

**Elaine Nascimento Aquino**

**Estudos Comparativos de Neutrófilos Estimulados e  
Ativados *in vitro***

**Brasília, 2012**

# **Estudos Comparativos de Neutrófilos Estimulados e Ativados *in vitro***

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: Elaine Nascimento Aquino

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

**Brasília, Distrito Federal, Brasil  
14 de Dezembro, 2012**

## DEDICATÓRIA

**A Deus,**

Pelo amor, Pela salvação,  
Pela vida e por ter me guiado  
E me ajudado a superar todos os obstáculos.

**Aos meus pais, José Hugo e Marizete,**

Pelo amor, Pela educação, pelo apoio,  
Por palavras de perseverança,  
Por ter me oferecido o melhor deles para que eu tivesse o melhor:  
Melhor estudo, melhor conforto, uma vida de qualidade.  
Toda a minha gratidão a eles.  
Por serem meus pais.

Ó profundidade das riquezas,  
tanto da sabedoria, como da ciência de Deus!  
Quão insondáveis são os seus juízos,  
e quão inescrutáveis os seus caminhos!

Romanos 11.33

E peço isto:  
que o vosso amor cresça  
mais e mais em ciência  
e em todo o conhecimento.

Filipenses 1.9

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, que sempre restaura minhas forças quando se fazem pequenas e fracas, e que me agraciou com a produção desta obra.

A todos que oraram e torceram por essa conquista.

Ao meu orientador e educador, professor Wagner Fontes, por seu apoio.

Aos Professores do laboratório de Bioquímica: Professora Mariana, professora Consuelo, professora Fabiane, professor Carlos André e professor Magno, pela contribuição na elaboração do projeto e incentivos.

Aos Professores Professor José Raimundo e professor Paulo, pela contribuição e ensinamentos nos ensaios, equipamento e programas.

Aos amigos que são e já passaram pelo laboratório de Bioquímica: Adriana, Carlos Uribes, Rafael, Karina, Gabriel, Carla, Liz, Everton, Jimmy, Michele, Diana, Rayner, Jaques, César, Adelson, Pedro, Carol, Humberto, Micaela, Rodrigo André, Hialy, Marli, Ana Elisa, Alininha, Jéssica, Rosa, Andreia, Glaucia, Juliana, Daniela, Pollyanna e Siliana pela ajuda, pelo companheirismo e pelos muitos momentos de descontração e alegria proporcionados. E a tantos outros amigos cujos nomes não estão citados aqui, mas são igualmente colaboradores e incentivadores.

Em especial aos amigos: Anne, Micaela, Diana e Janier pela especial ajuda e incentivo e pelas inúmeras vezes em que se prestou a colaborar pra este trabalho.

Aos técnicos: Thiago, Felipe, Márcia, Ingride e Lauro pelo apoio na citometria de fluxo e microscopias.

Ao Nuno e Antônio Rufino, pelo apoio técnico prestado no laboratório de bioquímica.

A todos dos professores e funcionários do LBQP por colaborarem e incentivarem a execução deste projeto.

Ao Professor colaborador do Laboratório de Virologia Enrique Argaranaz pela colaboração na utilização do equipamento.

Aos Professores colaboradores do Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Gilberto Domont e Magno Junqueira pela colaboração na utilização do equipamento.

As agências financiadoras: CNPq, CAPES, FAPDF e FINEP.

## **ABSTRACT**

Innate immunity is the first system activated against the invasion of microorganisms and particles in the body. This system includes the humoral and cellular responses. Neutrophils, a participant in the cellular immune response, are found in the bloodstream and move to the tissue when they are stimulated or activated by chemoattractants, known as effector cells of the inflammatory response. The activation and/or stimulation causes changes in this cell favouring movement, phagocytosis and destruction of microorganisms. This activation may be exacerbated by causing tissue injury. The activation process can be subdivided into three distinct phenotypic states: quiescent, stimulated or activated and these states can be triggered by substances as PAF and fMLP respectively. In the present study such conditions were compared. Tests demonstrating stimulation and activation of neutrophils by these agents were used as respiratory burst, cleavage of L-selectin and CD11b mobilization. After this evaluation, were compared two-dimensional gels among the three phenotypes (quiescent, stimulated and activated), which resulted in 166 proteins presenting differential abundance and among them 87 were identified. Analysis of the gene ontology terms for such proteins localized most of them in the cytoplasm and nucleus, and associated them to the biological processes of transcription in stimulated neutrophils and protein folding in activated neutrophils. Comparing among the three phenotypes, 16 proteins showed differential abundance and 11 were identified, among them 6 were more abundant in quiescent neutrophils, involved in processes like signal transduction, cell motility and modulation of the inflammatory response. Six other proteins were more abundant in neutrophils stimulated by PAF, related to cellular adhesion, signal transduction and antimicrobial activity. Among the identified proteins, 17 were described for the first time in neutrophils and 30 were associated for the first time to the stimulation by PAF or activation by fMLP.

## RESUMO

A imunidade inata é o primeiro sistema ativado contra a invasão de microorganismos e partícula ao organismo. Esse sistema compreende a resposta humoral e celular. Os neutrófilos, partícipes da resposta imune celular, são encontrados na circulação sanguínea e se movimentam para o tecido quando são estimulados ou ativados por quimioatraentes. A ativação e/ou estimulação provocam mudanças celulares em prol da movimentação, fagocitose e destruição dos microorganismos. Essa ativação pode ser exacerbada provocando até injúrias teciduais. O processo de ativação pode ser subdividido em três estados fenotípicos distintos: quiescentes, estimulados ou ativados e esses estados podem ser desencadeados por substâncias como PAF e fMLP respectivamente. No presente estudo, tais condições foram comparadas. Ensaios que comprovaram a estimulação e ativação dos neutrófilos por esses agentes foram utilizados, como: explosão respiratória, clivagem da L-selectina e a mobilização da CD11b. Após essa avaliação foram comparados géis bidimensionais entre os três fenótipos (quiescentes, estimulados e ativados), o que resultou em 166 *spots* apresentando abundância diferencial e dentre eles 87 identificações proteicas. A análise dos termos do *gene ontology* para essas proteínas detectou que a maioria delas encontra-se no citoplasma e núcleo, e o processo biológico com maior número de proteínas envolvidas foi a transcrição em neutrófilos estimulados e dobramento de proteínas em neutrófilos ativados. Na comparação entre os três fenótipos, 16 *spots* apresentaram abundância diferencial e 11 proteínas foram identificadas, dentre elas 6 proteínas mais abundantes em neutrófilos quiescentes, envolvidas em processos como transdução de sinal, motilidade celular e modulação da resposta inflamatória. Seis outras proteínas eram mais abundantes em neutrófilos estimulados pelo PAF, relacionadas a adesão celular, transdução de sinal e atividade antimicrobiana. Dentre as proteínas identificadas neste estudo, 17 foram descritas pela primeira vez em neutrófilos e 30 foram associadas pela primeira vez ao estímulo por PAF ou à ativação por fMLP.

## ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO .....	17
1.1) Estágios de ativação dos neutrófilos.....	18
1.2) Receptores de adesão .....	20
1.2.1) Selectinas.....	20
1.2.2) Integrinas.....	21
1.2.3) Transmigração .....	22
1.3) Grânulos e vesículas secretórias .....	22
1.3.1) Vesícula secretória.....	23
1.3.2) Grânulo gelatinase.....	23
1.3.3) Grânulos específicos.....	24
1.3.4) Grânulos azurofílicos .....	24
1.4) Complexo NADPH oxidase.....	25
1.5) Ativação da transcrição .....	28
1.6) Neutrófilos e ativadores.....	28
1.6.1) Fator de agregação plaquetária (PAF) .....	29
1.6.2) formyl – Methionyl – Leucyl - Phenylalanine (fMLP).....	31
1.6.3) Diferenças entre estimulação dos neutrófilos pelo PAF e ativação pelo fMLP.....	33
1.7) Técnicas adotadas .....	36
1.7.1) Citometria de fluxo .....	36
1.7.2) Proteômica.....	37
2. OBJETIVO .....	39
2.1) Para se atingir tal objetivo, foi adotada a seguinte estratégia: .....	39
3. METODOLOGIA.....	40
3.1) Delineamento experimental (Proteômica) .....	41
3.2) Obtenção da amostra.....	41
3.2.1) Coleta de sangue .....	42
3.2.2) Isolamento dos neutrófilos, estimulação e ativação .....	42
3.3) Análise celular .....	43
3.3.1) Citometria de fluxo e Microscopia confocal .....	43

3.3.2)	Adaptação do protocolo para análise de citometria de fluxo e microscopia confocal.....	44
3.4)	Proteômica .....	53
3.4.1)	Lise celular e dosagem de proteínas .....	53
3.4.2)	Eletroforese bidimensional (2D-PAGE)[77].....	53
3.4.3)	Análise Computacional das Imagens dos Géis .....	54
3.4.4)	Definição do número de replicatas biológicas e experimentais .....	55
3.4.5)	Análise Estatística.....	56
3.4.6)	Adaptação do protocolo de digestão trípica .....	73
3.4.7)	Digestão de <i>spots</i> proteicos.....	73
3.4.8)	Espectometria de massa .....	74
3.4.9)	Validação dos resultados de PMF e PFF.....	76
3.5)	Automação na predição das funções proteicas .....	77
4.	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	78
4.1)	Ativação do complexo NADPH oxidase .....	78
4.2)	Avaliação da L-selectina.....	79
4.3)	Avaliação da subunidade CD11b .....	82
4.4)	Proteômica .....	85
4.4.1)	Comparação entre neutrófilos quiescente e neutrófilos estimulados por PAF .....	86
4.4.2)	Predição da função proteica entre neutrófilos quiescentes e PAF .....	97
4.4.3)	Comparação entre neutrófilos quiescentes e neutrófilos ativados por fMLP.....	103
4.4.4)	Predição da função proteica entre neutrófilos quiescentes e fMLP .....	111
4.4.5)	Comparação entre neutrófilos estimulados pelo PAF e neutrófilos ativados por fMLP	117
4.4.6)	Predição da função proteica entre neutrófilos quiescentes e fMLP .....	122
4.4.7)	Comparação entre as três condições .....	124
4.4.8)	Predição da função proteica entre neutrófilos quiescentes estimulados por PAF e ativados por fMLP .....	131
5.	CONCLUSÕES.....	141
6.	PERSPECTIVAS .....	143
7.	REFERÊNCIAS.....	144
8.	ANEXOS.....	154



## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Estrutura da L-selectina.....	21
<b>Figura 2:</b> Esquema de ativação da NADPH oxidase.....	26
<b>Figura 3:</b> Produção dos metabólitos de oxigênio.....	27
<b>Figura 4:</b> Cascata de sinalização dos neutrófilos.....	35
<b>Figura 5:</b> Neutrófilos quiescentes imagens do microscópio confocal CD62L intracelular.....	46
<b>Figura 6:</b> Neutrófilos quiescentes imagens do microscópio confocal CD62L superfície.....	51
<b>Figura 7:</b> Neutrófilos quiescentes imagens do microscópio confocal CD62L superfície.....	52
<b>Figura 8:</b> Espectros de massa obtidos pela utilização do protocolo anchorchip 1 de peptídeos de lisozima.....	60
<b>Figura 9:</b> Espectros de massa do <i>spot</i> 1507.....	63
<b>Figura 10:</b> Espectros de massa do <i>spot</i> 18.....	67
<b>Figura 11:</b> Espectros de massa dos digestos de proteínas padrão.....	70
<b>Figura 12:</b> Géis bidimensionais de neutrófilos quiescentes em pH ácido.....	73
<b>Figura 13:</b> Ativação dos neutrófilos.....	78
<b>Figura 14:</b> Porcentagem de células apresentando CD62L.....	80
<b>Figura 15:</b> Intensidade Média de Fluorescência de CD62L.....	80
<b>Figura 16:</b> Intensidade de fluorescência de CD62L.....	81
<b>Figura 17:</b> Porcentagem de células com CD11b.....	83
<b>Figura 18:</b> Intensidade de Fluorescência de CD11b.....	83
<b>Figura 19:</b> Neutrófilos expondo CD11b.....	84
<b>Figura 20:</b> Géis bidimensionais contendo 50 µg de proteínas.....	85
<b>Figura 21:</b> Géis bidimensionais na faixa de ácida (4-7) de neutrófilos totais.....	87
<b>Figura 22:</b> Predição componente celular na comparação entre neutrófilos quiescentes e estimulados pelo PAF.....	98
<b>Figura 23:</b> Predição função molecular na comparação entre neutrófilos quiescentes e estimulados pelo PAF.....	100
<b>Figura 24:</b> Predição processo biológico na comparação entre neutrófilos quiescentes e estimulados pelo PAF.....	102
<b>Figura 25:</b> Géis bidimensionais na faixa de ácida (4-7) de neutrófilos totais.....	104
<b>Figura 26:</b> Predição componente celular na comparação entre neutrófilos quiescentes e ativado pelo fMLP.....	112

<b>Figura 27:</b> Predição função molecular na comparação entre neutrófilos quiescentes e ativado pelo fMLP.....	114
<b>Figura 28:</b> Predição processo biológico na comparação entre neutrófilos quiescentes e ativados pelo fMLP.....	117
<b>Figura 29:</b> Géis bidimensionais na faixa de ácida (4-7) de neutrófilos totais.....	118
<b>Figura 30:</b> Predição componente celular na comparação entre neutrófilos estimulados pelo PAF e ativado pelo fMLP.....	122
<b>Figura 31:</b> Predição função molecular na comparação entre neutrófilos estimulado pelo PAF e ativado pelo fMLP.....	123
<b>Figura 32:</b> Predição processo biológico na comparação entre neutrófilos estimulado pelo PAF e ativados pelo fMLP.....	124
<b>Figura 33:</b> Géis bidimensionais na faixa de ácida (4-7) de neutrófilos totais.....	126
<b>Figura 34:</b> Predição componente celular na comparação entre neutrófilos quiescentes e estimulados pelo PAF.....	131
<b>Figura 35:</b> Predição da função molecular na comparação entre neutrófilos quiescentes e estimulados pelo PAF.....	132
<b>Figura 36:</b> Predição processo biológico na comparação entre neutrófilos quiescentes e estimulados pelo PAF.....	132
<b>Figura 37:</b> Cascata de sinalização dos neutrófilos estimulados pelo PAF e ativados pelo fMLP.....	141
<b>Figura 38:</b> Resultado da busca do <i>spot</i> 521 proveniente de um gel de 300µg de proteínas.....	154
<b>Figura 39:</b> Resultado da busca do <i>spot</i> 521 proveniente de um gel de 50µg de proteínas.....	155
<b>Figura 40:</b> Cobertura da proteína identificada na Dinamarca.....	156
<b>Figura 41:</b> Cobertura da proteína identificada no Laboratório de Bioquímica e Química de Proteínas.....	156

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Modificações no protocolo base.....	57
Tabela 2: Modificações adotadas no protocolo para a placa anchorchip.....	58
Tabela 3: Modificações no protocolo anchorchip.....	61
Tabela 4: Modificações nos protocolos anchorchip.....	65
Tabela 5: Modificações nos protocolos anchorchip.....	68
Tabela 6: Modificações no protocolo anchorchip.....	71
Tabela 7: Comparação entre o protocolo otimizado e o protocolo da Dinamarca.....	72
Tabela 8: Identificação proteica de neutrófilos por MALDI-TOF-TOF.....	88
Tabela 9: Identificação proteica de neutrófilos por MALDI-TOF-TOF.....	105
Tabela 10: Identificação proteica de neutrófilos por MALDI-TOF-TOF.....	119
Tabela 11: <i>Spots</i> com expressão diferencial entre três condições.....	125
Tabela 12: Identificação proteica de neutrófilos por MALDI-TOF-TOF.....	127

## **SIGLAS E ABREVIACÕES**

**ACN:** Acetonitrila

**AF:** Ácido fórmico

**AMPc:** Adenosina monofosfato cíclico

**ARDS:** Síndrome da angústia respiratória aguda

**DAG:** Diacilglicerol

**CAMs:** Moléculas de adesão celular

**CD163:** Marcador celular para monócitos/macrófagos

**CD18:** subunidade  $\beta_2$  para moléculas de adesão

**CD62L:** L-selectina

**CD63:** Antígeno presente na membrana do grânulo azurofílico

**CD68:** Antígeno presente na membrana do grânulo azurofílico

**Cdc42:** Proteína que compõem o complexo NADPH oxidase

**CID:** Collision induced dissociation

**DAPI:** Diamidino-2-phenylindole

**DHB:** Ácido 2,5 dihidroxibenzoico

**DHR:** 1,2,3 diidrorodamina

**DTT:** Ditioneitol

**EDTA:** Ácido etilenodiaminotetraacético

**EGF-like:** domínio de crescimento epidermal

**ESG:** Extended Similarity Group

**ESL-1:** Receptor neutrofílico para E-selectina

**FITC:** Isotiacianato de fluoresceína

**FLRL 1 e 2:** Receptores de peptídeos formilados *like* 1 e 2

**fMLP:** n-formil-metionil-leucil-fenilalanina (também abreviado como fMLF)

**FPF:** Peptide Fragmentation Fingerprint

**FPR:** Receptor de peptídeos formilados

**GEF:** Fator de mudança de guanina

**GDP:** Guanosina difosfato

**gp91<sub>phox</sub>:** Subunidade transmembrana do complexo NADPH oxidase

**GPCRs:** Receptores acoplados à proteína G

**GPX1:** Glutathiona peroxidase 1

**GO:** Gene Ontology

**GTP:** Guanosina trifosfato

**GTPase:** Enzima guanosina trifosfato

**HBSS:** Solução balanceada de sais

**HCCA:** Ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicianamico

**iC3b:** Fragmento do sistema complemento

**ICAM-1:** Receptor do antígeno associado à função dos linfócitos 1 e antígenos de macrófago

**ICAM-2:** Receptor do antígeno associado à função dos linfócitos 2

**IKB $\alpha$ :** Inibidor kappa B alfa

**IP<sub>3</sub>:** Inositol trifosfato

**IPG:** Gradiente imobilizado de pH

**IPG-Phor:** Instrumento que utiliza gradiente imobilizado de pH

**LAM-1:** Proteína de membrana 1 associadas à lisossomo

**LAM-2:** Proteína de membrana 2 associadas à lisossomo

**LBQP:** Laboratório de Bioquímica e Química de Proteínas

**LC-MS:** Cromatografia líquida – espectrometria de massa

**LFA-1, CD11a/CD18,  $\alpha_L\beta_2$ :** Antígeno associado à função dos linfócitos

**LMA:** leucemia mieloide aguda

**LPS:** Lipopolissacarídeo

**LTB<sub>4</sub>:** Leucotrieno B<sub>4</sub>

**LTQ:** Linear trap quadrupolo

**Mac-1, CD11b/CD18,  $\alpha_M\beta_2$ :** Antígeno de macrófago

**MALDI:** Matrix assistida pelo laser dessorção e ionização

**MAPK:** Proteína cinasecinase de ativação mitogênica

**MS:** Mass Spectrometry

**MS/MS:** Mass Spectrometry / Mass Spectrometry

**MS BLAST:** Mass Spectrometry Basic Local Alignment Search Tool

**MOF:** Falência múltipla dos órgãos

**NCBI:** National Center for Biotechnology

**NADP<sup>+</sup>:** forma oxidada do dinucleotídeo nicotinamida-adenina

**NADPH:** forma reduzida do dinucleotídeo nicotinamida-adenina

**NDKA:** nucleosídeo difosfato cinasecinase A

**NF-κB:** Fator nuclear kappa B

**NH<sub>4</sub>CO<sub>3</sub>:** Bicarbonato de amônio

**p22<sub>phox</sub>:** Subunidade transmembrana do complexo NADPH oxidase

**p40<sub>phox</sub>:** Subunidade citosólica do complexo NADPH oxidase

**p47<sub>phox</sub>:** Subunidade citosólica do complexo NADPH oxidase

**p67<sub>phox</sub>:** Subunidade citosólica do complexo NADPH oxidase

**PA:** Proteína cinasecinase ativada

**PAF:** Fator de agregação plaquetária

**PAFR:** Receptor do fator de agregação plaquetária

**PBS:** Tampão fosfato

**PECAM-1, CD31:** Molécula de adesão de plaquetas e células endoteliais 1

**PKC:** Proteína cinasecinase C

**pI:** ponto isoelétrico

**PI3-K:** fosfoinositol 3-cinasecinase

**PLA<sub>2</sub>:** fosfolipase A<sub>2</sub>

**PLC:** fosfolipase C

**PMA:** 12-miristati, 13-acetato de forbol

**PMF:** Peptide Mass Fingerprint

**PMN:** Polimorfonuclear

**PSGL-1:** Receptor neutrofílico para P-selectina

**PSI-BLAST:** Position-Specific Iterative Basic Local Alignment Search Tool

**PTX:** Toxina pertussis

**Rac 2:** Proteína que compõem o complexo NADPH oxidase, ligada a RhoGDP

**Raf-1:** Proteína da superfamília Rap das pequenas GTPase

**Ras:** Proteína da superfamília Ras das pequenas GTPase

**RhoGDI:** Inibidor de RhoGDP

**ROS:** Espécies reativas de oxigênio

**R-PE:** R-ficoeritrina

**SDS:** Dodecil sulfato de sódio

**SDS-PAGE:** Eletroforese de poliacrilamida em gel utilizando dodecil sulfato de sódio

**SIRS:** Síndrome da resposta inflamatória sistêmica

**TFA:** Ácido tricloroacético

**TNF- $\alpha$ :** Fator de necrose tumoral alfa

**TOF:** Tempo de vôo



## 1. INTRODUÇÃO

A resposta imune inata é a primeira linha de defesa contra a invasão por microorganismos e ocorre rapidamente em função de diversos sinais de invasão ou lesão. A imunidade inata subdivide-se em resposta humoral e celular. A resposta humoral consiste na ativação de mediadores pró-inflamatórios, proteicos (por exemplo, citocinas, sistema complemento, proteínas da fase aguda) e lipídicos (leucotrienos e fator de agregação plaquetária, por exemplo). A resposta celular consiste na ativação de células, tais como as células dendríticas e fagócitos (neutrófilos e macrófagos). Após uma injúria, a resposta imune inata é mediada principalmente pelos neutrófilos que desempenham um papel fundamental na vigilância imunológica. São as primeiras células a chegar ao local da inflamação e uma das primeiras linhas de defesa contra a ameaça microbiana. Porém a ativação exacerbada desse fagócito acarreta danos teciduais graves, tornando essa célula patogênica de muitas doenças inflamatórias agudas e crônicas (Kuijpers, 2001; Pillay, Hietbrink *et al.*, 2007).

Estudos demonstram uma correlação positiva entre severidade da injúria e resposta inflamatória, por exemplo, nos quadros de pós-trauma severos nos quais observamos o desencadeamento da síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS), com a estimulação dos neutrófilos na circulação (Botha, Moore, Moore, Sauaia *et al.*, 1995). Essa estimulação dos neutrófilos pós-trauma, devido à isquemia e reperfusão é tão intensa que ocorre a migração dos neutrófilos a locais não afetados pelo trauma, podendo levar o paciente a um quadro de (SIRS), que pode evoluir apresentando a síndrome da angústia respiratória aguda (ARDS) seguida por falência múltipla dos órgãos (MOF) (Pillay, Hietbrink *et al.*, 2007)

Várias substâncias ativam ou estimulam os neutrófilos, tais como: o fator de agregação plaquetária (PAF), fator de necrose tumoral *alfa* (TNF- $\alpha$ ), interleucina-8 (IL-8), lipopolissacarídeo (LPS), n-formil-metionil-leucil-fenilalanina (fMLP) e 12-miristato, 13-acetato de forbol (PMA) (Kuijpers, 2001; Aquino, 2008). Dentre eles o PAF, o TNF- $\alpha$  e a IL-8 são produzidos por várias células do organismo humano como um sinal de perigo, já o LPS e fMLP são substâncias presentes nas paredes celulares bacterianas e finalmente o PMA, um substância vegetal, análogo do diacilglicerol (DAG), que entra nos neutrófilos

desencadeando a ativação. Todos ativadores citados a cima se ligam a um receptor específico na membrana dos neutrófilos, com exceção do PMA, que desencadeia a ativação característica de um processo inflamatório agindo a partir do compartimento intracelular (Santos, 2007; Aquino, 2008).

### **1.1) Estágios de ativação dos neutrófilos**

A resposta inflamatória é um processo complexo que ativa uma série de células, principalmente células do sistema imune. Os neutrófilos, células efetoras da resposta inflamatória, têm sido bastante estudados. Esses estudos têm demonstrado que os neutrófilos são ativados, mas que, na sua grande maioria, essas células passam por uma fase de estimulação, uma fase intermediária entre repouso e ativação, evidenciando que a transição entre esses estados não ocorre de forma "tudo ou nada".

Diversos autores concordam com existência de três fenótipos distintos em relação à ativação: repouso ou quiescente, estimulado e ativado (Botha, Moore, Moore, Fontes *et al.*, 1995; Swain S.D. , 2002; Sheppard, Kelher *et al.*, 2005). Os neutrófilos quiescentes são aqueles que circulam livremente na corrente sanguínea, não aderem ao endotélio e possuem a morfologia arredondada. O fenótipo estimulado é observado na primeira etapa de um processo inflamatório, expondo receptores para que ocorra adesão e, posteriormente, a diapedese entre as células endoteliais, produzindo pequena quantidade de espécies reativas de oxigênio e mudança na sua morfologia permitindo que ocorra a migração. Esses mesmos processos ocorrem nos neutrófilos ativados, porém em maior intensidade, além de ocorrer a fagocitose (Botha, Moore, Moore, Fontes *et al.*, 1995).

A membrana dos neutrófilos ativados e estimulados passa por várias mudanças viabilizando a migração, transmigração, e fagocitose, processos relacionados com a liberação de grânulos e vesículas secretórias. No primeiro momento a exposição da L-selectina, faz com que os neutrófilos adiram fracamente ao endotélio, logo em seguida a exposição de integrinas leva à adesão firme ao endotélio e posteriormente à migração dos neutrófilos para o tecido. A clivagem dos receptores de adesão e o surgimento de novos

receptores responsáveis pela movimentação dos neutrófilos no tecido caracterizam a transmigração dos neutrófilos. Além disso, os neutrófilos expõem outros receptores que estão relacionados com o reconhecimento do agente invasor e fagocitose e outros com a sinalização do processo de apoptose (Aquino, 2008).

O surgimento e clivagem de receptores necessários à migração, transmigração e fagocitose estão relacionados com a liberação de grânulos e vesículas. Segundo Faurschou e Borregaard (2003), a sequência de desgranulação começa pela liberação da vesículas secretórias, seguida de grânulos de gelatinase, grânulos específicos e grânulos azurofílicos (Faurschou e Borregaard, 2003).

Ao chegar ao local da injúria, os neutrófilos reconhecem, por meio de receptores, o patógeno e/ou o tecido lesado e emitem prolongamentos de membrana, engolfando o agente. Durante o processo fagocítico, partículas a serem fagocitadas são interiorizadas formando vesículas (fagossomas). Junto com esse processo os complexos NADPH oxidase são formados na membrana dos fagossomas, produzem espécies reativas de oxigênio, e ocorre a liberação de proteínas granulares dentro das vesículas levando à destruição do patógeno (Allen, 2003; Lee, Harrison *et al.*, 2003). Antes mesmo do fagossoma estar fechado, tem início a desgranulação, podendo ocorrer o escape de espécies reativas de oxigênio e proteínas granulares para o meio extracelular. A secreção de grânulos também pode ser desencadeada por ativadores e estimuladores de neutrófilos antes mesmo que ocorra a fagocitose (Kuijpers, 2001).

O complexo NADPH oxidase desempenha um papel importante na defesa contra microorganismos patogênicos pela geração de peróxido de hidrogênio que pode dar origem a outras espécies reativas de oxigênio (El-Benna, Dang *et al.*, 2005). A quantidade de espécies reativas de oxigênio é indicativa de estimulação ou ativação celular (Botha, Moore, Moore, Sauaia *et al.*, 1995).

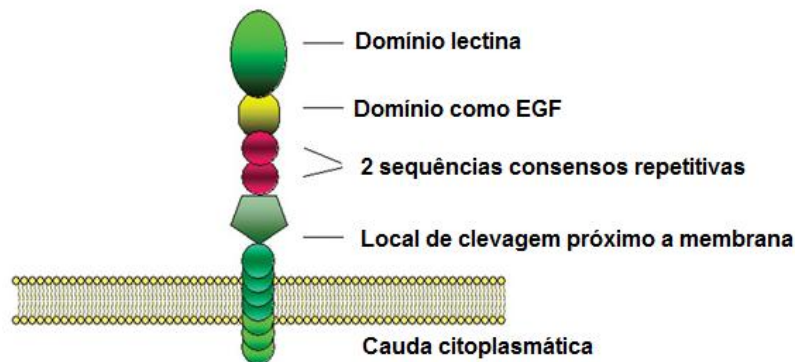
## 1.2) Receptores de adesão

Durante a inflamação os neutrófilos circulantes são estimulados ou ativados por algum quimioatraente e começam a se movimentar na direção indicada pelo gradiente quimiotático. O início do processo de deslocamento dos neutrófilos ainda circulantes, movimentação conhecida como rolamento, começa pela adesão fraca de receptores como: L-selectina, receptor neutrofílico para P-selectina (PSGL-1) e receptor neutrofílico para E-selectina (ESL-1) na membrana dos neutrófilos a seus ligantes na membrana de células endoteliais (respectivamente CD-34, P-selectina, E-selectina), promovendo a diminuição da velocidade dos neutrófilos em relação ao endotélio (Crockett-Torabi, 1998). A L-selectina envia sinais, mecanismo pouco conhecido, relacionados à mobilização das integrinas, moléculas de adesão que intermedeiam ligação célula-célula e ligação à matriz, evento conhecido como adesão firme (Wagner e Roth, 2000). Posterior à adesão firme ocorre a transmigração, migração dos neutrófilos da corrente sanguínea para o tecido através do endotélio, também intermediada por integrinas. Juntamente com a exposição das integrinas na superfície neutrofílica, diversas moléculas do citoesqueleto do neutrófilo sofrem modificações na polimerização levando à movimentação e à liberação dos grânulos (Wagner e Roth, 2000; Cicchetti, Allen *et al.*, 2002). Três grandes famílias de adesão celular (CAMs) desempenham papel de adesão endotélio-neutrófilos que são as selectinas, integrinas e imunoglobulinas (Albelda, Smith *et al.*, 1994).

### 1.2.1) Selectinas

As L-selectinas (CD62L) são constitutivas na superfície dos neutrófilos ainda quiescentes localizadas nas extremidades das microvilosidades, juntamente com os receptores de P-selectinas (PSGL-1) e de E-selectinas (ESL-1). A E-selectina, presente em células endoteliais é exposta à superfície após a ativação celular da mesma forma que a P-selectina, presente tanto no endotélio quanto em plaquetas. A exposição das L-selectinas marca o início da adesão dos neutrófilos ao endotélio, ainda uma adesão fraca, mas importante para a diminuição da velocidade do fluxo dos neutrófilos na corrente sanguínea (Wagner e Roth, 2000; Ivetic e Ridley, 2004). A L-selectina é constituída de um domínio

de lectina, seguido de um fator semelhante ao domínio de crescimento epidermal (EGF-like domain) e duas sequências consenso repetitivas, figura 1(Ivetic e Ridley, 2004). A L-selectina adere ao receptor sialomucina sulfatada no endotélio (CD34) (Wagner e Roth, 2000).



**Figura 1:** Estrutura da L-selectina. Proteína transmembrana. Modificado a partir de Ivetic, A. & Ridley, A.J., 2004(Ivetic e Ridley, 2004).

Após a ativação celular, diferente da P-selectina e E-selectina, a L-selectina sofre proteólise próxima à membrana liberando as regiões de domínios e sequências consenso. Estudos com neutrófilos ativados pelo PMA mostraram clivagem da L-selectina realizada por uma metaloprotease, regulada pela proteína cinase C (PKC). (Alexander, Kishimoto *et al.*, 2000; Ivetic e Ridley, 2004). Vários autores acreditam que durante o rolamento a L-selectina ou os produtos de sua proteólise enviam sinais de transdução que ativam a mobilização de integrinas, evento subsequente ao rolamento, que leva à adesão firme (Conejeros, Jara *et al.*; Crockett-Torabi, 1998; Wagner e Roth, 2000).

### 1.2.2) Integrinas

As integrinas são grupos de glicoproteínas transmembrânicas encontradas nos PMN (dentre outros tipos celulares) que intermedeiam a adesão célula-célula e transmigração através de células endoteliais. Uma informação importante é a presença de uma quantidade basal de integrinas na superfície dos neutrófilos, porém em conformação inativa. No processo de firme adesão dos neutrófilos a subunidade  $\beta_2$  (CD18) é ativada resultando na

formação de dois complexos diferentes: antígeno de macrófago (MAC-1; CD11b/CD18;  $\alpha_M\beta_2$ ) e antígeno associado à função dos linfócitos (LFA-1; CD11a/CD18;  $\alpha_L\beta_2$ ) (Albelda, Smith *et al.*, 1994; Anderson, Hotchin *et al.*, 2000; Wagner e Roth, 2000). O ligante endotelial para MAC-1 é o ICAM-1 e para LFA-1 são ICAM-1 e ICAM-2. Além disso, o CD11b possui uma gama de ligantes que inclui fibronectina, albumina desnaturada, fragmento do complemento (iC3b), dentre outros ainda desconhecidos (Albelda, Smith *et al.*, 1994).

A ativação dos neutrófilos leva a mobilização e mudança de conformação das moléculas de adesão. O CD11b é localizado de forma basal na membrana plasmática, mas também é encontrado nos grânulos específicos, grânulos gelatinases e vesículas secretórias (Borregaard e Cowland, 1997; Davey, Zuzel *et al.*, 2000).

### **1.2.3) Transmigração**

A transmigração ou diapedese é o evento onde os neutrófilos saem da corrente sanguínea em direção ao tecido passando entre as células endoteliais. Esse evento é mediado pelas integrinas e imunoglobulinas. Durante a transmigração as células endoteliais abrem as junções intercelulares e com auxílio da ligação do MAC-1 e ICAM-1 e a ligação da molécula de adesão de plaquetas e células endoteliais (PECAM-1; CD31) ocorre a diapedese (Albelda, Smith *et al.*, 1994; Wagner e Roth, 2000).

### **1.3) Grânulos e vesículas secretórias**

A estimulação e/ou ativação dos neutrófilos em resposta ao processo inflamatório leva o recrutamento ao local inflamado por gradiente quimioatraentes. O processo de locomoção e de destruição de microorganismos desencadeia mudanças na superfície dos neutrófilos levando a estados diferentes. Essa alteração está intrinsecamente relacionada com a movimentação ordenada dos grânulos e vesículas secretórias. Os grânulos são subdivididos em grânulos azurofílicos ou primários, grânulos específicos ou secretórios e grânulos terciários ou geletinosos. O mecanismo de mobilização é controlado e ordenado havendo distinção na quantidade e qualidade dependente do estimulado/ativador

(Faurischou e Borregaard, 2003). Segundo Faurischou, 2003 as vesículas secretórias são as primeiras a serem exocitadas, seguidas dos grânulos gelatinase, específicos e azurofílicos, nesta ordem.

### **1.3.1) Vesícula secretória**

As vesículas secretórias são produzidas por endocitose na maturação tardia dos neutrófilos na medula óssea. São as primeiras a serem mobilizadas e exocitadas. No conteúdo vesicular foram encontradas proteínas plasmáticas, porém faz se necessário maiores investigações. Já a membrana contém diversos receptores, dentre elas marcadores de adesão como CD11b/CD18. CD11b frequentemente é investigado como sinal de ativação inicial e é fundamental para o evento de adesão firme, interação neutrófilos ao endotélio. Outra molécula bastante relacionada à ativação é o heterodímero formado pelas subunidades p22<sub>phox</sub> e gp91<sub>phox</sub>. A mobilização desse heterodímero aumenta a formação do complexo NADPH oxidase na membrana plasmática e conseqüentemente a produção de ânion superóxido para o meio extracelular (Borregaard; Faurischou e Borregaard, 2003; Soehnlein, Weber *et al.*, 2009).

### **1.3.2) Grânulo gelatinase**

Os grânulos gelatinase são conhecidos como peroxidases negativos e são produzidos por células pós-mitóticas. Na ordem de desgranulação estabelecida, são liberados após as vesículas secretórias. No seu conteúdo não são encontradas proteínas antimicrobianas, mas proteínas relacionadas à degradação da matriz intercelular, importante para a transmigração e migração no tecido. As proteínas principais são a gelatinase, proteína que nomeia o grânulo, e lisosima. Na membrana desses grânulos encontramos mais uma vez marcadores de adesão CD11b/CD18 e o heterodímero de membrana do complexo NADPH oxidase (Faurischou e Borregaard, 2003; Murav'ev, Fomina *et al.*, 2003; Soehnlein, Weber *et al.*, 2009).

### **1.3.3) Grânulos específicos**

Os grânulos específicos também conhecidos com peroxidases negativos são produzidos no estágio de metamielócitos na maturação dos neutrófilos. É o terceiro compartimento a ter seu conteúdo liberado e possui, como proteína principal, a lactoferrina dentre outras proteínas antimicrobianas, além disso, os grânulos específicos contêm ativadores da cascata do complemento que podem amplificar a resposta inflamatória. Na membrana granular também apresentam o complexo Mac-1, subunidade da NADPH oxidase, já relatados nas vesículas secretórias e nos grânulos de gelatinase, e subunidade da proteína G dentre outras proteínas e receptores. Esse grânulo parece estar relacionado com a destruição de microorganismos invasoras no meio extracelular e com a modulação da resposta inflamatória (Gallin, 1985; Faurschou e Borregaard, 2003; Soehnlein, Weber *et al.*, 2009).

### **1.3.4) Grânulos azurofílicos**

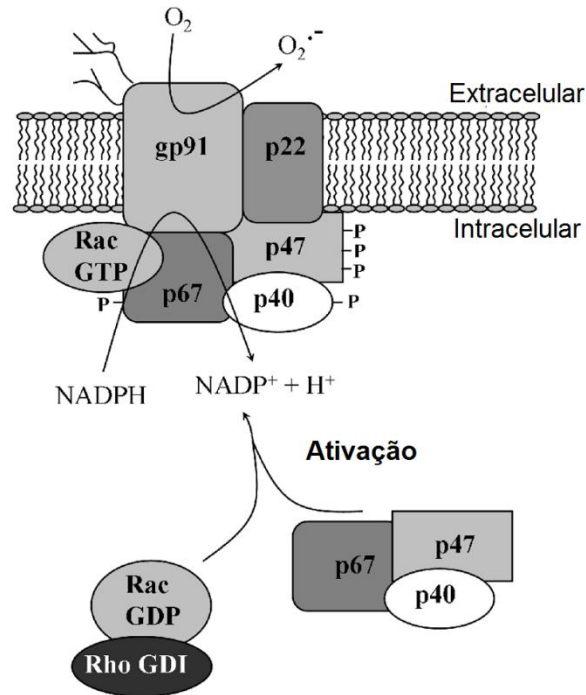
Os grânulos azurofílicos também conhecidos como peroxidase positivos por possuir mieloperoxidase são produzidos no estágio de promielócito da formação dos neutrófilos. A desgranulação dessas estruturas ocorre mais tardiamente do que os outros porém acredita-se que sua principal movimentação seja a fusão com o fagossomo. O seu conteúdo apresenta a proteína lisozima como a mais abundante, mas possuem hidrolases ácidas e proteinases, proteínas antimicrobianas. Por causa do seu conteúdo, fusão com o fagossomo e apresentação de CD63 em sua membrana os grânulos azurofílicos eram confundidos com o lisossomos primários, mas se diferenciavam por não apresentar LAM-1 e LAM-2, componentes do lisossomo e por apresentar CD68 ausente no lisossomo. A membrana do grânulo azurofílico, além do CD63 e CD68 já relatados apresenta presenlina-1, somatina e H<sup>+</sup> ATPase tipo V (Gallin, 1985; Faurschou e Borregaard, 2003; Fernandes, Passos *et al.*, 2005).



#### 1.4) Complexo NADPH oxidase

O complexo NADPH oxidase é constituído de 6 subunidades sendo 2 associadas à membrana plasmática e à membrana de grânulos. As demais subunidades são proteínas presentes no citosol. As subunidades p22<sub>phox</sub> e gp91<sub>phox</sub> associadas a membranas são conhecidas também como citocromo b<sub>588</sub> e as subunidades citosólicas são p47<sub>phox</sub>, p67<sub>phox</sub>, p40<sub>phox</sub> e a GTPase Rac2 (Brown, Stewart *et al.*, 2004). A montagem do complexo é fundamental para o funcionamento da enzima que converte NADPH em NADP<sup>+</sup> liberando dois elétrons e um próton. O próton é liberado para citoplasma enquanto os elétrons são transportados pela membrana plasmática ou do fagossomo e se ligam a duas moléculas de oxigênio formando o ânion superóxido (Rada e Leto, 2008).

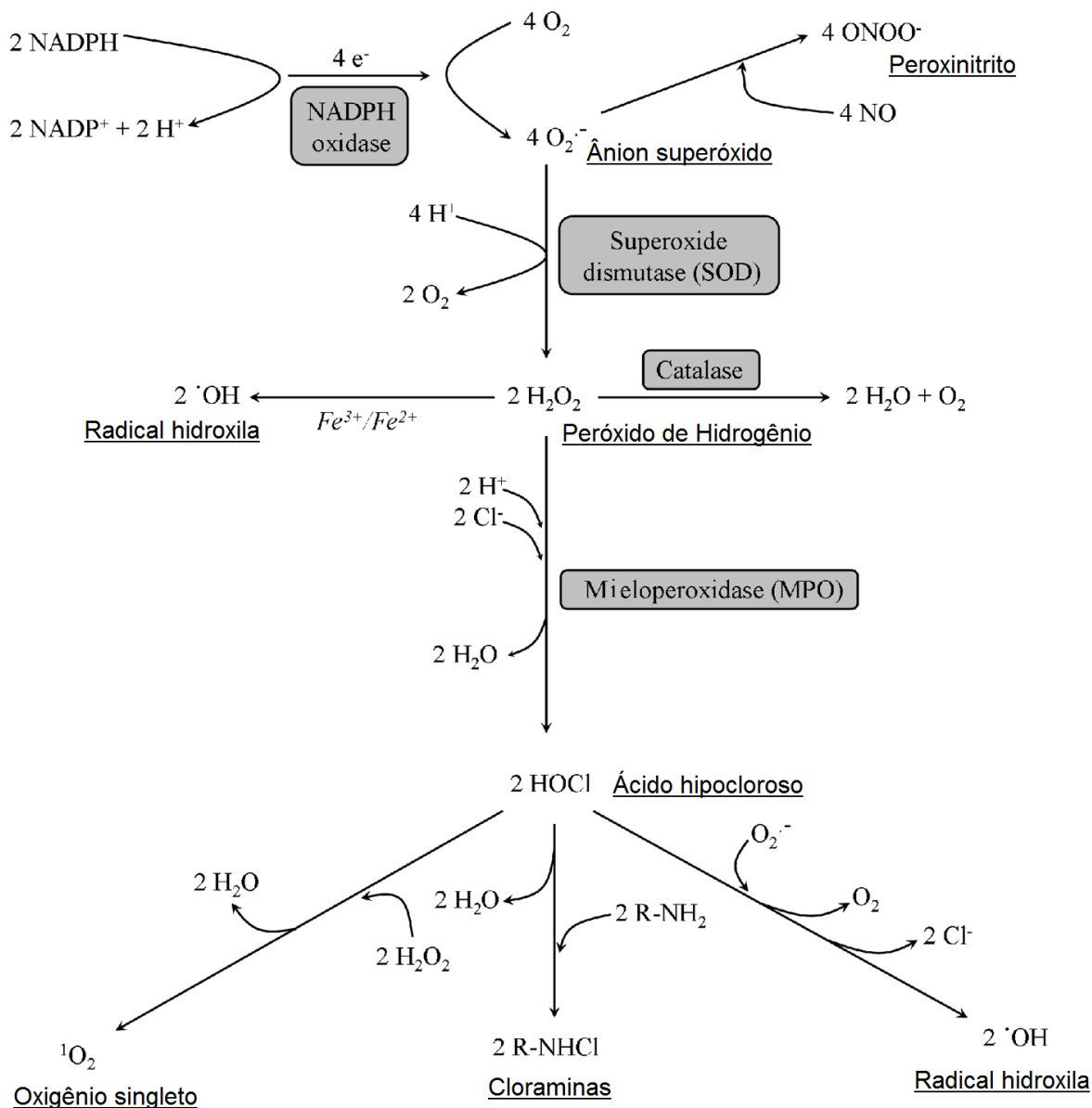
A ativação dos neutrófilos é amplamente associada à ativação do complexo NADPH oxidase, que resulta na completa montagem e ação desse complexo. Agentes comumente considerados como ativadores são o PMA e o fMLP. Mas algumas moléculas podem atuar tanto como estimuladores quanto ativadores, apresentando um efeito dependente de concentração, porém, em alguns casos, esse aumento não é fisiológico (Sheppard, Kelher *et al.*, 2005). A ativação requer a fosforilação dos resíduos de tirosina e serina da p47<sub>phox</sub>, p67<sub>phox</sub> e p40<sub>phox</sub> via cinases, tais como proteína cinase C (PKC), cinase p21 ativada, p38 MAPK, fosfoinositol 3-cinase (PI3-K) e proteína cinase ativada (PA), seguido por translocações para membrana plasmática e granular. Os componentes citosólicos possuem diversos domínios modulares que permitem interações proteína-proteína e proteína-lípido, possibilitando assim a montagem do complexo (Chen, Lin *et al.*, 2005; Sheppard, Kelher *et al.*, 2005). A subunidade p22<sub>phox</sub> presente nas membranas citoplasmáticas e granulares fornece um local para a p47<sub>phox</sub> se acoplar, quando ativada por meio de fosforilações. Assim a p47<sub>phox</sub> se liga à p22<sub>phox</sub> e conseqüentemente à gp91<sub>phox</sub>, proteínas formadoras de um heterodímero, e à p67<sub>phox</sub> que está ligada a gp91<sub>phox</sub>. A p40<sub>phox</sub> fosforilada liga-se tanto a p47<sub>phox</sub> quanto a p67<sub>phox</sub> para estabilizar o complexo. A p67<sub>phox</sub> é ativada também por fosforilação e liga-se a GTP-Rac, antes inativa no citosol na forma de GDP-Rac inibida por RhoGDI. A ligação p67<sub>phox</sub> e GTP-Rac promove o fluxo de elétrons pelo flavocitocromo (NADPH oxidase), como se observa na figura 2 (Rada e Leto, 2008).



**Figura 2:** Esquema de ativação da NADPH oxidase. Na ativação celular com a ilustração da montagem do complexo para a transformação de NADPH em  $NADP^+ + H^+$  e liberação de ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ). Modificado a partir de Rada, Balázs & Leto, Thomas L., 2008(Rada e Leto, 2008).

Eventos simultâneos acontecem após ativação dos neutrófilos dentre eles estão a montagem do complexo NADPH oxidase e a fagocitose. Assim a produção do ânion superóxido produzido pelo complexo ocorre ao mesmo tempo em que forma o fagossomo pelo processo de fagocitose. O complexo montado na membrana plasmática libera o ânion superóxido para meio extracelular e pode ser capturado por ser uma região de formação de fagossomo, porém ocorre escape de ( $O_2^{\cdot-}$ ). Outro evento que também acontece é a fusão de grânulos ao fagossomo aumentando a concentração de ânion superóxido. O ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) pode ser transformado em peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) de forma espontânea porém essa reação é catalisada pela enzima superóxido dismutase. O peróxido de hidrogênio é mais tóxico do que o ânion superóxido, pois é mais reativo, permeável a membrana e relativamente mais estável, o que permite a difusão desse composto. O peróxido de hidrogênio pode ser quebrado em  $H_2O$  e  $O_2$  pela enzima catalase diminuindo a toxicidade. Outras reações químicas que resultam espécies reativas de oxigênio podem acontecer dentro do fagossomo como: reação de Haber-Weiss ou de Fenton tendo como

substrato o peróxido de hidrogênio e o ânion superóxido e na presença de  $Fe^{++}$  ou  $Cu^{++}$  produzindo radical hidroxila ( $HO^\circ$ ) ou ainda na presença da enzima mieloperoxidase e halogênios produzindo, por exemplo, ácido hipocloroso, figura 3 (El-Benna, Dang *et al.*, 2005; Rada e Leto, 2008).



**Figura 3:** Produção dos metabólitos de oxigênio. Esquema das reações químicas na produção de metabólitos de oxigênio no fagossomo. Modificado a partir de Rada, Balázs & Leto, Thomas L., 2008(Rada e Leto, 2008).

### **1.5) Ativação da transcrição**

Estudos relatam que neutrófilos ativados por meio de isquemia e reperfusão e endotoxemia e conseqüentemente atuação de estimuladores como PAF e LPS respectivamente ativam a transcrição, por mecanismo controlado pelo proteossoma (De Kleijn, Kox *et al.*; Ichikawa, Flores *et al.*, 1997). Esse controle está relacionado com a ativação de fatores de transcrição, o mais conhecido o NF- $\kappa$ B, que acredita-se está inativo em células quiescentes (Wojcik e Di Napoli, 2004; Yu, Simonson *et al.*, 2009). Após o estímulo várias sinalizações intracelulares ocorrem, dentre elas a formação e ativação do NF- $\kappa$ B. O NF- $\kappa$ B é um dímero (p65/p50) da família Rel que, após o estímulo, é formado pela degradação parcial do precursor p105 mediado pela unidade 26S do proteossoma. Além disso, as subunidades p65 e p50 são montadas pela proteína I $\kappa$ B $\alpha$  formando um complexo, o qual é fosforilado e leva a ubiquitinação do I $\kappa$ B $\alpha$ , que por sua vez libera o dímero p65/p50 (NF- $\kappa$ B). A proteína ubiquitinada é degradada e o NF- $\kappa$ B fica livre no citoplasma com a sua porção sinalizadora de localização nuclear exposta. Esse sinal permite a sua translocação para o núcleo, onde liga-se ao promotor de vários genes pró-inflamatórios, tais como: TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-8 (Abdel-Mageed, Bajwa *et al.*, 2003) e induz a expressão e amplificação da resposta inflamatória (Wojcik e Di Napoli, 2004). A ativação que leva a liberação do fator de transcrição e os fatores de transcrição que são ativados pelo NF- $\kappa$ B ainda são desconhecidos.

### **1.6) Neutrófilos e ativadores**

A estimulação ou ativação dos neutrófilos podem ser desencadeadas por inflamações provocadas por infecção, onde estão presentes componentes de paredes bacterianas como LPS e fMLP, produzidos respectivamente por bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, que são agentes ativadores dos neutrófilos e atuam como quimioatraentes até o local da infecção. Quando os neutrófilos chegam ao local da infecção, as bactérias geralmente estarão opsonizadas, o que orienta os neutrófilos a realizar a fagocitose rapidamente e, em seguida, ocorre a apoptose dos neutrófilos.

Em uma inflamação sem infecção, outras quimiocinas, como TNF- $\alpha$ , interleucinas e PAF são liberadas pelos tecidos e leucócitos após injúrias teciduais, ocorrendo a quimiotaxia e a liberação dos grânulos sem a fagocitose. Nos dois tipos de processo inflamatório (infeccioso ou não), o equilíbrio entre recrutamento, liberação de substâncias tóxicas e apoptose dos neutrófilos é de fundamental importância para que o agente inflamatório seja erradicado e a resposta seja gradualmente interrompida.

Algumas doenças são agravadas pela perda desse equilíbrio, como: bacteremia, que pode evoluir a choque séptico; a coagulação intravascular disseminada, ou a isquemia seguida de reperfusão que pode evoluir para a síndrome da resposta inflamatória sistêmica, que, por sua vez, pode apresentar como complicação a síndrome da angústia respiratória aguda e como possível consequência a síndrome da disfunção de múltiplos órgãos (Kuijpers, 2001). Tal situação é frequente após traumas graves, podendo evoluir para ARDS, que apresenta elevação na concentração de PAF sérica e pode culminar na morte por falência múltipla de órgãos (MOF), cuja taxa de mortalidade passa dos 50% (Rodríguez, 1993; Botha, Moore, Moore, Fontes *et al.*, 1995).

### **1.6.1) Fator de agregação plaquetária (PAF)**

A inflamação, mecanismo de defesa do organismo, é um processo complexo que envolve células e mediadores. Assim, a importância dos estudos celulares e dos mecanismos de modulação são importantes para a compreensão de diversas patologias. O fator de agregação plaquetária (PAF) é um potente mediador do processo inflamatório, sendo cada vez mais estudado após a descoberta do pré-condicionamento do organismo a uma resposta inflamatória mais intensa (Penna, Bassino *et al.*; Mcmanus e Pinckard, 2000). O nome fator de agregação plaquetária foi originado por causa da ativação da agregação plaquetária de coelho, após estimulação de basófilos por IgE. O PAF (1-O-alkil-2-acetil-sn-glicero-3-fosfolina) é um glicerofosfolípido de baixa massa molecular (Penna, Bassino *et al.*; Rodríguez, 1993; Mcmanus e Pinckard, 2000).

PAF é um autacóide potente com ação em muitos sistemas, incluindo sistema vascular, cerebral e muscular, produzido por uma grande variedade de células, tais como PMN, monócitos/macrófagos, linfócitos, células do endotélio vascular, mastócitos,

basófilos, eosinófilos e plaquetas. O PAF é rapidamente sintetizado após estimulação por mediadores inflamatórios como trombina, angiotensina II, vasopressina, leucotrienos C4 e D4, histamina, bradicinina, elastase, catepsina, peróxido de hidrogênio, plasmina, interleucina 8 (IL-8), interleucina 1 (IL-1) e TNF (Penna, Bassino *et al.*; Mcmanus e Pinckard, 2000; Montrucchio, Alloatti *et al.*, 2000).

A fosfatidilcolina é o substrato para a produção do PAF que, em neutrófilos, pode ser estimulada após ativação por LPS ou fMLP. Tanto a produção como a ação do PAF podem ocorrer na mesma célula, o mediador lipídico possui 4 maneiras de atuação: intrácrina, estimulação interna da célula produtora, autócrina, estimulação da célula produtora após liberação, juxtácrina, estimulação da célula produtora e/ou de células adjacentes e parácrina, estimulação de células próximas à produtora (Mcmanus e Pinckard, 2000).

Os neutrófilos sofrem estimulação após a ligação do PAF ao seu receptor (PAFR) (Lee, Hybertson *et al.*, 2002). O PAFR é membro da superfamília de proteínas que formam 7 hélices em forma de serpentina transmembrânica, também encontrada na membrana endossomal. O quarto *loop* intracelular contém a extremidade carboxi-terminal, ligada à proteína G, tipos G<sub>q</sub> e G<sub>i</sub>. A proteína G, acoplada ao PAFR, é composta de três subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ . A ligação do PAF ao seu receptor ativa as subunidades  $\beta\gamma$ , induz a sinalização mediante subunidades insensíveis à toxina pertussis, subunidade G<sub>q</sub> $\alpha$ , ativando PI3K e fosfolipases C (PLC) e A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>). PLC produz inositol trifosfato (IP<sub>3</sub>) e diacilglicerol (DAG) (Penna, Bassino *et al.*; Kerkhoff, Nacken *et al.*, 2005). DAG ativa a proteína cinase C (PKC), que fosforila diversas proteínas. O IP<sub>3</sub> atua no retículo endoplasmático liberando cálcio, que por sua vez irá favorecer o influxo de cálcio do meio extracelular para o citosol. A ativação de PLA<sub>2</sub> produz ácido araquidônico, que metabolizado pela ciclooxygenase ou lipoxigenase produz prostaglandina e eicosanoides, principalmente leucotrieno B<sub>4</sub> (Nick, Avdi *et al.*, 1997; Mcmanus e Pinckard, 2000; Montrucchio, Alloatti *et al.*, 2000).

Pouco se sabe da via de sinalização intracelular dos neutrófilos estimulados pelo PAF, porém estudos mostram a ativação da via da MAP cinase pelas subunidades p38 e ERK1/2 (Chen, Lin *et al.*, 2005). Sabe-se que o fosfatidilinositol 3 cinase (PI3K) ativa ERK dependente de fosforilações por tirosinas cinases Ras, Raf-1 e MEK. PKC e PLA<sub>2</sub>

também ativam ERK. Além disso, PLA<sub>2</sub> ativa p38 através de MEK 3/6 (Garcia, Fernandez-Gallardo *et al.*, 1990; Nick, Avdi *et al.*, 1997; Khreiss, Jozsef *et al.*, 2004; Chen, Lin *et al.*, 2005), figura 4.

Sabe-se que os neutrófilos estimulados pelo PAF provocam a mobilização do CD11b para a membrana plasmática aumentando a adesão firme. Estudos sugerem que esse evento é induzido por ERK, IP<sub>3</sub> e p38. Estudos com pacientes asmáticos mostram o aumento de Mac-1 e LFA-1 em neutrófilos após estimulação pelo PAF, bem como o aumento de LTB<sub>4</sub> (Kitchen, Rossi *et al.*, 1996; Gabrijelcic, Acuna *et al.*, 2003). Também foi observado o aumento de P-selectina no endotélio pela estimulação do PAF (Vinson, Rickard *et al.*, 2005). A p38 também seria responsável pela fosforilação da subunidade p67<sub>phox</sub> da NADPH oxidase. O PAF também estimula a fosforilação da p40phox e Rac2 ativando o complexo, porém não é conhecido o caminho que leva a essa fosforilação. Como podemos observar vários pontos da via de estimulação dos neutrófilos pelo PAF ainda se encontram obscuros (Brown, Stewart *et al.*, 2004; Sheppard, Kelher *et al.*, 2005).

### **1.6.2) formyl – Methionyl – Leucyl - Phenylalanine (fMLP)**

Estudos mostram que a resposta inflamatória ativada devido à infecção bacteriana libera quimioatraentes que ativam neutrófilos e monócitos/macrófagos. Infecções por bactérias Gram negativas ou positivas liberam quimiotáticos relacionados ao crescimento bacteriano. Esses quimiotáticos são peptídeos de baixa massa molecular apresentando N-formil metionil em sua estrutura. Em meados de 1968 Ward e colaboradores confirmam a liberação de peptídeos N-formil metionina por várias bactérias Gram positivas e por mitocôndrias em células de mamíferos. Com essa descoberta e com o estudo do receptor de peptídeo formilados (FPR) foi produzido um protótipo *formyl – Methionyl – Leucyl – Phenylalanine* (fMLP), um tripeptídeo que liga-se ao receptor ativando as células, sendo considerado um modelo de ativação produzido por bactérias Gram-positivas (Prossnitz e Ye, 1997).

O protótipo quimioatraente que representa os peptídeos formilados fMLP foi encontrado em fluidos de culturas de *Staphylococcus aureus* com a mesma capacidade quimiotática para neutrófilos, estabelecendo-o como modelo de infecção (Christophe, Karlsson *et al.*, 2001).

Os receptores de peptídeos formilados (FPR) são encontrados em neutrófilos e monócitos/macrófagos e se apresentam em dois tipos: FPR *like* 1 (FPRL1) e FPR *like* 2 (FPRL2). O receptor FPRL2 só é encontrado em monócitos/macrófagos. Em neutrófilos, os receptores FPR estão localizados nas membranas dos grânulos gelatinase e na membrana plasmática, específicos e vesículas secretórias (Le, Murphy *et al.*, 2002; Faurschou e Borregaard, 2003). A estrutura dos FPRs é constituída de sete segmentos transmembrânicos em  $\alpha$  hélice que se ligam à proteína G (Prossnitz e Ye, 1997), família Gi, que estimulam as subunidades sensíveis à Toxina Pertussis (PTX). A proteína G é formada por três subunidades, sendo elas  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  e em repouso as subunidades estão ligadas ( $G\alpha\beta\gamma$ ). O complexo  $G\alpha\beta\gamma$  possui afinidade por guanosina difosfato (GDP) e após a ligação do peptídeo ao receptor o complexo é dissociado liberando a subunidade  $\alpha$  que interage com outras proteínas efetoras gerando um segundo mensageiro e transformando GDP em GTP (Ferretti, Nalli *et al.*, 2001; Zen e Liu, 2008). A ativação da via e geração de um segundo mensageiro é crucial para ações efetoras dos neutrófilos na resposta inflamatória como quimiotaxia, aderência, fagocitose, geração de ROS e secreção de enzimas lisossomais e granulares (Selvatici, Falzarano *et al.*, 2006).

A interação entre fMLP e seu receptor localizado na superfície dos neutrófilos inicia a modificação da proteína G liberando a subunidade  $\alpha$  e iniciando o processo de transdução de sinal. A subunidade livre ativa a fosfolipase C isoforma  $\beta$  (PLC $\beta$ ) que hidrolisa PIP<sub>2</sub> em DAG e IP<sub>3</sub>, DAG ativa PKC. A proteína  $G\alpha$  também ativa PI3K. Também há relato da ativação da PLA e consequente produção de LTB<sub>4</sub> e prostaglandinas. O IP<sub>3</sub> ativado causa o influxo de cálcio do meio extracelular para o citosol e a liberação de cálcio do retículo endoplasmático (Le, Murphy *et al.*, 2002; Zen e Liu, 2008). O cálcio livre no citosol é considerado um segundo mensageiro que provoca a produção de AMPc não envolvendo Adenilato Ciclase, mas um mecanismo ainda desconhecido. O cálcio também atua formando um complexo com a calmodulina desempenhando um papel no desencadeamento de pequenas proteínas GTPase como Ras, Rac e p21, assim como efetores PAKs, NADPH oxidase e ERK (Ferretti, Nalli *et al.*, 2001). A ligação da p21 no domínio PAK leva a interação com Rac na forma ativada ligada a GTP, processo ainda obscuro (Lian, Crossley *et al.*, 2001). Observou-se que após a ativação dos neutrófilos por fMLP, as proteínas Ras, PI3K, MEK-2, como isorfoma predominante, e ERK 1/2 exibiam uma rápida ativação. A



via da MAPK ativada por meio da ativação celular por fMLP foi verificado a capacidade de MKK3, MKK4 e MKK6 de fosforilar p38MAPK, onde Ric Kump (1997) cogita o envolvimento de Rac e/ou Cdc42 seguido de PAK, além disso, foram identificados 2 tipos de PAKs nesse contexto (Krump, Sanghera *et al.*, 1997; Ferretti, Nalli *et al.*, 2001; Lian, Crossley *et al.*, 2001), figura 4.

Sabe-se que a ativação dos neutrófilos por fMLP provoca adesão, migração, desgranulação, produção de ROS e fagocitose. O direcionamento e migração foram relacionados com a ativação de PI3K (Le, Murphy *et al.*, 2002). Estudos relatam que o aumento de CD11b e formação do complexo Mac-1 na superfície dos neutrófilos e a diminuição de L-selectina estão relacionados com a ativação de PKC, assim com a produção de ROS com ativação de PKC (Alexander, Kishimoto *et al.*, 2000; Le, Murphy *et al.*, 2002). Sugere-se a participação de ERK 1/2, MEK 1/2 e p38MAPK envolvidas na produção de ROS, sendo ERK 1/2 e MEK 1/2 responsáveis pela fosforilação de p47<sub>phox</sub> e as três envolvidas na fosforilação de p67<sub>phox</sub>, subunidades do complexo NADPH oxidase (Dang, Raad *et al.*; Dewas, Fay *et al.*, 2000).

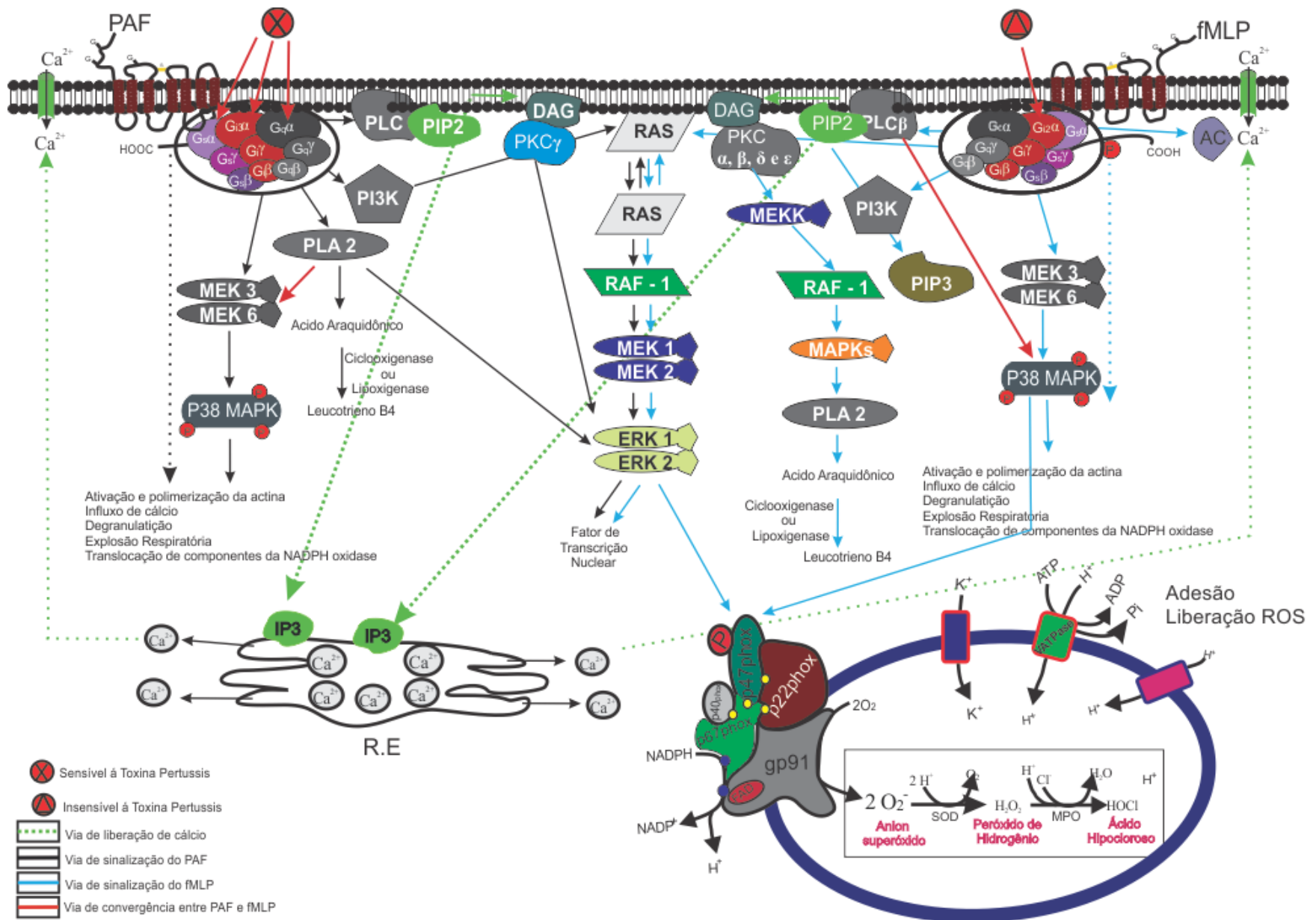
### **1.6.3) Diferenças entre estimulação dos neutrófilos pelo PAF e ativação pelo fMLP**

Os neutrófilos possuem um variedade de receptores em sua membrana, dentre eles receptores para substratos lipídicos (PAF) e protéicos (fMLP). Sabe-se que tanto o PAF quanto o fMLP iniciam suas cascatas de sinalização por meio de receptor acoplados a proteína G, onde a intensidade da resposta celular se dá pela ativação parcial ou total da mesma (Priscila Randazzo De Moura, 2011). Essa diferença foi caracterizada por Lee-Wei Chen e colaboradores, ao especificar a inibição ou não da subunidade G<sub>i</sub> pela *Toxina Pertussis* na cascata de ativação do PAF e fMLP. A resposta da ativação total do neutrófilo pelo fMLP é caracterizada pela sensibilidade da subunidade  $\alpha_{i2}$  da proteína G à *Toxina Pertussis*, que resulta da ativação completa da cascata de sinalização ativando os dois sistemas de transdução de sinais, via ativação da proteína G<sub>s</sub> promovendo a ativação da Fosfolipase C (produção de DAG e IP<sub>3</sub>) e inibição da subunidade G<sub>i2</sub> $\alpha$  (Chen, Lin *et al.*, 2005). Essa ativação é caracteristicamente observada na resposta celular onde há uma grande mobilização de cálcio, despolarização de membrana, montagem de actina, adesão ao

endotélio vascular, quimiotaxia, geração de superóxido, liberação de enzimas granulares e síntese de AMP cíclico. Já o PAF estimula os neutrófilos mostrando respostas celulares moderadas (liberação moderada de enzimas granulares e diminuição da liberação de AMPc), limitada (baixa intensidade de geração de superóxidos e pequena clivagem da L-selectina) com reversão espontânea (Kitchen, Rossi *et al.*, 1996) justificada pela insensibilização das subunidades  $G_{i3\alpha}$ ,  $G_s\alpha$  e  $G_q\alpha$  à *Toxina Pertussis*, onde somente a via da Fosfolipase C e A2 são ativadas culminando conseqüentemente da liberação parcial de cálcio via IP3.

Outra via que é comum na sinalização de PAF e fMLP é a ativação de PI3K através da subunidade  $\beta\gamma$  da proteína G e a fosforilação de ERK por duas vias: PLC e PKC, sendo que no estímulo por PAF, PKC é tipo  $\gamma$  (subunidade que provavelmente é dependente de cálcio) e no fMLP tipos  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$  e  $\epsilon$  (que pode ser dependente de cálcio ou não). Uma proteína cuja ativação é diferente nessas duas condições é a p38 MAPK, pois na ativação pelo fMLP ela é ativada pela PLC enquanto que na estimulação pelo PAF ela é ativada pela PLA<sub>2</sub> (Chen, Lin *et al.*, 2005), figura 4.

As diferenças encontradas no início das vias em estudo podem levar a ativações parciais em neutrófilos estimulados pelo PAF e direcionamento diferentes das funções a serem realizadas, dentre elas ainda pouco conhecida a regulação da transcrição. Em neutrófilos ativados comumente relata-se a migração e a degranulação, mas pouco se sabe do mecanismo interno que leva a essas movimentações.



**Figura 4:** Cascata de sinalização dos neutrófilos estimulados pelo PAF e ativados pelo fMLP

## **1.7) Técnicas adotadas**

De forma a abordar questões que envolvem aspectos funcionais dos neutrófilos, bem como complexas interações entre vias de sinalização, optou-se pelo uso das abordagens proteômica (Bernas, Gregori *et al.*, 2006). A primeira permite analisar variações intracelulares ou em sua superfície, tanto de forma a quantificar a intensidade de variação numa determinada população de células, quanto verificar a uniformidade de tal alteração na mesma população. A segunda permite quantificar a abundância de grandes grupos de proteínas, identificando-se as que apresentam variabilidade significativa entre as condições.

### **1.7.1) Citometria de fluxo**

A citometria de fluxo permite a contagem de células individuais caracterizando-as quanto ao tamanho, quantidade de grânulos e emissão de fluorescência, quando utilizado um marcador específico. O citômetro de fluxo é um sistema constituído por 5 elementos: fonte de radiação (lâmpada de mercúrio ou laser), uma câmara de fluxo, unidades de filtros ópticos para seleção de intervalos de comprimento de ondas específicas, fotodiodos ou fotomultiplicadores para detecção sensível e uma unidade que processa os dados recolhidos. A fonte de radiação emite um feixe de laser que será desviado ao encontrar com a célula. Esse desvio será detectado pelos fotodiodos. A combinação desses desvios revelará informações como a dimensão celular, a granularidade e a morfologia. Com a inclusão de um marcador fluorescente pode-se ter mais um parâmetro a ser analisado (Loureiro).

No presente projeto, foram utilizados o 1,2,3 diidrorodamina (DHR) como marcador para o espécies reativas de oxigênio. Com a estimulação e ativação dos neutrófilos a NADPH oxidase produz ânion superóxido que é transformada em peróxido de hidrogênio de forma espontânea e catalisada pela enzima superóxido dismutase. A 1,2,3 dihidrorodamina (DHR) é permeável a membranas celulares e é oxidada na presença de peróxido de hidrogênio, sendo assim um marcador indireto da estimulação e/ou ativação celular. Após a oxidação o novo composto formado 1,2,3 rodamina é fluorescente capaz de

ser excitado pelo *laser* de 488nm, emitindo fluorescência captada pelo canal cujo comprimento é entre 525-535nm(Bassoe, Li *et al.*, 2003; Wrona, Patel *et al.*, 2005).

Também foram utilizados dois marcadores de superfície que indicam ativação. O marcador CD62L é positivo para a ativação na ausência de L-selectina na superfície, já o marcador CD11b ocorre ao contrário. A ativação dos neutrófilos leva a liberação de uma metaloprotease que cliva a L-selectina e conseqüentemente a desgranulação de grânulos específicos, gelatinase e vesícula secretória que aumenta CD11b na membrana plasmática(Conejeros, Jara *et al.*). Foram utilizados para avaliação citométrica anticorpos conjugados com fluoróforo FITC (525-535nm) para CD62L e fluoróforo R-PE (555-600nm) para CD11b (Silva, 2004).

### **1.7.2) Proteômica**

Proteômica consiste no estudo de conjuntos de proteínas expressas, bem como das variações e modificações pós-traducionais em condições específicas. Várias abordagens são atualmente utilizadas em proteômica, sendo uma das frequentemente descritas a comparativa, onde proteínas são separadas, quantificadas e posteriormente identificadas. Um dos métodos de separação protéica é a utilização da eletroforese 2D que separa misturas complexas de proteínas, em intervalos definidos de pH e massa molecular, a comparação dos estado específicos, pode ser realizada por meio da comparação da intensidade dos *spots* presentes e pareados nas imagens dos géis de cada condição e a identificação das proteínas presentes pode ser realizada com base em dados obtidos pela espectrometria de massa como MALDI-TOF-TOF e LTQ XL Orbitrap.

Há poucos trabalhos de proteômica celulares totais de neutrófilos, porém nos últimos anos foram publicados trabalhos sobre frações celulares de neutrófilos, enfocando citoesqueleto, membrana plasmática e grânulos (Lominadze, Powell *et al.*, 2005; De Souza Castro, De Sa *et al.*, 2006; Jethwaney, Islam *et al.*, 2007; Uriarte, Powell *et al.*, 2008; Xu, Crawford *et al.*, 2009). Como o foco desse trabalho é caracterizar os neutrófilos em estados de ativação diferentes em vários aspectos, também foi utilizada a abordagem proteômica que permite separar, fracionar, identificar e catalogar uma grande quantidade de proteínas

ao mesmo tempo. O conjunto de proteínas com abundância diferente entre as condições testadas permitirá avaliar vias metabólicas participantes de tais processos, bem como sua ocorrência em organelas específicas. Com isso desenvolverá a abordagem clássica em proteômica, envolvendo eletroforese bidimensional (2DE), espectrometria de massa (MS e MS/MS) e bioinformática para que proteínas diferencialmente abundantes possam ser identificadas em bancos de dados internacionais (Palma).

Os neutrófilos são células de defesa do organismo de extrema importância que atuam principalmente em infecções fúngicas e bacterianas. Quando o funcionamento neutrofílico é eficiente e ao mesmo tempo está sob controle, o sistema imune e células endoteliais liberam substâncias que ativam, estimulam e inibem várias ações dessa célula. O PAF, IL-8 e TNF- $\alpha$  são substâncias que causam o efeito estimulador nos neutrófilos, já o fMLP e LPS causam a ativação dos neutrófilos, mimetizando uma infecção bacteriana e o PMA mimetiza a ativação iniciada internamente. Porém, diversas características morfológicas dentre elas a desgranulação dos neutrófilos e pontos das vias que levam a tal estimulação e ativação ainda não foram completamente esclarecidos na literatura. Com isso a comparação do perfil de ativação de adesão entre neutrófilos estimulados por PAF e ativados por fMLP, além da identificação de proteínas diferencialmente abundantes entre células quiescentes, células estimuladas pelo PAF e ativadas por fMLP fornecerá subsídios para uma elucidação mais detalhada dos mecanismos moleculares que levam à estimulação e ativação dos neutrófilos.

## **2. OBJETIVO**

Analisar diferenças por meio de ensaios citométricos e identificar proteínas de neutrófilos quiescentes, estimulado pelo fator de agregação plaquetária (PAF) e ativados pelo n-formil-metionil-leucil-fenilalanina (fMLP) que caracterizem diferença entre as condições.

### **2.1) Para se atingir tal objetivo, foi adotada a seguinte estratégia:**

- Comparação entre os neutrófilos quiescentes, estimulados por PAF e ativados pelo fMLP avaliando a liberação de espécies reativas de oxigênio, presença de CD11b na superfície celular e liberação do CD62L da superfície.

- Comparação entre os mapas proteômicos em pH ácido (4-7) em três situações: neutrófilos quiescentes, neutrófilos estimulados por PAF e neutrófilos ativados por fMLP.

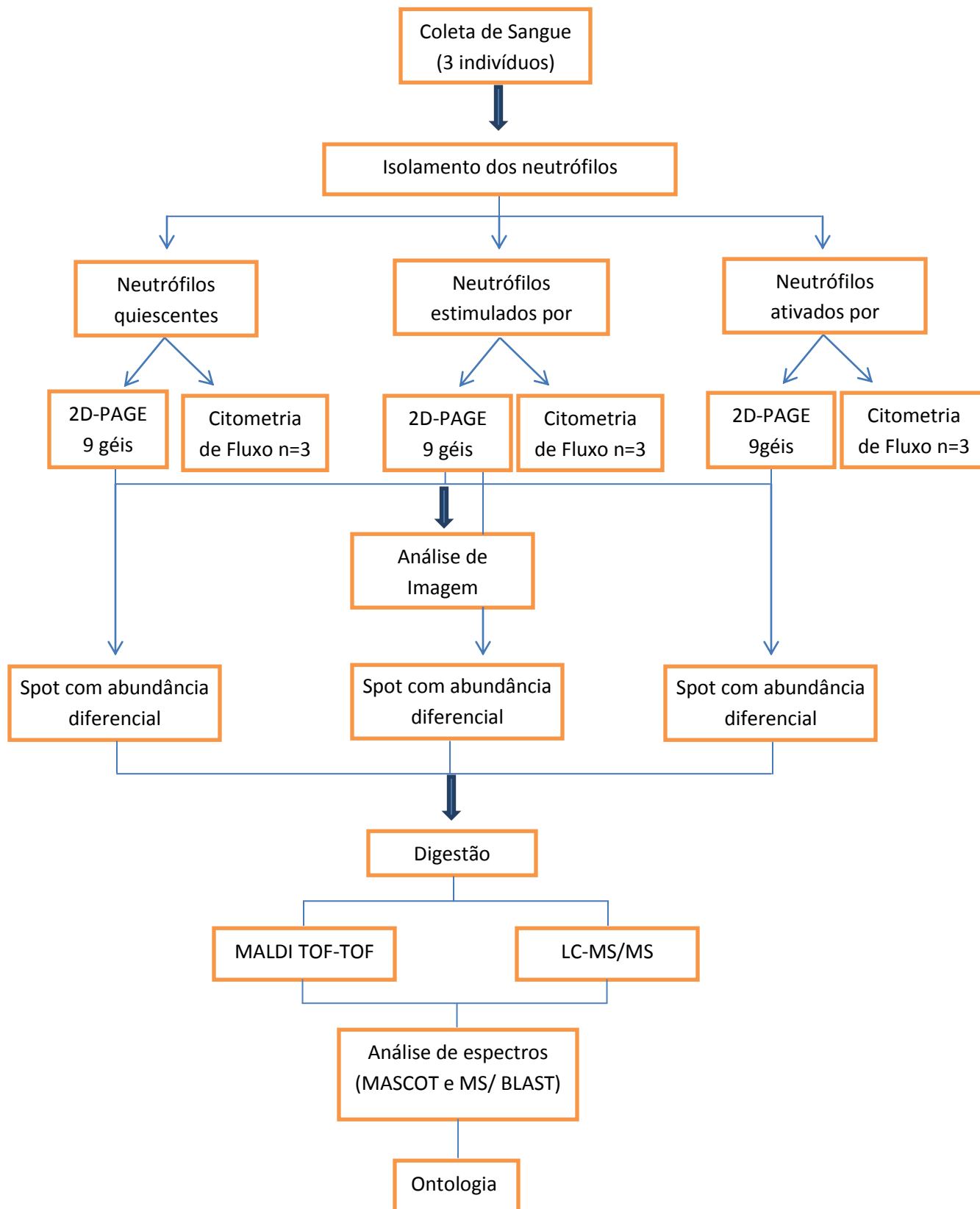
- Identificação de proteínas características de cada estímulo e ativação, bem como das que são comuns aos diversos estímulos em relação ao controle quiescente.

### **3. METODOLOGIA**

Para comparação proteômica foram escolhidos apenas 2 ativadores: PAF e fMLP, por já existirem géis bidimensionais já produzidos em trabalhos anteriores e a possibilidade de se comparar um estimulador PAF a um ativador fMLP cujos receptores estão acoplados a proteínas G. Além disso, essas duas situações representam dois níveis de ativação distintos, frequentemente referidos na literatura como pequena produção de espécies reativas de oxigênio e grande produção .



### 3.1) Delineamento experimental (Proteômica)



## **3.2) Obtenção da amostra**

### **3.2.1) Coleta de sangue**

O projeto foi aprovado pelo comitê de ética da UnB e todos os cuidados no procedimento de coleta de sangue foram tomados. 24 mL de sangue de 3 indivíduos masculinos com idade entre 20 e 50 anos, sem histórico de doenças crônicas, não fumantes, não alcoólatras, sem resposta inflamatória evidente e doença infecto-contagiosa e que não faziam uso de medicamentos foi coletado em tubos heparinizados. A coleta foi realizada com aspiração suave e em material plástico estéril para não ativar os neutrófilos (Biosciences).

### **3.2.2) Isolamento dos neutrófilos, estimulação e ativação**

Os neutrófilos foram separados por meio de centrifugação em gradiente de percoll. O percoll é composto de partículas de sílica inertes, não tóxicas, que não aderem a membranas, sendo adequado para purificação de células e organelas (Amershan; Haslett, Guthrie et al., 1985). O volume coletado foi dividido em 2 tubos de 50 mL, contendo gradientes de 60% (12 mL) e 70% de percoll (12 mL), ficando o de 70% no fundo do tubo; o sangue (12 mL) foi colocado sobre os gradientes de percoll. O material foi centrifugado por 15 minutos, 200g, a 22°C, aceleração e desaceleração lenta. Após a centrifugação os neutrófilos ficaram entre o gradiente de 60% e 70%, com eritrócitos no fundo e células mononucleadas e plasma sobre o gradiente de 60%. Os neutrófilos foram colhidos e lavados duas vezes em 7 mL de HBSS 1X para retirar o excesso de percoll. Os neutrófilos foram centrifugados por 5 minutos, 300g, aceleração e desaceleração de 5 a temperatura ambiente. Em caso de contaminação residual com eritrócitos realizava-se hemólise com água e retorno da osmolaridade com HBSS 2X (Santos, 2007).

Após a contagem dos neutrófilos, amostras contendo pelo menos  $7 \times 10^6$  neutrófilos, apresentando pureza acima de 97% e viabilidade acima de 98% foram selecionadas para a continuidade do estudo, uma vez que são necessárias  $1 \times 10^6$  células para cada gel, e foram realizadas triplicatas técnicas e biológicas (3 géis de cada indivíduo em cada situação e análise de neutrófilos de 3 indivíduos diferentes). Além disso, foram necessários  $3 \times 10^5$

neutrófilos para cada ensaio por citometria de fluxo. Após o isolamento os neutrófilos foram divididos em alíquotas e incubados por 30 minutos em temperatura ambiente com os ativadores nas seguintes concentrações: *1-O-Palmityl-2-acetyl-racglycero-3-phosphocholine* (Sigma P1402) PAF 20 nmol/L, fMLP 100nmol/L (Sigma F3506), para análise proteômica e para análise citométrica: PAF 20 nmol/L + fMLP 100 nmol/L e PMA 100 nmol/L (controle positivo) para análise citométrica. A concentração do PAF e fMLP foi definida com base na literatura revisada, tendo sido escolhido o valor de 20 nmol/L para PAF em função das características de estímulo celular (Botha, Moore, Moore, Fontes *et al.*, 1995) e 100 nmol/L para fMLP por ser a concentração mais utilizada em ensaios com essa ativador (Krump, Sanghera *et al.*, 1997; Dewas, Fay *et al.*, 2000; Le, Murphy *et al.*, 2002; Wittmann, Frohlich *et al.*, 2002; Zen e Liu, 2008). Outros requisitos adotados para a utilização dessas concentrações foram a ativação na montagem da NADPH oxidase verificada pela produção de espécies reativas de oxigênio, ser eficiente como um primeiro hit para posterior ativação pelo fMLP, característica como estimulante pelo PAF e possibilidade de reversão (Botha, Moore, Moore, Fontes *et al.*, 1995; Kitchen, Rossi *et al.*, 1996; Steel e Anderson, 2002; Mathison, Befus *et al.*, 2003).

### **3.3) Análise celular**

#### **3.3.1) Citometria de fluxo e Microscopia confocal**

Para a análise citométrica da estimulação de neutrófilos, após a adição do estimulador e do ativador, foi adicionado aos ensaios o marcador 1,2,3-dihidrorhodamina (DHR) (15 µmol/L) em cada condição. Esse marcador entra na célula e na presença de peróxido de hidrogênio, o DHR é oxidado em rodamina, substância fluorescente, que será detectada pelo citômetro de fluxo, após a incidência do *laser* no comprimento de onda de 488nm e a emissão captado no canal FL1 (verde, 525-535nm) leitura em unidades arbitrárias (Wrona, Patel *et al.*, 2005). Foram avaliados 10000 eventos no citômetro de fluxo FACS Calibur BD.

Para avaliar a ativação dos neutrófilos foram utilizados dois anticorpos: O anticorpo anti-CD62L conjugado ao fluoróforo FITC (verde, 525nm), para verificar se os neutrófilos estariam preparados para o início do rolamento e o anticorpo anti-CD11b conjugado ao

fluoróforo R-PE (amarelo, 575nm) para a avaliar a influência do estimulador e do ativador na liberação de grânulos específicos, de gelatinase e vesículas secretória (Borregaard e Cowland, 1997; Van Eeden, Klut *et al.*, 1999). Dois métodos de incubação foram utilizados: o primeiro a incubação dos neutrófilos com 1  $\mu$ L de cada anticorpo conjugado para cada  $10^6$  células foi iniciado junto com a estimulação e com leituras sequenciais nos tempos de 5, 15, 30, 60 e 120 minutos. Em cada tempo de exposição ao ativador foi realizada a leitura de 10000 eventos. O segundo método foi utilizado o seguinte protocolo: a incubação dos neutrófilos com 1  $\mu$ L de cada anticorpo conjugado para cada  $10^6$  foi realizada após estimulação e ativação por 30 minutos e lavagem com tampão PBS. As células foram incubadas com os anticorpos por 1 hora a 4°C, em seguida foram lavadas 3 vezes com PBS e finalmente fixadas com formaldeído 0,01% deixando no mínimo 15 minutos e no máximo 24 horas, antes da leitura no citômetro de fluxo. Na otimização do segundo protocolo algumas alíquotas foram separadas para análise no microscópio confocal para a validação da presença desses marcadores somente na superfície. Os neutrófilos separados foram incubados com DAPI na concentração de 3  $\mu$ M por 15 minutos e em seguida lavados 2 vezes por 5 minutos cada e leitura no microscópio confocal Leica TCS SP5 Microsystems.

### **3.3.2) Adaptação do protocolo para análise de citometria de fluxo e microscopia confocal**

Foi testada a ativação dos neutrófilos pela presença de CD62L e CD11b na superfície celular ao longo de 120 minutos, em intervalos definidos aos 5, 15, 30, 60 e 120 minutos.

A análise celular proposta, por citometria de fluxo e por microscopia confocal, demandou a otimização do protocolo, que inicialmente era voltado a células aderidas a lâmina, para procedimento em microtubos com células em suspensão.

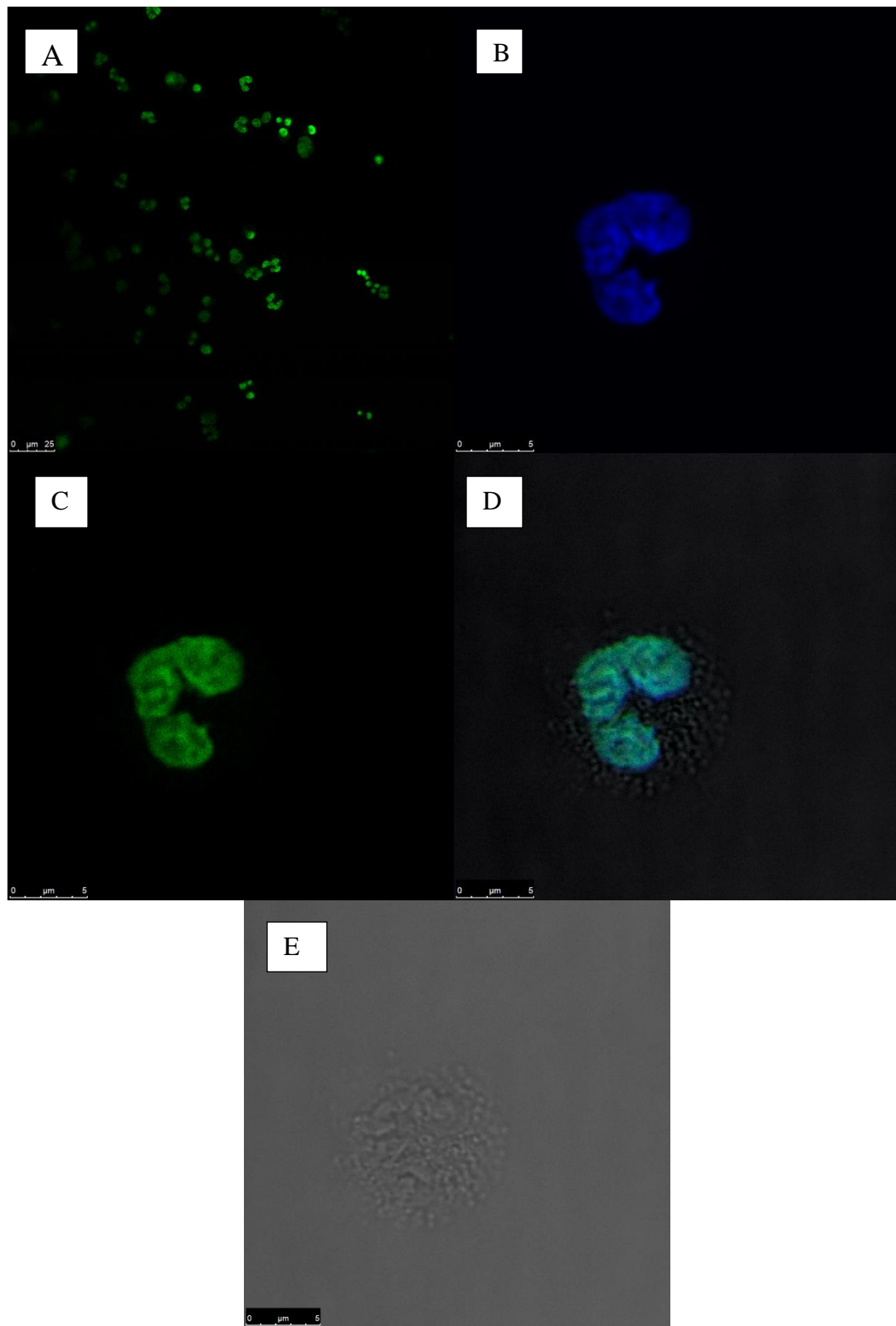
1ª Etapa – Adaptação células aderidas em lâminas para células em suspensão.

Protocolo inicial:

Após o isolamento dos neutrófilos as células eram aderidas a lâmina, lavadas com PBS pH 7,4, fixadas em solução de formaldeído 3,7% (sem metanol) em PBS por 10 minutos, temperatura ambiente, lavadas 2 vezes em tampão PBS, bloquear com BSA 1% em tampão PBS por 20 minutos, lavados com PBS por 5 minutos, em seguida incubadas com 1  $\mu$ L de cada anticorpo conjugado para cada  $10^6$  células, overnight, a 4°C. No dia seguinte, lavadas 3 vezes com tampão PBS com 10 minutos de incubação, em seguida adição de DAPI 4,6 Diamidino-2-phenylindole D 9542 (sigma-Aldrich) e lavadas 3 vezes com PBS.

Esse protocolo é adequado para microscopia confocal, mas para a citometria de fluxo é inviável, pois a citometria demanda células em suspensão. Outro problema encontrado é a ativação dos neutrófilos que estão em contato com o vidro, isso traria resultados falsos positivos de ativação. Então o protocolo foi modificado da seguinte maneira: Após o isolamento dos neutrófilos, as células foram lavadas com PBS pH 7,4, fixadas em solução de formaldeído 3,7% (sem metanol) em PBS por 10 minutos, temperatura ambiente, lavadas 2 vezes em tampão PBS, tiveram os sítios inespecíficos bloqueados com BSA 1% em tampão PBS por 20 minutos, lavados com PBS por 5 minutos, em seguida incubadas com anticorpo conjugado overnight, a 4°C. No dia seguinte lavadas 3 vezes com incubação por 10 minutos em tampão PBS. Uma alíquota foi retirada para leitura em citometria de fluxo e outra seguiu com a adição de DAPI 4,6 Diamidino-2-phenylindole D 9542 (sigma-Aldrich) e lavado 3 vezes com PBS, foi retirado o sobrenadante ressuspensionado em um volume de 10  $\mu$ L e adicionando esse volume com células em uma lâmina que foi centrifugada a 400g por 5 minutos.

Resultados: Foi constatado que as células estavam abrindo poros, com isso o anticorpo que deveria ligar somente a superfície estava penetrando nas células e aderindo à membrana nuclear, figura 5.



**Figura 5:** Neutrófilos quiescentes, A) neutrófilos marcados com CD62L conjugado com fluoróforo FITC (verde), na escala de 25 µm mostrando o núcleo (verde) B) núcleo do neutrófilo corado com DAPI, escala 5 µm, (roxo) C) núcleo de neutrófilos marcados com anticorpo-CD62L (verde), escala

5µm D) sobreposição de imagens campo claro, núcleo com DAPI (roxo) e com anticorpo-CD62L (verde), escala 5 µm E) neutrófilos sem fluorescência, campo claro, escala 5 µm.

#### 2ª Etapa – Mudança do tampão PBS para HBSS.

Nesse teste foi trocado o tampão PBS por HBSS. O tampão HBSS tem acréscimo de glicose o que poderia manter as células viáveis por mais tempo, mas não houve modificação no resultado. As células continuaram abrindo poros.

#### 3ª Etapa – Mudança da ordem de fixação e tempo de incubação do anticorpo

Com base na hipótese que a fixação com formaldeído 3,7% estaria abrindo poros, foi realizado outro teste. Após o isolamento dos neutrófilos, as células foram lavadas e incubadas com anticorpo conjugado por 1 hora a 4°C, lavadas 1 vez com tampão PBS gelado e duas alíquotas foram separadas, uma sem fixar e outra fixada com formaldeído 3,7%, porém essa comparação só pode ser feita na citometria, pois para visualizar a amostra na lâmina com o mesmo grau de ativação das alíquotas levadas para a citometria é indispensável a fixação. Na citometria a amostra não fixada ficou muito parecida com a amostra fixada, afastando a hipótese inicial.

#### 4ª Etapa – Monitoramento da viabilidade celular

Com o objetivo de se definir em que etapa estavam se abrindo os poros celulares, foi feito o monitoramento com azul de tripan em todas as etapas de separação celular, ativação e incubação com anticorpo e fixação e com esse monitoramento foi descoberto que as células abriam poros durante a incubação com o anticorpo.

#### 5ª Etapa – Modificação do protocolo de isolamento celular

Após a confirmação do início de necrose celular coincidente com o momento da incubação com anticorpos foram testadas mudanças no protocolo do isolamento celular tornando-o mais rápido, além de manter as células com atividade metabólica basal, para

isso foi adotado a manutenção das células a temperatura de 4°C, ativação celular a 37°C e incubação com anticorpo por 1 hora com fixação com formaldeído 3,7%. Com essa modificação as células se mantinham viáveis até a incubação com o anticorpo, abrindo poros no momento da fixação.

#### 6ª Etapa – Aumento do número de lavagens após a incubação com anticorpo

A partir dessa etapa todas as separações de neutrófilos foram realizadas com o novo protocolo e após o isolamento dos neutrófilos, as células foram lavadas e incubadas com anticorpo conjugado por 1 hora a 4°C. Foi proposta a hipótese que apenas uma lavagem permitiria a permanência de moléculas residuais de anticorpo no sistema de incubação. Nesse teste foi aumentado o número de lavagens após a incubação com o anticorpo de 1 lavagem para 3 vezes com tampão PBS gelado e fixada com formaldeído 3,7%. Porém ainda foram observados anticorpos perinucleares.

#### 7ª Etapa – Diminuição da quantidade de anticorpo

A diminuição da quantidade de anticorpo foi realizada para diminuir a sobra de anticorpos após incubação de 1 h consequentemente diminuição de artefatos. O protocolo inicial seguiu as recomendações do fabricante, 5 µL de anticorpo para 10<sup>6</sup> células. Então foram testados 5 µL, 2,5 µL e 1 µL de anticorpo para 10<sup>6</sup> células e foi demonstrado que 1 µL de anticorpo para 10<sup>6</sup> células é suficiente para marcação de forma reprodutível, porém ainda não foi obtido resultado satisfatório, pois uma quantidade pequena de anticorpo ainda entrava na célula.

#### 8ª Etapa – Modificação da concentração de fixador (formaldeído)

Após isolamento dos neutrófilos, as células foram lavadas, incubadas com 1 µL de anticorpo para 10<sup>6</sup> células por 1 hora a 4°C e foram testadas concentrações de 3,7%, 3,0% e 2,5% de formaldeído. Porém ainda houve a entrada do anticorpo em todas as concentrações testadas.



### 9ª Etapa – Mudança de fixador

Nessa etapa foi testado outro fixador contendo: 1% de paraformaldeído, 1% de cacodilato de sódio e 0,665% de cloreto de sódio, incubados por 15 minutos à 4°C, mas não obtivemos resultados satisfatórios com nenhum deles.

### 10ª Etapa – Mudança de concentração e de fixador

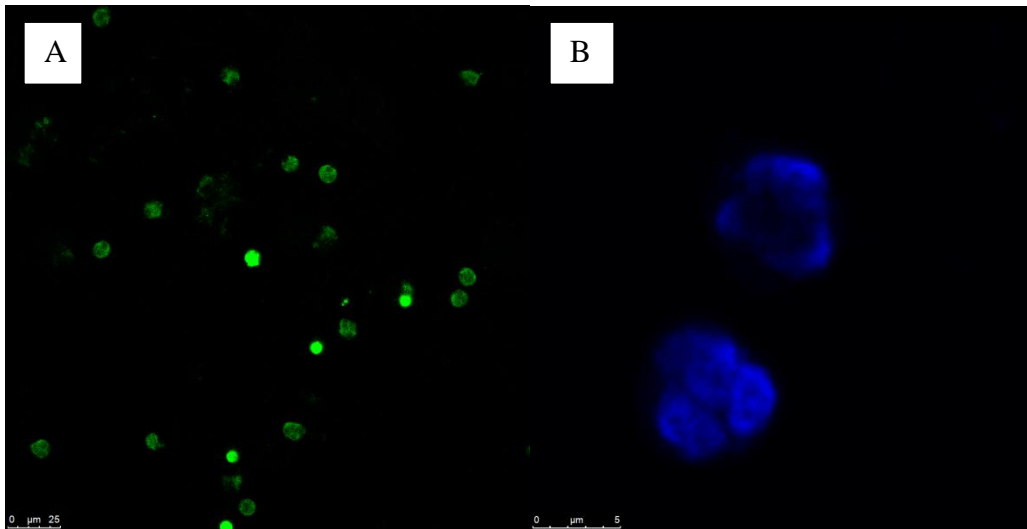
Nessa etapa insistimos mais uma pouco no teste de diferentes fixadores e concentrações diferentes, baseados na literatura. Então foram testadas três outras soluções: formaldeído 0,01%, paraformaldeído 0,01% e paraformaldeído 0,2%. Nesse teste foi observada a integridade da membrana sem entrada do anticorpo na solução com formaldeído 0,01%, membrana um pouco permeável na solução com paraformaldeído 0,01% e bastante permeável com paraformaldeído 0,2%. Nessa etapa foi resolvido o problema da permeabilidade celular com adição do fixador, porém foi observada a dificuldade de entrada do DAPI (marcador nuclear). Com a definição do fixador seguimos a recomendação do protocolo base de incubação com formaldeído por pelo menos 15 minutos e leitura até 24 horas de incubação.

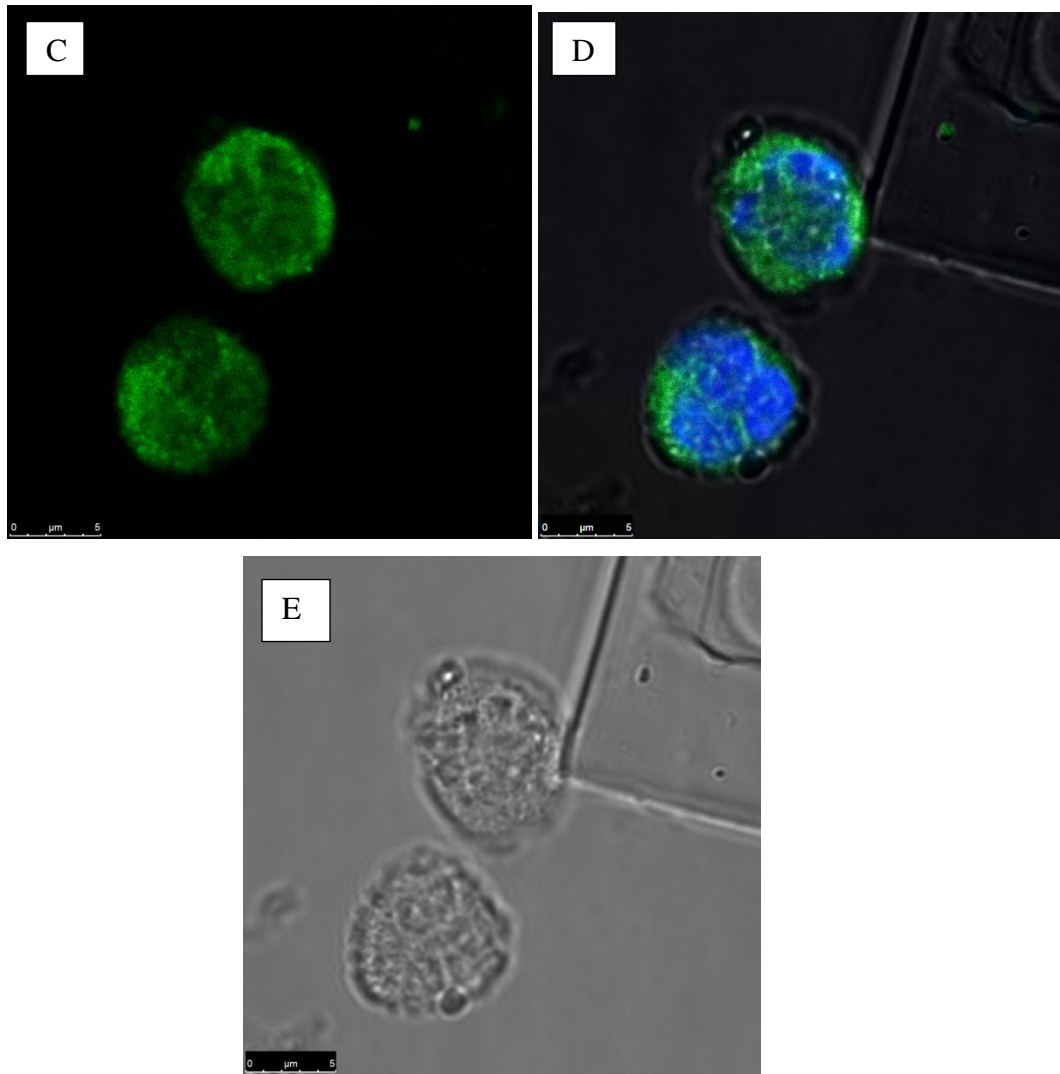
### 11ª Etapa – Mudança na concentração de DAPI e tempo de incubação

Após a fixação dos neutrófilos com formaldeído 0,01% overnight, no dia seguinte retira-se uma alíquota para leitura na citometria de fluxo e uma alíquota para a microscopia confocal. Foram realizados testes de concentração de 1,5  $\mu$ M de DAPI (metade da concentração original), e de incubação em tempos diferentes 5 minutos do protocolo base, 10 minutos e 15 minutos. Com 15 minutos e 1,5  $\mu$ M foi observada uma grande quantidade de células com membrana íntegra e núcleos bem corados, mas com excesso de DAPI na lâmina.

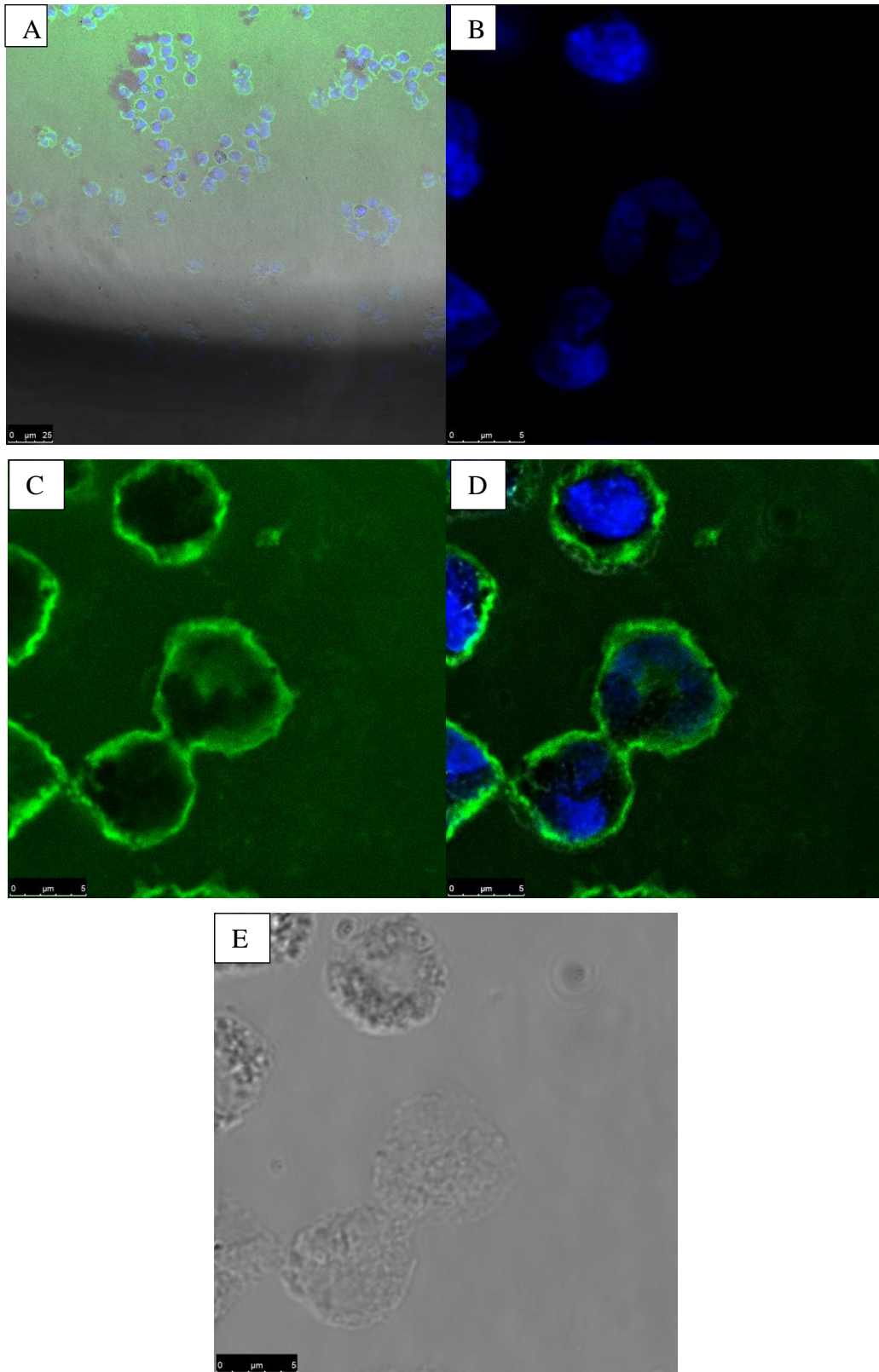
## 12ª Etapa – Aumento do número e tempo de lavagens

Considerando as adaptações realizadas até o momento, após o isolamento dos neutrófilos e ativação, as células foram lavadas, incubadas com 1  $\mu\text{L}$  de anticorpo para  $10^6$  células, seguem-se 3 lavagens com PBS gelado, incubado com formaldeído 0,01% *overnight*, em temperatura ambiente, no dia seguinte retira-se uma alíquota para leitura na citometria de fluxo e uma alíquota para a microscopia confocal. Foram realizados testes com 1 e 2 lavagens com tampão PBS após fixação e concentrações de 1,5  $\mu\text{M}$  e 3  $\mu\text{M}$  de DAPI, incubados por 15 minutos e lavagem por 5 minutos. A combinação de 2 lavagens com tampão PBS após fixação, concentração de 3  $\mu\text{M}$  de DAPI por 15 minutos e lavagem de 5 minutos para retirar o excesso de DAPI foi o melhor protocolo alcançado, para manter a célula íntegra com núcleo bem corado e diminuição do excesso DAPI sobre a lâmina sem enfraquecer a coloração nuclear, como mostra a figura 6 e 7.





**Figura 6:** Neutrófilos quiescentes, A) superfície dos neutrófilos marcados com CD62L conjugado com fluoróforo FITC (verde) na escala de 25  $\mu\text{m}$ , B) núcleo dos neutrófilos corados com DAPI (roxo), escala 5  $\mu\text{m}$ , C) superfície dos neutrófilos marcados com CD62L (verde), escala de 5  $\mu\text{m}$ , D) sobreposição de imagens com a marcação de superfície dos neutrófilos por anti-CD62L (verde) e núcleo dos neutrófilos corados por DAPI (roxo), escala 5  $\mu\text{m}$  E) neutrófilos sem fluorescência, campo claro, escala 5  $\mu\text{m}$ .



**Figura 7:** Neutr3filos quiescentes, A) superf3cie dos neutr3filos marcados com CD62L conjugado com fluoroforo FITC (verde) na escala de 25  $\mu\text{m}$ , B) n3cleo dos neutr3filos corados com DAPI (roxo), escala 5  $\mu\text{m}$ , C) superf3cie dos neutr3filos marcados com CD62L (verde), escala de 5  $\mu\text{m}$ , D)

sobreposição de imagens com a marcação de superfície dos neutrófilos por anti-CD62L (verde) e núcleo dos neutrófilos coarados por DAPI (roxo), escala 5 µm E) neutrófilos sem fluorescência, campo claro, escala 5 µm.

### **3.4) Proteômica**

#### **3.4.1) Lise celular e dosagem de proteínas**

Após a estimulação e ativação foi realizada a lise dos neutrófilos por ação de agentes caotrópicos e detergente (Uréia 7 mol/L, Tiouréia 2 mol/L, Triton-X100 1% v/v, Pharmalite 4-7 0,005% v/v), na presença de nucleases e inibidores de proteases (Protease inhibitor mix, GE Healthcere 1% v/v, 5 uL, nuclease mix, GE Healthcare 1% v/v, 5 uL) por 1 hora a 25°C e, a seguir adicionados DTT 1% v/v e EDTA 0,16 mol/L e incubado por mais uma hora. As amostras foram centrifugadas por 10 minutos, a temperatura ambiente a 14000 rpm, e uma alíquota do sobrenadante foi usada para dosagem de proteínas com base no método descrito por Bradford e adaptado por Ramagli (1985) para compatibilidade com o tampão de lise (Ramagli, 1985).

#### **3.4.2) Eletroforese bidimensional (2D-PAGE)(Dunn e Corbett, 1996)**

##### **a) Isoeletrofocalização**

Foram aplicados 50 ug de proteína a géis de IPG, de 18 centímetros de comprimento, com faixas de pH de 4-7 (ácida), para reidratação e incorporação da amostra. Os géis (em triplicata) foram submetidos à diferença de potencial elétrico, em sistema IPG-Phor, para focalização isoeletrica das proteínas, por 44000 volts/hora (Santos, 2007).

##### **b) Etapa de Equilíbrio**

Após o término da isoeletrofocalização, os géis de IPG foram incubados com DTT 1%, por 15 minutos, para redução das pontes dissulfeto e, em seguida, com iodoacetamida 135 mM também por 15 minutos, no escuro, a 25°C para alquilação das cisteínas (Gorg, Obermaier *et al.*, 2000).

### **c) SDS-PAGE**

Os géis contendo as proteínas reduzidas e alquiladas foram aplicados sobre géis, de poliacrilamida a 12%, contendo SDS e submetidos a uma corrente elétrica de 20 mA constante e tensão máxima limitada em 500V, temperatura de 19°C no tempo de 6 horas. para uma segunda separação com base na massa molecular (Dunn e Corbett, 1996; Santos, 2007).

### **d) Coloração**

Os géis obtidos após essa segunda corrida eletroforética foram corados pelo método prata de alta sensibilidade. Neste método a sensibilidade torna-se aumentada pela mistura de nitrato de prata com amônia e pela presença de ácido tricloroacético durante a fixação (De Souza Castro, De Sa *et al.*, 2006). Esse método de coloração permite a visualização dos *spots* com até 0,005 ng de proteína (De Souza Castro, De Sa *et al.*, 2006) e preserva a compatibilidade com a identificação por espectrometria de massa.

### **e) Digitalização e Secagem dos Géis**

Ao final da etapa de coloração, a imagem de cada gel foi digitalizada e armazenada em arquivos. Após ser digitalização, cada gel foi seco entre folhas de celofane hidrofílico e armazenado.

### **3.4.3) Análise Computacional das Imagens dos Géis**

Por meio do *software* Image Master foram detectados e pareados os *spots* realizando a comparação entre neutrófilos quiescentes, estimulados pelo PAF e ativados por fMLP. As imagens dos géis em tons de cinza no formato TIF foram utilizadas para serem analisadas com auxílio do software Image Master 2D Platinum versões 5.0 e 6.0. Para a utilização das imagens dos géis pelo Image Master foi realizada a conversão do formato TIF para o formato MEL.

No Image Master 2D Platinum versão 5 foram detectados os *spots* levando em consideração a sua área e intensidade a detecção foi realizada de forma automática e manual com auxílio de várias ferramentas disponíveis no programa. Após a detecção e revisão os géis foram transferidos para o programa Image Master Platinum versão 6.0 onde

foram realizado o pareamento dos *spots* entre os géis. Os géis foram pareados da seguinte forma:

- ♣ Classe dos Controles (quiescentes): onde foi selecionado um gel normal (quiescente) como referência, por ser o gel com maior número de *spots* e mais bem focalizado, pareado com triplicata dos indivíduos A, B e C.
- ♣ Classe dos Estimulados com PAF (PAF): onde foi selecionado um gel PAF referência pareado com as triplicatas dos indivíduos A, B e C.
- ♣ Classe dos Ativados com fMLP (fMLP): onde foi selecionado um gel fMLP referência pareado com as triplicatas dos indivíduos A, B e C.

A seguir foi feito o pareamento entre os géis referências: quiescente e PAF, quiescente e fMLP, PAF e fMLP. Foram obtidas tabelas com as porcentagens de volume de cada *spot* pareado, tanto intraclasse quanto interclasses e esses dados foram exportados para análise estatística.

#### **3.4.4) Definição do número de replicatas biológicas e experimentais**

A definição da quantidade de replicatas experimentais e biológicas é fundamental para a validação estatística da comparação amostral. Triplicatas experimentais e biológicas de uma condição foram utilizadas como estudo piloto e foi utilizado o valor da porcentagem de volume de cada *spot* fornecidos pelo programa *Image Master* para calcular quantas replicatas experimentais e biológicas seriam necessárias, segundo o modelo de análise de potência descrito por Cairns, D. (2011). Os cálculos foram realizados utilizando o programa estatístico R e foi observada a média da variação experimental de 0,08 e a média da variação biológica de 0,9, o que demonstra uma variação nas replicatas biológicas maior que nas técnicas, confirmando a reprodutibilidade técnica dos ensaios. Assim, para se obter um  $\alpha=0,05$  e  $\beta=0,8$ , e considerando-se a diferença de volumes entre os *spots* de no mínimo 4 vezes, as triplicatas biológicas e experimentais mostraram-se adequadas. Além disso, o *spot* só foi considerado com expressão diferencial quando estavam presentes em pelo menos 8 dos 9 géis e apresentavam  $p \leq 0,05$  (Cairns).

### 3.4.5) Análise Estatística

Os dados de volume normalizado dos *spots* das 3 condições foram submetidos a análise de distribuição normal utilizando o teste de Shapiro Wilk, aqueles que não apresentaram essa distribuição sofreram transformação logarítmica e novamente submetidos ao teste Shapiro Wilk. Os dados com distribuição normal foram submetidos dois a dois a análise pelo teste T de Student pareado e na comparação entre as condições PAF e fMLP foi utilizado teste T independente e os que não apresentaram distribuição normal foram submetidos ao teste de Wilcoxon e na comparação entre as condições PAF e fMLP foi utilizado teste Mann-Whitney. Foram considerados diferencialmente abundantes os *spots* que apresentaram  $p \leq 0.05$  (Spss, 2004; Biron, Brun *et al.*, 2006). O teste utilizado para definir as replicatas experimentais e biológicas também contribuiu na definição dos parâmetros de exclusão dos falsos positivos que são: exclusão dos grupos de *spots* cuja diferença de abundância era menor que 4 vezes e também *spots* que estavam presentes em menos que 8 géis, de acordo com o proposto por Biron (2006) (Cairns; Biron, Brun *et al.*, 2006). Para comparação das três condições foi utilizado o teste Kruskal Wallis.

### 3.4.6) Adaptação do protocolo de digestão triptica

A proposta desse estudo é a comparação de mapas proteômicos de 3 condições: neutrófilos quiescentes, estimulados pelo PAF e ativados pelo fMLP. Os mapas proteômicos dos neutrófilos quiescentes, estimulados por PAF e ativados pelo fMLP que configuram o efeito pró-inflamatório, já foram obtidos.

Nesse primeiro momento fez-se necessária a adaptação da digestão protéica no laboratório de bioquímica e química de proteínas para géis produzidos com 50ug de proteínas. Os mapas proteômicos de neutrófilos revelam em torno de 1500 *spots* corados com prata de alta sensibilidade que nos permite visualizar até 0,005 ng de proteína, sendo consideravelmente mais sensível que métodos de coloração frequentemente utilizados em proteômica. O gel corado com prata de alta sensibilidade, protocolo obtido por comunicação pessoal do Dr. Peter Mose Larsen e aperfeiçoado no LBQP (De Souza Castro, De Sa *et al.*, 2006). Tal protocolo de coloração, além da alta sensibilidade apresenta melhor compatibilidade com a espectrometria de massa (Chevallet, Diemer *et al.*, 2006)



## Protocolo base

A primeira tentativa de identificação foi realizada utilizando *spots* mais intensos, com base no descrito por Jin, 1999 (Jin, Chen *et al.*, 1999). Nesse protocolo foram realizadas lavagens com água para retirada do excesso da última solução de coloração, realizou-se redução com DTT 10 mM, alquilação com iodoacetamida 55 mM e lavagens com bicarbonato de amônio (NH<sub>4</sub>CO<sub>3</sub>) na concentração de 100 mM. Em seguida procedeu-se à digestão com a incubação das proteínas a 37°C por 12 horas em tampão contendo: 0,2 µg/µL de tripsina, NH<sub>4</sub>CO<sub>3</sub> 50 mM e CaCl 5 mM. Os peptídeos foram aderidos em uma coluna C18 (Zip Tip) e em seguida lavados com TFA 0,1% para a retirada do sal. Os peptídeos foram extraídos da coluna pela passagem de 2 µL da matriz HCCA 10 µg/µL diluída em solução (ACN e TFA 0,1%, 50:50, vol/vol) e aplicados na placa de aço polido. Como o resultado não permitiu a identificação de proteínas, optou-se por adaptar as etapas de lavagem do gel e de descoloração antes da digestão, com a intenção de se reduzir a interferência no processo de digestão. A tabela 1 mostra as condições testadas.

Tabela 1: Modificações no protocolo base.

Etapas de digestão	Protocolo Base	Protocolo 1	Protocolo 2
1ª Lavagem	água	água + 50% ACN	água + 50% ACN
Descoloração	não foi feita	*	ferrocianeto de potássio 15mM e tiosulfato de sódio 50mM
Redução e alquilação	DTT 10mM e iodoacetamida 55mM	*	*
2ª Lavagem	NH <sub>4</sub> CO <sub>3</sub> 100mM	*	*
Composição do tampão de tripsina	0,2µg/µL de tripsina, NH <sub>4</sub> CO <sub>3</sub> 50mM e CaCl 5mM	*	*
Temperatura e tempo de incubação com tripsina	37°C por 12 horas	*	*
Dessalinização	coluna C18 (Zip Tip) peptídeos lavados com TFA 0,1%	*	*
Matrizes	2µL da matriz HCCA 10µg/µL diluída em solução (ACN e TFA 0,1%, 50:50 vol/vol)	*	*
Placa	STEEL	*	*

(\*) Etapas sem modificações

Na primeira modificação foi acrescentada a primeira lavagem acetronitrila 50% para retirar o excesso de glicerol, interferente da digestão, deixada pela última solução de coloração. Já no protocolo 2 foi acrescentada a descoloração para retirar a prata e haletos de prata. Realizaram-se o protocolo base, 1 e 2 para *spots* intensos dos géis de neutrófilos e não obtivemos sucesso (não foi identificada nenhuma proteína) em nenhum desses.

### Protocolo AnchorChip

Optou-se por testar uma placa conhecida como AnchorChip que possui um halo hidrofóbico na periferia, contornando um ponto hidrofílico no centro do poço, o que aumenta a sensibilidade, pois concentra a amostra em um espaço menor. Foram testadas novamente as condições dos protocolos 1 e 2. A aplicação da amostra foi realizada diretamente na placa com a 1  $\mu$ L matriz HCCA 0,5  $\mu$ g/ $\mu$ L em 70% ACN e 30% TFA 0,1%, realizando a dessalinização na própria placa com aplicação de 2  $\mu$ L de TFA 0,1% por 10 segundos e em seguida a sua retirada, conforme detalhado na tabela 2 (Mineki, Taka *et al.*, 2002; Zhang, Shi *et al.*, 2007).

Tabela 2: Modificações adotadas no protocolo para a placa anchorchip 1 e 2, em relação ao protocolo base.

Etapas de digestão	Protocolo Base	Protocolo AnchorChip1	Protocolo AnchorChip2
1ª Lavagem	água	água + 50% ACN	água + 50% ACN
Descoloração	não foi feita	ferrocianeto de potássio 15mM e tiosulfato de sódio 50mM	ferrocianeto de potássio 15mM e tiosulfato de sódio 50mM
Redução e alquilação	DTT 10mM e iodoacetamida 55mM	*	Não foi feita
2ª Lavagem	NH <sub>4</sub> CO <sub>3</sub> 100mM	*	*
Composição do tampão de tripsina	0,2 $\mu$ g/ $\mu$ L de tripsina, NH <sub>4</sub> CO <sub>3</sub> 50mM e CaCl 5mM	*	*
Temperatura e tempo de incubação com tripsina	37°C por 12 horas	*	*

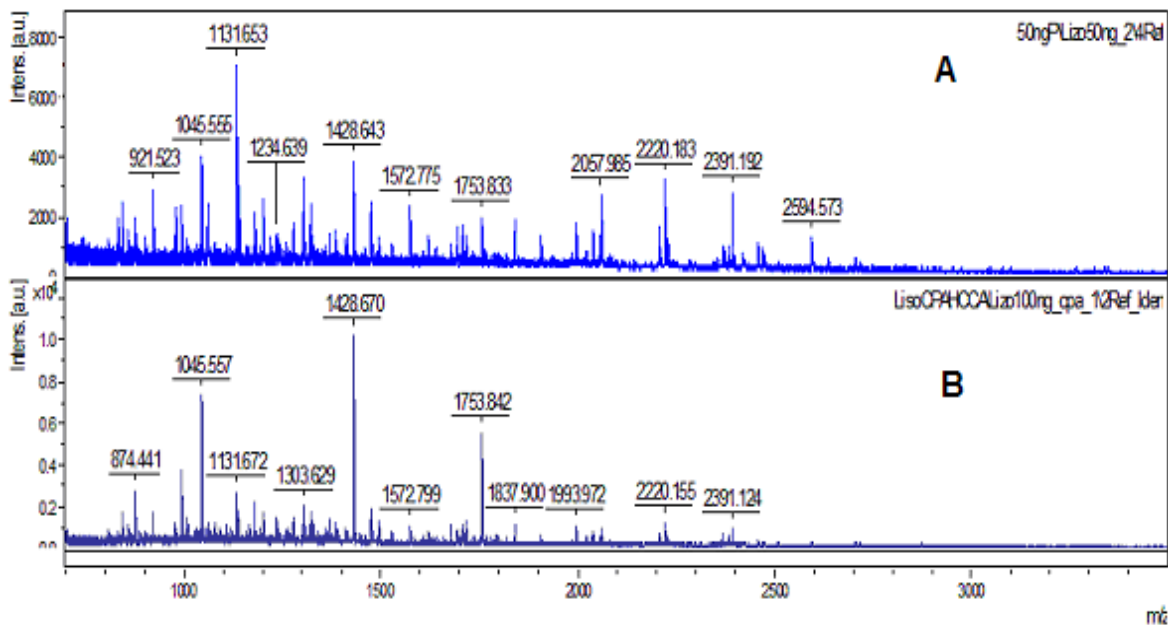
<b>Dessalinização</b>	coluna C18 (Zip Tip) peptídeos lavados com TFA 0,1%	dessalinização após a matriz na própria placa com aplicação de 2µL de TFA 0,1% por 10 segundos	dessalinização após a matriz na própria placa com aplicação de 2µL de TFA 0,1% por 10 segundos
<b>Matrizes</b>	2µL da matriz HCCA 10µg/µL diluída em solução (ACN e TFA 0,1%, 50:50, vol/vol)	1µL matriz HCCA 0,5µg/µL em solução (ACN e TFA 0,1%, 70:30, vol/vol)	1µL matriz HCCA 0,5µg/µL em solução (ACN e TFA 0,1%, 70:30, vol/vol)
<b>Placa</b>	STEEL	AnchorChip	AnchorChip

(\*) Etapas sem modificações

Os protocolos anchorchip 1 e 2, foram testados com a finalidade de aumentar a sensibilidade do método. Inicialmente foram testados com *spots* de neutrófilos intensos, porém sem sucesso.

Em função desse resultado, repetiu-se o teste utilizando o protocolo anchorchip 1, com uma proteína padrão (lisozima) nas concentrações 100 ng e 50 ng, oriundas de géis unidimensionais, e manteve-se a redução e alquilação do *spots*, pois essa etapa não fora feita entre a primeira e a segunda dimensões.

Na figura 8, observa-se menor intensidade do espectro e dos picos 1045, 1428 e 1753 (peptídeos da proteína lisozima) na concentração de 50 ng (figura 8A) em relação ao de 100 ng (figura 8B - note-se que as escalas de intensidade são diferentes entre as figuras), com menor resolução, o que dificultou a calibração interna, conseqüentemente houve a identificação da proteína somente com a utilização das massas do espectro 8B (100 ng).



**Figura 8:** Espectros de massa obtidos pela utilização do protocolo anchorchip 1 de peptídeos de lisozima. **A** lisozima com 50ng e **B** lisozima com 100ng.

Se todos os *spots* dos géis de neutrófilos tivessem a mesma concentração de proteínas teríamos 1500 *spots* com aproximadamente 30 ng, o que inviabilizaria a identificação por esse método, pois como foi demonstrado não obtivemos sucesso com a identificação da proteína na concentração de 50 ng.

Os géis de neutrófilos possuem uma distribuição desigual na concentração de proteínas e a maioria dos *spots* com expressão diferencial se apresenta em baixas concentrações, o que fez necessária uma adaptação do protocolo na busca de maior sensibilidade.

### Modificação do protocolo AnchorChip

Foram realizados 4 novos testes utilizando como base o protocolo anchorchip 2. As proteínas testadas foram oriundas de géis bidimensionais de neutrófilos. Mantiveram-se as lavagens com água e ACN 50%, descoloração dos *spots*, não se realizou redução e alquilação imediatamente antes da digestão, pois já fora feito entre a primeira e segunda dimensão eletroforética, lavagens  $\text{NH}_4\text{CO}_3$  100 mM e incubação a 37°C por 12 horas em tampão tripsina contendo: 0,2  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  de tripsina,  $\text{NH}_4\text{CO}_3$  50 mM e CaCl 5 mM. As

diferenças estão nas matrizes utilizadas e a forma de dessalinização: foi repetido o protocolo anchorchip 2, a amostra foi aplicada diretamente na placa com 1 µL de matriz HCCA 0,5 µg/µL em solução (ACN e TFA 0,1%, 70:30, vol/vol) e realizou-se a dessalinização na própria placa com aplicação de 2 µL de TFA 0,1% por 10 segundo. O segundo teste (protocolo anchorchip 3) aplicou a amostra direto na placa com a utilização 1 µL da mistura de matrizes [(HCCA 20 µg/µL em solução (ACN e ácido fórmico 5% (AF), 70:30, vol/vol) mais DHB 20 µg/µL em solução (ACN e TFA 0,1%, 70:30, vol/vol)], sem dessalinização, pois a matriz DHB é hidrofílica e poderia ser retirada nessa lavagem. No terceiro teste (protocolo anchorchip 4) foi realizado a dessalinização da amostra utilizando uma coluna com poros R2 (*gel loader*) e 20 µL TFA 0,1%. Realizou-se a extração dos peptídeos com 2 µL de matriz HCCA 0,5 µg/µL. No quarto (anchorchip 5) teste realizou-se a dessalinização da amostra utilizando uma coluna com poros R2 (*gel loader*) e extração dos peptídeos com 2 µL da mistura de matrizes [(HCCA 20 µg/µL em solução (ACN e ácido fórmico 5% (AF), 70:30, vol/vol) mais DHB 20 µg/µL em solução (ACN e TFA 0,1%, 70:30, vol/vol)] (Laugesen e Roepstorff, 2003; Thingholm, Jorgensen *et al.*, 2006; Zhang, Shi *et al.*, 2007). Todas as amostras foram aplicadas à placa AnchorChip (tabela 3 e figura 9).

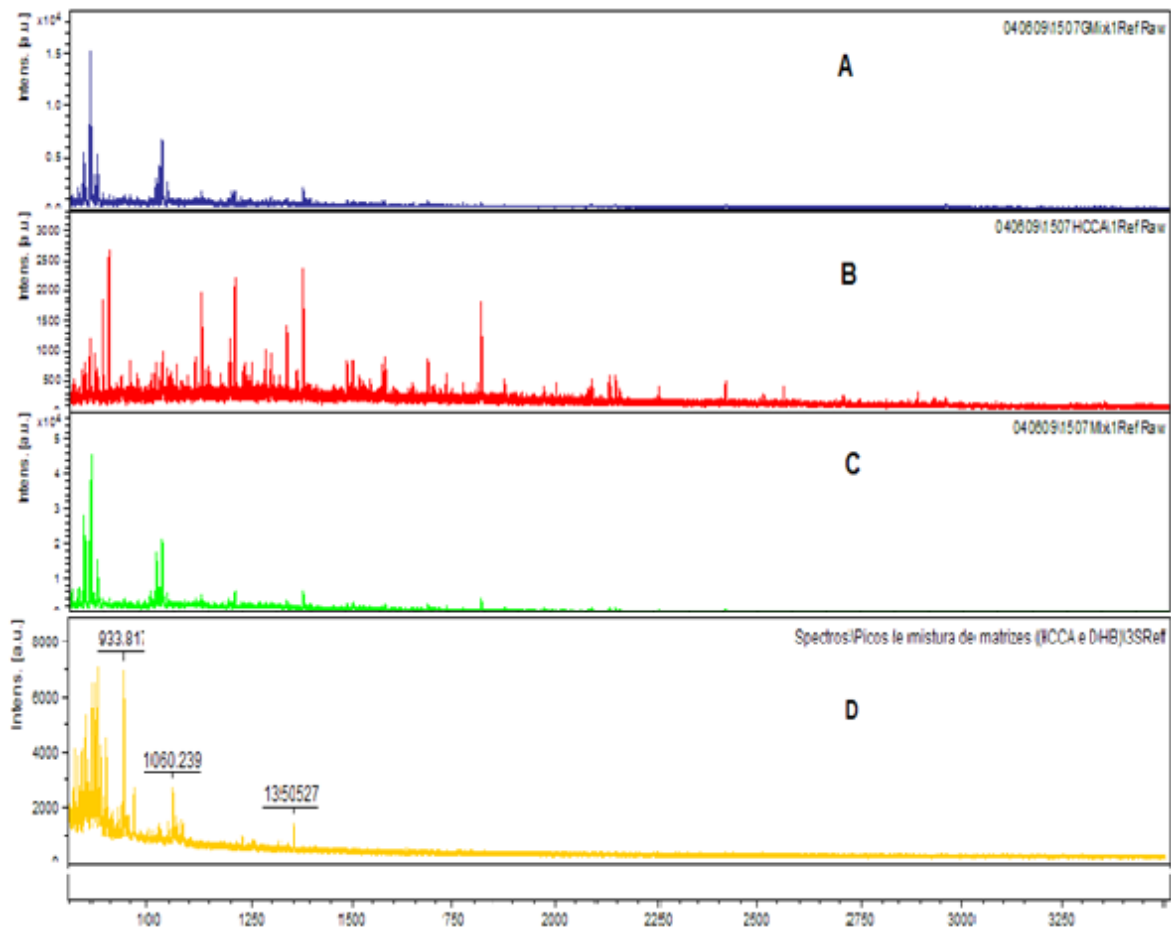
Tabela 3: Modificações no protocolo anchorchip 3, 4 e 5 a partir do protocolo AnchorChip 2.

<b>Etapas de digestão</b>	<b>Protocolo AnchorChip 2</b>	<b>Protocolo AnchorChip3</b>	<b>Protocolo AnchorChip 4</b>	<b>Protocolo AnchorChip 5</b>
<b>1ª Lavagem</b>	água + 50% ACN	*	*	*
<b>Descoloração</b>	ferrocianeto de potássio 15mM e tiosulfato de sódio 50mM	*	*	*
<b>Redução e alquilação</b>	Não foi feita	*	*	*
<b>2ª Lavagem</b>	NH <sub>4</sub> CO <sub>3</sub> 100mM	*	*	*
<b>Composição do tampão de tripsina</b>	0,2µg/µL de tripsina, NH <sub>4</sub> CO <sub>3</sub> 50mM e CaCl 5mM	*	*	*

<b>Temperatura e tempo de incubação com tripsina</b>	37°C por 12 horas	*	*	*
<b>Dessalinização</b>	dessalinização após a matriz na própria placa com aplicação de 2µL de TFA 0,1% por 10 segundos	sem dessalinização	coluna com poros R2 ( <i>gel loader</i> ) e 20µL de TFA 0,1%	coluna com poros R2 ( <i>gel loader</i> ) e 20µL de TFA 0,1%
<b>Matrizes</b>	1µL matriz HCCA 0,5µg/µL em solução (ACN e TFA 0,1%, 70:30, vol/vol)	1µL da mistura de matrizes (HCCA 20µg/µL em solução (ACN e ácido fórmico 5% (AF), 70:30, vol/vol) mais DHB 20µg/µL em solução (ACN e TFA 0,1%, 70:30, vol/vol)	2µL matriz HCCA 0,5µg/µL em solução (ACN e TFA 0,1%, 70:30, vol/vol)	2µL da mistura de matrizes (HCCA 20µg/µL em solução (ACN e ácido fórmico 5% (AF), 70:30, vol/vol) mais DHB 20µg/µL em solução (ACN e TFA 0,1%, 70:30, vol/vol)
<b>Placa</b>	AnchorChip	*	*	*

(\*) Etapas sem modificações

Utilizamos 3 *spots* intensos oriundos de géis de neutrófilos. A figura 9 mostra os espectros do *spot* 1507.



**Figura 9:** Espectros de massa do *spot* 1507. **A** Dessalinização com a utilização de microcoluna em ponteira *gel loader* e extração com mistura de matrizes HCCA e DHB (protocolo anchorchip 5), **B** Dessalinização na placa AnchorChip com a aplicação da matriz HCCA (protocolo anchorchip 2) e **C** Proteína aplicada na placa AnchorChip com a utilização da mistura de matrizes HCCA e DHB sem dessalinização (protocolo anchorchip 3). **D** Espectro somente com picos da mistura de matrizes. Não foram obtidos sinais de peptídeos, somente ruídos de matriz com o protocolo anchorchip 4.

Não foram obtidos sinais de peptídeos na amostra dessalinizada com *gel loader* e utilização da matriz HCCA 0,5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  (protocolo anchorchip 4) . Observamos que a amostra dessalinizada com utilização da *gel loader* e mistura de matrizes (figura 9A) apresentava muitos picos próximos na região de baixa massa que foram caracterizados como picos da mistura de matrizes (figura 9D), que se evidencia ao compararmos os espectros das figuras 9A e 9D. A mesma situação ocorreu na figura 9C. Já na figura 9B, observamos um espectro que, apesar de apresentar uma distribuição melhor dos picos, não resultou na identificação da proteína. Esse espectro estava com pouca intensidade e com

muito ruído. Também foi observado que a amostra tratada com a mistura de matrizes não ancora, isto é, não fica restrita ao halo hidrofílico da placa AnchorChip o que diminui a sensibilidade. Não obtivemos sucesso nesses protocolos.

### **Modificação na concentração das matrizes**

Foram realizados 5 novos testes utilizando como base o protocolo anchorchip 2 . As proteínas testadas foram oriundas de géis bidimensionais de neutrófilos. As modificações tiveram por finalidade a mudança na concentração da mistura de matrizes e a dessalinização, para diminuir picos de matrizes e aumentar a razão sinal/ruído. Foi testada a matriz HCCA na concentração 0,5 µg/µL em solução (ACN e TFA 0,1%, 70:30, vol/vol) dessalinização na placa ou não dessalinizada, a mistura de matrizes (HCCA 20 µg/µL em solução (ACN e ácido fórmico 5% (AF), 70:30, vol/vol) mais DHB 20 µg/µL em solução (ACN e TFA 0,1%, 70:30, vol/vol) dessalinização na placa ou não dessalinizada e a mistura de matrizes diluída (HCCA 0,5 µg/µL em solução (ACN e ácido fórmico 5% (AF), 70:30, vol/vol) mais DHB 0,5 µg/µL em solução (ACN e TFA 0,1%, 70:30, vol/vol) dessalinização na placa ou não dessalinizada (tabela 4 e figura 10).

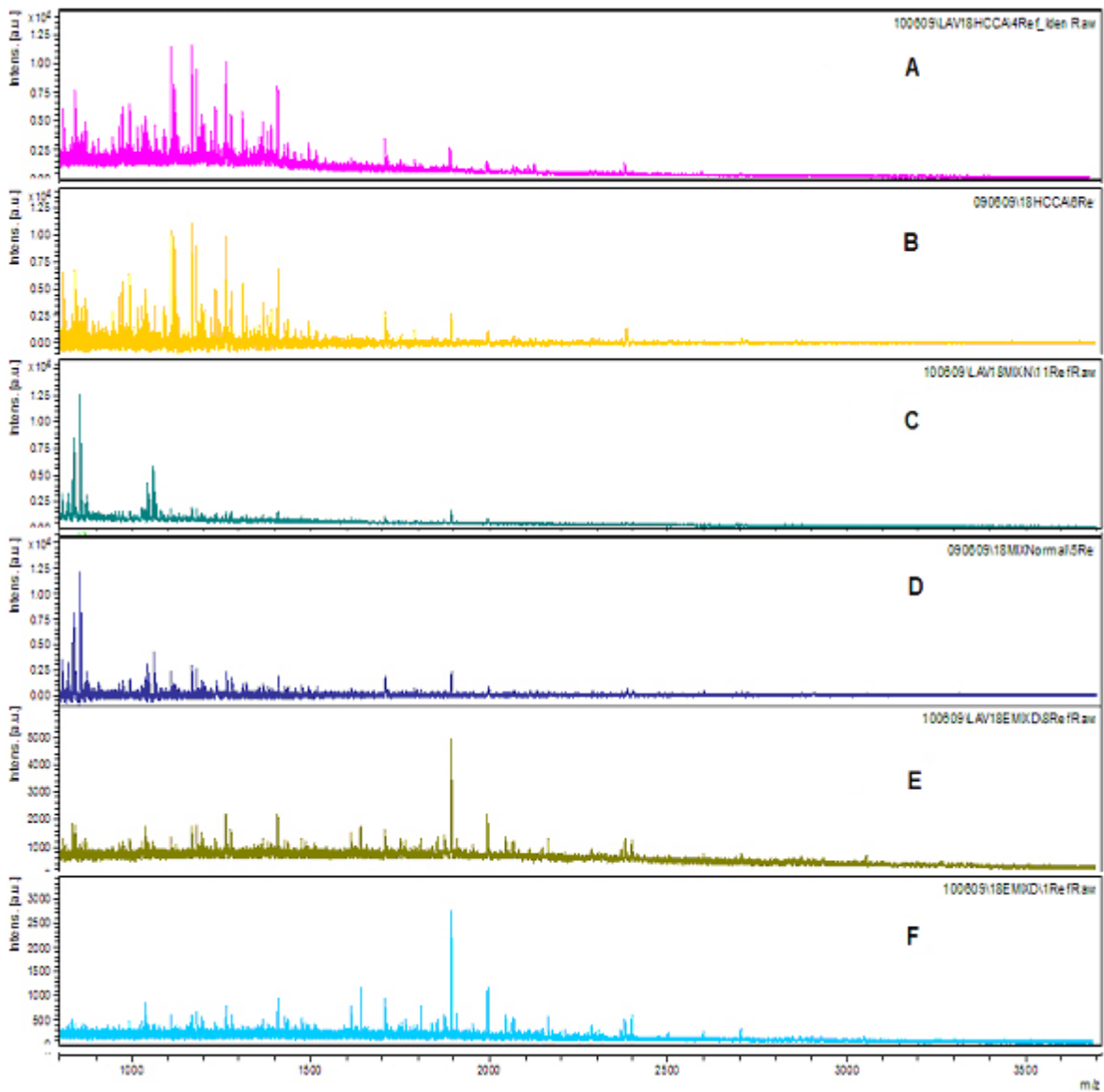


Tabela 4: Modificações nos protocolos anchorchip 6, 7, 8, 9 e 10 do protocolo anchorchip 2.

Etapas de digestão	Protocolo AnchorChip 2	Protocolo AnchorChip 6	Protocolo AnchorChip 7	Protocolo AnchorChip 8	Protocolo AnchorChip 9	Protocolo AnchorChip 10
<b>1ª Lavagem</b>	água + 50% ACN	*	*	*	*	*
<b>Descoloração</b>	ferrocianeto de potássio 15mM e tiosulfato de sódio 50mM	*	*	*	*	*
<b>Redução e alquilação</b>	Não foi feita	*	*	*	*	*
<b>2ª Lavagem</b>	NH <sub>4</sub> CO <sub>3</sub> 100mM	*	*	*	*	*
<b>Composição do tampão de tripsina</b>	0,2µg/µL de tripsina, NH <sub>4</sub> CO <sub>3</sub> 50mM e CaCl 5mM	*	*	*	*	*
<b>Temperatura e tempo de incubação com tripsina</b>	37°C por 12 horas	*	*	*	*	*
<b>Dessalinização</b>	dessalinização após a matriz na própria placa com aplicação de 2µL de TFA 0,1% por 10 segundos	sem dessalinização	dessalinização após a matriz na própria placa com aplicação de 2µL de TFA 0,1% por 10 segundos	sem dessalinização	dessalinização após a matriz na própria placa com aplicação de 2µL de TFA 0,1% por 10 segundos	sem dessalinização
<b>Matrizes</b>	1µL matriz HCCA 0,5µg/µL em solução (ACN e TFA 0,1%, 70:30, vol/vol)	1µL matriz HCCA 0,5µg/µL em solução (ACN e TFA 0,1%, 70:30, vol/vol)	1µL da mistura de matrizes (HCCA 20µg/µL em solução (ACN e ácido fórmico 5% (AF), 70:30, vol/vol) mais DHB 20µg/µL em solução (ACN e TFA 0,1%, 70:30, vol/vol)	1µL da mistura de matrizes (HCCA 20µg/µL em solução (ACN e ácido fórmico 5% (AF), 70:30, vol/vol) mais DHB 20µg/µL em solução (ACN e TFA 0,1%, 70:30, vol/vol)	1µL da mistura de matrizes (HCCA 0,5µg/µL em solução (ACN e ácido fórmico 5% (AF), 70:30, vol/vol) mais DHB 0,5µg/µL em solução (ACN e TFA 0,1%, 70:30,	1µL da mistura de matrizes (HCCA 0,5µg/µL em solução (ACN e ácido fórmico 5% (AF), 70:30, vol/vol) mais DHB 0,5µg/µL em solução (ACN e TFA 0,1%, 70:30, vol/vol)

					vol/vol)	
<b>Placa</b>	AnchorChip	*	*	*	*	*

(\*) Etapas sem modificações



**Figura 10:** Espectros de massa do *spot* 18. **A.** Proteína aplicada em AnchorChip com matriz HCCA e dessalinização na placa (protocolo anchorchip 2). **B.** Proteína aplicada em AnchorChip com matriz HCCA sem dessalinização (protocolo anchorchip 6), **C.** Proteína aplicada em AnchorChip com mistura de matrizes HCCA 20  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  e DHB 20  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  e dessalinização na placa (protocolo anchorchip 7) **D.** Proteína aplicada na placa AnchorChip com a utilização da mistura de matrizes HCCA 20  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  e DHB 20  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  sem dessalinização (protocolo anchorchip 8).. **E.** Proteína aplicada em AnchorChip com mistura de matrizes HCCA 0,5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  e DHB 0,5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  e dessalinização na placa (protocolo anchorchip 9). **F.** Proteína aplicada na placa AnchorChip com a utilização da mistura de matrizes HCCA 0,5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  e DHB 0,5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  sem dessalinização (protocolo anchorchip 10).

Foi observada diferença significativa entre os três tipos de matrizes utilizadas. A matriz HCCA se mostrou melhor com picos mais intensos, porém não apresentou distribuição uniforme de picos ao longo do espectro. Com a mistura de matrizes na

concentração de 20 µg/µL, como já havia sido observado anteriormente, apresentaram-se muitos picos contaminantes, da própria mistura de matrizes. Já a mistura na concentração de 0,5 µg/µL apresentou uma distribuição de picos ao longo do espectro, porém com baixa intensidade. Também foi observado que a mistura de matrizes na concentração 0,5 µg/µL dessalinizada apresentou um espectro com maior intensidade e a visualização de picos não perceptíveis no espectro não dessalinizado. A dessalinização da amostra contendo HCCA não apresentou diferenças perceptíveis e a dessalinização da amostra com a mistura de matrizes na concentração de 20 µg/µL apresentou perda de picos. Também não obtivemos sucesso na identificação.

### Testes com proteínas padrão

Nesse protocolo foram retomados os testes com proteínas padrão com 2 µg de cada proteína, oriundas de gel bidimensional com a redução e alquilação entre a primeira e a segunda dimensão da eletroforese, corando com prata de alta sensibilidade, simulando o mais próximo possível dos géis de proteínas dos neutrófilos. Foram digeridas três proteínas: lisozima, ovoalbumina e tripsinogênio.

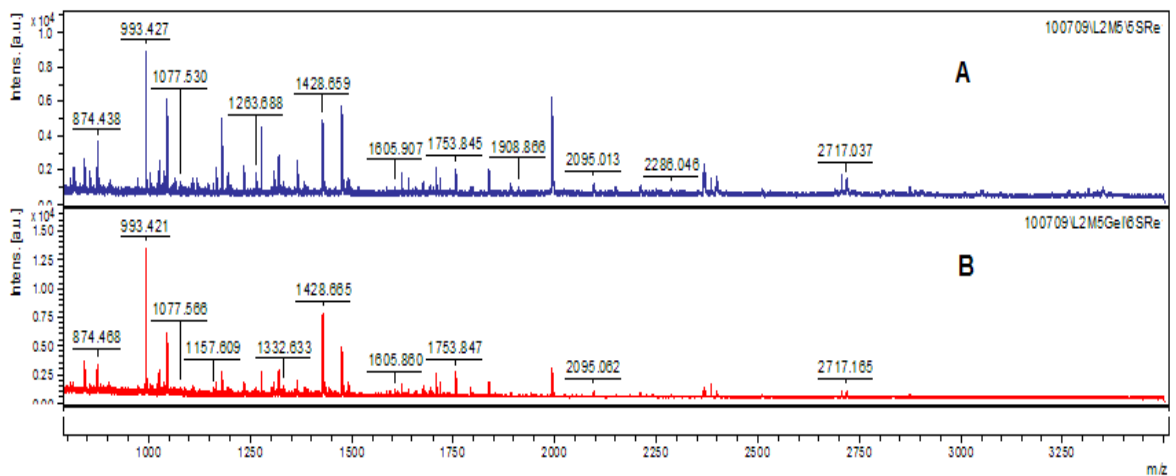
Com a observação dos protocolos anteriores, decidiu-se modificar esse novo utilizando os melhores resultados de cada um. Reduziu-se a concentração de NH<sub>4</sub>CO<sub>3</sub> tanto nas lavagens (de 100 mM para 50 mM) como no tampão tripsina (de 50 mM para 25 mM), para diminuir o sal na amostra, essa redução já havia sido testada por outro grupo do nosso laboratório. Nesse protocolo foi testada a dessalinização ou não utilizando a coluna poros R2 (em ponteira *gel loader*) e a extração dos peptídeos utilizando a mistura de matrizes, porém foi utilizada uma concentração intermediária as já testadas (HCCA 5 µg/µL em solução (ACN e ácido fórmico 5% (AF), 70:30, vol/vol) mais DHB 5 µg/µL em solução (ACN e TFA 0,1%, 70:30, vol/vol) (tabela 5 e figura 11).

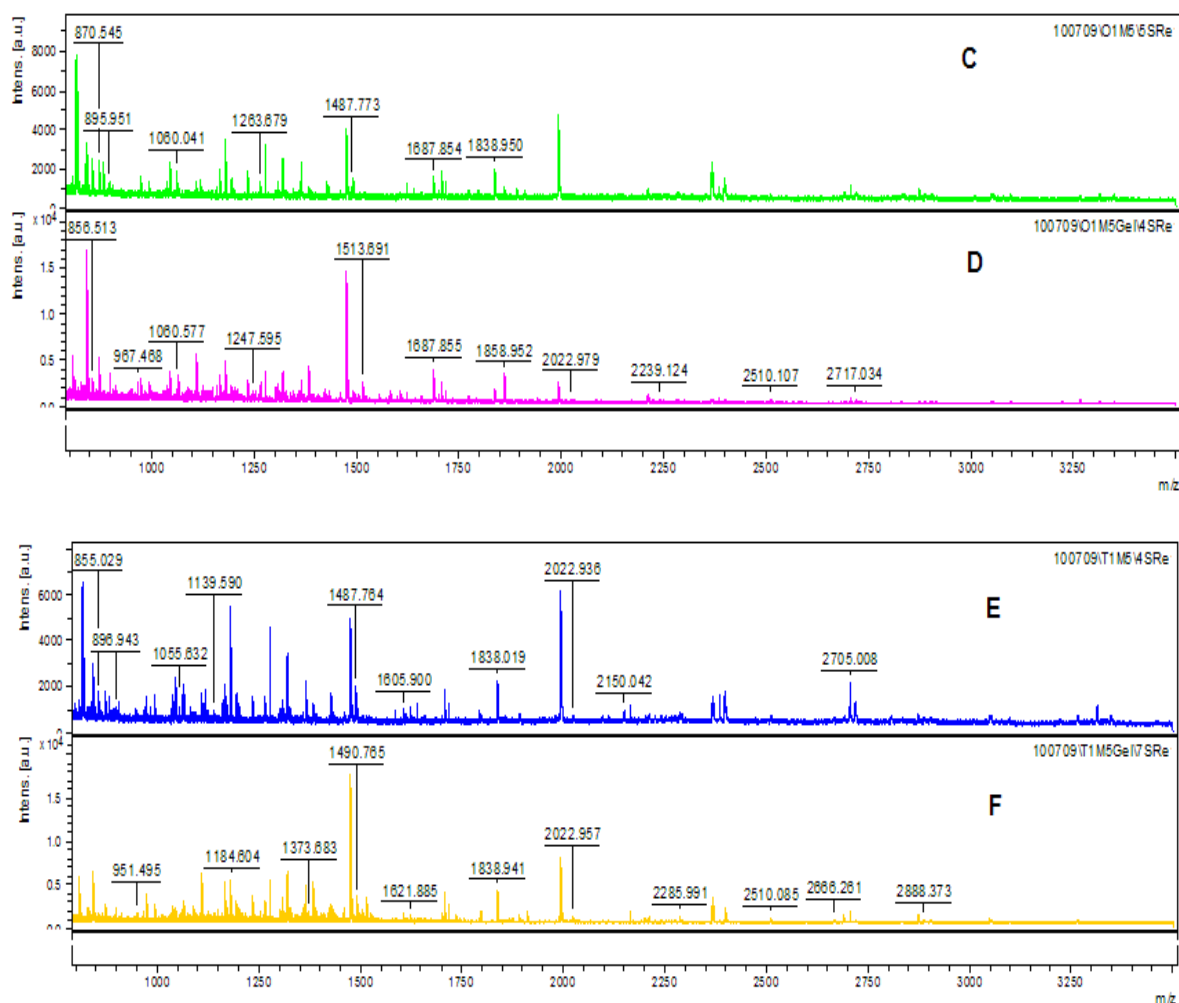
Tabela 5: Modificações nos protocolos anchorchip 11 e 12 do protocolo anchorchip 2.

Etapas de digestão	Protocolo AnchorChip 2	Protocolo AnchorChip 11	Protocolo AnchorChip 12
1ª Lavagem	água + 50% ACN	*	*
Descoloração	ferrocianeto de potássio 15mM e tiosulfato de sódio 50mM	*	*
Redução e	Não foi feita	*	*

alquilação			
2ª Lavagem	NH <sub>4</sub> CO <sub>3</sub> 100mM	NH <sub>4</sub> CO <sub>3</sub> 50mM	NH <sub>4</sub> CO <sub>3</sub> 50mM
Composição do tampão de tripsina	0,2µg/µL de tripsina, NH <sub>4</sub> CO <sub>3</sub> 50mM e CaCl 5mM	0,2µg/µL de tripsina, NH <sub>4</sub> CO <sub>3</sub> 25mM e CaCl 5mM	0,2µg/µL de tripsina, NH <sub>4</sub> CO <sub>3</sub> 25mM e CaCl 5mM
Temperatura e tempo de incubação com tripsina	37°C por 12 horas	*	*
Dessalinização	dessalinização após a matriz na própria placa com aplicação de 2µL de TFA 0,1% por 10 segundos	sem dessalinização	coluna com poros R2 (em ponteira <i>gel loader</i> ) e 20µL de TFA 0,1%
Matrizes	1µL matriz HCCA 0,5µg/µL em ACN e TFA 0,1%, 70:30, vol/vol	1µL da mistura de matrizes HCCA 5µg/µL em solução (ACN e ácido fórmico 5% (AF), 70:30, vol/vol) mais DHB 5µg/µL em solução (ACN e TFA 0,1%, 70:30, vol/vol)	1µL da mistura de matrizes HCCA 5µg/µL em solução (ACN e ácido fórmico 5% (AF), 70:30, vol/vol) mais DHB 5µg/µL em solução (ACN e TFA 0,1%, 70:30, vol/vol)
Placa	AnchorChip	*	*

(\*) Etapas sem modificações





**Figura 11:** Espectros de massa dos digestos de proteínas padrão. **A** Lisozima aplicada na placa AnchorChip sem dessalinização (protocolo anchorchip 11). **B** Lisozima aplicada na placa AnchorChip com dessalinização em ponteira *gel loader* (protocolo anchorchip 12). **C** Ovalbumina aplicada na placa AnchorChip sem dessalinização (protocolo anchorchip 11). **D** Ovalbumina aplicada na placa AnchorChip com dessalinização em ponteira *gel loader* (protocolo anchorchip 12). **E** Tripsinogênio aplicado na placa AnchorChip sem dessalinização (protocolo anchorchip 11). **F** Tripsinogênio aplicado na placa AnchorChip com dessalinização utilizando a *gel loader* (protocolo anchorchip 12).

Nesses protocolos obtivemos êxito na identificação das três proteínas, porém somente a Lisozima fora identificada nos dois protocolos (com e sem dessalinização), já as outras proteínas só foram identificadas com a utilização da dessalinização em *gel loader*. Foram detectados picos de baixa intensidade somente após a dessalinização, que foram fundamentais na identificação da proteína. Também foi observado o aumento da intensidade nos três espectros dessalinizados e a diminuição de picos de matrizes no início dos seis espectros, mostrando uma adequação na concentração das matrizes.

## Adequação do protocolo anchorchip 12

Após o êxito das identificações com a utilização da *gel loader*, optou-se pela utilização da coluna nas identificações de proteínas de neutrófilos provenientes de géis com 50 µg. Como ainda tivemos dificuldades na identificação de algumas proteínas, resolvemos testar mais uma pequena modificação, no tampão de extração dos peptídeos, aumentando a concentração de ACN de 70% para 90%, com o objetivo de eluir mais peptídeos da coluna. Então as matrizes foram diluídas da seguinte maneira: HCCA 5 µg/µL em solução (ACN e ácido fórmico 5% (AF), 70:30, vol/vol) mais DHB 5 µg/µL em solução (ACN e TFA 0,1%, 70:30, vol/vol) (tabela 6).

Tabela 6: Modificações no protocolo anchorchip 13 do protocolo anchorchip 12.

Etapas de digestão	Protocolo AnchoChip 12	Protocolo AnchoChip 13
<b>1ª Lavagem</b>	água + 50% ACN	*
<b>Descoloração</b>	ferrocianeto de potássio 15mM e tiosulfato de sódio 50mM	*
<b>Redução e alquilação</b>	Não foi feita	*
<b>2ª Lavagem</b>	NH <sub>4</sub> CO <sub>3</sub> 50mM	*
<b>Composição do tampão de tripsina</b>	0,2µg/µL de tripsina, NH <sub>4</sub> CO <sub>3</sub> 25mM e CaCl 5mM	*
<b>Temperatura e tempo de incubação com tripsina</b>	37°C por 12 horas	*
<b>Desalinização</b>	coluna com poros R2 ( <i>gel loader</i> ) e 20µL de TFA 0,1%	coluna com poros R2 ( <i>gel loader</i> ) e 20µL de TFA 0,1%
<b>Matrizes</b>	1µL da mistura de matrizes HCCA 5µg/µL em solução (ACN e ácido fórmico 5% (AF), 70:30, vol/vol) mais DHB 5µg/µL em solução (ACN e TFA 0,1%, 70:30, vol/vol)	1µL da mistura de matrizes HCCA 5µg/µL em solução (ACN e ácido fórmico 5% (AF), 90:10, vol/vol) mais DHB 5µg/µL em solução (ACN e TFA 0,1%, 90:10, vol/vol)
<b>Placa</b>	AnchorChip	*

(\*) Etapas sem modificações

Com esse protocolo conseguimos identificar proteínas oriundas de géis de 50 µg de neutrófilos. Três proteínas que já haviam sido identificada no laboratório na Universidade do sul da Dinamarca (Colaboração com a Universidade do Sul da Dinamarca) em géis de neutrófilos com 300 µg, foram confirmadas com esse novo

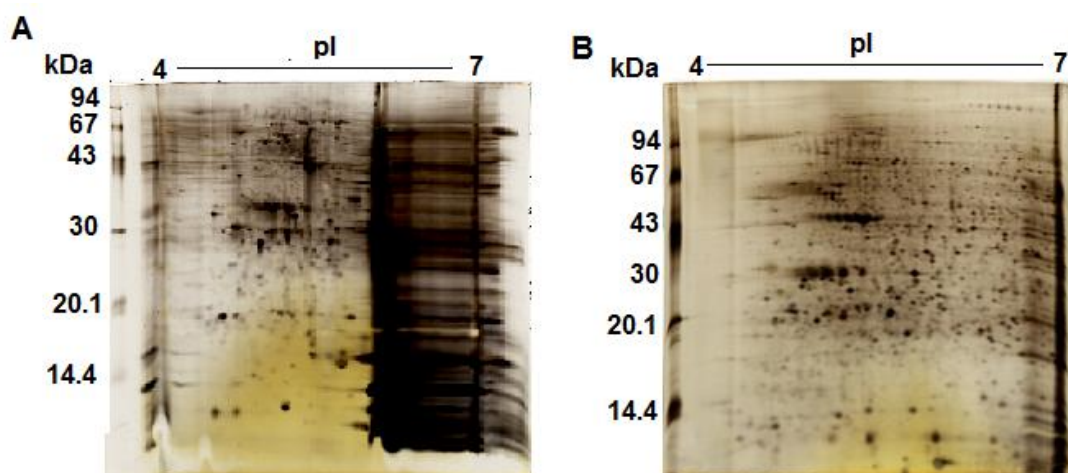
protocolo. As figuras em anexos 38, 39, 40 e 41 mostram os resultados da identificação de uma dessas proteínas oriundas da Universidade na Dinamarca e no Laboratório de Bioquímica e Química de Proteínas, tabela 7.

Tabela 7: Comparação entre o protocolo otimizado e o protocolo da Dinamarca

<b>Etapas de digestão</b>	<b>Protocolo AnchoChip 13</b>	<b>Protocolo realizado na Dinamarca</b>
<b>1ª Lavagem</b>	água + 50% ACN	*
<b>Descoloração</b>	ferrocianeto de potássio 15mM e tiosulfato de sódio 50mM	*
<b>Redução e alquilação</b>	Não foi feita	DTT 10mM e iodoacetamida 55mM
<b>2ª Lavagem</b>	NH <sub>4</sub> CO <sub>3</sub> 50mM	*
<b>Composição do tampão de tripsina</b>	0,2µg/µL de tripsina, NH <sub>4</sub> CO <sub>3</sub> 25mM e CaCl 5mM	*
<b>Temperatura e tempo de incubação com tripsina</b>	37°C por 12 horas	*
<b>Desalinização</b>	coluna com poros R2 ( <i>gel loader</i> ) e 20µL de TFA 0,1%	coluna com poros R2 ou poros R3( <i>gel loader</i> ) e 30µL de TFA 0,1%
<b>Matrizes</b>	1µL da mistura de matrizes HCCA 5µg/µL em solução (ACN e ácido fórmico 5% (AF), 90:10, vol/vol) mais DHB 5µg/µL em solução (ACN e TFA 0,1%, 90:10, vol/vol)	1µL da matrizes (HCCA 5µg/µL em ACN e TFA 0,1%, 70:30, vol/vol)
<b>Placa</b>	AnchorChip	STEEL

Com a exemplificação desse resultado, demonstramos que o protocolo "anchorchip 13" é adequado para géis de neutrófilos corados com prata de alta sensibilidade de 50 µg. Apesar da diferença na porcentagem de cobertura encontrada na identificação de proteínas com o protocolo realizado na Dinamarca (84%) e de score 429 em comparação com os nossos resultados (49%) e score 200, optou-se pelos géis com 50 µg de proteínas devido às dificuldades principalmente na focalização das proteínas para a produção dos géis ácidos de 300 µg de neutrófilos corados com prata de alta sensibilidade, além da sobreposição de *spots* o que dificulta o pareamento e a retirada isolada desses *spots*. Tal situação apresenta muitos *spots* com misturas de proteínas (figura 12).





**Figura 12:** Géis bidimensionais de neutrófilos quiescentes em pH ácido. **A** Gel bidimensional com 300 µg. **B** Gel bidimensional com 50 µg.

Após a definição do protocolo de identificação proteica, foi iniciada a digestão de proteínas que apresentaram expressão diferencial entre neutrófilos quiescentes *versus* neutrófilos estimulados por PAF e neutrófilos quiescentes *versus* neutrófilos ativados por fMLP, retomando a proposta do trabalho, identificar primeiro proteínas consequentes à estimulação pró-inflamatória dos neutrófilos.

### 3.4.7) Digestão de *spots* proteicos

Os *spots* que apresentaram abundância diferencial entre neutrófilos estimulados por PAF e neutrófilos quiescentes e *spots* que apresentaram abundância diferencial nas diversas comparações cabíveis, como, por exemplo, neutrófilos quiescentes *versus* neutrófilos ativados por fMLP, neutrófilos estimulados por PAF *versus* neutrófilos ativados por fMLP foram excisados do gel e lavados com água e acetonitrila (ACN) 50% para retirar principalmente glicerol vindo da coloração com prata.

Logo em seguida, foram removidos a prata e haletos de prata, com a utilização da solução de descoloração (ferrocianeto de potássio 15mM e tiosulfato de sódio 50 mM). Então a malha de bisacrilamida e acrilamida foi limpa e se tornou maleável, o SDS foi retirado e os *spots* mantidos em pH 8 com a adição de  $\text{NH}_4\text{CO}_3$  50 mM. Em seguida foi realizada a digestão com a incubação das proteínas a 37°C por 15 horas em tampão contendo: 0,2 µg/µL de tripsina,  $\text{NH}_4\text{CO}_3$  25 mM e CaCl 5 mM. Os peptídeos oriundos

da digestão trípica foram dessalinizados em uma micro coluna com matriz poros R2 (*gel loader*) e em seguida lavados com TFA 0,1%. Os peptídeos foram extraídos da coluna pela passagem de 2 µL mistura de matrizes contendo: 5 µg/µL HCCA em solução (ACN e ácido fórmico 5% (AF), 90:10, vol/vol) mais 5 µg/µL DHB em solução (ACN e TFA 0,1%, 90:10, vol/vol) e aplicados na placa AnchorChip (Laugesen e Roepstorff, 2003; Thingholm, Jorgensen *et al.*, 2006; Zhang, Shi *et al.*, 2007). Os peptídeos que foram levados para análise por LC-MS/MS em equipamento com analisador obitrap, tiveram sua extração da coluna realizada pela passagem de 4 µL de 90% ACN e 10% TFA 0,1% e em seguida foram secos (Teles, Aquino *et al.*).

### 3.4.8) Espectrometria de massa

Os espectros peptídicos foram obtidos em espectrômetro de massa tipo MALDI-TOF-TOF, modelo Autoflex2 (BrukerDaltonics, Bremen, Germany), em modo positivo e refletor (fonte de íons 1 = 20kV) com faixa de massa de 800 a 3500 (m/z), intensidade de *laser* entre 20 a 40, com calibração externa utilizando uma mistura padrão de peptídeos fornecida pelo fabricante do equipamento. Os espectros obtidos foram calibrados internamente com picos originários de digestão de queratina e tripsina, selecionados automaticamente e revisados manualmente com seleção de picos monocarregados apresentando distribuição isotópica característica. A seleção de picos foi realizada usando os programas Flexanalysis e Biotools (Teles, Aquino *et al.*).

As buscas em bancos de dados foram realizadas com auxílio do programa MASCOT ([www.matrixscience.com](http://www.matrixscience.com)), usando os bancos de dados não redundantes do NCBI, National Center for Biotechnology. Os parâmetros de busca para os dados de PMF foram: tolerância de desvio de massa molecular entre 50 e 200 ppm, taxonomia *Homo sapiens*, máximo de uma clivagem perdida, carbamidometilação como modificação constante de cisteína, oxidação da metionina e acetilação no N terminal da proteína como modificações variáveis. Para redução de redundância e validação foi utilizado o *software* GPMW na versão 8.0, para obtenção da clivagem teórica das proteínas e comparação com os dados experimentais (Teles, Aquino *et al.*).

Para os espectros de MS/MS obtidos no MALDI-TOF-TOF foram escolhidos pelo menos 3 peptídeos que compõem a proteína identificada por PMF e/ou com intensidade acima de 2000. Os peptídeos foram fragmentados pelo método lift com intensidade de

*laser* na faixa de 30 a 40. Os espectros foram somados até atingir a intensidade de  $1 \times 10^4$  a.u. e uma distribuição homogênea ao longo da faixa de massa até atingir a massa do peptídeo original.

Os peptídeos provenientes de *spots* considerados exclusivos de cada condição foram retirados do gel, digeridos e em seguida analisados utilizando equipamentos conjugados tipo LC-MS/MS, realizando cromatografia acoplado a espectrômetro de massa com analisadores de íons LTQ e orbitrap, produzindo picos duplamente carregados em abundância.

Os peptídeos trípticos obtidos a partir de pontos considerados únicos para cada condição foram submetidos à cromatografia em fase reversa, acoplada ao espectrômetro de massa por fonte de ionização nanoelectrospray, para identificação. Para cada *spot*, 4  $\mu$ L de digesto de peptídeos trípticos foram inicialmente aplicados em uma coluna de captura (*trap column*) de 2 cm de comprimento e 150  $\mu$ m de diâmetro interno contendo matriz com partículas de 5  $\mu$ m, Reprosil C18 (Dr. Maish), seguido por separação em uma coluna analítica de 15 cm de comprimento e 75  $\mu$ m de diâmetro interno contendo matriz com partículas de 3  $\mu$ m, Reprosil C18 (Dr. Maish). A cromatografia foi realizada em um Ultra-nano LC sistema (Ekseigent) acoplado a um espectrômetro de massa Orbitrap LTQ XL (Thermo). As amostras foram carregadas primeiro para a coluna de captura em 5  $\mu$ L/min e desalinizadas em ácido fórmico 0.1% durante 5 minutos. Depois do carregamento e da dessalinização foi iniciado o gradiente de separação cromatográfica, realizada a uma taxa de fluxo de 200 nL / min. A fase móvel A consistiu de 0,1% (v / v) de ácido fórmico em água, e a fase móvel B consistiu de 80% de acetonitrila em 0,1% (v / v) de ácido fórmico. O gradiente utilizado foi: 2 a 60% de solvente B em 50 min; rampa até 100% B em 5 minutos e manutenção desta concentração durante 5 min antes de iniciar o equilíbrio da coluna para a análise da amostra subsequente. Peptídeos eluídos foram introduzidos diretamente no espectrômetro de massa através da fonte de íons Nanospray II (Thermo). A tensão da fonte foi ajustada para 1,8 kV, temperatura do capilar a 200 °C e tensão da lente para 150 V. O valor-alvo AGC foi de 10.000 para ion trap MSn, e de 1.000.000 para FTMS. Os dados de fragmentação foram obtidos em uma aquisição dependente dos dados em um modo de alta-baixa (*DDA high-low*) em que a os espectros de peptídios intactos (MS1), foram obtidos no analisador Orbitrap (300 a 1800 m/z) a uma resolução de 60.000 (FWHM a 400m/z) e, para cada MS1 espectros dos 10 íons mais intensos foram

submetidos a fragmentação por CID (*collision induced dissociation*) no analisador por armadilha iônica linear (*linear ion trap*) com uma janela de isolamento de 2,5 Da, a energia de colisão normalizada de 35%; ativação Q de 0,25 e tempo de ativação de 30 s. Exclusão dinâmica foi habilitada e configurada com os seguintes valores: contagem de repetição = 1; tamanho exclusão da lista = 500; duração da exclusão = 90 s e largura de exclusão em massa de 10 ppm (Da Silva, Gomez-Mendoza *et al.*).

Listas de peptídeos de experimentos *Peptide Mass Fingerprints* (PMF) e *Peptide Fragmentation Fingerprint* (PFF) foram submetidos a pesquisas de banco de dados usando o software Mascot ([www.matrixscience.com](http://www.matrixscience.com)). Os parâmetros da pesquisa foram: banco de dados = NCBIInr, taxonomia = Homo sapiens, carbamidometilação de cisteínas como modificação fixa e oxidação de metionina como modificação variável: máximo de uma clivagem perdida; tolerância de massa para a massa precursor de 100 ppm de espectros originado de MALDI e 10 ppm para os espectros de origem no Orbitrap, tolerância de massa para íons de fragmentação (no Orbitrap) = 0,6 Da (Paba, Ricart *et al.*, 2004).

#### **3.4.9) Validação dos resultados de PMF e PFF**

Com a finalidade de se reduzir a possibilidade de falso-positivos, além do score estatístico gerado pelo programa Mascot foram introduzidos critérios de filtragem adicional.

Para as identificações realizadas pelo método PMF avaliamos a correspondência entre a massa e o pI teóricos e experimentais, nesse caso aceitamos resultados de massa com a variação de até 10% em relação à massa teórica e uma variação de apenas 0.5 quanto ao pI. Nas situações em que esses valores apresentaram divergências além dos limites indicados, investigou-se a cobertura C ou N terminal e possíveis modificações pós-traducionais utilizando o programa GPMW; foi avaliada a porcentagem de cobertura da proteína, quanto maior for esse valor, melhor será confiança dessa identificação, a partir de um mínimo de 15%; outro critério foi a confirmação e a coerência de clivagens perdidas, a confirmação se dá quando encontramos a sequência desse peptídeo sem a perda dessa clivagem, já a coerência está relacionada com a justificativa pelo qual houve essa perda, por exemplo, a proximidade de certos aminoácidos ao sítio de clivagem como: resíduos ácidos (ácido glutâmico e ácido

aspártico), resíduo de prolina e sítios de clivagens próximos como a proximidade de argininas e lisinas (Rodriguez, Gupta *et al.*, 2008); outro critério foi a confirmação das modificações variáveis como a presença e ausência das modificações, oxidação da metionina e acetilação do N-terminal da proteína, na mesma sequência.

Nas identificações obtidas pelo método de fragmentação também foi analisada a correspondência da massa e pI teórico com os experimentais, a sequência do peptídeo encontrado no PMF, a abundância de fragmentos das séries y e b, além da confirmação de alguns aminoácidos pela presença dos seus íons no espectro.

Os resultados de análises por LC-MS/MS foram validados baseados na pontuação estatística atribuída aos peptídeos. Os limiares de pontuação foram utilizados 60 para as identificações com base em um único peptídeo, e de 30 para até 2 peptídeos únicos e 20 para até 3 peptídeos únicos.

Os espectros oriundos do Orbitrap que não foram identificados e que apresentaram resultados duvidosos, foram reprocessados primeiro por um filtro, que retira sequências de queratina e tripsina, esse filtro encontra-se em um software chamado EagleEye após esse filtro foi realizado o sequenciamento de novo utilizando outro software chamado PepNovo que utiliza as massas dos picos oriundos do Orbitrap para fazer o sequenciamento dos peptídeos. Após o sequenciamento foi feita a busca utilizando MS BLAST que compara sequência inseridas no programa com sequência em banco de dados (Junqueira, Spirin *et al.*, 2008).

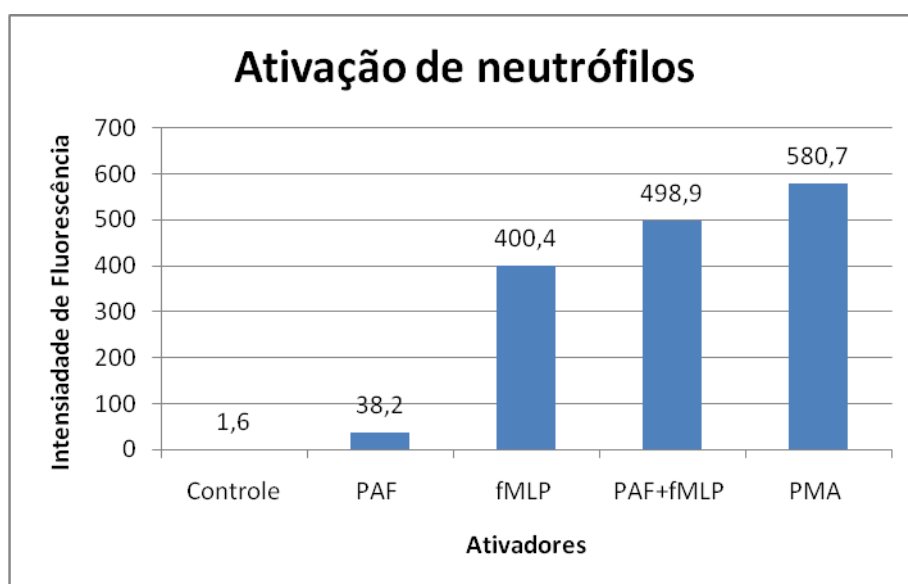
### **3.5) Automação na predição das funções proteicas**

As proteínas identificadas foram classificadas de acordo com o banco de dados de anotações proteicas *gene ontology* (GO). Nesse estudo foi aplicado o programa *extended similarity group* (ESG) (Chitale, Hawkins *et al.*, 2009) (<http://kiharalab.org/web/index.php>) que, com base na sequência da proteína, *GO term*, domínio da proteína e sua vizinhança avalia quão confiável é a previsão. Os parâmetros de busca usados na predição foram valor de corte de 0,35 que indica o número de *hits* do PSI-BLAST considera a cada nível de ESG e dois níveis de vizinhança ao redor da proteína (Ashburner, 2000; Chitale, 2009). O compartimento celular, a função molecular e o processo biológico foram selecionados somente quando eles apresentavam confiabilidade acima de 20%.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 4.1) Ativação do complexo NADPH oxidase

A avaliação da ativação dos neutrófilos nessas concentrações foi testada utilizando dados citométricos após a incubação com DHR. Foi observado o aumento de peróxido de hidrogênio entre as condições, da seguinte forma: 1,6 em neutrófilos quiescente para 38,2 em neutrófilos estimulados pelo PAF para 400,4 em neutrófilos ativados por fMLP para 498,9 em neutrófilos estimulados pelo PAF e ativados por fMLP e de 580,7 para neutrófilos ativados por PMA (figura 13).



**Figura 13:** Ativação dos neutrófilos. Gráfico que mostra a ativação dos neutrófilos pela avaliação citométrica demonstrando a intensidade de fluorescência do DHR na presença de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ). A ativação foi realizada por PAF, fMLP, PAF+fMLP e PMA.

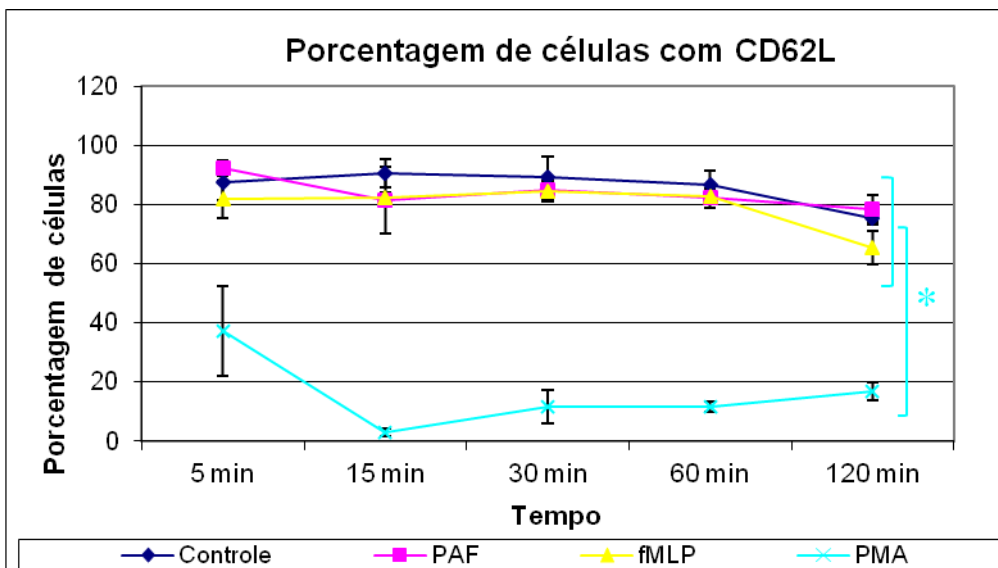
A detecção da ativação dos neutrófilos é comumente associada com a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS). A pequena quantidade da produção de ROS com a possibilidade de aumento dessa produção quando incubado com outro ativador define um estimulador. Assim observamos com esse resultado que o PAF pela pequena produção de ROS e aumento após a incubação com o ativador fMLP é considerado um estimulador (Dewald e Baggiolini, 1985).

Tanto o PAF quanto o fMLP são agentes que provocam produção de ROS em neutrófilos e ambos receptores são acoplados a proteínas G, porém provocam

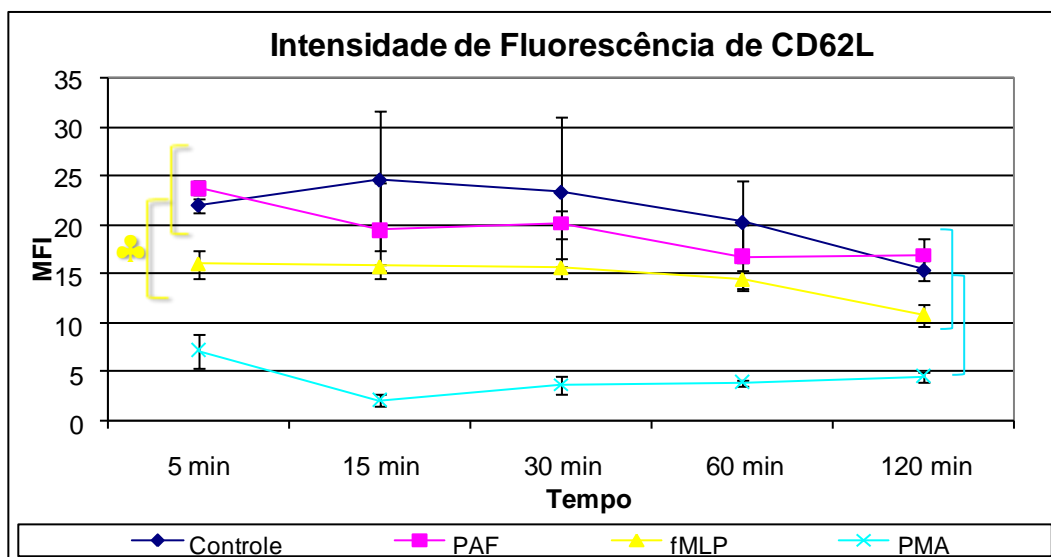
diferenças na quantidade de produção de ROS. Essa diferença pode estar associada à ativação das subunidades da proteína G. O PAF ativa parcialmente a proteína G, na subunidade insensível a toxina pertussis e o fMLP ativa a proteína G na subunidade sensível a pertussis. A ativação parcial desencadeia também parcialmente a via da p38MAPK. Outro fator também já observado é a montagem parcial da NADPH oxidase na estimulação pelo PAF somente é fosforilado e translocado para a membrana a p67<sub>phox</sub>, a p40<sub>phox</sub> e Rac2, mas não p47<sub>phox</sub>, diferente no que ocorre com fMLP que todas as subunidades são fosforiladas e monta o complexo por completo (Nick, Avdi *et al.*, 1997; Brown, Stewart *et al.*, 2004; Chen, Lin *et al.*, 2005; Sheppard, Kelher *et al.*, 2005; Sheppard, Moore *et al.*, 2005).

#### **4.2) Avaliação da L-selectina**

Com o primeiro protocolo (antes da otimização, portanto com a entrada de anticorpos na célula) foram avaliados, por citometria de fluxo, a porcentagem de células que apresentavam CD62L e CD11b na superfície e no citossol e a intensidade de fluorescência, isto é a quantidade desse marcador em 5 tempos diferentes ao longo de 120 minutos, tempos: 5, 15, 30, 60 e 120 minutos. O ensaio para avaliar CD62L demonstrou que aproximadamente 80% das células apresentam CD62L nas condições controle, PAF e fMLP ao longo do tempo e um pequeno decréscimo para aproximadamente 70% no tempo de 120 minutos. Na condição PMA, em 5 minutos, 40% das células apresentam CD62L. O marcador diminuiu para aproximadamente zero aos 15 minutos e, nos demais tempos, observou-se uma pequena elevação que chegou a aproximadamente 20% no tempo 120 minutos (figura 14). A quantidade de CD62L nos neutrófilos foi muito semelhante entre controle e PAF não apresentando diferença significativa entre as condições nem ao longo do tempo. Já as condições fMLP e PMA apresentaram diferenças significativas em relação ao controle e PAF (figura 15).



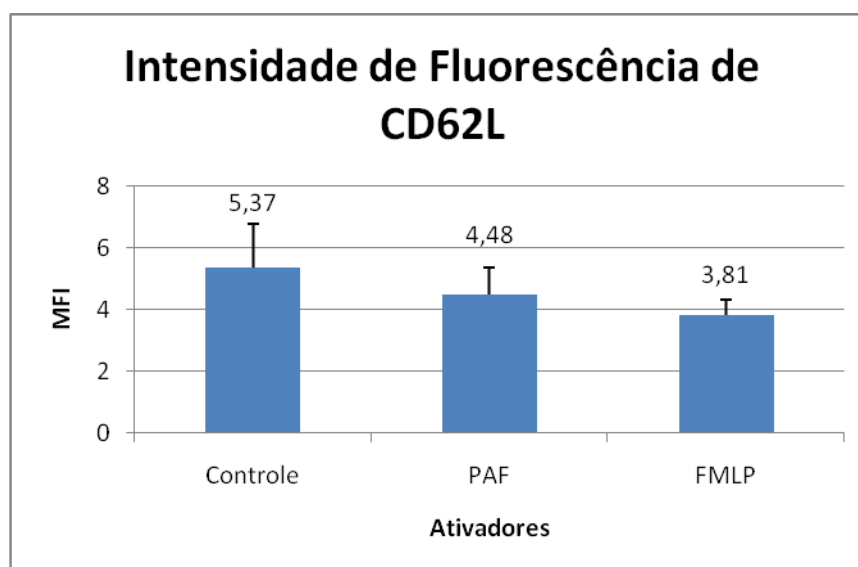
**Figura 14:** Porcentagem de células apresentando CD62L. Comparação entre neutrófilos quiescentes (controle), estimulado pelo PAF, ativado pelo fMLP e PMA. \*Diferença significativa da porcentagem de células que apresentam CD62L entre neutrófilos ativados por PMA e as demais condições com  $p \leq 0,05$ . Teste ANOVA.



**Figura 15:** Intensidade Média de Fluorescência de CD62L. Comparação entre neutrófilos quiescentes (controle), estimulado pelo PAF, ativado pelo fMLP e PMA. \*Diferença significativa da intensidade de fluorescência entre neutrófilos ativados por PMA e as demais condições com  $p \leq 0,05$ . ♣ Diferença significativa da intensidade de fluorescência entre neutrófilos ativados por fMLP e neutrófilos estimulados pelo PAF e controle  $p \leq 0,05$ . Teste ANOVA.



Com o segundo protocolo (após a otimização, portanto com anticorpos interagindo apenas com antígenos de superfície) a superfície dos neutrófilos foi novamente avaliada na intensidade de fluorescência para CD62L e CD11b somente para PAF e fMLP, além do controle no tempo de 30 minutos. A intensidade de fluorescência para CD62L na superfície dos neutrófilos foi maior no controle (5,37) do que o PAF (4,48) e fMLP (3,81) não demonstrando diferença significativa (figura 16). O ativador PMA não foi avaliado por esse protocolo, por não ter sido possível obter o número necessário de células íntegras. A análise foi realizada apenas no tempo de 30 minutos devido à ausência de variações significativas nos demais tempos estudados e a ser este o tempo utilizado na análise proteômica. O número de três indivíduos para o estudo da L-selectina pode ter sido insuficiente, pois apresentou uma variação alta entre um dos indivíduos em estudo, sendo necessário aumentar o n.



**Figura 16:** Intensidade de fluorescência de CD62L. O gráfico mostra diferenças entre a presença de CD62L na superfície dos neutrófilos após estimulação com PAF e ativação com fMLP por 30 min, porém diferenças não significativas.

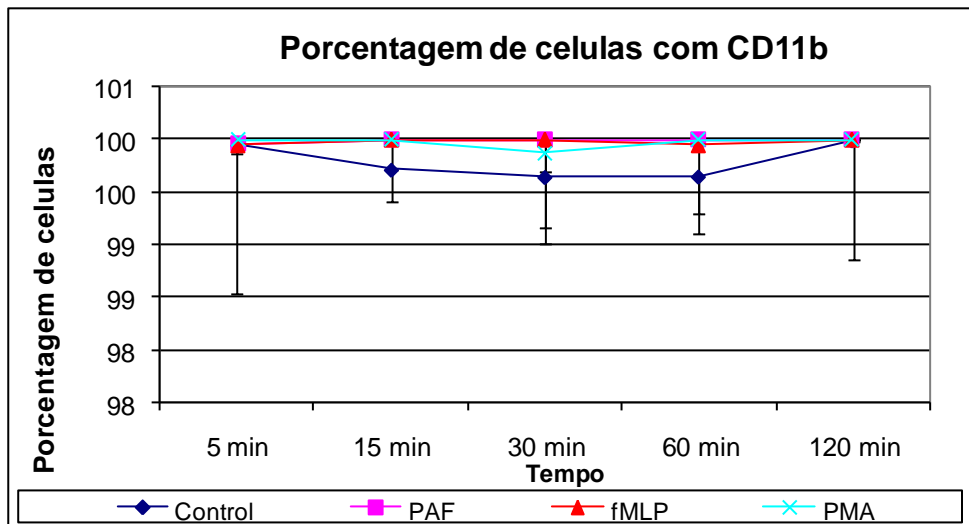
Neste trabalho foram avaliados CD62L ao longo do tempo (5-60 min.) para neutrófilos estimulados por PAF e ativados pelo fMLP e PMA (gráficos 2 e 3) e em outro ensaio com o tempo somente de 30 minutos avaliados neutrófilos estimulados por PAF e ativados por fMLP (figura 16). Esses ensaios resultaram na perda bem intensa de L-selectina em neutrófilos ativados pelo PMA ao logo do tempo com início antes mesmo de 5 minutos e aumento discreto da molécula de CD62L após 15 minutos. Apesar de não apresentar diferença de células que apresentam CD62L de neutrófilos

ativados pelo fMLP foi demonstrado que ocorre a diminuição da intensidade de fluorescência. Para o PAF não foi observado diferença significativa na redução da L-selectina.

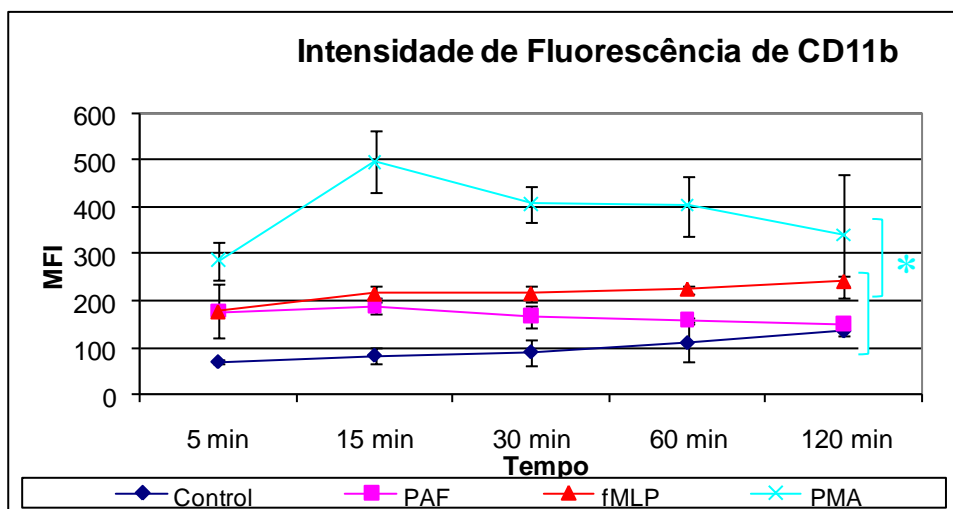
Na literatura já é relatado que neutrófilos ativados pelo PMA clivam a L-selectina da superfície (Alexander, Kishimoto *et al.*, 2000; Ivetic e Ridley, 2004). Segundo Alexander (2000), a clivagem da L-selectina pode estar associada à ativação da PKC, pois o PMA, análogo do diacilglicerol (DAG) inicia a ativação dos neutrófilos ativando PKC. Porém no ensaio com fMLP, cujo o receptor está acoplado à proteína G e ativa PKC não se verificou clivagem da L-selectina tão intensa quanto no caso do PMA. Nesse mesmo artigo os autores sugerem mais ensaios para avaliar quais isoformas de PKC são fosforiladas em fMLP e conseqüentemente ativadas, o que leva à clivagem do CD62L (Alexander, Kishimoto *et al.*, 2000). Já para neutrófilos estimulados pelo PAF a perda de L-selectina é discreta e não demonstrou diferença significativa em relação ao controle, na concentração de 20 nM, em concordância com os resultados de Condliffe (1996), que só observou clivagem da L-selectina com concentração de PAF superior a 100 nM (Conejeros, Jara *et al.*; Condliffe, Chilvers *et al.*, 1996). A L-selectina é importante para a interação leucócito-leucócito e leucócito-endotélio e marca a etapa inicial do processo inflamatório (Alexander, Kishimoto *et al.*, 2000).

#### **4.3) Avaliação da subunidade CD11b**

Com o primeiro protocolo a porcentagem de células que apresentaram CD11b foi de aproximadamente 100% em todas as condições (figura 17). Porém a intensidade de fluorescência demonstrou diferença, mas com significância somente entre PMA e as demais condições (figura 18).

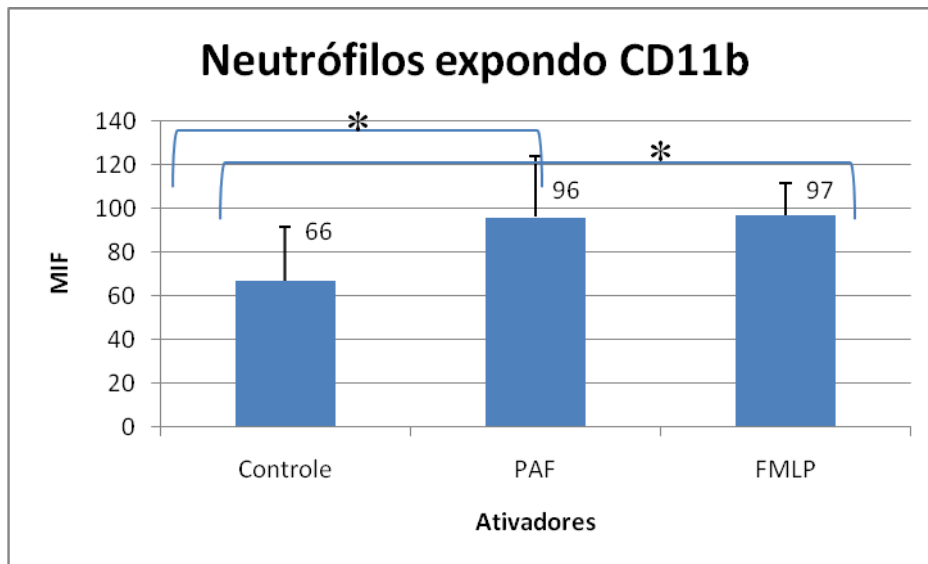


**Figura 17:** Porcentagem de células com CD11b. Comparação entre neutrófilos quiescentes (controle), estimulado pelo PAF, ativado pelo fMLP e PMA. Não foi observada diferença significativa, demonstrando que em todas as condições as células apresentavam CD11b.



**Figura 18:** Intensidade de Fluorescência de CD11b. Comparação entre neutrófilos quiescentes (controle), estimulado pelo PAF, ativado pelo fMLP e PMA. \*Diferença significativa da intensidade de fluorescência de CD11b na superfície entre neutrófilos ativados por PMA e as demais condições com  $p \leq 0,05$ . Teste ANOVA.

Com o segundo protocolo a intensidade de fluorescência para CD11b na superfície das células apresentou diferença significativa entre controle e PAF e controle e fMLP com intensidade de 66,97 para o controle, 96 estimulado por PAF e 97,10 ativados por fMLP (figura 19).



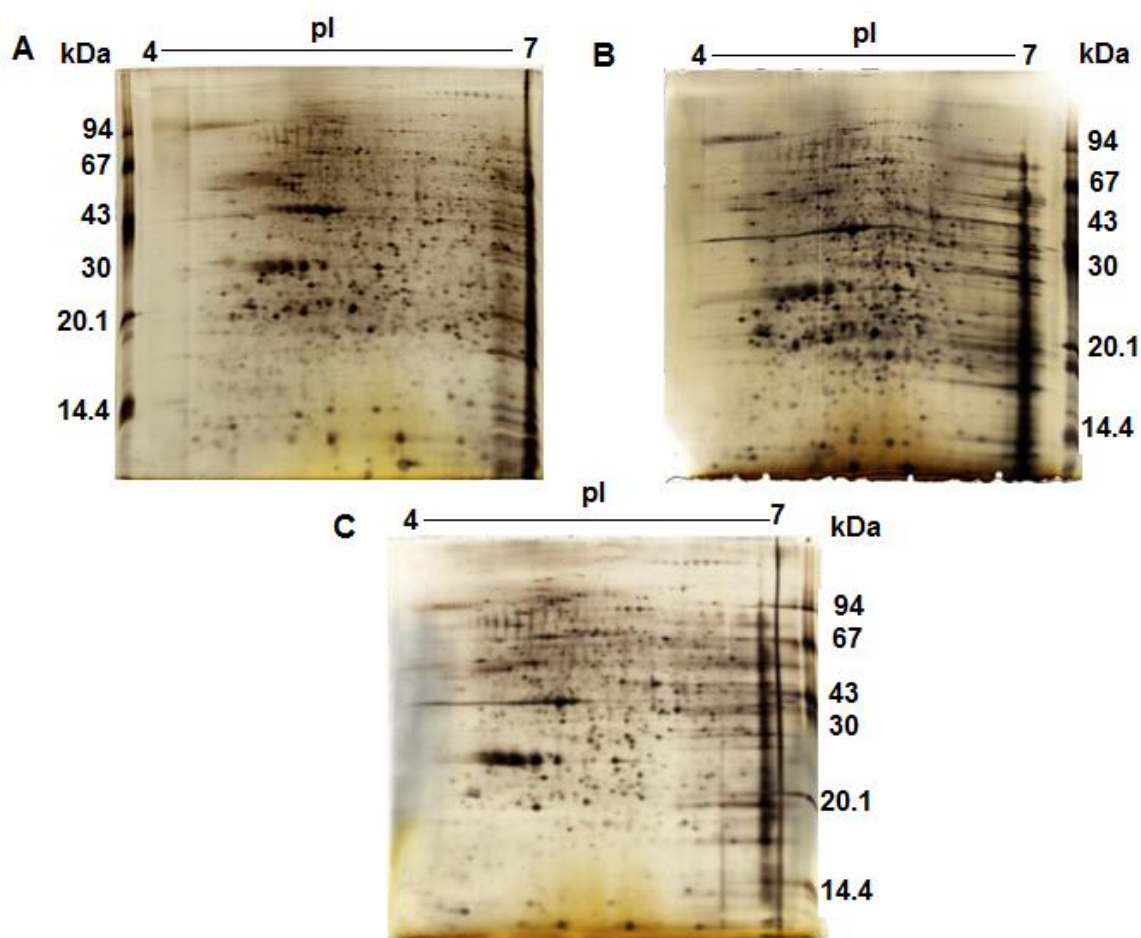
**Figura 19:** Neutrófilos expando CD11b. Gráfico que mostra intensidade média de fluorescência para a exposição do CD11b na superfície dos neutrófilos após ativação com PAF e fMLP, por 30min. \*A comparação entre controle e PAF e controle e fMLP apresentou diferença significativa no teste ANOVA com  $p \leq 0,05$ .

Na avaliação de CD11b não houve diferença na porcentagem de células que apresentavam CD11b em sua membrana em conformidade com autor Albelda, 1994 que relata a presença basal de integrina na superfície dos neutrófilos independente de ativação (Albelda, Smith *et al.*, 1994). Porém a quantidade de CD11b foi diferente entre os ativadores. Quando foi avaliado ao longo do tempo somente para o ativador PMA, observou-se diferença significativa em relação ao controle apresentando oscilação da quantidade de CD11b. Para os outros ativadores não se mostrou diferença significativa, porém houve um pequeno aumento para fMLP até 120 minutos e um aumento discreto para PAF com uma queda da quantidade. Já na avaliação de 30 minutos foi observado diferença significativa tanto para PAF quanto para fMLP em concordância a vários autores (Zhu, Tan *et al.*; Condliffe, Chilvers *et al.*, 1996; Kitchen, Rossi *et al.*, 1996; Von Den Driesch, Weller *et al.*, 1997). Estudos relatam que o PAF é um estimulador rápido com aumento do CD11b em menos de 1 minuto e a concentração com máxima ativação tanto para aumento para CD11b quanto para perda de CD62L foi acima de 100nM, além disso também foi relatado que a perda de CD62L não está relacionada com o aumento de CD11b e pode haver reversibilidade da expressão do CD11b ao longo do tempo em conformidade que foi observado nesse estudo (Condliffe, Chilvers *et al.*, 1996). O aumento do CD11b na membrana plasmática está relacionado com a

desgranulação e segundo Faurschou, 2003 a ativação dos neutrófilos pelo PMA libera vesícula secretória, grande quantidades de grânulos gelatinase , moderados grânulos específicos e poucos grânulos azurofílicos, já a ativação por fMLP e PAF libera muitas vesículas secretórias sem a liberação de grânulos (Faurschou e Borregaard, 2003).

#### 4.4) Proteômica

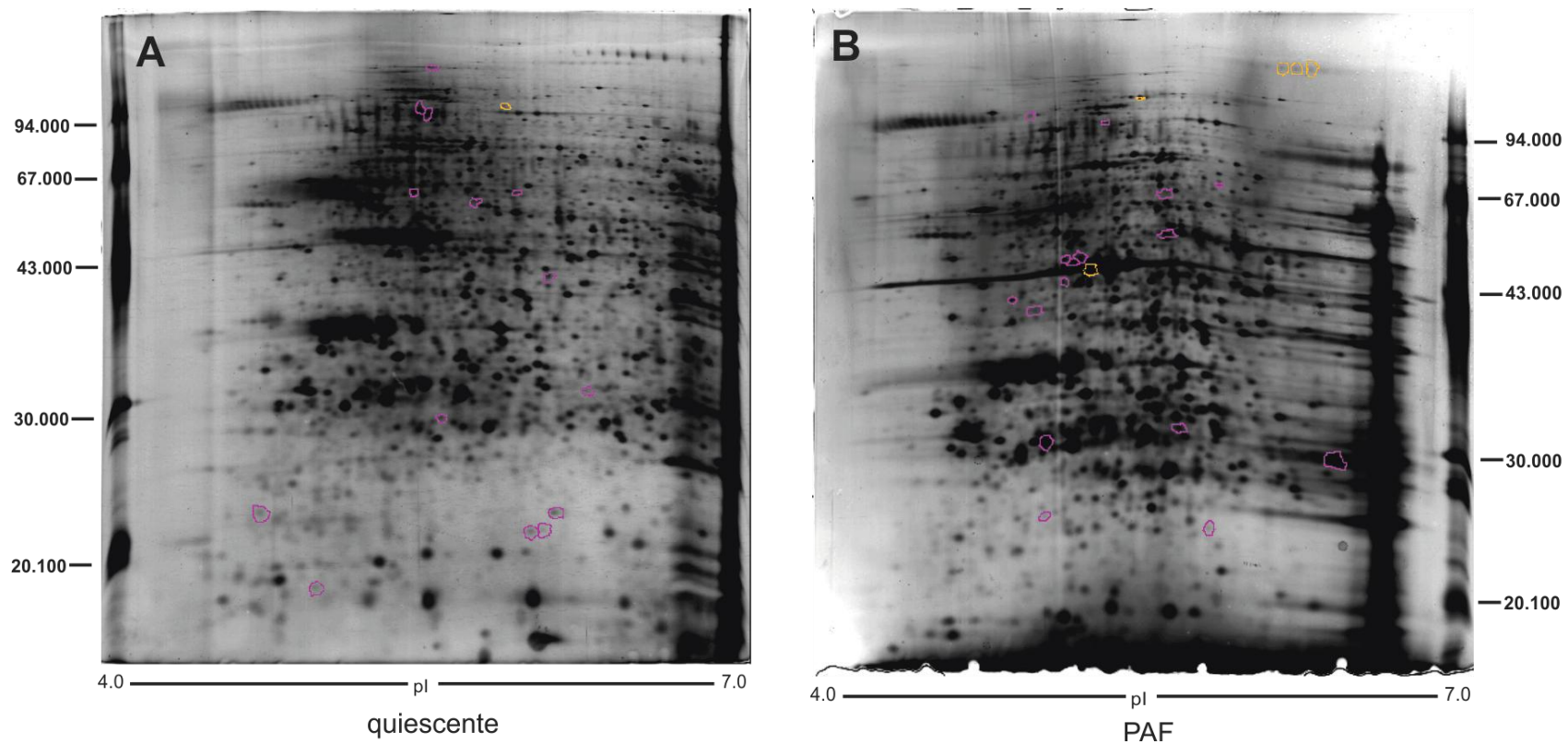
Todas as etapas do protocolo de proteômica estão otimizadas. Os géis dos 3 grupos foram resultados de projetos anteriores desenvolvidos no LBQP. A figura 20 abaixo mostra os géis considerados referências de cada categoria.



**Figura 20:** Géis bidimensionais contendo 50 µg de proteínas. A gel de neutrófilos quiescentes, B gel de neutrófilos estimulados por PAF e C gel de neutrófilos ativados por fMLP.

##### 4.4.1) Comparação entre neutrófilos quiescente e neutrófilos estimulados por PAF

Nessa comparação foram observados 51 *spots* com abundância diferencial, tendo sido 36 deles identificados. Dentre os 51 *spots* foram encontrados 10 *spots* quantitativamente aumentados para a condição estimulada por PAF, 2 *spots* com abundância diminuída para PAF, 16 *spots* considerados exclusivos da condição quiescente e 23 exclusivos da condição estimulada por PAF. Das 36 proteínas identificadas 6 apresentaram abundância aumentada na condição estimulada por PAF, 1 diminuída, 13 exclusivos de quiescente e 16 exclusivos de PAF, figura 21 e tabela 8.



**Figura 21:** Géis bidimensionais na faixa de ácida (4-7) de neutrófilos totais. A – Gel de neutrófilos quiescente: em rosa, *spots* exclusivos de neutrófilos quiescentes e em laranja, *spot* aumentado para neutrófilos quiescentes. B – Gel de neutrófilos estimulados pelo PAF: em rosa, *spots* exclusivos de neutrófilos estimulados pelo PAF e em laranja, *spots* aumentados para neutrófilos estimulados.

Tabela 8: Identificação proteica de neutrófilos por MALDI-TOF-TOF peptide mass fingerprinting and MS/MS fragmentação por orbitrap.

Spot	Parâmetro de Expressão <sup>a</sup>	p-value <sup>b</sup>	Número de acesso	Nome e Símbolo (UniPROT)	Atividades	pI (teor/exp)	Mr (teor/exp) (kDa)	Score <sup>c</sup>	C(%) <sub>d</sub>	MS/MS Score <sup>e</sup>	MS/MS peptídeos	Peptídeos e-value <sup>f</sup>
71	↑PAF (4.82)	0.021	<a href="#">gi3043652</a>	KIAA0564 (K0564_HUMAN)	Reparo do DNA	6.37 / 6.56	163 / 176	316	34			
72	↑PAF(4.00)	0.013	<a href="#">gi1212983</a>	polypeptide of 976 aa (SYCP1_HUMAN)*	Desfosforilação de resíduos de serina da RNA polimerase II	5.85 / 6.30	114 / 151	80	15			
73	↑PAF(4.55)	0.008	<a href="#">gi1212983</a>	polypeptide of 976 aa (SYCP1_HUMAN)	Desfosforilação de resíduos de serina da RNA polimerase II	5.85 / 6.38	114 / 151	75	21			
102	Q		<a href="#">gi34485727</a>	NCK-associated protein 1 – like (NCKPL_HUMAN)	Regula da polimerização da actina.	6.39 / 5.53	129/ 120	97	19			
147	↑PAF(8.00)	0.005	<a href="#">gi86143432</a>	RACK7 isoform i (Q2HXV4_HUMAN)	Ativa a proteína Cinase C	5.93 / 5.45	122 / 112	126	24			
181	PAF		<a href="#">gi177205</a>	92 kDa type IV collagenase (MMP9_HUMAN)	Catabolismo do colágeno	4.98 / 5.69	103 / 79			139	R.QSTLVLPFGDLR.T K.SLGPALLLQK.Q K.LGLGADVAQVTGALR.S	0.0097 0.00039 4.9e-06



											K.LGLGADVAQVTGALR.S	1.5e-05
192	↓PAF(0.25)	0.022	<a href="#">gi 156119605</a>	general transcription factor 3C polypeptide 4 (TF3C4_HUMAN)*	Componete do promotor de iniciação da RNA polimerase III.	6.21 / 5.93	93 / 94	123	30			
214	Q		gi 34526448	unnamed protein (K1C28_HUMAN)	Organização do citoesqueleto e biogêneses.	5.30 / 6.53	100 / 53	59 59 58 56 56	71 66 72 100 64	288	VRALEEANAELERK NANVILQIDNAR LAEQNRKDAEA MQNLNDR EGQKLEYEHLLDVK	
			gi 68533039	DSP variant protein (Q4LE79_HUMAN)	Filamento intermediário da organização do citoesqueleto e biogêneses.	5.30 / 6.45	100 / 265	90 64 63 60	100 72 90 70	277	KAITGFDDPFSGK AEKAITGFDDP KLASLEELKR KFGDSNTVMR	
216	Q		<a href="#">gi 631331</a>	PML protein, splice form 1	Controle da apoptose	5.88 / 5.34	96 / 96	69	17			
221	PAF		<a href="#">gi 118722349</a>	RNA-binding protein 12B (RB12B_HUMAN)*	Processando o mRNA	6.34 / 5.44	118 / 100	116	22			

479	PAF		<a href="#">gi119614422</a>	parathyroid hormone-responsive B1 (PTHB1_HUMAN)*	Aumento de cálcio no meio extracelular	5.81 / 6.05	71 / 71	100	24			
518	PAF		<a href="#">gi114205472</a>	LONP2 protein (LONP2_HUMAN)*	Protease	6.03 / 5.75	66 / 68	119	31			
566	Q		<a href="#">gi63998898</a>	SPS1/STE20-related protein kinase YSK4 (YSK4_HUMAN) *	Ativação da MAPK	6.25 / 5.27	58 / 59	134	29			
603	Q		gi1408188	Desmin (DESM_HUMAN)	Filamento intermediário	5.21 / 5.70	53 / 60	238	60			
704	PAF		<a href="#">gi119577021</a>	cold shock domain containing E1, RNA-binding (CSDE1_HUMAN)*	Aumento da tradução	6.22 / 5.75	62 / 57	143	39			
772	↑PAF(10.00)		<a href="#">gi311203834</a>	septin-4 isoform 4 (SEPT4_HUMAN)*	Proteína filamentosa relacionada a preservação da mitocôndria	5.69 / 5.19	54 / 47	78	26			
803	PAF		<a href="#">gi4504165</a>	gelsolin isoform a precursor		5.90 / 5.27	86 / 52			233	R.VPFDAATLHTSTAMAAQ HGMDDDGTGQK.Q 2 Oxidation (M) K.EPAHLMSLFGGKPMIYK.	0.011 23

				(GELS_HUMAN)								G 2 Oxidation (M)	
												R.EGGQTAPASTR.L	0.033
												R.AVEVLPK.A	0.0083
												K.AGALNSNDAFVLK.T	8.3e-06
												K.TGAQELLR.V	6.9e-06
					Filamento intermediário que direciona o filamento da actina							K.MDAHPPR.L Oxidation (M)	0.08
												R.LFACSNK.I	4.6
												K.DSQEEEKTEALTSAK.R	7
												K.TEALTSAK.R	0.63
												R.YIETDPANR.D	0.44
												R.YIETDPANRDR.R	2.5
												R.RTPITVVK.Q	0.027
												R.TPITVVK.Q	0.00021
818	PAF		<a href="#">gil148728589</a>	mutant desmin (A5Z217_HUMAN)*	Filamento intermediário	5.21 / 5.17	53 / 52	101	26				
827	PAF		<a href="#">gil16741033</a>	Proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, ATPase, 1 (PRS4_HUMAN)	Ativação do proteassoma	5.92 / 5.23	49 / 51	106	36				
893	PAF		<a href="#">gil194386994</a>	unnamed protein (B4DMF1_HUMAN)*	Aumento de cálcio na meio extracelular	5.18 / 5.17	46 / 47	77	21				

904	Q		gi150039531	CACNB2 (A6PVM6_HUMAN)*	Canal de voltagem de cálcio	6.41 / 6.16	46 / 43	84	31				
970	PAF		<a href="#">gi193787214</a>	unnamed protein (B3KRK8_HUMAN)	Filamento intermediário que segura os grânulos	4.94 / 4.88	47 / 44	106	34				
1006	PAF		<a href="#">gi51242955</a>	STE20-related kinase adapter protein alpha isoform 1 (STRAA_HUMAN)	Ativação da MAPK	6.02 / 5.01	48 / 42	101	29				
1242	Q		<a href="#">gi169145172</a>	TRIO and F-actin binding protein (B1AHE1_HUMAN)*	Filamento intermediário relacionado a ativação da migração e difusão	5.67 / 6.21	28 / 30	116	51				
1319	Q		gi4757756	annexin A2 (ANXA2_HUMAN)*	Liga a vesicular secretória a membrana plasmática	5.41 / 7.57	28 / 38			74	R.DALNIETAIK.T K.SLYYYIQDQTK.G R.TNQELQEINR.V	0.013 0.11 0.021	
			gi179950	Catalase (CATA_HUMAN)	Enzima que quebra H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	5.41 / 7.83	28 / 51		66	150	R.LSQEDPDYGIR.D R.FNTANDDNVTQVR.A RLSQEDPDYGIR	0.042 0.0024	

1345	PAF		<a href="#">gi119627796</a>	tektin 2 (testicular) (TEKT2_HUMAN)*	Como filamento intermediário associado ao centróssomos	5.53 / 6.72	38 / 32	93	26			
1373	PAF		<a href="#">gi183351</a>	glycogen phosphorylase type IV (PYGL_HUMAN)	Enzima que catalisa a degradação de glicogênio	8.20 / 5.07	41 / 31		90	119	K.LITSVADVNNNDPMVGS K.L Oxidation (M) ADVNNNDPMVGSK K.VIFLENYR.V K.VFADYEAYVK.C K.VSQLYMNP.K.A Oxidation (M) K.AWNTMVLK.N Oxidation (M) K.ISLSNESNK.V	0.0084 0.0038 0.0005 0.0024 0.15 0.19
1413	PAF		<a href="#">gi6912328</a>	N(G),N(G)-dimethylarginine dimethylaminohydrolase 1 (DDAH1_HUMAN)*	Enzima que hidrolisa proteínas, que possui arginina metilada	5.53 / 6.72	31 / 29	86	29			
1470	Q		<a href="#">gi14210477</a>	interleukin 18 precursor (Q96KJ8_HUMAN)	Citocina pró-inflamatória	4.58 / 4.43	22 / 22	75	26			
1471	Q		<a href="#">gi5410334</a>	WSB-1	Ubiquitinação	6.03 / 5.95	22 / 25	84	22			

				(Q9Y656_HUMAN)*									
1489	Q		gi 35068	Nm23 protein (NDKA_HUMAN)	Modulação da resposta inflamatória	7.07 / 5.97	20 / 21			102	K.FMQASEDLLK.E R.GDFCIQVGR.N K.EHYVDLK.D R.VMLGETNPADSKPGTIR. G Oxidation (M) R.NIIHGSDSVESA EK.E	0.025 6.1e-05 59 1.3 1.1	
			gi 4757756	annexin A2 (ANXA2_HUMAN)	Liga vesicular secretória a membrana plasmática	7.57 / 5.97	38 / 21			68	R.DALNIETAIK.T R.QDIAFAYQR.R R.TNQELQEINR.V	0.1 0.082 0.016	
1490	Q		gi 223976	haptoglobin Hp2 (HP2_HUMAN)	Remove espécies reativas de oxigênio e íons ferros	6.23 / 6.07	42 / 20		80	100	419	R.TEGDGVYTLNDK.K R.TEGDGVYTLNNEK.Q KLPECEAVCGK	8.6e-07 0.00027
1527	PAF		<a href="#">gi 119631362</a>	NCK-associated protein 1 (NCKAP1_HUMAN)	Regula a polimerização da actina	5.06/ 7.18	43 / 25			77 80 80 53	241	LDIEIATYR NMQGLVEDFK DTSVVLPMDN KRTEMENEFVLIK	

1541	Q	<a href="#">gi223668</a>	interferon C term modified	Citocinas proinflamatórias	6.30 / 4.27	19 / 18	90	30			
1547	PAF	<a href="#">gi184226</a>	HLF2 (TRFL_HUMAN)	Atividade antimicrobiana	8.51 / 6.00	79 / 24			120	K.DSAIGFSR.V K.GEADAMSLDGGYVYTA GK.C Oxidation (M) R.YYGYTGAFR.C	0.0037 0.00023 0.085
1652	Q	<a href="#">gi55661618</a>	RIO kinase 1 (yeast) (Q5W0K5_HUMAN)*	Produção da pequena subunidade do ribossomo 18S	5.77 / 5.83	64 / 59	92	25			

<sup>a</sup>Parâmetro de Expressão: análise comparativa entre células quiescentes e estimulada por PAF:

Q: Exclusivo para neutrófilos quiescentes

PAF: Exclusivo para neutrófilos estimulados pelo PAF

↓PAF: Expressão diminuída na condição PAF

↑PAF: Expressão aumentada na condição PAF

<sup>b</sup>p-value: valor da significância na comparação entre os spots dos grupos, utilizando o programa SPSS. Campos sem valores representam ausência de uma das condições demonstrando *spots* exclusivos.

<sup>c</sup>Score: Search score : a partir da análise peptide mass fingerprint utilizando programa Mascot contra o NCBI banco de dados não redundante ; a partir de MS-BLAST que representa a soma de segmentos de pares de alto score de cada peptídeo.

<sup>d</sup>C (%): porcentagem da cobertura da sequência da proteína pelos peptídeos correspondentes.

<sup>e</sup>MS/MS score: Busca do score a partir da análise do espectro de fragmentação dos peptídeos utilizando o programa Mascot contra o NCBI banco de dados não redundantes.

<sup>f</sup>Peptídeos *e-value*: Valores de expectativa para buscas por MS/MS. Representa o número de acertos obtidos ao acaso com *score* melhor ou igual ao obtido na identificação. Para um *score* exatamente no limite de significância ( $p < 0,05$ ) o *e-value* também será 0,05. Se o *score* for aumentado em 10 unidades, o *e-value* diminuirá para 0,005, portanto quanto menor o *e-value*, mais significativo será o *score*.

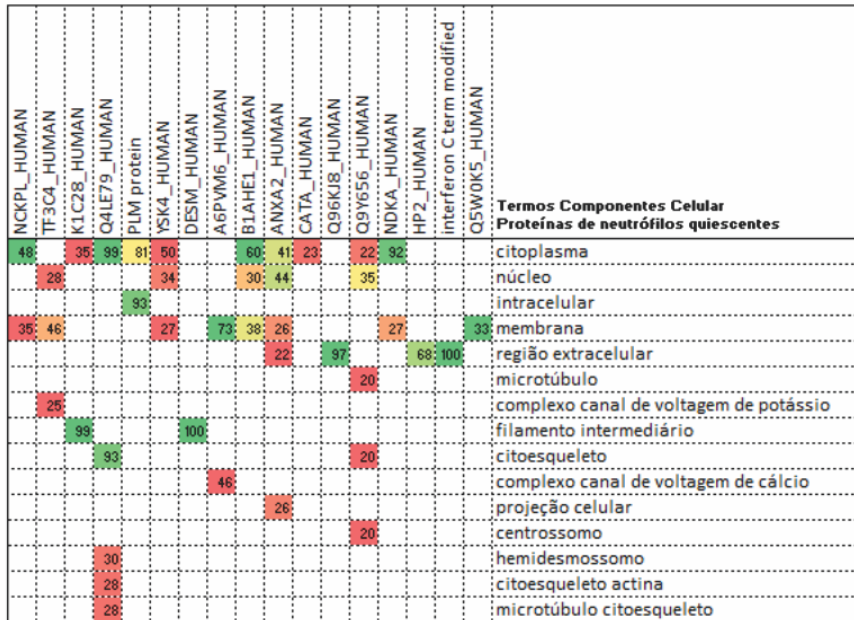
\* Proteínas descritas pela primeira vez em neutrófilos e associadas ao estímulo por PAF.



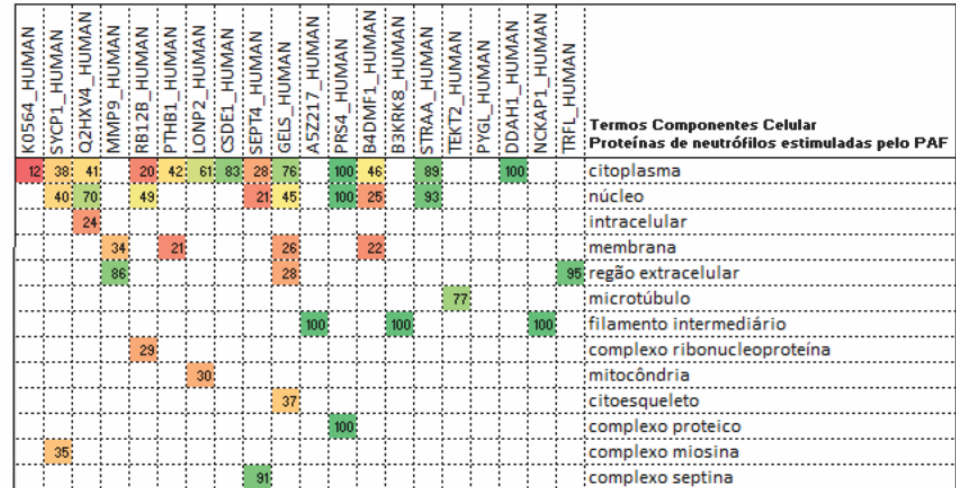
#### **4.4.2) Predição da função proteica entre neutrófilos quiescentes e PAF**

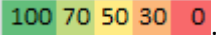
As identificações proteicas após a comparação entre neutrófilos quiescentes e estimulados pelo PAF demonstraram enriquecimento proteico com localização no citoplasma, membrana e núcleo, bem como um pequeno aumento para proteínas citoplasmáticas e nucleares quando estimuladas, figura 22.

**A**



**B**



**Figura 22:** Predição componente celular na comparação entre neutrófilos quiescentes e estimulados pelo PAF. (A) termos GO de proteínas mais abundantes nos neutrófilos quiescentes e (B) termos GO de proteínas mais abundantes nos neutrófilos estimulados por PAF. O mapa colorido ilustra a percentagem de confiabilidade atribuído pelo programa de ESG .

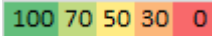
Na avaliação da função molecular observou-se que várias proteínas que ligam-se a nucleotídeos e a ATP, ou apresentam atividades de hidrolase e transferase quando os neutrófilos foram estimulados pelo PAF. Os neutrófilos quiescentes apresentam proteínas que ligam-se a outras proteínas e a metais, e atividades de transferase, figura 23.

A

Proteína	Termos Função Molecular Proteínas de neutrófilos quiescentes
NCKP1_HUMAN	
TF3C4_HUMAN	
KLC2B_HUMAN	
Q4LE79_HUMAN	
P1M protein	
YSK4_HUMAN	98
DIEM_HUMAN	98
A6PVM6_HUMAN	48: 28: 32
B1AH1L_HUMAN	
ANKA2_HUMAN	
CATA_HUMAN	
Q9R6J8_HUMAN	
Q9Y656_HUMAN	18: 20
NDKA_HUMAN	98
HP2_HUMAN	98
Interferon C term modified	
Q5W0K5_HUMAN	98
	liga a nucleotídeo
	liga a ATP
	liga a proteína
	liga a íons de zinco
	liga a íons de metais
	atividade de hidrolase
	atividades de quinase
	atividades de transferase
	atividades de quinase de proteínas serina/treonina
	atividade de peptidase
	atividade de ligase
	atividade catalítica
	liga a íons de cálcio
	atividade canal de voltagem de potássio
	iron ion binding
	structural molecule activity
	atividade endopeptidase tipo serina
	atividade de proteína quinase C
	liga a diacilglicerol
	liga a íons magnésio
	liga a actina
	atividade canal de cálcio
	atividade de catalase
	atividade de peroxidase
	atividade de oxidoreductase
	atividade citocinactokine activity
	liga a receptores de interleucina-1
	atividade quinase de nucleosídeo difosfato
	liga a fosfolípidos dependente de cálcio
	atividade inibitória da fosfolipase
	atividade inibitória da fosfolipase A2
	liga a hemoglobina
	hematopoietina/interferon-classe (D200-dominio) liga a receptor de citocina
	atividade hormonal
	atividade de fosfortransferase, grupo álcool como aceptor
	liga a ácido fólico
	atividade de tradução do fator de liberação

B

Proteína	Termos Função Molecular Proteínas de neutrófilos estimulados pelo PAF
K0564_HUMAN	
SYCP1L_HUMAN	
Q2HXV4_HUMAN	
MMP9_HUMAN	
RBL2B_HUMAN	98: 32
PTH1B1_HUMAN	38: 100
IONP2_HUMAN	
CSDEL_HUMAN	100
SEPT4_HUMAN	100
GELS_HUMAN	
ASZ217_HUMAN	
PRS4_HUMAN	100: 68
B4DMF1_HUMAN	100: 64
B3KRK8_HUMAN	30: 38
STRAA_HUMAN	
TEKT2_HUMAN	38
PYGL_HUMAN	
DDAHL1_HUMAN	
NCKP1L_HUMAN	
TRFL_HUMAN	
	liga a nucleotídeo
	liga a ATP
	liga a proteína
	liga a íons de zinco
	liga a íons de metais
	liga a DNA
	atividades de helicase
	atividade de hidrolase
	atividades de quinase
	atividades de transferase
	atividades de quinase de proteínas serina/treonina
	liga a calmodulina
	atividade de peptidase
	atividade de ligase
	liga a GTP
	atividade catalítica
	atividade de metaloendopeptidase
	liga a íons de cálcio
	liga a íons de ferro
	liga a ácido nucléicos
	atividade molecular estrutural
	liga a RNA
	atividade endopeptidase tipo serina
	liga a actina
	atividade de transferase, transferindo grupos glicosil
	atividade de fosforilase
	liga o fosfato piridoxal
	atividade de hidrolase, agindo na ligação carbono-nitrogênio (mas não peptídeo), em amidinas lineares
	atividade de deiminase arginina
	liga a íons de ferro férrico

**Figura 23:** Predição função molecular na comparação entre neutrófilos quiescentes e estimulados pelo PAF. (A) termos GO de proteínas mais abundantes nos neutrófilos quiescentes e (B) termos GO de proteínas mais abundantes nos neutrófilos estimulados por PAF. O mapa colorido ilustra a percentagem de confiabilidade atribuído pelo programa de ESG .

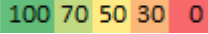
Os processos biológicos com maior número de proteínas participantes foram a transcrição e ciclo celular quando os neutrófilos estavam estimulados pelo PAF. Os neutrófilos quiescentes apresentaram maior número de proteínas com participação em fosforilação de aminoácidos, figura 24. Sabe-se que a transcrição em neutrófilos é ativada quando ocorre isquemia e reperfusão e um dos fatores liberados pelo endotélio é o PAF (Ichikawa, Flores *et al.*, 1997). Também há relatos que os monócitos estimulados pelo PAF ativam a expressão da IL-18 (Denault, April *et al.*, 1997). E em nossos estudos foi encontrada a IL-18 22kDa somente em neutrófilos quiescentes e a forma inativa possui 23 kDa, identificada como precursora. Estudos mostram que a forma ativa possui 18 kDa e é secretada. A liberação dessa proteína e a diferença de massa molecular são possíveis explicações para não se encontrar a proteína na sua forma ativa em neutrófilos estimulados e ativados (Volin e Koch). Além disso há relatos que a sinalização para a ativação de NF- $\kappa$ B pode ser enviada por PKC (Liu e Malik, 2006) e há relatos da ativação do NF- $\kappa$ B após estimulação celular pelo PAF (Baker, Schopfer *et al.*, 2009). Neste estudo foi identificada uma subunidade responsável pela ativação do proteassoma como proteína exclusiva do PAF e há evidências que a ubiquitinação e a degradação de proteínas mediadas pelo proteassoma 26S controla mecanismos da transcrição (Wojcik e Di Napoli, 2004; Yu, Simonson *et al.*, 2009).

A

NCKPL_HUMAN	IT3C4_HUMAN	KLC2B_HUMAN	Q4LEZ9_HUMAN	PUM protein	ISK4_HUMAN	DESM_HUMAN	AGPW66_HUMAN	BLAHEL_HUMAN	ANX2_HUMAN	CATA_HUMAN	Q96KJ8_HUMAN	Q9Y656_HUMAN	NDKA_HUMAN	HP2_HUMAN	interferon C term modified	OSW0K5_HUMAN	Termos Processos Biológico
																	Proteínas de neutrófilos quiescentes
					39				11			24			100		resposta de defesa
												24			58		proteína de fosforilação de aminoácidos
												20					regulação da transcrição dependente de DNA
																	ciclo celular
					74												ciclo ubiquitina
34																	tradução
	25														100		proteólise
		9															transporte de íons de potássio
							13										organização do citoesqueleto e biogênese
																	transporte
35																	cascata de sinalização intracelular
					43												transporte de íons de cálcio
																	resposta a estresses oxidativos
																	processo catabólico de peróxido de hidrogênio
																	transporte de eletrón
																	resposta imune
															33		processo de biosíntese de interferon-gama
																	regulação positiva da proliferação de células T ativadas
																	regulação de adesão celular
																	resposta imune tipo T-helper 1
																	indução da apoptose através receptores de domínio de morte
																	processo de biosíntese de GTP
																	processo de biosíntese de UTP
																	processo de biosíntese de CTP
																	Processo metabólico de nucleotídeo
																	ativação do complemento, via clássica
																	resposta imune inata
																	resposta a vírus
																	processo de biosíntese de lipopolissacarídeo
																	adesão celular
																	organização dos filamento intermediários do citoesqueleto e biogêneses
																	parada do ciclo celular
																	regulação da polimerização ou despolarização de microtúbulos

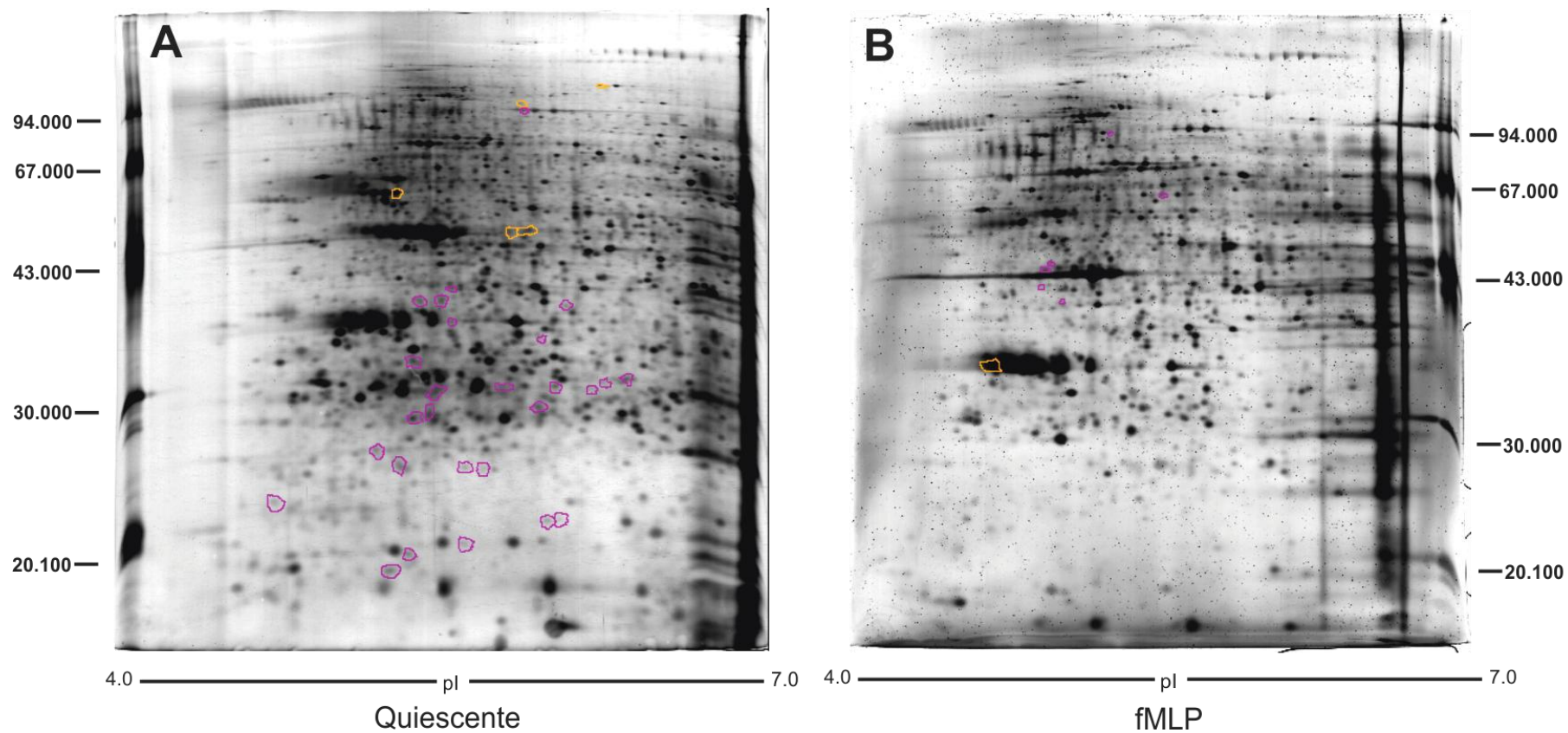
B

K0564_HUMAN	SYCP1_HUMAN	Q2HKV4_HUMAN	MMP9_HUMAN	RBI2B_HUMAN	PTH81_HUMAN	LONP2_HUMAN	CSDE1_HUMAN	SEPT4_HUMAN	GELS_HUMAN	ASZZ17_HUMAN	PRSA_HUMAN	BADMF1_HUMAN	B3KRK8_HUMAN	STRAA_HUMAN	TEKT2_HUMAN	PYGL_HUMAN	DDAHL1_HUMAN	NCKAP1_HUMAN	TRFL_HUMAN	Termos Processo Biológico	
																					Proteína de neutrófilos estimulada por PAF
51																					processo metabólico de proteína
41																					dobramento de proteína
41																					protein transport
37																					reparo de DNA
																					proteína fosforilação de aminoácidos
																					transcrição
																					regulação de transcrição dependente de DNA
																					ciclo celular
																					processo metabólico
																					organização do microtúbulo do citoesqueleto e biogêneses
																					tradução
																					proteólise
																					processo catabólico do colágeno
																					organização do citoesqueleto e biogênese
																					processo do mRNA
																					splicing do RNA
																					transporte
																					processo metabólico do carboidrato
																					proteólise dependente de ATP
																					processo metabólico de glicogênio
																					processo catabólico de proteínaprotein catabolic process
																					nivelamento dos filamentos de actina na porção final
																					processo catabólico de arginina
																					transporte de íon de ferro
																					adesão celular
21																					

**Figura 24:** Predição processo biológico na comparação entre neutrófilos quiescentes e estimulados pelo PAF. (A) termos GO de proteínas mais abundantes nos neutrófilos quiescentes e (B) termos GO de proteínas mais abundantes nos neutrófilos estimulados por PAF. O mapa colorido ilustra a percentagem de confiabilidade atribuído pelo programa de ESG .

#### **4.4.3) Comparação entre neutrófilos quiescentes e neutrófilos ativados por fMLP**

Nessa comparação foram observados 44 *spots* com abundância diferencial, sendo 41 identificações proteicas. Dentre os 44 *spots* foram considerados 2 *spots* com abundância aumentada para a condição ativada por fMLP, 5 *spots* com abundância diminuída para fMLP, 31 *spots* considerados exclusivos da condição quiescente e 6 exclusivos da condição ativada por fMLP. Das 41 proteínas identificadas 1 apresentou abundância aumentada na condição ativada por fMLP, 4 diminuída, 30 exclusivas de quiescente e 6 exclusivas de fMLP, como detalhado na figura 25 e tabela 9.



**Figura 25:** Géis bidimensionais na faixa de ácida (4-7) de neutrófilos totais. A – Gel de neutrófilos quiescente: em rosa, *spots* exclusivos de neutrófilos quiescentes e em laranja, *spots* aumentados para neutrófilos quiescentes. B – Gel de neutrófilos ativados pelo fMLP: em rosa, *spots* exclusivos de neutrófilos ativados pelo fMLP e em laranja, *spot* aumentado para neutrófilos ativado.



Tabela 9 – Identificação proteica de neutrófilos por MALDI-TOF-TOF peptide mass fingerprinting and MS/MS fragmentação por orbitrap.

Spot	Parâmetro de Expressão <sup>a</sup>	p-value <sup>b</sup>	Número de acesso	Nome e Símbolo (UniPROT)	Atividades	pI (teor/exp)	Mr (teor/exp) (kDa)	Score <sup>c</sup>	C(%) <sup>d</sup>	MS/MS Score <sup>e</sup>	MS/MS peptídeos	Peptídeos e-value <sup>f</sup>
125	↓fMLP (5.78)	0.017	gi 23573413	CADPS2 (CAPS2_HUMAN)	Regulação positiva da excitose	5.80/6.19	144/117	124	24			
192	↓fMLP (5.79)	0.038	<a href="#">gi 156119605</a>	general transcription factor 3C polypeptide 4 (TF3C4_HUMAN)	Componete do promotor de iniciação da RNA polimerase III.	6.21/5.77	93/98	123	30			
223	Q		gi 15082342	Molybdenum cofactor sulfurase (MOCOS_HUMAN)	Biosíntese do cofactor molibdênio	6.27/5.78	99/97	68	18			
443	fMLP		gi 46411195	PIG48 (Q2TU64_HUMAN)	Envolvida no dobramento de proteínas	5.98/5.67	61/63	154	43			
582	↓fMLP (7.22)	0.008	gi 55977474	Tubulin alpha-1B chain (TBA1B_HUMAN)	Constitue microtúbulos	4.94/6.52	50	190	58			
			gi 55977476	Tubulin alpha-4A chain (TBA4A_HUMAN)	Constitue microtúbulos	4.95/6.52	50	177	56			
			gi 55977864	Tubulin alpha-1A chain (TBA1A_HUMAN)	Constitue microtúbulos	4.94/6.52	50	164	54	325	R.AVFVDLEPTVIDEVR.T R.IHFPLATYAPVISAEEK.A K.VGINYQPPTVVPGGDLA K.V R.QLFHPEQLITGKEDAANN YAR.G	9.3e-08 3.7e-10 0.0013 3.9e-08
669	fMLP		gi 51095026	Rap guanine nucleotide exchange factor (GEF) <sub>5</sub> (RPGF5_HUMAN)	Regulação da pequena GTPase mediada pela	6.48/6.55	52/53	108	34			

					transdução de sinal							
685	fMLP		gi 340219	vimentin (VIME_HUMAN)	Filamento intermediário	5.03/5.95	53/42			121	K.VELQELNDR.F R.FLEQQNK.I K.ILLAELEQLK.G R.QDVDNASLAR.L K.MALDIEIATYR.K Oxidation (M)	0.7 0.95 9 0.0028 0.013
747	↓fMLP (11.57)	0.036	gi 19908424	mutant desmin (DESM_HUMAN)	Filamento intermediário	5.21/5.80	53/49	71	31			
752	↓fMLP (4.09)	0.023	gi 21595082	RCOR3 protein (RCOR3_HUMAN)	Regulação da transcrição	6.25/5.70	48/48	103	21			
968	Q		gi 14424674	CDC42 effector protein (Rho GTPase binding) 1 (BORG5_HUMAN)	Tradução de sinal da proteína Rho	5.38/6.64	39/40	90	30			
991	Q		gi 302144416	MHC class I antigen (D9UB11_HUMAN)	Imunidade	5.93/5.33	42/38	92	43			
994	Q		gi 119623792	major histocompatibility complex, class I, B	Imunidade	5.36/5.20	36/36	68	45			
1012	Q		gi 294660772	alkaline phosphatase, tissue-nonspecific isozyme (PPBT_HUMAN)	biomineralização	6.12/6.01	49/38	91	18			
1067	Q		gi 193787214	unnamed protein product (B3KRK8_HUMAN)	Filamento intermediário	4.94/5.38	47/36	131	42			
1118	Q		gi 118138239	Chain A, Crystal Structure Of Human Protein Tyrosine Phosphatase N4 (Ptpn4)	Cataliza a desfosforilação de peptídeos fosfotirosina	5.55/5.97	37/33	72	20			
1183	Q		gi 111052659	glucose-6-phosphate dehydrogenase (QOPHS1_HUMAN)	Metabolismo de carboidrato	5.62/5.18	34/32	91	51			
1231	Q		gi 29029552	adenosine deaminase CECR1 (CECR1_HUMAN)	Catabolismo de adenosina	6.05/6.33	30/31	87	39			
1242	Q		gi 169145172	TRIO and F-actin binding protein (B1AHE1_HUMAN)	Filamento	5.67/6.21	28/30	116	51			

					intermediário relacionado a ativação da migração e difusão							
1254	Q		gi 193787567	unnamed protein product (B3KSL1_HUMAN)	Liga-se a íons de zinco	6.38/5.95	36/30	67	37			
1255	Q		gi 20809940	SYT9 protein (Q8NCP8_HUMAN)	Transportador	6.51/5.66	36/30	115	42			
1256	Q		gi 206557837	RecName: Full=Putative basic leucine zipper and W2 domain-containing protein 1-like 1 (BZW1L_HUMAN)		5.64/6.14	31/30	112	36			
1260	Q		gi 90108664	Chain A, Crystal Structure Of Lipid-Free Human Apolipoprotein A-I		5.27/5.30	28/30	73	37			
1310	Q		gi 119587063	growth arrest-specific 8 (G3V1L5_HUMAN)	Controle de movimento celular	6.56/5.86	53/29	72	21			
1330	Q		gi 119578110	N-ethylmaleimide-sensitive fator (D3DXJ4_HUMAN)	Regulação da excitose	5.65/5.26	31/28	77	37			
1344	Q		gi 119624521	trinucleotide repeat containing 5		5.16/5.18	34/28	71	16			
1358	Q		gi 6912540	cytosolic Fe-S cluster assembly factor NUBP2 (NUBP2_HUMAN)	Organiza microtúbulos	5.55/5.36	29/27	98	39			
1372	fMLP		gi 6650622	Dimethylglycine dehydrogenase, mitochondrial; AltName: Full=ME2GLYDH; Flags: Precursor (M2GD_HUMAN)	Catabolismo de glicina	7.31/5.35	97/91	73	18			
1405	Q		gi 15290517	truncated cardiac troponin T (TNNT2_HUMAN)	Catabolismo de ATP	4.93/4.98	32/25	77	30			
1430	Q		gi 551547	prosome beta-subunit (PSB4_HUMAN)	Resposta a danos do DNA	5.70/5.10	25/24	71	19			
1436	Q		gi 123279700	dimethylarginine dimethylaminohydrolase 2 (Q5SSV3_HUMAN)	Metabolismo da arginina	5.46/5.54	23/23	94	41			

1438	Q		gi 73961087	PREDICTED: similar to tropomyosin 3 isoform 2 isoform 13 (Q5VU61_HUMAN)	Complexo associado a citoesqueleto e actina	4.81/5.55	26/24	85	43			
1470	Q		gi 14210477	interleukin 18 precursor (Q96KJ8_HUMAN)	Citocina proinflamatória	4.58/4.43	22 / 22	75	26			
1489	Q		gi 35068	Nm23 protein (NDKA_HUMAN)	Modulação da resposta inflamatória	7.07/5.97	20 / 21			102	K.FMQASEDLLK.E R.GDFCIQVGR.N K.EHYVDLK.D R.VMLGETNPADSKPGTIR. G Oxidation (M) R.NIIHGSDSVESAEK.E	0.025 6.1e-05 59 1.3 1.1
			gi 4757756	annexin A2 (ANXA2_HUMAN)	Liga vesicular secretória a membrana plasmática	7.57/5.97	38 / 21			68	R.DALNIETAIK.T R.QDIAFAYQR.R R.TNQELQEINR.V	0.1 0.082 0.016
1490	Q		gi 223976	haptoglobin Hp2 (HP2_HUMAN)	Remove espécies reativas de oxigênio e íons ferros	6.23/6.07	42 / 20	80	100	419	R.TEGDGVYTLNDK.K R.TEGDGVYTLNNEK.Q KLPECEAVCGK	8.6e-07 0.00027
1512	Q		gi 20452470	neuropilin and toll-like protein 1 isoform 1 precursor (NETO1_HUMAN)	Memoria	5.46/5.95	20/17	93	57			
1520	Q		gi 50927456	RAB6B protein (Q6AZ91_HUMAN)	Transporte de proteínas	5.41/5.15	23/19	72	37			
1537	Q		gi 194382120	unnamed protein product (B4DJF3_HUMAN)	Metabolismo de N-acetilglucosamina	5.63/5.05	23/18	78	35			
1587	fMLP		gi 6912280	activator of 90 kDa heat shock protein ATPase homolog 1	Resposta a estresse	5.41/4.93	38/39	80	31			

				(AHS1_HUMAN)								
1595	fMLP		gij62898077	tropomyosin 2 (beta) isoform 2 variant (TPM2_HUMAN)	Regulação da atividade de ATPase	4.63/5.06	33/36	127	49			
1707	↑fMLP (7.01)	0.000	gij51105863	indolethylamine N-methyltransferase		5.15/4.78	29/36	81	32			

<sup>a</sup> Parâmetro de Expressão: análise comparativa entre células quiescentes e ativada por fMLP:

Q: Exclusivo para neutrófilos quiescentes

fMLP: Exclusivo para neutrófilos estimulados pelo fMLP

↓fMLP: Expressão diminuída na condição fMLP

↑fMLP: Expressão aumentada na condição fMLP

<sup>b</sup>p-value: valor da significância na comparação entre os spots dos grupos, utilizando o programa SPSS. Campos sem valores representam ausência de uma das condições demonstrando *spots* exclusivos.

<sup>c</sup>Score: Search score : a partir da análise peptide mass fingerprint utilizando programa Mascot contra o NCBI banco de dados não redundante ; a partir de MS-BLAST que representa a soma de segmentos de pares de alto score de cada peptídeo.

<sup>d</sup>C (%): porcentagem da cobertura da sequência da proteína pelos peptídeos correspondentes.

<sup>e</sup>MS/MS score: Busca do score a partir da análise do espectro de fragmentação dos peptídeos utilizando o programa Mascot contra o NCBI banco de dados não redundantes.

<sup>f</sup>Peptídeos *e-value*: Valores de expectativa para buscas por MS/MS. Representa o número de acertos obtidos ao acaso com *score* melhor ou igual ao obtido na identificação. Para um *score* exatamente no limite de significância ( $p < 0,05$ ) o *e-value* também será 0,05. Se o *score* for aumentado em 10 unidades, o *e-value* diminuirá para 0,005, portanto quanto menor o *e-value*, mais significativo será o *score*.

#### **4.4.4) Predição da função proteica entre neutrófilos quiescentes e fMLP**

Na comparação entre neutrófilos quiescentes e ativados pelo fMLP, as proteínas identificadas em sua maioria com abundância aumentada ou exclusivas para neutrófilos quiescentes se mostrou em abundância no citoplasma, membrana e núcleo e para neutrófilos ativados localizada no citoplasma, figura 26.

**A**

CAPS2_HUMAN	TF3C4_HUMAN	IMCOS_HUMAN	DESM_HUMAN	RCOR3_HUMAN	BORG5_HUMAN	D9UB11_HUMAN	MHC 1	PPBT_HUMAN	B3KRK8_HUMAN	Ptpn4	Q0PHS1_HUMAN	CECR1_HUMAN	B1AHE1_HUMAN	B3KSL1_HUMAN	Q8NCP8_HUMAN	BZW11_HUMAN	Apolipoprotein A-1	G3VL15_HUMAN	D3DXJ4_HUMAN	trinucleotide	NUBP2_HUMAN	TNNT2_HUMAN	PSB4_HUMAN	Q5SSV3_HUMAN	Q5VUJ61_HUMAN	Q96KJ8_HUMAN	NDKA_HUMAN	ANKA2_HUMAN	HP2_HUMAN	NETO1_HUMAN	O6AZ91_HUMAN	B4DJF3_HUMAN	Termos Componente Celular Proteínas de neutrófilos quiescentes			
68				57					21	19	18	60	37		16		91	64		66		100	100	43		92	41				6	citoplasma				
				49														33						42								citoesqueleto				
63	46			55	99	100	60	83				38	70	99												27	26	44	44	81		membrana				
	28			100	20								30						50	71		37										núcleo				
																		27															microtúbulo			
41														91																			sinapse			
41														91																			junção celular			
																																		aparato de golgi		
													55																					endossomo		
																	99		86						97	22	68	46						região extracelular		
																	28																	projeção celular		
																		25					100												complexo central do proteossoma	
																																			complexo proteico	
																					17														complexo troponina	
																		50																	complexo de miosina	
																		26																	flagelo	
																		26																		cílios
																	44																			quilomicrom
														97																						vesícula sináptica
														89																						vesícula citoplasmática
		100						100																												filamento intermediário
					99	100																														complexo proteico MHC de classe I
26																																				complexo canal de voltagem de potássio

**B**

Q2TU64_HUMAN	RP6F5_HUMAN	VIME_HUMAN	M2GD_HUMAN	AHSA1_HUMAN	TPM2_HUMAN	indolethylamine	Termos Componentes Celular Proteínas de neutrófilos ativadas pelo fMLP
100	52	39	39	45	53		citoplasma
				43			citoesqueleto
	50						membrana
	24		29				retículo endoplasmático
	99						intracelular
	98						filamento intermediário

**Figura 26:** Predição componente celular na comparação entre neutrófilos quiescentes e ativado pelo fMLP. (A) termos GO de proteínas mais abundantes nos neutrófilos quiescentes e (B) termos GO de proteínas mais abundantes nos neutrófilos ativados por fMLP. O mapa colorido ilustra a percentagem de confiabilidade atribuído pelo programa de ESG **100 70 50 30 0**.



A função molecular mais abundante tanto em neutrófilos quiescentes como em neutrófilos ativados foi a de proteínas que se ligam a outras proteínas e em segundo lugar em neutrófilos quiescentes apresentaram-se proteínas que se ligam a metais, figura 27.

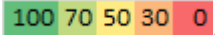
A

Gene	CAFS2_HUMAN	TF3CL_HUMAN	MCCOS_HUMAN	DESM_HUMAN	RCOR3_HUMAN	BORG5_HUMAN	D9UB11_HUMAN	NHC1	PPBT_HUMAN	BKRYK8_HUMAN	Ppp4	GOPH5_HUMAN	CECR1_HUMAN	BLAHEL_HUMAN	B3KSL1_HUMAN	Q8NCP8_HUMAN	BZWL1_HUMAN	Apolipoprotein A-I	G3YL15_HUMAN	D3DX4_HUMAN	trnucleotide	NUBP2_HUMAN	TNMT2_HUMAN	PSB4_HUMAN	O5SSV3_HUMAN	O5VU61_HUMAN	Q96K8_HUMAN	NDKA_HUMAN	ANKA2_HUMAN	HP2_HUMAN	NETO1_HUMAN	Q6AZ91_HUMAN	B4DF3_HUMAN	Termos Função Molecular		
									85			98						49																liga a actina		
									99																									atividade de hidrolase		
																																		atividade de deiminase arginina		
49					21				85																									liga a ions de zinco		
49	22				21				99																									liga a ions de metal		
									99																										atividade catalitica	
																																			liga a proteínas	
																																			liga a nucleotideos	
																																			atividade de transferase	
																																			atividade motor	
																																			liga ions magnésio	
																																			liga a DNA	
																																			liga a ions cálcio	
																																			atividade de deaminase glucosamina-6-fosfato	
																																			liga GTP	
																																				atividade de peptidase
																																				atividade de metaloprotease
																																				atividade estacina
																																				atividade de receptor
																																				atividade de citocina
																																				atividade de endopeptidase tipo serina
																																				liga a hemoglobina
																																				atividade de complemento C1s
																																				liga a calmodulina
																																				liga ao receptor de interleucina-1
																																				atividade de endopeptidase treonina
																																				liga a ATP
																																				atividade nucleosideo-trifosfatase
																																				liga lipideo
																																				liga
																																				liga diacilglicerol
																																				atividade de transporte de lipideo
																																				liga a heparina
																																				liga beta-amiloide
																																				tradução atividade do fator de iniciação
																																				atividade de transporte
																																				atividade da proteína tirosina fosfatase
																																				atividade de hidrolase fosfórico monoester
																																				atividade de fosfoproteína fosfatase
																																				atividade deaminase
																																				atividade de deaminase adenosina
																																				atividade de dehidrogenase glucose-6-fosfato
																																				atividade oxidoredutase
																																				receptor transmembrana atividade de proteína tirosina fosfatase
																																				atividade molecula estrutural
																																				atividade fosfatase alcalina
																																				atividade de receptor MHC classe I
																																				liga fosfato pirodoxal
																																				atividade de desulfurase cisteina
																																				exocitose
																																				atividade canal de voltagem de potássio
																																				liga fosfolipideo dependente de cálcio
																																				atividade inibitória da fosfolipase
																																				atividade quinase
																																				atividade quinase de nucleosideo difosfato

B

Gene	Q2TU64_HUMAN	RPC65_HUMAN	VIME_HUMAN	M2G0_HUMAN	AHSAL_HUMAN	TPM2_HUMAN	indolitylamine	Termos Função Molecular
								liga a actina
							45	liga a actina
							39	liga a ions zinco
							39	liga a ions metal
							100	liga a proteína
							100	liga a nucleotideo
							99	atividade de transferase
							49	liga a ions cálcio
							97	atividade metiltransferase
							35	atividade feniletanolamino N-metiltransferase
							29	atividade amino N-metiltransferase
							22	atividade nicotinamida N-metiltransferase
							98	atividade de ativador ATPase

**Figura 27:** Predição função molecular na comparação entre neutrófilos quiescentes e ativado pelo fMLP.

(A) termos GO de proteínas mais abundantes nos neutrófilos quiescentes e (B) termos GO de proteínas mais abundantes nos neutrófilos ativado pelo fMLP. O mapa colorido ilustra a percentagem de confiabilidade atribuído pelo programa de ESG .

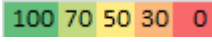
Os processos biológicos mais representados em neutrófilos quiescentes foram transporte, proteólise e resposta imune, em neutrófilos ativados pelo fMLP foi o dobramento de proteínas, figura 28. Os intermediários que atuam no dobramento de proteínas são fundamentais para realização de enovelamento correto das proteínas e assim formam domínios, facilitando as modificações pós-traducionais (Tsytlonok e Itzhaki). Uma das proteínas importantes que sofrem alterações no dobramento é a tubulina (Szymanski, 2002), constituintes dos microtúbulos. Os microtúbulos, após o estímulo celular se movimentam conduzindo os grânulos para a membrana, em favor da degranulação (Verhey e Gaertig, 2007).

A

Gene	Termos Processo Biológico
CAPS2_HUMAN	regulação da contração do músculo
TF3C4_HUMAN	processo catabólico de arginina
MOCOS_HUMAN	regulação da forma celular
DESM_HUMAN	transcrição
RCOR3_HUMAN	regulação da transcrição dependente de DNA
BORG5_HUMAN	transporte
D9UB11_HUMAN	processo metabólico do carboidrato
MHC1	processo metabólico da N-acetilglucosamina
PPBT_HUMAN	tradução de sinal mediada pela pequena GTPase
B3KRK8_HUMAN	transporte de proteína
Pipin4	transporte mediada por vesícula
QDPHS1_HUMAN	transporte de proteína intracelular
GERL1_HUMAN	desenvolvimento multicelular do organismo
BLAHE1_HUMAN	diferenciação celular
B3KSL1_HUMAN	proteólise
CBMCP8_HUMAN	adesão celular
BZWIL_HUMAN	angiogênese
Apolipoprotein A-1	processo metabólico de lipídeo
G3VL15_HUMAN	processo metabólico de esteroides
D3DX14_HUMAN	processo metabólico do colesterol
trinucleotide	regulação negativa da transdução de sinal
NURP2_HUMAN	resposta imune
TNNT2_HUMAN	ativação do complemento, via clássica
PSBA_HUMAN	processo de biosíntese interferon-gama
O5SSV3_HUMAN	regulação positiva da proliferação de células T ativas
Q5VUG1_HUMAN	regulação de adesão celular
Q96K18_HUMAN	resposta imune tipo T-helper 1
NDKA_HUMAN	indução da apoptose através receptor de domínio de morte
ANKA2_HUMAN	repouso
HP2_HUMAN	processo catabólico de proteínas dependente de ubiquitina
NETO1_HUMAN	transdução de sinal
Q6AZ91_HUMAN	processo catabólico de glicina
B4DJF3_HUMAN	montagem do cluster ferro-enxofre
	processo catabólico de proteína
	ciclo celular
	contração do músculo estriado
	desfosforilação de proteínas aminoácidos
	organização do citoesqueleto e biogêneses
	transporte de lipídios/lipid transport
	processo metabólico de lipoproteínas
	efluxo de colesterol
	regulação da iniciação da translocação
	tradução
	desfosforilação
	processo metabólico de nucleotídeo
	processo de biosíntese de purinas ribonucleosídeo monofosfato
	processo metabólico de glicose
	receptor transmembrana proteína tirosina fosfatase via sinalização
	processo metabólico
	transporte de fluido epitelial
	processamento de antígeno e apresentação de peptídeo antigénico via MHC de classe I
	transporte de íons potássio
	processo metabólico de cisteínas
	processo de biosíntese GTP
	processo de biosíntese UTP
	processo de biosíntese CTP

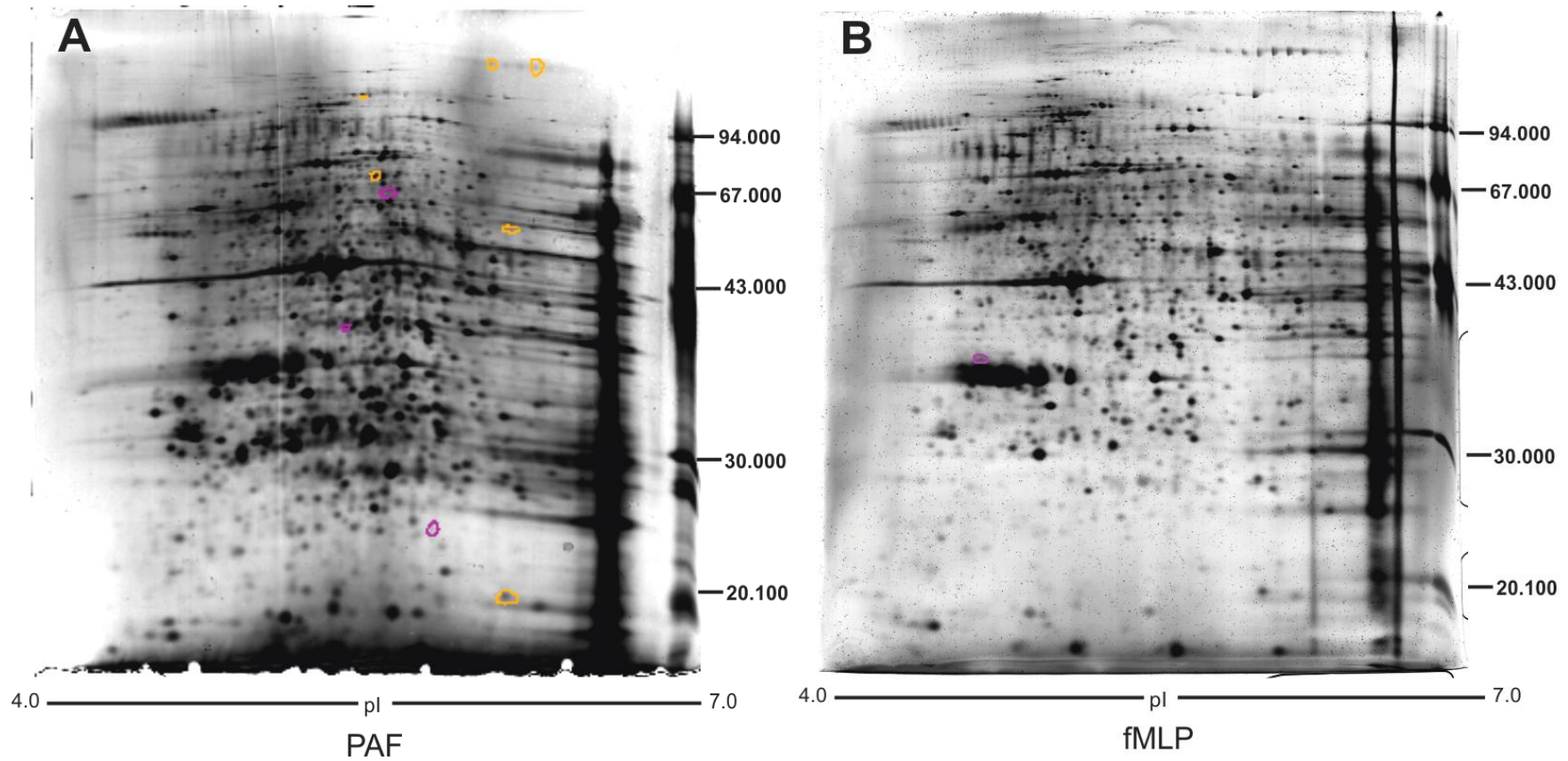
**B**

Q2TUG4_HUMAN	RPGF5_HUMAN	VIME_HUMAN	M2GD_HUMAN	AHSA1_HUMAN	TPM2_HUMAN	Indolethylamine	
					7		regulação da contração do músculo
					35		processo de biosíntese de catecolamina
			89				resposta de estresse
100			54				dobramento de proteína
	11						processo biológico
99							transdução de sinal mediada por pequena GTPase
	24						diferenciação celular
	52						cascata de sinalização intracelular
	24						regulação da transdução de sinal da proteína Rho
100							redobramento da proteína
100							processo metabólico celular de proteína

**Figura 28:** Predição processo biológico na comparação entre neutrófilos quiescentes e ativados pelo fMLP. (A) termos GO de proteínas mais abundantes nos neutrófilos quiescentes e (B) termos GO de proteínas mais abundantes nos neutrófilos ativados pelo fMLP. O mapa colorido ilustra a percentagem de confiabilidade atribuído pelo programa de ESG .

#### 4.4.5) Comparação entre neutrófilos estimulados pelo PAF e neutrófilos ativados por fMLP

Nessa comparação foram observados 71 *spots* com abundância diferencial, sendo 10 identificações proteicas. Dentre os 71 *spots* foram considerados 17 *spots* com abundância aumentada para a condição ativada por fMLP, 34 *spots* com abundância diminuída para fMLP, 15 *spots* considerados exclusivos da condição estimulada por PAF e 5 exclusivos da condição ativada por fMLP. Das 10 proteínas identificadas 6 apresentaram abundância diminuída na condição ativada por fMLP, 3 exclusivas da condição estimulada por PAF e 1 exclusiva de fMLP, figura 29 e tabela 10.



**Figura 29:** Géis bidimensionais na faixa de ácida (4-7) de neutrófilos totais. A – Gel de neutrófilos estimulados pelo PAF: em rosa, *spots* exclusivos de neutrófilos estimulados pelo PAF e em laranja, *spots* aumentados para neutrófilos estimulados pelo PAF. B – Gel de neutrófilos ativados pelo fMLP: em rosa, *spots* exclusivos de neutrófilos ativados pelo fMLP e em laranja, *spot* aumentado para neutrófilos ativado.

Tabela 10 – Identificação proteica de neutrófilos por MALDI-TOF-TOF peptide mass fingerprinting and MS/MS fragmentação por orbitrap.

<i>Spot</i>	Parâmetro de Expressão <sup>d</sup>	p-value <sup>b</sup>	Número de acesso	Nome e Símbolo (UniPROT)	Atividades	pI (teor/exp)	Mr (teor/exp) (kDa)	Score <sup>c</sup>	C(%) <sub>d</sub>	MS/MS Score <sup>e</sup>	MS/MS peptídeos	Peptídeos e-value <sup>f</sup>
70	↑PAF(4.38)	0.024	<a href="#">gi10047341</a>	KIAA1632 protein (EPG5_HUMAN)	Adesão celular	6.10/6.30	166/152	82	16			
73	↑PAF(4.76)	0.008	<a href="#">gi1212983</a>	polypeptide of 976 aa (SYCP1_HUMAN)	Desfosforilação de resíduos de serina da RNA polimerase II	5.85 / 6.38	114 / 151	75	21			
147	↑PAF(4.10)	0.001	<a href="#">gi86143432</a>	RACK7 isoform i (Q2HXV4_HUMAN)	Ativa a proteína Cinase C	5.93 / 5.45	122 / 112	126	24			
434	↑PAF(7.29)	0.001	<a href="#">gi13603887</a>	ring finger protein 17 long isoform (RNF17_HUMAN)	Diferenciação	5.83/5.52	75/67	77	24			
518	PAF		<a href="#">gi114205472</a>	LONP2 protein (LONP2_HUMAN)	Protease	6.03 / 5.75	66 / 68	119	31			
595	↑PAF(4.32)	0.040	<a href="#">gi153082755</a>	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 2 (IFIT2_HUMAN)	Resposta celular ao interferon alfa	6.32/6.59	55/58	82	23			

968	PAF		<a href="#">gi14424674</a>	CDC42 effector protein (Rho GTPase binding) 1  (BORG5_HUMAN)	Tradução de sinal da proteína Rho	5.38/6.00	39/40	90	30			
1035	fMLP		gi113960	Annexin A5 (ANXA5_HUMAN)	Processo anti- apoptose	4.94/4.71	36/29	219	54	120	R.GTVTDFPGFDER.A K.GLGTDEESILLLTSR.S	0.12 1.9e-07
1501	↑PAF(8.81)	0.000	<a href="#">gi208022703</a>	modulator of retrovirus infection  (MRI_HUMAN)		5,16/6.50	17/20	90	49			
1547	PAF		<a href="#">gi184226</a>	HLF2 (TRFL_HUMAN)	Atividade antimicrobiana	8.51 / 6.00	79 / 24			120	K.DSAIGFSR.V K.GEADAMSLDGGYVYTA GK.C Oxidation (M) R.YYGYTGAFR.C	0.0037 0.00023 0.085

<sup>a</sup>Parâmetro de Expressão: análise comparativa entre células estimulada por PAF e ativada por fMLP:

PAF: Exclusivo para neutrófilos estimulada por PAF

fMLP: Exclusivo para neutrófilos estimulados pelo fMLP

↓ PAF: Expressão diminuída na condição PAF

↑ PAF: Expressão aumentada na condição PAF



<sup>b</sup>p-value: valor da significância na comparação entre os spots dos grupos, utilizando o programa SPSS. Campos sem valores representam ausência de uma das condições demonstrando *spots* exclusivos.

<sup>c</sup>Score: Search score : a partir da análise peptide mass fingerprint utilizando programa Mascot contra o NCBI banco de dados não redundante ; a partir de MS-BLAST que representa a soma de segmentos de pares de alto score de cada peptídeo.

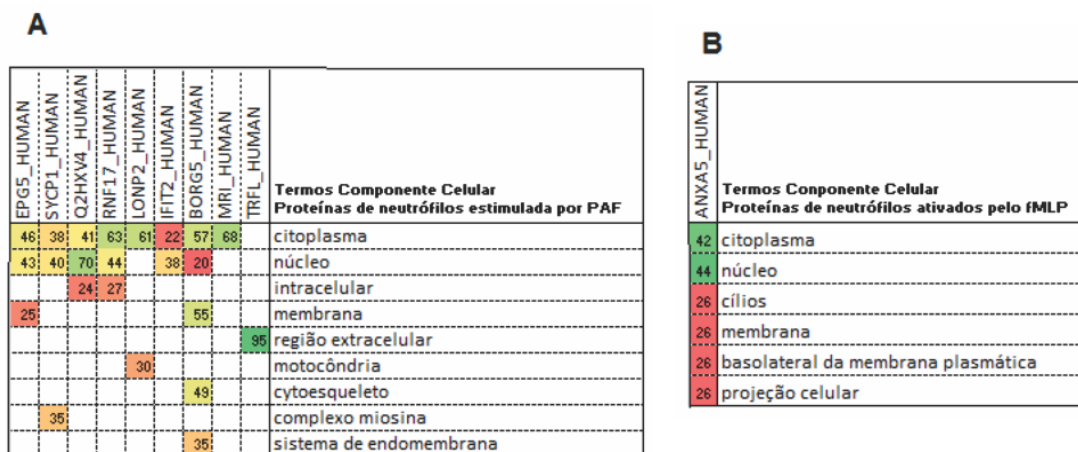
<sup>d</sup>C (%): porcentagem da cobertura da sequência da proteína pelos peptídeos correspondentes.

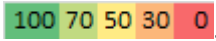
<sup>e</sup>MS/MS score: Busca do score a partir da análise do espectro de fragmentação dos peptídeos utilizando o programa Mascot contra o NCBI banco de dados não redundantes.

<sup>f</sup>Peptídeos *e-value*: Valores de expectativa para buscas por MS/MS. Representa o número de acertos obtidos ao acaso com *score* melhor ou igual ao obtido na identificação. Para um *score* exatamente no limite de significância ( $p < 0,05$ ) o *e-value* também será 0,05. Se o score for aumentado em 10 unidades, o *e-value* diminuirá para 0,005, portanto quanto menor o *e-value*, mais significativo será o score.

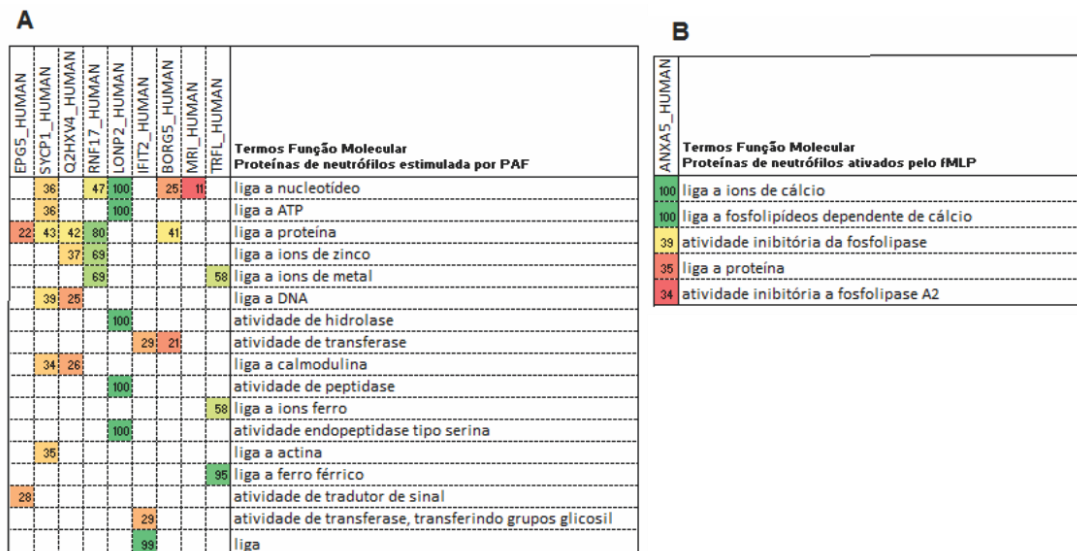
#### 4.4.6) Predição da função proteica entre neutrófilos quiescentes e fMLP

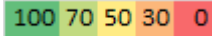
As proteínas que foram identificadas resultado da comparação entre neutrófilos estimulados pelo PAF e ativados pelo fMLP também foram avaliadas utilizando o programa ESG. O componente celular mais predito foi o citoplasma e núcleo, figura 30.



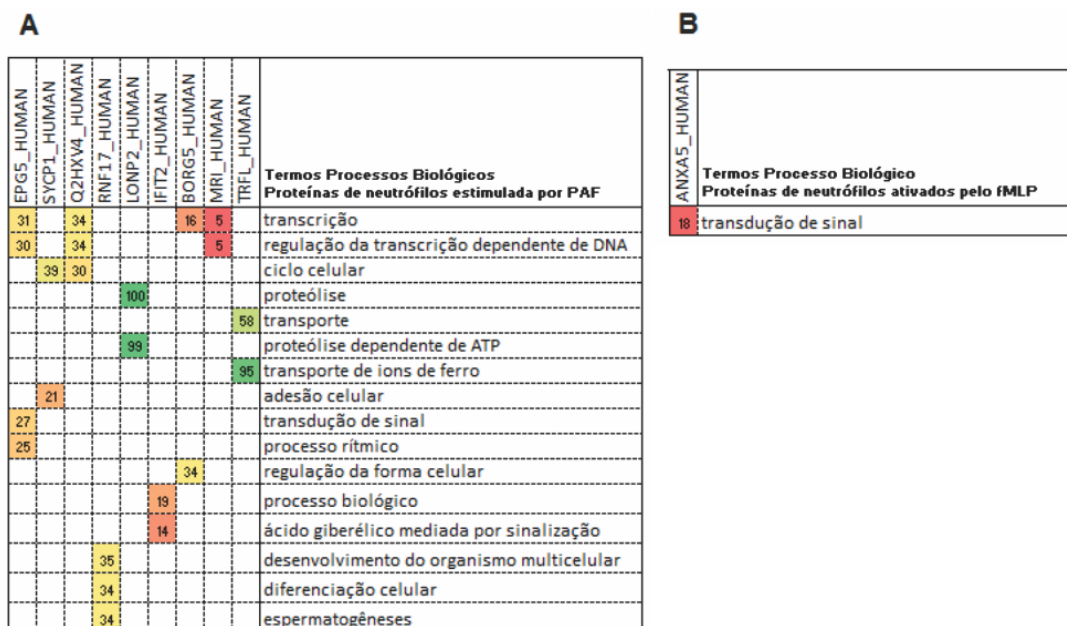
**Figura 30:** Predição componente celular na comparação entre neutrófilos estimulados pelo PAF e ativado pelo fMLP. (A) termos GO de proteínas mais abundantes nos neutrófilos estimulados pelo PAF e (B) termos GO de proteínas mais abundantes nos neutrófilos ativados por fMLP. O mapa colorido ilustra a percentagem de confiabilidade atribuído pelo programa de ESG .

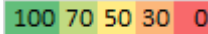
As proteínas que apresentaram maior abundância em neutrófilos estimulados pelo PAF quando comparados com neutrófilos ativados pelo fMLP tiveram em sua maioria preditas a função molecular de ligação a outras proteínas e nucleotídeos, figura 31.



**Figura 31:** Predição função molecular na comparação entre neutrófilos estimulado pelo PAF e ativado pelo fMLP. (A) termos GO de proteínas mais abundantes nos neutrófilos estimulados pelo PAF e (B) termos GO de proteínas mais abundantes nos neutrófilos ativado pelo fMLP. O mapa colorido ilustra a percentagem de confiabilidade atribuído pelo programa de ESG .

Na comparação entre neutrófilos estimulados pelo PAF e ativados pelo fMLP o processo biológico com maior quantidade de proteínas predominantes na resposta ao PAF foi a transcrição (figura 32), repetindo o que já foi encontrado na comparação entre neutrófilos quiescentes e estimulados pelo PAF.



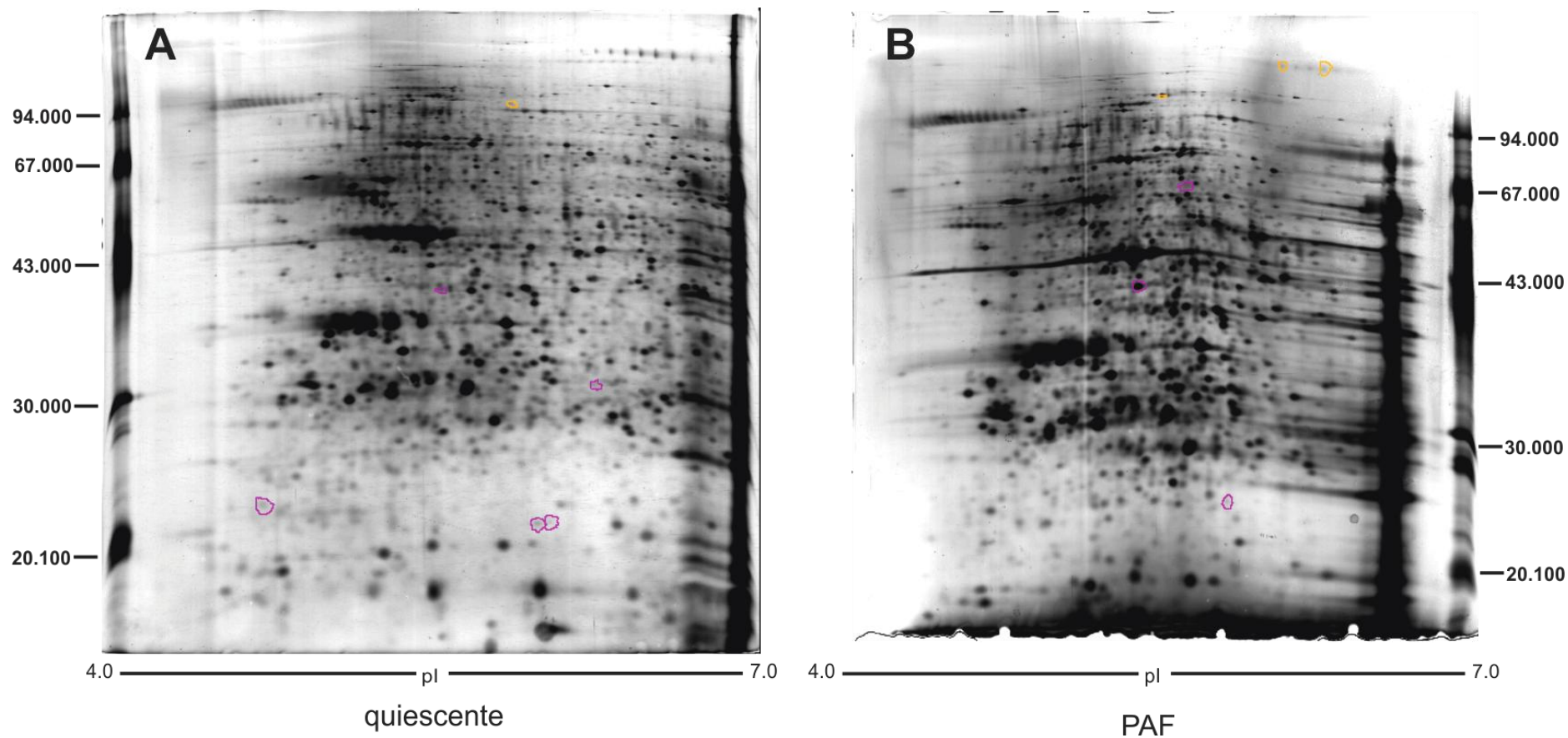
**Figura 32:** Predição processo biológico na comparação entre neutrófilos estimulado pelo PAF e ativados pelo fMLP. (A) termos GO de proteínas mais abundantes nos neutrófilos estimulados pelo PAF e (B) termos GO de proteínas mais abundantes nos neutrófilos ativados pelo fMLP. O mapa colorido ilustra a porcentagem de confiabilidade atribuído pelo programa de ESG .

#### 4.4.7) Comparação entre as três condições

Na comparação entre as três condições foram observados 16 *spots* com abundância diferencial, sendo 11 identificações proteicas, dentre elas 4 proteínas exclusivas de quiescentes quando comparadas com PAF e fMLP, 2 proteínas exclusivas de PAF quando comparadas a quiescente e fMLP, 1 proteína exclusiva de quiescente quando comparada a fMLP e a mesma exclusiva de PAF quando comparada a fMLP, 3 proteínas aumentadas em PAF e diminuídas em quiescente e fMLP e 1 proteína aumentada para quiescente e diminuída para PAF e fMLP (figura 33, tabela 11 e 12).

Tabela 11: *Spots* com expressão diferencial entre três condições: quiescente, PAF e fMLP

Spot	Quiescente		PAF		fMLP	
	X PAF	X fMLP	X Quiescente	X fMLP	X Quiescente	X PAF
70	↓	=	↑	↑	=	↓
73	↓	=	↑	↑	=	↓
147	↓	=	↑	↑	=	↓
192	↑	↑	↓		↓	
273	Ausente	Ausente	Exclusivo	↑	Exclusivo	↓
518	Ausente	Ausente	Exclusivo	Exclusivo	Ausente	Ausente
588	↓	↓	↑	=	↑	=
884	↓	↓	↑	=	↑	=
968	=	Exclusivo	=	Exclusivo	Ausente	Ausente
975	Ausente	Ausente	Exclusivo	↑	Exclusivo	↓
1242	Exclusivo	Exclusivo	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
1470	Exclusivo	Exclusivo	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
1489	Exclusivo	Exclusivo	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
1490	Exclusivo	Exclusivo	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
1547	Ausente	Ausente	Exclusivo	Exclusivo	Ausente	Ausente
1626	↓	↓	↑	=	↑	



**Figura 33:** Géis bidimensionais na faixa de ácida (4-7) de neutrófilos totais. A – Gel de neutrófilos quiescente: em rosa, *spots* exclusivos de neutrófilos quiescentes e em laranja, *spot* aumentado para neutrófilos quiescentes. B – Gel de neutrófilos estimulados pelo PAF: em rosa, *spots* exclusivos de neutrófilos estimulados pelo PAF e em laranja, *spots* aumentados para neutrófilos estimulados.

Tabela 12 – Identificação proteica de neutrófilos por MALDI-TOF-TOF peptide mass fingerprinting and MS/MS fragmentação por orbitrap.

<i>Spot</i>	Parâmetro de Expressão <sup>a</sup>	p-value <sup>b</sup>	Número de acesso	Nome e Símbolo (UniPROT)	Atividades	pI (teor/exp)	Mr (teor/exp) (kDa)	Score <sup>c</sup>	C(%) <sub>d</sub>	MS/MS Score <sup>e</sup>	MS/MS peptídeos	Peptídeos e-value <sup>f</sup>
70	↑PAF PAFxQ (5.16) PAFxMPLP (4.38)	0.002	<a href="#">gi10047341</a>	KIAA1632 protein (EPG5_HUMAN)	Adesão célula-célula	6.10/6.30	166/152	82	16			
73	↑PAF PAFxQ (5.32) PAFxMPLP (4.76)	0.002	<a href="#">gi1212983</a>	polypeptide of 976 aa (SYCP1_HUMAN)	Desfosforilação de resíduos de serina da RNA polimerase II	5.85 / 6.38	114 / 151	75	21			
147	↑PAF PAFxQ (4.67) PAFxMPLP (4.17)	0.001	<a href="#">gi86143432</a>	RACK7 isoform i (Q2HXV4_HUMAN)	Ativa a proteína Cinase C	5.93 / 5.45	122 / 112	126	24			
192	↑Q QxPAF (4.58)	0.007	<a href="#">gi156119605</a>	general transcription factor 3C polypeptide 4 (TF3C4_HUMAN)	Componete do promotor de iniciação da RNA polimerase III.	6.21 / 5.93	93 / 94	123	30			

	QxfMLP (6.56)												
518	PAF		<a href="#">gi114205472</a>	LONP2 protein (LONP2_HUMAN)	Protease	6.03 / 5.75	66 / 68	119	31				
968	PAF e Q		<a href="#">gi14424674</a>	CDC42 effector protein (Rho GTPase binding) 1 (BORG5_HUMAN)	Tradução de sinal da proteína Rho	5.38/6.00	39/40	90	30				
1242	Q		<a href="#">gi169145172</a>	TRIO and F-actin binding protein (B1AHE1_HUMAN)*	Filamento intermediário relacionado a ativação da migração e difusão	5.67 / 6.21	28 / 30	116	51				
1470	Q		<a href="#">gi14210477</a>	interleukin 18 precursor (Q96KJ8_HUMAN)	Citocina proinflamatória	4.58 / 4.43	22 / 22	75	26				
1489	Q		gi135068	Nm23 protein (NDKA_HUMAN)	Modulação da resposta inflamatória	7.07 / 5.97	20 / 21			102	K.FMQASEDLLK.E R.GDFCIQVGR.N K.EHYVDLK.D R.VMLGETNPADSKPGTIR. G Oxidation (M) R.NIIHGSDSVESAEK.E	0.025 6.1e-05 59 1.3 1.1	
			gi14757756	annexin A2	Liga vesicular secretória a	7.57 / 5.97	38 / 21			68	R.DALNIETAIK.T	0.1	



				(ANXA2_HUMAN)	membrana plasmática						R.QDIAFAYQR.R	0.082	
											R.TNQELQEINR.V	0.016	
1490	Q		gi 223976	haptoglobin Hp2 (HP2_HUMAN)	Remove espécies reativas de oxigênio e íons ferros	6.23 / 6.07	42 / 20			419	R.TEGDGVYTLNDK.K R.TEGDGVYTLNNEK.Q KLPECEAVCGK	8.6e-07 0.00027	
1547	PAF		<a href="#">gi 184226</a>	HLF2 (TRFL_HUMAN)	Atividade antimicrobiana	8.51 / 6.00	79 / 24		80	100	120	K.DSAIGFSR.V K.GEADAMSLDGGVYTA GK.C Oxidation (M) R.YYGYTGAFR.C	0.0037 0.00023 0.085

<sup>a</sup>Parâmetro de Expressão: análise comparativa entre células quiescentes, estimulada por PAF e ativada por fMLP:

Q: Exclusivo para neutrófilos quiescentes

PAF: Exclusivo para neutrófilos estimulados pelo PAF

↑PAF: Expressão aumentada na condição PAF

↑Q: Expressão aumentada na condição quiescente

PAF e Q: Exclusivo para neutrófilos quiescentes e PAF na comparação com fMLP

<sup>b</sup>p-value: valor da significância na comparação entre os spots dos grupos, utilizando o programa SPSS. Campos sem valores representam ausência de uma das condições demonstrando *spots* exclusivos.

<sup>c</sup>Score: Search score : a partir da análise peptide mass fingerprint utilizando programa Mascot contra o NCBI banco de dados não redundante ; a partir de MS-BLAST que representa a soma de segmentos de pares de alto score de cada peptídeo.

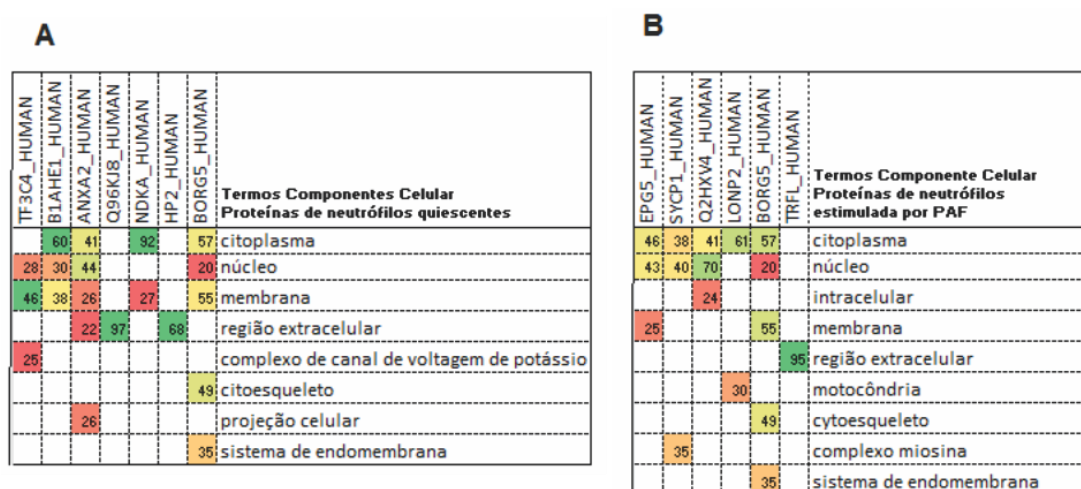
<sup>d</sup>C (%): porcentagem da cobertura da sequência da proteína pelos peptídeos correspondentes.

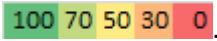
<sup>e</sup>MS/MS score: Busca do score a partir da análise do espectro de fragmentação dos peptídeos utilizando o programa Mascot contra o NCBI banco de dados não redundantes.

<sup>f</sup>Peptídeos *e-value*: Valores de expectativa para buscas por MS/MS. Representa o número de acertos obtidos ao acaso com *score* melhor ou igual ao obtido na identificação. Para um *score* exatamente no limite de significância ( $p < 0,05$ ) o *e-value* também será 0,05. Se o score for aumentado em 10 unidades, o *e-value* diminuirá para 0,005, portanto quanto menor o *e-value*, mais significativo será o score.

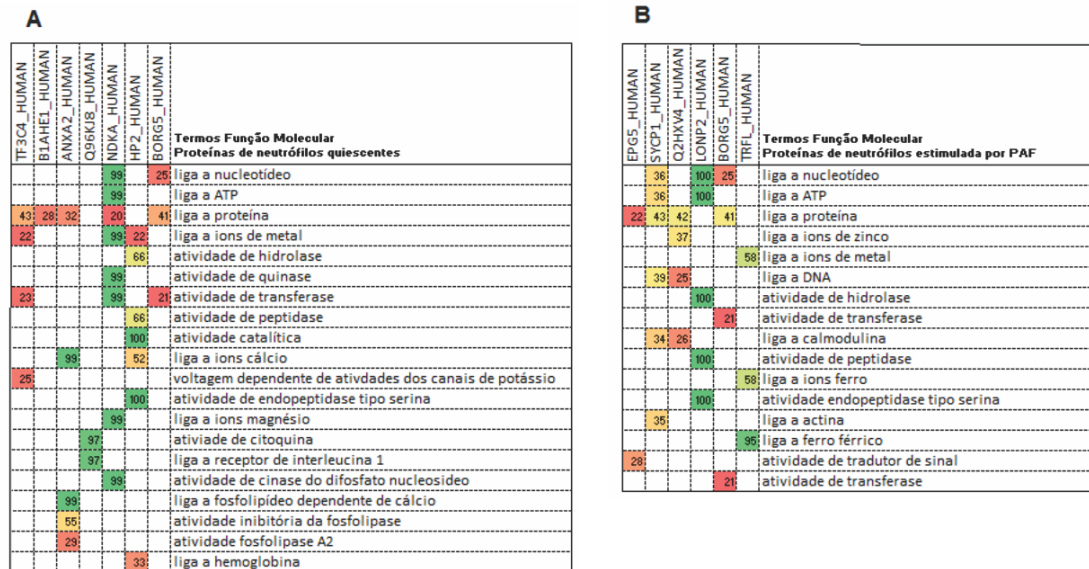
#### 4.4.8) Predição da função proteica entre neutrófilos quiescentes estimulados por PAF e ativados por fMLP

A comparação entre as três condições neutrófilos quiescentes, estimulados pelo PAF e ativados pelo fMLP apresentou 6 proteínas com abundância maior ou exclusivas para neutrófilos estimulados pelo PAF e 7 proteínas mais abundantes ou exclusivas para neutrófilos quiescentes. Com esse perfil foi demonstrado proteínas para neutrófilos estimulados em sua maioria localizados no citoplasma e núcleo e nos neutrófilos quiescentes localizado em membranas, citoplasma e núcleo, figura 34.



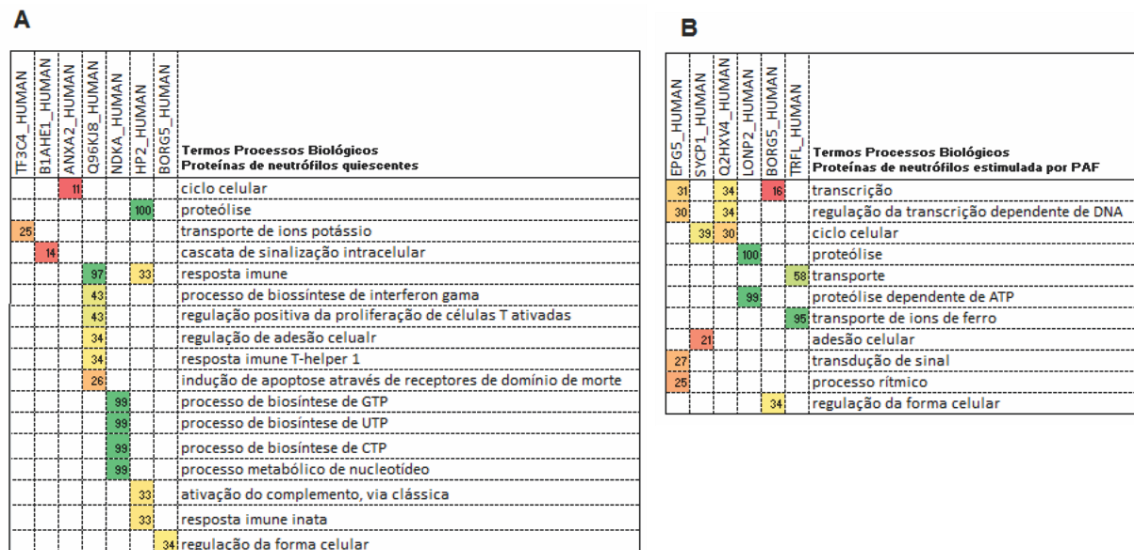
**Figura 34:** Predição componente celular na comparação entre neutrófilos quiescentes e estimulados pelo PAF. (A) termos GO de proteínas mais abundantes nos neutrófilos quiescentes e (B) termos GO de proteínas mais abundantes nos neutrófilos estimulados pelo PAF. O mapa colorido ilustra a percentagem de confiabilidade atribuído pelo programa de ESG .

A função molecular em neutrófilos estimulados por PAF que se apresentou enriquecida denota ligação a outras proteínas e a nucleotídeos. Em neutrófilos quiescentes, funções relacionadas com a ligação a outras proteínas e a metais e atividades de transferase, figura 35.

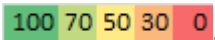


**Figura 35:** Predição da função molecular na comparação entre neutrófilos quiescentes e estimulados pelo PAF. (A) termos GO de proteínas mais abundantes nos neutrófilos quiescentes e (B) termos GO de proteínas mais abundantes nos neutrófilos estimulados pelo PAF. O mapa colorido ilustra a percentagem de confiabilidade atribuído pelo programa de ESG .

O processo biológico mais relatado em neutrófilos estimulados por PAF foi a transcrição e em neutrófilos quiescentes a resposta imune, figura 36.



**Figura 36:** Predição processo biológico na comparação entre neutrófilos quiescentes e estimulados pelo PAF. (A) GO termos de proteínas mais abundantes nos neutrófilos quiescentes e (B) GO termos de

proteínas mais abundantes nos neutrófilos estimulados pelo PAF. O mapa colorido ilustra a percentagem de confiabilidade atribuído pelo programa de ESG .

Todas as identificações foram avaliadas utilizando critérios de validação, já descritos na metodologia. Essas validações também foram otimizadas pelo grupo de pesquisas do Laboratório de Bioquímica e Química de Proteínas.

### **Proteínas KIAA 1632 (EPG5\_HUMAN)**

A família KIAA é formada por proteínas grandes, bastante hidrofóbicas e com a função ainda desconhecida. Algumas foram encontradas associadas à região cerebral (Nakayama, Kikuno *et al.*, 2002). A proteína KIAA 1632 teve sua expressão gênica relacionada ao câncer de mama. Os genes alterados em câncer estão relacionados a uma gama de modificações celulares como aumento de transcrição, adesão e invasão. A função dessa proteína é desconhecida, porém acredita-se no envolvimento na interação célula-célula (adesão) (Halama, Grauling-Halama *et al.*, 2007). Essa proteína foi identificada aumentada na estimulação dos neutrófilos pelo PAF. Estudos relatam que a estimulação pelo PAF provoca aumento de adesão ao endotélio (Condliffe, Chilvers *et al.*, 1996), figura 37.

### **Polipeptídeos de 976 aa (SYCP1\_HUMAN)**

O complexo Synaptonemal influencia no número de recombinações de cromossomos homólogos com auxílio de quiasmas estáveis (Zhang, Liu *et al.*), mas também está relacionado com a regulação do processo de transcrição do RNA mensageiro atuando como uma fosfatase, desfosforilando resíduos de serina da RNA polimerase II. A fosforilação e desfosforilação são mecanismos importantes para a movimentação da RNA polimerase II e conseqüentemente formação do mRNA, além disso a desfosforilação é um mecanismo de reciclagem dessa enzima (Zhang, Cho *et al.*; Heyting, 1996; Zhang, Kim *et al.*, 2006). Esta proteína foi encontrada com maior abundância tanto na condição estimulada pelo PAF quanto na condição ativada pelo fMLP, comparadas com os neutrófilos quiescentes Como o neutrófilo já é uma célula

madura e não sofre divisão, é pertinente propor a hipótese que SYCP1 esteja relacionado ao controle da transcrição, figura 37.

### **RACK 7 (Q2HXV4\_HUMAN)**

Estudos demonstram que proteínas da família RACK ancoram e ativam a proteína cinase C e aumentam a fosforilação durante a ativação celular. A proteína cinase C está envolvida na ativação de várias funções dos neutrófilos, dentre elas: explosão respiratória, adesão, mudança do pH, apoptose (Bertram e Ley; Fossey, Kuroda *et al.*, 2000). Porém ainda não se tem relato de estudos específicos para elucidar a função da proteína RACK isoforma 7. O presente trabalho mostra a expressão aumenta dessa proteína após estimulação dos neutrófilos com PAF, o que reforça a importância da RACK na estimulação, figura 37.

### **Fator de transcrição geral 3C polipeptídeo 4 (TF3C4\_HUMAN)**

A família da proteína TF3C4, família TFC4, possui em sua cadeia repetições de 11 tetratricopeptídeos. Os componentes dessa família ligam-se à RNA polimerase III e seus aparatos. A proteína TF3C4 (TFIIIC) é um componente de promotor encontrado em metazoa e eucariotos e faz parte da montagem do complexo para início da transcrição da RNA polimerase III, porém TFIIIB é a proteína responsável pelo início da transcrição. A RNA polimerase III é responsável pela transcrição dos RNAs essenciais a síntese de proteínas, processamento do RNA mensageiro e transporte de proteínas como: 5S RNA, tRNA, U6 snRNA, RNase, pRNA e 7SL RNA. A predição baseada na sequência da proteína, além de participar do complexo do promotor, sugere atividade relacionada a transporte de potássio e atividade de acetiltransferase (Moir e Willis, 2004). O mecanismo TF3C4 relacionado a estimulação dos neutrófilos não é conhecido, por isso o que podemos afirmar é a diminuição da abundância da proteína TF3C4 após estimulação dos neutrófilos pelo PAF e pela ativação com fMLP. Estudos relatam que a subunidade TF3C4 provavelmente está localizada a montante da subunidade responsável por iniciar a transcrição. Esse mesmo estudo relata que o aumento da transcrição é relacionado com a mudança de conformação após modificações pós-traducionais, provavelmente fosforilações dessa subunidade em dois

domínios PCF-1 e PCF-2 (Schramm e Hernandez, 2002). Com esses relatos podendo sugerir que a modificação pós-traducional dessa proteína pode ter modificado a massa e/ou o ponto isoelétrico, mudando o posicionamento dela no gel, nesse caso não podemos afirmar que a diminuição dessa proteína cause a diminuição da transcrição de componentes de RNA responsável pelo aparato de síntese de proteína, mas temos um indício de aumento de transcrição, figura 37.

### **Protease Lon homóloga 2, peroxisomal (LONP2\_HUMAN)**

A lon protease e suas isoformas podem ser encontradas em três organelas diferentes mitocôndria, cloroplasto e peroxisomo. A lon protease homolog 2 é localizada no peroxisomo. Essa protease dependente de ATP ainda não teve sua função elucidada, mas acredita-se que seja responsável pela degradação de proteínas deformadas. O peroxisomo é uma organela presente em células eucarióticas contendo várias enzimas responsáveis pela oxidação de ácidos graxos (Kikuchi, Hatano *et al.*, 2004). A sua função está relacionada a várias enzimas presentes nessa organela que utiliza o oxigênio para as reações oxidativas. Algumas das reações encontradas no peroxisomo são a degradação do peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), do óxido nítrico, metabólitos tóxicos para células.. A proteína LONP2 foi encontrada somente em neutrófilos estimulados o que nos sugere uma proteína envolvida na modulação da resposta inflamatória, outro evento também observado pelo presente trabalho foi a baixa detecção de peróxido de hidrogênio que pode ter sido consumido pela ação da calase, proteína encontrada nos peroxisomos. A catalase também foi identificada na comparação entre neutrófilos quiescentes e estimulados pelo PAF, porém apresentou ausência em neutrófilos estimulados, mas a atuação dessa proteína é dependente de fosforilação, sendo necessário mais estudos para comprovar se a sua ausência realmente demonstra a modificação pós-traducional(Putnam, Arvai *et al.*, 2000), figura 37.

### **Proteína efetora de CDC42 (ligação Rho GTPase) 1 (BORG5\_HUMAN)**

A proteína BORG5 (*binder of Rho guanosine 5-triphosphatase 5*) faz parte de uma nova família que se liga à proteína Cdc42 dependente de GTP (Joberty, Perlungher *et al.*, 1999). A proteína BORG5 é idêntica à proteína previamente descrita MSE55. A Cdc42 é membro de família Rho GTPase e regula múltiplas ações celulares que inclui

polimerização de actina, ativação da sinalização pela via das cinases e polarização celular. A BORG5 faz interação com a proteína cinase C isoforma  $\alpha$  (aPKC) e Cdc42 (Vong, Liu *et al.*). A PKC é ativada pela ação da estimulação dos neutrófilos pelo PAF e pela ativação pelo fMLP e pode ser sugerido que a aPKC ativa BORG5 e em seguida Cdc42 (Penna, Bassino *et al.*; Vong, Liu *et al.*). Uma função bastante relatada na ativação de Cdc42 é a mudança de forma celular pela polarização da actina levando até a formação de filopódios. Filopódios são filamentos bem finos, prolongamento de lamelipódios, formados por actinas e levam à migração celular pela atração de quimiocinas (Burbelo, Snow *et al.*, 1999). Essa proteína foi identificada de forma exclusiva em neutrófilos quiescentes e estimulados pelo PAF em relação a ativação por fMLP, supõe-se que essa proteína seja a forma inativa e, após a ativação, mudanças pós-traducionais podem levá-la à mudança de pI e massa, não sendo detectada no gel de fMLP. Corroborando tal possibilidade, há anotações no banco de dados indicando que essa proteína pode ser fosforilada, figura 37.

#### **Proteína de ligação TRIO e F-actina (B1AHE1\_HUMAN)**

TRIO é uma proteína que liga-se a F-actina e contém o domínio GEF. Outra proteína chamada TARA liga-se a F-actina e a TRIO e assim formam um complexo. Esse complexo é responsável pela organização do citoesqueleto, espalhamento e migração. Estudo relata que esse complexo se formou após o estímulo celular para modificar a forma. A porção GEF também é muito importante, pois pode ativar Rac1 e Rho G que auxilia o relaxamento e a contração celular relata em células Hela (Seipel, O'brien *et al.*, 2001).

A proteína TRIO foi encontrada somente em neutrófilos quiescentes quando comparados a PAF e fMLP, porém a movimentação celular, evento importante na estimulação e ativação dos neutrófilos, pode ter promovido a modificações na proteína TRIO que mudou a massa e/ou pI, impossibilitando a sua identificação nos neutrófilos estimulados/ativados, figura 37.

#### **Precursor da interleucina 18 (Q96KJ8\_HUMAN)**

A interleucina 18 (IL-18), membro da superfamília das interleucinas, produzida na forma inativa com 23 kDa, correspondendo o que foi encontrada somente em



neutrófilos quiescentes com 22 kDa sendo identificada como precursora da IL-18. Estudos mostram que a forma ativa possui 18 kDa e é secretada. A liberação dessa proteína e a diferença de massa molecular são possíveis explicações para não se encontrar a proteína na sua forma ativa em neutrófilos estimulados e ativados. A IL-18 ativa em resposta ao processo inflamatório participa da resposta imune inata e adaptativa, ativando células da resposta inata como: o próprio neutrófilo que o libera, monócitos, células NK e na resposta adaptativa, sendo quimioatraente para linfócitos T e estimulando a diferenciação em linfócitos T helper 1 ou 2 (Volin e Koch; Fortin, Ear *et al.*, 2009).

No meio intracelular essa proteína foi encontrada em grânulos, organelas intracelulares, associada a F-actinas e colocalizada a Cdc42. A clivagem da IL-18 é realizada pela caspase-1 ou pela proteinase 3. Estudos relatam aumento de IL-18 no soro humano associado a doenças como: disfunção de órgãos após trauma, falência de órgãos associado com pancreatite severa, disfunção pulmonar pos-injúria doença de Crohn, processo inflamatório crônico e ativações de neutrófilos *in vitro* com TNF (Silliman, Kelher *et al.*; Stassen, Breit *et al.*, 2003), figura 37.

### **Proteína NM23 (NDKA\_HUMAN)**

A proteína NM23, nucleoside diphosphate kinase A (NDKA), gene chamado de NME1 é uma proteína heterodimérica com ação catalítica que transfere fosforil do nucleosídeo difosfato ao nucleosídeo trifosfato (Ni, Gu *et al.*, 2003). Essa proteína é encontrada em leucócitos em geral e em monócitos normais (quiescentes), no citosol. Estudos também relatam que o aumento na expressão do gene da NM23 e a alta concentração no plasma contribuem para o pior prognóstico de leucemia mieloide aguda (LMA).

Muitas funções estão relacionadas com essa proteína como: mudança na forma celular, proliferação, diferenciação, adesão, reparo do DNA, migração, endocitose, transcrição e apoptose. Interage com Rac 1, Rad e Cdc42,  $\beta$  e  $\gamma$ -tubulinas e vimentina (Okabe-Kado, Kasukabe *et al.*, 2002; Valentijn, Koster *et al.*, 2006). Uma função muito interessante é a ação antioxidativa descrita em casos de aumento da expressão de NM23-H1. Tal expressão foi associada a baixos níveis de ROS, pelo aumento da enzima antioxidante glutatona peroxidase 1 (GPX1) e a forte resistência ao estresse oxidativo relacionado com o aumento de expressão de p53. A molécula p53 aumentada

forma um complexo com NM23. A relação entre p53 e GPX1 ainda é desconhecida, mas sabe-se que a inibição da expressão da p53 inibe a GPX1 (An, Chu *et al.*, 2008). No meio extracelular essa proteína induz monócitos ativados a entrar em apoptose, regula a homeostase epidermal e a proliferação de queratinócito provocando o reparo tecidual (Braun, Mauch *et al.*, 2007; Okabe-Kado, Kasukabe *et al.*, 2009).

No presente estudo foi encontrada NM23 somente em neutrófilos quiescentes, em concordância com outros estudos. Em neutrófilos estimulados por PAF e ativados pelo fMLP não foi detectada, sugerindo que essa proteína tenha sido liberada para o meio extracelular para realizar a modulação da resposta inflamatória pela indução da apoptose de macrófagos ativados e do reparo tecidual, figura 37.

### **Annexina A2 (ANXA2\_HUMAN)**

A Annexina A2 é uma proteína dependente de cálcio que se liga a fosfolípidos de membrana e é substrato de algumas cinases. Essa proteína também possui vários sítios para modificações pós-traducionais, tanto em variedade de modificações como em número da mesma modificação, como fosforilações (Emans, Gorvel *et al.*, 1993). Cabe ressaltar a variedade de interações e funções que essa proteína pode fazer como ligação de membranas, como por exemplo, membrana da vesícula secretória e membrana plasmática; interage com proteínas fosfolipídicas; com actina; apoia a montagem de lipídeos e o recrutamento de fatores que deflagram a remodelagem da actina como a família Rho GTPase. Cabe ressaltar que todos esses eventos estão relacionados com o processo de endocitose (Rescher, Ludwig *et al.*, 2008; Morel, Parton *et al.*, 2009). Outros estudos relatam também que a anexina A2 recruta para membrana o Cdc42, molécula envolvida no processo de fagocitose e ligação dessa proteína ao Mrna (Filipenko, Macleod *et al.*, 2004; Rescher, Ludwig *et al.*, 2008). Todas essas ligações e funções devem ser sinalizadas por modificações que essa molécula permite em sua estrutura, além das clivagens realizadas por cinases. Por causa desse quadro podemos sugerir que a proteína encontrada de forma exclusiva em neutrófilos quiescentes deve ser a molécula inativa que foi modificada após a estimulação e ativação mudando a massa e/ou pI e não sendo mais detectada nas condições de ativações, figura 37.

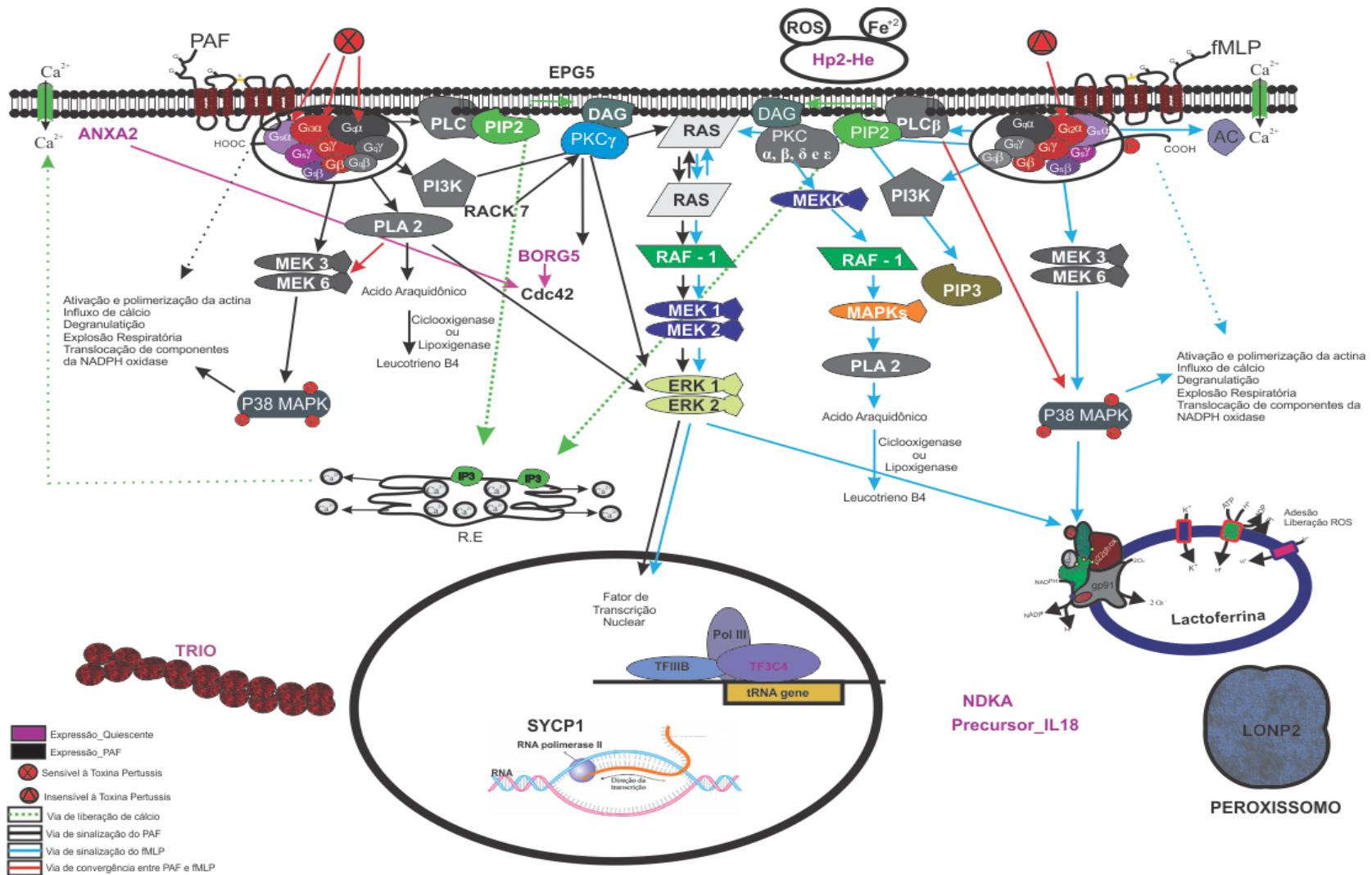
### **Haptoglobina (HP2\_HUMAN)**

A haptoglobina mostrou-se apenas presente em neutrófilos quiescentes, o que sugere que essa proteína é liberada quando o neutrófilo é estimulado ou ativado. Tal proposta está de acordo com estudos que mostram que essa proteína é indicativa de inflamação aguda, quando encontrada no plasma. Além disso, esse mesmo estudo mostra que a concentração da haptoglobina livre é bem maior do que em complexo com metaproteínase da matriz (Hp-MMP9) (Bannikov, Hinds *et al.*). A Hp possui funções como: a retirada de espécies reativas de oxigênio e íons ferro do meio extracelular pela ligação da Hp com a hemoglobina proveniente de lise de eritrócitos (Cox, Doherty *et al.*, 2007). O complexo Hp-hemoglobina liga-se ao CD163 dos monócitos/macrófagos sendo endocitados, onde o ferro será reciclado, protegendo os tecidos (Policelli, Bocedi *et al.*, 2008; Nielsen e Moestrup, 2009). Pode atuar como um fator de angiogênese que age na proliferação e diferenciação do endotélio. E pode agir de forma autócrina nos neutrófilos ligando-se ao CD11b, porém o seu efeito ainda não está esclarecido, só sugerem que essa ligação esteja relacionada à fagocitose (Berkova, Gilbert *et al.*, 1999). Em vários estudos a proteína Hp se mostra como uma molécula importante na modulação da resposta imune, figura 37.

### **Lactoferrina HLF2 (TRFL\_HUMAN)**

Estudos relatam que a lactoferrina é encontrada em grânulos específicos de neutrófilos maduros, porém nesse estudo foi encontrada a lactoferrina somente em neutrófilos estimulados. Também foi observado que a lactoferrina identificada apresentava massa experimental de 24 kDa, bem diferente da massa teórica de 80 kDa. Segundo Li, 2006 foram identificados em neutrófilos 3 lactoferrinas com massas moleculares diferentes 75-80 kDa, 65-70 kDa e 20-25 kDa, em nosso estudo foi identificada lactoferrina 24 kDa exclusiva de PAF em relação a neutrófilos quiescentes e a neutrófilos ativado por fMLP, sugerindo que seja a forma ativa em relação ao quiescente. Em neutrófilos ativados a ausência poderia ser explicada, pois essa proteína é encontrada em grânulos específicos que são degranuladas com a ativação. Estudos também relatam que após liberação dos grânulos pelos neutrófilos ativados há um aumento de lactoferrina no meio extracelular. Essa proteína tem ação antimicrobiana contra bactérias, fungos, vírus e parasitas, devido ao sequestro de ferro, composto necessário ao crescimento bacteriano, por exemplo, sendo considerada altamente

pleiotrópica pelo grande espectro de ação (De La Rosa, Yang *et al.*, 2008; Bournazou, Pound *et al.*, 2009). A lactoferrina em altas concentrações no soro além de ação antimicrobiana, também atua como antiinflamatório ligando a receptores específicos dos neutrófilos evitando a migração e a produção de citocinas pró-inflamatórias e estimulando produção de citocinas anti-inflamatórias, atuando também como uma proteína moduladora da resposta inflamatória (Li, Lu *et al.*, 2006; Bournazou, Pound *et al.*, 2009), figura 37.



**Figura 37:** Cascata de sinalização dos neutrófilos estimulados pelo PAF e ativados pelo fMLP e proteínas identificadas com expressão diferencial entre as três condições.

## 5. CONCLUSÕES

Há alguns anos estudos vêm relatando a diferença de ativação dos neutrófilos em resposta a diversos agentes. Algumas diferenças mais citadas na literatura são entre aspectos funcionais da estimulação dos neutrófilos pelo PAF e da ativação pelo fMLP, apesar da particularidade de ambas apresentarem receptores em neutrófilos acoplados à proteína G. Apesar dessa ampla descrição de aspectos funcionais, muitos pontos ainda são desconhecidos nos mecanismos vias de estimulação e ativação. Este estudo propôs o conhecimento das diferenças proteicas entre três fenótipos: neutrófilos quiescentes, estimulados pelo PAF e ativados pelo fMLP. Para a realização dos experimentos, alguns protocolos precisaram ser adaptados, resultando em inovações em relação aos procedimentos já publicados. Foram realizados ensaios que comprovaram algumas diferenças funcionais como: a clivagem da l-selectina, a mobilização do CD11b e a produção de espécies reativas de oxigênio. Após essa comprovação funcional, a comparação proteica revelou proteínas com abundância diferencial entre as condições comparadas (quiescentes versus estimulados pelo PAF), (quiescentes versus ativados pelo fMLP), (estimulados pelo PAF versus ativados pelo fMLP) e a comparação entre as três condições. O resultado mostrou neutrófilos estimulados por PAF com propensão a aumento da transcrição e ativados por fMLP com propensão a dobramentos de proteínas fundamentais em processos como migração e degranulação. Além disso a comparação entre as três condições apresentou proteínas mais abundantes em neutrófilos quiescentes como envolvidas em processos como transdução de sinal, motilidade celular e modulação da resposta inflamatória. Seis outras proteínas eram mais abundantes em neutrófilos estimulados pelo PAF, relacionadas a adesão celular, transdução de sinal e atividade antimicrobiana. Dentre as proteínas identificadas neste estudo, 17 foram descritas pela primeira vez em neutrófilos e 30 foram associadas pela primeira vez ao estímulo por PAF ou à ativação por fMLP.

Esse estudo possibilitou sugerir diferenças em processos biológicos em que os neutrófilos participam direcionadas a cada condição, importantes para a elucidação do processo inflamatório.

## 6. PERSPECTIVAS

Além das metodologias adaptadas, características funcionais estudadas e grupos de proteínas identificadas, o presente trabalho nos permitiu levantar diversas hipóteses, aqui caracterizadas como perspectivas para estudos futuros.

Dentre as perspectivas deste trabalho, estão a verificação da presença de modificações pós-traducionais das proteínas identificadas nos mapas proteômicos de neutrófilos quiescentes e estimulados por PAF e ativados por fMLP.

A realização do transcriptoma diferencial entre as condições.

Realizar comparações entre mapas proteômicos ácidos de neutrófilos ativados com PAF+fMLP, LPS, TNF e IL-8 e comparações de neutrófilos humanos de indivíduos que sofreram politraumatismo, trabalhos em andamento no Laboratório de Bioquímica e Química de Proteínas da UnB.

Identificar proteínas exocitadas após estimulação e ativação dos neutrófilos.

Analisar as diferenças quantitativas e qualitativas da composição de íons nos neutrófilos após estimulação e ativação (metalômica) e identificar as proteínas que se ligam a metais (metalo proteômica).

Avaliar as proteínas com expressões diferenciais, sob o aspecto da variabilidade populacional, indicando prováveis candidatas a marcadores moleculares para diagnóstico e terapias, associados ao trauma, estudo também em andamento.

Realizar estudos de funções das proteínas mais promissoras identificadas, utilizando diferentes técnicas como: citometria de fluxo; microscopia: eletrônica e confocal; imunofluorescência; *western blot*, dentre outras possibilidades.

Complementar as adaptações de protocolos realizadas neste estudo, de forma a se concluir o estudo sistemático da metodologia, por exemplo, em relação ao método para identificação de proteínas testando-se 2 eluições consecutivas, uma com 50%, outra com 90% de acetonitrila. Eluir somente com 90% poderia reter peptídios hidrofílicos por efeito HILIC. Também seria necessário complementar os testes utilizando-se os mesmos grupos de proteínas em todas as condições testadas.

A longo prazo, realizar estudo com anti-inflamatórios após a estimulação dos neutrófilos com PAF, visando o possível retorno do estado estimulado ao estado quiescente.

## 7. REFERÊNCIAS

ABDEL-MAGEED, A. B. *et al.* NF-kappaB-dependent gene expression of proinflammatory cytokines in T24 cells: possible role in interstitial cystitis. *Urol Res* [S.I.], v. 31, n. 5, p. 300-5, Oct 2003.

ALBELDA, S. M. *et al.* Adhesion molecules and inflammatory injury. *FASEB J* [S.I.], v. 8, n. 8, p. 504-12, May 1994.

ALEXANDER, S. R. *et al.* Effects of selective protein kinase C inhibitors on the proteolytic down-regulation of L-selectin from chemoattractant-activated neutrophils. *J Leukoc Biol* [S.I.], v. 67, n. 3, p. 415-22, Mar 2000.

ALLEN, L. A. Mechanisms of pathogenesis: evasion of killing by polymorphonuclear leukocytes. *Microbes Infect* [S.I.], v. 5, n. 14, p. 1329-35, Nov 2003.

AMERSHAN, B. *Percoll Methodology and applications.*

AN, R. *et al.* Over-expression of nm23-H1 in HeLa cells provides cells with higher resistance to oxidative stress possibly due to raising intracellular p53 and GPX1. *Acta Pharmacol Sin* [S.I.], v. 29, n. 12, p. 1451-8, Dec 2008.

ANDERSON, S. I. *et al.* Role of the cytoskeleton in rapid activation of CD11b/CD18 function and its subsequent downregulation in neutrophils. *J Cell Sci* [S.I.], v. 113 ( Pt 15), p. 2737-45, Aug 2000.

AQUINO, E. N. *Análise proteômica comparativa entre neutrófilos quiescentes e estimulados com o fator de agregação plaquetária (PAF).* (2008). 131 f. (Mestrado) - Pós-graduação em Patologia Molecular, Universidade de Brasília - UnB, Brasília, 2008.

ASHBURNER, M., BALL, C. A. , BLAKE, J. A., BOTSTEIN, D., BUTLER, H. J., CHERRY, M., DAVIS, A. P., DOLINSKI, K., DWIGHT, S. S., EPPIG, J. T., HARRIS, M. A., HILL, D. P., ISSEL-TARVER, L., KASARSKIS, A., LEWIS, S., MATESE, J. C., RICHARDSON, J. E., RINGWALD, M., RUBIN, G. M., SHERLOCK, G., . Gene Ontology: tool for the unification of biology. *Nature Genetics* [S.I.], v. 25, 2000.

BAKER, P. R. *et al.* Convergence of nitric oxide and lipid signaling: anti-inflammatory nitro-fatty acids. *Free Radic Biol Med* [S.I.], v. 46, n. 8, p. 989-1003, Apr 15 2009.

BANNIKOV, G. A. *et al.* Serum haptoglobin-matrix metalloproteinase 9 (Hp-MMP 9) complex as a biomarker of systemic inflammation in cattle. *Vet Immunol Immunopathol* [S.I.], v. 139, n. 1, p. 41-9, Jan.

BASSOE, C. F. *et al.* Investigations of phagosomes, mitochondria, and acidic granules in human neutrophils using fluorescent probes. *Cytometry B Clin Cytom* [S.I.], v. 51, n. 1, p. 21-9, Jan 2003.

BERKOVA, N. *et al.* TNF-induced haptoglobin release from human neutrophils: pivotal role of the TNF p55 receptor. *J Immunol* [S.I.], v. 162, n. 10, p. 6226-32, May 15 1999.



BERNAS, T. *et al.* Integrating cytomics and proteomics. *Mol Cell Proteomics* [S.I.], v. 5, n. 1, p. 2-13, Jan 2006.

BERTRAM, A.; LEY, K. Protein kinase C isoforms in neutrophil adhesion and activation. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* [S.I.], v. 59, n. 2, p. 79-87, Apr.

BIOSCIENCES, A. *Percoll Methodology and applications.*

BIRON, D. G. *et al.* The pitfalls of proteomics experiments without the correct use of bioinformatics tools. *Proteomics* [S.I.], v. 6, n. 20, p. 5577-96, Oct 2006.

BORREGAARD, N. Neutrophils, from marrow to microbes. *Immunity* [S.I.], v. 33, n. 5, p. 657-70, Nov 24.

BORREGAARD, N.; COWLAND, J. B. Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. *Blood* [S.I.], v. 89, n. 10, p. 3503-21, May 15 1997.

BOTHA, A. J. *et al.* Postinjury neutrophil priming and activation states: therapeutic challenges. *Shock* [S.I.], v. 3, n. 3, p. 157-66, Mar 1995.

\_\_\_\_\_. Early neutrophil sequestration after injury: a pathogenic mechanism for multiple organ failure. *J Trauma* [S.I.], v. 39, n. 3, p. 411-7, Sep 1995.

BOURNAZOU, I. *et al.* Apoptotic human cells inhibit migration of granulocytes via release of lactoferrin. *J Clin Invest* [S.I.], v. 119, n. 1, p. 20-32, Jan 2009.

BRAUN, S. *et al.* Novel roles of NM23 proteins in skin homeostasis, repair and disease. *Oncogene* [S.I.], v. 26, n. 4, p. 532-42, Jan 25 2007.

BROWN, G. E. *et al.* Distinct ligand-dependent roles for p38 MAPK in priming and activation of the neutrophil NADPH oxidase. *J Biol Chem* [S.I.], v. 279, n. 26, p. 27059-68, Jun 25 2004.

BURBELO, P. D. *et al.* MSE55, a Cdc42 effector protein, induces long cellular extensions in fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* [S.I.], v. 96, n. 16, p. 9083-8, Aug 3 1999.

CAIRNS, D. A. Statistical issues in quality control of proteomic analyses: good experimental design and planning. *Proteomics* [S.I.], v. 11, n. 6, p. 1037-48, Mar.

CHEN, L. W. *et al.* Different pathways leading to activation of extracellular signal-regulated kinase and p38 MAP kinase by formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine or platelet activating factor in human neutrophils. *J Biomed Sci* [S.I.], v. 12, n. 2, p. 311-9, 2005.

CHEVALLET, M. *et al.* Improved mass spectrometry compatibility is afforded by ammoniacal silver staining. *Proteomics* [S.I.], v. 6, n. 8, p. 2350-4, Apr 2006.

CHITALE, M. *et al.* ESG: extended similarity group method for automated protein function prediction. *Bioinformatics* [S.I.], v. 25, n. 14, p. 1739-45, Jul 15 2009.

CHITALE, M., HAWKINS, T., PARK, C., AND KIHARA, D. ESG: extended similarity group method for automated protein function prediction. *Bioinformatics* [S.I.], v. 25, n. 14, p. 1739-1745, 2009.

- CHRISTOPHE, T. *et al.* The synthetic peptide Trp-Lys-Tyr-Met-Val-Met-NH<sub>2</sub> specifically activates neutrophils through FPRL1/lipoxin A4 receptors and is an agonist for the orphan monocyte-expressed chemoattractant receptor FPRL2. *J Biol Chem* [S.I.], v. 276, n. 24, p. 21585-93, Jun 15 2001.
- CICCHETTI, G. *et al.* Chemotactic signaling pathways in neutrophils: from receptor to actin assembly. *Crit Rev Oral Biol Med* [S.I.], v. 13, n. 3, p. 220-8, 2002.
- CONDLIFFE, A. M. *et al.* Priming differentially regulates neutrophil adhesion molecule expression/function. *Immunology* [S.I.], v. 89, n. 1, p. 105-11, Sep 1996.
- CONEJEROS, I. *et al.* 2-Aminoethoxydiphenyl borate (2-APB) reduces respiratory burst, MMP-9 release and CD11b expression, and increases I-selectin shedding in bovine neutrophils. *Res Vet Sci* [S.I.], v. 92, n. 1, p. 103-10, Feb.
- COX, S. E. *et al.* Haplotype association between haptoglobin (Hp2) and Hp promoter SNP (A-61C) may explain previous controversy of haptoglobin and malaria protection. *PLoS One* [S.I.], v. 2, n. 4, p. e362, 2007.
- CROCKETT-TORABI, E. Selectins and mechanisms of signal transduction. *J Leukoc Biol* [S.I.], v. 63, n. 1, p. 1-14, Jan 1998.
- DA SILVA, A. J. *et al.* Blue native-PAGE analysis of *Trichoderma harzianum* secretome reveals cellulases and hemicellulases working as multienzymatic complexes. *Proteomics* [S.I.], v. 12, n. 17, p. 2729-38, Aug.
- DANG, P. M. *et al.* The NADPH oxidase cytosolic component p67phox is constitutively phosphorylated in human neutrophils: Regulation by a protein tyrosine kinase, MEK1/2 and phosphatases 1/2A. *Biochem Pharmacol* [S.I.], v. 82, n. 9, p. 1145-52, Nov 1.
- DAVEY, P. C. *et al.* Activation-dependent proteolytic degradation of polymorphonuclear CD11b. *Br J Haematol* [S.I.], v. 111, n. 3, p. 934-42, Dec 2000.
- DE KLEIJN, S. *et al.* Transcriptome kinetics of circulating neutrophils during human experimental endotoxemia. *PLoS One* [S.I.], v. 7, n. 6, p. e38255.
- DE LA ROSA, G. *et al.* Lactoferrin acts as an alarmin to promote the recruitment and activation of APCs and antigen-specific immune responses. *J Immunol* [S.I.], v. 180, n. 10, p. 6868-76, May 15 2008.
- DE SOUZA CASTRO, M. *et al.* Proteome analysis of resting human neutrophils. *Protein Pept Lett* [S.I.], v. 13, n. 5, p. 481-7, 2006.
- DENAULT, S. *et al.* Transcriptional activation of the interleukin-8 gene by platelet-activating factor in human peripheral blood monocytes. *Immunology* [S.I.], v. 91, n. 2, p. 297-302, Jun 1997.
- DEWALD, B.; BAGGIOLINI, M. Activation of NADPH oxidase in human neutrophils. Synergism between fMLP and the neutrophil products PAF and LTB<sub>4</sub>. *Biochem Biophys Res Commun* [S.I.], v. 128, n. 1, p. 297-304, Apr 16 1985.

DEWAS, C. *et al.* The mitogen-activated protein kinase extracellular signal-regulated kinase 1/2 pathway is involved in formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine-induced p47phox phosphorylation in human neutrophils. *J Immunol* [S.I.], v. 165, n. 9, p. 5238-44, Nov 1 2000.

DUNN, M. J.; CORBETT, J. M. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Methods Enzymol* [S.I.], v. 271, p. 177-203, 1996.

EL-BENNA, J. *et al.* Phagocyte NADPH oxidase: a multicomponent enzyme essential for host defenses. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* [S.I.], v. 53, n. 3, p. 199-206, May-Jun 2005.

EMANS, N. *et al.* Annexin II is a major component of fusogenic endosomal vesicles. *J Cell Biol* [S.I.], v. 120, n. 6, p. 1357-69, Mar 1993.

FAURSCHOU, M.; BORREGAARD, N. Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. *Microbes Infect* [S.I.], v. 5, n. 14, p. 1317-27, Nov 2003.

FERNANDES, E. S. *et al.* Cytokines and neutrophils as important mediators of platelet-activating factor-induced kinin B1 receptor expression. *Br J Pharmacol* [S.I.], v. 146, n. 2, p. 209-16, Sep 2005.

FERRETTI, M. E. *et al.* Modulation of neutrophil phospholipase C activity and cyclic AMP levels by fMLP-OME analogues. *Cell Signal* [S.I.], v. 13, n. 4, p. 233-40, Apr 2001.

FILIPENKO, N. R. *et al.* Annexin A2 is a novel RNA-binding protein. *J Biol Chem* [S.I.], v. 279, n. 10, p. 8723-31, Mar 5 2004.

FORTIN, C. F. *et al.* Autocrine role of endogenous interleukin-18 on inflammatory cytokine generation by human neutrophils. *FASEB J* [S.I.], v. 23, n. 1, p. 194-203, Jan 2009.

FOSSEY, S. C. *et al.* Identification and characterization of PRKCBP1, a candidate RACK-like protein. *Mamm Genome* [S.I.], v. 11, n. 10, p. 919-25, Oct 2000.

GABRIJELCIC, J. *et al.* Neutrophil airway influx by platelet-activating factor in asthma: role of adhesion molecules and LT<sub>B4</sub> expression. *Eur Respir J* [S.I.], v. 22, n. 2, p. 290-7, Aug 2003.

GALLIN, J. I. Neutrophil specific granule deficiency. *Annu Rev Med* [S.I.], v. 36, p. 263-74, 1985.

GARCIA, M. C. *et al.* Biosynthesis of platelet-activating factor (PAF) in human polymorphonuclear leucocytes. The role of lyso-PAF disposal and free arachidonic acid. *Biochem J* [S.I.], v. 268, n. 1, p. 91-8, May 15 1990.

GORG, A. *et al.* The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis* [S.I.], v. 21, n. 6, p. 1037-53, Apr 2000.

HALAMA, N. *et al.* Comparative integromics on the breast cancer-associated gene KIAA1632: clues to a cancer antigen domain. *Int J Oncol* [S.I.], v. 31, n. 1, p. 205-10, Jul 2007.

HASLETT, C. *et al.* Modulation of multiple neutrophil functions by preparative methods or trace concentrations of bacterial lipopolysaccharide. *Am J Pathol* [S.I.], v. 119, n. 1, p. 101-10, Apr 1985.

- HEYTING, C. Synaptonemal complexes: structure and function. *Curr Opin Cell Biol* [S.I.], v. 8, n. 3, p. 389-96, Jun 1996.
- ICHIKAWA, H. *et al.* Molecular mechanisms of anoxia/reoxygenation-induced neutrophil adherence to cultured endothelial cells. *Circ Res* [S.I.], v. 81, n. 6, p. 922-31, Dec 1997.
- IVETIC, A.; RIDLEY, A. J. The telling tail of L-selectin. *Biochem Soc Trans* [S.I.], v. 32, n. Pt 6, p. 1118-21, Dec 2004.
- JETHWANNEY, D. *et al.* Proteomic analysis of plasma membrane and secretory vesicles from human neutrophils. *Proteome Sci* [S.I.], v. 5, p. 12, 2007.
- JIN, X. *et al.* Capillary electrophoresis/tandem mass spectrometry for analysis of proteins from two-dimensional sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. *Rapid Commun Mass Spectrom* [S.I.], v. 13, n. 23, p. 2327-34, 1999.
- JOBERTY, G. *et al.* The Borgs, a new family of Cdc42 and TC10 GTPase-interacting proteins. *Mol Cell Biol* [S.I.], v. 19, n. 10, p. 6585-97, Oct 1999.
- JUNQUEIRA, M. *et al.* Protein identification pipeline for the homology-driven proteomics. *J Proteomics* [S.I.], v. 71, n. 3, p. 346-56, Aug 21 2008.
- KERKHOFF, C. *et al.* The arachidonic acid-binding protein S100A8/A9 promotes NADPH oxidase activation by interaction with p67phox and Rac-2. *FASEB J* [S.I.], v. 19, n. 3, p. 467-9, Mar 2005.
- KHREISS, T. *et al.* Activation of extracellular signal-regulated kinase couples platelet-activating factor-induced adhesion and delayed apoptosis of human neutrophils. *Cell Signal* [S.I.], v. 16, n. 7, p. 801-10, Jul 2004.
- KIKUCHI, M. *et al.* Proteomic analysis of rat liver peroxisome: presence of peroxisome-specific isozyme of Lon protease. *J Biol Chem* [S.I.], v. 279, n. 1, p. 421-8, Jan 2 2004.
- KITCHEN, E. *et al.* Demonstration of reversible priming of human neutrophils using platelet-activating factor. *Blood* [S.I.], v. 88, n. 11, p. 4330-7, Dec 1 1996.
- KRUMP, E. *et al.* Chemotactic peptide N-formyl-met-leu-phe activation of p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) and MAPK-activated protein kinase-2 in human neutrophils. *J Biol Chem* [S.I.], v. 272, n. 2, p. 937-44, Jan 10 1997.
- KUIJPERS, T. W. Neutrophils. *Encyclopedia of life/Nature Publishing Group* [S.I.], p. 1-10, 2001.
- LAUGESEN, S.; ROEPSTORFF, P. Combination of two matrices results in improved performance of MALDI MS for peptide mass mapping and protein analysis. *J Am Soc Mass Spectrom* [S.I.], v. 14, n. 9, p. 992-1002, Sep 2003.
- LE, Y. *et al.* Formyl-peptide receptors revisited. *Trends Immunol* [S.I.], v. 23, n. 11, p. 541-8, Nov 2002.
- LEE, W. L. *et al.* Phagocytosis by neutrophils. *Microbes Infect* [S.I.], v. 5, n. 14, p. 1299-306, Nov 2003.

- LEE, Y. M. *et al.* Platelet-activating factor induces lung inflammation and leak in rats: hydrogen peroxide production along neutrophil-lung endothelial cell interfaces. *J Lab Clin Med* [S.I.], v. 140, n. 5, p. 312-9, Nov 2002.
- LI, K. J. *et al.* Release of surface-expressed lactoferrin from polymorphonuclear neutrophils after contact with CD4+ T cells and its modulation on Th1/Th2 cytokine production. *J Leukoc Biol* [S.I.], v. 80, n. 2, p. 350-8, Aug 2006.
- LIAN, J. P. *et al.* Antagonists of calcium fluxes and calmodulin block activation of the p21-activated protein kinases in neutrophils. *J Immunol* [S.I.], v. 166, n. 4, p. 2643-50, Feb 15 2001.
- LIU, S. F.; MALIK, A. B. NF-kappa B activation as a pathological mechanism of septic shock and inflammation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* [S.I.], v. 290, n. 4, p. L622-L645, Apr 2006.
- LOMINADZE, G. *et al.* Proteomic analysis of human neutrophil granules. *Mol Cell Proteomics* [S.I.], v. 4, n. 10, p. 1503-21, Oct 2005.
- LOUREIRO, J. A. S. C. Aplicação da Citometria de Fluxo ao estudo do Genoma Vegetal. *Métodos em Biotecnologia - Citometria de Fluxo I.* [S.I.].
- MATHISON, R. D. *et al.* Modulation of neutrophil function by the tripeptide feG. *BMC Immunol* [S.I.], v. 4, p. 3, Mar 4 2003.
- MCMANUS, L. M.; PINCKARD, R. N. PAF, a putative mediator of oral inflammation. *Crit Rev Oral Biol Med* [S.I.], v. 11, n. 2, p. 240-58, 2000.
- MINEKI, R. *et al.* In situ alkylation with acrylamide for identification of cysteinyl residues in proteins during one- and two-dimensional sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Proteomics* [S.I.], v. 2, n. 12, p. 1672-81, Dec 2002.
- MOIR, R. D.; WILLIS, I. M. Tetratricopeptide repeats of Tfc4 and a limiting step in the assembly of the initiation factor TFIIB. *Adv Protein Chem* [S.I.], v. 67, p. 93-121, 2004.
- MONTRUCCHIO, G. *et al.* Role of platelet-activating factor in cardiovascular pathophysiology. *Physiol Rev* [S.I.], v. 80, n. 4, p. 1669-99, Oct 2000.
- MOREL, E. *et al.* Annexin A2-dependent polymerization of actin mediates endosome biogenesis. *Dev Cell* [S.I.], v. 16, n. 3, p. 445-57, Mar 2009.
- MURAV'EV, R. A. *et al.* [Gelatinase granules of the neutrophil granulocytes]. *Izv Akad Nauk Ser Biol* [S.I.], n. 4, p. 389-94, Jul-Aug 2003.
- NAKAYAMA, M. *et al.* Protein-protein interactions between large proteins: two-hybrid screening using a functionally classified library composed of long cDNAs. *Genome Res* [S.I.], v. 12, n. 11, p. 1773-84, Nov 2002.
- NI, X. *et al.* Isolation and characterization of a novel human NM23-H1B gene, a different transcript of NM23-H1. *J Hum Genet* [S.I.], v. 48, n. 2, p. 96-100, 2003.
- NICK, J. A. *et al.* Common and distinct intracellular signaling pathways in human neutrophils utilized by platelet activating factor and FMLP. *J Clin Invest* [S.I.], v. 99, n. 5, p. 975-86, Mar 1 1997.

NIELSEN, M. J.; MOESTRUP, S. K. Receptor targeting of hemoglobin mediated by the haptoglobins: roles beyond heme scavenging. *Blood* [S.l.], v. 114, n. 4, p. 764-71, Jul 23 2009.

OKABE-KADO, J. *et al.* Expression of cell surface NM23 proteins of human leukemia cell lines of various cellular lineage and differentiation stages. *Leuk Res* [S.l.], v. 26, n. 6, p. 569-76, Jun 2002.

\_\_\_\_\_. Extracellular NM23-H1 protein inhibits the survival of primary cultured normal human peripheral blood mononuclear cells and activates the cytokine production. *Int J Hematol* [S.l.], v. 90, n. 2, p. 143-52, Sep 2009.

PABA, J. *et al.* Proteomic analysis of *Trypanosoma cruzi* developmental stages using isotope-coded affinity tag reagents. *J Proteome Res* [S.l.], v. 3, n. 3, p. 517-24, May-Jun 2004.

PALMA, M. S. M., M.A.; MARQUES, M.R.;SOUZA B.M.;SANTOS, L.D. AND SANTOS, K.S. . Fundamentos em Análise Proteômica.

PENNA, C. *et al.* Platelet activating factor: the good and the bad in the ischemic/reperfused heart. *Exp Biol Med (Maywood)* [S.l.], v. 236, n. 4, p. 390-401, Apr 1.

PILLAY, J. *et al.* The systemic inflammatory response induced by trauma is reflected by multiple phenotypes of blood neutrophils. *Injury* [S.l.], v. 38, n. 12, p. 1365-72, Dec 2007.

POLTICELLI, F. *et al.* Human haptoglobin structure and function--a molecular modelling study. *FEBS J* [S.l.], v. 275, n. 22, p. 5648-56, Nov 2008.

PRISCILA RANDAZZO DE MOURA, F. A. P. V. Transdução de sinais: uma revisão sobre proteína G. *Scientia Medica* [S.l.], v. 21, n. 1, p. 31-36, 2011.

PROSSNITZ, E. R.; YE, R. D. The N-formyl peptide receptor: a model for the study of chemoattractant receptor structure and function. *Pharmacol Ther* [S.l.], v. 74, n. 1, p. 73-102, 1997.

PUTNAM, C. D. *et al.* Active and inhibited human catalase structures: ligand and NADPH binding and catalytic mechanism. *J Mol Biol* [S.l.], v. 296, n. 1, p. 295-309, Feb 11 2000.

RADA, B.; LETO, T. L. Oxidative innate immune defenses by Nox/Duox family NADPH oxidases. *Contrib Microbiol* [S.l.], v. 15, p. 164-87, 2008.

RAMAGLI, L. S. A. R., L.V. Quantitation of microgram amounts of protein in two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis sample buffet. *Electrophoresis* [S.l.], v. 6, p. 559-563, 1985.

RESCHER, U. *et al.* Tyrosine phosphorylation of annexin A2 regulates Rho-mediated actin rearrangement and cell adhesion. *J Cell Sci* [S.l.], v. 121, n. Pt 13, p. 2177-85, Jul 1 2008.

RODRÍGUEZ, C. G. *Biosíntesis del Factor Activador de las Plaquetas en los Leucocitos Polimorfonucleares Humanos. Estudio de los Mecanismos Implicados en la Trasduccions de la Señal.* (1993). 237 f. (Tesis Doctoral) - Facultad de Ciências Químicas -Departamento de Bioquímica y Biología Molecular Universidad Complutense de Madrid, 1993.

RODRIGUEZ, J. *et al.* Does trypsin cut before proline? *J Proteome Res* [S.I.], v. 7, n. 1, p. 300-5, Jan 2008.

SANTOS, K. C. *Análise Proteômica Comparativa entre Neutrófilos não Ativados e Neutrófilos Ativados com PMA, Um Análogo do Diacilglicerol.* (2007). (Dissertação de Mestrado) - Programa de pós graduação em Patologia Molecular, Laboratório de Bioquímica e Química de Proteínas, Departamento de Biologia Celular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília, 2007.

SCHRAMM, L.; HERNANDEZ, N. Recruitment of RNA polymerase III to its target promoters. *Genes Dev* [S.I.], v. 16, n. 20, p. 2593-620, Oct 15 2002.

SEIPEL, K. *et al.* Tara, a novel F-actin binding protein, associates with the Trio guanine nucleotide exchange factor and regulates actin cytoskeletal organization. *J Cell Sci* [S.I.], v. 114, n. Pt 2, p. 389-99, Jan 2001.

SELVATICI, R. *et al.* Signal transduction pathways triggered by selective formylpeptide analogues in human neutrophils. *Eur J Pharmacol* [S.I.], v. 534, n. 1-3, p. 1-11, Mar 18 2006.

SHEPPARD, F. R. *et al.* Structural organization of the neutrophil NADPH oxidase: phosphorylation and translocation during priming and activation. *J Leukoc Biol* [S.I.], v. 78, n. 5, p. 1025-42, Nov 2005.

\_\_\_\_\_. Clinically relevant osmolar stress inhibits priming-induced PMN NADPH oxidase subunit translocation. *J Trauma* [S.I.], v. 58, n. 4, p. 752-7; discussion 757, Apr 2005.

SILLIMAN, C. C. *et al.* Tumor necrosis factor-alpha causes release of cytosolic interleukin-18 from human neutrophils. *Am J Physiol Cell Physiol* [S.I.], v. 298, n. 3, p. C714-24, Mar.

SILVA, T. L. R., A. , HEWITT C. AND ROSEIRO, J.C. . Citometria de fluxo - Funcionalidade celular on-line em bioprocessos. *Métodos em Biotecnologia - Citometria de Fluxo II* [S.I.], 2004.

SOEHNLEIN, O. *et al.* Neutrophil granule proteins tune monocytic cell function. *Trends Immunol* [S.I.], v. 30, n. 11, p. 538-46, Nov 2009.

SPSS. *SPSS® 13.0 Base User's Guide.* Chicago, USA. 2004

STASSEN, N. A. *et al.* IL-18 promoter polymorphisms correlate with the development of post-injury sepsis. *Surgery* [S.I.], v. 134, n. 2, p. 351-6, Aug 2003.

STEEL, H. C.; ANDERSON, R. Dissociation of the PAF-receptor from NADPH oxidase and adenylate cyclase in human neutrophils results in accelerated influx and delayed clearance of cytosolic calcium. *Br J Pharmacol* [S.I.], v. 136, n. 1, p. 81-9, May 2002.

SWAIN S.D. , R. T. T., AND QUINN M.T. . Neutrophil Priming in Host Defense: Role of Oxidants as Priming Agents. *ANTIOXIDANTS & REDOX SIGNALING* [S.I.], v. 4, n. 1, p. 69-83, 2002.

SZYMANSKI, D. Tubulin folding cofactors: half a dozen for a dimer. *Curr Biol* [S.I.], v. 12, n. 22, p. R767-9, Nov 19 2002.

- TELES, L. M. *et al.* Comparison of the neutrophil proteome in trauma patients and normal controls. *Protein Pept Lett* [S.I.], v. 19, n. 6, p. 663-72, Jun 1.
- THINGHOLM, T. E. *et al.* Highly selective enrichment of phosphorylated peptides using titanium dioxide. *Nat Protoc* [S.I.], v. 1, n. 4, p. 1929-35, 2006.
- TSYTLONOK, M.; ITZHAKI, L. S. The how's and why's of protein folding intermediates. *Arch Biochem Biophys* [S.I.], Oct 23.
- URIARTE, S. M. *et al.* Comparison of proteins expressed on secretory vesicle membranes and plasma membranes of human neutrophils. *J Immunol* [S.I.], v. 180, n. 8, p. 5575-81, Apr 15 2008.
- VALENTIJJN, L. J. *et al.* Read-through transcript from NM23-H1 into the neighboring NM23-H2 gene encodes a novel protein, NM23-LV. *Genomics* [S.I.], v. 87, n. 4, p. 483-9, Apr 2006.
- VAN EEDEN, S. F. *et al.* The use of flow cytometry to measure neutrophil function. *J Immunol Methods* [S.I.], v. 232, n. 1-2, p. 23-43, Dec 17 1999.
- VERHEY, K. J.; GAERTIG, J. The tubulin code. *Cell Cycle* [S.I.], v. 6, n. 17, p. 2152-60, Sep 1 2007.
- VINSON, S. M. *et al.* Neutrophil adherence to bladder microvascular endothelial cells following platelet-activating factor acetylhydrolase inhibition. *J Pharmacol Exp Ther* [S.I.], v. 314, n. 3, p. 1241-7, Sep 2005.
- VOLIN, M. V.; KOCH, A. E. Interleukin-18: a mediator of inflammation and angiogenesis in rheumatoid arthritis. *J Interferon Cytokine Res* [S.I.], v. 31, n. 10, p. 745-51, Oct.
- VON DEN DRIESCH, P. *et al.* Adhesion of neutrophils to epidermal cells: prerequisites for and blocking by anti-CD11b antibodies. *Arch Dermatol Res* [S.I.], v. 289, n. 12, p. 692-7, Nov 1997.
- VONG, Q. P. *et al.* A role for borg5 during trophectoderm differentiation. *Stem Cells* [S.I.], v. 28, n. 6, p. 1030-8, Jun.
- WAGNER, J. G.; ROTH, R. A. Neutrophil migration mechanisms, with an emphasis on the pulmonary vasculature. *Pharmacol Rev* [S.I.], v. 52, n. 3, p. 349-74, Sep 2000.
- WITTMANN, S. *et al.* Characterization of the human fMLP receptor in neutrophils and in *Xenopus* oocytes. *Br J Pharmacol* [S.I.], v. 135, n. 6, p. 1375-82, Mar 2002.
- WOJCIK, C.; DI NAPOLI, M. Ubiquitin-proteasome system and proteasome inhibition: new strategies in stroke therapy. *Stroke* [S.I.], v. 35, n. 6, p. 1506-18, Jun 2004.
- WRONA, M. *et al.* Reactivity of 2',7'-dichlorodihydrofluorescein and dihydrorhodamine 123 and their oxidized forms toward carbonate, nitrogen dioxide, and hydroxyl radicals. *Free Radic Biol Med* [S.I.], v. 38, n. 2, p. 262-70, Jan 15 2005.
- XU, P. *et al.* Subproteome analysis of the neutrophil cytoskeleton. *Proteomics* [S.I.], v. 9, n. 7, p. 2037-49, Apr 2009.
- YU, L. *et al.* NF-kappaB regulates the transcription of protein tyrosine kinase Tec. *FEBS J* [S.I.], v. 276, n. 22, p. 6714-24, Nov 2009.



ZEN, K.; LIU, Y. Role of different protein tyrosine kinases in fMLP-induced neutrophil transmigration. *Immunobiology* [S.I.], v. 213, n. 1, p. 13-23, 2008.

ZHANG, M. *et al.* Selective inactivation of a human neuronal silencing phosphatase by a small molecule inhibitor. *ACS Chem Biol* [S.I.], v. 6, n. 5, p. 511-9, May 20.

\_\_\_\_\_. Structural and functional analysis of the phosphoryl transfer reaction mediated by the human small C-terminal domain phosphatase, Scp1. *Protein Sci* [S.I.], v. 19, n. 5, p. 974-86, May.

ZHANG, X. *et al.* An improved method of sample preparation on AnchorChip targets for MALDI-MS and MS/MS and its application in the liver proteome project. *Proteomics* [S.I.], v. 7, n. 14, p. 2340-9, Jul 2007.

ZHANG, Y. *et al.* Determinants for dephosphorylation of the RNA polymerase II C-terminal domain by Scp1. *Mol Cell* [S.I.], v. 24, n. 5, p. 759-70, Dec 8 2006.

ZHU, X. *et al.* Effects of ropivacaine on adhesion molecule CD11b expression and function in human neutrophils. *Int Immunopharmacol* [S.I.], v. 10, n. 6, p. 662-7, Jun.

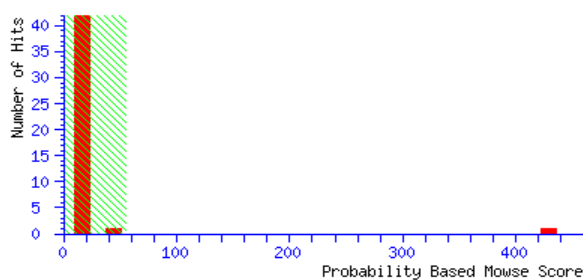
## 8. ANEXOS

### *{MATRIX}* Mascot Search Results

User : Carlos Garcia  
Email : scarlogarcia@gmail.com  
Search title : 38A  
Database : SwissProt 54.4 (287050 sequences; 105598259 residues)  
Taxonomy : Homo sapiens (human) (17565 sequences)  
Timestamp : 11 Nov 2007 at 17:34:16 GMT  
Top Score : 429 for **VIME\_HUMAN**, Vimentin - Homo sapiens (Human)

#### Probability Based Mowse Score

Protein score is  $-10 \cdot \log(P)$ , where P is the probability that the observed match is a random event.  
Protein scores greater than 55 are significant ( $p < 0.05$ ).



- |  |             |            |                 |                     |
|--|-------------|------------|-----------------|---------------------|
| <a href="#">VIME_HUMAN</a>                                   | Mass: 53676 | Score: 429 | Expect: 2.2e-39 | Queries matched: 45 |
| Vimentin - Homo sapiens (Human)                              |             |            |                 |                     |
| <a href="#">DESM_HUMAN</a>                                   | Mass: 53560 | Score: 23  | Expect: 90      | Queries matched: 8  |
| Desmin - Homo sapiens (Human)                                |             |            |                 |                     |
| <a href="#">HIG2A_HUMAN</a>                                  | Mass: 11578 | Score: 18  | Expect: 3.1e+02 | Queries matched: 2  |
| HIG1 domain family member 2A - Homo sapiens (Human)          |             |            |                 |                     |
| <a href="#">CDN2D_HUMAN</a>                                  | Mass: 17689 | Score: 17  | Expect: 3.2e+02 | Queries matched: 3  |
| Cyclin-dependent kinase 4 inhibitor D - Homo sapiens (Human) |             |            |                 |                     |
| <a href="#">OR4KF_HUMAN</a>                                  | Mass: 36916 | Score: 17  | Expect: 3.6e+02 | Queries matched: 4  |
| Olfactory receptor 4K15 - Homo sapiens (Human)               |             |            |                 |                     |

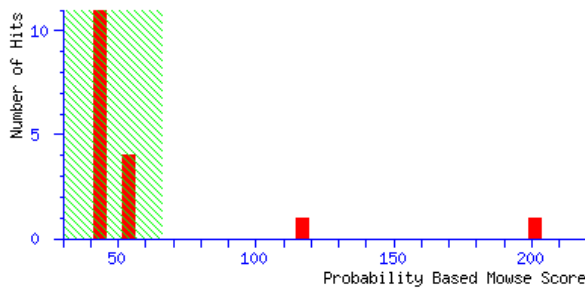
**Figura 38:** Resultado da busca do *spot* 521 proveniente de um gel de 300µg de proteínas. Essa identificação foi realizada na Dinamarca.

# *MATRIX* SCIENCE Mascot Search Results

User : Elaine  
 Email : elaineaquino@unb.br  
 Search title : Neut\_198C  
 Database : NCBIInr 20100108 (10291680 sequences; 3511877860 residues)  
 Taxonomy : Homo sapiens (human) (229196 sequences)  
 Timestamp : 14 Jan 2010 at 19:18:55 GMT  
 Top Score : 201 for [gi|62414289](#), vimentin [Homo sapiens]

## Probability Based Mowse Score

Protein score is  $-10 \cdot \log(P)$ , where P is the probability that the observed match is a random event. Protein scores greater than 66 are significant ( $p < 0.05$ ).



## Concise Protein Summary Report

1.	<a href="#">gi 62414289</a>	Mass: 53676	Score: <b>201</b>	Expect: 1.8e-15	Queries matched: 25
	vimentin [Homo sapiens]				
	<a href="#">gi 62896523</a>	Mass: 53708	Score: <b>199</b>	Expect: 2.9e-15	Queries matched: 25
	vimentin variant [Homo sapiens]				
	<a href="#">gi 167887751</a>	Mass: 49680	Score: <b>192</b>	Expect: 1.4e-14	Queries matched: 24
	vimentin variant 3 [Homo sapiens]				
	<a href="#">gi 193787214</a>	Mass: 47062	Score: <b>188</b>	Expect: 3.6e-14	Queries matched: 23
	unnamed protein product [Homo sapiens]				
	<a href="#">gi 340219</a>	Mass: 53738	Score: <b>187</b>	Expect: 4.6e-14	Queries matched: 24
	vimentin [Homo sapiens]				
	<a href="#">gi 47115317</a>	Mass: 53604	Score: <b>186</b>	Expect: 5.8e-14	Queries matched: 24
	VIM [Homo sapiens]				
	<a href="#">gi 21757045</a>	Mass: 52463	Score: <b>175</b>	Expect: 7.2e-13	Queries matched: 23
	unnamed protein product [Homo sapiens]				
	<a href="#">gi 16552261</a>	Mass: 47516	Score: <b>168</b>	Expect: 3.6e-12	Queries matched: 22
	unnamed protein product [Homo sapiens]				
	<a href="#">gi 340234</a>	Mass: 35089	Score: <b>127</b>	Expect: 4.6e-08	Queries matched: 16
	vimentin [Homo sapiens]				
	<a href="#">gi 167887748</a>	Mass: 26956	Score: <b>81</b>	Expect: 0.0019	Queries matched: 11
	vimentin variant 4 [Homo sapiens]				
	<a href="#">gi 57471647</a>	Mass: 20138	Score: 46	Expect: 5.5	Queries matched: 6
	vimentin [Homo sapiens]				
<hr/>					
2.	<a href="#">gi 5030431</a>	Mass: 41651	Score: <b>117</b>	Expect: 4.6e-07	Queries matched: 17
	vimentin [Homo sapiens]				

**Figura 39:** Resultado da busca do *spot* 521 proveniente de um gel de 50µg de proteínas. Essa identificação foi realizada no Laboratório de Bioquímica e Química de Proteínas.

## *{MATRIX}* Mascot Search Results

### Protein View

Match to: VIME\_HUMAN Score: 429 Expect: 2.2e-39  
Vimentin - Homo sapiens (Human)

Nominal mass ( $M_r$ ): 53676; Calculated pI value: 5.06  
NCBI BLAST search of [VIME\\_HUMAN](#) against nr  
Unformatted [sequence string](#) for pasting into other applications

Taxonomy: [Homo sapiens](#)

Fixed modifications: Carbamidomethyl (C)  
Variable modifications: Oxidation (M)  
Cleavage by Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P  
Number of mass values searched: 88  
Number of mass values matched: 45  
Sequence Coverage: 84%

Matched peptides shown in **Bold Red**

```
1 MSTRSVSSSS YRRMFGGPGT ASRPSSRSY VTTSTRTYSL GSALRPSTSR
51 SLYASSPGGV YATRSSAVRL RSSVPGVRL QDSVDFSLAD AINTEFKNTR
101 TNEKVELQEL NDRFANYIDK VRFLEQQNKI LLAELEQLKG QGKSRLGDLY
151 EEEMRELRQ VDQLTNDKAR VEVERDNLAE DIMRLREKLQ EEMLQREEAE
201 NTLQSFQDV DNASLARLDL ERKVESLQEE IAFLLKLEHEE EIQLQAQIQ
251 EQHVQIDVDV SKPDLTAALR DVRQQYESVA AKNLQEAEEW YKSKFADLSE
301 AANRNNDALR QAKQESTEYR RQVQSLTCEV DALKGTNESL ERQMREMEEN
351 FAVEAANYQD TIGRLQDEIQ NMKEEMARHL REYQDLLNVK MALDIEIATY
401 RKLLEGEESR ISLPLPNFSS LNLRETNLDS LPLVDTHSKR TLLIKTVETR
451 DGQVINETSQ HHHDDLE
```

Figura 40: Cobertura da proteína identificada na Dinamarca

## *{MATRIX}* Mascot Search Results

### Protein View

Match to: gi|62414289 Score: 201 Expect: 1.8e-15  
vimentin [Homo sapiens]

Nominal mass ( $M_r$ ): 53676; Calculated pI value: 5.06  
NCBI BLAST search of [gi|62414289](#) against nr  
Unformatted [sequence string](#) for pasting into other applications

Fixed modifications: Carbamidomethyl (C)  
Variable modifications: Acetyl (Protein N-term), Oxidation (M)  
Cleavage by Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P  
Number of mass values searched: 68  
Number of mass values matched: 25  
Sequence Coverage: 49%

Matched peptides shown in **Bold Red**

```
1 MSTRSVSSSS YRRMFGGPGT ASRPSSRSY VTTSTRTYSL GSALRPSTSR
51 SLYASSPGGV YATRSSAVRL RSSVPGVRL QDSVDFSLAD AINTEFKNTR
101 TNEKVELQEL NDRFANYIDK VRFLEQQNKI LLAELEQLKG QGKSRLGDLY
151 EEEMRELRQ VDQLTNDKAR VEVERDNLAE DIMRLREKLQ EEMLQREEAE
201 NTLQSFQDV DNASLARLDL ERKVESLQEE IAFLLKLEHEE EIQLQAQIQ
251 EQHVQIDVDV SKPDLTAALR DVRQQYESVA AKNLQEAEEW YKSKFADLSE
301 AANRNNDALR QAKQESTEYR RQVQSLTCEV DALKGTNESL ERQMREMEEN
351 FAVEAANYQD TIGRLQDEIQ NMKEEMARHL REYQDLLNVK MALDIEIATY
401 RKLLEGEESR ISLPLPNFSS LNLRETNLDS LPLVDTHSKR TLLIKTVETR
451 DGQVINETSQ HHHDDLE
```

Figura 41: Cobertura da proteína identificada no Laboratório de Bioquímica e Química de Proteínas