



TRAUMA



Liz Maria Batista Teles

**Análise Proteômica Comparativa Entre Neutrófilos
De Indivíduos Hígidos E Politraumatizados**

Brasília, Distrito Federal, Brasil

Março / 2011

**ANÁLISE PROTEÔMICA COMPARATIVA
ENTRE NEUTRÓFILOS DE INDIVÍDUOS
HÍGIDOS E POLITRAUMATIZADOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* da
Universidade de Brasília (UnB), como requisito parcial
para obtenção do grau de Doutor em Patologia Molecular

Aluna: LIZ MARIA BATISTA TELES
Biomédica, Analista Clínica – PUC-GO
Mestre em Patologia Molecular - UnB
Embaixatriz de Cristo

Orientador: Prof. Dr. WAGNER FONTES
Laboratório de Bioquímica e Química de Proteínas
Centro Brasileiro de Serviços em Proteínas
Universidade de Brasília - UnB
Distrito Federal - Brasil

Março / 2011

LIZ MARIA BATISTA TELES

**ANÁLISE PROTEÔMICA COMPARATIVA ENTRE NEUTRÓFILOS
DE INDIVÍDUOS HÍGIDOS E POLITRAUMATIZADOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília (UnB), como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor.

COMISSÃO EXAMINADORA

- Prof. Dr. Wagner Fontes
Laboratório de Bioquímica e Química de Proteínas – CBSP – UnB
- Prof. Dr. Ricardo Bastos Cunha
Laboratório de Bioquímica Analítica – IQ – UnB
- Profa. Dra. Fabiane Hiratsuka Veiga de Souza
Laboratório de Bioquímica e Química de Proteínas – CBSP – UnB
- Prof. Dr. Carlos Eduardo Ventura Gaio dos Santos
Laboratório de Sistema Respiratório – FMD – UnB
- Prof. Dr. Sacha Braun Chaves
Laboratório de Nanobiotecnologia – GEM – UnB
- Prof. Dr. Luciano Paulino da Silva
Laboratório de Espectrometria de Massa – NTB – EMBRAPA

Aprovada em: 01 de março de 2011

DEDICATÓRIA

- A ~~Jesus Cristo~~, meu Deus, meu Senhor, meu Rei. Assim como todas as coisas que dizem respeito a mim, esta tese de doutorado também entrego com honra em Suas mãos. Com tudo o que sou e tenho, sempre agradecerei e louvarei a Ti, Deus único e verdadeiro, Senhor dos senhores, Rei dos reis, Pai protetor, Maravilhoso conselheiro, Amado amigo, Razão pela qual vivo eu.
- Aos meus amados pais, Edson e Lúcia Teles. Sou aquilo que vocês plantaram com suas vidas em mim. Aos meus amados irmãos: Liziane, e Gerson e Diojane Teles. Nossas histórias são frutos do amor de Deus por nossa família. Aos meus amados irmãos: Procionete e Odair Cerqueira. Vocês são o cumprimento da palavra de Deus quando ela diz “Em todo o tempo ama o amigo, e na angústia se faz o irmão.”.
- Ao meu amado noivo, Rodrigo César de Melo. Você é em minha vida prova irrefutável de que “Porque para Deus não haverá impossíveis em todas as Suas promessas.”.
- Ao meu orientador, Prof. Dr. Wagner Fontes. Você é instrumento de Deus em minha vida ao me dar condições de aprender a perseverança e a disciplina.

AGRADECIMENTOS

- Ao Prof. Dr. Belchor Fontes, juntamente com sua equipe do Laboratório de Investigação Médica 62 do HCFMUSP, pela presteza na obtenção e no envio de amostras de lisados de neutrófilos de pacientes politraumatizados.
- Às colegas do Laboratório de Bioquímica e Química de Proteínas (LBQP) Elaine Nascimento Aquino e Anne Caroline Dias Neves, pela co-orientação que me deram em etapas fundamentais do trabalho.
- Aos também colegas do LBQP Adriana Dias Magalhães e Sébastien Olivier Charneau, pelos conhecimentos indispensáveis que me forneceram para padronização da técnica de isoeletrofocalização alcalina de proteínas de neutrófilos.
- Aos demais colegas do LBQP e ainda de outros laboratórios, por tudo o que me auxiliaram: Rafael Augusto, Micaella, Everton Luís, Vitório, Carinne, Karina, Alexandre, Pedro Ivo, Carlos Garcia, Carlos Morris, Gabriela, Jimmy Alexander, Larissa, Giselle, Leonardo, Fernanda, Hialy Cristina, Marli, Pollyanna, Rachel Louise, Lucas, Muhammad, Samina, Nuno Manoel, Rayner Myr, Antônio Rufino, Francisco Erivan, Gabriel, Liudy, Jaques, Diana Paola, Jéssica, Fabiane, Fábio, Flávia Melissa, Perla, Carlos Uribe, Aline.
- Ao Prof. Dr. Carlos André Ornelas Ricart, também do LBQP, pelos conselhos oportunos em momentos críticos no decorrer do trabalho.
- Aos demais professores do LBQP e de outros laboratórios, por toda a colaboração que somaram: Consuelo Lima, Pedro Zanotta, Marcelo Valle de Sousa, Mariana de Souza Castro, Ricardo Bastos Cunha, Carlos Roberto Felix, Luciano Paulino da Silva.
- Aos colegas da Unidade de Hematologia e Hemoterapia do Hospital Regional da Asa Sul (UHH-HRAS), pelo companheirismo durante o período de realização do trabalho: Dra. Roberta Horta, Dra. Maria da Penha Pereira, Dra. Maria Enoi Santos, Deuzenice Mota, Rodolfo

Fortes, Alberto Rego, Marilce Rabelo, Maria do Carmo Severino, Andréa Souza, Maria Augusta Oliveira, Vera Lúcia Guimarães, Maria José Santos, Vana Viana, Cláudia Amaral, Vera Lúcia Mariz, Cláudia Maria Oliveira, José Wilson Santos, Marly Diniz, Antônia Maria Borba, Elaine Cristina Silva, Elizete Sousa, Edelzuita Fátima Pereira, Humberto Lopes, Jiuliano Pereira, Marineide Lemos, Ana Maria Teles, Mezulina Gama, Raquel Gomes, Rogério Feitosa.

- Aos colegas da Fundação Hemocentro de Brasília (FHB), pela ajuda durante os 2 meses que antecederam a defesa da tese: Ana Rita de Carvalho, Dra. Bárbara Calaça, Dra. Bárbara Berçot, Marcela Coelho, Fabíola Andrade, Dra. Maria das Graças Giordano, Dra. Maria Beatriz Souza, Dra. Artemízia Néas, Dr. Marcelo Thá Veiga, Danielle Peixoto, Luciana Araújo, Thainá Amorim, Marcus Xavier.
- Aos familiares que são injeção de ânimo em minha vida: Maria Eunice Silva, Maria Estela Telles, Sônia Regina de Menezes, Edmundo Telles, Rosa Telles, Maria de Fátima e Francisco Silva, Irene e Oswaldo Telles, Cláudia Monteiro, Sílvia Monteiro, Maria Laci Alvim.
- Às pessoas que são instrumentos de Deus em minha vida, por contribuírem com meu crescimento pessoal: Almerinda Gonçalves, Maria Auxiliadora Brasil, Alzenira Freire, Carlos Roberto de Faria, Edson Gouveia, Marcelo Henrique da Silva, Sebastião e Jandira Guerra, Rita Lobo. E a tantas outras, que, para felicidade minha, são muitas e preciosas para terem todos os seus nomes inscritos aqui. Essa injusta falta de espaço não impede que o meu *muito obrigada* alcance-as.

“Eu sou o Alfa e o Ômega, o Primeiro e o Último, o Princípio e o Fim.”

Jesus Cristo

Bíblia Sagrada, Apocalipse 22:13

***“I am the Alpha and the Omega, the First and the Last, the Beginning
and the End.”***

Jesus Christ

Holy Bible, Revelation 22:13

RESUMO

Os neutrófilos são os leucócitos mais abundantes no sangue periférico humano, representando a principal linha de defesa contra bactérias, vírus e protozoários. Durante o processo de ativação, essas células podem liberar ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) e proteases oriundas de seus grânulos para o meio extracelular, promovendo dano tecidual. Em politraumatismo, o processo inflamatório pode tornar-se disseminado e resultar na síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS). O progresso dessa situação induz o desenvolvimento de síndrome da angústia respiratória aguda (ARDS) e falência de múltiplos órgãos (MOF). Devido à complexidade do sistema analisado, que envolve muitas e diferentes vias metabólicas de estimulação / ativação com diversos pontos de interação, a abordagem proteômica é considerada uma ferramenta apropriada para estudar as funções neutrofílicas. Este trabalho apresenta os resultados obtidos a partir da análise comparativa entre os mapas proteômicos de polimorfonucleares (PMN) humanos quiescentes e ativado por trauma grave. São pesquisados marcadores moleculares que possam estar envolvidos nos estados mórbidos observados após politraumatismo. Extratos proteicos de neutrófilos de 3 doadores hígidos e de 3 pacientes politraumatizados foram analisados, como triplicatas biológicas e experimentais, em dois intervalos de eletroforese bidimensional: pH 6-11 e 4-7. O processo comparativo da abordagem alcalina revelou 3 *spots* diferencialmente expressos, sendo que os três aumentaram sua expressão após ativação devido a trauma grave. Quanto ao perfil ácido, 114 *spots* foram diferencialmente expressos, onde 27 aumentaram e 87 diminuíram sua expressão devido à ativação por politraumatismo. Foram alcançadas identificações de algumas proteínas potencialmente relacionadas com quadros inflamatórios após trauma grave, como Zfyve19, MAOB e proteína semelhante à albumina, descritas pela primeira vez em polimorfonucleares. A partir do entendimento das funções bioquímicas dessas proteínas, espera-se que exames laboratoriais e terapias clínicas específicos possam ser desenvolvidos.

Palavras-chave: neutrófilo, trauma, inflamação sistêmica, proteoma.

ABSTRACT

Polymorphonuclear leukocytes (PMN) or neutrophils are thought to play divergent roles in critically injured patients. In one fashion, they are the first line of defense against bacterial, viral and protozoan infections through phagocytosis and release of reactive oxygen species (ROS). However, it has become apparent that inappropriate activation of these cells and release of ROS and tissue degrading enzymes from their granules contributes to systemic inflammatory response syndrome (SIRS), acute respiratory distress syndrome (ARDS) and multiple organ failure (MOF). Neutrophil protein extracts from three volunteer normal donors and from three major torso trauma patients were submitted, as technical and biological triplicates, to two ranges of bidimensional electrophoresis: pH 6-11 and 4-7. Alkaline and acidic proteomic maps of quiescent human neutrophils were analyzed and compared to those of activated neutrophils from severe trauma patients. The alkaline proteomic comparison revealed 3 *spots* whose measured volumes differed between activated and quiescent neutrophils, with all of them upregulated in trauma setting. On the other hand, the acidic proteomic analysis revealed 114 *spots* whose measured volumes differed between activated and quiescent polymorphonuclear leukocytes, with 27 upregulated and 87 downregulated in trauma condition. This work achieved the identification of several proteins potentially involved in signaling after trauma, as exemplified by the proteins Zfyve19, MAOB and albumin-like protein, described for the first time in polymorphonuclear leukocytes. Understanding the role of some neutrophil proteins, which are involved in the leukocyte metabolic actions in inflammatory response, can contribute to the development of new therapeutic strategies to control the deleterious inflammatory process and its pathological sequelae.

Keywords: neutrophil, trauma, systemic inflammation, proteome.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Os quatro estados funcionais do polimorfonuclear, didaticamente simplificados através de um exemplo de processo inflamatório pós-trauma	39
Figura 2 – Proteoma e sua aplicação em ciências biológicas	52
Figura 3 – Exemplo de separação, análise e identificação de proteínas por eletroforese bidimensional (2D-PAGE), acoplada a espectrometria de massa (MALDI-TOF)	54
Figura 4 – Rede de pareamentos realizados para a categoria alcalina	63
Figura 5 – Rede de pareamentos realizados para a categoria ácida	63
Figura 6 - Análise dos peptídeos identificados de <i>Vimentina</i>	72
Figura 7 - Peptídeos identificados de <i>CLIC4</i> (oxidação e acetilação)	73
Figura 8 – Busca resultante e lista de proteínas candidatas	74
Figura 9 – Gráfico de identificação (<i>Mowse Score</i>)	75
Figura 10 - Espectro de massa após fragmentação do peptídeo de massa 1570 Da da proteína <i>Vimentina</i>	76
Figura 11 - Séries de fragmentação esperadas para o peptídeo de massa 1570 Da da proteína <i>Vimentina</i>	76
Figura 12 – Algumas tentativas realizadas para padronização da focalização isoelétrica no intervalo de pH 6-11	80
Figura 13 - Gel master quiescente alcalino	83
Figura 14 - Gel master trauma alcalino	84
Figura 15 - Gel master quiescente ácido	86
Figura 16 - Gel master trauma ácido	88
Figura 17 – Mapa proteômico ácido de neutrófilos quiescentes	96

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 – Alguns dos mais importantes agentes de estimulação / ativação e estruturas de superfície de neutrófilos 36
- Tabela 2 – *Spots* com expressão diferencial da categoria alcalina 85
- Tabela 3 - *Spots* com expressão diferencial aumentada no grupo ativado por trauma, da categoria ácida 89
- Tabela 4 - *Spots* com expressão diferencial diminuída no grupo ativado por trauma, da categoria ácida 90
- Tabela 5 - *Spots* encontrados apenas no grupo de neutrófilos quiescentes, cujas identificações foram obtidas, da categoria ácida 93
- Tabela 6 - Proteínas participantes do estudo comparativo *Quiescente versus Trauma* 94

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- β_2 -integrina gp150,95: CD11c/CD18
- β_2 -integrina LFA-1: CD11a/CD18
- β_2 -integrina Mac-1: CR3 ou CD11b/CD18
- 2D-PAGE: eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida usando dodecilsulfato de sódio como detergente
- ADCC: citotoxicidade celular dependente de anticorpo
- ANXA3: proteína anexina A3
- ARDS: síndrome da angústia respiratória aguda
- BLTR1: receptor de LTB₄
- C5a: porção derivada da proteína C5 do complemento
- C5aR: receptor de C5a ou CD88
- CACNB2: subunidade beta 2 de canais de íons cálcio
- CARS: síndrome da resposta anti-inflamatória compensatória
- CD120: receptores de TNF- α
- CD126: gp130 + IL-6R α ou receptor de IL-6
- CID: dissociação induzida por colisão (*collision induced dissociation*)
- Citocromo b₅₅₈: citocromo formado pela associação entre as subunidades da NADPH oxidase p22^{phox} e gp91^{phox}
- CLIC4: proteína canal intracelular de íons cloreto 4
- COX-2: enzima ciclooxigenase 2
- CXCR1: receptor 1 de IL-8 ou CD181
- CXCR2: receptor 2 de IL-8 ou CD182
- DHB: ácido 2,5 dihidroxibenzoico
- DMOS: disfunção de múltiplos órgãos e sistemas
- DTT: ditioneitol
- ERK 1/2: MAPK p42 e p44
- ERN: espécies reativas/tóxicas de nitrogênio
- ERO: espécies reativas/tóxicas de oxigênio

- Escore Mowse: *Molecular Weight Search*; algoritmo que atribui p-valores às proteínas candidatas, listando-as com base em escores
- E-selectina: CD62E ou ELAM-1 ou CD15
- ESI: eletropulverização e ionização em um capilar submetido à alta voltagem (*electrospray ionization mass spectrometry*)
 - ESI-Q/TOF: espectrômetro de massa do tipo *electrospray* com analisador de massa do tipo tempo de voo
- FAK: quinase para adesões focais
- Fas: receptores de indução de apoptose; também chamados de receptores de TNF- α
- Fc γ : fração cristalizável constituinte de um anticorpo; sítio efetor do anticorpo
 - Fc γ RI: receptor I da porção Fc gama de um anticorpo; também chamado de CD64
 - Fc γ RII: receptor II da porção Fc gama de um anticorpo; também chamado de CD32
 - Fc γ RIII: receptor III da porção Fc gama de um anticorpo; também chamado de CD16
- fMLP: agente ativador de neutrófilos, oriundo de bactérias Gram positivas; formil-metionil-leucil-fenilalanina
 - FPR: receptor de fMLP
- G-CSF: fator estimulador de colônias de granulócitos
 - G-CSFR: receptor de G-CSF ou CD114
- GM-CSF: fator estimulador de colônias de granulócitos e monócitos
 - GM-CSFR: receptor de GM-CSF ou CD116
- GSTP1: enzima glutatíon S transferase P
- GTPase: enzima que hidrolisa GTP à GDP em receptores de membrana do tipo proteína G; permite que a proteína G retorne ao seu estado inativo nos processos de transdução de sinais
 - HCCA: ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico
 - HisRS: enzima histidyl-tRNA sintetase
 - HSPA1A: proteína de choque térmico 1

- HSPA1L: proteína de choque térmico similar a 1
- IEF: focalização isoelétrica ou isoeletrofocalização; 1^a dimensão da eletroforese bidimensional
 - IFIT2: proteína *interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 2*
 - IFN γ : interferon gama
 - IFNR: receptor de IFN- γ ou IFNGM
 - IL-1 β : interleucina 1 beta
 - IL-10: interleucina 10
 - IL-10R: receptor de IL-10 ou CDw210
 - IL-1R AcP: proteína acessória do receptor de IL-1 β
 - IL-1RA: antagonista do receptor de IL-1
 - IL-6: interleucina 6
 - IL-8: interleucina 8
 - IPG: anfólitos imobilizados na malha de poliacrilamida (*immobilized pH gradient*)
 - IRAK1/2: quinase associada ao receptor de IL-1 β
 - ISS: índice ou escore de severidade da injúria
 - JAK/STAT1: via metabólica que tem a participação de duas proteínas, JAK e STAT
 - JAK: janus quinase
 - JNK: c-Jun N-terminal quinase
 - KIAA0564: tipo de enzima ATPase
 - LPS: lipopolissacarídeo; estrutura de caráter aniônico e tóxico presente na parede celular de bactérias Gram negativas
 - L-selectina: CD62L ou LECAM-1
 - LTB₄: leucotrieno beta 4; sintetizado a partir da degradação do ácido araquidônico pela via da lipoxigenase
 - MALDI-TOF/TOF: ionização por dessorção a laser em um suporte excitável para experimentos em sequência onde dois espectrômetros de massa do tipo tempo de voo são usados seguidamente, sendo possível detectar um determinado íon e posteriormente submetê-lo a uma etapa de fragmentação

- MALDI-TOF: ionização por dessorção a laser em um suporte excitável com analisador por tempo de voo (*matrix assisted laser desorption mass spectrometry – time-of-flight*)

- MAOB: enzima monoamino oxidase B

- MAPK: proteína quinase ativada por mitógeno; receptor de transdução de sinais de membranas celulares, do tipo enzimático

- MARS: síndrome da angústia respiratória aguda moderada

- MKK: quinase de MAPK

- MOF: falência de múltiplos órgãos

- MRI: proteína moduladora de infecção por retrovírus

- MS/MS: fragmentação ou sequenciamento de peptídeos (*tandem mass spectrometry*)

- MS: espectrometria de massa (*mass spectrometry*)

- NADPH oxidase: complexo enzimático responsável pela geração de espécies reativas de oxigênio com função microbicida em células fagocíticas; NADPH (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato) corresponde a um cofator enzimático para enzimas óxido redutases

- NCKAP1L: proteína *NCK-associated protein 1-like*

- NO: óxido nítrico

- O₂^{•-}: ânion superóxido

- p38: tipo de MAPK

- p47^{phox}: proteína 47 citossólica; componente do complexo NADPH oxidase

- p60: receptor 1 de TNF- α ou TNFR1

- p67^{phox}: proteína 67 citossólica; componente do complexo NADPH oxidase

- p80: receptor 2 de TNF- α ou TNFR2

- PAF: fator ativador de plaquetas; fator de agregação plaquetária

- PAFR: receptor de PAF

- *phage display*: método baseado na produção de bacteriófagos para expressar peptídeos ou proteínas de interesse fundidos ao capsídeo

- PI3K: fosfoinositídeo 3 quinase

- PKC: proteína quinase C

- PLA: fosfolipase A

- PLC: fosfolipase C
- PLD: fosfolipase D
- PMA: agente ativador de neutrófilos; phorbol 12-myristate 13-acetate
- PMF: *peptide mass fingerprint*
- PMN: polimorfonuclear
- PMS2L3: proteína *postmeiotic segregation increased 2-like 3*
- PPA1: enzima pirofosfatase
- PSD: *post source decay*; tecnologia que permite fragmentação com aplicação de laser com maior energia em relação àquela utilizada para dessorção e ionização
 - P-selectina: CD62P ou GMP-140
 - PSGL-1: ligante glicoproteico 1 de P-selectina e de E-selectina; corresponde a uma sialomucina de leucócitos humanos
 - PUS7L: enzima homóloga da pseudo-uridina sintase
 - Rac: proteína GTPase; de ligação a GTP; componente do complexo NADPH oxidase
 - Raf: quinase de MKK
 - Ras: quinase de Raf
 - receptor de IL-1 β : IL-1RI (CD121a) + IL-1R AcP
 - Rho: proteína GTPase; de ligação a GTP
 - Rho-GDI: complexo proteico que se une à Rac em neutrófilos não ativados para inibir a montagem e o funcionamento da NADPH oxidase
 - rpm: rotações por minuto
 - RSSA: receptor de laminina 1
 - S100-A9: proteína calgranulina B; proteína relacionada a fator inibitório de migração 14
 - SDS: dodecilsulfato de sódio
 - SDS-PAGE: 2^a dimensão da eletroforese bidimensional
 - sequenciamento *de novo*: ocorre em situações nas quais o genoma de uma determinada espécie ainda não está completamente seqüenciado ou disponível; é necessário derivar a sequência primária de aminoácidos de um

determinado peptídeo baseado única e exclusivamente nos dados obtidos por espectrometria de massas, isto é, sem recorrer a banco de dados

- SIRS: síndrome da resposta inflamatória sistêmica
- SNAP: proteína *α -soluble NSF attachment protein*
- SNARE: receptor para fusão entre duas membranas plasmáticas; receptor para adesão a proteína de fusão sensível a *ethylmaleimide* solúvel
- SOS/Grb: reguladores de Ras
- Src: tirosina quinase
- STAT: tradutores e ativadores de transcrição de sinais
- TLR, LBP, CD14, MD-2, MyD88: componentes estruturais do receptor Toll ou *Toll-like receptor*, receptor de LPS
- TNF- α : fator de necrose tumoral alfa
- TRADD: proteína do domínio *morte* de TNFR1
- TRAF-6: fator 6 associado a receptor de TNF- α
- Tyk-2: tirosina quinase 2
- UCH-L5: enzima *ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L5*
- Zfyve19: proteína *zinc finger FYVE domain-containing protein 19*

SUMÁRIO

1) Introdução	20
I. Aspectos clínicos e laboratoriais	20
II. Respostas endócrino-metabólica e imunológica ao trauma	22
III. Neutrófilos e o processo inflamatório pós-trauma	34
IV. Integração das respostas no trauma	43
V. Diagnóstico laboratorial preditivo para SIRS, ARDS e MOF	46
VI. Análise proteômica	50
VII. 2D-PAGE, MALDI-TOF e MALDI-TOF/TOF	53
2) Objetivos	55
3) Metodologia	56
I. Esquema experimental	56
II. Preparação das amostras	57
III. Separação e lise dos neutrófilos	58
IV. Eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida	60
V. Análise de imagens	62
VI. Análise estatística	64
VII. Digestão de <i>spots</i>	66
VIII. Extração de peptídeos	67
IX. Espectrometria de massa	68
X. Critérios de validação de <i>peptide mass fingerprints</i> (PMF)	71
XI. Critérios de validação de <i>MS/MS</i> (MALDI-TOF/TOF)	74
4) Resultados	78
I. Obtenção de neutrófilos	78
II. Confecção de géis bidimensionais	79
III. Análise de imagens e análise estatística dos géis bidimensionais	82
IV. Identificação de proteínas	94

5) Discussão	98
I. Proteína com expressão aumentada após ativação de neutrófilos devido a trauma grave	99
II. Proteínas com expressão diminuída após ativação de neutrófilos devido a trauma grave	100
III. Proteínas exclusivamente observadas em neutrófilos quiescentes	108
IV. Sumário e conjecturas	116
6) Conclusões	118
7) Perspectivas	120

1) Introdução:

I. Aspectos Clínicos e Laboratoriais

Em todo o mundo, aproximadamente 56 milhões de mortes ocorrem a cada ano (**Allotey et al., 2010**). A injúria por trauma, que abrange 12% das mortes do mundo, é frequentemente ignorada como uma das principais causas de morte e requer estratégias inovadoras para reduzir seus valores (**Struck et al., 2009**).

A resposta metabólica à agressão representa um dos exemplos mais elegantes de integração orgânica, presidida por mecanismos neuroendócrinos complexos, tendo como consequência a preservação à vida em condições adversas e a garantia da possibilidade de escolha entre a fuga e a luta.

A melhor compreensão da fisiopatologia da agressão e a ampliação sem precedentes dos horizontes da cirurgia (considerada uma forma de trauma intencional), o desenvolvimento de sistemas de monitorização mais eficientes e mais acessíveis, a descoberta de novas drogas, o aprimoramento dos recursos hospitalares e vários outros fatores permitiram resgatar vítimas de traumas, que antes seguramente morreriam (**Birolini, 1997**).

Como decorrência do aumento na sobrevivência, quadros clínicos pós-traumáticos, antes mal conhecidos e pouco compreendidos, até por serem inusitados, passaram a ocorrer com maior frequência. Os resultados foram as identificações da insuficiência renal por necrose tubular aguda (década de 40), da insuficiência respiratória pós-traumática (década de 60) e da insuficiência de múltiplos órgãos e sistemas (anos 70 e 80). O reconhecimento destes quadros, por sua vez, induziu a um explosivo desenvolvimento tecnológico que afetou todas as áreas da medicina. Tais avanços, associados ao aperfeiçoamento dos instrumentos de pesquisas, à identificação de mediadores celulares, à compreensão das bases da biologia molecular, permitiram o reconhecimento

da síndrome da resposta inflamatória sistêmica (década de 90). Tudo isso também resultou na progressiva sofisticação da assistência, que passou a ser oferecida e aplicada a portadores de afecções cada vez mais complexas **(Freire, 2004)**.

A capacidade de responder a determinadas agressões, sejam elas de natureza infecciosa, cirúrgica ou traumática, é um componente fundamental apresentado pelos seres vivos. Se o processo que levou à lesão tecidual é de pequena intensidade e temporário, a restauração da homeostase metabólica e imune prontamente ocorre. Por outro lado, uma injúria significativa, como a observada no trauma grave e nas queimaduras extensas, por exemplo, pode ocasionar uma deterioração dos processos fisiológicos de manutenção da homeostase, fenômenos estes que levam, na ausência de intervenção terapêutica adequada, ao óbito. Apesar da resposta biológica à injúria ter como consequência frequente a preservação do organismo, observa-se que, dependendo da intensidade da agressão sofrida, as respostas endócrino-metabólica e imunológica podem ser tanto benéficas, na recuperação dos indivíduos afetados, como maléficas, como em casos de traumatismos extensos **(Freire, 2004)**.

Há uma resposta endócrino-metabólica ao trauma, com elevação de determinados hormônios e diminuição de outros, que é de fundamental importância para a sobrevivência do paciente. Há também uma resposta imunológica, referida a uma grande quantidade de mediadores humorais e de inflamação, que participam ativamente na atuação do organismo frente à injúria **(Birolini, 1997)**.

II. Respostas Endócrino-Metabólica e Imunológica ao Trauma

Em determinadas condições, como o jejum, a agressão cirúrgica, e os acidentes, uma importante alteração no ambiente hormonal faz-se presente. Essas modificações têm como uma de suas consequências a mobilização de substratos, a partir de proteínas e gorduras, que serão utilizados como fonte de energia por diversas células. O tecido adiposo fornece uma reserva energética considerável, uma vez que cada grama gera em torno de 9 kcal. Os ácidos graxos livres constituem a principal fonte de energia utilizada pelo organismo durante o trauma. O tecido muscular, de onde a maior parte de proteína também é mobilizada, é hidratado. Sendo ele composto de três partes de água para uma parte de proteína, gera apenas 1 kcal por grama, como valor calórico real. Apesar de seu baixo valor calórico, durante o estresse provocado pelo trauma e sob influência hormonal, as proteínas musculares sofrem um processo de lise e geram aminoácidos para a gliconeogênese, consistindo em uma etapa fundamental na resposta à injúria **(Sabiston Jr and Lyerly, 1999; Vieira et al., 2000)**.

O organismo, frente à injúria, mobiliza-se para a produção de glicose, permitindo que seja ofertada aos tecidos que a utilizam preferencialmente como fonte de energia (ex: células do sistema nervoso e hemácias). No mesmo sentido, a glicose possui como fonte de armazenamento principal o glicogênio hepático, que é rapidamente consumido. Nesse momento, o suprimento prevalente passa a ser da gliconeogênese, que é a produção de glicose a partir de substratos não-glicídicos, como aminoácidos (alanina e glutamina), glicerol e lactato **(Biolini, 1997)**.

Assim, ocorre uma resposta hormonal que deflagra um estímulo à gliconeogênese e à lipólise. Os estímulos nervosos provenientes do trauma percorrem fibras aferentes e alcançam o hipotálamo. Através do hormônio liberador de corticotrofina (CRF), tais estímulos promovem a síntese do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH). Dessa forma, as supra-renais são estimuladas a produzir cortisol, hormônio fundamental na resposta do

organismo a um trauma grave. Esse glicocorticoide é responsável pelas seguintes alterações (**Feliciano et al., 2004**):

a) promoção de um efeito generalizado sobre o catabolismo tecidual, onde há mobilização de aminoácidos da musculatura esquelética. Os aminoácidos glicogênicos servirão de precursores para a síntese hepática de novas moléculas de glicose (gliconeogênese), funcionarão como substratos para a cicatrização das feridas, e como componentes para a síntese hepática de proteínas de fase aguda (fibrinogênio, ceruloplasmina, proteína C reativa).

b) estímulo à lipólise. O cortisol facilita a ação de catecolaminas na mobilização de gorduras do tecido adiposo. Haverá liberação de glicerol, que servirá de substrato para a gliconeogênese, e ácidos graxos livres, que serão utilizados como fonte energética direta por alguns tecidos. Desajustes na circulação, como isquemia ou choque hipovolêmico, mesmo que transitórios, somados a estímulos provenientes das lesões teciduais, fazem com que o sistema nervoso simpático fique hiperativo. Tal quadro leva à estimulação da medula adrenal, com liberação de epinefrina, que contribuirá com a preservação da perfusão sanguínea de tecidos vitais, de forma a salvar o organismo das perdas volêmicas.

c) estímulo à glicogenólise e, juntamente com os opióides endógenos (endorfina, dinorfina, encefalinas), à atonia intestinal pós-operatória (ou pós-traumática), além de piloereção, broncodilatação, aumento da frequência cardíaca e relaxamento esfíncteriano.

d) secreção aumentada do hormônio antidiurético (vasopressina ou ADH). A vasopressina promove uma reabsorção de água pelos túbulos distais e dutos coletores. Dessa maneira, ocorre uma retenção hídrica natural no pós-operatório (ou pós-trauma), determinando oligúria funcional e edema. O ADH estimula também a glicogenólise e a gliconeogênese.

e) liberação da aldosterona, pela ação da angiotensina II. Esta última, por sua vez, surge em situações onde há lesões teciduais e aumento do potássio na circulação, e principalmente pela ação do ACTH. A aldosterona mantém o volume intravascular, ao conservar os níveis de sódio e eliminar hidrogênio e potássio.

f) alterações pancreáticas, onde os níveis de glucagon tornam-se elevados e os de insulina, baixos. O estímulo proveniente da epinefrina circulante pode ser o responsável. O glucagon elevado e a queda da insulina constituem-se também em um potente sinal para início e manutenção da gliconeogênese.

g) elevação do hormônio do crescimento (GH). Este peptídeo tem ação conjunta com a epinefrina para mobilizar gordura do tecido adiposo, isto é, promover lipólise. O GH estimula a síntese hepática do fator de crescimento insulina-símile (IGF-1), substância pela qual ele exerce a maioria de suas funções, principalmente anabólicas, como a síntese de proteínas. Como a fase inicial após uma injúria acidental ou cirurgia eletiva é de consumo proteico, acredita-se que o IGF-1 tenha seus níveis reduzidos, apesar dos valores plasmáticos aumentados de GH.

Na presença de jejum prolongado, injúrias acidentais graves, sepse e cirurgias de grande porte, existe todo um ambiente hormonal direcionado à produção de glicose. Isso leva a um balanço nitrogenado negativo, simbolizando um consumo de proteínas superior à síntese (**Freire, 2004; Sabiston Jr and Lyerly, 1999; Vieira et al., 2000**).

Após um acidente com lesões extensas, o indivíduo politraumatizado apresenta algumas fases metabólicas (**Freire, 2004; Sabiston Jr and Lyerly, 1999; Vieira et al., 2000**):

a) fase adrenérgica corticoide. É o período em que as ações promovidas pela epinefrina e pelos glicocorticoides fazem-se mais intensas. A liberação de mediadores pós-inflamatórios é máxima. Gliconeogênese, síntese de proteínas de fase aguda, atividade dos leucócitos e o balanço negativo de nitrogênio também atingem os maiores valores de todo o processo. A lipólise, com liberação de ácidos graxos e sua oxidação pelos tecidos, faz-se presente. É o período que se segue às cirurgias ou o período que sucede a uma curta fase de hipometabolismo, no início de traumas graves. Dura 6 a 8 dias em cirurgias eletivas não complicadas, mas pode perdurar por semanas no caso de sepse, trauma severo e queimaduras.

b) fase anabólica precoce. Também chamada de fase de retirada do corticoide. Esta fase tem como característica um declínio na excreção de nitrogênio, o que tende a um balanço em equilíbrio. Existe também uma restauração do balanço de potássio, uma vez que este era inicialmente positivo, e depois tendia a negatividade, no decorrer de horas e dias, devido ao efeito da aldosterona. Os níveis de IGF-1 começam a subir. A diminuição dos teores de ADH promove diurese do líquido retido. O paciente manifesta desejo de alimentar-se. Após um período variável, os pacientes entram em um balanço nitrogenado positivo, representado por síntese proteica e ganho de massa corporal magra.

c) fase anabólica tardia. Esse período é caracterizado por um ganho de peso mais lento, principalmente às custas do tecido adiposo, fenômeno chamado de balanço positivo de carbono.

d) fase de baixo fluxo. Na fase de baixo fluxo, ou simplesmente fluxo, o débito cardíaco diminui, a resistência vascular aumenta e o volume circulatório encontra-se reduzido. Essas alterações são determinadas em grande parte pela perda de volume do compartimento intravascular. Observam-se também perda de temperatura central e hipometabolismo, apesar dos níveis de hormônios do estresse encontrarem-se elevados.

e) fase de reperfusão. Com a restauração do fluxo sanguíneo por meio de cristaloides ou hemotransfusão, surge um novo período na resposta à injúria, chamado de reperfusão. Este é caracterizado por um intenso hipermetabolismo, o qual suplanta em muito aquele observado em operações eletivas. O metabolismo proteico altera-se, e a mobilização de aminoácidos a partir dos músculos esqueléticos e tecidos periféricos faz-se de modo intenso, quando comparada à resposta a cirurgias eletivas. Ou seja, ocorre uma proteólise acelerada. A glutamina, utilizada como combustível para os enterócitos, é metabolizada a amônia e a alanina. A alanina serve como substrato para a gliconeogênese hepática e a amônia é convertida em ureia, sendo eliminada. A glutamina também é captada pelos rins, onde contribui com o grupo amino, facilitando a excreção do cátion hidrogênio para o lúmen tubular. Durante a resposta ao trauma ou a cirurgias eletivas, a proteólise faz com que a alanina liberada do músculo ganhe a circulação e seja convertida no fígado em glicose (ciclo de Felig).

Dentro dos tecidos injuriados em um trauma grave, em neutrófilos, macrófagos e fibroblastos, a glicose é consumida através de um metabolismo anaeróbio, o que produz lactato. Este retorna ao fígado e é utilizado para a gliconeogênese (ciclo de Cori).

Ao contrário do que durante muitos anos foi acreditado, a sepse não é resultado apenas de infecções, mas pode ser desencadeada por vários outros estímulos, os quais têm em comum a capacidade de promover uma resposta imune por parte do indivíduo. Assim, o trauma, as queimaduras, e as situações de isquemia-reperfusão são considerados fatores relevantes para iniciar um evento séptico (**Povoa, 2002**). Para tentar uniformizar a terminologia e definir conceitos, Roger Bone organizou uma conferência de consensos em 1991 (**Bone, 1991**). Pela primeira vez, aparece o termo “síndrome da resposta inflamatória sistêmica” (SIRS - *systemic inflammatory response syndrome*) e alerta-se para o fato de que sepse e choque séptico são resultados de respostas descontroladas à infecção. A demonstração epidemiológica de que existe uma continuidade entre SIRS e choque séptico / falência de múltiplos órgãos (MOF – *multiple organ failure*) reforça a hipótese de que SIRS seja um fator de resposta inflamatória secundária a estímulos infecciosos ou não (**Pittet et al., 1995; Rangel-Frausto et al., 1995**). Em cada um dos estágios da resposta inflamatória mencionados, observou-se um aumento, em relação ao estágio anterior, da falência de múltiplos órgãos e da mortalidade. A complexa cascata dos processos imunológicos funciona de forma harmoniosa e equilibrada e constitui um mecanismo primordial de defesa do organismo contra a invasão de microrganismos. Por isso, todas as formas de imunodeficiência cursam com risco aumentado de infecções (**Povoa, 2002**).

Atualmente, estão identificados dezenas de mediadores da cascata imunológica. Toda essa rede de mediadores não está totalmente esclarecida, contudo, pode-se traçar um diagrama aproximado dos primeiros eventos bioquímicos que conduzem à sepse. Um dos elementos centrais em todo o processo são as citocinas. Estes peptídeos são responsáveis pela modulação, ativação e inibição da referida cascata. As citocinas pró-inflamatórias mais estudadas são: fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α), interleucina-1 β (IL-1 β) e

interleucina-8 (IL-8). Entre as citocinas de propriedades anti-inflamatórias, destaca-se a interleucina-10 (IL-10). Desta maneira, quando os microrganismos e seus constituintes antigênicos invadem o indivíduo, há um reconhecimento desse evento por parte dos neutrófilos e macrófagos, que liberam TNF- α e IL-1 β . Esses dois mediadores pró-inflamatórios serão responsáveis por uma gama de fenômenos em cascata, que incluem adesão de neutrófilos ao endotélio, ativação dos sistemas do complemento e da coagulação, e liberação de outros mediadores pró-inflamatórios (mais IL-1 β e TNF- α , IL-8, fator ativador de plaquetas (PAF), prostaglandinas, leucotrienos, espécies reativas de oxigênio e proteases) (**Blackwell and Christman, 1996**). Simultaneamente, também são liberados fatores essencialmente anti-inflamatórios como a IL-10, que inibe as atividades neutrofílicas, macrofágicas e linfocitárias, diminui a produção de TNF- α , e estimula a resposta de fase aguda e a produção de imunoglobulinas (**Chernoff et al., 1995**). Até 1997, a ênfase na gênese da sepse e do choque séptico era colocada em uma reação pró-inflamatória descontrolada. Mais uma vez, Roger Bone (**Bone, 1997**) reviu este conceito, ao chamar a atenção da comunidade científica para a possível responsabilidade dos mecanismos anti-inflamatórios na gênese da falência de múltiplos órgãos. Neste trabalho, Bone notou que a resposta imune é dividida em diferentes estágios, de 1 a 5, dependendo da evolução entre os estágios do equilíbrio e da magnitude para os fenômenos pró- e anti-inflamatórios.

a) Estágio 1: injúria (infecção) desencadeia reação local.

O mecanismo inicial seria a injúria, associada ou não à infecção, propiciando uma reação local. Ocorreria liberação de citocinas pró-inflamatórias que limitariam a lesão e iniciariam a reparação do dano. Haveria uma resposta anti-inflamatória compensatória, com liberação de citocinas anti-inflamatórias e receptores solúveis e antagonistas. A consequência da ação destes seria evitar que os mediadores inflamatórios tornassem autodestrutivos.

b) Estágio 2: reação sistêmica inicial.

Ocorreria a resposta sistêmica inicial. Haveria a liberação de substâncias pró-inflamatórias (aminas vasoativas, citocinas, fatores dos sistemas do complemento e da coagulação, eicosanoides e PAF), que atraem neutrófilos, monócitos/macrófagos, linfócitos T e B, e plaquetas ao local da lesão. Essas

substâncias estimulariam uma resposta anti-inflamatória sistêmica compensatória, que regularia a resposta pró-inflamatória inicial. Através de mecanismos neuro-humorais (reflexos dos barorreceptores cardíacos e aórticos), são mantidos o débito cardíaco aumentado e a resistência vascular periférica diminuída.

c) Estágio 3: inflamação sistêmica maciça.

Ocorreria inflamação sistêmica maciça. Há descompensação do balanço pró- vs anti- da resposta inflamatória inicial e seriam assinalados os sinais clínicos da SIRS, caracterizados por disfunção miocárdica e hipóxia tecidual difusa, com déficit de oxigênio persistente. Em termos celulares gerais, há a substituição da respiração aeróbia pela glicólise, com produção excessiva de ácido láctico e resultante acidose metabólica. Isso poderia evoluir para a sequência: diminuição do pH dos tecidos, esgotamento da resposta vasomotora, choque, disfunção de múltiplos órgãos e sistemas (DMOS) e MOF.

d) Estágio 4: supressão imune excessiva.

Ocorreria supressão imune excessiva, também chamada “paralisia imune” ou “janela de imunodeficiência”. A maioria dos pacientes com inflamação sistêmica maciça morreria rapidamente de choque. Aqueles que sobrevivessem, poderiam sofrer uma síndrome da resposta anti-inflamatória compensatória (CARS – *compensatory anti-inflammatory response syndrome*). A CARS explicaria o aumento da susceptibilidade à infecção em pacientes queimados com trauma e hemorragia, bem como a anergia encontrada nesses pacientes. A síndrome da resposta antagonista mista (MARS – *mild acute respiratory syndrome*) incluiria componentes de SIRS e CARS.

e) Estágio 5: dissonância imune.

Ocorreria dissonância imune em estágio final da DMOS persistente, com reação inflamatória exagerada, níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias, MOF e óbito.

Em termos de órgãos e sistemas, falência pulmonar ocorre primeiramente, seguida de falências hepática e intestinal, sendo usualmente o rim o último sistema a falhar. O intestino delgado é particularmente vulnerável, devido ao fato de a vasoconstrição visceral ser uma importante resposta compensatória

em um choque hipovolêmico pós-trauma, sendo a reperfusão visceral um dos últimos eventos a ser restaurado após a reanimação. Dessa maneira, a isquemia e a reperfusão intestinal cooperam para a resposta inflamatória. Assim, uma injúria microcirculatória atinge invariavelmente todos os sistemas, e a incapacidade do organismo em ativar as medidas anti-inflamatórias conduz a um quadro progressivo de DMOS e MOF, encaminhando o paciente ao óbito **(Fry, 2000)**. Contudo, alguns pacientes podem reverter a disfunção orgânica antes de ocorrer a MOF, restaurar a homeostase e sobreviver. Tentativas de tratamento da SIRS incluem ressuscitação com solução salina – que aparentemente tem ação anti-inflamatória -, uso de inibidores da cicloxigenase e corticoides, sendo a IL-10 aparentemente um mediador importante da CARS **(Mannick et al., 2001)**. A SIRS constitui-se na principal causa de morbidade e mortalidade em pacientes de UTI. Efeitos celulares e humorais que modulam a resposta do indivíduo podem, por ação prolongada, provocar injúria tissular e DMOS **(Ferraz and Ferraz, 2002)**.

Os principais fatores de risco para MOF são **(Offner and Moore, 2000)**:

a) Associados com o primeiro golpe (*first hit*):

- Gravidade da lesão.
- Choque – isquemia – reperfusão.
- Gravidade da SIRS.

b) Associados com o segundo golpe (*second hit*):

- Infecção.
- Transfusão de hemocomponentes.
- Cirurgias secundárias.

c) Fatores do indivíduo:

- Idade.
- Obesidade.
- Fatores genéticos.

Idade: É um importante fator de risco para ARDS e MOF. Pacientes com idade superior a 45 anos apresentam risco duas a três vezes maior **(Moore et al., 1997)**. Morris Jr e colaboradores **(Morris Jr et al., 1990)** atribuem pior

prognóstico a co-morbidades mais frequentes no envelhecimento que afetam os diferentes sistemas em algum grau.

Obesidade: Pacientes obesos (com índice de massa corporal superior a 30 kg/m²) possuem fatores de risco preexistentes para diabetes e disfunções cardiovasculares. Apesar de não ser considerado um fator de risco independente para complicações pulmonares, a obesidade contribui para uma permanência maior em internações na UTI de pacientes politraumatizados **(Dossett et al., 2008)**.

Fatores Genéticos: Pacientes pertencentes a famílias com características genéticas de baixa produção de TNF- α e elevada produção de IL-10 possuem elevadíssimo risco de ir a óbito pelo desenvolvimento de sepse, fato que pode ser desencadeado por um trauma grave. Além disso, deficiências de fundo hereditário, como deficiência na produção de imunoglobulinas ou outras imunodeficiências combinadas, também induzem a este tipo de predisposição **(Westendorp et al., 1997)**.

Transfusão de Hemocomponentes: É um fator de risco independente para MOF pós-injúria **(Moore et al., 1997)**. Em pacientes politraumatizados, há uma relação entre transfusão de hemocomponentes, como concentrado de hemácias **(Moore et al., 1997)**, concentrado de plaquetas **(Silliman et al., 2003)** e plasma fresco congelado **(Insunza et al., 2004)**, e piora do quadro clínico, com desencadeamento de sepse e MOF **(Spahn and Rossaint, 2005)**. Moore e colaboradores **(Moore et al., 1997)** analisaram 513 pacientes politraumatizados, com hemorragia severa e choque hemorrágico. Eles demonstraram que a MOF acometeu os pacientes transfundidos em média com 13 unidades de concentrado de hemácias nas primeiras 12 horas após a injúria. Comparativamente, os pacientes transfundidos com apenas 4 unidades do mesmo hemocomponente, no mesmo período, não desenvolveram MOF. Assim, os autores sugerem que um decréscimo no volume de hemácias transfundidas pode diminuir o risco e a severidade de MOF. Além disso, o tempo de estocagem das unidades de concentrados de hemácias também foi revelado como outro fator de risco para MOF pós-injúria a ser considerado

(Zallen *et al.*, 1999). A transfusão de concentrado de hemácias também tem sido mostrada como um fator de risco independente para o desenvolvimento de infecção pós-injúria (Spahn and Rossaint, 2005). A presença de leucócitos nas unidades de concentrado de hemácias pode ser o principal fator desencadeador do efeito imunossupressor da transfusão de hemocomponentes (Blajchman, 2002). A exposição dos pacientes a grandes quantidades de antígenos estranhos pode induzir a uma baixa modulação do sistema imune. Apesar da existência de estudos clínicos inconclusivos para dizer se a leucodepleção elimina o efeito imunossupressivo dos hemocomponentes (Vamvakas and Blajchman, 2001), um estudo prospectivo revelou que a proporção de infecção em pacientes politraumatizados que receberam pelo menos 1 unidade de concentrado de hemácias, durante as primeiras 48 horas de admissão ao hospital, foi significativamente maior do que aquele no qual os pacientes não receberam nenhuma unidade do mesmo hemocomponente (33% vs 7,6%, respectivamente) (Claridge *et al.*, 2002). Os autores concluíram que há uma forte correlação dose-dependente entre a quantidade de hemocomponente transfundido e o desenvolvimento de infecção. Da mesma maneira que foi observado para o desencadeamento de MOF, o desenvolvimento de infecção também pode estar associado com o tempo de estocagem de unidades de concentrados de hemácias transfundidas (Spahn and Rossaint, 2005). A injúria pulmonar aguda relacionada à transfusão (TRALI - *transfusion related acute lung injury*) é uma das mais sérias complicações decorrentes de uma transfusão. Essa síndrome é caracterizada por angústia respiratória aguda, com ou sem cianose, e severa hipóxia com edema pulmonar bilateral. Hipotensão e febre também ocorrem frequentemente. Esses sintomas geralmente desenvolvem-se entre 1 a 6 horas após transfusão de um hemocomponente. Em sua forma fulminante, TRALI é indistinguível da síndrome da angústia respiratória aguda. A lesão em um quadro de TRALI é usualmente transitório e o edema é rapidamente combatido, geralmente dentro de 72 horas. Entretanto, em 6 a 10% dos casos, TRALI é fatal. A frequência de TRALI é desconhecida e, talvez por esse motivo, é significativamente pouco diagnosticada. A síndrome TRALI é um evento imunomediado, mas o mecanismo patogênico preciso ainda é pouco claro. Os anticorpos responsáveis pela reação são, na maioria dos casos, de origem

do doador do hemocomponente (**Engelfriet et al., 2001**). Anticorpos contra soro humano, anticorpos contra antígenos leucocitários de histocompatibilidade (HLA) classes I e II, e anticorpos específicos contra antígenos de superfície de neutrófilos são descritos como envolvidos no desenvolvimento de TRALI. Esses anticorpos ligam-se a seus antígenos correspondentes (presentes nos receptores da transfusão), resultando na formação de imunocomplexos. Uma das hipóteses para o desencadeamento da síndrome sugere que a formação desses imunocomplexos induz a ativação de neutrófilos, através da sua ligação aos receptores de Fc γ destas células. Os neutrófilos ativados promoveriam a liberação de fatores solúveis, como espécies tóxicas de oxigênio, citocinas e proteases, gerando lesão pulmonar (**Nishimura et al., 2004**). Uma outra hipótese sugere que lipídios biologicamente ativos, similares ao PAF, acumulam-se nas bolsas de hemocomponentes estocados. Quando transfundidos, esses mediadores lipídicos podem estimular os neutrófilos dos pacientes/receptores, preparando-os para respostas funcionais aumentadas, quando forem desafiados por um segundo estímulo (modelo *two-hit*) (**Engelfriet et al., 2001; Silliman et al., 2003**).

Até os dias atuais, as tentativas terapêuticas de prevenir o desencadeamento da DMOS por bloqueio dos mediadores da SIRS foram infrutíferas. Na progressão do quadro clínico após trauma grave, de SIRS a MOF, o monitoramento cuidadoso das funções respiratórias, cardiovasculares, nervosas, renais, hepáticas, gastrointestinais e hematológicas é de vital importância. Mecanismos terapêuticos envolvendo diminuição do fornecimento de O₂ para as células e do estímulo aos neutrófilos, e aumento nas concentrações de interleucinas, TNF- α e NO (óxido nítrico) já foram aplicados, porém um tratamento eficaz no combate a essas síndromes permanece indefinível (**Kaye et al., 2005**). Fry (**Fry, 2000**) considera que a inflamação constitui-se em uma resposta nãoespecífica a uma injúria, inicialmente local, podendo ativar uma resposta sistêmica, comportando-se clinicamente de modo similar, seja sua origem infecciosa ou nãoinfecciosa. A ativação local da inflamação inclui: vasodilatação local da microcirculação; aumento da permeabilidade vascular com aporte aos tecidos de plasminas, proteínas dos

sistemas de coagulação, cininas e complemento, além de mediadores lipídicos como PAF; aparecimento de diversas substâncias quimiotáticas para neutrófilos e monócitos (**Goldsby et al., 2002**).

III. Neutrófilos e o Processo Inflamatório Pós-Trauma

Nos estágios iniciais de uma resposta inflamatória, o tipo celular predominante é o neutrófilo. A infiltração dos neutrófilos dentro dos tecidos alcança níveis máximos entre 1 e 6 horas do início de uma resposta inflamatória. Um adulto normal produz mais de 10^{10} neutrófilos por dia, mas durante um período de inflamação aguda, a produção de neutrófilos pode aumentar em até 10 vezes (**Goldsby et al., 2002**). Isso resulta em um processo cíclico por *feedback* positivo, recrutando mais leucócitos para o local da inflamação (**Verploegen et al., 2002**).

Os neutrófilos deixam a medula óssea e circulam dentro dos vasos. Em resposta a mediadores da inflamação aguda, as células endoteliais dos vasos sanguíneos circunvizinhos à área inflamada aumentam sua expressão de E- e P-selectinas. Moléculas de trombina e histamina (originadas a partir de um trauma severo, por exemplo) induzem um aumento na expressão de P-selectinas; citocinas como IL-1 β ou TNF- α (liberadas por macrófagos teciduais e por células endoteliais circunvizinhas à região inflamada) induzem um aumento na expressão de E-selectinas, ambas as classes de selectinas no endotélio. Os neutrófilos circulantes expressam mucinas, como PSGL-1, que se ligam a E- e P-selectinas. Essa ligação medeia a anexação ou o rolamento de neutrófilos ao endotélio vascular, permitindo que as células rolem na direção do fluxo sanguíneo. Durante esse tempo, quimiocinas, tais como IL-8 ou outros quimioatraentes (liberadas por macrófagos já situados no sítio inflamatório), agem sobre os neutrófilos, disparando um sinal de ativação mediado por proteína G. Isso, então, gera mudanças conformacionais nas integrinas, resultando em adesão dos neutrófilos e subsequente migração transendotelial (**Goldsby et al., 2002**).

Uma vez nos tecidos, os neutrófilos estimulados e ativados também expressam níveis aumentados de receptores para quimioatraentes e exibem quimiotaxia. Entre os mediadores pró-inflamatórios, que são quimiotáticos para neutrófilos, estão diversas quimiocinas, produtos de fragmentação do

complemento (C3a, C5a, e C5b67), fibrinopeptídeos, prostaglandinas e leucotrienos. Além disso, moléculas liberadas por microrganismos, como fMLP (formil-metionil-fenilalanina) e LPS (lipopolissacárides de parede bacteriana), são também quimiotáticas para neutrófilos. Neutrófilos estimulados e ativados expressam também níveis aumentados de receptores para fração Fcγ de anticorpos e receptores para complemento. Assim, essas células podem ligar-se mais efetivamente a patógenos opsonizados por anticorpo ou complemento, facilitando então a fagocitose (**Goldsby et al., 2002**). Os microrganismos ingeridos são então destruídos por espécies tóxicas de oxigênio, derivadas da produção de ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) pelo complexo enzimático NADPH oxidase (**Segal and Abo, 1993**), e por enzimas proteolíticas, liberadas dos grânulos (**Shukla et al., 2000**). Outras proteínas produzidas no sítio inflamatório, pelos próprios neutrófilos, são lançadas no sangue e estimulam a medula óssea a produzir mais neutrófilos (**Verploegen et al., 2002**). Além disso, entre o segundo e o quinto dia da ocorrência do trauma, os macrófagos também iniciam a fagocitose de debris teciduais e de neutrófilos hiporesponsivos ou mortos. Tal atividade macrofágica contribui para quimiotaxia e estimulação de mais leucócitos por meio da liberação de citocinas, e para iniciar processos de reparo tecidual e cicatrização (**Balbino et al., 2005**).

O sinal de ativação também estimula vias metabólicas de neutrófilos para a explosão respiratória, que produz intermediários reativos de oxigênio e intermediários reativos de nitrogênio. A liberação de alguns desses reativos intermediários e a liberação de enzimas a partir dos grânulos primários e secundários dos neutrófilos (proteases, fosfolipases, elastases, e collagenases), têm um papel relevante na eliminação de vários patógenos. Essas substâncias também contribuem para o dano tissular que pode ser originado a partir de uma resposta inflamatória (**Goldsby et al., 2002**).

Devido à potencialidade dos seus armamentos antimicrobianos, os neutrófilos podem ser considerados como células efetivas na destruição de microrganismos. Porém são indiscriminadas, pois têm pouca ou nenhuma capacidade para realizar uma inibição seletiva de suas respostas. Pelo fato de não ser seletiva, torna-se claro que a resposta do neutrófilo deve ser finamente

modulada para proporcionar uma atuação apropriada. Assim, a habilidade de agentes pró- ou anti-inflamatórios, conforme retrata a tabela 1, em modular uma resposta gradativa permite à célula responder proporcionalmente à severidade do estímulo ou insulto (**Swain et al., 2002**).

Tabela 1 – Alguns dos mais importantes agentes de estimulação / ativação e estruturas de superfície de neutrófilos, participantes das principais respostas do processo inflamatório (**Elgert, 2009; Mollinedo, 2003; Thomson and Lotze, 2003**).

Agente ou Estrutura	Tipo de Receptor	Nome do Receptor	Vias Metabólicas Utilizadas pelo PMN	Resultados no PMN da Utilização das Vias	Local no PMN de Síntese do Receptor
LPS	Componente da parede de bactérias Gram negativas	Complexo estrutural em forma de receptor composto por TLR, LBP, CD14, MD-2, MyD88	TRAF-6, MKK3/6 e p38, MKK4/7 e JNK1/2	Estimulação (rolamento, adesão frouxa, quimiotaxia, desgranulação, síntese de eicosanóides a partir de 5-LO, produção de ERO)	Membrana de vesículas secretórias
G-CSF	Citocina, fator de crescimento	G-CSFR ou CD114	JAK 1/2, Tyk2, STAT 1/3	Estimulação (rolamento, adesão frouxa, quimiotaxia, fagocitose, desgranulação)	Dados não obtidos
GM-CSF	Citocina, fator de crescimento	GM-CSFR ou CD116	JAK2, STAT5, PI3K	Estimulação (rolamento, adesão frouxa, quimiotaxia, fagocitose, desgranulação, produção de ERO, inibir apoptose)	Dados não obtidos
IL-6	Citocina	Complexo estrutural formado por gp130 + IL-6R α (CD126)	JAK 1/2, STAT 1/3, Raf, MKK e ERK 1/2	Anti-inflamatório (inibe produção de citocinas, inibe adesão e quimiotaxia, aumenta secreção do antagonista do receptor de IL-1 (IL-1RA), diminui produção de ERO, inibe apoptose)	Dados não obtidos
IL-10	Citocina	CDw210 ou IL-10R (heterotetrâmero composto por 2 moléculas de IL-10R1 e 2 moléculas de IL-10R2)	JAK1, Tyk2, STAT3	Anti-inflamatório (aumenta secreção do antagonista do receptor de IL-1 - IL-1RA, inibe produção de citocinas, reduz a expressão de COX-	Membrana de grânulos específicos ou secundários

				2, diminui produção de ERO, induz apoptose)	
IFN- γ	Citocina	IFNR ou IFNGM	JAK, Tyk2 STAT1, Raf, MKK e ERK 1/2	Estimulação (rolamento, adesão frouxa, desgranulação, fagocitose, produção de ERO)	Dados não obtidos
IL-1 β	Citocina	Complexo estrutural em forma de receptor da superfamília das imunoglobulinas (IL-1RI ou CD121a + IL-1R AcP)	MyD88, IRAK1/2 e TRAF6, MKK3 e p38	Ativação (mudança de forma, adesão firme, quimiotaxia, desgranulação, produção de ERO, inibição de apoptose)	Dados não obtidos
IL-8	Quimiocina (citocina quimiotática)	CXCR1 (CD181) e CXCR2 (CD182) (Receptor de domínio serpentina transmembrana proteína G)	PLD, Rho, PI3K, PLC, PKC, MKK e ERK 1/2	Estimulação (rolamento, adesão frouxa, abertura de canais de Ca ⁺² , desgranulação, quimiotaxia, produção de ERO)	Dados não obtidos
fMLP	Quimiocina (citocina quimiotática)	FPR (Receptor de domínio serpentina transmembrana proteína G)	Rho, PLC β , PKC, PI3K, MKK e ERK 1/2, MKK3/6 e p38	Ativação (mudança de forma, adesão firme, quimiotaxia, desgranulação, produção de ERO)	Membrana de grânulos específicos ou secundários, membrana de grânulos terciários, membrana de vesículas secretórias
PAF	Quimiocina (citocina quimiotática)	PAFR (Receptor de domínio serpentina transmembrana proteína G)	PKC, PI3K, PLC β e γ , PLD, PLA ₂ , MKK3/6 e p38, MKK e ERK 1/2	Estimulação (adesão frouxa, rolamento, abertura de canais de Ca ⁺² , desgranulação, montagem de NADPH oxidase, quimiotaxia)	Dados não obtidos
C5a	Anafilatoxina, produto de degradação do sistema do complemento	C5aR ou CD88 (Receptor de domínio serpentina transmembrana proteína G)	PLC β , PI3K, PLA ₂ , PLD, PI3K, MKK e ERK 1/2	Estimulação (rolamento, adesão frouxa, quimiotaxia, desgranulação, geração de ERO)	Dados não obtidos
LTB ₄	Eicosanóide, metabólito sintetizado a partir de AA por 5-lipoxigenase ou 5-LO	BLTR1 (Receptor de domínio serpentina transmembrana proteína G)	PLC β , PKC, PLD, Raf, MKK e ERK 1/2	Estimulação (rolamento, adesão frouxa, quimiotaxia, desgranulação, geração de ERO)	Dados não obtidos
TNF- α	Citocina	p60 ou TNFR1 e p80 ou TNFR2 (ou CD120)	PI3K, PLC γ , PKC, PLA ₂ , TRADD, MKK e ERK 1/2, MKK 3/6 e p38, MKK	Estimulação (quimiotaxia, desgranulação, produção de ERO, apoptose – inibição	Membrana de grânulos específicos ou secundários

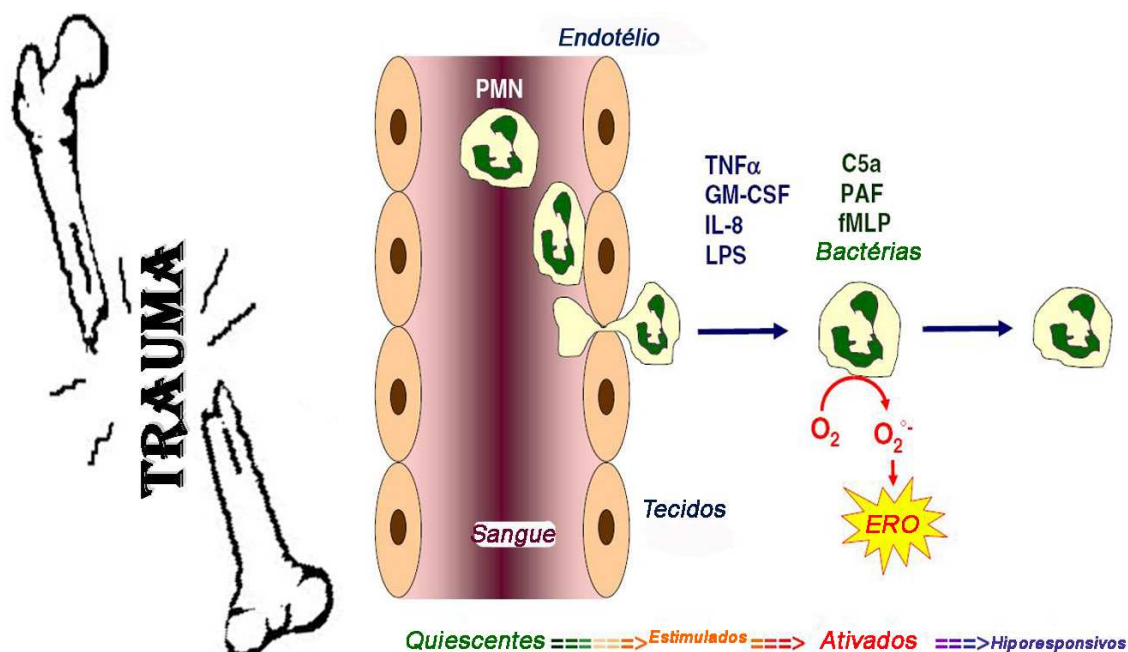
			4/7 e JNK 1/2	e indução)	
Fcγ	Estrutura, receptor da superfamília de imunoglobulinas	FcγRIII ou CD16, FcγRII ou CD32, FcγRI ou CD64	PLC, PI3K, PKC, MKK e ERK 1/2	Ativação (desgranulação, fagocitose, produção de ERO)	Membrana de vesículas secretórias
Selectina	Estrutura, receptor de adesão do tipo lectina	L-selectina ou CD62L ou LECAM-1, E-selectina ou CD62E ou ELAM-1 ou CD15, P-selectina ou CD62P ou GMP-140	SOS/Grb2, Rac, MKK e ERK 1/2, MKK3/6 e p38	Estimulação (adesão frouxa, rolamento, abertura de canais de Ca ⁺² , desgranulação)	Membrana de grânulos específicos ou secundários
Integrina	Estrutura, receptor de adesão	β ₂ -integrinas - LFA-1 (CD11a/CD18), Mac-1 ou CR3 (CD11b/CD18), gp150,95 (CD11c/CD18)	FAK, Src, PI3K, Rho, MKK e ERK 1/2, MKK3/6 e p38, MKK4/7 e JNK1/2	Ativação (mudança de forma, adesão firme, quimiotaxia, fagocitose, produção de ERO)	Membrana de grânulos específicos ou secundários, membrana de grânulos terciários, membrana de vesículas secretórias

Inicialmente pensava-se que o padrão para uma resposta do neutrófilo era a ativação completa. Apresentado a um estímulo apropriado, o neutrófilo que circulava no sangue seria atraído a um sítio de infecção e ativado totalmente. Esse processo envolveria a polarização morfológica da célula e subsequente quimiotaxia, fagocitose, produção de radicais tóxicos do oxigênio, e talvez liberação de enzimas granulares no meio extracelular. Mais tarde, estudos evidenciaram que a ativação não era um processo “tudo-ou-nada”. Esses estudos conduziram a conceitos complementares de ativação. Assim, atualmente, a ativação é reconhecida como um processo que ocorre em um gradiente contínuo, sendo observados dois estágios mais marcantes (**Mayadas et al., 2009**).

Os neutrófilos podem primeiramente encontrar um estímulo que não os ative totalmente, mas que os leve a um estado estimulado (processo também chamado de *priming*). Em algumas circunstâncias esses neutrófilos estimulados encontram um segundo estímulo apropriado, que pode induzir um estado completamente ativado. Portanto, pode ocorrer ativação quando a resposta funcional do neutrófilo a um estímulo é amplificada por exposição prévia da célula a um agente estimulatório. O agente estimulatório por si só

normalmente não promove uma resposta funcional notória, exceto quando está em elevadas concentrações (Swain *et al.*, 2002), fato que leva a célula diretamente do estado normal ao estado ativado. Além disso, também foi evidenciado que os neutrófilos estimulados podem retornar ao estado quiescente (Kitchen *et al.*, 1996). Porém, uma vez chegado ao estado ativado não há retorno ao estado de repouso. Apesar da simplificação vista na figura 1, diz-se que os neutrófilos podem ser observados em quatro estados distintos: quiescente (ou em repouso), estimulado, ativado (Swain *et al.*, 2002) e hiporesponsivo (El-Benna *et al.*, 2008).

Figura 1 – Os quatro estados funcionais do polimorfonuclear, didaticamente simplificados através de um exemplo de processo inflamatório pós-trauma.



Adaptado a partir de El-Benna *et al.*, 2008.

Logo após um evento traumático, uma resposta inflamatória aguda acontece, envolvendo efeitos localizados e sistêmicos. A resposta localizada começa quando o dano tissular e endotelial induz a formação de proteases plasmáticas (derivadas das cascatas das cininas, do complemento, e da coagulação), que levam à vasodilatação e ao aumento da permeabilidade vascular. Os neutrófilos e, posteriormente, os monócitos locomovem-se em direção ao sítio inflamatório. A ativação e a desgranulação dos polimorfonucleares, seguidas por ativação e desgranulação dos macrófagos,

levam à liberação de numerosos mediadores proinflamatórios, sendo que IL-1 β , interleucina-6 (IL-6), e TNF- α promovem efeitos sistêmicos. A resposta sistêmica inclui indução de febre, leucocitose com neutrofilia, catabolismo proteico, produção de corticosteroides (glicocorticoides) e estimulação à síntese, essencialmente em nível hepático, de numerosas outras proteínas – as proteínas de fase aguda. Estas apresentam uma função protetora ao organismo. As antiproteases (outro nome para os já conhecidos inibidores de proteases) previnem a ampliação do dano causado pela liberação de enzimas provenientes dos tecidos lesados e/ou das células fagocitárias (neutrófilos e macrófagos). A ceruloplasmina tem ação antioxidante expressiva (inativa espécies reativas de oxigênio, resultantes da intensa ativação de leucócitos). O fibrinogênio e a proteína C reativa auxiliam no reparo das injúrias teciduais **(Birolini, 1997)**.

Assim, na resposta de fase aguda, as proteínas podem ser divididas em *positivas* (aquelas que têm sua concentração aumentada) e *negativas* (aquelas cujas concentrações podem diminuir em até 25% após o início dessa resposta). Das proteínas cujos níveis decrescem nessas situações, o exemplo mais importante é a albumina **(Gabay and Kushner, 1999)**. As citocinas liberadas durante a resposta inflamatória funcionam como influenciadores da produção das proteínas de fase aguda. A IL-6, citocina com características tanto pró- quanto anti-inflamatórias **(Xing et al., 1998)**, é a principal responsável por este processo, e outras citocinas influenciam subgrupos de proteínas. Com relação às citocinas, as proteínas de fase aguda também podem ser divididas em 2 tipos. As proteínas de tipo I têm sua produção estimulada pelas citocinas primariamente originadas no início do processo inflamatório: IL-1 β , TNF- α e IL-6. Neste grupo estão incluídas a glicoproteína α 1-ácida, a proteína C reativa, e a proteína amilóide A do soro. As proteínas de tipo II compreendem o fibrinogênio, a haptoglobina, e as antiproteases α 1-antitripsina e α 1-antiquimiotripsina. As proteínas deste grupo são produzidas em resposta à atuação das proteínas da família IL-6 de citocinas, como a oncostatina M **(Moshage, 1997)**. As concentrações plasmáticas das proteínas de fase aguda são, em larga medida, dependentes do ritmo de sua produção em nível

hepático. As concentrações das proteínas do complemento e dos fatores da coagulação aumentam cerca de 50 a 100 vezes, ao passo que as antiproteases e a glicoproteína α 1-ácida aumentam em 3 a 5 vezes (**Gabay and Kushner, 1999**). A proteína C reativa e a proteína amilóide A do soro têm a particularidade de aumentar mais de 1000 vezes em relação aos seus valores basais e seu valor, em termos de concentração, depende apenas da velocidade de síntese (**Vigushin et al., 1993**).

A citocina IL-6 possui papéis paradoxais, na medida em que age como mediador pró-inflamatório quando o processo inflamatório torna-se crônico, ao promover a ativação de monócitos/macrófagos. Por outro lado, ela age como fator anti-inflamatório sobre os neutrófilos, durante a fase aguda (**Kaplanski et al., 2003**). Nos polimorfonucleares, a IL-6 inibe a produção de citocinas, a adesão, a quimiotaxia e a produção de ERO, promove aumento nos níveis do antagonista do receptor de IL-1 (IL-1RA), estimula a produção de inibidores de metaloproteinases, e inibe a apoptose (**Ward, 2006**). Um outro fator controlador das reações de fase aguda da inflamação é a citocina IL-10 (**Girndt et al., 2002**). Essa citocina, produzida por linfócitos T/B e monócitos/macrófagos, suprime a ativação de macrófagos, ao inibir sua habilidade de secretar citocinas pró-inflamatórias (**Ho and Moore, 1994**). Em neutrófilos, a IL-10 aumenta a secreção do antagonista do receptor de IL-1 (IL-1RA) (**Cassatella et al., 1994**), inibe a produção de citocinas (**Dang et al., 2006**), causa redução na expressão de cicloxigenase COX-2 (enzima envolvida na síntese de eicosanóides – mediadores inflamatórios – a partir de ácido araquidônico) (**Niuro et al., 1997**) e promove uma diminuição na produção de ERO (**Capsoni et al., 1997**).

Nos casos em que o organismo consegue eliminar o foco infeccioso ou naqueles em que o trauma não produziu lesões teciduais extensas, o processo inflamatório finaliza, com a atuação de fibroblastos para posterior reconstrução do tecido. Entretanto, nas situações em que o microrganismo causador de uma doença infecciosa sistêmica prolifera, resistente às tentativas de eliminação ou naquelas em que o grau de trauma é consideravelmente elevado, o processo inflamatório avança, em um ritmo cíclico e progressivo. Assim, a resposta

inflamatória pode ser encontrada mesmo em tecidos não atingidos pelo trauma ou pela infecção, dando origem à síndrome da resposta inflamatória sistêmica **(Teles, 2005)**.

IV. Integração das Respostas no Trauma

O trauma grave induz uma expressão sistêmica de mediadores proinflamatórios (PAF, LTB₄ (leucotrieno beta 4), IL-8, IL-6, IFN γ (interferon gama), C5a (fração 5a do sistema do complemento), entre outros) por linfócitos, monócitos/macrófagos, eosinófilos, basófilos, células endoteliais, e neutrófilos. Esses mediadores ativam as células endoteliais, e estimulam os polimorfonucleares circulantes para geração aumentada de O₂^{•-} e adesão aumentada ao endotélio de órgãos mais susceptíveis à injúria mediada pelos mesmos (**Botha et al., 1995**). A anatomia da circulação pulmonar e o fluxo relativamente lento do sangue existente nos capilares alveolares favorecem a retenção de neutrófilos no pulmão, o primeiro órgão a ser injuriado (**Windsor et al., 1993**). Sabe-se também que a linfa mesentérica, em casos de isquemia/reperfusão e trauma hemorrágico, contém fatores que promovem injúria de órgãos distantes do intestino, como os pulmões primeiramente, seguidos por rins, fígado e coração. Estudos investigativos dos mecanismos de indução de injúria pulmonar mostram que linfa mesentérica colhida após um trauma hemorrágico pode injuriar ou matar células endoteliais, aumentar a permeabilidade de monocamadas de células endoteliais, e ativar neutrófilos humanos (**Adams Jr et al., 2002**). Uma vez que a linfa mesentérica entra em contato com a circulação sanguínea na veia cava, o primeiro leito capilar encontrado pelos neutrófilos que entraram em contato com essa linfa é o pulmonar. Subsequentes insultos proinflamatórios, como aspiração de líquido de alguma cavidade, choque hemorrágico, ou procedimentos cirúrgicos secundários, promovem mais sequestro desses leucócitos nas áreas afetadas e mais ativação dos mesmos para aumento da liberação extracelular de O₂^{•-}. A injúria endotelial resultante leva a um ciclo vicioso: sequestro de neutrófilos – mais injúria endotelial – dano do órgão – falência. Diversos estudos têm documentado que os polimorfonucleares de pacientes severamente injuriados são estimulados para a liberação de O₂^{•-} durante os dois primeiros dias depois de um trauma grave. Entretanto, nos estágios finais de recuperação de traumas graves na região do tronco e de queimaduras, observaram-se uma inibição da

proliferação de células progenitoras de neutrófilos na medula óssea e uma reduzida capacidade de neutrófilos circulantes em liberar O_2^{\bullet} e em matar bactérias. Tais pacientes têm risco de desenvolver sepse. Baseado nessas observações clínicas, torna-se aparente que a oxidase dos polimorfonucleares, responsável pela liberação de O_2^{\bullet} em resposta à injúria, é um importante fator na determinação de dados clínicos e laboratoriais em pacientes que sofreram trauma grave ou queimadura (**Botha et al., 1995**).

Há muito tempo, o trauma é reconhecido como relevante fator de risco para ARDS e para MOF. A síndrome da angústia respiratória aguda é definida em função das alterações morfofuncionais do sistema respiratório e, na progressão deste quadro, ocorre falência de outros órgãos e sistemas, como fígado, aparelho gastrointestinal, coração, e rins. Essa falência múltipla dos órgãos compromete a homeostase e representa a principal causa de óbito que ocorre na fase tardia da evolução dos pacientes traumatizados tratados em unidades de terapia intensiva (**Fontes and Poggetti, 1996**). Assim, após o reconhecimento de que insultos não infecciosos ou infecciosos podem provocar uma resposta fisiológica equivalente, o termo SIRS foi criado. Adicionalmente, o termo *sepse* é reservado para situações em que SIRS existe na presença de uma fonte identificável de infecção (**Ho and Moore, 1994**). A partir do momento em que SIRS escapa à auto-regulação do organismo, começa a haver lesão de órgãos inteiros (inicialmente dos pulmões, quando alcança-se o quadro de ARDS). Um sistema de avaliação de MOF utiliza, para quantificá-la, a soma de valores atribuídos às quatro funções orgânicas mais comumente comprometidas na evolução dos pacientes traumatizados (respiratória, renal, hepática, cardíaca), avaliadas simultaneamente. Considera-se em MOF o paciente para o qual tal soma é maior ou igual a 4. A falência pulmonar, na forma de ARDS, constitui evento invariavelmente presente no desenvolvimento de MOF em pacientes traumatizados. O grau de ARDS é obtido pela soma dos seguintes valores: a- achados de exames radiológicos; b- hipoxemia: pressão arterial de oxigênio / fração de oxigênio inspirado; c- ventilação / minuto; d- pressão expiratória final positiva; e- complacência pulmonar estática. As variáveis, representantes das demais disfunções orgânicas, utilizadas para a quantificação de MOF são: creatinina sérica (disfunção renal); bilirrubina sérica

(disfunção hepática); e dose de inotrópicos em uso pelo paciente (disfunção cardíaca). A quantificação de MOF é habitualmente realizada após as primeiras 48 horas da admissão do paciente à UTI (após essas 48 horas, os distúrbios são irreversíveis) **(Fontes and Poggetti, 1996)**.

Apesar do crescente conhecimento acerca dos mecanismos patogênicos que contribuem para a manifestação da disfunção de múltiplos órgãos, o monitoramento clínico é, em geral, principalmente baseado em parâmetros que permitem a determinação de SIRS e sistemas de escore que descrevem disfunção orgânica (APACHE, escore de MOF segundo Goris e colaboradores) **(Goris et al., 1985; Knaus et al., 1985)**. Sauaia e colaboradores **(Sauaia et al., 1994)** propõem alguns determinantes prognósticos para a manifestação da disfunção e falência orgânica pós-traumática: Escore de Severidade da Injúria ou ISS > 25 pontos, idade \geq 55 anos, requerimento inicial de > 6 unidades de hemocomponentes dentro do período de 12 horas, lactato sanguíneo > 2.5 mmol/L (12 a 24 horas), e excesso de base < -8 mmol/L (0 a 12 horas). Apesar desses 5 critérios serem frequentemente preenchidos em pacientes severamente traumatizados, a predição da subsequente disfunção de múltiplos órgãos ainda parece difícil, de indivíduo para indivíduo. Então, há substancial interesse clínico em desenvolver parâmetros que estejam disponíveis em um período de tempo razoável, permitindo um monitoramento confiável de inflamação pós-traumática e predizendo, com certa probabilidade, o desenvolvimento de disfunção orgânica pós-traumática.

V. Diagnóstico Laboratorial Preditivo para SIRS, ARDS e MOF

Apenas um número limitado de marcadores inflamatórios estão geralmente disponíveis para o uso clínico diário. Como indicador de ativação granulocitária, a elastase de neutrófilos circulantes tem sido reportada como elevada logo após um trauma (**Nast-Kolb et al., 1992; Uhl et al., 1995**). Além disso, a concentração sanguínea de lactato foi repetidamente sugerida como um indicador de hipóxia tissular e pareceu ser preditiva quanto ao desenvolvimento de ARDS e MOF após um trauma (**Abramson et al., 1993; Roumen et al., 1993**). Resultados controversos foram encontrados com respeito à proteína C reativa, um reagente de fase aguda, que é largamente usado como um marcador inespecífico de inflamação (**Ensenauer et al., 1994; Uhl et al., 1995; Waydhas et al., 1992**). Alguns estudos reportaram que os valores prognósticos de proteína C reativa, elastase e lactato foram comparáveis e até mesmo mais úteis que o ISS ou outros sistemas de escore para prever consequências fisiológicas e falência orgânica de vítimas de trauma (**Nast-Kolb et al., 1992**). O sistema de escore ISS simboliza a severidade da injúria anatômica em pacientes politraumatizados por meio de uma escala numérica de 0 a 75 (**Baker et al., 1974**). É considerado trauma grave o quadro clínico de um paciente que obteve resultado > 15 neste sistema de escore, baseado na soma de pontuações por múltiplas injúrias (**Llullaku et al., 2009**).

De acordo com o entendimento atual de mecanismos de inflamação sistêmica após um trauma, a determinação sanguínea de TNF- α , IL-1 β , IL-6, ou IL-8 poderia ser útil para o monitoramento clínico. Entretanto, os esforços para quantificar TNF- α como parâmetro clínico têm sido mal sucedidos devido à ocorrência altamente variável e inconsistente de TNF- α na corrente sanguínea. A correlação de concentrações plasmáticas de TNF- α com injúria tissular, MOF, ou consequências fisiológicas em pacientes politraumatizados não foi encontrada (**Cinat et al., 1994; Pellegrini et al., 1996**). Ao contrário, resultados promissores têm sido reportados com dois receptores solúveis de TNF- α , TNFR1 (60 kDa) e TNFR2 (80 kDa), que são parte de um sistema fisiológico de

regulação para TNF- α (**Cinat et al., 1994; Schroder et al., 1995**). Em uma série de estudos, os receptores de TNF- α estiveram constantemente aumentados após um trauma grave ou sepse e tal aumento poderia estar relacionado a complicações como hipóxia, infecção e outras consequências fisiológicas (**Cinat et al., 1994; Ertel et al., 1995; Schroder et al., 1995**).

IL-6 é produzida por macrófagos, linfócitos, células mesenquimais e endoteliais e é um importante promotor da resposta hepática de fase aguda (**Gauldie et al., 1992**). A quimiocina IL-8 tem efeitos potentes na quimiotaxia e expressão de moléculas de adesão nos leucócitos. De forma interessante, IL-6 e IL-8 têm sido repetidamente mostradas como aumentadas em pacientes injuriados durante as primeiras 24 horas e permanecem elevadas por diversos dias após um trauma grave. Um estudo sugere que a elevação da IL-6 tem sido associada com elevação da mortalidade na presença de sepse (**Patel et al., 1994**). Outra série de estudos clínicos sugeriu que concentrações plasmáticas aumentadas de IL-6 e IL-8 foram compatíveis com o desenvolvimento de disfunção pulmonar, MOF e piores consequências fisiológicas (**Hoch et al., 1993; Meduri et al., 1995; Partrick et al., 1996**). Ainda em outro trabalho, com necessidade de subseqüentes comprovações, foi sugerido que níveis séricos de IL-6 e procalcitonina (glicoproteína sintetizada em alguns tecidos a partir de contato com IL-6 e TNF- α) poderiam ser úteis na indicação precoce de sepse e MOF em pacientes politraumatizados (**Haasper et al., 2010**).

O trabalho de Frank e colaboradores (**Frank et al., 2002**) avaliou a associação desses mediadores inflamatórios com o desenvolvimento de MOF em uma análise diária desses elementos. Os resultados desse estudo mostraram que tais mediadores possuem uma correlação fraca ou moderada com o escore de MOF. A predição do desenvolvimento de MOF com base nos mediadores sistêmicos proteína C reativa, elastase de neutrófilos, lactato, IL-6, IL-8, TNFR1 e TNFR2 é, em geral e em particular, individualmente ineficaz. A razão para essa baixa correlação pode ser devida à heterogeneidade dos pacientes politraumatizados, em relação à severidade e ao tipo de injúria, além de seus padrões individuais de resposta imunológica. Somados a isso, outros

fatores como idade, sexo e doença preexistente podem causar consideráveis variações entre indivíduos **(Bone, 1996)**. Agentes terapêuticos como transfusões de concentrado de hemácias e de plasma fresco congelado, e cirurgia secundária podem alterar as concentrações plasmáticas dos mediadores inflamatórios.

Apesar dos mediadores inflamatórios possuírem boa correlação com o processo inflamatório em pacientes vítimas de lesões severas, seus valores permanecem limitados quanto à predição do desenvolvimento e grau de falência de múltiplos órgãos. Uma análise proteômica de células estreitamente relacionadas com inflamação e dano tissular poderá trazer respostas em relação aos quadros de SIRS, ARDS e MOF observados após traumas severos.

Com o advento do Projeto Genoma Humano e das novas tecnologias em Proteômica, tem-se uma expectativa bastante otimista no que diz respeito ao detalhamento molecular e à compreensão dos balanços de ativação/repressão, transcrição/tradução e das diversas possibilidades de splicing e modificações pós-traducionais de genes participantes de importantes fenômenos em que há envolvimento de neutrófilos, descritos anteriormente. Até o presente momento, diversas análises eletroforéticas com neutrófilos já foram realizadas e relatadas na literatura. Entre elas, encontram-se vários estudos em que os polimorfonucleares utilizados poderiam pertencer tanto a seres humanos quanto a outros mamíferos, desde camundongos e ratos a bovinos e marsupiais. Assim, vários experimentos proteômicos identificaram proteínas de superfície, alcalinas e ácidas, de neutrófilos de ratos **(Watt and Burgess, 1981)**. Em 2002, o mapa proteômico de neutrófilos quiescentes de camundongos foi descrito, e suas proteínas foram parcialmente identificadas **(Piubelli et al., 2002)**. Em seres humanos também é encontrado um vasto número de estudos nessa área. Em alguns deles, a realização da eletroforese bidimensional e a análise de certas proteínas poderá vir a ser de extrema valia para a descoberta de tratamentos a serem usados na neutropenia severa crônica **(Kasper et al., 1997)** e na doença de Behçet **(Yamashita et al., 2000)**. Também já foi realizado um estudo eletroforético relacionando a importância

dos íons cálcio na secreção de proteínas pelo neutrófilo ativado por ionomicina **(Boussac and Garin, 2000)**. Além disso, já foram descritos experimentos realizados em neutrófilos humanos envolvendo Transcriptômica e Proteômica. Nesses estudos, essas ferramentas foram usadas para descrever a análise e a parcial identificação de proteínas expressas pelo neutrófilo ativado com LPS **(Fessler et al., 2002a; Fessler et al., 2002b)**. A equipe de trabalho na qual se insere o presente trabalho também tem contribuído para o crescente desenvolvimento de descobertas nessa área, quando descreveu o primeiro mapa proteômico referência para neutrófilos humanos quiescentes **(Castro et al., 2006)**. Além desse trabalho, outras análises proteômicas comparativas acrescentaram informações a respeito das funções neutrofílicas, quando da sua ativação por PMA (um análogo do diacilglicerol) **(Santos, 2007)**, quando da sua estimulação por fator ativador de plaquetas (PAF) **(Aquino, 2007)** e quando da sua ativação por peptídeos formilados da parede bacteriana de Gram positivas (fMLP) **(Neves, 2010)**. Um outro trabalho da equipe, finalizado em 2007, tem proporcionado a base para um novo leque de opções de análise, no uso de citometria de fluxo para relacionar resultados de proteômica às funções metabólicas do polimorfonuclear (citômica) **(Campos, 2007)**. Em 2009, um outro grupo de pesquisa em proteômica de neutrófilos reportou o encontro de mais informações acerca das proteínas expressas por esta célula em seu estado de repouso **(Tomazella et al., 2009)**.

VI. Análise Proteômica

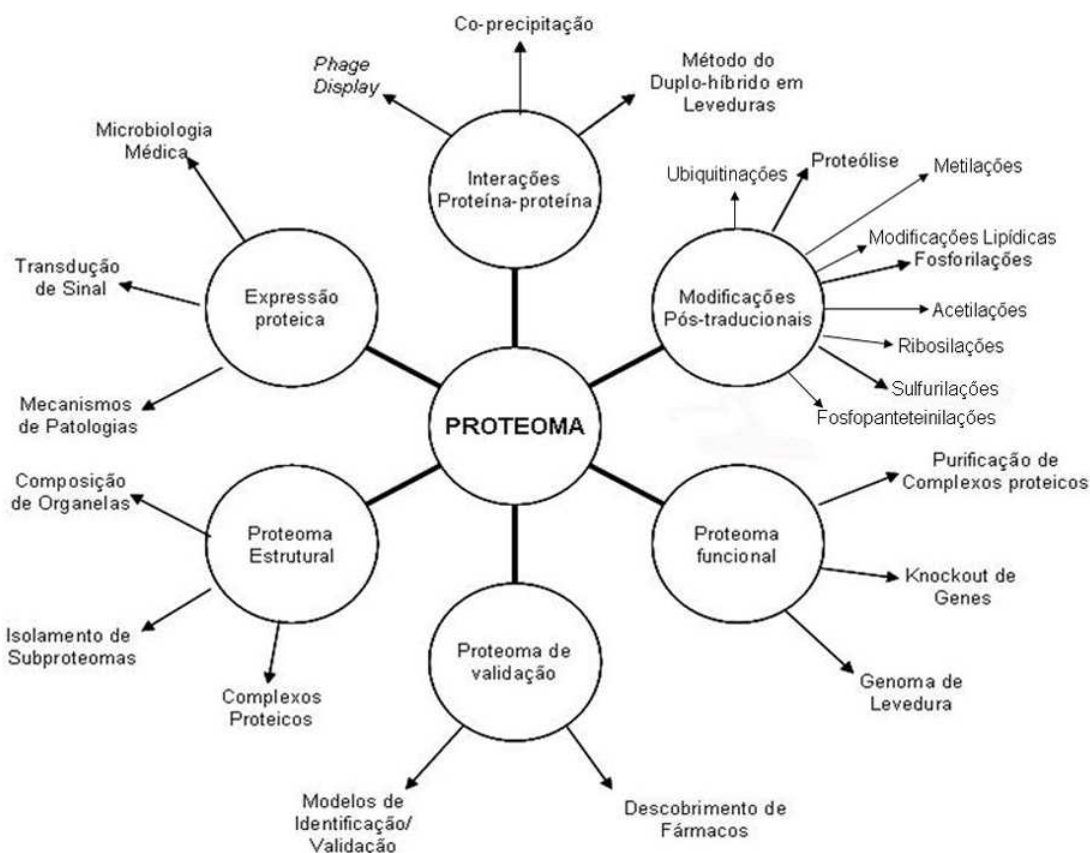
O termo *proteoma* surgiu por volta de 1995, definido como a caracterização e determinação em larga escala das proteínas presentes em um determinado tipo de célula, tecido ou organismo (**Wilkins et al., 1996**). Ele refere-se à análise das proteínas complementares de um genoma (**Pandey and Mann, 2000**), incluindo a determinação dos aminoácidos que constituem as sequências proteicas, suas modificações pós-traducionais e estruturais, além do caminho funcional que essas moléculas desempenham no sistema biológico em análise (**Vlahou and Fountoulakis, 2005**). O estudo das proteínas presentes em um organismo apóia-se em dois fatores principais: a) dependendo do organismo, apenas uma parte da sequência do genoma está correlacionada às suas funções biológicas; b) há baixa relação entre a abundância de RNA mensageiro (mRNA) e o nível de proteínas não modificadas presentes em uma célula (**Anderson and Seilhamer, 1997; Cristea et al., 2004**).

Desde a elucidação do genoma completo de vários organismos, especificamente o genoma humano em 2002, houve um reconhecimento maior de que somente os dados gênicos não são suficientes para responder todas as questões a respeito dos mecanismos que cercam os mais variados tipos de patologias animais e vegetais (**Aldred et al., 2004**). A partir de então vários grupos científicos têm fundamentado seus estudos nas mudanças sofridas pelas proteínas expressas pelo genoma. Logo a análise proteômica experimentou um rápido e vertiginoso crescimento, pois além de examinar a presença ou ausência de uma determinada proteína, ela é capaz de prover dados fundamentais para o entendimento dos vários fenômenos que ocorrem em uma célula, como mudanças pós-traducionais (**Anderson and Anderson, 1996**), *splicing* alternativo de transcrições primárias, presença de polimorfismos na sequência e outros mecanismos de processamento e translocação de proteínas (**Jensen, 2006; Walsh et al., 2005**). Inúmeros proteomas consistem em milhares de proteínas, sendo que nem todas são expressas ao mesmo tempo. Em termos fisiológicos, diversas mudanças ocorrem dentro de uma

célula em determinado momento, por isso torna-se inviável definir um proteoma como um retrato estático, característico dos genomas. Na análise proteômica, busca-se uma imagem temporal de uma organela, célula, tecido, organismo ou fluido biológico, a partir do estudo das proteínas presentes no sistema, considerando-se para tal, as condições onde o sistema está submetido. A combinação de diferentes técnicas de biologia molecular, bioquímica e bioinformática na abordagem de fatores como função e localização de proteínas, e suas interações / modificações, torna-se indispensável na elaboração de uma imagem integrada do sistema em análise. O objetivo não é apenas identificar as proteínas do sistema biológico, mas também criar um modelo para melhor compreensão do funcionamento desse sistema.

Graves e Haystead (**Graves and Haystead, 2002**) redefiniram o termo proteoma ao compararem as informações obtidas de um genoma e as informações obtidas a partir de um mapa proteômico. Os referidos autores concluíram que a combinação de estudos entre genoma e proteoma contribuirá na elucidação de mecanismos de algumas patologias e efeitos do meio ambiente na fisiologia do sistema biológico. Assim, proteoma pode ser qualificado como o resultado da expressão de um conjunto de genes e das modificações pós-traducionais das proteínas produzidas em resposta a condições ambientais pré-definidas. Muitas áreas de estudo de sistemas biológicos estão agrupadas a partir do tema proteoma, resumidos na figura 2. Essas áreas englobam estudos de interações proteína-proteína, modificações pós-traducionais, purificação de complexos proteicos e composição estrutural de organelas.

Figura 2 – Proteoma e sua aplicação em ciências biológicas.



Adaptado a partir de Graves e Haystead, 2002 e Walsh *et al.*, 2005.

Várias estratégias são usadas na análise proteômica de uma amostra biológica. As técnicas mais difundidas são a eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida (2D-PAGE) e a cromatografia líquida de alta eficiência, acopladas à espectrometria de massa, seja para a obtenção de padrões de massas de peptídeos (*peptide mass fingerprinting*, PMF) ou a correspondente sequência de aminoácidos pela fragmentação de peptídeos obtidos por prévia digestão enzimática (**Aebersold and Mann, 2003**). A análise espectrométrica de proteínas e peptídeos pode ser realizada através de técnicas diferentes de ionização, sendo duas as mais frequentes. A ionização a laser da amostra em um suporte excitável com analisador por tempo de voo (*matrix assisted laser desorption mass spectrometry – time-of-flight*, MALDI-TOF MS) ou por eletropulverização e ionização da mesma em um capilar submetido a alta voltagem (*electrospray ionization mass spectrometry*, ESI-MS) (**Fenn *et al.*, 1989; Karas and Hillenkamp, 1988**).

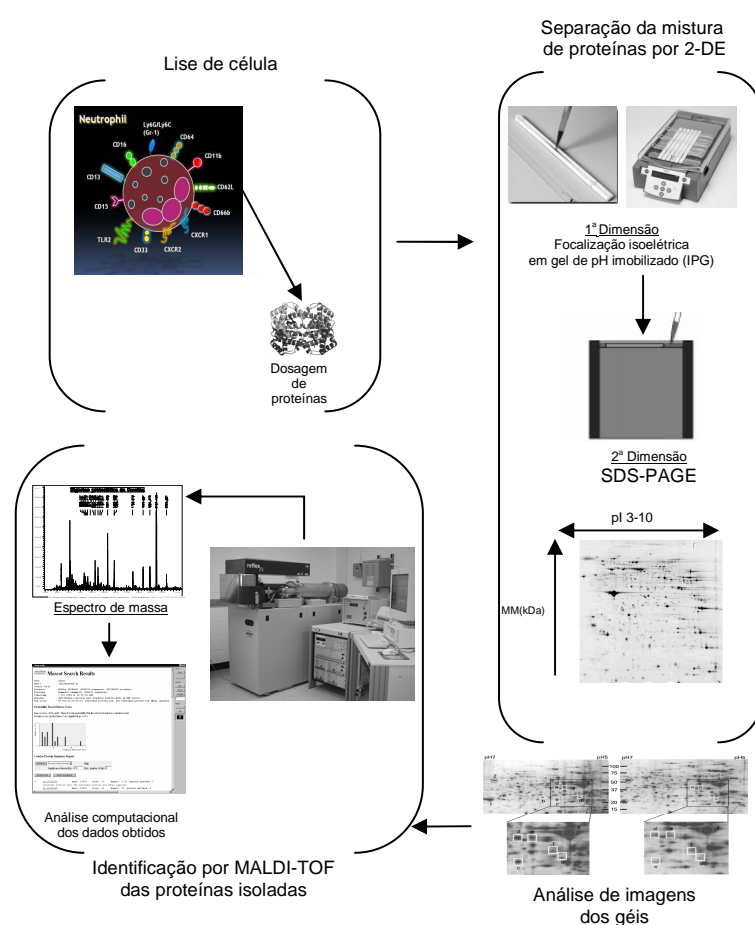
VII. 2D-PAGE, MALDI-TOF e MALDI-TOF/TOF

A eletroforese bidimensional (2D-PAGE) tem sido a plataforma preferida para a separação de proteínas anterior à análise por espectrometria de massa. Nela, as proteínas são separadas de acordo com o ponto isoelétrico e a massa molecular (**O'Farrell, 1975**). A popularidade dessa técnica aumentou quando géis contendo anfólitos imobilizados na malha de poliacrilamida (*immobilized pH gradient, IPG gel*) começaram a ser comercializados, superando a baixa reprodutibilidade inerente às separações realizadas com anfólitos de livre migração no gel durante a isoeletrofocalização (IEF). As principais limitações da 2D-PAGE referem-se à pouca representação de proteínas de alta massa molecular, proteínas hidrofóbicas e proteínas existentes em número reduzido de cópias por célula (**Gygi et al., 2000**), além da dificuldade para obter padrões eletroforéticos reprodutíveis para proteínas com pontos isoelétricos muito alcalinos (**Hoving et al., 2002**). O pré-fracionamento da amostra (**Gorg et al., 2002; Locke et al., 2002**), a diminuição da concentração da malha dos IPG (**Bruschi et al., 2003; Candiano et al., 2002**), assim como a diminuição do efeito eletroendosmótico em géis alcalinos (**Hoving et al., 2002**) têm aliviado substancialmente essas restrições.

Os mapas peptídicos resultantes da análise por espectrometria de massa tipo MALDI-TOF de um digesto trípico de interesse, permitem a identificação quando comparados com os mapas peptídicos de proteínas digeridas teoricamente (*in silico*), presentes nas bases de dados (**Henzel et al., 1993; Pappin et al., 1993**). Por outro lado, a fragmentação de peptídeos para obter sequências internas de aminoácidos pode ser realizada através da colisão com um gás inerte (CID ou dissociação induzida por colisão) (**Aebersold and Goodlett, 2001**) ou pela fragmentação espontânea em nível de ligações peptídicas e cadeias laterais dos aminoácidos após aceleração dos peptídeos ionizados a laser (*post source decay, PSD*). Nesses experimentos, utilizam-se geralmente equipamentos do tipo MALDI-TOF/TOF ou ESI-Q/TOF. Esse mecanismo gera espectros que podem ser interpretados para obter sequências *de novo* ou pelo uso direto destes (espectros obtidos por MS/MS) contra bases

de dados de onde possam ser gerados os espectros de fragmentação teóricos para todos os peptídeos com massas semelhantes àsquelas determinadas no ensaio (Eng *et al.*, 1994). A figura 3 mostra um esquema de análise proteômica, pelo uso de eletroforese bidimensional e espectrometria de massa do tipo MALDI-TOF.

Figura 3 – Exemplo de separação, análise e identificação de proteínas por eletroforese bidimensional (2D-PAGE), acoplada a espectrometria de massa (MALDI-TOF).



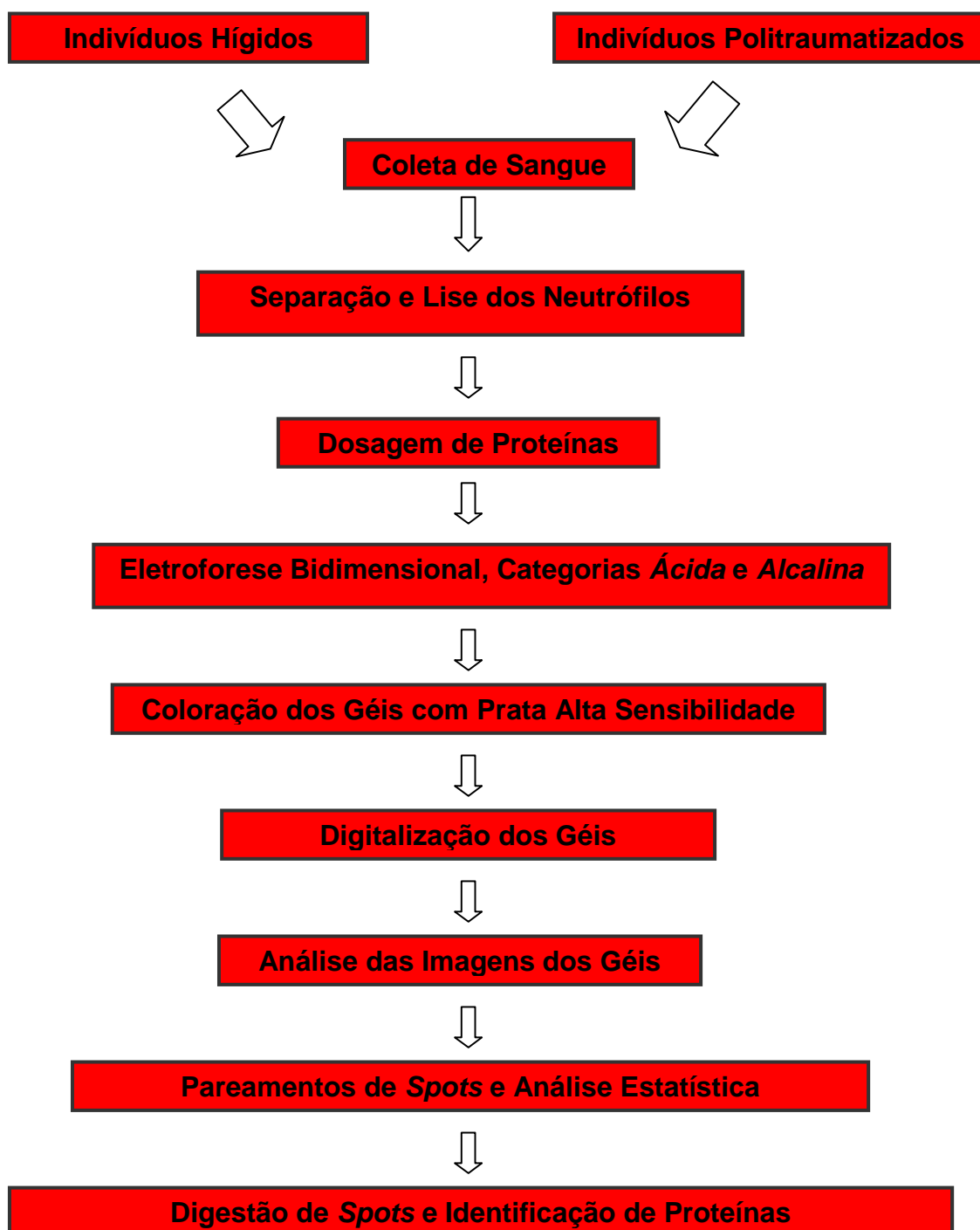
As proteínas de interesse são obtidas após lise celular. A mistura de proteínas resultante é submetida à dosagem e à purificação por eletroforese bidimensional (1ª dimensão corresponde à isoeletrofocalização; 2ª dimensão corresponde a um SDS-PAGE). Após purificação, as proteínas são analisadas como imagens de géis em programas computacionais específicos. E finalmente, são submetidas isoladamente à espectrometria de massa para posterior identificação em outros programas especializados.

2) **Objetivos:**

O objetivo principal deste trabalho é identificar de proteínas, possíveis marcadores moleculares, de neutrófilos, para situações onde os mesmos encontram-se ativados, como observado em consequência de um trauma grave.

3) Metodologia:

I. Esquema Experimental



II. Preparação das Amostras

Neutrófilos humanos foram obtidos a partir de coleta de sangue de três doadores voluntários que não possuíam histórico de doenças crônicas, não apresentaram doença inflamatória recente, e não estavam em uso de medicamento nos últimos 60 dias que precederam à punção venosa. As mesmas células também foram obtidas a partir de coleta de sangue de três indivíduos hospitalizados no HCFMUSP com trauma torácico e/ou abdominal grave. A coleta de sangue dos pacientes foi realizada em até 24 horas após o evento traumático em virtude da compreensão de que os polimorfonucleares circulantes são ativados dentro das primeiras 24 horas após o trauma e, depois de 48 horas, tornam-se hiporesponsivos (**Botha et al., 1995**). O índice de severidade de injúria anatômica – ISS – dos pacientes foi 29. Os indivíduos, doadores e pacientes, tinham idade variando entre 25 e 45 anos, e consistiram de dois homens e uma mulher, para cada grupo. O projeto de pesquisa foi aprovado pelos comitês de ética do HC-FMUSP e da UnB, antes de doadores e pacientes serem contactados. A coleta de sangue de todos os indivíduos foi realizada por aspiração suave, para evitar a ativação artefactual por choque mecânico nos neutrófilos. As seringas usadas para as coletas foram heparinizadas na concentração de 5 UI/ml, para evitar a coagulação sanguínea e inibir artefatuais processos de desgranulação e adesão dos neutrófilos (**Brown et al., 2003**).

III. Separação e Lise dos Neutrófilos

A separação dos neutrófilos foi realizada por meio de centrifugações utilizando gradientes de densidade de 60% e 70% de *percoll* (Amersham Biosciences). O *percoll* é um composto de partículas de sílica, inerte, não tóxico, que não adere às membranas celulares, sendo adequado para purificação de células e organelas (**Haslett et al., 1985**). A fração contendo neutrófilos foi lavada em HBSS e, subsequentemente, em água para lise das hemácias residuais. A osmolaridade foi restabelecida pela adição de PBS CaCl₂ 0,9 mmol e MgCl₂ 0,5 mmol. Uma pequena alíquota foi retirada para contagem celular e análise de viabilidade em microscópio óptico. Os processos de purificação foram realizados em temperatura ambiente para evitar ativação (**Glasser and Fiederlein, 1990**), exceto a etapa dos gradientes de densidade.

As amostras, contendo 2×10^7 células/ml (98% de neutrófilos e 99% viáveis), foram imediatamente submetidas a um tampão de lise (7M Ureia, 2M Tiourea, 1% (v/v) Triton X-100, 0,5% (v/v) Pharmalyte 4-7 e 6-11, 65 mmol/l DTT). Esse tampão é uma solução usada para promover lise celular e de organelas, e também para solubilizar grande parte das proteínas. O rompimento dos compartimentos intracelulares dos neutrófilos pode levar à proteólise e assim gerar *spots* artefatuais nos géis, que corresponderiam na verdade a produtos de clivagem proteolítica. Por isso, a proteólise deve ser evitada pela adição de nucleases e inibidores de proteases a esse tampão. O processo de lise celular transcorreu sob 2 horas de agitação, a 37 °C, e, depois da solubilização das proteínas, a solução foi congelada em freezer a -80 °C até a etapa de separação eletroforética.

Algumas considerações importantes devem ser ressaltadas quanto às etapas de separação e lise dos neutrófilos:

- a) Todos os frascos utilizados foram de material estéril, livre de contaminantes, e plástico, já que o vidro pode ativar os neutrófilos.
- b) Os tubos que apresentaram dificuldade na ressuspensão do *pellet* foram

descartados, pois isso foi indicativo de aglomeração e ativação de células *in vitro*.

c) Com exceção do *percoll*, todas as soluções foram mantidas a 20 °C, para evitar choque térmico no momento do contato com as células. O *percoll* precisa estar a 4 °C para manter uma relação de densidade adequada com as células, permitindo sua separação.

IV. Eletroforese Bidimensional em Gel de Poliacrilamida

Os extratos proteicos dos neutrófilos foram sujeitos à quantificação baseada no método de Bradford (**Bradford, 1976**), adaptado por Ramagli para compatibilidade com o tampão de lise (**Ramagli, 1999**). As amostras diluídas em tampão de lise de pH 4-7, para cada grupo de neutrófilos, normal (doadores) e trauma (pacientes), foram usadas para confecção dos géis ácidos. As amostras diluídas em tampão de lise de pH 6-11, para cada grupo de neutrófilos, normal (doadores) e trauma (pacientes), foram usadas para confecção dos géis alcalinos. Foram realizadas triplicatas experimentais e biológicas, de forma que para cada um dos três indivíduos de cada grupo foram realizados experimentos em triplicada tanto para a faixa ácida quanto para a faixa alcalina.

* Isoeletrofocalização ácida: 350 µl de amostra em tampão de lise, contendo 0,14 µg de proteínas por microlitro de solução, foram aplicados em géis de IPG de 18 cm de comprimento (*strips*), com um intervalo linear de pH de 4-7 (Amersham Biosciences) e submetidos à IEF em IPG-Phor (Amersham Biosciences, UK) (**Gorg et al., 2000**).

⇒ Depois de 12 h de reidratação, houve a focalização das proteínas de pl ácido usando as seguintes configurações no IPG-Phor: de 0 a 500 V para atingir 500 Vh (*gradient*), 3500 V para 3500 Vh (*gradient*), e 8000 V para 40000 Vh (*step and hold*). O processo ocorreu sob refrigeração a 20 °C e com corrente limite de 75 µA por *strip*.

* Isoeletrofocalização alcalina: 250 µl de amostra em tampão de lise, contendo 0,4 µg de proteínas por microlitro de solução, foram aplicados em géis de IPG de 18 cm de comprimento (*strips*), com um intervalo linear de pH de 6-11 (Amersham Biosciences) e submetidos à IEF em MULTI-Phor (Amersham Biosciences, UK) (**Sabouchi-Schutt et al., 2000**).

⇒ Os *strips* 6-11 foram separadamente reidratados por 10 h em um volume de 350 µl de tampão de reidratação. Ao final deste período, as amostras foram

diluídas em uma solução (250 µl de volume final) contendo 10% de isopropanol, 85 mmol de DTT, e 2,5% de Triton-X 100. A seguir, foram submetidas à agitação por 2 h e centrifugadas (14000 rpm; 15 min.). Assim, o sobrenadante das amostras foi aplicado à parte anódica do strip no MULTI-Phor. A focalização das proteínas de pl alcalino aconteceu sob refrigeração a 20 °C usando as seguintes configurações no MULTI-Phor: 150 V por 150 Vh, 300 V por 600 Vh, 600 V por 1200 Vh, e 3500 V por 40250 Vh (todos em *step and hold*).

Depois de focalizados, todos os *strips* foram submetidos a um processo de redução e alquilação das proteínas, em soluções contendo 125 mM de DTT e 300 mM de acrilamida, respectivamente. A SDS-PAGE foi realizada em géis 12% T de poliacrilamida, em um sistema Protean II (BioRad Hercules, CA, USA). Esta segunda dimensão ocorreu a 25 mA por gel, sob refrigeração a 20 °C, até o azul de bromofenol sair pela parte final do gel (**Westermeier et al., 2008**). As proteínas foram visualizadas por uma coloração de prata amoniacal, de alta sensibilidade. Especificamente, os géis foram fixados em TCA 12% (p/v) e metanol 50% (v/v) por 1 h, seguida por outra etapa de incubação por 1 h em ácido acético 12% (v/v) e etanol 50% (v/v). Depois de duas lavagens, de 5 min, em água milli Q, os géis foram incubados em uma solução contendo AgNO₃ 0,89% (p/v), NH₃ 0,3% (v/v) e NaOH 0,08% (v/v) por 20 min., seguida por uma outra etapa de lavagem de 5 min. em água milli Q. A revelação das proteínas foi obtida pela incubação dos géis em ácido cítrico 0,017% (p/v) e formaldeído 0,236% (v/v). Essa reação foi finalizada após incubação dos géis em solução contendo etanol 30% (v/v), ácido acético 7% (v/v) e glicerol 2,5% (v/v).

É importante ressaltar que os géis ácidos de neutrófilos quiescentes foram confeccionados previamente, a partir de outros trabalhos do grupo de pesquisa onde se inclui o presente estudo.

V. Análise de Imagens

Ao todo, trinta e seis géis foram confeccionados. Para cada uma das duas categorias de isoelectrofocalização, dezoito géis corados (nove para o grupo *quiescente* – *doadores normais* e nove para o grupo *ativado* – *indivíduos politraumatizados*) foram digitalizados com o *scanner* Magic Scan 32 V4.6 (Amersham Biosciences, UK). As imagens em formato tiff geradas com resolução de 300 dpi foram analisadas pelo *software* Image Master Platinum, versões 5 e 6 (SIB/GeneBio/GE Healthcare). Foi aplicada a cada gel a detecção automática de *spots*, seguida pela edição manual quando necessária. A detecção automática dos *spots* foi realizada com 5 *landmarks* bem definidos e distribuídos uniformemente em cada gel. Para cada grupo, um gel *master* foi selecionado dentre os nove géis (correspondendo à triplicata de três amostras), para cada uma das duas categorias de pontos isoelétricos. Duas etapas de pareamento foram realizadas pelo programa, com o intuito de detectar a variação da porcentagem do volume de cada *spot* (análise de expressão diferencial).

Figura 4 – Rede de pareamentos realizados para a categoria alcalina.

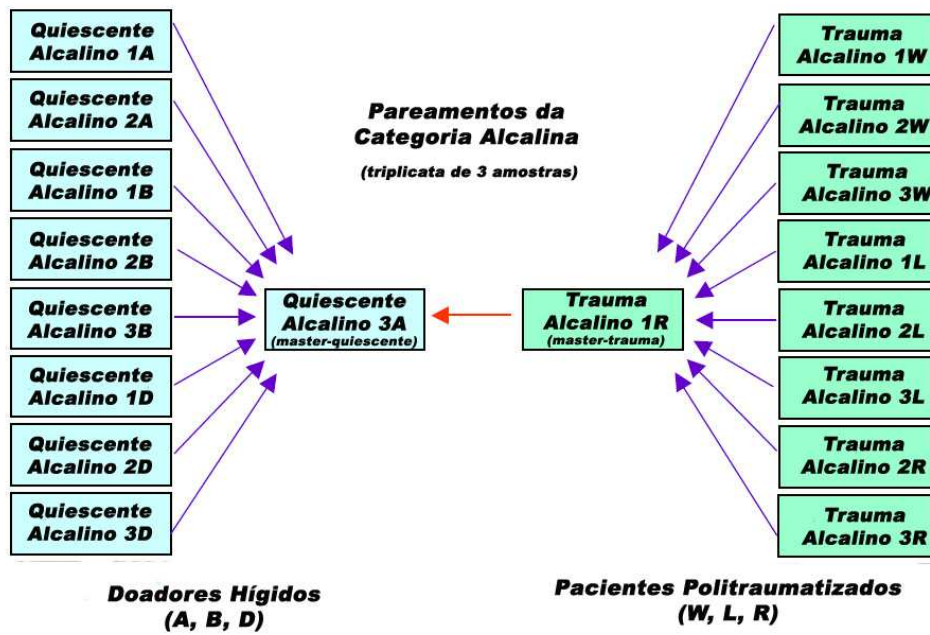
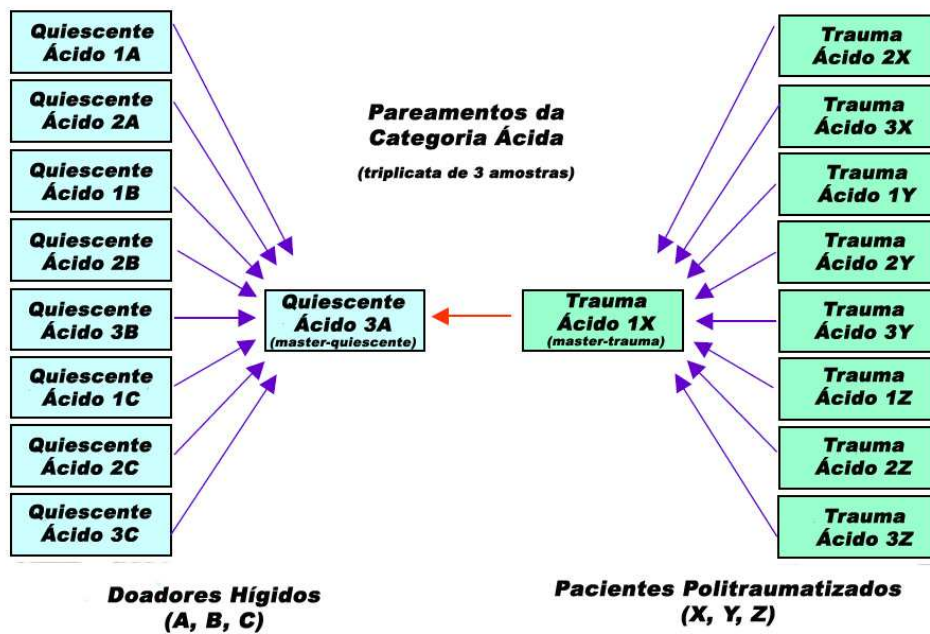


Figura 5 – Rede de pareamentos realizados para a categoria ácida.



VI. Análise Estatística

Os dados obtidos, através do programa Image Master, sobre a porcentagem de volume de cada *spot* de todos os géis foram agrupados/tabelados em “Quiescente” e “Trauma” no programa SPSS® 13.0, e permitiram a realização de cálculos estatísticos.

Considerando o volume normalizado dos *spots* dos géis produzidos (9 géis de neutrófilos quiescentes e 9 géis de neutrófilos ativados, tanto para a categoria ácida quanto para a alcalina), foi feito o teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov, que verificou a distribuição da frequência amostral como gaussiana, com $p \geq 0,05$. Para a realização desse teste levaram-se em consideração os critérios: médias dos *spots*, simetria da curva de Gauss e proporção altura x largura da curva (**Gerstman, 2008**).

Em seguida, aplicou-se o teste t de Student, para os dados que apresentaram uma distribuição normal. O teste t de Student, também conhecido como teste t para amostras independentes, baseia-se na comparação das médias de duas populações independentes quando os desvios padrões populacionais são desconhecidos. Este teste permite avaliar se as diferenças entre as médias das duas condições experimentais são realmente significativas e não aleatórias. A recomendação para o uso do teste t para amostras independentes é que os dados tenham uma distribuição gaussiana, pois a presença de muitos valores extremos diminui a confiabilidade na comparação das diferenças (**Gerstman, 2008**).

O teste de Mann-Whitney é o equivalente não-paramétrico do teste t para amostras independentes. Assim, é um teste fundamentado na premissa de que a distribuição da frequência de erros amostrais não é gaussiana. Neste teste, ocorre inicialmente a ordenação dos valores de volumes dos *spots*, tratando todos os dados como uma única amostra. Após isso, há o somatório de postos (*rankings*) dos *spots* para cada grupo, seguido da comparação dos valores em

uma tabela. Quanto maior a diferença nas somas, maior evidência de que existe diferença de volume entre os dois grupos **(Gerstman, 2008)**.

O teste t de Student e o teste de Mann-Whitney têm como objetivo, neste estudo, avaliar a influência da ativação mediada por trauma grave na expressão diferencial de proteínas, sendo adotado como critério de significância $p \leq 0,05$ **(IBMCompany, 2004)**.

Em alusão aos critérios estatísticos observados por Magalhães e colaboradores **(Magalhães et al., 2008)** e Biron e colaboradores **(Biron et al., 2006)**, os *spots* foram considerados exclusivos quando não apareceram em nenhum gel do grupo comparado e em, pelo menos, 5 géis do grupo analisado. Assim, a verificação dos *spots* exclusivos deu-se por meio da comparação entre classes dos géis dos 2 grupos, fornecida pelo programa *Image Master*. Para ser um *spot* diferencialmente expresso, foi preciso passar por 3 considerações (significância estatística $p \leq 0,05$, presente em pelo menos 5 géis de cada grupo e razão das médias $\geq 2,0$ ou $\leq 0,5$), sendo este último um critério estabelecido pela equipe de trabalho para evitar resultados falsos positivos, gerados pela difícil reprodutibilidade técnica dos géis bidimensionais. Todos os cálculos feitos levaram em conta a triplicata experimental (repetição de 3 géis de cada indivíduo) e a triplicata biológica (neutrófilos de 3 indivíduos) nos grupos quiescente e ativação por trauma.

VII. Digestão de Spots

A identificação das proteínas contidas nos *spots* recortados dos géis foi feita em dois momentos distintos. Algumas proteínas de géis ácidos de neutrófilos quiescentes foram identificadas em colaboração com o *Protein Research Group - Southern Denmark University*, na Dinamarca. As demais proteínas foram identificadas no próprio Laboratório de Bioquímica e Química de Proteínas (LBQP) da UnB. Os procedimentos de confecção dos géis e digestão de *spots* foram realizados com o cuidado de evitar as contaminações experimentais tais como queratina em excesso, interferente durante o processo de identificação de proteínas. Cada spot foi retirado de um gel de neutrófilo, cortado em cubos pequenos, e transferido para um eppendorf de 0,5 mL. Por meio de soluções descorantes como ferrocianeto de potássio 15 mM e tiosulfato de sódio 50 mM (oxidação e dissolução de haletos de prata), os spots tornaram-se expostos à atuação de compostos desidratadores e removedores de SDS (bicarbonato de amônia 50 mM e acetonitrila 100%), que facilitam a degradação trípica. Assim, a clivagem proteolítica promovida pela tripsina (tripsina suína modificada 12,5 ng/ μ L, da Promega) envolveu a adição de tampão de tripsina 2% (p/p) em tampão bicarbonato 0,1 Mol/L (pH 8,1) e incubação *overnight* a 37 °C por 12-13 horas. **(Castro et al., 2006).**

VIII. Extração de Peptídeos

A extração de peptídeos é o processo que dá continuidade à digestão dos *spots* e permite a submissão dos peptídeos obtidos ao espectrômetro de massa. A partir de alguns trabalhos descritos na literatura (**Laugesen and Roepstorff, 2003; Zhang et al., 2007**), foi obtido um protocolo para aumentar a sensibilidade no processo de ancoramento dos peptídeos hidrofílicos (à matriz DHB) e hidrofóbicos (à matriz HCCA) na placa de AnchorChip. A mistura dessas duas matrizes – DHB (2,5 Dihydroxybenzoic Acid – Fluka Analytical) e HCCA (α -Cyano-4-Hydroxycinnamic Acid – Bruker Daltonics) - na proporção de 1:1 com concentração final de 5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ proporcionou uma redução na quantidade de material perdido pelas lavagens subsequentes aos quais são submetidos os poços da placa AnchorChip. Adicionalmente, um outro procedimento que permitiu um ganho maior na quantidade de amostra aplicada à placa AnchorChip foi a utilização de ponteiros *Gel Loader*. Essas ponteiros funcionaram como microcolunas cromatográficas para aplicação dos peptídeos na placa, uma vez que são preenchidas com uma resina de fase reversa denominada *poros R2*, da *Applied Biosystems* (**Thingholm et al., 2006; Zhang et al., 2007**).

IX. Espectrometria de Massa

Após a etapa de eletroforese ou purificação, as proteínas isoladas devem ser convertidas em um conjunto de peptídeos. Isso ocorreu com o uso de enzimas, a exemplo da tripsina, que promovem a clivagem das proteínas em pontos específicos. Os peptídeos obtidos foram separados por meio da técnica de cromatografia líquida multidimensional, ionizados e transferidos (MALDI) para o analisador de massas. Sabidamente, MALDI aplicada à análise de peptídeos produz preferencialmente íons monocarregados. Assim, o espectro de massas dos peptídeos oriundos da digestão enzimática foi adquirido. Este resultado indicou a relação m/z e, por consequência, a massa molecular dos peptídeos (*peptide mass fingerprint* - PMF). Alguns peptídeos previamente detectados durante o PMF (chamados de íons precursores) foram isolados e submetidos à fragmentação por CID com moléculas de argônio, um gás inerte. Como resultado, a energia translacional transferida em cada colisão foi convertida em energia interna. E a energia interna adquirida induziu a transferência intramolecular de prótons em cada peptídeo, culminando na desestabilização das ligações do esqueleto polipeptídico e, por consequência, induzindo a formação de dois íon-fragmentos. Conhecidamente, estes íons são classificados como íons que retêm a carga residual (próton) no lado N-terminal (gerando fragmentos $-a$, $-b$ e $-c$, dependendo da ligação que é fragmentada) e íons que retêm a carga residual (próton) na região C-terminal (gerando os fragmentos $-x$, $-y$ e $-z$, dependendo da ligação que é fragmentada). Os pares de íons a/x , b/y e c/z serão sempre íons correspondentes aos fragmentos opostos e complementares entre si. A formação do par de fragmentos $-b/-y$ foi mais frequente que os demais pares de fragmentos, pois eles representaram as quebras das ligações peptídicas, menos energéticas. Considerando todos os íons que teoricamente podem ser produzidos em condições de CID, os íons $-b$ e $-y$ corresponderam a grande maioria dos íons observados, enquanto os íons $-a$ foram menos comuns (perda neutra de monóxido de carbono dos íons $-b$) (Cantu *et al.*, 2008).

Quanto à etapa de espectrometria de massa, alguns pontos foram relevantes para a interpretação dos resultados:

a) Na análise de peptídeos oriundos de digestão triptica (R – arginina - ou K – lisina - na posição C-terminal) a formação da série de íons $-y$ foi favorecida (em relação à série $-b$) devido à elevada basicidade desses resíduos de aminoácidos.

b) Quando a fragmentação ocorreu simultaneamente nas posições amino e carboxi-terminal do mesmo resíduo de aminoácido, íons imônio foram produzidos. Esses íons servem como íons diagnóstico, podendo indicar a presença ou ausência de determinados aminoácidos na sequência em estudo.

c) Além disso, algumas modificações pós-traducionais ocorridas nas cadeias laterais de certos aminoácidos puderam ser notadas, tais como fosforilação de serina (S) e treonina (T), glicosilação e/ou oxidação de metionina (M).

Finalmente, o espectro obtido é chamado de espectro de fragmentação ou MS/MS. Ao final do processo, os resultados inerentes à massa molecular dos peptídeos, obtida a partir do PMF, bem como a informação relativa à sequência de aminoácidos dos peptídeos, contida nos espectros de fragmentação (MS/MS), são usados pelos softwares de busca (*Mascot*) para localizar as proteínas nos bancos de dados (**Cantu et al., 2008**).

Os espectros referentes aos peptídeos extraídos de neutrófilos foram obtidos por meio de um espectrômetro de massa do tipo MALDI-TOF/TOF, modelo AutoFlex2 (Bruker Daltonics, Bremen, Germany). O programa usado para obter os espectros foi o *Flex Control*, e os parâmetros foram ajustados da seguinte forma: modo positivo, refletor com fonte de íons 1-20 kV, e faixa de massa de 800 a 3500 (m/z). Este programa computacional exige uma calibração externa que foi realizada com uma mistura padrão de peptídeos conhecidos, denominada *Pepmix*. Após a obtenção dos espectros, outro programa - *Flex Analysis* – permitiu uma calibração interna automática através de peptídeos conhecidos, originários do processo de digestão de *spots*, como os provenientes da autólise de tripsina (massas de 842,50; 2211,10 Da) e da

clivagem de queratina (massas de 1179,60; 1716,85; 1993,97; 1165,58; 1707,77 Da). O programa *BioTools* permitiu a edição manual e a seleção de picos monocarregados e com distribuição isotópica característica de peptídeos monocarregados. A lista de massa/carga dos espectros obtidos (*Flex Control*) e analisados (*Flex Analysis*) foi submetida ao programa *Mascot* (**Perkins et al., 1999**) para busca no bancos de dados *NCBI* (**Johnson et al., 2008**). Os parâmetros adotados na busca das sequências peptídicas foram: tolerância de desvio de massa molecular entre 50 e 100 ppm, taxonomia *Homo sapiens*, máximo de uma clivagem tríptica perdida, carbamidometilação ou propionamidação (alquilação feita por iodoacetamida ou acrilamida, respectivamente) como modificação fixa de cisteínas, e oxidação de metionina e acetilação da região N-terminal como modificações variáveis (**Mineki et al., 2002; Zhang et al., 2007**).

X. Critérios de Validação de *Peptide Mass Fingerprints* (PMF)

Os espectros obtidos, de acordo com os parâmetros de busca selecionados para proteínas de neutrófilos, foram validados pelos seguintes critérios:

A. Similaridade entre massa e pI teórico e experimental

A comparação de massa e pI de resultados alcançados a partir da identificação em banco de dados e as obtidas no gel bidimensional. As diferenças quanto a pI puderam ser justificadas pelas possíveis mudanças pós-traducionais que determinadas proteínas podem sofrer, além de variações inerentes ao método experimental. Os critérios de validação nesse sentido foram: Variação menor ou igual a 15% entre a massa ou pI apresentados no gel bidimensional e os valores obtidos no banco de dados. Divergências acima de tal valor foram indicativas da necessidade de busca confirmatória baseada em sequência, bem como da observação na sequência obtida quanto à presença/ausência de oxidações e acetilações, observação quanto à proteína ser uma precursora, e à cobertura obtida estar na extremidade C-terminal ou N-terminal. Neste último caso, foi possível realizar uma simulação de perda de peptídeos pelo programa *GPMAW*.

B. Cobertura da proteína

Está relacionada com a quantidade de resíduos de aminoácidos da proteína identificada no banco que estejam contidos nos peptídeos detectados experimentalmente. Tal valor é mostrado como porcentagem de cobertura da proteína e calculado pelo programa *Mascot*. Foram consideradas validadas proteínas cuja cobertura foi superior a 20%.

C. Escore de PMF

Quanto maior o escore calculado pelo *Mascot*, maior será a probabilidade de confirmação da proteína proposta, fator que diminui a identificação de proteínas falso-positivas. O escore é calculado com base no algoritmo *Mowse* (*Molecular Weight Search*), que atribui p-valores às proteínas candidatas (**Pappin et al., 1993**).

D. Número de clivagens perdidas

D.1 - Perda de clivagem coerente: A tripsina atua promovendo clivagem na região C-terminal dos resíduos de lisina (K) e arginina (R). Conforme exemplificado na figura 6 abaixo, clivagens perdidas são observadas em regiões que contenham resíduos de prolina (P), múltiplos resíduos de K ou R sucessivos (destacada em verde) e regiões que contenham resíduos de aminoácidos ácidos, como ácido glutâmico (E) e ácido aspártico (D) próximos ao sítio de clivagem. A presença de resíduos de prolina impede a clivagem tríptica devido ao impedimento espacial gerado por este aminoácido. Quando aminoácidos ácidos, como D e E, estão próximos aos básicos K e R, a clivagem não ocorre, possivelmente devido a uma torção da molécula causada pela repulsão das cadeias laterais de dois aminoácidos que têm cargas opostas, o que impediria a aproximação da tripsina (**Rodriguez et al., 2008**). Abaixo é vista a análise da proteína *Vimentina*, com as regiões que tiveram perda de clivagens próximas a prolina (destacada em preto) e próximas a ácido aspártico ou ácido glutâmico (destacada em amarelo).

Figura 6 - Análise dos peptídeos identificados de *Vimentina*.

Start - End	Observed	Mr (expt)	Mr (calc)	ppm	Miss Sequence
29 - 36	914.4354	913.4281	913.4505	-24	0 R.SYVTTSTR.T
37 - 50	1495.7976	1494.7903	1494.7790	8	0 R.TYSLGSALRPSTSR.S
51 - 64	1428.7555	1427.7482	1427.7045	31	0 R.SLYASSPGGVYATR.S
79 - 97	2126.0711	2125.0638	2125.0579	3	0 R.LLQDSVDFSLADAINTEFK.N
105 - 113	1115.4916	1114.4843	1114.5618	-70	0 K.VELQELNDR.F
114 - 120	870.4908	869.4836	869.4283	64	0 R.FANYIDK.V
114 - 122	1125.5145	1124.5072	1124.5978	-81	1 R.FANYIDKVR.F
144 - 155	1497.8325	1496.8252	1496.6929	88	1 <u>K.SRLGDLYEEEMR.E</u>
146 - 155	1270.6472	1269.6399	1269.5547	67	0 R.LGDLYEEEMR.E Oxidation (M)
160 - 168	1060.4702	1059.4630	1059.5197	-54	0 R.QVDQLTNDK.A
176 - 184	1076.5616	1075.5543	1075.4968	54	0 R.DNLAEDIMR.L
176 - 186	1345.6211	1344.6138	1344.6819	-51	1 <u>R.DNLAEDIMRLR.E</u>
187 - 196	1319.6687	1318.6615	1318.6551	5	1 <u>R.EKLQEEMLQR.E</u> Oxidation (M)
189 - 207	2366.9823	2365.9750	2366.1172	-60	1 <u>K.LQEEMLQREEAENTLQSEFR.Q</u> Oxidation (M)
208 - 217	1088.5921	1087.5849	1087.5258	54	0 R.QDVDNASLAR.L
271 - 282	1393.8063	1392.7990	1392.6997	71	1 R.DVRQQYESVAAK.N
293 - 304	1308.6824	1307.6751	1307.6469	22	1 K.SKFADLSEAANR.N
295 - 304	1093.5368	1092.5295	1092.5200	9	0 K.FADLSEAANR.N
305 - 313	1029.5984	1028.5911	1028.5363	53	1 R.NNDALROAK.Q
335 - 342	905.4096	904.4024	904.4250	-25	0 <u>K.GTNESLR.Q</u>
335 - 345	1320.6259	1319.6186	1319.6252	-5	1 <u>K.GTNESLERQMR.E</u>
391 - 401	1311.6571	1310.6498	1310.6540	-3	0 K.MALDIEIATYR.K Oxidation (M)
403 - 410	932.4165	931.4092	931.4610	-56	0 K.LLEGEESR.I
411 - 424	1570.8916	1569.8843	1569.8878	-2	0 R.ISLPLPNFSSLNLR.E
451 - 466	1836.8209	1835.8136	1835.7922	12	0 R.DGQVINETSQHDDLE.-

Destaque verde: exemplo de clivagem perdida em regiões contendo múltiplos resíduos de K ou R.

Destaque preto: exemplo de perda de clivagem em regiões próximas a P.

Destaque amarelo: exemplo de perda de clivagem em regiões próximas de D ou E.

Destaque azul: exemplo de confirmação de clivagem perdida.

D.2 - Confirmação por meio de clivagens perdidas: Além da confirmação por clivagens coerentes, foi também possível a confirmação de clivagens perdidas, quando houve a presença da mesma sequência com a clivagem correta (destacada em azul, na figura 6 acima). Há, entretanto, casos em que não se observa a mesma sequência com a clivagem correta (sequência dentro de caixa preta na figura 6 acima).

E. Confirmação por meio de oxidação de metionina e acetilação em posição N-terminal

Conforme exemplificada pela figura 7 dos peptídeos identificados de *CLIC4* pelo *Mascot*, foi observada uma sequência oxidada e acetilada (destacada em caixa preta), sendo esta confirmada com o aparecimento de uma mesma sequência sem a acetilação (destacada em caixa amarela) e outra sem a oxidação (destacada em caixa azul).

Figura 7 - Peptídeos identificados de *CLIC4* (oxidação e acetilação).

Start - End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	ppm	Miss	Sequence
1 - 13	1605.8049	1604.7976	1604.7756	14	0	M AEEQPQVELFVK.A Acetyl (Protein N-term); Oxidation (M)
1 - 20	2150.0597	2149.0524	2149.0361	8	1	M AEEQPQVELFVKA GSDGAK.I Oxidation (M)
2 - 13	1458.6963	1457.6890	1457.7402	-35	0	M AEEQPQVELFVK.A Acetyl (Protein N-term)
38 - 50	1437.7348	1436.7275	1436.7624	-24	1	K.GVTENVTTVDTR.R
139 - 166	3048.7009	3047.6936	3047.4571	78	1	K.VLDNYLTSPLPEGVDETSAEDEGVSQRK.F
184 - 192	1095.5657	1094.5584	1094.6270	-63	0	K.LHIVQVVK.K
196 - 204	1037.5206	1036.5133	1036.5342	-20	0	R.GFTIPEAFR.G

Destaque preto: exemplo de sequência oxidada e acetilada.

Destaque amarelo: exemplo de confirmação da sequência anterior, sem a acetilação.

Destaque azul: exemplo de confirmação da sequência anterior, sem a oxidação.

XI. Critérios de Validação de MS/MS (MALDI-TOF/TOF)

Os picos mais intensos do espectro de PMF dos peptídeos experimentais são os candidatos à fragmentação. Os critérios adotados para a escolha desses picos são: resolução monoisotópica de picos monocarregados e distância mínima de aproximadamente 20 Da entre picos intensos. Após o pico mais significativo ter sido escolhido e fragmentado, e procedida à busca, o banco de dados forneceu uma série de proteínas candidatas (figura 8) e um gráfico de identificação (figura 9). Um exemplo de busca que representa a fragmentação foi a escolha do peptídeo 1570 Dalton da proteína já identificada pelo PMF *Vimentina*.

Figura 8 – Busca resultante e lista de proteínas candidatas.

1. [gi|340219](#) Mass: 53738 Score: 71 Queries matched: 1
vimentin [Homo sapiens]

Check to include this hit in error tolerant search

Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	ppm	Miss	Score	Expect	Rank	Peptide
1	1570.8916	1569.8843	1569.8878	-2.24	0	71	1.2e-07	1	R.ISLPLPNFSSLNLR.E

Proteins matching the same set of peptides:

[gi|340234](#) Mass: 35089 Score: 71 Queries matched: 1
vimentin [Homo sapiens]

[gi|5030431](#) Mass: 41651 Score: 71 Queries matched: 1
vimentin [Homo sapiens]

[gi|16552261](#) Mass: 47516 Score: 71 Queries matched: 1
unnamed protein product [Homo sapiens]

[gi|21757045](#) Mass: 52463 Score: 71 Queries matched: 1
unnamed protein product [Homo sapiens]

[gi|47115317](#) Mass: 53604 Score: 71 Queries matched: 1
VIM [Homo sapiens]

[gi|62414289](#) Mass: 53676 Score: 71 Queries matched: 1
vimentin [Homo sapiens]

[gi|62896523](#) Mass: 53708 Score: 71 Queries matched: 1
vimentin variant [Homo sapiens]

[gi|167887751](#) Mass: 49680 Score: 71 Queries matched: 1
vimentin variant 3 [Homo sapiens]

A busca resultante após o pico mais significativo ter sido escolhido e fragmentado gerou uma lista de proteínas candidatas com informações. Dentre essas informações, há um valor numérico que determina a probabilidade de uma identificação ser randômica (*Mowse Score* visto na Figura 9).

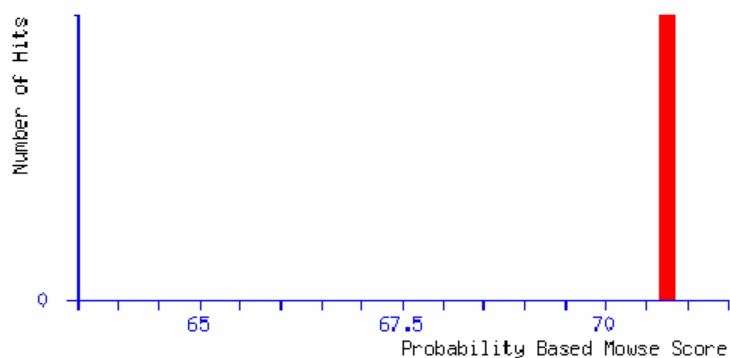
Figura 9 – Gráfico de identificação.

Probability Based Mowse Score

Ions score is $-10 \cdot \log(P)$, where P is the probability that the observed match is a random event.

Individual ions scores > 14 indicate identity or extensive homology ($p < 0.05$).

Protein scores are derived from ions scores as a non-probabilistic basis for ranking protein hits.



No espectro da fragmentação, as séries y e b são obtidas. Essas séries são formadas a partir da quebra das ligações peptídicas, onde ficaram expostas a região N-terminal (série b) e C-terminal (série y) – figura 10. A soma das massas encontradas nas duas séries confirma a sequência (figura 11).

Figura 10 - Espectro de massa após fragmentação do peptídeo de massa 1570 Da da proteína *Vimentina*.

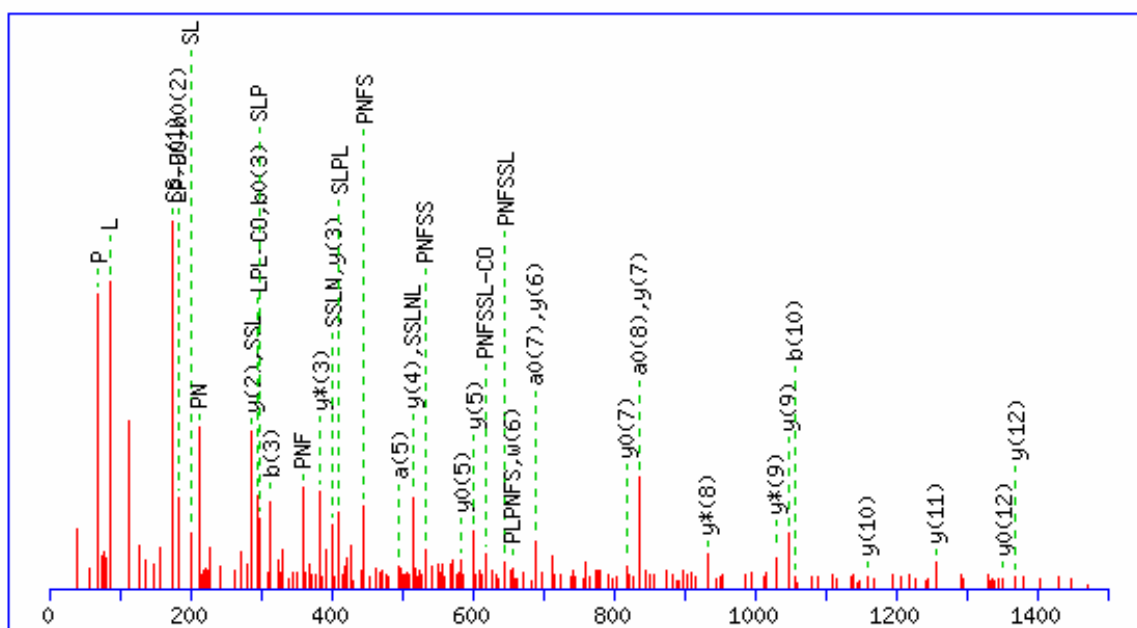


Figura 11 - Séries de fragmentação esperadas para o peptídeo de massa 1570 Da da proteína *Vimentina*.

#	Immon.	a	a*	a ⁰	b	b*	b ⁰	Seq.	v	w	y	y*	y ⁰	#
1	86.0964	86.0964			114.0913			I						14
2	60.0444	173.1285		155.1179	201.1234		183.1128	S	1425.7849	1424.7896	1457.8111	1440.7845	1439.8005	13
3	86.0964	286.2125		268.2020	314.2074		296.1969	L	1312.7008	1311.7056	1370.7791	1353.7525	1352.7685	12
4	70.0651	383.2653		365.2547	411.2602		393.2496	P	1215.6480	1214.6528	1257.6950	1240.6684	1239.6844	11
5	86.0964	496.3493		478.3388	524.3443		506.3337	L	1102.5640	1101.5687	1160.6422	1143.6157	1142.6317	10
6	70.0651	593.4021		575.3915	621.3970		603.3865	P	1005.5112	1004.5160	1047.5582	1030.5316	1029.5476	9
7	87.0553	707.4450	690.4185	689.4345	735.4400	718.4134	717.4294	N	891.4683	890.4730	950.5054	933.4789	932.4948	8
8	120.0808	854.5135	837.4869	836.5029	882.5084	865.4818	864.4978	F	744.3999		836.4625	819.4359	818.4519	7
9	60.0444	941.5455	924.5189	923.5349	969.5404	952.5138	951.5298	S	657.3678	656.3726	689.3941	672.3675	671.3835	6
10	60.0444	1028.5775	1011.5510	1010.5669	1056.5724	1039.5459	1038.5619	S	570.3358	569.3406	602.3620	585.3355	584.3515	5
11	86.0964	1141.6616	1124.6350	1123.6510	1169.6565	1152.6299	1151.6459	L	457.2518	456.2565	515.3300	498.3035		4
12	87.0553	1255.7045	1238.6779	1237.6939	1283.6994	1266.6729	1265.6888	N	343.2088	342.2136	402.2459	385.2194		3
13	86.0964	1368.7886	1351.7620	1350.7780	1396.7835	1379.7569	1378.7729	L	230.1248	229.1295	288.2030	271.1765		2
14	129.1135							R	74.0237	73.0284	175.1190	158.0924		1

O retângulo verde destaca as massas dos íons imônio, os retângulos amarelo e azul destacam, respectivamente, as séries *b* e *y*, mais frequentemente observadas em função do método de fragmentação utilizado.

A figura 11 é uma representação das massas esperadas para as séries *y* (retângulo azul), *b* (retângulo amarelo) e presença de imônios (retângulo verde)

como resultados da fragmentação do peptídeo de 1570 Da da *Vimentina*. Os valores mostrados em vermelho representam fragmentos encontrados experimentalmente, sendo que as séries representam fragmentos maiores de sequência e os imônios representam a ocorrência do resíduo de aminoácido isoladamente.

4) Resultados:

I. Obtenção de Neutrófilos

Após a coleta de sangue dos doadores e dos pacientes, um protocolo pré-estabelecido de separação dos neutrófilos das demais células sanguíneas foi cumprido. Com relação à eficiente separação dos neutrófilos (2×10^7 células/ml) dos outros componentes celulares sanguíneos (98% de neutrófilos e 99% viáveis), a abordagem principal foi o uso dos gradientes de *Percoll*, conforme trabalho de ativação *in vitro* de neutrófilos por PMA (um análogo do diacilglicerol) desenvolvido pela equipe na qual se insere o presente trabalho (**Santos, 2007**). Em um estudo acerca do uso de gradientes de *Ficoll-Hypaque* e de *Percoll* para separação destas células, o primeiro mostrou ser um fator artefactual para estimulação ou ativação de polimorfonucleares, pois desencadeou mudança de forma nas células (**Haslett et al., 1985**).

II. Confeção de Géis Bidimensionais

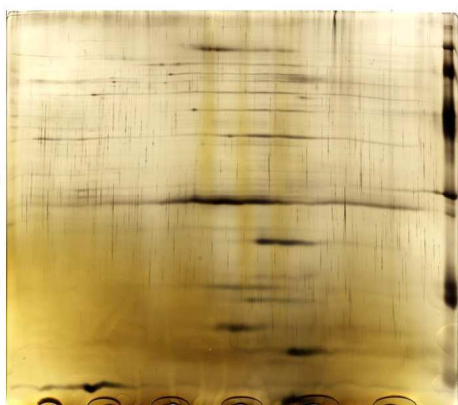
A. Géis Alcalinos

Uma das tarefas mais laboriosas deste trabalho foi a elaboração de um protocolo de confeção de géis bidimensionais alcalinos para neutrófilos humanos, algo ainda não desenvolvido ou relatado na literatura. O processo de adaptação da técnica de isoeletrofocalização conduziu-nos a aproximadamente 12 meses de intensas pesquisas e tentativas de aplicação a partir de trabalhos realizados com outros tipos de células eucarióticas como, por exemplo, células intestinais humanas (**Johnson et al., 2008**) e formas evolutivas de *T. cruzi* (**Magalhães et al., 2008**). Assim, a partir de uma adaptação baseada no protocolo de isoeletrofocalização de proteínas alcalinas de *Trypanosoma cruzi* (Figura 12), foram obtidos nove géis, correspondendo a três amostras realizadas em triplicata, para cada um dos dois grupos de neutrófilos estudados (total de 18 géis).

Figura 12 – Algumas tentativas realizadas para padronização da focalização isoelétrica no intervalo de pH 6-11.

Algumas Tentativas para Padronização de IEF 6-11

A - seguindo protocolo usado para *T. cruzi*



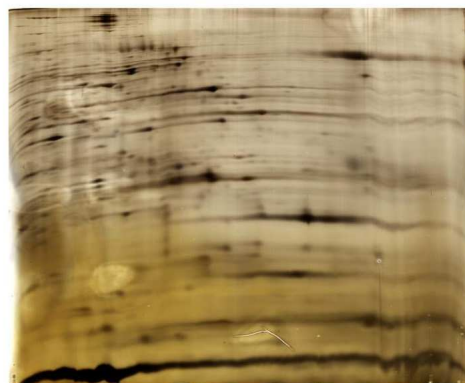
B - após precipitação de proteínas



C - aumento de [DTT] e [Triton], e 1h a mais no Multi-Phor



D - [DTT] e [Triton] igual à C, e 2h a mais no Multi-Phor



Apesar dos esforços desempenhados, o protocolo de isoeletrofocalização alcalina para proteínas de neutrófilos não atingiu a qualidade técnica esperada, mas permitiu uma análise comparativa inicial, configurada neste trabalho.

O padrão de géis atingido, suficiente para uma análise comparativa inicial, (condição D da figura 12), foi obtido através de um aumento na concentração de DTT e Triton-X, além do uso de isopropanol 10% e do método chamado de *paper bridge* no aparelho Multi-Phor. A adição de isopropanol 10% no tampão de amostra alcalino diminuiu os efeitos eletroendosmóticos (Hoving *et al.*, 2000), e o uso do método de *paper bridge* na isoeletrofocalização das proteínas

de ponto isoelétrico alcalino reduziu o aparecimento de falhas técnicas vistas após a coloração dos géis, ditas *streaking*, causadas por depleção de DTT em região alcalina (**Gorg et al., 1995**). A tentativa de precipitar proteínas para remoção de contaminantes não específicos da amostra, como sais, foi mal sucedida pela perda de material no processo. Ligeiros aumentos no tempo de focalização no Multi-Phor foram os passos mais adequados na etapa de padronização.

B. Géis Ácidos

Para elaboração dos géis bidimensionais ácidos, foi utilizado o mesmo protocolo já padronizado e descrito anteriormente pela equipe de pesquisa em que se inclui o atual trabalho (**Castro et al., 2006; Teles, 2005**). Objetivando algumas melhorias, como a validação de alguns dos resultados prévios, a análise proteômica comparativa em pH ácido entre os dois estados funcionais de neutrófilos estudados foi realizada neste trabalho, de forma a incluir triplicatas nas análises e aprofundamentos em análise de imagens e análise estatística, bem como a identificação de proteínas. Logo, após a adequação do protocolo para este tipo de gel, foram obtidos nove géis, correspondendo a três amostras realizadas em triplicata, para o grupo de neutrófilos de indivíduos politraumatizados e foram utilizados 9 géis previamente obtidos pelo grupo a partir de neutrófilos quiescentes (total de 18 géis).

III. Análise de Imagens e Análise Estatística dos Géis Bidimensionais

Após a obtenção das imagens dos géis bidimensionais, foi realizada a análise comparativa por meio do programa *Image Master Platinum*, versões 5.0 e 6.0.

A. Géis Alcalinos

Em média, foram detectados 435 *spots* nos géis de neutrófilos quiescentes e 315 *spots* nos géis de neutrófilos ativados devido a trauma grave. Com o desenvolvimento da análise estatística, 140 *spots* foram classificados como exclusivos do grupo quiescente e 69 *spots* foram exclusivos do grupo ativado por trauma. Além disso, outro dado obtido foi a *expressão diferencial*, ao considerar os critérios de validação mencionados anteriormente (significância estatística $p \leq 0,05$, presente em pelo menos 5 géis de cada grupo e razão das médias $\geq 2,0$ ou $\leq 0,5$). Assim, 3 *spots* tiveram expressão diferencial, sendo ela aumentada após ativação por trauma em todos os referidos *spots* (tabela 2). As figuras 13 e 14 correspondem aos géis usados como referência para os grupos *Quiescente* e *Trauma*, quanto à categoria de proteínas com ponto isoelétrico entre 6 e 11.

Figura 13 - Gel Master Quiescente Alcalino.

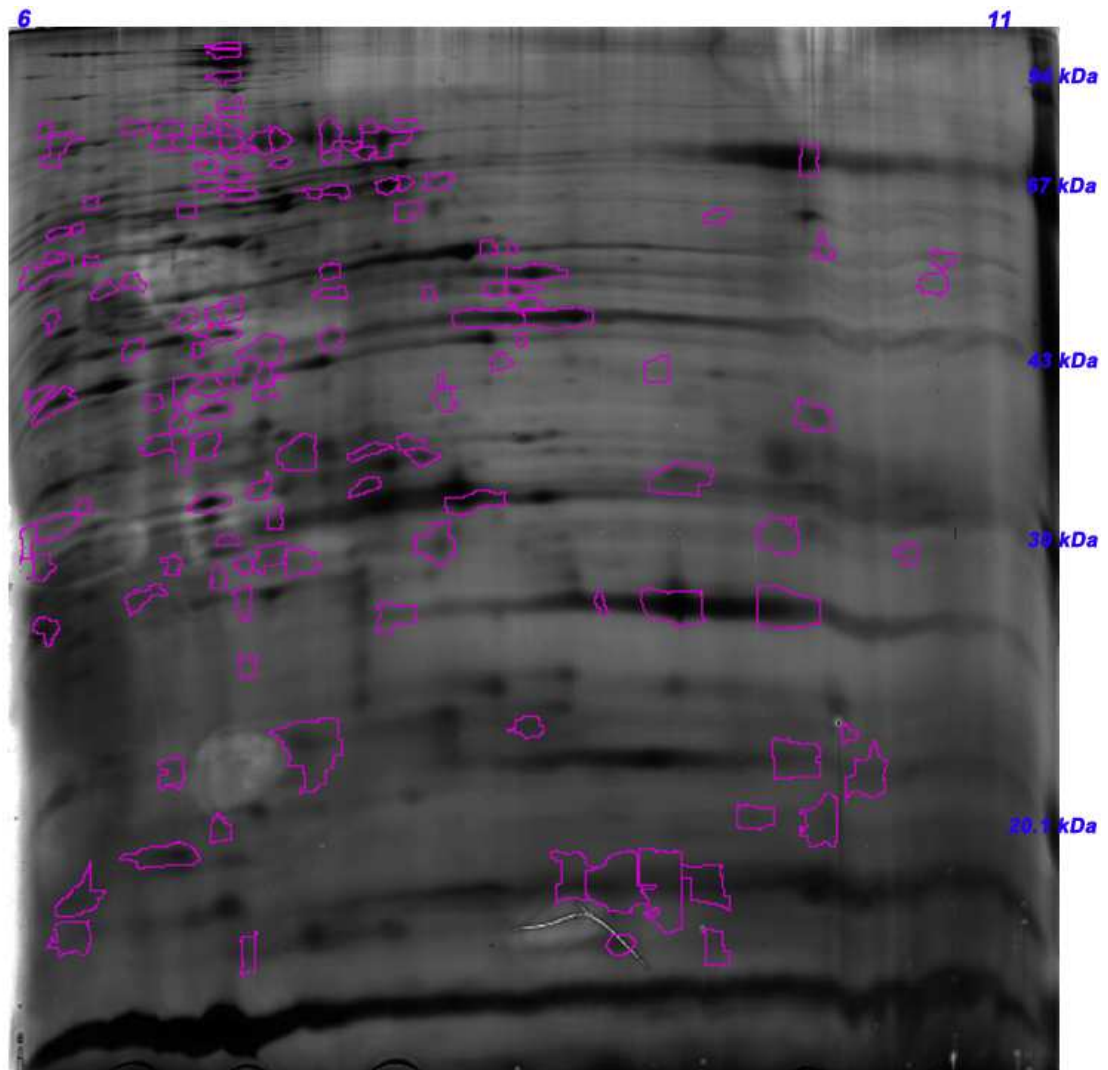


Imagem do gel referência de proteínas com ponto isoelétrico entre 6-11 (indicado na margem superior da figura) de neutrófilos quiescentes. Delimitados em lilás estão os *spots* exclusivos do grupo quiescente. Na extremidade direita da imagem estão os valores aproximados de massa molecular.

Figura 14 - Gel Master Trauma Alcalino.

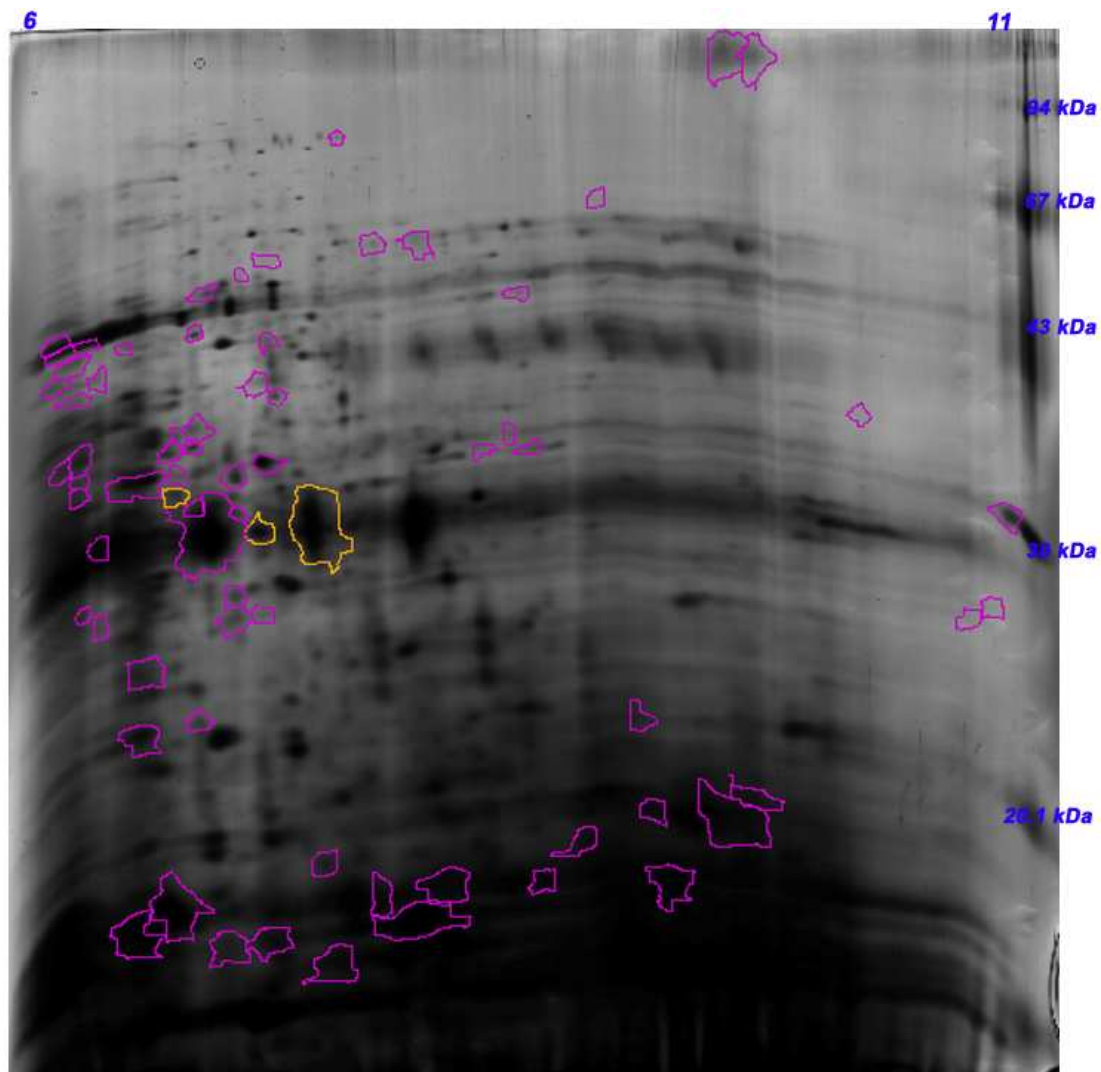


Imagem do gel referência de proteínas com ponto isoelétrico entre 6-11 (indicado na margem superior da figura) de neutrófilos ativados após trauma grave. Delimitados em lilás estão os *spots* exclusivos do grupo trauma e em amarelo, os que tiveram expressão aumentada após ativação por trauma. Na extremidade direita da imagem estão os valores aproximados de massa molecular.

Tabela 2 – *Spots* com expressão diferencial da categoria alcalina. O número do *spot* corresponde ao que recebeu no gel master quiescente pelo programa *Image Master*.

Nº <i>Spot</i> (no gel master quiescente)	Razão das Médias Quiescente (Q) / Trauma (T)	p ≤ 0,050
21143	0,27439	0,009
21166	0,03860	0,006
21175	0,28135	0,001

B. Géis Ácidos

O processo de detecção gerou, em média, 935 *spots* em cada gel de neutrófilos quiescentes e 750 *spots* em cada gel de neutrófilos ativados devido a trauma grave. Com a realização da análise estatística, 357 *spots* foram classificados como exclusivos do grupo quiescente e 244 *spots* foram exclusivos do grupo ativado por trauma. Adicionalmente, o dado *expressão diferencial*, considerando os 3 critérios de validação já mencionados, selecionou 114 *spots*. Dentre estes, 27 *spots* tiveram expressão aumentada após a ativação por trauma e 87 *spots* tiveram expressão diminuída devido à ativação (figuras 15 e 16 e tabelas 3 e 4). A tabela 5 mostra os *spots* exclusivos do grupo quiescente cujas identificações já foram obtidas.

Figura 15 - Gel Master Quiescente Ácido.

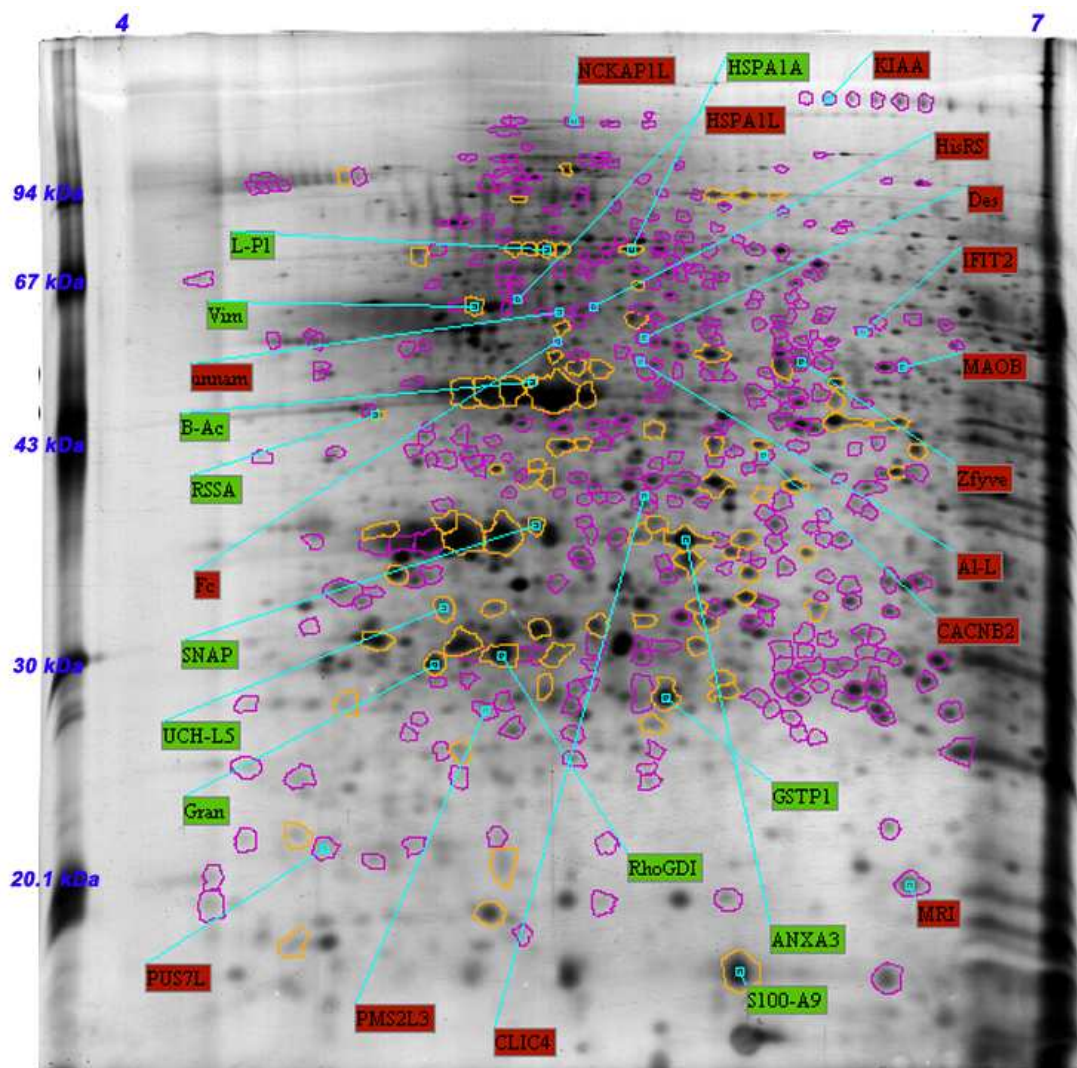


Imagem do gel referência de proteínas com ponto isoelétrico entre 4-7 (indicado na margem superior da figura) de neutrófilos quiescentes. Delimitados em lilás estão os *spots* exclusivos do grupo quiescente e em amarelo, os que tiveram expressão diminuída após ativação por trauma. As siglas contidas em caixas verdes correspondem aos nomes das proteínas identificadas contidas nos *spots* com expressão diminuída na ativação pós-trauma grave identificados. As siglas contidas em caixas vermelhas correspondem aos *spots* exclusivos de neutrófilos quiescentes identificados. Siglas: L-Pl = L-Plastin; Vim = Vimentin; B-Ac = β -Actin; SNAP = α -soluble NSF attachment protein; ANXA3 = Annexin A3; UCH-L5 = ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L5; Gran = Grancalcin; S100-A9 = S100A9; KIAA = KIAA0564 protein; NCKAP1L = NCK-associated protein 1-like; HSPA1A = heat shock 70 kDa protein 1; HSPA1L = heat shock 70 kDa protein 1-like; HisRS = histidyl-tRNA synthetase; unnam = unnamed protein product; IFIT2 = interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 2; Des = Desmin; Fc = ADCC-Enhanced Fc γ Fragment; A1-L = Albumin-like; Zfyve = zinc finger FYVE domain containing 19; MAOB = amine oxidase flavin-containing B; CACNB2 =

calcium channel voltage-dependent beta 2 subunit; PMS2L3 = postmeiotic segregation increased 2-like 3; CLIC4 = chloride intracellular channel 4; PUS7L = pseudouridylate synthase 7 homolog (*S. cerevisiae*)-like; MRI = modulator of retrovirus infection; GSTP1 = Glutathione S-transferase P; RhoGDI = RhoGDI Complex; RSSA = 40S ribosomal protein SA. Na extremidade esquerda da imagem estão os valores aproximados de massa molecular.

Figura 16 - Gel Master Trauma Ácido.

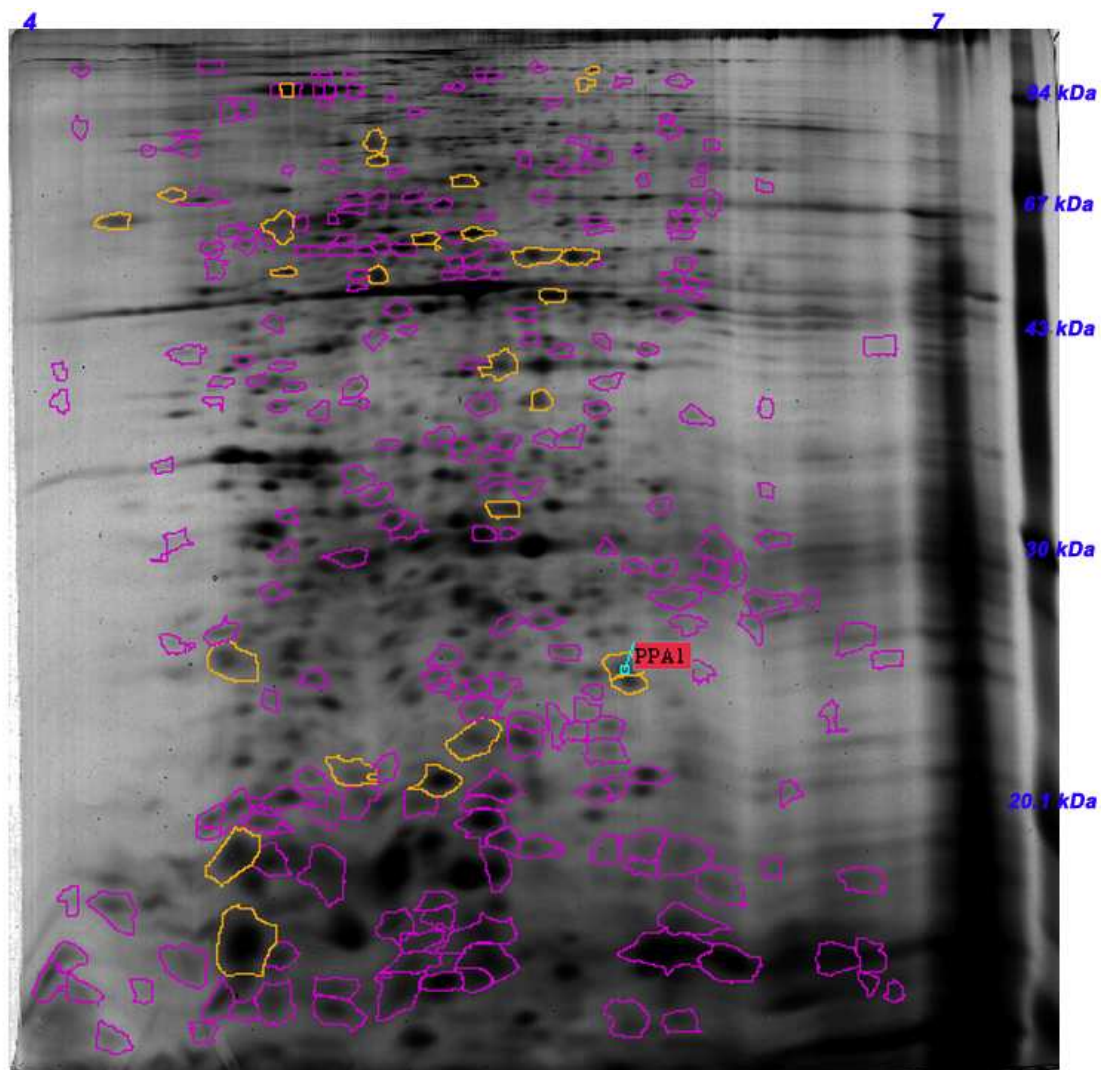


Imagem do gel referência de proteínas com ponto isoelétrico entre 4-7 (indicado na margem superior da figura) de neutrófilos ativados após trauma grave. Delimitados em lilás estão os *spots* exclusivos do grupo trauma e em amarelo, os que tiveram expressão aumentada após ativação por trauma. A sigla contida na caixa rosa corresponde ao *spot* com expressão aumentada na ativação pós-trauma grave identificado. Sigla: PPA1 – pyrophosphatase. Na extremidade direita da imagem estão os valores aproximados de massa molecular.

Tabela 3 - Spots com expressão diferencial aumentada no grupo ativado por trauma, da categoria ácida. O spot cuja identificação foi obtida tem seu nome na coluna Proteína Identificada.

N° Spot (no gel master quiescente)	Razão das Médias Quiescente (Q) / Trauma (T)	p ≤ 0,050	Proteína Identificada
189	0,27612	0,022	-
276	0,28219	0,031	-
432	0,29761	0,003	-
488	0,27494	0,008	-
506	0,37034	0,046	-
572	0,46786	0,006	-
609	0,06940	0,002	-
613	0,34011	0,004	-
624	0,36177	0,014	-
645	0,16426	0,004	-
671	0,33482	0,002	-
704	0,10918	0,024	-
707	0,11992	0,002	-
709	0,27195	0,002	-
803	0,41899	0,050	-
961	0,46096	0,024	-
1014	0,31774	0,002	-
1180	0,15705	0,006	-
1397	0,09106	0,017	-
1398	0,38533	0,050	PPA1
1426	0,48855	0,002	-
1468	0,14604	0,003	-
1488	0,45765	0,024	-
1522	0,26109	0,008	-
1563	0,08854	0,006	-
1694	0,36143	0,024	-

1705	0,23368	0,006	-
------	---------	-------	---

Tabela 4 - Spots com expressão diferencial diminuída no grupo ativado por trauma, da categoria ácida. Os spots cujas identificações foram obtidas têm seus nomes na coluna Proteína Identificada.

Nº Spot (no gel master quiescente)	Razão das Médias Quiescente (Q) / Trauma (T)	p ≤ 0,050	Proteína Identificada
162	3,08146	0,040	-
174	4,83305	0,002	-
221	3,92200	0,003	-
224	5,42415	0,001	-
231	3,40658	0,019	-
237	8,79567	0,008	-
352	2,84139	0,006	-
353	2,36453	0,014	-
354	4,59286	0,003	L-Plastina
357	5,20997	0,050	-
358	3,92706	0,024	HSPA1A
370	2,26154	0,019	-
476	2,74149	0,001	-
521	3,90442	0,003	Vimentina
557	5,28551	0,001	-
581	2,41409	0,014	-
656	2,46372	0,003	-
667	3,26752	0,014	-
684	9,68822	0,008	-
689	3,28062	0,001	-
691	2,19062	0,006	-
726	4,63593	0,015	-
729	2,74652	0,027	β-Actina
730	2,99807	0,019	-

733	2,49397	0,019	-
734	3,47479	0,008	-
738	2,28151	0,014	-
755	2,77142	0,006	-
765	6,64410	0,008	-
811	2,67832	0,040	RSSA
820	2,00162	0,006	-
827	4,63100	0,008	-
844	3,10891	0,006	-
875	2,72541	0,031	-
876	2,01952	0,050	-
879	2,22653	0,003	-
880	4,10987	0,005	-
893	2,84214	0,014	-
921	2,21481	0,019	-
927	2,94633	0,014	-
940	2,28603	0,011	-
947	3,35677	0,045	-
948	4,28834	0,029	-
958	4,97791	0,008	-
966	6,57230	0,001	-
981	2,58468	0,050	-
1024	5,76252	0,003	SNAP
1026	5,36169	0,024	-
1027	5,15870	0,031	-
1032	43,39397	0,008	-
1036	36,28240	0,008	-
1047	6,26058	0,040	-
1052	6,34282	0,001	ANXA3
1055	8,02694	0,002	-
1060	7,14256	0,008	-
1082	2,43049	0,006	-
1083	3,95573	0,024	-

1096	8,14003	0,008	-
1121	2,65139	0,032	-
1123	2,23847	0,031	-
1168	2,48444	0,006	-
1179	2,47468	0,006	UCH-L5
1187	2,12070	0,050	-
1190	3,36673	0,001	-
1192	4,06129	0,008	-
1207	2,37234	0,006	-
1208	3,31401	0,003	-
1216	3,47058	0,001	-
1218	2,80885	0,002	-
1238	10,68780	0,002	-
1246	5,18498	0,001	-
1253	2,93615	0,002	-
1260	8,79426	0,008	-
1262	10,66228	0,011	RhoGDI
1282	8,29746	0,001	Grancalcina
1310	2,04252	0,031	-
1330	9,30301	0,001	-
1333	5,40754	0,016	-
1336	2,53243	0,003	GSTP1
1348	5,18416	0,008	-
1378	3,13779	0,003	-
1405	2,94229	0,008	-
1470	3,83159	0,001	-
1486	3,50197	0,050	-
1515	2,08210	0,008	-
1534	2,55900	0,049	-
1543	4,97334	0,008	S100-A9

Tabela 5 - *Spots* encontrados apenas no grupo de neutrófilos quiescentes, cujas identificações foram obtidas, da categoria ácida. O número do *spot* corresponde ao que recebeu no gel master quiescente pelo programa *Image Master*.

Nº <i>Spot</i> (gel master quiescente ácido)	Proteína Identificada
71	KIAA0564
102	NCKAP1L
508	HSPA1L
526	HisRS
546	Proteína não nomeada
595	IFIT2
603	Desmina
629	Fragmento Fcγ para ADCC
679	Albumin-like
680	Zfyve19
695	MAOB
904	CACNB2
982	CLIC4
1360	PMS2L3
1479	PUS7L
1501	MRI

IV. Identificação de Proteínas

A tabela 6 abaixo mostra alguns dados acerca das proteínas que foram identificadas.

Tabela 6 - Proteínas identificadas no estudo comparativo *Quiescente versus Trauma*, pertencentes ao mapa proteômico do neutrófilo humano e seus códigos de acesso ao banco de dados *NCBI*, nome, atividade, ponto isoelétrico, massa molecular, escore e porcentagem de cobertura da sequência.

Spot	^a Parâmetro de Expressão	Número de Acesso	Nome	Atividade Funcional	pI (teor./prat.)	MM (teor./prat.) (kDa)	^b PMF Escore	^c PMF C(%)	^d MS/MS Escore
71	Q	gi 3043652	KIAA0564	Mecanismos Pós-Tradução	6.37 / 6.56	163 / 176	354	39	-
102	Q	gi 34485727	NCKAP1L	Estrutural	6.39 / 5.53	130 / 120	97	19	-
354	↓T	gi 10882207	L-plastin	Estrutural	5.20 / 5.20	71 / 70	259	64	138
358	↓T	gi 124256496	HSPA1A	Chaperona	5.48 / 5.56	70 / 75	361	60	67
508	Q	gi 124256496	HSPA1L	Chaperona	5.76 / 5.21	71 / 66	88	20	-
521	↓T	gi 62414289	vimentin	Estrutural	5.06 / 5.03	54 / 62	201	49	71
526	Q	gi 62766469	HisRS	Mecanismos Pós-Tradução	5.72 / 5.51	58 / 62	181	46	-
546	Q	gi 194389088	Proteína NãoNomeada	-	5.57 / 5.32	60 / 58	91	22	-
595	Q	gi 153082755	IFIT2	Mecanismos Pós-Tradução	6.32 / 6.59	55 / 59	82	23	-
603	Q	gi 1408188	desmin	Estrutural	5.21 / 5.70	53 / 60	238	60	-
629	Q	gi 171848866	ADCC-Enhanced Fcγ Fragment	Receptor de Anticorpo	6.37 / 5.35	26 / 54	78	60	39
679	Q	gi 763431	albumin-like	Estrutural	5.69 / 5.66	53 / 56	162	46	96
680	Q	gi 119612854	Zfyve19	Transporte Entre Organelas	5.21 / 6.13	48 / 53	109	27	-
695	Q	gi 38202207	MAOB	Processos de Estresse Oxidativo	7.20 / 6.79	59 / 52	103	34	-
	↓T	gi 14250401	β-actin	Estrutural	5.56 / 5.27	41 / 49	80	31	63

729									
811	↓T	gij283046708	RSSA	Receptor de Adesão	4.79 / 4.69	33 / 46	192	53	212
904	Q	gij150039531	CACNB2	Canal de Ca ²⁺	6.41 / 6.16	46 / 43	84	31	-
982	Q	gij7330335	CLIC4	Canal de Cl ⁻	5.45 / 5.60	29 / 38	76	41	-
1024	↓T	gij88651801	SNAP	Fusão e tráfego entre membranas	5.23 / 5.23	34 / 33	197	75	-
1052	↓T	gij4826643	ANXA3	Estrutural	5.63 / 5.63	37 / 36	268	62	499
1179	↓T	gij55859537	UCH-L5	Mecanismos Pós-Tradução	4.95 / 4.88	29 / 32	78	52	-
1262	↓T	gij56676393	RhoGDI	Estrutural / Montagem de NADPH Oxidase	5.10 / 5.12	23 / 29	167	81	38
1282	↓T	gij17943195	Grancalcin	Estrutural	5.77 / 4.87	19 / 28	69	28	33
1336	↓T	gij119578233	GSTP1	Processos de Estresse Oxidativo	5.43 / 5.67	23 / 28	143	52	247
1360	Q	gij119592171	PMS2L3	Mecanismos Pós-Tradução	4.52 / 5.13	19 / 27	67	25	-
1398	↑T	gij119626587	PPA1	Geração de Energia	6.82 / 6.03	16 / 25	70	50	-
1479	Q	gij119603770	PUS7L	Mecanismos Pós-Tradução	4.57 / 4.49	28 / 22	70	26	-
1501	Q	gij208022703	MRI	Mecanismos Pós-Tradução	5.16 / 6.50	17 / 20	90	49	-
1543	↓T	gij3779687	S100-A9	Mediador de Quimiotaxia	5.71 / 5.71	13 / 13	83	52	-

^a Parâmetro de Expressão: análise comparativa entre células quiescentes e ativadas após trauma grave:

Q: Exclusivo de Neutrófilos Quiescentes

↓T: Expressão Diminuída na Condição Pós-Trauma

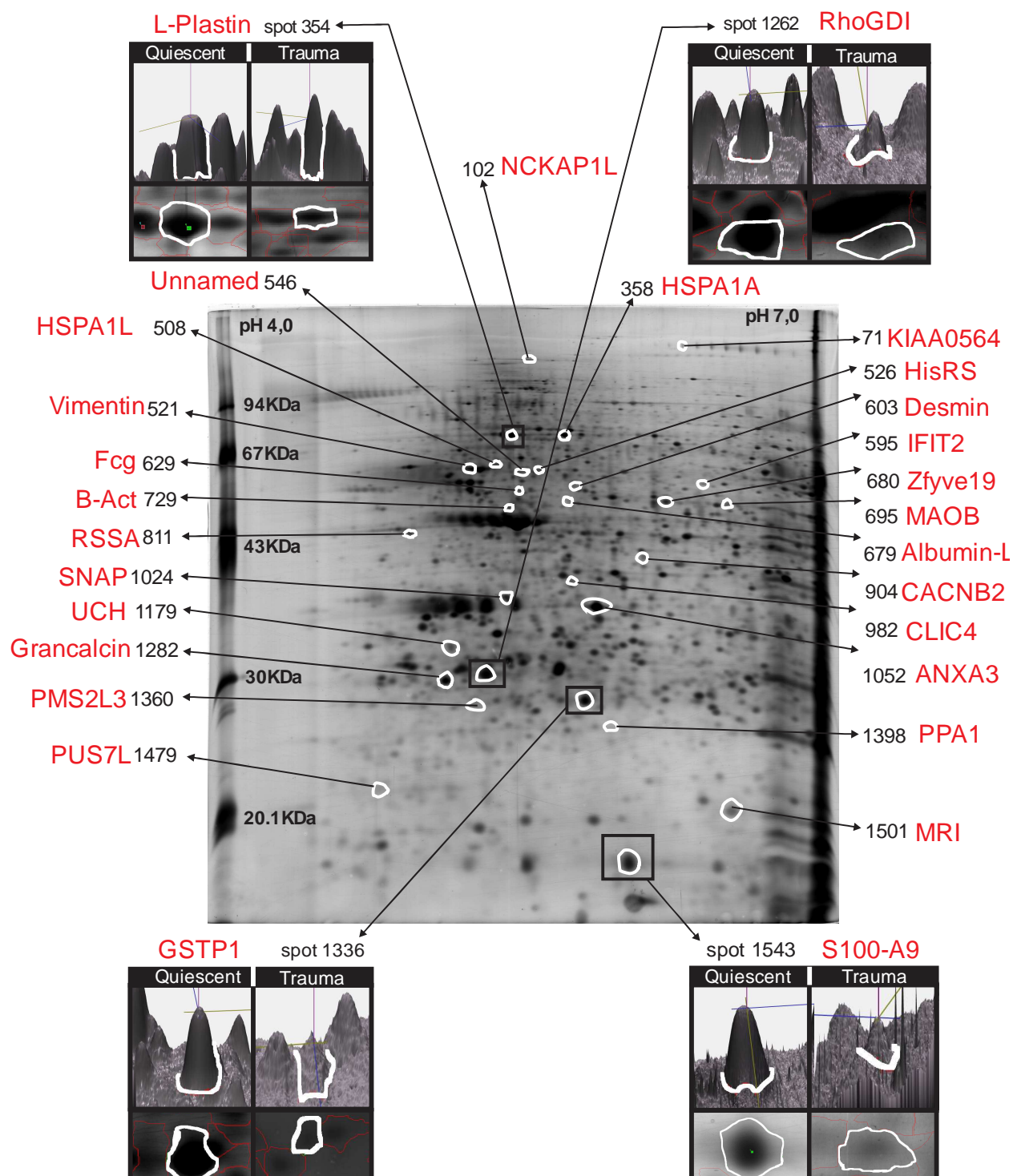
↑T: Expressão Aumentada na Condição Pós-Trauma

^b PMF Score: Escore de análise de *peptide mass fingerprint*, usando o programa *Mascot* e o banco de dados não-redundante *NCBI*.

^c PMF C (%): porcentagem de cobertura da sequência dos peptídeos encontrados pela pesquisa por *peptide mass fingerprint*.

^d MS/MS Score: Escore de análise dos espectros de fragmentação dos peptídeos, usando o programa *Mascot* e o banco de dados não-redundante *NCBI*.

Figura 17 – Mapa proteômico ácido de neutrófilos quiescentes.



Delimitados em branco na imagem central estão 29 proteínas identificadas, das que compõem este trabalho de análise comparativa entre polimorfonucleares quiescentes e ativados *in vivo*, em consequência de trauma grave. As imagens das 4 extremidades exemplificam comparações de volume entre os dois grupos para 4 spots que tiveram expressão diferencial. Ainda nas 4 imagens, na visualização tridimensional do spot, a altura do

pico representa a intensidade de coloração e a imagem correspondente no gel encontra-se logo abaixo. Escritos em vermelho estão os nomes das proteínas identificadas.

5) Discussão:

A partir dos dados decorrentes da tabela 6 e em acordo com o que será discutido neste tópico, a análise por espectrometria de massa, conforme a padronização dos métodos de validação por PMF e MS/MS, possibilitou a identificação de algumas proteínas até então nunca descritas em neutrófilos. As identificações das proteínas foram validadas, em algumas situações, em função de modificações pós-traducionais, uma vez que foram encontradas formas modificada e não modificada dos peptídeos, ou, em outros casos, confirmações através da presença de oxidação de metionina e acetilação em posição N-terminal nos peptídeos, por exemplo.

I. Proteína com expressão aumentada após ativação de neutrófilos devido a trauma grave

a) PPA1 (*spot* 1398) –

Quando ativados, os neutrófilos gastam mais energia para realizar suas funções, como quimiotaxia e produção de espécies reativas de oxigênio a partir da atividade do complexo enzimático NADPH oxidase (**Borregaard and Herlin, 1982**). O metabolismo energético destes leucócitos é demonstrado pelo consumo de glicose por meio de duas vias principais. A primeira delas é a glicólise, também conhecida como via do metabolismo anaeróbico, que gera lactato, ATP e NADP. A outra é a via das pentoses, ou via do fosfogluconato, que produz ribose-5-fosfato, CO₂ e NADPH. O NADPH é um transportador de energia química na forma de poder redutor, e é um componente fundamental para síntese de ânion superóxido, um radical livre destrutivo para tecidos e patógenos. Por outro lado, nos períodos iniciais do pós-trauma grave, onde os níveis sanguíneos do hormônio glucagon encontram-se elevados, os neutrófilos reduzem o consumo de glicose, necessitando de outras fontes de energia para cumprir suas atividades. Em situações como esta, a maioria dos tecidos (à exceção de tecido nervoso e hemácias) é capaz de utilizar ácidos graxos como combustível. Assim, os ácidos graxos são degradados em um processo conhecido como β -oxidação, onde ocorre a formação de 106 ATP/mol (a partir de ácido palmítico) em etapas de cadeia mitocondrial transportadora de elétrons e ciclo do ácido cítrico. Antes de serem oxidados, os ácidos graxos são ativados pela adição de CoA para formar acil-CoA graxo. A formação deste último é favorecida pela hidrólise de duas ligações de “alta energia” do ATP, onde pirofosfato inorgânico é hidrolisado pela pirofosfatase (PPA1) (**Motta, 2005; Nelson and Cox, 2005**). Assim, é compreensível que PPA1 tenha uma expressão aumentada nos neutrófilos ativados após trauma grave, especialmente nas horas iniciais do processo, devido à descarga aumentada de glucagon no sangue periférico. Além disso, já foi relatado que a pirofosfatase está associada à indução de apoptose (**Ilina, 2005**), um fenômeno que também está correlacionado com algumas proteínas descritas adiante.

II. Proteínas com expressão diminuída após ativação de neutrófilos devido a trauma grave

b) UCH-L5 (*spot* 1179) –

A atividade biológica de uma proteína é dependente de sua estrutura tridimensional. Entretanto, para alcançar essa estrutura durante a síntese é necessária a ocorrência de um delicado processo. Sugere-se que mais de 30% de todas as novas proteínas sintetizadas em uma célula nunca atingem seus estados ativos (**Schubert et al., 2000**). Quando enovelamentos errôneos de proteínas inviabilizam sua participação no funcionamento celular, mecanismos moleculares que previnem o acúmulo de proteínas erroneamente enoveladas são acionados com conseqüente formação de agregados e degradação. Duas medidas de proteção são utilizadas pela célula: a atuação de moléculas conhecidas como chaperonas e o sistema ubiquitina-proteassoma. As chaperonas estabilizam conformações proteicas nãoativas e promovem o enovelamento das proteínas para suas formas ativas sempre que possível. Alternativamente, proteínas enoveladas erroneamente são removidas da célula por degradação, quando envolvidas pelo sistema ubiquitina-proteassoma (**Patterson and Hohfeld, 2006**). UCH-L5 (ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L5) é uma enzima deubiquitinadora, que remove o peptídeo de ubiquitina da proteína que antes se encontrava marcada, ao hidrolisar a parte C-terminal do mesmo (**Nishio et al., 2009**). Essa enzima está associada com um complexo remodelador de cromatina e participa na regulação de fenômenos de transcrição e reparo de DNA (**Yao et al., 2008**). O achado de UCH-L5 como proteína expressa em níveis diminuídos nos neutrófilos ativados pós-trauma sugere um decréscimo nos mecanismos celulares de reparo, re-processamento proteico e regulação de transcrição, conforme havia sido proposto por Hossain et al. (**Hossain et al., 2009**).

c) L-Plastin (*spot* 354), Vimentin (*spot* 521) e β -Actin (*spot* 729) –

L-plastina é uma proteína empacotadora de feixes de actina, envolvida com as modificações que acontecem no citoesqueleto do leucócito ativado. Nesse

ínterim, o auxílio da L-plastina em formação de pseudópodes e quimiotaxia conferem à membrana plasmática um aspecto de folha pregueada (**Janji et al., 2006; Wabnitz et al., 2007**).

Vimentina é uma proteína filamentosa do citoesqueleto do neutrófilo que auxilia nos processos de adesão e quimiotaxia (**Moisan et al., 2007**). Ela é secretada para o meio extracelular e participa de processos citotóxicos, como a execução de patógenos pela geração de metabólitos derivados do oxigênio (**Moisan and Girard, 2006; Mor-Vaknin et al., 2003**).

β -Actina é a isoforma de actina expressa em neutrófilos (**Nunoi et al., 1999**). Como o principal constituinte do citoesqueleto destes leucócitos, ela configura-se em filamentos, criando um maquinário de feixes para rápida e eficiente movimentação da célula durante a quimiotaxia (**Cicchetti et al., 2002**).

A diminuição da expressão dessas 3 proteínas de citoesqueleto após a ativação dos neutrófilos devida ao trauma provavelmente está relacionada com processamento pós-traducional. E esse processamento possivelmente está mais envolvido com secreção, proteólise ou junção das proteínas em complexos durante os processos de remodelagem da membrana do que com decréscimo na expressão gênica das mesmas. Tais afirmativas confirmam os achados de Suchard e Boxer (**Suchard and Boxer, 1989**) e Mambole e colaboradores (**Mambole et al., 2008**) que descrevem a clivagem de proteínas de citoesqueleto durante a ativação de polimorfonucleares.

d) RSSA (*spot 811*) –

RSSA (40S ribosomal protein SA) ou receptor tipo 1 de laminina é uma proteína requerida para montagem e/ou estabilização da subunidade ribossomal 40S. Ela é encontrada em membranas, no citoplasma e no núcleo, e, especificamente em neutrófilos, na membrana dos grânulos específicos ou secundários (**Mollinedo, 2003**), correspondendo a um receptor de superfície para laminina. Esta é uma glicoproteína da membrana basal justaposta ao endotélio de vasos sanguíneos (**Bohnsack et al., 1990; Sixt et al., 2001**).

Após exposição a citocinas em um evento inflamatório, células endoteliais aumentam a expressão de laminina (**Sixt et al., 2001**). Um estudo realizado com neutrófilos quiescentes de coelhos revelou a presença de laminina também na superfície dos leucócitos, e presumivelmente ligada ao seu receptor (**Terranova et al., 1986**). O achado de quantidades menores do receptor tipo 1 de laminina após ativação neutrofílica pós-trauma pode representar um aumento do conjunto receptor–laminina nos leucócitos ativados, uma ocorrência precedente ao desenvolvimento de adesão, transmigração e quimiotaxia. Sabe-se que os polimorfonucleares respondem quimiotaticamente à laminina e preferencialmente usam essa glicoproteína durante o ataque ao colágeno tipo IV (presente nos vasos sanguíneos) e penetração nos tecidos (**Bryant et al., 1987**). Assim, se ainda existirem receptores de laminina desocupados na superfície da célula, os neutrófilos ativados poderiam ancorar-se, por meio deste receptor, a moléculas de laminina do endotélio e migrar em resposta a gradientes da referida glicoproteína, também presente em leucócitos já situados nos sítios ativos de inflamação ou injúria pós-trauma.

e) Grancalcin (*spot 1282*) –

Grancalcina é uma proteína citossólica que se liga a Ca^{+2} , expressa em grandes quantidades em neutrófilos. Ela pertence à família de proteínas PEF (proteínas com 5 domínios, no formato de uma mão e seus 5 dedos) e transloca-se para as membranas dos grânulos primários (azurofílicos) e secundários (específicos) sob ativação neutrofílica (**Roes et al., 2003; Teahan et al., 1992**). Nos polimorfonucleares ativados, grancalcina interage com L-plastina em etapas dependentes de Ca^{+2} dos processos de adesão e achatamento das células sobre o endotélio (**Lollike et al., 2001; Xu et al., 2006**). A diminuição quantitativa de grancalcina e L-plastina após ativação dos neutrófilos pós-trauma são condizentes e tais resultados são indicativos de que as células estavam acionando seus mecanismos moleculares para aderir e migrar. Isso pode ser inferido na medida em que moléculas de grancalcina podem associar-se às de L-plastina por oligomerização quando os leucócitos atingem seu estado ativado (**Jia et al., 2000**).

f) S100-A9 (*spot* 1543) –

S100-A9 (myeloid-related protein 14 ou MRP14) e S100-A8 (myeloid-related protein 8 ou MRP8) são as principais moléculas de ligação a Ca^{+2} expressas em neutrófilos (**Vogl *et al.*, 2004**). Essas proteínas da família S100 participam de processos de adesão e migração, além de colaborarem para o aumento da expressão de β_2 -integrina e ativação da NADPH oxidase em neutrófilos (**Kerkhoff *et al.*, 2005**; **Sroussi *et al.*, 2009**; **Vogl *et al.*, 2004**). S100-A9 (em um complexo com S100-A8) é direcionada para a superfície dos leucócitos e excitada durante a entrada de Ca^{+2} e ativação das células (**Bode *et al.*, 2008**; **Vandal *et al.*, 2003**; **Viemann *et al.*, 2005**). A exocitose de S100-A9 induz a ocorrência de quimiotaxia e desgranulação, pela via metabólica MAPK, em outros neutrófilos (**Simard *et al.*, 2010**). Tais afirmativas tornam consistentes os resultados de diminuição de expressão de S100-A9 neste trabalho e no trabalho comparativo entre neutrófilos estimulados *in vitro* por PAF (**Aquino, 2007**).

g) SNAP (*spot* 1024) e ANXA3 (*spot* 1052) –

SNAP (α -soluble NSF attachment protein) é uma proteína envolvida em transporte de substâncias produzidas pela célula entre as organelas retículo endoplasmático, aparelho de Golgi e vesículas secretórias. Ela corresponde a um adaptador de SNARE (receptor solúvel para ligação a NSF). Ao proporcionar a ligação de SNARE com NSF (N-ethylmaleimide-sensitive factor) (**Subramaniam *et al.*, 1997**), SNAP proporciona a abertura de poros e posterior fusão entre as membranas das organelas referidas, e constitui-se em agente primordial para ocorrência de exocitose (**Abonyo *et al.*, 2003**; **Rothman, 1994**; **Weber *et al.*, 2000**).

ANXA3 (annexin A3) é uma proteína de ligação a fosfolípidos dependente de Ca^{+2} com funcionamento relacionado à exocitose, formação ou modulação de canais de Ca^{+2} , adesão à membrana plasmática de elementos do citoesqueleto, inibição de fosfolipase A2 e clivagem de inositol 1,2-fosfato cíclico (cIns(1,2)P) a inositol 1-fosfato (Ins(1)P) (**Sekar *et al.*, 1996**). ANXA3

coopera com processos de fusão de membranas de organelas e agregação de grânulos em neutrófilos, conforme foi observado quando estes leucócitos engolfaram partículas fúngicas e moléculas de ANXA3 acumularam-se na área perifagossomal (**Le Cabec and Maridonneau-Parini, 1994**).

Sugere-se que SNAP e ANXA3 possuíram expressão reduzida nos neutrófilos ativados após o trauma pelo envolvimento destas proteínas com eventos de fusão entre membranas de organelas. Assim, SNAP e ANXA3 poderiam estar complexadas a elementos que proporcionem cooperativamente abertura de poros (**Weber et al., 2000**) ou canais de Ca^{+2} (**Hofmann et al., 2000**) em membranas.

h) HSPA1A (*spot 358*) –

O enovelamento das proteínas, *in vivo*, é auxiliado por proteínas HSP (*heat shock proteins*), ou chaperonas, como HSPA1A e HSPA1L. Através da atuação destas proteínas, há uma eficiência aumentada na síntese proteica, já que elas previnem a agregação de proteínas enoveladas erroneamente (**Patterson and Hohfeld, 2006**). HSPA1A (heat shock 70 kDa protein 1) estabiliza proteínas contra agregação e intervém no enovelamento de proteínas recém-traduzidas, localizadas tanto no citossol quanto em organelas, protegendo a célula contra danos oxidativos e retardando a apoptose (**Hoving et al., 2000**). Sua presença em níveis menores nos neutrófilos ativados pela inflamação pós-trauma grave revela que, neste estado funcional, as células estão mais propensas a sofrer injúrias oxidativas.

i) GSTP1 (*spot 1336*) –

GSTP1 (Glutathione S-transferase P) é uma enzima citoplasmática com importante participação na detoxificação de espécies reativas de oxigênio (ERO) e manutenção do estado *redox* celular. O estresse oxidativo envolve aumento na formação de (em escala de maior reatividade): radical hidroxil ($\bullet\text{OH}$), ânion superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), genericamente chamados de ERO. Como esses radicais frequentemente induzem danos em

moléculas de lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos, houve uma pressão seletiva que favoreceu o desenvolvimento de sistemas de defesa celulares que cooperam para a limpeza e detoxificação de ERO. Um antioxidante pode ser definido como uma substância que, quando presente em baixas concentrações comparadas com substratos oxidáveis, pode significativamente reduzir ou prevenir a oxidação daquele substrato. Nesta definição, o termo “substrato oxidável” abrange tudo aquilo que se refere a células, incluindo proteínas, lipídios, carboidratos e DNA (**Atalay et al., 2004**). Um dos possíveis mecanismos em que os antioxidantes podem proteger o organismo contra a toxicidade do oxigênio é a promoção de ambiente favorável para um efetivo funcionamento de outros antioxidantes (como um cofator ou a ativação e manutenção do estado *redox* celular) (**Sen, 2001**). Um grande número de substâncias fisiológicas são conhecidas por terem função de afinidade antioxidante, como superóxido dismutase, catalase e o sistema glutationa, onde se inclui a GSTP1. Yin e colaboradores (**Yin et al., 2000**) mostraram que GSTP1, em fibroblastos de camundongos, participa da regulação de vias metabólicas de estresse oxidativo do tipo JNK (jun N-terminal kinase) e protege as células contra apoptose após exposição a H₂O₂. Em macrófagos, essa mesma enzima inibe a ocorrência da via metabólica MAPK (mitogen-activated protein kinase), induzida por LPS, reduzindo a síntese de TNF- α e óxido nítrico (NO) (**Xue et al., 2005**). A presença de GSTP1 em níveis diminuídos nos neutrófilos ativado pós-trauma também coopera para a sugestão de que estes leucócitos, quando ativados, possuem diminuída proteção contra dano oxidativo, fato que os torna mais predispostos a sofrer apoptose.

Após a ocorrência do trauma grave, macrófagos teciduais e células endoteliais são impelidos a produzir TNF- α e IL-1 β , citocinas sistêmicas pró-inflamatórias. O TNF- α encontra dois tipos de receptores na superfície dos polimorfonucleares, p60TNFR e p80TNFR, tendo uma atividade de estimulação (*priming*) sobre as células (**Kilpatrick et al., 2002**). Por meio do receptor p60TNFR ou CD95, a citocina ativa a via de sinalização Fas, para apoptose nestes leucócitos (**Aggarwal, 2000**). A IL-6, citocina produzida em resposta à presença de IL-1 β circulante, tem papéis paradoxais, e age tanto a favor como

contrariamente ao desenvolvimento do processo inflamatório. Na vigência de endotoxemia (infecção aguda por bactérias Gram negativas), IL-6 opera como citocina anti-inflamatória, pois promove uma diminuição na síntese de TNF- α (**Romani et al., 1996**), o que refreia a sinalização pró-apoptótica nos neutrófilos. Além disso, a presença de sepse por bactérias Gram negativas promove o contato de macrófagos e neutrófilos com LPS (lipopolissacáride da parede bacteriana), induzindo um aumento na síntese de TNF- α e ativação da via pró-apoptótica nos neutrófilos (**Vulcano et al., 1998; Zhang et al., 2003**). O contato subsequente dos polimorfonucleares (2° desafio) com peptídeos formilados de bactérias Gram positivas - fMLP – impede a continuação da via pró-apoptótica disparada por p60TNFR, pois aquele impede a produção de TNF- α nas células estimuladas por LPS (**Vulcano et al., 1998**).

j) RhoGDI (*spot 1262*) –

Rho e Rac são proteínas de ligação a GTP, pertencentes à família de proteínas Rho. Rac, ou p21, coopera no funcionamento da NADPH oxidase dos neutrófilos e pode auxiliar na polimerização de actina, que, conseqüentemente, promove as mudanças estruturais na membrana plasmática para formação dos pseudópodes. Rho coopera na formação dos feixes de actina e dos sítios focalizados de adesão celular, o que também fomenta respostas de motilidade dos polimorfonucleares (**Tolias et al., 1998**). RhoGDI é um determinante essencial do funcionamento das proteínas da família Rho, já que ele inibe a dissociação de GDP e previne a hidrólise de GTP, mantendo as proteínas da família Rho em suas formas solúveis (citossólicas) (**Bokoch et al., 1994**). Em neutrófilos quiescentes Rac é associada com RhoGDI, como um complexo citossólico (**Bokoch et al., 1994; Ugolev et al., 2008**). Na ocorrência da ativação destes leucócitos, Rac é liberada deste complexo e torna-se associada com p67^{phox}, p47^{phox} e citocromo b₅₅₈ na membrana plasmática (**Abo et al., 1994**), que configurará a montagem da NADPH oxidase e a produção de ERO. Por sua vez, RhoGDI pode tornar-se um componente dos fagossomos nos neutrófilos ativados, por associar-se covalentemente a estruturas que formarão o fagossomo. Sugere-se que, pela possibilidade de associar-se

através de ligação covalente a estruturas que compõem o fagossomo, a observação de expressão diminuída de RhoGDI nas células ativadas pelo trauma é coerente.

III. Proteínas exclusivamente observadas em neutrófilos quiescentes

k) KIAA0564 (*spot* 71), HisRS (*spot* 526), IFIT2 (*spot* 595), MRI (*spot* 1501), PMS2L3 (*spot* 1360) e PUS7L (*spot* 1479) –

Ao lado de UCH-L5, que possuiu expressão diminuída após ativação neutrofílica devido ao trauma, estas proteínas compõem um subgrupo de componentes envolvidos em processos de tradução.

A proteína KIAA0564 é provavelmente uma ATPase (catalisa a hidrólise do ATP para originar ADP e P_i) e liga-se a nucleotídeos, como um modulador de expressão gênica (**Levy and Loomis, 2007**).

HisRS (histidyl-tRNA synthetase) é uma enzima homodimérica, existente em dois estados conformacionais distintos, responsável pela síntese de RNA transportador de histidina, componente essencial para a incorporação do aminoácido histidina às proteínas (**Freist et al., 1999**).

IFIT2 (interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 2) é um produto gênico expresso a partir de estimulação da célula por interferon (IFN). Das duas classes de IFN, a classe II abrange o tipo de interferon mais potente dentro do processo inflamatório: IFN- γ . Esta citocina é produzida por linfócitos e macrófagos / monócitos (**Schroder et al., 2004**). Sua atuação nos neutrófilos potencializa a produção de ERO e a secreção do conteúdo de grânulos específicos, induz a expressão do receptor de anticorpo Fc γ RI, ou CD64, e aumenta a expressão do receptor tipo 3 do complemento (CR3), também conhecido como Mac-1 ou β_2 -integrina ou CD11b/CD18 (**Cassatella et al., 1991**). IFN- γ exerce seus efeitos nos neutrófilos através de interação com um receptor específico, estruturado em 2 cadeias polipeptídicas, localizado na superfície dos leucócitos. A maioria dos efeitos que promove nos polimorfonucleares é devido a vários produtos gênicos, como IFIT2, que por sua vez são regulados por vias metabólicas JAK/STAT1 e MAPK ERK1/2

(Ramana *et al.*, 2002). IFIT2 especificamente promove regulação de transcrição e tradução, processamento de proteassoma, apoptose e atividades anti-virais e anti-proliferativas (Lai *et al.*, 2008).

MRI (modulator of retrovirus infection) é uma proteína citoplasmática ainda sem função definida que participa da regulação da atividade do proteassoma por *splicing*. Sua depleção em células humanas ocasiona uma diminuição na infecção pelo vírus HIV-1 (Agarwal *et al.*, 2006). Em células eucarióticas, a maioria das proteínas destinadas à degradação são inicialmente marcadas por uma cadeia polipeptídica de ubiquitina, em um processo dependente de energia, e posteriormente digeridas a pequenos peptídeos pela ação do proteassoma 26S, um grande complexo proteolítico envolvido na regulação da divisão celular, expressão e apresentação gênica. Este complexo multicatalítico 26S é formado pela associação das subunidades 19S e 20S, que constituem a forma ativa do proteassoma *in vivo*, responsável por grande parte do processo regular de degradação intracelular de proteínas ou *turnover* proteico (Berti, 2010). O DNA humano é constituído por 25000 genes, distribuídos por 23 pares de cromossomos. Ele é transcrito no núcleo e origina um pré-mRNA, que posteriormente será processado por vários mecanismos, como o *splicing*, antes de tornar-se um RNA funcional. Porém, apenas 5% do DNA total codifica proteínas, os chamados exons. Os restantes 95% correspondem a DNA que não é codificado, constituindo sequências não-codificantes e introns. Mecanismos de *splicing*, como os promovidos com a atuação de MRI, são de extrema importância porque selecionam partes codificantes de um gene, de forma a facilitar a tradução das proteínas por meio dos ribossomos. A existência de múltiplos introns e exons em um gene possibilita a combinação de vários exons, de maneira que um pré-mRNA pode originar múltiplos mRNA e, conseqüentemente, várias proteínas (Alberts *et al.*, 2002).

A atividade de reparo de pareamentos errôneos no DNA é crucial para manutenção da integridade do genoma. Os mecanismos que conduzem a esta reparação utilizam múltiplas proteínas responsáveis pelo reconhecimento de intermediários alterados. Nesse sentido, a proteína PMS2L3 (postmeiotic

segregation increased 2-like 3) compõe um mecanismo de reparo de pareamentos errôneos na dupla fita de DNA, através do recrutamento de fatores celulares para cortar e sintetizar novas moléculas deste ácido nucléico (**Meyers et al., 1997; Shah and Eckert, 2009**).

PUS7L (pseudouridylate synthase 7 homolog (*Saccharomyces cerevisiae*)-like) é a enzima pseudouridina sintase, que em uma molécula de RNA catalisa a isomerização de uridinas específicas a pseudouridinas, durante o processamento de tRNA (**Bechtel et al., 2007; TheMammalianGeneCollectionProjectTeam, 2004**).

O encontro das proteínas KIAA0564, HisRS, IFIT2, MRI, PMS2L3 e PUS7L apenas em neutrófilos quiescentes, somado à diminuição de expressão da proteína UCH-L5 nas células ativadas pelo trauma grave, mostra uma correlação entre elas, do ponto de vista funcional. Inserido nesse parâmetro, estes resultados sugerem uma atividade maior de vias bioquímicas e enzimas que modificam as proteínas após suas traduções se comparada com a ocorrência de síntese de novas proteínas, corroborando achados já descritos na literatura (**Lindemann et al., 2004**). Além disso, tais achados fortalecem a hipótese de que vias metabólicas de reparo estão suprimidas em uma célula propensa à apoptose, conforme também foi observado pelo trabalho de ativação de neutrófilos *in vitro* com fMLP (**Neves, 2010**). Um outro grupo de pesquisa em proteômica de polimorfonucleares também descreveu que há pouca concordância entre transcrições de mRNA e quantificação de novas proteínas nestes leucócitos (**Fessler et al., 2002a; Fessler et al., 2002b**).

l) NCKAP1L (*spot 102*) –

NCKAP1L (NCK-associated protein 1-like) é uma proteína transmembrânica, envolvida com ativação de Rac, polimerização de filamentos de actina e regulação da fosforilação de cadeias de miosina (uma proteína de citoesqueleto) para proporcionar movimentação e quimiotaxia dos neutrófilos (**Weiner et al., 2006**). Aqui reside outro possível complexo de interação entre proteínas, especificamente entre β -actina e NCKAP1L (**Weiner et al., 2007**), e

pode explicar a ausência desta última, associada à diminuição da primeira proteína, nos leucócitos ativados.

m) HSPA1L (*spot 508*) –

HSPA1L (heat shock 70 kDa protein 1-like) é uma chaperona, variante alélica da HSPA1A (**Patterson and Hohfeld, 2006**), possuidora das mesmas características funcionais desta última. Sua presença exclusiva ao grupo de neutrófilos quiescentes, aliada à diminuição de sua variante HSPA1A nas células ativadas devido ao trauma, é condizente com os demais resultados observados e confirma os relatos de que os leucócitos ativados estão predispostos a sofrer maior dano oxidativo e, conseqüentemente, apoptose.

n) Desmin (*spot 603*) –

Desmina é uma proteína filamentosa de classe III, pertencente a neutrófilos, à semelhança de vimentina. Já foi relatado que fagossomos de neutrófilos ativados são ricos em desmina (**Burlak et al., 2006**). E esta, por meio de fosforilações de PKC (proteína quinase C), associa-se com fibras de actina para formação de pseudópodes (**Kreienbuhl et al., 1992**). O achado de desmina como exclusivamente detectada em neutrófilos quiescentes suporta a hipótese de que os leucócitos ativados em decorrência do trauma grave tornam-se preparados para montar a maquinaria responsável pela fagocitose. Nesse ínterim, moléculas de desmina poderiam estar conectadas a feixes de actina, fato que justificaria sua ausência nos polimorfonucleares ativados utilizados neste trabalho.

o) Albumin-like protein (*spot 679*) –

A proteína semelhante à albumina, observada pela primeira vez em neutrófilos, tem uma estrutura similar à proteínas da família da albumina, como a proteína de ligação à vitamina D (DBP). Esta última pode ligar-se a feixes de actina no citoesqueleto (**Cooke, 1986**), funcionando como um cofator para a ligação de C5a ao seu receptor (C5aR ou CD88) na superfície dos neutrófilos

(Shah *et al.*, 2006; Zhang and Kew, 2004). C5a é uma glicoproteína, considerada como uma anafilatoxina pela clivagem de C5 durante a ativação do sistema do complemento. A ligação C5a-C5aR ocasiona a ativação de PLC (phospholipase C), PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase), PLA2 (phospholipase A2) e PLD (phospholipase D), gerando entrada de Ca^{+2} na célula, necessária para desgranulação (Jiang *et al.*, 1996), produção de PIP_3 (phosphatidylinositol triphosphate) e mudança de forma na membrana plasmática para quimiotaxia (Ember and Hugli, 1997). Além disso, quando a cascata de MAPK é ativada ocorre montagem de NADPH oxidase e produção de ERO (Gerard and Gerard, 1994). Como é postulado para DBP, conjectura-se que esta proteína semelhante à albumina, após ligar-se às fibras de actina, é proteoliticamente processada (Zhang and Kew, 2004), fato que explicaria sua não detecção nos polimorfonucleares ativados pós-trauma.

p) Zfyve19 (*spot* 680) –

Zfyve19 (zinc finger FYVE domain-containing protein 19) é um membro do grupo de proteínas com domínios FYVE, caracterizados como domínios de ligação a fosfoinositídeos. A ligação é altamente específica para $\text{PtdIns}(3)\text{P}$ (phosphatidylinositol 3-phosphate) e o reconhecimento da molécula é dependente de Zn^{+2} (Wywiał and Singh, 2010). Esta proteína, também pela primeira vez observada em neutrófilos, está envolvida em eventos, como transporte de compostos das vesículas secretórias e exocitose (Kutateladze, 2006; Rameh and Cantley, 1999). A falta de Zfyve19 nos leucócitos ativados pelo trauma poderia ser devida ao processamento proteolítico que esta proteína sofre depois que interage com $\text{PtdIns}(3)\text{P}$ e é recrutada para membranas exocíticas (Kutateladze, 2006; Rameh and Cantley, 1999), sugerindo que ela seja secretada pelos polimorfonucleares ativados.

q) MAOB (*spot* 695) –

MAOB (monoamine oxidase type B) é uma enzima presente na membrana externa das mitocôndrias. Ela catalisa a deaminação oxidativa de aminas primárias, tendo como cofator o dinucleotídeo adenina-flavina (FAD) (Binda *et*

al., 2004; Newton-Vinson *et al.*, 2000). A reação catalisada por enzimas monoamina oxidases (MAO) pode ser assim exemplificada: $R-H_2-NH_2 + O_2 + H_2O \rightarrow R-CHO + H_2O_2 + NH_3$. Como aconteceu para Albumin-like e Zfyve19, este trabalho relata pela primeira vez o encontro desta proteína em neutrófilos. Em um estudo feito com pulmões de ratos, sugeriu-se que MAOB poderia estar envolvida com transmigração e quimiotaxia de leucócitos em direção a sítios inflamatórios (O'Rourke *et al.*, 2008), pois H_2O_2 é considerada molécula sinalizadora (Vega *et al.*, 2004). Como a atuação da referida enzima desencadeia o surgimento de espécies tóxicas de nitrogênio (ERN) e oxigênio (ERO), conhecidos promotores de dano mitocondrial e apoptose (Bortolato *et al.*, 2008), o desaparecimento de MAOB após a ativação dos neutrófilos pode estar associado com o aumento de radicais tóxicos produzidos durante este estado celular e consequente degeneração de mitocôndrias.

r) CACNB2 (*spot 904*) –

CACNB2 (calcium channel voltage-dependent beta-2 subunit) é uma subunidade de um canal de Ca^{+2} , membro de uma família de proteínas que atuam como canais de Ca^{+2} (Correll *et al.*, 2008). O aumento na quantidade de Ca^{+2} do citossol é um pré-requisito para a ativação de neutrófilos. Os íons cálcio entram na célula através de aberturas feitas por canais de Ca^{+2} situados na membrana plasmática, e estes íons funcionam como sinalizadores para vias metabólicas que conduzem à ativação de PLA2 e, consequentemente, de NADPH oxidase, adesão, desgranulação e exocitose, e síntese de IL-8 (Catterall, 2000; Tintinger *et al.*, 2005). O abastecimento dos estoques intracelulares de Ca^{+2} após a ativação celular envolve o acoplamento de proteínas dos canais de Ca^{+2} da membrana plasmática com receptores de IP3 (inositol trifosfato), fato que poderia explicar não demonstração de CACNB2 nos polimorfonucleares ativados pelo trauma grave.

s) CLIC4 (*spot 982*) –

As proteínas CLIC (chloride intracellular channel) são homólogas estruturais de glutathione S-transferases, e a tipo 4 - CLIC4 - é predominantemente expressa em organelas, como fagossomos e grânulos, onde seja necessária apropriada acidificação citoplasmática ou fagossômica. CLIC4 não é apenas um canal para saída de Cl^- (íons cloreto), mas também possui atividade no transporte de prótons, funcionando como um portão para passagem de Cl^-/H^+ (**Zifarelli and Pusch, 2007**). As mudanças no pH do citoplasma dos neutrófilos após a ativação incluem uma rápida acidificação seguida por uma lenta alcalinização. A rápida acidificação é atribuída à geração de ácido fosfatídico e a lenta alcalinização é devida à atuação de proteínas que funcionam como portões para passagem de Na^+/H^+ e Cl^-/H^+ (**Bernardo et al., 2002; Simchowitz and Roos, 1985**). Variações no pH intracelular através de canais que permitem trocas de íons modulam diversas funções nos polimorfonucleares, como adesão e quimiotaxia, fagocitose, secreção de enzimas e liberação de ERO por parte de NADPH oxidase (**Busetto et al., 2007**). Quando os leucócitos tornam-se ativados, as β_2 -integrinas sofrem mudanças conformacionais, promovendo reorganização do citoesqueleto e ativação do complexo enzimático da NADPH oxidase. Como as proteínas canais de Cl^- operam nos neutrófilos após ligarem-se às β_2 -integrinas (**Menegazzi et al., 1999**), sugere-se que CLIC4 tenha sido indetectável nas células ativadas devido à interação física da mesma com as integrinas. Além disso, o achado de CLIC4 como exclusiva de neutrófilos quiescentes é condizente com a diminuição de expressão de GSTP1 nos leucócitos ativados, por similaridade.

t) Antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC)-enhanced $\text{Fc}\gamma$ fragment (*spot 629*) –

Na molécula de anticorpo, enquanto a fração Fab opsoniza o antígeno, a região $\text{Fc}\gamma$ representa um ligante para as classes de receptor $\text{Fc}\gamma$ - $\text{Fc}\gamma\text{RIII}$ (CD16), $\text{Fc}\gamma\text{RII}$ (CD32) e $\text{Fc}\gamma\text{RI}$ (CD64) – que diferem por suas afinidades ao anticorpo devido às suas estruturas moleculares diferentes (**Sondermann and Oosthuizen, 2002**). Assim, $\text{Fc}\gamma\text{RI}$ liga-se a IgG mais fortemente que $\text{Fc}\gamma\text{RII}$ e

Fc γ RIII porque aquele tem uma porção extracelular composta por 3 domínios do tipo imunoglobulina e os outros, apenas dois. Esta propriedade permite a ativação de Fc γ RI por uma única molécula de IgG (monômero), enquanto os outros dois receptores Fc γ precisam ligar-se a múltiplas moléculas de IgG (imunocomplexos) para serem ativados (**Fridman, 1991**). Como receptor de membrana, Fc γ RIII é ancorado por GPI (glycosylphosphatidylinositol). Por sua vez, Fc γ RI e Fc γ RII são proteínas transmembrânicas, com cauda citoplasmática (**Meddows-Taylor et al., 1997; Middelhoven et al., 1997; Sondermann and Oosthuizen, 2002**). Além disso, Fc γ RIII está presente na superfície de neutrófilos quiescentes e Fc γ RI é um marcador característico de células ativadas (**Davis et al., 2006; Fjaertoft et al., 2007**). Durante a ativação dos polimorfonucleares, e também durante a apoptose, Fc γ RIII é liberado da superfície celular por clivagem proteolítica, e a enzima responsável por este processo é provavelmente uma metaloprotease, que se liga à membrana, liberada de grânulos (**Middelhoven et al., 1997**). O achado do fragmento Fc γ apenas nas células quiescentes poderia representar o rompimento de agregados proteicos na membrana plasmática (lipídeos e proteínas pouco solúveis na membrana) e a quebra de interações moleculares entre as proteínas, situações configuradas pelo tampão de lise sobre os polimorfonucleares após coleta e separação (**Teles, 2005**). Assim, o rompimento de agregados protéicos na membrana plasmática dos leucócitos gerado pelo tampão de lise e a diferença estrutural entre as moléculas de receptor de anticorpo Fc γ RIII (célula não ativada) e Fc γ RI (célula ativada) seriam os responsáveis pela observação do fragmento Fc γ somente nos neutrófilos quiescentes.

IV. Sumário e Conjecturas

Embora diversos estudos tenham esclarecido muitos eventos acerca do papel dos neutrófilos no processo inflamatório, várias questões continuam sem respostas. Os resultados deste trabalho mostram diferenças entre os padrões proteômicos de polimorfonucleares quiescentes e ativados por intenso processo inflamatório desencadeado por trauma grave, com relatos de três proteínas sendo observadas pela primeira vez nesta célula (Albumin-like, Zfyve19 e MAOB), todas presentes em quantidades diferentes nas condições analisadas. Dentre as proteínas que diferenciam as duas condições, um subgrupo evidencia reorganização do citoesqueleto, motilidade celular e adesão, mesmo em células do *pool* circulante (L-Plastin, Vimentin, β -Actin, RhoGDI, NCKAP1L, Desmin e Albumin-like). Algumas, como Grancalcin, S100-A9, CACNB2 e CLIC4, reforçam as correlações vistas entre motilidade e fluxo de íons. Outras ainda constituem-se em fragmentos de receptores ou receptores de superfície dos polimorfonucleares, como Fc γ -fragment e RSSA. Um outro subgrupo de proteínas, constituído por SNAP, ANXA3 e Zfyve19, compreende compostos envolvidos com transporte entre organelas e vesículas secretórias, e exocitose. São demonstradas também evidências de que neutrófilos ativados podem apresentar proteção reduzida contra dano oxidativo, tornando-se predispostos a sofrer apoptose, baseadas no encontro de GSTP1, UCH-L5 e HSPA1A em concentrações diminuídas nos leucócitos ativados, PPA1 como aumentada em expressão nas células ativadas, e HSPA1L e MAOB como exclusivas de neutrófilos quiescentes. Mudanças quantitativas em proteínas participantes de processos de tradução e reparo (KIAA0564, HisRS, IFIT2, MRI, PMS2L3 e PUS7L) também suportam esta hipótese.

Em termos clínicos, a presença da enzima PPA1 em concentrações aumentadas no pós-trauma grave sugere que os pacientes, cujas amostras de sangue foram utilizadas nesse trabalho, provavelmente atravessavam a fase metabólica adrenérgica corticoide no momento da coleta. Nesta fase do pós-trauma, o consumo de glicose e os níveis aumentados do hormônio

pancreático glucagon justificam a utilização aumentada de ácidos graxos como fonte de energia pelas células.

Com respeito à morte celular programada dos polimorfonucleares ativados, observa-se que a literatura apresenta pontos conflitantes. Em um estudo acerca da estimulação dos leucócitos por meio de TNF- α , o paradoxo pode ser um pouco esclarecido, já que as vias metabólicas configuradas a partir dos receptores dessa citocina (também conhecidos como receptores de morte) podem bifurcar em vias anti- e pró-apoptóticas (**Kilpatrick et al., 2002**). Sabe-se ainda que os grânulos primários ou azurofílicos dos neutrófilos ativados liberam catepsina D, substância deflagradora de processamento proteolítico de caspase-8, dando início a eventos pró-apoptóticos como ativação de caspase-3 (**Conus et al., 2008**). Assim, com base nos dados literários, conjectura-se que nas horas iniciais após o trauma grave, os polimorfonucleares podem apresentar uma propensão à apoptose. Porém, nos períodos seguintes ocorre uma reversão para um quadro anti-apoptótico, quando na progressão do processo inflamatório a medula óssea é estimulada à síntese de novas células, a partir dos níveis aumentados de GM-CSF e G-CSF, conhecidas citocinas inibidoras de apoptose (**Kilpatrick et al., 2010**). Ainda relacionando os resultados deste trabalho com dados da literatura, pode-se conjecturar que uma possível entrada de microrganismos, especialmente bactérias Gram negativas, e sua disseminação nos indivíduos politraumatizados (em uma situação de sepse) conduziriam a apoptose dos neutrófilos.

6) Conclusões:

Através do seu impressionante conjunto de armas citotóxicas, os polimorfonucleares são capazes de progredir de um estado quiescente na corrente sanguínea para um estado totalmente ativado nos tecidos, quando na presença, por exemplo, de um patógeno ou de tecidos lesados. A quebra da sequência fisiológica de um processo inflamatório, por exemplo, na disseminação de citocinas e quimioatraentes vistas no trauma grave e na sepse, causa ativação inapropriada dos neutrófilos associada com lesões tissulares e orgânicas paradoxais.

Os resultados deste estudo permitiram:

a) Identificação de um conjunto de diferenças entre o padrão proteômico de neutrófilos quiescentes e ativados por intenso processo inflamatório desencadeado por trauma grave. Algumas das proteínas identificadas nesta análise comparativa revelam uma considerável perda de auto-proteção contra injúrias oxidativas e a apoptose como um evento ao qual os neutrófilos nas horas iniciais após o trauma grave estão propensos.

b) Ratificação de diversos dados da literatura ao observar que os neutrófilos são células em intensa atividade, dispensando uma grande quantidade de energia para execução de suas funções. Sendo assim, os ácidos graxos constituem a principal fonte de energia utilizada pelos polimorfonucleares ativados.

c) Identificação de proteínas que operam mudanças drásticas na estrutura física dos leucócitos ativados, pela reorganização do citoesqueleto.

d) Identificação de proteínas que capacitam as células ativadas a uma capacidade aumentada para interagir com o meio externo, tanto para entrada quanto para secreção de substâncias.

Estes dados poderão colaborar ricamente para a criação de abordagens mais eficazes com respeito a um bloqueio seletivo da inflamação e

possivelmente serão de relevante auxílio clínico e laboratorial em reduzir a incidência e/ou a severidade de complicações clínicas, como ARDS e sepse.

7) Perspectivas:

a) Várias proteínas podem vir a se tornar marcadores moleculares para diagnóstico / tratamento de quadros mórbidos vistos após trauma grave, através de uma análise mais detalhada da variação populacional dessas proteínas.

b) Continuar (para mapa proteômico ácido) e iniciar (para mapa proteômico alcalino) as identificações por PMF das proteínas diferencialmente expressas e exclusivas entre os grupos Q e T, confirmando com fragmentação para proteínas cuja validação apresente alguma dúvida.

c) Confirmação das alterações celulares observadas neste trabalho em comparações com estudos de estimulação / ativação *in vitro* utilizando TNF- α e LPS, em andamento no grupo de pesquisas (especialmente tendência dos neutrófilos à apoptose).

REFERÊNCIAS

- Abo, A., Webb, M. R., Grogan, A., *et al.* (1994). "Activation of NADPH oxidase involves the dissociation of p21rac from its inhibitory GDP/GTP exchange protein (rhoGDI) followed by its translocation to the plasma membrane." *Biochem J* 298: 585-591.
- Abonyo, B. O., Wang, P., Narasaraju, T. A., *et al.* (2003). "Characterization of Alpha-Soluble N-Ethylmaleimide–Sensitive Fusion Attachment Protein in Alveolar Type II Cells Implications in Lung Surfactant Secretion." *Am J Respir Cell Mol Biol* 29: 273-282.
- Abramson, D., Scalea, T. M., Hitchcock, R., *et al.* (1993). "Lactate clearance and survival following injury." *J Trauma* 35(4): 584-588.
- Adams Jr, C. A., Hauser, C. J., Adams, J. M., *et al.* (2002). "Trauma-hemorrhage-induced neutrophil priming is prevented by mesenteric lymph duct ligation." *Shock* 18(6): 513-517.
- Aebersold, R. and Goodlett, D. R. (2001). "Mass spectrometry in proteomics." *Chem Rev* 101(2): 269-295.
- Aebersold, R. and Mann, M. (2003). "Mass spectrometry-based proteomics." *Nature* 422(6928): 198-207.
- Agarwal, S., Harada, J., Schreifels, J., *et al.* (2006). "Isolation, characterization, and genetic complementation of a cellular mutant resistant to retroviral infection." *PNAS* 103(43): 15933–15938.
- Aggarwal, B. B. (2000). "Tumour necrosis factor receptor associated signalling molecules and their role in activation of apoptosis, JNK and NF-kappa-B." *Ann Rheum Dis* 59: 6–16.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., *et al.* (2002). Molecular Biology of the Cell. New York, Garland: 1300.
- Aldred, S., Grant, M. M. and Griffiths, H. R. (2004). "The use of proteomics for the assessment of clinical samples in research." *Clin Biochem* 37(11): 943-952.
- Anderson, L. and Seilhamer, J. (1997). "A comparison of selected mRNA and protein abundances in human liver." *Electrophoresis* 18(3-4): 533-537.
- Anderson, N. G. and Anderson, N. L. (1996). "Twenty years of two-dimensional electrophoresis: past, present and future." *Electrophoresis* 17(3): 443-453.
- Aquino, E. N. (2007). Análise Proteômica Comparativa Entre Neutrófilos Quiescentes E Estimulados Com Fator De Agregação Plaquetária (PAF). Departamento de Pós-Graduação em Patologia Molecular - Faculdade de Medicina. Brasília (DF), Universidade de Brasília. **Dissertação de Mestrado**: 149.
- Atalay, M., Oksala, N. K., Laaksonen, D. E., *et al.* (2004). "Exercise training modulates heat shock protein response in diabetic rats." *J Appl Physiol* 97(2): 605-611.
- Baker, S. P., O'Neill, B., Haddon, W., *et al.* (1974). "The Injury Severity Score: a method for describing patients with multiple injuries and evaluating emergency care." *J Trauma* 14: 187-196.

- Balbino, C. A., Pereira, L. M. and Curi, R. (2005). "Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão." *Braz J Pharmac Sci* 41(1): 27-51.
- Bechtel, S., Rosenfelder, H., Duda, A., *et al.* (2007). "The full-ORF clone resource of the German cDNA Consortium." *BMC Genomics* 8: 399-411.
- Bernardo, J., Hartlaub, H., Yu, X., *et al.* (2002). "Immune complex stimulation of human neutrophils involves a novel Ca²⁺/H⁺ exchanger that participates in the regulation of cytoplasmic pH: flow cytometric analysis of Ca²⁺/pH responses by subpopulations." *J Leukoc Biol* 72: 1172–1179.
- Berti, D. A. (2010). Peptídeos Intracelulares na Obesidade e Resistência à Insulina. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Tecidual, Instituto de Ciências Biomédicas. São Paulo (SP), Universidade de São Paulo. Tese de Doutorado: 183.
- Binda, C., Hubálek, F., Li, M., *et al.* (2004). "Crystal structures of monoamine oxidase B in complex with four inhibitors of the N-propargylaminoindan class." *J Med Chem* 47(7): 1767-1774.
- Birolini, D. (1997). "Trauma e a Evolução do Homem." *Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões* 95: 4.
- Biron, D. G., Brun, C., Lefevre, T., *et al.* (2006). "The pitfalls of proteomics experiments without the correct use of bioinformatics tools." *Proteomics* 6(20): 5577-5596.
- Blackwell, T. S. and Christman, J. W. (1996). "Sepsis and cytokines: current status." *Br J Anaesth* 77(1): 110-117.
- Blajchman, M. A. (2002). "Immunomodulation and blood transfusion." *Am J Ther* 9(5): 389-395.
- Bode, G., Luken, A., Kerkhoff, C., *et al.* (2008). "Interaction between S100A8/A9 and Annexin A6 Is Involved in the Calcium-induced Cell Surface Exposition of S100A8/A9." *J Biol Chem* 283(46): 31776–31784.
- Bohnsack, J. F., Akiyama, S. K., Damsky, C. H., *et al.* (1990). "Human neutrophil adherence to laminin in vitro. Evidence for a distinct neutrophil integrin receptor for laminin." *J Exp Med* 171(4): 1221-1237.
- Bokoch, G. M., Bohl, B. P. and Chuang, T. H. (1994). "Guanine nucleotide exchange regulates membrane translocation of Rac/Rho GTP-binding proteins." *J Biol Chem* 269(50): 31674-31679.
- Bone, R. C. (1991). "Sepsis, the sepsis syndrome, multi-organ failure: a plea for comparable definitions." *Ann Intern Med* 114(4): 332-333.
- Bone, R. C. (1996). "Toward a theory regarding the pathogenesis of the systemic inflammatory response syndrome: what we do and do not know about cytokine regulation." *Crit Care Med* 24(1): 163-172.
- Bone, R. C. (1997). Systemic inflammatory response syndrome: a unifying concept of systemic inflammation. Sepsis and Multiple Organ Failure. Fein, A. M., Abraham, E. M., Balk, R. A., *et al.* Baltimore, Williams & Wilkins: 35-42.
- Borregaard, N. and Herlin, T. (1982). "Energy Metabolism of Human Neutrophils during Phagocytosis." *J Clin Invest* 70: 550-557.
- Bortolato, M., Chen, K. and Shih, J. C. (2008). "Monoamine oxidase inactivation: from pathophysiology to therapeutics." *Adv Drug Deliv Rev* 60(13-14): 1527–1533.
- Botha, A. J., Moore, F. A., Moore, E. E., *et al.* (1995). "Postinjury neutrophil priming and activation states: therapeutic challenges." *Shock* 3(3): 157-166.

- Boussac, M. and Garin, J. (2000). "Calcium-dependent secretion in human neutrophils: a proteomic approach." *Electrophoresis* 21(3): 665-672.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." *Anal Biochem* 72: 248-254.
- Brown, R. A., Lever, R., Jones, N. A., *et al.* (2003). "Effects of heparin and related molecules upon neutrophil aggregation and elastase release in vitro." *Br J Pharmacol* 139(4): 845-853.
- Bruschi, M., Musante, L., Candiano, G., *et al.* (2003). "Soft immobilized pH gradient gels in proteome analysis: a follow-up." *Proteomics* 3(6): 821-825.
- Bryant, G., Rao, C. N., Brentani, M., *et al.* (1987). "A role for the laminin receptor in leukocyte chemotaxis." *J Leukoc Biol* 41(3): 220-227.
- Burlak, C., Whitney, A. R., Mead, D. J., *et al.* (2006). "Maturation of Human Neutrophil Phagosomes Includes Incorporation of Molecular Chaperones and Endoplasmic Reticulum Quality Control Machinery." *Mol Cell Proteomics* 5: 620-634.
- Busetto, S., Trevisan, E., Decleva, E., *et al.* (2007). "Chloride Movements in Human Neutrophils during Phagocytosis: Characterization and Relationship to Granule Release." *J Immunol* 179: 4110-4124.
- Campos, A. R. (2007). Application of Proteomics and Cytomics in Human Neutrophils Functional Studies. Departamento de Pós-Graduação em Patologia Molecular (Faculdade de Medicina) e Plataforma de Proteômica. Brasília (Brasil) e Barcelona (Espanha), Universidade de Brasília e Science Park of Barcelona. **Dissertação de Mestrado**.
- Candiano, G., Musante, L., Bruschi, M., *et al.* (2002). "Two-dimensional maps in soft immobilized pH gradient gels: a new approach to the proteome of the Third Millennium." *Electrophoresis* 23(2): 292-297.
- Capsoni, F., Minonzio, F., Ongari, A. M., *et al.* (1997). "Interleukin-10 down-regulates oxidative metabolism and antibody-dependent cellular cytotoxicity of human neutrophils." *Scand J Immunol* 45(3): 269-275.
- Cassatella, M. A., Bazzoni, F., Calzetti, F., *et al.* (1991). "Interferon-gamma transcriptionally modulates the expression of the genes for the high affinity IgG-Fc receptor and the 47-kDa cytosolic component of NADPH oxidase in human polymorphonuclear leukocytes." *J Biol Chem* 266(33): 22079-22082.
- Cassatella, M. A., Meda, L., Gasperini, S., *et al.* (1994). "Interleukin 10 (IL-10) upregulates IL-1 receptor antagonist production from lipopolysaccharide-stimulated human polymorphonuclear leukocytes by delaying mRNA degradation." *J Exp Med* 179(5): 1695-1699.
- Castro, M. S., Sa, N. M., Gadelha, R. P., *et al.* (2006). "Proteome analysis of resting human neutrophils." *Protein Pept Lett* 13(5): 481-487.
- Catterall, W. A. (2000). "Structure and regulation of voltage-gated Ca²⁺ channels." *Annu Rev Cell Dev Biol* 16: 521-555.
- Chernoff, A. E., Granowitz, E. V., Shapiro, L., *et al.* (1995). "A randomized, controlled trial of IL-10 in humans. Inhibition of inflammatory cytokine production and immune responses." *J Immunol* 154(10): 5492-5499.
- Cicchetti, G., Allen, P. G. and Glogauer, M. (2002). "Chemotactic signaling pathways in neutrophils: from receptor to actin assembly." *Crit Rev Oral Biol Med* 13(3): 220-228.

- Cinat, M. E., Waxman, K., Granger, G. A., *et al.* (1994). "Trauma causes sustained elevation of soluble tumor necrosis factor receptors." *J Am Coll Surg* 179(5): 529-537.
- Claridge, J. A., Sawyer, R. G., Schulman, A. M., *et al.* (2002). "Blood transfusions correlate with infections in trauma patients in a dose-dependent manner." *Am Surg* 68(7): 566-572.
- Cooke, N. E. (1986). "Rat vitamin D binding protein. Determination of the full-length primary structure from cloned cDNA." *J Biol Chem* 261(7): 3441-3450.
- Correll, R. N., Pang, C., Niedowicz, D. M., *et al.* (2008). "The RGK family of GTP-binding Proteins: Regulators of Voltage-dependent Calcium Channels and Cytoskeleton Remodeling." *Cell Signal* 20(2): 292-300.
- Cristea, I. M., Gaskell, S. J. and Whetton, A. D. (2004). "Proteomics techniques and their application to hematology." *Blood* 103: 3624-3634.
- Dang, P. M., Elbim, C., Marie, J. C., *et al.* (2006). "Anti-inflammatory effect of interleukin-10 on human neutrophil respiratory burst involves inhibition of GM-CSF-induced p47PHOX phosphorylation through a decrease in ERK1/2 activity." *Faseb J* 20(9): 1504-1506.
- Davis, B. H., Olsen, S. H., Ahmad, E., *et al.* (2006). "Neutrophil CD64 Is an Improved Indicator of Infection or Sepsis in Emergency Department Patients." *Arch Pathol Lab Med* 130: 654-661.
- Dossett, L. A., Heffernan, D., Lightfoot, M., *et al.* (2008). "Obesity and Pulmonary Complications in Critically Injured Adults." *Chest* 134(5): 974-980.
- Dovas, A. and Couchman, J. R. (2005). "RhoGDI: multiple functions in the regulation of Rho family GTPase activities." *Biochem J* 390: 1-9.
- El-Benna, J., Dang, P. M. and Gougerot-Pocidalò, M. A. (2008). "Priming of the neutrophil NADPH oxidase activation: role of p47phox phosphorylation and NOX2 mobilization to the plasma membrane." *Semin Immunopathol* 30(3): 279-289.
- Elgert, K. D. (2009). Immunology: Understanding The Immune System. New Jersey, Wiley-Blackwell: 726p.
- Ember, J. A. and Hugli, T. E. (1997). "Complement factors and their receptors." *Immunopharmacology* 38(1-2): 3-15.
- Eng, J., McCormack, A. L. and Yates III, J. R. (1994). "An approach to correlate tandem mass spectral data of peptides with amino acid sequences in a protein database." *J Am Soc Mass Spectrom.* 5: 976-989.
- Engelfriet, C. P., Reesink, H. W., Brand, A., *et al.* (2001). "Transfusion-related acute lung injury (TRALI)." *Vox Sang* 81(4): 269-283.
- Ensenauer, R., Puttmann, M., Quintel, M., *et al.* (1994). "Comparison of serum phospholipase A2, polymorphonuclear granulocyte elastase, C-reactive protein and serum amyloid A with the APACHE II score in the prognosis of multiple injured patients." *Clin Investig* 72(11): 843-849.
- Ertel, W., Keel, M., Bonaccio, M., *et al.* (1995). "Release of anti-inflammatory mediators after mechanical trauma correlates with severity of injury and clinical outcome." *J Trauma* 39(5): 879-885.
- Feliciano, D. V., Mattox, K. L. and Moore, E. E. (2004). Trauma. New York, McGraw-Hill Professional.
- Fenn, J. B., Mann, M., Meng, C. K., *et al.* (1989). "Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules." *Science* 246(4926): 64-71.

- Ferraz, A. A. B. and Ferraz, E. M. (2002). "Sepse Abdominal." Programa de Atualização de Antibióticos em Cirurgia 1(3): 1-25.
- Fessler, M. B., Malcolm, K. C., Duncan, M. W., *et al.* (2002a). "A genomic and proteomic analysis of activation of the human neutrophil by lipopolysaccharide and its mediation by p38 mitogen-activated protein kinase." J Biol Chem 277(35): 31291-31302.
- Fessler, M. B., Malcolm, K. C., Duncan, M. W., *et al.* (2002b). "Lipopolysaccharide stimulation of the human neutrophil: an analysis of changes in gene transcription and protein expression by oligonucleotide microarrays and proteomics." Chest 121(3): 75-76.
- Fjaertoft, G., Haringkansson, L. D., Pauksens, K., *et al.* (2007). "Neutrophil CD64 (FcγRI) expression is a specific marker of bacterial infection: A study on the kinetics and the impact of major surgery " Scand J Infect Dis 39(6-7): 525-535.
- Fontes, B. and Poggetti, R. S. (1996). "Mechanisms and evaluation of multiple organ and system failure after trauma." Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo 51(2): 72-77.
- Frank, J., Maier, M., Koenig, J., *et al.* (2002). "Circulating Inflammatory and Metabolic Parameters to Predict Organ Failure after Multiple Trauma." Eur J Trauma 28: 333-339.
- Freire, E. (2004). Trauma: A Doença dos Séculos. São Paulo, Atheneu: 3075.
- Freist, W., Verhey, J. F., Rühlmann, A., *et al.* (1999). "Histidyl-tRNA synthetase." Biol Chem 380(6): 623-646.
- Fridman, W. H. (1991). "Fc receptors and immunoglobulin binding factors." FASEB J 5(12): 2684-2690.
- Fry, D. E. (2000). Systemic inflammatory response and multiple organ dysfunction syndrome: biologic domino effect. Multiple organ failure: pathophysiology, prevention and therapy. Baue, A. E., Faist, E. and Fry, D. E. New York, Spring-Verlag: 23-29.
- Gabay, C. and Kushner, I. (1999). "Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation." N Engl J Med 340(6): 448-454.
- Gauldie, J., Richards, C. and Baumann, H. (1992). "IL6 and the acute phase reaction." Res Immunol 143(7): 755-759.
- Gerard, C. and Gerard, N. P. (1994). "C5A anaphylatoxin and its seven transmembrane-segment receptor." Annu Rev Immunol 12: 775-808.
- Gerstman, B. B. (2008). Basic Biostatistics: Statistics for Public Health Practice. Sudbury, Jones and Bartlett: 531.
- Girndt, M., Kaul, H., Sester, U., *et al.* (2002). "Anti-inflammatory interleukin-10 genotype protects dialysis patients from cardiovascular events." Kidney Int 62(3): 949-955.
- Glasser, L. and Fiederlein, R. L. (1990). "The effect of various cell separation procedures on assays of neutrophil function. A critical appraisal." Am J Clin Pathol 93(5): 662-669.
- Goldsby, R. A., Kindt, T. J. and Osborne, B. A. (2002). Kuby Immunology. New York, W. H. Freeman and Company: 560.
- Gorg, A., Boguth, G., Kopf, A., *et al.* (2002). "Sample prefractionation with Sephadex isoelectric focusing prior to narrow pH range two-dimensional gels." Proteomics 2(12): 1652-1657.
- Gorg, A., Boguth, G., Obermaier, C., *et al.* (1995). "Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis with immobilized pH gradients in the

- first dimension (IPG-Dalt): the state of the art and the controversy of vertical versus horizontal systems." *Electrophoresis* 16(7): 1079-1086.
- Gorg, A., Obermaier, C., Boguth, G., *et al.* (2000). "The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients." *Electrophoresis* 21(6): 1037-1053.
- Goris, R. J., Te Boekhorst, T. P., Nuytinck, J. K., *et al.* (1985). "Multiple-organ failure. Generalized autodestructive inflammation?" *Arch Surg* 120(10): 1109-1115.
- Graves, P. R. and Haystead, T. A. J. (2002). "Molecular biologist's guide to proteomics." *Microbiol Mol Biol Rev* 66(1): 39-63.
- Grottke, O., Henzler, D. and Rossaint, R. (2007). "Use of blood and blood products in trauma." *Best Pract Res Clin Anaesthesiol* 21(2): 257-270.
- Gygi, S. P., Corthals, G. L., Zhang, Y., *et al.* (2000). "Evaluation of two-dimensional gel electrophoresis-based proteome analysis technology." *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(17): 9390-9395.
- Haasper, C., Kalmbach, M., Dikos, G. D., *et al.* (2010). "Prognostic value of procalcitonin (PCT) and/or interleukin-6 (IL-6) plasma levels after multiple trauma for the development of multi organ dysfunction syndrome (MODS) or sepsis." *Technol Health Care* 18(2): 89-100.
- Haslett, C., Guthrie, L. A., Kopaniak, M. M., *et al.* (1985). "Modulation of multiple neutrophil functions by preparative methods or trace concentrations of bacterial lipopolysaccharide." *Am J Pathol* 119(1): 101-110.
- Henzel, W. J., Billeci, T. M., Stults, J. T., *et al.* (1993). "Identifying proteins from two-dimensional gels by molecular mass searching of peptide fragments in protein sequence databases." *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(11): 5011-5015.
- Ho, A. S. and Moore, K. W. (1994). "Interleukin-10 and its receptor." *Ther Immunol* 1(3): 173-185.
- Hoch, R. C., Rodriguez, R., Manning, T., *et al.* (1993). "Effects of accidental trauma on cytokine and endotoxin production." *Crit Care Med* 21(6): 839-845.
- Hofmann, A., Raguénès-Nicol, C., Favier-Perron, B., *et al.* (2000). "The annexin A3-membrane interaction is modulated by an N-terminal tryptophan." *Biochemistry* 39(26): 7712-7721.
- Hossain, M. A., Claggett, J. M., Nguyen, T., *et al.* (2009). "The cap binding complex influences H2B ubiquitination by facilitating splicing of the SUS1 pre-mRNA." *RNA* 15(8): 1515-1527.
- Hoving, S., Gerrits, B., Voshol, H., *et al.* (2002). "Preparative two-dimensional gel electrophoresis at alkaline pH using narrow range immobilized pH gradients." *Proteomics* 2(2): 127-134.
- Hoving, S., Voshol, H. and Van Oostrum, J. (2000). "Towards high performance two-dimensional gel electrophoresis using ultrazoom gels." *Electrophoresis* 21(13): 2617-2621.
- IBMCompany (2004). SPSS® 13.0, <http://www.spss.com/>.
- Iliina, Y. (2005). Functions of the yeast protein Stm1 and its involvement in apoptotic cell death. Institut für Biochemie. Stuttgart, Universität Stuttgart. **Doctorate Thesis**: 98.
- Insunza, A., Romon, I., Gonzalez-Ponte, M. L., *et al.* (2004). "Implementation of a strategy to prevent TRALI in a regional blood centre." *Transfus Med* 14(2): 157-164.

- Janji, B., Giganti, A., De Corte, V., *et al.* (2006). "Phosphorylation on Ser5 increases the F-actin-binding activity of L-plastin and promotes its targeting to sites of actin assembly in cells." *J Cell Sci* 119: 1947-1960.
- Jensen, O. N. (2006). "Interpreting the protein language using proteomics." *Nat Rev Mol Cell Biol* 7(6): 391-403.
- Jia, J., Han, Q., Borregaard, N., *et al.* (2000). "Crystal structure of human grancalcin, a member of the penta-EF-hand protein family." *J Mol Biol* 300(5): 1271-1281.
- Jiang, H., Kuang, Y., Wu, Y., *et al.* (1996). "Pertussis toxin-sensitive activation of phospholipase C by the C5a and fMet-Leu-Phe receptors." *J Biol Chem* 271: 13430-13434.
- Johnson, M., Zaretskaya, I., Raytselis, Y., *et al.* (2008). "NCBI BLAST: a better web interface." *Nucleic Acids Res* 36: 5-9.
- Kaplanski, G., Marin, V., Montero-Julian, F., *et al.* (2003). "IL-6: a regulator of the transition from neutrophil to monocyte recruitment during inflammation." *Trends Immunol* 24(1): 25-29.
- Karas, M. and Hillenkamp, F. (1988). "Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons." *Anal Chem* 60(20): 2299-2301.
- Kasper, B., Thole, H. H., Patterson, S. D., *et al.* (1997). "Cytosolic proteins from neutrophilic granulocytes: a comparison between patients with severe chronic neutropenia and healthy donors." *Electrophoresis* 18(1): 142-149.
- Kaye, A. D., Hoover, J. M. and Baluch, A. R. (2005). "A contemporary review of multiple organ failure." *Middle East J Anesthesiol* 18(2): 273-292.
- Kerkhoff, C., Nacken, W., Benedyk, M., *et al.* (2005). "The arachidonic acid-binding protein S100A8/A9 promotes NADPH oxidase activation by interaction with p67phox and Rac-2." *FASEB J* 19(3): 467-469.
- Kilpatrick, L. E., Lee, J. Y., Haines, K. M., *et al.* (2002). "A role for PKC-delta and PI 3-kinase in TNF-alpha-mediated antiapoptotic signaling in the human neutrophil." *Am J Physiol Cell Physiol* 283(1): 48-57.
- Kitchen, E., Rossi, A. G., Condliffe, A. M., *et al.* (1996). "Demonstration of reversible priming of human neutrophils using platelet-activating factor." *Blood* 88(11): 4330-4337.
- Knaus, W. A., Draper, E. A., Wagner, D. P., *et al.* (1985). "APACHE II: a severity of disease classification system." *Crit Care Med* 13(10): 818-829.
- Kreienbuhl, P., Keller, H. and Niggli, V. (1992). "Protein Phosphatase Inhibitors Okadaic Acid and Calyculin A Alter Cell Shape and F-Actin Distribution and Inhibit Stimulus-Dependent Increases in Cytoskeletal Actin of Human Neutrophils." *Blood* 80(11): 2911-2919.
- Kutateladze, T. G. (2006). "Phosphatidylinositol 3-phosphate recognition and membrane docking by the FYVE domain." *Biochim Biophys Acta* 1761: 868-877.
- Lai, K. C., Chang, K. W., Liu, C. J., *et al.* (2008). "IFN-Induced Protein with Tetratricopeptide Repeats 2 Inhibits Migration Activity and Increases Survival of Oral Squamous Cell Carcinoma." *Mol Cancer Res* 6(9): 1431-1439.

- Laugesen, S. and Roepstorff, P. (2003). "Combination of Two Matrices Results in Improved Performance of MALDI MS for Peptide Mass Mapping and Protein Analysis." *J Am Soc Mass Spectrom* 14: 992–1002.
- Le Cabec, V. and Maridonneau-Parini, I. (1994). "Annexin 3 is associated with cytoplasmic granules in neutrophils and monocytes and translocates to the plasma membrane in activated cells." *Biochem J* 303: 481-487.
- Levy, D. E. and Loomis, C. A. (2007). "STAT3 Signaling and the Hyper-IgE Syndrome." *N Engl J Med* 357(16): 1655-1658.
- Lindemann, S. W., Yost, C. C., Denis, M. M., *et al.* (2004). "Neutrophils alter the inflammatory milieu by signal-dependent translation of constitutive messenger RNAs." *PNAS* 101(18): 7076–7081.
- Llullaku, S. S., Hyseni, N. S., Bytyçi, C. I., *et al.* (2009). "Evaluation of trauma care using TRISS method: the role of adjusted misclassification rate and adjusted w-statistic." *World J Emerg Surg* 4: 1-6.
- Locke, V. L., Gibson, T. S., Thomas, T. M., *et al.* (2002). "Gradiflow as a prefractionation tool for two-dimensional electrophoresis." *Proteomics* 2(9): 1254-1260.
- Lollike, K., Johnsen, A. H., Durussel, I., *et al.* (2001). "Biochemical Characterization of the Penta-EF-hand Protein Grancalcin and Identification of L-plastin as a Binding Partner." *J Biol Chem* 276(21): 17762–17769.
- Lopez, A. D. and Mathers, C. D. (2006). "Measuring the global burden of disease and epidemiological transitions: 2002-2030." *Ann Trop Med Parasitol* 100(5-6): 481-499.
- Magalhães, A. D., Charneau, S., Paba, J., *et al.* (2008). "Trypanosoma cruzi alkaline 2-DE: Optimization and application to comparative proteome analysis of flagellate life stages." *Proteome Sci.* Sep 8;24. 6: 24-36.
- Mambole, A., Baruch, D., Nusbaum, P., *et al.* (2008). "The Cleavage of Neutrophil Leukosialin (CD43) by Cathepsin G Releases Its Extracellular Domain and Triggers Its Intramembrane Proteolysis by Presenilin/Gamma-Secretase." *J Biol Chem* 283(35): 23627–23635.
- Mannick, J. A., Rodrick, M. L. and Lederer, J. A. (2001). "The immunologic response to injury." *J Am Coll Surg* 193(3): 237-244.
- Meddows-Taylor, S., Martin, D. J. and Tiemessen, C. T. (1997). "Altered Expression of FcγRIII (CD16) on Polymorphonuclear Neutrophils from Individuals with Human Immunodeficiency Virus Type 1 Disease and Pulmonary Tuberculosis." *Clin Diagn Lab Immunol* 4(6): 789–791.
- Meduri, G. U., Headley, S., Kohler, G., *et al.* (1995). "Persistent elevation of inflammatory cytokines predicts a poor outcome in ARDS. Plasma IL-1 beta and IL-6 levels are consistent and efficient predictors of outcome over time." *Chest* 107(4): 1062-1073.
- Menegazzi, R., Busetto, S., Decleva, E., *et al.* (1999). "Triggering of Chloride Ion Efflux from Human Neutrophils as a Novel Function of Leukocyte β2 Integrins: Relationship with Spreading and Activation of the Respiratory Burst." *J Immunol* 162: 423–434.
- Meyers, M., Theodosiou, M., Acharya, S., *et al.* (1997). "Cell Cycle Regulation of the Human DNA Mismatch Repair Genes hMSH2, hMLHJ, and hPMS2." *Cancer Res* 57: 206-208.

- Middelhoven, P. J., Ager, A., Roos, D., *et al.* (1997). "Involvement of a metalloprotease in the shedding of human neutrophil Fc gammaRIIIB." *FEBS Lett* 414(1): 14-18.
- Mineki, R., Taka, H., Fujimura, T., *et al.* (2002). "In situ alkylation with acrylamide for identification of cysteinyl residues in proteins during one- and two-dimensional sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis." *Proteomics* 2(12): 1672-1681.
- Moisan, E., Chiasson, S. and Girard, D. (2007). "The intriguing normal acute inflammatory response in mice lacking vimentin." *Clin Exp Immunol* 150: 158–168.
- Moisan, E. and Girard, D. (2006). "Cell surface expression of intermediate filament proteins vimentin and lamin B1 in human neutrophil spontaneous apoptosis." *J Leukoc Biol* 79: 489-498.
- Mollinedo, F. (2003). "Human neutrophil granules and exocytosis molecular control." *Inmunologia* 22(4): 340-358.
- Moore, F. A., Moore, E. E. and Sauaia, A. (1997). "Blood transfusion. An independent risk factor for postinjury multiple organ failure." *Arch Surg* 132(6): 620-624.
- Mor-Vaknin, N., Punturieri, A., Sitwala, K., *et al.* (2003). "Vimentin is secreted by activated macrophages." *Nat Cell Biol* 5(1): 59-63.
- Morris Jr, J. A., MacKenzie, E. J. and Edelstein, S. L. (1990). "The effect of preexisting conditions on mortality in trauma patients." *JAMA* 263(14): 1942-1946.
- Moshage, H. (1997). "Cytokines and the hepatic acute phase response." *J Pathol* 181(3): 257-266.
- Motta, V. T. (2005). Metabolismo dos Lipídeos. Bioquímica. Motta, V. T. Caxias do Sul, EDUCS: 264-308.
- Nast-Kolb, D., Waydhas, C., Jochum, M., *et al.* (1992). "Biochemical factors as objective parameters for assessing the prognosis in polytrauma." *Unfallchirurg* 95(2): 59-66.
- Nelson, D. L. and Cox, M. M. (2005). Lehninger: Princípios de Bioquímica, Sarvier: 1119.
- Neves, A. C. D. (2010). Análise Proteômica Comparativa Entre Neutrófilos Quiescentes E Ativados Com Formyl - Methionyl – Leucyl – Phenylalanine (fMLP). Departamento de Pós-Graduação em Patologia Molecular - Faculdade de Medicina. Brasília (DF), Universidade de Brasília. **Dissertação de Mestrado**.
- Newton-Vinson, P., Hubalek, F. and Edmondson, D. E. (2000). "High-level expression of human liver monoamine oxidase B in *Pichia pastoris*." *Protein Expr Purif* 20(2): 334-345.
- Nihiro, H., Otsuka, T., Izuhara, K., *et al.* (1997). "Regulation by interleukin-10 and interleukin-4 of cyclooxygenase-2 expression in human neutrophils." *Blood* 89(5): 1621-1628.
- Nishimura, M., Ishikawa, Y. and Satake, M. (2004). "Activation of polymorphonuclear neutrophils by immune complex: possible involvement in development of transfusion-related acute lung injury." *Transfus Med* 14(5): 359-367.

- Nishioa, K., Kimb, S. W., Kawaic, K., *et al.* (2009). "Crystal structure of the de-ubiquitinating enzyme UCH37 (human UCH-L5) catalytic domain." *Biochem Biophys Res Commun* 390(3): 855-860.
- Nunoi, E. H., Yamazaki, T., Tsuchiya, H., *et al.* (1999). "A heterozygous mutation of beta-actin associated with neutrophil dysfunction and recurrent infection." *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 8693-8698.
- O'Farrell, P. H. (1975). "High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins." *J Biol Chem* 250: 4007-4021.
- O'Rourke, A. M., Wang, E. Y., Miller, A., *et al.* (2008). "Anti-Inflammatory Effects of LJP 1586 [Z-3-Fluoro-2-(4-methoxybenzyl)allylamine Hydrochloride], an Amine-Based Inhibitor of Semicarbazide-Sensitive Amine Oxidase Activity." *J Pharmacol Exp Ther* 324(2): 867-875.
- Offner, P. J. and Moore, E. E. (2000). Risk factors for MOF and pattern of organ failure following severe trauma. Multiple organ failure: pathophysiology, prevention and therapy. Baue, A. E., Faist, E. and Fry, D. E. New York, Springer-Verlag: 30-43.
- Pandey, A. and Mann, M. (2000). "Proteomics to study genes and genomes." *Nature* 405(6788): 837-846.
- Pappin, D. J., Hojrup, P. and Bleasby, A. J. (1993). "Rapid identification of proteins by peptide-mass fingerprinting." *Curr Biol* 3(6): 327-332.
- Partrick, D. A., Moore, F. A., Moore, E. E., *et al.* (1996). "The inflammatory profile of interleukin-6, interleukin-8, and soluble intercellular adhesion molecule-1 in postinjury multiple organ failure." *Am J Surg* 172(5): 425-429.
- Patel, R. T., Deen, K. I., Youngs, D., *et al.* (1994). "Interleukin 6 is a prognostic indicator of outcome in severe intra-abdominal sepsis." *Br J Surg* 81(9): 1306-1308.
- Patterson, C. and Hohfeld, J. (2006). Molecular Chaperones and the Ubiquitin-Proteasome System. Protein Degradation: The Ubiquitin-Proteasome System. Mayer, R. J., Ciechanover, A. and Rechsteiner, M. Weinheim, WILEY-VCH. 2: 1-30.
- Pellegrini, J. D., Puyana, J. C., Lapchak, P. H., *et al.* (1996). "A membrane TNF-alpha/TNFR ratio correlates to MODS score and mortality." *Shock* 6(6): 389-396.
- Perkins, D. N., Pappin, D. J., Creasy, D. M., *et al.* (1999). "Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data." *Electrophoresis*. 20.(18.): 3551-3567.
- Pittet, D., Rangel-Frausto, M. S., Li, N., *et al.* (1995). "Systemic inflammatory response syndrome, sepsis, severe sepsis and septic shock: incidence, morbidities and outcomes in surgical ICU patients." *Intensive Care Med* 21(4): 302-309.
- Piubelli, C., Galvani, M., Hamdan, M., *et al.* (2002). "Proteome analysis of rat polymorphonuclear leukocytes: a two-dimensional electrophoresis/mass spectrometry approach." *Electrophoresis* 23(2): 298-310.
- Povoa, P. (2002). "C-reactive protein: a valuable marker of sepsis." *Intensive Care Med* 28(3): 235-243.
- Ramagli, L. S. (1999). "Quantifying protein in 2-D PAGE solubilization buffers." *Methods Mol Biol* 112: 99-103.

- Ramana, C. V., Gil, M. P., Schreiber, R. D., *et al.* (2002). "Stat1-dependent and -independent pathways in IFN-gamma-dependent signaling." *Trends Immunol* 23(2): 96-101.
- Rameh, L. E. and Cantley, L. C. (1999). "The Role of Phosphoinositide 3-Kinase Lipid Products in Cell Function." *J Biol Chem* 274(13): 8347–8350.
- Rangel-Frausto, M. S., Pittet, D., Costigan, M., *et al.* (1995). "The natural history of the systemic inflammatory response syndrome (SIRS). A prospective study." *JAMA* 273(2): 117-123.
- Rodriguez, J., Gupta, N., Smith, R. D., *et al.* (2008). "Does Trypsin Cut Before Proline?" *J Proteome Res* 7: 300–305.
- Roes, J., Choi, B. K., Power, D., *et al.* (2003). "Granulocyte Function in Grancalcin-Deficient Mice." *Mol Cell Biol* 23(3): 826–830.
- Romani, L., Mencacci, A., Cenci, E., *et al.* (1996). "Impaired neutrophil response and CD4+ T helper cell 1 development in interleukin 6-deficient mice infected with *Candida albicans*." *J Exp Med* 183(4): 1345-1355.
- Rothman, J. E. (1994). "Mechanisms of intracellular protein transport." *Nature* 372: 55-63.
- Roumen, R. M., Redl, H., Schlag, G., *et al.* (1993). "Scoring systems and blood lactate concentrations in relation to the development of adult respiratory distress syndrome and multiple organ failure in severely traumatized patients." *J Trauma* 35(3): 349-355.
- Sabiston Jr, D. C. and Lyerly, K. H. (1999). Tratado de cirurgia: as bases biológicas da prática cirúrgica moderna. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan.
- Sabounchi-Schutt, F., Astrom, J., Olsson, I., *et al.* (2000). "An immobilized DryStrip application method enabling high-capacity two-dimensional gel electrophoresis." *Electrophoresis* 21(17): 3649-3656.
- Santos, K. C. (2007). Análise Proteômica Comparativa Entre Neutrófilos Não-Ativados e Neutrófilos Ativados com PMA, um Análogo do Diacilglicerol. Departamento de Pós-Graduação em Patologia Molecular - Faculdade de Medicina. Brasília, Universidade de Brasília. **Dissertação de Mestrado.**
- Sauaia, A., Moore, F. A., Moore, E. E., *et al.* (1994). "Early predictors of postinjury multiple organ failure." *Arch Surg* 129(1): 39-45.
- Schroder, J., Stuber, F., Gallati, H., *et al.* (1995). "Pattern of soluble TNF receptors I and II in sepsis." *Infection* 23(3): 143-148.
- Schroder, K., Hertzog, P. J., Ravasi, T., *et al.* (2004). "Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions." *J Leukoc Biol* 75: 163-189.
- Schubert, U., Anton, L. C., Gibbs, J., *et al.* (2000). "Rapid degradation of a large fraction of newly synthesized proteins by proteasomes." *Nature* 404: 770–774.
- Segal, A. W. and Abo, A. (1993). "The biochemical basis of the NADPH oxidase of phagocytes." *Trends Biochem Sci* 18(2): 43-47.
- Sekar, M. C., Sambandam, V., Grizzle, W. E., *et al.* (1996). "Dissociation of Cyclic Inositol Phosphohydrolase Activity from Annexin III." *J Biol Chem* 271(14): 8295–8299.
- Sen, C. K. (2001). "Antioxidant and redox regulation of cellular signaling: introduction." *Med Sci Sports Exerc* 33(3): 368-370.

- Shah, A. B., DiMartino, S. J., Trujillo, G., *et al.* (2006). "Selective inhibition of the C5a chemotactic cofactor function of the vitamin D binding protein by 1,25(OH)₂ vitamin D₃." *Mol Immunol* 43(8): 1109-1115.
- Shah, S. N. and Eckert, K. A. (2009). "Human Postmeiotic Segregation 2 Exhibits Biased Repair at Tetranucleotide Microsatellite Sequences." *Cancer Res* 69(3): 1143–1149.
- Shukla, A., Berglund, L., Nielsen, L. P., *et al.* (2000). "Regulated exocytosis in immune function: are SNARE-proteins involved?" *Respir Med* 94(1): 10-17.
- Silliman, C. C., Bjornsen, A. J., Wyman, T. H., *et al.* (2003). "Plasma and lipids from stored platelets cause acute lung injury in an animal model." *Transfusion* 43(5): 633-640.
- Simard, J. C., Girard, D. and Tessier, P. A. (2010). "Induction of neutrophil degranulation by S100A9 via a MAPK-dependent mechanism." *J Leukoc Biol* 87: 905-914.
- Simchowitz, L. and Roos, A. (1985). "Regulation of Intracellular pH in Human Neutrophils." *J Gen Physiol* 85(3): 443-470.
- Sixt, M., Hallmann, R., Wendler, O., *et al.* (2001). "Cell adhesion and migration properties of beta 2-integrin negative polymorphonuclear granulocytes on defined extracellular matrix molecules. Relevance for leukocyte extravasation." *J Biol Chem* 276(22): 18878-18887.
- Sondermann, P. and Oosthuizen, V. (2002). "Mediation and Modulation of Antibody Function: X-ray crystallographic studies of IgG–Fcc receptor interactions." *Biochem Soc Trans* 30: 481-486.
- Spahn, D. R. and Rossaint, R. (2005). "Coagulopathy and blood component transfusion in trauma." *Br J Anaesth* 95(2): 130-139.
- Sroussi, H. Y., Kohler, G. A., Agabian, N., *et al.* (2009). "Substitution of methionine 63 or 83 in S100A9 and cysteine 42 in S100A8 abrogate the antifungal activities of S100A8/A9: potential role for oxidative regulation." *FEMS Immunol Med Microbiol* 55(1): 55–61.
- Subramaniam, V. N., Loh, E. and Hong, W. (1997). "N-Ethylmaleimide-sensitive Factor (NSF) and a-Soluble NSF Attachment Proteins (SNAP) Mediate Dissociation of GS28-Syntaxin 5 Golgi SNAP Receptors (SNARE) Complex." *J Biol Chem* 272(41): 25441–25444.
- Suchard, S. J. and Boxer, L. A. (1989). "Characterization and Cytoskeletal Association of a Major Cell Surface Glycoprotein, GP 140, in Human Neutrophils." *J Clin Invest* 84: 484-492.
- Swain, S. D., Rohn, T. T. and Quinn, M. T. (2002). "Neutrophil priming in host defense: role of oxidants as priming agents." *Antioxid Redox Signal* 4(1): 69-83.
- Teahan, C. G., Totty, N. F. and Segal, A. W. (1992). "Isolation and characterization of grancalcin, a novel 28 kDa EF-hand calcium-binding protein from human neutrophils." *Biochem J* 286: 549-554.
- Teles, L. M. B. (2005). Dissertação de Mestrado: Análise Proteômica Comparativa Entre Neutrófilos de Indivíduos Hígidos e Neutrófilos de Indivíduos Politraumatizados. Departamento de Pós-Graduação em Patologia Molecular - Faculdade de Medicina. Brasília (DF), Universidade de Brasília. **Dissertação de Mestrado**: 127.

- Terranova, V. P., DiFlorio, R., Hujanen, E. S., *et al.* (1986). "Laminin Promotes Rabbit Neutrophil Motility and Attachment." *J Clin Invest* 77(4): 1180-1186.
- TheMammalianGeneCollectionProjectTeam (2004). "The Status, Quality, and Expansion of the NIH Full-Length cDNA Project: The Mammalian Gene Collection (MGC)." *Genome Research* 14: 2121–2127.
- Thingholm, T. E., Jorgensen, T. J., Jensen, O. N., *et al.* (2006). "Highly selective enrichment of phosphorylated peptides using titanium dioxide." *Nat Protoc* 1(4): 1929-1935.
- Thomson, A. W. and Lotze, M. T. (2003). The Cytokine. New York, Elsevier Science & Technology Books: 1572p.
- Tintinger, G., Steel, H. C. and Anderson, R. (2005). "Taming the neutrophil: calcium clearance and influx mechanisms as novel targets for pharmacological control." *Clin Exp Immunol* 141: 191–200.
- Tolias, K. F., Couvillon, A. D., Cantley, L. C., *et al.* (1998). "Characterization of a Rac1- and RhoGDI-associated lipid kinase signaling complex." *Mol Cell Biol* 18(2): 762-770.
- Tomazella, G. G., Silva, I., Laure, H. J., *et al.* (2009). "Proteomic analysis of total cellular proteins of human neutrophils." *Proteome Sci* 7: 32-41.
- Ugolev, Y., Berdichevsky, Y., Weinbaum, C., *et al.* (2008). "Dissociation of Rac1(GDP).RhoGDI complexes by the cooperative action of anionic liposomes containing phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate, Rac guanine nucleotide exchange factor, and GTP." *J Biol Chem* 283(32): 22257-22271.
- Uhl, W., Beger, H. G., Hoffmann, G., *et al.* (1995). "A multicenter study of phospholipase A2 in patients in intensive care units." *J Am Coll Surg* 180(3): 323-331.
- Vamvakas, E. C. and Blajchman, M. A. (2001). "Deleterious clinical effects of transfusion-associated immunomodulation: fact or fiction?" *Blood* 97(5): 1180-1195.
- Vandal, K., Rouleau, P., Boivin, A., *et al.* (2003). "Blockade of S100A8 and S100A9 Suppresses Neutrophil Migration in Response to Lipopolysaccharide." *J Immunol* 171: 2602-2609.
- Vega, A., Chacon, P., Monteseiri, J., *et al.* (2004). "A new role for monoamine oxidases in the modulation of macrophage-inducible nitric oxide synthase gene expression." *J Leukoc Biol* 75: 1093-1101.
- Verploegen, S., Van Leeuwen, C. M., Van Deutekom, H. W., *et al.* (2002). "Role of Ca²⁺/calmodulin regulated signaling pathways in chemoattractant induced neutrophil effector functions. Comparison with the role of phosphatidylinositol-3 kinase." *Eur J Biochem* 269(18): 4625-4634.
- Vieira, O. M., Chaves, C. P. and Manso, J. E. F. (2000). Clínica Cirúrgica: Fundamentos Teóricos e Práticos. Rio de Janeiro, Atheneu: 987.
- Viemann, D., Strey, A., Janning, A., *et al.* (2005). "Myeloid-related proteins 8 and 14 induce a specific inflammatory response in human microvascular endothelial cells." *Blood* 105(7): 2955-2962.
- Vigushin, D. M., Pepys, M. B. and Hawkins, P. N. (1993). "Metabolic and scintigraphic studies of radioiodinated human C-reactive protein in health and disease." *J Clin Invest* 91(4): 1351-1357.
- Vlahou, A. and Fountoulakis, M. (2005). "Proteomic approaches in the search for disease biomarkers." *J Chromatogr B Biomed Appl* 814(1): 11-19.

- Vogl, T., Ludwig, S., Goebeler, M., *et al.* (2004). "MRP8 and MRP14 control microtubule reorganization during transendothelial migration of phagocytes." *Blood* 104(13): 4260-4268.
- Vulcano, M., Alves-Rosa, M. F., Minnucci, F. S., *et al.* (1998). "N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (fMLP) inhibits tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) production on lipopolysaccharide (LPS)-stimulated human neutrophils." *Clin Exp Immunol* 113(1): 39-47.
- Wabnitz, G. H., Koecher, T., Lohneis, P., *et al.* (2007). "Costimulation induced phosphorylation of L-plastin facilitates surface transport of the T cell activation molecules CD69 and CD25." *Eur J Immunol* 37: 649-662.
- Walsh, C. T., Garneau-Tsodikova, S. and Gatto Jr, G. J. (2005). "Protein posttranslational modifications: the chemistry of proteome diversifications." *Angew Chem Int Ed Engl* 44(45): 7342-7372.
- Ward, N. S. (2006). Interleukin-6. Encyclopedia of Respiratory Medicine. Laurent, G. J. and Shapiro, S. D. Oxford, Elsevier: 363-365.
- Watt, S. M. and Burgess, A. W. (1981). "High-resolution two-dimensional electrophoretic analysis of acidic, basic and surface proteins of mouse neutrophils." *Biochim Biophys Acta* 640(2): 583-594.
- Waydhas, C., Nast-Kolb, D., Jochum, M., *et al.* (1992). "Inflammatory mediators, infection, sepsis, and multiple organ failure after severe trauma." *Arch Surg* 127(4): 460-467.
- Weber, T., Parlati, F., McNew, J. A., *et al.* (2000). "SNAREpins are functionally resistant to disruption by NSF and alphaSNAP." *J Cell Biol* 149(5): 1063-1072.
- Weiner, O. D., Marganski, W. A., Wu, L. F., *et al.* (2007). "An Actin-Based Wave Generator Organizes Cell Motility." *PLoS Biol* 5(9): 2053-2063.
- Weiner, O. D., Rentel, M. C., Ott, A., *et al.* (2006). "Hem-1 Complexes Are Essential for Rac Activation, Actin Polymerization, and Myosin Regulation during Neutrophil Chemotaxis." *PLoS Biol* 4(2): 186-199.
- Westendorp, R. G., Langermans, J. A., Huizinga, T. W., *et al.* (1997). "Genetic influence on cytokine production and fatal meningococcal disease." *Lancet* 349: 170-173.
- Westermeyer, R., Naven, T. and Hopker, H. R. (2008). Proteomics in Practice: A Guide to Successful Experimental Design. Weinheim, Wiley-Vch: 1-482.
- Wilkins, M. R., Pasquali, C., Appel, R. D., *et al.* (1996). "From proteins to proteomes: large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis." *Biotechnology* 14(1): 61-65.
- Windsor, A. C., Mullen, P. G., Fowler, A. A., *et al.* (1993). "Role of the neutrophil in adult respiratory distress syndrome." *Br J Surg* 80(1): 10-17.
- Wywiał, E. and Singh, S. M. (2010). "Identification and structural characterization of FYVE domain-containing proteins of *Arabidopsis thaliana*." *BMC Plant Biol* 10: 157-172.
- Xing, Z., Gauldie, J., Cox, G., *et al.* (1998). "IL-6 is an antiinflammatory cytokine required for controlling local or systemic acute inflammatory responses." *J Clin Invest* 101(2): 311-320.
- Xu, P., Roes, J., Segal, A. W., *et al.* (2006). "The role of grancalcin in adhesion of neutrophils." *Cell Immunol* 240(2): 116-121.
- Xue, B., Wu, Y., Yin, Z., *et al.* (2005). "Regulation of lipopolysaccharide-induced inflammatory response by glutathione S-transferase P1 in RAW264.7 cells." *FEBS Lett* 579: 4081-4087.

- Yamashita, S., Suzuki, A., Yanagita, T., *et al.* (2000). "Analysis of neutrophil proteins of patients with Behcet's disease by two-dimensional gel electrophoresis." *Biol Pharm Bull* 23(5): 519-522.
- Yao, T., Song, L., Jin, J., *et al.* (2008). "Distinct modes of regulation of the Uch37 deubiquitinating enzyme in the proteasome and in the Ino80 chromatin-remodeling complex." *Mol Cell* 31(6): 909-917.
- Yin, Z., Ivanov, V. N., Habelhah, H., *et al.* (2000). "Glutathione S-Transferase p Elicits Protection against H₂O₂-induced Cell Death via Coordinated Regulation of Stress Kinases." *Cancer Res* 60: 4053–4057.
- Zallen, G., Offner, P. J., Moore, E. E., *et al.* (1999). "Age of transfused blood is an independent risk factor for postinjury multiple organ failure." *Am J Surg* 178(6): 570-572.
- Zhang, B., Hirahashi, J., Cullere, X., *et al.* (2003). "Elucidation of molecular events leading to neutrophil apoptosis following phagocytosis: cross-talk between caspase 8, reactive oxygen species, and MAPK/ERK activation." *J Biol Chem* 278(31): 28443-28454.
- Zhang, J. and Kew, R. R. (2004). "Identification of a Region in the Vitamin D-binding Protein that Mediates Its C5a Chemotactic Cofactor Function." *J Biol Chem* 279(51): 53282–53287.
- Zhang, X., Shi, L., Shu, S., *et al.* (2007). "An improved method of sample preparation on AnchorChip targets for MALDI-MS and MS/MS and its application in the liver proteome project." *Proteomics* 14: 2340-2349.
- Zifarelli, G. and Pusch, M. (2007). "CLC chloride channels and transporters: a biophysical and physiological perspective." *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 158: 23-76.

APÊNDICES

Spots encontrados apenas no grupo de neutrófilos quiescentes, da categoria alcalina. O número do *spot* corresponde ao que recebeu no gel master quiescente pelo programa *Image Master*.

Relação dos números de <i>spots</i> (gel master quiescente alcalino)						
	20701	20935	21113	21256	21425	
	20724	20951	21114	21269	21435	
	20728	20959	21116	21273	21451	
	20734	20974	21124	21283	21452	
	20736	20975	21126	21284		
	20745	20977	21128	21294		
	20747	20978	21131	21295		
	20752	20981	21132	21304		
	20757	21000	21140	21313		
	20758	21014		21315		
20437	20641	20776	21016	21142	21320	21472
20446	20643	20790	21017	21146	21322	21473
20506	20648	20799	21020	21177	21324	21482
20577	20649	20813	21030	21178	21330	21492
20593	20652	20838	21032	21181	21346	21502
20610	20653	20846	21053	21185	21350	21503
20617	20655	20874	21056	21186	21351	21504
20618	20667	20883	21064	21189	21354	21505
20619	20671	20888	21071	21202	21357	21514
20621	20672	20904	21073	21222	21365	21546
20622	20674	20907	21075	21235	21377	21547
20629	20675	20911	21090	21237	21392	21557
20635	20680	20922	21101	21250	21418	21652
20640	20692	20928	21103	21252	21422	

Spots encontrados apenas no grupo de neutrófilos ativados por trauma, da categoria alcalina. O número do *spot* corresponde ao que recebeu no gel master trauma pelo programa *Image Master*.

Relação dos números de <i>spots</i> (gel master trauma alcalino)						
	14939	15043		15265	15467	15560
	14955	15060			15469	15569
					15492	15664
					15505	15665
						15668
14509	14789	14960	15061	15120	15266	15514
14545	14791	14982	15077	15126	15267	15516
14578	14866	15001	15084	15138	15276	15518
14635	14872	15011	15086	15143	15328	15524

14688	14888	15012	15090	15172	15371	15528
14700	14909	15033	15092	15242	15376	15540
14730	14921	15035	15111	15252	15389	15544
14760	14927	15038		15263	15457	15557

Spots encontrados apenas no grupo de neutrófilos quiescentes, não identificados, da categoria ácida. O número do *spot* corresponde ao que recebeu no gel master quiescente pelo programa *Image Master*.

Relação dos números de spots (gel master quiescente ácido)						
			978	1231	1428	
70	300	559	761	983	1242	1433
72	303	563	769	984	1243	1435
73	311	565	776	985	1255	1440
74	315	568	778	988	1256	1463
76	324	569	779	990	1257	1473
88	325	573	789	995	1261	1475
100	329	574	795	997	1265	1476
101	340	575	817	1000	1267	1480
105	341	584	818	1007	1268	1487
106	359	593	825	1012	1276	1498
110	361	598	831	1013	1280	1505
121	362	599	832	1025	1281	1508
125	363	600	835	1031	1286	1512
131	368	614	839	1037	1289	1527
132	371	617	842	1054	1290	1553
136	372	619	843	1059	1293	1617
138	386	623	846	1062	1295	1620
139	392	627	848	1064	1307	1622
145	401	631	850	1066	1312	1624
147	402	639	862	1068	1315	1625
149	406	642	872	1070	1319	1635
157	416	643	881	1074	1320	1645
160	417	644	882	1075	1321	1646
168	418	646	884	1088	1324	1647
171	423	654	891	1089	1326	1648
180	441	657	892	1103	1327	1649
184	442	660	895	1111	1328	1652
186	448	662	897	1113	1338	1654
190	451	663	898	1118	1340	1661
191	455	685	906	1127	1345	1663
193	459	690	907	1129	1350	1666
194	461	692	910	1132	1351	1668
196	466	694	911	1141	1355	1676
198	468	703	912	1142	1358	1679
201	471	708	914	1144	1361	1680
202	472	711	916	1146	1362	1682
212	479	714	918	1147	1368	1684
217	487	716	920	1153	1373	1686
223	496	720	926	1158	1374	1692
226	497	725	933	1170	1375	1700
249	501	735	937	1172	1384	1702

251	515	736	943	1174	1385	1707
265	519	753	944	1177	1386	1234
280	525	756	945	1191	1390	
281	533	758	949	1196	1391	
292	537	760	953	1199	1407	
294	544		954	1201	1408	
296	545		956	1205	1409	
298	558		970	1220	1416	
299			976	1224	1423	

Spots encontrados apenas no grupo de neutrófilos ativados por trauma, não identificados, da categoria ácida. O número do *spot* corresponde ao que recebeu no gel master trauma pelo programa *Image Master*.

Relação dos números de spots (gel master trauma ácido)						
	3711	4805		4540		4774
	3714	4809		4541		4775
3421	3821	3914	4156	4361	4564	4677
3429	3561	3916	4157	4362	4569	4680
3436	3823	3918	4158	4369	4571	4687
3449	3593	3940	4182	4406	4604	4707
3452	3850	3942	4183	4407	4608	4709
3453	3602	3945	4184	4408	4609	4712
3455	3608	3947	4186	4417	4619	4720
3456	3852	3958	4190	4432	4621	4722
3463	3624	3969	4192	4446	4623	4723
3469	3855	3985	4197	4450	4624	4733
3483	3633	4009	4225	4452	4627	4737
3484	3859	4024	4226	4454	4628	4739
3485	3642	4025	4228	4457	4635	4746
3486	3650	4046	4229	4476	4636	4749
3487	3862	4067	4235	4477	4638	4750
3490	3654	4074	4237	4478	4639	4751
3507	3876	4088	4275	4493	4646	4755
3520	3881	4100	4289	4504	4654	4756
3522	3673	4103	4301	4510	4657	4763
3539	3699	4789	4334	4533	4781	4770
3726	3546	3892	4128	4339	4551	4667
3737	3810	3894	4132	4350	4558	4668
3744	3551	3895	4135	4355	4560	4674
3759	3817	3901	4149	4357	4563	4675
3760	3824	3920	4160	4378	4573	4689
3764	3827	3921	4177	4387	4581	4694
3766	3840	3938	4178	4391	4591	4698
3769	3655	4077	4252	4480	4644	4752
3772	3871	4083	4265	4487	4645	4753
3776	3692	4107	4304	4512	4661	4764
3778	3694	4115	4308	4516	4664	4767
3795	3882	4788	4319	4526	4776	4769
3885	3884	4801	4543	4536		4771
3891	3702	4803	4544	4539		4773

ÍNDICE REMISSIVO AO TEXTO

1) Introdução	20
I. Aspectos clínicos e laboratoriais	20
II. Respostas endócrino-metabólica e imunológica ao trauma	22
III. Neutrófilos e o processo inflamatório pós-trauma	34
IV. Integração das respostas no trauma	43
V. Diagnóstico laboratorial preditivo para SIRS, ARDS e MOF	46
VI. Análise proteômica	50
VII. 2D-PAGE, MALDI-TOF e MALDI-TOF/TOF	53
2) Objetivos	55
3) Metodologia	56
I. Esquema experimental	56
II. Preparação das amostras	57
III. Separação e lise dos neutrófilos	58
IV. Eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida	60
V. Análise de imagens	62
VI. Análise estatística	64
VII. Digestão de <i>spots</i>	66
VIII. Extração de peptídeos	67
IX. Espectrometria de massa	68
X. Critérios de validação de <i>peptide mass fingerprints</i> (PMF)	71
XI. Critérios de validação de <i>MS/MS</i> (MALDI-TOF/TOF)	74
4) Resultados	78
I. Obtenção de neutrófilos	78
II. Confecção de géis bidimensionais	79
III. Análise de imagens e análise estatística dos géis bidimensionais	82
IV. Identificação de proteínas	94
5) Discussão	98
I. Proteína com expressão aumentada após ativação de neutrófilos devido a trauma grave	99

II. Proteínas com expressão diminuída após ativação de neutrófilos devido a trauma grave	100
III. Proteínas exclusivamente observadas em neutrófilos quiescentes	108
IV. Sumário e conjecturas	116
6) Conclusões	118
7) Perspectivas	120



TRAUMA

