratamento de macrófagos peritoneais murinos.**

Camundongos BALB/C foram eutanasiados em câmara de CO<sub>2</sub> e mergulhados em álcool 70% v/v. O lavado peritoneal foi realizado por meio da injeção de 10 mL de PBS/EDTA com seringa e agulha, em capela de fluxo laminar. O lavado foi transferido para tubos Falcon<sup>TM</sup> de 50 mL e centrifugado a 1.200 RPM por 10 min. O sobrenadante foi descartado e as células obtidas foram ressuspendidas em meio RPMI completo (antibióticos/antimicótico + 10% de SFB). As células foram diluídas em azul de Tripán e a viabilidade celular foi avaliada. Em seguida, as células viáveis foram plaqueadas (1x10<sup>6</sup> células por poço) em placa de 24 poços contendo lamínulas circulares para microscopia. As placas foram então incubadas em estufa a 37 °C contendo 5% de CO<sub>2</sub> por 3h. As células não aderentes foram descartadas junto com o sobrenadante e foram adicionados 500 µL de meio de careciamento (meio RPMI + 0,5% de SFB) aos poços, com posterior incubação *overnight*. No dia seguinte, os macrófagos receberam meio RPMI apenas, ou contendo Plg/Pla (2µg/mL), por 24h.

### **5.5.2 Isolamento de neutrófilos e indução de apoptose**

Uma amostra de sangue venoso foi coletada de voluntários saudáveis em tubos com sistema Vacuette® contendo citrato (3,2%), para obtenção dos neutrófilos. O protocolo para isolamento de neutrófilos consistiu no uso de gradientes de ficol (Histopaques 10771 e 11191- Sigma-Aldrich). Após a adição de 3mL de Histopaque 11191 seguida de 3mL de Histopaque 10771 em tubos Falcon<sup>TM</sup> de 15mL, foram adicionados 6 mL de suspensão preparada com 3mL de meio RPMI e 3 mL de sangue citratado (**Figura 6**). O gradiente foi então centrifugado a 1300 RPM durante 30 minutos, com desaceleração nula. A camada de neutrófilos foi recolhida com auxílio de pipeta Pasteur estéril (BD Biosciences), lavada com RPMI suplementado

com L-glutamina, bicarbonato de sódio, antibióticos e antimicóticos (Cultilab), sendo novamente centrifugada a 1.500 RPM por 15 minutos para retirar resíduos de ficol. As hemácias foram lisadas em meio hipotônico (9 mL de água para injetáveis, seguida de 1 mL de PBS 10X). Após nova centrifugação por 10 minutos a 1200 RPM, os neutrófilos foram ressuspensos em meio RPMI e a contagem e viabilidade desses foi avaliada com azul de tripan. A pureza da suspensão de neutrófilos foi avaliada por cito-centrifugação, seguida de coloração May-Grunwald-Giemsa utilizando o kit Panótico Rápido (LB Laborclin) e observação em microscópio ótico. Os neutrófilos foram mantidos em meio RPMI contendo 10% de SFB e 1µg/mL de gliotoxina (Fluka Biochemika, Switzerland) por 6h, o que leva a apoptose de 100% destas células (Wardet *al.*, 1999). A avaliação da apoptose foi realizada em preparações feitas por citospin seguidas de coloração de May-Grunwald-Giemsa. As células apoptóticas foram identificadas por alterações morfológicas características como, condensação da cromatina, fragmentação nuclear e formação de corpos apoptóticos.



**FIGURA 6 – Gradiente para isolamento de células mononucleares e neutrófilos humanos.**

Histopagues de diferentes gradientes foram posicionados em tubo Falcon<sup>TM</sup> de 15 mL, seguidos de meio RPMI contendo sangue humano na mesma proporção. Após centrifugação a 1.200 RPM por 30 minutos, o gradiente continha uma primeira camada de plasma, seguida da camada de células mononucleares, gradiente histopaque 10771, a camada de neutrófilos, histopaque 11191 e, por fim, a camada de células vermelhas.

### **5.5.3 Co-cultura de macrófagos e neutrófilos apoptóticos**

Os neutrófilos apoptóticos foram dados como iscas na proporção de 3:1 (3 neutrófilos para 1 macrófago) aos macrófagos peritoneais previamente tratados com Plg ou Pla ou meio de controle. A co-cultura foi mantida por 1h e então foi feita a lavagem por 3 vezes com PBS 1x para retirada dos neutrófilos que não foram efecitados. As lamínulas circulares foram retiradas dos poços, fixadas e coradas com May-Grunwald-Giemsa e, após secagem, foram coladas às lâminas para microscopia com Mowiol (Sigma-Aldrich), um polímero translúcido. Em microscópio óptico, foram escolhidos 5 campos aleatórios e todos os macrófagos foram contados, de forma que aqueles que continham corpos apoptóticos em seu interior eram classificados como macrófagos que efecitaram os neutrófilos dados como isca. O índice de efecitose foi obtido como sendo a porcentagem de macrófagos que efecitaram em relação ao total (Rossi *et al.*, 1998).

## **5.6 Ensaio de efecitose por microscopia de fluorescência**

### **5.6.1 Isolamento de BMDM (Macrófagos murinos derivados de medula óssea)**

Camundongos BALB/C com 8 a 10 semanas foram eutanasiados e mergulhados em álcool 70%v/v para assepsia. Após dissecação, a tíbia e fêmur foram obtidos para obtenção de macrófagos derivados da medula óssea. O interior dos ossos foi lavado com meio de Engle modificado por Dulbecco (DMEM, 3mL por osso) suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino inativado (SFB) (Cultilab), e antibióticos penicilina (100UI/mL) e gentamicina (100µg/m), e o meio contendo as células foi filtrado em *cell strainer*, para remoção de debris, e armazenados em tudo Falcon® de 50 mL. A suspensão celular foi então centrifugada por 5 minutos a 1.200 RPM. Após o descarte do sobrenadante o *pellet* foi ressuspendido em meio DMEM completo (10% de SFB, 20% de sobrenadante de células L919 – LCCM). A suspensão resultante foi distribuída em placas de 6 poços e incubadas a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. No 5° dia de cultivo, foi adicionado mais meio DMEM completo aos poços. No 7° dia de cultivo as células, já maduras, foram destacadas da placa por meio de tripsinização (1mL de solução de tripsina por poço) por 10 minutos, lavadas e plaqueadas em placas de 24 poços contendo lamínulas de microscopia, sendo 3x10<sup>5</sup> células/poço. As células

foram carenciadas por 12h com meio DMEM + 0,5% de SFB e então foi adicionado meio de cultura DMEM sem a presença de SFB, com ou sem Pla.

### **5.6.2 Isolamento de neutrófilos, indução de apoptose e marcação com CFSE.**

O isolamento e indução de apoptose de neutrófilos humanos foram realizados conforme descrito anteriormente. Após a apoptose, os neutrófilos foram marcados com CFSE (110µL de solução de CSFE a 5µM para cada mL de suspensão de neutrófilos), com incubação em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> por 15 minutos. Após a marcação, foi adicionado PBS 1x/BSA 5% (10x o volume da suspensão de células) e o conteúdo foi dividido em tubos Falcon® de 15mL. Os tubos foram então centrifugados por 10 minutos a 1.500 RPM e as células foram ressuspensas e lavadas duas vezes com 10mL de PBS/EDTA (0,5mM) por tubo, sendo que em cada lavagem houve uma incubação em estufa por 5 min e centrifugação por 10 min a 1.500RPM. Ao final da segunda lavagem, os neutrófilos apoptóticos marcados foram ressuspensos em volume definido de DMEM e contados em câmara de Neubauer.

### **5.6.3 Co-cultura de BMDM e neutrófilos apoptóticos marcados**

Após 12h de estímulo com Pla ou meio DMEM sem estímulo, foram adicionados neutrófilos apoptóticos marcados aos poços contendo macrófagos, na proporção de 1:3 (1 macrófago para 3 neutrófilos). A placa foi então incubada ao abrigo da luz por 1h em estufa contendo 5% de CO<sub>2</sub> e mantida a 37°C. Após a co-cultura, as lamínulas foram lavadas 2 vezes com PBS 1x e fixadas com acetona (1 mL por poço, por 1 minuto).

### **5.6.4 Marcação celular com F4/80 e DAPI**

Após a fixação e secagem, as lamínulas foram dispostas em câmara úmida, ao abrigo da luz, lavadas com PBS/BSA 1% por 10 min e posteriormente incubadas com Fc Block por 30 min. (1:100, 50 µL). Em seguida, as lamínulas foram lavadas com PBS-BSA1%- Perm Wash (para cada 1,2 mL de PBS/BSA 1%, foram adicionados 100 µL de Perm Wash) e receberam 50 µL de solução de F4/80 – PE, de fluorescência vermelha (eBioscience). Diluição 1:100 na solução PBS/BSA1% -

Perm Wash). Após 30 minutos de marcação com F4/80, foi adicionado DAPI (2 $\mu$ L/poço da solução estoque 1mg/mL) à solução com o F4/80 presente nas lamínulas com posterior incubação por 10 min. Em seguida as lamínulas foram lavadas 2x com PBS/BSA 1% e as lâminas foram montadas com meio de montagem Fluormount™.

### **5.6.5 Análise por microscopia de fluorescência**

As lâminas foram analisadas pelo microscópio Nikon Eclipse Ti com cabeça confocal C2. A intensidade de fluorescência foi medida utilizando o software Velocity 6,3 (Perkin-Elmer), com escolha de 20 células representativas por grupo e o perfil de fluorescência foi avaliado usando o Image J (NIH), com uma imagem representativa por grupo analisado.

## **5.7 Cultura de células**

Macrófagos murinos (RAW 264.7 ATCC, Nr. TIB-71) foram cultivados em meio DMEM, suplementado como descrito anteriormente, à temperatura de 37 °C, em estufa incubadora umidificada (Thermo Scientific) contendo 95% de ar e 5% de CO<sub>2</sub>.

### **5.7.1 Indução da reprogramação de macrófagos *in vitro***

Foi investigado se o Plg ou Pla seriam capazes de promover reprogramação de macrófagos *in vitro*, utilizando o protocolo descrito por Sheldon *et al.* (2013). Células RAW 264.7 foram cultivadas em DMEM suplementado com antibióticos e 10% de soro fetal bovino (SFB) inativado (Cultilab). As células foram mantidas a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>, e ao atingirem 70-80% de confluência, foram plaqueadas (1x10<sup>6</sup> células/poço) e carenciadas em DMEM suplementado com 0,5% de SFB por 12 h. Posteriormente, essas células foram tratadas com IFN- $\gamma$  (50 ng/ml) (controle de indução M1), cAMP (0.5 mM) (controle de indução M2), Plg ou Pla (2 $\mu$ g/mL) por 24 h. Ao final dos tratamentos, o RNA total foi extraído usando Trizol (Invitrogen), de acordo com as instruções do fabricante. O cDNA foi sintetizado a partir de 500 ng de RNA com a *SuperScript* III Reverse Transcriptase (Invitrogen), seguindo as recomendações do fabricante. O cDNA obtido foi adicionado aos iniciadores

adequados e ao *Power SYBER Green PCR Mastermix* (Applied Biosystems). A PCR em tempo real foi realizada em duplicata utilizando o Sistema *StepOne* (Applied Biosystems) e os dados foram analisados utilizando o *Software StepOne Detection*. Os níveis de expressão foram calculados pelo método  $\Delta Ct$ . A curva de dissociação foi incluída para confirmar a ausência de produtos inespecíficos. *Gapdh* foi usado como controle endógeno para normalizar os níveis de expressão e os resultados foram expressos como *fold increase*. Os iniciadores utilizados foram os seguintes: *iNOS* (*forward* 5'- ACAATGAACGCTACACACTGCAT - 3'; *reverse* 5' - AGCTAAGTATTAGAGCGGCGGCA-3'), *Arginase-1* (*forward*, 5'- TGACATCAACACTCCCCTGACAAC - 3'; *reverse*, 5' - GCCTTTTCTTCCTTCCCA GCAG - 3'), *Receptor de Manose - CD206* (*forward*, 5' - TCTTTTACGAGAAGT TGG GGTCAG - 3'; *reverse*, 5' - ATCATTCCGTTCCACAGAGGG-39), e *Gapdh* (*forward*, 5' - AGAAGACTGTGGATGGCCCC - 3'; *reverse*, 5' - TGACCTTGCCCACAGCCTT - 3').

### **5.7.2 Avaliação da expressão de AnxA1 por Western Blot em extrato de células RAW estimuladas por Plg e Pla**

Células RAW 264.7 foram cultivadas em garrafas médias contendo meio DMEM completo (DMEM +10% de SFB). Após a ressuspensão e contagem, essas células foram plaqueadas em placas de 24 poços ( $1 \times 10^6$  células/poço) em triplicata por grupo e carenciadas por 24h com meio DMEM contendo 0,5% de SFB. Após o carenciamento as células receberam meios contendo Plg ou Pla ou apenas o meio de controle. Após os tempos de 3h, 6h, 12h, 24h, o extrato celular foi obtido utilizando 100  $\mu$ L solução de lise por poço (composição descrita anteriormente) Os extratos foram então quantificados, preparados e analisados pela técnica de Western Blot para avaliação da expressão de AnxA1, utilizando-se anticorpo anti-anxA1 (Invitrogen, 1:3000)

### **5.8 Análises estatísticas**

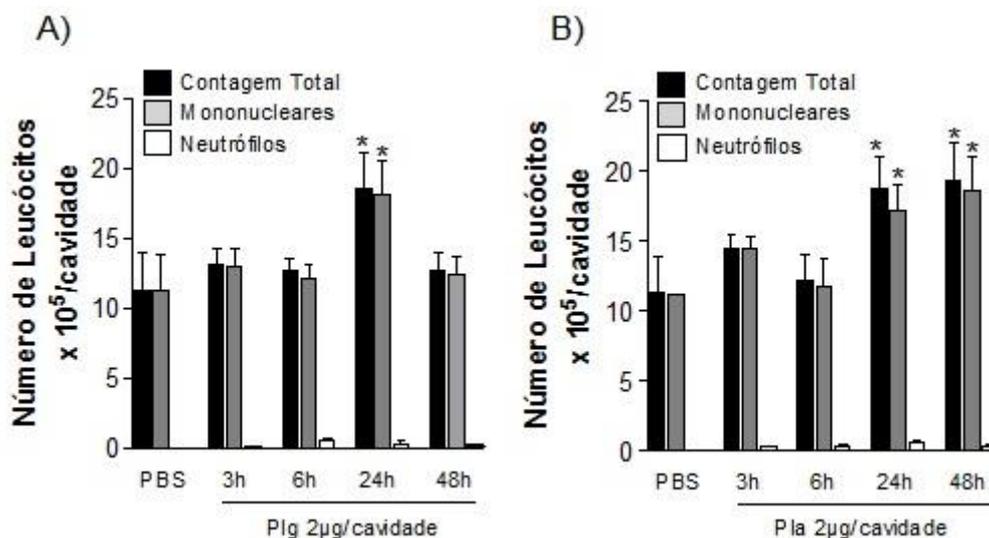
Os dados obtidos foram analisados estatisticamente por análise de variância (One-way ANOVA), seguida do teste Newman-Keuls, e as diferenças consideradas estatisticamente significativas se  $P < 0.05$ . Os resultados foram apresentados como

média EPM (Erro padrão da média). As análises estatísticas e os gráficos foram elaborados utilizando-se o *Software GraphPadPrism*.

## 6 RESULTADOS

### 6.1 Plasmina e Plasminogênio induzem o recrutamento de células mononucleares para a cavidade pleural de camundongos.

Como demonstrado anteriormente, a injeção de Plg ou Pla induz a migração de células mononucleares para a cavidade pleural de camundongos (Carmo *et al.*, 2014). Desta forma, foi analisado o recrutamento dessas células, em diferentes tempos de estímulo com Plg ou Pla, incluindo tempos mais precoces que aqueles estudados anteriormente. No presente estudo, a injeção intrapleural de Pla ou Pla promoveu um aumento no número de células mononucleares (barras cinzas) na cavidade pleural de camundongos BALB/c, sem alteração no número de neutrófilos (barras brancas). O plasminogênio foi capaz de promover o recrutamento de células mononucleares no tempo de 24h após a injeção (**Figura 7A**). Esse aumento ocorreu nos tempos de 24h e permanece até, pelo menos, 48h após o desafio com plasmina (**Figura 7B**), sendo que o número de células presentes na cavidade não se alterou nos tempos de 3h e 6h em ambos (**Figura 7A e 7B**).

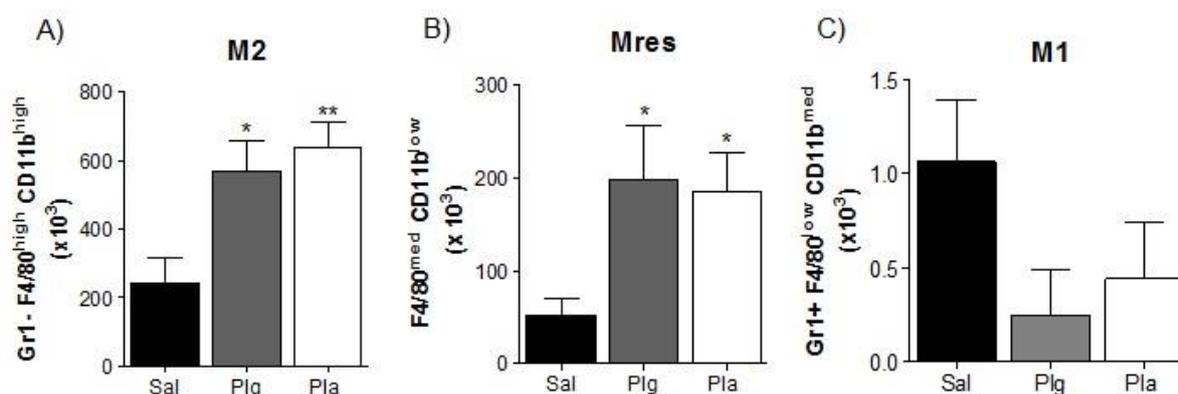


**FIGURA 7 – Efeito da injeção intrapleural de Plg ou Pla na migração de leucócitos para cavidade pleural de camundongos.** Camundongos BALB/C foram desafiados com injeção intrapleural de Plg (2µg/cavidade), Pla (2µg/cavidade) ou PBS (veículo). As células que migraram para esta cavidade foram coletadas após 3, 6, 24 e 48h de desafio e processadas para identificação e contagem. Os resultados das contagens foram expressos em número de células por cavidade e

mostrados como média  $\pm$  EPM. \*,  $P < 0.05$ , quando comparados com os camundongos desafiados com PBS (veículo).

## 6.2 Análise por citometria de fluxo das células mononucleares recrutadas por Plg/Pla mostra que essas são principalmente macrófagos de perfil anti-inflamatório e resolutivo.

Como já demonstrado anteriormente (Carmo *et al.*, 2014) e reforçado neste trabalho, Plg e Pla ( $2\mu\text{g}/\text{cavidade}$ ) induzem o influxo de células mononucleares para a pleura de camundongos quando administrados localmente, sem influxo significativo de neutrófilos. No entanto, não se sabe qual o perfil dos macrófagos recrutados neste modelo, o que motivou a análises por citometria de fluxo dos tipos celulares envolvidos nesse recrutamento, com base em uma descrição recente de três populações de macrófagos, sendo elas M1 ( $\text{Gr1}^+ \text{F4/80}^{\text{low}} \text{Cd11b}^{\text{med}}$ ), M2 ( $\text{Gr1}^- \text{F4/80}^{\text{high}} \text{Cd11b}^{\text{high}}$ ) e Mres ( $\text{F4/80}^{\text{med}} \text{Cd11b}^{\text{low}}$ ) (Schif-Zuck *et al.*, 2012; Ariel & Serhan, 2012, Vago *et al.*, 2015). A análise das células obtidas no lavado pleural mostra que essas são principalmente macrófagos, de perfil anti-inflamatório (M2) (**Figura 8A**) e resolutivo (Mres) (**Figura 8B**), sem modificação no número de macrófagos pró-inflamatórios (M1) (**Figura 8C**).

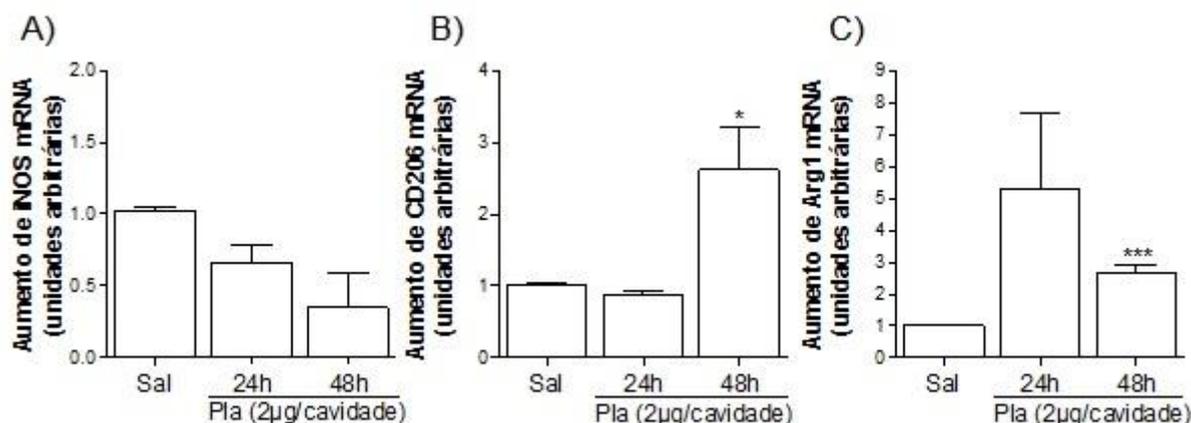


**FIGURA 8 – Perfil dos macrófagos recrutados para cavidade pleural após a injeção de Plasmina ou Plasminogênio.** Camundongos BALB/C foram desafiados pela via intrapleural com uma injeção de Plg ( $2\mu\text{g}/\text{cavidade}$ ) ou Pla ( $2\mu\text{g}/\text{cavidade}$ ) ou PBS (veículo). As células que migraram para a cavidade pleural foram coletadas após 48h e processadas para análise por citometria de fluxo dos macrófagos de perfil M2 (A), Mres (B) e M1 (C). Os resultados foram expressos em número de

células e mostrados como média  $\pm$  EPM. \*,  $P < 0.05$  ou \*\*  $P < 0.01$  quando comparados com os camundongos desafiados com PBS (veículo). Estes experimentos foram repetidos três vezes.

### 6.3 Pla induz aumento na expressão dos marcadores de macrófagos M2, CD206 e Arginase-1, sem alterar a expressão de iNOS, um marcador de macrófagos de perfil M1

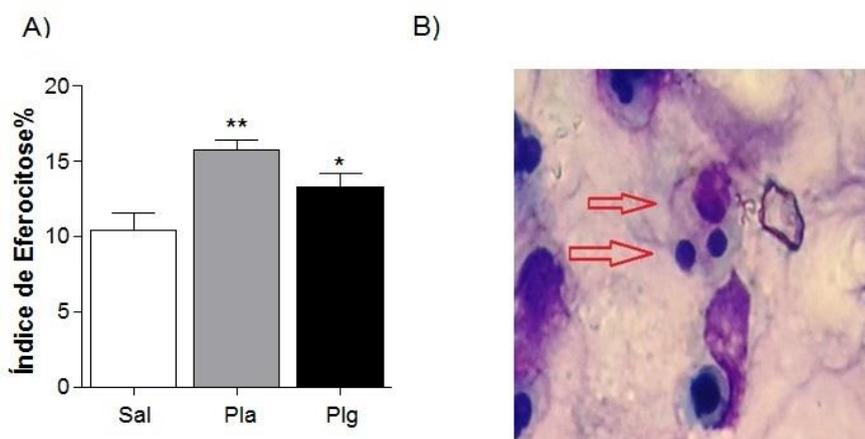
Para avaliar se a Pla seria capaz de promover reprogramação macrofágica, foi realizada a injeção dessa proteína na cavidade pleural de camundongos e, após 24h e 48h, o lavado pleural foi obtido para extração do mRNA das amostras e obtenção do cDNA. Posteriormente, foi feita a avaliação por qPCR da expressão de genes envolvidos na assinatura genética de diferentes macrófagos, como M1, pela análise de iNOS (**Figura 9A**) e M2, pela análise da expressão de CD206 (receptor de manose) (**Figura 9B**) e Arg-1 (**Figura 9C**). Os resultados mostram que Pla aumenta a expressão de CD206 e Arg-1, sem alterações na expressão de iNOS.



**FIGURA 9 – Expressão de genes envolvidos na assinatura gênica de macrófagos M1 e M2, em células obtidas do lavado pleural de camundongos estimulados com Pla.** Camundongos BALB/c receberam Pla (2µg/cavidade) e PBS (veículo) por via intrapleural. O lavado da cavidade foi realizado 24h e 48h após o desafio. Os mRNAs das células obtidas foram extraídos com Trizol e os cDNA foram obtidos para análise por qPCR. Os resultados foram expressos em unidades arbitrárias e mostrados como média  $\pm$  EPM. \*\*\*  $P < 0.001$  quando comparados ao grupo não tratado.

#### 6.4 Plg e Pla aumentam a capacidade eferocítica de macrófagos peritoneais murinos

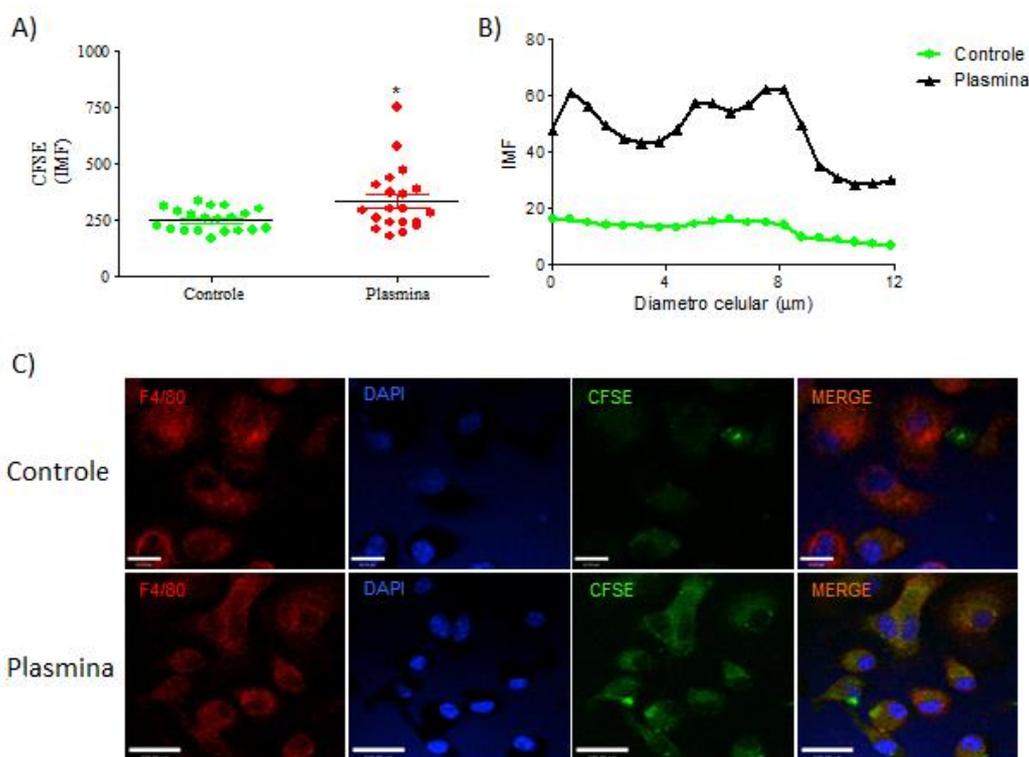
Os macrófagos do tipo M2 e Mres têm maior capacidade de eferocitar corpos apoptóticos, sendo este um evento essencial para o processo de resolução da inflamação (Alessandri *et al.*, 2013). Visto que Plg/Pla recrutam células de perfil anti-inflamatório e resolutivo, foi investigado se essas proteínas seriam capazes de modular funções dos macrófagos como a sua capacidade eferocítica (fagocitose de corpos apoptóticos). Dessa forma, macrófagos peritoneais de camundongos, tratados ou não com Plg ou Pla, foram incubados com células apoptóticas e a capacidade de eferocitose foi avaliada por meio da contagem das lâminas de citospin, pela análise da presença de corpos apoptóticos no interior dos macrófagos. De acordo com os resultados, Plg/Pla são capazes de aumentar a capacidade eferocítica de macrófagos peritoneais murinos, evidenciada pelo aumento no índice de eferocitose (porcentagem de macrófagos que eferocitaram) no grupo de macrófagos tratados em relação ao grupo não tratado (**Figura 10A e 10B**).



**FIGURA 10 – Efeito do Plg e Pla na modulação da capacidade eferocítica de macrófagos.** (A) Macrófagos peritoneais residentes foram obtidos de quatro camundongos BALB/C e plaqueados ( $1 \times 10^6$  células/poço). Após carenciamento, os macrófagos foram tratados com Plg ou Pla ( $2 \mu\text{g/mL}$ ) por 24h e receberam neutrófilos apoptóticos (na proporção de 3:1, ou seja,  $3 \times 10^6$  neutrófilos) sendo a co-cultura incubada em estufa por 1h. Após a incubação, as células aderentes foram lavadas e em seguida coradas com panótico. O resultado obtido foi expresso em índice de eferocitose, obtido como descrito em material e métodos. (B) Macrófago contendo dois corpos apoptóticos.

## 6.5 Plasmina aumenta a capacidade eferocítica de macrófagos murinos isolados de medula óssea (BMDMs).

No intuito de se comprovar o efeito observado com os macrófagos residentes, foram realizados experimentos utilizando BMDMs. O tratamento de macrófagos murinos derivados de medula óssea com plasmina promoveu um aumento da capacidade eferocítica dessas células frente aos neutrófilos humanos apoptóticos marcados previamente com CFSE. Esse aumento foi evidenciado por um maior índice médio de fluorescência em relação ao grupo controle, tanto por análise pelo software Volocity 6,3 (Perkin-Elmer), como pela avaliação do perfil de fluorescência usando o Image J (NIH) (**Figura 11B**), com análise do índice de fluorescência medido por todo o diâmetro de uma única célula representativa por grupo. Os macrófagos tratados por Pla apresentaram maior internalização de neutrófilos marcados com CFSE, de fluorescência verde. (**Figura 11C**).

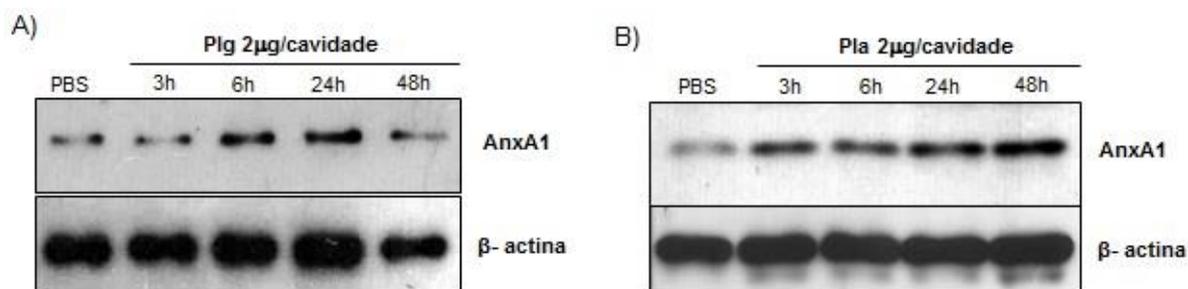


**Figura 11 – Efeito da Plasmina na modulação da capacidade eferocítica de macrófagos derivados de medula óssea em ensaio de fluorescência.** Macrófagos murinos foram isolados de medula óssea de camundongos com 8 a 10 semanas. Após diferenciação e maturação em cultura, os macrófagos foram plaqueados ( $3 \times 10^5$  céls/poço) em placas de 24 poços contendo lamínulas para

microscopia e carenciados com meio DMEM contendo 0,5% de SFB. Após o carenciamento, macrófagos foram tratados com meio DMEM apenas ou contendo Pla (2µg/mL) por 12h. Paralelamente, neutrófilos foram isolados de sangue humano e induzidos à apoptose com gliotoxina (1µg/mL) por 6h. Os neutrófilos foram então marcados com CFSE (5µM), lavados e incubados com os macrófagos plaqueados, na proporção de três neutrófilos para cada macrófago. Após a co-cultura por 1h, as lamínulas foram lavadas, fixadas e as células foram marcadas com F4/80 (macrófagos) e DAPI (núcleo celular). A leitura das lamínulas foi feita utilizando microscópio Nikon Eclipse Ti com cabeça confocal C2. A intensidade de fluorescência foi medida por meio do software Volocity 6,3 (Perkin-Elmer), com escolha de 20 células representativas por grupo (A) e o perfil de fluorescência foi avaliado usando o Image J (NIH) (B), com uma imagem representativa por grupo analisado. As imagens foram processadas e demonstradas de acordo com cada marcação/fluorescência (C).

## **6.6 O recrutamento de células para a cavidade pleural após injeção de Plg/Pla é acompanhado pelo aumento da expressão de AnxA1**

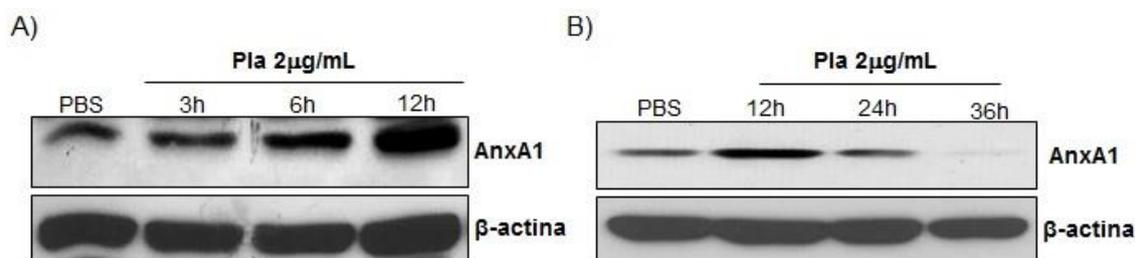
Após verificar que ambos Plg e Pla foram capazes de aumentar a capacidade fagocítica de macrófagos, perguntou-se qual seria o mecanismo envolvido neste processo. Das *et al.* (2014) analisaram proteínas que poderiam ser reguladas pelo Plg durante a fagocitose, por meio de ensaio de microarranjo contendo matriz dos genes que codificam proteínas envolvidas nesse processo, e detectaram uma diminuição da expressão da proteína AnxA1 em animais Plg KO. A AnxA1 é de fato uma proteína envolvida com o aumento da capacidade fagocítica de macrófagos podendo funcionar como um sinal de “eat-me” e uma ponte entre a fosfatidilserina exposta pela célula apoptótica e o receptor FPR2 (receptor de Anxa1) em macrófagos (McArthur *et al.*, 2010). Para tentar elucidar um dos mecanismos envolvidos no aumento da capacidade fagocítica de macrófagos, foi avaliada a expressão de AnxA1 por Western Blot em amostras de extrato proteico celular obtido de lavado pleural após cinética de recrutamento celular com Plg/Pla. A análise revelou que há um aumento na expressão de AnxA1 (**Figura 12A**) nos camundongos injetados com Plg. O aumento também ocorreu nos camundongos tratados com Pla, que se inicia no tempo de 3h com níveis elevados até 48h (**Figura 12B**).



**FIGURA 12 – Avaliação dos níveis da proteína AnxA1 em extratos celulares recuperados da pleura de animais após a injeção com Plg/Pla.** Camundongos BALB/C foram desafiados com Plg/Pla por via intrapleural e as células presentes na cavidade foram coletadas 3h, 6h, 24h e 48h após o desafio. O extrato celular foi obtido e processado para análise de AnxA1 por Western Blot tanto para o grupo tratado com Plg (A) quanto com Pla (B). A  $\beta$ -actina foi utilizada como controle da quantidade de proteínas aplicadas às diferentes canaletas.

### 6.7 O tratamento de células RAW 264.7 com plasmina aumenta a expressão de AnxA1

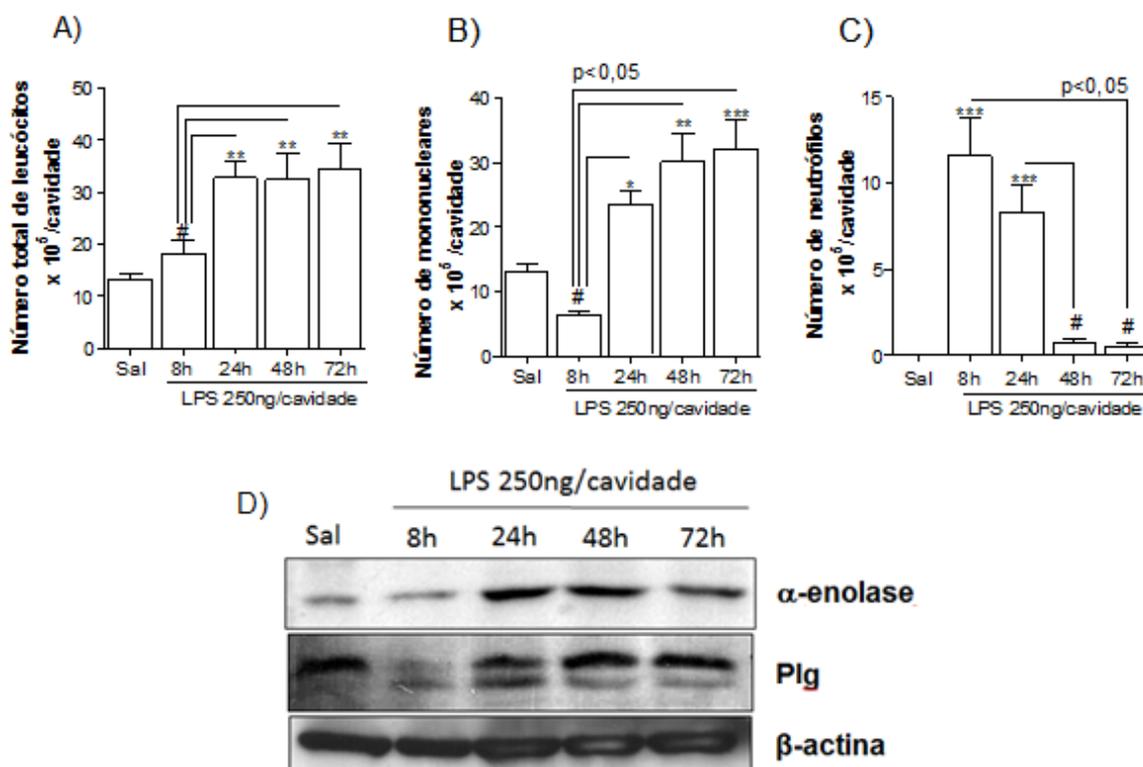
Para analisar a indução da expressão de AnxA1 por Plg e Pla, foram realizados ensaios *in vitro* utilizando uma linhagem celular macrofágica (RAW 264.7). As células RAW foram tratadas com Pla (2 $\mu$ g/mL) e lisadas nos tempos de 3h, 6h e 12h (**Figura 13A**). Uma segunda análise nos tempos de 12h, 24h e 36h foi feita, para avaliar a expressão desta proteína (**Figura 13B**). Similarmente ao estudo *in vivo*, as análises *in vitro* mostraram um aumento da expressão de AnxA1 que se inicia em 6h e é maior no tempo de 12h após adição de Pla, decaindo nos tempos posteriores.



**FIGURA 13: Efeito da Pla na expressão de AnxA1 em células RAW 264.7** Células murinas da linhagem RAW 264.7 foram carenciadas e tratados ou não com Pla (2 $\mu$ g/mL) durante diferentes tempos: 3, 6, e 12 horas (A) e 12, 24 e 36 horas (B). As células foram então coletadas e processadas para análise de AnxA1 por Western Blot. As membranas foram normalizadas com  $\beta$ -actina.

## 6.8 A resolução natural da pleurisia induzida por LPS é acompanhada pelo aumento de células mononucleares e maior expressão de $\alpha$ -enolase e plasminogênio

Para avaliar a expressão de componentes do sistema Plg/Pla no processo de inflamação aguda, foi utilizado o modelo de pleurisia induzida por LPS em camundongos BALB/C, utilizando como controle um grupo de animais que receberam apenas veículo (sal), ou seja, não inflamados (Sousa *et al.*, 2010; Vago *et al.*, 2012; Vago *et al.*, 2015). Nesse modelo, a injeção intrapleural de LPS induz um influxo de leucócitos para cavidade pleural, sendo que há um aumento na contagem total de células nos tempos de 24h, 48h e 72h (**Figura 14A**). A migração de mononucleares teve o mesmo perfil que a cinética da migração de células totais, com aumento no número dessas células a partir de 24h horas após a administração de LPS (**Figura 14B**). O pico da inflamação, ou seja, o momento onde há maior número de neutrófilos é em 8h após a indução da pleurisia, com números de neutrófilos ainda altos após 24h. A redução do número de neutrófilos (resolução), já é bastante significativa após 48h e segue reduzido em 72h, tempos considerados então, de resolução do processo inflamatório (**Figura 14C**). A análise da expressão do Plg, bem como do seu receptor  $\alpha$ -enolase, foi feita por Western Blot dos extratos protéicos celulares recuperados da pleura dos animais desafiados com LPS. O receptor  $\alpha$ -enolase foi fracamente detectado nos animais não inflamados (sal) e no grupo com 8h de inflamação, com expressão aumentada nos tempos de 24h e 48h, quando os eventos de anti-inflamação/resolução se iniciam. A expressão desse receptor reduz posteriormente, no tempo de 72h, mas ainda é maior em relação ao grupo controle e ao grupo que representa o pico da inflamação. O Plg foi detectado no grupo desafiado com PBS (controle) e sua expressão foi diminuída na fase produtiva da inflamação (8h), voltando para níveis basais nos tempos onde há recrutamento de mononucleares, quando se inicia o processo de anti-inflamação/resolução e se mantendo até 72h, quando ocorre o completo estabelecimento do processo resolutivo. Portanto, há um aumento da expressão de Plg, em relação ao período de pico da inflamação, bem como do seu receptor em correspondência aos tempos de resolução da resposta inflamatória (**Figura 14D**). É importante ressaltar que a expressão de ambos, Plg e  $\alpha$ -enolase, está associada ao maior influxo de células mononucleares para cavidade pleural.

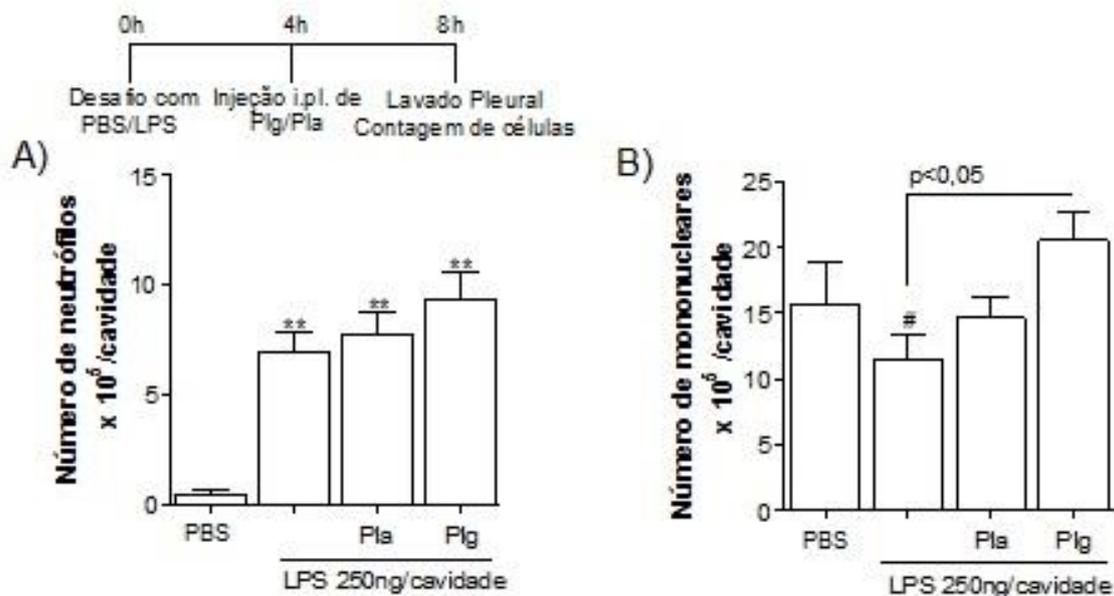


**FIGURA 14 – Cinética da pleurisia induzida por LPS em camundongos e análise de expressão de componentes do sistema Plg/PlA.** Camundongos BALB/c foram desafiados com 250ng de LPS pela via intrapleural sendo as células que migraram para a cavidade pleural, coletadas nos tempos indicados e processadas para contagem total e diferencial e análise para detecção do plasminogênio (Plg) bem como do seu receptor  $\alpha$ -enolase por Western Blot, sendo as membranas normalizadas com  $\beta$ -actina. Os resultados das contagens foram expressos em número de células por cavidade e mostrados como média  $\pm$  EPM. \*,  $P < 0.05$ , \*\*,  $P < 0.01$ , \*\*\*,  $P < 0.001$ , quando comparados com os camundongos injetados com PBS e #,  $P < 0.05$ , quando comparados com os camundongos desafiados com LPS.

### 6.9 A injeção de Plg/PlA, em animais com processo inflamatório estabelecido, não altera o curso da inflamação aguda

Com base no perfil das células recrutadas e na capacidade de Plg e Pla em aumentar a capacidade eferocítica de macrófagos, foi investigados se o tratamento com Plg ou Pla, após indução de pleurisia com LPS, aceleraria o processo de resolução nesse modelo de inflamação, avaliado pela contagem de neutrófilos no sítio inflamatório. No entanto, a administração de Plg ou Pla na pleura de camundongos 4h após a indução de pleurisia induzida por LPS não modificou o

processo de resolução, visto que não houve diminuição no número de neutrófilos na cavidade pleural (**Figura 15A**). Curiosamente, o Plg foi capaz de aumentar o número de mononucleares na cavidade (**Figura 15B**), um efeito que merece ser futuramente investigado. Outro protocolo de tratamento com Pla incluiu a avaliação do lavado pleural após 18h de tratamento, permitindo um maior tempo de tratamento, e novamente, não foi observada alteração do número de neutrófilos.

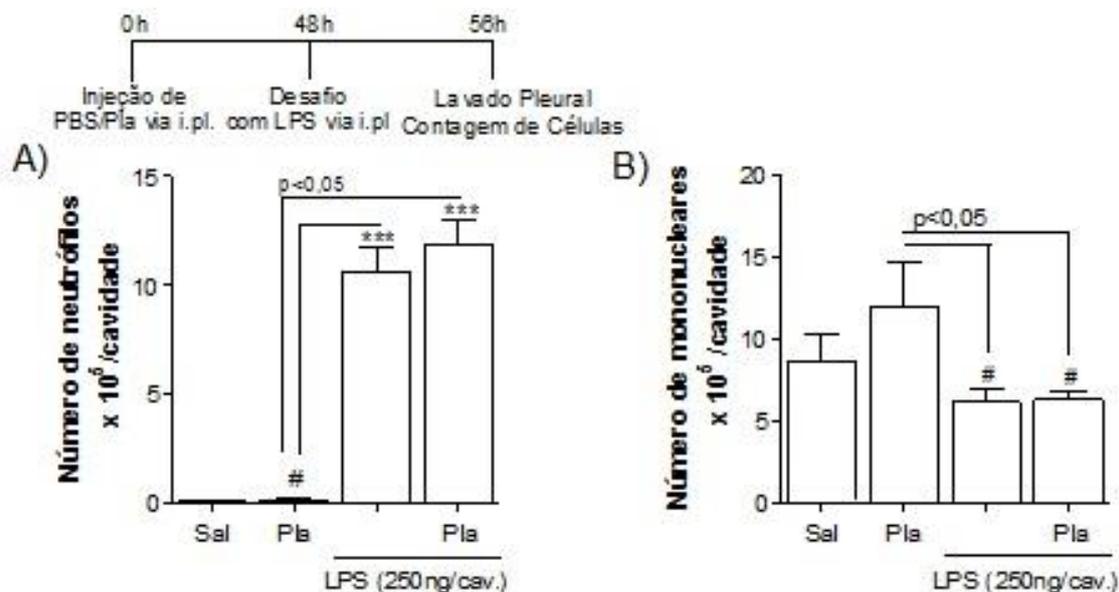


**FIGURA 15 – Efeito da administração de Plg e Pla após a injeção intrapleural de LPS.** Camundongos BALB/c receberam LPS por via intrapleural (250ng/cavidade) e 4h após foi feito o tratamento com injeção de Plg/Pla (2 µg/cavidade, i.pl.). As células presentes na cavidade pleural foram coletadas 8h após o desafio com LPS e processadas para contagem de neutrófilos (A) e de células mononucleares (B). Os resultados das contagens foram expressos em número de células por cavidade e mostrados como média ± EPM. \*\*,  $P < 0.01$ , quando comparados com os camundongos injetados com PBS e, #,  $P < 0.05$ , quando comparados com os camundongos injetados com LPS, mas não tratados com Plg/Pla.

### 6.10 O pré-tratamento de camundongos com plasmina não acelera o processo de resolução da pleurisia induzida por LPS

Sabendo-se que Plg e Pla induzem o recrutamento de macrófagos de um perfil anti-inflamatório e resolutivo, além de serem capazes de aumentar a capacidade eferocítica de macrófagos peritoneais murinos, a hipótese de que o pré-tratamento de camundongos com essas proteínas poderia acelerar o processo de resolução da

inflamação aguda foi avaliada. No entanto, a injeção intrapleural de Pla (2 $\mu$ g/cavidade) 48h antes da indução da pleurisia por LPS, foi incapaz de acelerar o processo resolutivo, uma vez que não houve redução no número de neutrófilos na cavidade pleural em relação ao grupo que não recebeu Pla antes do desafio com LPS (**Figura 16A**). Além disso, não houve alteração no número de células mononucleares em comparação ao grupo não tratado (**Figura 16B**).



**FIGURA 16 – Efeito do pré-tratamento com Pla na resolução de pleurisia induzida por LPS em camundongos.** Camundongos BALB/C foram pré-tratados com Pla (2 $\mu$ g/cavidade, i.pl.) 48h antes do desafio com LPS (250ng/cavidade). As células do lavado pleural foram coletadas 8h após a administração de LPS, e processadas para contagem de neutrófilos (A) e mononucleares (B). Os resultados dessas contagens foram expressos em número de células por cavidade e mostrados como média  $\pm$  EPM. \*\*\*,  $P < 0.001$ , quando comparados com os camundongos injetados com PBS e #,  $P < 0.05$ , quando comparados com os camundongos que receberam apenas injeção intrapleural de Pla

## 7 DISCUSSÃO

O processo inflamatório é essencial para a manutenção da homeostase tecidual. Eventos que estimulam a inflamação e culminam na eliminação do agente nocivo, assim como, eventos que levam ao retorno da condição de equilíbrio do tecido são importantes e envolvem um conceito que vem sendo consolidado, denominado resolução da inflamação (Serhan *et al.*, 2007). Vários eventos e mecanismos têm sido estudados para descrever o processo resolutivo da inflamação e para nortear futuras estratégias terapêuticas para doenças inflamatórias, distintas das atuais, que buscam amenizar a fase produtiva do processo inflamatório (Gilroy *et al.*, 2004; Hallet *et al.*, 2008; Alessandri *et al.*, 2013)

O sistema Plg/Pla já tem seu papel bem definido na degradação dos coágulos de fibrina, prevenindo a ocorrência de eventos trombóticos no organismo. Diversos estudos mostram a participação desse sistema na geração de respostas inflamatórias (Jenkins *et al.*, 1997; Herren *et al.*, 2001; Lijnen, 2001, Sousa *et al.*, 2005; Bae *et al.* 2012) e nos eventos pró-resolutivos como angiogênese, eferocitose e migração leucocitária (Ploplis *et al.*, 1998; D'Mello *et al.*, 2009; Gong & Plow, 2012; Díaz-Ramos *et al.*, 2012; Shen *et al.*, 2012; Rosenwald *et al.*, 2012; Das *et al.*, 2014; Carmo *et al.*, 2014). Esses dados sugerem um equilíbrio de funções desse sistema, sejam elas inflamatórias e pró-resolutivas, que buscam alcançar o retorno à homeostasia tecidual.

A migração leucocitária da microcirculação para o tecido é um evento essencial para a resposta imune, caracterizada principalmente na sua fase produtiva e inata pela ação de PMN, mas também pela atuação de macrófagos de perfil pró-inflamatório, de forma a fornecer funções efetoras contra agentes nocivos ao organismo (Petri, Phillipson & Kubes, 2008). Porém, a atuação de células mononucleares, especialmente macrófagos de perfis anti-inflamatórios e pró-resolutivos conduz ao processo de resolução da inflamação. Dessa forma, é interessante estudar os mecanismos e agentes responsáveis pelo recrutamento de células imunes.

O sistema Plg/Pla foi alvo de diversos estudos que investigaram a migração leucocitária. Experimentos *in vitro* conduzidos por Syrovets *et al.* (1997) mostraram a

alta capacidade quimiotática da Pla frente a monócitos, sem exercer quimiotaxia sobre neutrófilos. Em concordância, estudos *in vivo* realizados por Ploplis *et al.* (1998) e Gong *et al.* (2008) demonstraram que em animais Plg<sup>-/-</sup>, a migração de mononucleares, após o estímulo com tioglicolato, está comprometida, mas não há alteração no recrutamento de neutrófilos em comparação aos animais que não são deficientes para o gene (WT). Além disso, a Pla provoca a adesão firme de monócitos, com subsequente transmigração para o músculo cremaster de camundongos quando administrada localmente (Reichel *et al.*, 2011). Recentemente, Carmo *et al.* (2014) confirmaram a capacidade do sistema Plg/Pla em promover migração celular, demonstrando que essas proteínas são capazes de induzir migração de macrófagos e fibroblastos murinos *in vitro*, além de promoverem recrutamento de macrófagos para a pleura de camundongos quando administrados localmente, sem alteração no número de neutrófilos e linfócitos (Carmo *et al.*, 2014). Em contraste, Busuttill *et al.* (2004) demonstraram uma redução no recrutamento tanto de macrófagos, quanto de neutrófilos, em modelo de peritonite induzida pelo implante de biomateriais, sugerindo que a influência do sistema Plg/Pla no recrutamento leucocitário pode ser dependente do estímulo envolvido.

Embora os diversos estudos tenham demonstrado o papel do sistema Plg/Pla na migração celular (Ploplis *et al.*, 1998; Guo *et al.*, 2011; Wygrecka *et al.*, 2012; Gong & Plow, 2012; Carmo *et al.*, 2014.) não se sabe ainda qual o perfil dos macrófagos recrutados, bem como de que forma esse sistema atuaria na resolução da inflamação aguda. Dessa forma, o presente estudo foi proposto visando avançar no entendimento das ações do sistema Plg/Pla na resposta pró-resolutiva.

Inicialmente, o perfil de migração de leucócitos pela injeção intrapleural de Plg/Pla em camundongos BALB/C foi avaliado e, em seguida, o perfil das células recrutadas para a pleura foi avaliado por citometria de fluxo. Tanto o Plg quanto a Pla aumentaram o número de macrófagos de perfil anti-inflamatório (M2: Gr1<sup>-</sup> F4/80<sup>high</sup> e CD11b<sup>high</sup>) e do tipo resolutivo (Mres: F4/80<sup>med</sup> CD11b<sup>low</sup>) na cavidade pleural de camundongos, 48h após o desafio, sem alteração no número de macrófagos de perfil inflamatório (M1: Gr1<sup>+</sup> F4/80<sup>low</sup> Cd11b<sup>med</sup>). No entanto, alguns pontos de reprogramação macrofágica devem ser explorados, visando responder se a reprogramação *in vivo* de um perfil inflamatório para pró-resolutivo é atribuída ao

recrutamento ou à expansão de diferentes tipos de macrófagos dentro do ambiente tecidual em diferentes estágios da inflamação. Além disso, é preciso esclarecer se representam macrófagos responsivos a uma mudança do sítio inflamatório com alterações de fenótipo, ou ainda se ocorre uma combinação de eventos (Korns *et al.*, 2011). Ainda não se sabe se essas células já são recrutadas por Plg/Pla com um perfil pré-definido ou se a reprogramação macrofágica ocorre *in situ*, tanto para os monócitos recrutados da microcirculação, quanto para macrófagos residentes no tecido (Korns *et al.*, 2011; Lichtnekert *et al.*, 2013; Davies *et al.*, 2013). Macrófagos residentes são “M2-like”, mas em condições de homeostase esses macrófagos não se encontram ativos, e ainda não existem marcadores específicos para diferenciar macrófagos residentes de macrófagos que infiltraram no tecido (Lichtnekert *et al.*, 2013).

Macrófagos do tipo M2 podem ser induzidos por IL-4 and IL-13 (M2a), uma combinação de agonistas de TLRs e imunocomplexos (M2b), glicocorticoides e IL-10 (M2c), M-CSF ou TGF- $\beta$ . Eles frequentemente exibem altos níveis de arginase, determinados receptores, como o receptor de manose (CD206), e citocinas anti-inflamatórias, enquanto a produção de citocinas pró-inflamatórias, espécies reativas de oxigênio e óxido nítrico está diminuída (Lichtnekert *et al.*, 2013) Além dos dados de citometria de fluxo, os experimentos de PCR realizados para avaliar a expressão de genes envolvidos na assinatura genética de macrófagos de perfil M1 e M2 mostram uma modulação da expressão de CD206 e Arg-1, marcadores gênicos de perfil M2, sem aumento de iNOS (marcador de M1) em células obtidas do lavado pleural de camundongos desafiados com Pla e PBS (veículo).

Considerando a capacidade de Plg e Pla em promoverem aumento do número de células de características anti-inflamatórias e pró-resolutivas, elaborou-se a hipótese de que este sistema poderia atuar processo de resolução da inflamação através do aumento da ocorrência de eventos chave que acelerem o retorno à homeostase tecidual. Possíveis vias de ação do sistema Plg/Pla incluem o *clearance* de corpos apoptóticos e debris celulares no sítio inflamatório, liberação de mediadores anti-inflamatórios como IL-10 e TGF- $\beta$  por macrófagos do tipo M2 e, aceleração do processo de reparo tecidual e inibição de processos fibróticos e oxidantes, pela ação de macrófagos resolutivos, pela liberação de mediadores lipídicos, como a Resolvina

E1, que também pode atuar no aumento do *clearance* de neutrófilos apoptóticos (Korns *et al.*, 2011; El Kebir, Gjørstrup & Filep, 2012; Lichtnekert *et al.*, 2013). No presente estudo a administração de Pla ou Plg promoveu o aumento de um importante mediador pró-resolutivo, a AnxA1.

Uma vez que Plg e Pla são capazes de aumentar o número de macrófagos do tipo M2 e Mres, na cavidade pleural de camundongos, foi investigado se macrófagos tratados com essas proteases teriam capacidade eferocítica aumentada em relação aos macrófagos tratados com meio controle. Rosenwald *et al.* (2012) evidenciaram que corpos apoptóticos levam à ativação de Plg e sua capacidade de aumentar o *clearance* dessas células. Além disso, em estudo recente, Das *et al.* (2014) demonstraram que o Plg aumenta a eferocitose de timócitos apoptóticos e de hemácias opsonizadas, por macrófagos, de forma dependente de sua ligação ao receptor na superfície celular dessas células. No entanto, não há estudos na literatura que avaliaram a atuação do sistema Plg/Pla na capacidade de eferocitose de macrófagos frente a neutrófilos apoptóticos, que são células protagonistas da resposta inflamatória.

No presente estudo, foi avaliada a capacidade de Plg e Pla em aumentar a capacidade de eferocitose de macrófagos peritoneais murinos e macrófagos derivados de medula óssea frente a neutrófilos humanos apoptóticos. De fato, tanto Plg quanto Pla foram capazes de aumentar a capacidade eferocítica de macrófagos peritoneais e BMDMs murinos em ensaio *in vitro*. No entanto, a técnica utilizada não permitiu uma avaliação criteriosa do número de corpos apoptóticos que foram internalizados pelos macrófagos. Posteriormente, o ensaio de eferocitose por imunofluorescência, confirmou que a Pla é capaz de aumentar a internalização de neutrófilos apoptóticos por macrófagos, tratados por 12h com esta protease. Essa técnica exclui interferências como artefatos de técnica durante a coloração com May-Grunwald-Giemsa e permite a visualização de eferocitose em processo tardio, onde já houve degradação dos corpos apoptóticos no interior dos fagossomos. As imagens obtidas não evidenciaram corpos apoptóticos marcados em verde pontualmente dentro dos macrófagos, como se estivessem em fagossomos, mas sim pequenos pontos em todo o citoplasma dessas células. Isto pode ser devido a um processo tardio de eferocitose, com vários eventos por macrófagos, mas

também pode ser que essas células eferocitaram fragmentos de corpos apoptóticos. Por exemplo, em tecido adiposo inflamado, um adipócito em processo de morte parece ser eferocitado por vários macrófagos, com ingestão de pequenos fragmentos por célula (Poon *et al.*, 2014). Além disso, o tratamento dos macrófagos por 24h com Pla, diferentemente do ensaio anterior em que o estímulo foi por 12h, pode ter sido um dos fatores responsáveis por esse perfil de eferocitose visto.

O processo de fagocitose de corpos apoptóticos envolve o recrutamento de fagócitos por meio de sinais do tipo "find me", o reconhecimento das células apoptóticas por sinais "eat me" e ativação de vias de sinalização que levam ao rearranjo no citoesqueleto com posterior internalização dessas células (Hochreiter-Hufford & Ravichandran, 2013). Os sinais do tipo "find me" incluem, por exemplo, esfingosina 1-fosfato (S1P) e nucleotídeos como ATP e UTP. Já os sinais "eat me" conhecidos são mudanças na glicosilação de proteínas de superfície ou mudanças na carga da membrana plasmática, a ligação de proteínas séricas às células apoptóticas, tais como trombospondina e complemento C1q, bem como a exposição de certas proteínas intracelulares como calreticulina e AnxA1 e principalmente a exposição do fosfolípido fosfatidilserina na superfície celular (Ravichandram, 2011; Hochreiter-Hufford & Ravichandran, 2013). A calreticulina e AnxA1 tem se mostrado co-localizadas com fosfatidilserina na superfície de células apoptóticas e aumentam o *clearance* dessas células por fagócitos (Arur *et al.*, 2003; Dalli *et al.*, 2012). Além disso, a AnxA1 funciona como um sinal de *eat-me* e uma ponte entre a fosfatidilserina exposta pela célula apoptótica e o receptor FPR2 de macrófagos (McArthur *et al.*, 2010). Scannell e colaboradores (2007) demonstraram que a AnxA1 é liberada por células apoptóticas e estimula sua fagocitose por macrófagos. Além disso, a expressão de AnxA1, também por macrófagos, aumenta o *clearance* de corpos apoptóticos, como mostrado em estudos realizados por Dalli e colaboradores (2012) e Maderna e colaboradores (2005)

Em análise por *microarray*, Das e colaboradores (2014) mostraram que animais deficientes para o gene que codifica o plasminogênio, possuem expressão diminuída de AnxA1 no baço, além de outras proteínas envolvidas com fagocitose, o que pode ser um dos motivos pelo qual esses animais apresentam uma deficiência na fagocitose de hemácias opsonizadas por IgG, quando comparados aos animais WT.

Dessa forma, para elucidar um dos mecanismos envolvidos no aumento da capacidade fagocítica de macrófagos por Plg e Pla, foi avaliada a expressão de AnxA1 em extratos celulares obtidos da pleura de camundongos após injeção de Plg ou Pla, bem como de células RAW tratadas por diferentes tempos com essas proteases. O fato de que Plg e Pla aumentam a expressão de AnxA1, mesmo em tempos onde não há recrutamento de mononucleares, mostra que essas proteínas alteram a expressão de AnxA1 *in situ*, porém é necessário avaliar se as células recrutadas já apresentam uma expressão aumentada mesmo antes de chegarem ao tecido. Além disso, a Pla também foi capaz de promover esse aumento em células murinas mantidas em cultura, no tempo de 12h sob estímulo. Embora futuras análises sejam necessárias para se avaliar o impacto da inibição/antagonismo de AnxA1 na capacidade fagocítica do Plg/Pla demonstramos aqui que há de fato um aumento da expressão de AnxA1 por estas proteases, sugerindo que Plg/Pla possam atuar no processo de resolução através do aumento da expressão de AnxA1 associado ao aumento da capacidade fagocítica dos macrófagos. Além disso, a análise da expressão de outras moléculas envolvidas no processo se faz necessária.

Para avaliar a atuação do sistema Plg/Pla, bem como a expressão de componentes desse sistema frente a um processo inflamatório, foi utilizado um modelo inflamatório de resolução espontânea em camundongos, por meio de injeção intrapleural de LPS (250ng/cavidade), como descrito por Sousa *et al.* (2010). Nesse modelo, o desafio com LPS induziu um influxo, dependente do tempo, de neutrófilos para a cavidade pleural de camundongos, com pico entre 8 e 24h após a injeção. O número de neutrófilos começa a diminuir após 48h e a resolução completa da inflamação ocorre 72h após o desafio (Sousa *et al.*, 2010). Neste estudo, a resolução completa já foi evidente 48h após a injeção de LPS, o que mostra que o período resolutivo da pleurisia induzida por LPS pode variar entre 48 e 72h.

A partir do extrato das células obtidas pelo lavado pleural dos camundongos desafiados com LPS em diferentes tempos, foi analisada a expressão de Plg e de seu receptor  $\alpha$ -enolase. Na superfície celular, a interação de Plg com esse receptor aumenta sua ativação por t-PA e o protege de inibição pelo seu inibidor,  $\alpha$ 2-antiplasmina (Wygrecka *et al.*, 2009, Serhan *et al.*, 2007). No estudo realizado por

Wygrecka *et al.* (2009), a  $\alpha$ -enolase promoveu o recrutamento de monócitos mediado por Plg durante inflamação pulmonar aguda. Em outro estudo, Díaz-Ramos *et al.*, (2012) demonstraram, usando modelo de distrofia em musculatura esquelética, um novo papel de  $\alpha$ -enolase para restaurar a homeostase de tecido muscular lesionado, ao controlar a localização pericelular da atividade de plasmina. No presente estudo, foi observado um aumento da expressão de  $\alpha$ -enolase nos tempos onde se iniciam os eventos de resolução (24h), apesar de ainda ser um tempo de fase produtiva da inflamação, bem como nos tempos onde este processo resolutivo já está consolidado (48h e 72h). O Plg teve sua expressão significativamente reduzida no pico da inflamação (8h), porém, essa redução foi seguida por um aumento na expressão dessa proteína nos demais tempos. Visto que o processo de resolução da inflamação no modelo estudado pode ocorrer já no tempo de 48h após injeção de LPS, o programa endógeno envolvido na resolução da inflamação pode ser iniciado em tempos mais precoces, como no período de 24h, mesmo sendo este um tempo com grande número de neutrófilos, de forma dependente de plasminogênio e de seu receptor  $\alpha$ -enolase.

Vale ressaltar que o sistema Plg/Pla também está relacionado a eventos inflamatórios, em parte por uPA e uPAR, que podem estar envolvidos na liberação de citocinas pró-inflamatórias e fibrose (Stewart *et al.*, 2013) e Plg parece ter papel importante em orquestrar a resposta inflamatória em modelo murino de asma (Swaigood *et al.*, 2007). No modelo de inflamação do presente estudo, Plg, bem como seu receptor  $\alpha$ -enolase, provavelmente são regulados principalmente no período de anti-inflamação/resolução. Não houve aumento da expressão de  $\alpha$ -enolase no tempo de 8h, considerado pico de inflamação, mas sua expressão foi aumentada em 24h e se manteve maior até 72h após a indução da pleurisia. Por outro lado, o Plg teve sua expressão reduzida na fase produtiva da inflamação, voltando aos níveis basais nos demais tempos, onde se inicia e se consolida o processo resolutivo. Esses dados mostram que componentes do sistema Plg/Pla, como o próprio Plg e também os seus receptores são regulados durante a resolução da inflamação, o que sugere a participação deste sistema no retorno à homeostase tecidual, em modelo de pleurisia induzida por LPS.

Alguns estudos apontam para a capacidade do sistema Plg/Pla de atuar em processos que levam à resolução e retorno à homeostase tecidual. Em estudo realizado por Shen *et al.* (2012), a administração de Plg acelerou o processo de cicatrização de feridas agudas e de camundongos diabéticos. Além disso, o mesmo grupo (Shen *et al.*, 2014) mostrou que o Plg foi capaz de iniciar a cicatrização de perfurações agudas e crônicas na membrana timpânica de camundongos. Embora esses estudos mostrem o papel de Plg no processo de cicatrização, importante para o retorno à homeostasia, não há estudos que avaliem a capacidade do sistema Plg/Pla na resolução de processos inflamatórios agudos em camundongos, isto é, na redução precoce do número de células inflamatórias, como os neutrófilos, do tecido inflamado.

Sabendo que Plg e Pla promovem o recrutamento de macrófagos de perfil pró-inflamatório e resolutivo e são capazes de aumentar a capacidade efecrótica dessas células, foi investigado se o tratamento de camundongos com Plg/Pla (2 µg/cavidade) após o desafio com LPS (250ng/cavidade) seria capaz de acelerar o processo de resolução da pleurisia. Os resultados obtidos mostram que, a administração de Plg ou Pla aos animais inflamados não foi capaz de reduzir o número de neutrófilos na cavidade pleural após desafio com LPS. No entanto, o Plg foi capaz de aumentar o número de células mononucleares na cavidade, o que merece ser investigado, já que o aumento do número dessas células, principalmente macrófagos, pode aumentar o “*clearance*” de corpos apoptóticos e debris celulares. Além disso, pode resultar no aumento da produção de citocinas anti-inflamatórias e moléculas pró-resolutivas, o que depende, é claro, do perfil das células recrutadas. De forma semelhante, o pré-tratamento com Pla também não foi capaz de alterar o número de neutrófilos na cavidade pleural de camundongos 8h após a indução de pleurisia. Vale ressaltar que o modelo de inflamação estudado apresenta limitações, uma vez que se baseia em um processo de resolução rápida. Um modelo mais crônico de inflamação como o de cicatrização de feridas, poderia ser mais interessante para análises em relação ao pré e pós-tratamento com Plg ou Pla.

## 8 CONCLUSÕES

As análises dos nossos resultados permite identificar o sistema Plg/Pla como um sistema atuante no processo resolutivo de inflamação aguda, de forma que é capaz de alterar de forma positiva eventos chave envolvidos na resolução, como promover recrutamento de macrófagos de perfil anti-inflamatórios bem como resolutivos e aumentar o *clearance* de corpos apoptóticos através do aumento na expressão de AnxA1, uma molécula também com características pró-resolutivas. Além disso, a expressão de Plg que é reduzida no pico da inflamação na pleurisia induzida por LPS, mas retorna aos níveis basais nos tempos de anti-inflamação/resolução, bem como o aumento da expressão de seu receptor  $\alpha$ -enolase nesses tempos mostra que essas moléculas são reguladas durante a inflamação e podem ser essenciais no processo resolutivo.

## 9 PERSPECTIVAS

Ao final desta dissertação podemos perceber alguns pontos que precisam ser melhor investigados. Desta forma, alguns experimentos precisam ser conduzidos para que possamos complementar o trabalho e torna-lo apto à publicação. Descrevemos abaixo os experimentos em andamento e planejados.

Experimentos para avaliar o perfil de expressão gênica de macrófagos estimulados por Plg/Pla *in vitro*, estão em andamento. Esses estudos poderão nos confirmar a reprogramação macrofágica exercida por Plg/Pla.

Estudos *in vivo* com inibidores da atividade de Plg/Pla estão em andamento para avaliar a importância do sistema Plg/Pla para a resolução espontânea da inflamação aguda. Além disso, o uso desses inibidores se faz importante nos experimentos de eferocitose para avaliar a participação da atividade proteolítica e dos sítios de ligação à lisina na capacidade eferocítica de macrófagos.

Os experimentos de eferocitose por fluorescência serão conduzidos também com Plg, assim que o produto importado estiver disponível em laboratório. Além disso, serão realizados mais experimentos para investigar o envolvimento da AnxA1 no aumento de eferocitose promovida por Plg/Pla, pelo uso de anticorpos anti-AnxA1 e inibidores de receptores ALXR e FPR, além da avaliação da contribuição de outras moléculas importantes no processo de eferocitose.

Também avaliaremos a capacidade fibrinolítica de macrófagos nas diferentes fases da inflamação induzida por LPS.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALESSANDRI, A. L., SOUSA, L. P., LUCAS, C. D., *et al.* Resolution of inflammation: mechanisms and opportunity for drug development. **PharmacolTher.**, v.139, n.2, p.189-212, Aug 2013.

ARIEL A., SERHAN C.N. New Lives Given by Cell Death: Macrophage Differentiation Following Their Encounter with Apoptotic Leukocytes during the Resolution of Inflammation. **Front Immunol**, v. 3, n. 4, p. 3-4, Jan 2012.

ARUR S., UCHE U.E., REZAUL K. *et al.* Annexin I is an endogenous ligand that mediates apoptotic cell engulfment. **Dev Cell**, v. 4, n. 4, p-587-98, Apr 2003.

AUFFRAY, C. *et al.* Monitoring of blood vessels and tissues by a population of monocytes with patrolling behavior. **Science**, v.317, n.3, p.666–670, Aug 2007.

BAE S., KIM H., LEE N., *et al.*  $\alpha$ -Enolase Expressed on the Surfaces of Monocytes and Macrophages Induces Robust Synovial Inflammation in Rheumatoid Arthritis. **J Immunol.**, v.189, n.1, p. 365-372, Jul 2012.

BANNACH, F., GUTIERREZ, A., FOWLER, B. *et al.* Localization of regulatory elements mediating constitutive and cytokine-stimulated plasminogen gene expression. **J. Biol. Chem.**, v. 277, p. 38579-38587, Oct 2002.

BAUMAN, K., WETTLAUFER, S, OKUNISHI, K., *et al.* The antifibrotic effects of plasminogen activation occur via prostaglandin E2 synthesis in humans and mice. **J Clin Invest.**, v. 120, n. 6, p.1950-1960, Jun 2010.

BURG N.D, PILLINGER M.H. The neutrophil: function and regulation in innate and humoral immunity. **Clinimmunol**, v. 99, n. 7, p.7-17, Apr 2001

BUSUTTIL, S. J., V. A. PLOPLIS, F. J., CASTELLINO, L. *et al.* A central role for plasminogen in the inflammatory response to biomaterials. **J. Thromb. Haemost.** v. 2, n. 10, p. 1798–1805, Sep 2004.

BRIKEN, V. & MOSSER, D. M. Editorial: Switching on arginase in M2 macrophages. **J Leukoc Biol.** v. 90, n. 5, p-839–841. Nov 2011

CARMO, A.F.; ROCHA, B.R.C.; VAGO, J. P. *et al.* Plasmin induces in vivo monocyte recruitment through protease-activated receptor-1, MEK/ERK and CCR2 mediated signaling. **Journal of Immunology**, v. 193, n. 7, p. 3654-63, Oct 2014.

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

CHATTERJEE B.E., YONA S., ROSIGNOLI G., *et al.* Annexin 1-deficient neutrophils exhibit enhanced transmigration in vivo and increased responsiveness in vitro. **J Leukoc Biol**, v.78, n.3, p-639-46, Sep 2005.

COTRAN, R. S., KUMAR, V., COLLINS, T. **Pathologic Basis of Disease**, v. 6, p. 50–88, 1999. (W. B. Saunders Company, Philadelphia).

COTRAN, R. S., KUMAR, V., COLLINS, T. **Pathologic Basis of Disease**, n. 6, p.89–112, 1999. (W. B Saunders and Company, Philadelphia).

DALLI J., JONES C.P., CAVALCANTI D.M., *et al.* Annexin A1 regulates neutrophil clearance by macrophages in the mouse bone marrow. **FASEB J**, v. 26, n. 1, p. 387-96, Jan 2012.

DAS R., GANAPATHY S., SETTLE M., *et al.* Plasminogen promotes macrophage phagocytosis in mice. **Blood**, v. 124, n. 5, p. 679-88, May 2014 2014.

DAVIES, L.C., JENKINS, S.J., ALLEN J.E., *et al.* Tissue-resident macrophages. **Nature Immunology**, v. 14, p. 986–995, Sep 2013

D'MELLO, V., SINGH, S., WU, Y., *et al.* The Urokinase Plasminogen Activator Receptor Promotes Efferocytosis of Apoptotic Cells. **J BiolChem**, v. 284, n.25, p.17030–17038, Jun 2009.

DÍAZ-RAMOS, A., ROIG-BORRELLAS, A., GARCÍA-MELERO, A., *et al.* Requirement of Plasminogen Binding to Its Cell-Surface Receptor  $\alpha$ -Enolase for Efficient Regeneration of Normal and Dystrophic Skeletal Muscle. **Plos One**, v. 7, n.12, p.1-13, 2012.

DUFFIN R., LEITCH A.E., FOX S., *et al.* Targeting granulocyte apoptosis: Mechanisms, models, and therapies. **Immunol Ver**, v. 235, p. 28-40, Jul 2010.

EL KEBIR D., GJORSTRUP P., FILEP J.G. Resolvin E1 promotes phagocytosis-induced neutrophil apoptosis and accelerates resolution of pulmonary inflammation. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.109, n.37, p. 14983-8, Sep 2012.

FRANCO, R. F. Fisiologia da coagulação do sangue e da fibrinólise. In: ATHENEU (Ed.). **Hematologia: fundamentos e prática**. 1ª. Edição, São Paulo cap. 65, p.739 – 748, 2004.

FRANKENBERGER, M., STERNSDORF, T., PECHUMER, H., *et al.* Differential cytokine expression in human blood monocyte subpopulations: a polymerase chain reaction analysis. **Blood** v.87, n.1, p.373–377, Jan 1996.

GILROY, D.W., LAWRENCE, T., PERRETTI, M., *et al.* Inflammatory Resolution: new opportunities for drug discovery. **Nat Rev Drug Discov.** 3, n. 5, p.401-416, May 2004.

GEISSMANN, F., JUNG, S., LITTMAN, D. R. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. **Immunity** v.19, n. 1, p.71–82, Jul 2003

GONG, Y., FAN, Y., HOOVER-PLOW, J. Plasminogen Regulates Stromal Cell-Derived Factor-1/CXCR4-Mediated Hematopoietic Stem Cell Mobilization by Activation of Matrix Metalloproteinase-9. **ArteriosclerThrombVasc Biol.**, v.31, n. 9, p.2035-2043, Sep 2011.

GONG, Y. *et al.*, Inflammatory macrophage migration requires MMP-9 activation by plasminogen in mice. **The Journal of Clinical Investigation**, v.118, n.9, p.3012-3024, Sep 2008.

GORDON, S., TAYLOR, F. R. Monocyte and macrophage heterogeneity. **Nature Reviews Immunology**, v.5, n. 12, p.953-964, Dec 2005.

GUO, Y., LI, J., HAGSTROM, E., *et al.* Protective Effects of Plasmin(ogen) in a Mouse Model of Staphylococcus aureus–Induced Arthritis. **Arthritis & Rheumatism**, v.58, n. 3, p.764-772, Mar 2008.

HALLETT, J. M., LEITCH, A. E., RILEY, N. A., *et al.* Novel pharmacological strategies for driving inflammatory cell apoptosis and enhancing the resolution of inflammation. **Trends Pharmacol Scim**, v.29, n. 5, p. 250-257, May 2008.

HASEGAWA, T., SORENSEN, L., DOHI, M., *et al.* Induction of urokinase-type plasminogen activator receptor by IL-1. **Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.**, v. 16, n. 6, p.-692, Jun 1997.

HERREN, T., BURKE, T., JARDI, M. *et al.* Regulation of plasminogen binding to neutrophils. **Blood**. v. 97, n. 4, p. 1070-1078, Feb 2001.

HOCHREITER-HUFFORD, A., RAVICHANDRAN, K.S. Clearing the dead: apoptotic cell sensing, recognition, engulfment, and digestion. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, v. 5, n. 1, Jan 2013.

HOOVER-PLOW, J. L. *et al.* Strain and model dependent differences in inflammatory cell recruitment in mice. **Inflamm Res**, v. 57, n. 10, p. 457-63, Oct 2008.

HUYNH, M.L, FADOK, V.A., HENSON, P.M. Phosphatidylserine-dependent ingestion of apoptotic cells promotes TGF-beta1 secretion and the resolution of inflammation. **J. Clin. Invest.** V. 109, n. 1, p. 41-50. Jan 2002.

ISOBE, Y., KATO, T., ARITA, M. Emerging roles of eosinophils and eosinophil-derived lipid mediators in the resolution of inflammation. **Frontiers in Immunology**, v. 270, n.3, p.1-6, Aug 2012.

JENKINS, G., SEIFFERT, D., PARMER, R. *et al.* Regulation of plasminogen gene expression by interleukin-6. **Blood**. v. 89, n. 7, p. 2394-2403, Apr 1997.

KASZA, A., KOJ, A. Cytokines regulate plasminogen activation system in astrocytoma cells. **J. Phys. and Pharm.** v 53, n. 1, p. 95-104, Mar 2002.

KORNS D., FRASCH S.C., FERNANDEZ-BOYANAPALLI R., *et al.* Modulation of macrophage efferocytosis in inflammation. **Front Immunol**, v. 2, n. 57, p. 1-10, Nov 2011.

LABONTE A.C., TOSELLO-TRAMPONT A.C., HAHN Y.S. The role of macrophage polarization in infectious and inflammatory diseases. **Mol Cells**, v. 37, n. 4, p. 275-85, Apr 2014.

LICHTNEKERT J., KAWAKAMI T., PARKS W.C. *et al.* Changes in macrophage phenotype as the immune response evolves. **Curr Opin Pharmacol.**, v. 13, n. 4, p. 555-64, Aug 2013.

LIJNEN, H. Elements of the fibrinolytic system. **Ann. New York Acad. Sci.** v. 936, p. 226-236, 2001.

MADERNA P., YONA S., PERRETTI M. *et al.* Modulation of phagocytosis of apoptotic neutrophils by supernatant from dexamethasone-treated macrophages and annexin-derived peptide Ac(2-26). **J Immunol**, v. 174, n. 6, p-3727-33, Mar 2005.

MEDZHITOV, R. Inflammation 2010: New Adventures of an Old Flame. *Cell*, v. 140, n.6, p.771-776, Mar 2010.

MILES, L., LIGHVANI, S., BAIK, N. The Plasminogen Receptor, Plg-RKT, and Macrophage Function. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, p.1-14, Oct 2012.

NATHAN C., DING A. Nonresolving inflammation. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 871-882, Mar 2010.

NORLING, L. V., SERHAN, C. N. Profiling in resolving inflammatory exudates identifies novel anti-inflammatory and pro-resolving mediators and signals for termination. **J. Intern. Med**, v.268, n. 1, p.15–24, Jul 2010.

PETRI, B.; PHILLIPSON, M.; KUBES, P. The physiology of leukocyte recruitment: an in vivo perspective. **J Immunol**, v. 180, n. 10, p. 6439-46, May 2008.

PINHO, V., SOUZA, D. G., BARSANTE, M. M., *et al.* Phosphoinositide-3 kinases critically regulate the recruitment and survival of eosinophils in vivo: importance for the resolution of allergic inflammation. **J. Leukoc.Biol.** v.77, n. 5, p.800-810, May 2005.

POON, I.K.H, LUCAS C.D, ROSSI, A.G., *et al.* Apoptotic Cell Clearance: Basic Biology and Therapeutic Potential. **Nature Reviews**, v. 14, n. 3, p. 166-177, Mar 2014.

PLOPLIS, V. A. *et al.* Plasminogen deficiency differentially affects recruitment of inflammatory cell populations in mice. **Blood**, v. 91, n. 6, p. 2005-9, Mar 1998.

PLOW, E. F., HERREN, T., REDLITZ, A., *et al.* The cell biology of plasminogen system. **FASEB J.**, v. 9, n. 10, p. 939-945, 1995.

RAVICHANDRAN, K.S. Beginnings of a good apoptotic meal: the find-me and eat-me signaling pathways. **Immunity**, v. 35, n. 4, p-445-55, Oct 2011.

ROSENWALD, M., KOPPE, U., KEPPELER, H., *et al.* Serum-Derived Plasminogen Is Activated by Apoptotic Cells and Promotes Their Phagocytic Clearance. **J. Immunol**, v. 189, n.12, p.1-7, Dec 2012.

ROSSI, A.G., MCCUTCHEON, J.C., ROY, N., *et al.* Regulation of Macrophage Phagocytosis of Apoptotic Cells by cAMP. **J. Immunol**, v.160, n.7, p.3562-8, Apr 1998.

SAFFAR A. S, ASHDOWN H., GOUNNI A. S. The molecular mechanisms of glucocorticoids mediated neutrophil survival. **CurrDrugTargets** v.12, n. 4, p.556-62, Apr 2011.

SAVILL, J. Apoptosis in resolution of inflammation. **J LeukocBiol**, v.61, n. 4, p.375-380, Apr 1997

SCHIF-ZUCK, S. *et al.* Saturated-efferocytosis generates pro-resolving CD11b low macrophages: modulation by resolvins and glucocorticoids. **European journal of immunology**, v. 41, n. 2, p. 366-79, Feb 2011.

SCHULIGA, M., WESTALL, G., XIA, Y., Stewart, A. The plasminogen activation system: new targets in lung inflammation and remodeling. **Current Opinion in Pharmacology**, v.13, n. 3, p.386-393, Jun 2013.

SERHAN, C. N. & PETASIS, N. A. Resolvins and Protectins in Inflammation Resolution. **Chem Rev**, v.111, n.10, p.5922-5943, 2011

SERHAN, C.N., BRAIN, S.D., BUCKLEY, C.D., *et al.* Resolution of inflammation: state of the art, definitions and terms. **FASEB J**, v.21, n.12, p.325-32, Feb 2007.

SHELDON K. E., SHANDILYA H., KEPKA-LENHART D., *et al.*, "Shaping the murine macrophage phenotype: IL-4 and cyclic AMP synergistically activate the arginase I promoter," **J Immunol**, v. 191, n. 5, p. 2290-2298, Sep 2013.

SHEN, Y., GUO, Y., MIKUS, P., *et al.* Plasminogen is a key proinflammatory regulator that accelerates the healing of acute and diabetic wounds. **Blood**, v.119, n.24, p.5879-5887, Jun 2012.

SOEHNLEIN O., LINDBOM L. Phagocyte partnership during the onset and resolution of inflammation. **Nat Rev Immunol.**, v.10, n.6, p.427-439, Jun 2010.

SOUSA L.P., ALESSANDRI A.L., PINHO V., TEIXEIRA M.M. Pharmacological strategies to resolve acute inflammation. **Curr Opin Pharmacol**, v. 13, n. 4, p. 625-31, Aug 2013.

SOUSA L.P., BRASIL B.S, Silva B. M., *et al.* Characterization of alpha-enolase as an interferon-alpha 2 alpha 1 regulated gene. **Front Biosci**, Sep 2005.

SOUSA L.P., SILVA B.M., BRASIL B.S., *et al.* Plasminogen/plasmin regulates alpha-enolase expression through the MEK/ERK pathway. **Biochem Biophys Res Commun.**, v.337, n.4, p.1065-1071, Dec 2005.

SOUSA, L. P., CARMO, A. F., REZENDE, B. M., *et al.* Cyclic AMP enhances resolution of allergic pleurisy by promoting inflammatory cell apoptosis via inhibition of PI3K/Akt and NF-kappaB. **BiochemPharmacol**, v. 78, n.4, p.396-405, Aug 2009.

SOUSA, L. P., LOPES, F., SILVA, D. M., *et al.* PDE4 inhibition drives resolution of neutrophilic inflammation by inducing apoptosis in a PKA-PI3K/Akt-dependent and NF-kappaB-independent manner. **J LeukocBiol**.v.87, n. 5, p.895-904, May 2010.

STEWART A., XIA Y., HARRIS T., *et al.* Plasminogen-stimulated airway smooth muscle cell proliferation is mediated by urokinase and annexin A2, involving plasmin-activated cell signalling. **Br J Pharmacol**, v. 170, n. 7, p. 1421-35, Dec 2013.

SWAISGOOD C.M., ARONICA M.A., SWAIDANI S. *et al.* Plasminogen is an important regulator in the pathogenesis of a murine model of asthma. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 176, n.4, p. 333-42. Aug 2007.

SYROVETS T, LUNOV O, SIMMET, T. Plasmin as a proinflammatory cell activator. **J Leukoc Biol. Review**, v.92, n.3, p.509-19, Sep 2012.

VAGO, J. P., NOGUEIRA, C. R., TAVARES, L. P., *et al.* Annexin A1 modulates natural and glucocorticoid-induced resolution of inflammation by enhancing neutrophil apoptosis. **J LeukocBiol**, v.92, n. 2, p. 249-258, Aug 2012.

WILLENBORG, S., LUCAS, T., VAN LOO, G., *et al.* CCR2 recruits an inflammatory macrophage subpopulation critical for angiogenesis in tissue repair. **Blood**, v.120, n. 3, p.613-625, Jul 2012.

WYGRECKA M., MARSH L.M., MORTY R.E., *et al.* Enolase-1 promotes plasminogen-mediated recruitment of monocytes to the acutely inflamed lung. **Blood**, v.113, n.22, p.5588-98, May 2009.

## 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**.

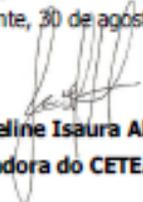
Este certificado expira-se em **14/03/2017**.

## 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.

  
 Prof<sup>ª</sup>. **Jacqueline Isaura Alvarez-Leite**  
 Coordenadora do CETEA/UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais  
 Avenida Antônio Carlos, 8827 – Campus Pampulha  
 Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2006  
 31270-901 - Belo Horizonte, MG - Brasil  
 Telefone: (31) 3498-4518  
[www.ufmg.br/bioetica/cetea](http://www.ufmg.br/bioetica/cetea) - [cetea@orpo.ufmg.br](mailto:cetea@orpo.ufmg.br)

## ANEXO B - Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP

**Projeto: CAAE – 0319.0.203.000-11**

**Interessado(a): Prof. Vandack Alencar Nobre Jr.  
Departamento de Clínica Médica  
Faculdade de Medicina - UFMG**

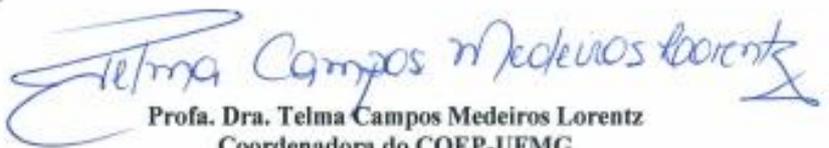
### DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP analisou e aprovou, no dia 29 de julho de 2014, as alterações, abaixo relacionadas, no projeto de pesquisa intitulado "Estudo da função endotelial e cardiovascular em pacientes portadores de sepse: implicações diagnósticas, definição de risco e terapêutica":

1. Avaliação oftalmológica completa; exame clínico, realizado por oftalmologista, no próprio CTI, ou seja, sem necessidade de transporte do paciente para o setor de oftalmologia;
2. Coleta de sangue total para separação de:
  - 2.1 Células mononucleares do sangue periférico (CMSP): avaliar a apoptose celular e viabilidade dessas células, bem como características da via do inflamossoma e da produção de citocinas in vitro (os resultados serão correlacionados com a gravidade e prognóstico dos pacientes);
  - 2.2 Neutrófilos; este estudo pretende avaliar o perfil de ativação e capacidade de migração de neutrófilos, avaliar vias de sinalização da P13K nos neutrófilos através de marcação de atividade de Akt/PKB e sua fosforilação e, por fim, avaliar o efeito do tratamento de inibidores na via da P13K no recrutamento de neutrófilos provenientes de pacientes com sepse;
  - 2.3 estudo da função dos neutrófilos na sepse através da realização de ensaios de marcadores de membrana celular e de moléculas relacionadas à via de sinalização da P13K;
3. Dosagem de alguns micro RNAs (miRNA 150, miRNA 574-5p, miRNA 133\* e miRNA 193b) no plasma, que serão testados em relação à gravidade da sepse e ao prognóstico dos pacientes;
4. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para familiar ou responsável;
5. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para o paciente.

A aprovação é válida por dois anos (de 29 de julho de 2014 a 28 de julho de 2017).

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.

  
Prof. Dra. Telma Campos Medeiros Lorentz  
Coordenadora do COEP-UFMG