

Anne Caroline Dias Neves

**Influência do estímulo por PAF no perfil de abundância proteica em
neutrófilos: Uma abordagem proteômica**

Brasília

2015

Anne Caroline Dias Neves

**Influência do estímulo por PAF no perfil de abundância proteica em
neutrófilos: Uma abordagem proteômica**

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

Brasília

2015

DEDICATÓRIA

Agradeço a Deus em primeiro lugar:
por oferecer a vida
a saúde, a paz, a sabedoria e a fé.

Por Ele colocar na minha vida a família maravilhosa que tenho, meus irmãos (Gustavo e Leonardo) e cunhadas (Janaína e Savana), meus sobrinhos que são a alegria da minha vida (Alice Vitória, Pedro Henrique e Ana Sofia), minhas primas e meus tios.
Em especial agradeço á Deus pelos pais maravilhosos que tenho, Raimundo e Fátima, que sempre me apoiaram em todas as decisões, me insentivando e me amando acima de tudo. O amor que sinto por meus pais é inesgotável. São pessoas que me ensinaram a amar, a respeitar, a lutar pelos meus objetivos e acima de tudo amar à Deus.

“Aquele que habita no esconderijo do Altíssimo
á sombra do Onipotente descansará
Direi do Senhor:
é o meu Deus,
o meu refúgio,
a minha fortaleza
e nele confiarei.” (Salmo 91)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por Ele colocar ao longo da minha vida, pessoas maravilhosas que sempre estiveram do meu lado, tanto nos momentos difíceis como nos momentos felizes. Quero agradecer meus amigos e companheiros de laboratório: Luz Helena, Muhammad Tahir, Samina, Micaela, Jéssica, Andreia, Diego, Jaques, Diana, Antônio e Nuno. E aos professores Marcelo Vale, Carlos André, Sebastien, Fabiane, Mariana e Consuelo.

Agradeço a amizade da Elaine, que durante o tempo que passei na UnB me ensinou e deu o apoio para a conclusão do mestrado e doutorado.

Agradeço de forma especial o professor Martin Rossel Larsen (supervisor) e Ole Jensen (diretor do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular) pela oportunidade que tive de trabalhar juntamente com o *PRgroup* na *University of Southern Denmark* colaborando para a conclusão desse trabalho. Nessa jornada de doutorado sanduiche, agradeço principalmente ao professor Peter Roepstorff e Lene B. Horning pelo acolhimento e carinho, assim como aos amigos Loreta Bllaci, Serafina Gallina, Mary Joy, Ea Boleyn, Lilya Dridi, Renata Blatnik, Maria Ibanez, Veit, Lars e Marta.

Agradeço pelo companheirismo e amizade do Thiago Verano e Marcella Braga que durante minha permanência em Odense foram meus amigos e minha família. Principalmente a Marcella que me ajudou nos trabalhos realizados na *University of Southern Denmark*.

Em especial agradeço meu orientador Wagner Fontes, por ter aberto as portas do laboratório me dando a oportunidade de conquistar um objetivo de vida. Por ser um orientador sempre presente e amigo.

RESUMO

Durante o processo inflamatório são ativadas uma quantidade grande de células, entre elas se destacam os leucócitos polimorfonucleares neutrófilos por serem os mais abundantes do sangue periférico (40% a 70% das células brancas) e por chegarem primeiro ao local da injúria tecidual ou local da infecção. O conhecimento dos mecanismos de ativação desse tipo celular torna-se importante para se compreender a regulação imunológica em diversas situações patológicas, sendo algumas destas conseqüentes à falha na regulação de ativação de polimorfonucleares. Os casos mais comuns encontrados são nas complicações da doença granulomatosa crônica, doença pulmonar obstrutiva crônica, síndrome da angústia respiratória aguda, artrite reumatóide e síndrome da resposta inflamatória sistêmica. Pesquisas relataram que o Fator de Agregação Plaquetária (PAF) está relacionado à ativação dos neutrófilos nessas condições, onde o estudo das proteínas e das suas modificações pós traducionais tornam-se pontos centrais para entender a sinalização celular dos neutrófilos nas doenças citadas anteriormente. No presente trabalho foi feito o estudo proteômico de neutrófilos quiescentes com a identificação de mais de 3000 proteínas e de neutrófilos estimulados pelo PAF que revelou um perfil protéico que caracteriza essa estimulação, onde proteínas que fazem parte de processos essenciais tiveram a abundância aumentada como reorganização do citoesqueleto, sinalização intracelular mediada por RAS e Proteína G, subunidades da ATPases vacuolar, e alguns produtos característico do processo inflamatório como NF κ B e prostaglandina E. Por outro lado, como os neutrófilos estão em seu estado estimulado outras proteínas tiveram abundância diminuída, entre elas proteínas responsáveis pelo processo de diferenciação e amadurecimento dos neutrófilos e proteínas que fazem parte do sistema de controle de processos essenciais da célula como síntese de proteínas, metabolismo energético e motilidade celular. A identificação de proteínas acetiladas nos indicou as possíveis proteínas alvos para regulação de importantes vias de estimulação dos neutrófilos como tradução, formação estrutural do núcleo multilobulado dos neutrófilos, transporte de vitamina B12, assim como em pontos de regulação na síntese de ATP e de subunidades de ATPases. A identificação dessas proteínas com abundância diferencial e acetiladas é de fundamental importância para indicar possíveis alvos terapêuticos de doenças auto-imunes e inflamatórias causadas pelo PAF.

ABSTRACT

During the inflammatory process is activated a large number of cells, these include polymorphonuclear neutrophil leukocytes to be the most abundant in the peripheral blood (40% to 70% of white cells) and reaching the first site of tissue injury or local infection. Knowledge of this type of cellular activation mechanisms becomes important to understand the immune regulation in various pathological situations, some of these failed in the subsequent activation of polymorphonuclear regulation. The most common cases are found in the complications of chronic granulomatous disease, chronic obstructive pulmonary disease, acute respiratory distress syndrome, rheumatoid arthritis and systemic inflammatory response syndrome. Research reported that platelet aggregation factor (PAF) is related to the activation of neutrophils such conditions, where the study of proteins and their post-translational modifications become key points to understand cell signaling in neutrophils in the above-mentioned diseases. In the present work was done the proteomic study of quiescent neutrophils with the identification of over 3,000 proteins and neutrophils stimulated by PAF which revealed a protein profile that characterizes this stimulation, in which proteins that are part of key processes had increased abundance as reorganization cytoskeleton, intracellular signaling mediated by Ras and G-protein subunits of vacuolar ATPases, and some typical products of the inflammatory process as NF κ B and prostaglandin E. On the other hand, since neutrophils are stimulated in their state had decreased abundance other proteins, including proteins responsible for the process of differentiation and maturation of neutrophils and proteins that are part of the key process control system of the cell as protein synthesis, metabolism energy and cell motility. The identification of acetylated proteins indicated the possible targets proteins for regulation of important pathways stimulation of neutrophils such as translation, formation of the structural core of the multi-lobed neutrophil, vitaminda B12 transportation, as well as set points in the synthesis of ATP and of subunit ATPases. Identifying these proteins with differential abundance and acetylated is fundamental to indicate possible therapeutic targets for autoimmune and inflammatory diseases caused by PAF.

ÍNDICE DO TEXTO

I.	INTRODUÇÃO	18
1.	Neutrófilos	18
1.1.	Morfologia Celular	19
1.2.	Maturação Celular	21
1.2.1.	Grânulos Peroxidase Positivos	22
1.2.2.	Grânulos Peroxidase Negativos	23
1.2.3.	Vesículas secretórias	25
1.3.	Importância dos grânulos na ação dos neutrófilos	26
1.4.	Mecanismos de ação dos neutrófilos na resposta inflamatória	27
1.4.1.	Relações estimulação dos neutrófilos e processo de desgranulação	30
1.5.	Complexo NADPH Oxidase	31
1.6.	Fagocitose	36
1.7.	Apoptose	37
2.	Fator de Agregação Plaquetária (PAF)	40
2.1.	Variabilidade da estrutura química do PAF	41
2.2.	Biossíntese e Degradação do PAF	42
2.3.	Importância Clínica	44
2.4.	Receptor do PAF em neutrófilos	45
2.5.	Cascata de sinalização intracelular de neutrófilos estimulados pelo PAF	46
3.	Proteômica e Modificações Pós Traducionais	49
3.1.	Acetilação de proteínas	51
II.	JUSTIFICATIVAS	54
III.	OBJETIVO	56
IV.	METODOLOGIA	57
4.1.	Delineamento Experimental	57
4.2.	Amostras	58
4.3.	Métodos de avaliação das amostras	59

4.3.1. Pureza	59
4.3.2. Viabilidade Celular	60
4.3.3. Contagem de células	60
4.4. Ativação celular	61
4.4.1. NBT quantitativo	62
4.5. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	62
4.6. Lise Celular	63
4.7. Método de Análise de Aminoácidos	64
4.8. Redução, Alquilação e Digestão Triptica de proteínas	65
4.9. Marcação das amostras com iTRAQ	66
4.10. Modificação Pós Traducional	69
4.10.1. Dessalinização da amostra	69
4.10.2. Enriquecimento com anticorpo anti-acetilisina	69
4.11. HILIC	71
4.12. Nano-LC-MS/MS	72
4.12.1. Métodos de aquisição de dados no espectrômetro de massas	72
4.13. Análise de dados e estatística	73
V. RESULTADOS E DISCUSSÃO	75
5.1. Teste de ativação por NBT Quantitativo	75
5.2. Análise morfológica por MEV	76
5.3. Análise Proteômica	79
5.3.1. Quantificação de peptídios por análise de aminoácidos	79
5.3.2. Confirmação da marcação dos ions repórter	80
5.3.3. Confirmação de peptídios acetilados na FT-água-Acetilação	84
5.3.4. Análise do proteômica de neutrófilos não enriquecidos	85
5.3.5. Análise proteômica de neutrófilos estimulados com PAF	90
5.3.5.1. Proteínas com abundância aumentada	90
I. Grupo 1	92
II. Grupo 2	94
5.3.5.2. Proteínas com abundância diminuída	95
I. Grupo 1	101
II. Grupo 2	102

III. Grupo 3	104
IV. Grupo 4	105
V. Grupo 5	106
VI. Grupo 6	109
VII. Grupo 7	110
VIII. Grupo 8	111
IX. Grupo 9	112
X. Grupo 10	114
XI. Grupo 11	115
5.3.6. Proteínas acetiladas de neutrófilos estimulados com PAF	121
VI. CONCLUSÃO	124
VII. PERSPECTIVAS	126
REFERÊNCIAS	

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Morfologia dos neutrófilos quiescentes	19
Figura 2. Alterações morfológicas de neutrófilos ativados	20
Figura 3. Maturação dos neutrófilos	21
Figura 4. Defesa imune inata mediada por neutrófilos e moléculas de adesão	29
Figura 5. Formação de anion superóxido e peróxido de hidrogenio	30
Figura 6. Equação química para formação de ácido hipocloroso	31
Figura 7. Representação esquemática do citocromo b558	33
Figura 8. Proteína p47phox	34
Figura 9. Proteína p40phox	34
Figura 10. Proteína p67phox	35
Figura 11. Complexo NADPH oxidase	35
Figura 12. Apoptose em neutrófilos	39
Figura 13. Estrutura química do PAF	40
Figura 14. Cadeias laterais R1 para PAF	42
Figura 15. Biossíntese do PAF	42
Figura 16. Degradação do PAF	44
Figura 17. Sinalização intracelular dos neutrófilos estimulados com PAF	48
Figura 18. Estrutura química do reagente iTRAq	50
Figura 19. Delineamento Experimental	57
Figura 20. Tubo Falcon com as células separadas pelos gradientes	59
Figura 21. Câmara de Neubauer	61
Figura 22. Teste de NBT quantitativo	75
Figura 23. MEV de neutrófilos quiescentes e estimulados com PAF	77
Figura 24. Intensidade dos íons reporters- Amostra 1	81

Figura 25. Intensidade dos íons reporters- Amostra 2	81
Figura 26. Intensidade dos íons reporters- Amostra 3	82
Figura 27. Intensidade dos íons reporters- Amostra 4	82
Figura 28. Intensidade dos íons reporters- Amostra 5	83
Figura 29. Porcentagem da marcação iTRAq	84
Figura 30. Espectros MS/MS das amostras 1,2,3,4 e 5 da acetilação	85
Figura 31. Espectros MS/MS das amostras 2 e 4 da acetilação	86
Figura 32. Proteoma de neutrófilos não enriquecidos	86
Figura 33. Gene Ontology – Função Molecular	87
Figura 34. Gene Ontology – Processos Biológicos	88
Figura 35. Gene Ontology – Compartimento Celular	89
Figura 36. Enzimas de neutrófilos identificadasna fração não enriquecida	89
Figura 37. STRING das proteínas com abundância aumentada	92
Figura 38. Proteassoma 26 S	93
Figura 39. STRING das proteínas com abundância diminuída	101
Figura 40. Formação dos corpos multivesiculares	102
Figura 41. Complexo ESCRT III e proteínas acessórias	104
Figura 42. Formação do complexo ribossômico 80S	108
Figura 43. Cascata de sinalização das MAPKs	113
Figura 44. Enzimas reguladas	121
Figura 45. Visão Geral das identificações	122

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Proteínas encontradas nos grânulos azurofílicos	23
Tabela 2. Proteínas encontradas nos grânulos específicos	24
Tabela 3. Proteínas encontradas nos grânulos gelatinase	25
Tabela 4. Proteínas de membrana das vesículas secretórias	26
Tabela 5. Tipos e quantidades de reagentes no preparo dos gradientes	58
Tabela 6. Delineamento experimental dos ensaios realizados	62
Tabela 7. Marcação das amostras com iTRAq	68
Tabela 8. Quantidade de beads-TiO ₂ utilizadas nas incubações com as amostras	71
Tabela 9. Quantificação por análise de aminoácidos das amostras	80
Tabela 10. Porcentagem de marcação com iTRAq das amostras	83
Tabela 11. Tabela de proteínas reguladas com abundância aumentada	92
Tabela 12. Tabela de proteínas reguladas com abundância diminuída	95
Tabela 13. Enzimas reguladas	116
Tabela 14. Proteínas reguladas	121

SIGLAS E ABREVIACÕES

AAA: *Amino Acid Analysis* (análise de aminoácidos)

ACN: *Acetonitrile* (Acetonitrila)

Apaf: *Apoptotic protease activating factor 1* (Protease fator ativador de apoptose 1)

ATP: *Adenosine triphosphate* (Adenosina Trifosfato)

Bcl-2: *B cell lymphocytic leukemia proto-oncogene-2* (Proto-oncogene leukemia linfocítica de células B)

Bfl-1: *Anti-apoptotic gene A1* (Gene anti-apoptótico A1)

CaCo: Cacosilato

CD11b/CD18: integrina

CD15: carboidrato de adesão

CD62P: P-selectina

CFU: *colony forming unit* (unidade formadora de colônia)

CFS-GM: *colony forming unit granulocyte macrophage* (Unidade formadora de colônia granulócito macrófago)

CID: *Collision Induced Dissociation* (Dissociação induzida por colisão)

CR1: *Complement receptor type 1* (Receptor do complemento tipo 1)

CR3: *Complement receptor type 3* (Receptor do complemento tipo 3)

CRISP-3: *Cysteine rich secretory protein-3* (Proteína secretória 3 rica em cisteína)

CXC: Ligação cisteína - X - cisteína

DAF: *Decay accelerating factor* (Fator acelerador de decaimento)

DG: *Diacylglycerol* (Diacilglicerol)

DGC: Doença Granulomatosa Crônica

DHB: *Dihydroxybenzoic acid* (ácido dihidroxibenzoico)

DHR: Dihidrorhodamine (Dihidrorodamina)

DISC: *death inducing signaling complex* (Complexo de sinalização indutor de morte)

DNA: *deoxyribonucleic acid* (ácido desoxirribonucléico)

DPOC: Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica

DR: *Death receptor* (Receptor de morte)

DTT: *Dithiothreitol* (Ditiotreitól)

EDTA: *Ethylene Diamine Tetracetic Acid* (ácido etileno diamine tetracético)

EgL-1: *egg laying abnormal - 1* (coloração de ovo anormal 1)

ERK: *Extracellular Signal Resgulated Protein Kinase* (Sinal Extracelular regulatada por Proteína Quinase)

ESI: *Electrospray* (Eletrospray)

ESL-1: *E-selectin ligand-1* (Ligante de E selectina 1)

EthAc: *Ethyl Acetate* (Acetato de etila)

FAD: *flavin Adenine Dinucleotide* (Falvin Adenina Dinucleotídeo)

FADD = *Fas associated death complex* (Complexo de morte associado a Fas)

FcγRIIA: *Fcγ receptor type RIIA* (Receptor Fcγ tipo RIIA)

FcγRIIIB: *Fcγ receptor type RIIIB* (Receptor Fcγ tipo RIIIB)

fMLP: *formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine* (formil-metionil-leucil-fenilalanina)

fMLPR: fMLP receptor

FT: *Flow Through* (Flui através)

GDP: *Guanosin diphosphate* (Guanosina difosfato)

GPCR: *G protein acoupled receptor* (Receptor acoplado a proteína G)

GTP: *Guanosin triphosphate* (Guanosina triphosphate)

HATs: Histonas acetiltransferases

HCAP: *Human cathelicidin protein* (catelicidina proteína humana)

HCCA: *cyano-4-hydroxycinnamic acid* (ácido ciano-4-hidroxicinamico)

HDACs: Histonas desacetilases

HCl: ácido clorídrico

HBSS: *Hank's Balanced Salt Solution* (Solução salina balanceada de Hank)

HILIC: *Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography* (Cromatografia líquida de interação hidrofílica)

HOCl: Ácido hipocloroso

HPLC: *High Performance Liquid Chromatography* (Cromatografia líquida de alta performance)

H₂O₂: peróxido de hidrogênio

IAA: *Iodoacetamide* (iodoacetamida)

ICAM-1: *Intercellular adhesion molecule 1* (Molécula de adesão intracelular 1)

IL-1a: Interleucina 1a

IL-1b: Interleucina 1b

IL-8: Interleucina 8

IL- 10: Interleucina 10

IMAC: *Immobilized Metal Affinity* (Afinidade de metal imobilizado)

IP3: *Inositol 3 phosphate* (inositol 3 fosfato)

IP3K: *inositol 3 phosphate kinase* (Inositol 3 fosfato quinase)

iTRAq: *Isobaric Tag for Relative and Absolute Quantification* (marcação isobárica para quantificação relativa e absoluta)

LDHR: *leukocyte dependente histamine release* (Leucócitos dependents de liberação de histamina)

LPS: *lipopolysaccharide* (lipossacarídeo)

LTB4: *Leukotriene B4* (LeucotrienoB4)

MAC: *Receptor de complement 3* (Receptor do complement)

MALDI-TOF: *Matrix Assisted Laser Desorption Time of Flight* (Dessorção de laser assistida por matriz tempo de voo)

MAPK: *Mitogen Activated Protein Kinase* (Mitogen proteína quinase ativada)

Mcl-1: *myeloid cell leukemia-1* (célula de leucemia mielóide 1)

MEV: Microscopia Eletrônica de Varredura

MEK: *Mitogen activated protein kinase* (Mitogen quinase ativada)

MMP: Matrix metalloproteinase

MPO: mieloperoxidase

MEK1\2: *Mitogen activated Protein kinase 1\2* (Mitogen quinase ativada 1/2)

MYD88: *Myeloid Differentiation Primary Response Protein 88* (Proteína de resposta á diferenciação mielóide primária 88)

NaCl: Cloreto de sódio

NADPH: *Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase* (Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase)

NAD⁺: *nicotinamide adenine dinucleotide* (nicotimanida adenine dinucleotideo)

NBT: *Nitroblue Tetrazolium* (tetrazólio nitroazul)

NCBI: *National Center for Biotechnology* (Centro Nacional de biotecnologia)

NET: *Neutrophil Extracellular Traps* (armadilhas de neutrófilos extracellular)

NGAL: *neutrophil gelatinase associated lipocalin* (Gelatinase neutrofilica associado áLipocalina)

NRAMP-1: *Natural Resistance – associated macrophage protein* (Resistência natural – associado a proteína macrofago)

NT: *nucleotide transporters* (transportadores de nucleotídeos)

O₂⁻: ânion superóxido

PAF: *Platelet Aggregating Factor* (Fator de agregação plaquetário)

PAFR: *Platelet Aggregating Factor receptor* (Receptor do Fator de Agregação plaquetário)

PAMP: *Pathogen associated molecular pattern* (Padrão molecular associado ao patógeno)

PC: *Phosphatidylcholine* (Fosfatidilcolina)

Phox: *phagocytic oxidase* (Oxidase fagocítica)

PI: *Propidium iodide* (iodeto de propídeo)

PI3K: *phosphatidylinositol 3 kinase* (fosfatidilinositol 3 quinase)

PIP2: *phosphatidylinositol 4,5 biphosphate* (fosfatidilinositol 4,5 bifosfatase)

PTK: *Tyrosine Kinase protein* (Proteína tirosina quinase)

PLA: *Phospholipase A (fosfolipase A)*

PLC: *Phospholipase (Fosfolipase C)*

PMA: *Phorbol Myristate Acetate* (acetate meristato de forbol)

PMF (MS): *Peptide Mass Fingerprints* (massa do peptídeo impressão digital)

PMN: Polimorfonucleares

PSGL-1: *P-selectin glycoprotein ligand (glicoproteína ligante de P selectina)*

PKC: *Protein kinase C* (Proteína quinase C)

RAC: pertence a família das GTPases.

ROS: *Reactive Oxygen Species* (Espécies reativas de oxigênio)

SARA: Síndrome da Angústia Respiratória Respiratória Aguda

SCAMP: *Secretory Carrier Membrane Protein* (Proteína secretora transportadora de membrana)

SDC: *sodium deoxy cholate* (desoxi colato de sódio)

SDS: *sodium dodecyl sulfate* (dodecilsulfato de sódio)

SIMAC: *Sequential IMAC* (sequencial IMAC)

SIRS: Síndrome da Angústia Respiratória Sistêmica

SNAP-23: *Soluble NSF-Attachment Protein-23* (Proteína acessória solúvel NSF)

SNARE: *Soluble N-ethylmaleimide Sensitive Fusion Protein Attachment Protein Receptor (Receptor de Proteína acessória solúvel N-etilmaleimida de fusão)*

SOD: *Superoxide Dismutase* (superóxido dismutase)

STAT: *Signal Transducers and Activators of Transcription* (Transdutores de sinais e ativadores de transcrição)

TEAB: *Tetraethylammonium bromide* (brometo de tetraetilamonio)

TCD4: Linfócito T auxiliar

TCD8: Linfócito T citotóxico

TFA: *Trifluoroacetic acid* (ácido trifluoroacético)

TGF- β : *Transforming growth factor beta* (Fator transformador de crescimento beta)

TiO₂: Dióxido de titânio

TLR: *Toll-like receptor* (receptor toll-like)

TNF- α : *Tumor Necrosis Factor α* (Fator de necrose tumoral alfa)

TNFR1: *Tumor Necrosis Factor receptor* (receptor de fator de necrose tumoral)

TRAIL: *TNF related apoptosis inducing ligand* (TNF relacionada a apoptose induzida por ligante)

TRAP LC/MS/MS: *Ion Trap mass spectrometers* (espectrometro de massa armadilha de ion)

UI/mL: unidades por mililitro

VAMP: *Vesicular associated membrane protein* (proteína vasicular associada a membrana)

INTRODUÇÃO

1. Neutrófilos

O organismo possui um sistema de defesa rico em respostas celulares que abrangem duas linhas principais, sendo a primeira a imunidade inata caracterizada pelas barreiras físicas e químicas (epitélio e substâncias antibacterianas nas superfícies epiteliais), células *Natural Killers* e fagocitárias (neutrófilos e macrófagos), proteínas do sangue (componentes do sistema complemento) e proteínas denominadas citocinas (mediadores inflamatórios). Já a segunda é caracterizada por uma resposta altamente específica para um grande número de substâncias, sejam elas microbianas ou não, chamada de imunidade adaptativa ou adquirida envolvendo células especializadas como linfócitos T e B (ABBAS, 2005).

A resposta imune inata mediada por células fagocitárias tem início geralmente quando um invasor microbiano ou fúngico consegue passar pelas barreiras físicas e químicas do epitélio. Também pode ocorrer independente de infecção, consequente a dano tecidual. O combate a esses microrganismos invasores e/ou a remoção de tecidos lesados resulta da resposta inflamatória que é um passo essencial para o controle da infecção, onde são observados vasodilatação e na permeabilidade vascular da região afetada, edema, dor localizada, migração e acúmulo de neutrófilos no tecido seguidos por reparo e recuperação do tecido lesionado. Há grande preocupação em se controlar esses mecanismos de combate a microorganismos invasores e reparo celular durante a inflamação, pois o tempo de inflamação prolongada na fase aguda pode vir a causar danos irreparáveis por meio do desequilíbrio dos mecanismos compensatórios anti- e pró-inflamatórios resultando no agravamento do estado clínico e óbito do paciente (KUIJPERS, 2001; LIMA, 2007; QUINN; GAUSS, 2004).

Durante o processo inflamatório tipos celulares são ativados, dentre as quais podemos destacar os neutrófilos, os primeiros a migrar ao sítio de injúria. Os neutrófilos, conhecidos também como granulócitos neutrófilos ou leucócitos polimorfonucleares (PMNs), são os leucócitos mais abundantes do sangue periférico compreendendo cerca de 40% a 70% do total de células brancas em condições normais.

Nos tópicos a seguir veremos com mais detalhes os neutrófilos, desde sua formação até a morte programada (apoptose) (ABBAS, 2005; KUIJPERS, 2001; NEVES, 2010).

1.1. Morfologia Celular

De acordo com o estágio funcional dos neutrófilos, os mesmos podem ser caracterizados fenotipicamente em três condições: quiescente, estimulado e ativado. Nesses três estágios são observadas mudanças tanto na morfologia específica de cada condição como no crescimento celular e diminuição quantitativa dos grânulos quanto na atividade bioquímica celular com a liberação de grânulos e vesículas, quimiotaxia, rolamento, transmigração e diapedese (ROSA, 2012).

Os neutrófilos quiescentes são caracterizados morfológicamente pela forma esférica e tamanho variando entre 12 e 15 μ m de diâmetro, com núcleo segmentado e multilobulado (geralmente de 3 a 5 lóbulos conectados), nucléolo ausente e presença de grânulos citoplasmáticos (figura 1). Sua membrana apresenta numerosas projeções curtas chamadas de microvilosidades que tornam a superfície dos neutrófilos irregulares e apresentam uma área total de 40 a 90% de excesso em relação à área necessária para conter seu volume. Esse excesso permite que os neutrófilos fiquem mais flexíveis e consigam se adaptar a pequenos espaços durante a transmigração e diapedese no processo inflamatório sem que haja lise celular. Outra característica observada por Troy Mitchell e cols é a distribuição homogênea dos filamentos de actina nos neutrófilos quiescentes, cuja marcação em vermelho é conferida pela rhodamine-phalloidin (figura 1A) (ABBAS, 2005; NEVES, 2010; ROSA, 2012) (MITCHELL et al, 2008).

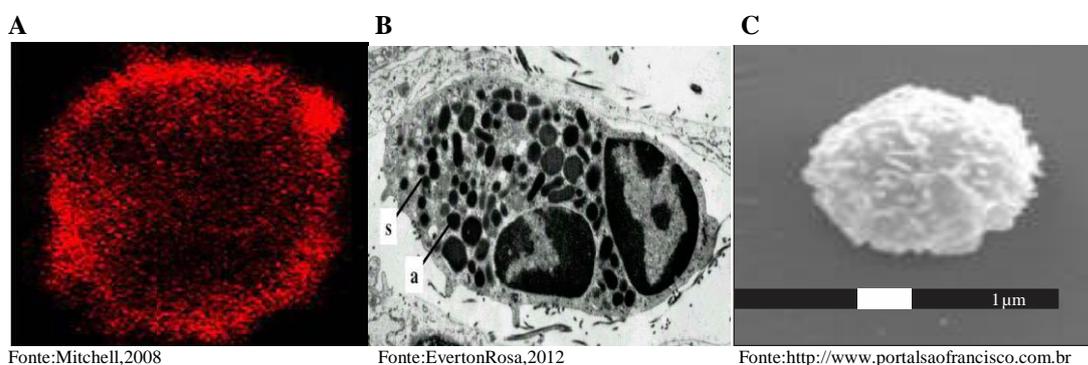


Figura 1. Análise morfológica de neutrófilos quiescentes por Microscopia confocal (A), Microscopia eletrônica de transmissão (B) onde s = grânulos específicos e a = grânulos azurofílicos, Microscopia eletrônica de varredura (C).

Durante o processo de estimulação ou ativação dos neutrófilos, são observados algumas mudanças na morfologia celular como, por exemplo, a despolimerização da actina (concentração da actina na extremidade da célula), visualizada por meio da microscopia confocal com ensaio de marcação com rhodamine-phalloidin em vermelho (figura 2A), o aparecimento de bolhas (figura 2C inferior), citonemas e extensões tubulovesiculares (figura 2C superior) evidenciados pela microscopia de varredura e a movimentação dos grânulos primários para as extremidades da célula assim como o seu aumento quantitativo mostrado pela microscopia eletrônica de transmissão (figura 2C) (MITCHELL et al., 2008; ROSA, 2012).

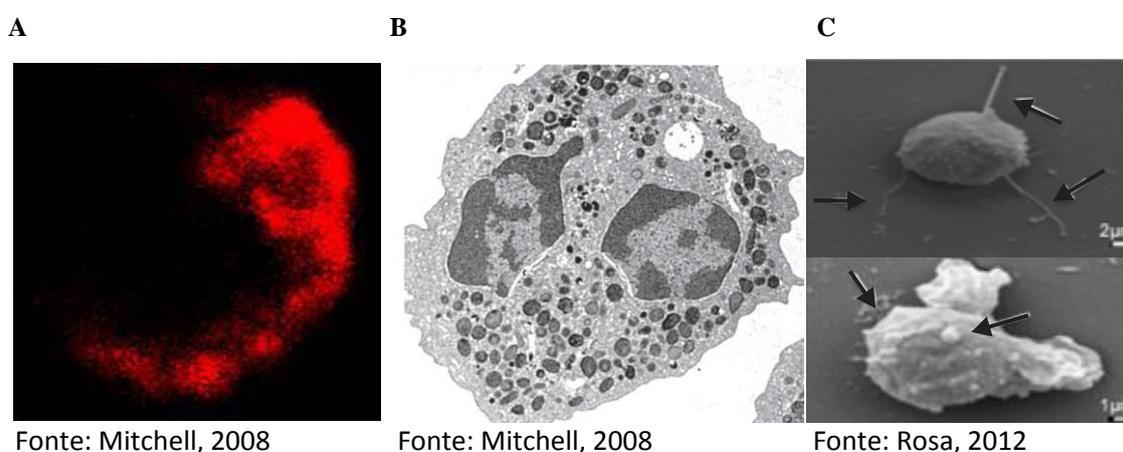


Figura 2. Análise morfológica de neutrófilos ativados por Microscopia Confocal (A), Microscopia Eletrônica de Transmissão (B) e Microscopia Eletrônica de Varredura (C).

Essas modificações são observadas em diferentes casos, dependendo do tipo de estímulo ou ativação como, por exemplo, pelo PMA, titânio, LPS, PAF e fMLP. Mais adiante iremos mostrar algumas morfologias características dos neutrófilos quiescentes e neutrófilos estimulados pelo PAF pela microscopia de varredura, na tentativa de observar quais seriam as modificações da superfície celular que justificariam a mudança de abundância de certas proteínas envolvidas no citoesqueleto dos neutrófilos.

1.2. Maturação Celular

Os neutrófilos são produzidos na medula óssea por um processo chamado granulopoiese, que compreende um complexo processo de diferenciação celular mieloide que tem início com a célula tronco hematopoiética pluripotente. Essas células passarão por cinco etapas, durante 2 semanas, até chegarem ao estágio final de amadurecimento que são os neutrófilos segmentados (ou neutrófilos maduros). Sendo assim as células tronco dão origem à unidade formadora de colônias de granulócitos-macrófagos (CFU-GM) que por sua vez se diferenciam em mieloblastos (núcleo grande e ausência de grânulos), os quais sofrerão exposição ao fator estimulador de colônia granulócito-macrófago (CSF-GM) formando os promielócitos. Nessa fase ocorre a formação dos grânulos azurofílicos seguida da formação dos grânulos específicos na fase mielocítica, caracterizando os mielócitos neutrófilos. A divisão nuclear para e o núcleo começa a diminuir formando os metamielócitos neutrófilos. Após a formação desses dois tipos de grânulos, o núcleo passa a ser segmentado formando inicialmente os bastonetes neutrófilos, onde a produção de síntese das proteínas granulares cessa e o núcleo adquire a forma de bastão. Finalizando o processo de maturação teremos os neutrófilos segmentados, que apresentam potencial antimicrobiano (formação de grânulos de gelatinase) e atingirão a corrente sanguínea dois dias após sua completa maturação (Figura 3) (GABRILOVICH, 2005; KUIJPERS, 2001; NEVES, 2010).

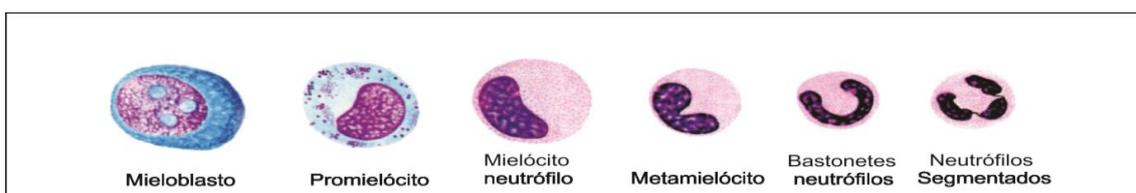


Figura 3. Diferenciação celular que fazem parte da Maturação dos neutrófilos. Modificada a partir de <http://pt.slideshare.net/lucasalmeidaodonto/sangue-e-hematopoiese>

Na medula óssea cerca de 60% das células nucleadas pertencem à série mieloide, onde é produzida uma grande quantidade de neutrófilos (20 vezes a mais que a quantidade circulante) e liberadas na corrente sanguínea cerca de 10^{11} células por dia em indivíduos saudáveis. Quando os neutrófilos estão presentes na corrente sanguínea, o tempo de vida é de aproximadamente 10 horas, depois disso alguns autores sugerem

que os neutrófilos migram para os tecidos onde ficarão ativos e entrarão em processo de apoptose para posterior remoção pelos macrófagos (KUIJPERS, 2001).

Tendo em vista a importância da maturação dos neutrófilos e da constituição proteica dos grânulos e vesículas secretórias para os processos de quimiotaxia, rolamento, transmigração e diapedese dos neutrófilos, os mesmos serão descritos com mais detalhes adiante.

Mikkel Faurschou e Niels Borregaard publicaram detalhes sobre os diferentes tipos de grânulos nos neutrófilos em 2003, classificando-os em três grandes grupos de acordo com a ordem hierárquica de produção: grânulos azurofílicos ou primários, grânulos específicos ou secundários e grânulos de gelatinase ou terciários. Na época foi sugerida outra subdivisão, de acordo com a presença da enzima peroxidase, em dois grupos: Grânulos Peroxidase Positivos constituído pelos grânulos azurofílicos e Grânulos Peroxidase Negativos formados pelos grânulos específicos e grânulos gelatinase (FAURSCHOU; BORREGAARD, 2003).

1.2.1. Grânulos Peroxidase Positivos

Os grânulos primários ou azurofílicos ficaram conhecidos também como Peroxidase Positivos devido à grande quantidade de mieloperoxidase (MPO) encontrada no interior dos grânulos. A MPO é umas das proteínas mais importantes para a geração de intermediários reativos de oxigênio, pois ela interage com o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) produzido pela NADPH Oxidase formando ácido hipocloroso (HOCl). Esse ácido é um dos principais produtos que destrói a membrana de microorganismos invasores. Além da MPO outro constituinte em abundância é a α -defensina, um peptídeo antimicrobiano e citotóxico que forma poros na membrana de bactérias, protozoários, fungos e vírus encapsulados. Outros grupos de proteínas também são encontrados, como mostrado na tabela 1, onde destacam-se as proteínas antimicrobianas com atividade de serino proteases, chamadas de Serprocidinas (Proteinase-3, Catapsina G e Elastase). Mikkel Faurschou observou que tanto as α -defensinas e serprocidinas quanto a azurocidina atuam também como quimiotáticos para monócitos, macrófagos, fibroblastos, células epiteliais e células T (BORREGAARD; COWLAND, 1997; CASSATELLA, M.A, 2003; FAURSCHOU; BORREGAARD, 2003; NEVES, 2010).

A maioria das proteínas dos grânulos azurofílicos é sintetizada na sua forma pró-proteína constituindo o estado inativo, passando posteriormente por um sistema proteolítico até atingir sua forma ativa dentro dos grânulos. Um fato curioso foi observado em neutrófilos estimulados, onde os grânulos azurofílicos sofrem exocitose limitada e acredita-se contribuir para o combate e degradação de microorganismos nos fagolisossomos (CASSATELLA, M.A, 2003; FAURSCHOU; BORREGAARD, 2003; NEVES, 2010).

Proteínas de Membrana	
CD68	Estomatina
CD63	H ⁺ ATPase do tipo vacuolar
Presenilina-1	
Proteínas da Matriz	
Ácido β -glicerofosfatase	Catepsina
Ácido mucopolissacarídeo	α -defensina
α 1-antitripsina	Elastase
α 1- manosidase	Lisozima
Azurocidina	MPO
Proteína ubiquitina	N-acetil- β -glicosaminidase
β -glicerofosfatase	Proteinase-3
β -glicoronidase	Sialidase

Tabela 1. Proteínas encontradas nos grânulos azurofílicos (Faurshou e Borregaard, 2003).

1.2.2. Grânulos Peroxidase Negativos

Os grânulos peroxidase negativos são divididos em dois tipos, sendo eles grânulos específicos e grânulos gelatinase. Esses dois tipos de grânulos possuem características distintas quando se refere ao conteúdo proteico e propriedades de secreção (CASSATELLA, M.A, 2003; NEVES, 2010).

Os grânulos específicos ou grânulos secundários são ricos em substâncias antibióticas (tabela 2) e atuam principalmente nas atividades antimicrobianas mobilizando substâncias para o fagossomo ou realização exocitose de proteínas, tais

como lactoferrina (pertence à família das transferrinas, cuja ação é capturar o ferro vindo a limitar o crescimento de bactérias Gram positivas e negativas), hCAP-18 (peptídeo antimicrobiano da família das catelicidinas, exerce atividade contra bactérias Gram positivas e negativas e induz a quimiotaxia de neutrófilos, células T e monócitos) e a MMP-8 (metaloproteinase responsável pela degradação da matriz extracelular) (BORREGAARD; COWLAND, 1997; FAURSCHOU; BORREGAARD, 2003).

Proteínas de Membrana	
CD11b/CD18	Estomatina
CD15	Leucolisina-R
CD66	antígeno NB1
Citocromo b558	Proteína 19KDa
Fmlp-R	Proteína 155KDa
Fibronectina-R	Rap 1 e Rap 2
Subunidade da proteína α	SCAMP
Laminina-R	SNAP 23 e 25
Trombosporina-R	
Proteínas da Matriz	
Histaminase	Heparinase
hCAP-18	Lectoferrina
CRISP-3 (SGP-28)	NGAL
Colagenase	uPA
β -microglobulina	Transcobalamina 1
Sialidase	Gelatinase

Tabela 2. Proteínas encontradas nos grânulos específicos (Faurischou e Borregaard, 2003).

Já os grânulos de gelatinase ou terciários são especialistas em armazenamento de enzimas (tabela 3) que atuarão na degradação da matriz extracelular e na exposição de receptores de membrana nos neutrófilos, facilitando assim a transmigração e diapedese dessas células, tais como a MMP-9. Outra proteína encontrada nesses grânulos é a Nram-1 que é translocada para a membrana fagossomal logo após a desgranulação, atuando no transporte de cátions divalentes que podem ser essenciais

para a sobrevivência dos microorganismos presentes no interior do fagossomo, tais como Fe^{2+} , Mn^{2+} e Zn^{2+} (FAURSCHOU; BORREGAARD, 2003).

Proteínas de Membrana	
CD11b/CD18	SNAP 23 e 25
Citocromo b558	uPA-R
Fmlp-R	VAMP 2
Leucolisina-R	H ⁺ ATPase do tipo vacuolar
NRAMP-1	SCAMP
Proteínas da Matriz	
Acetiltransferase	Lisozima
CRISP-3 (SGP-28)	Gelatinase
β 2-microglobulina	

Tabela 3. Proteínas encontradas nos grânulos de gelatinase (Faurischou e Borregaard, 2003).

Ao mesmo tempo em que os grânulos apresentam inúmeras distinções, podemos evidenciar também algumas semelhanças principalmente em relação a três tipos proteicos: citocromo b558, lisozima e metaloproteinase 25 (MMP-25). O citocromo b558 aparece somente nos grânulos peroxidase negativos, nos quais é externalizado para a superfície dos neutrófilos ou transferido para a membrana dos fagossomos, atuando na explosão respiratória. A MMP-25 foi encontrada em neutrófilos quiescentes em vários locais, como grânulos específicos (~10%), grânulos gelatinase (~40%), vesículas secretórias (~30%) e membrana plasmática (~20%). Já a lisozima foi encontrada em todos os grânulos, apresentando uma maior concentração nos grânulos específicos, atuando junto aos proteoglicanos nas paredes bacterianas e exercendo atividade bactericida em Gram-positivas (FAURSCHOU; BORREGAARD, 2003).

1.2.3. Vesículas secretórias

As vesículas secretórias aparecem nos neutrófilos já maduros, constituídas principalmente de receptores de membrana necessários para as primeiras fases da

resposta inflamatória mediada por neutrófilos. Podemos evidenciar as β -integrinas (CD11b/CD18), receptor de fMLP, Receptor de complemento 1 (CR1), receptor para Fc γ III (CD16), os quais são incorporados na membrana plasmática dos neutrófilos após a exocitose. Abaixo são mostradas todas as proteínas identificadas na membrana das vesículas secretórias responsáveis por esse processo inicial (FAURSCHOU; BORREGAARD, 2003).

Proteínas de Membrana	
CD11b/CD18	CR1
Citocromo b558	C1q-R
Fmlp-R	VAMP 2
Leucolisina-R	CD10
DAF	CD13
CD14	CD45
CD16	

Tabela 4. Proteínas de membrana das vesículas secretórias (Faurischou e Borregaard, 2003).

1.3. Importância dos grânulos na ação dos neutrófilos

Para que os neutrófilos realizem seu papel central na primeira linha de defesa contra microrganismos invasores, eles apresentam uma complexa e coordenada maquinaria bioquímica que envolve a mobilização de grânulos e vesículas secretórias durante o processo inflamatório como ponto chave para todas as etapas que caracterizam o neutrófilo estimulado ou ativado. Essa caracterização pode ser observada pela migração dos neutrófilos para o local da inflamação seguindo os passos de adesão vascular, transmigração e diapedese, assim como pela modificação morfológica observada por microscopia de transmissão mostrando a mobilização de grânulos e pela dosagem de metabolitos de oxigênio e de substâncias microbidas pelo método de Citometria de Fluxo (FAURSCHOU; BORREGAARD, 2003; NEVES, 2010; STEIN et al., 2003; WAGNER; ROTH, 2000).

Esses grânulos possuem características estruturais semelhantes sendo formados por bicamada lipídica, onde o diferencial está nos tipos de proteínas presentes em cada grânulo, na localização subcelular e na ordem com que são liberados. O controle da ordem de liberação desses grânulos é realizado pela expressão de genes de proteínas granulares mediada pela combinação dos fatores de transcrição mieloide iniciadas ainda na fase de granulopoiese. Segundo Mikkel Faurschou as vesículas secretórias são as primeiras a serem exocitadas expondo inúmeros receptores de membrana, seguidas dos grânulos gelatinase, grânulos específicos e por fim os grânulos azurofílicos (FAURSCHOU; BORREGAARD, 2003; NEVES, 2010).

O conjunto de grânulos contido nos neutrófilos forma um importante reservatório, não só com proteínas antibacterianas, proteases e componentes da explosão respiratória, mas também por mediadores solúveis da inflamação, moléculas de adesão e receptores (ambos acoplados a membrana dos grânulos) (FAURSCHOU; BORREGAARD, 2003).

1.4. Mecanismos de ação dos neutrófilos na resposta inflamatória

Como foi dito anteriormente, os neutrófilos são normalmente encontrados no sangue periférico com sobrevivência de aproximadamente 10 horas. Quando o indivíduo é acometido por uma infecção (contato com constituintes antigênicos de microorganismos) ou sofre uma injúria tecidual (trauma), os neutrófilos e macrófagos reconhecem esses agentes e passam a produzir e liberar mediadores pró-inflamatórios tais como TNF- α e IL-1 β . Com a liberação desses dois mediadores pró-inflamatórios, é iniciada uma cascata de eventos que incluem quimiotaxia e adesão dos neutrófilos ao endotélio vascular, ativação do Sistema Complemento e da Cascata de Coagulação e liberação de outros mediadores pró-inflamatórios como IL-1 β , TNF- α , IL-8, PAF, prostaglandinas, leucotrienos, ROS e proteases. A prevenção de uma resposta exacerbada dos neutrófilos, macrófagos e linfócitos, é consequência da liberação simultânea de fatores anti-inflamatórios como IL-10 que irá inibir a ação de tais células, de forma que ocorre uma compensação na resposta inflamatória mantendo os níveis de mediadores pró e anti inflamatórios regulados (NEVES, 2010; TELES et al., 2012).

Nos neutrófilos o reconhecimento dos quimiotáticos presentes no meio é feito pelos inúmeros receptores de membrana chamados de receptores de recrutamento, que são expressos em alta quantidade em neutrófilos que estão circulando no sangue periférico. Destacamos três receptores (CXCL8, CXCR1 e CXCR2) pertencentes à superfamília CXC que possui características estruturais comuns como a presença de duas alças dissulfeto internas e resíduos de cisteínas na porção N-terminal separados por um aminoácido. Além desses receptores de recrutamento, os neutrófilos apresentam ainda na medula óssea, outros tipos tais como receptores de IL-1a, IL-1b, TNF- α e TGF- β , e receptores de quimiocinas como IL-8Ra, IL-8Rb e CXCL-6. Dessa maneira os neutrófilos são capazes de reconhecer concentrações diferentes de várias quimiocinas, que irão orientar a movimentação dessas células para o sítio da inflamação (CASSATELLA, M. A., 1999; KOBAYASHI; VOYICH; DELEO, 2003; NEVES, 2010; THEILGAARD-MONCH; PORSE; BORREGAARD, 2006)

Durante a resposta inflamatória aguda, moléculas pró inflamatórias como o PAF são rapidamente sintetizados e expostas na superfície de células endoteliais dos vasos sanguíneos circunvizinhos à área inflamada, em resposta a mediadores como histamina e trombina (geralmente liberadas quando se tem lesão tecidual) resultando na estimulação dos neutrófilos (TELES et al., 2012).

Observou-se também que após 1 a 2 horas da estimulação com PAF, ocorre o aumento de expressão de moléculas de adesão nas células endoteliais como E-selectina (CD62E) e P-selectina (CD62P). Nos neutrófilos quiescentes encontramos L-selectina na membrana onde se ligam de forma precoce e rápida (baixa afinidade) ao endotélio vascular. Após participar da adesão sofrerá proteólise por uma metaloprotease próxima à membrana, regulada pela PKC em neutrófilos ativados com PMA, e seus fragmentos possuem um papel importante na mediação da resposta inflamatória com a participação da transdução de sinais que mobilizarão as integrinas. Quando os neutrófilos são estimulados, passam a expressar ligantes glicanos como PSGL-1 (se liga à CD62P) e ESL-1 (se liga a CD62E) localizados nas extremidades dos microvilos. A ligação entre os glicanos e as selectinas é fraca e pode ser rompida com a força do fluxo sanguíneo, proporcionando o processo chamado rolamento dos neutrófilos (diminuição da velocidade dos neutrófilos na corrente sanguínea, processo esse que antecede a diapedese). Segundo Diane Lorant e Sarah McMeekin, a adesão dos neutrófilos e o processo de rolamento e firme adesão está relacionada a um trabalho conjunto entre as

selectinas (E e P) e PAF ligado ao seu receptor (AQUINO, 2008; GABRILOVICH, 2005; KUIJPERS, 2001; LORANT et al., 1993; MCMEEKIN et al., 2006; NEVES, 2010; OSTROVSKY et al., 1998).

À medida que esse processo de rolamento acontece, ocorre o aumento da expressão de receptores de firme adesão nos neutrófilos chamados $\beta 2$ integrinas (MAC-1 ou CD11b/CD18), e posteriormente a diminuição da liberação de L-selectina. Segundo Tanya N. Mayadas há uma firme interação entre MAC-1 e ICAM-1, que mantém os sinais de sobrevivência, prolongando assim o tempo de vida dos neutrófilos. Com as influências constantes de substâncias quimiotáticas, os neutrófilos e as células endoteliais passam a produzir cada vez mais moléculas de firme adesão, resultando na transmigração e diapedese dessas células para o local da infecção ou injúria tecidual (Figura 4) (KHREISS et al., 2004; KUIJPERS, 2001; MAYADAS; CULLERE, 2005).

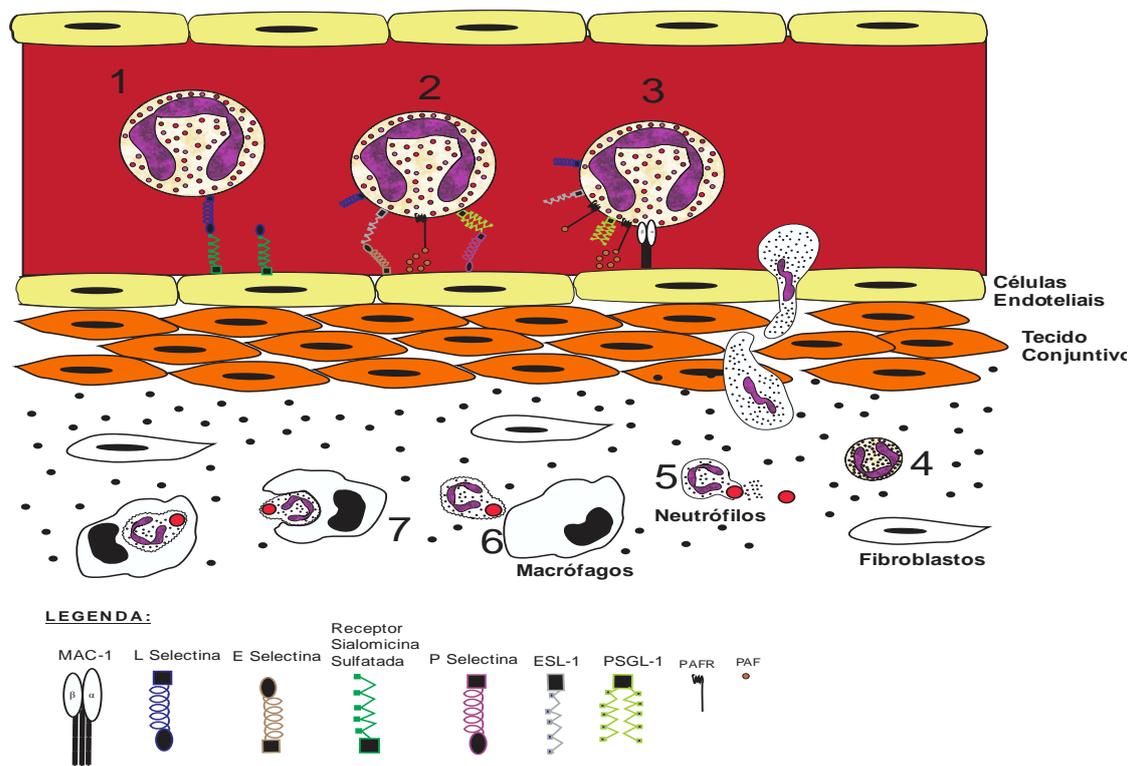


Figura 4. Defesa imune inata mediada por neutrófilos e moléculas de adesão. (1) rolamento por meio das ligações entre L-selectina e Receptor Sialomucina Sulfatada (2) Ligação de PSGL-1 e P-selectina; ESL-1 e E-selectina; (3) firme adesão e transmigração por meio da ligação entre MAC-1 e ICAM-1; (4) diapedese; (5) fagocitose e desgranulação; (6) apoptose; (7) fagocitose dos neutrófilos apoptóticos (NEVES, 2010)

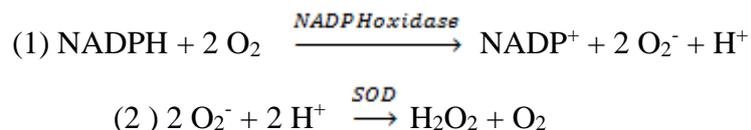
1.4.1. Relação entre estimulação dos neutrófilos e processo de desgranulação

Para que ocorra esse processo anteriormente explicado, os neutrófilos estimulados (ainda na corrente sanguínea) induzem a exocitose da maioria das vesículas secretórias e uma parte significativa dos grânulos de gelatinase. Com a fusão de vesículas secretórias na membrana dos neutrófilos, receptores essenciais para o processo de adesão firme (CD11b/CD18) e componentes do Complexo NADPH Oxidase (citocromo b558 não mitocondrial e Rap1A) passam a ser expostos. Já o conteúdo dos grânulos de gelatinase também favorece a adesão expondo CD11b/CD18 e favorece o processo de transmigração e diapedese por meio da degradação da matriz extracelular pela liberação de MMP-9 (LIGETI; MOCSAI, 1999; NEVES, 2010).

Em seguida são liberados os grânulos específicos que conferem proteases para a ação antimicrobiana, durante a qual serão liberadas enzimas tóxicas aos microrganismos como, por exemplo, a lisozima, lactoferrina, hCAP-18 e Nram-1, assim como proteínas que garantem o processo de adesão (CD11b/CD18; CD15 e CD66) e ativação do Complexo NADPH Oxidase (citocromo b558, Rap1 e 2) (GABRILOVICH, 2005).

Com a exocitose de vesículas secretórias, grânulos gelatinase e grânulos específicos os neutrófilos passam a produzir substâncias tóxicas como anion superóxido (O_2^-) produzido pela transferência de elétrons da NADPH para O_2 e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) que é rapidamente sintetizado pela enzima abundante na célula chamada superóxido dismutase (SOD) (Figura 8). Tal produção frequentemente é iniciada em níveis moderados devido à montagem parcial do complexo NADPH oxidase (GABRILOVICH, 2005).

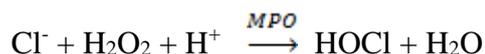
Figura 5. Equação química para (1) Formação de ânion superóxido (O_2^-) e (2) formação de Peróxido de hidrogênio (H_2O_2).



Com a desgranulação dos grânulos azurofilicos a resposta se torna mais acentuada sendo caracterizada pela produção de ácido hipocloroso ($HOCl$), por meio da

liberação da enzima Mieloperoxidase (MPO) (presente nos grânulos azurofílicos) (Figura 6). Outro ponto importante é a riqueza que esses grânulos possuem na constituição de proteínas antimicrobicas como as α -defensinas, BPI, proteinase-3, catepsina, azurocidina e elastase (GABRILOVICH, 2005).

Figura 6. Equação química para formação de ácido hipocloroso (HOCl).



Dessa forma a ação conjunta e programada da liberação de vesículas e grânulos ao longo da estimulação dos neutrófilos, proporciona a sua adesão ao endotélio vascular, transmigração, diapedese, amadurecimento do fagossomo e ativação do complexo NADPH Oxidase com liberação de substâncias altamente tóxicas. O potencial da ação dos neutrófilos é caracterizado pela ativação desse complexo, fenômeno que é avaliado pela detecção quantitativa das espécies reativas de oxigênio como, por exemplo, pelo método de dosagem de peróxido de hidrogênio por citometria de fluxo (KAMPEN; TOLLERSRUD; LUND, 2004).

1.5. Complexo NADPH Oxidase

Durante o processo inflamatório, os neutrófilos atuam significativamente para a destruição do patógeno de forma mais agressiva podendo ocasionar também danos aos tecidos, pois possuem maquinaria especializada na geração de substâncias tóxicas principalmente espécies reativas de oxigênio como anion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e ácido hipocloroso (HOCl). A produção desses agentes ou substâncias tóxicas é resultado da ativação de um complexo multiproteico chamado de Complexo NADPH Oxidase (*Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate Oxidase*) (BABIOR, 1999; QUINN; GAUSS, 2004).

Esse complexo é formado por cinco proteínas principais, podendo ser divididas em dois grupos de acordo com sua localização: proteínas de membrana que são p22phox e gp91phox (localizados nas membranas de vesículas secretórias e grânulos específicos) e proteínas do citoplasma (que se apresentam em neutrófilos quiescentes

em forma de complexo) sendo formado pelas proteínas p40phox, p47phox e p67phox (GABRILOVICH, 2005; NEVES, 2010).

Observou-se também a participação de outros componentes durante a ativação do complexo, como a Rac-2 (em neutrófilos quiescentes fica localizada no citoplasma em forma de um complexo dimérico com Rho-GDI), Rap1A (localizada na membrana e pode ser purificada juntamente com o citocromo b558) e o citocromo b558 não mitocondrial. O citocromo b558 é um heterodímero que contém dois grupos heme associados e possui a função de transportar elétrons dos carreadores de elétrons (FADH₂ e NADPH) para a NADPH oxidase durante a estimulação dos neutrófilos. Mais a diante veremos a localização e importância dessas proteínas na estabilização e ativação do Complexo NADPH Oxidase (BABIOR, 1999; GABRILOVICH, 2005; KUIJPERS, 2001).

As proteínas de membrana gp91phox e p22phox foram descritas inicialmente em pacientes acometidos pela doença granulomatosa crônica (que leva o indivíduo a ter recorrentes infecções bacterianas e fúngicas) e posteriormente foram localizados os genes no cromossomo X (CYBB) e no cromossomo 16q24 (CYBA), respectivamente. A gp91phox é uma glicoproteína que possui de 3 a 5 sítios de glicosilações voltados para o meio extracelular, em um total de 570 aminoácidos da sua formação primária, enquanto que a p22phox é formada por 195 aminoácidos e sua principal característica é a grande quantidade de prolinas que interagem com os domínios SH3 da p47phox (que será visto mais adiante na figura 8) (DAHLGREN; KARLSSON, 1999; GABRILOVICH, 2005; QUINN; GAUSS, 2004; ROOS; VAN BRUGGEN; MEISCHL, 2003).

A interação dessas duas proteínas (gp91phox e p22phox) na membrana plasmática dos neutrófilos constitui o citocromo b558. No esquema mostrado abaixo podemos observar o citocromo b558 assim como a interação entre suas proteínas (RABELO et al., 2010).

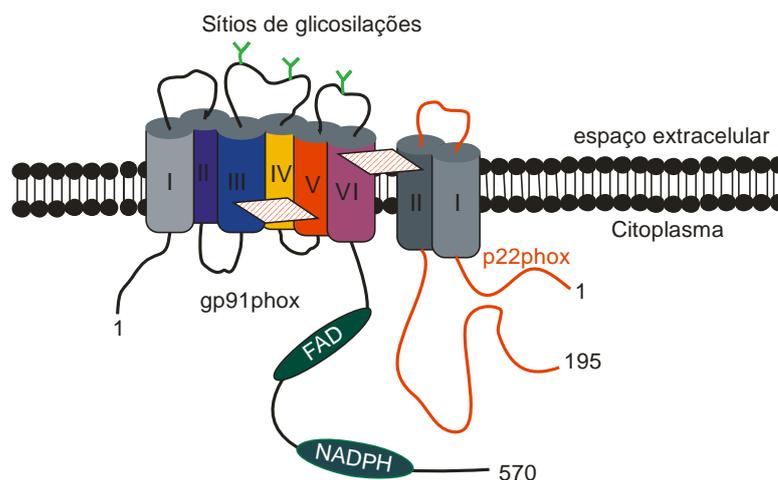


Figura 7. Representação esquemática do citocromo b558. Interação entre os componentes da p22phox (I e II) e gp91phox (I, II, III, IV e V) por meio dos grupos heme (retângulo hachurado de vermelho e branco) (modificado de Gabrilovich, 2005).

A conformação tridimensional da proteína gp91phox é caracterizada anfipaticamente pela porção N-terminal hidrofóbica que possui dois domínios com grupo heme que se liga as hélices transmembrânicas III e V da gp91 e outro grupo heme entre as hélices VI da gp91phox e II da p22phox (Figura 7). O grupo heme nesses dois casos proporciona a interação entre gp91phox e p22phox, assim como a estabilização de ambas na membrana. Por outro lado a porção C-terminal é hidrofílica voltada para o meio intracelular, onde é observada a presença de dois sítios de ligação, um para FAD e outro para NADPH. Observou-se também a formação de um loop com 20 aminoácidos que se reorganizam quando a subunidade p67phox se liga a gp91phox, resultando na formação do sítio ativo de alta afinidade para a ligação de NADPH durante a ativação do complexo (GABRILOVICH, 2005; ROOS et al., 2003).

A proteína citoplasmática p47 phox (gene chamado NCF 1, presente no cromossomo 7) é uma proteína central na produção de espécies reativas de oxigênio, pois quando fosforilada é responsável pela ativação do Complexo NADPH Oxidase (testes confirmam que a fosforilação da p47phox é regulada pela Proteína Cinase A quando os neutrófilos são ativados com fMLP e pela Proteína Cinase C quando ativados com PMA). Sua estrutura primária é formada por 390 aminoácidos (proteína madura) contendo um sítio de fosforilação e dois domínios SH3 (figura 8). A extremidade C-terminal dessa proteína tem um domínio rico em prolina (que provavelmente interage com p67phox) enquanto que a extremidade N-terminal tem o domínio PX (responsável pela interação com um fosfolípido). Mark Quinn sugere que fosfatidilinositol 4-5

bifosfato (PIP2) atue como um segundo mensageiro interagindo com o domínio PX da p47phox durante a ativação dos neutrófilos (GABRILOVICH, 2005; QUINN; GAUSS, 2004).

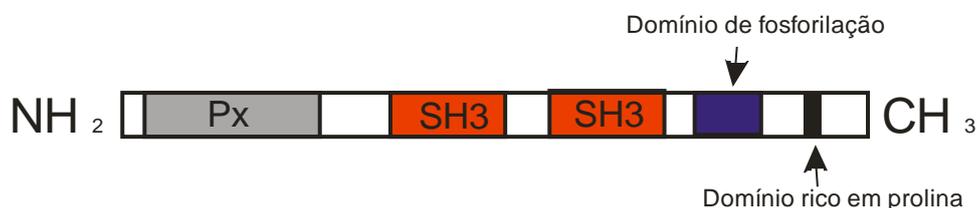


Figura 8. Proteína p47phox. Localização dos domínios PX, SH3, domínio rico em prolina e sítio de fosforilação (modificado de Gabrilovich, 2005).

O domínio PX também é observado na proteína p40phox (Figura 9). Acredita-se que a interação do domínio PX com o domínio TPR da proteína p67phox venha a estabilizar as interações entre elas. A p40phox é constituída por 339 aminoácidos (codificados pelo gene NCF 4 localizado no cromossomo 22) e é caracterizada pela presença de dois sítios de fosforilação (Thr 154 e Ser 315, ambos fosforilados pela Proteína Cinase C na ativação com PMA) além do domínio SH3 no centro e PC na extremidade C-terminal, que se ligará ao domínio PB1 da p67phox. Dmitry Gabrilovich propõe que a proteína p40phox esteja relacionada com a estabilização dos componentes citoplasmáticos do Complexo NADPH Oxidase (GABRILOVICH, 2005; ROOS et al., 2003).



Figura 9. Proteína p40phox. Localização dos domínios PX, SH3 e PC (modificado de Gabrilovich, 2005).

Dentre as proteínas citoplasmáticas, a p67phox é a mais complexa. Possui 526 aminoácidos, dois sítios de fosforilação, dois domínios SH3 na porção C-terminal (para ligação de domínio rico em prolina de p47phox), um domínio rico em prolina (para ligação com SH3), um domínio ativador e um domínio PB1 que se liga ao domínio PC da p40phox (figura 10). Na ativação de neutrófilos com fMLP, observou-se que ambas extremidades são fosforiladas, sendo que na porção C-terminal foi por ação da

p38MAPK e a N-terminal pela ERK MAPK(GABRILOVICH, 2005; ROOS et al., 2003).

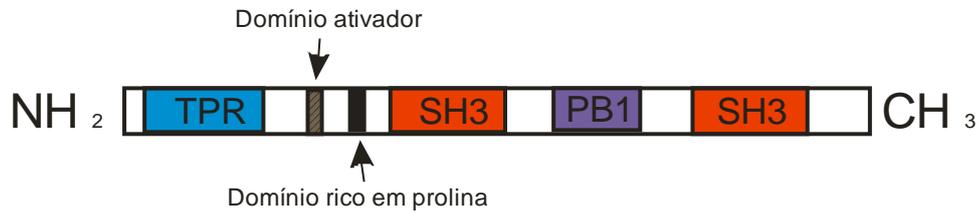


Figura 10. Proteína p67phox. Localização dos domínios TRP, SH3, PB1, domínio rico em prolina domínio ativador (modificado de Gabrilovich, 2005).

A ativação do Complexo NADPH oxidase tem início com a fosforilação da proteína citoplasmática p47 Phox nos resíduos de serina. O domínio rico em prolina da p47 Phox vai interagir com o domínio SH3 da p67 Phox, fazendo com que haja um aumento da afinidade entre p67 Phox e p22 Phox (figura 11 (2)). A p47 Phox depois de ativada, fosforila a p67 Phox. Ao mesmo tempo o outro domínio SH3 da p47 Phox se liga aos domínios ricos em prolina da p22 Phox (figura 11 (1)) enquanto que a p40 Phox, por meio do domínio C terminal PX, também se liga a p67 Phox (figura 11 (3)).

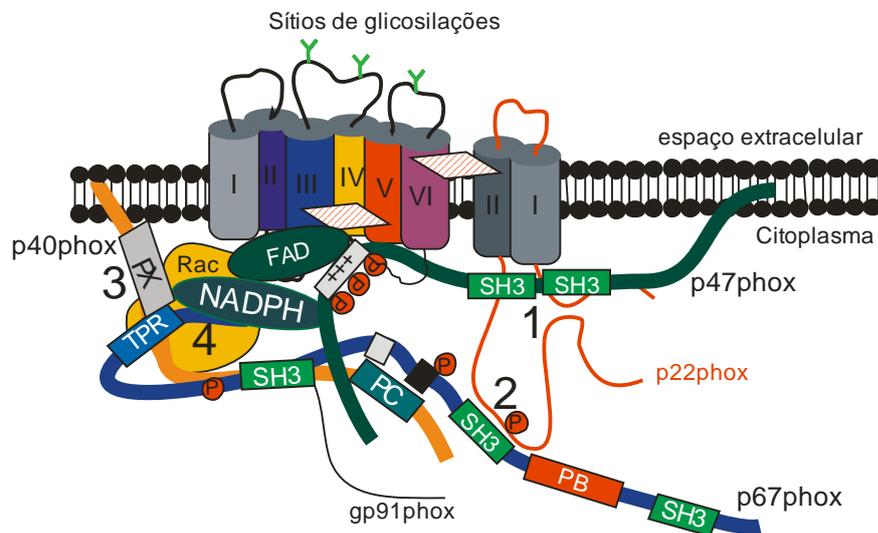


Figura 11. Complexo NADPH oxidase. (1) Interação entre p47phox e p22phox; (2) Interação entre p67phox e p22phox; (3) Interação entre p67phox e p40phox; (4) Interação entre p40phox e p67phox com Rac (modificado de Gabrilovich, 2005)

A interação de Rac na região N terminal da p67 phox é essencial na estabilização da ligação durante a ativação do Complexo NADPH Oxidase quanto do processo de reorganização da actina (GABRILOVICH, 2005; ROOS et al., 2003).

Depois de um detalhamento sobre o mecanismo que leva à explosão respiratória nos neutrófilos, retomaremos a revisão dos processos que envolvem os neutrófilos na resposta inflamatória, abordando os mecanismos de fagocitose e apoptose.

1.6. Fagocitose

Além da produção de substâncias tóxicas, os neutrófilos utilizam outro mecanismo chamado fagocitose (por isso ele foi classificado como fagócito profissional). Esse tipo de resposta tem origem em dois mecanismos moleculares: interação direta com o reconhecimento de PAMPs (padrões moleculares específicos para alguns patógenos) e interação indireta por meio da mediação por opsoninas (IgG ou componentes da cascata do Sistema Complemento fixadas na superfície do patógeno) (DIACOVICH; GORVEL, 2010; FLANNAGAN; COSIO; GRINSTEIN, 2009).

A interação direta envolve o reconhecimento de patógenos por receptores específicos como os TLRs (Receptores Toll-like). Esses receptores são os mais caracterizados existindo 10 tipos em humanos, onde TLR 3,7,8 e 9 detectam ácidos nucleicos microbianos enquanto TLR 2,4 e 5 reconhecem lipopolissacarídeos (LPS), lipoproteínas e flagelos. Diacovich observou que as moléculas virais também são reconhecidas no interior da célula (citoplasma) desencadeando a secreção de citocinas inflamatórias, como por exemplo, a Interleucina 1 β (IL-1 β) (DIACOVICH; GORVEL, 2010).

Já na interação indireta temos a participação de receptores do sistema complemento (CR1 e CR3) e receptores do tipo Fc γ . Nos neutrófilos quiescentes estão presentes os receptores do tipo Fc γ RIIa (CD32) e FC γ RIIIb (CD16) com baixa afinidade para ligação com IgG (KUIJPERS, 2001; LEE; HARRISON; GRINSTEIN, 2003).

Para que a fagocitose ocorra de forma eficaz, podemos destacar três pontos cruciais:

a) Opsonização (quando os patógenos são cobertos por opsoninas C3b e C5b, que posteriormente se ligarão a receptores CR1 e CR3 nos neutrófilos, vindo a iniciar uma cascata de eventos que resultará na formação de poros e lise do microorganismo);

b) Internalização de partículas (ligação entre partículas opsonizadas e receptores de membrana nos neutrófilos tipo $Fc\gamma$, fazendo com que os neutrófilos emitam pseudópodes ao redor da partícula, promovendo a fusão da membrana e dando origem ao fagossomo);

c) Maturação do fagossomo (o fagossomo irá adquirir seus efeitos antimicrobianos através da fusão com vesículas secretórias e grânulos e da posterior produção de ROS, caracterizando o fagossomo maduro pela presença de Rab 5, 7 e 9, pequenas GTPases, receptores de transferrina e LAMPs). A finalização da fagocitose é promovida pela fusão do fagossomo maduro com o lisossomo através da proteína Rab 7, onde as proteínas V-ATPases promoverão o transporte de H^+ acidificando acentuadamente o lúmen do fagolisossomo (pH abaixo de 5,0). Observa-se também a presença de altas concentrações de proteases e hidrolases e de espécies reativas de oxigênio [O_2^-] e [H_2O_2] (FLANNAGAN et al., 2009; LEE et al., 2003).

1.7. Apoptose

Quando os neutrófilos não recebem sinais de citocinas ou de outros agentes pró-inflamatórios, tais como IL-1, IL-2, IL-15, TNF e PAF, sobrevivem o tempo estimado de 10 horas e depois entram em processo de apoptose espontânea (morte celular programada que ocorre de forma ativa e fisiológica). Esses neutrófilos apoptóticos, assim como necróticos (morte celular geralmente mediada por estímulos externos agressivos e não fisiológicos como por exemplo a hipóxia) e debris celulares (oriundos de trauma por exemplo) são então fagocitados por fibroblastos (ocasionalmente) e por macrófagos nos tecidos, assim como removidos no fígado pelas Células de Kupffer. Nos últimos anos tem se mostrado outro mecanismo de morte celular chamado netiose, originária do nome “Neutrophil Extracellular Traps (NETs)”, que é caracterizado pela formação e liberação extracelular de redes compostas de DNA,

histonas e enzimas presentes nos grânulos (AKGUL; MOULDING; EDWARDS, 2001; KOLACZKOWSKA; KUBES, 2013; NETTO, 2001; SCHEEL-TOELLNER et al., 2004).

No tecido inflamado temos o trabalho conjunto de mediadores anti-apoptóticos e pró-apoptóticos fazendo um equilíbrio (homeostase) entre a eliminação de microrganismos e apoptose de neutrófilos, no qual são destacados dois pontos cruciais: quantidade reduzida de oxigênio podendo desempenhar um papel importante na sobrevivência dos neutrófilos e produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) por neutrófilos ativados podendo ser um mediador pró-apoptótico que promoverá a formação do apoptossomo resultando em apoptose.

Segundo D.Scheel Toellner, os neutrófilos possuem dois mecanismos que iniciam o processo de apoptose, fatores extrínsecos e fatores intrínsecos. Os primeiros são caracterizados pela presença de receptores de morte celular na superfície dos neutrófilos [DR (Death Receptor), TNFR (receptor de fator de necrose tumoral), TRAIL (fator de necrose tumoral relacionados a indução do ligante) e Fas] que atuarão indiretamente na autoproteólise da pró-caspase 8 ativando-a e posteriormente ativando a caspase 3, resultando na apoptose. Já os Fatores Intrínsecos, também conhecidos como mecanismo apoptótico mitocondrial, são responsáveis pela ativação e potencialização da resposta apoptótica de acordo com a produção elevada de ROS. Nesse caso estão envolvidos mecanismos que envolvem a família das proteínas Bcl-2 (proteínas pró-apoptóticas e anti-apoptóticas que regulam a dimerização de receptores, controlando as caspases e a disfunção mitocondrial na apoptose) e da formação do apoptossomo (ligação do citocromo c com o fator ativador de proteases pró-apoptótico-1 (Apaf-1), resultando na ativação da caspase 9 seguida das caspases 3, 6 e 7, culminando na apoptose) (Figura 12) (SCHEEL-TOELLNER et al., 2004).

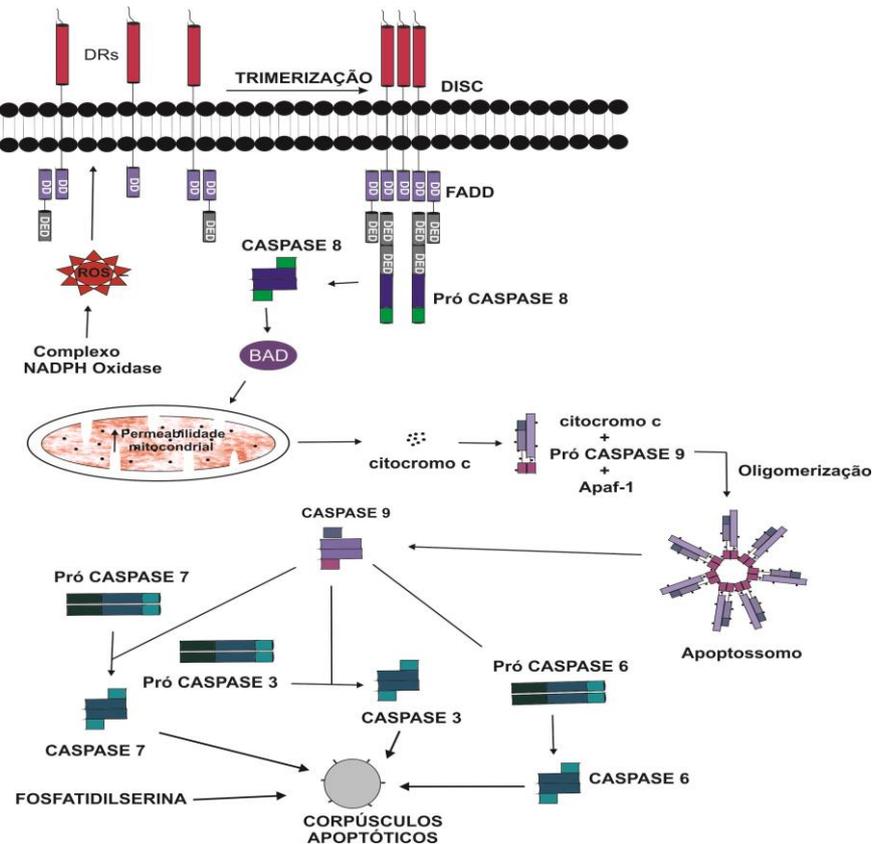


Figura 12. Apoptose em neutrófilos. Ligação de Fas ao receptor de membrana neutrofilico CD95, resultando na formação do complexo DISC e ativação da via extrínseca (envolvendo a ativação das caspases 8 e 3) e a via intrínseca (envolvendo a ativação das caspases 9, 3, 6 e 7) (NEVES, 2010).

Os neutrófilos apoptóticos assumem tanto características morfológicas com o encolhimento celular, formação de vacúolos citoplasmáticos, compactação da cromatina e perda da forma multilobular do núcleo, quanto características bioquímicas com a liberação de citocromo c e exposição na membrana de fosfatidilcolina, assim como diminuição da expressão de alguns receptores de membrana (CD31, CD50, CD66acde, CD66b, CD63 e CD87) e de receptores de superfície celular (CD15, CD16, CD32, CD35, CD88 e CD120b) (GABRILOVICH, 2005).

Acredita-se que a sobrevivência aumentada dos neutrófilos esteja relacionada com o tempo de exposição de mediadores anti-apoptóticos na superfície dos neutrófilos, tais como Mcl-1 e Bfl-1. A perda gradual desses mediadores diferencia as células não apoptóticas, com altos níveis de expressão de Mcl-1, das células apoptóticas, que têm a expressão significativamente diminuída desses mediadores (AKGUL et al., 2001; RADOVIC, 2008; SCHEEL-TOELLNER et al., 2004).

2. Fator de Agregação Plaquetária (PAF)

O nome Fator de Agregação Plaquetária foi criado em 1972 por Benveniste, Henson e Cochrane ao descrever mecanismo imunológico que induz a liberação de componentes vasoativos a partir de plaquetas, em específico a liberação de histamina dependente de leucócitos (LDHR). Eles observaram que os leucócitos basófilos de coelhos imunizados passavam a liberar um fator solúvel que ocasionaria a agregação de plaquetas por meio da liberação de histamina. Esse ensaio foi primeiramente descrito por Barbaro e Zvairler em meados de 1970, que mostrou uma molécula solúvel com atividade envolvendo reações alérgicas, plaquetas e leucócitos basófilos (BENVENISTE; HENSON; COCHRANE, 1972; HENSON; LANDES, 1976).

Após a descoberta da funcionalidade do PAF, o segundo passo foi caracterizar sua estrutura química. Esses ensaios foram realizados então por três laboratórios em 1979, que passaram a caracterizá-lo quimicamente como Acetil glicerol éter fosforilcolina (1-O-alkil-2-acetil-sn- glicero-3-fosfocolina) (figura 13). O terceiro laboratório determinou também que o PAF era idêntico a um fosfolípídeo hipotensor (APRL) localizado na medula renal, informação essa importante para a descoberta posterior de antagonistas do PAF e trabalhos voltados à reversibilidade da ativação por PAF (HANDLEY et al., 1987).

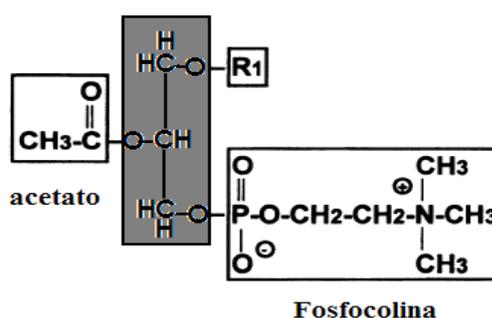


Figura 13. Estrutura química do PAF. Esqueleto de glicerol (em cinza) incluindo as cadeias laterais na posição R1 podendo se ligar um éter, éster ou vinil-éter; um grupo acetil esterificado na posição R2 e uma fosfocolina em R3 (cabeça polar).

Hoje sabemos que o PAF é um fosfolípídeo de éter acetilado que possui uma atividade biológica potente pró-inflamatória, sendo produzido por uma grande variedade de tipos celulares incluindo monócitos, macrófagos, eosinófilos, neutrófilos, plaquetas e células endoteliais em resposta a estimuladores inflamatórios como trombina, angiotensinaII, vasopressina, leucotrienos C4 e D4, histamina, bradicinina, elastase, catepsina, peróxido de hidrogênio, plasmina, interleucina 8, interleucina 1 e TNF. Observou-se que os mesmos tipos celulares também são alvo para as ações biológicas de PAF apresentando interações de alta afinidade com receptores de membrana (mecanismo autócrino). Da mesma forma foi observado que a célula produtora de PAF pode não excretá-lo ativando a própria célula (mecanismo intrácina), ou excretar o PAF que atuará nas células mais próximas para que não cause uma resposta sistêmica (mecanismo parácrino), ou atuará na estrutura molecular da célula proporcionando um contato físico com outra célula (mecanismo juxtácrino). Nos neutrófilos a resposta ao estímulo pelo PAF é acompanhada por quimiotaxia, liberação de grânulos, secreção de enzimas, aumento da fagocitose e geração de espécies reativas de oxigênio (HANDLEY et al., 1987; MCMANUS, L. M.; PINCKARD, 2000; MONTRUCCHIO; ALLOATTI; CAMUSSI, 2000; TURNER et al., 1994).

2.1. Variabilidade da Estrutura Química do PAF

Na análise da estrutura química do PAF com esqueleto baseado no glicerol, observaram-se modificações na natureza da ligação química na sua cadeia lateral R1, podendo ligar-se a três formas distintas: éter, éster ou vinil-éter. Com essas três subclasses de PAF as células criaram um grande repertório de PAF, isto é, garantiram uma grande variedade de espécies estruturalmente semelhantes sendo elas o Alquil-PAF, Acil-PAF e Alquenil-PAF, respectivamente (Figura 14). Segundo McManus, o O 1-O-alkuil-2-acetil-sn-glicero-3-fosfocolina pode apresentar também duas variações na quantidade de carbono da cadeia saturada alquil, sendo elas 16-O-alkuil-PAF e 18-O-alkuil-PAF (MCMANUS, L. M.; PINCKARD, 2000).

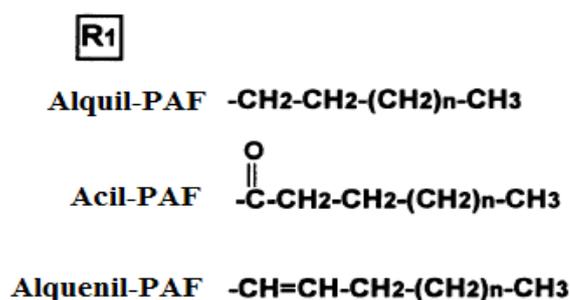


Figura 14. Cadeias laterais R1 para PAF (Alquil-PAF, Acil-PAF e Alquenil-PAF).

A quantidade em que essas subclasses de PAF são produzidos dependerá do tipo celular que a produz durante a ativação celular, como por exemplo, nos neutrófilos a produção chega a 86% do tipo alquil-PAF e 14% do tipo acil-PAF (MCMANUS, L. M.; PINCKARD, 2000).

2.2. Biossíntese e Degradação do PAF

Outra modificação que ocorre na estrutura do PAF é durante o processo de biossíntese que envolve a cadeia lateral R2. Essa modificação pode ocorrer por meio de duas vias: a primeira chamada *de novo* (usada pelas células para manter os níveis de PAF durante a função celular normal) e a segunda *remodelação* (ativada pelos agentes anti-inflamatórios) (FERREIRA, 2006).

A via da remodelação é a mais comum. O precursor para o caminho da remodelação é um fosfolípido de membrana, geralmente a fosfatidilcolina (PC) (figura 15)

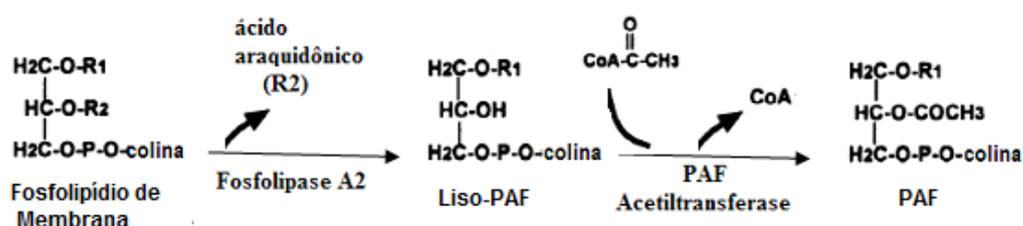


Figura 15. Biossíntese do PAF.

Essa via tem início com a estimulação dos neutrófilos por um agente pró-inflamatório, como por exemplo o PAF, seguida da ativação da enzima fosfolipase A2 α citosólica. A ativação dessa enzima é um ponto fundamental, pois ela hidrolisa a cadeia lateral acil-graxo esterificada na posição R2 do fosfolípídeo de membrana formando o Liso-PAF e liberando ácido araquidônico. A presença do Liso-PAF é curta, sendo rapidamente acetilado para formar o PAF (fosfolípídeo ativo) por meio da enzima PAF acetiltransferase (AQUINO, 2008; MCMANUS, L. M.; PINCKARD, 2000; RUBIN et al., 2005).

Tendo em vista as vantagens para uma produção rápida de PAF (precursor (FC) de fácil acesso, rápida atividade da fosfolipase A2 α e da PAF acetiltransferase) a célula não armazena PAF na sua forma final e nem na sua forma pré-formada (liso-PAF), o PAF é rapidamente produzido após a ativação celular. Relatos comprovam que a administração do Liso-PAF *in vivo* aumentou a sobrevivência de murinos com septicemia, vindo a prolongar o tempo de ação dos neutrófilos no combate ao agente infeccioso (AQUINO, 2008; FRASCH et al., 2007; MCMANUS, L. M.; PINCKARD, 2000; RUBIN et al., 2005).

Uma vantagem que essa via possui é a liberação de ácido araquidônico durante a ação da fosfolipase A2 em muitas células inflamatórias, pois o mesmo pode ser metabolizado em uma grande variedade de produtos biologicamente ativos por ação de enzimas da cascata do ácido araquidônico (lipoxigenases e sintases) formando, por exemplo, os Leucotrienos B4 (neutrófilos), tromboxano A2 (plaquetas), prostaglandina E2 (monócitos/macrófagos) e prostaciclina (células endoteliais). Segundo Maria Del Carmen Garcia, os leucotrienos B4 e o PAF possuem um precursor em comum (1-alquil-2-araquidonoil-sn-3-glicerofosfocolina) que pode sintetizar tanto eicosanoides a partir do ácido araquidônico, como PAF a partir de Liso-PAF pelos neutrófilos (GARCIA et al., 1990; MCMANUS, L. M.; PINCKARD, 2000; SNYDER, 1995).

Com o objetivo de limitar a ação do PAF no organismo, o mecanismo de regulação da biossíntese é fundamental durante o processo da inflamação. A regulação é feita principalmente pela sua degradação por meio da ação enzimática da PAF acetilhidrolase (PAF-AH), originalmente identificada no plasma sanguíneo produzida por monócitos e macrófagos, que atua retirando o grupo acetato da cadeia lateral R2 do PAF formando o Liso-PAF. O Liso-PAF é então transformado no seu precursor (fosfolípídeo de membrana) por meio da enzima Acil transferase (Figura 16). Outro

ponto de regulação sugerido por Maria Del Carmen é por meio da enzima 5-lipoxigenase que modula a biossíntese do PAF agindo na fosfolipase A2 por inibição alostrérica reversível ou até mesmo por inibição competitiva (GARCIA et al., 1990; MCMANUS, L. M.; PINCKARD, 2000).

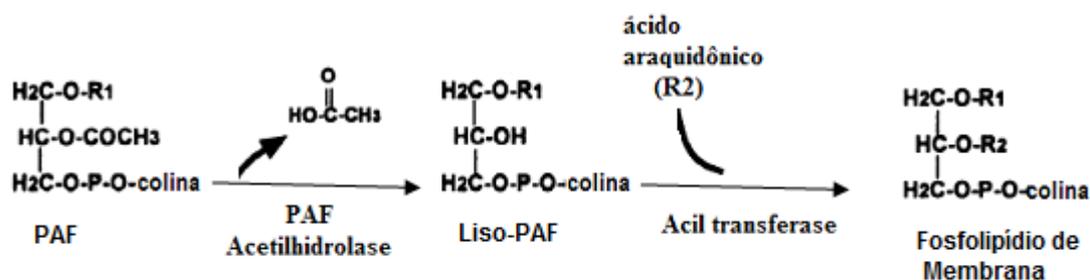


Figura 16. Degradação do PAF

2.3. Importância Clínica

O processo inflamatório é o resultado da ação de defesa imediata do organismo, que se inicia com a ativação do sistema imune inato, contra microrganismos invasores, remoção de restos teciduais e reparo do tecido lesionado envolvendo inúmeros mediadores pró-inflamatórios entre eles o PAF e LTB₄ (mediadores endógenos que atuam em condições não infecciosas) e o fMLP e LPS (mediadores exógenos que atuam em condições infecciosas).

O PAF é um importante mediador pró-inflamatório encontrado no sangue, urina, fluido amniótico e saliva, cuja produção e ação generalizada pode agravar o quadro clínico de pacientes em várias doenças, tais como choque anafilático e séptico, anafilaxia cardíaca, asma, rejeições hiperagudas de órgãos transplantados, necrose intestinal isquêmica, doença granulomatosa crônica (DGC), síndrome da angústia respiratória aguda (ARDS) e síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SRIS). Acredita-se também que o PAF seja um dos principais fatores para a evolução da aterosclerose, onde foi mostrado que a detecção da enzima PAF-AH tenha potencial para diagnóstico laboratorial da doença arterial coronariana. Susana Moreno e colaboradores associaram a ação do PAF na fisiopatologia de outras doenças

inflamatórias como lúpus eritromatoso sistêmico, artrite reumatoide e doença de Crohn (HANDLEY et al., 1987; MIOTLA; JEFFERY; HELLEWELL, 1998; MORENO et al., 2006).

Tem-se observado que o PAF e seus precursores, assim como as enzimas que atuam na via da remodelagem, estejam envolvidos em uma grande escala de doenças que vão desde a rejeição de órgãos até doenças autoimunes como mencionadas anteriormente. O funcionamento regulado dessa via da remodelagem é um dos pontos cruciais para o controle da homeostase do organismo durante uma resposta imunológica evitando complicações mais graves como SARA, ARDS e SRIS (FERREIRA, 2006; RUBIN et al., 2005).

Essas complicações podem ser explicadas pela resposta exacerbada do sistema imune na tentativa de proteger o organismo, onde o PAF como um dos mediadores centrais na resposta imune inata, age provocando vasodilatação, migração de granulócitos, hemoconcentração (resultante do aumento da permeabilidade vascular e aumento do hematócrito), trombocitopenia e neutropenia. Em consequência foi observado broncoconstrição, hipotensão, disfunção cardíaca, hipertensão pulmonar e edema pulmonar, características essas associadas à maioria das complicações citadas anteriormente (ARDS e SIRS) (HANDLEY et al., 1987; TURNER et al., 1994).

2.4. Receptor do Fator de Agregação Plaquetária em neutrófilos

A estimulação dos neutrófilos por PAF tem início com a sua ligação ao receptor de membrana no neutrófilo, chamado PAFR (Figura 16). Esse receptor faz parte da família de receptores de membrana do tipo serpentina constituído de sete segmentos transmembrânicos em α hélice, com características hidrofóbicas e que se ligam a grupos hidrofílicos no interior da célula. Outra característica crucial desse tipo de receptor é que ele pertence à superfamília dos Receptores Acoplados a Proteína G (GPCRs) insensíveis à Toxina Pertussis, em específico do tipo G_{i3} , G_{as} e $G_{\alpha q}$, diferentemente do receptor para fMLP. Essa especificidade de sensibilidade à toxina é sugerida por muitos autores como responsável pela diferença de intensidade de resposta entre a ativação por fMLP e a estimulação pelo PAF. Um dos pontos observados foi que na estimulação pelo PAF não ocorre mobilização de cálcio das reservas intracelulares

(Retículo Endoplasmático) sugerindo ativação parcial dos neutrófilos, isto é, estimulação. Várias perguntas têm sido feitas a respeito do processo de estimulação e ativação, entre elas podemos citar: O estímulo pelo PAF e a ativação pelo fMLP desencadeiam ativação de diferentes vias intracelulares? Seria possível ambas condições compartilharem parte das vias, como por exemplo na produção de LTB₄ e prostaglandinas? Quais diferenças entre o perfil proteico dos neutrófilos quiescentes e neutrófilos estimulados pelo PAF podem ser associadas a mecanismos de ativação? Que vias fazem com que o estímulo por PAF seja reversível e a ativação por fMLP não seja?(MORENO et al., 2006)

Elizabeth Kitchen relata que o PAF possui ação “priming” nos neutrófilos, sendo caracterizada como rápida (mediada pelo receptor), associada à ativação direta mínima com pouca ou nenhuma liberação de ânion superóxido e reversibilidade utilizando receptores antagonistas de alta afinidade com PAF. Acredita-se que a natureza do efeito “priming” venha a desempenhar um papel fundamental na resposta inflamatória a longo prazo (AQUINO, 2012; FRASCH et al., 2007; KITCHEN et al., 1996; STEEL; COCKERAN; ANDERSON, 2002).

Recentemente uma pesquisa realizada por S.Courtney revelou que a estimulação dos neutrófilos por Liso-fosfatidilcolina foi acompanhada de modificações na membrana plasmática e um aumento considerável no receptor G2A na superfície da célula seguida de movimentação de vesículas secretórias (FRASCH et al., 2007).

2.5. Cascata de sinalização intracelular de neutrófilos estimulados pelo PAF

A via de sinalização intracelular de neutrófilos ativados pelo PAF ainda é pouco conhecida, sendo descritos alguns pontos isolados caracterizando principalmente o receptor (PAFR), o aumento de alguns segundos mensageiros como o diacilglicerol (DG), inositol-trifosfato (IP₃) e cálcio, assim como a ativação de alguns tipos de cinases (MAPK, PKC, PTK) e fosfolipases (PLA₂ e PLC β). A sinalização intracelular mediada pelo PAF envolve participação de várias proteínas ainda não descritas que podem ser a chave para entendermos melhor o funcionamento da maquinaria neutrofilica durante alguns processos patológicos. Entre as estratégias utilizadas temos a análise das modificações pós-traducionais (como por exemplo fosforilação, metilação e acetilação),

com o objetivo geral de propor a via de sinalização entre as proteínas identificadas, que veremos com mais detalhes adiante (FERNANDES et al., 2005; YANG; SETO, 2008).

Sabe-se que a via de sinalização do PAF em neutrófilos estimulados tem início com a ligação do PAF ao seu receptor de membrana (PAFR) e a posterior dissociação das subunidades $\beta\gamma$ e α da proteína G. Como foi elucidado anteriormente, o PAFR está acoplado à proteína G insensível à Toxina Pertussis, que irá ativar três proteínas: a Fosfoinositol 3 Cinase (conhecida também como PI3K, sendo um heterodímero ligado às subunidades $\beta\gamma$ da proteína G), a fosfolipase A2 (PLA2) e fosfolipase C (PLC) (FAZAL et al., 2002; NICK et al., 1997).

Um dos caminhos ativado pela proteína G envolve a ativação da Proteína Tirosina Cinase (PTK) que irá ativar PI3K, que por sua vez ativa duas proteínas pertencentes à família das MAPK chamadas ERK1 e ERK2 via Ras, Raf e MEK 1/2 (CHEN; LIN; HSU, 2005; FAZAL et al., 2002; NICK et al., 1997).

Outro caminho é a ativação da PLC. Ela irá clivar o fosfatidilinositol 1,5 bifosfato (PIP2) formando 1,4,5 inositol trifosfato (IP3) (que será liberado para o citosol por possuir características hidrofílicas se ligando a receptores de cálcio do retículo endoplasmático) e 1,2 diacilglicerol (DG) (que se movimentará na membrana, por ser hidrofóbico, até entrar em contato com a Proteína Cinase C (PKC), ativando-a). Em sequência, a PKC ativará ERK1/ERK2 (formam um dímero) que por sua vez irá ativar o complexo NADPH Oxidase e também fatores de transcrição. O dímero também pode ser formado por meio da ativação das proteínas Ras, Raf e MEK1/2 que posteriormente atuarão nas subunidades ERK1 e ERK2. Lee-Wei Chen mostrou que essa via de ativação da ERK1/ERK2 não tem ligação com a via de ativação da proteína p38MAPK (uma das principais proteínas ativadas na resposta celular), pois a p38MAPK é ativada somente via PLA2 e MEK3/6 em estimulações pelo PAF. Apesar dos dados publicados, ainda restam questionamentos, como: Será ERK1/ERK2 ativado diretamente por PKC, Ras, Raf e MEK1/2 ou há outros intermediários no processo? E no caso da ativação da p38MAPK? Quais possíveis proteínas poderiam estar envolvidas de forma intermediária nessas principais ativações? Haveria ativação de outros fatores de transcrição, por exemplo, por acetilação? Que vias estariam envolvidas em tal ativação, uma vez que ERK1/ERK2 realizam fosforilação? (Lee-Wei Chen descreveu a p38MAPK como a responsável pela ativação parcial do Complexo NADPH oxidase, no qual somente a subunidade p67 é ativada propondo assim o estímulo pelo PAF). Que proteínas estariam

3. Proteômica e Modificações Pós Traducionais

A proteômica é um método microanalítico que tem sido muito utilizado na investigação quantitativa e qualitativa das proteínas existentes em sistemas biológicos, seja ele em sua forma nativa ou modificada, como por exemplo por meio de um estímulo. Um dos métodos mais utilizados na proteômica é chamado *shotgun proteomics*. Esse método é frequentemente usado em uma abordagem de descoberta, buscando identificar proteínas que apresentem abundância diferencial entre condições. O método parte de amostras previamente digeridas sem a necessidade de separação em nível de proteínas com aumento do rendimento e da cobertura de identificação e quantificação. A mistura de peptídios das várias proteínas presentes é separada por meio da cromatografia, cujas frações eluídas são automaticamente injetadas e analisadas em um espectrômetro de massas, como o Q-exactive. Esse equipamento permite não só obter os espectros MS de alta resolução onde os peptídios têm sua massa molecular determinada, como também espectros MS² (MS/MS) onde os peptídios são fragmentados e a proteína pode ser identificada a partir da sequência identificada. A quantificação pode ser realizada em nível de MS ou MS², a depender da técnica utilizada, seja livre de marcadores ou com marcação isotópica em nível de peptídios respectivamente. Permite também a análise de modificações pós-traducionais, como por exemplo acetilação, glicosilação e fosforilação nesses peptídios (HIRSCH et al., 2004; HULTIN-ROSENBERG et al., 2013; MERTINS et al., 2013).

Recentes estudos têm direcionado para a identificação de modificações pós traducionais (fosforilação, ubiquitinação, acetilação, glicosilação entre outras), onde tem sido possível especificar cada tipo de modificação de forma qualitativa e quantitativa assim como a localização dos seus sítios de modificação. Uma das principais descobertas metodológicas nessa área foi o aprimoramento do enriquecimento de amostras complexas, onde passou-se a obter mais informações de uma mesma amostra, como por exemplo utilizando “*immobilized metal affinity spectrometric analysis*” (IMAC) ou então o dióxido de titânio (TiO₂) para obter peptídios monofosforilados e multifosforilados. Logo em seguida descobriu-se que se fossem feitas sucessivas eluições de IMAC seria obtida uma quantidade maior de amostras recuperadas, então passou-se a usar o método “Sequential IMAC” ou mais conhecido como SIMAC. Esses

tipos de enriquecimento podem ser combinados entre si ou com diversas enzimas, nas quais são extraídos peptídios com outras modificações pós traducionais como por exemplo as glicosilações (EYRICH; SICKMANN; ZAHEDI, 2011; MELO-BRAGA et al., 2014; MERTINS et al., 2013; THINGHOLM et al., 2008).

A espectrometria de massas pode ser usada na proteômica não somente para demonstrar a presença de uma proteína e/ou modificação pós-traducional, mas também na medida da dinâmica de variações na abundância de proteínas. Para isso tem sido utilizada a marcação química com isótopos estáveis como o iTRAQ (*isobaric tag for relative and absolute quantification*). O iTRAQ consiste na ligação de marcadores isobáricos em aminas primárias dos peptídios, permitindo que as amostras das condições em análise sejam misturadas e analisadas em uma única etapa cromatográfica, aumentando a reprodutibilidade. Os peptídios são fragmentados num espectrômetro de massas, gerando picos de m/z específicos para cada marcador sem alterar a sequência peptídica. Da diferença na intensidade relativa desses picos se infere a abundância relativa do peptídio marcado e conseqüentemente da proteína (THOMPSON et al., 2003).

A marcação com iTRAQ permite a multiplexação de até quatro tipos diferentes de amostras em um mesmo experimento LC/MS/MS, quando utilizado o kit 4Plex. Os reagentes iTRAQ não são poliméricos e apresentam marcação isobárica que consiste de um grupo repórter (1), um grupo de equilíbrio (2) e um grupo com peptídio reativo, conforme mostrado na figura abaixo:

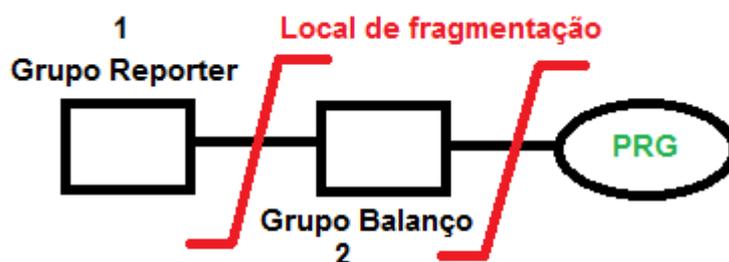


Figura 18. Estrutura Química do Reagente iTRAQ.

Nesse esquema podemos descrever dois pontos fundamentais da marcação iTRAQ: o grupo PRG que faz a ligação covalente dos grupos iTRAQ de marcação isobárica com cada cadeia lateral de lisina e também com grupo N-terminal de cada peptídeo, onde vários peptídios em uma só amostra são marcados. O segundo é o grupo balanço, que pode apresentar massas de 31, 30, 29 ou 28 Da e assegura que um peptídeo marcado com reagente iTRAQ cujo grupo repórter apresente massa, respectivamente, de 114, 115, 116 e 117 Da tenham todos a mesma massa de 145 Da.

Durante o MS/MS, a fragmentação ocorre nos pontos mostrados na figura acima (em vermelho). Como resultado da fragmentação, temos a perda do grupo balanço neutro (isto é, não ionizado) e a geração dos íons do grupo repórter. Esses íons aparecem como picos na região de massa baixa entre m/z 113 e m/z 119, fazendo com que os íons encontrados sejam somente dos íons repórter correspondentes à amostra marcada. Em seguida, as relações entre as condições podem ser quantificadas por comparação da área do pico de um grupo repórter para o outro. A proporção entre a área de um pico comparada a outro, representa a quantidade relativa de um dado peptídeo em cada uma das amostras.

3.1. Acetilação de proteínas

As modificações pós-traducionais são fundamentais para a regulação das funções essenciais de muitas proteínas eucarióticas, onde a acetilação de lisinas se torna hoje uma pesquisa central para entender melhor a sinalização intracelular. Tal fato se observa porque a acetilação de lisina está envolvida em diversos eventos bioquímicos intracelulares como a ativação de fatores de transcrição e liberação de proteínas efetoras responsáveis pelos processos celulares fundamentais como mobilidade celular, metabolismo energético, endocitose, autofagia, sinalização da membrana plasmática, estabilidade protéica, regulação do ciclo celular, regulação do processo de ativação de proteossoma, controle das atividades proteolíticas entre outros (SADOUL et al., 2008; YANG; SETO, 2008).

Vários trabalhos têm sido publicados mostrando a importância da acetilação e desacetilação nos processos de regulação da expressão de genes inflamatórios. Em seu trabalho voltado para pesquisa de acetilação nas histonas durante a asma e a doença

pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), Kazuhiro Ito sugeriu que alguns resíduos de lisinas presentes nas histonas são acetilados em abundância e que essas acetilações são os fatores iniciais para a regulação da expressão de genes inflamatórios. Já Makoto Ishii relatou a influência da acetilação da histona 3 (H3) nos níveis aumentados de CXCR2 em neutrófilos ativados durante a sepse, proporcionando assim o aumento do recrutamento dos neutrófilos para os locais da infecção. A influência da acetilação em neutrófilos também foi relatada na regulação da expressão do gene TREM-1 (membro da superfamília das imunoglobulinas expressas em macrófagos e neutrófilos sendo um potente amplificador do sinal TLR que inicia a resposta inflamatória). Ao ocorrer a hipoacetilação das histonas 3 e 4 nos resíduos de lisina ocorre a inibição de TREM-1, resultando em um efeito anti-inflamatório e aumento da sobrevivência dos modelos animais com sepse. Existem outras pesquisas que relacionam uma maquinaria mais complexa envolvendo um sistema de codificação coordenada e especificada pelas modificações pós-traducionais. Um exemplo é a ativação do fator de transcrição NFκβ, que está temporariamente inativo no citoplasma e quando recebe um estímulo é acetilado e depois fosforilado (ISHII et al., 2012).

As enzimas envolvidas nesse processo de acetilação e desacetilação de histonas foram caracterizadas como Histonas Acetiltransferases (HATs) e Histonas Desacetilases (HDACs), respectivamente. Um fato curioso mostra que outros tipos proteicos possuem atividade intrínseca ao HAT, como por exemplo CBP, P300, P/CAT, TIP-60 e receptores co-ativadores de esteróides. A acetilação pelas HATs foi observada nas lisinas presentes na cauda N-terminal das histonas promovendo o desenrolamento da cromatina e início da transcrição. Esse processo pode ser regulado pelos fatores de transcrição pró-inflamatórios, tais como NFκβ, AP-1 e STAT. Além de atuarem nas histonas, outros estudos mostraram que essas enzimas atuam também em uma grande variedade de proteínas não-histonas e de proteínas citoplasmáticas incluindo p53, c-Myb, NFκβ, STATs, α-tubulinas, Ku70 e proteínas do choque térmico. Tendo em vista que uma grande variedade de proteínas possui ativação vinculada ao processo de acetilação ou desacetilação, tornou-se imprescindível a pesquisa de proteínas acetiladas em neutrófilos ativados pelo Fator de Agregação Plaquetária (PAF). O principal objetivo é conhecer quais as proteínas acetiladas estão envolvidas no processo de transcrição de genes inflamatórios e também em outros mecanismos da via de sinalização intracelular na ativação dos neutrófilos, cujas características principais são a

produção de espécies reativas de oxigênio (ativação do Complexo NADPH oxidase), retardo da apoptose e produção de Leucotrieno (YANG; SETO, 2008; YUAN et al., 2012).

II. JUSTIFICATIVA

Para que a resposta imunológica mediada por neutrófilos seja eficiente e ao mesmo tempo esteja sob controle, células do sistema imune e células endoteliais liberam substâncias que ativam, estimulam e inibem várias ações dos neutrófilos. O PAF é uma dessas substâncias, pois é um mediador lipídico liberado por vários tipos celulares (células endoteliais, neutrófilos,) que atua diretamente como um estimulador em neutrófilos quando o indivíduo sofre um trauma ou indiretamente quando é acometido por uma infecção, atuando como um potencializador de outra ativação. Uma extensa e complexa cascata de sinalização intracelular é iniciada nos neutrófilos após a estimulação pelo PAF, porém ainda há diversas lacunas no conhecimento a respeito das proteínas que integram as vias desde o recebimento do sinal na membrana até as diferentes consequências funcionais do neutrófilo durante a resposta inflamatória. Para entendermos melhor como os neutrófilos agem em resposta à estimulação pelo Fator de Agregação Plaquetária (PAF) é necessário que se identifiquem as proteínas envolvidas nessa cascata de sinalização evidenciando principalmente as alterações na abundância de proteínas específicas em relação a cada condição (quiescente e estimulado pelo PAF). A identificação de tais proteínas e sua correlação com as vias de estímulo e ativação dos neutrófilos permitirá a elucidação de pontos ainda obscuros em vias já descritas como, por exemplo a ativação do Complexo NADPH Oxidase pela ERK1/ERK2 e p38 (duas vias principais relatadas até hoje), assim como as questões a respeito do controle dos fatores de transcrição por meio de modificações pós traducionais como acetilação e também no estabelecimento de correlações entre essas vias (por meio de interatoma).

O estudo da morfologia dos neutrófilos configura-se como estratégia complementar ao estudo da proteômica nas diversas condições de estímulo e ativação, como por exemplo na estimulação pelo PAF. Sabe-se que a morfologia dos neutrófilos sofre alterações durante sua ativação, como descrito acima, porém a falta de detalhamento de tais alterações, bem como das variações morfológicas decorrentes de diferentes vias de ativação dá margem às perguntas propostas na introdução. O presente

estudo se propõe a buscar respostas para tais questões por meio da análise morfológica pela Microscopia Eletrônica de Varredura.

É importante ressaltar também o potencial biotecnológico de tais resultados, uma vez que as proteínas a serem identificadas podem vir a ser caracterizadas, em estudos futuros, como biomarcadores. Tais biomarcadores constituirão alvos em potencial para novos antiinflamatórios e marcadores moleculares diagnósticos, com aplicação em uma ampla gama de condições clínicas, como a resposta inflamatória sistêmica pós-trauma, enterites, hepatites, dermatoses, e diversas patologias auto-imunes.

III. OBJETIVO

O objetivo do presente trabalho é identificar proteínas totais com abundância diferencial em neutrófilos estimulados pelo Fator de Agregação Plaquetária (PAF), assim como proteínas acetiladas propondo possíveis indicadores proteicos que possam vir a controlar doenças como DPOC, asma, SARA, SRIS e outras doenças citadas anteriormente.

a. Estratégias utilizadas para alcançar o objetivo proposto

- Identificar e analisar a abundância proteica diferencial dos neutrófilos estimulados pelo Fator de Agregação Plaquetária (PAF) por meio da técnica de proteômica iTRAQ.

- Identificar as proteínas que passaram pelo processo de acetilação/desacetilação durante a estimulação pelo Fator de Agregação Plaquetária (PAF).

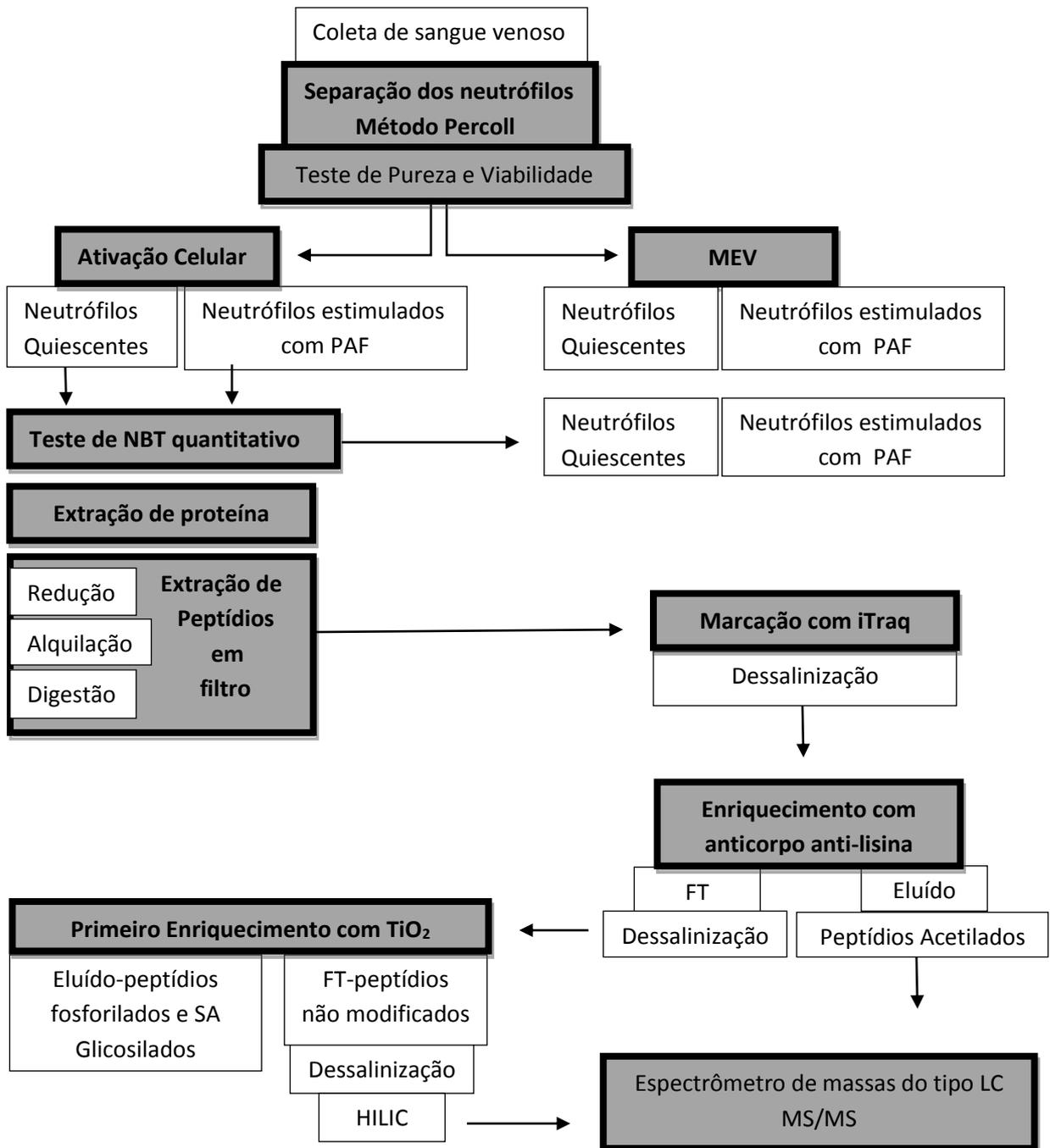
- Analisar o interatoma das proteínas identificadas, propondo as vias de sinalização dos neutrófilos nessa estimulação.

- Identificar padrões morfológicos da superfície celular característicos da estimulação dos neutrófilos pelo PAF pelo uso de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).

IV. METODOLOGIA

4.1. Delineamento experimental

Figura 19. Delineamento experimental



4.2. Amostras

A amostra foi coletada de cinco indivíduos voluntários que atendiam aos seguintes critérios de escolha: ausência de histórico de doenças crônicas, ou de manifestações alérgicas, inflamatórias e infecto contagiosas nos últimos 3 meses, não fumante, sem uso de álcool nos cinco dias que antecedem a coleta, que não estejam fazendo uso de medicamentos e que estejam em uma faixa etária de 23 a 35 anos). Todos eles preencheram e assinaram o TCLE, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa.

Após a coleta sanguínea por punção venosa periférica com seringa heparinizada (5 UI/mL), os neutrófilos foram separados pela diferença de densidade celular por meio de dois gradientes de Percoll (*Amersham Biosciences*) em concentrações de 60% e 70% (tabela 5). A montagem do gradiente foi feita em um tubo Falcon de 15mL, onde são apresentados a ordem de montagem: Gradiente 60%; Gradiente 70% e sangue venoso (todos na quantidade de 3 mL). No preparo desses dois gradientes foi utilizado HBSS 10x (0,2 g Cloreto de Potássio; 0,03 g Fosfato de Potássio monobásico; 4 g NaCl; 0,024g Fosfato de Sódio dibásico; 0,5 g D-glicose; 0,0055 g vermelho de fenol; 0,175 g Bicarbonato de sódio; 50 mL água milli-Q; pH entre 7.2 e 7.4) e HBSS 1x, como mostrado na tabela abaixo (SANTOS, 2007).

Reagentes	60% (3mL)	70%(3mL)
Percoll 100%	1800 µL	2100µL
HBSS 1X	990 µL	645µL
HBSS 10X	210µL	255µL

Tabela 5. Tipos e quantidades de reagentes no preparo dos gradientes.

Após a primeira centrifugação a 1300 rpm por 15 minutos, temos a separação de células da seguinte forma: as hemácias no fundo do tubo, logo acima o gradiente de Percoll 70%, seguido de um halo com os neutrófilos, depois o gradiente de Percoll 60%, e por fim as células mononucleares e o plasma, como mostrado na figura abaixo.

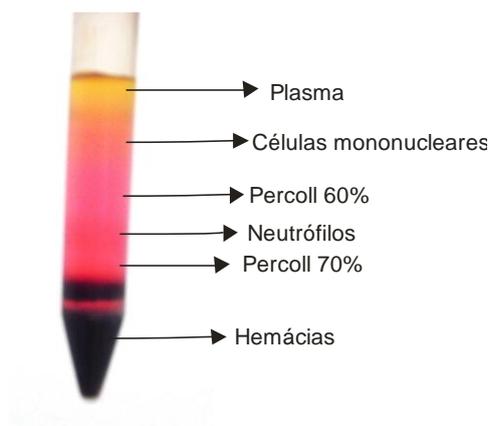


Figura 20. Tubo Falcon com as células separadas pelos gradientes

Depois que os gradientes de Percoll e as células foram separadas, os neutrófilos foram transferidos para outro tubo Falcon de 15 mL no qual foram submetidos a 2 centrifugações com HBSS 1X para retirada do Percoll da amostra. Em seguida foi realizada hemólise com água destilada por 15 segundos para retirada de hemácias, seguida por reconstituição da osmolaridade com HBSS 2X (NEVES, 2010).

4.3. Métodos de avaliação da amostra

Os métodos de avaliação da amostra descritos abaixo foram utilizados para confirmar a confiabilidade da amostra. Amostras que não atendessem a tais critérios foram excluídas do estudo. Vale ressaltar que após o último processo de purificação dos neutrófilos, os mesmos são ressuspensos em HBSS 1X com cálcio e Magnésio sem vermelho de fenol para que possam ser estimulados posteriormente pelo PAF.

4.3.1. Pureza da amostra

A amostra foi avaliada por meio do esfregaço corado pelo método de *Wright*. Na avaliação foram contadas 100 células em 4 campos diferentes da lâmina, analisando as características morfológicas visualizadas com aumento de 1600x em óleo de imersão.

Foram aceitas apenas amostras que apresentavam pureza acima de 98% de neutrófilos (SANTOS, 2007).

Um ponto a ser evidenciado é que os eosinófilos (granulação mais grosseira e mais avermelhada) não podem ser separados dos neutrófilos pelo método de gradiente devido à sua semelhança de densidade, podendo ser diferenciados dos neutrófilos pelo método de *Wright*. Por esse motivo a importância de se fazer uma seleção de indivíduos que não apresentem reações alérgicas com frequência, nem portadores de parasitoses intestinais. Ainda assim, indivíduos que apresentassem mais que 2% de eosinófilos foram excluídos do estudo.

4.3.2. Viabilidade celular

A porcentagem de células vivas e mortas foi verificada antes e depois da estimulação, utilizando-se a solução de nigrosina, em uma contagem de 100 células onde podem ser observadas células vivas com núcleos transparentes e as células mortas com os núcleos corados de preto. As amostras aceitáveis para a continuação dos experimentos apresentaram mais de 98% de células vivas (SANTOS, 2007).

4.3.3. Contagem de células

Nesse método foram utilizados 50 μ L do líquido de *Turck* (2 mL ácido acético glacial, 1mL de azul de metileno 1% e 93 mL de água destilada, sendo filtrada) para 10 μ L de neutrófilos em suspensão. A análise é feita por microscopia óptica em câmara de *Neubauer*, cuja visualização é realizada no aumento de 100 x para a contagem das quatro regiões L, conforme a figura abaixo. A contagem se fez necessária para que os ensaios subsequentes fossem realizados com um número constante de células (SANTOS, 2007).

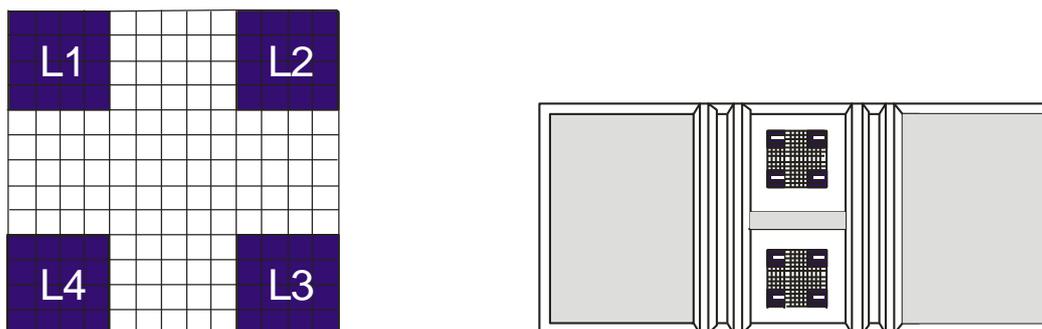


Figura 21. Câmara de Neubauer

4.4. Ativação celular

Com a confirmação de pureza e viabilidade acima de 98%, deu-se continuidade nos ensaios que foram divididos em três vertentes (tabela 6): Teste de NBT quantitativo, Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Proteômica. Nessa análise do proteoma foram realizados os ensaios com neutrófilos quiescentes e estimulados com PAF para análise total de proteínas (conjunto de proteínas obtidas sem enriquecimento) e análise das proteínas acetiladas.

As amostras destinadas à proteômica foram incubadas por 30 minutos a 37 °C para os neutrófilos quiescentes e neutrófilos estimulados pelo Fator de Agregação Plaquetária (200 nmol/L), assim como para as demais condições citadas nesse trabalho (fMLP e TiO₂). Note-se que o presente trabalho aborda os resultados obtidos a partir do estímulo com PAF. A ativação com fMLP foi utilizada aqui apenas como controle positivo para os ensaios de NBT. Os demais resultados para as condições de ativação por fMLP e de contato com TiO₂ não foram abordados no presente estudo por limitações de tempo e serão alvo de projetos futuros. Para o teste de NBT quantitativo foi utilizado como controle positivo o fmlp 100 nmol/L. A tabela abaixo mostra o esquema de estimulação dos neutrófilos nos diversos ensaios realizados assim como a quantidade de células necessária para cada ensaio (AQUINO, 2008; PINTO, 2006).

Ensaio	Ativadores	Quantidade de neutrófilos
MEV	Quiescente/PAF	$1,8 \times 10^6$
NBT quantitativo	Quiescente/PAF/fMLP	2×10^5
Proteômica	Quiescente/PAF	1×10^7

Tabela 6. Delineamento experimental dos ensaios realizados (NBT quantitativo, MEV, Identificação do Proteoma Total e Identificação de Proteínas Acetiladas).

4.4.1. NBT quantitativo

Após a contagem dos neutrófilos é necessária a realização de um teste quantitativo para confirmar a estimulação das células. Neste caso utilizamos o teste de NBT quantitativo cujo superóxido produzido pelos neutrófilos estimulados converterá o tetrazólio (incolor e solúvel) em formazan (solução insolúvel azulada) que será detectado no comprimento de onda de 550 nm em espectrofotômetro (PEIXOTO, 2002; PINTO, 2006).

O preparo das amostras tem início com a separação de 2×10^5 neutrófilos para cada condição (nesse caso foram três alíquotas: controle negativo com neutrófilos quiescentes, neutrófilos ativados com fMLP 100 nmol/L e neutrófilos estimulados pelo PAF 200 nmol/L). Depois de separados em tubos eppendorf, os neutrófilos foram então ativados e estimulados a 37°C por 10 minutos. Após esses 10 minutos foram acrescentados 50 µL de NBT 0,1% (volume final de 500 µL) por 20 minutos. Passados os 30 minutos de ativação e estimulação, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 9.500 rpm e o sobrenadante retirado. Acrescentou-se 900 µL de ácido acético 50% nas amostras e foi sonicado por 5 minutos. As amostras foram novamente centrifugadas por 10 minutos a 9.500 rpm e em seguida realizada a leitura do sobrenadante em 550 nm.

4.5. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Após os testes de avaliação da amostra citados anteriormente, os neutrófilos foram separados em alíquotas de $1,8 \times 10^6$ células para cada condição (neutrófilos quiescentes e estimulados com PAF). Neste ensaio foram obtidas imagens de

neutrófilos de 3 indivíduos, cada uma analisada em triplicata experimental. As células foram então estimuladas pelo PAF (concentração final de 200 nmol/L) por 30 minutos a 37°C e em seguida centrifugadas por 1 minuto a 9500 rpm. As células do grupo quiescente foram submetidas ao mesmo procedimento, porém foram incubadas apenas com HBSS, sem PAF. Foram adicionados 1000 µL da solução de Karnovsky (12% paraformaldeído + 8% glutaraldeído + tampão de cacodilato (CaCo) 0,1 mol/L) e incubado por 2 horas. Em seguida as amostras foram lavadas 2 vezes com tampão PBS (Sigma-Aldrich_231.791-2) por 5 minutos com centrifugações de 9.500 rpm, ressuspensas em 1000 µL de PBS e levadas para outra etapa (fixação, secagem e metalização) no laboratório de microscopia de varredura.

A fixação das amostras iniciou-se com o preparo das lamínulas com poli-L-Lisina 0,1% (Sigma P8920) e secas, adicionando-se em seguida 200 µL da amostra e deixando sedimentar por 5 minutos. As amostras foram incubadas com tetróxido de ósmio 2% por 30 minutos e lavadas com água destilada (2 vezes). Após as lavagens, as amostras passaram por um processo de desidratação com acetona, seguindo a ordem de concentrações a seguir: 50%, 70%, 90% e 100% nos tempos de 5 minutos cada, sendo o último 10 minutos. As amostras foram então lavadas com CO₂ líquido 5 vezes a 4°C, secas no ponto crítico com CO₂ na temperatura de 30°C a 37°C (aparelho Balzers CPD 030) e por fim a metalização das amostras com ouro por 2 minutos. As imagens foram obtidas no Microscópio de Varredura Jeol 840A, com aceleração de voltagem de 20kV. As lamínulas foram armazenadas posteriormente em ambiente seco (ROSA, 2012).

4.6. Lise Celular (Extração de proteínas)

Após a separação dos neutrófilos e confirmação dos testes de viabilidade e pureza das amostras, uma alíquota foi destinada à análise por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa (LC/MS-MS), na qual as amostras foram centrifugadas por 15 minutos à 2000 rpm e retirado o sobrenadante. Em seguida foram acrescentados ao pellet, 400 µL de Tampão de lise celular (composto de SDS 2%, DTT 0.1 mol/L, TEAB 20 mmol/L, inibidor de protease 2% e inibidor de fosfatases phosphostop (Roche) 2%) e expostos a 15 ciclos de TIP sonicador (temperatura próxima de 4°C) por 10s a 60% de potência em cada sonicação, com intervalos de

resfriamento no gelo por 1 minuto entre cada ciclo. Depois as amostras foram centrifugadas por 1 minuto a 6000 rpm seguidas de uma incubação de 10 minutos a 80°C sob agitação de 500 rpm em *thermomixer*. As amostras foram então congeladas a -80°C e enviadas à Dinamarca e posteriormente estocadas em freezer -20°C.

4.7. Método de Análise de Aminócidos

O método de quantificação por *Amino Acid Analysis* (AAA) foi utilizado para determinar a quantidade de proteínas existentes em cada amostra, sendo que a capacidade de detecção desse método varia entre as concentrações de 12,5 µg/mL a 5 mg/mL de proteína. O teste se baseia na hidrólise ácida completa das proteínas seguida pela separação dos aminoácidos em sistema cromatográfico de troca catiônica e eluição com variações de pH e força iônica. Os aminoácidos já separados passam por processo de derivatização com ninhidrina. A ninhidrina reage com os aminoácidos, tornando-os detectáveis por absorvância nos comprimentos de onda de 440 e 570 nm. A quantificação desses aminoácidos é determinada pela medição da quantidade de luz absorvida .

No preparo da amostra para a AAA, 30 uL de amostra que correspondem a uma massa aproximada (com base em ensaios anteriores) 5 ug de proteínas foram aliqüotados em eppendorfs de 500 uL devidamente marcados (marcação sem tinta com furos na tampa e limpos) onde em seguida foram secos a vácuo. Os eppendorfs foram colocados em frascos específicos de vidro (máximo 4 por vidro), que contêm em sua tampa um sistema de válvula que controla a entrada e saída de gases, juntamente com 400 uL de tampão de hidrólise (6N HCl; 0,1% Fenol; 0,1% ácido tioglicólico). Esse sistema ficou em atmosfera de gás argônio por alguns segundos e em seguida exposto a vácuo ocorrendo reação com o tampão de hidrólise. O sistema foi incubado a 110°C por 20 horas e seco a vácuo. As amostras foram dissolvidas em Tampão *Loading* (Biochrom 2.20 citrate buffer w.NorLeu) e transferidos para um frasco autoinjeter com dispositivo de vidro, onde foi então iniciado o resfriamento e programado o aparelho (DAVIES, 1973).

4.8. Redução, Alquilação e Digestão trípica das Proteínas

Após a quantificação das proteínas as amostras passaram pelos processos de lavagens, redução e alquilação, antes da digestão trípica.

A estratégia geral deste protocolo de digestão envolve a concentração das proteínas em filtros de PVDF, a lavagem com solução de ureia, com a finalidade de remoção do SDS e os procedimentos de redução, alquilação e digestão todos processados no filtro. Após a digestão, os peptídios são eluídos do filtro e a dessalinização é feita por precipitação do detergente SDC e remoção dos componentes apolares por partição de fase líquida. Devido à limitação do filtro em relação às quantidades de SDS e de proteína adicionadas, são necessárias várias adições de amostra intercaladas por lavagens com solução de ureia. Esta é gradativamente substituída por SDC/TEAB, compatíveis com os processos de alquilação e digestão trípica. Tal estratégia foi baseada no recente trabalho desenvolvido por Leon e cols (LEON et al., 2013).

Durante esses processos foram utilizados os seguintes reagentes e soluções: Ureia 8mol/L; DB3 (1% SDC, 20 mmol/L TEAB); Ovoalbumina 10 pmol/ μ L (428.81 μ g/mL em DB3); DTT (DTT 200mmol/L em DB3); IAA (Iodoacetamida 0.05 mol/L em DB3); Tripsina (0.02 μ g/ μ L em DB3); EthAc (acetato de etila) e TFA (20% em água milli-Q).

Inicialmente foram adicionados 3200 μ L de ureia 8 mol/L em 728 μ L da amostra (contendo 800 μ g de proteínas, conforme dosagem realizada anteriormente) mais 4 μ L de Ovoalbumina 10 pmol/ μ L, completando o volume final para 3932 μ L. Esse volume final foi então centrifugado a 10000g por 2 minutos (protocolo utilizado para 1 μ g/ μ L de proteínas). O volume de 393.2 μ L do sobrenadante foi transferido para o filtro do tipo Vivacon 500 e submetido a uma centrifugação de 10000 g por 10 minutos. Em seguida o filtrado foi descartado e acrescentado 200 μ L de ureia 8 mol/L no filtro. Novamente foi realizado uma centrifugação a 10000 g por 10 minutos e descartado o filtrado. As etapas onde se inicia com acréscimo da amostra no filtro e término com o segundo descarte do filtrado foram repetidas 10 vezes, para que se atingisse a quantidade de proteína desejada (800 μ g) sem ultrapassar o limite de massa de SDS no filtro (1.1 μ g/ μ L). Após esse ciclo foram acrescentados novamente 200 μ L de

ureia 8 mol/L, centrifugado a 10000 g por 15 minutos e descartado o filtrado. Foram adicionados 500 μ L de DB3 e 26.3 μ L de DTT 200 mmol/L, sendo em seguida centrifugado a 10000g por 10 minutos e descartado o filtrado. Antes da alquilação o filtro foi lavado com 400 μ L de DB3, seguido de centrifugação a 10000 g por 15 minutos e descarte do filtrado. Na alquilação foram acrescentados 400 μ L de Iodoacetamida 0,05 mol/L no filtro, seguido de leve agitação (600 rpm) no Thermomix por 1 minuto a temperatura ambiente. Depois as amostras ficaram incubando sem agitação no escuro por 20 minutos. A amostra foi centrifugada a 10000 g por 15 minutos e descartando o filtrado em seguida. Adicionou-se 400 μ L de DB3 no filtro e centrifugou-se a 10000 g por 15 minutos.

Por fim, foi feita a digestão acrescentando-se 400 μ L de DB3 no filtro seguido de centrifugação a 10000 g por 15 minutos. A tripsina 0,02ug/uL foi adicionada ao filtro (400 μ L) com agitação suave por 1 minuto, seguido de vedação dos eppendorfs com parafilme e incubação a 37°C por 15 horas em câmara úmida. Os filtros foram transferidos para novos eppendorfs seguido de centrifugação a 14000 g por 15 minutos, mantendo o filtro. Foram adicionados então 360 μ L de DB3 no filtro e centrifugado a 14000 g por 15 minutos, mantendo o filtro. Em seguida o filtro foi descartado e acrescentou-se 700 μ L de EthAc no eppendorf e realizado vortex. Acrescentou-se 40 μ L de TFA 20%, misturando por 1 minuto e centrifugou-se a 15000 g por 15 minutos. Após essa centrifugação foram descartados a camada superior assim como qualquer camada membranosa existente (com característica esbranquiçada). Foram então adicionados novamente 700 μ L de EthAc e realizado vortex, seguido de centrifugação a 15000 g por 5 minutos, onde a camada superior assim como qualquer camada membranosa foi novamente descartada. Os peptídios (30 uL referentes a 5 ug, como explicado anteriormente) foram quantificados pelo método de análise de aminoácidos descrito acima.

4.9. Marcação das amostras com iTRAQ

Para os ensaios de marcação com iTRAQ foram utilizados os reagentes da *Applied Biosystems* (iTRAQ Reagent 114; 115; 116 e 117). Para nosso estudo utilizamos um kit 4 Plex com marcação dos neutrófilos quiescentes; neutrófilos ativados

com PAF; neutrófilos ativados com fMLP e neutrófilos ativados com TiO₂ (apenas os dados dos neutrófilos quiescentes e neutrófilos ativados pelo PAF serão mostrados nesta tese, sendo os demais dados alvos de outros estudos em andamento). A partir da etapa de marcação com iTRAQ, todos os eppendorfs utilizados foram do tipo *low binding* para que a perda da amostra por adsorção ao tubo fosse mínima.

De acordo com a quantificação de proteínas por AAA de cada amostra, foi padronizada a mesma quantidade de proteínas entre as condições do mesmo indivíduo, isto é, condição que tinha menos proteínas foi tomada como referência e foram diluídas as demais condições e marcadas com iTRAQ de forma que todas as condições de um mesmo indivíduo tivessem a mesma quantidade de peptídios (tabela 7).

Para a marcação com iTRAQ os reagentes foram utilizados em temperatura ambiente, onde cada marcador foi diluído em 50 µL de isopropanol seguido de vortex e de um *spin* (centrifugação em 3000 rpm por 30 segundos). No preparo das amostras, como as proteínas já passaram pelo processo de redução e alquilação e estão em tampão contendo ureia, as mesmas foram ressuspensas em 20 µL de *iTRAQ dissolution Buffer* para manter o pH do meio em torno de 8.5. Em seguida, para cada condição contendo 25 µg de proteínas (quiescente, PAF, fMLP e TiO₂) foram acrescentados 50 µL de cada marcador, sendo os íons repórter distribuídos como mostrado na tabela a seguir:

Indivíduo	Amostra	Quantidade de proteína (µg)	Ion Reporter
Indivíduo 1	Quiescente	73	114
Indivíduo 1	PAF	73	115
Indivíduo 1	fMLP	73	116
Indivíduo 1	TiO ₂	73	117
Indivíduo 2	Quiescente	150	115
Indivíduo 2	PAF	150	116
Indivíduo 2	fMLP	150	117
Indivíduo 2	TiO ₂	150	114
Indivíduo 3	Quiescente	90	116

Indivíduo 3	PAF	90	117
Indivíduo 3	fMLP	90	114
Indivíduo 3	TiO ₂	90	115
Indivíduo 4	Quiescente	80	117
Indivíduo 4	PAF	80	114
Indivíduo 4	fMLP	80	115
Indivíduo 4	TiO ₂	80	116
Indivíduo 5	Quiescente	230	117
Indivíduo 5	PAF	230	114
Indivíduo 5	fMLP	230	115
Indivíduo 5	TiO ₂	230	116

Tabela 7. Marcação das amostras com iTRAQ (114, 115, 116 e 117) de acordo com cada condição estudada (quiescente, PAF, fMLP, TiO₂). Quantidade de proteína padronizada por indivíduo.

A padronização da quantidade de proteínas por indivíduo é importante posteriormente para a padronização das intensidades dos íons reporters das condições, isto é, quando combinarmos as marcações dos iTRAQ das quatro condições (Quiescente, PAF, fMLP e TiO₂) em um único eppendorf (representando um indivíduo) teremos a mesma intensidade dos íons reporters.

Após a marcação, as amostras ficaram incubando por 2 hora a temperatura ambiente. Após a incubação as amostras foram analisadas por MALDI-TOF-TOF para confirmar a homogeneidade da marcação dos íons reporters.

Confirmada a marcação, foram combinados os conteúdos das várias condições em um só eppendorf e seco a vácuo. Para se evitar eventuais desvios causados por diferentes afinidades aos marcadores, cada replicata biológica teve um sistema de marcação distinto e randomizado, conforme demonstrado na tabela 7.

4.10. Modificações Pós traducionais

Na tentativa de se obter o máximo de informações possíveis da amostra em questão, foi montado um fluxo de trabalho que resultou na identificação das proteínas com as principais modificações pos traducionais já estudadas. Por meio do enriquecimento combinado com SIMAC e TiO₂ obteve-se os peptídios fosforilados (monofosforilados e multifosforilados), glicopeptídios sialilados (utilizando a PNGase e Sialidase) e peptídios acetilados (combinado com anticorpo anti-acetil-lisina). Note-se que apenas a fração não enriquecida e a fração enriquecida para acetilações foram abordadas nesta tese, devido às limitações de tempo. As demais serão alvo de outros estudos. O esquema da figura 18 mostra o fluxo de trabalho utilizado nesse estudo.

4.10.1. Dessalinização das amostras

Após a marcação com iTRAQ, as amostras foram dessalinizadas com a coluna de fase reversa C18 tipo SEP-PAK-VAC (Waters). A coluna foi preparada com 2 ciclos de metanol 100% e ACN 100% (intercalando entre eles) e depois equilibrado 3 vezes com TFA 0.1%. As amostras foram ressuspensas em TFA 0,1%, carregadas na coluna e lavadas com TFA 0,1% duas vezes (essas soluções oriundas do fluxo do carregamento da amostra e lavagem da coluna foram combinadas em um eppendorf para posterior dessalinização usando Poros R3). Os peptídios foram eluídos com solução ACN 60%/TFA 0,1%. As soluções combinadas dos fluxos de lavagem iniciais foram desalinizadas utilizando uma microcoluna de fase reversa Poros R3 empacotada em uma ponteira P200, com o objetivo de recuperar peptídios hidrofílicos que não tenham sido retidos na matriz SerpPak. Para empacotar a resina na ponteira foi utilizado um pequeno tampão de C8 (Empore™) de forma que a resina seja retida mantendo um fluxo das soluções através da coluna. Os dois eluídos foram combinados e secos na centrifuga a vácuo.

4.10.2. Enriquecimento com anticorpo anti-acetilisina

Antes de iniciar a combinação do anticorpo com a amostra, foi necessário lavar o anticorpo 2 vezes com 100 uL de tampão imunoprecipitação [MOPS 50 mM; Fosfato de sódio 10 mM e Cloreto de sódio 50 mM (proporção 7:2)]. Em seguida, as amostras

foram ressuspensas em 200 uL de tampão imunoprecipitação (pH 8) e incubados com anticorpo anti acetil lisina (Immune Chem Pharmaceuticals Inc., Burnaby, Canadá) por 12 horas na câmara fria e em rotação. Após a incubação, as amostras foram centrifugadas e recolhido o sobrenadante em um novo eppendorf (FT tampão-Acetilação). As amostras foram então lavadas 4 vezes com 200 uL do tampão imunoprecipitação, o sobrenadante recolhido junto com o FT tampão-Acetilação e 2 vezes com 100 uL de água (FT água-Acetilação), esse ultimo recolhido em eppendorf separado. Os peptídios acetilados foram eluídos com 200 uL de TFA 1% e recolhidos em um novo eppendorf. As três frações (FT tampão-Acetilação; FT água-Acetilação e eluído da Acetilação) foram passadas separadamente em uma tip C8, para filtrar possíveis anticorpos com agarose, e os possíveis peptídios que tenham se ligado á C8 foram eluídos com acetonitrila 60% / TFA 0,1%. Após o enriquecimento é importante a verificação da presença de peptídios acetilados na fração FT água-Acetilação, se confirmado o mesmo deve ser combinado com o Eluído da Acetilação e seco para aquisição dos dados no espectrômetro.

4.10.3. Primeiro enriquecimento com TiO₂

Os peptídios (após marcação com iTRAQ) foram ressuspensos em tampão *loading*-TiO₂ (80% ACN, 5% TFA, 1M ácido glicólico) e incubados com *beads* de TiO₂ (0.3 mg de *beads* para 100 ug de peptídio) por 10 minutos em forte agitação. De acordo com a tabela 8, foi utilizado quantidade de *beads* proporcional a quantidade de peptídio. Após os 10 minutos as amostras foram centrifugadas e o sobrenadante incubado novamente, nas mesmas condições que a primeira incubação, em outro *eppendorf* contendo a metade das *beads* usadas na primeira incubação como mostrado na tabela 8.

Amostra (quantidade de peptídios)	Quantidade de beads_TiO ₂ Primeira Incubação	Quantidade de beads_TiO ₂ Segunda Incubação
Indivíduo 1 (73µg)	1.68	0.84
Indivíduo 2 (150µg)	3.6	1.8
Indivíduo 3 (90µg)	2.16	1.08
Indivíduo 4 (80µg)	1.92	0.96
Indivíduo 5 (230µg)	5.52	2.76

Tabela 8. Quantidade de beads de TiO₂ utilizadas nas incubações com as amostras (Indivíduos 1,2,3,4 e 5) no enriquecimento com TiO₂.

O sobrenadante foi recolhido em um *ependorf* (chamado de FT-TiO₂). As *beads* das duas incubações foram combinadas em um novo *ependorf* com 100 uL de tampão *loading*, seguido de *vortex* e centrifugação. O sobrenadante foi recolhido junto com o FT-TiO₂. Em sequência as *beads* foram lavadas em dois tampões: Primeiro (200 uL 80% ACN, 1% TFA) e segundo (200 uL 10% ACN, 0.1% TFA) no qual foram retirados os peptídios não-modificados. O sobrenadante dessas duas lavagens foram combinadas ao FT-TiO₂. As *beads* foram secas e expostas ao tampão básico [100 uL solução de amônia (60 uL de hidróxido de amônia 28% em 940 uL de água)] para eluir os peptídios multifosforilados e glicopeptídios. O eluído foi passado em uma ponteira contendo C8 para remover possíveis beads e lavada com mais 30uL de tampão básico, e em seguida eluído com 5 uL de acetonitrila 30%. O FT-TiO₂ desse enriquecimento foi dessalinizado em uma coluna de fase reversa solida SEP-PAK-VAC (*Waters*) seguida da Poros R3, como mencionado anteriormente, antes de seguir para HILIC (HPLC Agilent 1200_coluna HILIC TSK AMide 80_Sigma Aldrich) e aquisição dos espectros no LC-MS/MS (Q-Exactive).

4.11. HILIC (Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography)

É uma técnica de separação de alta resolução que usa pontes de hidrogênio entre a fase estacionária hidrofílica e o peptídeo, isto é, a retenção aumenta com o

aumento da polaridade do peptídio, o qual geralmente é eluído com aumento da polaridade da fase móvel (MCNULTY; ANNAN, 2008).

Os peptídios não enriquecidos, monofosforilados e deglicosilados foram fracionados usando HILIC (HPLC Agilent 1200 Serie, Agilent, Santa Clara CA) e carregados para uma coluna capilar (450 μm OD x 320 μm ID x 17 cm) empacotada com TSK Amide-80 (3 μm ; Tosoh Bioscience, Stuttgart, Germany). Antes de cada amostra o sistema foi estabilizado com “Branco” (40 μL ACN 100%; 0.4 μL TFA 10%; 3.5 μL água). Os peptídios (3.5 μL) foram ressuspensos em 40 μL ACN 100% e 0.4 μL TFA 10% e eluídos durante 48 minutos com os tampões de Solução A (ACN 90%/TFA 0.1%) para a Solução B (ACN 0,1%/TFA 0.1%). As frações foram coletadas automaticamente (como exemplificado em verde claro no gráfico 1) e secas a vácuo. As frações foram combinadas manualmente (no gráfico, os traços pretos representam as frações que foram combinadas e os pontos em vermelho representam as localizações das frações combinadas) usando ácido fórmico 0.1% de acordo com a absorbância de cada fração. As absorbâncias em torno de 750 mAU, foram recolhidas isoladamente (MCNULTY; ANNAN, 2008).

4.12. Nano-LC-MS/MS

4.12.1. Método de aquisição de dados no espectrômetro de massas

Para a aquisição dos dados, as frações foram ressuspensas em 6 μL de ácido fórmico 0,1% e submetidas a uma nano cromatografia de fase reversa (EASY-nLC system) acoplada a um espectrômetro de massas de alta resolução do tipo nano eletrospray (Q-exactive). Primeiramente as frações foram carregadas e dessalinizadas por meio da injeção através de uma coluna (*trap column*) de 3cm de comprimento e 100 μm de diâmetro interno empacotada com resina de 5 μm Reprisil C18 (Dr.Maish, Ammerbuch-Entringen, Germany). Depois as válvulas foram ligadas ocorrendo a separação através da coluna analítica (20cm de comprimento e 75 μm de diâmetro interno empacotada com resina de 3 μm Reprisil C18) cujo gradiente de separação cromatográfico seguiu uma taxa de fluxo de 250nL/min no sentido fase A (100%) para fase B (34%). A fase móvel A consistia de 0,1% de ácido fórmico diluído em água e a fase móvel B consistia de 0,1% de ácido fórmico em 95% de acetonitrila. Os peptídios

foram eluídos e diretamente introduzidos a partir da ponta da coluna (em agulha) para o espectrômetro de massas por meio da fonte de íons do tipo nanospray.

Os dados foram adquiridos em uma aquisição dependente de dados (DDA) em um modo de alta-alta onde a pesquisa de digitalização de espectros (MS1) foram gerados no analisado Orbitrap (400 a 1400 m/z) em uma resolução de 70.000 (FWHM), com controle automático de ganho (AGC) de 1×10^6 íons e tempo de preenchimento máximo (maximum TI) de 120ms. Para cada espectro MS1 os 10 íons mais intensos com carga 2 foram direcionados a fragmentação por HCD (*higher energy collision dissociation*). Já na configuração MS² a resolução foi de 17.500 (FWHM) e faixa de varredura de 200 a 2000 m/z, com AGC de 5×10^4 e tempo de preenchimento máximo de 100ms, janela de isolamento de 1.5 m/z em 20s e energia de colisão normalizada (NCE) em 31%.

4.13. Análise dos dados e estatística

Os arquivos contendo os dados das amostras (.raw) foram obtidas a partir do espectrômetro de massas Q-Exactive (Thermo scientific) e analisados por meio do programa Proteome Discoverer 1.4.

Os arquivos .raw foram analisados realizando a busca automática através dos programas Mascot e Sequest com os seguintes parâmetros: restrição enzimática com tripsina usada para a digestão de proteínas com o máximo de 2 clivagens perdidas, possíveis modificações variáveis como oxidação (M), acetilacao (N-terminal) e carbamidometilação (C), Tolerância da massa do precursor de 10ppm e do fragmento de 15ppm.

Após aquisição dos dados, os resultados seguiram para a busca dos peptídios baseada no maior score (o score é um método aplicado para avaliar a probabilidade de “match” entre os espectros experimentais e teóricos chamado de *Peptide spectrum match* (PSM)). Alguns algoritmos foram utilizados para validar esses PSM, detectando as taxas de erro dos matches (Percolator) e calculando a acurácia estatística baseado no q-value (FDR de 0.01) mostrando posteriormente os erros de probabilidade. Na análise dos dados pelo Proteome Discoverer foram utilizados parâmetros como: Peptide rank

(1), Peptide Confidence (high), Search Engine Rank (1 para peptídios não modificados), Peptide score (22), Score versus Charge state e o Peptide Delta Cn (máximo de 1).

Já para análise estatística das proteínas de neutrófilos quiescentes e neutrófilos estimulados pelo PAF, utilizamos a razão entre as intensidades controles e estimuladas dos cinco indivíduos. Foi realizada a transformação logarítmica das intensidades, seguida por normalização pela mediana, a normalização das proteínas pela média das medianas e realizado o teste t de Student pareado. Foram consideradas estatisticamente significativas as abundâncias diferenciais entre proteínas com um valor de $p < 0.05$.

Uma vez tendo os resultados da identificação e quantificação das proteínas foi necessário fazer uma correlação biológica. Para ajudar nessa etapa de interpretação dos resultados as proteínas foram classificadas segundo *Gene Ontology* (GO) quanto à função molecular, processos biológicos e compartimento celular. O GO foi obtido a partir do Protein Center-Denmark para interpretar os resultados a nível de proteína onde foi padronizado estatisticamente com 5% de False Discovery Rate (FDR) e números de domínios transmembrana. Para análise de enzimas foi realizado uma predição da atividade e classificado com base no número EC pelo programa Blast2GO (parâmetros:*default*). As proteínas foram agrupadas em redes de interação com auxílio do programa *STRING* (TAHIR, 2014; BRAGA, 2014)

V. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para a análise dos neutrófilos ativados pelo método NBT, assim como pela análise morfológica por MEV e proteômica, todos os neutrófilos foram avaliados quanto a pureza e viabilidade. Foi confirmada a pureza com 98% de neutrófilos e a viabilidade com 99% dos neutrófilos vivos de acordo com os testes explicados anteriormente.

5.1. Teste de Ativação Celular por NBT quantitativo

Com o teste de NBT quantitativo, os neutrófilos foram avaliados de acordo com a liberação de formazan, como explicado anteriormente. O gráfico abaixo mostra os dados das leituras do controle negativo (neutrófilos quiescentes), controle positivo (neutrófilos ativados com fMLP) e neutrófilos estimulados com PAF.

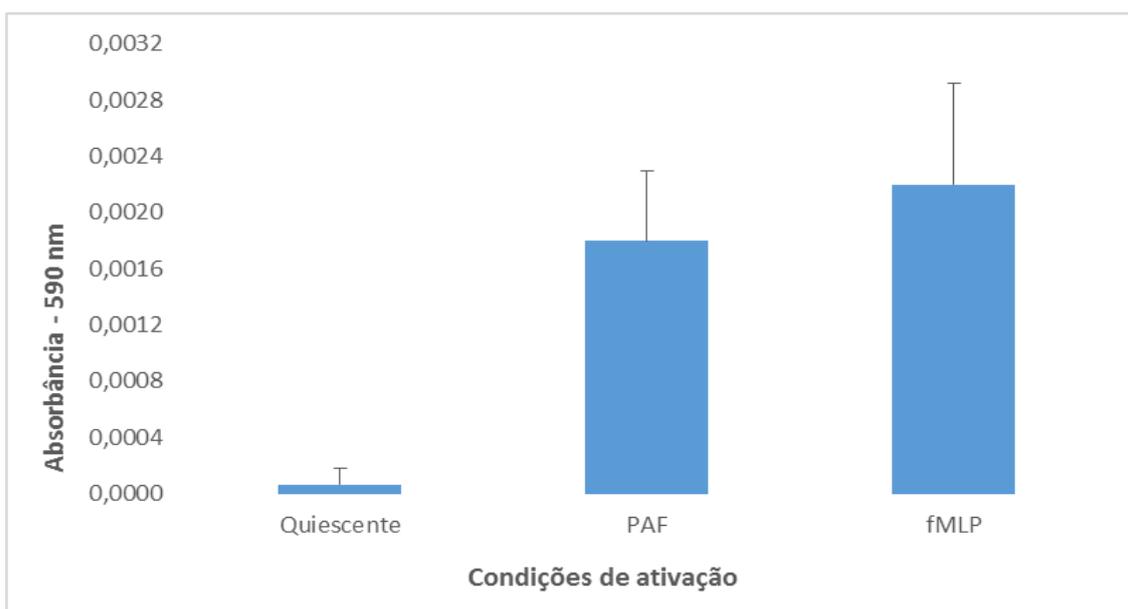


Figura 22. Teste de NBT quantitativo. Média das leituras dos níveis de formazan pelo Método de espectrofotometria. Absorbância a 590 nm. Análise de triplicata experimental e biológica de cada condição: Neutrófilos quiescentes, neutrófilos estimulados pelo PAF, neutrófilos ativados pelo fMLP.

Os resultados expostos anteriormente (gráfico 2) foram baseados na média da produção de espécies reativas de oxigênio pela formação do formazan de três indivíduos escolhidos aleatoriamente como controle experimental, dentre os 3 indivíduos deste

estudo. Observamos o controle negativo (neutrófilos quiescentes na presença de NBT e ácido acético) e o controle positivo (caracterizado pelos neutrófilos ativados com fMLP) expressando uma média das leituras em torno de 0,0022, enquanto que os neutrófilos estimulados com o PAF em torno de 0,0018, vindo a confirmar a liberação de superóxidos e a ativação das células. Quando comparamos os neutrófilos ativados com fMLP e estimulados com PAF, não observamos diferença significativa entre as médias das leituras a ponto de discriminar entre condição estimulada e ativada dos neutrófilos. Para detectar com mais precisão essa diferença na produção de ROS é necessário utilizar outro método mais sensível, como por exemplo o DHR na Citometria de Fluxo, como evidenciado no trabalho realizado por Elaine Aquino em 2012 (AQUINO, 2012).

5.2. Análise morfológica por MEV

Com a técnica de MEV foi possível avaliar a estrutura morfológica da superfície dos neutrófilos, na ordem de 1 nm a 20 nm conferindo uma imagem tridimensional detalhada, por meio de um feixe de elétrons que varre a superfície celular ponto a ponto por linhas sucessivas transmitindo o sinal do detector a uma tela catódica com uma perfeita sincronia com o feixe incidente (DEDAVID, 2007; ROSA, 2012; WATT, 1997).

Os resultados obtidos a partir dessa análise mostraram a morfologia celular de superfície dos neutrófilos quiescentes (Figura 23 A) apresentando aspecto irregular da superfície da membrana conferida pelas várias microvilosidades, conhecida também por dobras ou projeções curtas. Essas microvilosidades funcionam como uma reserva da membrana, proporcionando aos neutrófilos um aumento considerável da área em processos que exigem flexibilidade e agilidade em um curto espaço de tempo como na fagocitose e diapedese (DEWITT; HALLETT, 2007; HALLETT, 2003; MARTINELLI et al., 2013; ROSA, 2012).

Quando os neutrófilos estão ativados conseguem percorrer grandes distâncias exibindo comportamentos morfológicos típicos de quimiotaxia, diapedese e fagocitose de microrganismos caracterizado pelo espalhamento das microvilosidades resultando em expansão da superfície celular e adesão entre as células (figura 23 B). Causam modificações radicais na estrutura do seu citoesqueleto caracterizada principalmente pela orientação das fibras de actina com o estiramento das suas membranas formando

protusões celulares como citonemas ou extensões tubulovesiculares (figura 23 C, D, E), NETs (figura 23 F) (DEWITT; HALLETT, 2007; GALKINA et al., 2010; MARTINELLI et al., 2013; ROSA, 2012)

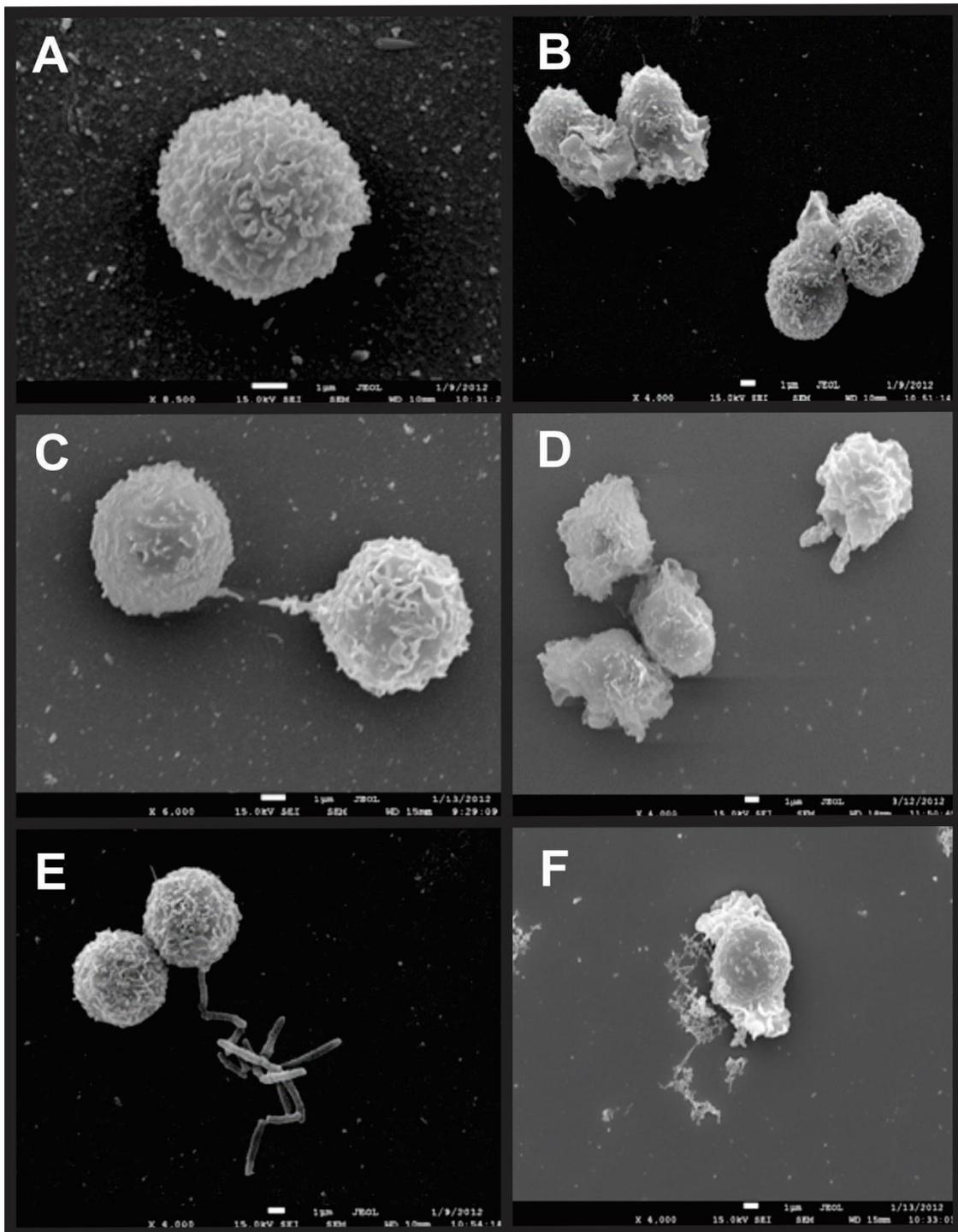


Figura 23. Microscopia Eletrônica de Varredura de neutrófilos quiescentes (A), neutrófilos ativados com PAF (B a F). Imagens de neutrófilos aderidos (B), neutrófilos com extensões tubulovesiculares formando uma comunicação entre neutrófilos (C) e formando uma invaginação para formação de pseudopodes (D), neutrófilos com NETs (E). As amostras foram tratadas com solução de Kornovsky, fixados com poli-L-Lisina e metalinizados com ouro. Barra: 1µm

Observamos em neutrófilos estimulados pelo PAF, a adesão entre as células (figura 23 B) conferida por uma matrix chamada glicocálice. Essa foi identificada por Siham Sabri e colaboradores como sendo uma matrix extracelular formada de glicolipídios, esfingolipídios, glicoproteínas e proteoglicanos. A formação do glicocálice está proporcionalmente associada com o aumento do poder de adesão de monócitos (auxilia a ação do CD43) e em neutrófilos auxilia MAC 1 e LECAM 1. A formação desse glicocálice ajuda também nos processos de proteção celular contra agressões físicas e químicas, assim como a participação da comunicação intercelular. Sendo assim, uma força de associação entre as membranas (conferida pelo glicocálice) auxilia os receptores de adesão dos fagócitos nos processos sucessivos de adesão e antiadesão, processo esse similar ao rolamento de neutrófilos. Essa adesão proporciona também a união com as células vizinhas, formando uma espécie de aglomerado de células *in vitro* dependendo do estado de estimulação celular.

Juntamente com a ação das moléculas de adesão e glicocálice no processo de comunicação intercelular e processo de rolamento, temos também a formação de citonemas (longas e finas extensões tubulovesiculares). As extensões tubulovesiculares foram observadas em momentos distintos como uma possível comunicação entre duas células ativadas (figura 23 C), como uma formação inicial da extensão onde poderia ser acompanhada por uma invaginação de membrana ou lócus de compensação de endocitose (figura 23 D) ou como uma estrutura complexa, grande e altamente flexível sem ligação com outro tipo celular (figura 23 E). Essas extensões possuem características primordiais na eliminação de bactérias ao excretarem secreções bactericidas a longa distância sem que haja a diluição das secreções ou injúria dos tecidos vizinhos, assim como pelo processo de fagocitose na eliminação de microrganismos. Segundo Galkina e colaboradores as extensões tubulovesiculares podem apresentar-se de forma forte, altamente flexível e com alta taxa de desenvolvimento podendo variar entre 150 a 240 nm diâmetro. Já Ross Corriden e colaboradores observaram protusões maiores tipicamente próximas de 500 nm diâmetro, isso associado com placas de A3AR (Receptor de Adenosina A3) ao pesquisar a direção que essas extensões tubulovesiculares seguiriam durante uma perseguição bacteriana (CORRIDEN et al., 2014; GALKINA et al., 2010).

Algo interessante observado nas imagens de neutrófilos estimulados com PAF foi a possível liberação de NETs (Neutrophil Extracellular Traps) (Figura 23 F – setas em amarelo). Estas estruturas foram primeiramente observadas em 2004 por Volker Brinkmann e colaboradores no momento em que os neutrófilos tentavam matar bactérias. Esse é um achado até então não descrito nessa condição de ativação, tendo em vista que as NETs foram descritas em neutrófilos até o momento apenas em fagocitose de bactérias como *S.aureus* e *Salmonella* e neutrófilos ativados com PMA (Forbol 12 miristato 13 acetato) (BRINKMANN; ZYCHLINSKY, 2007; DEWITT; HALLETT, 2007; ERLANDSEN; HASSLEN; NELSON, 1993; GALKINA et al., 2010; PILSCZEK et al., 2010)

5.3. Análise Proteômica

5.3.1. Quantificação de peptídios por análise de aminoácidos

Foi realizada a quantificação de peptídios pelo método de análise de aminoácidos das amostras, como mostrado na tabela abaixo.

Amostra	Condição	Quantidade (µg/µL)
Indivíduo 1	Quiescente	71
Indivíduo 1	PAF	76
Indivíduo 1	fMLP	77
Indivíduo 1	TiO2	79
Indivíduo 2	Quiescente	150
Indivíduo 2	PAF	224
Indivíduo 2	fMLP	214
Indivíduo 2	TiO2	228
Indivíduo 3	Quiescente	177
Indivíduo 3	PAF	120

Indivíduo 3	fMLP	89
Indivíduo 3	TiO ₂	348
Indivíduo 4	Quiescente	230
Indivíduo 4	PAF	313
Indivíduo 4	fMLP	194
Indivíduo 4	TiO ₂	78
Indivíduo 5	Quiescente	334
Indivíduo 5	PAF	281
Indivíduo 5	fMLP	233
Indivíduo 5	TiO ₂	325

Tabela 9. Quantificação por análise de aminoácido das amostras 1,2,3,4 e 5 separados em quatro condições (quiescente, PAF, fMLP e TiO₂), após digestão com tripsina e dessalinização dos peptídios.

5.3.2. Confirmação das marcações dos íons reporter

Após a marcação com iTRAQ, as amostras foram avaliadas quanto a intensidade de marcação dos íons repórter em cada condição (Figuras 24 a 28). Foram recolhidos 1µl de cada amostra, combinados e dessalinizados em uma Geloader contendo uma microcoluna Poros R3, equilibrado com TFA 0,1% e eluído com HCCA 20µg/µL diretamente na placa steel para aquisição dos espectros no MALDI-TOF-TOF (Bruker).

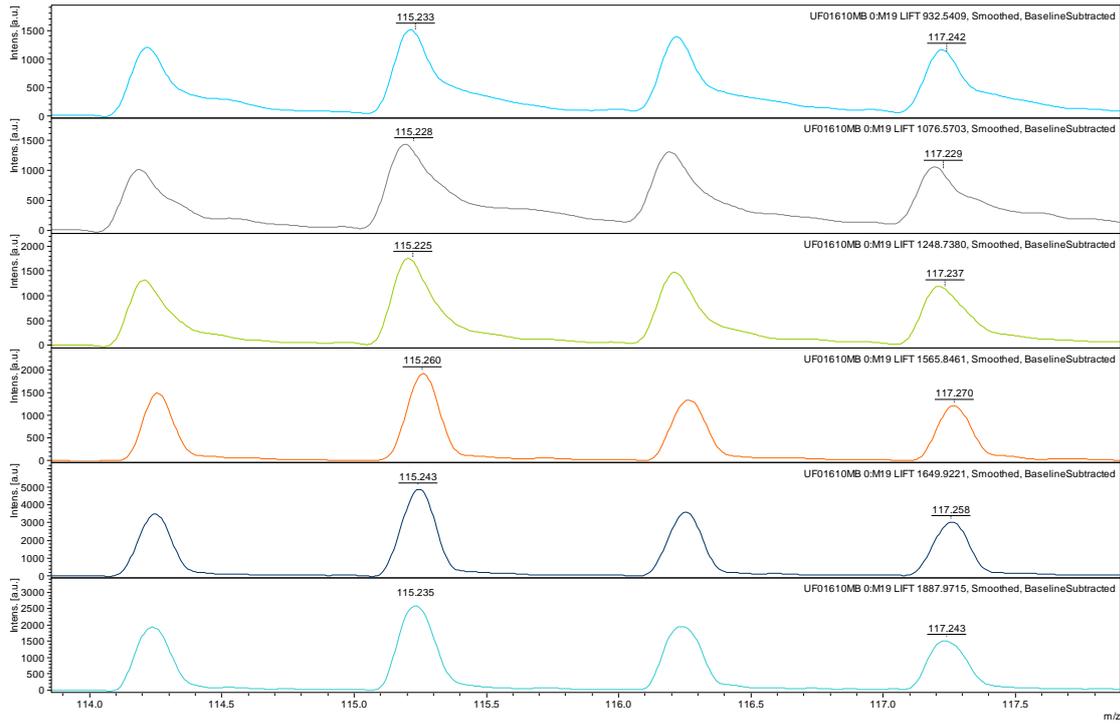


Figura 24. Intensidade dos ions reporter - amostra 1. Fragmentação de 6 peptídios (932Da, 1076Da,1248Da, 1565Da, 1649Da, 1887Da).

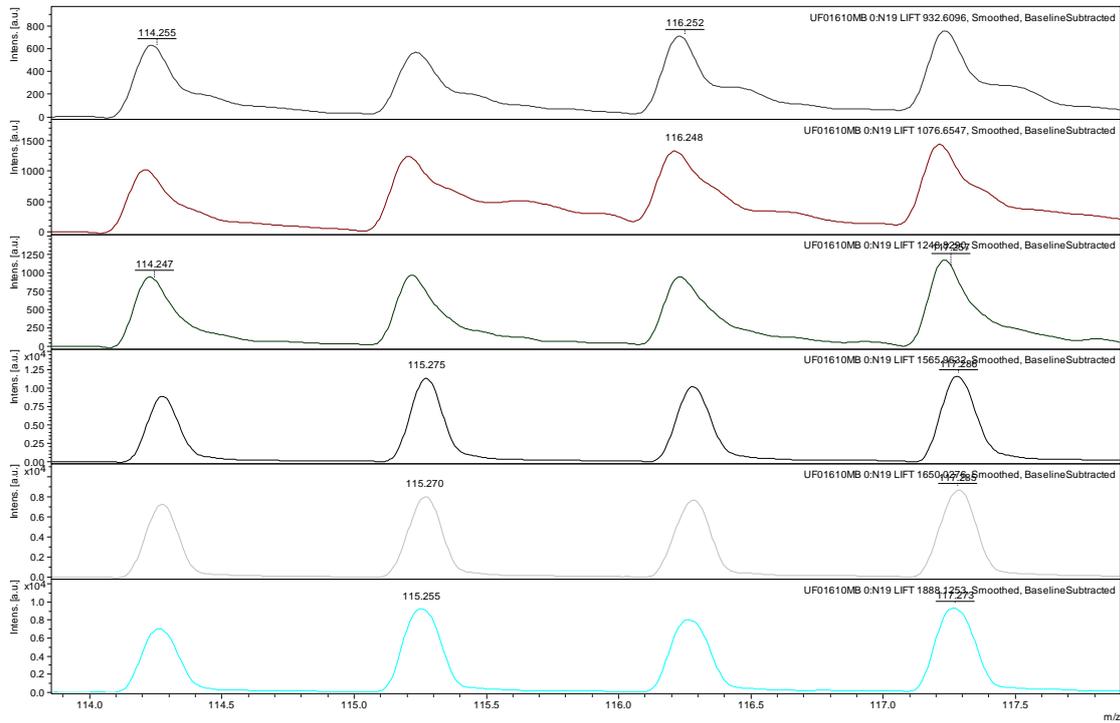


Figura 25. Intensidade dos ions reporter - amostra 2. Fragmentação de 6 peptídios (932Da, 1076Da,1248Da, 1565Da, 1649Da, 1887Da).

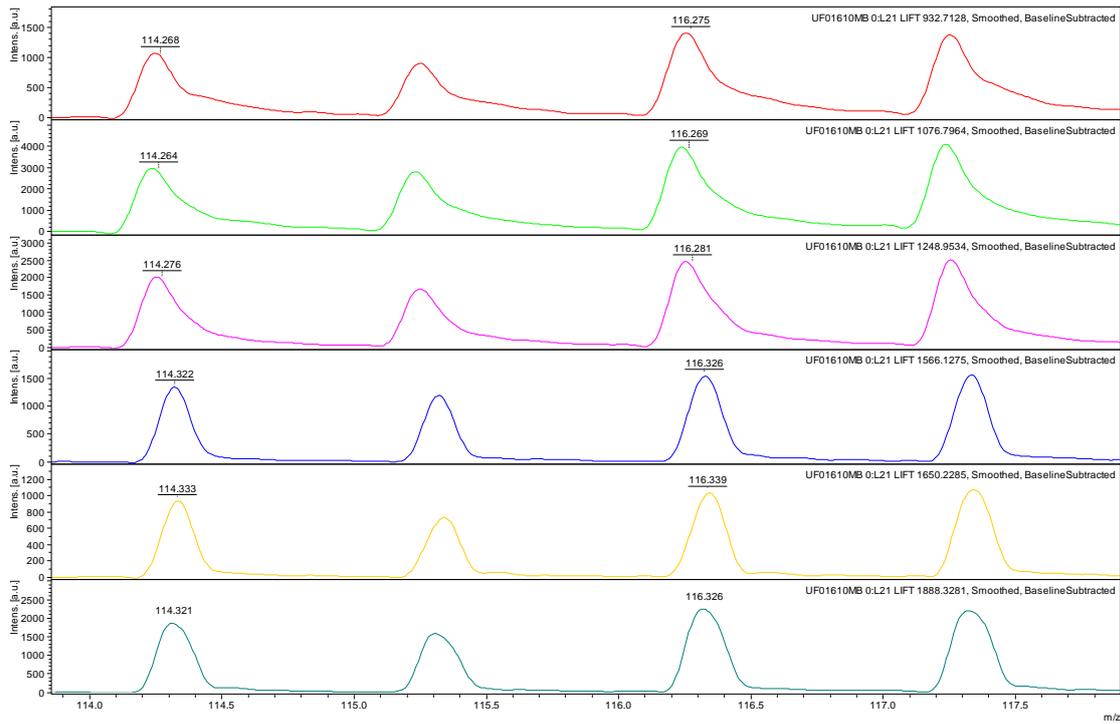


Figura 26. Intensidade dos ions reporter - amostra 3. Fragmentação de 6 peptídios (932Da, 1076Da,1248Da, 1565Da, 1649Da, 1887Da).

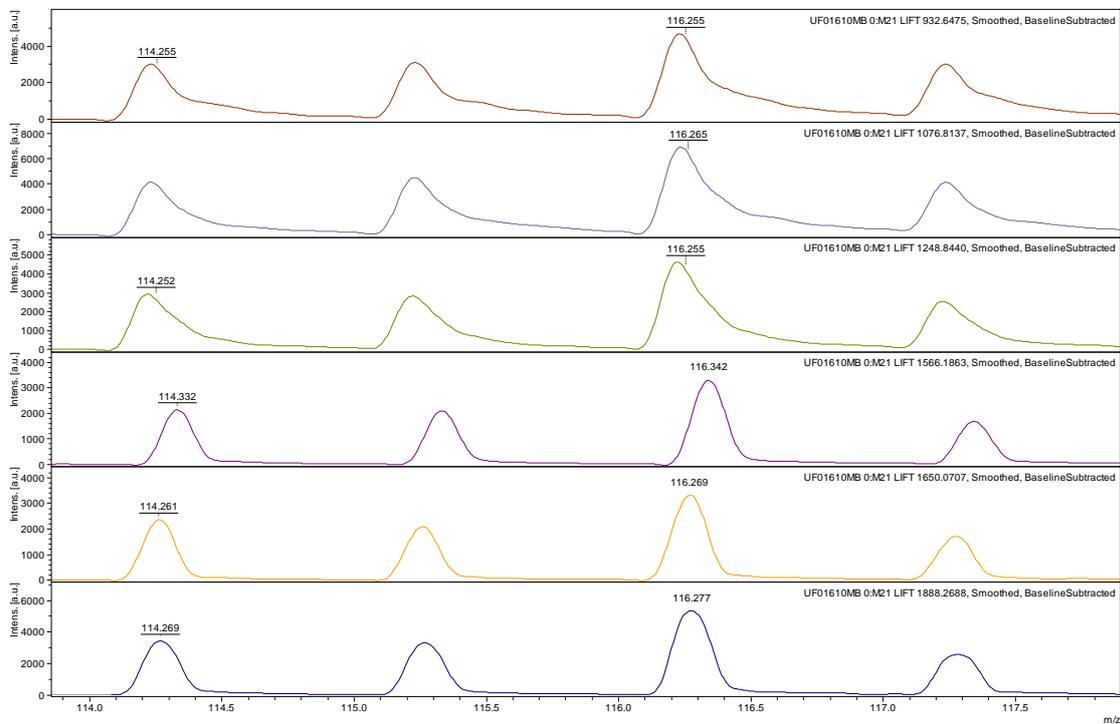


Figura 27. Intensidade dos ions reporter - amostra 4. Fragmentação de 6 peptídios (932Da, 1076Da,1248Da, 1565Da, 1649Da, 1887Da).

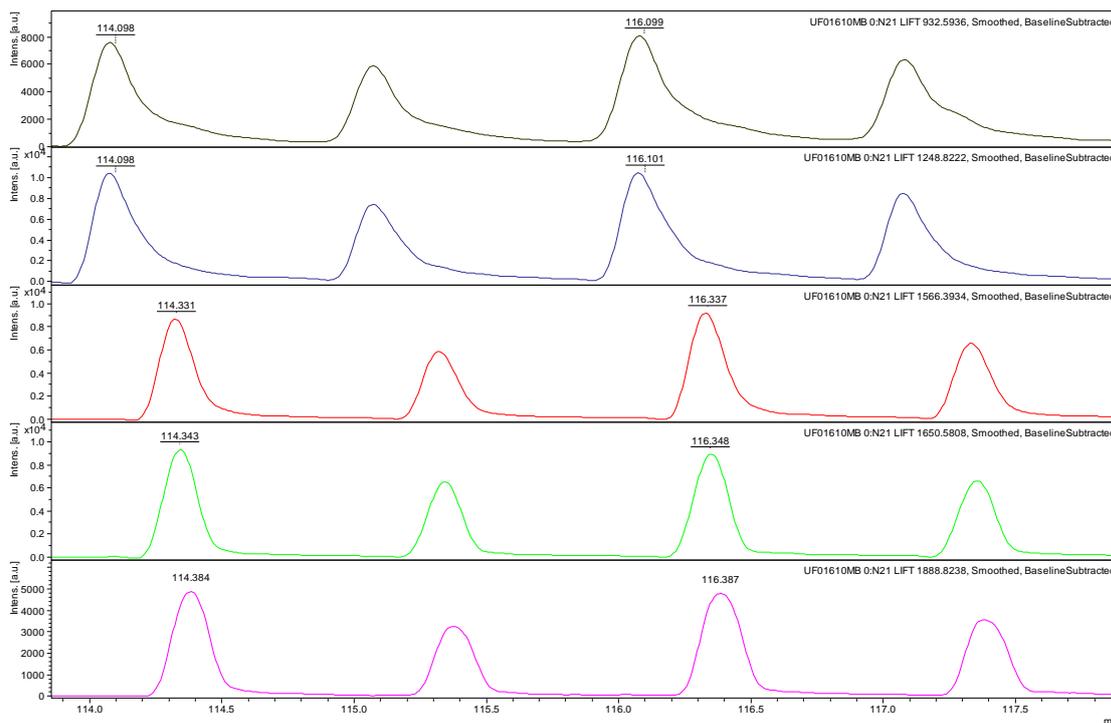


Figura 28. Intensidade dos íons reporter - amostra 5. Fragmentação de 6 peptídios (932Da, 1076Da, 1248Da, 1565Da, 1649Da, 1887Da).

Em todas as marcações foram aceitáveis variações máximas de 25% entre as condições analisadas. As amostras que tiveram variação maior que 25% foram retiradas do estudo. Segue na tabela abaixo, a porcentagem de marcação entre as amostras de neutrófilos quiescentes e neutrófilos estimulados com PAF.

Amostra	Porcentagem de marcação Quiescente/PAF
Indivíduo 1	75%
Indivíduo 2	92%
Indivíduo 3	99%
Indivíduo 4	87%
Indivíduo 5	77%

Tabela 10. Porcentagem de marcação com iTRAQ entre as amostras 1, 2, 3, 4 e 5 nas condições quiescentes e estimulados com PAF.

5.3.3. Confirmação de peptídios acetilados na FT água-Acetilação

No protocolo de enriquecimento de peptídios acetilados, existe uma segunda lavagem do anticorpo anti-lisina com água em que é necessário verificar a presença de peptídios acetilados. Foi recolhido 1 μ L de cada amostra, combinados e os peptídios retidos em uma microcoluna Poros R3 em Geloader, equilibradas com TFA 0,1%, eluídas com HCCA 20 μ g/ μ L diretamente da placa steel para aquisição dos espectros no MALDI-TOF-TOF. Verificamos a presença de peptídios nas amostras, principalmente nas amostras dos indivíduos 2 e 4 (figura 29) e confirmação de peptídios acetilados nessas duas amostras (indivíduo 2 e 4) como mostrado no figura 30. Essa verificação foi possível pela presença de imônios da acetilação (143 Da, 126Da ou 170Da).

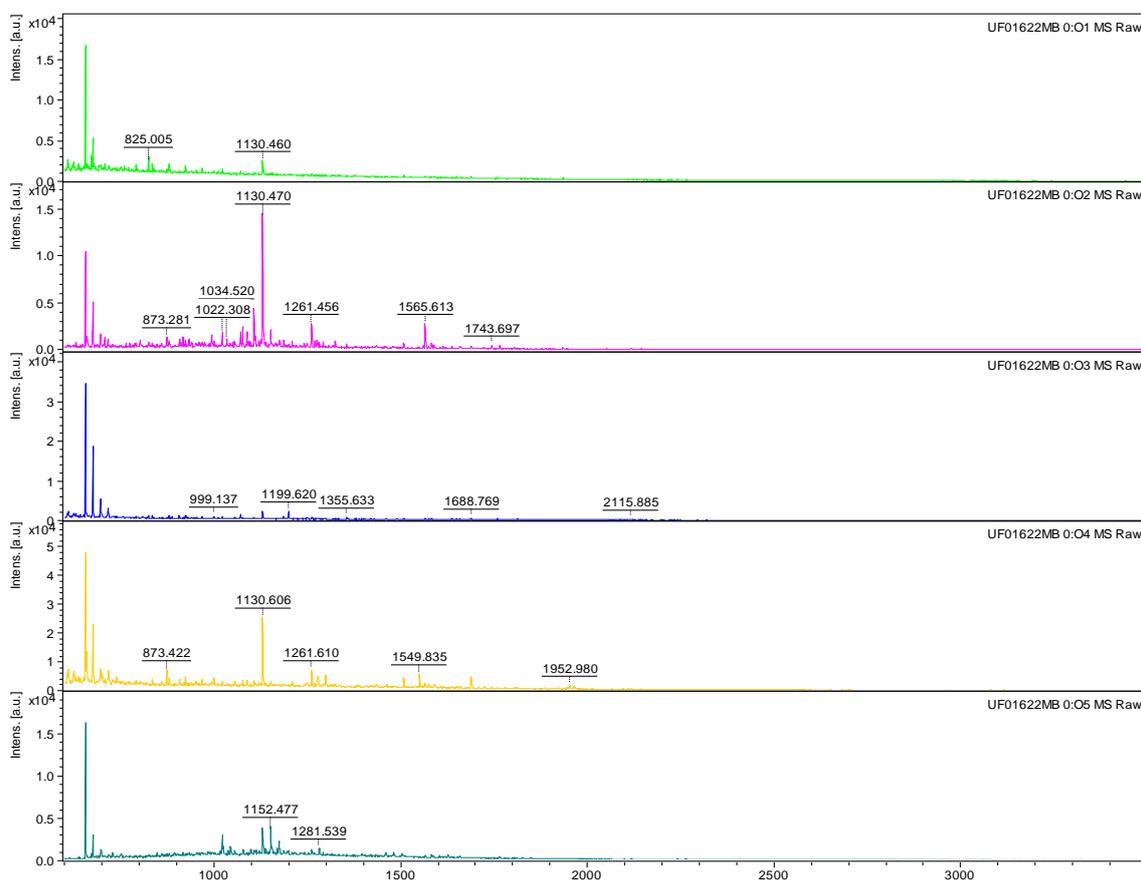


Figura 29. Espectro MS das amostras 1,2,3,4 e 5 do FT água-Acetilação do enriquecimento de peptídios acetilados.

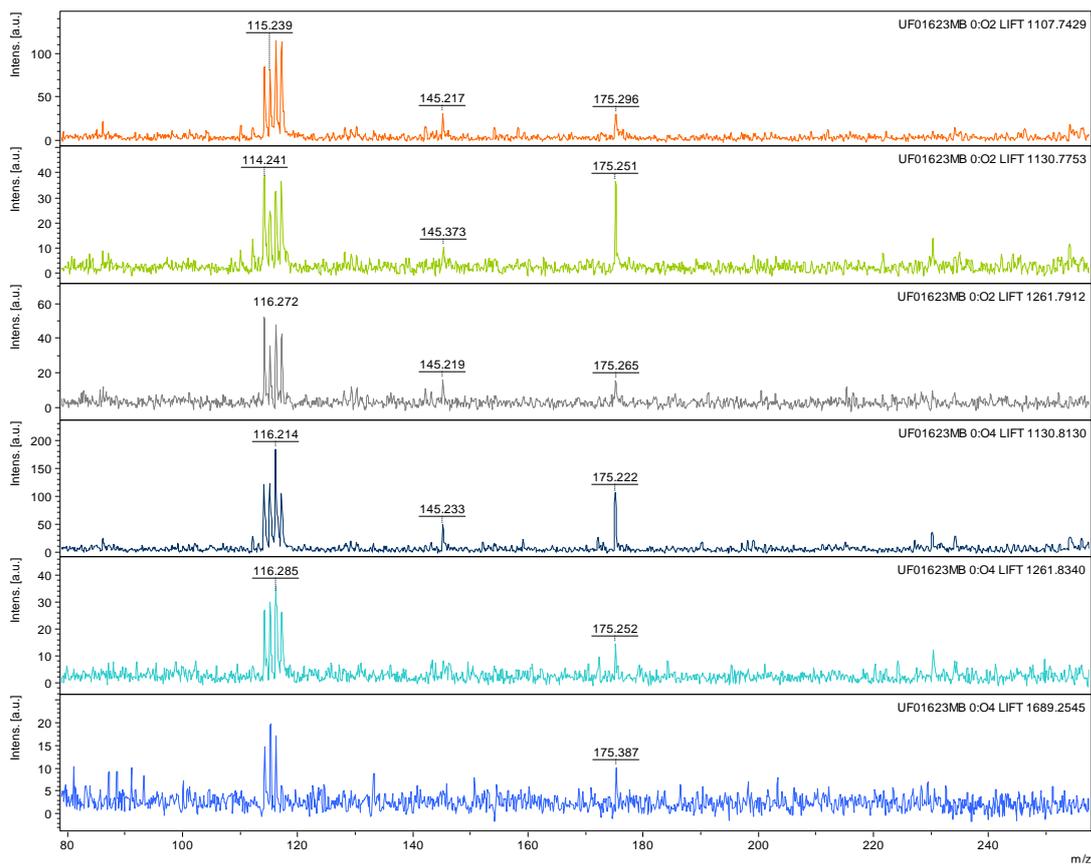


Figura 30. Espectro MS/MS das amostras 2 e 4 do FT água-Acetilação do enriquecimento de peptídios acetilados. Presença de imônios da acetilação (145Da e 175Da).

Com a confirmação de peptídios acetilados nas amostras FT-água Acetilação, os mesmos foram combinados com os peptídios acetilados (Eluídos do enriquecimento com anticorpo anti-lisina) e secos para análise no espectrômetro de massas.

5.3.4. Análise proteômica de neutrófilos não enriquecidos

Na análise do proteoma de neutrófilos não enriquecidos foram identificadas 3126 proteínas, a maior quantidade de proteínas já identificadas em neutrófilos. Já na análise das frações enriquecidas evidenciamos as seguintes modificações pós traducionais: glicosilações com 2296 proteínas, fosforilações com 1487 proteínas e acetilações com 412 proteínas (figura 31).

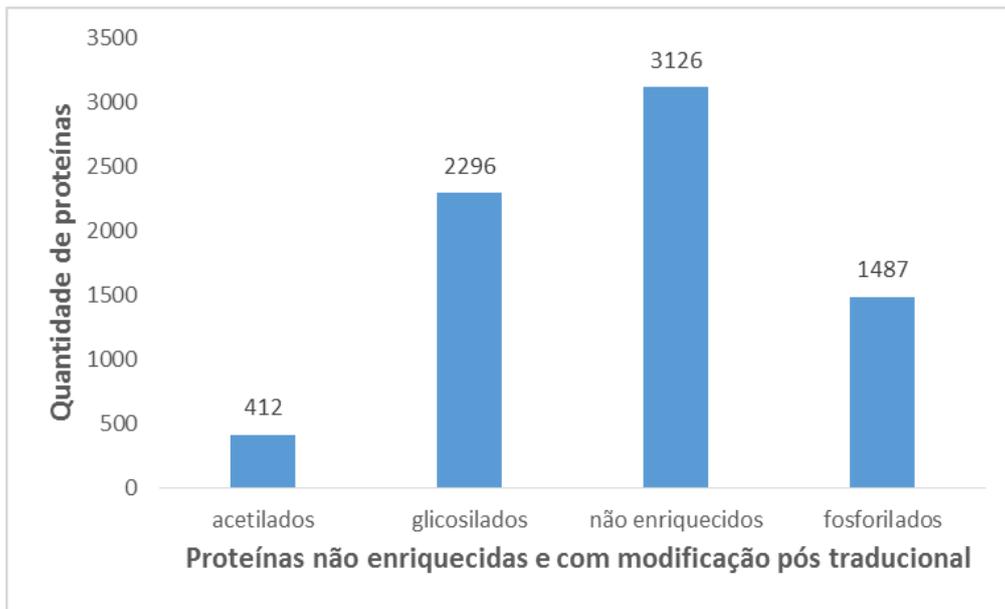


Figura 31. Proteoma de neutrófilos não enriquecidos. Proteínas não enriquecidas em cinza (3126), em vermelho as proteínas glicosiladas (2296), em amarelo as proteínas fosforiladas (1487) e em verde as proteínas acetiladas (412).

Analisando as proteínas com modificações pós traducionais, evidenciamos tanto proteínas que possuem as três modificações (321) quanto proteínas que aparecem exclusivamente em cada modificação como glicosilações (849), fosforilações (109) e acetilações (20) (figura 32).

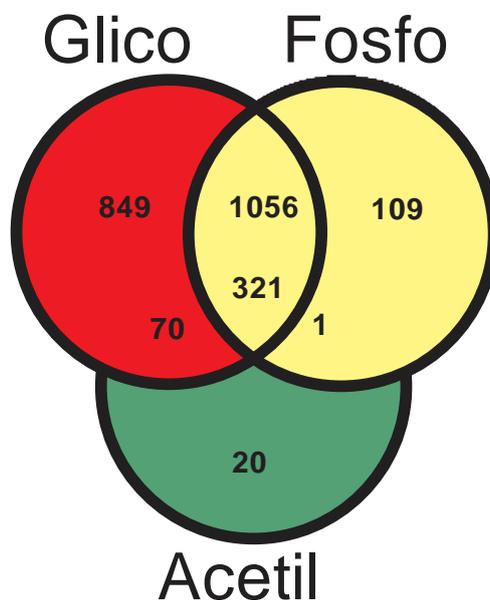


Figura 32. Proteínas com modificações pós traducionais. Em vermelho proteínas glicosiladas, em amarelo proteínas fosforiladas e em verde proteínas acetiladas.

Tendo em vista o funcionamento dos neutrófilos quiescentes e estimulados com PAF (fração não enriquecida), observamos pela análise de Gene Ontology que a maioria das proteínas identificadas possuem interações com outros tipos proteínas (32%), seguida de proteínas com atividade catalítica (20%) e proteínas com interações a nucleotídeos (10%) (figura 33).

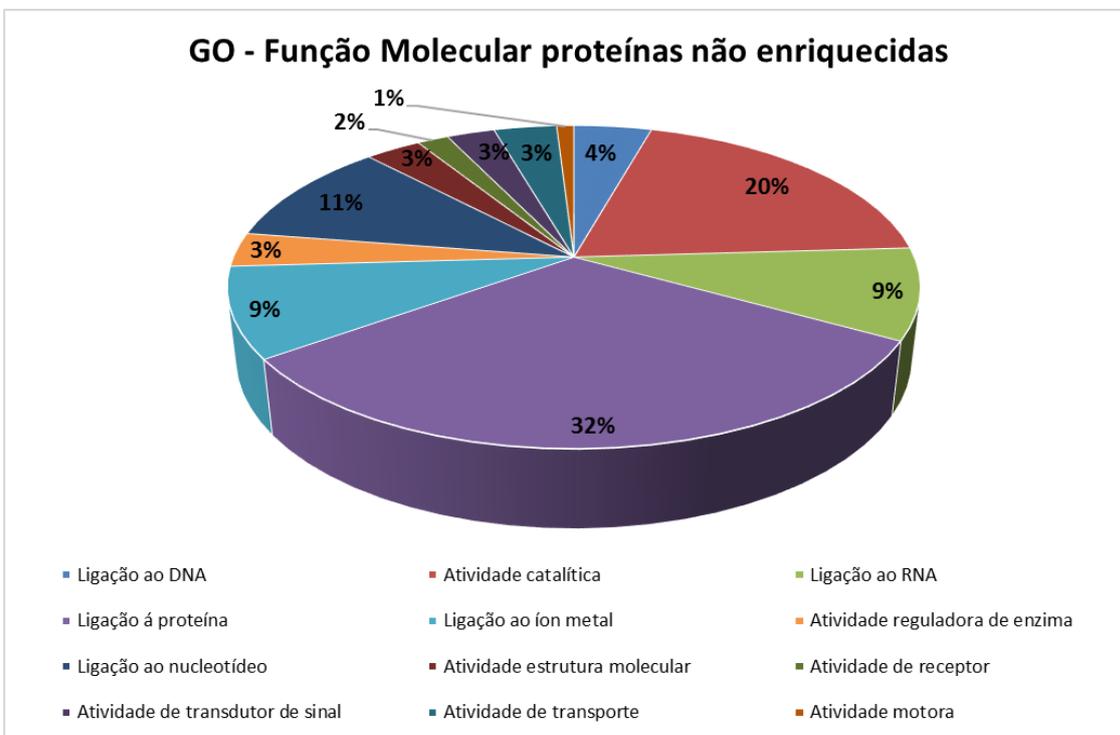


Figura 33. Gene Ontology-Função Molecular de proteínas não enriquecidas

Já em relação aos processos biológicos (Gene Ontology), destacamos os processos metabólicos (22%) e regulação de processos biológicos (19%), seguido de resposta a estímulos (15%) e organização celular e biogênese (12%) (figura 34).

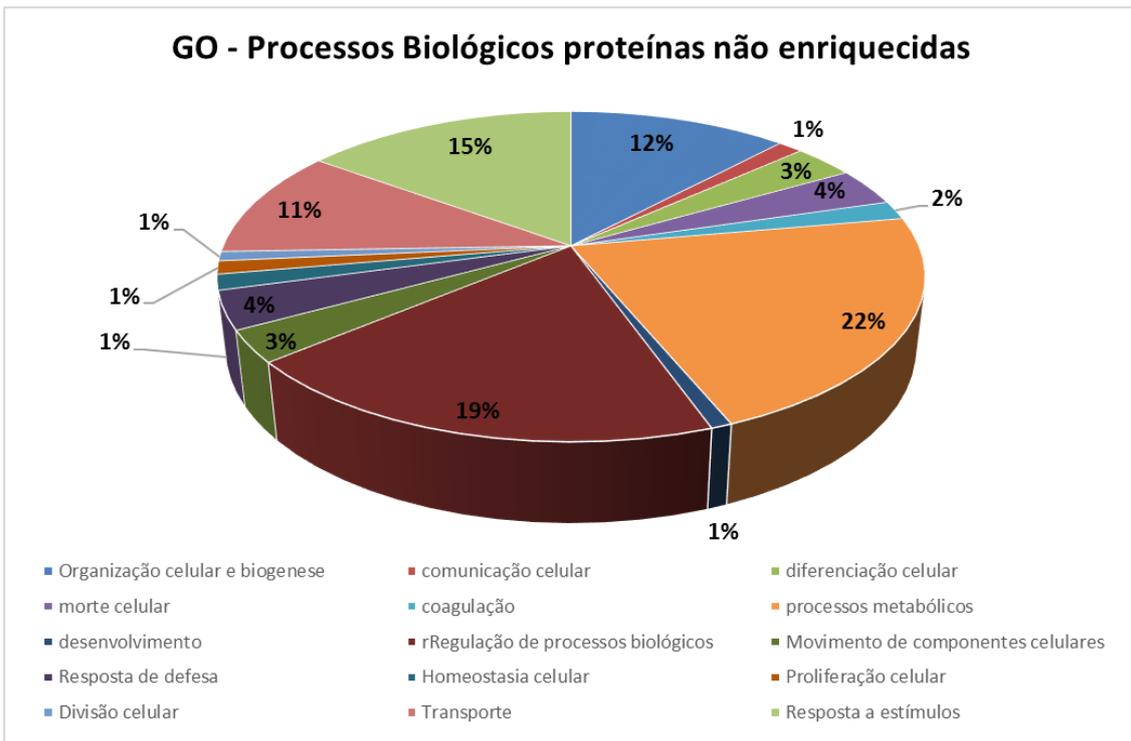


Figura 34. Gene Ontology-Processos Biológicos de proteínas não enriquecidas

A distribuição das proteínas não enriquecidas nos compartimentos celulares segundo o Gene Ontology, estão principalmente no citoplasma (20%) e na membrana (20%), seguido do núcleo (16%) e citosol (13%) (figura 35).

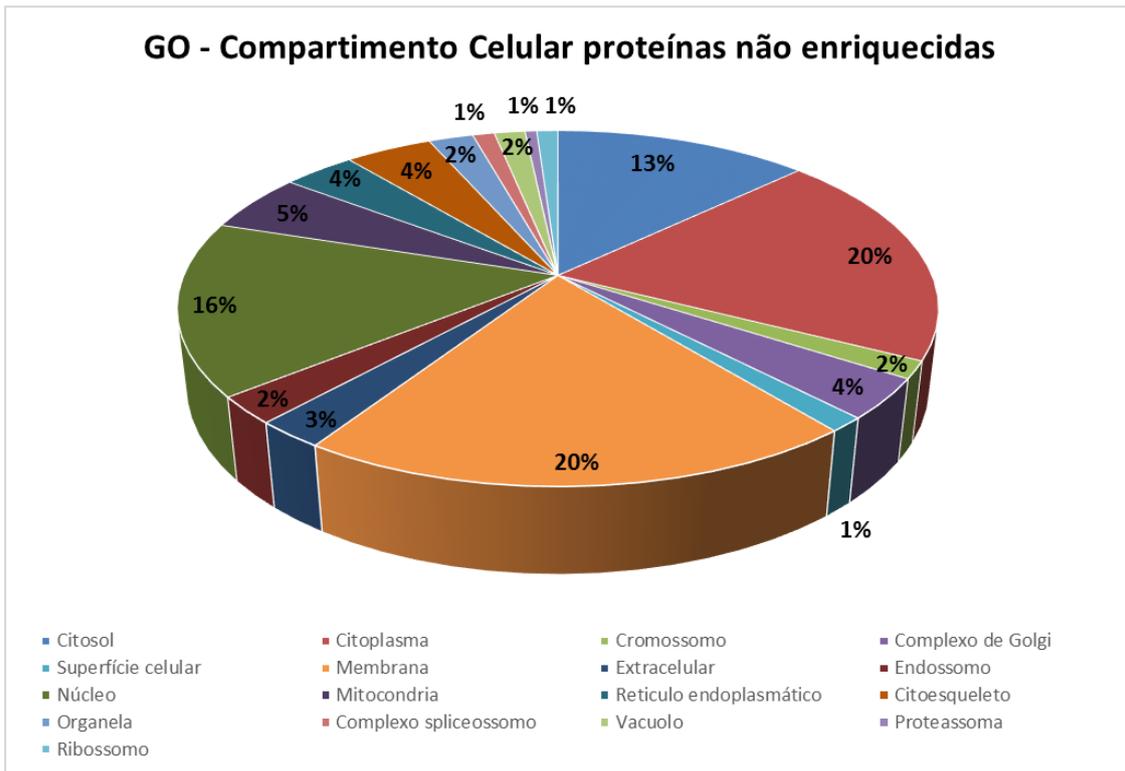


Figura 35. Gene Ontology-Compartimento Celular de proteínas não enriquecidas

Dentre as frações não enriquecidas identificadas, destacamos as proteínas com função enzimática, onde se destacam com maior quantidade as hidrolases (374), transferases (314) e Oxidoredutases (166), seguido das Ligases (93), Isomerases (53) e Liases (37) como mostrado na figura abaixo.

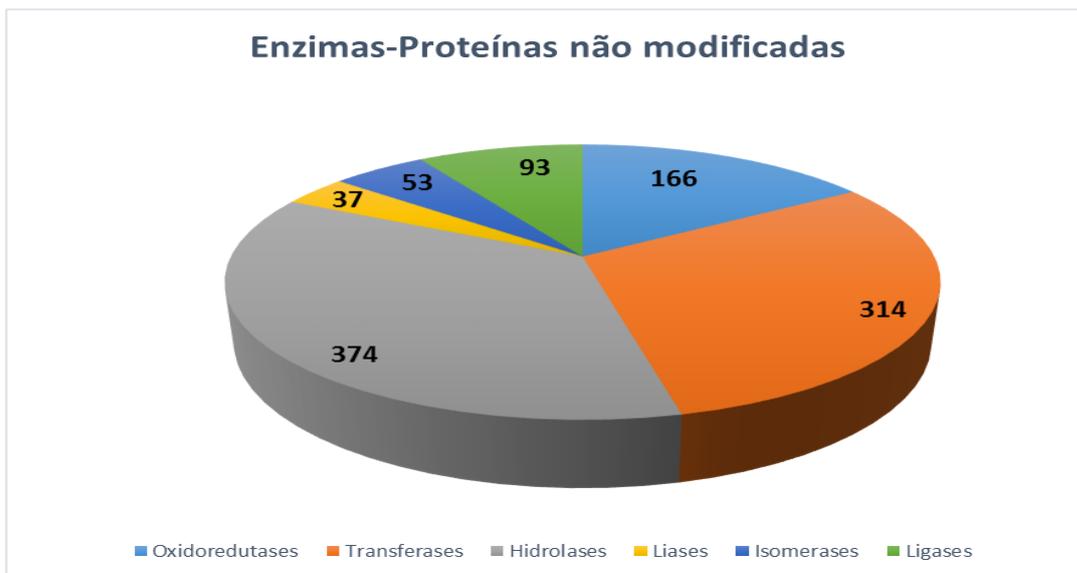


Figura 36. Enzimas de neutrófilos identificadas na fração não enriquecida. Distribuição das proteínas entre as classes enzimáticas (Oxidoredutases, Transferases, Hidrolases, Liases, Isomerases e Ligases).

A distribuição das proteínas segundo os critérios do Gene Ontology, nos mostra que a maquinaria intracelular dos neutrófilos estão voltadas tanto para o funcionamento normal da célula com a maioria das proteínas relacionadas a processos metabólicos e suas regulações, assim como resposta a estímulos e reorganização celular. Observamos também a distribuição homogênea entre os principais compartimentos celulares (citoplasma, membrana e núcleo), com ações de ligação proteína-proteína e proteína-nucleotídeos, assim como proteínas com funções catalíticas destacando principalmente as enzimas hidrolases, transferases e oxidoredutases.

5.3.5. Análise Proteômica de neutrófilos estimulados pelo PAF

A proteômica comparativa entre neutrófilos quiescentes e neutrófilos estimulados pelo PAF revelou a abundância diferencial de 173 proteínas, através da realização do teste t pareado como explicado anteriormente ($p < 0.05$). Identificamos 27 proteínas com abundância aumentada (Tabela 11), onde destacamos proteínas relacionadas ao ribossomo e proteassoma (RPL29, RPN2, RPS24, PSMA2), motilidade (ACTB e PPP1CB), ativação de ATPase (ATP6V1), tráfego intracelular a partir de formação de vesículas (Rab 8, Rab44 e GNG7), assim como produção de prostaglandinas (PTGES3), catepsina (CTSD) e NF kappa B ρ 105 (NFKB1). Outras 146 proteínas tiveram abundância diminuída (Tabela 12), destacando algumas proteínas da cascata das MAPK, moduladores nucleares, proteínas das subunidades ATPase, proteínas envolvidas na produção de aminoácidos e enzimas do Ciclo do Ácido Cítrico e fosforilação oxidativa.

5.3.5.1. *Proteínas com abundância aumentada*

Dentre as proteínas com abundância diferencial, destacamos proteínas que tiveram abundância aumentada (Tabela 11). A análise pelo STRING mostrou uma alta confiança para a interação entre as proteínas formando 2 grupos (Figura 27), sendo eles: grupo 1 (RPL29, RPN2, RPS24 e PSMA2) e grupo 2 (PPP1CB e ACTB).

nº acesso	Uniprot	P-value	Média	Descrição
P60709	ACTB	0,031	0,294289	Actin, cytoplasmic 1
P61006	RAB8A	0,017	0,30823	Ras-related protein Rab-8A
P62140	PPP1CB	0,025	0,344474	serine/threonine-protein phosphatase PP1-beta catalytic subunit isoform 1
P25787	PSMA2	0,012	0,306741	Proteasome subunit alpha type-2
O60262	GNG7	0,035	0,250176	Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(O) subunit gamma-7 precursor
P48059	LIMS1	0,025	0,238129	LIM and senescent cell antigen-like-containing domain protein 1 isoform b
P62847	RPS24	0,029	0,321029	40S ribosomal protein S24 isoform c
Q9H4E7	DEF6	0,045	0,329802	differentially expressed in FDCP 6 homolog
P21283	ATP6V1	0,021	0,350682	V-type proton ATPase subunit C 1
P04844	RPN2	0,031	0,30869	dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit 2 isoform 1 precursor
P51812	RPS6KA3	0,039	0,357973	Ribosomal protein S6 kinase alpha-3
Q15185	PTGES3	0,039	0,356991	prostaglandin E synthase 3 isoform a
P30042	C21orf33	0,040	0,222416	ES1 protein homolog, mitochondrial
Q9NPP4	NLRC4	0,036	0,228212	NLR family CARD domain-containing protein 4 isoform a
P07339	CTSD	0,047	0,240998	cathepsin D preproprotein
Q9Y262	EIF3L	0,023	0,271067	eukaryotic translation initiation factor 3 subunit L isoform 1
Q7Z6P3	RAB44	0,048	0,307718	Ras-related protein Rab-44
Q16891	IMMT	0,016	0,432167	MICOS complex subunit Mic60 isoform 1
Q9UKG1	APPL1	0,044	0,208496	DCC-interacting protein 13-alpha
P47914	RPL29	0,026	0,203785	60S ribosomal protein L29
P19838	NFKB1	0,019	0,356762	Nuclear factor NF-kappa-B p105 subunit isoform 2
P45974	USP5	0,030	0,247419	ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 5 isoform 1
O15173	PGRMC2	0,044	0,246794	Membrane-associated progesterone receptor component 2
Q9C0E8	LNP	0,038	0,344345	protein lunapark isoform 4
Q5S007	LRRK2	0,023	0,31664	Leucine-rich repeat serine/threonine-protein kinase 2
P06280	GLA	0,049	0,151146	alpha-galactosidase A precursor

Q03518	TAP1	0,044	0,10071	antigen peptide transporter 1 isoform 1
--------	------	-------	---------	---

Tabela 11. Tabela de Proteínas Reguladas com abundância aumentada (27 proteínas).

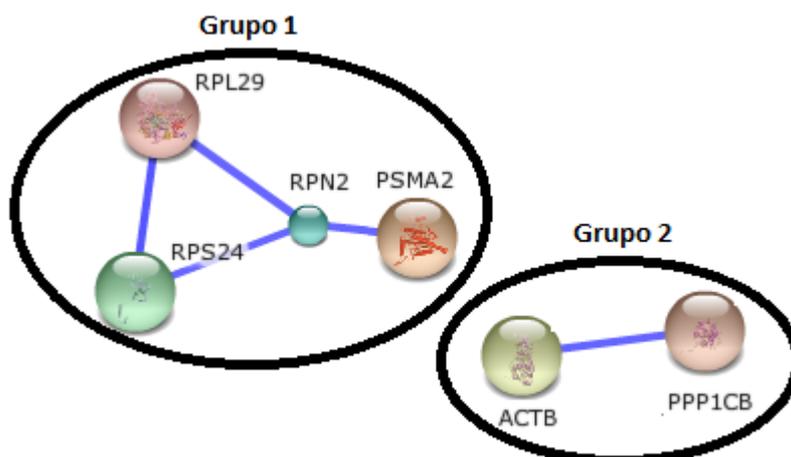


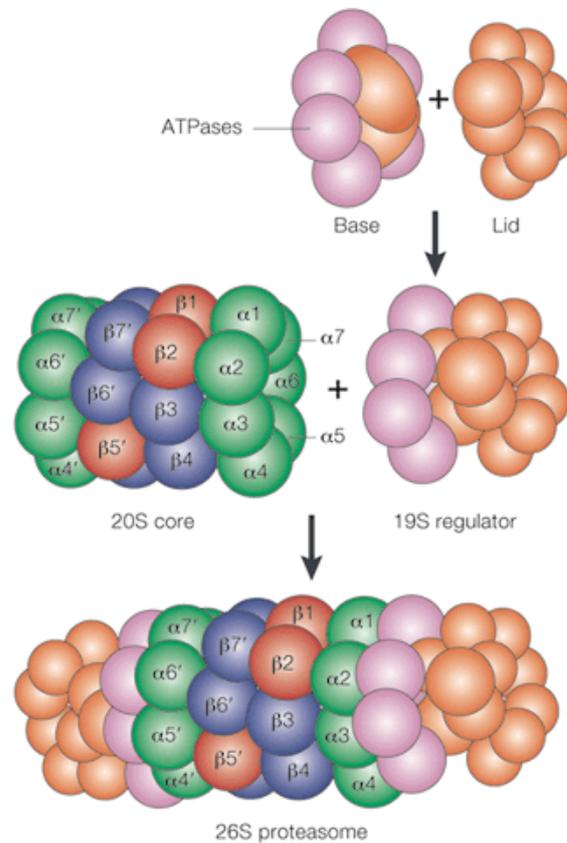
Figura 37. STRING das proteínas com abundância aumentada

I. Grupo 1

As proteínas ribossomais S24 (RPS24) e L29 (RPL29) contribuem na clivagem do pré-rRNA e ajudam no amadurecimento do pequeno ribossomo 40S (BADHAI et al., 2009; ZMIJEWSKI; BANERJEE; ABRAHAM, 2009). Valéria Choemmel evidenciou a participação da RPS24 na estabilização de proteínas ribossomais em subunidades ribossomais maduras, mostrando a importância dessa proteína na manutenção do ciclo celular e apoptose em células cancerosas (CHOESMEL et al., 2008). Já a proteína RPL29 está associada a uma ligação com a heparina na superfície celular chamada HP/HSPG (Heparin/Heparan sulfate-proteoglycan) que tem como consequência a modulação da adesão celular, de fatores de crescimento, da proliferação e de citocinas (SAWAZAKI; MINEZAWA, 1999)

Uma proteína de ligação ao ribossomo também foi identificada e está localizada no proteassoma, chamada de RPN2 (Riboforina 2). O Proteassoma 26S é um complexo enzimático formado por um centro catalítico e outro regulador responsável pela degradação de peptídios. O complexo catalítico central chamado 20S é formado por 4 anéis heptaméricos, sendo 2 alfas (incluindo PSMA2, outra proteína do

proteassoma identificado) e 2 betas (na sequência alfa-beta-beta-alfa como mostrado na figura 38) (CRIMAUDO et al., 1987; ZHU et al., 2014)



Nature Reviews | Molecular Cell Biology

Figura 38. Proteassoma 26S. Complexo catalítico (20S) e Complexo Regulador (19S) (Peter-M. Kloetzel, 2001).

O PSMA2 ou subunidade alfa 2 do proteassoma faz parte do complexo multicatalítico proteinase que é caracterizado por clivar peptídios com Arg, Phe, Tyr, Leu e Glu, sendo um potente regulador de outros componentes desse complexo por meio da fosforilação de tirosina (ZHU et al., 2014). O outro complexo regulador é chamado 19S localizado nas extremidades do proteassoma, sendo formado por uma base e por proteínas não enzimáticas (como a RPN1 e RNP2) (KLOETZEL, 2001). Um estudo realizado com o complexo RPN1-RPN2 revelou sua importância no controle da translocação de substratos ubiquitinizados para o núcleo catalítico do proteassoma, promovendo a estabilização entre esses dois complexos e melhorando a atividade proteassômica de 20S (ZMIJEWSKI et al., 2009). Em neutrófilos foi comprovado que

na presença de níveis elevados de ROS (principalmente peróxido de hidrogênio) a RPN2 sofre oxidação e glutationilação, resultando na diminuição da atividade catalítica do proteassoma 26S e assim diminuindo o processo inflamatório. Essa diminuição é justificada ao controlar os níveis de algumas proteínas pró-inflamatórias, mantendo os níveis de I κ B- α estáveis (TAKAHASHI et al., 2013). Outros estudos mostraram que a RPN2 faz parte de um complexo de transferases de N-oligossacarídeos que atua na glicosilação de outras proteínas, como por exemplo na glicosilação de moléculas CD63 em células cancerosas. Essa glicosilação em específico controla a localização celular de CD63, que pode contribuir para a malignidade do câncer estudado (TOMINAGA et al., 2014).

II. Grupo 2

No grupo 2, duas proteínas foram identificadas: uma subunidade (β) da Proteína fosfatase 1 (PP1CB), que está inserida na parte catalítica de PP1, caracterizada como serina-treonina fosfatase (KORRODI-GREGORIO et al., 2014) e a ACTB (beta actina) responsável principalmente pela motilidade celular (SAKAI et al., 2012).

De forma geral a PP1 está relacionada a diversos processos celulares, entre eles a divisão celular, metabolismo do glicogênio, contratilidade muscular, síntese de proteínas e regulação da condensação da cromatina através da desfosforilação das Histonas H3 (IvanTan, 2001). Em particular, M.Ghorbel sugere que a subunidade β da PP1 esteja relacionada com a regulação positiva da migração de células endoteliais em processos de angiogênese em certos tipos de câncer (IACOBAZZI et al., 2015). Essa regulação pode ser por meio das chamadas Focal Adhesions (FAs), que são locais de contato entre o citoesqueleto e a matriz extracelular via integrina de membrana e por meio da polimerização da actina (FRESU et al., 2001). Segundo Stefen R Thom durante a migração coordenada dos neutrófilos ocorre a comunicação entre β 2-Intergrinas e os filamentos de actina com a S-nitrosilação de β actina (outra proteína identificada nesse grupo), promovendo um aumento na formação de curtos filamentos de actina intracelular e proporcionando assim a reorganização do citoesqueleto (R.THOM, 2011).

O conjunto de proteínas com abundância aumentada revelou um importante processo de preparo da célula em um estado caracterizado como estimulado ou *priming*.

Observamos um aumento parcial da abundância de proteínas ribossomais e do proteossoma que juntas participam do sistema *turnover* de proteínas. Houve um aumento também de proteínas envolvidas no processo de transdução de sinal (como proteína G, Ras e NFκβ) e da enzima que sintetiza a prostaglandina E (vasodilatador e atua na resolução da inflamação). No processo de estímulo dos neutrófilos pelo PAF observamos através da microscopia eletrônica de varredura a modificação da superfície celular principalmente com a formação de citonemas. Essas modificações requerem uma rápida reorganização do citoesqueleto, sendo coerente com um aumento da abundância de proteínas envolvidas na motilidade celular e na translocação de vesículas e grânulos (NUNOI et al., 1999; TELES et al., 2012; TOMINAGA et al., 2014).

5.3.5.2. Proteínas com abundância diminuída

Dentre as proteínas com abundância diferencial destacamos 146 com abundância diminuída (Tabela 12). A análise no STRING revelou a formação de 11 grupos com alta confiança para interação proteica (Figura 29), sendo eles: grupo 1 (HK2 e DERA), grupo 2 (VTA1, CHMP2A, IST1), grupo 3 (TCN1, PRSS3, PRTN3 E ELANE), grupo 4 (STK17B, CHP1, CD44), grupo 5 (NACA 2, RPL8, EIF3J, RPL5, RPS15A, SRP9, REPL32), grupo 6 (PDIA6, CS, IDH1, SDHB, FAH, UQCRC1, ETFA), grupo 7 (FARSA, FARSB e AARS), grupo 8 (ATP6V1G1, TCIRG1, TF), grupo 9 (MAPK14, PTK2B, GNB2, MAP2K1, MAPK1, RPS6KA1, AP2M1, PRKAR2A), grupo 10 (H2AFZ, LMNB1, LMNB2) e grupo 11 (PAFAH1B1 e LPCAT2).

nº acesso	P-value	Média	Descrição
P63313	0,046296	-0,22891	thymosin beta-10
P62328	0,043086	-0,25344	Thymosin beta-4
P05109	0,010949	-0,17237	Protein S100-A8
P22392	0,011188	-0,20347	nucleoside diphosphate kinase B isoform a
Q9H3K6	0,033086	-0,25386	bola-like protein 2
P08758	0,027450	-0,16075	annexin A5
P20700	0,002412	-0,08841	lamin-B1 isoform 1
O15144	0,033700	-0,14765	Actin-related protein 2/3 complex subunit 2

P61020	0,006114	-0,1727	ras-related protein Rab-5B isoform 1
Q99653	0,014596	-0,19968	Calcineurin B homologous protein 1
P61978	0,009057	-0,11577	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K isoform b
P49458	0,008963	-0,08845	signal recognition particle 9 kDa protein isoform 2
P07108	0,018834	-0,17057	acyl-CoA-binding protein isoform 3
P08246	0,013289	-0,17049	neutrophil elastase preproprotein
Q13231	0,015199	-0,14776	chitotriosidase-1 isoform 1 precursor
P62879	0,021260	-0,09942	Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) subunit beta-2
P28482	0,027323	-0,09278	mitogen-activated protein kinase 1
Q9Y2S6	0,004727	-0,18526	Translation machinery-associated protein 7
Q9Y5Z4	0,012470	-0,18856	Heme-binding protein 2
O75874	0,011271	-0,19959	Isocitrate dehydrogenase [NADP] cytoplasmic
Q15833	0,008223	-0,10659	syntaxin-binding protein 2 isoform a
O60869	0,005694	-0,07703	Endothelial differentiation-related factor 1 isoform alpha
Q7L5N7	0,003356	-0,11895	Lysophosphatidylcholine acyltransferase 2
Q9Y394	0,010773	-0,11949	dehydrogenase/reductase SDR family member 7 precursor
Q16539	0,029644	-0,06964	mitogen-activated protein kinase 14 isoform 2
P0C0S5	0,038858	-0,1369	Histone H2A.Z
Q02978	0,001116	-0,12741	mitochondrial 2-oxoglutarate/malate carrier protein isoform 1
P24158	0,019160	-0,16628	myeloblastin precursor
Q15084	0,036405	-0,09777	protein disulfide-isomerase A6 isoform d precursor
Q6XQN6	0,015152	-0,10642	nicotinate phosphoribosyltransferase isoform 1
Q99729	0,012678	-0,18842	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B
O00231	0,027513	-0,1413	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 11
O00233	0,012363	-0,16661	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 9 isoform 1
Q01082	0,013105	-0,09568	Spectrin beta chain, non-erythrocytic 1 isoform 1

O75348	0,039979	-0,18421	V-type proton ATPase subunit G 1
P81605	0,033858	-0,14301	dermcidin isoform 1 preproprotein
P26022	0,016901	-0,21227	pentraxin-related protein PTX3 precursor
O75695	0,010699	-0,11807	Protein XRP2
P35659	0,021855	-0,15936	protein DEK isoform 1
Q969H8	0,003396	-0,12699	UPF0556 protein C19orf10 precursor
P06454	0,030519	-0,16946	prothymosin alpha isoform 1
P55957	0,007781	-0,12905	BH3-interacting domain death agonist isoform 2
Q9UBW5	0,018160	-0,17591	Bridging integrator 2
P13804	0,048998	-0,09467	electron transfer flavoprotein subunit alpha, mitochondrial isoform a
O15347	0,010653	-0,12394	high mobility group protein B3 isoform a
P61163	0,018423	-0,22124	Alpha-centractin
O00602	8,02E-05	-0,39255	ficolin-1 precursor
P00387	0,004169	-0,08644	NADH-cytochrome b5 reductase 3 isoform 1
O95571	0,000835	-0,14077	Persulfide dioxygenase ETHE1, mitochondrial
Q02750	0,006031	-0,23152	Dual specificity mitogen-activated protein kinase kinase 1
O60610	0,030520	-0,08239	protein diaphanous homolog 1 isoform 1
Q15418	0,022585	-0,14947	ribosomal protein S6 kinase alpha-1 isoform a
Q9P0L0	0,037276	-0,14557	vesicle-associated membrane protein-associated protein A isoform 2
P30043	0,010852	-0,1664	flavin reductase (NADPH)
O75390	0,031051	-0,14534	citrate synthase, mitochondrial precursor
Q03252	0,030216	-0,1507	Lamin-B2
P43034	0,005624	-0,09996	Platelet-activating factor acetylhydrolase IB subunit alpha
Q9Y2Q5	0,013110	-0,24047	regulator complex protein LAMTOR2 isoform 1
Q9Y315	0,023855	-0,18058	deoxyribose-phosphate aldolase isoform 1
P09417	0,012034	-0,17695	dihydropteridine reductase
Q01432	0,011478	-0,15704	AMP deaminase 3 isoform 1B
P49755	0,038779	-0,15369	Transmembrane emp24 domain-containing protein

			10 precursor
P80217	0,003547	-0,19862	interferon-induced 35 kDa protein
Q9Y4H4	0,012424	-0,19721	G-protein-signaling modulator 3
P53634	0,004912	-0,24556	Dipeptidyl peptidase 1
Q92608	0,040775	-0,10003	Dedicator of cytokinesis protein 2
Q13765	0,040881	-0,16668	nascent polypeptide-associated complex subunit alpha isoform b
O75015	0,004564	-0,2081	Low affinity immunoglobulin gamma Fc region receptor III-B
Q96C86	0,042841	-0,28063	M7GpppX diphosphatase
Q99598	0,023210	-0,2196	Translin-associated protein X
Q13488	0,002368	-0,12752	V-type proton ATPase 116 kDa subunit a isoform 3 isoform a
Q9BS26	0,004962	-0,13182	endoplasmic reticulum resident protein 44 precursor
P62244	0,004428	-0,23772	40S ribosomal protein S15a
Q7Z4W1	0,011458	-0,19959	L-xylulose reductase isoform 1
P14866	0,019954	-0,09957	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L isoform a
Q9ULC4	0,018826	-0,25188	malignant T-cell-amplified sequence 1 isoform 1
O43633	0,042110	-0,19725	charged multivesicular body protein 2a
Q14116	0,020132	-0,16615	Interleukin-18 isoform 1 proprotein
Q7L1Q6	0,020507	-0,09234	basic leucine zipper and W2 domain-containing protein 1 isoform 1
Q6RW13	0,013486	-0,22209	type-1 angiotensin II receptor-associated protein isoform a
Q8N8A2	0,042404	-0,13408	Serine/threonine-protein phosphatase 6 regulatory ankyrin repeat subunit B isoform A
Q9NR45	0,017263	-0,16558	sialic acid synthase
Q14289	0,017384	-0,0701	protein-tyrosine kinase 2-beta isoform a
P62917	0,027328	-0,14416	60S ribosomal protein L8
O95498	0,012339	-0,16086	Vascular non-inflammatory molecule 2
P46777	0,030098	-0,16322	60S ribosomal protein L5

P35573	0,006924	-0,11717	glycogen debranching enzyme isoform 1
P20061	0,006055	-0,22722	transcobalamin-1 precursor
Q9H0A8	0,013695	-0,26079	COMM domain-containing protein 4 isoform 1
P45880	0,001576	-0,21742	voltage-dependent anion-selective channel protein 2 isoform 2
P31930	0,003791	-0,09151	cytochrome b-c1 complex subunit 1, mitochondrial precursor
P52789	0,008023	-0,17795	Hexokinase-2
O43143	0,042923	-0,13535	Putative pre-mRNA-splicing factor ATP-dependent RNA helicase DHX15
Q9BUP3	0,004695	-0,27191	oxidoreductase HTATIP2 isoform b
Q13011	0,023492	-0,14528	delta(3,5)-Delta(2,4)-dienoyl-CoA isomerase, mitochondrial precursor
O75937	0,002183	-0,1051	DnaJ homolog subfamily C member 8
P53990	0,042400	-0,14345	IST1 homolog
P12004	0,040880	-0,24061	proliferating cell nuclear antigen
Q6GMV3	0,004593	-0,19376	Putative peptidyl-tRNA hydrolase PTRHD1
P13861	0,026736	-0,14698	cAMP-dependent protein kinase type II-alpha regulatory subunit
P16930	0,006909	-0,16912	Fumarylacetoacetase
P05091	0,009284	-0,21794	aldehyde dehydrogenase, mitochondrial isoform 1 precursor
P27918	0,016482	-0,18521	properdin precursor
O00241	0,001167	-0,11454	signal-regulatory protein beta-1 isoform 1 precursor
O75688	0,017692	-0,1661	protein phosphatase 1B isoform 1
P55036	0,021584	-0,16219	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 4
P62910	0,005051	-0,08068	60S ribosomal protein L32
P11387	0,013398	-0,19678	DNA topoisomerase 1
P55209	0,007952	-0,28862	Nucleosome assembly protein 1-like 1
O60749	0,024970	-0,14419	sorting nexin-2 isoform 1
Q6UW68	0,002447	-0,31675	Transmembrane protein 205
O75822	0,013458	-0,29316	eukaryotic translation initiation factor 3 subunit J

			isoform 1
P10619	0,046927	-0,196	lysosomal protective protein isoform b precursor
O95989	0,013578	-0,17735	Diphosphoinositol polyphosphate phosphohydrolase 1
Q92974	0,015214	-0,20519	rho guanine nucleotide exchange factor 2 isoform 1
P11908	0,003986	-0,12433	ribose-phosphate pyrophosphokinase 2 isoform 2
Q9NSD9	0,029273	-0,24444	Phenylalanine--tRNA ligase beta subunit
Q9NP79	0,003121	-0,10994	vacuolar protein sorting-associated protein VTA1 homolog isoform a
Q9HC35	0,013521	-0,21007	Echinoderm microtubule-associated protein-like 4
Q13867	0,016016	-0,15756	bleomycin hydrolase
P12270	0,012915	-0,20772	Nucleoprotein TPR
Q96CW1	0,017706	-0,10525	AP-2 complex subunit mu isoform a
Q8TAQ2	0,011394	-0,21252	SWI/SNF complex subunit SMARCC2 isoform a
O94768	0,022601	-0,14049	Serine/threonine-protein kinase 17B
P25024	0,034409	-0,14692	C-X-C chemokine receptor type 1
P09661	0,006974	-0,24966	U2 small nuclear ribonucleoprotein A'
Q9Y285	0,026421	-0,17591	Phenylalanine--tRNA ligase alpha subunit
O75533	0,013229	-0,08592	Splicing factor 3B subunit 1 isoform 1
Q16630	0,023817	-0,14112	cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 6 isoform 1
P02787	0,006192	-0,42339	Serotransferrin
O43865	0,012442	-0,17416	putative adenosylhomocysteinase 2 isoform a
P21912	0,032513	-0,30967	succinate dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur subunit, mitochondrial precursor
P35030	0,032508	-0,04029	Trypsin-3
Q13618	0,022200	-0,16841	Cullin-3 isoform 1
P16070	0,016947	-0,16087	CD44 antigen isoform 1 precursor
Q5VYY1	0,011113	-0,17282	Ankyrin repeat domain-containing protein 22
P52888	0,046211	-0,17998	thimet oligopeptidase
Q9Y266	0,040539	-0,12889	nuclear migration protein nudC
P02671	0,012395	-0,25829	fibrinogen alpha chain isoform alpha-E

			preproprotein
Q96FS4	0,017355	-0,2304	signal-induced proliferation-associated protein 1
Q9H2K8	0,034546	-0,17549	Serine/threonine-protein kinase TAO3
Q9NTZ6	0,037415	-0,15604	RNA-binding protein 12
P42226	0,000293	-0,12418	signal transducer and activator of transcription 6 isoform 1
P49588	0,011317	-0,18732	Alanine--tRNA ligase, cytoplasmic
P11717	0,046463	-0,17768	Cation-independent mannose-6-phosphate receptor
Q9BZH6	0,034618	-0,30476	WD repeat-containing protein 11

Tabela 12. Tabela de Proteínas Reguladas com abundância diminuída (146 proteínas).

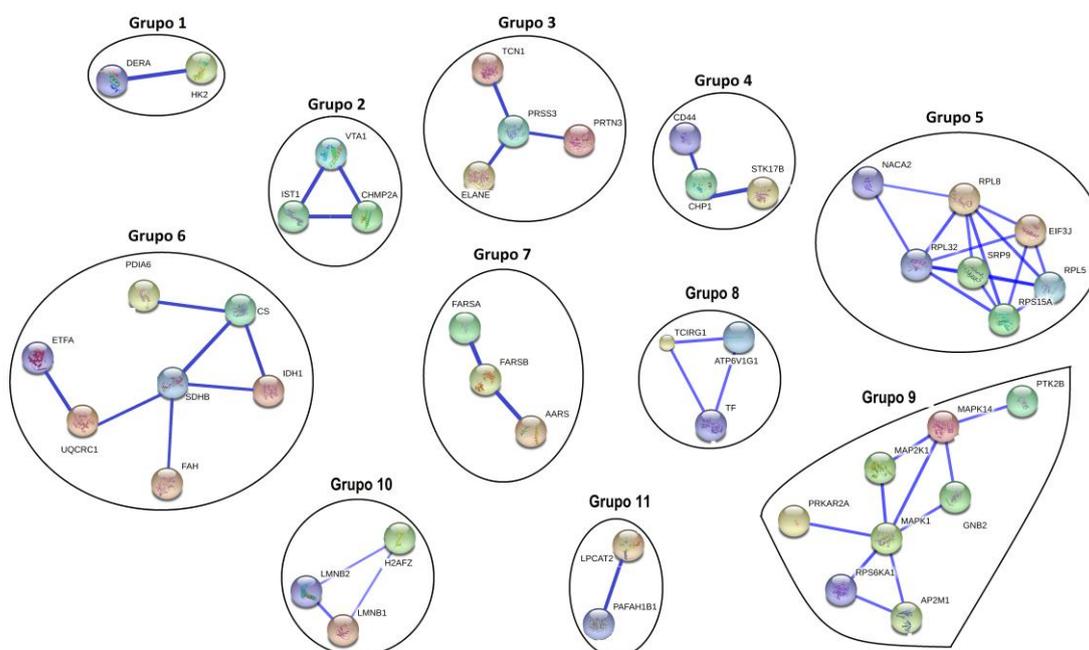


Figura 39. STRING das proteínas com abundância diminuída - Grupos 1 a 11.

I. Grupo 1

Destacamos no grupo 1 duas enzimas fundamentais para a obtenção de energia para a célula, a Hexocinase 2 (HK2) e a aldolase desoxirribose fosfato (DERA). A Hexocinase ou ATP D-hexose 6 fosfotransferase é responsável pela fosforilação da glicose em glicose 6 fosfato com gasto de ATP, tendo sido observada a translocação dessa enzima em neutrófilos ativados por PMA e fMLP para diferentes regiões da

membrana (HUANG, J. B.; KINDZELSKII; PETTY, 2002). Bryan N relatou que a hexocinase 2 foi encontrada em altas expressões em células cancerígenas e está associada ao crescimento acelerado tumoral e a incapacidade da célula em entrar em apoptose. Essas duas características estão vinculadas a localização da hexocinase 2 na membrana externa da mitocôndria (BRYAN; RAISCH, 2015). Já a aldolase desoxirribose fosfato ou DERA é uma via alternativa de obtenção de energia, onde a 2 desoxi-D-ribose-5 fosfato é convertida em Gliceraldeído 3 fosfato (G3P) e acetaldeído.

II. Grupo 2

Nesse grupo foram identificadas três proteínas acessórias do complexo ESCRT (Endossomal Sorting Complexes Required for Transport), sendo elas a CHMP2A (Charged multivesicular body protein 2A) conhecida também como Vps2, IST1 (Increased Sodium Tolerance 1) e VTA1 (Vacuolar Protein Sorting Associated Protein 1) (BAJOREK et al., 2009). O grande complexo ESCRT é formado por complexos citossólicos menores classificados como ESCRT 0 (Vps27 e Hse1), ESCRT I (Vps23, Vps28, Vps37 e MUB12), ESCRT II (Vps22, Vps25 e Vps36) e ESCRT III (Vps2, Vps20, Vps24, Snf7, Vps60, Did2 e IST1). Em conjunto, esse grande complexo ESCRT permite uma remodelação da membrana e a abscisão da vesícula endossomal com a presença da biogênese dos corpos multivesiculares (MVB-Multivesicular bodies) (Figura 24) (SCHMIDT; TEIS, 2012). Esses MVB são de fundamental importância para o transporte de proteínas ubiquitinadas para o lisossomo (PRYOR; LUZIO, 2009; SCHMIDT; TEIS, 2012). Na figura 40 observamos o esquema da formação desses MVBs (endosome/MVB) e a sua posterior fusão com o lisossomo.

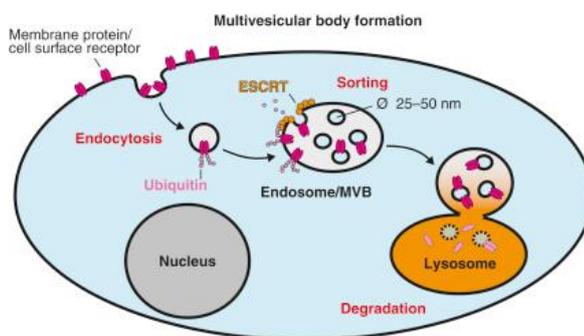


Figura 40. Formação dos corpos multivesiculares (MVBs) (modificada a partir de Oliver Schmidt, 2012).

Segundo Oliver Shmidt, a formação das MVBs tem início com a interação entre as proteínas Vps27 e Hse1 (complexo ESCRT 0) que se ligarão as proteínas ubiquitinadas e em seguida interagirão com PIP3 da membrana dos endossomos. Vps27 vai se ligar a Vps23 e interligar as demais proteínas desse complexo ESCRT I. Vps23 se ligará à Vps36 do complexo ESCRT II, que em seguida se liga a proteína Vps20 (complexo ESCRT III). Dessa forma todos os complexos serão ativados, onde o próximo passo é a formação de um “cordão” formado pelas proteínas essenciais, que seguem uma interação sequencial para a ativação do complexo (Vps20→Snf7→Vps24→Vps2) (Figura 25). Vps2 vai interagir com Vps4 e recrutar **VTA1** para a formação do complexo Vps4-VTA1, cuja principal função é desmontar o complexo ESCRT III terminando assim a formação do MVB. Outras proteínas conhecidas como não essenciais, tais como Vps60, **IST1** e Did2, ajudam na interação de **Vps2** com o complexo energético Vps4-ATPase (NICKERSON et al., 2010). O principal intermediário dessas ligações é a proteína IST1, onde segundo Monila Bajorek a IST1 se liga tanto em Vps4 quanto em Did2. Por outro lado temos a proteína VTA1, que foi citada anteriormente, e que é essencial para a comunicação entre a proteína acessória Vps60 (atraves do domínio MIT) e o complexo Vps4-ATPase (através do domínio VSL) durante a formação do endossoma-MVB (Figura 40) (NICKERSON et al., 2010). Dessa forma temos a identificação de três proteínas centrais na estabilização do complexo ESCRT III na formação do endossoma-MVB.

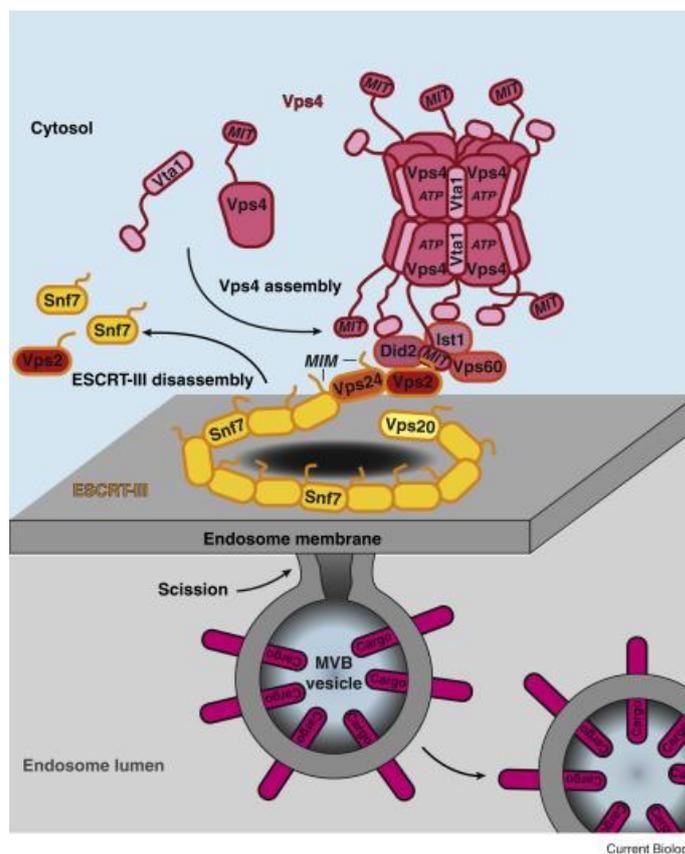


Figura 41. Complexo ESCRT III e as proteínas acessórias. As subunidades do complexo III chamadas Vps24 a Vps 2 terminam a montagem desse complexo (Oliver Schmidt, 2012)

III. Grupo 3

No grupo 3 foram identificados três serino proteases, sendo elas PRSS3 (conhecida também como tripsina 3), PRTN3 (Proteinase 3) e ELANE (elastase expressa em neutrófilos). As atividades das serino-proteases estão vinculadas a uma tríade de aminoácidos (aspartato, histidina e serina) que conferem uma interação específica, para a formação do sítio catalítico da enzima (KORKMAZ, 2010). Estudos revelam que essas serino proteases são altamente expressas na fase promielocítica da diferenciação celular, mas que têm uma rápida diminuição quando passam para a fase mielocítica madura. Cogita-se que durante essa fase, as serino-proteases (em específico proteinase 3 e elastase) atuem para a formação das α -Defensinas ativas que atuarão em neutrófilos ativados com características antimicrobianas, antiviral e antifúngicas (GLENTHOJ et al., 2015). Chistine T. N. Pham relatou em seu trabalho que as serino-

proteases atuam tanto no meio intracelular com a degradação de proteínas via fagolisossomo quanto no meio extracelular regulando o sistema imunitário e auxiliando na degradação de ECM (componentes da matriz extracelular) (PHAM; LEY, 1999). Outra proteína identificada é TCN1 (Transcobalamina I), cuja principal função é transportar a vitamina B12 do sangue para as células periféricas. Outra função relatada é sua participação na síntese de purinas e pirimidinas e da metilação de homocisteína para a produção de S-adenosilmetionina na síntese de metionina. A adenosil-TCN1 é um cofator para a enzima metilmalonilmutase em uma reação que converte metilmalonil Coa em Succinil Coa (entra no Ciclo de Krebs) (QUADROS; SEQUEIRA, 2013). Philip Toskes relatou em seu estudo clínico, que pacientes com disfunção pancreática melhora a mal absorção de vitamina B12 através do aumento da trispina no organismo.

As proteínas PRSS3 (Proteína serina 3), ELANE (Elastase neutrofílica) e PRTN3 (Proteinase 3) que são muito importantes para o controle de diversas doenças como SARA (Síndrome da Angustia Regulatória Aguda), artrite reumatoide, DPOC (Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica) e fibrose cística também tiveram a abundância diminuída. Como a ação exacerbada dos neutrófilos ativados libera grandes quantidades de enzimas proteolíticas (entre elas as serino-proteases), o controle das mesmas seria de fundamental importância para a diminuição dos danos teciduais causados nessas doenças (KORKMAZ, 2010).

IV. Grupo 4

No grupo 4 destacamos uma proteína (CD44) que ajuda no processo de rolamento dos neutrófilos. CD44 é uma glicoproteína transmembrana tipo 1 que é expressa tanto em células hematopoiéticas quanto não hematopoiéticas. O ligante de CD44 é o ácido hialurônico (glicosaminoglicano da matriz extracelular) que é exposto em uma grande variedade de células, entre elas as células do endotélio. A interação entre CD44 dos neutrófilos e o ácido hialurônico das células do endotélio auxilia no rolamento dos neutrófilos e a posterior adesão firme com a interação entre integrinas e PSGL1, resultando na transmigração para o local da inflamação (MCDONALD; KUBES, 2015). Outra função observada é o aparecimento de CD44 em neutrófilos em processo de morte programada. Os macrófagos reconhecem e removem neutrófilos que

expõem CD44 na sua superfície (SWAIN, 2015). Essa marcação de superfície de morte programada associa outras duas proteínas identificadas nesse grupo, que são STK17B (Serine Treonine Kinase 17B) e CHP1 (Calcineurin like EF hand Protein 1). STK17B interage com CHP e induz sua translocação do complexo de Golgi para o núcleo, enquanto que CHP pode associar-se a microtúbulos e organelas ligadas à membrana do complexo de Golgi e Retículo Endoplasmático direcionando a fusão das vesículas secretórias com a membrana plasmática. Relatos sugerem a ação integrada entres essas duas proteínas (STK17B e CHP), onde CHP regula negativamente a ação de uma serina treonina cinase chamada DRAK2 (Death-associated protein kinase related apoptosis inducing kinase 2) de acordo com a concentração aumentada de Ca^{+2} intracelular. Regula negativamente também a atividade de STK17B. Além de regular o sistema de morte programada, DRAK2 possui um importante papel na transdução do sinal da apoptose (KUWAHARA et al., 2003). Sandra Verploegen comprovou a importância da calcineurina na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), onde sua inibição diminui os níveis de EROs e assim sua ativação.

Algumas proteínas essenciais no processo de adesão dos neutrófilos ativados, são reguladas, como por exemplo a CD44. Essa proteína ajuda tanto no processo de transmigração e diapedese (fraca adesão) quanto na sinalização da apoptose. Acredita-se que as moléculas de CD44 expressas na superfície dos neutrófilos sejam perdidas ao longo do processo de rolamento e/ou clivadas por metaloproteases, assim como as selectinas. CD44 foi relatada também na superfície de células apoptóticas. Já a calcineurina (CHP) faz parte de vários processos que requerem cálcio durante a ativação celular, como por exemplo sendo um cofator da maioria das fosfatases e cinases. Um exemplo bem significativo foi a identificação de STK17B, uma proteína que faz parte da família serina/treonina cinases, que em conjunto com a Calcineurina (CHP) regula a inibição da apoptose e promove um aumento na sobrevivência do neutrófilo.

V. Grupo 5

Já no grupo 5 destacamos o sistema de transporte de proteínas nascentes do ribossomo, sendo que a proteína SRP9 (Signal Recognition Particle 9) tem um papel essencial no direcionamento de proteínas secretoras para o retículo endoplasmático. As

proteínas da família SRP reconhecem sequências específicas das cadeias de polipeptídios nascentes e interagem com o ribossomo formando o Complexo Ribossomo-Cadeia, que em seguida é translocado para a membrana do retículo endoplasmático (BOVIA et al., 1997). Estudos revelam um mecanismo de regulação para a formação desse complexo, onde a proteína SRP9 forma um complexo estável interagindo com SRP14 e o domínio Alu (pertencente a família Alu e compreende sequências repetitivas nas extremidades finais de 3' e 5' do mRNA) e que juntos medeiam a pausa da síntese de ribossomo associado a polipeptídios nascentes (BOVIA et al., 1997; HSU et al., 2003). Outra proteína identificada é a NACA 2 (Nascent polypeptide associated complex alpha subunit 2) que age na regulação seletiva de polipeptídios durante esse transporte impedindo as interações com polipeptídios nascentes inadequados. Segundo Birgitta Beatrix, NACA é um complexo formado por duas subunidades (α e β) cuja ação de ligar-se ao ribossomo de forma firme é conferida pela subunidade β (NACA 2), mas a ação de impedir as interações inadequadas só ocorre com o complexo formado (BEATRIX; SAKAI; WIEDMANN, 2000).

Algumas proteínas ribossômicas foram identificadas também nesse grupo, sendo três da subunidade 60S (RPL5, RPL8 e RPL32) e uma da subunidade 40S (RPS15a). Em conjunto essas duas subunidades (40S e 60S) formam o complexo 80S ribossomal. A dinâmica de interações para a formação desse complexo, envolve as proteínas chamadas Eukaryotic Initiation Factor (eIFs). A proteína identificada nesse trabalho chamada eIF3 foi localizada no centro da subunidade 40S, agindo na via de iniciação e se ligando a outros eIFs como eIF1, eIF4 e eIF5. A montagem do complexo tem início com a interação entre eIF3 e a subunidade 40S (que consiste de um complexo formado por Met - tRNAⁱ - eIF2 ligada a GTP - eIF1 e eIF1A), como mostrado na figura abaixo. eIF3 promoverá a ligação de 5'-mG do mRNA através da interação com eIF4, onde posteriormente o complexo de iniciação 40S fará uma varredura em mRNA no sentido 5' para 3' a procura do códon iniciador (AUG). Com o reconhecimento desse códon, eIF2 em conjunto com outras eIFs são ejetadas da subunidade ribossômica. A subunidade 60S junta-se ao complexo de iniciação 40S por meio de eIF5 e forma o complexo ribossômico 80S (Figura 43) (MAYEUR et al., 2003).

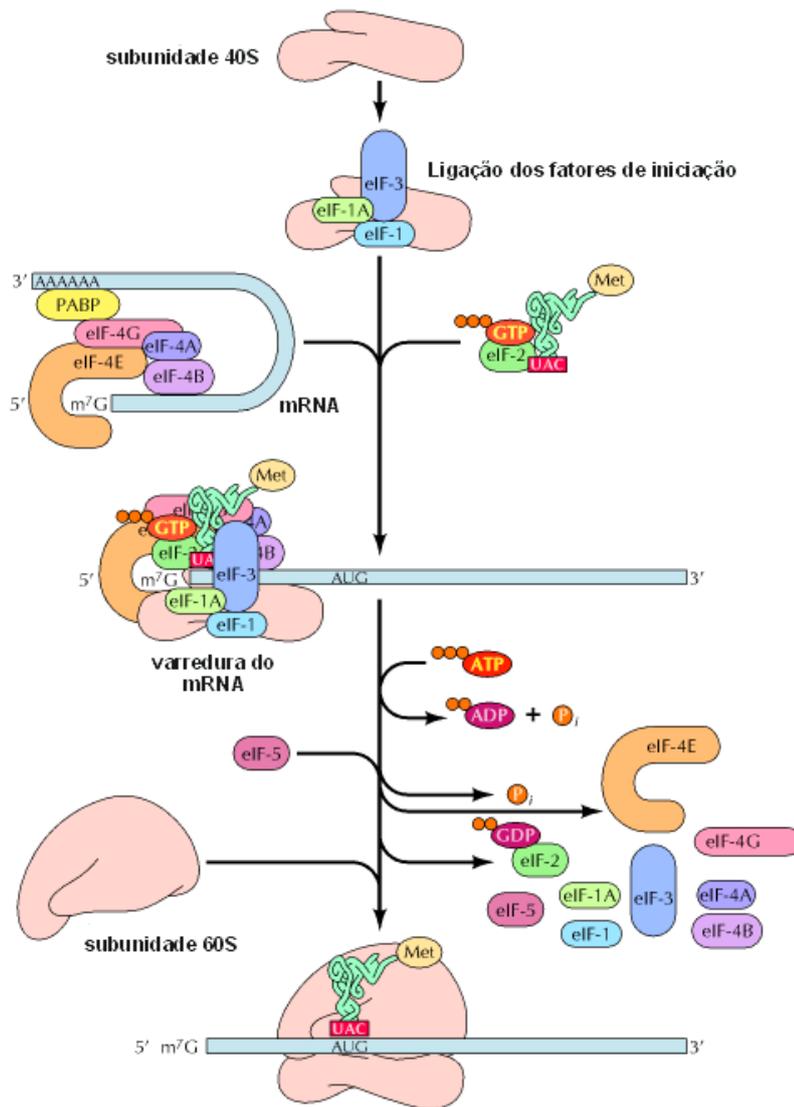


Figura 42. Formação do complexo ribossômico 80S (https://www.ufpe.br/biolmol/Genetica-Medicina/sintese_proteica.htm).

A proteína RPS15a (Ribosomal Protein S15a) possui uma região altamente conservada e promove a ligação de mRNA com uma pequena subunidade ribossômica em fase de iniciação da tradução chamada Eukaryotic Initiation Factor 4F (eIF-4F) (LIAN et al., 2004). Já a proteína RPL8 se liga a rRNA 5.8S que posteriormente se associa ao Eukaryotic Initiation Factor 2 (eIF-2) (HANES et al., 1993). A proteínas RPL5 (Ribosomal Protein L5) se associa ao complexo 5S-La (5S rRNA – protein La) para formar uma RNP1(ribonucleoproteína), que por sua vez participa da montagem do ribossomo. A ação da RPSL5 na formação do ribossomo ainda é desconhecida (MICHAEL; DREYFUSS, 1996). RLP32 também faz parte desse grupo de proteínas

associada ao processamento de pré-mRNA, e também está associada a ativação da transcrição e ligação ao DNA onde um domínio regula o outro (WANG, J.; YUAN; JIANG, 2006).

VI. Grupo 6

No grupo 6 destacamos algumas proteínas ligadas à geração de energia (ATP), com a identificação de 3 proteínas relacionadas ao Ciclo de Krebs (CS – citrate synthase, IDH1 – isocitrate dehydrogenase, SDHB – succinate dehydrogenase complex) e dois da cadeia respiratória mitocondrial (ETF α - Electron transfer flavoprotein alpha, UQCRC1 – Ubiquinol cytochrome c reductase core protein 1 e SDHB (Succinate Dehydrogenase Complex - subunit B). Outras duas proteínas foram identificadas nesse grupo, a FAH (fumarylacetoacetase) que participa do catabolismo da tirosina gerando intermediários para síntese de ATP e a PDIA6 (Protein Disulfide Isomerase Family A member 6) que participa do remodelamento de proteínas nascentes.

A PDIA6 é uma enzima encontrada no retículo endoplasmático, pertencentes a família Proteínas Dissulfeto Isomerase (PDI). As ligações dissulfeto encontradas na formação e rearranjo das proteínas são moduladas pelas PDIs (JORDAN et al., 2005). Estresse do retículo endoplasmático pode resultar em proteínas mal enoveladas resultando na translocação de PDI, que em seguida se liga a NADPH oxidase promovendo sua ativação (AMANSO, 2009). Na cadeia transportadora de elétrons identificamos algumas proteínas, sendo o complexo III ou Ubiquinol cytochromo c reductase (UQCRC 1), uma enzima oligomérica que catalisa a transferência de elétrons da coenzima Q protonada (QH₂) para um ferricitocromo c com a translocação de prótons através da membrana interna mitocondrial para gerar um gradiente de prótons e o potencial de membrana para a síntese de ATP (HOFFMAN et al., 1993; YU; YU, 1993). Outra proteína identificada foi o Complexo II ou Succinato Desidrogenase, que oxida succinato em fumarato no Ciclo do Ácido Cítrico e transfere os elétrons (sem bombeamento de prótons) por meio de FAD e proteínas ferro-enxofre para a Coenzima Q (HUANG, S.; MILLAR, 2013; RUSTIN; MUNNICH; ROTIG, 2002). A Flavoproteína de transporte de elétrons-Q oxidoreductase (ETF), que é uma enzima heterodimérica contendo um simples equivalente de FAD, responsável pela

transferência de elétrons da flavoproteína na matriz mitocondrial para a Coenzima Q através de um FAD e um centro ferro-enxofre também foi identificada. ETF está relacionada ao catabolismo de lipídeos e aminoácidos (ROBERTS; FRERMAN; KIM, 1996).

Outra proteína identificada responsável pelo catabolismo de aminoácidos é a FAH (Fumarylacetoacetase) que participa da via do catabolismo da tirosina, hidrolisando 4 fumarilacetato em acetoacetato e fumarato (intermediários para a geração de ATP). A Succinato Desidrogenase (comentado anteriormente) trabalha de forma dependente da reação de outras enzimas do Ciclo do Ácido Cítrico, no qual seu produto (fumarato) será transformado em malato (por hidratação) e em seguida em oxaloacetato gerando NADH (que é o produto final e o ponto de regulação do ciclo). A velocidade de funcionamento do ciclo é regulada pela enzima Citrato Sintase que promove a condensação de um resíduo acetil e o carbono α ceto do oxaloacetato para a formação do citrato. No passo mais adiante do ciclo o citrato é catalisado a isocitrato, qual será descarboxilado pela enzima Isocitrato de Desidrogenase com a formação de NADH (DE CASTRO BRAS et al., 2014).

VII. Grupo 7

No grupo 7 foram identificadas proteínas chamadas FARSA (Phenylalanyl-tRNA synthetase alpha) e FARSB (Phenylalanyl-tRNA synthetase beta), juntas formam a Phenylalanyl-tRNA Synthase (FRS) que é conhecida por pertencer a família das aminoacil-tRNA synthetase. Essa família tem um papel chave na tradução fiel do código genético, uma vez que elas catalisam a ligação de cada aminoácido ao seu respectivo tRNA (Abdulraheem Almalki, 2014). Tanto a subunidade α quanto a β de FARS se unem ao seu tRNA_(Phe) específico formando Phenylalanyl-tRNA_(Phe) (com gasto de ATP). Outra proteína identificada foi a AARS (Alanyl-tRNA synthetase) que também realiza o mesmo processo de aminoacilação (processo caracterizado pela adição de um grupo aminoacil a um composto), a diferença é que se forma a Alanyl-tRNA_(Ala). A ligação aminoacil-tRNA se liga ao sítio A do ribossomo, onde terá início com a localização do códon e a montagem do polipeptídeo (RODOVA; ANKILOVA; SAFRO,

1999). Esse grupo se destaca pela formação fiel de polipeptídios, com a interação específica de cada códon vinculado ao aminoacil-tRNA de cada aminoácido.

VIII. Grupo 8

Os neutrófilos possuem em sua membrana plasmática, nas membranas dos grânulos e das vesículas um sistema de bombeamento de prótons através de um complexo heteromultimérica chamada V-ATPase (NIESSEN et al., 1997). Esse complexo é formado por dois domínios, um periférico chamado V1 envolvido na acidificação de organelas endomembranas, com componentes citosólicos (a, b, c, d, e) e outro integrante chamado V0 que está diretamente relacionado com a exocitose de vesículas secretórias e com ação proteolítica de lipídeos durante a fusão das membranas, composta de a1, a2, a3 e a4 (Alice Gilman-Sachs, 2015). Nesse trabalho foram identificados esses dois tipos de proteínas V-ATPase, sendo elas TCIRG1 (V-type próton ATPase isoform a3) e ATP6V1G1 (ATPase subunit V1). Niels Borregard publicou em 2003 um estudo de identificação das proteínas presente nos grânulos e vesículas secretórias, sendo que esse complexo foi localizado nos grânulos azurofílicos e gelatinase (BORREGARD et al., 2003). Já em 2015 Alice Gilman-Sachs mostrou que parte desse complexo é localizada nos grânulos e que são translocadas para a membrana plasmática depois da ativação dos neutrófilos (GILMAN-SACHS et al., 2015). Uma proteína acessória identificada chamada AP2M1 (Adaptador Related Protein Complex 2 subunidade Mu 1) faz parte desse sistema do complexo ATPase vacuolar, uma vez que ela é essencial para ativação do complexo por meio da ligação com alta afinidade à subunidade V1. Ela é uma proteína que trabalha associada com a proteína clatrina que está presente na superfície de vesículas destinadas à fusão de membrana e início do endossoma (WANG, M. et al., 2010). Observamos que essas proteínas são importantes nos neutrófilos ativados para a acidificação dos grânulos (um dos mecanismos utilizados para matar agentes invasores) e ação proteolítica na superfície durante a exocitose dos grânulos e vesículas. Mellisa R.Fessel identificou um novo sistema de ATPase vinculada ao metal ferro, onde sugeriu que Fe^{+3} -ATPase pode ser responsável pelo transporte de ferro no núcleo. A proteína chamada Transferrina (TF) é uma glicoproteína responsável pelo transporte de ferro (Fe^{+3}), onde no sangue forma um

complexo Transferrina-Bicarbonato de sódio-ferro. Ambos sistemas de transporte de ferro são essenciais para a regulação do Fe^{+3} em níveis aceitáveis nas células, tendo em vista que em concentrações mais elevadas podem gerar espécies reativas de oxigênio (FESSEL et al., 2007).

IX. Grupo 9

Nesse grupo podemos evidenciar um dos principais grupos de enzimas, chamado cinases. As cinases são responsáveis por catalisar a fosforilação de proteínas através da transferência do grupo fosfato de ATP para resíduos de treonina e tirosina de outras proteínas. Foi identificado duas proteínas cinases que ajudam outras proteínas da via das MAPKs (RPS6KA1 -Ribossomal Protein S6 Kinase e a PTK2 – Protein Tyrosine Kinase 2). A RPS6KA1 regula a tradução a nível ribossomal através de RPS6 e fosforila eIF4B para iniciar a montagem do ribossoma e assim a tradução (HU et al., 2004). Já a PTK2 está envolvida em muitos processos biológicos, como na regulação da reorganização do citoesqueleto de actina, polarização celular, migração e adesão, assim como na regulação de muitas vias entre elas da cascata de sinalização da MAPK incluindo a ativação de MAPK1/ERK2, MAPK3/ERK1 e MAPK8/JNK1. A PTK2 está envolvida também nos controles de canais iônicos induzidos por cálcio, onde sua rápida fosforilação intracelular ativa receptores Acetilcolina nicotínico, depolarizando a membrana ou ativando PKC (LEV et al., 1995).

Em alguns casos existe um sistema de fosforilação por meio de GTP, no qual se destacam as Serino/Treonina cinases. Nesse trabalho temos quatro proteínas pertencentes a esse grupo que tiveram abundância diferencial, sendo elas a MAPK1 (Mitogen Activated Protein Kinase 1), MAPK14 (Mitogen Activated Protein Kinase 14), MAPK1 (Mitogen Activated Protein Kinase 1) e PRKAR2A (Protein Kinase cAMP-dependent regulatory type II alpha). Todas fazem parte do sistema de sinalização intracelular das MAPK, que são essenciais para algumas funções biológicas como crescimento celular, adesão, sobrevivência e diferenciação através da regulação de transcrição, tradução e rearranjo do citoesqueleto. Além disso estão envolvidas também na regulação de endossomas, incluindo o processamento em lisossoma e endossoma (CAO et al., 2014; OWAKI et al., 1992). A cascata de sinalização das MAPKs,

geralmente tem início com a ligação do ativador (ex: Fator de crescimento) ao seu receptor. Essa ligação vai promover uma mudança conformacional na proteína transmembrana e ativar uma proteína RAS através da molécula adaptadora GRB2 juntamente com SOS (fator de troca do nucleotídeo guanina), induzindo a ativação de RAS por meio da fosforilação trocando ATP por ADP. RAS ativo estimula uma série de proteínas citoplasmáticas de forma serial, como por exemplo a Raf (cinase específica de Ser/Treonina) que estimula MEK e por fim MAPK. As MAPKs ativadas vão se translocar para o núcleo e fosforilar proteínas nucleares (Figura 43). Duas proteínas identificadas neste trabalho podem estar relacionadas a essa cascata de sinalização. Uma chamada GNB2 (Guanine Nucleotide Binding protein (G protein) Beta) que tem atividade GTPase e está envolvida como um modulador da Proteína G, ligando sinais de receptores a proteínas efetoras (Jiaxin Niu, 2003). A outra é chamada MAPK2K1 (Mitogen Activated Protein Kinase Kinase 1) que atua em conjunto com MEK1 formando MAPK2K1/MEK1, que por sua vez é ativado por fosforilação mediada por Raf-1 (CAO et al., 2014; V.SILVA, 2009).

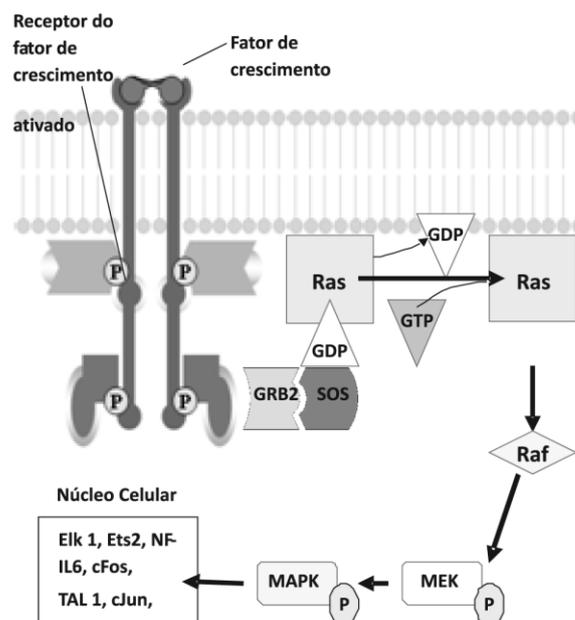


Figura 43. Cascata de sinalização das MAPKs (Silva. BV, 2009)

A proteína PRKAR2A é uma serino protease cinase com multi-subunidades, que se destaca pela presença de sítios reguladores (R) e sítios catalíticos (C), um dos quais denominado sítio regulador II alfa (RII α). As PKA regulam a sinalização de

cAMP (um segundo mensageiro) para vários processos intracelulares, sendo um deles (cadeias reguladoras tipo II) a associação com a membrana através da ligação a proteínas de ancoragem incluindo MAPK2 (Silvia Ferreira, 2014). A proteína MAPK14 pertence à família da p38MAPK e atuam em diversos processos na cascata de sinalização sequencial intracelular em resposta a estímulos extracelulares, tais como citocinas pro-inflamatórias ou estresse físico que conduzem fatores de transcrição direta. Hirota pesquisou a importância de mecanismos alternativos para a eliminação de organelas envelhecidas por meio da formação de vesículas e destacou a importância de MAPK1 e MAPK14 nesse processo, onde confirmou a necessidade dessas duas proteínas no processo de autofagia.

X. Grupo 10

As proteínas Laminas nucleares são proteínas fibrosas que possuem função estrutural assim como transcricional regulando o núcleo da célula. Em conjunto com a membrana, têm a formação das chamadas Laminas Nucleares que se localizam no envelope nuclear. Essa proteína foi estudada em neutrófilos, onde duas frentes de pesquisas foram feitas. A primeira relacionou a ação de Laminas em neutrófilos em apoptose onde é caracterizado pela condensação da cromatina na periferia nuclear, fragmentação do DNA e clivagem da Lamina por caspases. Essas células apresentaram a exposição de cromatina e de Lamina nuclear na superfície da célula de forma dependente de caspases e um acúmulo de proteínas nucleares no interior da célula, sendo que em condições normais essas células são fagocitadas. Algumas doenças autoimunes (como lupus eritematoso sistêmico e esclerose múltipla) são oriundas de uma falha nessa fagocitose e são gerados auto anticorpos contra as proteínas nucleares (KLEIN; LUTZ-MEINDL; KERSCHBAUM, 2014). A segunda frente de pesquisa foi associar a presença de Lamina B à formação de núcleos multilobulados em neutrófilos, característica essa observada principalmente na doença de Pelgel Hues no qual os neutrófilos dos pacientes não possuem multilobulos devido à diminuição de Lamina B (HOFFMANN et al., 2002; ROWAT et al., 2013).

As células eucarióticas mantêm o seu DNA e as histonas de forma altamente organizada no núcleo formando os nucleossomas. As histonas são classificadas de

acordo com a localização celular: sendo as nucleares (H2A, H2B, H3 e H4) e vinculadas (H4 e H5). Estruturalmente todas as histonas compartilham um motivo estrutural comum que consiste de uma hélice central longa franqueada por um motivo hélice-hélice de cadeia simples em cada extremidade. Possuem uma cauda N-terminal rica em lisina e arginina e resíduos que se estendem para a fora do núcleo, caracterizando uma região altamente flexível e que sofrem muitas modificações pós traducionais como acetilação, fosforilação, ubiquitinação, metilação, sumoilação e ribosilação. Essa região é responsável por desempenhar um papel central na regulação da transcrição, reparo do DNA, replicação do DNA e estabilidade cromossômica (Ramanjaneyulu Allam, 2014). A histona nuclear H2B é essa parte que sobressai do nucleossoma e tem acesso ao meio extra nuclear que são os pontos de regulação das histonas durante a replicação de gene (DHAENENS et al., 2014).

As proteínas relacionadas a mudanças da estrutura do núcleo, como Lamina B1 e B2 e as histonas H2A, tiveram suas abundâncias diminuídas podendo ser justificada em dois pontos: o primeiro é que como os níveis de Lamina são observados em células em processo de apoptose (dependentes de caspase) os neutrófilos estimulados ainda não estão em apoptose e conseqüentemente não tem uma abundância aumentada para tal função. Segundo é que as células não foram ativadas a ponto de aumentar o processo de síntese de proteínas e de histonas H2A.

XI. Grupo 11

Uma proteína envolvida na via da remodelação do PAF foi identificada, chamada LPCAT2 (Lysophosphatidylcholine Acyltransferase 2), também conhecida como PAFAT/LPCAT2. Essa enzima possui uma atividade tanto de aciltransferase quanto de acetiltransferase dependente de cálcio, que catalisa a síntese de PAF tanto a partir de Liso-PAF quanto a partir de glicerofosfolipídeos de membrana. Em inflamações agudas foi observada somente a atividade da acetiltransferase, mas o mecanismo de escolha entre as duas atividades (acetiltransferase e aciltransferase) ainda é desconhecido. Em células ativadas o sentido da reação enzimática é para a produção de PAF a partir de liso-PAF ou até mesmo dos glicerofosfolipídeos de membrana. Quando as células estão em repouso o sentido preferencial é para a produção de

Fosfatidilcolina (PC) a partir de liso-PAF ou para a produção de lipídeos de membrana (glicerofosfolipídeos) (SHINDOU et al., 2007; TARUI et al., 2014). Outra proteína relacionada ao PAF foi identificada, a PAFAH1B1 (Platelet Activating Factor Acetylhydrolase 1B subunit 1). Ela faz parte de um sistema enzimático composto pelas subunidades α (PAFH1B1), β (PAFH1B2) e γ (PAFH1B3). A subunidade α catalisa a remoção do grupo acetato da cadeia lateral R2 do PAF formando Liso-PAF e ácido acético. Essa é uma reação de degradação do PAF e formação de fosfolipídeos de membrana como por exemplo a fosfatidilcolina. Foi relatado que essa mesma subunidade α é necessária para a ativação das GTPases Rho e polimerização da actina na migração celular (MCMANUS, L. F., 2000).

A análise de proteínas com abundância diminuída revelou a redução das vias de obtenção de energia convencionais como glicólise, ciclo do ácido cítrico e fosforilação oxidativa, assim como da síntese de fenilalanina e alanina. Essa diminuição pode estar relacionada ao controle da produção de ATP a nível estimulatório onde a abundância de proteínas talvez esteja relacionada a demanda de produção de ATP e controle do sistema energético.

Outro aspecto importante a ser citado é a diminuição de proteínas envolvidas no sistema endossomal (ativado quando os neutrófilos fazem fagocitose, realizando o transporte e digestão de partículas ou macromoléculas para o lisossomo), de algumas proteínas essenciais durante a formação do núcleo e grânulos (na diferenciação celular), de proteínas relacionadas ao processo de síntese de proteínas (aumentada quando as células estão ativadas) e de proteases que geralmente estão associadas a doenças como SARA, DPOC e artrite reumatoide. As diminuições desses conjuntos de proteínas são caracterizadas pelos neutrófilos maduros (que tem uma diminuição de proteínas responsáveis pela formação e amadurecimento celular) e por neutrófilos estimulados.

Dentre as proteínas com abundância diferencial, destacamos 67 enzimas reguladas (tabela 13) que foram classificadas como: oxidoredutases (11 proteínas), transferases (20 proteínas), hidrolases (27 proteínas), liases (1 proteínas), isomerases (4 proteínas) e ligases (4 proteínas).

n° acesso	E.C	Abundância	p-value	Descrição
Oxidoreduktases				
O75874	1.1.1.42	diminuída	0,011271	Isocitrate dehydrogenase [NADP] cytoplasmic
O95571	1.13.11.18	diminuída	0,000835	Persulfide dioxygenase ETHE1, mitochondrial
P00387	1.6.2.2	diminuída	0,004169	NADH-cytochrome b5 reductase 3 isoform 1
P05091	1.2.1.3	diminuída	0,009284	aldehyde dehydrogenase, mitochondrial isoform 1 precursor
P09417	1.5.1.34	diminuída	0,012034	dihydropteridine reductase
P21912	1.3.5.1	diminuída	0,032513	succinate dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur subunit, mitochondrial precursor
P30043	1.5.1.30	diminuída	0,010852	flavin reductase (NADPH)
P30043	1.3.1.24	aumentada	0,010852	flavin reductase (NADPH)
Q7Z4W1	1.1.1.10	diminuída	0,011458	L-xylulose reductase isoform 1
Q9BUP3	1.1.1.-	diminuída	0,004695	oxidoreductase HTATIP2 isoform b
Q9Y394	1.1.-.-	diminuída	0,010773	dehydrogenase/reductase SDR family member 7 precursor
Transferases				
O75390	2.3.3.1	diminuída	0,031051	citrate synthase, mitochondrial precursor
O94768	2.7.11.1	diminuída	0,022601	Serine/threonine-protein kinase 17B
P04844	2.4.99.18	aumentada	0,031868	dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit 2 isoform 1 precursor
P11908	2.7.6.1	diminuída	0,003986	ribose-phosphate pyrophosphokinase 2 isoform 2
P22392	2.7.4.6	diminuída	0,011188	nucleoside diphosphate kinase B isoform a
P22392	2.7.13.3	aumentada	0,011188	nucleoside diphosphate kinase B isoform a

P28482	2.7.11.24	diminuída	0,027323	mitogen-activated protein kinase 1
P51812	2.7.11.1	aumentada	0,039166	Ribosomal protein S6 kinase alpha-3
P52789	2.7.1.1	diminuída	0,008023	Hexokinase-2
Q02750	2.7.12.2	diminuída	0,006031	Dual specificity mitogen-activated protein kinase kinase 1
Q14289	2.7.10.2	diminuída	0,017384	protein-tyrosine kinase 2-beta isoform a
Q15418	2.7.11.1	diminuída	0,022585	ribosomal protein S6 kinase alpha-1 isoform a
Q16539	2.7.11.24	diminuída	0,029644	mitogen-activated protein kinase 14 isoform 2
Q5S007	2.7.11.1	aumentada	0,023543	Leucine-rich repeat serine/threonine-protein kinase 2
Q7L5N7	2.3.1.23	diminuída	0,003356	Lysophosphatidylcholine acyltransferase 2
Q7L5N7	2.3.1.51	diminuída	0,003356	Lysophosphatidylcholine acyltransferase 2
Q7L5N7	2.3.1.67	diminuída	0,003356	Lysophosphatidylcholine acyltransferase 2
Q9H2K8	2.7.11.1	diminuída	0,034546	Serine/threonine-protein kinase TAO3
Q9NR45	2.5.1.56	diminuída	0,017263	sialic acid synthase
Q9NR45	2.5.1.57	diminuída	0,017263	sialic acid synthase
Hidrolases				
O43143	3.6.4.13	diminuída	0,042923	Putative pre-mRNA-splicing factor ATP-dependent RNA helicase DHX15
O43865	3.3.1.1	diminuída	0,012442	putative adenosylhomocysteinase 2 isoform a
O75688	3.1.3.16	diminuída	0,017692	protein phosphatase 1B isoform 1
O95498	3.5.1.92	diminuída	0,012339	Vascular non-inflammatory molecule 2
O95989	3.6.1.52	diminuída	0,013578	Diphosphoinositol polyphosphate phosphohydrolase 1
O95989	3.6.1.-	diminuída	0,013578	Diphosphoinositol polyphosphate phosphohydrolase 1

P06280	3.2.1.22	aumentada	0,049504	alpha-galactosidase A precursor
P07339	3.4.23.5	aumentada	0,047059	cathepsin D preproprotein
P08246	3.4.21.37	diminuída	0,013289	neutrophil elastase preproprotein
P10619	3.4.16.5	diminuída	0,046927	lysosomal protective protein isoform b precursor
P16930	3.7.1.2	diminuída	0,006909	Fumarylacetoacetase
P24158	3.4.21.76	diminuída	0,01916	myeloblastin precursor
P25787	3.4.25.1	aumentada	0,012296	Proteasome subunit alpha type-2
P35030	3.4.21.4	diminuída	0,032508	Trypsin-3
P35573	3.2.1.33	diminuída	0,006924	glycogen debranching enzyme isoform 1
P35573	3.2.1.33	diminuída	0,006924	glycogen debranching enzyme isoform 1
P45974	3.4.19.12	aumentada	0,030411	ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 5 isoform 1
P52888	3.4.24.15	diminuída	0,046211	thimet oligopeptidase
P53634	3.4.14.1	diminuída	0,004912	Dipeptidyl peptidase 1
P62140	3.1.3.53	aumentada	0,025507	serine/threonine-protein phosphatase PP1-beta catalytic subunit isoform 1
P62140	3.1.3.16	aumentada	0,025507	serine/threonine-protein phosphatase PP1-beta catalytic subunit isoform 1
P81605	3.4.-.-	diminuída	0,033858	dermcidin isoform 1 preproprotein
Q01432	3.5.4.6	diminuída	0,011478	AMP deaminase 3 isoform 1B
Q13231	3.2.1.14	diminuída	0,015199	chitotriosidase-1 isoform 1 precursor
Q13867	3.4.22.40	diminuída	0,016016	bleomycin hydrolase
Q6GMV3	3.1.1.29	diminuída	0,004593	Putative peptidyl-tRNA hydrolase PTRHD1
Q96C86	3.6.1.59	diminuída	0,042841	M7GpppX diphosphatase
Liases				
Q9Y315	4.1.2.4	diminuída	0,023855	deoxyribose-phosphate aldolase isoform 1
Isomerases				
P11387	5.99.1.2	diminuída	0,013398	DNA topoisomerase 1
Q13011	5.3.3.-	diminuída	0,023492	delta(3,5)-Delta(2,4)-dienoyl-CoA

				isomerase, mitochondrial precursor
Q15084	5.3.4.1	diminuída	0,036405	protein disulfide-isomerase A6 isoform d precursor
Q15185	5.3.99.3	aumentada	0,039912	prostaglandin E synthase 3 isoform a
Ligases				
P49588	6.1.1.7	diminuída	0,011317	Alanine--tRNA ligase, cytoplasmic
Q6XQN6	6.3.4.21	diminuída	0,015152	nicotinate phosphoribosyltransferase isoform 1
Q9NSD9	6.1.1.20	diminuída	0,029273	Phenylalanine--tRNA ligase beta subunit
Q9Y285	6.1.1.20	diminuída	0,026421	Phenylalanine--tRNA ligase alpha subunit

Tabela 13. Enzimas reguladas (67 enzimas)

Observamos no figura 44 que em neutrófilos estimulados por PAF, uma grande parte das enzimas com abundância aumentada (em azul) são as hidrolases, seguidos das transferases e isomerases. Para as enzimas com abundância diminuída (em vermelho) a grande maioria são as hidrolases, transferases e isomerases. As enzimas atuam em todos os processos biológicos celulares, desde a obtenção de energia (hidrolases e oxidoreduases) a regulação da síntese de intermediários essenciais (transferases e isomerases). O controle dessas enzimas no estímulo de neutrófilos por PAF revelou uma mudança discreta (maior quantidade de enzimas que diminuíram a abundância) nas atividades de forma geral quando comparado às características de neutrófilos ativados (como por exemplo a cascata das MAPK, a síntese e degradação de PAF, funcionamento das subunidades dos proteassomas e ativação do sistema ATPase).

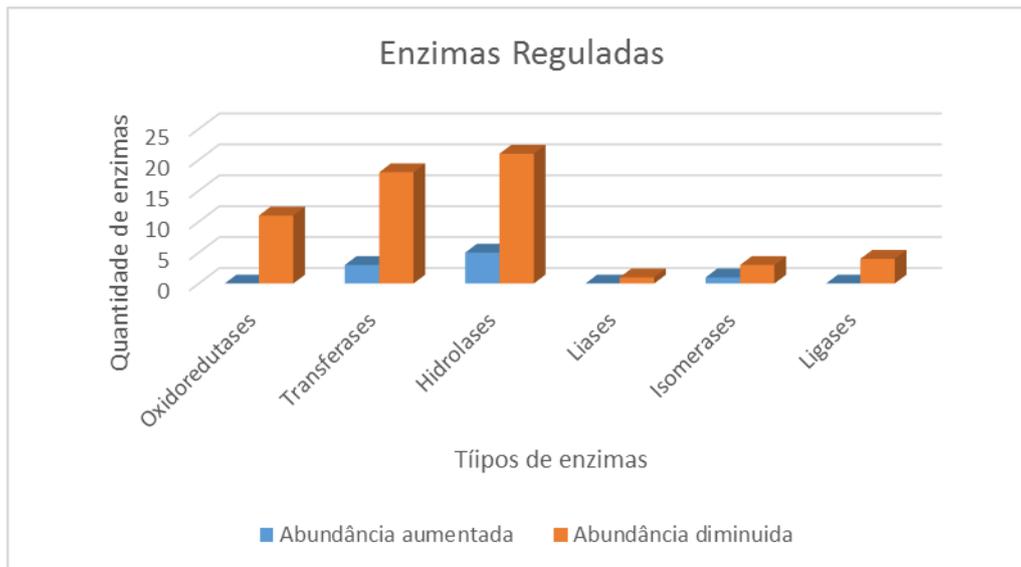


Figura 44. Enzimas reguladas. Proteínas com abundância aumentada (em azul) e abundância diminuída (em vermelho).

5.3.6. Acetiloma de neutrófilos estimulados com PAF

A acetilação de lisinas tem sido estudada como ponto importante para entender o funcionamento de processos biológicos essenciais como ativação de fatores de transcrição e liberação de diversos efetores responsáveis pela motilidade celular, metabolismo energético, endocitose, autofagia, regulação do processo de ativação do proteossoma, controle de atividades proteolíticas, sinalização de membrana plasmática entre outros (SADOUL et al., 2008; YANG; SETO, 2008).

A acetilação das proteínas ocorre de duas formas: acetilação de N-terminal (que frequentemente é observada) e acetilação de grupos ε-amino de lisinas (menos encontradas) (ITO, 2007). A acetilação de lisinas foi pesquisada neste trabalho identificando 340 proteínas acetiladas (tabela em anexo), sendo algumas encontradas dentre as proteínas com abundância diferencial (Tabela 14).

Número de acesso	Nome da proteína
P60709	Actin, cytoplasmic 1
P62328	Thymosin beta-4
P05109	Protein S100-A8
P08758	annexin A5
P20700	lamin-B1 isoform 1

O15144	Actin-related protein 2/3 complex subunit 2
P61020	ras-related protein Rab-5B isoform 1
P61978	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K isoform b
P07108	acyl-CoA-binding protein isoform 3
Q9Y2S6	Translation machinery-associated protein 7
P0C0S5	Histone H2A.Z
Q99729	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B
P81605	dermcidin isoform 1 preproprotein
O75695	Protein XRP2
Q9UBW5	Bridging integrator 2
O00602	ficolin-1 precursor
O75390	citrate synthase, mitochondrial precursor
Q92608	Dedicator of cytokinesis protein 2
Q14116	Interleukin-18 isoform 1 proprotein
Q7L1Q6	basic leucine zipper and W2 domain-containing protein 1 isoform 1
O95498	Vascular non-inflammatory molecule 2
P20061	transcobalamin-1 precursor
Q9NP79	vacuolar protein sorting-associated protein VTA1 homolog isoform a

Tabela 14. Proteínas reguladas acetiladas. Proteína com abundância aumentada (em vermelho) e Proteínas com abundância diminuída (em azul).

A acetilação dessas proteínas torna-se um ponto importante para descobrir o funcionamento dos neutrófilos estimulados pelo PAF, pois é uma modificação pós traducional que regula processos fundamentais na tradução, na formação estrutural do núcleo multilobulado dos neutrófilos, no transporte de vitamina B12, assim como em pontos de regulação na síntese de ATP e de subunidades de ATPases, entre outros.

Na figura abaixo observamos que dentre as 3126 proteínas não enriquecidas identificadas (em vermelho), somente 173 tiveram a abundância diferencial (em amarelo), sendo que dessas 23 proteínas estão acetiladas (tabela 14). Das 340 proteínas acetiladas (em azul) temos 22 com abundância diminuída (em roxo) e 1 com abundância aumentada (em cinza).

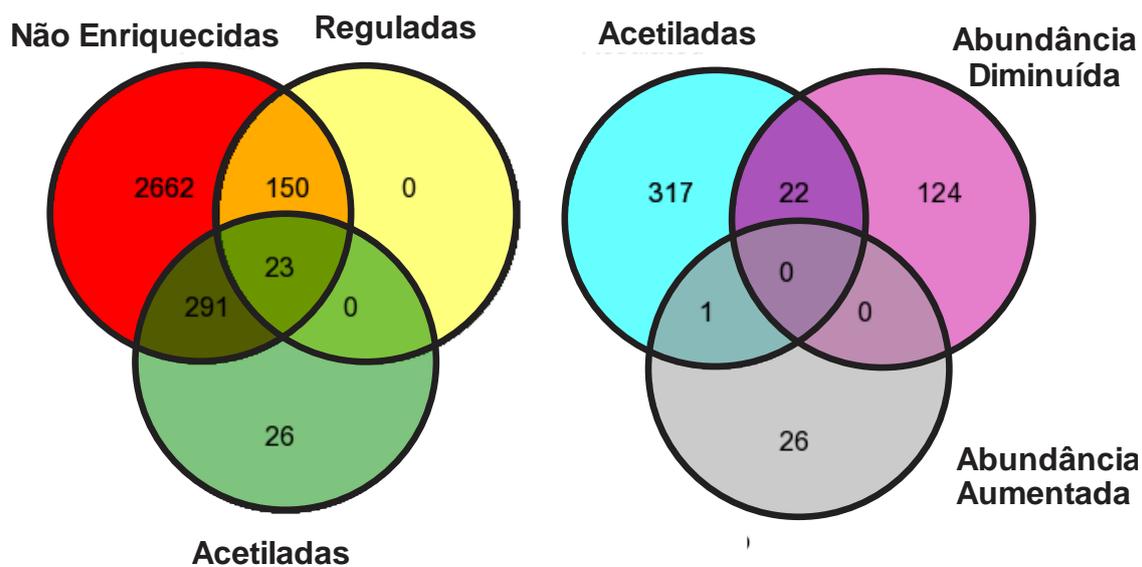


Figura 45. Visão geral das identificações. Frações não enriquecidas (em vermelho), Proteínas reguladas (em amarelo) e Proteína acetiladas (340).

Para entender melhor como a acetilação de lisinas irá regular o processo inflamatório mediado por neutrófilos estimulados pelo PAF, será necessário a pesquisa da localização dos sítios de acetilação de cada proteína envolvida nesses processos e qual a função que ela regula. Esse trabalho será realizado posteriormente.

VI. CONCLUSÕES

Os neutrófilos são células do sistema imune que representam a primeira linha de defesa contra microrganismos invasores, possuindo uma maquinaria intracelular coordenada e altamente complexa envolvendo ativação de sistemas essenciais como o complexo NADPH oxidase (geração de espécies reativas de oxigênio), formação de endossomas a partir de moléculas endocitadas, amadurecimento dos grânulos e vesículas com o aumento da acidez interna (funcionamento de ATPases), reorganização do citoesqueleto, produção de prostaglandinas e leucotrienos, entre outros.

O processo de estímulo celular mostrou que parte das proteínas ribossomais, proteossomais e da ATPase tiveram subunidades com abundância regulada. As atividades associadas a esses processos em neutrófilos estimulados pelo PAF caracterizaram seu perfil de estímulo nesses complexos. A hipótese levantada com a caracterização desse perfil é que os neutrófilos ativam parte dos processos que regulam a síntese de proteínas e iniciam a acidificação de grânulos e vesículas pela ativação parcial de ATPases. Esses mecanismos se tornam pontos centrais para entender o funcionamento da célula em processo de estimulação dos neutrófilos por PAF.

Outra hipótese deste trabalho é que o PAF seja um fator estimulante e não ativador, sendo esperado que os neutrófilos estejam em uma fase pré-ativa com o funcionamento parcial de algumas vias de sinalização e modificação da estrutura com o rearranjo do citoesqueleto. Como o PAF é produzido por muitas células, em um menor sinal de injúria ou invasão por patógeno, os neutrófilos circulantes no sangue são estimulados e preparados para uma segunda ativação, seja ela por bactérias ou por citocinas pró-inflamatórias mais potentes.

A identificação de proteínas com abundância diferencial nos mostrou um perfil característico de neutrófilos estimulados pelo PAF, porém não mostrou como essas proteínas se comportam e se estão ativadas ou não. O estudo das modificações pós traducionais (acetilação, fosforilação e glicosilação) nos ajudará a entender melhor esses mecanismos identificados nesse trabalho.

Com o perfil proteico caracterizado nesse trabalho e com as identificações das proteínas com modificações pós traducionais (acetilação, fosforilação e glicosilação),

esperamos propor algumas vias de sinalizações de neutrófilos estimulados pelo PAF e indicar possíveis alvos terapêuticos e/ou diagnósticos para algumas doenças como a Artrite Reumatóide, Síndrome da Dificuldade Respiratória do Adulto, Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica, Doença Granulomatosa Crônica e outras doenças auto-imunes.

A análise da morfologia dos neutrófilos pela Microscopia Eletrônica de Varredura caracterizou e distinguiu as diferenças entre neutrófilos quiescentes e neutrófilos estimulados pelo PAF, confirmadas nas replicatas técnicas e biológicas. A presença de modificações na superfície dessas células possibilitou a confirmação dessa ativação por meio do aparecimento de citonemas ou extensões tubulovesiculares que são observadas quando a célula está em processo de migração e fagocitose. Outro ponto foi a reestruturação das fibras de actina com modificações no citoesqueleto e morfologia celular com espalhamento da superfície, assim como pela formação das chamadas zeioses ou bolhas cogitando-se ser proveniente do processo de desgranulação após o processo de ativação do Complexo NADPH Oxidase. Outro achado interessante, ainda não descoberto em neutrófilos estimulados com PAF, foram possíveis NETs. Apareceram ao longo de algumas imagens e em específico ao redor de algumas neutrófilos como mostrado nesse trabalho. Mas esse é um achado que requer um estudo mais minucioso e a confirmação da localização do DNA, por meio de outras técnicas paralelas ao MEV como por exemplo a microscopia confocal. Mas fica uma pergunta interessante que envolve o estudo dessa descoberta de NETs em neutrófilos estimulados com PAF associados a proteômica. Se neutrófilos estimulados com o Fator de Agregação Plaquetária (PAF) formam "*Neutrophil Extracellular Traps*" quais seriam os mecanismos (via de sinalização) utilizados pelos neutrófilos nessa condição? Sabendo que a ruptura dos neutrófilos, assim como a formação de NETs causariam injúria tecidual, qual seria a melhor estratégia proteômica associada à farmacêutica para evitar a formação dessas NETs em casos como DGC (Doença Granulomatosa Crônica), SRIS (Síndrome de Resposta Inflamatória Sistêmica) e SARA (Síndrome da Angústia Respiratória Aguda)?

VII. PERSPECTIVAS

Em relação ao desenvolvimento de trabalhos futuros, temos duas metas principais:

Primeira: fazer ensaios que confirmem as modificações morfológicas observadas na microscopia eletrônica de varredura (NETs e glicocalice).

Segunda: fazer a análise comparativa das modificações pós traducionais (acetilações, fosforilações e glicosilações) de neutrófilos quiescentes e neutrófilos estimulados pelo PAF, indentificando os sítios de cada modificação e sua influência nas vias intracelulares.

Esses dados vão colaborar para o melhor entendimento do funcionamento dos neutrófilos estimulados pelo PAF em diversas doenças auto-imunes e inflamatórias, proporcionando o indicativo de possíveis alvos proteômicos terapêuticos nessas doenças.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K. **Imunologia Celular e Molecular**. Elsevier, 2005.

AKGUL, C.; MOULDING, D. A.; EDWARDS, S. W. Molecular control of neutrophil apoptosis. **FEBS Lett**, v. 487, n. 3, p. 318-22, Jan 5 2001.

AMANSO, A. M. **Papel da degradação de proteínas dependente do ER via proteassoma nos mecanismos iniciais de ativação da NADPH oxidase: interação com a dissulfeto isomerase proteica**. 2009. Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo

AQUINO, E. N. **Análise proteômica comparativa entre neutrófilos quiescentes e estimulados com fator de agregação plaquetário (PAF)** 2008. Departamento de Patologia Molecular, Universidade de Brasília, Brasília.

_____. **Estudo comparativo de neutrófilos estimulados e ativados *in vitro***. 2012. Departamento de Patologia Molecular, Universidade de Brasília, Brasília.

BABIOR, B. M. NADPH oxidase: an update. **Blood**, v. 93, n. 5, p. 1464-76, Mar 1 1999.

BADHAI, J. et al. Ribosomal protein S19 and S24 insufficiency cause distinct cell cycle defects in Diamond-Blackfan anemia. **Biochim Biophys Acta**, v. 1792, n. 10, p. 1036-42, Oct 2009.

BAJOREK, M. et al. Biochemical analyses of human IST1 and its function in cytokinesis. **Mol Biol Cell**, v. 20, n. 5, p. 1360-73, Mar 2009.

BEATRIX, B.; SAKAI, H.; WIEDMANN, M. The alpha and beta subunit of the nascent polypeptide-associated complex have distinct functions. **J Biol Chem**, v. 275, n. 48, p. 37838-45, Dec 1 2000.

BENVENISTE, J.; HENSON, P. M.; COCHRANE, C. G. Leukocyte-dependent histamine release from rabbit platelets. The role of IgE, basophils, and a platelet-activating factor. **J Exp Med**, v. 136, n. 6, p. 1356-77, Dec 1 1972.

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

BOVIA, F. et al. The SRP9/14 subunit of the human signal recognition particle binds to a variety of Alu-like RNAs and with higher affinity than its mouse homolog. **Nucleic Acids Res**, v. 25, n. 2, p. 318-26, Jan 15 1997.

BRINKMANN, V.; ZYCHLINSKY, A. Beneficial suicide: why neutrophils die to make NETs. **Nat Rev Microbiol**, v. 5, n. 8, p. 577-82, Aug 2007.

BRYAN, N.; RAISCH, K. P. Identification of a Mitochondrial-Binding Site on the Amino-Terminal End of Hexokinase II. **Biosci Rep**, Apr 24 2015.

CAO, S. et al. Molecular cloning of the duck mitogen-activated protein kinase 1 (MAPK1) gene and the development of a quantitative real-time PCR assay to detect its expression. **Poult Sci**, v. 93, n. 9, p. 2158-67, Sep 2014.

CASSATELLA, M. A. Neutrophil-derived proteins: selling cytokines by the pound. **Adv Immunol**, v. 73, p. 369-509, 1999.

CASSATELLA, M. A. **Neutrophil: An emerging regulator of inflammatory and immune response**. Karger, 2003.

CHEN, L. W.; LIN, M. W.; HSU, C. M. 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**, v. 12, n. 2, p. 311-9, 2005.

CHOESMEL, V. et al. Mutation of ribosomal protein RPS24 in Diamond-Blackfan anemia results in a ribosome biogenesis disorder. **Hum Mol Genet**, v. 17, n. 9, p. 1253-63, May 1 2008.

CORRIDEN, R. et al. Kinetic analysis of antagonist-occupied adenosine-A3 receptors within membrane microdomains of individual cells provides evidence of receptor dimerization and allostery. **FASEB J**, v. 28, n. 10, p. 4211-22, Oct 2014.

CRIMAUDO, C. et al. Human ribophorins I and II: the primary structure and membrane topology of two highly conserved rough endoplasmic reticulum-specific glycoproteins. **EMBO J**, v. 6, n. 1, p. 75-82, Jan 1987.

DAHLGREN, C.; KARLSSON, A. Respiratory burst in human neutrophils. **J Immunol Methods**, v. 232, n. 1-2, p. 3-14, Dec 17 1999.

DAVIES, M. G. An investigation of hydrolytic techniques for the amino acid analysis of foodstuffs. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 24, 1973.

DE CASTRO BRAS, L. E. et al. Citrate synthase is a novel in vivo matrix metalloproteinase-9 substrate that regulates mitochondrial function in the postmyocardial infarction left ventricle. **Antioxid Redox Signal**, v. 21, n. 14, p. 1974-85, Nov 10 2014.

DEDAVID, B. A. **Microscopia Eletrônica de Varredura_Aplicação e preparação de amostras**. Rio Grande do Sul, Brazil: Centro de Microscopia Eletrônica e Microanálise do IDEIA-PUC 2007.

DEWITT, S.; HALLETT, M. Leukocyte membrane "expansion": a central mechanism for leukocyte extravasation. **J Leukoc Biol**, v. 81, n. 5, p. 1160-4, May 2007.

DHAENENS, M. et al. Neutrophil Elastase in the capacity of the "H2A-specific protease". **Int J Biochem Cell Biol**, v. 51, p. 39-44, Jun 2014.

DIACOVICH, L.; GORVEL, J. P. Bacterial manipulation of innate immunity to promote infection. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 2, p. 117-128, Feb 2010.

ERLANDSEN, S. L.; HASSLEN, S. R.; NELSON, R. D. Detection and spatial distribution of the beta 2 integrin (Mac-1) and L-selectin (LECAM-1) adherence receptors on human neutrophils by high-resolution field emission SEM. **J Histochem Cytochem**, v. 41, n. 3, p. 327-33, Mar 1993.

EYRICH, B.; SICKMANN, A.; ZAHEDI, R. P. Catch me if you can: mass spectrometry-based phosphoproteomics and quantification strategies. **Proteomics**, v. 11, n. 4, p. 554-70, Feb 2011.

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

FAZAL, N. et al. Lyn- and ERK-mediated vs. Ca²⁺-mediated neutrophil O responses with thermal injury. **Am J Physiol Cell Physiol**, v. 283, n. 5, p. C1469-79, Nov 2002.

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

FERREIRA, M. A. **Avaliação da angiogênese inflamação e crescimento tumoral em camundongos com deleção gênica dos receptores para o PAF**. 2006. Departamento de Fisiologia e Biofísica, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil.

FESSEL, M. R. et al. A partially purified putative iron P type-ATPase mediates Fe³⁺-transport into proteoliposome. **Arch Biochem Biophys**, v. 458, n. 2, p. 229-35, Feb 15 2007.

FLANNAGAN, R. S.; COSIO, G.; GRINSTEIN, S. Antimicrobial mechanisms of phagocytes and bacterial evasion strategies. **Nat Rev Microbiol**, v. 7, n. 5, p. 355-66, May 2009.

FRASCH, S. C. et al. Lysophospholipids of different classes mobilize neutrophil secretory vesicles and induce redundant signaling through G2A. **J Immunol**, v. 178, n. 10, p. 6540-8, May 15 2007.

FRESU, M. et al. Cell-cycle-dependent association of protein phosphatase 1 and focal adhesion kinase. **Biochem J**, v. 358, n. Pt 2, p. 407-14, Sep 1 2001.

GABRILOVICH, D. I. **The neutrophils new outlook for old cells**. Imperial College Press, 2005.

GALKINA, S. I. et al. Microbial alkaloid staurosporine induces formation of nanometer-wide membrane tubular extensions (cytonemes, membrane tethers) in human neutrophils. **Cell Adh Migr**, v. 4, n. 1, p. 32-8, Jan-Mar 2010.

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**, v. 268, n. 1, p. 91-8, May 15 1990.

GILMAN-SACHS, A. et al. Expression and role of $\alpha 2$ vacuolar-ATPase ($\alpha 2V$) in trafficking of human neutrophil granules and exocytosis. **J Leukoc Biol**, v. 97, n. 6, p. 1121-31, Jun 2015.

GLENTHOJ, A. et al. Processing of Neutrophil alpha-Defensins Does Not Rely on Serine Proteases In Vivo. **PLoS One**, v. 10, n. 5, p. e0125483, 2015.

GRINNELL, F. Migration of human neutrophils in hydrated collagen lattices. **J Cell Sci**, v. 58, p. 95-108, Dec 1982.

HALLETT, M. B. Holding back neutrophil aggression; the oxidase has potential. **Clin Exp Immunol**, v. 132, n. 2, p. 181-4, May 2003.

HANDLEY, D. A. et al. Biological properties of the antagonist SRI 63-441 in the PAF and endotoxin models of hypotension in the rat and dog. **Immunopharmacology**, v. 13, n. 2, p. 125-32, Apr 1987.

HANES, J. et al. Characterization by cDNA cloning of the mRNA of human ribosomal protein L8. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 197, n. 3, p. 1223-8, Dec 30 1993.

HENSON, P. M.; LANDES, R. R. Activation of platelets by platelet activating factor (PAF) derived from IgE-sensitized basophils. IV. PAF does not activate platelet factor 3 (PF3). **Br J Haematol**, v. 34, n. 2, p. 269-82, Oct 1976.

HIRSCH, J. et al. Proteomics: current techniques and potential applications to lung disease. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, v. 287, n. 1, p. L1-23, Jul 2004.

HOFFMAN, G. G. et al. Complete coding sequence, intron/exon organization, and chromosomal location of the gene for the core I protein of human ubiquinol-cytochrome c reductase. **J Biol Chem**, v. 268, n. 28, p. 21113-9, Oct 5 1993.

HOFFMANN, K. et al. Mutations in the gene encoding the lamin B receptor produce an altered nuclear morphology in granulocytes (Pelger-Huet anomaly). **Nat Genet**, v. 31, n. 4, p. 410-4, Aug 2002.

HSU, M. J. et al. Signaling mechanisms of enhanced neutrophil phagocytosis and chemotaxis by the polysaccharide purified from *Ganoderma lucidum*. **Br J Pharmacol**, v. 139, n. 2, p. 289-98, May 2003.

HU, Y. et al. 90-kDa ribosomal S6 kinase is a direct target for the nuclear fibroblast growth factor receptor 1 (FGFR1): role in FGFR1 signaling. **J Biol Chem**, v. 279, n. 28, p. 29325-35, Jul 9 2004.

HUANG, J. B.; KINDZELSKII, A. L.; PETTY, H. R. Hexokinase translocation during neutrophil activation, chemotaxis, and phagocytosis: disruption by cytochalasin D, dexamethasone, and indomethacin. **Cell Immunol**, v. 218, n. 1-2, p. 95-106, Jul-Aug 2002.

HUANG, S.; MILLAR, A. H. Succinate dehydrogenase: the complex roles of a simple enzyme. **Curr Opin Plant Biol**, v. 16, n. 3, p. 344-9, Jun 2013.

HULTIN-ROSENBERG, L. et al. Defining, comparing, and improving iTRAQ quantification in mass spectrometry proteomics data. **Mol Cell Proteomics**, v. 12, n. 7, p. 2021-31, Jul 2013.

IACOBAZZI, D. et al. Protein Phosphatase 1 Beta is Modulated by Chronic Hypoxia and Involved in the Angiogenic Endothelial Cell Migration. **Cell Physiol Biochem**, v. 36, n. 1, p. 384-94, 2015.

ISHII, M. et al. CRTH2 is a critical regulator of neutrophil migration and resistance to polymicrobial sepsis. **J Immunol**, v. 188, n. 11, p. 5655-64, Jun 1 2012.

ITO, K. Impact of post-translational modifications of proteins on the inflammatory process. **Biochem Soc Trans**, v. 35, n. Pt 2, p. 281-3, Apr 2007.

JORDAN, P. A. et al. A role for the thiol isomerase protein ERP5 in platelet function. **Blood**, v. 105, n. 4, p. 1500-7, Feb 15 2005.

KAMPEN, A. H.; TOLLERSRUD, T.; LUND, A. Flow cytometric measurement of neutrophil respiratory burst in whole bovine blood using live *Staphylococcus aureus*. **J Immunol Methods**, v. 289, n. 1-2, p. 47-55, Jun 2004.

KHREISS, T. et al. Activation of extracellular signal-regulated kinase couples platelet-activating factor-induced adhesion and delayed apoptosis of human neutrophils. **Cell Signal**, v. 16, n. 7, p. 801-10, Jul 2004.

KITCHEN, E. et al. Demonstration of reversible priming of human neutrophils using platelet-activating factor. **Blood**, v. 88, n. 11, p. 4330-7, Dec 1 1996.

KLEIN, B.; LUTZ-MEINDL, U.; KERSCHBAUM, H. H. From the nucleus to the plasma membrane: translocation of the nuclear proteins histone H3 and lamin B1 in apoptotic microglia. **Apoptosis**, v. 19, n. 5, p. 759-75, May 2014.

KLOETZEL, P. M. Antigen processing by the proteasome. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 2, n. 3, p. 179-87, Mar 2001.

KOBAYASHI, S. D.; VOYICH, J. M.; DELEO, F. R. Regulation of the neutrophil-mediated inflammatory response to infection. **Microbes Infect**, v. 5, n. 14, p. 1337-44, Nov 2003.

KOLACZKOWSKA, E.; KUBES, P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. **Nat Rev Immunol**, v. 13, n. 3, p. 159-75, Mar 2013.

KORKMAZ, B. Neutrophil Elastase, proteinase 3 and cathepsin G as Therapeutic targets in human diseases. **Pharmacological Reviews**, 2010.

KORRODI-GREGORIO, L. et al. TGF-beta cascade regulation by PPP1 and its interactors -impact on prostate cancer development and therapy. **J Cell Mol Med**, v. 18, n. 4, p. 555-67, Apr 2014.

KUIJPERS, T. W. Neutrophils. **ENCYCLOPEDIA OF LIFE SCIENCES/Nature Publishing Group**, 2001.

KUWAHARA, H. et al. The apoptosis-inducing protein kinase DRAK2 is inhibited in a calcium-dependent manner by the calcium-binding protein CHP. **J Biochem**, v. 134, n. 2, p. 245-50, Aug 2003.

LEE, W. L.; HARRISON, R. E.; GRINSTEIN, S. Phagocytosis by neutrophils. **Microbes Infect**, v. 5, n. 14, p. 1299-306, Nov 2003.

LEON, I. R. et al. Quantitative assessment of in-solution digestion efficiency identifies optimal protocols for unbiased protein analysis. **Mol Cell Proteomics**, v. 12, n. 10, p. 2992-3005, Oct 2013.

LEV, S. et al. Protein tyrosine kinase PYK2 involved in Ca²⁺-induced regulation of ion channel and MAP kinase functions. **Nature**, v. 376, n. 6543, p. 737-45, Aug 31 1995.

LIAN, Z. et al. Human S15a expression is upregulated by hepatitis B virus X protein. **Mol Carcinog**, v. 40, n. 1, p. 34-46, May 2004.

LIGETI, E.; MOCSAI, A. Exocytosis of neutrophil granulocytes. **Biochem Pharmacol**, v. 57, n. 11, p. 1209-14, Jun 1 1999.

LIMA, R. R. **Inflamação em doenças neurodegenerativas**. Revista Paranaense de Medicina. Paraná, Brazil. 21 2007.

LORANT, D. E. et al. Inflammatory roles of P-selectin. **J Clin Invest**, v. 92, n. 2, p. 559-70, Aug 1993.

MARTINELLI, R. et al. Release of cellular tension signals self-restorative ventral lamellipodia to heal barrier micro-wounds. **J Cell Biol**, v. 201, n. 3, p. 449-65, Apr 29 2013.

MAYADAS, T. N.; CULLERE, X. Neutrophil beta2 integrins: moderators of life or death decisions. **Trends Immunol**, v. 26, n. 7, p. 388-95, Jul 2005.

MAYEUR, G. L. et al. Characterization of eIF3k: a newly discovered subunit of mammalian translation initiation factor eIF3. **Eur J Biochem**, v. 270, n. 20, p. 4133-9, Oct 2003.

MCDONALD, B.; KUBES, P. Interactions between CD44 and Hyaluronan in Leukocyte Trafficking. **Front Immunol**, v. 6, p. 68, 2015.

MCMANUS, L. F. Questions and answers about organ and tissue donation. **J S C Med Assoc**, v. 96, n. 3, p. 118-24, Mar 2000.

MCMANUS, L. M.; PINCKARD, R. N. PAF, a putative mediator of oral inflammation. **Crit Rev Oral Biol Med**, v. 11, n. 2, p. 240-58, 2000.

MCMEEKIN, S. R. et al. E-selectin permits communication between PAF receptors and TRPC channels in human neutrophils. **Blood**, v. 107, n. 12, p. 4938-45, Jun 15 2006.

MCNULTY, D. E.; ANNAN, R. S. Hydrophilic interaction chromatography reduces the complexity of the phosphoproteome and improves global phosphopeptide isolation and detection. **Mol Cell Proteomics**, v. 7, n. 5, p. 971-80, May 2008.

MELO-BRAGA, M. N. et al. Comprehensive quantitative comparison of the membrane proteome, phosphoproteome, and sialome of human embryonic and neural stem cells. **Mol Cell Proteomics**, v. 13, n. 1, p. 311-28, Jan 2014.

MERTINS, P. et al. Integrated proteomic analysis of post-translational modifications by serial enrichment. **Nat Methods**, v. 10, n. 7, p. 634-7, Jul 2013.

MICHAEL, W. M.; DREYFUSS, G. Distinct domains in ribosomal protein L5 mediate 5 S rRNA binding and nucleolar localization. **J Biol Chem**, v. 271, n. 19, p. 11571-4, May 10 1996.

MIOTLA, J. M.; JEFFERY, P. K.; HELLEWELL, P. G. Platelet-activating factor plays a pivotal role in the induction of experimental lung injury. **Am J Respir Cell Mol Biol**, v. 18, n. 2, p. 197-204, Feb 1998.

MITCHELL, G. K. et al. Multidisciplinary care planning in the primary care management of completed stroke: a systematic review. **BMC Fam Pract**, v. 9, p. 44, 2008.

MONTRUCCHIO, G.; ALLOATTI, G.; CAMUSSI, G. Role of platelet-activating factor in cardiovascular pathophysiology. **Physiol Rev**, v. 80, n. 4, p. 1669-99, Oct 2000.

MORENO, S. E. et al. Signaling via platelet-activating factor receptors accounts for the impairment of neutrophil migration in polymicrobial sepsis. **J Immunol**, v. 177, n. 2, p. 1264-71, Jul 15 2006.

NETTO, F. A. **Apoptosis, neutrophils and the surgeon**. Revista Colegio Brasileiro de Cirurgiões. Brazil. 28 2001.

NEVES, A. C. D. **Análise proteômica comparativa entre neutrófilos quiescentes e neutrófilos ativados por N-formil-metionil-leucil-fenilalanina (fMLP)**. 2010. Departamento de Patologia Molecular, Universidade de Brasília, Brasília.

NICK, J. A. et al. Common and distinct intracellular signaling pathways in human neutrophils utilized by platelet activating factor and FMLP. **J Clin Invest**, v. 99, n. 5, p. 975-86, Mar 1 1997.

NICKERSON, D. P. et al. Regulators of Vps4 ATPase activity at endosomes differentially influence the size and rate of formation of intraluminal vesicles. **Mol Biol Cell**, v. 21, n. 6, p. 1023-32, Mar 15 2010.

NIESSEN, H. et al. Granulocyte colony-stimulating factor upregulates the vacuolar proton ATPase in human neutrophils. **Blood**, v. 90, n. 11, p. 4598-601, Dec 1 1997.

NUNOI, H. et al. A heterozygous mutation of beta-actin associated with neutrophil dysfunction and recurrent infection. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 96, n. 15, p. 8693-8, Jul 20 1999.

OSTROVSKY, L. et al. A juxtacrine mechanism for neutrophil adhesion on platelets involves platelet-activating factor and a selectin-dependent activation process. **Blood**, v. 91, n. 8, p. 3028-36, Apr 15 1998.

OWAKI, H. et al. Extracellular signal-regulated kinases in T cells: characterization of human ERK1 and ERK2 cDNAs. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 182, n. 3, p. 1416-22, Feb 14 1992.

PEIXOTO, A. P. **Hemograma e metabolismo oxidativo dos neutrófilos de bon=vinos da raça Holandesa preta e branca - influência dos fatores etários.** Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal 2002.

PHAM, C. T.; LEY, T. J. Dipeptidyl peptidase I is required for the processing and activation of granzymes A and B in vivo. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 96, n. 15, p. 8627-32, Jul 20 1999.

PILSCZEK, F. H. et al. A novel mechanism of rapid nuclear neutrophil extracellular trap formation in response to Staphylococcus aureus. **J Immunol**, v. 185, n. 12, p. 7413-25, Dec 15 2010.

PINTO, O. M. **Influencia, in vitro, da vancomicina, da anfotericina B desoxicolato e de ambas sobre a função fagocitária, produção de radicais de oxigênio e fator de necrose tumoral alpha por fagócitos do sangue periferico de indivíduos normais.** 2006. Universidade de Brasília, Brasília.

PRYOR, P. R.; LUZIO, J. P. Delivery of endocytosed membrane proteins to the lysosome. **Biochim Biophys Acta**, v. 1793, n. 4, p. 615-24, Apr 2009.

QUADROS, E. V.; SEQUEIRA, J. M. Cellular uptake of cobalamin: transcobalamin and the TCbIR/CD320 receptor. **Biochimie**, v. 95, n. 5, p. 1008-18, May 2013.

QUINN, M. T.; GAUSS, K. A. Structure and regulation of the neutrophil respiratory burst oxidase: comparison with nonphagocyte oxidases. **J Leukoc Biol**, v. 76, n. 4, p. 760-81, Oct 2004.

R.THOM, S. Neutrophil B2 integrin inhibition by enhancer interactions of vasodilator-stimulated phosphoprotein with S-nitrosylated actin. **The journal of Biological Chemistry**, 2011.

RABELO, L. A. et al. Redox unbalance: NADPH oxidase as therapeutic target in blood pressure control. **Arq Bras Cardiol**, v. 94, n. 5, p. 643-51, 684-93, May 2010.

RADOVIC, N. **Molecular aspects of apoptosis.** Acta MEd Croatica. 62 2008.

ROBERTS, D. L.; FRERMAN, F. E.; KIM, J. J. Three-dimensional structure of human electron transfer flavoprotein to 2.1-Å resolution. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 93, n. 25, p. 14355-60, Dec 10 1996.

RODOVA, M.; ANKILOVA, V.; SAFRO, M. G. Human phenylalanyl-tRNA synthetase: cloning, characterization of the deduced amino acid sequences in terms of the structural domains and coordinately regulated expression of the alpha and beta subunits in chronic myeloid leukemia cells. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 255, n. 3, p. 765-73, Feb 24 1999.

ROOS, D.; VAN BRUGGEN, R.; MEISCHL, C. Oxidative killing of microbes by neutrophils. **Microbes Infect**, v. 5, n. 14, p. 1307-15, Nov 2003.

ROSA, E. L. **Análise morfológica e proteômica da captação de nanopartículas de dióxido de titânio por neutrófilos humanos *in vitro***. 2012. Departamento de Patologia Molecular, Universidade de Brasília, Brasília.

ROWAT, A. C. et al. Nuclear envelope composition determines the ability of neutrophil-type cells to passage through micron-scale constrictions. **J Biol Chem**, v. 288, n. 12, p. 8610-8, Mar 22 2013.

RUBIN, B. B. et al. Cytosolic phospholipase A2-alpha is necessary for platelet-activating factor biosynthesis, efficient neutrophil-mediated bacterial killing, and the innate immune response to pulmonary infection: cPLA2-alpha does not regulate neutrophil NADPH oxidase activity. **J Biol Chem**, v. 280, n. 9, p. 7519-29, Mar 4 2005.

RUSTIN, P.; MUNNICH, A.; ROTIG, A. Succinate dehydrogenase and human diseases: new insights into a well-known enzyme. **Eur J Hum Genet**, v. 10, n. 5, p. 289-91, May 2002.

SADOUL, K. et al. Regulation of protein turnover by acetyltransferases and deacetylases. **Biochimie**, v. 90, n. 2, p. 306-12, Feb 2008.

SAKAI, J. et al. Reactive oxygen species-induced actin glutathionylation controls actin dynamics in neutrophils. **Immunity**, v. 37, n. 6, p. 1037-49, Dec 14 2012.

SANTOS, K. C. **Análise Proteômica Comparativa entre Neutrófilos não Ativado e Neutrófilos Ativado 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.

SAWAZAKI, T.; MINEZAWA, M. The pig aminoacylase 1 (ACY1) and ribosomal protein L29 (RPL29)/heparin/heparan sulfate interacting protein (HIP) genes are located together at

13q21-->q22, corresponding to human 3p21.1. **Cytogenet Cell Genet**, v. 86, n. 1, p. 56-61, 1999.

SHEEL-TOELLNER, D. et al. Early events in spontaneous neutrophil apoptosis. **Biochem Soc Trans**, v. 32, n. Pt3, p. 461-4, Jun 2004.

SCHMIDT, O.; TEIS, D. The ESCRT machinery. **Curr Biol**, v. 22, n. 4, p. R116-20, Feb 21 2012.

SHINDOU, H. et al. A single enzyme catalyzes both platelet-activating factor production and membrane biogenesis of inflammatory cells. Cloning and characterization of acetyl-CoA:LYSO-PAF acetyltransferase. **J Biol Chem**, v. 282, n. 9, p. 6532-9, Mar 2 2007.

SNYDER, F. Platelet-activating factor: the biosynthetic and catabolic enzymes. **Biochem J**, v. 305 (Pt 3), p. 689-705, Feb 1 1995.

STEEL, H. C.; COCKERAN, R.; ANDERSON, R. Platelet-activating factor and lyso-PAF possess direct antimicrobial properties in vitro. **APMIS**, v. 110, n. 2, p. 158-64, Feb 2002.

STEIN, B. N. et al. Activation of endothelial extracellular signal-regulated kinase is essential for neutrophil transmigration: potential involvement of a soluble neutrophil factor in endothelial activation. **J Immunol**, v. 171, n. 11, p. 6097-104, Dec 1 2003.

SWAIN, D. K. Neutrophil dynamics in the blood and milk of crossbred cows naturally infected with *Staphylococcus aureus*. **Veterinary World**, 2015.

TAKAHASHI, R. U. et al. Ribophorin II regulates breast tumor initiation and metastasis through the functional suppression of GSK3beta. **Sci Rep**, v. 3, p. 2474, 2013.

TARUI, M. et al. Selective inhibitors of a PAF biosynthetic enzyme lysophosphatidylcholine acyltransferase 2. **J Lipid Res**, v. 55, n. 7, p. 1386-1396, May 21 2014.

TELES, L. M. et al. Comparison of the neutrophil proteome in trauma patients and normal controls. **Protein Pept Lett**, v. 19, n. 6, p. 663-72, Jun 1 2012.

THEILGAARD-MONCH, K.; PORSE, B. T.; BORREGAARD, N. Systems biology of neutrophil differentiation and immune response. **Curr Opin Immunol**, v. 18, n. 1, p. 54-60, Feb 2006.

THINGHOLM, T. E. et al. SIMAC (sequential elution from IMAC), a phosphoproteomics strategy for the rapid separation of monophosphorylated from multiply phosphorylated peptides. **Mol Cell Proteomics**, v. 7, n. 4, p. 661-71, Apr 2008.

THOMPSON, A. et al. Tandem mass tags: a novel quantification strategy for comparative analysis of complex protein mixtures by MS/MS. **Anal Chem**, v. 75, n. 8, p. 1895-904, Apr 15 2003.

TOMINAGA, N. et al. RPN2-mediated glycosylation of tetraspanin CD63 regulates breast cancer cell malignancy. **Mol Cancer**, v. 13, p. 134, 2014.

TURNER, N. C. et al. Effects of PAF, FMLP and opsonized zymosan on the release of ECP, elastase and superoxide from human granulocytes. **Eur Respir J**, v. 7, n. 5, p. 934-40, May 1994.

V.SILVA, B. Proteínas quinases: características estruturais e inibidores químicos. **Quimica nova**, v. 32, 2009.

WAGNER, J. G.; ROTH, R. A. Neutrophil migration mechanisms, with an emphasis on the pulmonary vasculature. **Pharmacol Rev**, v. 52, n. 3, p. 349-74, Sep 2000.

WANG, J.; YUAN, S.; JIANG, S. The ribosomal protein L32-2 (RPL32-2) of *S. pombe* exhibits a novel extraribosomal function by acting as a potential transcriptional regulator. **FEBS Lett**, v. 580, n. 7, p. 1827-32, Mar 20 2006.

WANG, M. et al. Tracking the endocytic pathway of recombinant protein toxin delivered by multiwalled carbon nanotubes. **ACS Nano**, v. 4, n. 11, p. 6483-90, Nov 23 2010.

WATT, I. M. **The principle and practice of electron microscopy**. New York, EUA: 1997.

YANG, X. J.; SETO, E. Lysine acetylation: codified crosstalk with other posttranslational modifications. **Mol Cell**, v. 31, n. 4, p. 449-61, Aug 22 2008.

YU, C. A.; YU, L. Mitochondrial ubiquinol-cytochrome c reductase complex: crystallization and protein: ubiquinone interaction. **J Bioenerg Biomembr**, v. 25, n. 3, p. 259-73, Jun 1993.

YUAN, Z. et al. Curcumin mediated epigenetic modulation inhibits TREM-1 expression in response to lipopolysaccharide. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 44, n. 11, p. 2032-43, Nov 2012.

ZHU, J. et al. Quantitative proteomics reveals differential biological processes in healthy neonatal cord neutrophils and adult neutrophils. **Proteomics**, v. 14, n. 13-14, p. 1688-97, Jul 2014.

ZMIJEWSKI, J. W.; BANERJEE, S.; ABRAHAM, E. S-glutathionylation of the Rpn2 regulatory subunit inhibits 26 S proteasomal function. **J Biol Chem**, v. 284, n. 33, p. 22213-21, Aug 14 2009.