

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

NATÁLIA ALVES DE MATOS

**Estudo do papel do receptor ativado por protease
(PAR)-2 no recrutamento de eosinófilos induzido por
triptase em modelo de pleurisia em camundongos**

Belo Horizonte

2013

NATÁLIA ALVES DE MATOS

**Estudo do papel do receptor ativado por protease
(PAR)-2 no recrutamento de eosinófilos induzido por
triptase em modelo de pleurisia em camundongos**

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.

Co-orientador: Prof. Dr. Igor Dimitri Gama Duarte

Belo Horizonte

2013

**"ESTUDO DO PAPEL DO RECEPTOR ATIVADO POR PROTEASE
(PAR)-2 NO RECRUTAMENTO DE EOSINÓFILOS INDUZIDO
POR TRIPTASE EM MODELO DE PLEURISIA EM
CAMUNDONGOS"**

NATALIA ALVES DE MATOS

Dissertação de Mestrado defendida e aprovada, no dia **12 de julho de 2013**, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores:



PROF. DR. LIRLÂNDIA PIRES DE SOUSA
FARMÁCIA/UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS



PROF. DR. MÁRCIO DE MATOS COELHO
FARMÁCIA/UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS



PROF. DR. ANDRÉ KLEIN
ICB/UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ORIENTADOR

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

Belo Horizonte, 12 de julho de 2013

Dedicatória

Aos meus pais, Miguel Arcanjo e Maria Ivanir, e aos meus irmãos Rogério e Plínio, por todo amor, apoio e incentivo em todos os dias da minha vida, eles que acompanharam todas as minhas realizações e sempre aplaudiram as minhas conquistas.

“Acredite que você pode, assim você já está no meio do caminho.”

(Theodore Roosevelt)

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis”.

(José de Alencar)

Agradecimentos

A Deus, pela saúde, força, coragem, determinação e discernimento concedido durante toda a minha trajetória. Agradeço a Nossa Senhora por sua poderosa interseção nos momentos de escuridão.

Ao meu orientador, André Klein, pela acessibilidade, conhecimentos transmitidos, orientação científica, esclarecimentos, sugestões, conselhos, simpatia, pela confiança e pelo estímulo que sempre me concedeu ao longo de todo o trabalho.

Ao meu co-orientador, Igor Dimitri Gama Duarte, pelo apoio, disponibilidade e simpatia.

Aos meus pais, Miguel Arcanjo e Maria Ivanir, exemplos de amor, companheirismo, trabalho, dedicação e honestidade. Por toda ajuda financeira e sentimental, por me ajudarem a alcançar meu sonho, sem vocês eu não teria chegado até aqui!

Aos meus irmãos, Plínio e Rogério, anjos da minha vida! Minhas sobrinhas Gabriela e Beatriz pelo amor puro e verdadeiro, motivo para a minha alegria. Minhas cunhadas Sabrina e Adriely pela amizade e carinho. Obrigada por estarem sempre ao meu lado!

A minha vovó Ana, pelo amor, carinho e constantes orações.

Aos demais familiares, pela torcida e por entenderem a distância física. Em especial minha afilhada Talita e primo Douglas pelo carinho e abraço sincero.

A minha amiga-irmã Larissa *um tesouro que pra sempre vou guardar.*

A minha professora e orientadora de graduação, Analina Furtado Valadão pelo apoio e incentivo nessa busca. E a todos que deixaram em mim grandes aprendizados: Ana Cristina Chaves, Rívia Moraes, Stael Martins Duarte Souza, Matheus Senna, Leonardo Paes, Anderson Vilela e Carla de Aredes Brum.

As minhas amigas da república, Kelly, Karine e Lorena. A presença de vocês deixou minha caminhada mais fácil e mais alegre, e de certa forma vocês são a minha família.

A professora Janetti, pela atenção, competência, apoio e exemplo de dedicação à ciência.

A todos os professores do Departamento de Fisiologia e Farmacologia que continuamente contribuem com seus ensinamentos.

A Banca Examinadora, pela atenção dispensada na leitura desse trabalho.

Aos amigos do meu laboratório, Webster, Tamires, Nerissa, Taíssa, Igor, Pedro, Ana Luiza, Samuel, Gabriela, pelos bons momentos compartilhados.

A querida Lindis, pela amizade verdadeira, carinho, companheirismo, ensinamentos, ajuda nos momentos difíceis, incentivo, abraços, conversas, pelos maravilhosos bolinhos e tortas que só ela sabe fazer.

Aos meus amigos Rapha e Vivi, pelos ensinamentos, conselhos e incentivo.

A professora Miriam Lopes por todo apoio e incentivo, e toda equipe do LSAT meus queridos amigos Verlane, Ariadne, Katinha, Fernanda, Dalton, Ana Cândida, Luciana e Marina, pelo companheirismo, carinho e presença.

Aos amigos da pós-graduação: Clarice, Renata, Cristina, Suzane, Pollyana, Lorena, Daniela, Josiane, Rosária, Talita, Celso, Érika, Luciana Guzzo, Luciana Moreira, Ana Flávia, Pedro Gobira, Paulo, Rogério, Ana Raquel. Obrigada pelos momentos de carinho, força, entretenimento e distração.

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

Aos funcionários Rinaldo, Jorge, Wellington, Dona Tânia e Sílvio, pela presença atenciosa e necessária para a realização desse trabalho.

As secretárias da pós-graduação, Cinthya e Nilda, pelo suporte técnico e conselhos indispensáveis do meio acadêmico, muito obrigada.

Aos professores Geovanni Cassali e Virgínia Lemos pelas colaborações para realização deste trabalho.

A CAPES, CNPq e Fapemig, pelo apoio financeiro

RESUMO

Os receptores ativados por proteases (proteinase-activated receptor, PAR) fazem parte de uma família de receptores acoplados à proteína G que são ativados por serino-proteases através da clivagem proteolítica de uma sequência específica de aminoácidos em sua porção N-terminal. Sua ativação vem sendo associada à regulação de diferentes fenômenos inflamatórios. Estes receptores foram classificados de 1 a 4 por ordem de descoberta apresentando similaridade estrutural mas, também possuem diferenças no grupamento N-terminal e da serino-protease responsável pela clivagem. PAR-2 é expresso nas vias aéreas, no epitélio, endotélio e músculo liso do tecido pulmonar, fibroblastos da traqueia e brônquios, e células inflamatórias tais como mastócitos e eosinófilos. Nos últimos anos, estudos têm demonstrado o envolvimento de PAR-2 no recrutamento e na ativação de leucócitos, no entanto, embora existam na literatura alguns estudos mostrando a presença e ativação de receptores PAR-2 em eosinófilos, ainda não estão bem esclarecidos os mecanismos moleculares envolvidos na sinalização desencadeada pela ativação deste receptor pelos seus respectivos agonistas. Nosso objetivo foi avaliar o papel do PAR-2 para o recrutamento de eosinófilos em pleurisia experimental, bem como a participação da triptase de mastócitos e a importância de sua inibição para este fenômeno. Os protocolos experimentais foram aprovados pelo comitê de ética animal (CEUA/UFMG, 193/2012). Após realização do protocolo de tratamento os animais foram sacrificados em câmara de CO₂, e o lavado pleural foi coletado para posteriores análises nos tempos adequados. As análises estatísticas utilizadas foram: One-Way ANOVA seguido do pós-teste de Newman-Keuls para as análises de migração celular e Student's t test para as análises de western blotting. A injeção intrapleural (i.pl.) em camundongos BALB/c naive com agonista seletivo de PAR-2 SLIGRL-NH₂ (30 µg), ou triptase de mastócitos (300 ng) ou ovalbumina (1 µg), em animais previamente sensibilizados para este antígeno, induziu recrutamento de eosinófilos para a cavidade pleural destes animais. Sendo assim, camundongos foram injetados por via i.pl. com antagonista seletivo de PAR-2 ENMD1068 (3 µg) 15 minutos antes da injeção i.pl. de OVA (OVA; 1 µg), em camundongos imunizados, ou com triptase de mastócitos (300 ng) ou eotaxina-1 (100 ng) em camundongos naive para estudar o papel de PAR-2 no recrutamento de eosinófilos. O ENMD1068 inibiu a eosinofilia induzida por OVA (97%), por triptase (87%) como também por eotaxina-1 (61%), o que sugere a participação da ativação de PAR-2 no recrutamento de eosinófilos induzido por estes estímulos. De outra forma, em camundongos tratados com triptase (300 ng) foi avaliada a expressão de PAR-2 por western blotting 4, 8, 24 e 48 horas após o estímulo i.pl. demonstrando aumento da expressão do receptor 24 e 48 horas após o tratamento quando comparados aos respectivos controles, em leucócitos obtidos do lavado pleural. Além disso, testes de imuno-citoquímica demonstraram co-localização do receptor PAR-2 na membrana e citoplasma de eosinófilos e células mononucleares 24 e 48 horas após desafio i.pl. com triptase. Uma vez demonstrada a participação do PAR-2 no recrutamento de eosinófilos induzido pela triptase, foi avaliada a importância da triptase endógena para o recrutamento de eosinófilos no modelo de pleurisia, e o pré-tratamento com APC366 (5 mg/kg) via um inibidor seletivo de triptase, diminuiu o recrutamento de eosinófilos induzido pelo SLIGRL-NH₂ (30 µg) ou eotaxina-1 (100ng). Em conclusão, nossos resultados sugerem um papel de PAR-2 e de sua ativação no controle do recrutamento de eosinófilos, e conseqüentemente para o desenvolvimento da resposta inflamatória na cavidade pleural. O presente estudo contribui para o entendimento dos mecanismos envolvidos na eosinofilia, sugerindo uma nova estratégia terapêutica para o seu controle, através do bloqueio de PAR-2. Suporte financeiro: CNPq/CAPES/ FAPEMIG

PALAVRAS-CHAVE: PAR-2, recrutamento de eosinófilos, triptase, OVA, eotaxina-1, pleurisia.

ABSTRACT

Proteinase-activated receptors (PAR) are part of a family of G-protein-coupled receptors that are activated by serine proteases via proteolytic cleavage of a specific sequence of amino acids in N-terminal portion, and its activation has been associated with the regulation of different inflammatory phenomena. These receptors were classified from 1 to 4 by order of discovery, have structural similarities but also have differences in the group N-terminal and the serine-protease responsible for cleavage. PAR-2 is expressed in the airways, the epithelium, endothelium and smooth muscle tissue of the lung, trachea and bronchial fibroblasts and inflammatory cells such as mast cells and eosinophils. In recent years, studies have shown the involvement of PAR-2 in the recruitment and activation of leukocytes, however, although there are few studies in the literature showing the presence and activation of PAR-2 in eosinophils, the mechanisms involved in molecular signaling triggered by activation of this receptor by their respective agonists are not well understood. Our objective was to evaluate the role of PAR-2 in the control of eosinophil recruitment in experimental pleurisy, as well as the participation of mast cell tryptase and its importance in inhibiting this phenomenon. The experimental protocols were approved by the animal ethics committee (CEUA / UFMG, 193/2012). After the treatment protocol, mice were sacrificed in a CO₂ chamber, and pleural lavage was collected for further analysis in the proper times. One-Way ANOVA followed by Newman-Keuls post-test was used for analysis of cell migration and Student's t test for analysis of western blotting. Intraleural (i.pl.) injection in naive BALB/c mice with selective agonist of PAR-2 SLIGRL-NH₂ (30 µg), or mast cell tryptase (300 ng) or ovalbumin (OVA; 1 µg) in animals previously sensitized to this antigen, induced eosinophil recruitment into the pleural cavity of these animals. Thus, mice were injected i.pl. with selective antagonist of PAR-2 ENMD1068 (3 µg) 15 minutes before the i.pl. injection OVA (1µg) in mice immunized; or with mast cell tryptase (300 ng) and eotaxin-1 (100 ng) in naive mice to study the role of the PAR-2 in the recruitment of eosinophils. The ENMD1068 inhibited eosinophilia induced by OVA (97%), by tryptase (87%), and also by eotaxin-1 (61%), suggesting the involvement of PAR-2 activation in the recruitment of eosinophils induced by these stimuli. Otherwise, in mice treated with tryptase (300 ng) we evaluated receptor expression 4, 8, 24 and 48 hours after stimulation i.pl., using western blotting. The results demonstrated increased receptor expression 24 and 48 hours after treatment compared to their respective controls in leukocytes obtained pleural lavage. Furthermore, immuno-histochemical tests have demonstrated co-localization of the receptor PAR-2 in the membrane and cytoplasm of eosinophils and mononuclear cells 24 and 48 hours after i.pl. challenge with tryptase. Once demonstrated the involvement of PAR-2 in eosinophil recruitment induced by tryptase we evaluated the importance of endogenous tryptase to the recruitment of eosinophils in the pleurisy model, and the pre-treatment with APC366 (5 mg/kg), a selective inhibitor of tryptase, decreased the recruitment of eosinophils induced by SLIGRL-NH₂ (30 µg) and eotaxin-1 (100 ng). In conclusion, our results suggest a role of PAR-2 activation in the control of eosinophils recruitment and thus in the development of the inflammatory response in the pleural cavity. The present study contributes to the understanding of the mechanisms involved in eosinophilia, suggesting the blockage of PAR-2 as a new therapeutic strategy for its control. Financial support: CNPq/CAPES/ FAPEMIG

KEYWORDS: PAR-2, eosinophils recruitment, tryptase, OVA, eotaxin-1, pleurisy.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Domínios estruturais e funcionais de PAR.....	17
Figura 2. Resumo da ação de agonistas PAR-2.....	19
Figura 3. Contenção do camundongo para a administração intrapleural (i.pl.).....	35
Figura 4. Coleta do lavado pleural.....	36
Figura 5. Esquema representando o pré-tratamento dos camundongos com ENMD1068 e os diferentes estímulos.....	37
Figura 6. Esquema representando o pré-tratamento dos camundongos com APC366 e os diferentes estímulos.....	37
Figura 7. Migração de leucócitos para a cavidade pleural induzida pelo agonista PAR-2 SLIGRL-NH ₂	43
Figura 8. Migração de eosinófilos induzida pelo SLIGRL-NH ₂ para a cavidade pleural de camundongos Balb/c em função do tempo.....	44
Figura 9. Recrutamento de eosinófilos induzido pela ovalbumina (OVA) para a cavidade pleural de camundongos Balb/c em função do tempo.....	46
Figura 10. Efeito induzido pelo ENMD1068 (antagonista de PAR-2) sobre o recrutamento de eosinófilos para a cavidade pleural induzido por OVA.....	47
Figura 11. Migração de eosinófilos para a cavidade pleural induzida pela triptase de mastócitos.....	49
Figura 12. Migração de eosinófilos induzida pela triptase para a cavidade pleural de camundongos Balb/c em função do tempo.....	50
Figura 13. Leucócitos de lavado pleural corados pelo método de May Grunwald-Giemsa.....	51
Figura 14. Migração de eosinófilos para a cavidade pleural de camundongos induzida pela triptase.....	52
Figura 15. Recrutamento de eosinófilos para a cavidade pleural induzido por triptase é eliminado por exposição da enzima ao calor.....	54

Figura 16. Efeito do pré-tratamento com ENMD1068 sobre a migração de eosinófilos induzida pela administração intrapleural de triptase.....	56
Figura 17. Expressão de PAR-2 após injeção intrapleural de triptase.....	58
Figura 18. Imuno-localização de PAR-2 em leucócitos pleurais após administração de triptase.....	59
Figura 19. Efeito induzido pelo pré-tratamento com APC366 (inibidor de triptase) na migração de eosinófilos induzida pela administração i.pl. de SLIGRL-NH ₂	61
Figura 20. Efeito induzido pelo ENMD1068 sobre o recrutamento de eosinófilos para a cavidade pleural induzida pela eotaxina-1.....	63
Figura 21. Efeito induzido pelo pré-tratamento com APC366 (inibidor de triptase) na migração de eosinófilos induzida pela administração i.pl. eotaxina-1.....	65
Figura 22. Esquema final.....	66

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APC366: inibidor de triptase de mastócitos

Asp: aspartato

BSA: albumina de soro bovino tipo V

CCR3: receptor para eotaxina

CEBIO: Centro de Bioterismo

CEUA: Comissão de Ética no Uso de Animais

CO₂: gás carbônico

CysLts: cistenilleucotrienos

DMSO: dimetilsufóxido

ENMD1068: antagonista seletivo de PAR-2

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

Hist:histidina

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

ICAM-1: molécula-1 de adesão intercelular

IFN- γ : interferon gama

IgE: imunoglobulina E

IL-3:interleucina-3

IL-4: interleucina-4

IL-6:interleucina-6

IL-8: interleucina-8

IL-10: interleucina-10

IL-12: interleucina-12

IL-13: interleucina-13

IL-15:interleucina-15

LPS: lipopolissacarídeo

LRGILS-NH2: peptídeo inativo de PAR-2

LTB₄: leucotrieno B₄

LTC₄: leucotrieno C₄

MBP: proteína básica principal dos eosinófilos

MCP-1: proteína-1 quimiotática para macrófago

MIP-1 α : proteína inflamatória de macrófago 1 α

MMP-9: metaloproteinase-9

OVA: albumina de ovo de galinha - ovalbumina

PAF: fator ativador de plaquetas

PAR: receptores ativados por proteases (*proteinase activated receptors*)

PBS: solução de salina tamponada (Phosphate buffered saline, PBS)

PDGF: fator de crescimento derivado de plaqueta

PGE₂: prostaglandina E₂

PR-3: proteinase-3 de leucócitos

RANTES: *regulated upon activation, normal T-cell expressed and secreted*, quimiocina CCL5

ROS: espécie reativa de oxigênio

SCF: fator de crescimento celular

Ser: serina

SLIGRL-NH₂: Agonista seletivo para PAR-2

TGF- β : fator de de crescimento transformante - Beta

TNF- α : fator de necrose tumoral

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

VEGF: fator de crescimento endotelial vascular

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
1.1 Aspectos gerais dos receptores ativados por proteases no desenvolvimento da inflamação.....	16
1.2 Participação dos PAR nas ações mediadas por eosinófilos.....	22
2. JUSTIFICATIVA.....	25
3. OBJETIVO GERAL.....	26
3.1 Objetivos específicos:.....	26
4. MATERIAIS E MÉTODOS	27
4.1 Animais.....	27
4.2 Drogas, anticorpos e reagentes	27
4.3 Preparo de soluções	29
4.3.1 Solução de Salina tamponada (PBS).....	29
4.3.2 Solução de TBS	29
4.3.3 Solução de Tris-HCl 0,5 M	30
4.3.4 Tampão de lise	30
4.3.5 Tampão de amostra	30
4.3.6 Tampão de corrida	31
4.3.7 Tris-glicina (10x)	31
4.3.8 Tampão de transferência	31
4.3.9 Vermelho Ponceau 0,3%	31
4.3.10 Gel de poliacrilamida 10%.....	32
4.3.11 Solução de albumina bovina (BSA).....	32
4.3.12 Solução diluidora de leucócitos (Solução de Turk)	32
4.3.13 Preparo da solução de SLIGRL-NH ₂	32
4.3.14 Preparo da solução de ENMD1068	33
4.3.15 Preparo da solução de Triptase.....	33
4.3.16 Preparo da solução de ovalbumina (OVA)	33
4.3.17 Preparo da solução de Eotaxina-1.....	34
4.3.18 Preparo da solução de APC 366	34
4.4 Estudos do recrutamento de leucócitos em pleurisia.....	34
4.4.1 Contenção dos camundongos	34

4.4.2	Imunização	35
4.4.3	Tratamentos farmacológicos e coleta do lavado pleural	35
4.4.4	Indução de pleurisia por triptase de mastócitos, eotaxina-1 ou OVA	36
4.5	Avaliação da expressão e localização de PAR-2 em leucócitos de camundongos <i>naives</i> desafiados com triptase de mastócitos.....	39
4.5.1	Determinação da expressão proteica de PAR-2 por Western blot	39
4.5.2	Localização do receptor PAR-2 por imunocitoquímica	40
4.6	Análise Estatística.....	41
5.	RESULTADOS.....	42
5.1	Recrutamento de eosinófilos induzido pelo agonista seletivo de PAR-2 (SLIGRL-NH ₂) para a cavidade pleural dos camundongos	42
5.2	Efeito induzido pelo pré-tratamento com antagonista de PAR-2 ENMD1068 sobre o recrutamento de eosinófilos induzido por OVA em modelo de pleurisia experimental alérgica	45
5.3	Recrutamento de eosinófilos induzido pela triptase de mastócitos para a cavidade pleural dos camundongos	48
5.4	Avaliação da participação do receptor PAR-2 sobre a migração de eosinófilos na pleurisia induzida pela triptase.....	55
5.5	Avaliação do pré-tratamento com inibidor de triptase de mastócitos (APC366) no recrutamento de eosinófilos induzido por SLIGRL-NH ₂	60
5.6	Avaliação da participação do receptor PAR-2 na migração de eosinófilos na pleurisia induzida pela eotaxina-1	62
6.	DISCUSSÃO	67
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	78
	ANEXOS	90
	Anexo A – Certificado de aprovação do projeto pela Comissão de Ética no uso de animais da UFMG (CEUA)	91
	Anexo B – Artigo completo publicado em periódico	92

1. INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos gerais dos receptores ativados por proteases no desenvolvimento da inflamação

As proteases participam de inúmeras funções fisiológicas importantes no organismo, desde a digestão intra e extracelular de proteínas a processos como inflamação, fibrinólise, resposta imune e coagulação sanguínea (DASH *et al.*, 2003). Estas são classificadas em exo ou 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; BUTLER, 1987). Mais recentemente, foi inserida uma nova classificação em famílias baseada na similaridade dos aminoácidos das proteases (RAWLINGS *et al.*, 2006) e no seu mecanismo de catálise, sendo nomeadas em aspártico, metalo, cisteíno, serino e treonino-proteases (RAMACHADRAN; HOLLENBERG, 2008). As serino-proteases 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, quimiotripsina, elastase, catepsina G de neutrófilos, proteinase C de leucócitos e enzimas da homeostasia e da coagulação, como exemplos importantes (RAWLINGS *et al.*, 2006).

Muitas das respostas fisiológicas mediadas por serino-proteases podem ocorrer através da sinalização via receptores ativados por proteases (*Proteinase Activated Receptor* - PAR) (STEINHOFF *et al.*, 2005). Esses receptores acoplados à proteína G são classificados de acordo com a ordem cronológica de descoberta em PAR-1, PAR-2, PAR-3 e PAR-4 (VU *et al.*, 1991), sendo expressos em uma variedade de células incluindo plaquetas,

células endoteliais, epiteliais, células das vias aéreas, neutrófilos e mononucleares, desencadeando respostas como agregação plaquetária, aumento intracelular de cálcio, quimiotaxia de neutrófilos e eosinófilos, proliferação celular e recrutamento de leucócitos *in vivo* (COCKS, MOFFATT, 2000; REED *et al.*, 2004; SCHMIDLIN *et al.*, 2002; RAMACHANDRAN, HOLLENBERG, 2008; BRAGA *et al.*, 2010; GOMIDES *et al.*, 2012). Os membros da família PAR distinguem-se dos demais receptores acoplados a proteína G por sua característica peculiar de ativação.

Após o reconhecimento seletivo do receptor por uma serino-protease ocorrerá clivagem proteolítica dos sítios específicos na porção N-terminal do receptor, e posterior à clivagem, é exposta uma nova sequência N-terminal que, finalmente, agindo como um ligante ancorado ativa o próprio receptor desencadeando eventos de sinalização celular e consequente aumento de cálcio intracelular. Dessa forma, ao contrário da ativação de receptores convencionais, é requerida uma atividade proteolítica para a ativação dos PAR, cabendo ressaltar que a ativação destes receptores é irreversível, uma vez clivado por serino-proteases, o receptor será degradado em lisossomos (VU *et al.*, 1991; ASOKANANTHAN *et al.*, 2002; VERGNOLLE, 2005; TAKIZAWA *et al.*, 2005; REED *et al.*, 2004; BOITANO *et al.*, 2011; OSSOVSKAYA, BUNNETT, 2004). Este mecanismo de ativação e de produção de diferentes ligantes após clivagem em sítios específicos está mostrado esquematicamente na **figura 1**.

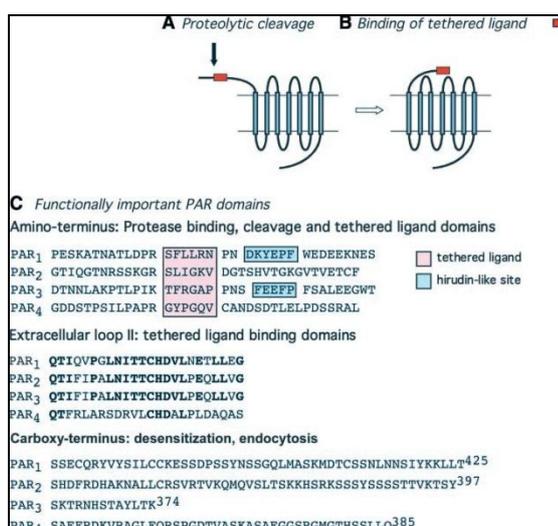


Figura 1: Domínios estruturais e funcionais de PAR. A figura mostra o alinhamento de domínios de receptores humanos PAR-1, PAR-2, PAR-3 e PAR-4. **A e B:** mecanismo de clivagem e interação do ligante com domínios de ligação extracelular. **C:** domínios

de importância funcional de cada receptor na porção amino-terminal, no segundo domínio extracelular, e na porção carboxi-terminal (Retirado de Ossovskaya, V. S.; Bunnett, N. W. 2004).

Os PAR, com exceção de PAR-3, podem ser ativados por peptídeos sintéticos que são capazes de clivar ou não sequências específicas do grupamento N-terminal, os quais têm sido úteis como ferramentas farmacológicas no estudo sobre o papel das serino-proteases na regulação de fenômenos biológicos. 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 PAR (SCARBOROUGH *et al.*, 1992). Ainda, a descoberta de agonistas e antagonistas seletivos para estes receptores têm fornecido um grande avanço para estudos da regulação de processos inflamatórios utilizando a via de ativação desses receptores como, por exemplo, na atividade de células endoteliais (McDOUGALL *et al.*, 2009), no recrutamento *in vivo* de leucócitos (HOULE *et al.*, 2005) e na liberação de citocinas (SCHMIDLIN *et al.*, 2001; SMITH *et al.*, 2009). Cabe ressaltar que já foram identificados agonistas endógenos para estes receptores, por exemplo PAR-1, 3 e 4 são ativados por trombina, tripsina ou catepsina G, enquanto que PAR-2 é resistente a trombina, porém responde à tripsina e a várias outras serino-proteases, incluindo triptase liberada de mastócitos, proteinase-3 de leucócitos (PR-3), catepsina G, enzimas derivadas de bactéria (OSSOVSKAYA, BUNNETT, 2004; COUGHLIN, 2000; CARVALHO *et al.*, 2010), além de proteases reguladoras da coagulação, fatores VIIa e Xa (KAWABATA *et al.*, 2000; HOULE *et al.*, 2005; VERGNOLLE, 2005; BARRY *et al.*, 2010).

Cada receptor tem se mostrado capaz de modular diferentes processos relacionados ao desenvolvimento da resposta inflamatória, a saber: PAR-2 (expresso em células endoteliais, células epiteliais, neurônios sensoriais, monócitos, fibroblastos da traquéia e brônquios e células inflamatórias) desencadeia respostas celulares tais como injúria tecidual, angiogênese, recrutamento celular, hiperresponsividade brônquica e percepção da dor (MACFARLANE *et al.*, 2001; COUGHLIN, CAMERER, 2003, COELHO *et al.*, 2003; SEVIGNY *et al.* 2011; REED *et al.*, 2004). Muitos dos 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 o rolamento de leucócitos em células endoteliais (VERGNOLLE, 1999; LINDER *et al.* 2000), inflamação neurogênica, hiperalgesia, reparo tecidual, angiogênese, efeito mucoprotetor, liberação de mediadores inflamatórios e recrutamento de eosinófilos *in vivo* (VERGNOLLE, 1999; COELHO *et al.* 2003; VERGNOLLE *et al.*, 2010; RUF, ROTHMEIER, 2012; STEINHOFF *et al.*, 2000; MATOS *et al.*, 2013) (**Figura 2**). Ao contrário desses efeitos mediados por agonistas, a inibição das ações de PAR-2 pode ser obtida através do uso de antagonistas seletivos para este receptor. O ENMD1068 (*N1-3-methylbutyryl-N4-6-aminohexanoyl-piperazine*) é um antagonista derivado da substituição de um composto piperazina (KELSO *et al.*, 2005; RAMACHANDRAN, HOLLENBERG, 2008) capaz de inibir seletivamente o receptor PAR-2 tanto *in vitro* quanto *in vivo*, atenuando o processo de artrite em modelo animal (KELSO *et al.*, 2005).

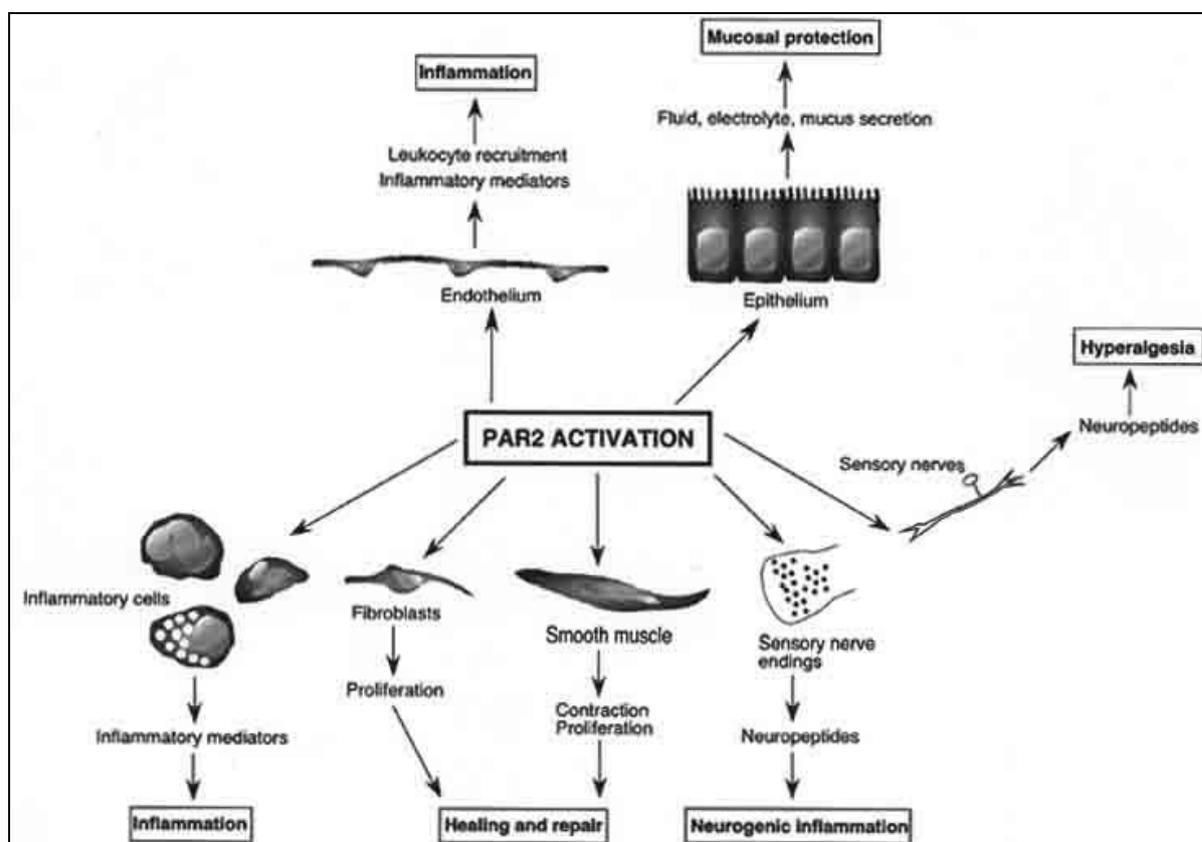


Figura 2: Resumo da ação de agonistas PAR-2 (Retirado de COELHO *et al.*, 2003).

A ativação dos PAR é importante para o desenvolvimento da resposta inflamatória e respostas imunes inata e adaptativa uma vez que nestes processos há presença de serino-proteases e estes receptores estão presentes na superfície de leucócitos e demais células imuno-competentes (SHPACOVITCH *et al.*, 2008). Como exemplo os neutrófilos expressam PAR-2 e PAR-3 (HOWELLS *et al.*, 1997; LOURBAKOS *et al.*, 1997), os eosinófilos PAR-2 (BOLTON *et al.*, 2003; MIIKE *et al.*, 2001), monócitos PAR-1, PAR-2 e PAR-3 (COLOGNATO *et al.*, 2003), macrófagos PAR-1, PAR-2 e PAR-3 (COLOGNATO *et al.*, 2003), mastócitos PAR-2 (MOORMANN *et al.*, 2006), linfócitos B PAR-4 (RULLIER *et al.*, 2006) e linfócitos T PAR-1, PAR-2 e PAR-3 (MARI *et al.*, 1996, HANSEN *et al.*, 2004). Além disso, PAR-1 e PAR-2 são altamente expressos em queratinócitos, células endoteliais e nervos sensoriais (KAWAGOE *et al.*, 2002; SEELIEGER *et al.*, 2003; STEINHOFF *et al.*, 2003). Em modelo experimental de dermatite de contato, por exemplo, PAR-2 tem um papel fundamental no desenvolvimento de alergia e em animais nocautes para PAR-2 ocorreu redução de inchaço na orelha, como também da infiltração de células imunes tais como neutrófilos, linfócitos T, macrófagos, eosinófilos, extravasamento plasmático e da aderência de leucócitos (KAWAGOE *et al.* 2002; SEELIGER *et al.* 2003).

Na inflamação das vias aéreas e alergia, a resposta desencadeada pela ativação dos PAR tem se mostrado importante em patologias como asma, edema pulmonar e hipersensibilidade (REED *et al.*, 2004; LAN *et al.*, 2002; KAWABATA, KAWAO, 2005), uma vez que estes receptores estão presentes em uma grande variedade de células das vias aéreas, como células epiteliais, endoteliais, músculo liso brônquico, neutrófilos e macrófagos (REED *et al.*, 2004; MOFFATT *et al.*, 2004). A ativação de PAR-2 por peptídeos sintéticos promove inflamação pulmonar através do aumento da permeabilidade em células pulmonares e aumento do recrutamento de leucócitos em lavado broncoalveolar (SU *et al.*, 2005). Além disso, a ativação de PAR-2 proporciona a liberação de fator estimulador de colônia para macrófagos e granulócitos (GM-CSF) por células locais que promovem o aumento na sobrevivência de eosinófilos (VLIAGOFITS *et al.*, 2001). Já a ativação de PAR-2 pela triptase, parece estar envolvida na hiperresponsividade das vias aéreas *in vitro* e *in vivo* (BARRIOS *et al.*, 2003; MOLINO *et al.*, 1997), sendo capaz de mobilizar cálcio

intracelular, promover broncoconstrição (MOLINO *et al.*, 1997; CORVERA *et al.*, 1999; SCHMIDLIN *et al.*, 2001; MINAI, LEVI, 2009; SHAKOORY *et al.*, 2004; PALMER *et al.*, 2007), ocasionar remodelamento da matriz extracelular (HERNÁNDEZ *et al.*, 2012) e também, capaz de ativar PAR-2 expresso na superfície de células endoteliais e epiteliais promovendo aumento da produção de citocinas, de moléculas de adesão e mediadores quimioatraentes para eosinófilos e basófilos (HOLGATE, 1999).

No caso de indivíduos previamente sensibilizados, ao entrarem em contato com o antígeno, ocorre a produção de imunoglobulina E (IgE) por linfócitos B. A IgE irá ativar células que expressam seu receptor (FcεRI), tais como os mastócitos (BACHERT *et al.*, 1990; CHANG *et al.*, 1990) residentes nos tecidos e submucosa das vias aéreas (PEARLMAN, 1999). Além da IgE, peptídeos e citocinas como IL-3 e GM-CSF e SCF, quimiocinas como IL-8, MCP-1, MIP-1α e RANTES, fatores da cascata do complemento, parasitas e bactérias podem ser responsáveis pela ativação dos mastócitos (McNEIL, 1996; ZAPPULLA *et al.*, 2002). Os mastócitos maduros são caracterizados por um grande número de grânulos secretores ligados a membrana e uma vez ativado ocorrerá o processo de degranulação de mediadores pré-formados que incluem as aminas biogênicas como histamina, as enzimas como triptase, quimase, carboxipeptidase, catepsina G, hidrolases ácidas, fosfolipase, aminopeptidase e hexoaminodase, e os proteoglicanos como heparina e sulfato de condroitina, como também de novos mediadores sintetizados que incluem IL-1, IL-8, TNF-α, IL-12, IL-13, IL-15, quimiocinas, fatores de crescimento e de angiogênese (VEGF e PDGF), bem como prostaglandinas e leucotrienos (ROBBIE-RYAN; BROWN, 2002). Estes mediadores produzidos e liberados pelos mastócitos possuem diferentes atividades biológicas, sendo que a triptase é a enzima predominante nos grânulos (METCALFE *et al.*, 1997).

A triptase de mastócitos exerce um papel fundamental para o desenvolvimento de doenças inflamatórias de natureza alérgica como a asma. Assim, a inibição das ações da triptase pode ser considerada uma estratégia eficaz para a redução dos sintomas associados à inflamação alérgica das vias respiratórias. Estudos têm demonstrado que inibidores de triptase diminuem a infiltração eosinofílica tecidual e em lavado broncoalveolar e a produção de muco e edema brônquico em modelo de asma experimental induzida por

ovalbumina (OH *et al.*, 2002), como também diminui a infiltração eosinofílica e hiperresponsividade brônquica induzida pela metacolina em modelo experimental de asma induzida por ácaros de poeira (CHEN *et al.*, 2006). Sendo a triptase um agonista endógeno de PAR-2, estratégias farmacológicas modulando esta via de ativação também se tornam um grande alvo de estudo.

1.2 Participação dos PAR nas ações mediadas por eosinófilos

Os eosinófilos são leucócitos circulantes que geralmente compreendem apenas 1-2% do total dos leucócitos sanguíneos (RANKIN *et al.*, 2000). Residem principalmente em tecidos que mantêm contato com o ambiente externo ou com a microbiota intestinal, tais como o trato gastrointestinal e respiratório (ADAMKO *et al.*, 2005), e participam da resposta inflamatória e infecciosa de diversas doenças, sendo que seu aumento tem sido associado a doenças alérgicas (asma, rinite, eczema e dermatite atópica), de origem bacteriana e parasitária (inflamação intestinal, gastroenterite eosinofílica e pneumonia) e malignas (doença de Hodgkin e algumas leucemias (HOGAN *et al.*, 2008; CONROY *et al.*, 1997; STONE *et al.*, 2010; MONCHY *et al.*, 1985 *apud* JOSE *et al.*, 1994). São recrutados do sangue periférico para o tecido inflamado em resposta a diversos estímulos produzidos nos locais da inflamação onde irão modular a resposta imune, podendo sobreviver por até duas semanas (SPRY, 1971 *apud* CONROY *et al.*, 1997; MINAI, LEVI, 2009; STONE *et al.*, 2010). São considerados importantes efetores na morte de certos parasitas (BUTTERWOTH, 1984 *apud* CONROY *et al.*, 1997), mas também podem causar diretamente danos teciduais por uma variedade de mecanismos, incluindo a liberação de proteínas catiônicas, mediadores lipídicos, radicais reativos de oxigênio, citocinas e quimiocinas que irão contribuir para a gravidade da doença (GLEICH *et al.* 1988 *apud* CONROY *et al.* 1997; CARA *et al.*, 2000).

De todas as citocinas e quimiocinas envolvidas no recrutamento de leucócitos, apenas a IL-5 e a eotaxina são seletivas para o tráfego de eosinófilos (TAKIZAWA *et al.*, 2005). Existem 3 subtipos de eotaxina, eotaxina-1, eotaxina-2 e eotaxina-3 que se diferem na região amino-terminal mas que

apresentam propriedades similares. Em geral, a eotaxina é uma proteína produzida rapidamente em resposta a um alérgeno (CONROY; WILLIAMS, 2001) e vários tipos celulares do pulmão são capazes de sintetizá-la: células epiteliais, células musculares lisas das vias aéreas, células vasculares endoteliais, macrófagos, eosinófilos (HUMBLES *et al.*, 1997; LAMKHIOUED *et al.*, 1997) e as citocinas sintetizadas por linfócitos Th2 também modulam esta produção. A eotaxina age diretamente no receptor CCR3, que é altamente expresso em eosinófilos (PONATH *et al.*, 1996), sinergicamente com IL-5 para induzir o recrutamento destas células *in vivo* (COLLINS *et al.*, 1995; PALFRAMAN *et al.*, 1998). O aumento na produção de eotaxina está diretamente relacionado com o aumento da infiltração de eosinófilos nas vias aéreas e na presença de asma, sendo que a ativação de PAR-2 em células epiteliais pode ser essencial para a produção de eotaxina e consequente processo inflamatório alérgico das vias aéreas (TAKIZAWA *et al.*, 2005). Além disso, em camundongos, geneticamente modificados, que não expressam esta quimiocina e imunizados com ovalbumina há uma redução de 70% no recrutamento de eosinófilos para o lavado broncoalveolar 18 horas após desafio, quando comparado aos animais selvagens (ROTHENBERG *et al.*, 1997)

O acúmulo de eosinófilos ocorre preferencialmente em locais onde ocorrem reações alérgicas, bem como infecções parasitárias e inflamações alérgicas onde desempenham um papel extremamente importante na fisiopatologia da asma e outras doenças respiratórias através da liberação de uma variedade de mediadores que irão levar a congestão nasal, aumento da produção de muco das vias aéreas, hipersensibilidade e hiperresponsividade brônquica (CONROY *et al.*, 1997; HOGAN *et al.*, 2008; NAKAGOME, NAGATA, 2011), liberação de mediadores tais como cistenil leucotrienos (CysLts) que é um importante mediador pró-inflamatório, broncoconstritor e secretagogo glandular, liberação de proteína básica principal (MBP), radicais oxigênio e citocinas (MOQBEL *et al.*, 1994) que juntos contribuirão para a piora do quadro do paciente. Além disso, os eosinófilos são capazes de produzir e liberar citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento (ex. IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-13, GM-CSF, SCF, TGF- β) bem como mediadores lipídicos (ex. fator ativador de plaquetas - PAF, leucotrieno (LT) C_4 e prostaglandina (PG)-E $_2$ (MINAI, LEVI,

2009; PRUSSIN, METCALFE, 2006), proteína catiônica eosinofílica, neurotoxina derivada do eosinófilo, peroxidase eosinofílica, proteína básica principal que é lesiva ao epitélio brônquico e está relacionada com a fase tardia da reação alérgica e defesa contra helmintos (Hogan *et al.*, 2008). É de extrema importância entender os mecanismos envolvidos no recrutamento de eosinófilos, uma vez que a migração excessiva destas células promove danos ao hospedeiro. Estudos têm demonstrado que em modelo de inflamação alérgica utilizando camundongos nocautes, que não expressam PAR-2, ocorreu inibição de 73% da infiltração de eosinófilos, e um aumento de 83% em camundongos com superexpressão deste receptor em resposta ao antígeno, quando comparado aos camundongos selvagens (SCHMIDLIN *et al.*, 2002). Dessa forma, o receptor PAR-2 se torna um grande candidato para o entendimento deste processo e alvo farmacológico para o controle de doenças nas quais os eosinófilos desempenham um papel patológico.

2. JUSTIFICATIVA

A migração de eosinófilos, bem como de outros leucócitos para o foco inflamatório é um fator importante para o controle da inflamação e necessária para a resolução do processo, mas, caso o infiltrado celular ocorra em excesso pode exacerbar a liberação de mediadores inflamatórios, provocar lesões teciduais e piorar o prognóstico do paciente. Nos últimos anos, resultados experimentais apresentados por alguns grupos vêm sugerindo que agonistas de PAR-2 apresentam um papel pró-inflamatório, assim como tem sido demonstrado o envolvimento de PAR-2 no recrutamento e na ativação de leucócitos. No entanto, embora existam na literatura alguns estudos mostrando a presença e ativação de receptores PAR-2 em eosinófilos, ainda não está bem esclarecido seu papel para o recrutamento de eosinófilos para o foco inflamatório desencadeado pelos seus respectivos agonistas com destaque para a triptase de mastócitos, uma protease endógena.

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

3. OBJETIVO GERAL

Avaliar o papel do PAR-2 no recrutamento de eosinófilos em pleurisia experimental, bem como a participação da triptase de mastócitos e a importância de sua inibição para este fenômeno.

3.1 Objetivos específicos:

1. Avaliar a capacidade da triptase e do peptídeo ativador de PAR-2 SLIGRL-NH₂ em induzir recrutamento de eosinófilos para a cavidade pleural de camundongos BALB/c não imunizados (*naïve*);
2. Avaliar a importância da triptase endógena para o recrutamento de eosinófilos no modelo de pleurisia induzida por eotaxina-1 ou pelo peptídeo ativador de PAR-2 SLIGRL-NH₂;
3. Avaliar os efeitos do tratamento com o antagonista de PAR-2 ENMD1068 sobre o recrutamento de eosinófilos na pleurisia induzida por triptase ou eotaxina-1 em camundongos BALB/c *naïve*, ou induzida por OVA em animais sensibilizados para este imunógeno;
4. Avaliar a capacidade da triptase em induzir a expressão de PAR-2 em leucócitos presentes na cavidade pleural de camundongos BALB/c *naïve*.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizados camundongos Balb/c fêmeas, com 6 a 8 semanas, pesando entre 20 a 25 g, fornecidos pelo Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG (CEBIO). Os animais foram mantidos em ciclo claro-escuro de 12 h com livre acesso de ração e água. Todos os procedimentos utilizando animais foram aprovados pela Comissão de Ética no uso de animais da UFMG (CEUA/UFMG, certificado nº 193/2012).

4.2 Drogas, anticorpos e reagentes

1. Triptase de mastócito (*Cappel MP Biomedicals*);
2. Inibidor de Triptase: APC366 (*Tocris Bioscience*)
3. Agonista seletivo para PAR-2: SLIGRL-NH₂ (*Tocris Bioscience*)
4. Antagonista seletivo de PAR-2: ENMD1068 (*Tocris Bioscience*)
5. Peptídeo inativo de PAR-2: LRGILS-NH₂ (*Tocris Bioscience*)
6. Albumina de ovo de galinha - ovalbumina (*Sigma*)
7. Solução de hidróxido de alumínio (*Sigma*)
8. Eotaxina-1 (*Sigma*)
9. Albumina de soro bovino tipo V - BSA (*Calbiochem*)
10. Albumina de soro bovino tipo V, livre de ácidos graxos, nucleases e proteases – BSA (*Calbiochem*)
11. Solução de salina tamponada (Phosphate buffered saline, PBS)
12. DMSO (Dimetilsufóxido) (*Sigma*)

Anticorpos

1. Anticorpo policlonal IgG de cabra anti-PAR-2 (Santa Cruz Biotechnology)

2. Anticorpo secundário de PAR-2 de cabra anti-camundongo IgG-HRP (Millipore)
3. Anticorpo monoclonal de camundongo anti- β -actina (Santa Cruz Biotechnology)
4. Anticorpo secundário de β -actina anti-camundongo produzido em cabra IgG-HRP (1:8.000)
5. Anticorpo secundário (ADVANCE HRP–ready to use–DakoCytomation)

Corantes para microscopia

1. Giemsa (QEEL - Química Especializada Erich Ltda., Brasil)
2. May Grunwald (Dinâmica Contemporânea Ltda., Brasil)
3. Violeta de Genciana (Vetec Química fina Ltda, Brasil) - Preparo de solução diluidora de leucócitos;
4. Hematoxilina – contra-coloração para imunocitoquímica

Material utilizado no ensaio de Western blotting

1. TBS (*Tris-buffered saline*)
2. Tampão de amostra
3. Tampão de corrida
4. Tampão de lise (acrescido de inibidores de proteases – Sigma FAST)
5. Tampão de transferência
6. Vermelho Ponceau
7. Gel de poliacrilamida 10%
8. Membrana de nitrocelulose (Millipore)
9. Bloqueio de membrana – Albumina bovina sérica (BSA) 3%, diluída em TBS
10. Substrato Luminata Western HRP (Millipore) para reação de quimiluminescência

Material utilizado no ensaio de Imunocitoquímica

1. Diaminobenzidina – DAB (Sigma) cromógeno para imunocitoquímica

2. Meio permanente para lâminas de imunocitoquímica (bálsamo ou entelan)
3. Bloqueio da biotina endógena (Ultra Block V – Thermoscientific)
4. Bloqueio da peroxidase (10% de peróxido 30 vol para 90% de metanol)

4.3 Preparo de soluções

4.3.1 Solução de Salina tamponada (PBS)

Foi preparada uma solução 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 mg
Cloreto de sódio -----	8,2 g
Cloreto de potássio-----	200 mg
Água destilada-----	1.000 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 ATM durante 20 minutos, estando assim pronta para ser utilizada.

4.3.2 Solução de TBS

Foi preparada uma solução tampão de TBS pH 8,0 (Tris-HCL 100 mM, NaCl 150 mM, Tween 20).

Tris-HCl -----	1,58 g
NaCl -----	8,77 g
Tween 20 -----	500 µl
Água destilada -----	1.000 ml

O pH foi ajustado para 8,0 e a solução foi armazenada em geladeira.

4.3.3 Solução de Tris-HCl 0,5 M

Tris -----	6,057 g
Água Milli-Q -----	100 ml

Corrigiu-se o pH para 6,8.

4.3.4 Tampão de lise

Foi preparada uma solução tampão de lise pH 8,0 (NaCl 150 mM, Tris 50 mM, EDTA-2Na 5 mM, MgCl₂ 1 mM).

NaCl -----	0,44 g
Tris -----	0,3 g
EDTA-2Na -----	0,093g
MgCl ₂ -----	0,05 g
Água Milli-Q -----	50 ml

Corrigiu-se o pH para 8,0 e acrescentou-se:

Nonidet P40 -----	0,5 ml
Triton X-100 -----	0,15 ml

4.3.5 Tampão de amostra

Foi preparada uma solução de tampão de amostra (2-mercaptoetanol 10%, Tris-HCl 0,125 M, glicerol 20%, SDS 10%, azul de bromofenol 0,004%).

2-mercaptoetanol -----	500 µl
Tris-HCl -----	2,5 ml
Glicerol -----	2 ml
SDS -----	2 ml
Azul de bromofenol -----	400 µl
Água destilada -----	10 ml

Após o preparo foram feitas alíquotas de 500 µl cada e congeladas a – 20°C.

4.3.6 Tampão de corrida

Foi preparada uma solução contendo:

Tris -----	15 g
Glicina -----	72 g
SDS -----	5 g
Água destilada -----	500 ml

Após o preparo, a solução foi filtrada em Millipore 0,45 µm.

4.3.7 Tris-glicina (10x)

Tris-base -----	30 g
Glicina -----	140 g
Água destilada -----	1.000 ml

4.3.8 Tampão de transferência

Tris-glicina (10x) -----	100 ml
Água destilada -----	700 ml
Metanol -----	200 ml

4.3.9 Vermelho Ponceau 0,3%

Para coloração da membrana de nitrocelulose foi feita a solução de vermelho Ponceau contendo:

Ponceau -----	0,3 g
Ácido acético -----	1 ml
Água destilada -----	100 ml

4.3.10 Gel de poliacrilamida 10%

Acrilamida 30% -----	1,67 ml
Tris-HCl -----	1,25 ml
SDS 10% -----	100 µl
Água Milli-Q -----	1,90 ml
PSA -----	25 µl
Temed -----	10 µl

4.3.11 Solução de albumina bovina (BSA)

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

4.3.12 Solução diluidora de leucócitos (Solução de Turk)

A solução de Turk, utilizada para a contagem de leucócitos, 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.

4.3.13 Preparo da solução de SLIGRL-NH₂

As concentrações do agonista seletivo de PAR-2 SLIGRL-NH₂ utilizadas na curva dose resposta foram 10, 20 e 30 µg/0,1 ml. Sendo assim, foram diluídos os 5 mg de SLIGRL-NH₂ em 1 ml de PBS estéril dos quais foram retiradas alíquotas para fazer as soluções com as concentrações citadas. O

mesmo procedimento foi adotado para o preparo da solução de peptídeo controle de PAR-2 LRGILS-NH₂.

4.3.14 Preparo da solução de ENMD1068

As concentrações de ENMD1068 utilizadas na curva dose resposta foram 3, 10 e 30 µg/0,1 ml. Sendo assim, foram diluídos 5 mg de ENMD1068 em 5 ml de PBS estéril de onde foram retiradas alíquotas para fazer as soluções com as concentrações citadas.

4.3.15 Preparo da solução de Triptase

Para a obtenção da curva dose resposta de triptase foram utilizadas concentrações de 30, 100 e 300 ng/0,1 ml. Para isso, foi feita uma solução estoque de triptase 10 µg/ml em PBS estéril, de onde foram pipetadas alíquotas suficientes para fazer as soluções com as respectivas concentrações. Para avaliação do efeito proteolítico desta serino-protease, foi realizado o procedimento de inativação da triptase através do seu aquecimento em eppendorf vedado já na dose padronizada para os experimentos (300 ng/0,1ml), durante 10 minutos sob fervura com auxílio de um recipiente com água e ebulidor.

4.3.16 Preparo da solução de ovalbumina (OVA)

A dose de OVA utilizada para imunização foi de 0,5 mg/ml e o volume a ser administrado via subcutânea foi de 200 µl. Dessa forma, pesou-se 25 mg de OVA e acrescentou-se 50 ml de hidróxido de alumínio. Enquanto que a solução de OVA utilizada para o desafio intrapleural (1 µg/0,1 ml) foi preparada a partir da diluição de uma solução estoque de OVA (1 mg/1 ml) em PBS estéril (Klein *et al.*, 2000).

4.3.17 Preparo da solução de Eotaxina-1

A solução de eotaxina-1 (100 ng/0,1 ml) foi preparada a partir da diluição de uma solução estoque de eotaxina-1 (1 µg/1 ml) em uma solução de PBS + BSA (0,1%) livre de ácidos graxos, nucleases e proteases (Klein *et al.*, 2001).

4.3.18 Preparo da solução de APC 366

A dose de APC 366 utilizada foi de 5 mg/kg e os animais apresentaram peso médio de 25 g. Dessa forma, foram pesados 2 mg de APC 366 e acrescentados 1,6 ml de DMSO 20% (20% DMSO + 80% PBS estéril), resultando em uma solução com a concentração desejada da droga por kg de animal.

4.4 Estudos do recrutamento de leucócitos em pleurisia

4.4.1 Contenção dos camundongos

Os camundongos foram manipulados de maneira firme e gentil a fim de que se evitasse estresse desnecessário. Para uma total imobilização do camundongo, segurou-se a pele da nuca com o polegar e o indicador, virando-se a mão de maneira que ele ficasse com o abdômen voltado para cima. Prendeu-se, então, a cauda entre o terceiro e quarto dedo, conforme mostra a **Figura 3**, e posteriormente a substância a ser utilizada foi administrada pela via intrapleural de maneira rápida.



Figura 3. Contenção do camundongo para a administração intrapleural (i.pl.).

4.4.2 Imunização

Os animais receberam duas injeções subcutâneas (s.c.) de (50 µg/100 µl) de uma solução de hidróxido de alumínio contendo ou não OVA e este procedimento foi repetido após sete dias. Quatorze dias após a primeira imunização, os animais foram desafiados com a injeção intrapleural de OVA (1,0 µg/100 µl) ou de PBS (100 µl).

4.4.3 Tratamentos farmacológicos e coleta do lavado pleural

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 0,30 x 13 foram utilizadas, através do uso de ponteiros adaptadas, a fim de se obter uma trava e passar a ter uma agulha medindo aproximadamente 3mm de comprimento, objetivando 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 estéril (100 µl) foi injetado nos animais do grupo controle. Todos os animais foram submetidos à eutanásia em câmara de CO₂

imediatamente antes da coleta do lavado (**Figura 4**), e em seguida suas cavidades torácicas foram abertas e lavadas com PBS+albumina 3%, com um volume final de 2 ml. Este volume do interior da cavidade foi recolhido com pipeta automática para avaliação do acúmulo de células inflamatórias.



Figura 4. Coleta do lavado pleural

4.4.4 Indução de pleurisia por triptase de mastócitos, eotaxina-1 ou OVA

4.4.4.1 Pré-tratamentos dos animais com antagonista de PAR-2 ou com inibidor de triptase e a indução da pleurisia por diferentes agentes

A fim de avaliar a participação do PAR-2 na migração de eosinófilos para a cavidade pleural de camundongos, os animais foram submetidos ao pré-tratamento com antagonista seletivo de PAR-2 ENMD1068 (3 $\mu\text{g}/0.1$ ml) 15 minutos antes da injeção intrapleural de 100 μl de triptase (300 ng), OVA (1 μg) ou eotaxina-1 (100 ng) (**Figura 5**).

Além disso, os animais foram pré-tratados com APC366 (5 mg/kg) subcutaneamente 1 hora antes da injeção i.pl. de 100 μl de SLIGRL-NH₂ (30 $\mu\text{g}/0,1$ ml) ou eotaxina-1 (100 ng/0,1 ml) (**Figura 6**). LRGILS-NH₂ (30 $\mu\text{g}/0,1$ ml) foi utilizado como peptídeo controle para o agonista de PAR-2 SLIGRL-NH₂.

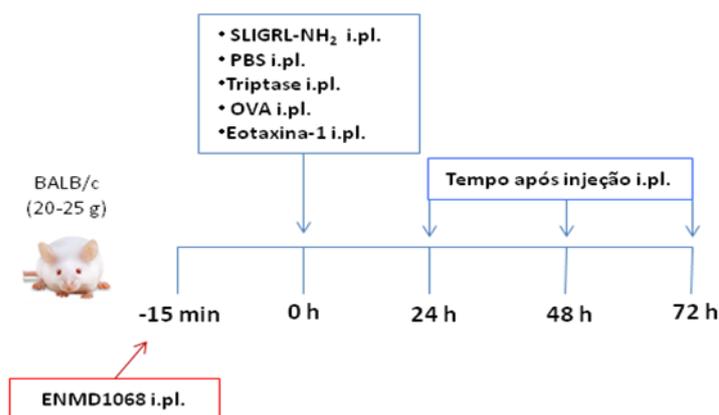


Figura 5 - Esquema representando o pré-tratamento dos camundongos com ENMD1068 e os diferentes estímulos.

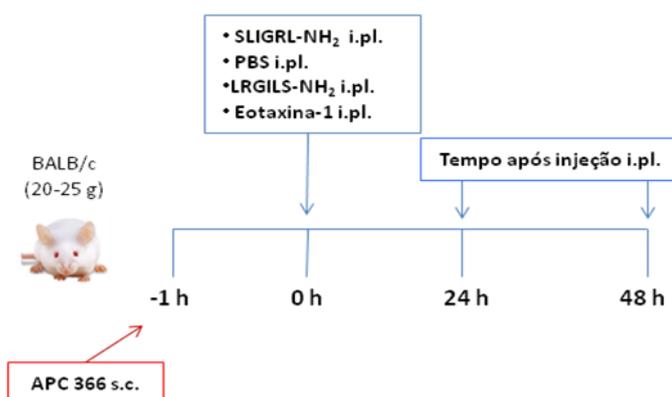


Figura 6 - Esquema representando o pré-tratamento dos camundongos com APC366 e os diferentes estímulos.

Inicialmente foi construída uma curva dose resposta para SLIGRL-NH₂ (10, 20, 30 µg/0,1 ml), triptase (30, 100 e 300 ng/0,1 ml) e ENMD1068 (3, 10, 30 µg/0,1 ml). Para os mediadores inflamatórios específicos OVA e eotaxina-1 foram utilizadas as doses de 1 µg/cavidade/0,1 ml e 100 ng/cavidade/0,1 ml, respectivamente. O agente inibidor da triptase endógena, APC366, foi utilizado na dose de 5 mg/kg.

Para a construção da curva dose resposta os animais foram eutanasiados em câmara de CO₂ 24 h após a administração do agente inflamatório, para migração celular 4, 24 ou 48 h após estímulo e para a curva tempo-resposta 24, 48 e 72 horas após desafio. Para os experimentos de western blotting, foi montada uma curva com os tempos 4, 8, 24 e 48 horas após injeção de triptase a fim de avaliar a variação da expressão do receptor nesses tempos. Para detecção do receptor por imunocitoquímica, as células foram analisadas 24 e 48 horas após injeção de triptase.

4.4.4.2 Avaliação de leucócitos presentes na cavidade pleural em resposta aos estímulos inflamatórios

Para a coleta dos leucócitos, os animais foram eutanasiados e 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 100g) por 4 min, o sobrenadante foi desprezado e as células foram ressuspensas com BSA (3%).

Os leucócitos obtidos após a centrifugação foram utilizados para realizar a contagem 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 para contagem total de leucócitos em microscópio óptico.

Para realizar a contagem diferencial, 40-50 µL da solução ressuspensa com BSA (3%), foram adicionados em um Cytospin (Fanem), 100 rpm por 40 s, 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 imersão em óleo, com aumento de 1.000 vezes. O número de leucócitos encontrados foi expresso na forma de células por cavidade x10⁵.

4.4.4.3 Avaliação diferencial dos leucócitos presentes na cavidade pleural

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 escurridas 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 $\times 10^5$, como descrito anteriormente.

4.5 Avaliação da expressão e localização de PAR-2 em leucócitos de camundongos *naïves* desafiados com triptase de mastócitos

4.5.1 Determinação da expressão proteica de PAR-2 por Western blot

Para avaliar a expressão de PAR-2 em leucócitos, o lavado pleural de camundongos tratados com triptase (300 ng/0,1 ml) ou PBS foram obtidos 4, 8, 24 e 48 horas após a injeção i.pl do estímulo. Foram utilizados quatro animais para cada tempo. O lavado pleural foi centrifugado (4°C à 1300g) por 5 min. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuspenso e homogeneizado em 0,3 ml de tampão de lise (NaCl 150 mmol/L; Tris 50 mmol/L; EDTA.2Na 5 mmol/L; MgCl₂ 1 mmol/L) acrescido de 1% de Triton X-100, 0,5% de SDS e de coquetel de inibidores de proteases (SigmaFast®, Sigma).

O lisado foi centrifugado a 8000 g por 8 minutos, e a concentração de

proteínas no sobrenadante foi determinada por espectrofotometria pelo método de Bradford. Trinta microgramas de proteínas foram separadas em gel de poliacrilamida (10%) e transferidas para membrana de nitrocelulose (Millipore[®]). A qualidade da transferência foi monitorada através da coloração da membrana com solução de Ponceau 0,3%. A membrana foi então lavada em água destilada e colocada em solução de bloqueio (0,1% TBS-Tween; 3% de albumina sérica bovina), a 4°C *overnight*. Os seguintes anticorpos primários (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) foram utilizados: anticorpo policlonal anti-PAR-2 feito em cabra (1:1000) e anti- β -actina feito em camundongo (1:3000). Os anticorpos secundários (Millipore[®]) foram: anti-camundongo feito em cabra IgG-HRP (1:8.000) e anti-cabra feito em coelho IgG-HRP (1:8000). As bandas proteicas foram detectadas por uma reação de quimioluminescência (Luminata Western HRP *Substrates* - Millipore[®]) e a intensidade das mesmas foi avaliada por análise densitométrica através do software Image J 1.4 (National Institute of Health, USA). A β -actina foi utilizada como controle da quantidade de proteínas aplicadas às diferentes canaletas, sendo considerado como um normalizador.

4.5.2 Localização do receptor PAR-2 por imunocitoquímica

Os animais foram injetados por via intrapleural com triptase de mastócito (300 ng/0,1 ml) e após 24 ou 48 horas realizadas as coletas dos lavados pleurais e obtenção das preparações de células em citospin conforme descrito em 4.4.4.2, sendo as lâminas fixadas em álcool 70%. Antes de iniciar o procedimento de imunocitoquímica, as lâminas foram lavadas com PBS durante 5 minutos. Para o bloqueio da peroxidase endógena todas as lâminas foram incubadas em 10 % peróxido de hidrogênio (volume 30) para 90% de metanol durante 15 minutos, e repetiu-se este procedimento mais uma vez. Em seguida, as lâminas foram lavadas duas vezes com PBS durante 5 minutos cada.

Para o bloqueio da biotina endógena foi utilizado Ultra Block V (Thermos científico) e após o bloqueio, as lâminas foram incubadas com o anticorpo

primário anti-PAR-2 (Santa Cruz Biotechnology) por uma hora a 37°C. Na sequência foi aplicado o método de amplificação biotina-peroxidase com identificação a partir de anticorpo secundário e revelação polimérica (ADVANCE HRP – *ready to use* – Dako Cytomation). Por último, as células foram expostas ao cromógeno 3,3 – diaminobenzidina 4 HCl e contra-coradas com hematoxilina de Mayer's. Controles negativos foram obtidos pela substituição do anticorpo primário por PBS.

4.6 Análise Estatística

A construção dos gráficos e as análises estatísticas foram realizadas com auxílio dos programas Graph Pad Prism 5 e Sigma Stat 3.5, respectivamente. Os dados foram analisados por meio da análise de variância simples, one-way ANOVA, seguida pelo teste Newman-Keuls, que compara todos os grupos experimentais entre si, com exceção das análises de migração de 4h para a triptase e do western blotting para os quais foi utilizado o teste t de Student. 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 Recrutamento de eosinófilos induzido pelo agonista seletivo de PAR-2 (SLIGRL-NH₂) para a cavidade pleural dos camundongos

Inicialmente, foram realizados experimentos com o objetivo de determinar a dose do agonista seletivo de PAR-2 (SLIGRL-NH₂) capaz de induzir o recrutamento de eosinófilos para a cavidade pleural dos animais.

A administração de SLIGRL-NH₂ nas doses de 10 e 20 µg/cavidade não aumentou significativamente o número de eosinófilos na cavidade pleural dos camundongos 24 horas após a sua administração (**Figura 7**). A dose de 30 µg/cavidade, por sua vez, induziu aumento significativo no número de eosinófilos na cavidade pleural. Houve também aumento significativo do número de neutrófilos em relação aos valores basais desses após administração das doses de 20 e 30 µg/cavidade (**Tabela 1**). Diante desse resultado, a dose de 30 µg/cavidade foi adotada para ser utilizada nos experimentos posteriores de pleurisia induzida pelo agonista, como também pelo seu respectivo peptídeo controle LRGILS-NH₂.

A fim de avaliar o perfil temporal de migração de eosinófilos induzido pelo agonista na cavidade pleural dos camundongos, os animais foram tratados com SLIGRL-NH₂ e os leucócitos coletados 24, 48 e 72 horas após a administração do estímulo. Observou-se que a injeção intrapleural (i.pl.) do SLIGRL-NH₂ (30 µg/cavidade) induziu recrutamento de eosinófilos para a cavidade pleural, de modo tempo-dependente, com aumento de eosinófilos com 24 horas e pico 48 horas após sua administração (**Figura 8, Tabela 2**).

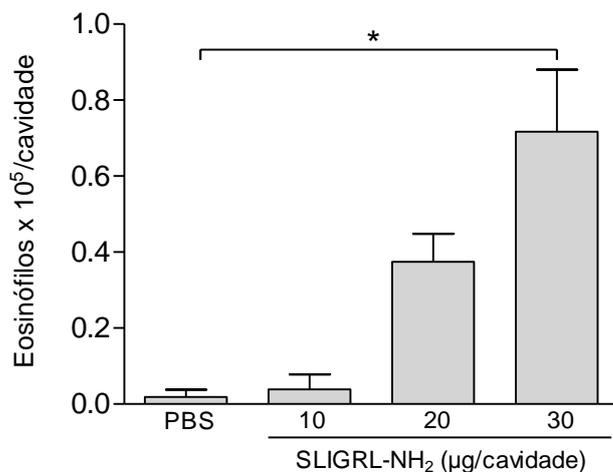


Figura 7. Migração de leucócitos para a cavidade pleural induzida pelo agonista PAR-2 SLIGRL-NH₂. Camundongos Balb/C foram desafiados com SLIGRL-NH₂ (10, 20 ou 30 µg/cavidade) ou PBS (0,1 ml/cavidade) por via intrapleural e o número de eosinófilos foi avaliado 24 horas após. As barras representam média ± e.p.m. de 5 a 6 animais por grupo. *p< 0.001 em relação ao grupo controle.

Tabela 1: Leucócitos presentes na cavidade pleural de camundongos 24 horas após administração i.pl. de diferentes doses de SLIGRL-NH₂.

	PBS	SLIGRL-NH ₂ (µg/cavidade)		
		10	20	30
Total	10,4 ± 0,7	10,9 ± 1,6	18,2 ± 1,0**	14,7 ± 1,4
Eosinófilos	0,01 ± 0,01	0,03 ± 0,03	0,4 ± 0,07	0,7 ± 0,1***
Mononucleares	10,4 ± 0,7	10,4 ± 1,5	16,2 ± 1,0*	13,1 ± 1,2
Neutrófilos	0,02 ± 0,02	0,5 ± 0,3	1,6 ± 0,1***	0,9 ± 0,1*

Os valores representam a média e o erro padrão da média x 10⁵ células. * p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001 em relação ao grupo controle. n=5 a 6.

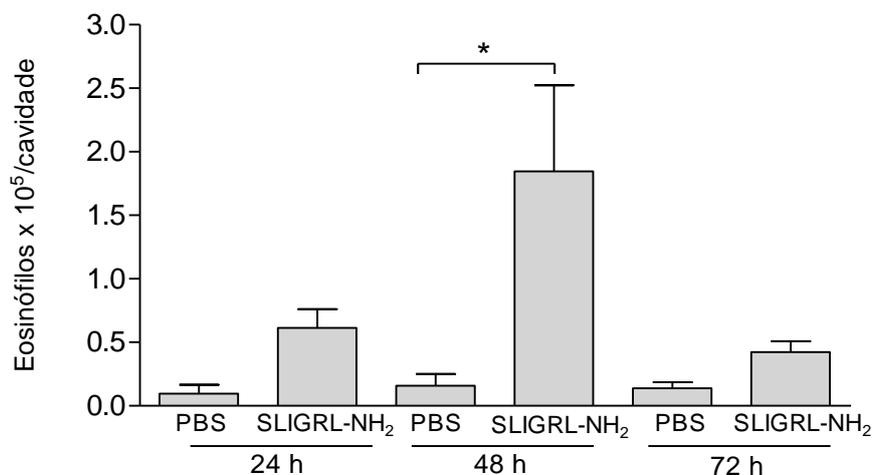


Figura 8. Migração de eosinófilos induzida pelo SLIGRL-NH₂ para a cavidade pleural de camundongos Balb/c em função do tempo. Os camundongos foram desafiados com SLIGRL-NH₂ (30 µg/cavidade) ou PBS (0,1 ml/cavidade) por via intrapleural e o número de eosinófilos foi avaliado 24, 48 e 72 horas após. As barras representam média ± e.p.m. de 6 a 7 animais por grupo. *p< 0,01 em relação ao grupo controle.

Tabela 2: Leucócitos presentes na cavidade pleural de camundongos 24, 48 e 72 horas após administração i.pl. de SLIGRL-NH₂ (30 µg/cavidade).

	Tempo (h)					
	24		48		72	
	PBS	SLIGRL-NH ₂	PBS	SLIGRL-NH ₂	PBS	SLIGRL-NH ₂
Total	12,3 ± 1,2	15,0 ± 1,3	18,7 ± 2,9	19,4 ± 1,9	16,3 ± 0,5	13,6 ± 1,2
Eosinófilos	0,09 ± 0,06	0,6 ± 0,1	0,2 ± 0,09	1,8 ± 0,6*	0,1 ± 0,04	0,4 ± 0,08
Mononucleares	12,1 ± 1,2	13,9 ± 1,1	18,5 ± 2,9	17,6 ± 1,4	16,2 ± 0,5	13,2 ± 1,2
Neutrófilos	0,1 ± 0,07	0,5 ± 0,1**	0,02 ± 0,02	0,04 ± 0,03	0 ± 0	0 ± 0

Os valores representam a média e o erro padrão da média x 10⁵ células. *p<0,01 e **p<0,001 em relação ao grupo controle do tempo respectivo. n=6 a 7.

5.2 Efeito induzido pelo pré-tratamento com antagonista de PAR-2 ENMD1068 sobre o recrutamento de eosinófilos induzido por OVA em modelo de pleurisia experimental alérgica

Primeiramente, foi avaliada a capacidade de um imunógeno em induzir o recrutamento de eosinófilos para a cavidade pleural de camundongos em função do tempo. Para isto, os camundongos foram previamente submetidos a um protocolo de imunização para o agente imunizante OVA e desafiados com a injeção i.pl. de 1 µg/cavidade de OVA, conforme descrito na seção de materiais e métodos. O número de leucócitos presentes nessas cavidades foi avaliado 24, 48 e 72 horas após. Assim, a administração i.pl. de OVA induziu recrutamento de eosinófilos 48 e 72, mas não 24 horas, após (**Figura 9**).

No próximo experimento, os camundongos imunizados foram pré-tratados por via i.pl. com o antagonista PAR-2 ENMD1068 (3, 10 e 30 µg/cavidade) 15 minutos antes da administração i.pl. de OVA (1 µg/cavidade), e as células presentes nesta cavidade avaliadas 48 horas após. O pré-tratamento com as três doses do antagonista de PAR-2 reduziu significativamente tanto o número total de leucócitos (**Tabela 3**) como a migração de eosinófilos para a cavidade pleural induzida pela OVA (**Figura 10**). Diante deste resultado, a dose de 3 µg/cavidade do antagonista de PAR-2 foi escolhida para ser utilizada nos experimentos posteriores, já que proporcionou inibição significativa e foi a menor dose utilizada.

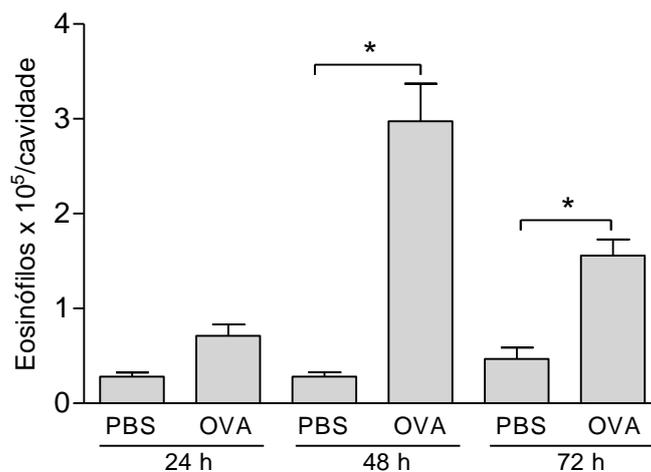


Figura 9: Recrutamento de eosinófilos induzido pela ovalbumina (OVA) para a cavidade pleural de camundongos Balb/c em função do tempo. Os animais foram imunizados durante duas semanas por via subcutânea com $\text{Al}(\text{OH})_3$ + OVA (0,5 mg/ml, OVA) ou apenas com $\text{Al}(\text{OH})_3$ (0,1 ml, PBS) e então desafiados por via i.pl. com OVA (1 μg /cavidade) ou PBS (0,1 ml/cavidade). O número de eosinófilos foi avaliado 24, 48 e 72 horas após o desafio. As barras representam média \pm e.p.m. de 6 a 7 animais por grupo. * $p < 0,001$ em relação ao grupo controle.

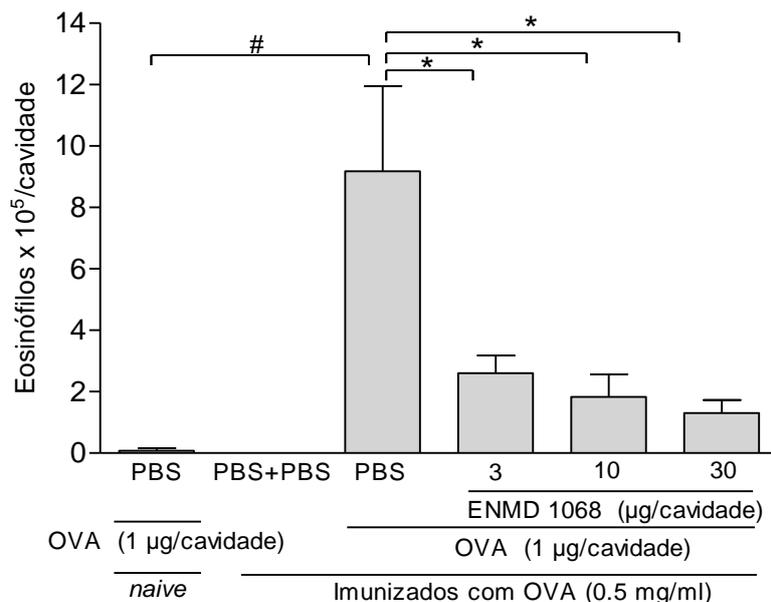


Figura 10. Efeito induzido pelo ENMD1068 (antagonista de PAR-2) sobre o recrutamento de eosinófilos para a cavidade pleural induzido por OVA. Os animais foram imunizados durante duas semanas por via subcutânea com Al(OH)₃ + OVA (0,5 mg/ml, OVA) ou apenas com Al(OH)₃ (0,1 ml, animais *naive*) e então desafiados com OVA (1 µg/cavidade, via i.pl.) ou PBS (0,1 ml, i.pl.) em animais pré-tratados ou não com ENMD1068 (3, 10 ou 100 µg/cavidade). O número de eosinófilos presentes na cavidade pleural dos animais foi avaliado 48 horas após o desafio. As barras representam média ± e.p.m. de 5 a 6 animais por grupo. [#]p < 0,001 em relação ao grupo controle, ^{*}p < 0,001 em relação ao grupo desafiado com OVA.

Tabela 3: Leucócitos presentes na cavidade pleural de camundongos em resposta a injeção i.pl. de diferentes doses de ENMD1068 em pleurisia experimental induzida por OVA (1 µg/cavidade).

	Animais <i>naive</i>		Animais imunizados (OVA 0.5mg/ml)			
	PBS+OVA	PBS+PBS	PBS	OVA (1µg/cavidade)		
				ENMD1068 (µg/cavidade)		
			3	10	30	
Total	20,3 ± 2,5	16,3 ± 1,6	54,0 ± 5,0 ^{& *}	29,4 ± 4,5 ^{###}	37,5 ± 4,5 ^{##}	35,8 ± 3,3 ^{##}
Eosinófilos	0,08 ± 0,08	0,0 ± 0,0	9,2 ± 2,7 ^{& *}	2,6 ± 0,6 ^{###}	1,8 ± 0,7 ^{###}	1,3 ± 0,4 ^{###}
Mononucleares	20,2 ± 2,5	16,3 ± 1,6	44,8 ± 2,6 ^{& *}	26,8 ± 4,0 ^{##}	34,8 ± 4,2	33,9 ± 3,3
Neutrófilos	0,1 ± 0,06	0,0 ± 0,0	0 ± 0	0 ± 0	0,9 ± 0,2 ^{###}	0,6 ± 0,2 [#]

Os valores representam a média e o erro padrão da média x 10⁵ células. [&]p < 0,001 em relação ao grupo controle/*naive*; ^{*}p < 0,001 em relação ao grupo controle (PBS+PBS); [#]p < 0,05 ^{##}p < 0,01 ^{###}p < 0,001 em relação ao grupo desafiado com OVA. n=5 a 6.

5.3 Recrutamento de eosinófilos induzido pela triptase de mastócitos para a cavidade pleural dos camundongos

A triptase é uma serino-protease liberada por mastócitos ativados durante processos alérgicos e ligante natural de PAR-2. A fim de avaliar a capacidade desta protease em recrutar eosinófilos, os animais foram tratados por via i.pl. com as doses de 30, 100 e 300 ng/cavidade e o acúmulo de leucócitos avaliado 24 horas após. As doses de 30 e 100 ng/cavidade não induziram recrutamento de eosinófilos ou de outros leucócitos na cavidade pleural dos camundongos. No entanto, a dose de 300 ng/cavidade induziu recrutamento de eosinófilos, bem como de células mononucleares (**Tabela 4, Figura 11**). Diante desse resultado, a dose de 300 ng/cavidade foi escolhida para ser utilizada nos experimentos posteriores de pleurisia induzida por triptase.

Para avaliar o perfil de migração de eosinófilos induzida pelo agonista para a cavidade pleural dos camundongos em função do tempo, os animais foram tratados com triptase (300 ng/cavidade) e os leucócitos pleurais coletados 24, 48 e 72 horas após a administração do agonista. Observou-se que a triptase induziu recrutamento máximo de eosinófilos 24 horas após o estímulo (**Figura 12**), como também um aumento significativo no número de células mononucleares e neutrófilos (**Tabela 5**). A **Figura 13** representa essa maior migração de leucócitos, através de microscopia óptica.

O mesmo protocolo foi realizado em tempo menor, 4 horas, a fim de avaliar se a administração de triptase (300 ng/cavidade) seria capaz de induzir o recrutamento de neutrófilos para a cavidade pleural de camundongos. Após este intervalo, o agonista induziu o recrutamento de eosinófilos (**Figura 14**), assim como também induziu o recrutamento de outros leucócitos, tais como os neutrófilos e células mononucleares (**Tabela 6**).

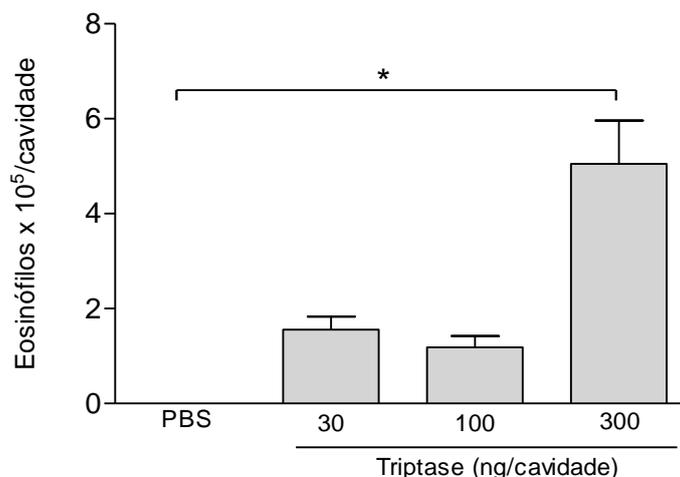


Figura 11. Migração de eosinófilos para a cavidade pleural induzida pela triptase de mastócitos. Os camundongos foram desfiados com a injeção i.pl. de triptase (30, 100, 300 ng/cavidade) ou PBS (0,1 ml), e o número de eosinófilos foi avaliado 24 horas após. As barras representam média \pm e.p.m. de 5 a 7 animais por grupo. * $p < 0,001$ em relação ao grupo controle.

Tabela 4: Leucócitos presentes na cavidade pleural de camundongos 24 horas após administração i.pl. de diferentes doses de triptase.

	PBS	Triptase (ng/cavidade)		
		30	100	300
Total	11,6 \pm 1,7	24,2 \pm 3,6	17,4 \pm 3,4	37,7 \pm 7,0*
Eosinófilos	0,0 \pm 0,0	1,5 \pm 0,2	1,2 \pm 0,2	5,0 \pm 0,9**
Mononucleares	11,2 \pm 1,4	22,7 \pm 3,6	16,2 \pm 3,1	32,4 \pm 6,2*
Neutrófilos	0,4 \pm 0,2	0,04 \pm 0,04	0,05 \pm 0,05	0,3 \pm 0,1

Os valores representam a média e o erro padrão da média $\times 10^5$ células. * $p < 0,01$ ** $p < 0,001$ em relação ao grupo controle. n=5 a 7.

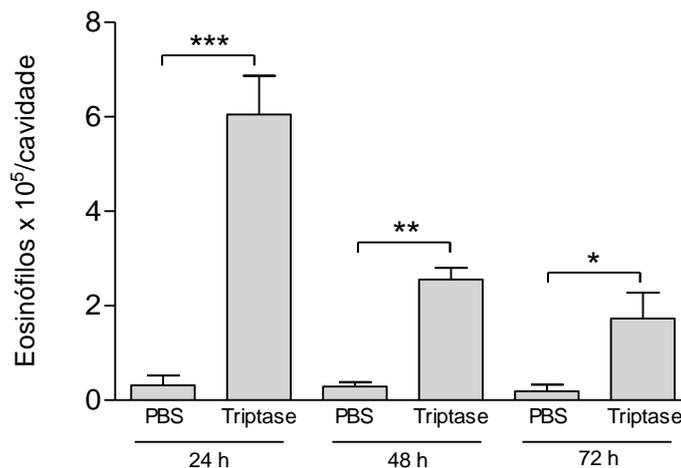


Figura 12. Migração de eosinófilos induzida pela triptase para a cavidade pleural de camundongos Balb/c em função do tempo. Os camundongos foram desafiados por via i.pl. com Triptase (300 ng/cavidade) ou PBS (0,1ml), e o número de eosinófilos foi avaliado 24, 48 e 72 horas após. As barras representam média ± e.p.m. de 4 a 6 animais por grupo. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$ em relação ao grupo controle.

Tabela 5: Leucócitos presentes na cavidade pleural de camundongos 24, 48 e 72 horas após administração i.pl. de triptase (300 ng/cavidade).

	Tempo (h)					
	24		48		72	
	PBS	Triptase	PBS	Triptase	PBS	Triptase
Total	25,6 ± 1,2	47,2 ± 3,7***	15,5 ± 1,4	24,1 ± 1,3*	12,5 ± 1,9	23,0 ± 1,8**
Eosinófilos	0,3 ± 0,2	6,0 ± 0,8***	0,3 ± 0,1	2,5 ± 0,2**	0,2 ± 0,1	1,7 ± 0,5*
Mononucleares	23,3 ± 1,9	37,1 ± 3,3 ***	15,2 ± 1,4	21,6 ± 1,4	12,3 ± 1,8	21,1 ± 1,7**
Neutrófilos	1,9 ± 1,4	4,1 ± 0,2*	0,02 ± 0,02	0 ± 0	0 ± 0	0,1 ± 0,1

Os valores representam a média e o erro padrão da média x 10⁵ células. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$ em relação ao grupo controle do tempo respectivo. n=4 a 6.

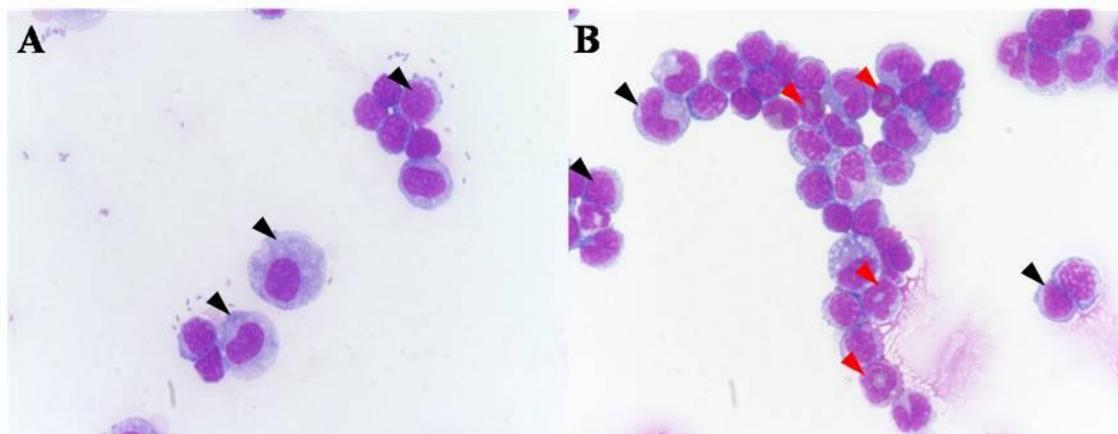


Figura 13. Leucócitos de lavado pleural corados pelo método de May Grunwald-Giemsa. Os camundongos foram desafiados por via i.pl. com: (A) PBS (0,1 ml) ou (B) triptase (300 ng/cavidade) e os leucócitos foram avaliados 24 horas após o estímulo. A figura representa os leucócitos de lavado pleural, eosinófilos (setas vermelhas) e mononucleares (setas pretas), visualizados em microscópio óptico acoplado a um sistema de fotografia (aumento de 1000x) que foram montados em lâmina de vidro e corados pelo método de May Grunwald-Giemsa.

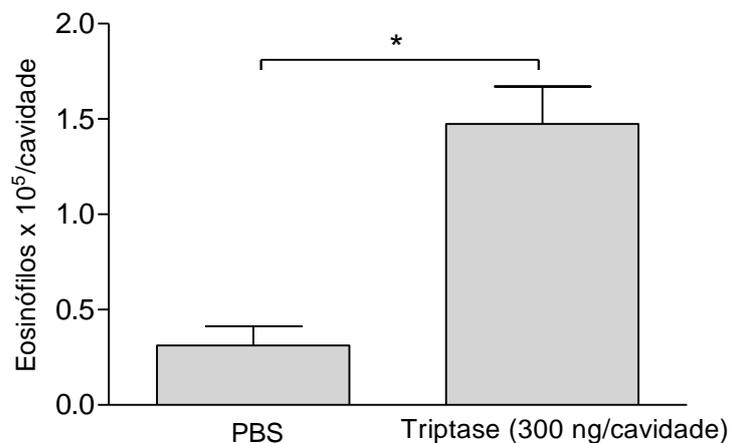


Figura 14. Migração de eosinófilos para a cavidade pleural de camundongos induzida pela triptase. Os camundongos foram desafiados por via i.pl. com triptase (300 ng/cavidade) ou PBS (0,1 ml) e o número de eosinófilos foi avaliado 4 horas após. As barras representam média \pm e.p.m. de 5 animais por grupo. Análise estatística foi realizada através do Student's t-test com correção de Welch's, onde * P = 0,0033 em relação ao grupo controle.

Tabela 6: Leucócitos presentes na cavidade pleural de camundongos 4 horas após administração i.pl. de triptase (300 ng/cavidade).

	PBS	Triptase (300 ng/cavidade)
Total	23,4 \pm 2,8	53,3 \pm 5,8***
Eosinófilos	0,3 \pm 0,1	1,5 \pm 0,2****
Mononucleares	23,0 \pm 0,3	43,6 \pm 4,2**
Neutrófilos	0,1 \pm 0,1	8,2 \pm 2,1*

Os valores representam a média e o erro padrão da média x 10⁵ células. *p<0,02 **p<0,007 ***p<0,0059 ****p<0,0033 em relação ao grupo controle. n=5.

Para avaliar se a migração de eosinófilos induzida pela triptase é devido a sua atividade proteolítica, os animais foram tratados com triptase não-fervida (300 ng/cavidade) ou triptase fervida (300 ng/cavidade) e os leucócitos pleurais coletados 24 horas após a administração do agonista. O tratamento com triptase não-fervida (300 ng/cavidade) recrutou eosinófilos para a cavidade pleural (**Figura 15**), assim como já demonstrado em experimentos anteriores (**Figura 12**, **Figura 14**), enquanto que a triptase inativada pela fervura não induziu a migração de eosinófilos, mostrando que esse efeito é dependente de sua atividade proteolítica.

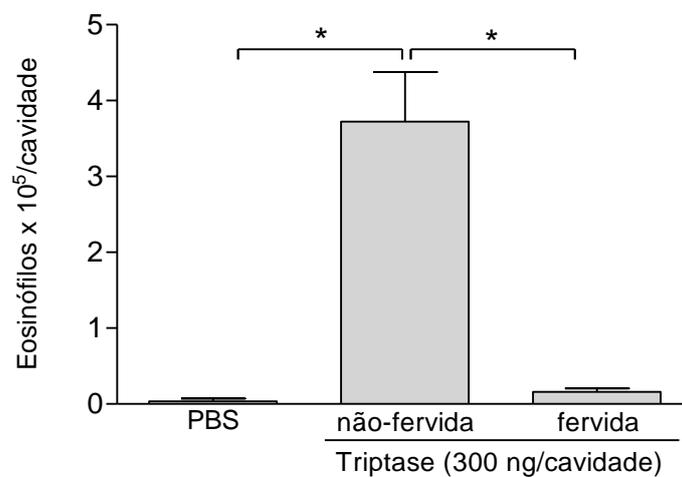


Figura 15. Recrutamento de eosinófilos para a cavidade pleural induzido por triptase é eliminado por exposição da enzima ao calor. Os camundongos foram desafiados por via i.pl. com triptase (300 ng/cavidade) ou triptase fervida (300 ng/cavidade) ou PBS (0,1ml), e o número de eosinófilos foi avaliado 24 horas após. As barras representam média ± e.p.m. de 5 a 6 animais por grupo, * $p < 0,0001$.

5.4 Avaliação da participação do receptor PAR-2 sobre a migração de eosinófilos na pleurisia induzida pela triptase

Uma vez que o tratamento com o antagonista PAR-2 reduziu a migração de eosinófilos para a cavidade pleural induzida pela OVA, decidimos investigar se o antagonista de PAR-2 também inibiria o recrutamento de eosinófilos induzido por triptase. Os camundongos foram tratados por via i.pl. com ENMD1068 (3 µg/cavidade) 15 minutos antes da administração i.pl. de triptase (300 ng/cavidade). O tratamento com ENMD1068 reduziu significativamente o número de eosinófilos na cavidade pleural induzido pela triptase quando avaliado 24 horas após estímulo (**Figura 16**). Também houve redução significativa do acúmulo das células mononucleares, como demonstrado na **Tabela 7**.

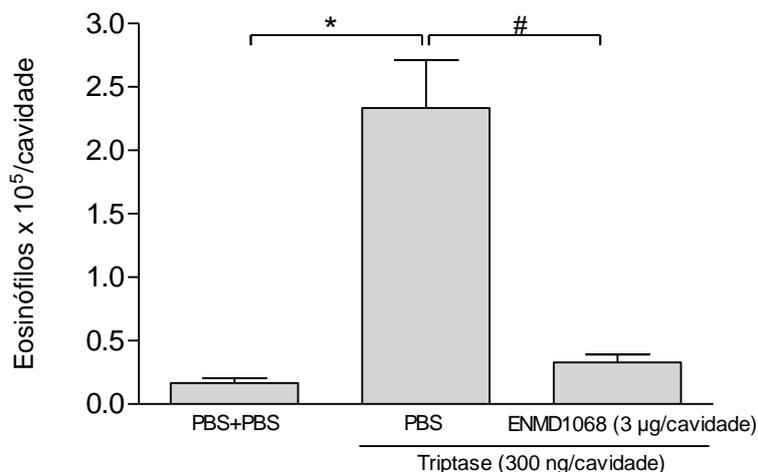


Figura 16. Efeito do pré-tratamento com ENMD1068 sobre a migração de eosinófilos induzida pela administração intrapleural de triptase. Os animais foram pré-tratados com ENMD1068 (3 µg/cavidade) ou PBS (0,1 ml) por via intrapleural, 15 minutos antes do desafio com Triptase (300 ng/cavidade). O número de eosinófilos foi avaliado 24 horas após o desafio. As barras representam média ± e.p.m. de 6 a 8 animais por grupo. *p< 0,001 em relação ao grupo controle, #p<0,001 em relação ao grupo tratado com triptase.

Tabela 7: Leucócitos presentes na cavidade pleural de camundongos em resposta a injeção i.pl. de ENMD1068 (3 µg/cavidade) em pleurisia experimental induzida por triptase (300 ng/cavidade).

	Triptase (300 ng/cavidade)		
	PBS+PBS	PBS	ENMD1068 (3 µg/cavidade)
Total	11,3 ± 1,4	20,9 ± 1,5**	13,6 ± 1,3##
Eosinófilos	0,1 ± 0,03	2,3 ± 0,4**	0,3 ± 0,06###
Mononucleares	11,2 ± 1,4	18,5 ± 1,7*	13,2 ± 1,2#
Neutrófilos	0,01 ± 0,01	0,08 ± 0,04	0,06 ± 0,04

Os valores representam a média e o erro padrão da média x 10⁵ células. *p<0,01 **p<0,001 em relação ao grupo controle, #p<0,05 ##p<0,01 ###p<0,001 em relação ao grupo tratado com triptase. n=6 a 8.

Uma vez confirmada a participação do PAR-2 no recrutamento de eosinófilos induzido por triptase, experimentos foram realizados a fim de demonstrar a expressão de PAR-2 em leucócitos obtidos do lavado pleural, dos animais desafiados com 300 ng/cavidade de triptase. Para isto, os lavados pleurais de camundongos tratados com triptase ou PBS foram obtidos 4, 8, 24 e 48 horas após a injeção i.pl do estímulo. A determinação da produção de PAR-2 foi realizada por meio de *Western blot*. A expressão proteica de PAR-2 foi significativamente aumentada 24 horas após o desafio com triptase, em relação ao seu controle (**Figura 17**).

Para verificar a presença e localização do PAR-2 nos leucócitos obtidos do lavado pleural, os animais foram tratados com triptase (300 ng/cavidade) e submetidos à eutanásia 24 ou 48 horas após. Após coleta do lavado pleural e centrifugação da amostra, as células foram preparadas em citospin sobre lâminas gelatinizadas e realizado o processo de imunocitoquímica utilizando anticorpo anti-PAR-2. Houve marcação de PAR-2 em eosinófilos e em células mononucleares, 24 e 48 horas após a injeção de triptase (**Figura 18**).

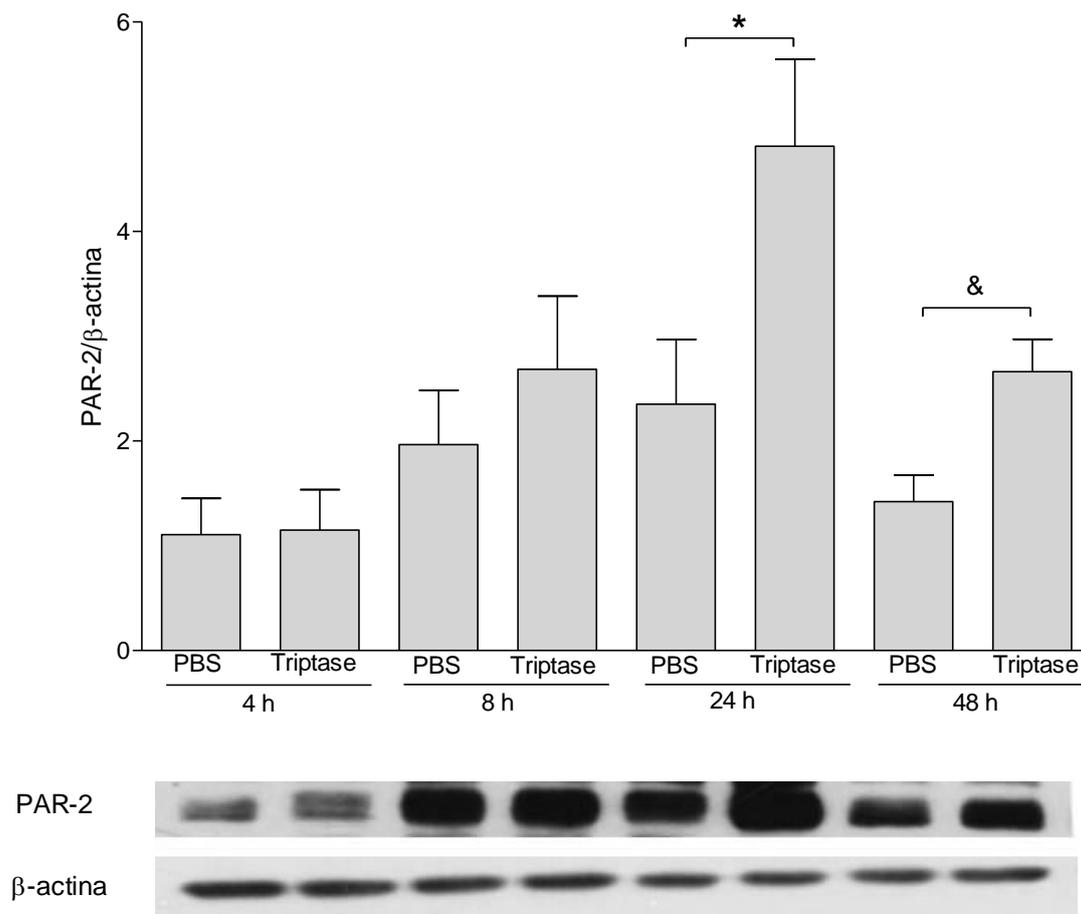


Figura 17. Expressão de PAR-2 após injeção intrapleural de triptase. Os camundongos foram desafiados com triptase (300 ng/cavidade) por via i.pl. e o lavado pleural foi coletado em diferentes tempos após o desafio. Este gel é representativo de quatro experimentos com resultados similares. Os resultados foram normalizados pela β -actina contida em cada amostra. A análise estatística foi realizada através do Student t-test. * $p=0,0486$ & $p=0,017$.

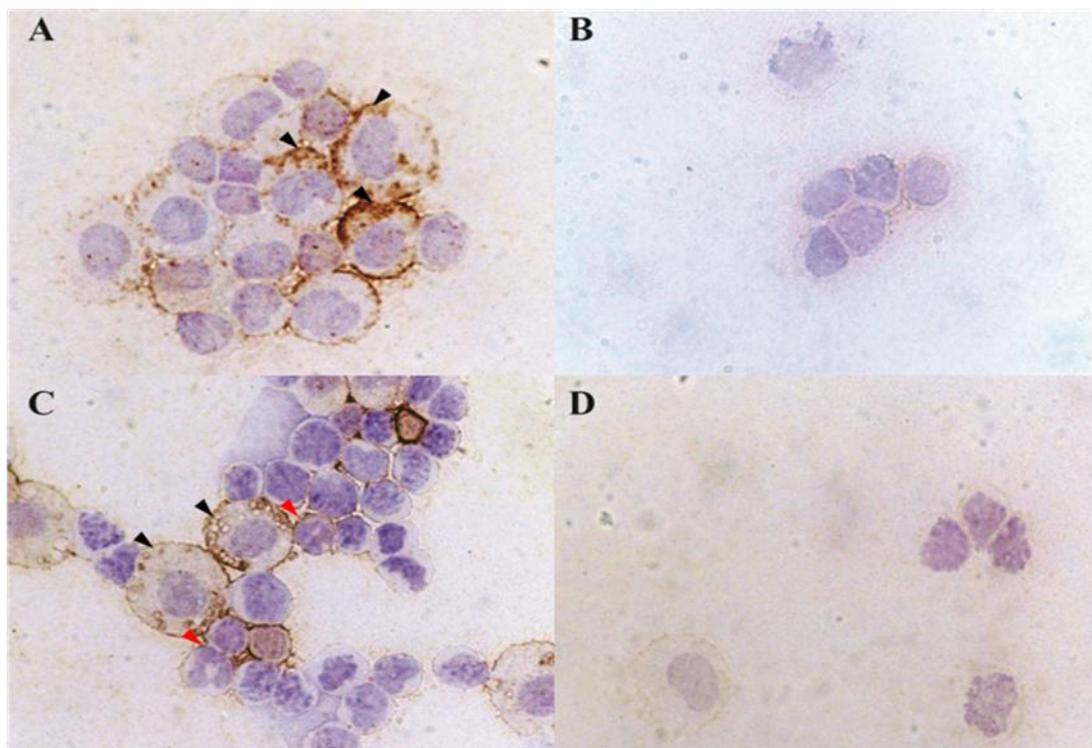


Figura 18. Imuno-localização de PAR-2 em leucócitos pleurais após administração de triptase. Os camundongos foram desafiados com triptase (300 ng/cavidade) por via intrapleural e as células foram coletadas 24 h (a) ou 48 h (c) após o desafio. PAR-2 foi localizado em eosinófilos (setas vermelhas) e em células mononucleares (setas pretas). O controle negativo foi obtido por meio da omissão do anticorpo primário (b e d) para cada tempo. A figura é representativa de três experimentos com resultados similares.

5.5 Avaliação do pré-tratamento com inibidor de triptase de mastócitos (APC366) no recrutamento de eosinófilos induzido por SLIGRL-NH₂

Uma vez que demonstramos que a triptase é capaz de induzir recrutamento de eosinófilos quando administrada por via i.pl. e que atua por meio da ativação de PAR-2, resolvemos investigar a participação da triptase endógena para a migração de eosinófilos induzida pelo agonista seletivo do PAR-2. Dessa forma os camundongos foram pré-tratados com o inibidor de triptase APC366 (5 mg/Kg, s.c) 1 hora antes da administração i.pl. de SLIGRL-NH₂ (30 µg/cavidade). O tratamento com APC366 reduziu significativamente o número de eosinófilos na cavidade pleural induzido pelo SLIGRL-NH₂ 24 horas após o estímulo i.pl. (**Figura 19**).

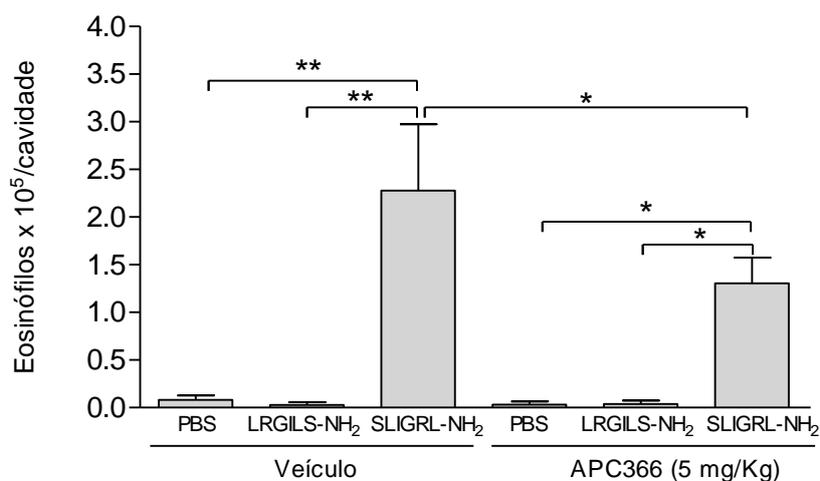


Figura 19. Efeito induzido pelo pré-tratamento com APC366 (inibidor de triptase) na migração de eosinófilos induzida pela administração i.pl. de SLIGRL-NH₂. Os animais foram pré-tratados com APC 366 (5 mg/kg) ou com veículo (DMSO 20%+PBS 80%) por via subcutânea 1 hora antes do desafio i.pl. com SLIGRL-NH₂ (30 µg/cavidade) ou PBS (0,1 ml) ou peptídeo controle LRGILS-NH₂ (30 µg/cavidade). O número de eosinófilos foi avaliado 24 horas após o desafio. As barras representam média ± e.p.m. de 4 a 5 animais por grupo. *p < 0,05 ** p < 0,001.

5.6 Avaliação da participação do receptor PAR-2 na migração de eosinófilos na pleurisia induzida pela eotaxina-1

Uma vez que demonstramos que a ativação do PAR-2 em modelo de pleurisia experimental está envolvida na migração de eosinófilos induzida pelo peptídeo sintético (SLIGRL-NH₂), pelo antígeno (OVA) ou pelo agonista endógeno de PAR-2 (triptase de mastócitos), resolvemos investigar a importância deste receptor para o recrutamento de eosinófilos induzido pela eotaxina-1, uma quimiocina seletiva para o tráfego de eosinófilos e também presente em respostas alérgicas. Dessa forma, os camundongos foram pré-tratados por via i.pl. com ENMD1068 (3 µg/cavidade) 15 minutos antes da administração i.pl. de eotaxina-1 100 ng/cavidade. O tratamento com ENMD1068 reduziu significativamente a migração de eosinófilos para a cavidade pleural induzida pela eotaxina-1 48 horas após o estímulo (**Figura 20**). Esta inibição no recrutamento se mostrou seletiva para essas células, uma vez que o pré-tratamento com ENMD1068 não alterou o número de mononucleares em animais desafiados com eotaxina-1 (**Tabela 8**).

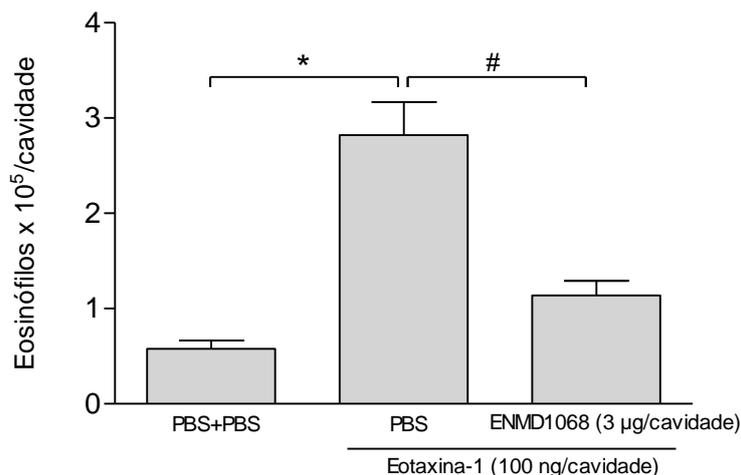


Figura 20. Efeito induzido pelo ENMD1068 sobre o recrutamento de eosinófilos para a cavidade pleural induzida pela eotaxina-1. Os animais foram pré-tratados com ENMD1068 (3 µg/cavidade) ou PBS (+0,1% BSA) por via intrapleural 15 minutos antes do desafio i.pl. com eotaxina-1 (100 ng/cavidade). O número de eosinófilos foi avaliado 48 horas após o desafio. As barras representam média ± e.p.m. de 6 a 7 animais por grupo. * $p < 0,001$ em relação ao grupo controle, # $p < 0,001$ em relação ao grupo tratado com eotaxina-1.

Tabela 8: Leucócitos presentes na cavidade pleural de camundongos em resposta a injeção i.pl. de ENMD1068 (3 µg/cavidade) em pleurisia experimental induzida por eotaxina-1 (100 ng/cavidade).

	PBS+PBS	Eotaxina-1 (100 ng/ cavidade)	
		PBS	ENMD1068 (3µg/cavidade)
Total	29,9 ± 6,3	23,2 ± 3,1	21,3 ± 2,9
Eosinófilos	0,6 ± 0,08	2,8 ± 0,3*	1,1 ± 0,1 [#]
Mononucleares	28,8 ± 6,4	20,0 ± 2,9	19,9 ± 2,8
Neutrófilos	0,5 ± 0,3	0,4 ± 0,1	0,3 ± 0,1

Os valores representam a média e o erro padrão da média x 10⁵ células. * $p < 0,001$ em relação ao grupo controle, # $p < 0,001$ em relação ao grupo tratado com eotaxina-1. n=6 a 7.

Uma vez demonstrada a participação do PAR-2 na eosinofilia induzida pela eotaxina-1, resolvemos investigar se o inibidor de triptase APC366, também seria capaz de inibir o recrutamento de eosinófilos induzido pela eotaxina-1. Os camundongos foram tratados com APC366 (5 mg/Kg, s.c) 1 hora antes da administração i.pl. de eotaxina-1 100 ng/cavidade. O tratamento com APC366 reduziu significativamente o número de eosinófilos na cavidade pleural induzido pela eotaxina-1 48 horas após o estímulo i.pl. (**Figura 21**).

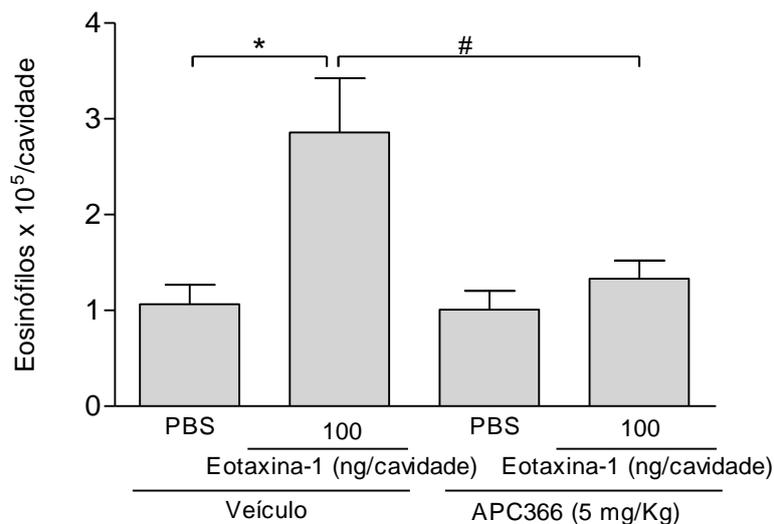


Figura 21. Efeito induzido pelo pré-tratamento com APC366 (inibidor de triptase) na migração de eosinófilos induzida pela administração i.pl. eotaxina-1. Os animais foram pré-tratados (1 hora antes do desafio) com APC366 (5 mg/kg/0,1 ml, s.c.) ou com veículo (DMSO 20%+PBS 80% /0,1 ml, s.c.), uma hora antes do desafio i.pl. com Eotaxina-1 (100ng/cavidade) ou PBS (0,1 ml). As barras representam média \pm e.p.m. de 6 a 7 animais por grupo. O número de eosinófilos foi avaliado 48 horas após o desafio. * $p < 0,01$ em relação ao grupo controle, # $p < 0,01$ em relação ao grupo tratado com eotaxina-1.

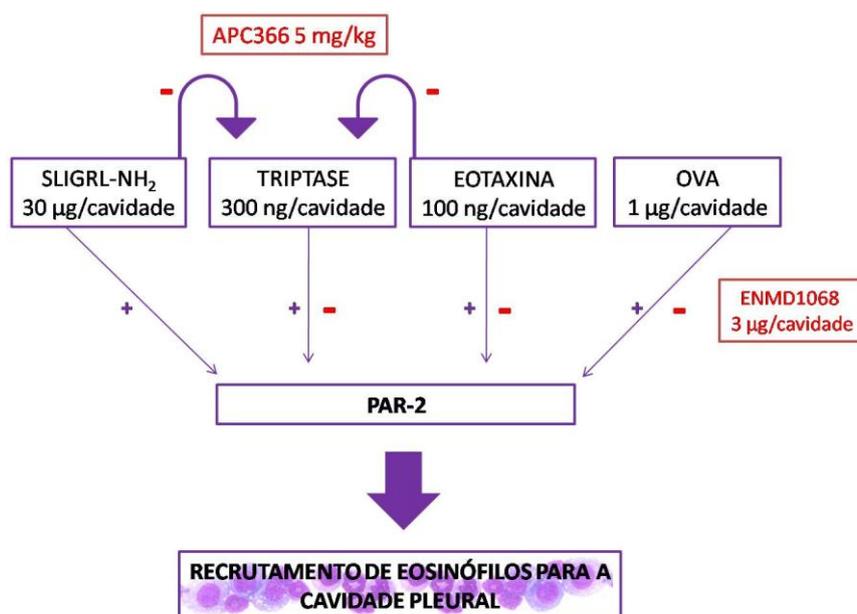


Figura 22. Esquema final. Os estímulos utilizados neste estudo induziram o recrutamento de eosinófilos para a cavidade pleural dos camundongos via ativação de PAR-2 uma vez que o bloqueio deste receptor, com o antagonista, inibiu esse recrutamento. A inibição da triptase endógena via APC366 também inibiu a migração de eosinófilos em pleurisia experimental. Nossos dados quando analisados em conjunto, sugerem a participação do PAR-2 para o desenvolvimento da resposta inflamatória para a cavidade pleural dos camundongos.

6. DISCUSSÃO

A indução de pleurisia em murinos constitui um modelo de inflamação bem descrito, sendo utilizada para o estudo de drogas com potencial para reduzir parâmetros inflamatórios, como formação de exsudato, extravasamento de proteínas ou migração de leucócitos para tecidos inflamados (Ackerman *et al.*, 1980). Neste modelo, tanto o tecido mesotelial como as células mononucleares residentes funcionam como gatilhos da resposta inflamatória, uma vez que em resposta a alguma lesão liberam mediadores lipídicos, aminas, citocinas e quimiocinas e promovem a expressão de moléculas de adesão tanto nas células do endotélio vascular como nos leucócitos, levando ao recrutamento de leucócitos da microcirculação adjacente para a cavidade pleural. Além disso, após um estímulo inflamatório, as células mesoteliais contribuem diretamente para o desenvolvimento da pleurisia, uma vez que são capazes de secretar IL-8/CXCL8, proteína inflamatória de macrófago (MIP)-1 α /CCL3, proteína quimiotática de monócitos (MCP)-1/CCL2 e interferon (IFN)- γ que atuam no recrutamento de neutrófilos e na ativação e recrutamento de mononucleares (ANTONY, 2003; CAILHIER *et al.*, 2006).

A pleurisia experimental vem sendo utilizada para o estudo das ações de PAR na inflamação induzida por diferentes estímulos. Utilizando este modelo, nosso grupo vem demonstrando um papel dos PAR no controle do recrutamento de leucócitos para o sítio inflamatório. Assim, Braga e colaboradores (2010) demonstraram que o recrutamento de eosinófilos é dependente das ações da serino-potese tripsina e da ativação de PAR-4. Demonstramos, ainda, que o tratamento de camundongos BALB/c com o antagonista de PAR-4 tcY-NH₂ inibe o recrutamento de neutrófilos para a cavidade pleural induzida por carragenina e que tripsina induz um recrutamento de neutrófilos de modo dose-dependente via este receptor (GOMIDES *et al.*, 2012). No presente estudo, utilizamos o modelo de pleurisia induzida por antígeno em animais previamente sensibilizados, por triptase de mastócitos, peptídeo ativador de PAR-2 (SLIGRL-NH₂) ou pela quimiocina eotaxina-1 em animais *naive* para estudar o papel de PAR-2 no recrutamento de eosinófilos.

Inicialmente, avaliamos a capacidade do peptídeo ativador de PAR-2 em induzir recrutamento de eosinófilos e sua importância para a regulação deste fenômeno. Nossos resultados mostram que a ativação de PAR-2 induziu o recrutamento de eosinófilos no modelo de pleurisia e estão de acordo com evidências encontradas na literatura que mostram a participação deste receptor no recrutamento de leucócitos neste modelo experimental, no qual o agonista de PAR-2 SLIGRL-NH₂ foi capaz de ativar o receptor presente em células mesoteliais da pleura e de promover liberação de quimiocinas, aumento dos níveis de TNF- α , MIP-2 e recrutamento de neutrófilos para a cavidade pleural (LEE *et al.*, 2005)

O recrutamento de leucócitos a partir da microcirculação adjacente ao tecido constitui um evento de importância fundamental para os mecanismos de imunidade natural e adaptativa do organismo. Por outro lado, o acúmulo de leucócitos nos compartimentos extravasculares também pode ocasionar lesão tecidual em decorrência da liberação excessiva de substâncias tóxicas, incluindo proteases e espécies reativas de oxigênio, que modulam a permeabilidade vascular e a produção de mediadores inflamatórios, resultando no desenvolvimento de quadros patológicos ou ainda contribuindo para o agravamento de doenças já estabelecidas (LIU *et al.*, 2004; HEIT *et al.*, 2002; GUO, WARD, 2002). Nos pulmões, a migração transendotelial, que é a passagem dos leucócitos circulantes dos vasos sanguíneos para o parênquima pulmonar, está relacionada à patogenia de doenças inflamatórias, como por exemplo a asma, a bronquite aguda e a doença pulmonar obstrutiva crônica (BLOEMEN *et al.*, 1997, HAMID *et al.*, 2003). No caso de doenças alérgicas, as proteases liberadas são capazes de amplificar a resposta inflamatória por comprometer a permeabilidade do epitélio brônquico (WAN *et al.*, 1999).

Nos últimos anos, estudos têm demonstrado o envolvimento de PAR-2 no recrutamento e na ativação de leucócitos (VERGNOLLE, 1999; MIIKE *et al.*, 2001), assim como agonistas de PAR têm sido relacionados com a produção de quimiocinas, indução da expressão de moléculas de adesão E e P-selectinas em células endoteliais, de molécula-1 de adesão de célula vascular (VCAM-1) e de molécula-1 de adesão intercelular (ICAM-1) (MIIKE *et al.*, 2001; SENDEN *et al.*, 1998). No entanto, embora existam na literatura alguns estudos mostrando a presença e ativação de receptores de PAR-2 em eosinófilos,

ainda não estão bem esclarecidos os mecanismos moleculares envolvidos na sinalização desencadeada pela ativação deste receptor pelos seus respectivos agonistas (MIIKE *et al.*, 2001; BOLTON *et al.*, 2003), assim como existem dados conflitantes em relação ao recrutamento de eosinófilos mediado pela ativação de PAR-2. Desta forma, Vliagoftis e colaboradores (2001) demonstraram que a ativação de PAR-2 por agonistas em células epiteliais das vias aéreas induz a liberação de metaloproteinase-9 (MMP-9) e de fator estimulante de granulócitos e monócitos (GM-CSF) que juntos promovem a sobrevivência de eosinófilos. Além do mais, em modelo de inflamação alérgica induzida por OVA em camundongos que não expressam PAR-2, houve diminuição da infiltração de eosinófilos para os pulmões, como também ocorreu um aumento desta infiltração em animais que superexpressam este receptor (SCHMIDLIN *et al.*, 2002). Ao contrário desses achados, De Campo & Henry (2005) sugeriram um efeito antiinflamatório resultante da ativação de PAR-2, uma vez que a administração intranasal do peptídeo ativador de PAR-2 em camundongos desafiados com OVA inibiu a infiltração eosinofílica quando comparados aos animais tratados com peptídeo controle.

Uma vez que os efeitos mediados por PAR podem ser mimetizados por meio do uso de peptídeos sintéticos que são semelhantes à sequência de aminoácidos do ligante específico e agem como agonistas (SCARBOROUGH *et al.*, 1992), experimentos iniciais foram realizados com o peptídeo ativador de PAR-2 SLIGRL-NH₂. Esse peptídeo tem sido ferramenta essencial para a elucidação da ação deste subtipo de receptor ativado por protease (BARRY *et al.*, 2010; SCARBOROUGH *et al.*, 1992), a fim de avaliar sua capacidade em induzir o recrutamento de eosinófilos para a cavidade pleural de camundongos. Em estudo utilizando este mesmo agonista, Vergnolle (1999) demonstrou o seu papel pró-inflamatório, uma vez que a injeção intraperitoneal deste peptídeo induziu recrutamento de polimorfonucleares para a cavidade peritoneal, assim como um aumento no rolamento e adesão de leucócitos. Em nosso estudo, a injeção do peptídeo ativador induziu o recrutamento de eosinófilos para a cavidade pleural de camundongos de maneira dose e tempo dependente, sugerindo que a migração de eosinófilos é dependente da via de ativação de PAR-2 também neste modelo experimental.

Os mecanismos que medeiam o recrutamento de eosinófilos para o foco inflamatório têm sido uma área de bastante interesse para a pesquisa principalmente para inflamação alérgica das vias aéreas nas quais a presença dos eosinófilos torna-se um marcador importante para o quadro clínico do paciente. Estudos publicados na última década têm sugerido a participação de PAR-2 na inflamação de natureza alérgica. Assim, em modelo experimental de inflamação alérgica induzida por OVA após desafio com o imunógeno em animais nocautes para o receptor houve uma redução de 73% da infiltração eosinofílica, enquanto a superexpressão de PAR-2 exacerbou esta resposta em 88% quando comparado aos animais selvagens (SCHIMIDLIN *et al.*, 2002). A administração conjunta de peptídeo ativador de PAR-2 e OVA foi capaz de aumentar significativamente o número de leucócitos totais e as concentrações de IL-13 e TNF α no lavado broncoalveolar (BAL) de camundongos quando comparados a administração apenas do peptídeo controle (EBELING *et al.*, 2005). De outra forma, realizando um pré-tratamento com o inibidor de protease inespecífico AEBSF também em modelo de inflamação alérgica induzido por OVA, Saw e colaboradores (2012) observaram uma redução da contagem total de leucócitos, assim como do número de eosinófilos e neutrófilos neste modelo. Sendo assim, utilizamos a OVA para mimetizar os efeitos da presença do antígeno para o desenvolvimento da inflamação alérgica e que tem potencial para desencadear uma resposta mediada por PAR-2. A injeção i.pl. de 1 μ g/cavidade de OVA em animais previamente imunizados induziu infiltração de eosinófilos e de células mononucleares para a cavidade pleural 48 horas após o desafio com o antígeno, e o antagonista seletivo de PAR-2 ENMD1068 inibiu este recrutamento.

O mecanismo pelo qual a ativação de PAR-2 induz a infiltração de eosinófilos na inflamação alérgica das vias aéreas não está bem esclarecido. No entanto os mastócitos são grandes candidatos a contribuírem para este fenômeno, uma vez que estão presente nestes processos e secretam a triptase que é um agonista endógeno de PAR-2. Em outros processos patológicos, estudos sugerem uma correlação entre o aumento do número de mastócitos com o aumento de eosinófilos em patologias como esofagite eosinofílica (ABONIA *et al.*, 2010) e gastrite eosinofílica (XI LI *et al.*, 2007), como também entre o aumento das concentrações de triptase com o aumento da infiltração

eosinofílica na asma (STERNBERG *et al.*, 2006) e na presença de pneumonia eosinofílica (BARGAGLI *et al.*, 2005). No entanto a relação entre mastócitos, ativação de PAR-2 e recrutamento de eosinófilos não tem sido bem demonstrada em modelo de inflamação das vias aéreas.

A triptase liberada de mastócitos ativa PAR-2 em diferentes células, tais como fibroblastos de pulmão (AKERS *et al.*, 2000), células musculares lisas das vias aéreas (BERGER *et al.*, 2001), neurônios mesentéricos (CORVERA *et al.*, 1999), queratinócitos (STEINHOFF *et al.*, 1999), células endoteliais (SHPACOVITCH *et al.*, 2002), entre outras. Entretanto, a capacidade da triptase em ativar PAR-2 *in vivo* em condições fisiológicas e patológicas necessita de mais estudos. Em vista disto, no presente estudo foi verificada a capacidade da triptase em induzir o recrutamento de eosinófilos para a cavidade pleural. A injeção i.pl. de 300 ng/cavidade deste ligante natural de PAR-2 induziu recrutamento de eosinófilos com migração máxima 24 horas após o estímulo, sendo que nos demais tempos de 48 e 72 horas também houve aumento do número de eosinófilos. No entanto, a triptase não foi seletiva para o tráfego de eosinófilos, pois, esta mesma dose capaz de recrutar células mononucleares 24 horas após o estímulo, assim como 4 horas após a injeção i.pl. da triptase já houve recrutamento de eosinófilos como também de neutrófilos e células mononucleares para cavidade, evidenciando a importância desta serino-protease para o recrutamento de leucócitos.

Estudos já haviam demonstrado que a triptase *in vitro* ou o peptídeo ativador de PAR-2 é capaz de ativar as células mesoteliais da pleura promovendo a liberação de MIP-2/CXCL2 e TNF α que contribuem para o recrutamento de neutrófilos para a cavidade pleural (LEE *et al.*, 2005). Já o tratamento de células endoteliais humanas com triptase aumentou significativamente a produção de MCP-1/CCL2 e IL-8/CXCL8 nestas células 6 horas após a exposição (KINOSHITA *et al.*, 2005). Os mastócitos humanos que contém triptase em seus grânulos expressam PAR-2 e, em estudo *in vitro*, o pré-tratamento dessas células com peptídeo ativador de PAR-2 promoveu aumento da secreção de IL-8/CXCL8 (CARVALHO *et al.*, 2010). A incubação de triptase em cultura de células endoteliais (*Human Umbilical Vein Endothelial Cells*, HUVECs) induz migração de neutrófilos *in vitro* que é dependente da ação de IL-8, uma vez que a adição de anticorpo anti-IL-8 à cultura inibiu este

efeito quimiotático (COMPTON *et al.*, 2000). Este conjunto de informações pode explicar em parte o aumento do número total de leucócitos após o estímulo pela triptase.

Uma vez que os mecanismos de ativação de PAR envolvem a ação proteolítica de seus ligantes causando a clivagem de uma sequência específica de aminoácidos nos receptores correspondentes, confirmamos em nossos experimentos que a capacidade de induzir recrutamento de eosinófilos exibida pela triptase é dependente de sua integridade e conseqüente atividade proteolítica, corroborando a hipótese de uma atividade quimiotática para eosinófilos por meio de sua ação nos receptores correspondentes a este ligante (PAR-2). Antes de verificar se este fenômeno era dependente da ativação de PAR-2, demonstramos que a inativação da triptase pela fervura inibiu o recrutamento de eosinófilos para a cavidade pleural. Diante disso, o próximo passo foi estudar a importância de PAR-2 no recrutamento de eosinófilos para a cavidade pleural induzido pela triptase. O ENMD1068, na mesma dose determinada no experimento com OVA, também inibiu o recrutamento de eosinófilos, monócitos e macrófagos para a cavidade pleural dos animais desafiados com triptase.

Como demonstrado, a ativação de PAR-2 pelo peptídeo ativador é de grande importância para o recrutamento de eosinófilos, enquanto a resposta induzida por OVA ou pela triptase ocasiona um aumento significativo no número total de leucócitos na cavidade pleural induzindo o recrutamento de eosinófilos, monócitos e macrófagos, este recrutamento é inibido pelo ENMD1068. Estes dados evidenciam uma amplificação da resposta mediada pela ativação de PAR-2 no desenvolvimento de uma resposta inflamatória induzida por antígeno, provavelmente por meio das ações da triptase nestes receptores.

A presença de antígeno nas vias aéreas induz produção de IgE levando à degranulação de mastócitos dependente de sua ligação à superfície destas células, liberando mediadores inflamatórios e proteases incluindo a triptase (SHAKOORY *et al.*, 2004), conduzindo então à uma resposta Th₂ com liberação de citocinas que favorecerão o recrutamento de leucócitos para o foco inflamatório como exemplo a IL-5 também produzida por mastócitos, que promove o recrutamento de eosinófilos da circulação adjacente e diferenciação

destes leucócitos a nível medular (GREENFEDER *et al.*, 2001; KIM *et al.*, 2010; FACCIOLI *et al.*, 1991; FACCIOLI *et al.*, 1996), assim como a própria triptase é capaz de ativar os mastócitos promovendo sua degranulação (MOORMANN *et al.*, 2006; BERGER *et al.*, 2003). Os mastócitos também sintetizam e secretam TNF- α , MCP-1/CCL2, MIP-1 α /CCL3, GM-CSF, IL-5, IL-13, IL-8, entre outros mediadores, que contribuem para o recrutamento de eosinófilos, monócitos e macrófagos (KINOSHITA *et al.*, 2005; LEE *et al.*, 2005). Assim, estas células podem ser consideradas células-chave em mediar o recrutamento de eosinófilos em respostas alérgicas.

Em nossos experimentos a triptase induziu um recrutamento de eosinófilos e monócitos. A capacidade da triptase em promover a migração de monócitos e sua posterior diferenciação local em macrófagos, sugere um papel potencial da ativação de PAR-2 em mediar mecanismos de diferenciação do macrófago em seus subtipos M1 e M2. Os macrófagos são células distribuídas em diferentes tecidos e órgãos onde realizam diversas funções como homeostasia, remodelamento tecidual e liberação de mediadores em resposta a antígenos. Dependendo do microambiente, os macrófagos adquirem um perfil diferenciado.

Geralmente os macrófagos se diferenciam em M1 na presença de citocinas inflamatórias e produtos de microorganismos e expressam receptores do tipo Toll (TLRs: *tolllikereceptors*) e secretam inúmeras citocinas tais como IL-12, TNF- α , IL-1, IL-6 (BENOIT *et al.* 2008). Os M2 são subdivididos em três grupos: M2a induzido por IL-4, IL-13 ou IL-21, M2b por imunocomplexos ou agonistas de TLR ou IL-1, M2c por IL-10, TGF- β ou glicocorticóides (GORDON, 2003), sendo que os M2a têm sido associados à participação na resposta Th2 ao aumento da produção de IL-33. Em modelo de alergia induzida por OVA em animais nocautes para IL-33, houve redução do processo inflamatório e diminuição da diferenciação para M2 (KUROWSKA-STOLARSKA *et al.*, 2009). Em nosso estudo, houve aumento da migração de monócitos para a cavidade pleural, com posterior diferenciação em macrófagos após estímulo pela OVA ou triptase por mecanismo dependente da ativação de PAR-2 uma vez que ENMD1068 inibiu o recrutamento destas células, em ambos os estímulos.

Diante deste fato, o próximo passo foi investigar a presença de PAR-2 em leucócitos obtidos do lavado pleural de camundongos desafiados com

triptase i.pl. e, posteriormente, se a expressão do gene do receptor estaria modificada nos animais tratados quando comparados aquela dos animais controle. Em modelo de inflamação alérgica induzida por OVA, há expressão de PAR-2 nas vias aéreas no epitélio, endotélio e músculo liso do tecido pulmonar, no epitélio nasal de camundongos Balb/c, assim como em células mononucleares e eosinófilos presentes em lavado broncoalveolar (BAL) de animais tratados com SLIGRL-NH₂ intranasal, macrófagos alveolares apresentaram maior intensidade para a marcação de PAR-2 (EBELING *et al.*, 2005). PAR-2 também é expresso por mastócitos localizados na pele humana (MOORMANN *et al.*, 2006) e esta expressão foi aumentada juntamente com o número de mastócitos em biopsia de pele de pacientes com inflamação crônica de pele do tipo psoríase ou carcinoma de células basais (CARVALHO *et al.*, 2010), sugerindo que sua expressão possa ser modulada através da inflamação. Em nossos experimentos demonstramos um aumento na expressão do receptor em animais tratados com triptase 24 horas após o estímulo quando comparados aos animais controles e também que há uma co-localização deste receptor na membrana plasmática e no citoplasma em eosinófilos, monócitos e macrófagos. Nossos resultados corroboram os resultados encontrados por Ebeling e colaboradores (2005), uma vez que também houve maior intensidade de marcação para PAR-2 em macrófagos e monócitos, o que sugere maior resposta desencadeada por estes tipos celulares.

Uma vez que em nossos experimentos a triptase induziu um aumento na expressão de PAR-2 e um recrutamento de eosinófilos que foi inibido pelo antagonista de PAR-2, sugerimos que o recrutamento de leucócitos mediado pela ativação de PAR-2 possa ser dependente da liberação de triptase endógena pelos mastócitos presentes no ambiente da inflamação alérgica. Os mastócitos participam da resposta imune sendo residentes em muitos tecidos, principalmente nos subcutâneos e nas mucosas (METCALFE *et al.*, 1997), e podem ser classificados em função da presença das proteases neutras quimase e triptase de acordo com o microambiente em mastócitos triptase e quimase (MC_{TC}), mastócitos quimase (MC_C) e mastócito triptase (MC_T) (METCALFE *et al.*, 1997). Mastócitos pulmonares e intestinais geralmente contém triptase (MCNEIL, 1996), que possivelmente é o subtipo encontrado em

nosso estudo. A triptase apresenta um papel fundamental na patogênese da asma (OH *et al.*, 2002), bem como participa de outros eventos importantes para o desenvolvimento da resposta inflamatória, existindo evidências para um papel desta protease e seu receptor na quimiotaxia de neutrófilos. Assim, a incubação *in vitro* de neutrófilos humanos com o inibidor de triptase APC366 ou com antagonista de PAR-2 *P2pal-18S pepducin* inibiu a ação quimiotática da triptase para estes leucócitos, (SEVINGNY *et al.*, 2011). Além disso, em modelo de inflamação alérgica induzida por OVA em camundongos Balb/c fêmeas, o pré-tratamento com um inibidor de triptase reduziu o número de eosinófilos e neutrófilos em BAL e reduziu a produção de muco e o edema peribrônquico (OH *et al.*, 2002). Em nosso estudo, o pré-tratamento com APC366 reduziu significativamente o número de eosinófilos na cavidade pleural induzido pelo SLIGRL-NH₂, 24 horas após o desafio, sugerindo que a migração de eosinófilos induzida pela ativação de PAR-2 em pleurisia experimental seja dependente da ação da triptase liberada de mastócitos da interface pulmonar, que é capaz de potencializar a resposta inflamatória mediante estímulo local.

Nossos resultados demonstram um papel fundamental da ativação de PAR-2 no fenômeno de migração de eosinófilos induzido pela triptase ou por antígeno, o que nos conduz a contextualizar que em um processo de inflamação alérgica ocorra amplificação da resposta por contribuição de cada um destes estímulos. Contudo, a inflamação e o recrutamento de eosinófilos para o foco inflamatório são processos amplos e influenciados por diversos mediadores, tais como citocinas e quimiocinas liberados por células locais, bem como por células que migram para o tecido afetado. Sendo assim, a importância da ativação de PAR-2 para o recrutamento de eosinófilos induzido por estímulo quimiotático da eotaxina-1/CCL11 também foi estudada. A eotaxina é uma quimiocina seletiva para o tráfego de eosinófilos, age por meio da interação com o receptor CCR3 que é altamente expresso em eosinófilos (KITAURA *et al.*, 1996), mas também é encontrado em basófilos (UGUCCIONI *et al.*, 1997), mastócitos (ROMAGNANI *et al.*, 1999) e linfócitos do tipo Th2 (SALLUSTO *et al.*, 1997), conduzindo assim o recrutamento destas células na inflamação alérgica.

Vários tipos de células no pulmão são capazes de sintetizar eotaxina, por exemplo as células epiteliais, do músculo liso, do endotélio vascular,

macrófagos e também os próprios eosinófilos (CONROY; WILLIAMS, 2001). Estudos têm mostrado que células epiteliais das vias aéreas produzem eotaxina quando são estimuladas por peptídeo ativador de PAR-2 (VLIAGOFTIS *et al.*, 2001), de outra maneira em animais desafiados com OVA observa-se um aumento dos níveis de eotaxina e do número de eosinófilos em BAL de camundongos selvagens enquanto que em animais nocautes para PAR-2 tanto os níveis de eotaxina quanto o número de eosinófilos são reduzidos (TAKIZAWA *et al.*, 2005). Nossos resultados indicam que a migração de eosinófilos para a cavidade pleural induzida por eotaxina-1 é dependente da ativação de PAR-2 nesse modelo experimental, uma vez que o antagonista de PAR-2 ENMD1068 bloqueou o recrutamento de eosinófilos induzido tanto pela eotaxina como pela OVA.

Finalmente, avaliamos se a triptase liberada de mastócitos teria importância na resposta mediada pela eotaxina em pleurisia, uma vez que demonstramos a participação de PAR-2 no recrutamento de eosinófilos induzido pela eotaxina, como também a importância da liberação de triptase pelos mastócitos para o recrutamento de eosinófilos em processos mediados por PAR-2.

Para isto, pré-tratamos os animais com APC366 antes de desafiá-los com eotaxina-1, e de maneira semelhante ao que aconteceu com o SLIGRL-NH₂, a inibição da ação da triptase endógena promoveu redução significativa no número de eosinófilos presentes no lavado pleural dos camundongos, o que mostra que a ação da eotaxina neste modelo experimental é dependente da ação de triptase, e uma vez que os efeitos da triptase são dependentes de sua ação proteolítica e esta age por meio de PAR-2, é possível que os mecanismos de ativação de PAR-2 desencadeados pela triptase estejam envolvidos na resposta induzida pela eotaxina-1.

A capacidade da eotaxina em induzir o acúmulo de eosinófilos no tecido *in vivo* parece necessitar tanto do aumento do número de eosinófilos circulantes quanto da presença de mastócitos residentes, tornando-os importantes para ação quimiotática de eosinófilos exibida pela eotaxina (DAS *et al.*, 1998). Das e colaboradores (2006) demonstraram que a administração de eotaxina em animais desafiados com OVA ocasionou eosinofilia em BAL, e esta resposta foi abolida em camundongos nocautes para mastócitos quando

comparados a camundongos selvagens nas mesmas condições, e o pré-tratamento com anticorpo anti-CCR3 em camundongos antes do desafio com eotaxina reduziu em 67% o número de eosinófilos presentes no BAL quando comparados ao grupo controle.

Os mastócitos, assim como os eosinófilos, expressam CCR3. Ensaios *in vitro* têm sugerido um papel quimiotático da eotaxina também para os mastócitos (ROMAGNANI *et al.*, 1999). Esta quimiocina também tem sido relacionada com ativação de mastócitos *in vivo*. Em modelo experimental de conjutivite alérgica utilizando camundongos deficientes de eotaxina-1, foi verificada uma redução da produção de citocinas inflamatórias e da degranulação de mastócitos quando comparados aos camundongos selvagens desafiados com alérgeno (MIYAZAKI *et al.*, 2009), e o bloqueio de CCR3 pelo antagonista W-56750 em camundongos selvagens, reduziu significativamente os parâmetros clínicos, a eosinofilia e a degranulação de mastócitos após desafio com antígeno (KOMATSU *et al.*, 2008).

Os nossos resultados demonstram que o pré-tratamento com o antagonista de PAR-2 ENMD1068 inibiu a migração de eosinófilos para a cavidade pleural de camundongos desafiados com OVA, triptase e eotaxina-1. A inibição da triptase endógena prejudicou o recrutamento de eosinófilos induzido pelo peptídeo ativador ou eotaxina-1. A triptase promoveu aumento do número de eosinófilos, como da expressão de PAR-2, e este fato também foi observado em monócitos e macrófagos sendo que a inibição do recrutamento destas células também ocorreu após o ENMD1068. Em conjunto, essas ações sugerem um papel de PAR-2 e de sua ativação no controle do recrutamento de eosinófilos, e conseqüentemente para o desenvolvimento da resposta inflamatória na cavidade pleural.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABONIA, J. P.; BLANCHARD, C.; BUTZ, B. B.; RAINEY, H. F.; COLLINS, M. H.; STRINGER, K.; PUTNAM, F., ROTHENBERG, M. E. Involvement of mast cells in eosinophilic esophagitis. **J Allergy Clin Immunol**, v.126, n.1, p.140-149, Jul 2010.

ACKERMAN, N.; TOMOLONIS, A.; MIRAM, L.; KHEIFETS, J.; MARTINEZ, S.; CARTER, A. Three Day pleural inflammation: a new model to detect drug effects on macrophage accumulation. **J Pharmacol Exp Ther**, v.215, n.3, p.588-595, Dec 1980.

ADAMKO, D. J.; ODEMUYIWA, S. O.; VETHANAYAGAM, D.; MOQBEL, R. The rise of the phoenix: the expanding role of the eosinophil in health and disease. **Allergy**, v.60, n.1, p.13-22, Jan 2005.

AKERS, I. A.; PARSONS, M.; HILL, M. R.; HOLLENBERG, M. D.; SANJAR, S.; LAURENT, G. J.; MCANULTY, R. J. Mast cell tryptase stimulates human lung fibroblast proliferation via protease-activated receptor-2. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, v.278, n.1, p.L193-201, Jan 2000.

ANTONY, V. B. Immunological mechanisms in pleural disease. **Eur Respir J**, v.21, n.3, p.539-544, Mar 2003.

ASOKANANTHAN, N.; GRAHAM, P. T.; FINK, J.; KNIGHT, D. A.; BAKKER, A. J.; WILLIAM, A. S.; THOMPSON, P. J.; STEWART, G. A. 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, p.3577-3585, Jan 2002.

BACHERT, C.; PROHASKA, P.; PIPKORN, U. IgE-positive mast cells on the human nasal mucosal surface in response to allergen exposure. **Rhinology**, v.28, p.149-158, 1990.

BARGAGLI, E.; BIGLIAZZI, C.; LEONINI, A.; NIKIFORAKIS, N.; PERARI, M. G.; ROTTOLI, P. Tryptase concentrations in bronchoalveolar lavage from patients with chronic eosinophilic pneumonia. **Clinical Science**, v.108, p.273-276, 2005.

BARRIOS, V. E.; JAROSINSKI, M. A.; WRIGHT, C. D. Proteinase-activated receptor-2 mediates hyperresponsiveness in isolated guinea pig bronchi. **Biochem Pharmacol**, v.66, p.519-525, Apr 2003.

BARRY, G. D.; SUEN, J. Y.; LE, G. T.; COTTERELL, A.; REID, R. C.; FAIRLIE, D. P. Novel Agonists and Antagonists for Human Protease Activated Receptor 2. **J Med Chem**, v.53, p.7428-7440, Jul 2010.

BENOIT, M.; DESNUES, B.; MEGE, J. L. Macrophage polarization in bacterial infections. **J Immunol**, v.181, n.6, p.3733-3739, Sep 2008.

BERGER P.; PERNG, D. W.; THABREW, H.; COMPTON, S. J.; CAIRNS, J. A.; MCEUEN, A. R.; MARTHAN, R.; TUNON DE LARA, J. M.; WALLS, A. F. Tryptase and agonists of PAR-2 induce the proliferation of human airway smooth muscle cells. **J Appl Physiol**, v.91, p.1372-1379, Set 2001.

BERGER, P.; GIRODET, P. O.; BEGUERET, H.; OUSOVA, O.; PERNG, D. W.; MARTHAN, R.; WALLS, A. F.; TUNON DE LARA, J. M. Tryptase-stimulated human airway smooth muscle cells induce cytokine synthesis and mast cell chemotaxis. **FASEB J**, v.17, n.14, p.2139-2141, 2003.

BLOEMEN, P. G.; HENRICKS, P. A.; NIJKAMP, F. P. Cell adhesion molecules and asthma. Clinical and experimental allergy. **J Br Soc Allergy Clin Immunol**, v.27, n.2, p.128-141, Feb 1997.

BOITANO, S.; FLYNN, A. N.; SCHULZ, S. M.; HOFFMAN, J.; PRICE, T. J.; VAGNER, J. Potent Agonists of the Protease Activated Receptor 2 (PAR2). **J Med Chem**, v.54, n.5, p.1308-1313, Apr 2011.

BOLTON, S. J.; McNULTY, C. A.; THOMAS, R. J.; HEWITT, C. R. A.; WARDLAW, A. J. Expression of and functional responses to protease-activated receptors on human eosinophils. **J Leuk Biol**, v.74, p.60-68, Jul 2003.

BOND, J. S.; BUTLER, P. E. Intracellular proteases. **Annu Rev Biochem**, v.56, p.333-364, 1987.

BRAGA, A. D.; MIRANDA, J. P.; FERREIRA, G. M.; BILHEIRO, R. P.; DUARTE, I. D.; FRANCISCHI, J. N.; KLEIN, A. Blockade of proteinase-activated receptor-4 inhibits the eosinophil recruitment induced by eotaxin-1 in the pleural cavity of mice. **Pharmacology**. 2010; doi: 10.1159/000319751

CAILHIER, J. F.; SAWATZKY, D. A.; KIPARI, T.; HOULBERG, K.; WALBAUM, D.; WATSON, S.; LANG, R. A.; CLAY, S.; KLUTH, D.; SAVILL, J.; HUGHES, J. Resident pleural macrophages are key orchestrators of neutrophil recruitment in pleural inflammation. **Am J Respir Crit Care Med**, v.173, n.5, p.540-547, Mar 2006.

CARA, D. C.; NEGRÃO-CORREA, D.; TEIXEIRA, M. M. Mechanisms underlying eosinophil trafficking and their relevance in vivo. **Histol Histopathol**, v.15, n.3, p.899-920, Jul 2003.

CARVALHO, R. F. S.; NILSSON, G.; HARVIMA, I. T. Increased mast cell expression of PAR-2 in skin inflammatory diseases and release of IL-8 upon PAR-2 activation. **Exp Dermatol**. 2010; doi: 10.1111/j.1600-0625.2009.00998.x

CHANG, T. W.; DAVIS, F. M.; SUN, N. C.; SUN, C. R. Y.; MacGLASHAN, D. W.; HAMILTON, R. G. Monoclonal antibodies specific for human IgE-producing B cells:

a potential therapeutic for IgE-mediated allergic diseases, **Biotechnology**, v.8, p.122-126, 1990.

CHEN, C. L.; WANG, S. D.; ZENG, Z. Y.; LIN, K. J.; KAO, S. T.; TANI, T.; YU, C. K.; WANG, J. Y. Serine protease inhibitors nafamostatmesilate and gabexatemesilate attenuate allergen-induced airway inflammation and eosinophilia in a murine model of asthma. **J Allergy Clin Immunol**, v.118, n.1, p.105-12, 2006.

COCKS, T. M.; MOFFATT, J. D. Protease activated-receptors: sentries for inflammation. **Trends Pharmacol Sci**, v. 21, n.3, p.103-108, Mar 2000.

COELHO, A. M.; OSSOVSKAYA, V.; BUNNETT, N. W. Proteinase- Activated Receptor-2: Physiological and Pathophysiological Roles. **Curr Med Chem**, v.1, p.61-72, 2003.

COLLINS, P. D.; MARLEAU, S.; GRIFFITHS-JOHNSON, D. A.; JOSE, P. J.; WILLIAMS, T. J. Cooperation between interleukin-5 and the chemokine eotaxin to induce eosinophil accumulation in vivo. **J Exp Med**, v.182, v.4, p.1169-1174 , 1995.

COLOGNATO, R.; SLUPSKY, J. R.; JENDRACH, M.; BURYSEK, L.; SYROVETS, T.; SIMMET, T. Differential expression and regulation of protease-activated in human peripheral monocytes and monocyte-derived antigen-presenting cells. **Blood**, v.102, p.2645-2652, 2003.

COMPTON, S. J.; CAIRNS, J. A.; HOLGATE, S. T.; WALLS, A. F. Human mast cell tryptase stimulates the release of an IL-8-dependent neutrophil chemotactic activity from human umbilical vein endothelial cells (HUVEC). **Clin Exp Immunol**, v.121, n.1, p.31-36, Jul 2000.

CONROY, D. M.; HUMBLES, A. A.; RANKIN, S. M.; PALFRAMAN, R. T.; COLLINS, P. D.; JOHNSON, D. A. G.; JOSE, P. J.; WILLIAMS, T. J. The Role of the Eosinophil-selective Chemokine, Eotaxin, in Allergic and Non-allergic Airways Inflammation. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.92, vol.183, supp.2, p.183-191, 1997.

CONROY, D. M.; WILLIAMS, T. J. Eotaxin and the attraction of eosinophils to the asthmatic lung. **Respir Res**, v.2, n.3, p.150-156, 2001.

CORVERA, C. U.; DÉRY, O.; MCCONALOGUE, K.; GAMP, P.; THOMA, M.; AL-ANI, B.; CAUGHEY, G. H.; HOLLENBERG, M. D.; BUNNETT, N. W. Thrombin and mast cell tryptase regulate guinea-pig myenteric neurons through proteinase-activated receptors-1 and -2. **J Physiol**, v.517, p. 741-756, Jun 1999.

COUGHLIN, S. R. Trombin signaling and protease-activated receptors. **Nature**, v.407, p.258-264, Sep 2000.

COUGHLIN, S. R.; CAMERER, E. Participation in inflammation. **J Clin Invest**, v.111, n.1, p.25-27, Jan 2003.

DAS, A. M.; FLOWER, R. J.; PERRETTI, M. Resident mast cells are important for eotaxin-induced eosinophil accumulation in vivo. **J Leukoc Biol**, v.64, n.2, p.156-162, Aug 1998.

DAS, A. M.; VADDI, K. G.; SOLOMON, K. A.; KRAUTHAUSER, C.; JIANG, X.; MCINTYRE, K. W.; YANG, X. X.; WADMAN, E.; WELCH, P.; COVINGTON, M.; GRADEN, D.; YELESWARAM, K.; TRZASKOS, J. M.; NEWTON, R. C.; MANDLEKAR, S.; KO, S. S.; CARTER, P. H.; DAVIES, P. Selective inhibition of eosinophil influx into the lung by small molecule CC chemokine receptor 3 antagonists in mouse models of allergic inflammation. **J Pharmacol Exp Ther**, v.318, n.1, p.411-417, Jul 2006.

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.

DE CAMPO, B. A.; HENRY, P. J. Stimulation of protease-activated receptor-2 inhibits airway eosinophilia, hyperresponsiveness and bronchoconstriction in a murine model of allergic inflammation. **Br J Pharmacol**, v.144, p.1100-1108, 2005.

EBELING, C.; FORSYTHE, P.; NG, J.; GORDON, J. R.; HOLLENBERG, M., VLIAGOFTIS, H. Proteinase-activated receptor 2 activation in the airways enhances antigen-mediated airway inflammation and airway hyperresponsiveness through different pathways. **J Allergy Clin Immunol**, v.115, n.3, p.623-630, Mar 2005.

FACCIOLI, L. H.; MOKWA, V. F.; SILVA, C. L.; ROCHA, G. M.; ARAUJO, J. I.; NAHORI, M. A.; VARGAFTIG, B. B. IL-5 drives eosinophils from bone marrow to blood and tissues in a guinea-pig model of visceral larva migrans syndrome. **Mediators Inflamm**, v.5, n.1, p.24-31, 1996.

FACCIOLI, L. H.; NOURSHARGH, S.; MOQBEL, R.; WILLIAMS, F. M.; SEHMI, R.; KAY, A. B.; WILLIAMS, T. J. The accumulation of In-eosinophils induced by inflammatory mediators, *in vivo*. **Immunology**, v.73, n.2, p.222-227, Jun 1991.

GOMIDES, L. F.; DUARTE, I. D.; FERREIRA, R. G.; PEREZ, A. C.; FRANCISCHI, J. N.; KLEIN, A. Proteinase-Activated Receptor-4 Plays a Major Role in the Recruitment of Neutrophils Induced by Trypsin or Carrageenan during Pleurisy in Mice. **Pharmacology**, 2012; doi:10.1159/000337378

GORDON, S. Alternative activation of macrophages. **Nat Rev Immunol**, v.3, n.1, p.23-35, Jan 2003.

GREENFEDER, S.; UMLAND, S. P.; CUSS, F. M.; CHAPMAN, R. W.; EGAN, R. W. Th2 cytokines and asthma. The role of interleukin-5 in allergic eosinophilic disease. **Respir Res**, v.2, n.2, p.71-79, Mar 2001.

GUO, R.; WARD, P. A. Mediators and regulation of neutrophil accumulation in inflammatory responses in lung: insights from the IgG immune complex model. **Free Radical Biol Med**, v.33,n.3, p.303-310, Aug 2002.

HAMID, Q.; TULIĆ, M. K.; LIU, M. C.; MOQBEL, R. Inflammatory cells in asthma: mechanisms and implications for therapy. **J Allergy Clin Immunol**, v.111, n.1, Jan 2003.

HANSEN, K. K.; SAIFEDDINE, M.; HOLLENBERG, M. D. Tethered ligand-derived peptides of proteinase-activated receptor 3 (PAR-3) activate PAR1 and PAR2 in Jurkat T cells. **Immunology**, v.112, p.183-190, 2004

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.

HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ, L.; SANZ, C.; GARCÍA-SOLAESA, V.; PADRÓN, J.; GARCÍA-SÁNCHEZ, A.; DÁVILA, I.; ISIDORO-GARCIA, M.; LORENTE, F. Tryptase: Genetic and functional considerations. **Allergo Immunopathol**, v.40, n.6, p.385-389, 2012.

HOGAN, S. P.; ROSENBERG, H. F.; MOQBEL, R.; PHIPPS, S.; FOSTER, P. S.; LACY, P.; KAY, A. B.; ROTHENBERG, M. E. Eosinophils: Biological Properties and Role in Health and Disease. **Clin Exp Allergy**, v. 38, p.709-750, 2008.

HOLGATE, S. T. The epidemic of allergy and asthma. **Nature**, vol.402, supp.25, p.B2-4, Nov 1999.

HOULE, S.; PAPEZ, M. D.; FERAZZINI, M.; HOLLENBERG, M. D.; VERGNOLLE, N. Neutrophils and kallikrein-kinin system in proteinase-activated receptor 4-mediated inflammation in rodents. **Br J Pharmacol**, v.146, n.5, p.670-678, Nov.2005.

HOWELLS, G. L.; MACEY, M. G.; CHINNI, C.; HOU, L.; FOX, M.T.; HARRIOTT, P.; STONE, S. R. Proteinase-activated receptor-2 expression by human neutrophils. **J Cell Sci**, v.110, p.881-887, 1997.

HUMBLES, A. A.; CONROY, D. M.; MARLEAU, S.; RANKIN, S. M.; PALFRAMAN, R. T.; PROUDFOOT, A. E. I.; WELLS, T. N. C.; LI, D.; JEFFERY, P. K.; GRIFFITHS, J. D. A.; WILLIAMS, T. J.; JOSE, P. J. Kinetics of eotaxin generation and its relationship to eosinophil accumulation in allergic airways disease: analysis in a guinea pig model in vivo. **J Exp Med**, v. 186, p.601-612, 1997.

JOSE, P. J.; GRIFFITHS-JOHNSON, D. A.; COLLINS, P. D.; WALSH, D. T.; MOQBEL, R.; TOTTY, N. F.; TRUONG, O.; HSUAN, J. J.; WILLIAMS, T. J. Eotaxin: A Potent Eosinophil Chemoattractant Cytokine Detected in a Guinea Pig Model of Allergic Airways Inflammation. **J Exp Med**, v.179, p.881-887, Mar 1994.

KAWABATA, A.; KAWAO, N. Physiology and pathophysiology of proteinase-activated receptors (PARs): PARs in the respiratory system: cellular signaling and physiological/pathological roles. **J Pharmacol Sci**, v.97, p.20-24, 2005.

KAWABATA, A.; MORIMOTO, N.; NISHIKAWA, H.; KURODA, R.; ODA, Y.; KAKEHI, K. 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.

KAWAGOE, J.; TAKIZAWA, T.; MATSUMOTO, J.; TAMIYA, M.; MEEK, S. E.; SMITH, A. J.; HUNTER, G. D.; PLEVIN, R.; SAITO, N.; KANKE, T.; FUJII, M.; WADA, Y. Effect of protease-activated receptor-2 deficiency on allergic dermatitis in the mouse ear. **Jpn J Pharmacol**, v.88, p.77-84, 2002.

KELSO, E. B.; LOCKHART, J. C.; HEMBROUGH, T.; DUNNING, L.; PLEVIN, R.; HOLLENBERG, M. D.; SOMMERHOFF, C. P.; LEAN, J. S.; FERREL W. R. Therapeutic Promise of Proteinase-Activated Receptor-2 Antagonist in Joint Inflammation. **J Pharmacol Exp Ther**, v.316, n.3, p.1017-1024, Oct 2005.

KIM, H. Y.; DEKRUYFF, R. H.; UMETSU, D. T. The many paths to asthma: phenotype shaped by innate and adaptive immunity. **Nat Immunol**. 2010; doi:10.1038/ni.1892.

KINOSHITA, M.; OKADA, M.; HARA, M.; FURUKAWA, Y.; MATSUMORI, A. Mast cell tryptase in mast cell granules enhances MCP-1 and interleukin-8 production in human endothelial cells. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v.25, n.9, p. 1858-1863, Sep 2005.

KITAURA, M.; NAKAJIMA, T.; IMAI, T.; HARADA, S.; COMBADIÈRE, C.; TIFFANY, H. L.; MURPHY, P. M.; YOSHIE, O. Molecular cloning of human eotaxin, an eosinophil-selective CC chemokine, and identification of a specific eosinophil eotaxin receptor, CC chemokine receptor 3. **J Biol Chem**, v.271, n.13, p.7725-7730, Mar 1996.

KLEIN, A.; TALVANI, A.; CARA, D. C.; GOMES, K. L.; LUKACS, N. W.; TEIXEIRA, M. M. Stem cell factor plays a major role in the recruitment of eosinophils in allergic pleurisy in mice via the production of leukotriene B₄. **J Immunol**, v.164, p.4271-4276, 2000.

KLEIN, A.; TALVANI, A.; SILVA, P. M. R.; MARTINS, M. A.; WELLS, T. N. C.; PROUDFOOT, A.; LUCKACS, N. W.; TEIXEIRA, M. M. 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, p.524-531, 2001.

KOMATSU, N.; MIYAZAKI, D.; TOMINAGA, T.; KUO, C. H.; NAMBA, S.; TAKEDA, S.; HIGASHI, H.; INOUE, Y. Transcriptional analyses before and after suppression of immediate hypersensitivity reactions by CCR3 blockade in eyes with experimental allergic conjunctivitis. **Invest Ophthalmol Vis Sci**. 2008; doi: 10.1167/iops.08-2154.

KUROWSKA-STOLARSKA, M.; STOLARSKI, B.; KEWIN, P.; MURPHY, G.; CORRIGAN, C. J.; YING, S.; PITMAN, N.; MIRCHANDANI, A.; RANA, B.; VAN ROOIJEN, N.; SHEPHERD, M.; MCSHARRY, C.; MCINNES, I. B.; XU, D.; LIEW, F. Y. IL-33 amplifies the polarization of alternatively activated macrophages that

contribute to airway inflammation. **J Immunol.** 2009; doi: 10.4049/jimmunol.0901575

LAMKHIOUED, B.; RENZI, P. M.; YOUNES, A.; GARCIA-ZEPEDA, E. A.; ALLAKHVERDI, Z.; GHAFAR, O.; ROTHENBERG, M. D.; LUSTER, A. D.; HAMID, Q. A. Increased expression of eotaxin in bronchoalveolar lavage and airways of asthmatics contributes to the chemotaxis of eosinophils to the site of inflammation. **J Immunol**, v.159, p.4593-4601, 1997.

LAN, R. S.; STEWART, G. A.; HENRY, P. J. Role of protease-activated receptors in airway function: a target for therapeutic intervention? **Pharmacol Ther**, v.95, p.239-257, 2002.

LEE, Y. C.; KNIGHT, D. A.; LANE, K. B.; CHENG, D. S.; KOAY, M. A.; TEIXEIRA, L. R.; NESBITT, J. C.; CHAMBERS, R. C.; THOMPSON, P. J.; LIGHT, R. W. Activation of proteinase-activated receptor-2 in mesothelial cells induces pleural inflammation. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, v.288, p.L734-L740, 2005.

LIU, Y.; SHAW, S. K.; MA, S.; YANG, L.; LUSCINSKAS, F. W.; PARKOS, C. A. Regulation of Leucocyte Transmigration: Cell Surface Interactions and Signaling Events. **J Immunol**, v.172, p.7-13, 2004

LOURBAKOS, A.; CHINNI, C.; THOMPSON, P.; POTEMPA, J.; TRAVIS, J.; MACKIE, E. J.; PIKE, R. N. Cleavage and activation of proteinase-activated receptor-2 on human neutrophils by gingipain-R from *Porphyromonas gingivalis*. **FESBS Lett**, v.435, p.45-48, 1998.

MACFARLANE, S. R.; SEATTER, M. J.; KANKE, T.; HUNTER, G. D.; PLEVIN, R. Proteinase-activated receptors. **Pharmacol Rev**, v.53, n.2, p.245-282, Jun 2001.

MARI, B.; GUERIN, S.; FAR, D. F.; BREITMAYER, J. P.; BELHACENE, N.; PEYRON, J. F.; ROSSI, B.; AUBERGER, P. Trombin and trypsin-induced Ca(2+) mobilization in human T cells lines through interaction with different protease-activated receptors. **FASEB J**, v.10, p.309-316, 1996.

MATOS, N. A.; SILVA, J. F.; MATSUI, T. C.; DAMASCENO, K. A.; DUARTE, I. D. G.; LEMOS, V. S.; CASSALI, G. D.; KLEIN, A. Mast cell tryptase induces eosinophil recruitment in the pleural cavity of mice via proteinase-activated receptor 2. **Inflammation**, 2013, doi: 10.1007/s10753-013-9664-5.

Mc NEIL, H. P. The mast cell and inflammation. *Australian New Zealand J Med*, v. 26, p. 216-225, 1996.

McDOUGALL, J. J.; ZHANG, C.; CELLARS, L.; JOUBERT, E.; DIXON, C. M.; VERGNOLLE, N. Triggering of proteinase-activated receptor 4 leads to joint pain and inflammation in mice. **Arthritis Rheum**, v.60, n.1, p.728-737, Mar 2009.

METCALFE DD, BARAM D, MEKORI YA. MAST CELLS. **Physiol Rev**, v.4, p.1033-1079, Oct 1997.

MIIKE, S.; WILLIAM, A. S.; KITA, H. Trypsin induces activation and inflammatory mediator release from human eosinophils through protease-activated receptor-2. **J Immunol**, v.167, p.6615-6622, 2001.

MINAI-FLEMINGER, Y.; LEVI-SCHAFFER, FRANCESCA. Mast cells and eosinophils: the two key effector cells in allergic inflammation. **Inflamm Res**, v.58, p.631-638, 2009.

MIYAZAKI, D.; NAKAMURA, T.; OHBAYASHI, M.; KUO, C. H.; KOMATSU, N.; YAKURA, K.; TOMINAGA, T.; INOUE, Y.; HIGASHI, H.; MURATA, M.; TAKEDA, S.; FUKUSHIMA, A.; LIU, F. T.; ROTHENBERG, M. E.; ONO, S. J. Ablation of type I hypersensitivity in experimental allergic conjunctivitis by eotaxin-1/CCR3 blockade. **Int Immunol**. 2009; doi: 10.1093/intimm/dxn137

MOFFATT, J. D.; PAGE, C. P.; LAURENT, G. J. Shooting for PARs in lung diseases. **Curr Opin Pharmacol**, v.4, p.221-229, 2004.

MOLINO, M.; BARNATHAN, E. S.; NUMEROF, R.; CLARK, J.; DREYER, A. C.; HOXIET, J. A.; SCHECHTER, N. WOOLKALIS, M.; BRASS, L. F. Interactions of Mast Cell Tryptase with Thrombin Receptors and PAR-2. **J Biol Chem**, v.272, n.7, p.4043-4049, Feb 1997.

MOORMANN, C.; ARTUC, M.; POHL, E.; VARGA, G.; BUDDENKOTTE, J.; VERGNOLLE, N.; BREHLER, R. HENZ, B. M.; SCHENEIDER, S. W.; LUGER, T. A.; STEINHOFF, M. Functional Characterization and Expression Analysis of the Proteinase-Activated Receptor-2 in Human Cutaneous Mast Cells. **J Invest Dermatol**, v.126, p.746–755, 2006.

MOQBEL, R.; LEVI-SCHAFFER, F.; KAY, A. B. Cytokine generation by eosinophils. **J Allergy Clin Immunol**, v.94, p. 1183-1188.

NAKAGOME, K.; NAGATA, M. Pathogenesis of airway inflammation in bronchial asthma. **Auris Nasus Larynx**, v.38, p.555-563, 2011.

OH, S. W.; PAE, C. I.; LEE, D. K.; JONES, F.; CHIANG, G. K.; KIM, H. O.; MOON, S. H.; CAO, B.; OGBU, C.; JEONG, K. W.; KOZU, G.; NAKANISHI, H.; KAHN, M.; CHI, E. Y.; HENDERSON, W. R. Jr. Tryptase inhibition blocks airway inflammation in a mouse asthma model. **J Immunol**, v.168, n.4, p.1992-2000, Feb 2002.

OSSOVSKAYA, V. S.; BUNNETT, N. W. Protease-Activated Receptors: Contribution to Physiology and Disease. **Physiol Rev**, v.84, p.579-621, 2004.

PALFRAMAN, R. T.; COLLINS, P. D.; WILLIAMS, T. J.; RANKIN, S. M. Eotaxin induces a rapid release of eosinophils and their progenitors from the bone marrow. **Blood**, v. 91, p.2240-2248, 1998.

PALMER, H. S.; KELSO, E. B.; LOCKHART, J. C.; SOMMERHOFF, C. P.; PLEVIN, R.; GOH, F. G.; FERREL, W. R. Protease-Activated Receptor 2 Mediates the Proinflammatory Effects of Synovial Mast Cells. **Arthritis Rheum**, v.56, n.11, p.3532-3540, Nov 2007.

PEARLMAN, D. S. Pathophysiology of the inflammatory response. **J Allergy Clin Immunol**, v.104, n.4, p.S132-137, Oct 1999.

PONATH, P. D.; QIN, S.; POST, T. W.; WANG, J.; WU, L.; GERARD, N. P.; NEWMAN, W.; GERARD, C.; MACKAY, C. R. Molecular cloning and characterization of a human eotaxin receptor expressed selectively on eosinophils. **J Exp Med**, v. 183, n.6, p.2437-2448 ,1996.

PRUSSIN, C., METCALFE, D. D. IgE, mast cells, basophils, and eosinophils. **J. Allergy. Clin Immunol**, v.117, n.2, p.S450-456, Feb 2006.

RAMACHADRAN, R.; HOLLENBERG, M. D. Proteinases and signaling: pathophysiological and therapeutic implications via PARs and more. **Br J Pharmacol**, v.153, p.263-282, Dec 2008.

RANKIN, S. M.; CONROY, D. M.; WILLIAMS, T. J. Eotaxin and eosinophil recruitment: implications for human disease. **Mol Med Today**, v.6, p.20-27, Jan 2000.

RAWLINGS, N. D.; MORTON, F. R.; BARRET, A. J. MEROPS: the peptidases database. **Nucleic Acids Res**, v.1, n.34, p.270-272, Jan 2006.

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

RINDERKNETCHT, H. Activation of pancreatic zymogens. Normal activation, premature intrapancreatic activation, protective mechanisms against inappropriate activation. **Dig Dis Sci**, v.31, n.3, p.314-321, Mar 1986.

ROBBIE-RYAN, M. & BROWN, M.A. The role of mast cells in allergy and autoimmunity. **Current Opinion Immunol**, v. 14, n. 6, p. 728-733, 2002.

ROMAGNANI, P.; DE PAULIS, A.; BELTRAME, C.; ANNUNZIATO, F.; DENTE, V.; MAGGI, E.; ROMAGNANI, S.; MARONE, G. Tryptase-chymase double-positive human mast cells express the eotaxin receptor CCR3 and are attracted by CCR3-binding chemokines. **Am J Pathol**, v.155, n.4, p.1195-1204, Oct 1999.

ROTHENBERG, M. E.; MACLEAN, J. A.; PEARLMAN, E.; LUSTER, A. D.; LEDER, P. Targeted disruption of the chemokine eotaxin partially reduces antigen-induced tissue eosinophilia. **J Exp Med**, v.185, p.785-790, 1997.

RUF, W.; ROTHMEIER, A. S. Protease-activated receptor 2 signaling in inflammation. **Semin Immuno Pathol**, v.34, p.133-149, 2012.

RULLIER, A.; SENANT, N.; KISIEL, W.; BIOULAC-SAGE, P.; BALABAUND, C.; LE BAIL, B.; ROSENBAUM, J. Expression of protease-activated receptors and tissue factor in human liver. **Virchows Arch**, v.448, p.46-51, 2006.

SALLUSTO, F.; MACKAY, C. R.; LANZAVECCHIA, A. Selective expression of the eotaxin receptor CCR3 by human T helper 2 cells. **Science**, v.277, n.5334, p.2005-2007, Sep 1997.

SAW, S.; KALE, S. L.; ARORA, N. Serine Protease Inhibitor Attenuates Ovalbumin Induced Inflammation in Mouse Model of Allergic Airway Disease. **Plos One**, v.7, p.1-9, Jul 2012.

SCARBOROUGH, R. M.; NAUGHTON, M. A.; TENG, W.; HUNG, D. T.; ROSE, J.; VU, T. K.; WHEATON, V. I.; TURCK, C. W.; COUGHLIN, S. R. 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.13146-13149, Jul 1992.

SCHMIDLIN, F.; AMADESI, S.; DABBAGH, K.; LEWIS, D. E.; KNOTT, P.; BUNNETT, W. N.; GATER, P. R.; GEPPETTI, P.; BERTRAND, C.; STEVENS, M. E. Protease-Activated Receptor 2 Mediates Eosinophil Infiltration and Hyperreactivity in Allergic Inflammation of the Airway. **J Immunol**, v.169, p.5315-5321, Aug 2002.

SCHMIDLIN, F.; AMADESI, S.; VIDIL, R.; TREVISANI, M.; MARTINET, N.; GAUCHEY, G.; TOGNETTO, M.; CAVALLESICO, G.; MAPP, C.; GEPPETTI, P.; BUNNETT, N. W. Expression and Function of Proteinase-activated Receptor 2 in Human Bronchial Smooth Muscle. **Am J Resp Crit Care Med**, v.164, p.1276-1281, 2001.

SEELIGER, S.; DERIAN, C. K.; VERGNOLLE, N.; BUNNETT, N. W.; NAWROTH, R.; SCHMELZ, M.; VON DER WEID, P. Y.; BUDDENKOTTE, J.; SUNDERKOTTER, C.; METZE, D.; ANDRADE-GORDON, P.; HARMS, E.; VESTWEBER, D.; LUGER, T. A.; STEINHOFF, M. Proinflammatory role of proteinase-activated receptor-2 in humans and mice during cutaneous inflammation in vivo. **FASEB J**, v.17, p.1871-1885, 2003.

SENDEN, N. H.; JEUNHOMME, T. M.; HEEMSKERK, J. W.; WAGENVOORD, R.; VAN'T VEER, C.; HEMKER, H. C.; BUURMAN, W. A. Factor Xa induces cytokine production and expression of adhesion molecules by human umbilical vein endothelial cells. **J Immunol**, v.161, p.4318-4324, 1998.

SEVIGNY, L. M.; ZHANG, P.; BOHM, A.; LAZARIDES, K.; PERIDES, G.; COVIC, L.; KULIOPULOS, A. Interdicting protease-activated receptor-2-driven inflammation with cell-penetrating pepducins. **PNAS**, v.108, n.20, p.8491-8496, Apr 2011.

SHAKOORY, B.; FITZGERALD, S. M.; LEE, S. A.; CHI, D. S.; KRISHNASWAMY, G. The Role of Human Mast Cell-Derived Cytokines in Eosinophil Biology. **J Interferon Cytokine Res**, v.24, n.5, p.271-281, May 2004.

SHPACOVITCH, V. M.; BRZOSKA, T.; BUDDENKOTTE, J.; STROH, C.; SOMMERHOFF, C. P.; ANSEL, J. C.; SCHULZE-OSTHOFF, K.; BUNNETT, N. W.; LUGER, T. A.; STEINHOFF, M. Agonists of proteinase-activated receptor 2 induce cytokine release and activation of nuclear transcription factor kappaB in human

dermal microvascular endothelial cells. **J Invest Dermatol**, v.118, p.380-385, Feb 2002.

SHPACOVITCH, V.; FELD, M.; HOLLENBERG, M. D.; LUGER, T. A.; STEINHOFF, M. Role of protease-activated receptors in inflammatory responses, innate and adaptive immunity. **J Leuk Biol**, v.83, p.1309-1322, Jun 2008.

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.; BUDDENKOTTE, J.; SHPACOVITCH, V.; RATTENHOLL, A.; MOORMANN, C.; VERGNOLLE, N.; LUGER, T. A.; HOLLENBERG, M. D. Protease-activated receptors: Transducers of Proteinase-Mediated Signaling in Inflammation and Immune Response. **Endocr Rev**, v.26, n.1, p.43, May 2005.

STEINHOFF, M.; CORVERA, C. U.; THOMA, M. S.; KONG, W.; MCALPINE, B. E.; CAUGHEY, G. H.; ANSEL, J. C.; BUNNETT, N. W. Proteinase-activated receptor-2 in human skin: tissue distribution and activation of keratinocytes by mast cell tryptase. **Exp Dermatol**, v.8, p.282-294, Aug 1999.

STEINHOFF, M.; NEISIUS, U.; IKOMA, A.; FARTASCH, M.; HEYER, G.; SKOV, P.S.; LUGER, T. A.; SCHMELZ, M. Proteinase-activated receptor-2 mediates itch: a novel pathways for pruritus in human skin. **J Neurosci**, v.23, p.6176-6180, 2003.

STEINHOFF, M.; VERGNOLLE, N.; YOUNG, M.; TOGNETTO, M.; AMADESI, H. S.; ENESS, H. S.; TREVISANI, M.; HOLLENBERG, M. D.; WALLACE, J. L.; CAUGHEY, G. H.; MITCHELL, S. E.; WILLIAMS, L. M.; GEPPETTI, P.; MAYER, E. A.; BUNNETT, N.W. Agonists of proteinase-activated receptor 2 induce inflammation by a neurogenic mechanism. **Nature Medicine**, v.6, n.2, p.151-158, Feb 2000.

STERNBERG, B. S.; SLY, P. D.; LOH, R. K. S.; ISIDORO, A.; HABRE, W. Value of eosinophil cationic protein and tryptase levels in bronchoalveolar lavage fluid for predicting lung function impairment in anaesthetized, asthmatic children. **Anaesthesia**, v.61, p.1149-1154, 2006.

STONE, K. D.; PRUSSIN, C.; METCALFE, D. D. IgE, mast cells, basophils, and eosinophils. **J Allergy Clin Immunol**, v.125, n.2, p.S74-80, Feb 2010.

SU, X.; CAMERER, E.; HAMILTON, J. R.; COUGHLIN, S. R.; MATTHAY, M. A. Protease-activated receptor-2 activation induces acute lung inflammation by neuropeptide-dependent mechanisms. **J Immunol**, v.175, p.2598-2605, 2005.

TAKIZAWA, T.; TAMIYA, M.; HARA, T.; MATSUMOTO, J.; SAITO, N.; KANKE, T.; KAWAGOE, J.; HATTORI, Y. Abrogation of Bronchial Eosinophilic Inflammation and Attenuated Eotaxin Content in Protease-Activated Receptor 2-Deficient Mice. **J Pharmacol Sci**, v.98, p.99-102, Mar 2005

UGUCCIONI, M.; MACKAY, C. R.; OCHENSBERGER, B.; LOETSCHER, P.; RHIS, S.; LAROSA, G. J.; RAO, P.; PONATH, P. D.; BAGGIOLINI, M.;

DAHINDEN, C. A. High expression of the chemokine receptor CCR3 in human blood basophils. Role in activation by eotaxin, MCP-4, and other chemokines. **J Clin Invest**, v.100, n.5, p.1137-1143, Sep 1997.

VERGNOLLE, N. Protease-activated receptors and inflammatory hyperalgesia. *MemInstOswaldo Cruz*, v.100 (Suppl.I), p.173-176, 2005.

VERGNOLLE, N. Proteinase-Activated Receptor-2-Activating Peptides Induce Leukocyte Rolling, Adhesion, and Extravasation In Vivo. **J Immunol**, v.163, p.5064-5069, 1999.

VERGNOLLE, N.; BUNNETT, N. W.; SHARKEY, K. A.; BRUSSEE, V.; COMPTON, S. J.; GRADY, E. F.; CIRINO, G.; GERARD, N.; BASBAUM, A. I.; GORDON, P. A.; HOLLENBERG, M. D.; WALLACE, J.L. Proteinase-activated receptor-2 and hyperalgesia: A novel pain pathway. **Nature Medicine**, v.7, n.7, p.821-826, Jul 2010.

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.679-685, Apr 2001.

VU, T. H.; 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, p.1057-1068, Mar 1991.

WAN, H.; WINTON, H. L.; SOELLER, C.; TOVEY, E. R.; GRUENERT, D. C.; THOMPSON, P. J.; STEWART, G. A.; TAYLOR, G. W.; GARROD, D. R.; CANNELL, M. B.; ROBINSON, C. Der p 1 facilitates transepithelial allergen delivery by disruption of tight junctions. **J Clin Invest**, v.104, n.1, p.123-133, Jul 1999.

XI LI, Z. J. G.; CAO, J. W.; YU, B. P.; SONG, L. L.; LUO, H. S. Increase of mast cells may be associated with infiltration of eosinophils and proliferation of microvessels in gastric eosinophilic granuloma. **J Gastroenterol Hepatol**, v.22, p.37-42, Jan 2007.

ZAPPULLA, J.P.; AROCK, M.; MARS, L.T.; LIBLAU, R.S. Mast cells: new targets for multiple sclerosis therapy? **J Neuroimmunol**, v.131, p. 5-20, 2002.

ANEXOS

Anexo A – Certificado de aprovação do projeto pela Comissão de Ética no uso de animais da UFMG (CEUA)

	<p>UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS</p>
<p>UFMG</p>	<p>CEUA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS</p>
<p>CERTIFICADO</p>	
<p>Certificamos que o Protocolo nº. 193 / 2012, relativo ao projeto intitulado "PAPEL DO RECEPTOR ATIVADO POR PROTEASE (PAR)-2 NO RECRUTAMENTO DE EOSINÓFILOS EM PLEURISIA EXPERIMENTAL", que tem como responsável André Klein, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG), tendo sido aprovado na reunião de 13/08/2012. Este certificado expira-se em 13/08/2017.</p>	
<p>CERTIFICATE</p>	
<p>We hereby certify that the Protocol nº. 193 / 2012, related to the Project entitled "ROLE THE PROTEASE ACTIVATED RECEPTOR (PAR)-2 ON THE EOSINOPHILS RECRUITMENT IN EXPERIMENTAL PLEURISY", under the supervision of André Klein, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CEUA/UFMG), and was approved in 13/08/2012. This certificates expires in 13/08/2017.</p>	
<p>FRANCISNETE GRACIANE ARAUJO MARTINS</p>	
<p>Coordenador(a) da CEUA/UFMG Belo Horizonte, 13/08/2012.</p>	
<p>Atenciosamente.</p>	
<p>Sistema CEUA-UFMG https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/</p>	
<p>Universidade Federal de Minas Gerais Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005 31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592 www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br</p>	

Anexo B – Artigo completo publicado em periódico