

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

LINDISLEY FERREIRA GOMIDES

**Participação da tripsina e do receptor ativado por protease
(PAR)-4 no recrutamento de neutrófilos em modelo de pleurisia
experimental**

Belo Horizonte

2012

LINDISLEY FERREIRA GOMIDES

**Participação da tripsina e do receptor ativado por protease
(PAR)-4 no recrutamento de neutrófilos em modelo de pleurisia
experimental**

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

Orientador: Prof. Dr. André Klein


Belo Horizonte

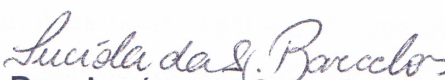
2012

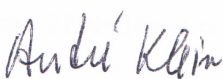
**“PARTICIPAÇÃO DA TRIPSINA E DO RECEPTOR ATIVADO
POR PROTEASE (PAR)-4 NO RECRUTAMENTO DE
NEUTRÓFILOS EM MODELO DE PLEURISIA EXPERIMENTAL”.**

LINDISLEY FERREIRA GOMIDES

Dissertação de Mestrado defendida e aprovada, no dia 27 de Janeiro de 2012, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores:


PROFA. DRA. SILVIA PASSOS ANDRADE
DEPTO DE FISIOLOGIA E BIOFÍSICA
ICB/UFMG


PROFA. DRA. LUCÍOLA DA SILVA BARCELOS
DEPTO DE FISIOLOGIA E BIOFÍSICA
ICB/UFMG


PROF. DR. ANDRÉ KLEIN
DEPTO DE FARMACOLOGIA
ICB/UFMG – ORIENTADOR

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Fisiologia e Farmacologia
Instituto de Ciências Biológicas - Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Belo Horizonte, 27 de Janeiro de 2012.

Dedicatória

Aos meus pais, **Antônio e Maria Lúcia** (*in memoriam*),
razão maior do meu recomeço.

*“O amor nos socorre de todo esquecimento porque sobrevive na continuidade do que
plantamos!”
(Pe. Fábio de Melo)*

“Imagine uma nova estória para a sua vida e acredite nela!”

(Paulo Coelho)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a **Deus**, meu refúgio e fortaleza, por ouvir meus sonhos e por me permitir buscá-los em meio a uma realidade de limitações. Agradeço pela força de cada dia, que me permitiu caminhar segura e confiante, e olhar sempre para frente, a alcançar os sonhos se renovando em mim.

Agradeço ao **André** - amigo, professor, orientador e 'pai científico' por acreditar na minha força e na minha capacidade, em meio a um momento tão frágil; pela oportunidade deste recomeço, pela confiança, atenção, ensinamentos, dedicação, paciência, disponibilidade e por tudo que vivemos e construímos juntos. Guardo comigo lições não somente do mundo científico, mas também de um ser humano admirável que reconhece o valor na simplicidade das coisas. André, **VOCE É ESPECIAL!**

Gratidão eterna aos meus pais, **Antônio e Maria Lúcia (in memoriam)**, por tudo que me ensinaram durante toda a minha vida. Pelo amor dedicado; pelo esmero em sempre oferecer o melhor, na criação e na formação; pelos momentos vividos e principalmente, pelo exemplo de determinação, fé e coragem. Vocês são luz no meu caminho! Saudades eternas!

À minha irmã **Luciene**, companheira incansável de todas as horas, por entender que eu não poderia parar. Acreditou que o meu sonho não cabia em caixinhas e me permitiu partir. Obrigada por estar sempre ao meu lado.

Ao meu cunhado **Célio**, amigo de opiniões valiosas, pelo carinho e paciência ao cuidar de mim; por entender meus tropeços e por ser o porto seguro que acolhe a irmã que tanto amo.

Às minhas vovós, **Dolores e Maria das Neves**: o carinho e a força das suas orações guiam os meus passos.

Aos demais familiares, pela torcida. Em especial, a jovem **Nayara**, pelo carinho ao cuidar de mim, pela companhia agradável em todos os momentos e pelos sonhos compartilhados. **Victória**, a Dindinha te ama! **Tia Rita e os seus**, pelo aconchego dos primeiros meses e pelo carinho dessa acolhida.

Ao **José**, meu eterno Xangô, mestre nos ensinamentos sobre o meu equilíbrio emocional. Nosso elo espiritual justifica o carinho e cuidado mútuos, aqui e na eternidade.

Às queridas amigas, **Claudinha e Elis**, por estarem sempre no meu caminho, anjos de luz que me ajudam a seguir em frente.

Aos professores que deixaram em mim grandes lições: **Matheus Senna, Analina Furtado, Leonardo Paes, Adriana Santos, Ana Cristina Chaves, Anderson Vilela, Gilmar Miranda e Wanderson Martins**, pelo exemplo de dedicação ao ensino, pelo apoio e incentivo nessa busca.

À professora **Janetti Francischi**, pelo exemplo de dedicação e amor à ciência.

Aos professores do Departamento de Fisiologia e Farmacologia: **Igor Dimitri, Miriam Lopes, Adelina Reis, Dalton Ferreira, Daniella Bonnaventura, Fabrício Moreira, Steyner Cortes, Christopher Kushmerick e Helton Reis**, pelos ensinamentos.

À **Banca Examinadora**, pela atenção dispensada na leitura desse trabalho.

Aos amigos que fazem parte da família do Laboratório de Inflamação e Dor: **Samuel, Tamires, Paula, Francilene, Gabriela, Ana Clara, Nerissa**. A nossa convivência reúne em mim lembranças de momentos maravilhosos, que enfeitaram ainda mais a rotina de trabalho. **Naty**, à você em especial, por ser presença na fase final desse projeto. Obrigada por me acolher nos momentos de alegria, de dúvidas e de contratempos.

Ao **Webster**, técnico do laboratório e grande amigo. Sua companhia, seus conselhos e o seu suporte foram imprescindíveis para a realização desse trabalho. Obrigada pela presença alegre e pela boa vontade em ajudar.

Ao **Raphael Gomes**, meu amigo-irmão, companheiro desde a minha chegada na UFMG. Obrigada pelos ensinamentos, paciência, orações e conselhos. Já vejo em você um cientista de grandes idéias.

À querida **Vivi Saito**, que deixou saudades mesmo antes da partida. Obrigada pela amizade sincera, por tudo que você me ensinou e pelo que ainda vamos passar juntas. *The future is right there, we'll see!*

Ao amigo **Rafael Rezende**, exemplo de dedicação e de perseverança. Abraço certo, na hora certa, e ainda com uma palavra iluminadora de brinde. Dádiva que não tem preço!

Aos amigos da Faculdade de Farmácia: **Bráulio, Flávia, Marcus Vinícius, Julierny, Nayana, Nanda e Polly**. Obrigada pelos bons momentos que se renovam, pelo apoio e pelo incentivo.

Aos colegas da pós-graduação: **Maria Cecília, Paulo, Rosária, Aline, Luciano, Pedro, Dalton, Brisa, Celso, Thércia, Ana Cândida, Fernanda, Thiago, Luiz Felipe, Matheus, Kátia, Luciana, Denise, Geovani, Mariana e Daniele**. Obrigada pelos momentos de entretenimento e distração, festas, conselhos, carinho e força. Em especial, **Rogério, Ariadne e Ana Flávia**, por superarem comigo os medos, inseguranças e incertezas.

À **Turminha da Dança** que, com energia, charme e elegância, conseguiu me mostrar que o lado desarmônico da vida também pode virar uma melodia dançante. 'E o fim é belo e certo. Depende de como você vê!' (O Teatro Mágico).

Aos colegas do CEBIO, **Gilmar e Elmo**, pela dedicação e profissionalismo no atendimento, pelo carinho e disposição em ajudar.

Aos funcionários **Jorge, Silvio, Rinaldo e Wellington**, pela presença atenciosa e necessária a realização desse trabalho.

As secretárias da pós-graduação, **Cinthya e Nilda**, e ao jovem **Gabriel**, pelo suporte técnico e conselhos indispensáveis do meio acadêmico.

Aos **Animais** que com suas vidas, deram vida a esse projeto em prol da ciência.

A **CAPES, CNPq e Fapemig**, pelo apoio financeiro.

RESUMO

As serinoproteases agem através da clivagem do grupamento amino terminal de receptores acoplados à proteína G denominados PAR (*proteinase activated receptors*, PARs). Após clivagem, a porção restante de aminoácidos serve como ligante para o seu receptor. Estes receptores são classificados de 1 a 4, dependendo do local de clivagem do grupamento N-terminal e da serinoprotease responsável pela clivagem. Os PAR são expressos em um grande número de células e estão envolvidos em mecanismos fisiológicos diversos, entre eles a inflamação. PAR-4 são expressos em leucócitos e sua ativação por trombina ou por tripsina parece estar envolvida com a ativação destas células, bem como nos mecanismos pró-inflamatórios induzidos por estas proteases. No entanto, os mecanismos envolvidos na regulação do recrutamento de leucócitos para o sítio inflamatório em resposta às serinoproteases ainda não foram elucidados. Desta forma, neste trabalho, investigou-se a participação da tripsina no recrutamento de neutrófilos para a cavidade pleural de camundongos BALB/c, em resposta a diferentes estímulos inflamatórios, avaliando-se a importância do PAR-4 no controle deste processo. O pré-tratamento dos animais com aprotinina ou com o antagonista seletivo de PAR-4, tcY-NH₂, inibiu a migração de neutrófilos induzida por carragenina ou por tripsina. O recrutamento de neutrófilos induzido pela tripsina foi também inibido após tratamento com antagonista de leucotriena(LT)B₄. A administração intrapleural de um peptídeo ativador de PAR-4, LTB₄ e interleucina (IL)-8 também foram capazes de induzir o recrutamento de neutrófilos para a cavidade pleural. Em conclusão, nossos resultados demonstram que a ativação de PAR-4 exerce um papel importante na regulação do recrutamento de neutrófilos em modelo de pleurisia experimental. Em conjunto, estes resultados expandem o conhecimento da participação de proteases na resposta inflamatória, sugerindo uma nova estratégia terapêutica para o seu controle, através do bloqueio de PAR-4.

PALAVRAS-CHAVE: PAR-4, recrutamento de neutrófilos, carragenina, tripsina, pleurisia.

ABSTRACT

Serine proteases act through the cleavage of the N-terminus cluster of G protein-coupled receptors known as *PARs* (*proteinase activated receptors*). After the cleavage, the remaining aminoacid chain acts like a ligand for its own receptors. Those receptors are classified from 1 to 4, and this classification depends on two factors: first, the cleavage spot in the N-terminal domain and second, on the serine protease responsible for the cleavage. PARs are expressed on a vast array of cells and are involved in various physiological mechanisms, being inflammation one of them. PAR-4 are expressed on leukocytes and their activation by trombin or trypsin seems to be involved with the activation of those cells, together with the pro-inflammatory phenomena induced by these proteases. However, the regulation process involved in the leukocytes recruitment to the inflammatory site in response to the serine proteases has not been elucidated. In this way, the trypsin participation on neutrophils recruitment to the pleural cavity of BALB/c mice in response to different inflammatory stimuli was investigated in this work, assessing the PAR-4 importance in the control of this process. Pre-treatment of the animals with aprotinin or with a PAR-4 selective antagonist, tcY-NH₂, inhibited neutrophils migration induced by carrageenan or by trypsin, the neutrophils recruitment induced by trypsin equally inhibited after a treatment with a leucotrien(LT)B₄ antagonist. Intrapleural administration of a PAR-4 activator peptide, LTB₄, and interleucin (IL)-8 were also capable of inducing neutrophils recruitment to the pleural cavity. In conclusion, our studies demonstrate that PAR-4 activation plays an important role on the regulation of neutrophils recruitment in the pleurisy experimental model. Altogether, these results expand the knowledge of proteases participation in inflammatory response, thus suggesting a new strategic therapy to its control, through PARs-4 blockade/inhibition.

KEYWORDS: PAR-4, neutrophil recruitment, carrageenan, trypsin, pleurisy.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismo de ativação de PAR.....	19
Figura 2. Esquema representando o pré-tratamento dos camundongos com aprotinina, tcY-NH ₂ , U75302 e AY-NH ₂ e os estímulos flogogênicos.....	32
Figura 3. Migração de neutrófilos para a cavidade pleural de camundongos induzida por diferentes doses de carragenina (30, 100, 300 µg/0.1 mL).....	36
Figura 4. Efeito induzido pelo pré-tratamento com aprotinina (0.01, 0.03 e 0.1 µg/cavidade) sobre a migração de neutrófilos induzida pela administração i.pl. de carragenina (30 µg/0.1 mL).....	38
Figura 5. Migração de neutrófilos para a cavidade pleural de camundongos, 4 horas após desafio com tripsina (0.1, 1, 10 µg/0.1 mL).....	40
Figura 6. Migração de neutrófilos para a cavidade pleural de camundongos , 4 horas após desafio com tripsina (0.1, 1, 10 µg/0.1 mL).....	41
Figura 7. Efeito induzido pelo pré-tratamento com aprotinina (0.1 µg/cavidade) sobre a migração de neutrófilos induzida pela administração i.pl. de tripsina (10 µg/0.1 L).....	43
Figura 8. Efeito induzido pelo pré-tratamento com tcY-NH ₂ (0.1, 0.3 e 1.0 µg/cavidade) sobre a migração de neutrófilos induzida pela administração i.pl. de tripsina (10 µg/0.1 mL).....	45
Figura 9. Efeito induzido pelo pré-tratamento com tcY-NH ₂ (1.0 µg/cavidade) sobre a migração de neutrófilos induzida pela administração i.pl. de tripsina (10 µg/0,1 mL).....	47
Figura 10. Efeito induzido pelo pré-tratamento com U75302 (3.0 µg/cavidade) sobre a migração de neutrófilos induzida pela administração i.pl. de tripsina (10 µg/0.1mL).....	49
Figura 11. Efeito induzido pelo pré-tratamento com U75302 (3.0 µg/cavidade) sobre a migração de neutrófilos induzida pela administração i.pl. de LTB4 (500ng/0.1mL).....	50
Figura 12. Efeito induzido pelo pré-tratamento com tcY-NH ₂ (1.0 µg/cavidade) sobre a migração de neutrófilos induzida pela administração i.pl. de IL-8 (60ng/0.1 mL).....	52
Figura 13. Efeito induzido pelo pré-tratamento com tcY-NH ₂ (3.0 µg/cavidade) sobre a migração de neutrófilos induzida pela administração i.pl. de IL-8 (60ng/0.1 mL).....	53

Figura 14. Migração de neutrófilos para a cavidade pleural de camundongos induzida por diferentes doses de AY-NH₂ (0.1, 1, 10 µg/0.1 mL)55

Figura 15. Efeito induzido pelo pré-tratamento com tcY-NH₂ (1.0 µg/cavidade) sobre a migração de neutrófilos induzida pela administração i.pl. de AY-NH₂ (10 µg/0.1 mL).....57

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AP: peptídeo agonista;

Asp: aspartato;

Arg-41: arginina na posição 41;

ATMs : atmosférico;

BSA: albumina de soro bovino tipo V;

CD11b/CD18: receptor de adesão celular de neutrófilos;

CEC: circulação extracorpórea;

CETEA: Comitê de Ética em Experimentação Animal;

CEBIO: Centro de Bioterismo;

CG: catepsina G;

Cg: carragenina;

CGRP: peptídeos relacionados ao gene da calcitonina;

CO₂: gás carbônico;

CXC: quimiocinas da família CXC;

GM-CSF: fator estimulador de colônia para monócitos e granulócitos;

fMLP: peptídeo *formyl-Met-Leu-Phe*, quimioatraente de neutrófilos;

Hist: histidina;

HUVEC: célula endotelial de cordão umbilical de humanos (*human umbilical vein endothelial cell*);

IL-1: interleucina-1;

IL-6: interleucina-6;

IL-8: interleucina-8;

LTB₄ : leucotriena B₄;

LPS: lipopolissacarídeo ;

MCP-1: proteína-1 quimiotática para macrófago;

MIP-1 α : proteína inflamatória de macrófago 1 α ;

MMP-9: metaloproteinase de matriz 9;

MPO: mieloperoxidase;

NO: óxido nítrico;

Ser: serino;

Ser-42: serina, na posição 42;

SFLLRN: sequência do domínio N-terminal de PAR-1;

SP: substância P;

PARs: receptores ativados por proteinases (*proteinase activated receptors*);

PAF: fator ativador de plaquetas;

PBS: tampão fosfato salino;

PG: prostaglandina;

PR-3: proteinase-3 de leucócitos;

TNF- α : fator de necrose tumoral alfa;

TRPV-1: receptor de potencial transiente do tipo vanilóide 1;

SUMÁRIO

1. REVISÃO DA LITERATURA	17
1.1 PROTEASES E RECEPTORES ATIVADOS POR PROTEASES (PARs)	17
1.2 PAPEL DE PARs NA INFLAMAÇÃO	21
2. JUSTIFICATIVA.....	25
3. OBJETIVO GERAL.....	26
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:	26
4. MATERIAIS E MÉTODOS	27
4.1 ANIMAIS	27
4.2 DROGAS E REAGENTES.....	27
4.3 PREPARO DE SOLUÇÕES.....	28
4.3.1 Solução de PBS.....	28
4.3.2 Solução de albumina bovina (BSA)	28
4.3.3 Solução diluidora de leucócitos (Turk)	29
4.4 TRATAMENTOS FARMACOLÓGICOS	29
4.4.1 Preparo da suspensão de carragenina.....	29
4.4.2 Preparo da solução de aprotinina	30
4.4.3 Preparo da solução de tripsina	30
4.4.4 Preparo da solução de tcY-NH ₂	30
4.4.5 Preparo da solução de U75302	30
4.4.6 Preparo da suspensão de AY-NH ₂	31
4.4.7 Preparo da solução de LTB ₄	31
4.4.8 Preparo da solução de IL-8.....	31
4.4.9 Preparo da solução de Dexametasona.....	31
4.4.10 Pré-tratamentos dos animais com aprotinina, tcY-NH ₂ , U75302 e AY-NH ₂ e a indução da pleurisia por diferentes agentes flogogênicos.....	32
4.5 AVALIAÇÃO DO NÚMERO DE LEUCÓCITOS PRESENTES NA CAVIDADE PLEURAL	33
4.6 AVALIAÇÃO DIFERENCIAL DOS LEUCÓCITOS PRESENTES NA CAVIDADE PLEURAL	33
4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	34
5. RESULTADOS.....	35

5.1 DETERMINAÇÃO DA DOSE DE CARRAGENINA A SER UTILIZADA NOS EXPERIMENTOS DE PLEURISIA	35
5.2 AVALIAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DE SERINOPROTEASES NA MIGRAÇÃO DE NEUTRÓFILOS INDUZIDA PELA CARRAGENINA	37
5.3 CAPACIDADE DA TRIPSINA EM INDUZIR RECRUTAMENTO DE NEUTRÓFILOS PARA A CAVIDADE PLEURAL	39
5.4 AVALIAÇÃO DO PRÉ-TRATAMENTO COM APROTININA NO RECRUTAMENTO DE NEUTRÓFILOS INDUZIDO POR TRIPSINA.....	42
5.5 AVALIAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DO PAR-4 SOBRE A MIGRAÇÃO DE NEUTRÓFILOS NA PLEURISIA INDUZIDA PELA CARRAGENINA	44
5.6 AVALIAÇÃO DO PAPEL DO PAR-4 SOBRE A MIGRAÇÃO DE NEUTRÓFILOS NA PLEURISIA INDUZIDA POR TRIPSINA	46
5.8 AVALIAÇÃO DO PAPEL DO PAR-4 SOBRE A MIGRAÇÃO DE NEUTRÓFILOS INDUZIDA POR IL-8	51
5.9 AVALIAÇÃO DA ATIVAÇÃO DIRETA DO PAR-4 EM INDUZIR O RECRUTAMENTO DE NEUTRÓFILOS PARA A CAVIDADE PLEURAL DOS CAMUNDONGOS.....	54
6. DISCUSSÃO	58
7. CONCLUSÃO	65
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	66
ANEXOS	72
ANEXO A - CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DO PROJETO PELO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ANIMAL DA UFMG (CETEA).....	73
ANEXO B – ARTIGO ACEITO PARA PUBLICAÇÃO.....	74

1. REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Proteases e Receptores Ativados por Proteases (PARs)

As proteases participam de inúmeras funções fisiológicas importantes no organismo, desde a digestão intra e extra-celular de proteínas a processos como inflamação, fibrinólise, resposta imune e coagulação sanguínea (Dash e colaboradores, 2003), e são classificadas em exo e endopeptidases de acordo com a posição da ligação peptídica a ser clivada na cadeia polipeptídica. As exopeptidases atuam na porção final das cadeias polipeptídicas, em regiões N e C terminais, e as endopeptidases ou proteases como também são conhecidas, clivam ligações peptídicas entre as regiões N-terminal e C-terminal da cadeia polipeptídica, sendo essas classificadas de acordo com os seus mecanismos catalíticos (Bond e Butler, 1987).

Recentemente, foi sugerida uma nova classificação em famílias baseada na similaridade dos aminoácidos das proteases (Rawlings e colaboradores, 2006) e no seu mecanismo de catálise, sendo nomeadas em aspártico, metálico, cisteínico, serínico e treonínico-proteases (Ramachandran e colaboradores, 2008). As serinoproteases constituem uma classe de enzimas proteolíticas caracterizada por um catalisador único, composto por uma tríade de serina (Ser), histidina (Hist) e aspartato (Asp), resíduos capazes de hidrolisar ligações peptídicas (Rinderknecht, 1986). A maioria das enzimas dessa família são endopeptidases, tendo a tripsina, a quimiotripsina, a elastase, a catepsina G de neutrófilos, a proteinase C de leucócitos e enzimas da homeostasia e da coagulação, exemplos importantes (Rawlings e colaboradores, 2006).

Produzidas como precursores inativos (zimogênios), as serinoproteases são convertidas em enzimas fisiologicamente ativas através de um processo chamado de "proteólise limitada" ou ativação de zimogênios (Walsh e Ahmad, 2002), sendo que muitas respostas fisiológicas mediadas por serinoproteases podem ocorrer através da sinalização via PAR (Steinhoff e colaboradores, 2005). Em mamíferos, atuam como moduladores da resposta imune durante a inflamação, além de regular o balanço fibrinolítico e hemostático e degradar neuropeptídeos envolvidos na inflamação neurogênica (Thomas e colaboradores, 1977).

Esses receptores acoplados á proteína G são expressos de acordo com a ordem cronológica da descoberta em PAR-1, PAR-2, PAR-3 e PAR-4, sendo expressos em uma variedade de células incluindo plaquetas, células endoteliais e epiteliais, células das vias aéreas, neutrófilos e mononucleares, desencadeando respostas como agregação plaquetária, aumento intracelular de cálcio, quimiotaxia e proliferação celular (Cocks e colaboradores, 2000).

Os membros da família PAR distinguem-se dos demais receptores acoplados à proteína G por sua peculiar característica de ativação: após o reconhecimento seletivo do receptor por uma serinoprotease, há uma clivagem proteolítica dos sítios específicos da porção N-terminal extracelular do receptor. Após a clivagem, é exposta uma nova sequência N-terminal que, finalmente, agindo como um ligante ancorado ativa o próprio receptor desencadeando eventos de sinalização celular (Hollenberg e colaboradores, 2004; Coughlin, 2000; Steinhoff e colaboradores, 2005) **(Figura 1)**. Dessa forma, ao contrário dos agonistas convencionais, a atividade proteolítica é requerida para a sua ativação. Estudos de Vu e colaboradores, em 1991, mostraram que uma mutação no local da clivagem torna o receptor não responsivo à ação das proteases, sendo a ativação proteolítica irreversível e, uma vez clivados, os receptores são degradados em lisossomos (Reed e colaboradores, 2004).

Proteases também podem regular negativamente a ativação e clivagem de PARs através do desarme do receptor por clivagem de uma sequência de aminoácidos que ativa um sítio responsável pela remoção da porção ligante. Assim, esses receptores continuam respondendo aos agonistas PAR, mas não conseguem sinalizar em um ambiente fisiológico (Ramachandran e colaboradores, 2008).

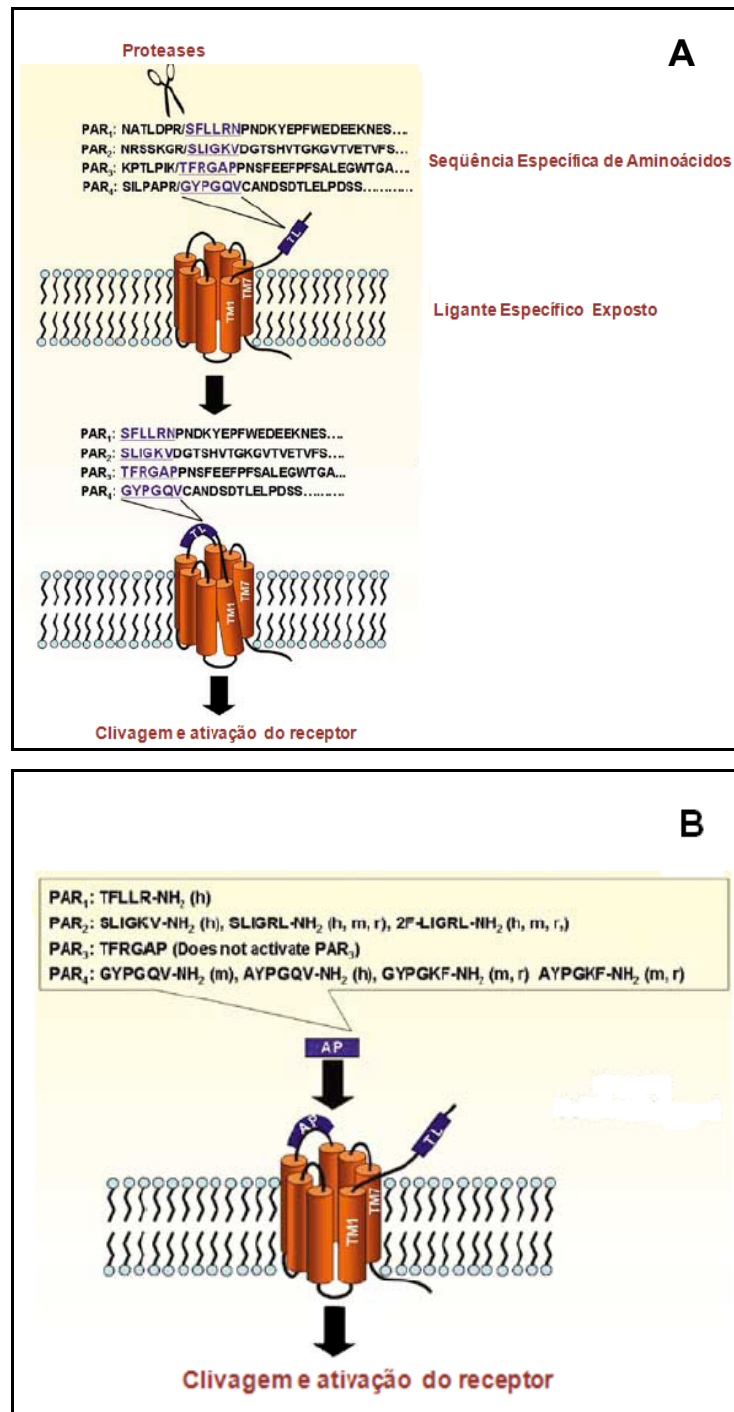


Figura 1. Mecanismo de ativação dos PAR. (A) Ocorre clivagem do receptor, por uma serinoprotease, na porção N-terminal liberando um ligante específico (TL). (B) Ativação da sinalização do PAR, por manipulação exógena de peptídeo agonista PAR sintético (AP), sem a necessidade da clivagem proteolítica (Adaptado de Ramachandran e colaboradores, 2008).

A descoberta de que serinoproteases exercem seus efeitos por meio da ação proteolítica em receptores despertou um maior interesse por essas enzimas quanto aos seus papéis como reguladores de mecanismos inflamatórios bem como em outros fenômenos biológicos.

O desenvolvimento de peptídeos sintéticos capazes de clivar ou não, sequências específicas do grupamento N-terminal vem permitindo o desenvolvimento de novos estudos sobre o papel de determinadas serinoproteases na regulação de fenômenos biológicos.

Assim, os PARs, com exceção de PAR-3, também podem ser ativados por uma curta sequência de peptídeos sintéticos, semelhante à sequência revelada pelo ligante específico (Scarborough e colaboradores, 1992). Essa sequência, usualmente compreendida por seis ou mais aminoácidos, é específica para cada receptor, por isso a síntese de peptídeos agonistas tem sido ferramenta essencial na elucidação de ação dos PARs.

Outro aspecto importante do novo mecanismo de ativação desses receptores é que uma molécula de protease agonista é capaz de ativar múltiplos receptores, em contraste com a maioria dos eventos mediados por receptores convencionais, nos quais a ocupação do receptor pelo ligante é necessária para manter um estado ativo. Assim, as respostas dos eventos mediados por essas proteases são fortemente influenciadas pela concentração do receptor.

A indução de pleurisia em murinos constitui um modelo de inflamação aguda bem estabelecido, sendo utilizada para o estudo de drogas com potencial em reduzir parâmetros inflamatórios como formação de exsudato, extravasamento de proteínas ou migração de leucócitos para tecidos inflamados (Ackerman e colaboradores, 1980). O modelo é caracterizado pelo rápido influxo de polimorfonucleares, seguido pela infiltração de mononucleares, para a cavidade pleural dos animais (Murai e colaboradores, 2003). Esse processo é regulado tanto por células mononucleares residentes (Cailhier e colaboradores, 2006) como também pelo mesotélio (Antony, 2003), o qual é constituído por células epiteliais e forma a pleura, membrana que envolve o pulmão.

Tanto o tecido mesotelial como as células mononucleares residentes funcionam como gatilhos da resposta inflamatória, uma vez que, após alguma lesão liberam mediadores lipídicos, aminas e citocinas que irão atuar ativando outras células, recrutando leucócitos da circulação, além de promover a expressão de moléculas de adesão tanto nas células do endotélio vascular como nos leucócitos (Antony, 2003; Cailhier e colaboradores, 2006). Dessa forma, o modelo de pleurisia será uma importante ferramenta no estudo da participação da tripsina e do PAR-4 no

recrutamento de neutrófilos para a cavidade pleural induzido por diferentes estímulos inflamatórios.

1.2 Papel dos PARs na Inflamação

A disponibilidade de agonistas e antagonistas seletivos, inibidores de proteases e modelos genéticos reúnem evidências que sugerem que proteases e seus receptores estão envolvidos na regulação de importantes aspectos da inflamação como, por exemplo, na atividade de células endoteliais (McDougall e colaboradores, 2009), no recrutamento *in vivo* de leucócitos (Houle e colaboradores, 2005) e na liberação de citocinas (Schmidlin e colaboradores, 2001; Slofstra e colaboradores, 2007; Smith e colaboradores, 2009).

Receptores ativados por proteases 1, 3 e 4 foram os primeiros alvos identificados para a trombina, mas também podem ser ativados por tripsina ou catepsina G(CG). Por outro lado, PAR-2 é resistente à trombina, porém responde à tripsina e a várias outras serinoproteases, incluindo triptase, proteinase-3 de leucócitos (PR3), enzimas derivadas de bactéria (Ossovskaya e colaboradores, 2004; Coughlin, 2000), além de proteases reguladoras da coagulação, fatores VIIa e Xa (Camerer e colaboradores, 2000; Kawabata e colaboradores, 2000; Houle e colaboradores, 2005).

Cada receptor tem se mostrado capaz de modular diferentes processos relacionados ao desenvolvimento da resposta inflamatória. Desta forma, PAR-2, expresso em células endoteliais, epiteliais e no músculo liso de uma variedade de órgãos (Déry e colaboradores, 1998), desencadeia respostas celulares tais como reparo e injúria tecidual, angiogênese, recrutamento celular e percepção da dor (Macfarlane e colaboradores, 2001; Coughlin e colaboradores, 2003).

Muitos efeitos biológicos dos agonistas de PAR-2 são pró-inflamatórios, incluindo vasodilatação dependente de óxido nítrico, extravasamento de proteínas plasmáticas, infiltração de neutrófilos e secreção de citocinas pró-inflamatórias. Além disso, agonistas de PAR-2 promovem rolamento de leucócitos em células endoteliais (Vergnolle, 1999), sendo que elevado rolamento observado após procedimentos cirúrgicos é notavelmente diminuído em camundongos deficientes de PAR-2 (Lindner e colaboradores, 2000).

Nas vias aéreas, o papel pró-inflamatório de agonistas PAR-2 está relacionado com a liberação de metaloproteinase-9 de matriz (MMP-9) e fator estimulador de colônia para macrófagos e granulócitos (GM-CSF), promovendo a sobrevivência de eosinófilos (Vliagofts e colaboradores, 2001), células com alta afinidade por esse receptor (Miike e colaboradores, 2001).

Os receptores PAR-1, PAR-3 e PAR-4 também desempenham importantes papéis sinalizadores, funcionando muitas vezes de forma integrada. A trombina, apesar da alta afinidade por PAR-3, não é capaz de ativar mecanismos de transdução de sinais intracelulares. Sendo assim, após a sua ligação, PAR-3 funciona como um co-fator para a ativação de PAR-1 ou PAR-4 (Sambrano e colaboradores, 2001; McLaughlin e colaboradores, 2007), sendo que, muitas ações fisiológicas da trombina envolvem células endoteliais, plaquetas e leucócitos, resultado da ativação de PAR-1, PAR-4 ou ambos (Cirino e colaboradores, 2000).

A trombina se liga a PAR-1 em dois sítios na porção N-terminal extracelular do receptor que se estendem no sítio de clivagem. Assim, PAR-1 é clivado entre Arg-41 e Ser-42 e expõe um novo domínio ligante N-terminal com a sequência SFLLRN. Esse interage com domínios extracelulares do receptor, que altera a sua conformação permitindo o acoplamento às proteínas G. PAR-3 também contém os locais de ligação da trombina, porém PAR-4 carece de tais sítios e, por isso, responde apenas a altas concentrações dessa protease (Schmidlin e Bunnett, 2001).

Entre as repostas para a ativação dos PARs pela trombina podem ser citadas propriedades pró-inflamatórias como aumento da permeabilidade vascular, desgranulação de mastócitos, quimiotaxia para neutrófilos, liberação de citocinas, entre outras (Vergnolle e colaboradores, 2002). Também foi demonstrado que a trombina é capaz de induzir rolamento e adesão de leucócitos no endotélio vascular (Toothill e colaboradores, 1990), provavelmente por ativação de PAR-1 (Zimmerman e colaboradores, 1994).

Além disso, em plaquetas, a ativação de PAR-1 por trombina pode amplificar a resposta inflamatória e/ou o recrutamento de células inflamatórias através da produção de mediadores como serotonina e prostaglandina (Coughlin, 2000), além da produção endotelial de interleucina (IL)-6 e interleucina (IL)-8 (Asokanathan e colaboradores, 2002; Ossovskaya e colaboradores, 2004).

O receptor ativado por protease 4 (PAR-4) foi primeiro descrito como um importante receptor ativado pela trombina, para a agregação de plaquetas em

humanos e em camundongos (Kahn e colaboradores, 1998). Camundongos deficientes para o gene que expressa PAR-4 apresentavam aumento no tempo de sangramento, enfatizando a importância deste receptor na sinalização para eventos de coagulação *in vivo* (Sambrano e colaboradores, 2001). Além do papel de agregação plaquetária induzida pela trombina, estudos têm demonstrado os efeitos de agonistas de PAR-4 no recrutamento de leucócitos e extravasamento de plasma (Vergnolle e colaboradores, 2002).

A expressão de PAR-4 é bem caracterizada em células do epitélio respiratório (Lan e colaboradores, 2000), na superfície de neutrófilos de ratos (Vergnolle e colaboradores, 2002), fígado, intestino delgado, pâncreas, placenta, tireóide, próstata, megacariócitos (Hoogerwerf e colaboradores, 2002; Xu e colaboradores, 1998; Macfarlane e colaboradores, 2001) e articulações (McDougall e colaboradores, 2005).

A importância da ativação de PAR-4 nas vias aéreas se dá pela regulação da resposta inflamatória, no recrutamento de células (Cocks e colaboradores, 2001), além de remodelamento do tecido pulmonar (Lan e colaboradores, 2000). Estudos *in vitro* acrescentaram o papel de PAR-4 na sinalização para a liberação de mediadores como citocinas e prostaglandinas (Asokanathan e colaboradores, 2002; Mule e colaboradores, 2004).

O PAR-4, na articulação do joelho do camundongo, parece ser essencialmente pró-inflamatório (McDougall e colaboradores, 2009), enquanto no trato gastrointestinal e em seus aferentes sensoriais, baixas doses de seu agonista inibem o desenvolvimento de hiperalgesia e alodinia *in vivo* e o influxo de Ca^{+2} frente a diversos estímulos *in vitro* (Augé e colaboradores, 2009).

A tripsina, uma das serinoproteases melhor caracterizada até o momento, exerce suas funções através da ativação de PAR-2 e PAR-4 (Cottrel e colaboradores, 2004; Macfarlane e colaboradores, 2001), mediando efeitos inflamatórios e nociceptivos. Embora produzida pelo pâncreas a fim de degradar as proteínas da dieta no intestino, a tripsina também está presente no sistema nervoso e em células epiteliais da pele, esôfago, estômago, intestinos grosso e delgado, pulmão, fígado e rim, bem como nos leucócitos do baço, de seres humanos e de camundongos (Koshikawa e colaboradores, 1998), onde desempenha diversas ações pela ativação dos PARs. Tanto a tripsina como agonistas de peptídeos ativadores de PAR-2 induzem a produção de neuropeptídeos como a substância P

(SP) e peptídeos relacionados ao gene da calcitonina (CGRP) de neurônios aferentes espinais, com consequente formação de edema na pata dos ratos *in vivo* (Steinhoff e colaboradores, 2005).

Além da tripsina e da trombina, outras proteases importantes na ativação de PAR-4 são as proteases de neutrófilos. Essas células armazenam uma variedade de proteases (catepsina G, elastase e proteinase-3) nos grânulos azurófilos (Korkmaz e colaboradores, 2010). A catepsina G é liberada dos neutrófilos ativados e causa agregação plaquetária que pode ser mediada pelo PAR-4 (Vergnolle e colaboradores, 2002).

Portanto, espera-se que a compreensão da estrutura de cada PAR, bem como dos mecanismos envolvidos na sua clivagem e ativação em diferentes modelos experimentais, possa contribuir para o desenvolvimento de novas estratégias farmacológicas para o tratamento de doenças onde as proteases estão envolvidas e apresentam papel relevante dentro do processo fisiopatológico.

2. JUSTIFICATIVA

Alguns trabalhos tem mostrado que o bloqueio de PAR-4 pode ser útil para o tratamento de edema e recrutamento de granulócitos (Houle e colaboradores, 2005) e da inibição do recrutamento de neutrófilos em diferentes tecidos sobre o modelo de inflamação sistêmica induzido por LPS (lipopolissacarídeo da membrana de bactérias) (Sjoukje e colaboradores, 2007), além de reduzir a inflamação na pata de camundongos induzido pela carragenina, sugerindo que a ativação endógena de PAR-4 contribui para a resposta inflamatória nesse modelo (Houle e colaboradores, 2005).

Além disso, também foi demonstrado que peptídeos agonistas de PAR-4 podem mediar a formação de edema na pata de ratos independente da liberação de neuropeptídeos dos neurônios sensoriais e de desgranulação de mastócitos (Hollenberg e colaboradores, 2004). Estes estudos suportam a participação de PAR-4 na inflamação, e em particular no controle do recrutamento de neutrófilos, bem como das proteases endógenas e peptídeos agonistas que o ativam, porém até o momento, os mecanismos e as serinoproteases envolvidas neste processo ainda não estão muito bem esclarecidos.

Dessa forma, propomos investigar a contribuição deste receptor e o papel da tripsina na modulação do recrutamento de neutrófilos para a cavidade pleural em modelo de pleurisia.

3. OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito da tripsina e da ativação de PAR-4 no recrutamento de neutrófilos para a cavidade pleural de camundongos BALB/c.

3.1 Objetivos específicos:

- Caracterizar a migração de neutrófilos para a cavidade pleural em modelo de pleurisia;
- Avaliar a capacidade da tripsina e do peptídeo ativador de PAR-4 (AY-NH₂) em induzir o recrutamento de neutrófilos para a cavidade pleural;
- Avaliar a importância de PAR-4 sobre a migração de neutrófilos na pleurisia induzida por carragenina, tripsina e interleucina-8 (IL-8).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizados camundongos BALB/c fêmeas, com 6 a 8 semanas e massas de 20 a 25 gramas, fornecidos pelo Centro de Bioterismo (CEBIO), ICB, UFMG. Os animais foram mantidos em ciclo claro-escuro de 12 horas, sendo que ração e água foram fornecidas *ad libitum*. Todos os procedimentos utilizando animais foram analisados, estão de acordo com os princípios éticos da experimentação animal, e foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG, protocolo nº 005/2011) (**Anexo A**).

4.2 Drogas e reagentes

- PBS (Tampão fosfato salino) - Veículo;
- Carragenina λ tipo IV (Sigma, EUA) - Estímulo inflamatório;
- Interleucina (IL)-8 (PeproTech, EUA) - Quimiocina pró-inflamatória;
- Leucotriena (LT)-B₄ (Cayman chemical - Ann Arbor, MI, EUA) - Agente quimiotático para leucócitos;
- U75302 (6-(6- (3R- hydroxy- 1E, 5Z- undecadien- 1- yl)- 2- pyridinyl)- 1, 5S- hexanediol) (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, EUA) - Antagonista do receptor de LTB₄ (LTB₁);
- Tripsina (Sigma, EUA) - Serinoprotease;
- Aprotinina (Sigma, EUA) - Inibidor não seletivo de proteases;
- AY-NH₂ (Tocris Bioscience - Bristol, Reino Unido) - Peptídeo agonista seletivo de PAR-4;
- tcY-NH₂ (Tocris Bioscience - Bristol, Reino Unido) - Peptídeo antagonista seletivo de PAR-4;
- Fosfato dissódico de dexametasona (Aché Laboratórios Farmacêuticos S.A, Brasil) – Antiinflamatório esteroideal;
- Giemsa (QEEL-Química Especializada Erich Ltda, Brasil) - Corante para microscopia;

- May Grunwald (Dinâmica Contemporânea Ltda, Brasil) - Corante para microscopia;
- Violeta de Genciana (Vetec Química fina Ltda, Brasil) - Preparo de solução diluidora de leucócitos;
- Ácido acético glacial P.A (Vetec Química fina Ltda, Brasil) - Preparo de soluções;
- BSA (Calbiochem, EUA) - Albumina de soro bovino tipo V;
- BSA (Calbiochem, EUA) - Albumina de soro bovino tipo V, livre de ácidos graxos, nucleases e proteases.

4.3 Preparo de soluções

4.3.1 Solução de PBS

Foi preparada uma solução tampão de PBS pH 7,4 (Na_2HPO_4 8,1 mM, KH_2PO_4 1,84 mM, NaCl 0,14 M e KCl 2,68 mM).

Fosfato dibásico de sódio -----	1,15 g
Fosfato monobásico de potássio -----	250,00 mg
Cloreto de sódio -----	8,20 g
Cloreto de potássio-----	200,00 mg
Água destilada-----	1.000,00 mL

O pH foi ajustado para 7,4 com solução de ácido fosfórico 0,1 M e, em seguida, a solução foi esterilizada por autoclavação a 120 °C, 2 ATMs durante 20 minutos, estando assim pronta para ser utilizada.

4.3.2 Solução de albumina bovina (BSA)

A solução de BSA 3% (p/v) foi preparada em PBS e congelada à temperatura de -20 °C. No dia do experimento, a solução era retirada do congelador, colocada em repouso em temperatura ambiente, sendo utilizada após descongelamento.

4.3.3 Solução diluidora de leucócitos (Turk)

A solução de Turk, utilizada para a lise de hemácias na contagem total de neutrófilos, obedeceu às seguintes proporções:

Violeta genciana -----	100 mg
Ácido acético glacial -----	30 mL
Água destilada -----	70 mL

O reagente violeta genciana foi adicionado sobre a solução contendo água destilada e ácido acético glacial.

4.4 Tratamentos Farmacológicos

Imediatamente antes da sua administração, as drogas foram devidamente preparadas com base nas concentrações desejadas para a realização de cada protocolo. As seringas de 1 mL com agulhas 13 x 3 mm foram utilizadas, através do uso de ponteiras adaptadas, passando a medir aproximadamente 3 mm de comprimento a fim de não aprofundar na cavidade pleural além do necessário para a administração das drogas. A agulha foi introduzida do lado direito da cavidade torácica dos camundongos para realização da injeção do estímulo, e um volume igual de PBS (100 μ L) foi injetado nos animais do grupo controle. Todos os animais foram submetidos à eutanásia em câmara de CO₂ imediatamente antes da coleta do lavado para contagem de leucócitos.

4.4.1 Preparo da suspensão de carragenina

Foram preparadas suspensões de carragenina (30, 100, 300 μ g/0.1 mL) em PBS estéril. Foi feita uma solução estoque (300 μ g/0.1 mL) e a partir dessa foram feitas as diluições para a obtenção das demais doses. Após a construção de uma curva dose resposta (**Figura 03**), a suspensão de carragenina com concentração de 30 μ g/0.1mL foi escolhida para a realização dos protocolos posteriores.

4.4.2 Preparo da solução de aprotinina

Para a construção da curva dose resposta da aprotinina foram utilizadas doses de 10, 30 e 100 ng/0.1 mL. Para isso, foi feita uma solução estoque de aprotinina 5 mg/mL em PBS estéril, de onde foram pipetadas alíquotas suficientes para fazer as soluções com as respectivas concentrações. Após a construção da curva dose resposta (**Figura 04**), a solução de aprotinina com concentração de 100 µg/0.1mL foi escolhida para a realização dos protocolos posteriores.

4.4.3 Preparo da solução de tripsina

As concentrações de tripsina utilizadas na curva dose resposta foram 0.1, 1.0 e 10 µg/0.1 mL (**Figura 05**). Sendo assim, foram diluídos 100 mg de tripsina em 1 mL de PBS estéril de onde foram retiradas alíquotas para fazer as soluções com as doses citadas. Após a construção da curva, a suspensão de tripsina com concentração de 10 µg/0.1mL foi escolhida para a realização dos protocolos posteriores.

4.4.4 Preparo da solução de tcY-NH₂

A construção da curva dose resposta do tcY-NH₂ foi feita com as doses de 0.1, 0.3 e 1.0 µg/0.1mL (**Figura 08**) e após a realização da mesma, a dose de 1.0 µg/0.1mL foi a escolhida para o seguimento dos protocolos posteriores.

Pesou-se 1 mg de tcY-NH₂ e dilui-se em 1 mL de PBS estéril. Dessa solução estoque foram pipetadas alíquotas suficientes para o preparo das soluções descritas.

4.4.5 Preparo da solução de U75302

Foram pipetadas alíquotas da solução estoque para produzir as soluções de U75302 3 µg/0.1mL, dose testada e mantida para a realização dos protocolos posteriores. De acordo com o fabricante a solubilidade do U75302 em PBS estéril (pH 7.2) é aproximadamente 80 µg/ml.

4.4.6 Preparo da suspensão de AY-NH₂

Para a construção da curva dose resposta do AY-NH₂ foram utilizadas doses de 0.1, 1.0 e 10.0 µg/0.1mL (**Figura 14**). Foram pesados 1 mg da droga e diluídos em 1 mL de PBS estéril, resultando em uma solução estoque de onde foram pipetadas as alíquotas necessárias à construção da curva dose resposta.

4.4.7 Preparo da solução de LTB₄

O LTB₄ é solúvel em PBS (pH 7.2) na concentração de 1 mg/ml. A solução de LTB₄ (500 ng/0.1 mL) (Klein e colaboradores, 2001) foi preparada a partir da diluição de uma solução estoque de LTB₄ (50 µg/500 µL) em PBS estéril.

4.4.8 Preparo da solução de IL-8

A solução de IL-8 (60 ng/0.1 mL) (Ramos e colaboradores, 2003) foi preparada a partir da diluição de uma solução estoque de IL-8 (1 µg/1 µL) em uma solução de PBS + BSA (0,1%) livre de ácidos graxos, nucleases e proteases.

4.4.9 Preparo da solução de Dexametasona

A dose de dexametasona utilizada foi de 0.5 mg/Kg e os animais apresentaram peso médio de 26 g. Dessa forma, foram pipetados 32 µL da solução de dexametasona comercial (4 mg/mL) e acrescentados 968 µL de PBS estéril, resultando em uma solução com a concentração desejada da droga por kg de animal.

4.4.10 Pré-tratamentos dos animais com aprotinina (inibidor de protease), tcY-NH₂ (antagonista PAR-4), U75302 (antagonista LTB₄) e AY-NH₂ (agonista PAR-4) e a indução da pleurisia por diferentes agentes flogogênicos

A fim de avaliar a migração de neutrófilos para a cavidade pleural de camundongos, os animais foram submetidos ao pré-tratamento com aprotinina ou tcY-NH₂ ou U75302 30 minutos antes da reação de pleurisia induzida por injeção intrapleural (i.pl.) de 100 µL das seguintes soluções flogogênicas: carragenina (30 µg/0.1 mL) ou tripsina (10 µg/0.1 mL) ou LTB₄ (500 ng/0.1 mL) ou IL-8 (500 ng/0.1 mL) ou AY-NH₂ (Figura 2).

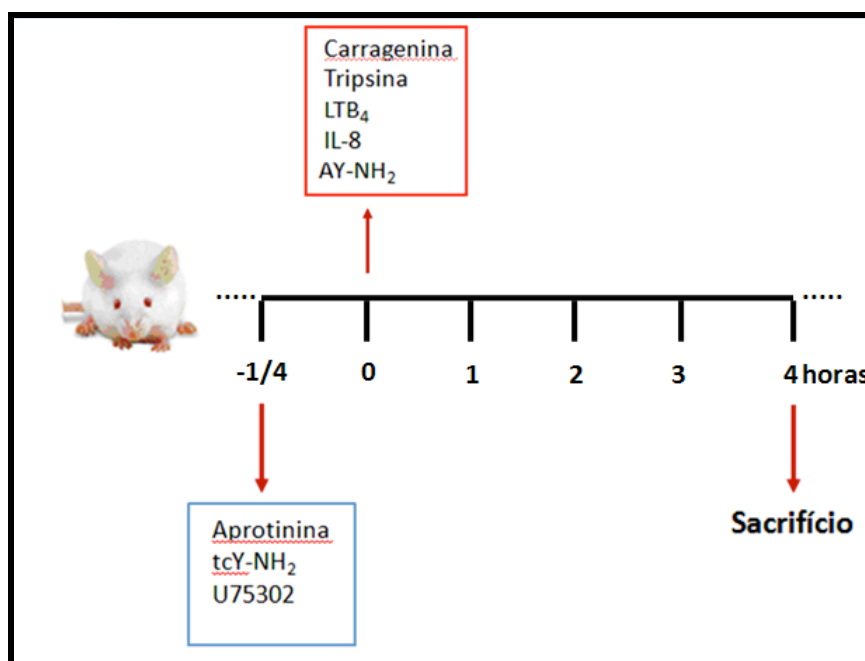


Figura 2. Esquema representando o pré-tratamento dos camundongos com aprotinina, tcY-NH₂, U75302 e AY-NH₂, bem como os estímulos flogogênicos.

Inicialmente, foi construída uma curva dose resposta para carragenina (30, 100, 300 µg/0.1 mL), aprotinina (10, 30 e 100 µg/0.1 mL), tripsina (0.1, 1.0, 10 µg/0.1 mL), tcY-NH₂ (0.1, 0.3 e 1.0 µg/0.1 mL), U75302 (0.1, 1.0 e 10.0 µg/0.1 mL) e AY-NH₂ (0.1, 1.0 e 10 µg/0.1 mL) 0.1 mL (i.pl.), conforme apresentado na seção de resultados. Para os mediadores inflamatórios específicos LTB₄ e IL-8 foram utilizadas as doses de 500 ng/cavidade/0.1 mL e 60 ng/cavidade/0.1 mL,

respectivamente, de acordo com Klein e colaboradores (2001) e Ramos e colaboradores (2003). A dexametasona, antiinflamatório usado para avaliação da migração com IL-8 foi utilizada na dose de 0.5 mg/kg do camundongo. Em todos os protocolos, os animais foram eutanasiados em câmara de CO₂ 4 horas após a administração do agente inflamatório, com exceção do tratamento com a tripsina onde foram realizadas duas curvas tempo resposta: na primeira, os animais foram sacrificados após 4 horas e na segunda após 48 horas após o estímulo, a fim de avaliar a presença de neutrófilos nesses tempos.

4.5 Avaliação do número de leucócitos presentes na cavidade pleural

Para a coleta dos leucócitos, depois de eutanaziados, os animais tiveram a cavidade torácica aberta para a coleta do lavado pleural com 2 mL de BSA/PBS (1:100). O lavado foi centrifugado (4 °C à 100xg) por 4 minutos, o sobrenadante foi desprezado e as células ressuspensas com BSA (3%).

Os leucócitos obtidos após a centrifugação foram utilizados para realizar as contagens total e diferencial. Para isto, 20 µL da solução ressuspensa com BSA (3%) foram colocados em um tubo contendo 180 µL da solução de Turk e, em seguida, uma alíquota foi retirada e colocada em uma câmara de Neubauer (Brand) para contagem total de leucócitos em microscópio óptico.

4.6 Avaliação diferencial dos leucócitos presentes na cavidade pleural

Para realizar a contagem diferencial, 40-50 µL da solução ressuspensa com BSA (3%), foram adicionados em um Cytospin (Fanem), 100 rpm por 40 segundos, abastecido com lâminas de vidro. Após a secagem, as lâminas foram coradas com soluções de Giemsa & May Grunwald e utilizadas para realização da contagem diferencial de leucócitos em microscópio óptico com objetivo de imersão em óleo, com aumento de 1.000 vezes. O número de leucócitos encontrados foi expresso na forma de células por cavidade x10⁴.

A avaliação dos tipos celulares presentes na cavidade pleural dos animais foi realizada através da análise das lâminas histológicas obtidas a partir dos lavados pleurais. Para isto, as lâminas foram coradas com May-Grunwald & Giemsa, sendo o corante Giemsa diluído na proporção de uma gota de corante para 1 mL de água

destilada. Assim, as lâminas foram colocadas sobre um suporte específico e com auxílio de uma pipeta plástica foram adicionadas aproximadamente 50 gotas do corante May-Grunwald. Após 3 minutos foram acrescentados aproximadamente 50 gotas de água destilada sobre as lâminas, seguido de mais 1 minuto de intervalo. Imediatamente após, as lâminas foram escorridas e, sem lavar, foram colocadas aproximadamente, 50 gotas do corante Giemsa diluído (1 gota por mL de água destilada). Após um intervalo de 30 minutos, as lâminas foram lavadas em água corrente e colocadas em posição vertical à temperatura ambiente para secagem. As lâminas foram analisadas com auxílio de microscópio óptico e o número de leucócitos encontrados foi expresso na forma de células por cavidade $\times 10^4$, como descrito anteriormente.

4.7 Análise Estatística

A construção dos gráficos e as análises estatísticas foram realizadas com auxílio dos programas *GraphPad Prism 5* e *SigmaStat 3.5*, respectivamente. Os dados foram analisados por meio da análise de variância simples, *one-way ANOVA*, seguidas pelo teste *Newman-Keuls*, que compara todos os grupos experimentais entre si, além de evitar o surgimento de erro tipo I na análise experimental. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média e comparados com os resultados dos grupos controles. Foram consideradas estatisticamente significativas as diferenças com $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1 Determinação da dose de carragenina a ser utilizada nos experimentos de pleurisia

Inicialmente, foram realizados experimentos com o objetivo de determinar a dose de carragenina eficaz em induzir o recrutamento de neutrófilos para a cavidade pleural dos animais. As administrações de carragenina nas doses de 30, 100 e 300 µg/cavidade aumentaram de maneira dose dependente, o número total de leucócitos, bem como o número de neutrófilos na cavidade pleural dos camundongos (**Figura 3**), mas não de células mononucleares (**Tabela 1**) em relação aos valores basais destas células quando avaliado 4 horas após a sua administração. Com base neste resultado, a dose de 30 µg de carragenina/cavidade foi utilizada nos experimentos de pleurisia induzida por esse estímulo.

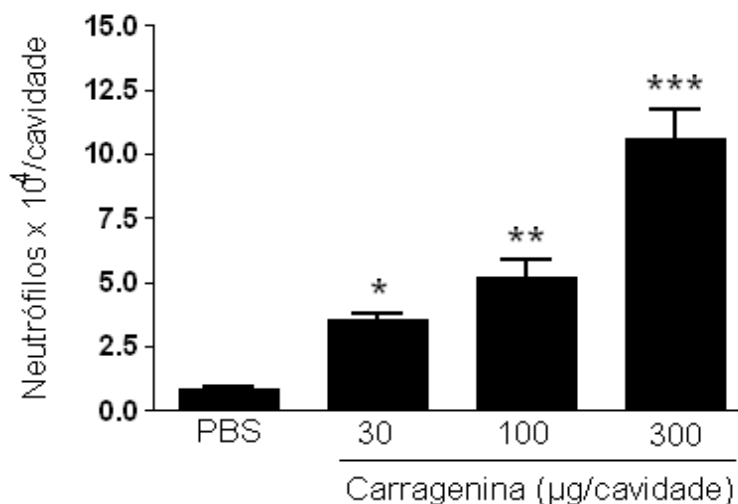


Figura 3. Curva dose-resposta de carragenina para a migração de neutrófilos para a cavidade pleural de camundongos BALB/c. Os camundongos foram tratados com carragenina (30, 100 e 300 µg/cavidade, via i.pl) e o número de neutrófilos foi avaliado 4 horas após. As barras representam média ± e.p.m de 7 a 12 animais por grupo. *p<0.05, **p<0.01 e ***p<0.001 em relação ao grupo controle.

Tabela 1: Leucócitos presentes na cavidade pleural de camundongos 4 horas após administração i.pl. de diferentes doses de carragenina.

	Carragenina (µg/cavidade)			
	PBS	30	100	300
Total	1.4 ± 0.1	4.7 ± 0.4 ^{***}	6.2 ± 0.7 ^{***}	12.0 ± 1,5 ^{***}
Neutrófilos	0.8 ± 0,1	3.6 ± 0.3 [*]	5.2 ± 0.7 ^{**}	10.6 ± 1.2 ^{***}
Mononucleares	0.5 ± 0.1	1.1 ± 0.2	1.0 ± 0.1	1.5 ± 0.4

Os valores representam a média e o erro padrão da média x 10⁴ células. *p<0.05, **p<0.01 e ***p<0.001 em relação ao grupo controle (PBS). n = 7 a 12.

5.2 Avaliação da participação de serinoproteases na migração de neutrófilos induzida pela carragenina

A fim de avaliar o envolvimento de serinoproteases na pleurisia induzida pela carragenina, os camundongos foram pré-tratados com aprotinina (10, 30 e 100 ng/cavidade) i.pl. 30 minutos antes da injeção i.pl. de carragenina (30 µg/cavidade). O pré-tratamento dos animais com aprotinina inibiu o recrutamento de neutrófilos para a cavidade pleural dos animais desafiados com carragenina (**Figura 4**). O número de células mononucleares também foi reduzido pelo pré-tratamento com aprotinina (**Tabela 2**). Diante desses resultados, adotou-se para os procedimentos posteriores a dose de 100 ng de aprotinina/cavidade.

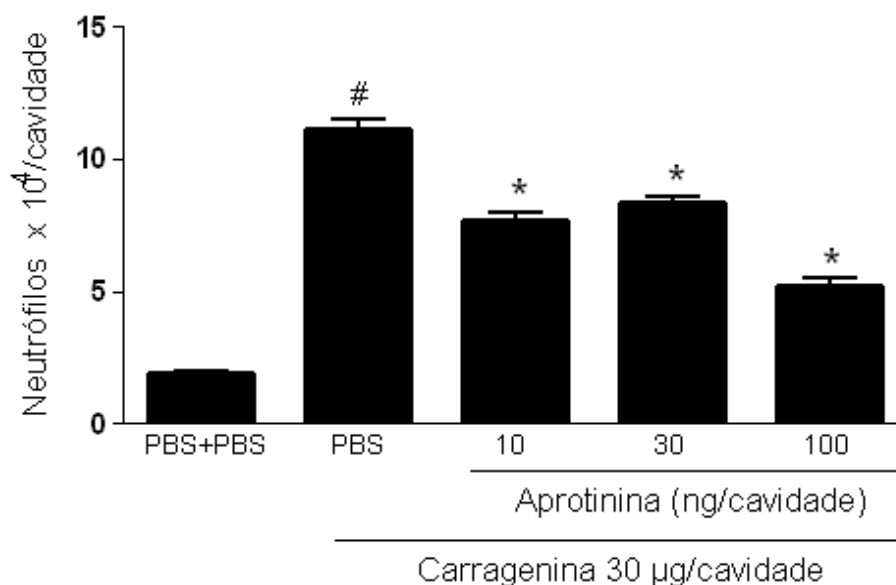


Figura 4. Efeito induzido pela aprotinina sobre o recrutamento de neutrófilos para a cavidade pleural de camundongos BALB/c induzido por carragenina. Os camundongos foram pré-tratados com aprotinina (10, 30 e 100 ng/cavidade, via i.pl.) 30 minutos antes da injeção de carragenina (30 µg/cavidade) e o número de neutrófilos foi avaliado 4 horas após o desafio. As barras representam média \pm e.p.m de 10 a 12 animais por grupo. # $p < 0.001$ em relação ao grupo não desafiado com carragenina, * $p < 0.001$ em relação ao grupo desafiado com carragenina.

Tabela 2: Leucócitos presentes na cavidade pleural de camundongos em resposta a injeção i.pl. de diferentes doses de aprotinina em pleurisia experimental induzida por carragenina (30 µg/cavidade).

	Carragenina (30 µg/ cavidade)				
	PBS + PBS	PBS	Aprotinina (ng/cavidade)		
			10	30	100
Total	3.7 \pm 0.6	14.0 \pm 1.4 [#]	9.3 \pm 1.2 [*]	10.4 \pm 1.0 [*]	6.5 \pm 0.9 [*]
Neutrófilos	1.9 \pm 0.3	11.2 \pm 1.0 [#]	7.6 \pm 1.0 [*]	8.3 \pm 0.9 [*]	5.2 \pm 0.8 [*]
Mononucleares	1.7 \pm 0.3	3.2 \pm 0.5 [†]	1.6 \pm 0.2 [*]	2.0 \pm 0.2 ^{**}	1.6 \pm 0.3 [*]

Os valores representam a média e o erro padrão da média $\times 10^4$ células. Para Total e Neutrófilos: # $p < 0.001$ em relação ao grupo não desafiado com carragenina (controle), * $p < 0.001$ em relação ao grupo desafiado com carragenina. Para mononucleares: † $p < 0.05$ em relação ao grupo não desafiado com a carragenina e * $p < 0.05$ e ** $p < 0.01$ em relação ao grupo tratado com carragenina. n= 10 a 12.

5.3 Capacidade da tripsina em induzir recrutamento de neutrófilos para a cavidade pleural

A administração de tripsina na dose de 0.1 µg/cavidade não aumentou significativamente o número de neutrófilos na cavidade pleural dos camundongos 4 horas após a sua administração (**Figura 5**). As doses de 1 e 10 µg/cavidade, por sua vez, apresentaram um aumento de maneira dose dependente do número de neutrófilos na cavidade pleural . Não houve variação significativa do número de células mononucleares em relação aos valores basais dessas em nenhuma das doses administradas (**Tabela 3**). Diante desse resultado, a dose de 10 µg/cavidade foi adotada para ser utilizada nos experimentos posteriores de pleurisia induzida por tripsina.

O mesmo protocolo foi realizado a fim de avaliar o número de neutrófilos na cavidade pleural dos camundongos 48 horas após a administração de tripsina. Observou-se que, após esse intervalo de tempo, não houve alteração do número de neutrófilos na cavidade pleural em relação aos valores basais desses em resposta ao estímulo administrado na dose de 0.1 µg/cavidade (**Figura 6**). Além disso, observou-se que nas doses de 1 e 10 µg/cavidade o número de neutrófilos estava reduzido em relação aos seus valores basais e que não houve alteração significativa em relação ao número de células mononucleares (**Tabela 4**).

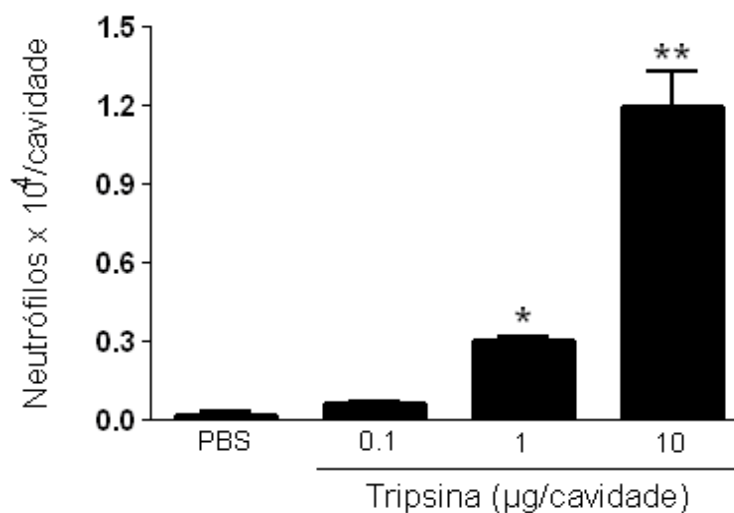


Figura 5. Curva dose-resposta da tripsina para a migração de neutrófilos para a cavidade pleural de camundongos BALB/c. Os camundongos foram desafiados com tripsina (0.1, 1.0 ou 10 µg/cavidade) por via intrapleural e o número de neutrófilos foi avaliado 4 horas após. As barras representam média ± e.p.m de 9 a 12 animais por grupo. *p<0.01 e **p<0.001 em relação ao grupo controle.

Tabela 3: Leucócitos presentes na cavidade pleural de camundongos 4 horas após administração i.pl. de diferentes doses de tripsina.

	Tripsina (µg/cavidade)			
	PBS	0.1	1.0	10.0
Total	1.6 ± 0.1	1.8 ± 0.3	2.0 ± 0.2**	2.6 ± 0.4**
Neutrófilos	0.02 ± 0.004	0.06 ± 0.02	0.3 ± 0.05*	1.2 ± 0.4**
Mononucleares	1.6 ± 0.1	1.7 ± 0.3	1.7 ± 0.2	1.5 ± 0.2

Os valores representam a média e o erro padrão da média x 10⁴ células. *p<0.01 e **p<0.001 em relação ao grupo controle. n=9 a 12.

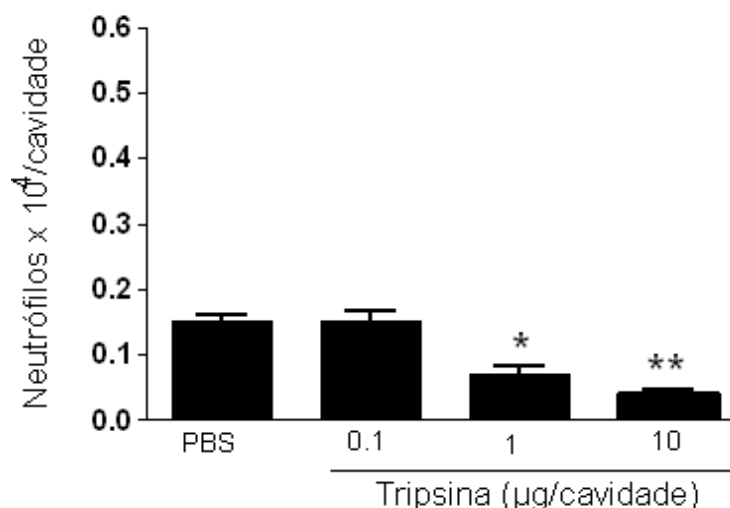


Figura 6. Curva dose-resposta da tripsina para a migração de neutrófilos na cavidade pleural de camundongos BALB/c. Os camundongos foram desafiados com tripsina (0.1, 1 ou 10 µg/cavidade) por via intrapleural e o número de neutrófilos foi avaliado 48 horas após a injeção de tripsina. As barras representam média ± e.p.m de 6 animais por grupo. *p<0.01 e **p<0.001 em relação ao grupo controle.

Tabela 4: Leucócitos presentes na cavidade pleural de camundongos 48 horas após administração i.pl. de diferentes doses de tripsina.

	Tripsina (µg/cavidade)			
	PBS	0.1	1.0	10.0
Total	3.8 ± 1.3	3.8 ± 0.4	2.7 ± 0.5	3.0 ± 0.2
Neutrófilos	0.2 ± 0.01	0.2 ± 0.01	0.07 ± 0.02*	0.04 ± 0.006**
Mononucleares	3.7 ± 1.3	3.6 ± 0.4	2.7 ± 0.5	3.0 ± 0.2

Os valores representam a média e o erro padrão da média x 10⁴ células. *p<0.01 e **p<0.001 em relação ao grupo controle. n=6.

5.4 Avaliação do pré-tratamento com aprotinina no recrutamento de neutrófilos induzido por tripsina

Os camundongos foram pré-tratados com aprotinina (100 ng/cavidade), dose escolhida após plotagem da curva em pleurisia induzida por carragenina, 30 minutos antes da administração de tripsina (10 µg/cavidade). O pré-tratamento com a aprotinina reduziu significativamente o número de neutrófilos na cavidade pleural induzido pela tripsina (**Figura 7**), bem como o de células mononucleares (**Tabela 5**).

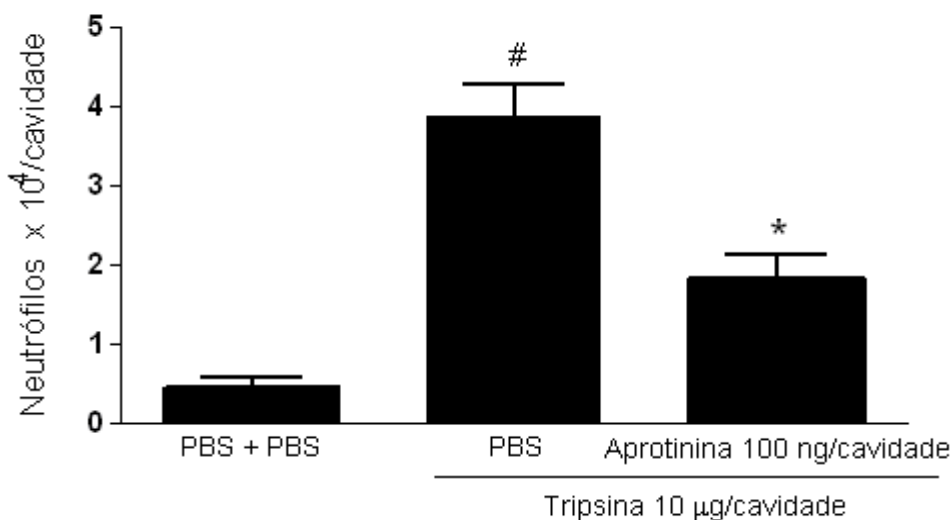


Figura 7. Efeito induzido pelo pré-tratamento com aprotinina sobre a migração de neutrófilos induzida pela administração intrapleural de tripsina. Os camundongos foram tratados com aprotinina (100 ng/cavidade), por via intrapleural, 30 minutos antes da injeção intrapleural de tripsina (10 µg/cavidade). O número de neutrófilos foi avaliado 4 horas após o desafio. As barras representam média ± e.p.m de 6 animais por grupo. [#]p<0.001 e ^{*}p<0.001 em relação ao grupo controle (PBS) e ao grupo tratado com tripsina, respectivamente.

Tabela 5: Leucócitos presentes na cavidade pleural de camundongos em resposta a injeção i.pl. de aprotinina (100 ng/ cavidade) em pleurisia experimental induzida por tripsina (10 µg/cavidade).

	Tripsina (10 µg/ cavidade)		
	PBS + PBS	PBS	Aprotinina (100 ng/ cavidade)
Total	2.9 ± 0.5	6.2 ± 0.6 [#]	3.5 ± 0.3 ^{**}
Neutrófilos	0.4 ± 0.1	3.9 ± 0.4 [#]	1.8 ± 0.3 ^{**}
Mononucleares	2.5 ± 0.3	2.3 ± 0.3 [#]	1.7 ± 0.2 [*]

Os valores representam a média e o erro padrão da média x 10⁴. [#]p<0.001 em relação ao grupo controle, ^{*}p<0.01 e ^{**}p<0.001 em relação ao grupo tratado com tripsina. n=6.

5.5 Avaliação da participação do receptor PAR-4 sobre a migração de neutrófilos na pleurisia induzida pela carragenina

Uma vez que demonstramos que o recrutamento de neutrófilos induzido por carragenina é dependente de serinoproteases e, como serinoprotease tal qual a tripsina também é capaz de induzir recrutamento de neutrófilos quando administrada em pleura, e ainda já que tripsina atua através da ativação de PAR-4, resolvemos investigar a importância desse receptor para o recrutamento de neutrófilos. Dessa forma, os camundongos foram pré-tratados com tcY-NH₂ (0.1, 0.3 e 1.0 µg/cavidade) 30 minutos antes da administração de carragenina 30 µg/cavidade. O tratamento com tcY-NH₂ reduziu significativamente o número de neutrófilos na cavidade pleural induzido pela carragenina (**Figura 8**). Em relação às células mononucleares, nas doses de 0.1, 0.3 e 1.0 µg/cavidade observou-se uma redução, como mostrado na (**Tabela 6**).

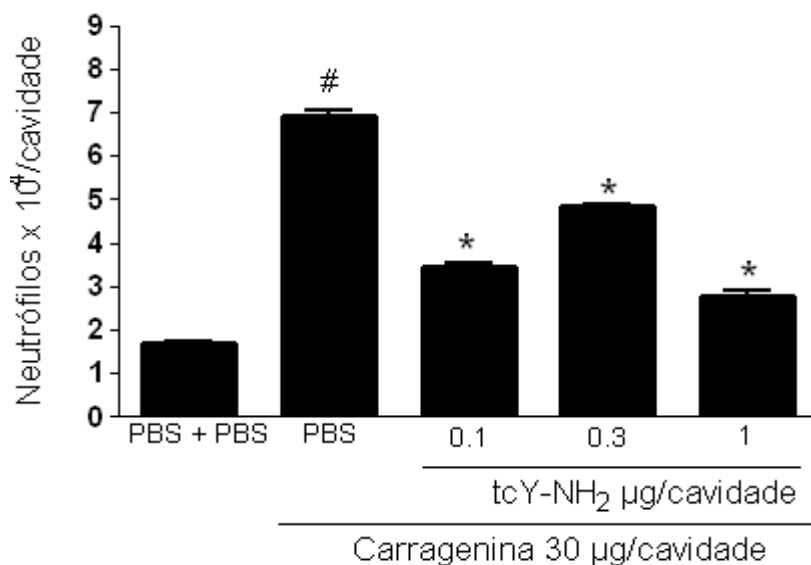


Figura 8. Curva dose-resposta do tcY-NH₂ para inibição do recrutamento sobre a migração de neutrófilos induzida pela administração intrapleural de carragenina. Os camundongos foram pré-tratados com tcY-NH₂ (0.1, 0.3 e 1.0 µg/cavidade) por via intrapleural, 30 minutos antes da injeção de carragenina (30 µg/cavidade). O número de neutrófilos foi avaliado 4 horas após o desafio. As barras representam média ± e.p.m de 12 animais por grupo. *p<0.001 em relação ao grupo tratado com tcY-NH₂ e #p<0.001 em relação ao grupo controle.

Tabela 6: Leucócitos presentes na cavidade pleural de camundongos em resposta a injeção i.pl. de diferentes doses de tcY-NH₂ em pleurisia experimental induzida por carragenina (30 µg/cavidade).

	Carragenina (30 µg/cavidade)				
	PBS + PBS	PBS	tcY-NH ₂ (µg/ cavidade)		
			0,1	0,3	1,0
Total	4.1 ± 0.4	8.7 ± 0.6 [#]	4.8 ± 0.4 [*]	5.9 ± 0.3 [*]	4.1 ± 0.4 [*]
Neutrófilos	1.7 ± 0.2	7.0 ± 0.5 [#]	3.5 ± 0.4 [*]	4.8 ± 0.3 [*]	2.8 ± 0.3 [*]
Mononucleares	2.4 ± 0.3	2.0 ± 0.1 [†]	1.1 ± 0.08 ^{††}	1.0 ± 0.1 ^{††}	1.3 ± 0.1 ^{††}

Os valores representam a média e o erro padrão da média x 10⁴ células. #p<0.001 e †p<0.05 em relação ao grupo controle e *p<0.001 e ††p<0.05 em relação ao grupo que recebeu carragenina. n=12.

5.6 Avaliação do papel do PAR-4 sobre a migração de neutrófilos na pleurisia induzida por tripsina

Uma vez que o tratamento com o tcY-NH₂ reduziu significativamente o número de neutrófilos na cavidade pleural induzido pela carragenina, faz-se necessário investigar se o antagonista de PAR-4 utilizado era, na mesma dose utilizada nos experimentos de carragenina, capaz de inibir sua ativação por seu ativador natural, a tripsina. Para isso, os camundongos foram pré-tratados com tcY-NH₂ (1.0 µg/cavidade) 30 minutos antes da administração de tripsina 10 µg/cavidade. O tratamento com a tcY-NH₂ reduziu significativamente o número de neutrófilos na cavidade pleural induzido pela tripsina (**Figura 9**), não havendo variação significativa no que se refere ao número de células mononucleares (**Tabela 7**).

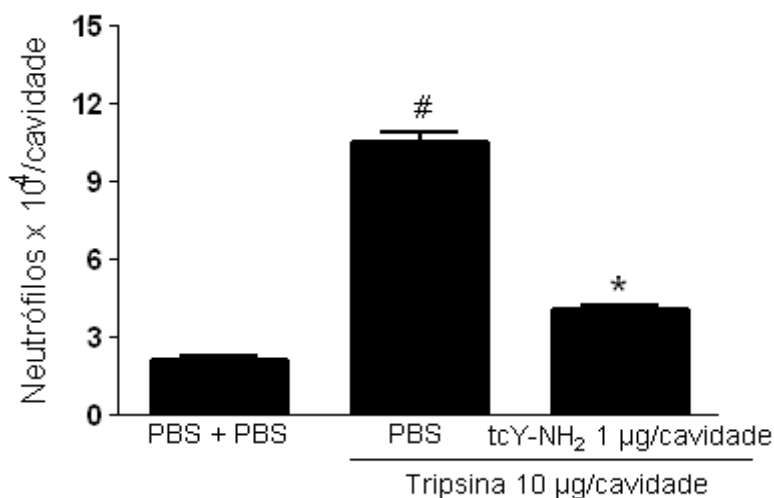


Figura 9. Efeito induzido pelo pré-tratamento com tcY-NH₂ sobre a migração de neutrófilos induzida pela administração intrapleural de tripsina. Os camundongos foram pré-tratados com tcY-NH₂ (1 µg/cavidade) por via intrapleural, 30 minutos antes do desafio com tripsina (10 µg/cavidade). O número de neutrófilos foi avaliado 4 horas após o desafio com tripsina. As barras representam média ± e.p.m de 10 animais por grupo. [#]p<0.001 em relação ao grupo controle e ^{*}p<0.001 em relação ao grupo tratado com tripsina.

Tabela 7: Leucócitos presentes na cavidade pleural de camundongos em resposta a injeção i.pl de tcY-NH₂ (1 µg/ cavidade) em pleurisia experimental induzida por tripsina (10 µg/cavidade).

	Tripsina (10 µg/cavidade)		
	PBS + PBS	PBS	tcY-NH ₂ (1 µg/ cavidade)
Total	5.7 ± 0.7	13.7 ± 1.1 [#]	6.8 ± 0.9 [*]
Neutrófilos	2.2 ± 0.4	10.6 ± 1.0 [#]	4.1 ± 0.5 [*]
Mononucleares	3.5 ± 0.4	3.1 ± 0.2	2.7 ± 0.4

Os valores representam a média e o erro padrão da média x 10⁴ células. [#]p<0.001 em relação ao grupo controle e ^{*}p<0.001 em relação ao grupo que recebeu. n=10.

5.7 Papel da Leucotriena B₄ no recrutamento de neutrófilos induzido por tripsina

Os camundongos foram pré-tratados com U75302 (3.0 µg/cavidade) 30 minutos antes da administração de tripsina (10 µg/cavidade). O tratamento com o U75302 reduziu significativamente o número de neutrófilos (**Figura 10**), bem como o número de leucócitos totais na cavidade pleural induzido pela tripsina. Observou-se uma redução do número de células mononucleares na cavidade pleural dos animais desafiados com tripsina em relação aos valores basais dessas células e esse valor não sofreu alteração frente ao pré-tratamento com U75302 (**Tabela 8**).

Uma vez observado que a pleurisia induzida tanto pela carragenina quanto pela tripsina envolve a participação de PAR-4, fez-se necessário verificar se a mesma dose do antagonista de LTB₄, utilizada nos experimentos com a tripsina, reproduz resultado semelhante com o estímulo do LTB₄. Dessa forma, os animais foram pré-tratados com U75302 (3 µg/cavidade) 30 minutos antes da administração de LTB₄ (500 ng/cavidade). Observou-se que na dose de 3 µg/cavidade, o U75302 foi eficaz em diminuir o recrutamento de leucócitos induzido pelo seu agonista endógeno (**Figura 11**), bem como o de células mononucleares (**Tabela 9**).

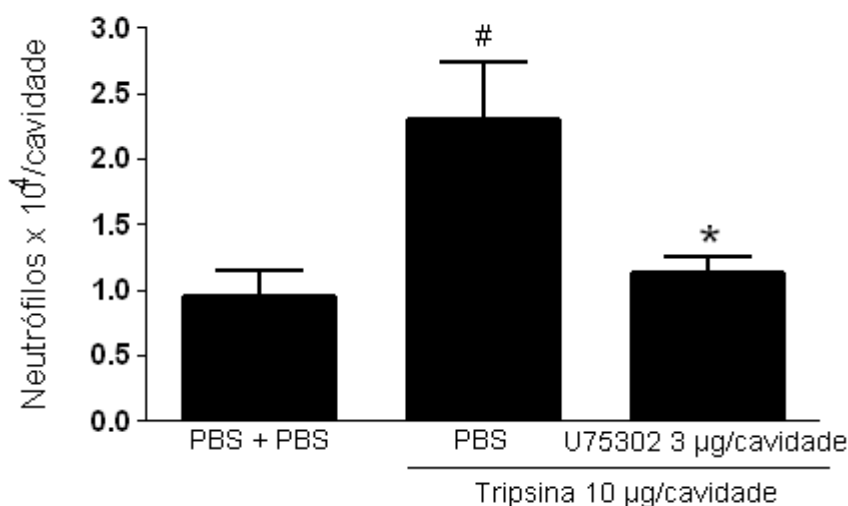


Figura 10. Efeito induzido pelo pré-tratamento com U75302 sobre a migração de neutrófilos induzida pela administração intrapleural de tripsina. Os camundongos foram pré-tratados com U75302 (3.0 µg/cavidade) por via intrapleural, 30 minutos antes do desafio com tripsina (10 µg/cavidade). O número de neutrófilos foi avaliado 4 horas após o desafio com tripsina. As barras representam média ± e.p.m de 5-6 animais por grupo. #p<0.05 em relação ao grupo controle e *p<0.05 em relação ao grupo tratado com tripsina.

Tabela 8: Leucócitos presentes na cavidade pleural de camundongos em resposta a injeção i.pl. de U75302 (3.0 µg/cavidade) em pleurisia experimental induzida por tripsina (10 µg/cavidade).

	Tripsina (10 µg/cavidade)		
	PBS + PBS	PBS	U75302 (3.0 µg/cavidade)
Total	3.5 ± 0.4	2.8 ± 0.5 [†]	1.5 ± 0.08 ^{**}
Neutrófilos	0.9 ± 0.2	2.3 ± 0.4 [#]	1.1 ± 0.1 [*]
Mononucleares	2.5 ± 0.3	0.4 ± 0.1 [#]	0.3 ± 0.04

Os valores representam a média e o erro padrão da média x 10⁴ células. #p<0.05 e [†]p<0.001 em relação ao grupo controle e *p<0.05 e **p<0.001 em relação ao grupo que recebeu tripsina. n= 5 a 6.

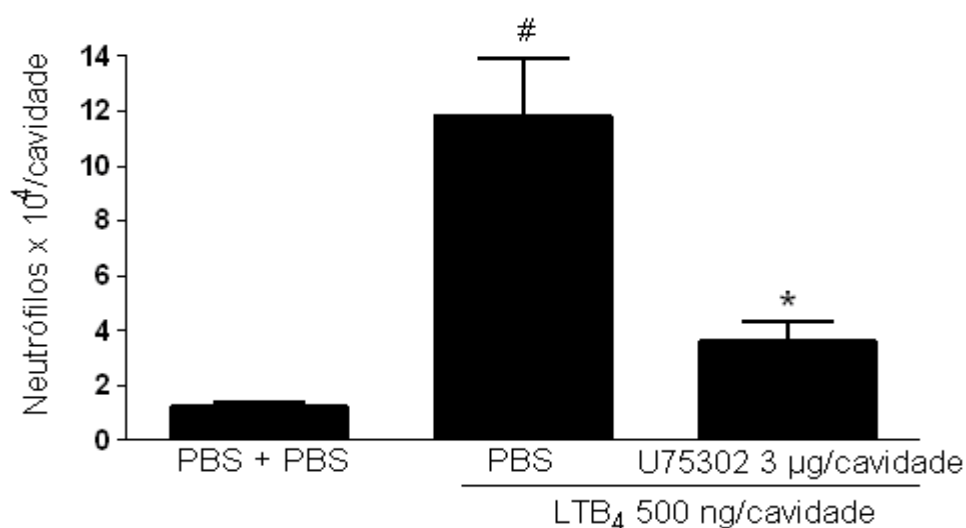


Figura 11. Efeito induzido pelo pré-tratamento com U75302 sobre a migração de neutrófilos induzida pela administração intrapleural de LTB₄. Os camundongos foram tratados com U75302 (3.0 µg/cavidade) por via intrapleural, 30 minutos antes do desafio com LTB₄ (500 ng/cavidade). O número de neutrófilos foi avaliado 4 horas após o desafio com LTB₄. As barras representam média ± e.p.m de 5-6 animais por grupo. [#]p<0.001 em relação ao controle e ^{*}p<0.001 em relação ao grupo tratado com LTB₄.

Tabela 9: Leucócitos presentes na cavidade pleural de camundongos em resposta ao tratamento intrapleural de U75302 (3.0 µg/cavidade) em pleurisia experimental induzida por LTB₄ (500 ng/cavidade).

	PBS + PBS	LTB ₄ (500 ng/cavidade)	
		PBS	U75302 (3.0 µg/cavidade)
Total	2.5 ± 0.2	18.0 ± 1.9 [#]	4.2 ± 0.8 [*]
Neutrófilos	1.2 ± 0.1	11.9 ± 2.0 [#]	3.6 ± 0.7 [*]
Mononucleares	1.4 ± 0.1	2.2 ± 0.5	0.6 ± 0.1 [*]

Os valores representam a média e o erro padrão da média x 10⁴ células. [#]p<0.001 em relação ao grupo controle e ^{*}p<0.001 em relação ao grupo que recebeu LTB₄. n= 5-6.

5.8 Avaliação do papel do PAR-4 sobre a migração de neutrófilos induzida por IL-8

Os camundongos foram pré-tratados com tcY-NH₂ (1 µg/cavidade) ou com Dexametasona (0.5 mg/kg) 30 minutos antes da administração de IL-8 (60 ng/cavidade). O tratamento com o tcY-NH₂ reduziu significativamente o número de leucócitos totais na cavidade pleural dos animais em relação aos valores basais desses (**Tabela 10**), bem como o número de neutrófilos na cavidade pleural induzido pela IL-8 (**Figura 12**). Em relação às células mononucleares, embora o número tenha sido reduzido com o pré-tratamento com a dexametasona, não houve variação significativa com o pré-tratamento com o tcY-NH₂ em relação ao grupo de animais desafiados com IL-8 e sem tratamento. No entanto, o pré-tratamento dos animais com 3.0 µg/cavidade de tcY-NH₂ reduziu o número de neutrófilos a nível basal em relação ao grupo de animais tratados apenas com IL-8 (**Figura 13**). Esta inibição no recrutamento de neutrófilos se mostrou seletiva para essas células, uma vez que o pré-tratamento de tcY-NH₂ não alterou o número de mononucleares, em animais desafiados com IL-8 e em relação aos tratamento (**Tabela 11**).

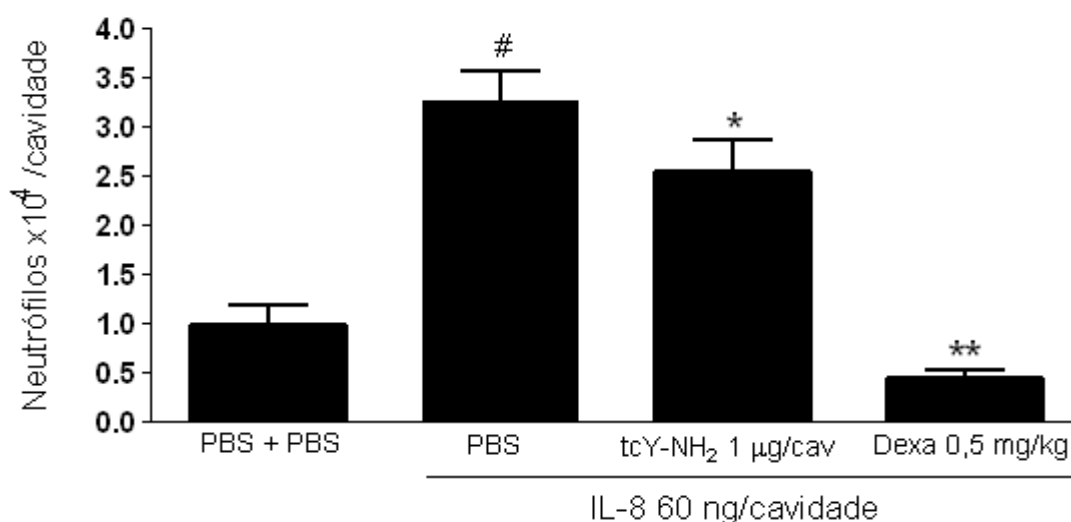


Figura 12. Efeito induzido pelo pré-tratamento com tcY-NH₂ sobre a migração de neutrófilos induzida pela administração intrapleural de IL-8. Os camundongos foram tratados com tcY-NH₂ (1.0 µg/cavidade) por via intrapleural, ou Dexametasona (Dexta 0.5 mg/kg), por via intraperitoneal, 30 minutos antes do desafio com IL-8 (60 ng/cavidade). O número de neutrófilos presentes na cavidade pleural dos animais foi avaliado 4 h após o desafio. As barras representam média ± e.p.m de 7 animais por grupo. #p<0.05 em relação ao grupo controle e *p<0.05 e **p<0.001 em relação ao grupo desafiado com IL-8.

Tabela 10: Leucócitos presentes na cavidade pleural de camundongos em resposta a injeção i.pl. de tcY-NH₂ (1 µg/cavidade) em pleurisia experimental induzida por IL-8 (60 ng/cavidade)

	IL-8 (60 ng/cavidade)			
	PBS + PBS	PBS	tcY-NH ₂ (1 µg/cavidade)	Dexta (0.5 mg/kg)
Total	1.7 ± 0.3	4.3 ± 0.4 [†]	3.6 ± 0.3 ^{**}	0.7 ± 0.09 ^{**}
Neutrófilos	1.0 ± 0.2	3.3 ± 0.3 [#]	2.5 ± 0.3 [*]	0.4 ± 0.08 ^{**}
Mononucleares	0.7 ± 0.1	1.0 ± 0.2	1.0 ± 0.06	0.2 ± 0.03 ^{**}

Os valores representam a média e o erro padrão da média x 10⁴ células. #p<0.05 e [†]p<0.001 em relação ao grupo controle, *p<0.05 e **p<0.001 em relação ao grupo que recebeu IL-8. n=7.

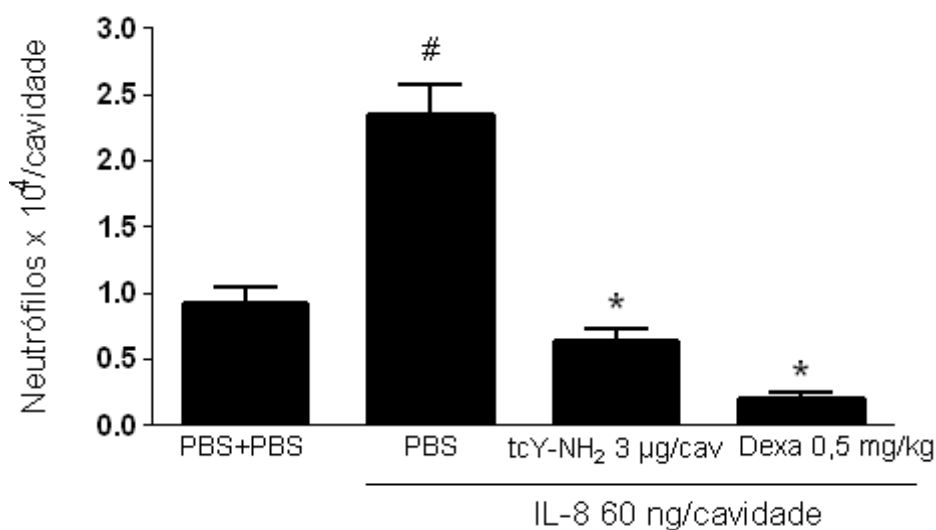


Figura 13. Efeito induzido pelo pré-tratamento com tcY-NH₂ sobre a migração de neutrófilos induzida pela administração intrapleurar de IL-8. Os camundongos foram tratados com tcY-NH₂ (3.0 µg/cavidade) por via intrapleurar, ou Dexametasona (0,5 mg/cavidade), por via intraperitoneal, 30 minutos antes do desafio com IL-8 (60 ng/cavidade). O número de neutrófilos presentes na cavidade pleural dos animais foi avaliado 4 horas após o desafio. As barras representam média ± e.p.m de 13-14 animais por grupo. #p<0.001 em relação ao grupo controle e *p<0.001 em relação ao grupo tratado com IL-8.

Tabela 11: Leucócitos presentes na cavidade pleural de camundongos em resposta a injeção i.pl. de tcY-NH₂ (3 µg/cavidade) em pleurisia experimental induzida por IL-8 (60 ng/cavidade).

	IL-8 (60 ng/cavidade)			
	PBS + PBS	PBS	tcY-NH ₂ (3 µg/cavidade)	Dexta (0.5 mg/kg)
Total	2.0 ± 0.3	2.3 ± 0.3 [†]	1.3 ± 0.1*	0.7 ± 0.05*
Neutrófilos	0.9 ± 0.1	2.3 ± 0.2 [#]	0.6 ± 0.08*	0.2 ± 0.05*
Mononucleares	1.2 ± 0.1	1.0 ± 0.1	0.6 ± 0.08	0.6 ± 0.07

Os valores representam a média e o erro padrão da média x 10⁴ células. #p<0.001 e [†]p<0.05 em relação ao grupo controle, e *p<0.001 em relação ao grupo que recebeu IL-8. n=13 a 14.

5.9 Avaliação da ativação direta do PAR-4 em induzir o recrutamento de neutrófilos para a cavidade pleural dos camundongos

As administrações do agonista PAR-4 (AY-NH₂) nas doses de 0.1, 1.0 e 10 µg/cavidade apresentaram um aumento de maneira dose dependente do número de leucócitos totais, bem como do número de neutrófilos na cavidade pleural (**Figura 14**) em relação aos valores basais destas células quando avaliado 4 horas após a sua administração. Além disso, também houve variação significativa do número de células mononucleares em relação ao valor basal dessas em todas as doses administradas (**Tabela 12**). Diante desse resultado, a dose de 10 µg/cavidade foi adotada para ser utilizada no experimento posterior de pleurisia induzida por AY-NH₂.

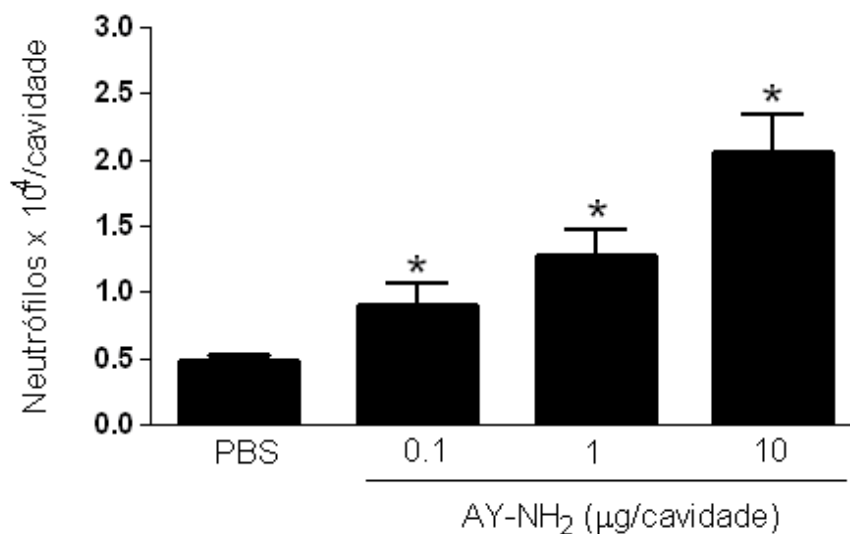


Figura 14. Curva dose-resposta do AY-NH₂ para a migração de neutrófilos na cavidade pleural de camundongos BALB/c. Os camundongos foram tratados com AY-NH₂ (0.1, 1.0 ou 10 µg/cavidade) por via intrapleural e o número de neutrófilos foi avaliado 4 horas após. As barras representam média ± e.p.m de 6 animais por grupo. *p<0.001 em relação ao grupo controle.

Tabela 12: Leucócitos presentes na cavidade pleural de camundongos 4 horas após administração i.pl. de diferentes doses de AY-NH₂.

	AY-NH ₂ (µg/cavidade)			
	PBS	0.1	1.0	10.0
Total	1.8 ± 0.2	1.8 ± 0.3	1.7 ± 0.2	3.0 ± 0.5 **
Neutrófilos	0.5 ± 0.04	0.9 ± 0.16**	1.3 ± 0.2**	2.05 ± 0.3**
Mononucleares	1.3 ± 0.1	0.9 ± 0.1**	0.5 ± 0.05**	0.9 ± 0.2*

Os valores representam a média e o erro padrão da média x 10⁴ células. *p<0.01 e **p<0.001 em relação ao grupo controle. n=6.

Uma vez observado que o agonista PAR-4, AY-NH₂, induziu o recrutamento de neutrófilos de maneira dose-dependente, fez-se necessário verificar se a mesma dose do antagonista de PAR-4, utilizada nos experimentos anteriores com a carragenina, tripsina, LTB₄ e IL-8, seria capaz de reproduzir resultado semelhante em inibir esse recrutamento ao bloquear seu ligante endógeno. Dessa forma, os animais foram pré-tratados com tcY-NH₂ (1 µg/cavidade), 30 minutos antes da administração de AY-NH₂ (10 µg /cavidade). Observou-se que essa dose de tcY-NH₂ é eficaz não só em diminuir o recrutamento de leucócitos totais, induzido pelo seu agonista, mas também o número de neutrófilos para a cavidade pleural em relação aos valores basais destas células quando avaliado 4 horas após a sua administração (**Figura 15**), bem como o de células mononucleares (**Tabela 13**) corroborando resultados anteriores que sugerem a participação desse receptor na migração celular.

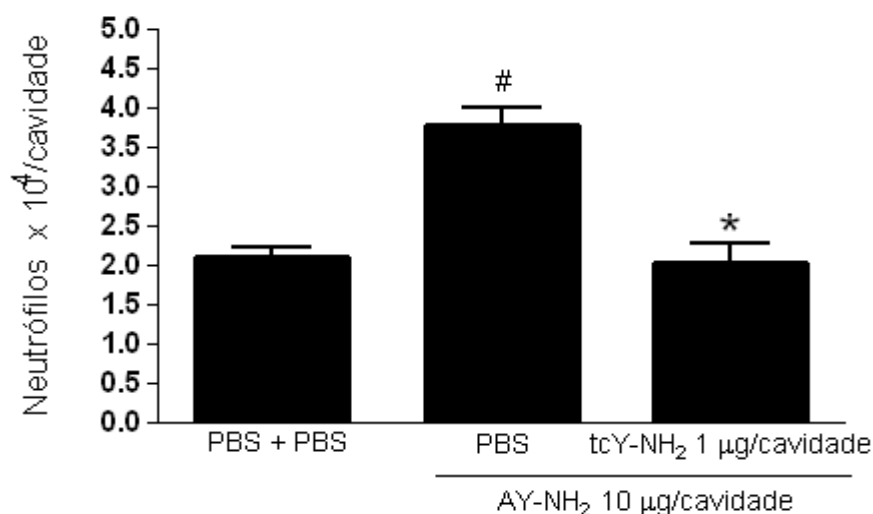


Figura 15. Efeito induzido pelo pré-tratamento com tcY-NH₂ (1.0 µg/cavidade) sobre a migração de neutrófilos induzida pela administração i.pl. de AY-NH₂ (10 µg/0.1mL). Os camundongos foram pré-tratados com tcY-NH₂ (1.0 µg/cavidade) por via intrapleural 15 minutos antes do estímulo com AY-NH₂ (10 µg/cavidade). O número de neutrófilos foi avaliado 4 horas após. As barras representam média ± e.p.m de 6 animais por grupo. [#]p<0.001 em relação ao grupo controle e ^{*}p<0.001 em relação ao grupo que recebeu AY-NH₂.

Tabela 13: Leucócitos presentes na cavidade pleural de camundongos em resposta a injeção intrapleural de tcY-NH₂ (1 µg/cavidade) em pleurisia experimental induzida por AY-NH₂ (10.0 µg/cavidade).

	AY-NH ₂ (10.0 µg/cavidade)		
	PBS + PBS	PBS	tcY-NH ₂ (1 µg/cavidade)
Total	5.0 ± 0.3	5.8 ± 0.4 [*]	4.0 ± 0.4 ^{**}
Neutrófilos	2.0 ± 0.1	3.8 ± 0.2 [#]	2.0 ± 0.2 ^{**}
Mononucleares	3.0 ± 0.2	2.0 ± 0.2 [#]	2.0 ± 0.2 [#]

Os valores representam a média e o erro padrão da média x 10⁴ células. ^{*}p<0.01 e [#]p<0.001 em relação ao grupo controle e ^{**}p<0.001 em relação ao grupo tratado com AY-NH₂. n=6.

6. DISCUSSÃO

As proteases participam de muitas funções fisiológicas importantes no organismo, entre essas destaca-se a resposta inflamatória (Coughlin e Camerer, 2003). Recentemente, com a descoberta de que as serinoproteases em particular são capazes de clivar porções específicas de determinados receptores, os PARs, desencadeando determinadas respostas biológicas de modo dependente do tipo e da concentração de serinoprotease (Hollenberg e colaboradores, 2004; Coughlin, 2000; Steinhoff e colaboradores, 2005), estas enzimas e seus receptores tornaram-se alvos potenciais para a abordagem terapêutica em quadros onde possuem relevância para o desenvolvimento de doenças inflamatórias.

No presente trabalho, avaliou-se em modelo de pleurisia, a importância de um dos receptores ativados por proteases, o PAR-4, para um fenômeno singular da resposta inflamatória: a migração de neutrófilos. O recrutamento de leucócitos a partir da microcirculação adjacente ao tecido é um processo importante para o desenvolvimento e/ou para o estabelecimento da inflamação. Uma vez ativados, leucócitos são capazes de liberar enzimas que causam danos ao tecido e que modulam a permeabilidade vascular e a produção de mediadores inflamatórios (Heit e colaboradores, 2002).

Durante a inflamação pleural, as células mesoteliais são responsáveis pela secreção de interleucina (IL)-8 e outras quimiocinas como proteína inflamatória de macrófago (MIP)-1 α , proteína de quimioatração de monócitos (MCP)-1 e interferon gama (IFN)- γ que atuam no recrutamento de neutrófilos e mononucleares (Hallett e colaboradores, 1995).

Várias substâncias são conhecidas por induzir a pleurisia em camundongos promovendo a liberação de diferentes mediadores inflamatórios. Na pleurisia induzida por carragenina, ocorre a liberação de mediadores lipídicos como prostaglandinas (PGs) e LTs (Raychaudhuri e colaboradores, 1997), além de citocinas como TNF, IL-1, IL-6 e IL-8. Esses mediadores irão promover o acúmulo de neutrófilos e células mononucleares a partir dos vasos sanguíneos, além de ativar as células endoteliais (Frode e colaboradores, 2001). Inicialmente, os experimentos do presente trabalho visaram avaliar a participação de serinoproteases na migração de neutrófilos induzida pela carragenina, um estímulo flogogênico bastante conhecido.

Para tal, utilizamos a aprotinina nesse estudo. Essa é caracterizada como um inibidor de serinoproteases não específico, usada extensivamente em operações cardíacas desde meados de 1980, quando alguns grupos relataram que o uso desse inibidor em pacientes submetidos a cirurgias cardíacas com circulação extracorpórea reduzia a necessidade de transfusão sanguínea (Westaby, 2008). Possui amplas propriedades hemostáticas que são mediadas por bloqueio de vias de ativação do complemento e fibrinolítica, atuando inibindo o sistema cinina-caliceína e as ações de proteases como tripsina e a plasmina (Asimakopoulos e colaboradores, 2000). Também foi observado que a aprotinina modifica respostas inflamatórias reduzindo a secreção de IL-8 no pulmão, no pós-operatório de cirurgias cardiopulmonares (Hill e colaboradores, 1996).

Os inibidores de proteases tem sido sugeridos como inibidores da migração de leucócitos em cultura de células (Cepinskas e colaboradores, 1997). Asimakopoulos e colaboradores (2000) também mostraram o efeito da aprotinina no extravasamento de leucócitos *in vivo* e *in vitro*, demonstrando a sua habilidade em inibir de forma significativa e de maneira dose dependente a migração de neutrófilos. Foram utilizadas células endoteliais do cordão umbilical de humanos (*human umbilical vein endothelial cell*, HUVEC), em resposta a quimioatraentes como fator ativador de plaquetas (PAF), IL-8, e fMLP em resposta ao peptídeo *Phe* (fMLP), quimioatraente de neutrófilos.

Nesse último trabalho foi sugerido que a aprotinina intravenosa, em dose equivalente a usada em cirurgias cardíacas, poderia exercer um efeito inibitório sobre o extravasamento de leucócitos induzido por esses agentes. No entanto, nestes estudos o mecanismo pelo qual a aprotinina exerceria esta ação, não foi elucidado. Além disso, o grupo de Asimakopoulos (2000) sugeriu que a aprotinina também é capaz de inibir a secreção de mieloperoxidase (MPO) de neutrófilos, agindo em sinergismo na diminuição da migração de neutrófilos para o tecido inflamado.

Os resultados do presente trabalho corroboraram os resultados obtidos por Asimakopoulos e colaboradores (2000), uma vez que observamos que a aprotinina inibiu o recrutamento de neutrófilos induzido pela carragenina no modelo de pleurisia. Esse dado sugere que a inibição do recrutamento de neutrófilos possa estar parcialmente envolvida com uma ou mais vias que potencialmente são inibidas pela aprotinina.

Como citado anteriormente, um dos mecanismos de ação propostos para a aprotinina é a inibição do sistema de cininas plasmáticas, inibindo a caliceína plasmática, precursora da bradicinina, bem como a inibição da ação da tripsina (Smith e colaboradores, 2009). A bradicinina, assim como a carragenina, induz recrutamento de neutrófilos através da produção de mediadores lipídicos como o PAF e a LTB₄ (Sato e colaboradores, 1996), porém os efeitos pró-inflamatórios mediados pela carragenina não dependem apenas da ativação do sistema de cininas, e portanto apenas a inibição das ações e/ou produção destas cininas, por parte da aprotinina, poderia não ser suficiente para explicar a ação inibitória da aprotinina sobre o recrutamento de neutrófilos induzida pela carragenina nos experimentos realizados nesse trabalho. Portanto, surgiu a necessidade de investigar se a inibição da tripsina poderia justificar os efeitos da aprotinina na migração de neutrófilos em nosso modelo experimental, e se a tripsina por sua vez estaria envolvida de alguma forma no recrutamento de neutrófilos na pleurisia.

Após um intervalo de 4 horas da administração intrapleural de tripsina, observou-se um recrutamento de neutrófilos dose dependente. No entanto, não foi observada a presença significativa de neutrófilos após o intervalo de 48 horas da administração desse estímulo e, mais importante do que isso, não há alterações de infiltrado de outro tipo celular que não de mononucleares, como por exemplo, linfócitos. Esses dados demonstram que o recrutamento celular induzido pela tripsina para a cavidade pleural é seletivo para neutrófilos.

A aprotinina, semelhante aos experimentos com a carragenina, também foi capaz de inibir o recrutamento de neutrófilos induzido pela tripsina. Essa observação evidencia que, na mesma dose usada nos protocolos com a carragenina, a aprotinina também foi capaz de inibir o recrutamento induzido pela maior dose de tripsina, escolhida nesses experimentos.

A tripsina é conhecida por ativar PAR-2 e PAR-4 (Hollenberg e Compton, 2002), existindo pelo menos três genes distintos para a tripsina em humanos: tripsina I, tripsina II e mesotripsina. A tripsina IV é uma forma variante da mesotripsina, sendo estas proteases também capazes de ativar PAR-4. As tripsinas estão amplamente distribuídas e expressas em muitas células extra-pancreáticas, incluindo células endoteliais e epiteliais (Koshikawa e colaboradores, 1998), sistema nervoso (Koshikawa e colaboradores, 1998) e em tumores (Koivunen e colaboradores, 1989). Entretanto, apesar dessa ampla distribuição, pouco se sabe

sobre o controle da secreção ou ativação de tripsinas extra-pancreáticas e suas funções potenciais como ativadoras dos PARs. A nossa hipótese é que, em um ambiente inflamado, moléculas que apresentem atividade semelhante à tripsina como tripsina II, mesotripsina, a tripsina IV contribuam para o desenvolvimento da resposta inflamatória por induzir o recrutamento de neutrófilos através da ativação de PAR-4.

No cenário inflamatório, tem sido recentemente demonstrado que a tripsina, induz vasodilatação e extravasamento de proteínas do plasma de ratos (Obreja e colaboradores, 2006). A tripsina também é capaz de estimular a secreção de fator de necrose tumoral (TNF- α) em macrófagos peritoniais (Lundberg e colaboradores, 2000) e induzir vasodilatação dependente de óxido nítrico (NO) (Kawabata e colaboradores, 2001), além de potencializar a inflamação articular em camundongos (Kelso e colaboradores, 2006).

Paszczuk e colaboradores (2008), mostraram que a tripsina foi capaz de produzir uma resposta inflamatória aguda com formação de edema de pata dose dependente em rato, com acúmulo de granulócitos, acompanhado de aumento da atividade de mieloperoxidase. Somado a esses resultados, a injeção de tripsina induziu nocicepção dose e tempo dependentes, bem como respostas hipernociceptivas térmicas e mecânicas. Ambos estão ligados a produção de neuropeptídeos, provavelmente envolvendo a ativação de fibras-C e receptor de potencial transiente do tipo vanilóide-1 (TRPV-1), além da estimulação de receptores B₂ de bradicinina.

Estudos realizados por diferentes grupos demonstraram que a ativação de PAR-4 por um peptídeo agonista seletivo induz migração de neutrófilo para a cavidade peritoneal de ratos (Vergnolle e colaboradores, 2002) e medeia inflamação articular e dor (McDougall e colaboradores, 2009). Da mesma forma, o bloqueio desse receptor é útil na redução do edema e do recrutamento de granulócitos, bem como na redução do recrutamento de neutrófilos induzido pelo LPS em modelo de inflamação sistêmica (Sjoukje e colaboradores, 2007). Pensando na importância da ativação do PAR-4 no recrutamento de neutrófilos e sabendo que a tripsina ativa esse receptor, o próximo passo foi investigar se o PAR-4 estaria envolvido no recrutamento de neutrófilos para a cavidade pleural induzido pela tripsina ou pela carragenina. Para isto, foi utilizado um antagonista seletivo para PAR-4, o peptídeo YPGKF-NH₂ (tcY-NH₂).

Assim, o pré-tratamento dos animais com tcY-NH₂, reduziu de forma significativa o número de neutrófilos na cavidade pleural tanto em resposta à tripsina como à carragenina, sugerindo que a ativação de PAR-4 por esta protease, ou ainda a ativação deste receptor, são peças importantes para que ocorra o recrutamento de neutrófilos em pleurisia induzida por carragenina, e ainda, que a dose do antagonista PAR-4 utilizado foi efetiva em inibir a ação da tripsina, que é um de seus agonistas. Esses dados corroboram os estudos de Houle e colaboradores (2005), em que o tratamento com o antagonista de PAR-4 (P4pal-10) reduziu expressivamente o edema e o infiltrado de granulócitos 4 horas após o desafio com a carragenina na pata de ratos. Propomos então, um mecanismo para o recrutamento de neutrófilos para a cavidade pleural mediado por PAR-4 em resposta a tripsina ou carragenina.

O estudo de Vergnolle e colaboradores (2002) sugere o PAR-4 como um alvo para desencadear rolamento e aderência de leucócitos em vênulas mesentéricas de ratos induzido pela trombina. Também Houle e colaboradores (2005) sugeriram um mecanismo envolvendo a ativação de PAR-4 na superfície de neutrófilos induzida pela trombina, com consequente ativação da cascata de cininas, levando à produção de bradicinina, edema e migração de neutrófilos. Em nosso trabalho, o tratamento com a aprotinina inibiu o recrutamento de leucócitos induzido por tripsina e por carragenina. Além disso, a aprotinina é um inibidor de tripsina que também inibe a calicreína e dessa forma, indiretamente, prejudica a produção da bradicinina; mas não inibe a trombina. Assim, tem-se como prosposta no presente estudo, uma via adicional que não foi sugerida por Houle e colaboradores, no qual a tripsina está envolvida no recrutamento de neutrófilos.

Este caminho demonstra um papel fundamental para a tripsina ou enzimas semelhantes a tripsina na mediação da migração de neutrófilos através da ativação de PAR-4. Contudo, a participação da trombina neste processo não pode ser descartada. A constatação de que a aprotinina e o antagonista de PAR-4 inibem apenas parcialmente o recrutamento de neutrófilos em camundongos desafiados com carragenina e tripsina é consistente com o envolvimento de outros mediadores envolvidos, como por exemplo a produção de trombina e a ativação de PAR-4 por esta protease.

A importância da ativação de PAR-4 para o recrutamento de neutrófilos induzido por estímulos quimiotáticos tal como IL-8 também foi estudada, bem como a avaliação do envolvimento LTB₄ nesse processo. O LTB₄ é um metabólito

biologicamente ativo derivado do ácido araquidônico, e está presente em condições patológicas como doenças inflamatórias. Este metabólito, produzido por diferentes células inflamatórias incluindo mastócitos, eosinófilos e macrófagos, estimula a adesão de leucócitos no endotélio vascular, facilitando a migração dessas células para o tecido adjacente (Dahlen e colaboradores, 1981). Além disso, estudos apontam esse mediador lipídico, como responsável pelo aumento da permeabilidade da vênula pós-capilar, vasodilatação e desgranulação de polimorfonucleares (Lewis e colaboradores, 1990)

Interessantemente, animais pré-tratados com o antagonista do receptor de LTB₄ (U75302) não apresentaram migração significativa de neutrófilos para cavidade pleural em resposta a administração de tripsina em comparação com seus níveis basais. Somado a isso, no experimento seguinte, ao pré-tratarmos os animais com o U75302, observamos que houve inibição da migração de neutrófilos para cavidade pleural induzida pelo LTB₄. Em outras palavras, a mesma dose do antagonista de LTB₄ capaz de inibir o recrutamento de neutrófilos induzido pela tripsina, também conseguiu prevenir a migração estimulada pelo seu agonista específico. O resultado demonstra que LTB₄ participa do recrutamento de polimorfonucleares induzido pela tripsina.

A IL-8, por sua vez, identificada como o principal fator ativador e quimiotático para neutrófilos (Townsend e colaboradores, 2000), é considerada um pivô dos processos inflamatórios; expressa em neutrófilos, linfócitos, macrófagos e células endoteliais, ela desencadeia uma cascata de eventos pró-inflamatórios ao se ligar aos seus receptores. Induz aumento da integrina CD11b/CD18 em neutrófilos; aumenta a adesão de leucócitos em células endoteliais; estimula a angiogênese, quimiotaxia e desgranulação de neutrófilos, entre outros (Ramos e colaboradores, 2003).

Os resultados obtidos nesse trabalho apontam que a migração de polimorfonucleares para a cavidade pleural induzida pela IL-8 também parece ser dependente da ativação do PAR-4 nesse modelo experimental, uma vez que esse estímulo na dose de 1 µg/cavidade foi bloqueado pelo tcY-NH₂, e ainda, na dose de 3 µg/cavidade reduziu o número de neutrófilos a níveis basais.

Finalmente, avaliamos a habilidade da ativação direta de PAR-4 no recrutamento de neutrófilos para a cavidade pleural em resposta ao seu agonista sintético, o AY-NH₂. Nossos resultados demonstram que o AY-NH₂ estimula o

recrutamento de neutrófilos para a cavidade pleural. Também, na mesma dose capaz de prevenir o recrutamento de neutrófilos induzido por agentes como carragenina, tripsina, LTB₄ e IL-8, o tcY-NH₂, da mesma forma, conseguiu prevenir a migração com o seu agonista endógeno. Esses dados são consistentes com observações na pata posterior e na circulação mesentérica de ratos, onde a ativação de PAR-4 leva a infiltração de granulócitos e formação de edema (Vergnolle e colaboradores, 2002; Houle e colaboradores, 2005), e sugerem que a ativação de PAR-4 seja relevante para que ocorra o recrutamento de neutrófilos, e conseqüentemente para o desenvolvimento da resposta inflamatória na cavidade pleural.

7. CONCLUSÃO

O modelo de pleurisia foi eficaz em discriminar a migração pleural induzida pelos agentes estudados nesse trabalho, bem como o envolvimento da participação do PAR-4 e de serinoproteases nesse processo. Em conjunto, nossos resultados evidenciam a importância do PAR-4 no recrutamento de neutrófilos em um modelo experimental de pleurisia sugerindo ainda que a tripsina ou moléculas semelhantes a tripsina sejam as proteases responsáveis por estimular o recrutamento de neutrófilos para a cavidade pleural via ativação de PAR-4 e produção de LTB₄.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACKERMAN, N. et al. Three day pleural inflammation: a new model to detect drug effects on macrophage accumulation. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 215, n. 3, p. 588-95, Dec 1980.
- ANTONY, V. B. Immunological mechanisms in pleural disease. **Eur Respir J**, v. 21, n. 3, p. 539-44, Mar 2003.
- ASIMAKOPOULOS, G. et al. An anti-inflammatory property of aprotinin detected at the level of leukocyte extravasation. **J Thorac Cardiovasc Surg**, v. 120, n. 2, p. 361-9, Aug 2000.
- ASOKANANTHAN, N. et al. Activation of protease-activated receptor PAR-1, PAR-2, and PAR-4 stimulates IL-6, IL-8, and prostaglandin E2 release from human respiratory epithelial cells. **J Immunol**, v. 168, n. 7, p. 3577-85, Apr 2002.
- AUGÉ, C. et al. Protease-activated receptor-4 (PAR-4): a role as inhibitor of visceral apin and hypersensitivity. **Neurogastroenterol Motil**, v. 21, n. 11, p. 1129-32, Nov 2009.
- BOND, J. S.; BUTLER P. E. Intracellular proteases. **Annu Rev Biochem**, v. 56, p. 333-64, 1987.
- CAILHIER, J. F. et al. Resident pleural macrophages are key orchestrators of neutrophil recruitment in pleural inflammation. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 173, n. 5, p. 540-7, Mar 2006.
- CEPINSKAS, G.; NOSEWORTHY, R.; KVIETYS, P. R. Transendothelial neutrophil migration: role of neutrophil derived proteases and relationship to transendothelial protein movement. **Circ Res**, v. 81, n. 4, p. 618-26, Oct 1997.
- CIRINO, G.; NAPOLI, C.; BUCCI, M.; CICALA, C. Inflammation-coagulation network: are serine protease receptors the knot? **Trends Pharmacol Sci**, v. 21, n. 5, p. 170-2, May 2000.
- COCKS, T. M.; MOFFATT, J. D. Protease activated-receptors: sentries for inflammation. **Trends Pharmacol Sci**, v. 21, n. 3, p. 103-8, Mar 2000.
- COTTRELL, G. S. et al. Trypsin IV, a novel agonist of protease-activated receptors 2 and 4. **J Biol Chem**, v. 279, p. 13532-9, Apr 2004.
- COUGHLIN, S. R. Thrombin signalling and protease-activated receptors. **Nature**, v. 407, p. 258-64, Sep 2000.
- COUGHLIN, S. R.; CAMERER, E. Participation in inflammation. **J Clin Invest**, v.111, n. 1, p. 25-7, Jan 2003.

DAHLÉN, S. E. et al. Leukotrienes promote plasma leakage and leukocyte adhesion in postcapillary venules: in vivo effects with relevance to the acute inflammatory response. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 78, n. 6, p. 3887-91, Jun 1981.

DASH, C.; KULKAMI, A.; DUNN, B.; RAO, M. Aspartic peptidase inhibitors: implications in drug development. **Crit Rev Biochem Mol Biol**, v. 38, n. 2, p. 89-119, 2003.

DÉRY O.; CORVERA, C. U.; STEINHOFF, M.; BUNNETT, N. W.; Proteinase-activated receptors: novel mechanisms of signaling by serine proteases. **Am J Physiol**, v. 274, n. 6, p. 1429-52, Jun 1998.

FRODE, T. S.; SOUZA, G. E.; CALIXTO, J. B. The modulatory role played by TNF-alpha and IL-1 beta in the inflammatory responses induced by carrageenan in the mouse model of pleurisy. **Cytokine**, v. 13, n. 3, p. 162-8, Feb 2001.

HALLETT, M. B.; LLOYDS, D. Neutrophil priming: the cellular signals that say 'amber' but not 'green'. **Immunol Today**, v. 16, n. 6, p. 264-8, Jun 1995.

HEIT, B.; TAVENER, S.; RAHARIO, E.; KUBES, P. An intracellular signaling hierarchy determines direction of migration in opposing chemotactic gradients. **J Cell Biol**, v. 159, n. 1, p. 91-102, Oct 2002.

HILL, G. E. et al. Aprotinin reduces interleukin-8 production and lung neutrophil accumulation after cardiopulmonary bypass. **Anesth Analg**, v. 83, n. 4, p. 696-700, Oct 1996.

HOULE, S.; et al. Neutrophils and the kallikrein-kinin system in proteinase-activated receptor 4-mediated inflammation in rodents. **Br J Pharmacol**, v. 146, n. 5, p. 670-8, Nov 2005.

HOLLENBERG, M. D.; COMPTON S. J. International Union of Pharmacology. XXVIII. Proteinase-activated receptors. **Pharmacol Ver**, v. 54, n. 2, p. 203-17, Jun 2002.

HOLLENBERG, M. D. et al. Proteinase-activated receptor-4: evaluation of tethered ligand-derived peptides as probes for receptor function and as inflammatory agonists in vivo. **Br J Pharmacol**, v. 143, n. 4, p. 443-54, Sep 2004.

HOOGERWERF, W. A. et al. Molecular cloning of the rat proteinase-activated receptor 4 (PAR-4). **BMC Mol. Biol**, v. 3, n. 2, Feb 2002.

KAHN, M. L. et al. A dual thrombin receptor system for platelet activation. **Nature**. v. 13; n. 394, p. 690-4, Aug 1998.

KAWABATA, A. et al. Activation of protease-activated receptor 2 (PAR-2) triggers ucin secretion in the rat sublingual gland. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 270, n. 1, p. 298-302, Apr 2000.

KELSO, E. B. et al. Therapeutic promise of proteinase-activated receptor-2 antagonism in joint inflammation. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 316, n. 3, p. 1017-24, Mar 2006.

KLEIN, A. et al. Stem cell factor-induced leukotriene B4 production cooperates with eotaxin to mediate the recruitment of eosinophils during allergic pleurisy in mice. **J Immunol**, v. 167, n. 1, p. 524-531, Jul 2001.

KOIVUNEN, E.; HUHTALA, M. L.; STENMAN, U. H. Human ovarian tumor-associated trypsin. Its purification and characterization from mucinous cyst fluid and identification as an activator of pro-urokinase. **J. Biol. Chem**, v. 264, p. 14095-14099, 1989.

KOSHIKAWA, N. et al. Expression of trypsin by epithelial cells of various tissues, leukocytes, and neurons in human and mouse. **Am J Pathol**, v. 153, n. 3, p. 937-44, Sep 1998.

KORKMAZ, B.; HORWITZ, M. S.; JENNE, D. E.; GAUTHIER, F. Neutrophil Elastase, Proteinase 3, and Cathepsin G as Therapeutic Targets in Human Diseases. **Pharmacol Rev**, v. 62, n. 4, p. 726-59, Dec 2010.

LAN, R. S.; STEWART, G. R.; HENRY, P. J. Modulation of airway smooth muscle tone by protease activated receptor-1-2-3 and -4 in trachea isolated from influenza A virus-infected mice. **Br J Pharmacol**, v. 129, n. 1, p. 63-70, Jan 2000.

LINDENER, J. R. et al. Delayed onset of inflammation in protease-activated receptor-2-deficient mice. **J Immunol**, v. 165, n. 11, p. 6504-10, Dec 2000.

LEWIS, R. A.; AUSTEN, K. F.; SOBERMAN R. J. Leukotrienes and other products of the 5-lipoxygenase pathway. Biochemistry and relation to pathobiology in human diseases. **N. Engl. J. Med**, v. 6, n. 10, p. 645-55, Sep 1990.

LUNDBERG, A. H. et al. Trypsin stimulates production of cytokines from peritoneal macrophages in vitro and in vivo. **Pancreas**, v. 21, n. 1, p. 41-51, Jul 2000.

McDOUGALL, J. J. et al. Triggering of proteinase-activated receptor 4 leads to joint pain and inflammation in mice. **Arthritis Rheum**, v. 60, n. 3, p. 728-37. Mar 2009.

MACFARLANE, S. R. et al. Proteinase-activated receptors. **Pharmacol Rev**, v. 53, n. 2, p. 245-82, Jun 2001.

McLAUGHLIN, J. N.; PATTERSON, M. M.; MALIK, A. B. Protease-activated receptor-3 (PAR-3) regulates PAR-1 signaling by receptor dimerization. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 104, n. 13, p. 5662-7, Mar 2007.

MIIKE, S.; McWILLIAM, A. S.; KITA, H. Trypsin induces activation and inflammatory mediator release from human eosinophils through protease-activated receptor-2. **J Immunol**, v. 1, n. 167, p. 6615-22, Dec 2001.

MULÈ, F.; PIZZUTI, R.; CAPPARELLI, A.; VERGNOLLE, N. Evidence for the presence of functional protease activated receptor-4 (PAR-4) in the rat colon. **Gut**, v. 53, n. 2, p. 229-34, Feb 2004.

MURAI, N. et al. Concurrent evolution and resolution in an acute inflammatory model of rat carrageenin-induced pleurisy. **J Leukoc Biol**, v. 73, n. 4, p. 456-63, Apr 2003.

OBREJA, O.; RUKWIED, R.; STEINHOFF, M.; SCHMELZ, M. Neurogenic components of trypsin and thrombin-induced inflammation in rat skin, in vivo. **Exp. Dermatol**, v. 15, n. 1, p. 58-65, Jan 2006.

OSSOVSKAYA, V. S.; BUNETT, N. W. Protease-activated receptors: contribution to physiology and disease. **Physiol**, v. 84, n. 2, p. 579-621. Apr 2004.

PASZCUK, A. F. et al. Mechanisms underlying the nociceptive and inflammatory responses induced by trypsin in the mouse paw. **Eur J Pharmacol**, v. 26, n. 581, p. 204-15, Nov 2008.

RAMACHADRAN, R.; HOLLENBERG, M. D. Proteinases and signalling: pathophysiological and therapeutic implications via PARs and more. **Br J Pharmacol**, v. 153, p. 263-82, Dec 2008.

RAMOS, C. D. et al. Neutrophil migration induced by IL-8-activated mast cells is mediated by CINC-1. **Cytokine**, v. 7, n. 21, p. 214-23, Mar 2003.

RAYCHAUDHURI, A. et al. Inhibition of LTB₄ biosynthesis in situ by CGS 23885, a potent 5-lipoxygenase inhibitor, correlates with its pleural fluid concentrations in an experimentally induced rat pleurisy model. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**, v. 355, n. 4, p. 470-4, Apr 1997.

RAWLINGS, N. D.; MORTON, F. R.; BARRET, A. J. MEROPS: the peptidase database **Nucleic Acids Res**, v. 1, n. 34, p. 270-2, Jan 2006.

REED, C. E., KITA, H. The role of protease activation of inflammation in allergic respiratory diseases. **J Allergy Clin Immunol**, v. 114, n. 5, p. 997-1008, Nov 2004.

RINDERKNECHT H. et al. Activation of pancreatic zymogens. Normal activation, premature intrapancreatic activation, protective mechanisms against inappropriate activation. **Dig Dis Sci**, v. 31, n. 3, p. 314-21, Mar 1986.

SAMBRANO, G. R. et al. Role of thrombin signalling in platelets in haemostasis and thrombosis. **Nature**, v. 413, n. 6851, p. 74-8, Sep 2001.

SATO, E. et al. Bradykinin stimulates alveolar macrophages to release neutrophil, monocyte, and eosinophil chemotactic activity. **J Immunol**, v. 157, n. 7, p. 3122-9, Oct 1996.

SCARBOROUGH, R. M. et al. Tethered ligand agonist peptides. Structural requirements for thrombin receptor activation reveal mechanism of proteolytic unmasking of agonist function. **J Biol Chem**, v. 267, n. 19, p. 13146-9, Jul 1992.

SCHMIDLIN, F.; BUNNETT, N. W. Protease-activated receptors: how proteases signal to cells. **Curr Opin Pharmacol**, v. 1, n. 6, p. 575-82, Dec 2001.

SJOUKJE, H. et al. Protease-activated receptor-4 inhibition protects from multiorgan failure in a murine model of systemic inflammation. **Blood**, v. 110, n. 9, p. 3176-82, Jul 2007.

SLOFSTRA, S. H. et al. Protease-activated receptor-4 inhibition protects from multiorgan failure in a murine model of systemic inflammation. **Blood**, v. 110, n. 9, p. 3176-82, Jul 2007.

SMITH, M.; KOCHER, H, M.; HUNT, B. J. Aprotinin in Severe Acute Pancreatitis. **Int. J. Clin. Pract**, v. 64, n. 1, p. 84-92, Jan 2009.

STEINHOFF, M. et al. Protease-activated receptors: Transducers of Proteinase-Mediated Signaling in Inflammation and Immune Response. **Endocr. Rev**, v. 26, n. 1, p. 43, May 2005.

VERGNOLLE, N. et al. Characterization of the inflammatory response to proteinase-activated receptor-2 (PAR-2) activating peptides in the rat paw. **Br J Pharmacol**, v. 27, n. 5, p. 1083-90, Jul 1999.

VERGNOLLE, N. Proteinase-activated receptor-2-activating peptides induce leukocyte Rolling, adhesion and extravasation in vivo. **J. Immunol**, v. 163, n. 9, p. 5064-69, Nov 1999.

VERGNOLLE, N. et al. Characterization of thrombin-induced leukocyte rolling and adherence: a potential proinflammatory role for proteinase-activated receptor-4. **J Immunol**, v. 169, n. 3, p.1467-73, Aug 2002.

VLIAGOFTIS, H.; BEFUS, A. D.; HOLLENBERG, M. D.; MOGBEL, R. Airway epithelial cells release eosinophil survival-promoting factors (GM-CSF) after stimulation of proteinase-activated receptor 2. **J Allergy Clin Immunol**, v. 107, n. 4, p. 679-85, Apr 2001.

VU, T. K.; HUNG, D. T. ; WHEATON, V.; I, COUGHLIN S. R. Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation. **Cell**, v. 64, n. 6, p. 1057-68, Mar 1991.

THOMAS, C. A. et al. Cellular serine proteinase induces chemotaxis by complement activation. **Nature**, v. 269, n. 5628, p. 521-2, Oct 1977.

TOOTHIL, V. et al. Characterization of the enhanced adhesion of neutrophil leukocytes to trombin-stimulated endothelial cells. **J. Immunol**, v. 145, n. 1, 283-91, Jul 1990.

TOWNSEND, M. J.; MCKENZIE, A. N. Unravelling the net? Cytokines and diseases. **J Cell Sci**, v. 113, p. 3549-50, Oct 2000.

XU, W. F. et al. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A**, v. 9, n. 95, p. 6642-6, Jun 1998.

WALSH, P. N.; AHMAD, S. S. Proteases in blood clotting. **Essays Biochem**, v. 38, p. 95-111, 2002.

WESTABY S. Aprotinin: twenty-five years of claim and counterclaim. **J Thorac Cardiovasc Surg**, v. 135, n. 3, p. 487-91, Mar 2008.

ZIMMERMAN, B. et al. Thrombin receptor peptide –mediated leukocyte rolling in rat mesenteric venules: roles of P-selectin and sialyl Lewis X. **Am J Physiol**, v. 267, n. 3 p. 1049-53, Sep 1994.

ANEXOS

Anexo A - Certificado de aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da UFMG (CETEA)

Anexo B – Artigo aceito para publicação

Pharmacology (2012). S. Karger AG, Basel

Proteinase activated receptor-4 plays a major role in the recruitment of neutrophils induced by trypsin or carrageenan in pleurisy in mice

L F Gomides, I D Duarte, R G Ferreira, A C Perez, J N Francischi, A Klein

A Klein (Author to correspondence)

Departamento de Farmacologia, Instituto de Ciências Biológicas,

Universidade Federal de Minas Gerais,

Av. Antônio Carlos, 6627 Pampulha, 31270-901

Belo Horizonte MG Brazil

E-mail:klein@ufmg.br

fax+ 55 021 31 34092695

This work was supported by Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPq) and Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).

Abstract

Background/Aims. The activation of proteinase-activated receptors (PARs) has been implicated in the development of important hallmarks of inflammation, like *in vivo* leukocyte recruitment. Here, we examined the effects of aprotinin, a potent trypsin proteinase and kallikrein-kinin system inhibitor, and the PAR-4 antagonist YPGKF-NH₂ (tcY-NH₂) on neutrophil recruitment in response to carrageenan and trypsin in the pleural cavity of mice.

Methods. BALB/c mice were intrapleurally injected with trypsin or PAR-4 activating peptide AY-NH₂, pretreated with aprotinin or tcY-NH₂ (1 µg/cavity) prior to an intrapleural injection of trypsin or carrageenan, or pretreated with leukotriene(LT)B₄ antagonist U75302 (3 µg/cavity) prior to a trypsin injection. The number of infiltrating neutrophils was evaluated at 4 h.

Results. PAR-4 activating peptide AY-NH₂ and Trypsin induced a neutrophil recruitment that was inhibited by aprotinin, tcY-NH₂ or U75302. Aprotinin and tcY-NH₂ also inhibited the neutrophil recruitment induced by carrageenan.

Conclusion. These data suggest a key role for PAR-4 in mediating neutrophil recruitment in a pleurisy model in mice, specifically due to the activity of trypsin or trypsin-like enzymes.

Introduction

Neutrophil accumulation at the site of an injury plays an important role in the progression of tissue damage through release of proteases contained in their azurophil granules, like neutrophil elastase, cathepsin G and proteinase-3 [1,2], lysosomal enzymes and reactive oxygen species, which then promote lesions in surrounding tissues and contribute to the severity of the inflammatory disease [3,4].

Neutrophils are circulating cells that are recruited from blood vessels into tissue in response to chemoattractants released at the local site of injury, including the CXC chemokines CXCL8/interleukin (IL-)8, keratinocyte-derived chemokine (KC/CXCL1, a mice homologue for the human IL-8), and lipid mediators like leukotriene(LT)B₄, acting directly on their surface [5,6].

Serine proteases have been implicated in the development of inflammatory response because of their ability to selectively activate G-protein-coupled proteinase-activated receptors (PARs) through the proteolytic cleavage of a specific site on the N-terminal amino acid sequence of the receptor, revealing a tethered ligand that then binds to and activates the receptor [7]. The activation of PARs has been implicated in the regulation of important hallmarks of inflammation, such as vascular endothelial cell activity [8], *in vivo* leukocyte recruitment [9] and cytokine release [10,11].

The PARs are a family of four receptors named PAR 1 to 4, according to the chronological order of their discovery [7], and are activated by different serine proteinases. These receptors, with the exception of PAR-3, can be pharmacologically modulated with the use of short synthetic peptides derived from the tethered ligand by cleaving the N-terminal amino acid sequence at the appropriate site for activation or at a non-receptor activating site that fails to induce receptor activation [12, 13, 14].

It has been shown that PAR-4 is expressed on the surface of different cells, including activated neutrophils and endothelial cells [9,14], and can be activated by thrombin, trypsin, extrapancreatic trypsin IV, tissue kallikrein and the neutrophilic granule protease cathepsin G [13,15,16,17], triggering multiple signaling pathways following PAR-4 agonist exposure [18].

PAR-4 activation has been implicated in the modulation of different aspects of inflammation, like joint inflammation, pain [19] and, of particular interest, events associated with leukocyte recruitment. PAR-4 activation, through the use of a selective PAR-4-activating peptide, induces a time-dependent increase in leukocyte rolling and adhesion and neutrophil migration into the peritoneal cavity of rats [9]. PAR-4 blockade can be useful for ameliorating edema and granulocyte recruitment [20] and inhibiting neutrophil recruitment into different tissues in a LPS-induced systemic inflammation model [21]. In addition, we have demonstrated that PAR-4 activation is also required to mediate the eotaxin-1-induced eosinophil recruitment [22].

Although there is evidence of a role for PAR-4 activation in the modulation of leukocyte recruitment and the relevance of its blockade in the inflammatory reaction has been demonstrated, the mechanisms underlying these activities are still unknown and remain to be elucidated. In this study, we examined the ability of trypsin to induce neutrophil recruitment in the pleural cavity of mice through a mechanism dependent on the activation of PAR-4. We also evaluated the effects of aprotinin, a potent trypsin proteinase and kallikrein-kinin system inhibitor [23], and a PAR-4 antagonist on neutrophil migration in the same inflammatory model.

Material and Methods

Animals

Female BALB/c mice (18-25 g) were used throughout these experiments. Animals were housed in a temperature-controlled room with free access to food and water. The experimental procedures have been previously approved by the local Animal Ethics Committee.

Drugs and reagents

PAR-4 antagonist trans-cinnamoyl-YPGKF-NH₂ (tcY-NH₂) and PAR-4 activating peptide AY-NH₂ were purchased from Tocris Bioscience (Bristol, UK), and dissolved in PBS. Leukotriene B₄ (LTB₄) and the specific and long-acting LTB₄ antagonist U-75302 (6-(6-(3R-hydroxy-1E,5Z-undecadien-1-yl)-2-pyridinyl)-1,5S-hexanediol) [24,25] were purchased from Cayman chemical (Ann Arbor, MI, USA). Carrageenan, trypsin and aprotinin were obtained from Sigma. Trypsin, aprotinin, LTB₄ and U-75302 were dissolved in PBS (pH 7.2) to obtain 1mg/ml of a final stock solution and stored at -20°C until use. Control mice received drug vehicle.

Leukocyte migration into the pleural cavity induced by PAR-4 activating peptide, carrageenan, trypsin, or LTB₄

PAR-4 activating peptide AY-NH₂ (0.1 – 10 µg/0.1ml), carrageenan (30 µg/0.1 ml), trypsin (0.1 – 10 µg/0.1 ml), LTB₄ (500 ng /0.1 ml) or vehicle (PBS/0.1 ml) were injected intrapleurally (i.pl) in mice, which were then sacrificed in a CO₂ chamber 4 h after the injection. The cells present in the cavity were harvested by injecting 2ml of PBS and total cell counts performed in a modified Neubauer chamber using Turk's stain. Differential cell counts were performed on cytopsin preparations stained with

May Grunwald using standard morphologic criteria to identify cell types as previously described [26]. The results were presented as the number of cells per cavity. The dose of LTB₄ utilized has been previously described as effective in inducing *in vivo* leukocyte recruitment in the same pleurisy model [27].

Effects of aprotinin treatment on the neutrophil recruitment induced by carrageenan or trypsin

In order to evaluate the role of endogenous serine proteinases on neutrophil recruitment induced by carrageenan or trypsin, mice were pretreated i.pl. with aprotinin (10 – 100 ng/0.1 ml) or with vehicle (PBS) 15 min prior to the i.pl. injection of carrageenan (30 µg/0.1 ml) or trypsin (10 µg/0.1 ml), and the number of infiltrating neutrophils was assessed after 4 hours.

Effects of PAR-4 antagonist pretreatment on neutrophil recruitment induced by PAR-4 activating peptide AY-NH₂, carrageenan or trypsin.

To investigate the contribution of PAR-4 in the regulating of the neutrophil recruitment induced by PAR-4 activating peptide AY-NH₂, carrageenan or trypsin in the pleural cavity of mice, the PAR-4 antagonist tcY-NH₂ (0.1 – 1.0 µg /0.1 ml) was administered i.pl. 15 min prior to the i.pl. injection of AY-NH₂ (10 µg/0.1 ml), carrageenan (30 µg/0.1 ml) or trypsin (10 µg/0.1 ml), and the number of infiltrating neutrophils was assessed after 4 hours.

Contribution of LTB₄ receptors on neutrophil migration induced by trypsin

To evaluate the role of endogenous LTB₄ on trypsin-induced neutrophil migration, we injected the LTB₄ antagonist U75302 i.pl. at a dose of 3 µg/0.1 ml 15 min prior to the trypsin i.pl injection (10 µg/0.1 ml). The number of infiltrating

neutrophils was assessed 4 h later. An experiment was previously performed in order to confirm the efficacy of U-75302 effective in inhibiting neutrophil recruitment in response to an i.pl. LTB₄ injection. Thus, U-75302 was injected (3.0 µg/0.1 ml) into the pleural cavity of mice 15 min prior to the i.pl. injection of LTB₄ (500 ng/0.1 ml), and the number of infiltrating neutrophils was assessed 4 h later as previously described.

Statistical analysis

All the results are presented as mean ± standard error mean (SEM). They were analysed using the software SigmaStat[®] 3.5 (San Diego, CA, USA). Comparisons between groups were performed using the one-way ANOVA test, and differences between groups were assessed using the Tukey post-test. $P < 0.05$ was considered significant.

Results

Effects of aprotinin pretreatment on neutrophil recruitment induced by carrageenan in the pleural cavity

Initial experiments were carried out to investigate the effects of i.pl. aprotinin pretreatment on neutrophil recruitment induced by i.pl. injection of carrageenan in mice. The pretreatment with local injection of aprotinin (10 - 100 ng/0.1 ml/cavity) significantly inhibited the neutrophil recruitment induced by i.pl. carrageenan injection (Figure 1, PBS + PBS: 1.9 ± 0.3 ; PBS + Cg: 11.2 ± 1.1 ; Cg + aprotinin 10 ng: 7.7 ± 1.0 ; Cg + aprotinin 30 ng: 8.3 ± 0.9 ; Cg + aprotinin 100 ng: $5.2 \pm 0.8 \times 10^4$ neutrophils/cavity).

Evaluation of the ability of trypsin to induce neutrophil migration into the pleural cavity of mice.

Because aprotinin was able to inhibit neutrophil recruitment into the pleural cavity in response to carrageenan and because this drug is a trypsin inhibitor, we hypothesized that trypsin may be involved in this phenomenon by exhibiting a neutrophil chemotactic activity for neutrophils. As shown in Figure 2, the intrapleural injection of trypsin induced a dose-dependent neutrophil migration (PBS: 0.02 ± 0.004 ; Trypsin 0.1 $\mu\text{g}/0.1 \text{ ml}/\text{cavity}$: 0.06 ± 0.02 ; Trypsin 1.0 $\mu\text{g}/0.1 \text{ ml}/\text{cavity}$: 0.3 ± 0.05 ; Trypsin 10 $\mu\text{g}/0.1 \text{ ml}/\text{cavity}$: $1.2 \pm 0.4 \times 10^4$ neutrophils/cavity). However, the trypsin injection did not increase the number of mononuclear cells in the pleural cavity at the two lower doses utilized. Rather, this population of cells was reduced at the higher dose utilized (see Table 1).

In addition to the ability of trypsin to induce neutrophil migration into the pleural cavity of mice, and in concordance with the effects of aprotinin on neutrophil migration induced by carrageenan, aprotinin treatment was able to partially inhibit neutrophil recruitment in response to trypsin (Figure 3, PBS + PBS: 0.4 ± 0.1 ; PBS + Trypsin: 3.9 ± 0.4 ; Trypsin + aprotinin 1.0 μg : $1.8 \pm 0.3 \times 10^4$ neutrophils/cavity).

Blockade of PAR-4 inhibits neutrophil recruitment induced by carrageenan or trypsin

Because aprotinin inhibited neutrophil recruitment induced by carrageenan and trypsin in our experiments, and because aprotinin inhibits serine proteinases that work through PAR-4 activation, experiments were designed to investigate the potential contribution of PAR-4 activation on the regulation of carrageenan- or trypsin-induced neutrophil influx. Pretreatment of mice with the PAR-4 antagonist tcY-NH₂ inhibited neutrophil recruitment induced by both carrageenan (Figure 4, PBS: 1.7

± 0.2 ; carrageenan: 7.0 ± 0.5 ; carrageenan + tcY-NH₂ 0.1 $\mu\text{g}/0.1$ ml/cavity: 3.5 ± 0.3 ; carrageenan + tcY-NH₂ 0.3 $\mu\text{g}/0.1$ ml/cavity: 5.0 ± 0.3 ; carrageenan + tcY-NH₂ 1.0 $\mu\text{g}/0.1$ ml/cavity: $2.8 \pm 0.3 \times 10^4$ neutrophils/cavity) and trypsin (Figure 5, PBS: 2.2 ± 0.3 ; trypsin 10 $\mu\text{g}/0.1$ ml/cavity: 10.6 ± 1.0 ; trypsin + tcY-NH₂ 1.0 $\mu\text{g}/0.1$ ml/cavity: $4.1 \pm 0.5 \times 10^4$ neutrophils/cavity).

Blockade of LTB₄ receptors inhibits neutrophil recruitment induced by trypsin

Because LTB₄ is a powerful chemotactic agent present in the inflammatory model induced by carrageenan and other inflammatory stimuli [28], and because the PAR-4 antagonist tcY-NH₂ was able to inhibit neutrophil migration in response to trypsin and carrageenan, the next series of experiments was performed to investigate the contribution of endogenous LTB₄ to neutrophil recruitment in response to a trypsin injection. Blockade of leukotriene B₄ receptors partially inhibited the trypsin-induced neutrophil migration (Figure 6A, PBS: 0.9 ± 0.2 ; trypsin 10 $\mu\text{g}/0.1$ ml/cavity: 2.3 ± 0.4 ; U75302 3 $\mu\text{g}/0.1$ ml/cavity + trypsin 10 $\mu\text{g}/0.1$ ml/cavity: $1.1 \pm 0.1 \times 10^4$ neutrophils/cavity). The dose of the LTB₄ antagonist U75302 utilized was effective in abolishing the neutrophil recruitment induced by LTB₄ as demonstrated by the experiment performed with this antagonist in LTB₄-treated mice (Figure 6B, PBS: 1.2 ± 0.1 ; LTB₄ 500 ng/0.1 ml/cavity: 10.2 ± 2.7 ; LTB₄ 500 ng/0.1 ml/cavity + U75302 3.0 $\mu\text{g}/0.1$ ml/cavity: $3.6 \pm 0.7 \times 10^4$ neutrophils/cavity).

Blockade of PAR-4 inhibits neutrophil recruitment induced by PAR-4 activating peptide AY-NH₂

The intrapleural injection of PAR-4 activating peptide AY-NH₂ induced a dose-dependent neutrophil migration (Figure 7A, PBS: 0.5 ± 0.04 ; AY-NH₂ 0.1 $\mu\text{g}/0.1$ ml/cavity: 0.9 ± 0.1 ; AY-NH₂ 1.0 $\mu\text{g}/0.1$ ml /cavity: 1.3 ± 0.2 ; AY-NH₂ 10 $\mu\text{g}/0.1$

ml/cavity: $2.0 \pm 0.3 \times 10^4$ neutrophils/cavity). Pretreatment of mice with the PAR-4 antagonist tcY-NH₂ inhibited neutrophil recruitment induced by AY-NH₂ (Figure 7B, PBS 0.1 ml/cavity: 2.0 ± 0.1 ; AY-NH₂ 1.0 µg/0.1 ml/cavity: 3.7 ± 0.2 ; AY-NH₂ 1.0 µg/0.1 ml/cavity + tcY-NH₂ 1.0 µg/0.1 ml/cavity: 2.0 ± 0.2 ; $\times 10^4$ neutrophils/cavity). These results confirm that the dose of the PAR-4 antagonist utilized in our experiments has been effective in selectively inhibit PAR-4-induced neutrophil migration.

Discussion

The role of neutrophils in the pathophysiology of inflammatory diseases is well established with evidence supporting a direct correlation of their presence at the inflammatory site and the progression of inflammatory diseases [3,4]. Therefore, drugs that inhibit neutrophil recruitment and/or activation may become important new therapeutic strategies for the treatment of inflammatory diseases. A detailed understanding of the pathways and the chemoattractant molecules needed for neutrophil migration from the blood vessels to the inflamed tissues and for their activation will be important in the development of such strategies.

There are several experimental studies supporting a role for PARs in the development of inflammation [13, 17, 19, 22, 29]. In the last few years, PAR-1 and PAR-2 have been studied with a focus on understanding their role in mechanisms of leukocyte recruitment or activation [30–32]. Of particular interest, PAR-4 is a thrombin receptor that is activated by trypsin [15], tissue kallikreins [16] and the neutrophilic granule protease cathepsin G [17] found on the surface of many cells implicated in inflammation, including lung epithelium, smooth muscle cells, platelets, endothelial cells and neutrophils [9,15]. PAR-4 has also been implicated in the modulation of the different aspects of inflammation, including leukocyte recruitment,

mediation of the rolling and adherence of neutrophils to blood vessels at the microcirculatory level [9], eosinophil recruitment [22], rat paw edema and pain [19, 33].

In the present study, we investigated the ability of trypsin to induce neutrophil recruitment in the pleural cavity of mice and the effects of the PAR-4 antagonist YPGKF-NH₂ (tcYNH₂) in carrageenan- or trypsin-induced neutrophil recruitment in the pleural cavity of mice. Our initial experiments were designed to investigate the contribution of the endogenous serine proteases in mediating neutrophil recruitment in the carrageenan-induced pleurisy and to investigate the ability of aprotinin to inhibit the neutrophil recruitment following an i.pl. carrageenan challenge. Carrageenan is a well-known inflammatory stimulus utilized in the studies of the *in vivo* neutrophil migration that elicits the production of inflammatory mediators, including cytokines and lipid mediators, which in turn contribute to the development and progression of the inflammatory response [34].

The present data demonstrates that an i.pl. injection of aprotinin prior to the i.pl. injection of carrageenan partially suppressed the neutrophil migration evoked by carrageenan. Because aprotinin is a serine protease inhibitor with great stoichiometric inhibitory affinity for trypsin and a weak kallikrein inhibitor [23], these results suggest that the influx of neutrophils into the pleural cavity in carrageenan-injected mice may be at least partially dependent on the action of the local release of proteases that are inhibited by aprotinin, such as trypsin or trypsin-like enzymes. In our experiments, the i.pl. injection of trypsin induced neutrophil recruitment in a dose-dependent manner that was inhibited by aprotinin pretreatment. This finding supports a role for trypsin in mediating neutrophil recruitment in this inflammation model.

The present experiments suggest that either carrageenan or trypsin's effects on neutrophil recruitment may be at least partially due to the local release of trypsin-like enzymes, which may in turn act on the PAR-4 present on surface of neutrophils and endothelial cells. Thus, experiments were conducted to investigate the role of PAR-4 activation in mediating these effects. Trypsin and PAR-4 activating peptide induced neutrophil recruitment into the pleural cavity of mice, while the blockade of PAR-4 inhibited the neutrophil recruitment in the pleural cavity of mice following an intrapleural injection of carrageenan or trypsin. Taken together, our results suggest that PAR-4 activation by trypsin or trypsin-like enzymes is required for the carrageenan-induced neutrophil migration.

In addition to its expression in inflammatory cells, PAR-4 is widely expressed in the gastrointestinal tract, including the pancreas, stomach, small intestine and duodenum [11,15]; therefore, PAR-4 may be activated by the pancreatic enzyme trypsin. This activation in the pancreas, or at other sites in the gastrointestinal tract, could have an important role in the physiopathology of pancreatitis. However, because trypsin production is restricted to the GI tract and is not usually found in the circulatory system, it is unlikely that pancreatic trypsin has a relevant physiological role in tissues outside of the GI tract. Extrapancreatic trypsin-like enzymes, such as trypsinogen and trypsin IV, are also able to cleave and activate PAR-4 [15]. Therefore, it is reasonable to suggest that they may have a pathophysiological role in the development of an inflammatory response outside of the GI tract. Based on our results, we suggest that enzymes with trypsin-like activity that are released in close proximity to cells expressing PAR-4 may stimulate this receptor during inflammation and mediate neutrophil migration.

Carrageenan has been shown to stimulate tissue cells and leukocytes to release lipid-derived inflammatory mediators, including the neutrophil chemoattractant LTB₄ [28]. Murine neutrophils express the LTB₄ receptors on their surface [35], and a direct effect of LTB₄ in mediating the recruitment of neutrophils via surface LTB₄ receptors has been previously demonstrated [36]. Experiments were carried out to investigate whether the effects of trypsin on neutrophil recruitment were due to its action through an indirect mechanism via the activation of LTB₄ receptors. Interestingly, blocking the LTB₄ receptors inhibited the neutrophil recruitment induced by trypsin, suggesting that the neutrophil recruitment mediated by trypsin is dependent on the LTB₄ action on neutrophil receptors. Further studies are required to examine the underlying mechanisms involved in this phenomenon.

Other studies have shown the ability of PAR-4 to modulate the leukocyte activation in response to a range of different stimuli. For example, PAR-4 activation through the use of a selective PAR-4-activating peptide induces neutrophil migration into the peritoneal cavity of rats [9], whereas a PAR-4 blockade can be useful for ameliorating edema and granulocyte recruitment [20] and for inhibiting neutrophil recruitment into different tissues in an LPS-induced systemic inflammation model [21]. In the present study, we propose a mechanism for the PAR-4-mediated neutrophil recruitment in response to trypsin or carrageenan.

Our results partially agree with a previous study from Houle et al. In that study, the authors suggest a mechanism involving a thrombin-induced PAR-4 activation at the neutrophil surface with a consequent activation of the cascade of kinins, leading to bradykinin production, edema and neutrophil migration. The aprotinin treatment inhibited the leukocyte recruitment induced by both trypsin and carrageenan. Moreover, aprotinin is a trypsin inhibitor that inhibits kallikrein (thus indirectly

impairing bradykinin production) but does not inhibit thrombin. Therefore, we propose an additional pathway that was not suggested by Houle et al. This pathway has a key role for trypsin or trypsin-like enzymes in mediating the neutrophil migration through the activation of PAR-4. A role for thrombin in this process cannot be ruled out. The finding that aprotinin and PAR-4 antagonist only partially inhibited the neutrophil recruitment in the carrageenan-injected mice may be consistent with the involvement of thrombin.

In conclusion, this work demonstrates a key role for PAR-4 in mediating the neutrophil recruitment in a pleurisy model in mice and suggests that the activity of trypsin or trypsin-like enzymes may act as mediators of this process. Given that the inhibition of PAR-4 activation may reduce the migration of neutrophils to sites of inflammation, a PAR-4-based therapy may be a potential strategy in the treatment of inflammatory diseases.

References

- [1] Faurschou M, Borregaard N: Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. *Microbes and Infection* 2003; 5(14):1317-1327.
- [2] Korkmaz B, Horwitz MS, Jenne DE, Gauthier F: Neutrophil Elastase, Proteinase 3, and Cathepsin G as Therapeutic Targets in Human Diseases. *Pharmacol Rev* 2010; 62(4):726-759.
- [3] Kobayashi SD, DeLeo FR: Role of neutrophils in innate immunity: a systems biology-level approach. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med* 2009; 1(3):309-333.
- [4] Weiss SJ: Tissue destruction by neutrophils. *N Engl J Med* 1989; 320(6):365-376.
- [5] Kobayashi Y: The role of chemokines in neutrophil biology. *Front Biosci* 2008; 13:2400-2407.
- [6] Samuelsson B: Leukotrienes: mediators of immediate hypersensitivity reactions and inflammation. *Science* 1983; 220(4597):568-575.
- [7] Hollenberg MD, Compton SJ: International Union of Pharmacology XXVIII. Proteinase-activated receptors. *Pharmacol Rev* 2002; 54(2):203-217.
- [8] Coughlin SR: Protease-activated receptors in hemostasis, thrombosis and vascular biology. *J Thromb Haemost* 2005; 3(8):1800-1814.
- [9] Vergnolle N, Derian CK, D'Andrea MR, Steinhoff M, Andrade-Gordon P: Characterization of thrombin-induced leukocyte rolling and adherence: a potential proinflammatory role for proteinase-activated receptor-4. *J Immunol* 2002; 169(3):1467-1473.
- [10] Asokanathan N, Graham PT, Fink J, Knight DA, Bakker AJ, McWilliam AS, Thompson PJ & Stewart GA: Activation of protease-activated receptor (PAR)-1, PAR-2, and PAR-4 stimulates IL-6, IL-8, and prostaglandin E₂ release from human respiratory epithelial cells. *J Immunol* 2002; 168(7):3577-3585.

- [11] Steinhoff M, Buddenkotte J, Shpacovitch V, Rattenholl A, Moormann C, Vergnolle N, Luger TA, Hollenberg MD: Proteinase-activated receptors: transducers of proteinase-mediated signaling in inflammation and immune response. *Endocr Rev* 2005; 26(1):1-43.
- [12] Martin L, Augé C, Boué J, Buresi MC, Chapman K, Asfaha S, Andrade-Gordon P, Steinhoff M, Cenac N, Dietrich G, Vergnolle N: Thrombin receptor: An endogenous inhibitor of inflammatory pain, activating opioid pathways. *Pain* 2009; 146(1-2):121-129.
- [13] Vergnolle N: Protease-activated receptors as drug targets in inflammation and pain. *Pharmacol Ther* 2009; 123(3):292-309.
- [14] Ramachandran R, Hollenberg MD: Proteinases and signalling: pathophysiological and therapeutic implications via PARs and more. *Br J Pharmacol* 2008; 153(Suppl 1):S263-S282.
- [15] Cottrell GS, Amadesi S, Grady EF, Bunnett NW: Trypsin IV, a novel agonist of protease-activated receptors 2 and 4. *J Biol Chem* 2004; 279(14):13532-13539.
- [16] Oikonomopoulou K, Hansen KK, Saifeddine M, Tea I, Blaber M, Blaber SI, Scarisbrick I, Andrade-Gordon P, Cottrell GS, Bunnett NW, Diamandis EP, Hollenberg MD: Proteinase-activated receptors (PARs), targets for kallikrein signalling. *J Biol Chem* 2006; 281(43):32095-32112.
- [17] Sambrano GR, Huang W, Faruqi T, Mahrus S, Craik C, Coughlin SR : Cathepsin G activates protease-activated receptor-4 in human platelets. *J Biol Chem* 2000; 275(10):6819- 6823.
- [18] Kataoka H, Hamilton JR, McKemy DD, Camerer E, Zheng YW, Cheng A, Griffin C, Coughlin SR: Protease-activated receptors 1 and 4 mediate thrombin signaling in endothelial cells. *Blood* 2003; 102(9):3224-3231.

- [19] McDougall JJ, Zhang C, Cellars L, Joubert E, Dixon CM, Vergnolle N: Triggering of proteinase-activated receptor 4 leads to joint pain and inflammation in mice. *Arthritis Rheum* 2009; 60(3):728-737.
- [20] Houle S, Papez MD, Ferazzini M, Hollenberg MD, Vergnolle N: Neutrophils and the kallikrein–kinin system in proteinase-activated receptor 4-mediated inflammation in rodents. *Br J Pharmacol* 2005; 146(5):670-678.
- [21] Slofstra SH, Bijlsma MF, Groot AP, Reitsma PH, Lindhout T, ten Cate H, Spek CA: Protease-activated receptor-4 inhibition protects from multiorgan failure in a murine model of systemic inflammation. *Blood* 2007; 110(9):3176-3182.
- [22] Braga AD, Miranda JP, Ferreira GM, Bilheiro RP, Duarte ID, Francischi JN, Klein A: Blockade of Proteinase-Activated Receptor-4 Inhibits the Eosinophil Recruitment Induced by Eotaxin-1 in the Pleural Cavity of Mice. *Pharmacology* 2010; 86(4):224-230.
- [23] Smith M, Kocher HM, Hunt BJ: Aprotinin in severe acute pancreatitis. *Int J Clin Pract* 2010; 64(1):84-92.
- [24] Falcone RC, Aharony D: Modulation of ligand binding to leukotriene B4 receptors on guinea pig lung membranes by sulfhydryl modifying reagents. *J Pharmacol Exp Ther* 1990; 255(2):565-571.
- [25] Richards IM, Griffin RL, Oostveen JA, Morris J, Wishka DG, Dunn CJ: Effect of the selective leukotriene B4 antagonist U-75302 on antigen-induced bronchopulmonary eosinophilia in sensitized guinea pigs. *Am Rev Respir Dis* 1989; 140(6):1712-1716.
- [26] Das AM, Flower RJ, Hellewell PG, Teixeira MM, Perretti M: A novel murine model of allergic inflammation to study the effect of dexamethasone on eosinophil recruitment. *Br J Pharmacol* 1997; 121(1):97-104.

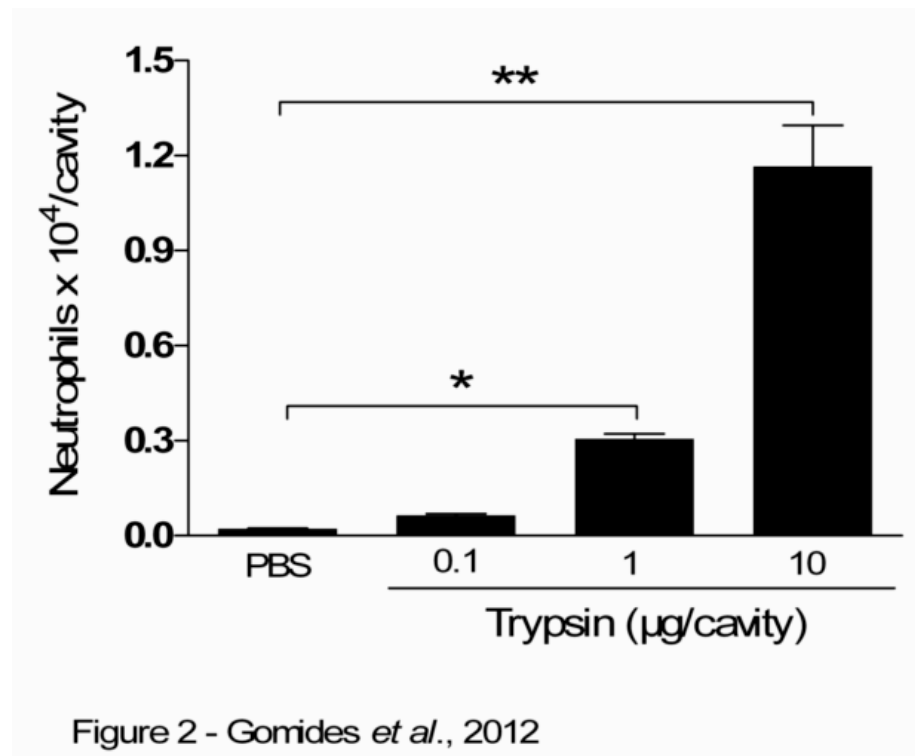
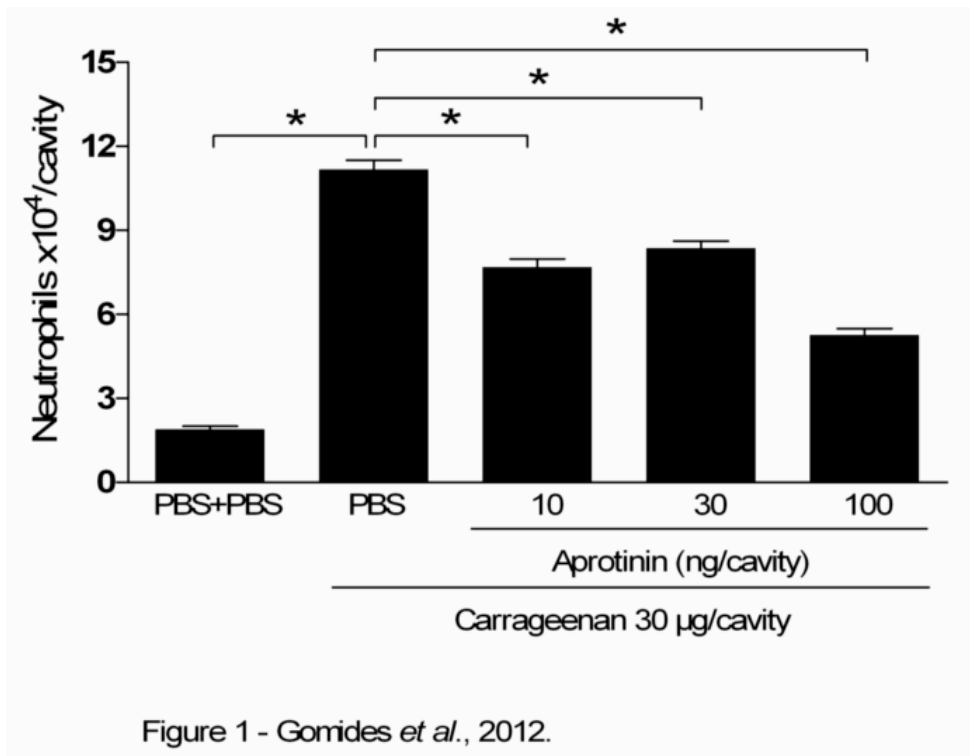
- [27] Klein A, Talvani A, Silva PM, Martins MA, Wells TN, Proudfoot A, Luckacs NW and Teixeira MM: Stem cell factor-induced leukotriene B₄ production cooperates with eotaxin to mediate the recruitment of eosinophils during allergic pleurisy in mice. *J Immunol* 2001; 167(1):524-531.
- [28] Mathieu J, Tissot M, Nolibe D, Florentin I, Kergonou JF, Giroud JP: Local and systemic effects of an acute inflammation on eicosanoid generation capacity of polymorphonuclear cells and macrophages. *Int J Exp Pathol* 1990; 71(5):603-616.
- [29] Chen D, Carpenter A, Abrahams J, Chambers RC, Lechler RI, McVey JH, Dorling AJ: Protease-activated receptor 1 activation is necessary for monocyte chemoattractant protein 1-dependent leukocyte recruitment in vivo. *J Exp Med* 2008; 205(8):1739-1746.
- [30] Su X, Camerer E, Hamilton JR, Coughlin SR, Matthay MA: Protease-activated receptor-2 activation induces acute lung inflammation by neuropeptide-dependent mechanisms. *J Immunol* 2005; 175(4):2598-2605.
- [31] Vergnolle N: Proteinase-activated receptor-2-activating peptides induce leukocyte rolling, adhesion, and extravasation in vivo. *J Immunol* 1999; 163(9): 5064-5069.
- [32] Bolton SJ, McNulty CA, Thomas RJ, Hewitt CR, Wardlaw AJ: Expression of and functional responses to proteinase-activated receptors on human eosinophils. *J Leukoc Biol* 2003; 74(1):60-68.
- [33] Paszcuk AF, Quintão NL, Fernandes ES, Juliano L, Chapman K, Andrade-Gordon P, Campos MM, Vergnolle N, Calixto JB: Mechanisms underlying the nociceptive and inflammatory responses induced by trypsin in the mouse paw. *Eur J Pharmacol* 2008; 581: 204–215.

[34] Saleh TS, Calixto JB, Medeiros YS: Effects of antiinflammatory drugs upon nitrate and myeloperoxidase levels in the mouse pleurisy induced by carrageenan. *Peptides* 1999; 20(8):949-956.

[35] Okuno T, Yokomizo T, Hori T, Miyano M, Shimizu T: Leukotriene B₄ receptor and the function of its helix 8. *J Biol Chem* 2005, 280(37):32049-32052.

[36] Yokomizo T, Izumi T, Chang K, Takuwa Y, Shimizu T: A G-protein-coupled receptor for leukotriene B₄ that mediates chemotaxis. *Nature* 1997; 387(6633): 620-624.

Figures



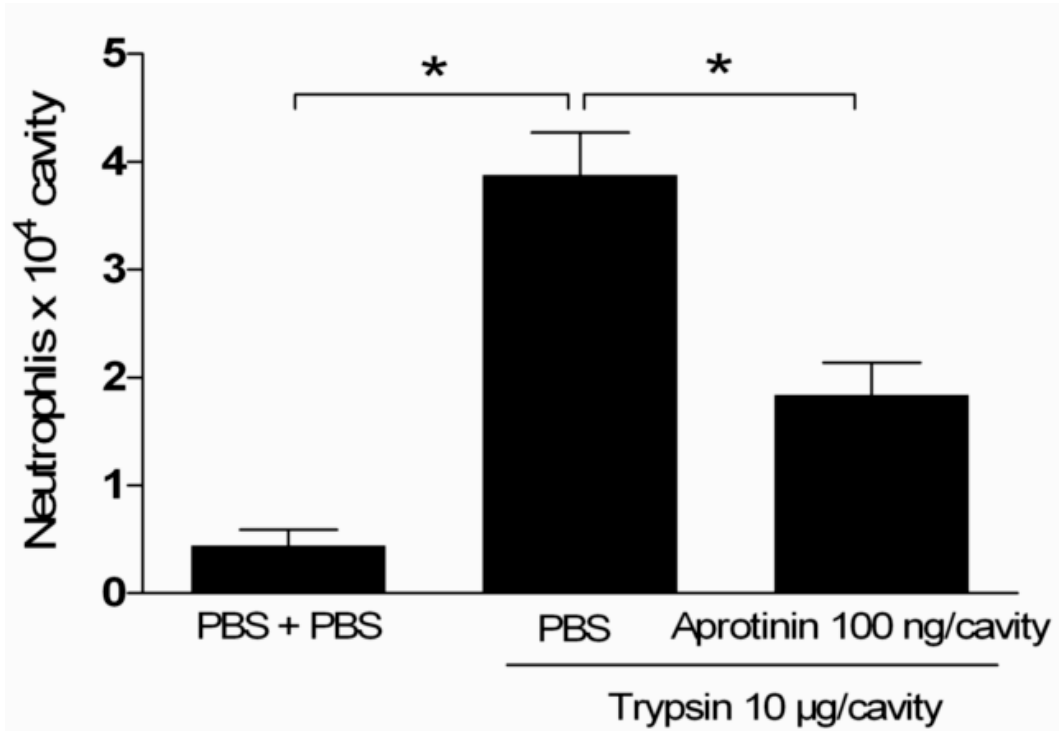


Figure 3 - Gomides *et al.*, 2012

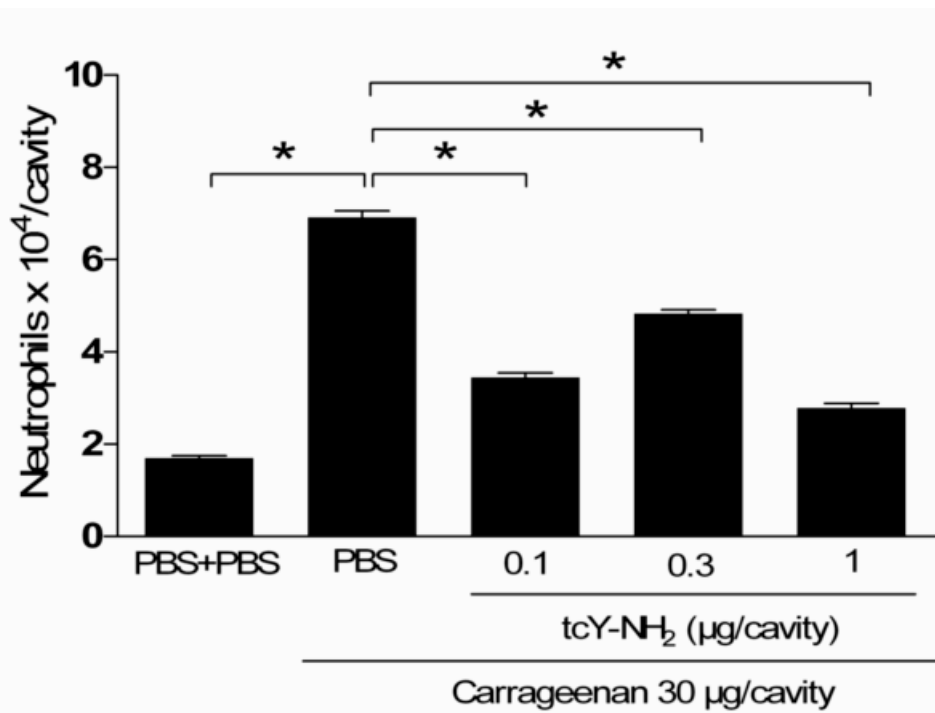
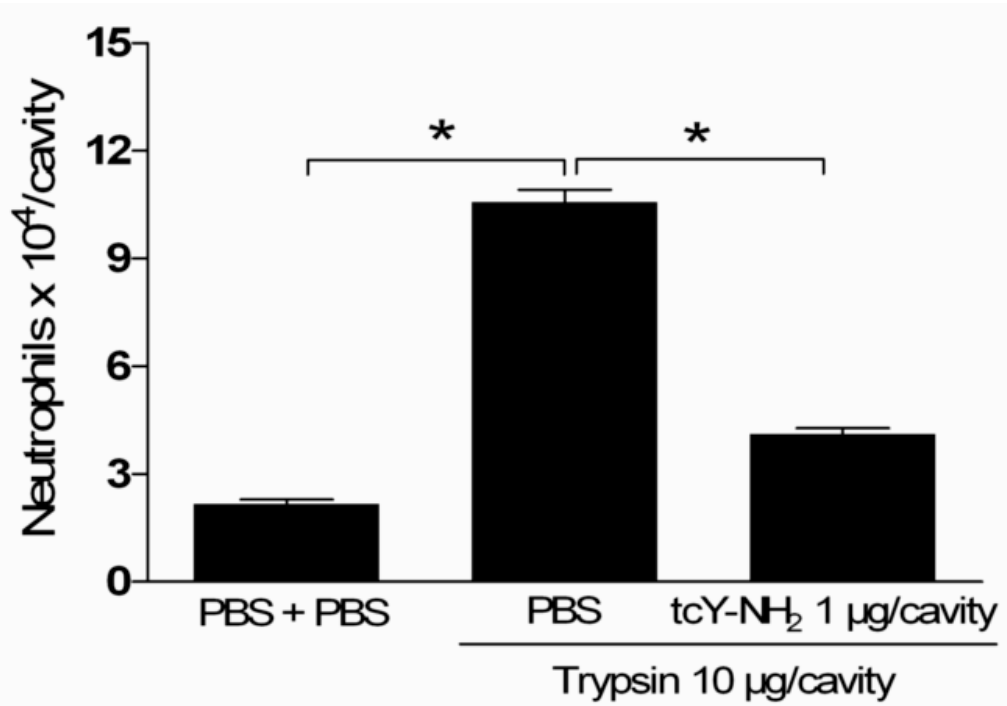
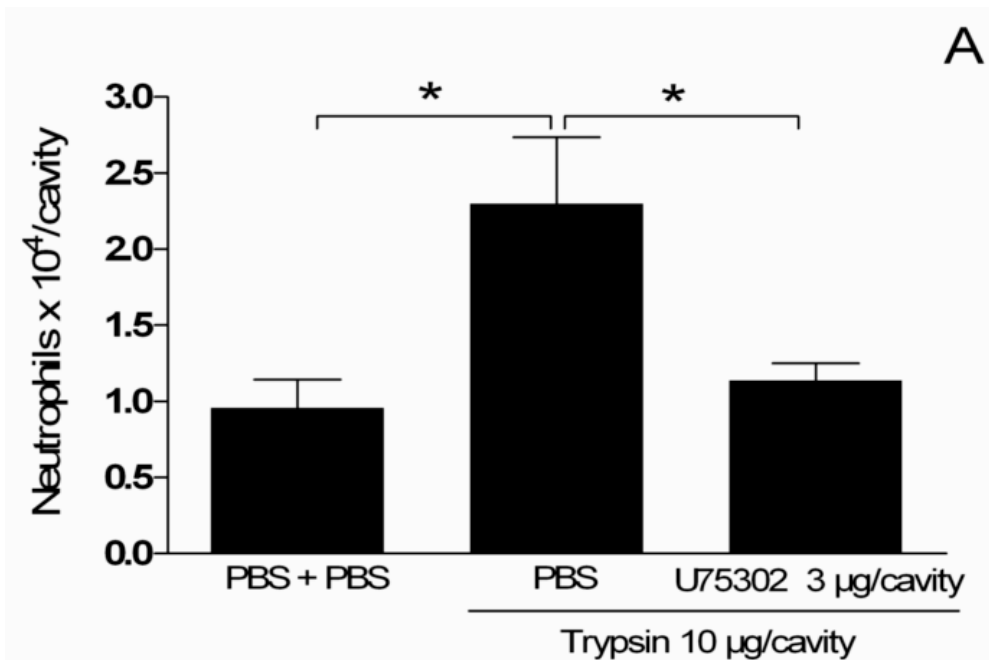


Figure 4 - Gomides *et al.*, 2012.

Figure 5 - Gomides *et al.*, 2012Figure 6A - Gomides *et al.*, 2012.

