

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

AYSLAN BARRA

ESTUDO DO PAPEL DOS RECEPTORES ATIVADOS POR
PROTEASE (PAR)2 E PAR4 NA FAGOCITOSE E ATIVAÇÃO *IN VITRO*
DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS OBTIDOS DE CAMUNDONGOS
C57BL/6

BELO HORIZONTE

2015

AYSLAN BARRA

ESTUDO DO PAPEL DOS RECEPTORES ATIVADOS POR
PROTEASE (PAR)2 E PAR4 NA FAGOCITOSE E ATIVAÇÃO *IN VITRO*
DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS OBTIDOS DE CAMUNDONGOS
C57BL/6

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 a obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas: Ênfase em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. André Klein

BELO HORIZONTE

2015

Dedicatória

À minha mãe, Eunice, por sempre apoiar as minhas escolhas em busca dos meus sonhos. À minha irmã, Andressa, pelo carinho, incentivo e exemplo de profissional.

“As oportunidades normalmente se apresentam disfarçadas de trabalho árduo e é
por isso que muitos não as reconhecem”
(ANN LANDERS)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, fonte de vida que me move todos os dias.

Ao meu professor e orientador André Klein, pela oportunidade e por acreditar em meu potencial. Sempre disposto a contribuir para o meu crescimento. Você foi mais que um orientador, um amigo, um conselheiro confiante, referência profissional e pessoal que me fez enxergar muito além das pesquisas científicas.

À professora Míriam Tereza Paz Lopes pelo apoio irrestrito ao uso de reagentes e equipamentos indispensáveis ao desenvolvimento do trabalho.

À professora Janetti Nogueira de Francischi por seus ensinamentos, lições e momentos agradáveis compartilhados. Um exemplo de profissional dedicada e comprometida com a educação, ciência e pesquisa.

Ao professor Evanguedes Kalapothakis e aos alunos do seu laboratório, por disponibilizar o uso da estufa de CO₂, essencial para o cultivo da cultura de macrófagos.

À professora Regina Maria de Marco Turchetti Maia, pelas conversas agradáveis e divertidas no laboratório.

À Kátia pelo apoio e suporte na execução dos experimentos.

Ao Programa de pós-graduação em Fisiologia e Farmacologia, pela oportunidade e apoio em prol do crescimento científico e pessoal dos alunos.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais pela concessão da Bolsa.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pelos recursos financeiros para a realização do trabalho.

À minha família, pelo incentivo e apoio em minha escolha. Minha amada mãe Eunice, uma mulher forte e guerreira que me ensinou a correr atrás dos meus objetivos e sonhos.

À minha irmã, Andressa por ser um exemplo e inspiração. Sempre me apoiando nos momentos de aperto. Concluir essa jornada não seria possível sem essas duas mulheres fundamentais em minha vida.

Aos meus avós, Sebastião e Sílvia pelo cuidado, orações e compreensão que me fortaleceram e me guiaram em todos os momentos.

Aos meus Tios e todos familiares pelo apoio, incentivo e união.

À querida Kelly, pelo companheirismo, cumplicidade e amor sincero.

À Marina, por ceder abrigo nas primeiras semanas em Belo Horizonte e pela amizade, companhia, conversas e desabafos na hora do almoço.

Aos colegas e amigos do laboratório de Inflamação e Dor da UFMG, que ajudaram e que me mostraram possibilidades infinitas. Com vocês estreitei os laços de amizade, acolhimento e parceria.

Agradecimento especial à Natália, pela receptividade, ensinamentos e amizade. Sempre paciente e disposta a ajudar.

À Flavia pela amizade, momentos de alegria e exemplo de aluna dedicada e organizada.

A todas as demais alunas do laboratório, Taissa, Maria Vitória, Camilla, Carol, Marcella e Bárbara pela companhia agradável, aprendizado e momentos de descontração.

Aos amigos do laboratório de Substância Antitumorais em especial a técnica Luciana e aluna Ariadne pela atenção e apoio técnico no preparo do meio de cultura.

Aos Bioteristas, Rinaldo e Wellington pelo cuidado e qualidade no manejo dos animais utilizados nos experimentos.

Aos auxiliares dos serviços gerais pela limpeza e conservação dos laboratórios e banheiros.

RESUMO

Os receptores ativados por protease (PAR) pertencem à família dos receptores acoplados à proteína G e são alvos de serino proteases, sendo classificados de 1 a 4, em função da ordem de descoberta. Tanto PAR2 quanto PAR4 são expressos em leucócitos, e estão envolvidos no recrutamento e ativação dessas células. Embora seja caracterizado o papel do PAR em modelos de inflamação e ativação celular, pouco se sabe sobre a participação desses receptores na função efetora de macrófagos como, por exemplo, a fagocitose e a secreção de mediadores inflamatórios. Diante disso, o nosso objetivo foi avaliar o papel de PAR2 e PAR4 sobre a fagocitose de partículas de zimosano e liberação de mediadores inflamatórios em macrófagos peritoneais *in vitro*. Para isso, os macrófagos foram obtidos de camundongos C57BL/6, os quais foram injetados previamente com solução de tioglicolato 6 % por via intraperitoneal. Após três dias, foi feita a coleta do lavado peritoneal e essas células foram pré-incubadas com LPS (10 µg/mL) 30 minutos antes da incubação com o agonista de PAR2 (SLIGRL-NH₂, 30 µM) ou agonista de PAR4 (AYPGKF-NH₂ 30 µM) em presença ou não dos seus respectivos antagonistas seletivos (PAR2: ENMD 1068; PAR4: TcY-NH₂); seguida pela adição de zimosano (10 µg/mL). A avaliação da fagocitose foi expressa através do Índice de Fagocitose (IF), definido como a razão entre o somatório do total de partículas fagocitadas em 100 células contadas sobre a porcentagem de macrófagos fagocíticos. O sobrenadante da cultura foi utilizado para a dosagem de óxido nítrico (NO), espécies reativas de oxigênio (ROS) e produção de citocinas (TNF-α e IL-10). A incubação dos macrófagos com o agonista de PAR2 (30 µM) foi capaz de aumentar o IF, fato não encontrado quando houve incubação concomitante com seu antagonista. Em contrapartida a incubação com o agonista de PAR4 reduziu o IF. Essa redução não foi observada, quando administrado junto ao seu antagonista. A co-incubação de agonista de PAR2 (30 µM) com o agonista de PAR4 (30 µM) não alterou o IF. A ativação *in vitro* de PAR2 ou PAR4 foi capaz de aumentar a produção de NO após 24 horas de incubação. Porém, após 48 horas de incubação, houve uma redução na produção desse mediador. A ativação do PAR2 (30 µM) não alterou os níveis de ROS 24 e 48 após a incubação. Porém, na presença do agonista de PAR4 (30 µM) houve um aumento na produção de ROS foi observado nos dois tempos analisados. A incubação dos macrófagos com agonista de PAR2 (30 µM) ou agonista de PAR4 (30 µM) não alterou a produção de TNF-α, porém o agonista de PAR2 (30 µM) aumentou a produção de IL-10 no tempo de 24 horas, enquanto o agonista de PAR4 (30 µM) reduziu a produção dessa citocina após 4 horas de incubação. Em conclusão, os dados sugerem um papel regulador de PAR2 e PAR4 no fenômeno fagocítico dos macrófagos e na produção de mediadores pró ou anti-inflamatório essenciais para o controle da resposta efetora dessas células.

PALAVRAS-CHAVE: PAR2, PAR4, Macrófagos, Fagocitose

ABSTRACT

The protease activated receptors (PAR) belong to the family of G protein-coupled receptors and are targets of serine proteases, classified from 1 to 4 depending on the order of discovery. Both PAR2 and PAR4 are expressed in leukocytes, and are involved in the recruitment and activation of these cells. Although the role of the PAR is characterized in inflammation and cell activation models, little is known about the role of these receptors in macrophages during effector functions, for example, phagocytosis and the secretion of inflammatory mediators. Therefore, our objective was to evaluate the role of PAR2 and PAR4 on the phagocytosis of zymosan particles and release of inflammatory mediators in peritoneal macrophages in vitro. For that, macrophages were obtained from C57BL/6 mice, which were previously injected with 6% thioglycollate solution intraperitoneally. After three days, was made the collection of the peritoneal fluid and these cells were pre-incubated with LPS (10 µg/ml) 30 minutes before the incubation with PAR2 agonist (SLIGRL-NH₂, 30 µM) or PAR4 agonist (AYPGKF-NH₂, 30 µM) in the absence or presence of the respective selective antagonists (PAR2: ENMD 1068, 30 µM; PAR4: TCY-NH₂, 30 µM); followed by addition of zymosan (10 µg/ml). The evaluation was expressed by Phagocytosis Index (PI) defined as the ratio between the sum of the total particles engulfed in 100 cells counted on the percentage of phagocytic macrophages. The culture supernatant was used for the dosage of nitric oxide (NO), reactive oxygen species (ROS) and cytokine production (TNF-α and IL-10). Incubation of macrophages with PAR2 agonist was able to increase the PI, which did not occur when there was a concomitant incubation with antagonist thereof. However, incubation with PAR4 agonist reduced the PI. This reduction was not observed when administered with his antagonist. The co-incubation of PAR2 agonist (30µM) with PAR4 agonist (30µM) did not alter the PI. The PAR2 activation in vitro or PAR4 was able to increase NO production after 24 hours of incubation. However, after 48 hours of incubation, there was a reduction in the production of this mediator. The PAR2 activation (30µM) did not alter the levels of ROS 24 and 48 after incubation. Nevertheless, in the presence of PAR4 agonist (30 µM) an increase in ROS production was observed in both times analyzed. Incubation of macrophages with SLIGRL-NH₂ (30µM) or AYPGKF-NH₂ (30µM) did not affect TNF-α production, but PAR2 agonist increased IL-10 production in 24 hours, whereas the PAR4 agonist reduces the production of cytokine after 4 hours of incubation. In conclusion, the data suggest a regulatory role of PAR2 and PAR4 in the phagocytic phenomenon of macrophages and in the production of mediators pro and anti-inflammatory essential for controlling the effector response of these cells.

KEYWORDS: PAR2, PAR4, macrophages, phagocytosis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Domínios estruturais e funcionais do PAR.	15
Figura 2. Efeito do LPS sobre o índice de fagocitose em macrófagos peritoneais <i>in vitro</i>	30
Figura 3. Efeito do agonista de PAR2 SLIGRL-NH ₂ sobre o índice de fagocitose em macrófagos peritoneais <i>in vitro</i>	31
Figura 4. Efeito do agonista de PAR2 SLIGRL-NH ₂ sobre o índice de fagocitose em macrófagos peritoneais <i>in vitro</i> , na presença de concentrações crescentes do antagonista seletivo de PAR2 ENMD-1068.....	33
Figura 5. Efeito do agonista de PAR4 AYPGKF-NH ₂ sobre o índice de fagocitose em macrófagos peritoneais <i>in vitro</i>	34
Figura 6. Efeito do agonista de PAR4 AYPGKF-NH ₂ sobre o índice de fagocitose em macrófagos peritoneais <i>in vitro</i> , na presença de concentrações crescentes do antagonista seletivo de PAR4 tcY-NH ₂	35
Figura 7. Efeito da co-incubação dos agonistas de PAR2 SLIGRL-NH ₂ e PAR4 AYPGKF-NH ₂ sobre o índice de fagocitose em macrófagos peritoneais <i>in vitro</i>	36
Figura 8. Efeito da co-incubação dos agonistas de PAR2 SLIGRL-NH ₂ e PAR4 AYPGKF-NH ₂ sobre o número de macrófagos peritoneais fagocíticos <i>in vitro</i>	37
Figura 9. Microscopia ótica de macrófagos peritoneais incubados com os agonistas de PAR2 SLIGRL-NH ₂ , PAR4 AYPGKF-NH ₂ ou ambos e o efeito desses peptídeos sobre o número e avidéz dessas células em fagocitar partículas de zimosano <i>in vitro</i>	38
Figura 10. Produção de óxido nítrico em macrófagos peritoneais <i>in vitro</i> 24 horas após a incubação com o agonista de PAR2 SLIGRL-NH ₂ ou agonista de PAR4 AYPGKF-NH ₂	40
Figura 11. Produção de óxido nítrico em macrófagos peritoneais <i>in vitro</i> 48 horas após a incubação com o agonista de PAR2 SLIGRL-NH ₂ ou agonista de PAR4 AYPGKF-NH ₂	42
Figura 12. Produção de espécies reativas de oxigênio em macrófagos peritoneais <i>in vitro</i> na presença de agonista de PAR2 SLIGRL-NH ₂ ou agonista de PAR4 AYPGKF-NH ₂	

Figura 13. Produção de espécies reativas de oxigênio em macrófagos peritoneais <i>in vitro</i> na presença de agonista de PAR2 SLIGRL-NH ₂ ou agonista de PAR4 AYPGKF-NH ₂	46
Figura 14. Efeito do agonista de PAR2 SLIGRL-NH ₂ sobre a viabilidade celular de macrófagos peritoneais <i>in vitro</i>	48
Figura 15. Efeito do agonista de PAR4 AYPGKF-NH ₂ sobre a viabilidade celular de macrófagos peritoneais <i>in vitro</i>	49
Figura 16. Efeito do agonista de PAR2 SLIGRL-NH ₂ sobre a produção de citocinas TNF- α e IL-10 em cultura de macrófagos peritoneais em função do tempo.....	51
Figura 17. Efeito do agonista de PAR4 AYPGKF-NH ₂ sobre a produção de citocinas TNF- α e IL-10 em cultura de macrófagos peritoneais em função do tempo.....	52

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AYPGKF-NH₂ - peptídeo sintético ativador de PAR4

CEUA - Comitê de Ética no Uso de Animais da UFMG

DCFH - 2'7'-diclorofluoresceína

DCFH-DA - diacetato de 2'7'-diclorofluoresceína

DMEM – meio de cultura Dulbecco modificado

DMSO: dimetilsulfóxido

ELISA: ensaio imunoenzimático

ENMD-1068 - peptídeo sintético antagonista de PAR2

Fator VIIa - fator VII ativado

Fator Xa - fator X ativado

H₂O₂ – peróxido de hidrogênio

H₂SO₄ - ácido sulfúrico

IFN- γ - interferon do tipo gamma

i.p. - intraperitoneal

IL- Interleucina

M - molar (Mol/Litro)

mg/kg - miligramas por quilo

MTT - 3-(4,5 dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio

NO - óxido nítrico

PAR- receptor ativado por protease

PBS - tampão fosfato salina

p/v - peso sobre volume

ROS - espécies reativas de oxigênio

RRP - receptores de reconhecimento de padrão

SLIGRL-NH₂ - peptídeo sintético ativador de PAR2

TcY-NH₂ - peptídeo sintético antagonista de PAR4

TGF-β - fator de crescimento transformante - beta

TLR - receptor do tipo *Toll*

TNF-α - fator de necrose tumoral alfa

UFMG - Universidade Federal de Minas Gerais

v/v - volume por volume

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
1.1 Proteases	14
1.2 Receptores ativados por proteases (PARs)	15
1.3 Inflamação e macrófagos	17
2. JUSTIFICATIVA	21
3. OBJETIVOS	22
3.1 Objetivo Geral	22
3.2 Objetivos específicos	22
4. MATERIAIS E MÉTODOS	23
4.1 Animais.....	23
4.2 Preparo das Soluções e Reagentes.....	23
4.2.1 Preparo da Solução de Tioglicolato 6%	23
4.2.2 Preparo do Meio de cultura (DMEM).....	23
4.2.3 Preparo da solução de Xilazina e Quetamina	24
4.2.4 Preparo da solução de LPS	24
4.2.5 Preparo da solução de Zimosano	24
4.2.6 Preparo das soluções dos agonistas e antagonistas de PAR2 e PAR4	24
4.2.7 Preparo da solução diluidora de leucócitos (solução de Turk).....	24
4.2.8 Preparo da solução de Trypan Blue 0,4%.....	25
4.3 Obtenção e Coleta dos Macrófagos	25
4.4 Contagem total e avaliação da viabilidade celular.....	25
4.5 Cultivo de macrófagos peritoneais	26
4.5.1 Estudos da atividade fagocítica.....	26
4.5.2 Avaliação da síntese de Óxido Nítrico.....	27
4.5.3 Avaliação da produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS).....	27
4.5.4 Avaliação da viabilidade celular na cultura de macrófagos	28
4.5.5 Ensaio imunoenzimático para dosagem das citocinas TNF- α e IL-10	28
4.6 Análise Estatística	29
5. RESULTADOS	30
5.1 Avaliação do efeito da concentração do LPS sobre a fagocitose de macrófagos peritoneais estimulados <i>in vitro</i>	30
5.2 Participação de PAR2 e PAR4 na regulação da fagocitose de macrófagos estimulados <i>in vitro</i> com LPS	30

5.2.1 Efeito do peptídeo sintético ativador de PAR2 SLIGRL-NH ₂ sobre a fagocitose de partículas de zimosano por macrófagos peritoneais estimulados com LPS	31
5.2.2 Efeito do peptídeo sintético antagonista de PAR2 ENMD-1068 sobre a fagocitose de partículas de zimosano por macrófagos peritoneais estimulados com LPS induzida por SLIGRL-NH ₂	32
5.2.3 Efeito do peptídeo sintético ativador de PAR4 AYPGKF-NH ₂ sobre a fagocitose de partículas de zimosano por macrófagos peritoneais estimulados com LPS	33
5.2.4 Efeito do peptídeo sintético antagonista de PAR4 tcY-NH ₂ sobre a inibição em resposta ao AYPGKF-NH ₂ da fagocitose de partículas de zimosano por macrófagos peritoneais estimulados com LPS.....	34
5.2.5 Efeito da co-incubação dos peptídeos sintéticos ativadores de PAR2 SLIGRL-NH ₂ e PAR4 AYPGKF-NH ₂ sobre a fagocitose de partículas de zimosano por macrófagos peritoneais estimulados com LPS.....	35
5.2.6 Efeito dos peptídeos sintéticos ativadores de PAR2 SLIGRL-NH ₂ e PAR4 AYPGKF-NH ₂ sobre a porcentagem de macrófagos que fagocitaram partículas de zimosano	36
5.3 Participação de PAR2 e PAR4 sobre a produção de óxido nítrico e espécies reativas de oxigênio em macrófagos estimulados <i>in vitro</i> com LPS.....	39
5.3.1 Efeito do peptídeo sintético ativador de PAR2 SLIGRL-NH ₂ e do agonista de PAR4 AYPGKF-NH ₂ sobre a produção de óxido nítrico em macrófagos peritoneais 24 horas após estimulação com LPS	39
5.3.2 Efeito do peptídeo sintético ativador de PAR2 SLIGRL-NH ₂ e do agonista de PAR4 AYPGKF-NH ₂ sobre a produção de óxido nítrico em macrófagos peritoneais 48 horas após estimulação com LPS	41
5.3.3 Efeito do peptídeo sintético ativador de PAR2 SLIGRL-NH ₂ e do agonista de PAR4 AYPGKF-NH ₂ sobre a produção de espécies reativas de oxigênio em macrófagos peritoneais 24 horas após estimulação com LPS.....	43
5.3.4 Efeito do peptídeo sintético ativador de PAR2 SLIGRL-NH ₂ e do agonista de PAR4 AYPGKF-NH ₂ sobre a produção de espécies reativas de oxigênio em macrófagos peritoneais 48 horas após estimulação com LPS.....	45
5.4 Análise da potencial influência da ativação PAR2 e PAR4 sobre a viabilidade dos macrófagos estimulados <i>in vitro</i> com LPS.....	47
5.5 Efeitos dos agonistas de PAR2 e PAR4 sobre a produção de IL10 e TNF- α em macrófagos estimulados <i>in vitro</i> com LPS.....	50
6. DISCUSSÃO	53
8. REFERÊNCIAS.....	60
ANEXO	66
ANEXO – Certificado de aprovação do projeto pela Comissão de Ética no uso de Animais da UFMG (CEUA).....	67

1. INTRODUÇÃO

1.1 Proteases

Proteases, proteinases ou peptidases são enzimas proteolíticas que clivam uma cadeia de aminoácidos em pequenos fragmentos. Esse processo é essencial para a síntese, degradação e regulação das propriedades estruturais e funcionais de todas as proteínas do corpo. As proteases compõem 2% do genoma humano e no organismo essas enzimas participam da digestão, crescimento, maturação, envelhecimento e morte, controlando diversas funções no ciclo de vida (Puente *et al.*, 2005).

As proteases são rigorosamente seletivas em clivar sequências específicas de aminoácidos, e podem ser classificadas de acordo com a sua função catalítica em seis tipos: aspártico, cisteínico, glutâmico, metálico, treonino e serino, onde cada tipo possui atividade e funções biológicas definidas (Puente *et al.*, 2005). As serino proteases são representadas por um terço de todas as proteases. Algumas enzimas desse grupo como a tripsina e trombina estão presentes em inúmeros tecidos e desempenham diversos papéis fisiológicos como na digestão, hemostasia, fertilização, apoptose e resposta imune (Cera, 2009).

Essa diversificada e notável atividade das proteases sobre o controle de funções vitais da célula têm atraído o interesse de pesquisadores no desenvolvimento de novos alvos farmacológicos para o tratamento de diferentes doenças.

Dentre os inúmeros papéis fisiológicos das proteases, a inflamação é uma condição em que a participação dessas enzimas é fundamental para a regulação desse processo. Após uma lesão tecidual, proteases presentes no microambiente que podem originar-se da circulação (fatores de coagulação), de células inflamatórias (triptase de mastócitos e elastase de neutrófilos), como também de outras fontes (bactérias, fungos e células epiteliais) (Shmidlin & Bunnett, 2001) são

responsáveis pela ativação de plaquetas, recrutamento de leucócitos e reparo tecidual (Shmidlin & Bunnett, 2001; Cocks & Moffatt, 2000).

1.2 Receptores ativados por proteases (PARs)

A maneira pela qual as proteases são capazes de gerar respostas fisiológicas importantes ocorre através da sua interação com receptores específicos presentes na superfície de células. Esses receptores, denominados de receptores ativados por proteases (PARs, do inglês, "Protease-Activated Receptors") pertencem à superfamília de receptores acoplados à proteína G que são alvos de proteases, com destaque para as serinoproteases e metaloproteases (Adams *et al.*, 2011; Austin *et al.*, 2013). A presença de proteases no microambiente celular é capaz de clivar uma porção específica no domínio extracelular N-terminal do receptor. A sequência recém-exposta, onde a ligação foi rompida, se liga em um sítio específico do próprio receptor, levando a sua ativação e transdução do sinal (Soh *et al.*, 2010), conforme apresentado esquematicamente na **figura 1**.

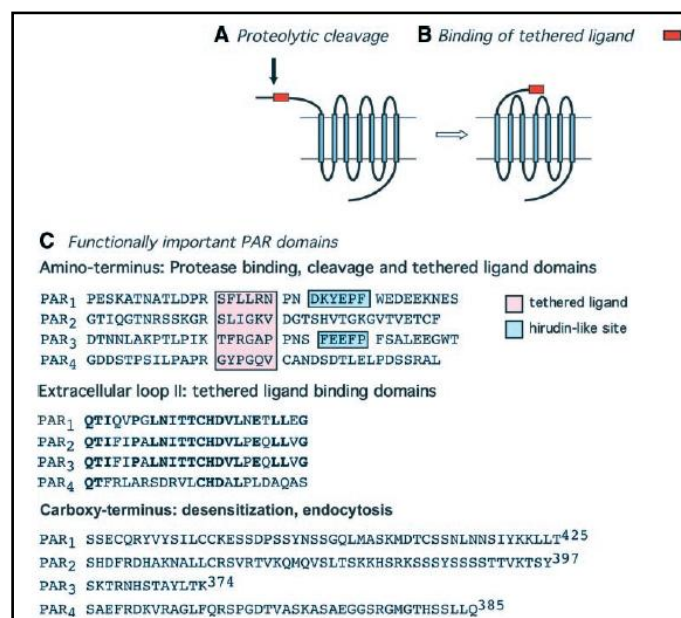


Figura 1: Domínios Estruturais e Funcionais do PAR. A figura mostra o alinhamento de domínios de receptores humanos PAR1, PAR2, PAR3 E PAR4. **A e B:** Mecanismo de clivagem e interação do ligante com domínios de ligação extracelular. **C:** Domínios de importância funcional de cada receptor na porção amino-terminal, no segundo domínio extracelular, e na porção carboxi-terminal (retirado de Ossovskaya, V. S.; Bunnett, N.W. 2004).

Esse mecanismo peculiar de ativação do PAR pode ser mimetizado através do uso de peptídeos sintéticos que reproduzem a sequência de aminoácidos do ligante ancorado ao receptor. Ao contrário das proteases, esses peptídeos são capazes de ativar o PAR, de maneira reversível, sem a necessidade de proteólise (Adams *et al.*, 2011). Após a ativação do PAR, a transdução do sinal pode ocorrer via proteína $G\alpha_q$, $G\alpha_i$, $G\alpha_{12/13}$, $G\beta_\gamma$ ou por β -arrestinas (Soh *et al.*, 2010; Grimsey *et al.*, 2014).

Os PARs são expressos em grande número de tecidos e células e até o momento foram clonados quatro subtipos desse receptor. Eles são nomeados de 1-4, de acordo com a ordem de sua descoberta e diversas proteases têm demonstrado ativar diferentes subtipos de PARs e com potências relativamente variáveis. Assim, o subtipo PAR1 pode ser ativado por trombina, catepsina G e fator Xa; PAR2 por tripsina, triptase de mastócitos, fator VIIa e fator Xa; PAR3 por trombina e PAR4 por trombina, tripsina, catepsina G e fator Xa, entre outros (Ossovszkaya & Bunnett., 2004; Camerer, *et al.*, 2000; Cottrell, *et al.*, 2004; Sambrano *et al.*, 2000).

A descoberta relativamente recente do PAR na década de 90 tem enriquecido a literatura, ao longo desse tempo, com vários trabalhos concentrando-se em elucidar o papel fisiológico e a contribuição desse receptor no contexto de diversas patologias. O PAR1 foi o primeiro receptor clonado e identificado (Rasmussen *et al.*, 1991; Vu *et al.*, 1991), sendo expresso em plaquetas, células endoteliais, fibroblastos, célula muscular lisa, monócitos, linfócitos, entre outras revisado por Steinhoff *et al.*, 2005. Esse subtipo tem importância funcional na hemostasia, inflamação e analgesia (Vergnolle *et al.*, 1999; Asfaha *et al.*, 2002; Cenac *et al.*, 2005; Coughlin, 2005).

O segundo receptor clonado e caracterizado foi o PAR2 (Nystedt *et al.*, 1994; Bohm *et al.*, 1996). Esse subtipo de PAR é altamente expresso no trato respiratório, gastrointestinal, células epiteliais, células endoteliais, macrófagos, células dendríticas, entre outras (Steinhoff *et al.*, 2005). No contexto inflamatório, o PAR2 tem demonstrado ser o principal receptor dessa classe, atuando como um efetador na detecção de proteases associadas a uma infecção ou dano tecidual.

Alguns anos mais tarde, outros dois tipos de receptores de trombina foram clonados: PAR3 (Ishihara *et al.*, 1997) e PAR4 (Kahn *et al.*, 1998; Xu *et al.*, 1998). O PAR3 funciona como um cofator para a ativação de outros tipos do PAR, sendo necessária a co-expressão de outros subtipos na célula para o seu correto funcionamento na forma de heterodímero (Nakanishi-Matsui *et al.*, 2000).

O PAR4 foi o último receptor dessa classe descoberto. Ele é expresso em células endoteliais, plaquetas, neurônios sensoriais, neutrófilos, macrófagos entre outras (Asfaha, *et al.*, 2007; Vergnolle *et al.*, 2002; Colognato *et al.*, 2003). Assim, como o PAR1 esse receptor foi inicialmente caracterizado como alvo de proteases como a trombina, tendo função primordial na hemostasia (Kahn *et al.*, 1998). Porém nos últimos anos muitos trabalhos vêm desvendando o papel desse receptor em modelos de dor e inflamação (Vergnolle *et al.*, 2002; Bradesi, 2010; Gomides *et al.*, 2014). Embora os PARs, em especial PAR2 e PAR4 sejam expressos em leucócitos e outras células inflamatórias, o papel destes receptores e de seus ligantes endógenos na modulação da inflamação ainda não está muito bem esclarecido.

1.3 Inflamação e macrófagos

A inflamação é uma resposta do organismo a um estímulo nocivo de natureza física, química ou biológica que visa à manutenção da integridade tecidual e homeostase local (Medzhitov, 2010). Na inflamação aguda clássica, macrófagos, mastócitos e células dendríticas circulantes ou residentes monitoram locais estratégicos do organismo e alertam sobre a presença de patógenos invasores. A maneira como essas células identificam e amplificam a resposta antimicrobiana é desencadeada através do reconhecimento de padrões moleculares característicos para uma classe de microorganismos em particular (Akira *et al.*, 2006). Vários receptores evoluíram a fim de detectar domínios conservados presentes em fungos, bactérias, vírus ou parasitos de modo a produzir uma resposta específica direcionada a cada classe de microorganismos. Esses receptores são conhecidos como Receptores de Reconhecimento de Padrão (PRRs, do inglês *Pattern Recognition Receptors*), e uma vez ativados, geram uma resposta bioquímica que culmina com a migração de células inflamatórias como neutrófilos, macrófagos,

mastócitos, células dendríticas e eosinófilos para o local da infecção ou lesão. Após a migração, essas células produzem mediadores bioativos como quimiocinas, citocinas, eicosanóides, aminas vasoativas, entre outras que contribuem para a amplificação da resposta inata e desenvolvimento da imunidade adaptativa (Medzhitov, 2010). Alguns exemplos de PPRs incluem os receptores do tipo NOD (NLRs, do inglês *Nucleotide-binding Oligomerization Domain receptors*), receptores de lecitina (CLRs, do inglês *C-Type Lectin Receptors*) e receptores do tipo Toll (TLRs, do inglês *Toll-like receptors*), que podem estar localizados na superfície celular, em organelas citoplasmáticas ou solúveis no sangue onde se ligam a antígenos e sinalizam (opsonização) para as células sentinelas (Takeuchi & Akira, 2010).

Os RRP são expressos principalmente nos macrófagos e tem papel chave na resposta imune inata e adaptativa (Takeuchi & Akira, 2010). Os macrófagos são células que derivam diretamente dos monócitos a partir da linhagem progenitora mielóide da medula óssea. Os monócitos sob estímulos periféricos (citocinas, quimiocinas, moléculas microbianas) migram para os tecidos-alvos, onde se diferenciam em macrófagos (Shi & Pamer, 2011; Auffray *et al.*, 2009). Uma vez no local da lesão, macrófagos residentes ou recrutados iniciam uma resposta celular especializada de combate ao patógeno invasor que é sincronizada com uma fase de resolução e reparação tecidual. Uma característica comum dos macrófagos que o define como um fagócito é a capacidade de internalizar e matar bactérias, degradar células apoptóticas, eliminar compostos tóxicos, produzir mediadores inflamatórios importantes no combate a patógenos e ativar e recrutar leucócitos para o sítio inflamatório (Aderem, 2003; Murray & Wynn, 2011).

Os macrófagos são células muito versáteis e possuem, além da caracterização clássica de célula pró-inflamatória e microbicida, a capacidade de alterar o seu fenótipo e função de acordo com os sinais do microambiente local (Martinez & Gordon, 2014). Esses perfis fenotípicos têm sido classificados em dois tipos principais: Macrófagos classicamente ativados (M1) ou pró-inflamatórios e os alternativamente ativados ou pró-resolutivos (M2) (Mantovani *et al.*, 2012; Martinez & Gordon, 2014). Os macrófagos M1 são ativados por LPS ou IFN- γ e contribuem para a resposta imune inata através da produção de mediadores como NO, ROS,

citocinas e quimiocinas que vão promover a morte de patógenos e amplificar a resposta antimicrobiana (Murray & Wynn, 2011). Os macrófagos M2 são ativados por IL-4 e IL-13, e produzem TGF- β , lipoxinas, protectinas, resolvinas e fatores de crescimento que vão contrabalançar os efeitos dos mediadores pró-inflamatórios e iniciar a fase de resolução da inflamação e restauração da homeostase tecidual (Lech & Anders, 2013). Se a resposta inflamatória aguda não consegue eliminar o agente patogênico, o processo inflamatório persiste e adquire caráter crônico. Essa nova etapa é marcada por um efetivo contingente de macrófagos e células T que, numa tentativa frustrada de restaurar a homeostase local, liberam mediadores diretamente relacionados com a formação de granulomas, fibrose tecidual a gênese de doenças autoimunes (Nathan & Ding, 2010).

Assim, os macrófagos exercem um efeito regulador tanto na geração, quanto na resolução da resposta inflamatória, revisado por Gordon *et al.*, 2014 e um dos mecanismos efetores dessas células que contribui para a duração ou término desse processo é a fagocitose.

A fagocitose foi descrita inicialmente por Metchnikoff no século XIX e foi caracterizada como um mecanismo ancestral desenvolvido inicialmente com o intuito de obter nutrientes (Gordon, 2008). Em organismos superiores ela evoluiu no sentido de proteger o hospedeiro contra patógenos invasores e na remoção de debris celulares e células senescentes. A fagocitose é um mecanismo complexo, porém essencial na biologia dos macrófagos e está envolvido não só na defesa antimicrobiana como também na homeostasia local e remodelamento do tecido. Ela corresponde à etapa inicial da resposta imune inata que culmina de maneira especializada e organizada com o desenvolvimento da resposta adaptativa (Underhill & Goodridge., 2012).

Nos macrófagos, a fagocitose pode ser classificada, didaticamente, em três fases: A fase de reconhecimento, de internalização e de degradação. A fase de reconhecimento envolve a discriminação entre estruturas celulares do hospedeiro e de patógenos invasores. Essa detecção compreende o reconhecimento específico de domínios conservados presentes em estruturas de bactérias, fungos e parasitos, denominados de padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs, do inglês *Pathogen-Associated Molecular Patterns*) que são indispensáveis a sobrevivência

desses organismos (Takeuchi & Akira, 2004). Neste grupo se incluem, por exemplo, o lipopolissacarídeo (LPS) e ácido lipotecoico de bactérias gram-negativas e o muramil-dipeptídeo de bactérias gram-positivas. Vários RRP participam do reconhecimento, em especial TLRs. Outros receptores fagocíticos específicos como o receptor de manose, dectina-1 e o receptor de "scavenger" também estão envolvidos (Goodridge *et al.*, 2012; Underhill & Goodridge., 2012). A segunda fase compreende a internalização do microorganismo ou partícula para dentro da célula. A internalização requer a participação de proteínas contráteis do citoesqueleto como miosina e actina, onde a associação entre o estado contrátil desses filamentos com proteínas da membrana celular promovem a internalização do microorganismo e a formação do fagossomo. A simples fagocitose e aprisionamento do microorganismo no fagossomo são insuficientes para a sua morte e degradação, por isso, na terceira fase, ocorre à maturação do fagossomo. Essa organela inicialmente é imatura, mas após a fagocitose do patógeno, há modificações estruturais na composição bioquímica dessa estrutura celular, de modo que o fagossomo maduro se funde com lisossomos contendo enzimas hidrolíticas de alta capacidade microbicida. Isso resulta na morte e degradação do patógeno, e algumas proteínas específicas desse microorganismo podem ser apresentadas como antígenos aos linfócitos e assim dar início a resposta imune adaptativa (Flannagan *et al.*, 2012; Underhill & Goodbridge, 2012).

Diante da importância da fagocitose e do PAR na inflamação, e tendo em vista que o PAR é um receptor expresso em macrófagos (Colognato, et al., 2003), avaliou-se o papel do PAR2 e PAR4 na fagocitose e na ativação *in vitro* de macrófagos peritoneais pré-estimulados com LPS.

2. JUSTIFICATIVA

Após a descoberta dos receptores ativados por protease (PAR) na década de 90, muitos estudos têm demonstrado a sua importância na homeostasia, dor, inflamação, entre outras. A literatura a respeito do PAR no contexto inflamatório é rica e têm como base trabalhos envolvendo os subtipos de PAR2 e PAR4 no recrutamento celular e liberação de mediadores. Porém apesar do crescimento e interesse na área, pouco ou nenhum estudo aborda o papel desses receptores sobre a função efetora dos macrófagos. Diante disso, o nosso trabalho visa caracterizar o papel de PAR2 e PAR4 sobre a fagocitose de partículas de zimosano e liberação de mediadores inflamatórios por macrófagos peritoneais *in vitro*.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Caracterizar o papel dos receptores ativados por protease (PAR)2 e PAR4 sobre a fagocitose de partículas de zimosano e liberação de mediadores inflamatórios por macrófagos peritoneais *in vitro*.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar o papel de PAR2 e PAR4 sobre a capacidade dos macrófagos peritoneais em fagocitar partículas de zimosano em modelo *in vitro*;
- Avaliar o efeito da ativação de PAR2 e PAR4 sobre a produção de óxido nítrico (NO) por macrófagos peritoneais *in vitro*;
- Avaliar o efeito da ativação de PAR2 e PAR4 sobre a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) por macrófagos peritoneais *in vitro*;
- Avaliar o efeito da ativação de PAR2 e PAR4 sobre a viabilidade celular dos macrófagos peritoneais *in vitro*;
- Avaliar o efeito da ativação de PAR2 e PAR4 sobre a produção de citocinas TNF- α e IL-10 por macrófagos peritoneais *in vitro*.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

Camundongos fêmeas da linhagem C57BL/6 com idade em torno de 6 a 8 semanas e peso aproximado de 15-20 gramas foram utilizados na experimentação (Certificado do comitê de ética da UFMG - CEUA, Nº 374/2014). Os animais foram obtidos do Centro de Bioterismo (Cebio) da UFMG e mantidos sob cuidados no biotério do Departamento de Farmacologia da UFMG, com controle de luz, temperatura e livre acesso à ração e água.

4.2 Preparo das Soluções e Reagentes

4.2.1 Preparo da Solução de Tioglicolato 6%

Previamente foram pesados seis gramas de Tioglicolato (Caldo Tioglicolato® Meio, Acumedia *Manufacturers*) e solubilizado em água destilada, sob aquecimento por trinta minutos até o aparecimento de uma coloração amarelo-escura. Após essa etapa, o volume final da solução foi acertado para 100 mL. A solução foi armazenada em recipiente âmbar e conduzida para esterilização na autoclave por 20 minutos à 120°C.

4.2.2 Preparo do Meio de cultura (DMEM)

O meio de cultura Dulbecco (DMEM, Cultilab®) foi preparado conforme recomendação do fabricante. No meio de cultura foram adicionados Ampicilina (100 mg/L, Sigma-Aldrich), estreptomicina (100 mg/L, Sigma-Aldrich) e Anfotericina B (5 mg/L, Sigma-Aldrich). No final, o meio foi filtrado em membrana de 0,22 µm para esterilização e o pH corrigido para 7,4.

4.2.3 Preparo da solução de Xilazina e Quetamina

Previamente foi preparado uma solução contendo 1 mL de Quetamina (10% p/v, Vetecia) com 0,75 mL de Xilazina (2% p/v, König). Dessa solução foi retirada uma alíquota de 20µL para a indução da eutanásia nos animais.

4.2.4 Preparo da solução de LPS

Lipopolissacarídeo da parede celular de *Escherichia coli* (LPS, Sigma-Aldrich, 0111:B4) foi solubilizado em PBS para concentração final de 1 mg/mL. Posteriormente o LPS foi diluído na concentração de 10 µg/mL e utilizado no meio de cultura.

4.2.5 Preparo da solução de Zimosano

O Zimosano é um polissacarídeo obtido da parede celular do fungo *Saccharomyces cerevisiae* (Sigma-Aldrich) e foi pesado e solubilizado em água destilada, formando uma solução inicial na concentração de 1 mg/mL. No meio de cultura o Zimosano foi diluído para a concentração de 10 µg/mL.

4.2.6 Preparo das soluções dos agonistas e antagonistas de PAR2 e PAR4

Os peptídeos sintéticos ativadores de PAR2 (SLIGRL-NH₂, *American Peptide*) e PAR4 (AYPGKF-NH₂, *American Peptide*); e os peptídeos antagonistas de PAR2 (ENMD-1068, Enzo) e PAR4 (tcY-NH₂, *Tocris Bioscience*) foram preparados numa solução com concentração inicial de 1 mg/mL.

4.2.7 Preparo da solução diluidora de leucócitos (solução de Turk)

A solução de Turk, utilizada para a contagem total, foi preparada da seguinte forma:

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.

4.2.8 Preparo da solução de Trypan Blue 0,4%

A solução de Trypan Blue, utilizada para medição da viabilidade celular, foi feita conforme abaixo:

Trypan Blue -----	40 mg
Água destilada -----	10 mL

4.3 Obtenção e Coleta dos Macrófagos

Em torno de 8 semanas de vida, camundongos C57BL6 foram injetados com 1 mL de Tioglicolato 6% e após transcorridos três dias de migração celular, os animais foram eutanasiados com a solução de Quetamina (120 mg/kg) e Xilazina (20 mg/kg) por via intramuscular. Após esse procedimento foi realizado a coleta das células do lavado intraperitoneal com 5 mL de meio de cultura DMEM. O conteúdo do lavado foi transferido para tubos de ensaios, mantidos sob refrigeração, e em seguida foram centrifugados a 100 G por 4 minutos. Posteriormente, o sobrenadante foi descartado e as células ressuspendidas em 1 mL de meio de cultura DMEM.

4.4 Contagem total e avaliação da viabilidade celular

Após a centrifugação e ressuspensão das células em meio DMEM, uma alíquota de 20 µL da amostra foi misturada com 180 µL de corante Turk para contagem de células totais em câmara de Neubauer, utilizando um microscópio ótico. Outra alíquota de 10 µL dessa amostra foi diluída em 20 µL do corante Trypan Blue, a fim de se avaliar a viabilidade celular inicial da amostra em câmara de Neubauer. Em todas as coletas a viabilidade celular obtida foi > 96% e a partir desse parâmetro foi feita a correção do número de células viáveis para o plaqueamento e cultivo no meio de cultura.

4.5 Cultivo de macrófagos peritoneais

4.5.1 Estudos da atividade fagocítica

Em uma placa de 24 poços, foram inseridas lamínulas circulares e os macrófagos obtidos do lavado peritoneal foram plaqueados na concentração de 50.000 células por poço. Após essa etapa, a placa foi incubada por três horas em estufa de CO₂ 5% a 37°C, com o intuito de promover a aderência dos macrófagos nas lamínulas. Transcorrido esse tempo, a placa foi lavada três vezes com DMEM e os macrófagos aderidos foram estimulados com LPS (10 µg/ml, durante 30 minutos). Ao término desse intervalo foram acrescentadas concentrações crescentes do peptídeo ativador de PAR2 (SLIGRL-NH₂, 1 µM, 5 µM e 30 µM) ou do peptídeo ativador de PAR4 (AYPGKF-NH₂, 1 µM, 5 µM e 30 µM), durante 30 minutos. Em alguns experimentos, os respectivos antagonistas de PAR (PAR2: ENMD-1068: 0,1-30 µM; PAR4: TcY-NH₂: 0,1-30 µM) foram adicionados em concentrações crescentes 30 minutos antes da adição dos respectivos agonistas por 30 minutos a fim de se avaliar o fenômeno estudado com o bloqueio do receptor alvo. O passo seguinte foi adicionar zimosano (10 µg/ml) por 1 hora em estufa a 37°C e 5% CO₂. Transcorrido esse tempo, o meio de cultura foi removido e a placa permaneceu em temperatura ambiente até secar. No dia seguinte, as lamínulas foram retiradas e submetidas à coloração com os corantes May Grunwald (RENYLAB, Ltda.) e Giemsa (QEEL, Ltda.).

A atividade fagocítica dos macrófagos peritoneais sobre partículas de zimosano foi avaliada através do índice de fagocitose (IF), calculado como a razão entre o somatório do total de partículas fagocitadas pelos macrófagos sobre a porcentagem de macrófagos fagocíticos. Em geral foram contadas 100 células por campo, incluindo macrófagos fagocíticos ou não, e o somatório do total de partículas contadas foi dividido sobre a porcentagem das células que fagocitaram, conforme a fórmula abaixo:

$$IF = \frac{\text{Total de partículas fagocitadas}}{\% \text{ de células fagocíticas}}$$

4.5.2 Avaliação da síntese de Óxido Nítrico

A reação de Griess é utilizada para indicar a presença de nitrito orgânico em uma solução. O nitrito presente no sobrenadante da cultura reage com a sulfanilamida em meio ácido, formando um sal diazônio que reage com N-1-naftiletilenodiamina (Reagente de Griess, Sigma) gerando um composto de coloração vermelha intensa e espectro de absorção característico. Para a preparação da reação de Griess, 500 mg desse reagente foi diluído em 12,5 mL de água destilada, minutos antes de ser utilizado. A medida da absorbância em 540 nm foi feita após 10 minutos da mistura de 50 µL da solução do reagente de Griess com igual volume da amostra de sobrenadante, coletadas 24 ou 48 horas após a incubação. A dosagem de nitrito foi obtida através da construção de uma curva padrão de nitrito.

4.5.3 Avaliação da produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS)

A dosagem de ROS foi avaliada utilizando uma sonda fluorescente diacetato de 2'7'-diclorofluoresceína (DCFH-DA) numa placa de 96 poços, onde foram incubados 6×10^5 células/ poço. Essa sonda tem propriedades físico-

químicas de baixa polaridade, permitindo que ela atravessasse a membrana plasmática. Após a incorporação, essa sonda sofre hidrólise de esterases intracelulares e é convertida em 2'7'-diclorofluoresceína (DCFH), molécula polar sem propriedade fluorescente. O DCFH é rapidamente oxidado, por espécies reativas de oxigênio (ROS), a um composto com elevada propriedade fluorescente que pode ser medido por fluorimetria. Após o protocolo de incubação com LPS, agonistas e zimosano, as células foram tratadas com 5µM de DCFH-DA (Sigma) diluído em dimetil-sulfóxido (DMSO, LabSynth) por 4h a 37°C. Transcorrido esse tempo, a intensidade fluorescente foi medida em um fluorímetro com comprimento de onda de excitação de 485 nm e comprimento de emissão de 538 nm. Os resultados foram expressos como a porcentagem de produção de ROS comparada ao grupo de macrófagos sem estímulo que receberam a sonda (DMEM).

4.5.4 Avaliação da viabilidade celular na cultura de macrófagos

Foram realizadas análises da viabilidade celular dos macrófagos em cultura nos intervalos de 6, 24 e 48 horas após o protocolo de incubação. Em cada tempo analisado, o sobrenadante da placa foi descartado e a mesma contendo os macrófagos aderidos foi incubada com o MTT, brometo de (3-(4,5 dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio, Sigma) por quatro horas em estufa de CO₂ 5% a 37 °C. Esse sal é metabolizado em mitocôndria de células viáveis, formando cristais insolúveis de coloração azul. Transcorrido esse tempo, a solução de MTT foi removida e adicionou-se DMSO em todos os poços (*LabSynth*) para a solubilização dos cristais visualizados nos poços viáveis. No leitor de Elisa, foi medida a absorbância em 570 nm que fornece a medida da proporção de células viáveis.

4.5.5 Ensaio imunoenzimático para dosagem das citocinas TNF-α e IL-10

As citocinas foram dosadas em 60 µL do sobrenadante coletado usando kits de imunoenensaio da R&D Systems, seguindo a recomendação do fabricante. A placa de 96 poços foi sensibilizada com 100 µL/poço do anticorpo primário

(anti-camundongo) específico para a citocina em questão e incubada a 4°C *overnight*. A placa foi lavada 6 vezes com 400 µL de PBS pH 7,4 contendo 0,05% de Tween 20 (tampão de lavagem). Em seguida foram adicionados à placa 200 µL/poço de PBS pH 7,4 com 1 % BSA, seguido de incubação por 1 hora para bloquear os sítios de ligações inespecíficas. Posteriormente a placa foi novamente lavada por 5 vezes com tampão de lavagem. Os padrões e as amostras diluídas em PBS pH 7,4 com 0,1% BSA e 0,05% Tween 20 (100 µL/poço) foram adicionadas à placa e incubados a 4°C *overnight*. A placa foi lavada com o tampão de lavagem (5 vezes) e foram adicionados 100 µL/poço do anticorpo de detecção biotinilado a ser dosado. Após a incubação por 2 horas, a placa foi novamente lavada por 5 vezes com o tampão de lavagem, e foram adicionados 100 µL/poço do conjugado estreptavidina peroxidase (1:200) seguido de incubação por 20 minutos à temperatura ambiente. Após nova lavagem da placa (5 vezes), foram adicionados 100 µL/ poço de OPD (ortofenilenodiamina, Sigma) 0,5% diluído em tampão citrato 0,03 % pH 5,0 contendo 0,02 % de H₂O₂ (v/v). A placa foi incubada ao abrigo da luz por no máximo 30 minutos e a reação foi interrompida por adição de 50 µL/poço de H₂SO₄ 1M (Sigma). A leitura das placas foi feita em espectrofotômetro a 492 nm. Todas as amostras foram avaliadas em duplicatas e as incubações (exceto *overnight*) foram à temperatura ambiente. Uma curva-padrão, com sete pontos, foi construída a partir de 15,62 pg/mL a 1000 pg/mL dos respectivos anticorpos. Os resultados foram expressos em pg/mL obtido dos sobrenadantes da cultura de células.

4.6 Análise Estatística

A construção dos gráficos e as análises estatísticas foram realizadas com auxílio do programa Graph Pad Prism 5. A análise dos dados foi feita por One Way ANOVA, Seguida pelo teste de Tukey. Os resultados foram expressos como média ± 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 Avaliação do efeito da concentração do LPS sobre a fagocitose de macrófagos peritoneais estimulados *in vitro*

No primeiro momento nós definimos em qual concentração o LPS apresentou melhor resposta sobre a fagocitose de partículas de zimosano por macrófagos peritoneais. Assim, essas células foram estimuladas *in vitro* com concentrações crescentes de LPS e a sua capacidade fagocítica foi avaliada através do Índice de Fagocitose (IF) (**FIGURA 2**). Conforme abaixo, os macrófagos incubados com 10 µg/mL de LPS durante 30 minutos apresentaram um aumento significativo do Índice de Fagocitose.

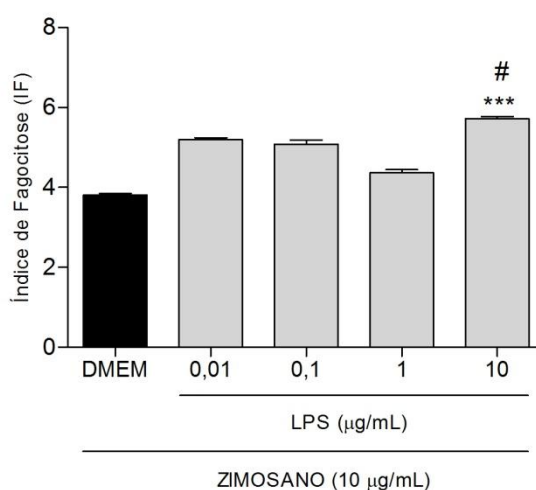


Figura 2. Efeito do LPS sobre o índice de fagocitose em macrófagos peritoneais *in vitro*. Macrófagos peritoneais foram incubados com LPS na concentração de (0.01; 0.1; 1 e 10 µg/mL) e zimosano (10 µg/mL) e a capacidade fagocítica dessas células foi avaliada 2 horas após a incubação com o LPS. Cada barra representa a média ± erro padrão da média (e.p.m) de três amostras por grupo.***P<0,001 quando comparado com o controle (macrófagos não estimulados) e #P<0,01 quando comparado com os macrófagos estimulados na concentração de 0.01 µg/mL. Essa figura é representativa de três experimentos.

5.2.1 Efeito do peptídeo sintético ativador de PAR2 SLIGRL-NH₂ sobre a fagocitose de partículas de zimosano por macrófagos peritoneais estimulados com LPS

Nosso primeiro objetivo foi avaliar a importância de PAR2 e PAR4 na fagocitose *in vitro* de partículas de zimosano por macrófagos peritoneais estimulados com LPS. Desta forma, os macrófagos peritoneais provenientes de animais previamente estimulados com zimosano foram incubados em concentrações crescentes com o agonista de PAR2 SLIGRL-NH₂ por 30 minutos e a capacidade fagocítica dessas células foi avaliada através do cálculo do índice de fagocitose (IF). O peptídeo sintético ativador de PAR2 SLIGRL-NH₂ foi capaz de aumentar o IF destes macrófagos de forma concentração dependente. Por outro lado, 30 μ M deste peptídeo aumentou o IF significativamente em comparação aos macrófagos estimulados com LPS na ausência do peptídeo ativador (**Figura 3**).

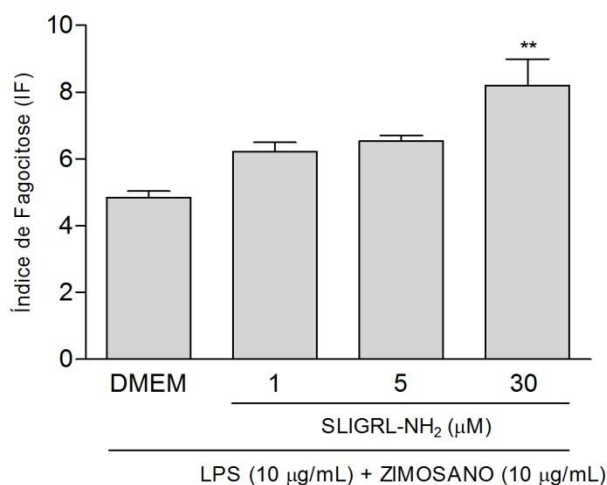


Figura 3. Efeito do agonista de PAR2 SLIGRL-NH₂ sobre o índice de fagocitose em macrófagos peritoneais *in vitro*. Macrófagos peritoneais foram incubados com LPS (10 μ g/mL), SLIGRL-NH₂ (30 μ M) e zimosano (10 μ g/mL) e a capacidade fagocítica dessas células foi avaliada 2 horas após a incubação com o agonista SLIGRL-NH₂ através do índice de Fagocitose. Cada barra representa a média \pm erro padrão da média (e.p.m) de três amostras por grupo. **P<0,01 quando comparado com o controle (macrófagos não estimulados). Essa figura é representativa de três experimentos.

5.2.2 Efeito do peptídeo sintético antagonista de PAR2 ENMD-1068 sobre a fagocitose de partículas de zimosano por macrófagos peritoneais estimulados com LPS induzida por SLIGRL-NH₂

Para avaliar se a inibição da atividade fagocítica observada com a incubação dos macrófagos com o peptídeo sintético de PAR2, se devia de fato à ativação deste receptor, os macrófagos foram pré-incubados com concentrações crescentes do antagonista de PAR2 ENMD-1068 30 minutos antes da incubação do peptídeo sintético SLIGRL-NH₂ (30 μM). A pré-incubação com o antagonista PAR2 nas concentrações estudadas (3, 10 e 30 μM), reduziu o IF a valores próximos ao observado na incubação dos macrófagos apenas com LPS e na ausência dos peptídeos agonista e antagonista do receptor (**Figura 4a**). Esta redução foi observada também quando os macrófagos foram pré-incubados nas mesmas condições com concentrações muito baixas do antagonista ENMD 1068 (**Figura 4b**). Este resultado confirma que a capacidade do peptídeo sintético ativador de PAR2 em aumentar a fagocitose de partículas de zimosano pelos macrófagos em resposta ao LPS, é mediada por este receptor, e que o antagonista PAR2 utilizado em nossos experimentos possui potência elevada.

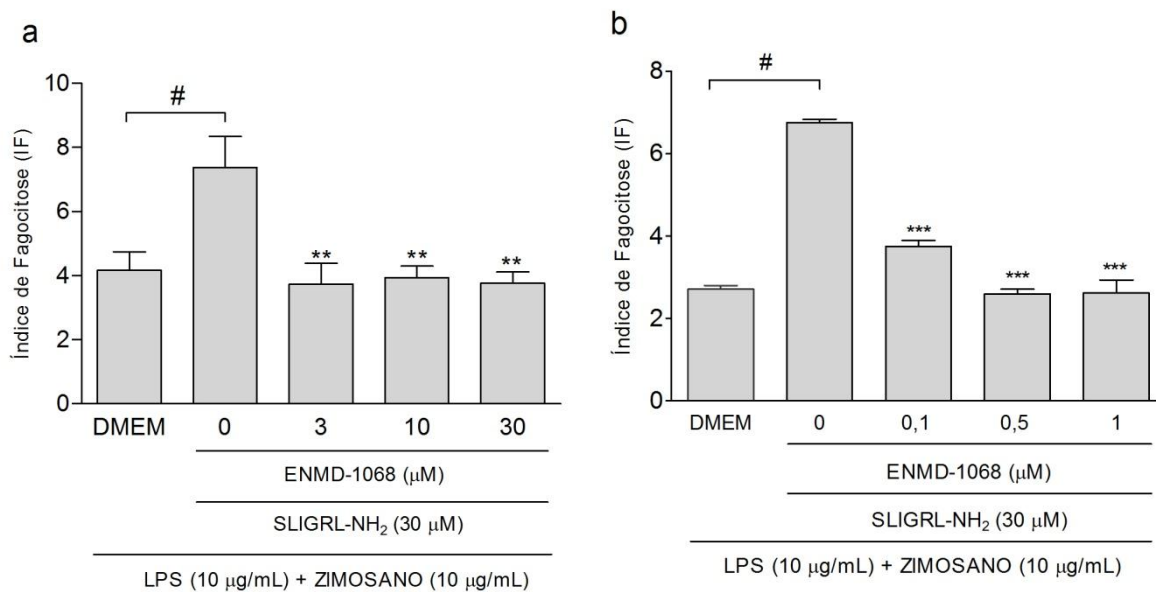


Figura 4. Efeito do agonista de PAR2 SLIGRL-NH₂ sobre o índice de fagocitose em macrófagos peritoneais *in vitro*, na presença de concentrações crescentes do antagonista seletivo de PAR2 ENMD-1068. Macrófagos peritoneais foram incubados com LPS (10 μg/mL), SLIGRL-NH₂ (30 μM), zimosano (10 μg/mL) e ENMD-1068 nas concentrações de (3, 10 e 30 μM) em **a** e (0,1, 0,5 e 1 μM) em **b**; e a capacidade fagocítica dessas células foi avaliada 2 horas após a incubação com o agonista através do índice de Fagocitose. Cada barra representa a média ± erro padrão da média (e.p.m) de três amostras por grupo. *P<0.05 e #P<0.001 quando comparado com o controle (macrófagos não estimulados) e **P<0.05 e ***P<0.001 quando comparado com as células incubadas na ausência do antagonista ENMD-1068. Essa figura é representativa de três experimentos.

5.2.3 Efeito do peptídeo sintético ativador de PAR4 AYPGKF-NH₂ sobre a fagocitose de partículas de zimosano por macrófagos peritoneais estimulados com LPS

A participação de PAR4 na regulação da atividade fagocítica de macrófagos estimulados *in vitro* com LPS também foi avaliada. A pré-incubação dos macrófagos com o peptídeo sintético ativador de PAR4 AYPGKF-NH₂ na concentração de 30 μM por 30 minutos reduziu a capacidade fagocítica dessas células sobre as partículas de zimosano, quando comparado com os macrófagos estimulados com LPS na ausência do peptídeo ativador (**Figura 5**).

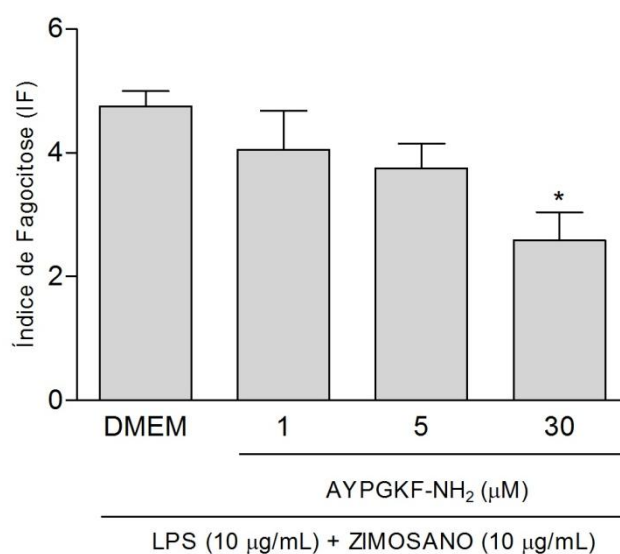


Figura 5. Efeito do agonista de PAR4 AYPGKF-NH₂ sobre o índice de fagocitose em macrófagos peritoneais *in vitro*. Macrófagos peritoneais foram incubados com LPS (10 μg/mL), AYPGKF-NH₂ (1, 5 ou 30 μM) e zimosano (10 μg/mL) e a capacidade fagocítica dessas células foi avaliada 2 horas após a incubação com o agonista através do índice de Fagocitose. Cada barra representa a média ± erro padrão da média (e.p.m) de três amostras por grupo. *P<0,05 quando comparado com o controle (macrófagos não estimulados). Essa figura é representativa de três experimentos.

5.2.4 Efeito do peptídeo sintético antagonista de PAR4 tcY-NH₂ sobre a inibição em resposta ao AYPGKF-NH₂ da fagocitose de partículas de zimosano por macrófagos peritoneais estimulados com LPS

Para comprovar que a inibição da fagocitose observada com a incubação dos macrófagos com o peptídeo sintético ativador de PAR4 se devia à ativação desse

receptor, os macrófagos foram pré-incubados por 30 minutos com concentrações crescentes do antagonista de PAR4 tcY-NH₂ antes da incubação com o peptídeo sintético AYPGKF-NH₂ (30 μM). Este antagonista na concentração de 15 e 30 μM foi efetivo não somente em reverter a inibição da fagocitose induzida pelo peptídeo sintético ativador de PAR4 como ainda foi capaz de potencializar a fagocitose (30 μM) em comparação com células estimuladas apenas com LPS (**Figura 6**).

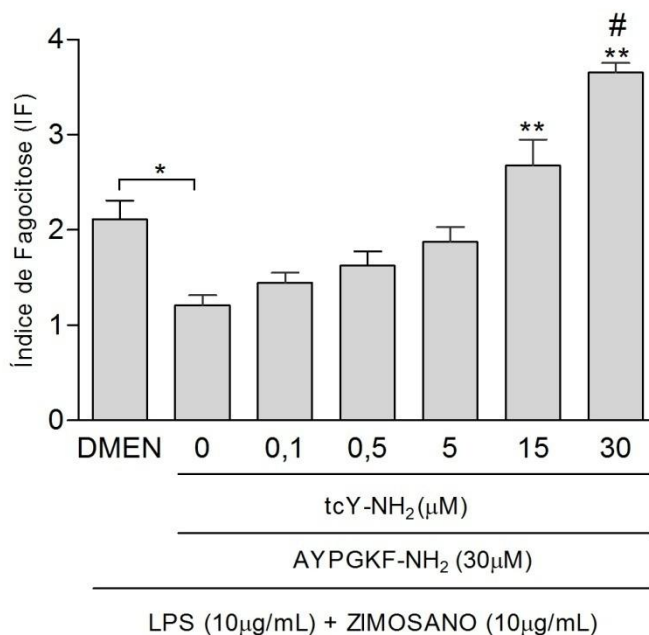


Figura 6. Efeito do agonista de PAR4 AYPGKF-NH₂ sobre o índice de fagocitose em macrófagos peritoneais *in vitro*, na presença de concentrações crescentes do antagonista seletivo de PAR4 tcY-NH₂. Macrófagos peritoneais foram incubados com LPS (10 μg/mL), AYPGKF-NH₂ (30 μM), zimosano (10 μg/mL) e tcY-NH₂ (0,1; 0,5; 5; 15; e 30 μM) e a capacidade fagocítica dessas células foi avaliada 2 horas após a incubação com o agonista através do Índice de Fagocitose. Cada barra representa a média ± erro padrão da média (e.p.m.) de três amostras por grupo. *P<0.05 quando comparado com o controle (macrófagos não estimulados) e **P<0.001 quando comparado com as células incubadas na ausência do antagonista tcY-NH₂. #P<0.001 quando comparado com macrófagos.

O contraste de efeito observado sobre a fagocitose de zimosano por macrófagos peritoneais quando essas células foram incubadas isoladamente com os peptídeos ativadores de PAR2 e PAR4 instigou-nos a pensar numa possível interação molecular entre esses receptores. Assim, os macrófagos foram pré-estimulados com LPS e co-incubados com SLIGRL-NH₂ e AYPGKF-NH₂ adicionados concomitantemente e em concentrações equimolares por 30 minutos e o índice de

fagocitose foi avaliado. Apesar do aumento já observado no índice de fagocitose com a adição do peptídeo sintético ativador de PAR2 (SLI) na cultura; e redução desse índice com a incubação dos macrófagos apenas com o peptídeo sintético de PAR4 (AYP). A co-estimulação desses receptores ao mesmo tempo não provocou um aumento da fagocitose (**Figura 7**). Esse resultado confirma o possível papel regulador desses receptores sobre a função fagocítica dos macrófagos.

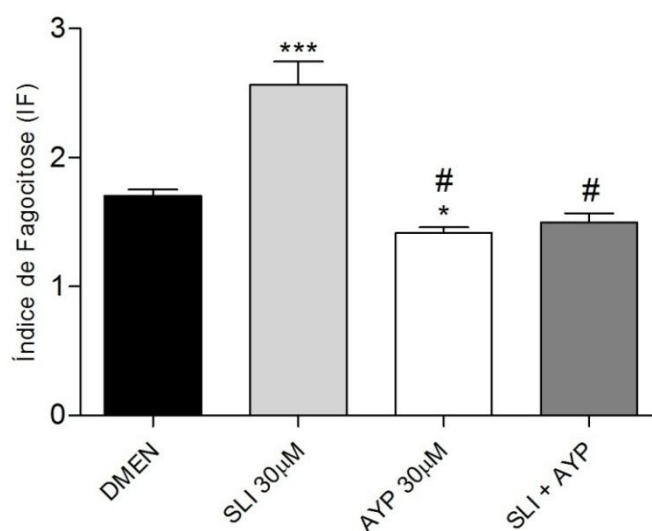
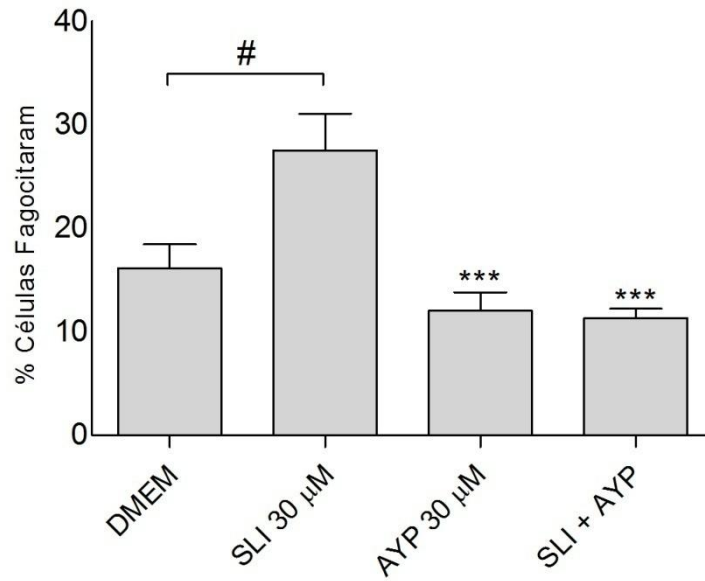


Figura 7. Efeito da co-incubação dos agonistas de PAR2 (SLIGRL-NH₂) e PAR4 (AYPGKF-NH₂) sobre o índice de fagocitose em macrófagos peritoneais *in vitro*. Macrófagos peritoneais foram incubados com LPS (10 µg/mL), AYPGKF-NH₂ (AYP, 30µM) ou SLIGRL-NH₂ (SLI, 30 µM) ou ambos e zimosano (10 µg/mL). A capacidade fagocítica dessas células foram avaliadas 2 horas após a incubação com o (os) agonista (s) através do índice de Fagocitose. Cada barra representa a média ± erro padrão da média (e.p.m.) de três amostras por grupo. *P<0.05 e ***P<0.001 quando comparado com o controle (macrófagos incubados na ausência do agonista); #P<0.001 quando comparado com células incubadas apenas na presença de SLIGRL-NH₂. Essa figura é representativa de três experimentos.

Os macrófagos ativados pelos seus respectivos agonistas sintéticos foram avaliados quanto à proporção do número de células que tiveram a sua capacidade fagocítica sobre as partículas de zimosano modulada pelos peptídeos. A pré-incubação dos macrófagos com 30 µM do peptídeo sintético ativador de PAR2 SLIGRL-NH₂ aumentou a porcentagem de macrófagos fagocíticos, enquanto que o tratamento dessas células com concentração equimolar do peptídeo sintético

ativador de PAR4 AYPGKF-NH₂ não teve efeito significativo sobre esse parâmetro



(Figura 8 e 9).

Figura 8. Efeito da co-incubação dos agonistas de PAR2 (SLIGRL-NH₂) e PAR4 (AYPGKF-NH₂) sobre o número de macrófagos peritoneais fagocíticos *in vitro*. Macrófagos peritoneais foram incubados com LPS (10 μg/mL), AYPGKF-NH₂ (AYP, 30 μM) ou SLIGRL-NH₂ (SLI, 30 μM) ou ambos e por fim, em cada poço, foi adicionado Zimosano (10 μg/mL). O número de células fagocíticas foi avaliado 2 horas após a incubação com o (os) agonista(s). Cada barra representa a média ± erro padrão da média (e.p.m.) de três amostras por grupo. #P<0.05 quando comparado com o controle (macrófagos incubados na ausência do agonista); ***P<0.001 quando comparado com células incubadas apenas na presença de SLIGRL-NH₂. Essa figura é representativa de três experimentos.

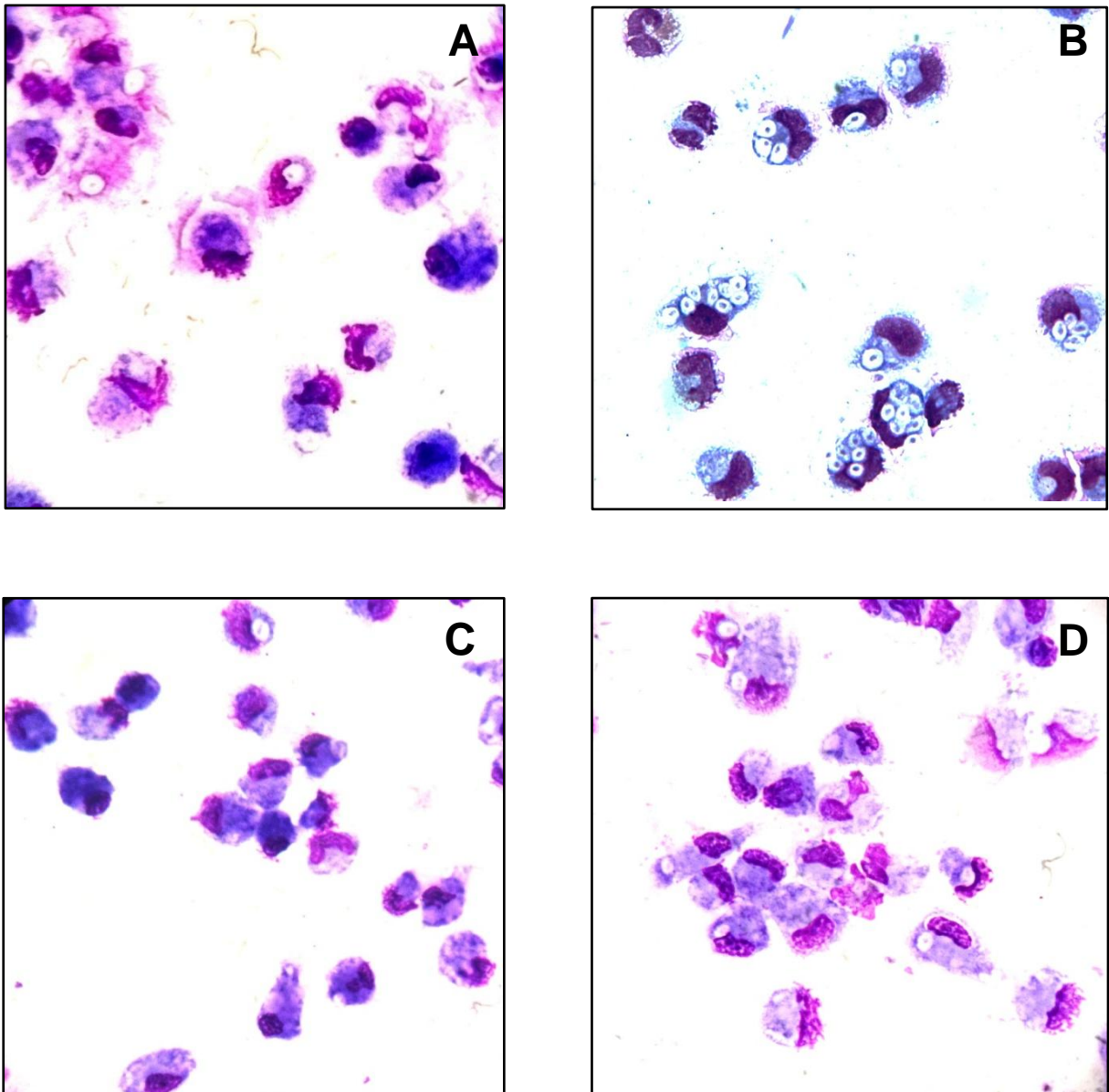


Figura 9. Microscopia ótica de macrófagos peritoneais incubados com os agonistas de PAR2 (SLIGRL-NH₂), PAR4 (AYPGKF-NH₂) ou ambos e o efeito desses peptídeos sobre o número e avidéz dessas células em fagocitar partículas de zimosano *in vitro*. Todos os macrófagos peritoneais foram pré-estimulados *in vitro* com LPS (10 μg/mL) e no final foi adicionado zimosano (10 μg/mL). **A:** Controle: apenas LPS; **B:** Em presença de SLIGRL-NH₂ (30 μM); **C:** Em presença de AYPGKF-NH₂ (30 μM); **D:** ambos os peptídeos SLIGRL-NH₂ (30 μM) e AYPGKF-NH₂ (30 μM). As células foram coradas com May-Grunwald e Giemsa.

5.3 Participação de PAR2 e PAR4 sobre a produção de óxido nítrico e espécies reativas de oxigênio em macrófagos estimulados *in vitro* com LPS

5.3.1 Efeito do peptídeo sintético ativador de PAR2 SLIGRL-NH₂ e do agonista de PAR-4 AYPGKF-NH₂ sobre a produção de óxido nítrico em macrófagos peritoneais 24 horas após estimulação com LPS

A ativação da fagocitose pode desencadear a produção de mediadores pró-inflamatórios e microbicidas pelos macrófagos. Nesse contexto, os macrófagos peritoneais incubados com o peptídeo sintético ativador de PAR2 SLIGRL-NH₂ apresentaram um aumento da produção de nitrito em 24 horas de incubação nas concentrações de 15 e 30 µM de SLIGRL-NH₂ quando comparados com os macrófagos incubados apenas com LPS (**Figura 10a**). De maneira semelhante, quando os macrófagos foram incubados no mesmo período de tempo com o agonista de PAR4 AYPGKF-NH₂, houve um aumento significativo na produção de nitrito em todas as concentrações estudadas do agonista em comparação às células não estimuladas com o peptídeo sintético ativador de PAR4 (**Figura 10b**).

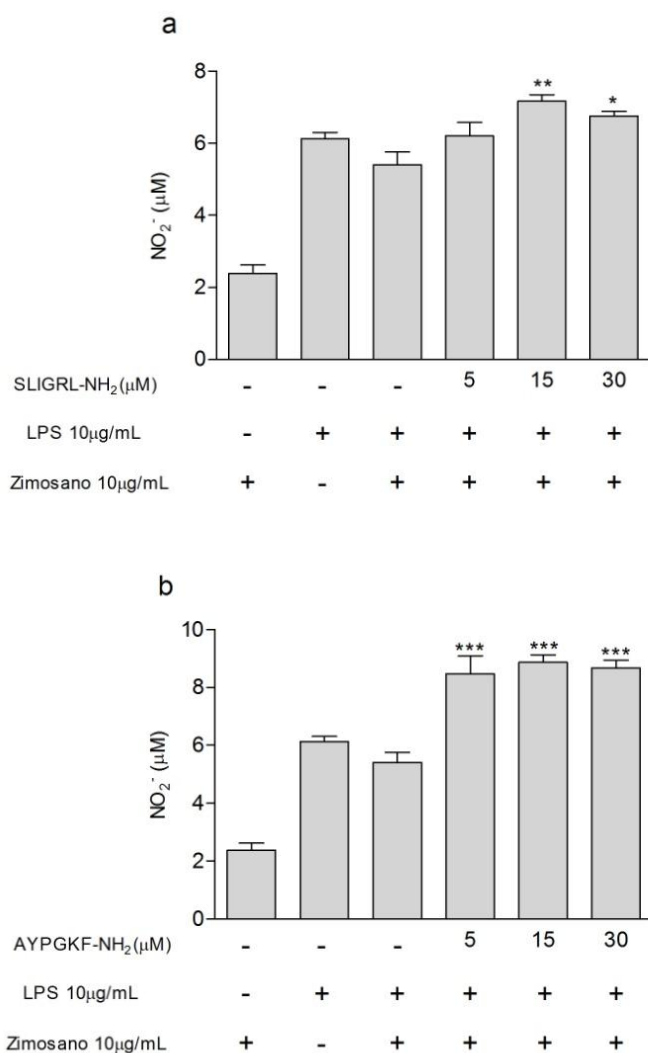


Figura 10. Produção de óxido nítrico em macrófagos peritoneais *in vitro* 24 horas após a incubação com o agonista de PAR2 SLIGRL-NH₂ ou agonista de PAR4 AYPGKF-NH₂. Macrófagos peritoneais foram incubados com LPS (10 µg/mL), SLIGRL-NH₂ (5, 15 ou 30 µM) ou AYPGKF-NH₂ (5, 15 ou 30 µM) e zimosano (10 µg/mL). Os sobrenadantes foram analisados 24 horas após a incubação com o agonista SLIGRL-NH₂ em **a** ou AYPGKF-NH₂ em **b**, quanto à produção de nitrito pela reação de Griess, medida indireta da produção de óxido nítrico. Cada barra representa a média ± erro padrão da média (e.p.m) de três amostras por grupo. *P<0.05, **P< 0.01 e ***P<0.001 quando comparado com macrófagos estimulados apenas na presença de LPS e Zimosano. Essa figura é representativa de três experimentos.

5.3.2 Efeito do peptídeo sintético ativador de PAR2 SLIGRL-NH₂ e do agonista de PAR4 AYPGKF-NH₂ sobre a produção de óxido nítrico em macrófagos peritoneais 48 horas após estimulação com LPS

O cultivo de macrófagos peritoneais incubados com o agonista de PAR2 SLIGRL-NH₂ apresentou uma redução significativa da produção de nitrito em 48 horas de incubação em todas as concentrações estudadas quando comparado com os macrófagos incubados apenas com LPS (**Figura 11a**). De maneira semelhante, quando os macrófagos foram estimulados no mesmo período de tempo com o agonista de PAR4 (AYPGKF-NH₂) houve uma redução significativa na produção de nitrito a partir da concentração de 5 µM (**Figura 11b**).

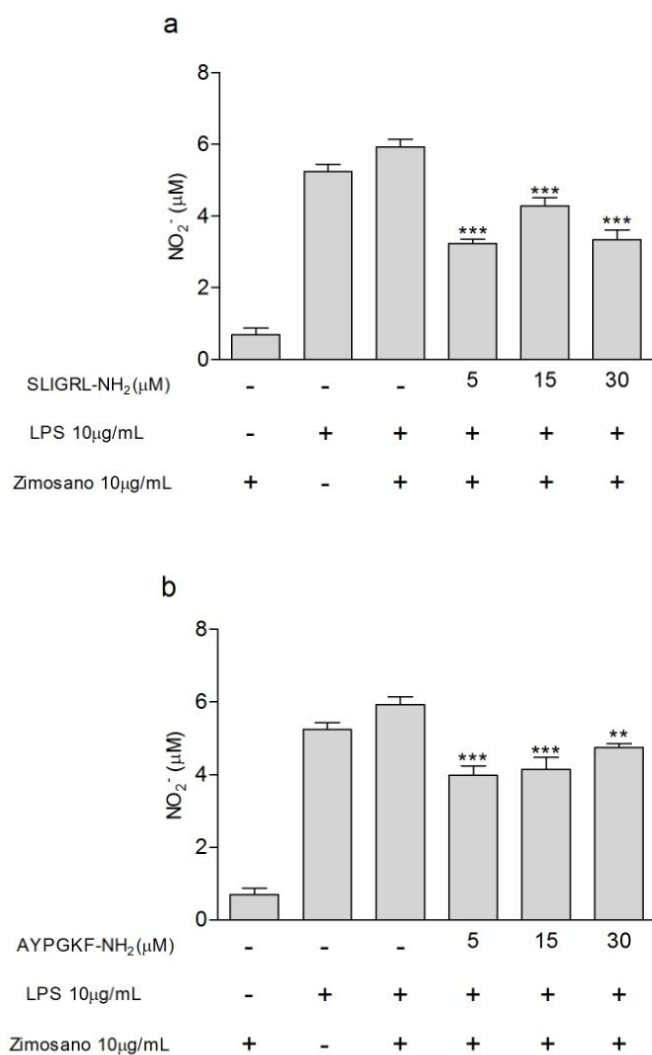


Figura 11. Produção de óxido nítrico em macrófagos peritoneais *in vitro* 48 horas após a incubação com o agonista de PAR2 SLIGRL-NH₂ ou agonista de PAR4 AYPGKF-NH₂. Macrófagos peritoneais foram incubados com LPS (10 µg/mL), SLIGRL-NH₂ (5, 15 ou 30 µM) ou AYPGKF-NH₂ (5, 15 ou 30 µM) e zimosano (10 µg/mL). Os sobrenadantes foram analisados 48 horas após a incubação com os agonistas quanto à produção de nitrito pela reação de Griess, medida indireta da produção de óxido nítrico. Cada barra representa a média ± erro padrão da média (e.p.m) de três amostras por grupo. **P<0.01 e ***P< 0.001 quando comparado com macrófagos estimulados apenas na presença de LPS e Zimosano. Essa figura é representativa de três experimentos.

5.3.3 Efeito do peptídeo sintético ativador de PAR2 SLIGRL-NH₂ e do agonista de PAR4 AYPGKF-NH₂ sobre a produção de espécies reativas de oxigênio em macrófagos peritoneais 24 horas após estimulação com LPS

Os macrófagos peritoneais incubados com o peptídeo sintético ativador de PAR2 SLIGRL-NH₂ não apresentaram alteração na produção de espécies reativas de oxigênio, após 24 horas de incubação, em relação aos macrófagos não estimulados com o agonista (**Figura 12a**). Por outro lado, quando os macrófagos foram estimulados durante o mesmo período de tempo com o agonista de PAR4 AYPGKF-NH₂, houve um aumento na produção dessas espécies a partir da concentração de 5 μM (**Figura 12b**).

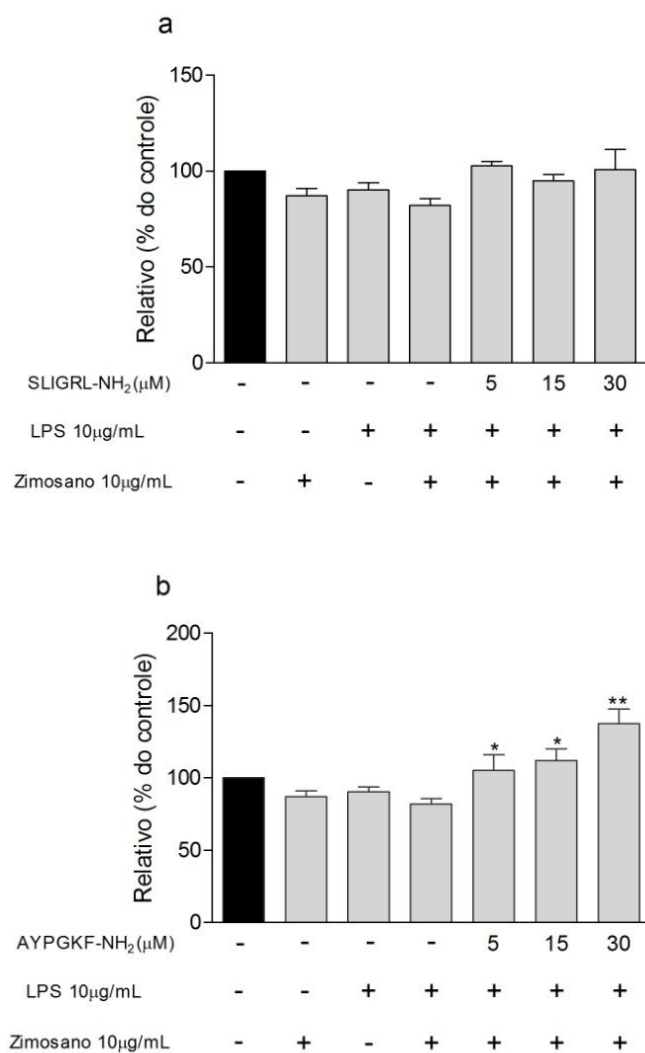


Figura 12. Produção de espécies reativas de oxigênio em macrófagos peritoneais *in vitro* na presença de agonista de PAR2 SLIGRL-NH₂ ou agonista de PAR4 AYPGKF-NH₂. Macrófagos peritoneais foram incubados com LPS (10 μg/mL), zimosano (10 μg/mL), SLIGRL-NH₂ (5, 15 ou 30 μM) em **a** ou AYPGKF-NH₂ (5, 15 ou 30 μM) em **b**. Os sobrenadantes foram analisados 24 horas após a incubação quanto à produção de espécies reativas de oxigênio por fluorimetria. Os valores foram expressos em relação à % do controle. As barras representam a média ± erro padrão da média (e.p.m) de três poços na placa. Cada experimento foi repetido três vezes.

5.3.4 Efeito do peptídeo sintético ativador de PAR2 SLIGRL-NH₂ e do agonista de PAR4 AYPGKF-NH₂ sobre a produção de espécies reativas de oxigênio em macrófagos peritoneais 48 horas após estimulação com LPS

Os macrófagos peritoneais incubados com o agonista de PAR2 SLIGRL-NH₂ não apresentaram diferença em relação à produção de espécies reativas de oxigênio após 48 horas em comparação aos macrófagos não estimulados com o agonista (**Figura 12a**). Por outro lado, após o mesmo período de incubação, os macrófagos estimulados com o agonista de PAR4 AYPGKF-NH₂ apresentaram um aumento da produção dessas espécies reativas a partir da concentração de 5μM (**Figura 12b**).

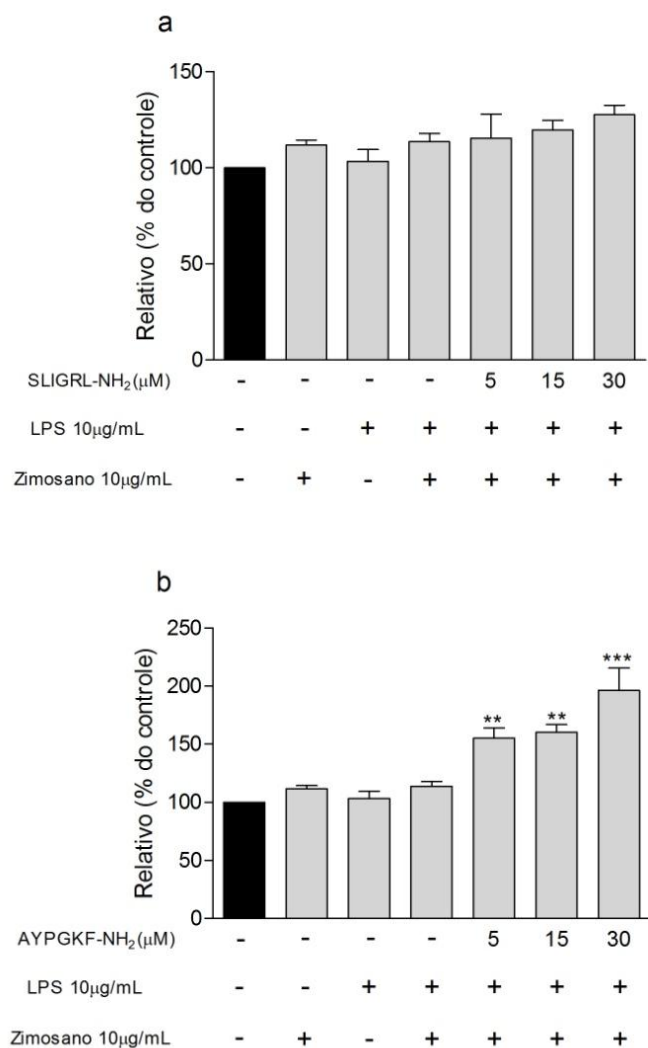


Figura 13. Produção de espécies reativas de oxigênio em macrófagos peritoneais *in vitro* na presença de agonista de PAR2 SLIGRL-NH₂ ou agonista de PAR4 AYPGKF-NH₂. Macrófagos peritoneais foram incubados com LPS (10 μg/mL), zimosano (10 μg/mL), SLIGRL-NH₂ (5, 15 ou 30 μM) em **a** ou AYPGKF-NH₂ (5, 15 ou 30 μM) em **b**. Os sobrenadantes foram analisados 48 horas após a incubação quanto à produção de espécies reativas de oxigênio por fluorimetria. Os valores foram expressos em relação à % do controle (macrófagos incubados sem nenhum estímulo). As barras representam a média ± erro padrão da média (e.p.m) de três poços na placa. Cada experimento foi repetido três vezes.

5.4 Análise da potencial influência da ativação de PAR2 e PAR4 sobre a viabilidade dos macrófagos estimulados *in vitro* com LPS

A influência da incubação dos macrófagos tanto do peptídeo ativador sintético de PAR2 como de PAR4 sobre a viabilidade celular foi analisada em culturas de 6, 24 e 48 horas de duração com os respectivos agonistas, através do ensaio de MTT. Tanto os macrófagos incubados com o agonista de PAR2 SLIGRL-NH₂ (**Figura 14**) ou com o agonista de PAR4 AYPGKF-NH₂ (**Figura 15**) não apresentaram diferenças em relação à viabilidade celular, nos três tempos analisados, quando comparados ao grupo controle macrófagos estimulados apenas com LPS e zimosano. Porém quando os macrófagos incubados com os respectivos agonistas foram comparados aos grupos controle, onde as células foram incubadas apenas com o meio de cultura DMEM e, portanto, não estimuladas com LPS, há uma redução da viabilidade dessas células nos três tempos analisados.

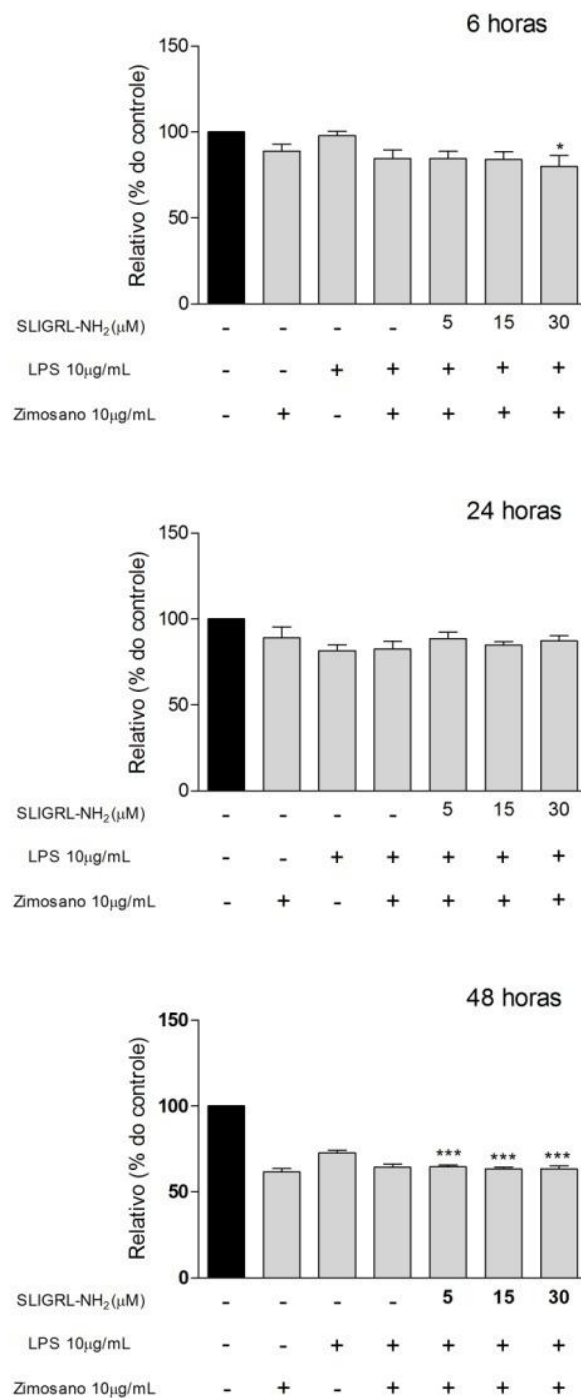


Figura 14. Efeito do agonista de PAR2 SLIGRL-NH₂ sobre a viabilidade celular de macrófagos peritoneais *in vitro*. Macrófagos peritoneais foram incubados com LPS (10 μg/mL), SLIGRL-NH₂ (5, 15 ou 30 μM) e zimosano (10 μg/mL). A viabilidade celular foi analisada por MTT nos intervalos de 6 horas, 24 horas e 48 horas após a incubação com o SLIGRL-NH₂. Os valores foram expressos em relação à % do controle (macrófagos não estimulados e na ausência do peptídeo). As barras representam a média ± erro padrão da média (e.p.m) de três poços na placa. *P<0.05 e ***P<0.001 quando comparado com o controle. O experimento foi repetido três vezes.

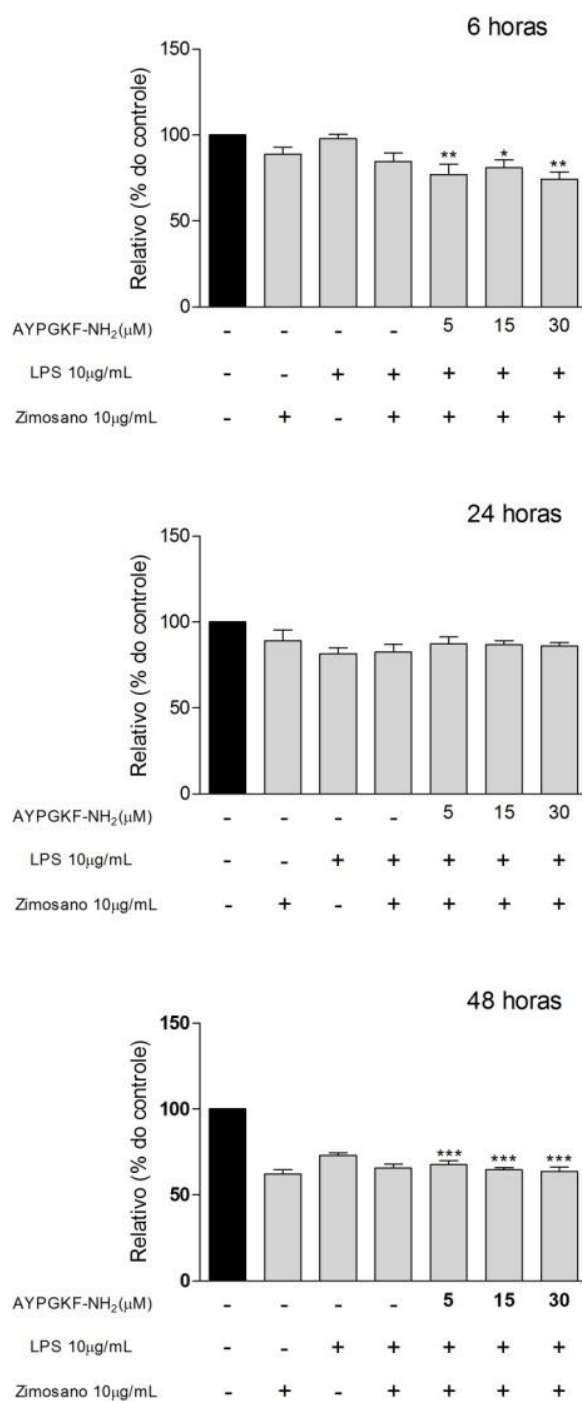


Figura 15. Efeito do agonista de PAR4 AYPGKF-NH₂ sobre a viabilidade celular de macrófagos peritoneais *in vitro*. Macrófagos peritoneais foram incubados com LPS (10 μg/mL), AYPGKF-NH₂ (5, 15 ou 30 μM) e zimosano (10 μg/mL). A viabilidade celular foi analisada por MTT nos intervalos de 6, 24 e 48 horas após a incubação com o AYPGKF-NH₂. Os valores foram expressos em relação à % do controle (macrófagos não estimulados e na ausência do peptídeo). As barras representam a média ± erro padrão da média (e.p.m) de três poços na placa. *P<0.05, **P<0.01 e ***P<0.001 quando comparado com o controle. O experimento foi repetido três vezes.

5.5 Efeitos dos agonistas de PAR2 e PAR4 sobre a produção de IL10 e TNF- α em macrófagos estimulados *in vitro* com LPS

A produção de citocinas pelos macrófagos peritoneais foi avaliada nos tempos de 0,25h; 1h; 4h e 24h. Os macrófagos tratados com 30 μ M de agonista de PAR2 SLIGRL-NH₂ demonstraram já nos primeiros minutos, uma produção notável de TNF- α . Esse aumento persistiu até a primeira hora após a incubação com o agonista e a partir de 4 horas, houve uma queda nos níveis dessa citocina até o tempo de 24 horas (**Fig. 16a**). Já a produção de IL-10 aumentou de maneira similar no grupo incubado com o SLIGRL-NH₂ até a primeira hora. Após 4 horas, houve uma redução dos níveis dessa citocina que decaiu até o tempo de 24 horas. Entretanto nesse intervalo, observamos um nível de IL-10, significativamente elevado, quando comparado aos macrófagos incubados na ausência de SLIGRL-NH₂ (**Fig.17b**). Os macrófagos incubados na presença de 30 μ M de agonista de PAR-4 (AYPGKF-NH₂) aumentaram rapidamente a produção de TNF- α já nos primeiros minutos e essa produção aumentou e permaneceu elevada até 4 horas após a incubação. Só após esse intervalo que os níveis dessa citocina diminuíram até o tempo de 24 horas (**Fig.16a**). Em relação à produção de IL-10, os macrófagos tratados com AYPGKF-NH₂ estimularam a liberação desta citocina, já nos primeiros minutos após a incubação. Essa produção aumentou até o intervalo de 4 horas, no qual os macrófagos incubados em presença de AYPGKF-NH₂ reduziram a produção de IL-10 de maneira significativa em relação aos macrófagos estimulados apenas com LPS. Após esse intervalo, os níveis de IL-10 se reduziram até o tempo de 24 horas (**Fig. 16b**).

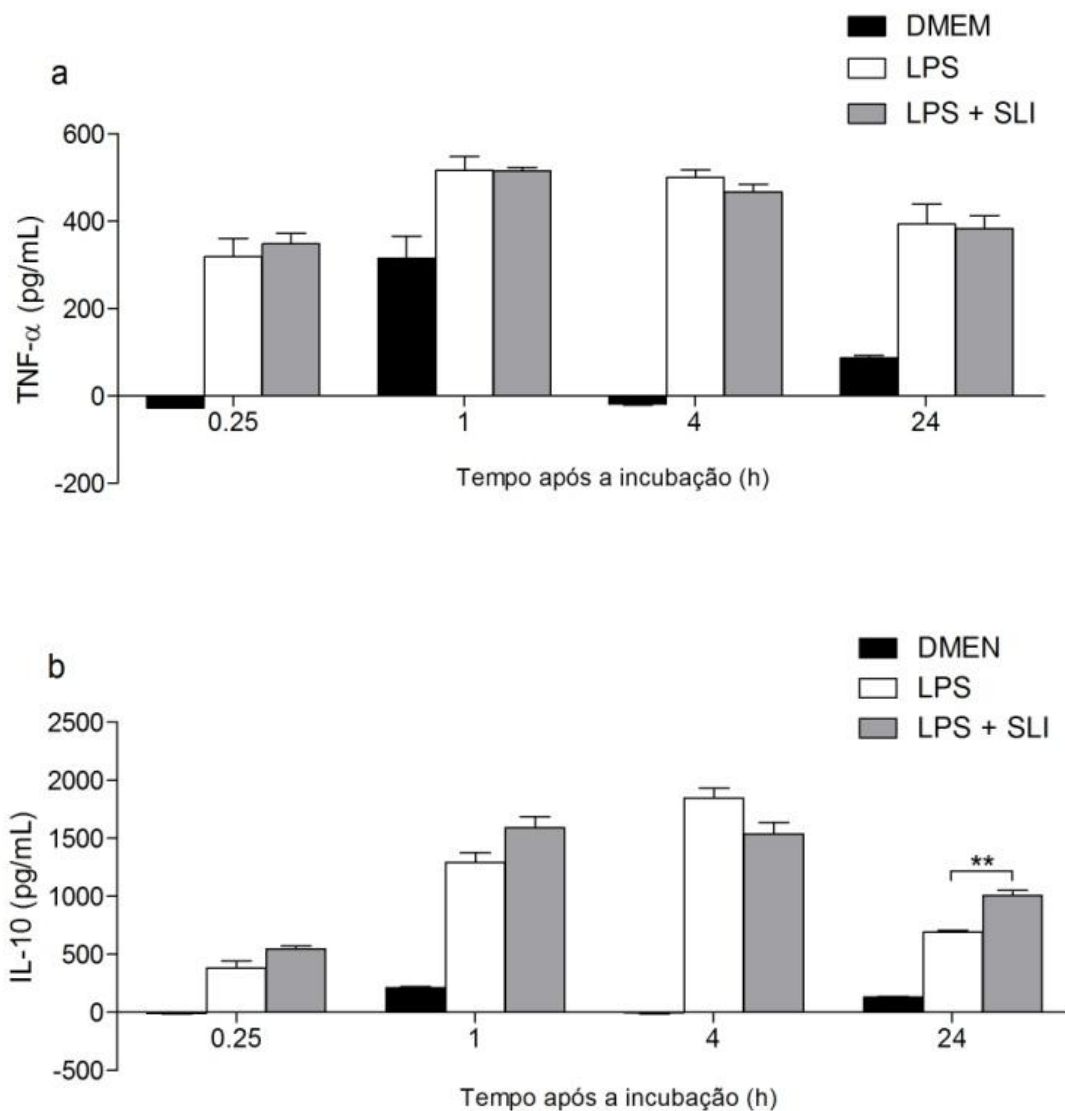


Figura 16. Efeito do agonista de PAR2 SLIGRL-NH₂ sobre a produção de citocinas TNF- α e IL-10 em cultura de macrófagos peritoneais em função do tempo. Macrófagos peritoneais foram incubados com LPS (10 μ g/mL), SLIGRL-NH₂ (30 μ M) e zimosano (10 μ g/mL). O sobrenadante foi coletado 0.25 ; 1; 4 e 24 horas após a incubação com o agonista e foi analisada quanto a produção de TNF- α em **a** e IL-10 em **b** por Ensaio imunoenzimático (ELISA). As barras representam a média \pm erro padrão da média (e.p.m) de três poços na placa. **P<0.01 quando comparado com o grupo controle incubado na ausência do agonista (LPS). O experimento foi repetido três vezes.

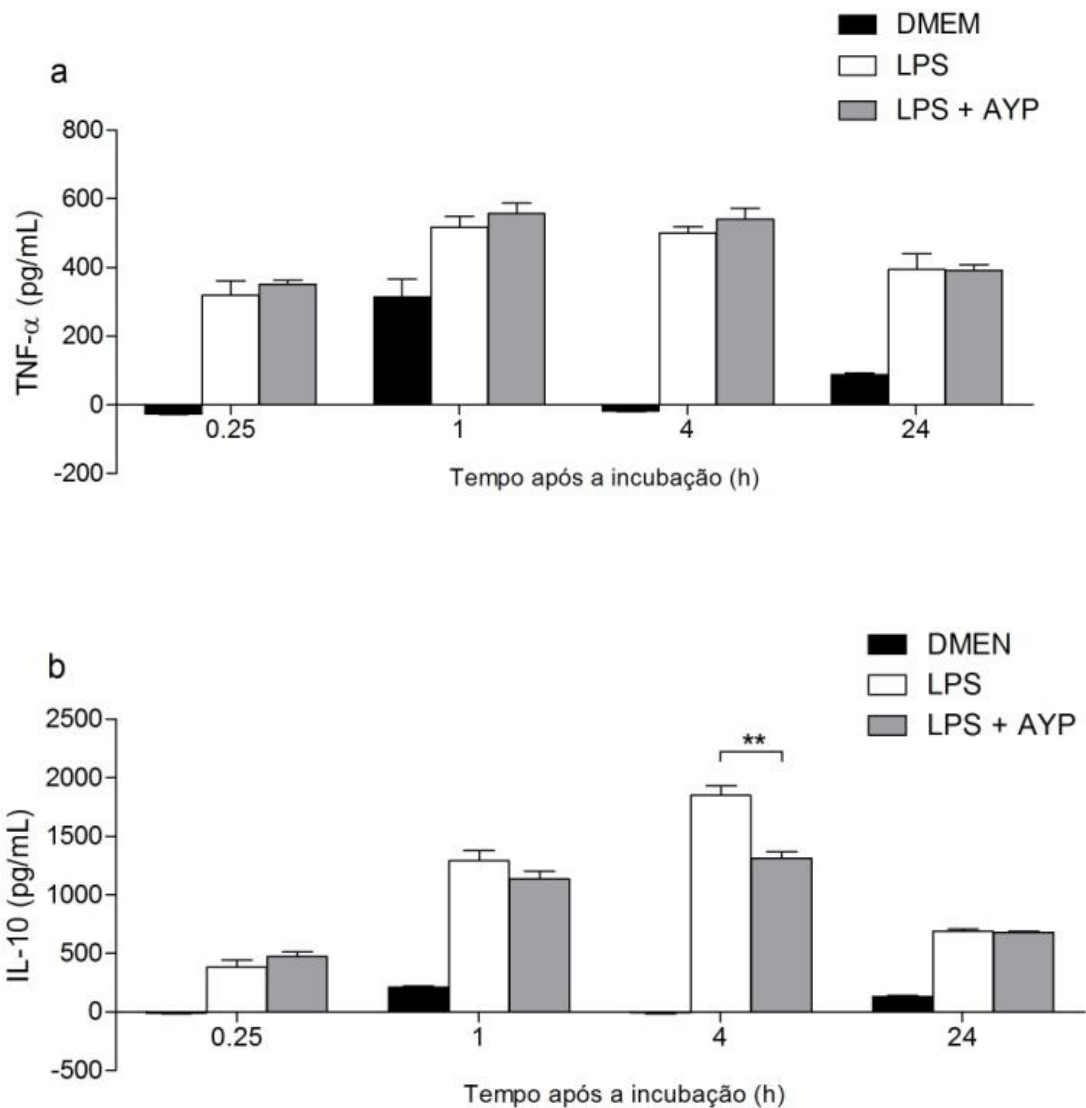


Figura 17. Efeito do agonista de PAR4 AYPGKF-NH₂ sobre a produção de citocinas TNF- α e IL-10 em cultura de macrófagos peritoneais em função do tempo. Macrófagos peritoneais foram incubados com LPS (10 μ g/mL), SLIGRL-NH₂ (30 μ M) e zimosano (10 μ g/mL). O sobrenadante foi coletado 0.25 ; 1; 4 e 24 horas após a incubação com o agonista e foi analisada quanto a produção de TNF- α em **a** e IL-10 em **b** por Ensaio imunoenzimático (ELISA). As barras representam a média \pm erro padrão da média (e.p.m) de três poços na placa. **P<0.01 quando comparado com o grupo controle incubado na ausência do agonista (LPS). O experimento foi repetido três vezes.

6. DISCUSSÃO

Os macrófagos desempenham um papel crucial em várias doenças relacionadas à inflamação crônica, como diabetes, obesidade, aterosclerose, câncer e doenças neurodegenerativas (Yona *et al.*, 2013). A versatilidade demonstrada por essas células se explica em parte pela sua capacidade de polarização em fenótipos e funções definidas que vão direcionar a progressão ou resolução da resposta inflamatória (Mosser & Edwards, 2008; Martinez & Gordon, 2014). Assim os macrófagos podem apresentar um perfil pró-inflamatório (M1) ou anti-inflamatório (M2) que varia de acordo com o microambiente celular (Lyamina *et al.*, 2011; Martinez & Gordon, 2014). Nesse microambiente, durante uma lesão tecidual ou infecção, pode haver a liberação de proteases como trombina, tripsina e triptase por células que sofreram algum dano (Cocks & Moffatt., 2000; Ossovskaya & Bunnett., 2004) Essas enzimas secretadas nessas condições atuam sobre receptores ativados por protease (PAR) que são expressos na superfície de macrófagos, podendo, então, desencadear respostas celulares complexas. A sinalização via proteases sobre o PAR ativa vias relacionadas ao sistema de detecção antimicrobiana do hospedeiro, sendo capaz de afetar a sua defesa contra patógenos invasores e desenvolvimento da resposta imune inata e adaptativa (Shpacovitch *et al.*, 2008).

Dentre os PAR, os subtipos PAR2 e PAR4 são os mais expressos em células inflamatórias (Zhang *et al.*, 2014) e vários trabalhos têm demonstrado a participação desses receptores em eventos inflamatórios associados ao recrutamento e ativação de leucócitos (Vergnolle *et al.*, 2002; Gomides *et al.*, 2012; Matos *et al.*, 2013;). Apesar dessa caracterização do PAR como um “sensor” celular relacionado à inflamação e desenvolvimento da resposta imune (Ossovskaya & Bunnett., 2004; Shpacovitch *et al.*, 2007), pouco se sabe a respeito do papel desses receptores na função efetora dos macrófagos. Diante disso, nós investigamos a participação de PAR2 e PAR4 sobre a fagocitose de partículas de zimosano e a produção de mediadores inflamatórios em macrófagos peritoneais.

Os macrófagos secretam citocinas no local da lesão ou infecção que amplificam a inflamação, como também fagocitam microorganismos, células senescentes ou apoptóticas (Murray & Wynn, 2011). A fagocitose nesse aspecto tem uma importância biológica essencial na morte, degradação de patógenos, desenvolvimento da resposta imune adaptativa, como também na resolução do processo inflamatório, evitando assim, a sua cronicidade (Aderem, 2003; Greenberg & Grinstein, 2002). Na fagocitose, o reconhecimento e a internalização de microorganismos ou parte de suas estruturas envolvem a participação de vários receptores de adesão. Esses receptores além de promover o reconhecimento e internalização do patógeno, podem ativar vias pró-inflamatórias à jusante, que contribuem para a amplificação da resposta antimicrobiana (Aderem & Underhill, 1999; Underhill & Goodridge; 2012). Entre essas moléculas com capacidade de ser reconhecida e fagocitada, encontra-se o zimosano. Este polissacarídeo derivado da parede celular do fungo *Saccharomyces cerevisiae* é um ligante para TLR2, TLR4 e Dectina-1 (Dicarlo & Fiore, 1958; Amanianda *et al.*, 2009; Drummond & Brown, 2011) que pode ser reconhecido, internalizado e digerido pelo macrófago. Essas partículas são compostas de β -glucanas que é característico de fungos patogênicos, sendo utilizado como modelo para estudos dos mecanismos de reconhecimento de microorganismos, fagocitose e regulação da produção de citocinas (Jiang *et al.*, 2013). O LPS é outro fragmento celular que tem a capacidade de se ligar ao TLR4 e CD14 e com isso ativar a fagocitose e a produção de mediadores inflamatórios em macrófagos (Akira *et al.*, 2006). Dessa forma, Zimosano e LPS atuam de maneira sinérgica no aumento das funções efetoras dessas células.

Nesse sentido, inicialmente nós investigamos em qual concentração o LPS apresentaria melhor resposta sobre a fagocitose de partículas de zimosano por macrófagos peritoneais *in vitro*. Na concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$ de LPS nós encontramos o maior efeito sobre o índice de fagocitose, dentre todas as utilizadas, e padronizamos essa concentração para os ensaios posteriores. Esse resultado está de acordo com estudos anteriores em linhagens de macrófagos RAW 264.7, no qual a fagocitose de partículas de zimosano aumentou de maneira concentração-dependente e atingiu o máximo efeito na mesma faixa de concentração do LPS (Fuentes *et al.*, 2014).

O segundo passo foi investigar o possível envolvimento do PAR2 na fagocitose de partículas de zimosano em macrófagos pré-estimulados com LPS. O peptídeo sintético ativador de PAR2, SLIGRL-NH₂, na concentração de 30 µM foi capaz de aumentar a fagocitose de partículas de zimosano por macrófagos peritoneais *in vitro*, sendo este efeito revertido em presença do antagonista PAR2 ENMD 1068. Esse resultado é corroborado por trabalhos anteriores na qual o PAR2 foi capaz de aumentar a fagocitose em macrófagos e queratinócitos *in vitro* (Sharlow *et al.*, 2000). Ou seja, a ativação desse receptor sobre a fagocitose de microorganismos pode contribuir para a defesa do hospedeiro e desenvolvimento da resposta imune inata. Desta forma, é possível que, dentro do ambiente inflamatório, proteases ativadoras de PAR2 como tripsina ou triptase contribuam para a inflamação agindo em seus receptores, presentes em macrófagos, favorecendo assim a fagocitose.

Outro receptor potencialmente que é expresso em macrófagos é o receptor de PAR4 (Colognato *et al.*, 2003; Cocks & Moffat, 2000). Em um trabalho recente, Fu e colaboradores revisaram a participação desse subtipo na inflamação. Com base nisso, nós investigamos também o papel de PAR4 na fagocitose de partículas de zimosano por macrófagos peritoneais *in vitro*. Em contraste com o resultado observado com o PAR2, os macrófagos incubados com 30 µM de AYPGKF-NH₂ reduziram a capacidade fagocítica dessas células, e de maneira semelhante ao observado na ativação de PAR2, o antagonismo prévio de seu receptor com o antagonista sintético de PAR4 TcY-NH₂ seguido pelo estímulo com AYPGKF-NH₂ aumentou a fagocitose induzida por AYPGKF-NH₂ a valores acima do controle (macrófagos estimulados na ausência do peptídeo ativador). Assim como o PAR2, muitos trabalhos nos últimos anos, incluindo os do nosso grupo, têm caracterizado o papel do PAR4 sobre o recrutamento celular (Vergnolle *et al.*, 2002; Gomides *et al.*, 2014). Os resultados desses trabalhos suportam a hipótese de um papel pró-inflamatório do PAR4 em termos de recrutamento celular. Porém em relação à fagocitose dos macrófagos nós demonstramos um efeito regulador negativo, sugerindo a participação de PAR2 e PAR4 na regulação desse fenômeno.

Em um estudo realizado em células HEK 293, foi demonstrado que ativação de PAR2 pode aumentar a expressão e sinalização de receptores de PAR4 quando

são co-expressos na célula (Cunningham *et al.*, 2012). Baseando nesse estudo, poderíamos formular a hipótese de que em um modelo *in vivo*, durante a inflamação, proteases liberadas no meio extracelular atuariam sobre receptores de PAR2, promovendo a ativação de PAR2. Isso resultaria no aumento da atividade fagocítica dos macrófagos sobre patógenos invasores. Porém na medida em que a inflamação seria contrarregulada por um processo resolutivo, a ativação de PAR2 levaria a um aumento da sinalização de PAR4, culminando com a redução da fagocitose. Essa hipótese da interação entre os mecanismos de ação foi mostrado através da co-incubação dos macrófagos com SLIGRL-NH₂ e AYPGKF-NH₂, no qual o aumento da fagocitose proporcionado pela ativação de PAR2 foi compensado pela redução causada pela ativação de PAR4. Assim, nossos resultados confirmam uma possível interação entre esses receptores sobre a regulação do fenômeno fagocítico. Em relação à porcentagem de macrófagos que fagocitaram partículas de zimosano, apenas as células incubadas com o agonista PAR2 SLIGRL-NH₂ demonstraram aumentar a avidéz por partículas de zimosano, confirmando um possível papel pró-resolutivo de PAR2 sobre os macrófagos.

A ativação da fagocitose e a internalização do micro-organismo pelos macrófagos desencadeia a ativação de vias antimicrobianas e pró-inflamatórias (Aderem, 2003). Nesse sentido nós avaliamos parâmetros de ativação dos macrófagos como a medida do estresse oxidativo e produção de citocinas. A produção e secreção de óxido nítrico (NO) e espécies reativas de oxigênio (do inglês, *Reactive Oxygen Species*, ROS) por macrófagos visa danificar componentes estruturas de bactérias, fungos e protozoários (West *et al.*, 2011; Holmström & Finkel, 2014). Essa atividade citotóxica reduz a carga microbiana e promove a defesa do hospedeiro contra patógenos invasores. Nesse sentido nós medimos a produção de NO e ROS no tempo de 24 ou 48h quando os macrófagos foram incubados na presença de SLIGRL-NH₂ ou AYPGKF-NH₂. Estudos prévios demonstraram que a pré-incubação dos macrófagos com LPS promovem a expressão de iNOS e a produção de NO (Mills *et al.*, 2000). Em nossos experimentos, 24 horas após a incubação com SLIGRL-NH₂, houve um aumento da produção de NO a partir da concentração de 15 µM. De maneira semelhante, a incubação com AYPGKF-NH₂ no mesmo tempo analisado também aumentou a produção de NO, porém esse aumento já foi significativo a partir da concentração de

5 μM , como também em termos de magnitude. No intervalo de 48 horas ambos agonistas reduziram a produção de NO, mas essa redução foi menos expressiva nos macrófagos incubados com AYPGKF-NH₂. Esse achado demonstra que a incubação com o AYPGKF-NH₂ foi muito mais sensível em promover a liberação de NO, como também em termos de magnitude na produção, sugerindo um envolvimento desses peptídeos sobre a regulação da atividade da iNOS, tendo o PAR4 um perfil mais pró-inflamatório.

Estudos envolvendo PAR2 demonstraram que a sua ativação leva a geração de ROS em eosinófilos, linfócitos e células pulmonares (Aoshiba *et al.*, 2001; Miike *et al.*, 2001; Lim *et al.*, 2006;). Em nossos experimentos, nós demonstramos pela primeira vez que a ativação do PAR2 em macrófagos peritoneais não altera a produção de ROS nos intervalos de 24 ou 48 horas. E que esses macrófagos quando incubados com o peptídeo sintético ativador de PAR4 AYPGKF-NH₂ aumentam a geração dessas espécies reativas de oxigênio nos mesmos intervalos analisados. Esses resultados corroboram uma ação pró-inflamatória originada a partir da ativação de PAR4 sobre macrófagos peritoneais e essa hipótese é sustentada por uma revisão recente, onde esse receptor tem sido associado a um perfil pró-inflamatório. (Fu *et al.*, 2015).

A fim de eliminar possíveis análises errôneas e validar os experimentos realizados, foram realizados também testes para avaliação da viabilidade celular nos tempos de 6, 24 e 48h após a incubação com os respectivos agonistas de PAR. Os macrófagos incubados na presença dos peptídeos sintéticos ativadores de PAR2 e PAR4, SLIGRL-NH₂ ou AYPGKF-NH₂, respectivamente, permaneceram viáveis em relação ao controle (macrófagos incubados na ausência dos respectivos agonistas). Sendo assim os peptídeos sintéticos não demonstraram nenhum efeito citotóxico direto sobre essas células.

A importância de PARs na modulação de funções em macrófagos não está muito bem estabelecida, existindo opiniões diferentes a respeito do papel de PAR2 e PAR4 na modulação do macrófago. Estudos prévios demonstram que a ativação de PAR2 em monócitos humanos leva a produção de citocinas pró-inflamatórias, IL-1 β , IL-6 e IL-8 (Johansson *et al.*, 2005). Em outro trabalho, macrófagos peritoneais incubados com trombina foram capazes de aumentar a expressão de

ciclooxigenase-2 e Prostaglandina E2 (Lo *et al.*, 2009). Porém alguns estudos demonstram um perfil anti-inflamatório para o PAR2, onde o recrutamento de macrófagos pré-estimulados com LPS foi inibido pela presença do agonista de PAR2 SLIGRL-NH₂ a partir de 48 horas após a incubação (Moffatt *et al.*, 2002).

Uma vez que demonstramos um papel modulador de PAR2 e PAR4 na fagocitose *in vitro* de partículas de zimosano por macrófagos peritoneais, resolvemos investigar qual o efeito da incubação com agonistas PAR2 ou PAR4 sobre o perfil fenotípico destes macrófagos. A medida da produção de citocinas pró-inflamatórias ou anti-inflamatórias estimuladas pelo PAR em macrófagos fornece informações a respeito do perfil fenotípico dessas células em pró-inflamatório ou pró-resolutivo (Mosser & Edwards, 2008 ;Lyamina *et al.*, 2013). Desta forma, medimos a produção de duas citocinas, TNF- α e IL10, características de macrófagos M1 pró-inflamatórios ou M2 resolutivos (Mosser & Edwards, 2008; Martinez & Gordon., 2014) em resposta à estimulação dos receptores por seus peptídeos sintéticos ativadores em presença de LPS. Em nossa condição experimental, tanto a incubação dos macrófagos peritoneais com o peptídeo sintético ativador de PAR2 SLIGRL-NH₂, como com o peptídeo sintético ativador de PAR4 AYPGKF-NH₂ não aumentaram a produção de TNF- α acima daquela obtida com o pré-estímulo com LPS. O TNF- α é a principal citocina produzida por macrófagos e é liberada em grande quantidade mesmo após um estímulo inflamatório de baixa intensidade (O'Shea & Murray., 2008). Nossos resultados sugerem uma ausência de efeitos tanto de PAR2 como de PAR4 sobre a modulação da produção da citocina pró-inflamatória TNF- α . É possível, no entanto, que a concentração de LPS utilizada em nossas culturas (10 μ g/mL) tenha saturado a produção dessa citocina, sendo essa hipótese baseada em um ensaio, na qual a ativação de PAR2 em macrófagos foi capaz de aumentar a produção dessa citocina, quando essas células foram pré-estimuladas por 24 horas com LPS (100 ng/mL) e na presença de 200 μ M do peptídeo ativador de PAR2 SLIGKV-NH₂ (Nhu *et al.*, 2012).

No entanto, quando analisamos a produção da citocina resolutiva IL-10, em resposta à estimulação *in vitro* dos macrófagos peritoneais com ambos agonistas, o peptídeo sintético ativador de PAR2 SLIGRL-NH₂, ou o peptídeo sintético ativador de PAR4 AYPGKF-NH₂, observamos um perfil distinto do observado para a produção

de TNF- α . A ativação de PAR2 promove a produção de IL-10 por macrófagos em presença de LPS após 24 horas de cultivo celular, enquanto a incubação dos macrófagos com o peptídeo sintético ativador de PAR4 AYPGKF-NH₂ reduziu a produção desta citocina, 4 horas após o início da cultura, sugerindo a participação desse receptor de PAR2 na resolução do processo inflamatório. Esse resultado confirma os estudos anteriores, no qual após 24 horas de incubação com o peptídeo ativador de PAR2, há a liberação de IL-10 pelos macrófagos (Nhu et al., 2012). Esse achado sugere que a ativação de PAR2 reduz a sinalização pró-inflamatória em resposta ao LPS, através da secreção de IL-10, como mecanismo contrarregulador da inflamação. Já a incubação com o peptídeo ativador de PAR4 reduziu a produção de IL-10, 4 horas após a incubação, sendo coerente com a escala temporal no processo inflamatório, nos quais nesse intervalo há maior proporção de células e mediadores pró-inflamatório. Sendo esse dado coerente com os resultados obtidos anteriormente, no quais tem sido atribuído ao PAR4 um papel pró-inflamatório.

Assim, em conjunto, os resultados obtidos nos ensaios de fagocitose, onde a ativação de PAR2 aumenta a fagocitose de partículas de zimosano, nos permite propor um mecanismo no qual esse receptor modula as ações dos macrófagos sobre a atividade fagocítica, bem como favorece uma resposta de natureza anti-inflamatória ou pró-resolutiva. Por outro lado, o PAR4 parece exercer um efeito oposto ao PAR2, agindo na modulação fenotípica de macrófagos em etapa inicial da resposta inata, de modo que sua capacidade em reduzir a produção desta citocina, favorece um ambiente pró-inflamatório, necessário à defesa do corpo em resposta a agentes inflamatórios. Desta forma, propomos existir um balanço entre PAR2 e PAR4, onde uma delicada regulação de suas funções seria importante para a atividade de macrófagos nestas condições.

8. REFERÊNCIAS

- ADAMS, M. N.; RAMACHANDRAM, R.; YAU, M.K.; SUEM, J.Y.; FAIRLIE, D.P.; HOLLEMBERG, M.D.; HOOPER, J.D. Structure, function and pathophysiology of protease activated receptors. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 130, n. 3, p. 248–282, 2011.
- ADEREM, A. Phagocytosis and the inflammatory response. **The Journal of infectious diseases**, v. 187 Suppl , n. Suppl 2, p. S340–5, 2003.
- AIMANIANDA, V.; CLAVAUD, C., SIMENEL, C.; FONTAINE T.; DELEPIERRE, M.; LATGE, J.P. Cell Wall β -(1,6)-Glucan of *Saccharomyces cerevisiae* Structural Characterization and situsynthesis. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 20, p. 13401–13412, 2009.
- AKIRA, S.; UEMATSU, S.; TAKEUCHI, O. Pathogen Recognition and innate immunity. **Cell**, v. 3, p. 783–801, 2006.
- ASFAHA, S.; Brussee, V.; CHAPMAN, K.; ZOCHODNE, D.W.; VERGNOLLE, N. Proteinase-activated receptor-1 agonists attenuate nociception in response to noxious stimuli. **Br J Pharmacol**, v. 135, n. 5, p. 1101–1106, 2002.
- ASFAHA, S.; CENAC, N.; HOULE, S.; ALTIER, C.; PAPEZ, M.D.; NGUYEN, C.; STEINHOFF, M.; CHAPMAN, K.; ZAMPONI, G.W.; VERGNOLLE, N. Protease-activated receptor-4: a novel mechanism of inflammatory pain modulation. **British journal of pharmacology**, v. 150, p. 176–185, 2007.
- AUFFRAY, C.; SIEWEKE, M.H.; GEISSMANN, F. Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. **Annual review of immunology**, v. 27, p. 669–92, 2009.
- AUSTIN, K.M.; COVIC, L.; KULIOPULOS, A. Matrix metalloproteases and PAR1 activation. **Blood**, v. 121, n. 3, p. 431–39, 2013.
- BRADESI, S. PAR4: a new role in the modulation of visceral nociception. **Neurogastroenterology and motility**, v. 21, n. 11, p. 1129–32, nov. 2009.
- 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**, v. 86, n. 4, p. 224–230, 2010.
- CAMERER, E.; HUANG, W.; COUGHLIN, S. R. Tissue factor- and factor X-dependent activation of protease-activated receptor 2 by factor VIIa. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, n. 10, p. 5255–5260, 2000.
- CENAC, N.; VERGNOLLE, N. Proteases and protease-activated receptors (PARs):

- novel signals for pain. **Curr Top Med Chem**, v. 5, n. 6, p. 569–576, 2005.
- CERA, E. DI. Serine Proteases. **IUBMB Life**, v. 61, n. 5, p. 510–515, 2009.
- COCKS, T. M.; MOFFATT, J. D. Protease-activated receptors: sentries for inflammation? **Tips**, v. 21, n. March, p. 103–108, 2000.
- COLOGNATO, R.; SLUPSKY, J.R., JENDRACH, M.; BURYSEK, L.; SYROVETS, T.; SIMMET, T. Differential expression and regulation of protease-activated receptors in human peripheral monocytes and monocyte-derived antigen-presenting cells. **Blood**, v. 102, n. 7, p. 2645–2652, 2003.
- COUGHLIN, S. R. Protease-activated receptors in hemostasis, thrombosis and vascular biology. **Journal of Trombosis and Haemostasis**, v. 3, p. 1800–1814, 2005.
- DI CARLO, F. J.; FIORE, J. V. On the composition of zymosan. **Science**, v. 127, n. 3301, p. 756–7, 4 abr. 1958.
- FLANNAGAN, R. S.; JAUMOILLÉ, V.; GRINSTEIN, S. The cell biology of phagocytosis. **Annual review of pathology**, v. 7, p. 61–98, 2012.
- FU, Q.; CHENG, J.; GAO, Y.; ZHANG, Y.; CHEN, X.; XIE, J. Protease-Activated Receptor 4: A Critical Participator in Inflammatory Response. **Inflammation**, v. 38, n. 2, p. 886–895, 2015.
- FUENTES, A.-L.; MILLIS, L.; VAPENIQ, J.; SIGOLA, L. Lipopolysaccharide-mediated enhancement of zymosan phagocytosis by RAW 264.7 macrophages is independent of opsonins, laminarin, mannan, and complement receptor 3. **The Journal of surgical research**, v. 189, n. 2, p. 304–12. 2014.
- 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**, v. 89, n. 5-6, p. 275–282, 2012.
- GOMIDES, L. F.; LIMA, O.C.O.; MATOS, N.A.; FREITAS, K.M.; FRANCISCHI, J.N.; TAVARES, J.C.; KLEIN, A. Blockade of proteinase-activated receptor 4 inhibits neutrophil recruitment in experimental inflammation in mice. **Inflammation Research**, v. 63, n. 11, p. 935–41, nov. 2014.
- GOODRIDGE, H. S.; UNDERHILL, D. M.; TOURET, N. Mechanisms of Fc receptor and dectin-1 activation for phagocytosis. **Traffic**, v. 13, n. 8, p. 1062–71, ago. 2012.
- GORDON, S. Elie Metchnikoff: father of natural immunity. **European journal of immunology**, v. 38, n. 12, p. 3257–64, dez. 2008.
- GORDON, S.; PLÜDDEMANN, A.; MARTINEZ ESTRADA, F. Macrophage heterogeneity in tissues: phenotypic diversity and functions. **Immunological**

reviews, v. 262, n. 1, p. 36–55, nov. 2014.

GREENBERG, S.; GRINSTEIN, S. Phagocytosis and innate immunity. **Current Opinion in Immunology**, v. 14, p. 136–145, 2002.

GRIMSEY, N.; LIN, H.; TREJO, J. NIH Public Access. **Methods Enzymol.**, v. 535, p. 389–401, 2014.

HOLMSTRÖM, K. M.; FINKEL, T. Cellular mechanisms and physiological consequences of redox-dependent signalling. **Nature Molecular Cell Biology**, v. 15, n. 6, p. 411–421, 2014.

ISHIHARA, H.; CONNOLLY, A.J.; ZENG, D.; KAHN, M.L.; ZHENG, Y.W.; TIMMONS, C.; TRAM, T.; COUGHLIN, S.R. Protease-activated receptor 3 is a second thrombin receptor in humans. **Nature**, v. 386, n. 6624, p. 502–6, 3 abr. 1997.

JIANG, L. I.; STERNWEIS, P. C.; WANG, J. E. Zymosan activates protein kinase A via adenylyl cyclase VII to modulate innate immune responses during inflammation. **Molecular Immunology**, v. 54, n. 1, p. 14–22, 2013.

JOHANSSON, U.; LAWSON, C.; DABARE, M.; SYNDERCOMBE-COURT, D.; NEWLAND, A.C.; HOWELLS, G.L.; MACEY, M.G. Human peripheral blood monocytes express protease receptor-2 and respond to receptor activation by production of IL-6, IL-8, and IL-1 β . **Journal of Leukocyte Biology**, v. 78, p. 967–975, 2005.

KAHN, M. L.; ZHENG, Y.W.; HUANG, W.; BIGORNIA, V.; ZENG, D.; MOFF, S.; FARESE, R.V.; TAM, C.; COUGHLIN, S.R. A dual thrombin receptor system for platelet activation. **Nature**, v. 394, n. 6694, p. 690–4, 1998.

LECH, M.; ANDERS, H. Macrophages and fibrosis: How resident and infiltrating mononuclear phagocytes orchestrate all phases of tissue injury and repair. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1832, n. 7, p. 989–97, 2013.

LO, H.; CHEN, C.; TSAI, Y.; WU, P.; WU, W., Thrombin induces cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin E2 release via PAR1 activation and ERK1/2- and p38 MAPK-dependent pathway in murine macrophages. **Journal of cellular biochemistry**, v. 108, n. 5, p. 1143–52, 1 dez. 2009.

LYAMINA, S. V.; KRUGLOV, S.V.; VEDENIKIN, T.Y.;BORODOVITSYNA, O.A.; SUVOROVA, I.A.; SHIMSHELASHVILI, Sh.I.; MALYSHEV, I.Y. Alternative Reprogramming of M1 / M2 Phenotype of Mouse Peritoneal Macrophages *In Vitro* with Interferon- γ and Interleukin-4. **Cell Technologies in Biology and Medicine**, n. 4, p. 548–551, 2012.

MANTOVANI, A.; BISWAS, S.; GALDIERO, M.S.; SICA, A.; LOCATI, M. Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodelling. **Journal of Pathology**, v. 229, p. 176–185, 2012.

- MARTINEZ, F. O.; GORDON, S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. **F1000prime reports**, v. 6, n. March, p. 1–13, 2014.
- 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**, v. 36, n. 6, p. 1260–1267, 2013.
- MEDZHITOV, R. Inflammation 2010 : New Adventures of an Old Flame. **Cell**, v. 140, p. 771–776, 2010.
- MIIKE, S.; MCWILLIAM, A. S.; KITA, H. Trypsin induces activation and inflammatory mediator release from human eosinophils through protease-activated receptor-2. **Journal of immunology**, v. 167, n. 11, p. 6615–22, 2001.
- MOFFATT, J. D.; JEFFREY, K. L.; COCKS, T. M. Protease-Activated Receptor-2 Activating Peptide SLIGRL Inhibits Bacterial Lipopolysaccharide-Induced Recruitment of Polymorphonuclear Leukocytes into the Airways of Mice. **Am. J. Respir. Cell Mol. Biol**, v. 26, n. 4, p. 680–684, 2002.
- MOSSER, D. M.; EDWARDS, J. P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. **Nature Reviews Immunology**, v. 8, n. 12, p. 958–969, 2008.
- MURRAY, P. J.; WYNN, T. A. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. **Nature Reviews Immunology**, v. 11, n. 11, p. 723–737, 2011.
- NAKANISHI-MATSUI, M.; ZHENG, Y.; SULCINER, D. J.; WEISS, E.J.; LUDEMAN, M.J.; COUGHLIN, S.R. PAR3 is a cofactor for PAR4 activation by thrombin. **Nature**, v. 404, n. April, p. 609–613, 2000.
- NATHAN, C.; DING, A. Review Nonresolving Inflammation. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 871–882, 2010.
- NHU, Q. M.; SHIREY, K.A.; PENNINI, M.E.; STILTZ, J.; VOGEL, S.N. Proteinase-activated receptor 2 activation promotes an anti-inflammatory and alternatively activated phenotype in LPS-stimulated murine macrophages. **Innate immunity**, v. 18, n. 2, p. 193–203, abr. 2012.
- NYSTEDT, S.; EMILSSON, K.; WAHLESTEDTT, C.; SUNDELIN, J. Molecular cloning of a potential proteinase activated receptor. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 91, p. 9208–9212, 1994.
- O'SHEA, J. J.; MURRAY, P. J. Cytokine Signaling Modules in Inflammatory Responses. **Immunity**, v. 28, n. 4, p. 477–487, 2008.
- OSSOVSKAYA, V. S.; BUNNETT, N. W. Protease-Activated Receptors : Contribution to Physiology and Disease. **Physiol Rev**, v. 84, p. 579–621, 2004.

PUENTE, X.S.; GUTIÉRREZ-FERNÁNDEZ, A.; VELASCO, G.; LÓPEZ-OTIN, C. Proteases and their Inhibitors in Neurodegenerative Disease A genomic view of the complexity of mammalian proteolytic systems. **Biochemical Society Transactions**, v. 33, p. 331–334, 2005.

RASMUSSEN, U. B.; VOURET-CRAVIARI, V.; JALLAT, S.; SCHLESINGER, Y.; PAGÉS, G.; PAVIRAI, A.; LECOCQ, J.P.; POUSSÉGUR, J.; OBBERGHEN-SCHILLING, E.V.; DNA cloning and expression of a hamster α -thrombin receptor coupled to Ca^{2+} mobilization. **Febs Letters**, v. 288, n. 1, p. 123–128, 1991.

SCHMIDLIN, F.; BUNNETT, N. W. Protease-activated receptors: how proteases signal to cells. **Gastrointestinal**, v. 1, p. 575–582, 2001.

SHARLOW, E. R.; PAINE, C.S.; BABIARZ, L.; EISINGER, M.; SHAPIRO, S.; SEIBERG, M. The protease-activated receptor-2 upregulates keratinocyte phagocytosis. **Journal of cell science**, v. 113, p. 3093–3101, 2000.

SHI, C.; PAMER, E. G. Monocyte recruitment during infection and inflammation. **Nature reviews. Immunology**, v. 11, n. 11, p. 762–74, nov. 2011.

SHPACOVITCH, V.; FELD.; M.; BUNNETT, N.W.; STEINHOFF, M. Protease-activated receptors: novel PARTners in innate immunity. **TRENDS in Immunology**, v. 28, n. 12, p. 541–550, 2007.

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

SOH, U. J. K.; DORES, M.R.; CHEN, B.; TREJO, J. Signal transduction by protease-activated receptors. **British Journal of Pharmacology**, v. 160, p. 191–203, 2010.

STEINHOFF, M.; BUDDENKOTTE, J.; SHPACOVITCH, V.; RATTENHOLL, A.; MOORMANN, C.; VERGNOLLE, N.; LUGER, T.A.; HOLLENBERG, M.D. Proteinase-Activated Receptors: Transducers of Proteinase-Mediated Signaling in Inflammation and Immune Response. **Endocrine Reviews**, v. 26, n. 1, p. 1–43, 2005.

TAKEUCHI, O.; AKIRA, S. Pattern Recognition Receptors and Inflammation. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 805–820, 2010.

UNDERHILL, D. M.; GOODRIDGE, H. S. Information processing during phagocytosis. **Nature Reviews Immunology**, v. 12, n. 7, p. 492–502, 2012.

VERGNOLLE, N.; DERIAN, C.K.; DÁNDREA, M.R.; STEINHOFF, M.; ANDRADE-GORDON, P. Characterization of Thrombin-Induced Leukocyte Rolling and Adherence: A Potential Proinflammatory Role for Proteinase-Activated Receptor-4. **The Journal of Immunology**, v. 169, p. 1467–1473, 2002.

VERGNOLLE, N.; HOLLENBERG, M. D.; WALLACE, J. L. Pro- and anti-inflammatory actions of thrombin: a distinct role for proteinase-activated receptor-

1(PAR-1). **British Journal of Pharmacology**, v. 126, p. 1262–1268, 1999.

VU, T.-K. 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 Press**, v. 64, p. 1057–1068, 1991.

WEST, A. P.; BRODSKY, I.E.; RAHNER, C.; WOO, D.K.; ERDJUMENT-BROMAGE, H.; TEMPST, P.; WALSH, M.C.; CHOI, Y.; SHADEL, G.S.; GHOSH, S. TLR signalling augments macrophage bactericidal activity through mitochondrial ROS. **Nature**, v. 472, n. 7344, p. 476–480, 2011.

XU, W.-F.; ANDERSEN, H.; WHITMORE, T.E.; PRESNEL, S.R.; YEE, D.P.; CHING, A.; GILBER, T.; DAVIE, E.W.; FOSTER, D.C. Cloning and characterization of human protease-activated receptor 4. **PNAS**, v. 95, n. 12, p. 6642–6, 1998.

YONA, S.; KIM, K.-W.; WOLF, Y.; MILDNER, A.; VAROL, D.; BREKER, M.; STRAUSS-AYALI, D.; VIUKOV, S.; GUILLIANS, M.; MISHARIN, A.; HUME, D.A, PERLMAN, H., MALISSEN, B.; ZELZER, E.; JUNG, S.; Fate Mapping Reveals Origins and Dynamics of Monocytes and Tissue Macrophages under Homeostasis. **Immunity**, v. 38, n. 1, p. 79– 91, 2013.

ZHANG, H.; ZENG, X.; HE, S. Evaluation on potential contributions of protease activated receptors related mediators in allergic inflammation. **Mediators of inflammation**, v. 2014, p. 1–20, 2014.

ANEXO

ANEXO – Certificado de aprovação do projeto pela Comissão de Ética no uso de Animais da UFMG (CEUA)



UFMG

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº. 374 / 2014, relativo ao projeto intitulado "Estudo do papel do receptor ativado por protease PAR2 e PAR4 sobre a ativação e fagocitose de macrófagos in vitro", 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 28/04/2015. Este certificado expira-se em 28/04/2020.

CERTIFICATE

We hereby certify that the Protocol nº. 374 / 2014, related to the Project entitled "Study of the role of protease-activated receptor PAR2 e PAR4 on the activation and macrophage phagocytosis in vitro", 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 28/04/2015. This certificates expires in 28/04/2020.

Cleuza Maria de Faria Rezende
Coordenador(a) da CEUA/UFMG
Belo Horizonte, 28/04/2015.

Atenciosamente,

Sistema CEUA-UFMG

<https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/>

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