

ANÁLISE PROTEÔMICA COMPARATIVA ENTRE
NEUTRÓFILOS NÃO ATIVADOS E NEUTRÓFILOS ATIVADOS
COM PMA, UM ANÁLOGO DO DIACILGLICEROL.

Karina Cunha dos Santos

Orientador: Prof. Dr. Wagner Fontes

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

ANÁLISE PROTEÔMICA COMPARATIVA ENTRE
NEUTRÓFILOS NÃO ATIVADOS E NEUTRÓFILOS ATIVADOS
COM PMA, UM ANÁLOGO DO DIACILGLICEROL.

Dissertação apresentada ao programa de
Pós-Graduação em Patologia Molecular
da Universidade de Brasília como parte dos
requisitos para obtenção do título de Mestre

Brasília 2007

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação a minha mãe Geralda,
por seu exemplo de vida e por tudo que ela representa.
E ao meu esposo Sérgio, por alegrar o meu viver, a cada dia.
Amo vocês!

" Nenhuma mente que se abre para uma nova
Idéia voltará a ter o tamanho original "

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

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

Ao meu orientador e educador, professor Wagner Fontes, por seu apoio, incentivo e exemplo de dedicação, além de seu afeto e compreensão sempre presentes.

Aos amigos do laboratório de Bioquímica: Aline, Adriana, Pollyana, Perla, Flávia, Rafael, Pedro Ivo, Anne, Gabriel, Carol, Fábio, Carla, Oscar, Gabriela, Carlos Morris, Larissa, Alison, Carlos Garcia, Camila, Sebastián, Liz, Everton, Vitório, Liudy, Jimmi, pela ajuda, pelo companheirismo e pelos muitos momentos de descontração e alegria proporcionados. E a tantos outros amigos cujos nomes não estão citados aqui, mas são igualmente colaboradores e incentivadores.

Às colegas Viviane e Júlia, pelo apoio nas técnicas de hematologia e de citometria de fluxo.

À amiga Elaine, pela especial ajuda nos experimentos e pelas inúmeras vezes em que se prestou a colaborar pra este trabalho.

Ao Nuno e Antônio Rufino, pelo apoio técnico prestado.

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

Aos meus irmãos Kênia e Kleber, e a todos os meus familiares, que mesmo distantes sempre se fizeram presentes.

A todos os servidores e amigos do Programa Saúde da Família de São Sebastião, pela imensa compreensão de minhas ausências e pelo apoio sempre que precisei.

Aos Laboratórios de Pesquisa em Doença de Chagas, Biofísica, Genética e Nanobiotecnologia pela colaboração na utilização dos equipamentos.

ABSTRACT

Neutrophils are the major type of leukocytes in peripheral blood and protect against fungal and bacterial infections. Directed migration in a gradient of chemotactic stimuli enables these cells to rapidly find the site of infection and destroy the invading pathogens. PMNs can exist in three different activation states, namely, resting, primed, and activated states. Activated neutrophils produce reactive oxygen species (ROS), in what is known as respiratory burst, increase phagocytosis, delay apoptosis, among other functions. These cells can also be activated in vitro by particles and substances such as phorbol-myristate-acetate (PMA). The PMA is a diacylglycerol (DAG) analog that bypasses membrane receptors and directly activates intracellular protein kinase C isoforms (PKC).

In this study, human neutrophils were prepared from peripheral venous blood of healthy volunteers (greater than 96% purity, greater than 97% viability) and were obtained by density centrifugation on percoll gradient. 10^7 cells were activated with 100ng PMA for 30 minutes in 1 mL of PBS. Cytometric analysis was executed for measurement of respiratory burst, viability and purity from neutrophils.

A comparative analysis of 2D-electrophoresis gels, of normal and PMA activated neutrophils was executed, and 83 spots revealed differential expression, from which 13 spots were up regulated after PMA activation and 70 were down regulated in this condition ($p \leq 0,05$). Moreover, 141 spots were regarded as belonging only to normal gel, and 109 spots were exclusive of the PMA activated neutrophil map

Thirty five conserved spots were subjected to peptide mass fingerprinting, yielding six identifications. Among the identified proteins, four are related to the inflammatory process and two are classified as structural.

RBCK1 and CRAa, were found for first time in neutrophils. Our hypothesis is that MEK1 and MEK kinase 1 (MEKK1) represses the RBCK1 activity, and PKA enhances its activity.

Lysozyme, a microbicidal protein of specific granules, and β -actin, the main isoform of neutrophil cytoskeleton were identified too. MRP-14, present in the neutrophil cytoplasm, provides bacteriostatic and cytokine-like effects.

RESUMO

Os neutrófilos constituem o principal tipo de leucócito do sangue periférico e protegem contra infecções fúngicas e bacterianas. Devido à sua capacidade de quimiotaxia, conseguem chegar rapidamente a um sítio de infecção e destruir os patógenos invasores. Essas células podem existir em três estágios de ativação denominados, quiescente, estimulado e ativado. Neutrófilos ativados produzem espécies reativas de oxigênio (ROS), aumentam sua capacidade fagocitária; têm a apoptose retardada além de outras funções. Os polimorfonucleares podem ser ativados *in vitro* por várias substâncias, dentre elas o PMA, que atravessa as membranas e ativa, diretamente, várias isoformas de PKC.

Neste trabalho, os neutrófilos foram purificados a partir do sangue venoso periférico, e obtidos após centrifugação do sangue total em um gradiente de percoll (pureza maior que 96% e viabilidade maior que 97%). Em seguida, 10^7 células foram ativadas com PMA 100 ng/mL, por 30 minutos, mantendo também um grupo controle não ativado. Análises citométricas foram executadas para se acompanhar a ativação celular através da explosão respiratória e a viabilidade e pureza da separação dos neutrófilos.

Também foi realizada uma análise comparativa dos géis bidimensionais na condição Normal e ativada com PMA, verificando que 12 spots tiveram sua expressão aumentada com a ativação e 62 apresentaram expressão diminuída nesta condição. Além disso, 141 spots foram considerados como pertencentes apenas ao gel Normal e 109 spots foram exclusivos da condição PMA. Trinta e cinco spots foram sujeitos à identificação por *peptide mass fingerprinting*, dos quais seis foram identificados. Entre as proteínas identificadas, quatro são relacionadas ao processo inflamatório e duas foram classificadas como estruturais.

RBCK1 e CRAa, foram encontradas pela primeira vez em neutrófilos. Nossa hipótese é que MEK1 e MEKK1, reduzam a atividade transcricional de RBCK1, enquanto PKA aumenta sua atividade.

A lisozima, proteína microbicida de grânulos específicos e a β -actina, classificada como a principal isoforma do citoesqueleto de neutrófilos, também foram identificadas. MRP-14, presente no citoplasma de neutrófilos, apresenta efeitos bacteriostáticos e semelhantes às citocinas.

Índice do texto

1 – INTRODUÇÃO.....	1
1.1 - Fases de maturação.....	1
1.2 - O Neutrófilo na inflamação.....	3
1.3 - Marginação e migração.....	4
1.4 - Fagocitose.....	6
1.5 - Neutrófilo – Grânulos.....	9
1.5.1 - Grânulos azurófilos.....	10
1.5.2 - Grânulos peroxidase negativos.....	11
1.5.3 - Vesículas secretórias.....	11
1.5.4 - Mecanismos de Degranulação: estímulos com fMLP e PMA.....	12
1.5.5 - Fusão de grânulos com as membranas.....	13
1.6 - NADPHoxidase.....	14
1.6.1 - Flavocitocromo b558.....	16
1.6.2 - p47phox.....	16
1.6.3 - p67phox.....	17
1.6.4 - Rac2.....	17
1.6.5 - Ativação da NADPHoxidase.....	17
1.6.6 - Disfunções na Explosão Respiratória.....	18
1.6.6.1 - Doença Granulomatosa Crônica.....	18
1.6.6.2 - ANCAs.....	19
1.6.6.3 - SIRS, SARA e SDMO.....	19
1.7 - Estimulação e Ativação do Neutrófilo na Resposta Inflamatória.....	20
1.8 - O PMA e o Neutrófilo.....	23
1.8.1 - PKC estrutura, família e função.....	24
1.8.2 - Interação com o endotélio após ativação com PMA.....	26
1.8.3 - Montagem de actina e quimiotaxia em neutrófilos ativados com PMA.....	27
1.8.4 - Ativação da NADPHoxidase após ativação com PMA.....	27
1.8.5 - A via das MAPcinases e o PMA.....	29
1.9 - Estratégias de estudo de mecanismos de ativação do neutrófilo.....	30
1.10 - Citometria de Fluxo.....	31

1.11 - Proteômica.....	35
1.11.1 - Eletroforese Bidimensional.....	35
1.11.2 - Análise de Imagens.....	36
1.11.3 - Espectrometria de massa.....	36
1.11.4 - Análise Proteômica de Neutrófilos.....	37
2 - OBJETIVOS E JUSTIFICATIVAS.....	39
2.1 - Objetivos Gerais.....	52
2.2 – Objetivos Específicos.....	52
3 - METODOLOGIA.....	40
3.1 - Fluxograma geral dos procedimentos:.....	40
3.2 - Coleta de sangue.....	41
3.3 - Separação de neutrófilos.....	41
3.4 - Ativação celular.....	45
3.5 - Citometria de fluxo.....	46
3.6 - Lise celular.....	46
3.7 - Dosagem de Proteínas das Amostras.....	47
3.8 - Focalização Isoelétrica (IEF ou 1ª Dimensão):.....	47
3.9 - Etapa de Equilíbrio:	48
3.10 - Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE ou 2ª Dimensão):.....	48
3.11 - Coloração dos Géis.....	49
3.12 - Digitalização e Secagem dos Géis:.....	50
3.13 - Análise Computacional das Imagens dos Géis:	50
3.13.1 - Análise Estatística	53
3.14 - Digestão de spots protéicos.....	54
3.15 - Espectrometria de massa (MALDI-TOF)	54
4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	56
4.1 - Coleta de sangue.....	56
4.2 - Separação celular e citometria de fluxo.....	56
4.3 - Ativação in vitro.....	60
4.4 - Lise celular e Dosagem de proteínas.....	66
4.5 – Géis.....	66
4.5.1 - Padronização de géis.....	66
4.5.2 - Análise dos géis.....	70
4.6 - Identificação de proteínas.....	75

5 - CONCLUSÕES.....	87
6 - PERSPECTIVAS.....	88
7 -REFERÊNCIAS.....	89

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Vida média e estágios de maturação do neutrófilo.....	2
Figura 2. Processo de rolamento, ativação, adesão e migração transendotelial do neutrófilo.....	6
Figura 3. Fagocitose de neutrófilos.....	8
Figura 4. Ativação da NADPHoxidase.....	16
Figura 5. Ativação do polimorfonuclear em um processo contínuo caracterizado por dois estágios: estimulado e ativado.....	22
Figura 6. Estrutura molecular do PMA.....	24
Figura 7. Estrutura primária das diferentes isoformas da PKC	25
Figura 8. Domínio de ligação C1 da PKC δ ao PMA.....	26
Figura 9. Vias de ativação das MAP cinases por PMA.	30
Figura 10. Análise das características físicas das células – tamanho e granulosidade ..	32
Figura 11. Estrutura básica de um citômetro de fluxo.	33
Figura 12 . Estrutura molecular da DHR1,2,3.	34
Figura 13. Molécula de Iodeto de Propídio	34
Figura 14. Lâmina corada com Wright obtida para a contagem diferencial.....	43
Figura 15. Campo visualizado durante a contagem de células coradas com nigrosina.	44
Figura 16. Câmara de Neubauer	44
Figura 17. Visualização de neutrófilos em Hemocitômetro	45
Figura 18. Esquema geral do pareamento.....	51
Figura 19. Esquema da rede de pareamentos.....	52
Figura 20. Esquema de divisão da classe e subclasses criadas durante a análise de imagens.	53
Figura 21. Perfil de separação de neutrófilos utilizando quatro gradientes de percoll...57	
Figura 22. Tamanho e granulosidade celular de sangue, sedimentado por 30 minutos (A) e dos granulócitos separados por gradiente de percoll (B).....	57
Figura 23. Tamanho celular por intensidade de fluorescência da DHR no canal FL1 ..	58
Figura 24. Perfil da separação de neutrófilos utilizando dois gradientes de percoll,.....	59
Figura 25. Tamanho celular por intensidade de fluorescência da DHR 1,2,3, mostrando a estimulação de neutrófilos com PMA nas concentrações indicadas.....	61

Figura 26. Tamanho celular versus fluorescência de DHR1,2,3 após ativação com 100,200 e 400 ng/mL de PMA.....	62
Figura 27. Intensidade de fluorescência e tamanho celular, após ativação em diferentes concentrações de PMA.	62
Figura 28. Tamanho, granulosidade, produção de H ₂ O ₂ e porcentagem de células fluorescentes, em soluções de PBS sem cálcio e com cálcio.....	64
Figura 29. Otimização das condições de preparo do gel..	68
Figura 30. Perfil bidimensional do proteoma de neutrófilos normais (300µg de proteínas) corado por CPA, para a identificação de spots por PMF.....	69
Figura 31. Gel bidimensional de neutrófilo normal.....	71
Figura 32. Gel bidimensional de neutrófilo ativado com PMA 100ng/mL	71
Figura 33. Proteínas identificadas no neutrófilo quiescente	75
Figura 34. Exemplo de uma busca de impressão digital usando o programa Mascot ...	79
Figura 35. Esquema da via das MAPcinases com participação da RBCK1.....	85
Figura 36. Regulação do alongamento de um filamento de actina em neutrófilos.....	98

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Reagentes e soluções para a montagem do gradiente de percoll.....	49
Tabela 2: Leucócitos e as densidades celulares correspondentes.....	60
Tabela 3: Spots com expressão aumentada após ativação com PMA.....	73
Tabela 4: Spots com expressão aumentada no netrófilo Normal	73
Tabela 5: Proteínas identificadas do Netrófilo quiescente e seus respectivos códigos de acesso ao banco de dados NCBI, nome, ponto isoelétrico, massa, Score, porcentagem de cobertura da sequência e número de peptídeos pareados com a proteína constante no banco de dados.....	76
Tabela 6: Proteínas identificadas do Netrófilo quiescente e seus respectivos códigos de acesso ao banco de dados NCBI, massa molecular e ponto isoelétrico experimentais e teóricos, porcentagem de cobertura da seqüência teórica e score da identificação.....	80

SIGLAS E ABREVIACÕES

2DE : eletroforese bidimensional

AIRE : regulador autoimune

ANCAS : anticorpos citoplasmáticos anti-neutrófilos

APPL-1 : proteína adaptadora contendo o domínio PH domain, PTB domain, and leucine zipper motif; também conhecido como CRAa

Arp2/3 : complexo nucleador de actina

BPI : proteína indutora de permeabilidade na membrana

CD11a-CD18 : antígeno associado a função de linfócitos 1

CD11b-CD18 : receptor de complemento 3

CD16 : receptor de porção Fc de IgG RIIIB

CD32 : receptor de porção Fc de IgG RIIA

CD63 : granulofisina

CD64 : receptor de porção Fc de IgG RI

CINC : citocina indutora de quimiotaxia em neutrófilos

CR3 : receptor de complemento 3

DAG : diacilglicerol

DGC : doença granulomatosa crônica

DHR 1,2,3 : dihidrorodamina 1,2,3

DTT : ditioneitol

EDTA : ácido etilenodiamino tetraacético

EGF : fator de crescimento epidermal

ERK1 : cinase regulada por sinalização extracelular 1

ERK2 : cinase regulada por sinalização extracelular 2

Fc γ RIIA : receptor de porção Fc de IgG RIIA

Fc γ RIIIB : receptor de porção Fc de IgG RIIIB

Fc γ RI : receptor de porção Fc de IgG RI

fMLP : formil peptídeo met-leu-phe

FSC : célula de leitura de espalhamento frontal, indica o tamanho celular

G-CSF : fator de crescimento estimulador de colônia de granulócitos

GM-CSF : fator de crescimento estimulador de colônia de granulócitos e de macrófagos

GRO α : produto gênico α relacionado ao crescimento
GRO β : produto gênico β relacionado ao crescimento
GRO γ : produto gênico γ relacionado ao crescimento
HBSS : solução balanceada de sais
IEF : isoeletrofocalização
ICAM : molécula de adesão endotelial
IL-1 : interleucina 1
IL-8 : interleucina 8
IP3 : inositol trifosfato
IPG : gradiente imobilizado de pH
ITAM : motivo de ativação baseado no imunoreceptor de tirosina
LAMP 1 e 2 : proteínas de membrana 1 e 2 associadas ao lisossomo
LFA-1 : antígeno associado a função de linfócitos 1
LPS : lipopolissacarídeo
LTB4 : leucotrieno B4
MALDI-TOF MS : espectrometria de massa por desorção e ionização a laser assistida por matriz
Mac-1 : receptor de complemento 3
MAP kinase-kinase-kinase : proteína cinase cinase cinase ativada por mitose
MAPKAPK-2 : proteína cinase 2 ativada por MAPK
MARCKS : substrato de PKC miristoilado rico em alanina
MEK1 : cinase ativadora de ERK1
MEKK1 : cinase ativadora de MEK1
MIG : monocina induzida por INF γ
MIP-2 : proteína macrófago inflamatória 2
MPO : mieloperoxidase
MRP-8 : *Myeloid-related protein - 8*
MRP-14 : *Myeloid-related protein - 14*
NADPH : forma reduzida do dinucleotídeo nicotinamida-adenina
NGAL : lipocalina associada à gelatinase
PAF : fator de ativação plaquetária
PBS : tampão salina fosfato
Phox : produto gênico fosforilado que compõe uma oxidase de fagócitos
pI : ponto isoelétrico

PI : iodeto de propídeo
PKC : proteína cinase C
PLC : fosfolipase C
PLD: fosfolipase D
PLA₂: fosfolipase A2
PMA : 13-acetato de fobol éster 12-miristato
PMF : impressão digital do mapa peptídico
PMN : polimorfonuclear
PR-3 : proteinase 3
p42 MAPK : cinase ativada por mitose, regulada por sinalização extracelular 1
p44MAPK : cinase ativada por mitose, regulada por sinalização extracelular 2
p38 MAPK : proteína p38 cinase ativada por mitose
Raf-1 : proteína cinase cinase cinase ativada por mitose
RBCK-1 : proteína da família RBCC que interage com PKC.
RNS : espécies reativas de nitrogênio
ROS : espécies reativas de oxigênio
SARA : Síndrome da Angústia Respiratória Aguda
SCAMP : e proteína de membrana carreadora secretória
SDMO : Síndrome da Disfunção de Múltiplos Órgãos
SDS : dodecil sulfato de sódio
SNARE : receptor protéico de fusão de proteínas solúveis em n-etilmaleimida.
SOD : superóxido dismutase
SRIS : Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica
SSC : célula de leitura de espalhamento lateral, granulocidade celular
TFM : tubo fotomultiplicador
TK : tirosina cinase
TNF- α : fator de necrose tumoral α
VAMP-2 : proteína 2 associada a vesículas

1. INTRODUÇÃO

Os neutrófilos são os principais tipos de leucócitos encontrados no sangue periférico, compreendendo de 40% a 70% do total de glóbulos brancos sanguíneos, em condições normais. Embora eles sejam chamados comumente de granulócitos, esse termo inclui também os granulócitos eosinofílicos (eosinófilos) e os granulócitos basofílicos (basófilos). A nomenclatura é devida a diferenças na cor entre os grânulos citoplasmáticos dessas células, após coloração padrão Romanowsky.

Os neutrófilos têm uma meia-vida curta na circulação de apenas seis a dez horas. Da circulação essas células podem migrar para os tecidos, sendo recrutadas a um sítio de inflamação, seguindo um gradiente de quimiocinas específicas, onde permanecem ativas por dois até seis dias. A abundância de neutrófilos no sangue, a eficácia de seu recrutamento e suas ações antimicrobianas e fagocitárias no sítio inflamatório, fazem dessas células uma primeira linha de defesa do sistema imune inato.[1]

1.1. Fases de maturação

Os neutrófilos são produzidos na medula óssea, onde necessitam, em média, de duas semanas para completar a fase de maturação. Os fatores de crescimento estimuladores de colônia de granulócitos e de macrófagos-granulócitos (G-CSF e GM-CSF), produzidos por fibroblastos e células endoteliais após indução de mediadores inflamatórios, como a IL-1, desempenham uma importante função nesse processo. Na primeira parte desse período, as células precursoras passam por cinco divisões e se diferenciam de mieloblastos a promielócitos e por último, a mielócitos.

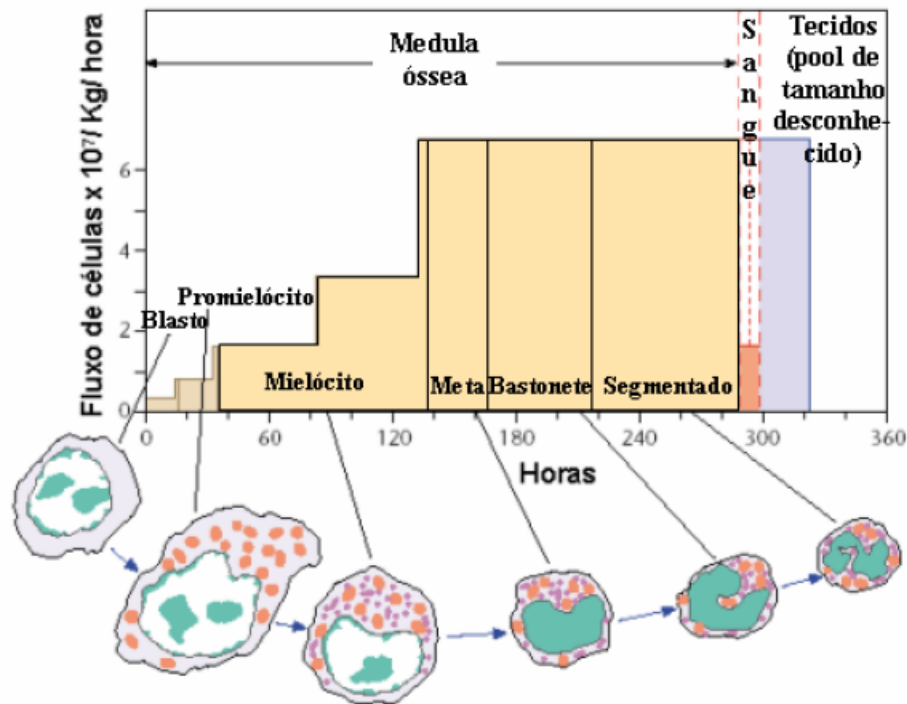


Figura 1. Vida média e estágios de maturação pelos quais passa o neutrófilo, mostrando o tempo que ele passa na medula óssea, sangue e tecidos. *Modificado a partir da referência [1]*

Os mieloblastos têm um grande núcleo, com cromatina frouxa, ocupando quase todo o citoplasma, e pouco ou nenhum grânulo. No estágio de promielócitos há a formação dos grânulos azurófilos, seguida pela formação de grânulos específicos no estágio mielocítico. Nas etapas posteriores não mais ocorrem divisões celulares e os mielócitos apenas se diferenciam em metamielócitos, seguidos dos estágios de bastonetes e segmentados. Como o próprio nome indica, estas últimas fases são caracterizadas pelo aparecimento de núcleo em forma de bastão, que passa a apresentar estreitamentos originando segmentos no estágio posterior.

A medula óssea compreende uma reserva de neutrófilos maduros que contém aproximadamente 20 vezes mais a quantidade destas células presentes na circulação. Em condições normais, os neutrófilos são liberados para o sangue dois dias após sua completa maturação. Durante as infecções, estas células podem ser liberadas mais rapidamente, ainda sob a forma de bastão. O aparecimento de formas imaturas no sangue é refletido por uma diminuição na resposta quimiotática celular.[1]

1.2. O Neutrófilo na inflamação

Quando os patógenos ultrapassam as barreiras externas da imunidade inata, como pele e mucosas, ocorre a instalação da infecção que pode induzir uma cascata de eventos conhecidos como resposta inflamatória. A presença da inflamação é uma resposta do organismo a uma agressão crônica ou aguda. A resposta inflamatória aguda combate os estágios iniciais de infecção e inicia os processos de reparação dos danos teciduais. Os sinais de uma inflamação localizada foram descritos pela primeira vez pelos romanos há quase 2000 anos atrás: dor, calor, rubor, tumor. Minutos após a lesão tecidual, há um aumento no diâmetro vascular (vasodilatação), resultando numa elevação do volume sanguíneo na área, que causa o aquecimento local e a vermelhidão. A permeabilidade vascular também aumenta, levando ao extravasamento de fluidos (edema) deixando o tecido intumescido. Em poucas horas, os leucócitos aderem ao endotélio da região inflamada e passam através das paredes dos capilares alcançando o tecido.

Os neutrófilos e outros fagócitos englobam patógenos invasores e liberam mediadores moleculares, como as citocinas, que contribuem para a resposta inflamatória e para o recrutamento e ativação de mais células efetoras. As quimiocinas, também liberadas durante uma resposta inflamatória, fazem parte de um grupo de citocinas, que têm como característica a capacidade de agir como quimiotáticos (substâncias que atraem as células em direção ao seu gradiente de concentração). Outros importantes quimioatraentes são os produtos do complemento C5a, C3a, e vários N-formil peptídeos produzidos por fragmentação bacteriana durante uma infecção [2]. Os neutrófilos também possuem a capacidade de migrar em direção aos tecidos lesados, onde podem liberar componentes tóxicos, como espécies reativas de oxigênio e enzimas proteolíticas, como a elastase, desenvolvendo um processo inflamatório ausente de infecções.

Os mediadores lipídicos como leucotrieno B4 (LTB4) e fator de ativação plaquetária (PAF) são também fortes agentes quimioatraentes. As quimiocinas são produzidas pelos leucócitos em resposta à inflamação, lesão tecidual, hipóxia ou outras formas de estresse. Para cada um desses agentes, existem receptores específicos no neutrófilo. Os receptores de fMLP (um formil peptídeo) e PAF pertencem à superfamília “sevenspan” de proteínas integrais de membrana com sete domínios transmembrana. A especificidade de cada ligante é devida a diferenças nos domínios

extracelulares. Os domínios intracelulares interagem com várias proteínas que se ligam ao guanosina trifosfato (GTP), desencadeando vias de transdução de sinal que levam a uma ampla variedade de respostas funcionais. A ativação de enzimas citoplasmáticas, tais como fosfolipases C, D e A2, e diferentes proteínas cinases (PK), cada uma com seus substratos e produtos, levam a várias funções efetoras como a adesão ao endotélio, quimiotaxia, fagocitose, retardo da apoptose e ativação da explosão respiratória em neutrófilos [1]. Os neutrófilos quando estimulados, seja por fagocitose ou por ação de mediadores inflamatórios, manifestam um aumento do consumo de oxigênio, utilizado na geração de uma grande quantidade de superóxido e peróxido de hidrogênio, dos quais derivam vários metabólitos oxidantes, num processo chamado "explosão respiratória" [3].

Em estudos "in vitro", o PMA, 13-acetato de fobol éster 12-miristato, um análogo do diacilglicerol, também se mostra quimiotático para neutrófilos humanos [4]. A membrana plasmática é permeável a esse ativador, que ativa diretamente a proteína cinase C (PKC). Gabler e colaboradores sugerem que o possível mecanismo para indução da migração seja através de um gradiente de ativação de PKC. Esta via pode ser uma alternativa à via clássica de ativação por receptores de membrana, já que vários mediadores inflamatórios solúveis podem estabelecer gradientes intracelulares de ativação de PKC.[4]

1.3. Marginação e migração

Os polimorfonucleares são capazes de reconhecer um gradiente de concentração de quimiotáticos e migrar em direção à fonte desses agentes, no sítio de inflamação. Este é um processo muito complexo, do qual muitos detalhes ainda são desconhecidos [1].

Os neutrófilos são as primeiras células a migrar do sangue para o sítio de infecção e se apresentam com um vasto armamento de defesa contra os agentes infectantes. O processo de migração para o local da inflamação é finamente regulado por citocinas e outros mediadores. As citocinas também agem nas células endoteliais próximas à região inflamada induzindo um aumento da expressão de moléculas de adesão (CAMs), deixando esse epitélio num estado de ativação.[2]

Ocorre uma interação fraca, de baixa afinidade, entre glicoproteínas mucinas do neutrófilo com selectinas das células endoteliais. Na ausência de sinais inflamatórios, esta ligação se rompe pela força do fluxo sanguíneo e a célula continua circulante. Mas quando há um estímulo inflamatório, estas interações fracas são estabilizadas pelas ligações de integrinas com as ICAMs endoteliais, facilitando a diapedese [2]. Além disso, a ligação de quimiocinas ou outros quimiotáticos a receptores de membrana de neutrófilos induz uma mudança conformacional em proteínas da família das integrinas, aumentando sua afinidade por moléculas de adesão intracelular (ICAMs) situadas no endotélio. Interleucina 8, GRO α , GRO β , GRO γ , ativador de neutrófilo derivado de célula epitelial, MIP2, citocina indutora de quimioatração em neutrófilos (CINC) e MIG, são as principais quimiocinas que exercem atividade quimiotática e estimulatória em neutrófilos, favorecendo a adesão [5]

As ligações dependentes de ativação das β 2 integrinas (Mac-1, LFA-1) dos neutrófilos aos seus ligantes endoteliais (ICAM-1) convertem as interações transitórias do rolamento em firme adesão. Então, os neutrófilos aplainam sobre o endotélio, resultando em um aumento do contato e formação de um grande número de pontes de ligação pelas integrinas. Subseqüentemente, os neutrófilos sofrem transformações na sua forma, permitindo que eles passem entre as junções interendoteliais da parede do vaso. A partir de então, eles penetram no espaço tissular extravascular e migram para os sítios inflamatórios [6]. Os polimorfonucleares possuem muitas proteases capazes de quebrar colágeno, laminina e outros componentes da matriz extracelular. Após a diapedese, os neutrófilos migram em direção a um gradiente de várias substâncias quimiotáticas através da liberação de proteases e emissão de pseudópodes [7].

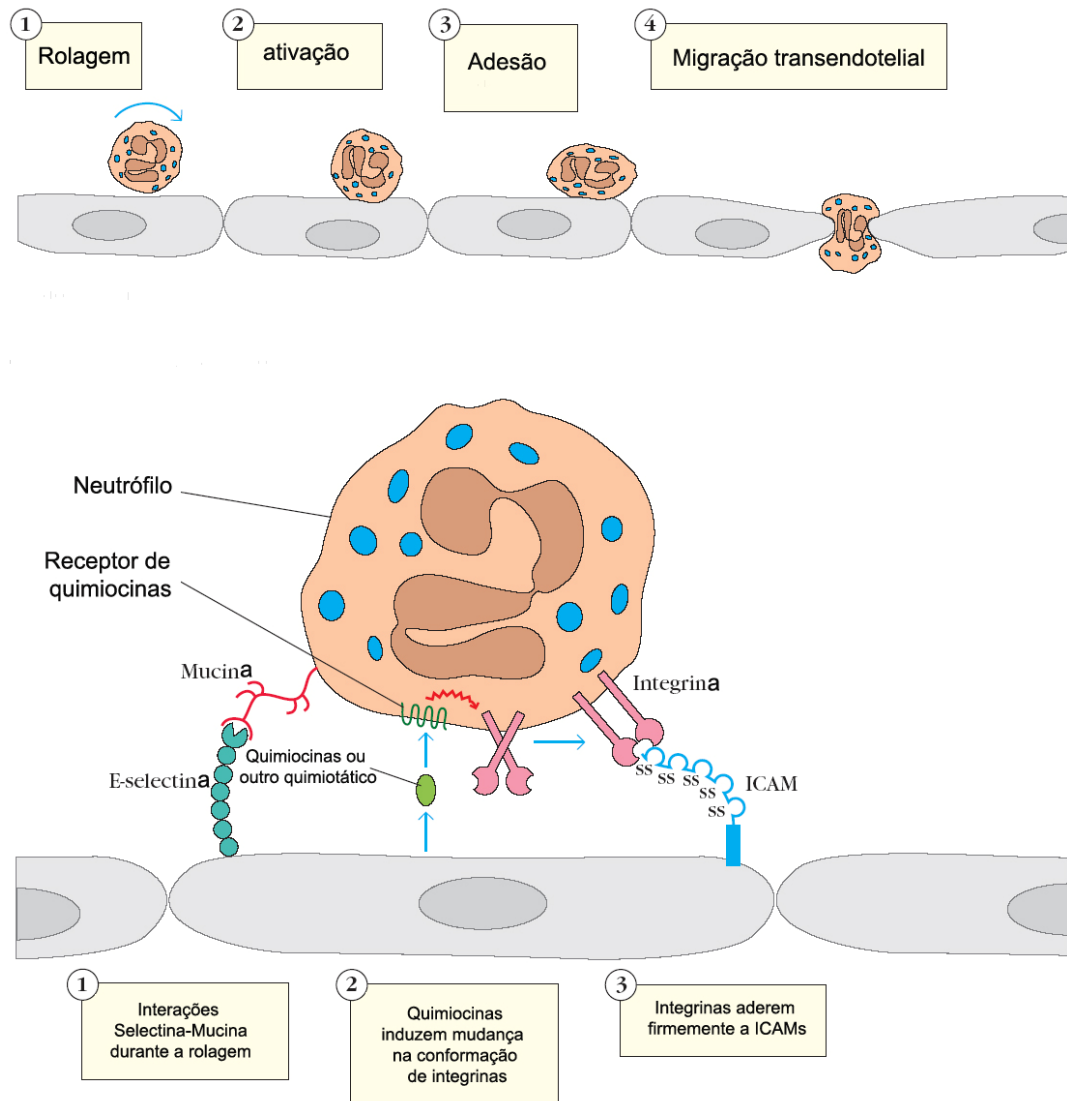


Figura 2. Processo de rolamento, ativação, adesão e migração transendotelial do neutrófilo. Em destaque, as interações entre o neutrófilo e o endotélio durante a adesão. A adesão de quimiocinas ao receptor induz uma mudança de conformação nas integrinas facilitando sua interação com as ICAMs endoteliais. Modificado a partir da referência [2].

1.4. Fagocitose

Ao atingir o sítio inflamatório, inicia-se no neutrófilo o processo de fagocitose de microorganismos invasores. Os fagócitos são equipados com receptores especializados que reconhecem seus alvos e iniciam os mecanismos de degradação, culminando com a morte e liberação de partículas lisadas. Assim como os macrófagos, os neutrófilos também podem internalizar partículas opsonizadas ou não opsonizadas.

Os principais receptores de opsoninas (RFc) ligam-se a imunoglobulinas, na porção Fc, além do subgrupo de β 2-integrinas que se liga a partículas ativadas pelo complemento.

Existem dois tipos mais conhecidos de β 2 integrinas expressas em neutrófilos: LFA-1 (CD11a-CD18), que se liga especificamente às moléculas de adesão ICAM-1 e ICAM-2; e MAC-1 (CR3, CD11b-CD18), que também se liga a ICAM-1 e ao iC3b, produto ativado do complemento. [8]

Os principais receptores Fc de neutrófilos normais são Fc γ RIIA (CD32) e Fc γ RIIIB (CD16), enquanto os receptores com alta afinidade de ligação Fc γ RI (CD64) apresentam-se em neutrófilos estimulados com interferon ou fatores de crescimento. [9] Estudos em macrófagos sugerem que a ligação aos receptores Fc γ inicia o estendimento dos pseudópodos e a internalização da partícula. Os receptores Fc γ levam à fosforilação e subsequente ativação de tirosina cinases das famílias Src e Syk, que se associam a um motivo *immunoreceptor tyrosine-based activation motif* ITAM, situado nas subunidades dos receptores Fc γ . As tirosinas cinases ativadas, fosforilam o motivo ITAM e outros substratos que levam a um aumento na concentração de cálcio intracelular, reorganização do citoesqueleto e ativação transcricional [10].

O receptor Fc γ RIIIB, em neutrófilos, pode se mover rapidamente durante a apoptose ou a ativação desta célula. A ligação de partículas opsonizadas a um receptor Fc eleva a concentração de tais receptores ao redor da área de contato, e as células estendem seus pseudópodos em volta da partícula, formando um canal (figura 3). Então o canal formado se funde, originando uma vesícula (fagossomo). Além disso, a ligação do patógeno opsonizado pode desencadear dois outros processos: a geração de compostos reativos de oxigênio, através da enzima NADPH oxidase e a liberação do conteúdo granular para o fagossomo[1].

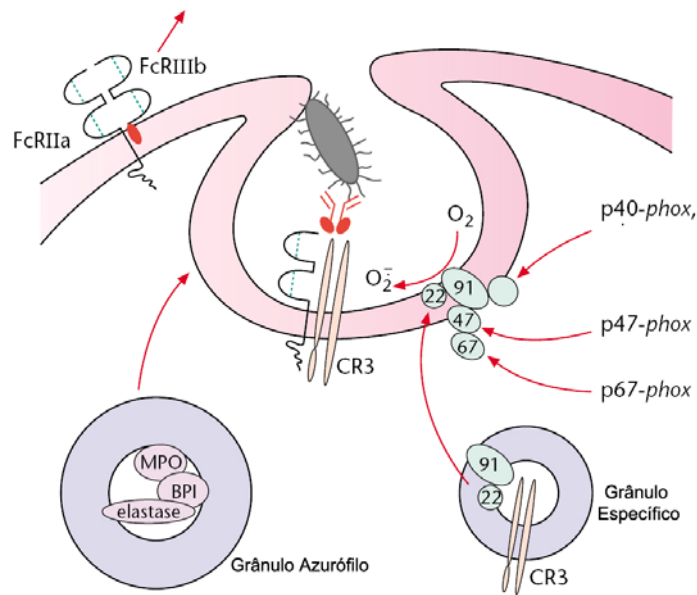


Figura 3. Microorganismos opsonizados ligam-se aos receptores Fc γ e aos receptores de complemento na superfície de neutrófilos. Como resultado, os microorganismos são engolfados originando um fagossoma intracelular. Grânulos se fundem com a membrana do fagossomo e descarregam seus constituintes. A NADPH oxidase também é ativada com a montagem do complexo na membrana do fagossomo, iniciando a produção de radicais superóxido. Modificado a partir da referência [1].

Uma vez formado, o vacúolo passa por uma série de eventos que alteram sua composição adquirindo capacidade de matar patógenos e dispor dos debrís. Estes eventos remodeladores são conhecidos como maturação do fagossomo. A composição inicial de um fagossomo não é ainda microbicida e o termo maturação se refere ao processo pelo qual o fagossomo nascente adquire competência para destruir e eliminar os microorganismos internalizados. Este fenômeno é um processo dinâmico que inclui a aquisição de enzimas microbicidas, ATPases vacuolares, importantes para a diminuição do pH e a montagem do complexo NADPH oxidase.[10]

Em neutrófilos, o fagossomo adquire capacidade antimicrobiana quando se funde com as vesículas secretórias e grânulos. Estas organelas contêm um poderoso arsenal de peptídeos antimicrobianos, enzimas proteolíticas e proteínas de membrana que contribuem para a eliminação do patógeno. Elevados níveis de cálcio citosólicos são detectados durante a secreção de grânulos e a fagocitose [11]. Os compartimentos secretórios têm diferentes limiares de cálcio para secreção. O mais baixo e o mais alto são das vesículas secretórias e dos grânulos azurófilos respectivamente [12].

1.5. Neutrófilo – Grânulos

A maioria das etapas de um processo inflamatório mediado por neutrófilos é dependente da mobilização de grânulos citoplasmáticos e vesículas secretórias. Os vários subgrupos de grânulos não são apenas reservatórios de proteínas antimicrobianas, proteases e componentes da explosão respiratória oxidativa, mas também de receptores de membrana para moléculas de adesão, proteínas da matriz extracelular, produtos bacterianos e mediadores inflamatórios. A mobilização destas organelas citoplasmáticas permite a transformação do neutrófilo de uma célula passivamente circulante a um potente efetor do sistema imune inato. A precisa regulação da exocitose de grânulos, capacita o neutrófilo a liberar seu arsenal granular potencialmente citotóxico de maneira orientada, prevenindo danos teciduais em muitas situações. [13]

Os grânulos são formados sequencialmente durante a maturação celular. Ainda no estágio de promielócitos, a produção de grânulos se inicia por brotamento do complexo de golgi.[14] Os grânulos formados nesta fase são definidos como peroxidase-positivos pois contêm altas concentrações de mieloperoxidase. Eles também são chamados de grânulos azurófilos devido à sua afinidade pelo corante básico, azure A ou simplesmente designados grânulos primários. A produção de MPO é interrompida no estágio de transição de promielócito para mielócito. Em estágios posteriores, ocorre a formação de grânulos peroxidase-negativos, que podem ser divididos em específicos (secundários) e de gelatinase (terciários), baseados no tempo de aparecimento e no conteúdo granular. Os grânulos específicos são formados nos estágios de mielócitos e metamielócitos com um alto conteúdo de lactoferrina e pouca quantidade de gelatinase, enquanto os grânulos de gelatinase são formados na fase de bastão, com altas concentrações de gelatinase e pouca lactoferrina.[15, 16] Já as vesículas secretórias surgem nos neutrófilos segmentados, também chamados polimorfonucleares e contêm proteínas plasmáticas, sugerindo sua formação por endocitose.[17-19]

Existem várias diferenças entre os tipos de grânulos considerando o conteúdo protéico e o destino desses grânulos. Muitos estudos mostram que a composição do grânulo é dependente do tempo de biossíntese da proteína, ou seja, as proteínas sintetizadas em um dado estágio de maturação celular pertencerão aos grânulos formados naquele período, já que nem todas as proteínas sintetizadas são direcionadas com eficiência para os grânulos onde ficam armazenadas.[16, 20] Os mecanismos

responsáveis pelo endereçamento entre as vias exocíticas constitutivas e regulatórias são ainda desconhecidos.

1.5.1. Grânulos azurófilos

Os grânulos azurófilos foram inicialmente considerados lisossomos primários por conter granulofisina (CD63) em sua membrana. Contudo, eles não expressam proteínas de membrana associadas ao lisossomo (LAMP1 e 2), e, além disso, o direcionamento de proteínas para esse grânulo não depende do receptor de manose-3P, como ocorre nos lisossomos [21]. Esses grânulos primários têm uma limitada exocitose em resposta a um estímulo, sendo mais comum a sua fusão com fagossomos para agir contra os patógenos engolfados. [12, 22]

A MPO, componente importante dos grânulos azurofílicos, como descrito acima, é uma heme proteína microbicida de 150-kDa que catalisa a reação de H_2O_2 , na presença de um halogênio (Cl^- , Br^- , I^-) induzindo a formação de ácido hipocloroso (HClO).

$$H_2O_2 + H^+ Cl^- \xrightarrow{\text{(MPO)}} HOCl + HO$$

Outros produtos clorados, radicais de tirosina e espécies reativas de nitrogênio (RNS), também podem ser produzidos e causar alterações nas superfícies de membranas de microorganismos

As alfa-defensinas são as principais proteínas constituintes dos grânulos azurófilos. Elas são peptídeos catiônicos, de aproximadamente 3.5kDa, com ampla ação contra bactérias, fungos, vírus envelopados e protozoários. Outra potente proteína catiônica antimicrobiana dos grânulos azurófilos é a BPI, de 50kDa, que aumenta a permeabilidade bacteriana, sendo efetivo em concentrações nanomolares, contra bactérias Gram-negativas.[23]

Proteinase-3, catepsina G e elastase são serino proteases chamadas comumente de serprocidinas, que possuem atividade proteolítica contra uma variedade de componentes da matriz extracelular como elastina, fibronectina, laminina, colágeno tipo IV e vitronectina. Elas induzem a ativação de células endoteliais e epiteliais, macrófagos, linfócitos e plaquetas, e possuem propriedades microbicidas.[24] A azurocidina é uma serino protease homóloga também presente nos grânulos azurófilos, que aumenta a permeabilidade vascular durante o extravasamento dos neutrófilos, sendo inclusive, quimiotática para monócitos, fibroblastos e células T [25].

1.5.2. Grânulos peroxidase negativos

Os grânulos peroxidase negativos podem ser divididos em específicos (secundários) e de gelatinase (terciários). Os grânulos específicos são ricos em substâncias antibióticas enquanto os terciários não são. Contudo, os grânulos de gelatinase são importantes reservatórios de enzimas degradantes de matriz e receptores de membrana, necessários durante o extravasamento e a diapedese [26]. Já os grânulos específicos participam na atividade antimicrobiana por mobilização do seu arsenal de substâncias em direção ao fagossomo ou para o exterior da célula. Jeisatis, et al, 1990 verificaram que logo após a fagocitose de *S. aureus* opsonizados ha uma translocação de grânulos específicos que se fundem com o fagossomo formado, onde ocorre a liberação do conteúdo granular e a produção de radicais livres de oxigênio [27].

Os grânulos peroxidase negativos possuem o citocromo p22/gp91phox (citocromo b₅₅₈) que é transferido para a membrana plasmática ou fagossomal na ativação do neutrófilo. Após essa translocação, o citocromo funciona como um carregador de elétrons na montagem do complexo multienzimático NADPH-oxidase, responsável pela produção de ROS na explosão respiratória oxidativa [27].

A lactoferrina é uma glicoproteína de 78kDa, predominantemente estocada nos grânulos específicos, ativa contra bactérias Gram negativas e positivas devido à sua propriedade de impedir o crescimento bacteriano por seqüestro de ferro [28].

Também é encontrada nos grânulos específicos, uma proteína antimicrobiana de 25-kDa, chamada de lipocalina associada à gelatinase (NGAL), não sendo produzida apenas por neutrófilos, mas também por uma variedade de tecidos normais e inflamados [29]. A lisozima é um peptídeo antimicrobiano de 14kDa que está presente em todos os tipos de grânulos, com um pico de concentração nos grânulos específicos, em concordância com o seu perfil biossintético [30].

1.5.3. Vesículas secretórias

Essas vesículas constituem uma reserva de receptores associados à membrana, que são úteis nas primeiras fases da resposta inflamatória, mediada por neutrófilos. Elas são mobilizadas em resposta a uma ampla variedade de estímulos como: fMLP, PMA, GM-CSF, IL-8, LT-B4, PAF e TNF- α [12, 31]. As membranas de vesículas secretórias

são ricas em β 2-integrinas Cd11b/CD18 (Mac-1, CR-3), receptor de complemento 1 (CR1), receptores para peptídeos bacterianos, receptor de LPS (CD14), receptor Fc γ III (CD16) e leucolisina, as quais são incorporadas à membrana plasmática após a exocitose. A mobilização dessas vesículas é acompanhada de aparecimento de L-selectina na superfície do neutrófilo. Estas mudanças na membrana plasmática, induzidas pela incorporação das vesículas secretórias, permitem ao neutrófilo estabelecer firme contato com o endotélio vascular ativado para alcançar o sítio inflamatório.[13]

1.5.4. Mecanismos de Degranulação: estímulos com fMLP e PMA

A mobilização dos subtipos de grânulos depende da propensão de cada um para a exocitose. Como regra, os grânulos formados em estágios mais tardios da mielopoiese têm um maior potencial secretório que os grânulos formados em precursores mielóides mais imaturos. As vesículas secretórias têm maior facilidade para liberação extracelular seguido por grânulos de gelatinase, específicos e azurófilos [12, 26]. A estimulação “in vitro” de neutrófilos, em concentrações nanomolares de mediadores inflamatórios como o fMLP, leva a uma rápida e completa descarga de vesículas secretórias, sem significativa liberação dos outros grânulos. Já a estimulação com agonistas mais poderosos, como o PMA, induz a liberação exaustiva de grânulos de gelatinase, moderada liberação de grânulos específicos e pouca degranulação de azurófilos [22, 32].

A degranulação hierárquica dos grânulos pode ser reproduzida “in vitro” pela gradual elevação dos níveis de cálcio intracelular[12]. Vários estímulos têm mostrado a indução de um aumento de cálcio citosólico, incluindo a ativação direta de proteína cinase C por PMA e a ligação de L-selectina, β 2 integrina e fMLP aos seus receptores [12, 33]. A ligação de β 2 integrinas induz ativação de tirosina cinase citoplasmática, que fosforila e ativa uma série de proteínas incluindo fosfolipase C γ 2 e fosfolipase D [34-36]. Estas fosfolipases catalisam a quebra de fosfatidil-inositol e fosfatidilcolina e a geração de inositol-3fosfato, diacilglicerol e ácido fosfatídico. Estes metabólitos gerados também ativam a proteína cinase C (PKC) que induz a liberação do cálcio intracelular armazenado e o influxo do cálcio extracelular através da membrana plasmática.[36-38]

1.5.5. Fusão de grânulos com as membranas

Na degranulação, as vesículas secretórias e os grânulos são capazes de se fundirem com a membrana plasmática, quando as células são ativadas por agonistas solúveis. Entretanto, durante o engolfamento de partículas, a fusão fica restrita à membrana dos fagossomos. Provavelmente, alguns mecanismos devem existir para garantir a direcionabilidade e a especificidade desses eventos de fusão [10].

As anexinas são proteínas que se ligam a fosfolipídeos e fazem o intermédio entre a agregação vesicular e a fusão com a membrana quando expostos a altas concentrações de cálcio. Várias anexinas têm sido identificadas em neutrófilos e parecem promover eventos de fusão granular “in vitro” dependentes cálcio [39].

Alem disso, o cálcio pode regular interações entre SNAREs, *soluble n-ethylmaleimide-sensitive-fusion-protein-attachment protein receptor*, que são componentes de um maquinário de brotamento vesicular e fusão. Pensa-se que um SNARE (receptor protéico de fusão) em uma membrana doadora interage com um SNARE cognato da membrana alvo. Então ocorre a formação de um complexo estável, consistindo de quatro hélices, montadas pelos dois SNAREs. Esse complexo tetraédrico faz com que as duas membranas se unam, promovendo a fusão. Embora os SNAREs sejam importantes mediadores dos eventos de fusão em membranas, o grau de especificidade de suas interações permanece questionável. Acredita-se que a família Rab das GTPases, em especial, Rab5, complete esse papel juntamente com os SNAREs, conferindo uma camada extra de especificidade para a união das membranas doadora e alvo [10].

Muitos SNARES foram identificados recentemente no neutrófilo, incluindo a proteína 2 associada a vesículas (VAMP-2) e proteína de membrana carreadora secretória (SCAMP), encontradas nas membranas de vesículas secretórias, grânulos de gelatinase e específicos[40]. VAMP-2 está presente predominantemente na membrana de vesículas secretórias e, em menor extensão, nas membranas de grânulos secundários e terciários, sugerindo-se que a densidade de VAMP2 corresponde ao potencial exocítico de diferentes vesículas [41].

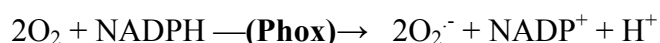
A geração de radicais livres de oxigênio durante a explosão respiratória e a degranulação são eventos preferencialmente destinados à liberação de produtos microbicidas no interior do fagossomo. Contudo a secreção destes produtos pode começar antes do fagossomo estar completamente fechado, e alguns radicais de

oxigênio e enzimas granulares podem escapar para o meio extracelular. Em alguns casos, quando o neutrófilo não consegue fagocitar a partícula, ele pode secretar esses produtos para o espaço extracelular, podendo causar danos aos tecidos adjacentes. Durante a fagocitose, eventos intracelulares induzem a fusão de grânulos com a membrana plasmática, de forma a ocorrer a exocitose das enzimas. A degranulação e a produção de radicais livres de oxigênio, são minimamente detectadas em neutrófilos, na ausência de estímulos [1].

1.6. NADPHoxidase

Em neutrófilos, monócitos e macrófagos, outro dispositivo antimicrobiano, além da fagocitose, contribui para uma defesa prolongada e efetiva. Esse mecanismo oxidativo emprega espécies reativas de oxigênio (ROS) e de nitrogênio (RNS), que são gerados a partir do ânion superóxido produzido pelo complexo NADPHoxidase. As partículas fagocitadas são internalizadas nos fagossomos, onde os ROS e RNS são usados como microbicidas [1]. A catálise da redução da molécula de oxigênio em ânion superóxido, é dependente de uma contínua redução de NADP em NADPH que é gerada às custas de um marcante aumento da glicólise pela via das pentoses [3].

As NADPHoxidases são um grupo de enzimas associadas a membranas encontradas em uma variedade de células de origem mesodermal. As mais amplamente estudadas são as leucocitárias, que se encontram nos fagócitos e linfócitos B. O complexo NADPHoxidase, catalisa a produção do anion superóxido O_2^- , pela redução do oxigênio, tendo o NADPH como doador de elétrons [3].



O complexo NADPH oxidase possui componentes ligados à membrana e também citosólicos, que são requeridos para sua ativação. A fração membranar, chamada de flavocitocromo b558, é constituída das proteínas p22phox e gp91phox. Já os componentes citosólicos p47phox, p67phox, p40phox, e Rac2 precisam translocar-se para a membrana durante a ativação do complexo [42].

Após a fagocitose, se inicia o processo da montagem do complexo NADPH oxidase e essas células começam a explosão respiratória, caracterizada pelo rápido aumento no consumo de glicose e de oxigênio molecular, utilizados na produção intensa de radicais livres de oxigênio, altamente reativos, incluindo o ânion superóxido, peróxido de hidrogênio, radical hidroxila e ácido hipocloroso [43].

O radical superóxido inicialmente gerado é transformado espontaneamente em peróxido de hidrogênio, por dismutação ou pela ação enzimática da superóxido dismutase (SOD) conforme a reação: $O_2^{\cdot -} + O_2^{\cdot -} + 2H^+ \xrightarrow{\text{(SOD)}} H_2O_2 + O_2$

O peróxido de hidrogênio também pode reagir com o ion superóxido, na presença de um metal de transição, geralmente ferro ou cobre, originando o radical hidroxila. $O_2^{\cdot -} + H_2O_2 \xrightarrow{(\text{Fe}^{2+} \text{ ou } \text{Cu}^{2+})} OH^\circ + OH^- + O_2$

A mieloperoxidase (MPO) liberada de grânulos azurófilos catalisa a transformação de H_2O_2 , na presença de halogênios, em produtos altamente tóxicos como o ácido hipocloroso. $H_2O_2 + H + Cl^- \xrightarrow{\text{(MPO)}} HOCl + HO$

Outras reações também podem ocorrer levando a formação de outros radicais de oxigênio e de cloraminas tóxicas, altamente eficazes contra os microorganismos fagocitados [43].



Vários radicais de nitrogênio também são formados por sua reação com radicais superóxido. Por exemplo, o $\cdot NO$, reage com $O^{\cdot -}$, produzindo um potente oxidante, o peroxinitrito $ONOO^-$ [44]. O íon nitrito também tem sido mostrado como um substrato para várias peroxidases, incluindo a MPO, a qual produz um agente fortemente oxidante, o dióxido de nitrogênio (NO_2). O íon nitrito também pode reagir com HOCl para formar espécies transitórias como NO_2Cl , que reagem com anéis fenólicos [45].

Em neutrófilos não ativados, o sistema Phox permanece dormente, sendo ativado após exposição das células a um estímulo infeccioso ou inflamatório. A fosforilação dos componentes citosólicos p47phox, p67phox, p40phox e p22phox, além da dissociação de Rac de sua proteína inibitória, e a posterior ligação aos componentes de membrana, resultam na ativação do complexo e produção de ROS [42].

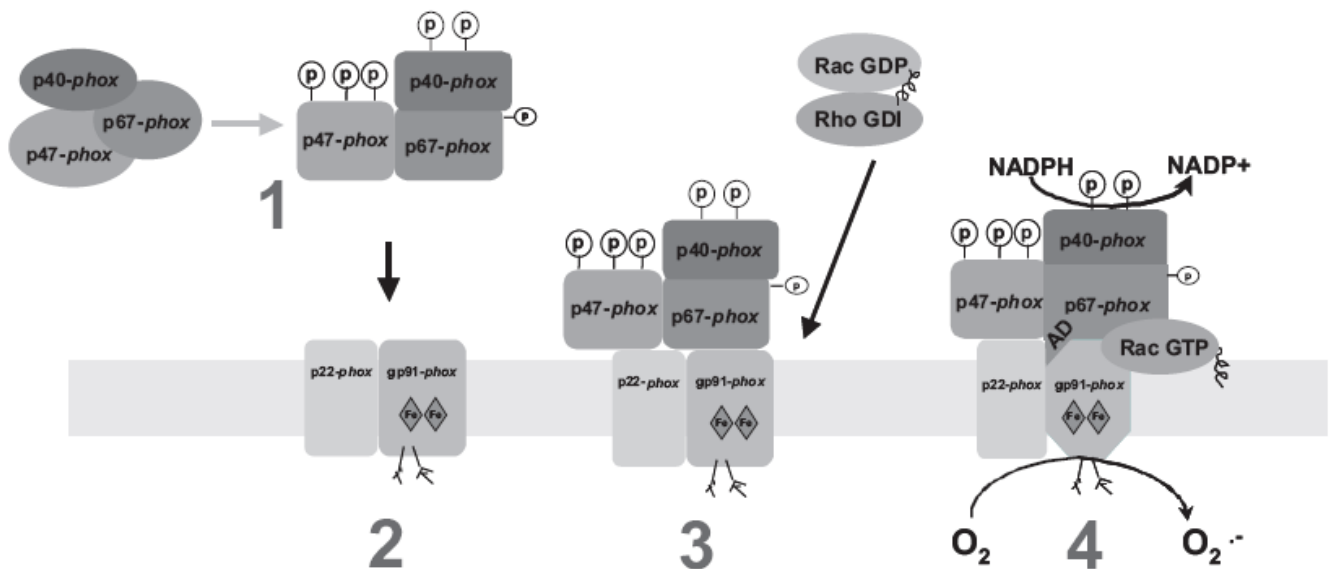


Figura 4. Ativação da NADPHoxidase: Os componentes p47phox, p67phox e p40phox são fosforilados após ativação celular (1), e migram para a membrana onde se associam aos componentes gp91phox e p22phox (2). Ao mesmo tempo, Rac se dissocia de seu inibidor rho-GDI e migra para a membrana (3). O citocromo b558 é ativado pelo domínio de ativação (AD) e Rac2 promove a interação entre p67phox e o citocromo (4). NADPHoxidase ativada usa o NADPH para reduzir o oxigênio e produzir ânions superóxido. [43]

1.6.1. Flavocitocromo b558

É o componente de membrana central da NADPHoxidase, composto de duas subunidades, gp91phox e p22phox. A subunidade gp91phox contém um FAD e dois grupos heme onde ocorre a transferência de elétrons durante a oxidação. A gp91phox é considerada como a molécula transferidora de elétrons enquanto os outros componentes do complexo NADPHoxidase são chamados de regulatórios. Um modelo do fluxo de elétrons no flavocitocromo tem sido proposto por Nisimoto e colaboradores (1999) [46].



1.6.2. p47phox

É o componente responsável pelo transporte da fração citossólica para a membrana, e também é o organizador das subunidades do complexo, durante a ativação. Essa subunidade é fortemente fosforilada, enquanto o p40phox é fracamente fosforilado durante a ativação. [43]

1.6.3. p67phox

Associa-se fortemente com o citoesqueleto e é fosforilado durante a estimulação, mas em menor extensão que o p47phox. P67phox interage com Rac1/2 e com o citocromo b558, podendo regular sua atividade catalítica através de uma sequência chamada domínio de ativação[46]. Esse mecanismo de regulação ainda não é bem conhecido, mas acredita-se que o domínio de ativação presente na p67phox ative diretamente algum passo na transferência de elétrons entre o NADPH e o FAD. Nisimoto et al (1999) sugere que p67phox favoreça a transferência de um hidreto do NADPH para a flavina [46]. Sheppard e colaboradores (2005) também indicam a presença de um sítio catalítico para transferência de elétrons do NADPH para o FAD na subunidade p67phox [47].

1.6.4. Rac2

Após ativação, Rac 2 é convertida do estágio de ligação ao GDP para GTP, dissociando-se do seu inibidor Rho-GDP e migrando para a membrana. Rac2 liga-se diretamente ao p67phox na membrana, mas não se liga ao p40phox ou p47phox. Recentemente identificou-se que Rac2 é essencial para a produção de O_2^- , quimiotaxia e arrançamento de F-actina [47].

A importância vital dessa enzima é ilustrada por uma doença genética chamada “doença granulomatosa crônica” (DGC), a qual é associada a um aumento na susceptibilidade do indivíduo a infecções fúngicas e bacterianas, na qual alterações genéticas levam à redução na produção de ROS. A excessiva liberação de ROS também pode causar danos aos tecidos adjacentes, amplificando as reações inflamatórias[43].

1.6.5. Ativação da NADPHoxidase

Em neutrófilos não ativados, 15% do citocromo b558 está localizado na membrana plasmática, e 85% na membrana de grânulos específicos e vesículas secretórias, que são translocados para a membrana plasmática durante a ativação[47].

Após um estímulo, as subunidades p47, p67 e p40 interagem para formar a fração citossólica. Durante a ativação, aproximadamente 10% dessas proteínas migram para a membrana plasmática [43].

Em condições normais, uma região autoinibitória de p47phox impede sua ligação ao p22phox e Rac é mantida ligada a uma proteína inibitória RhoGDP. Vários relatos sugerem que a fosforilação de p47phox induz mudanças conformacionais que descobrem o sítio de ligação para o flavocitocromo. P47phox age então como um adaptador, facilitando também a interação de p67phox e de p40phox com p22phox [48].

Além disso, p22phox forma um complexo estabilizante com gp91phox (citocromo b558) e sua região carboxi-terminal possui um sítio, rico em prolina, para ligação de p47phox. O flavocitocromo b558 é inativo em neutrófilos não estimulados, mas torna-se ativado quando as células são expostas a microorganismos ou mediadores inflamatórios resultando na ligação das subunidades citossólicas ao citocromo [49]. O domínio de ativação de p67phox ativa a transferência de elétrons do NADPH para o FAD, sendo a etapa determinante da produção de superóxido. Essa etapa protege contra ativação acidental da oxidase [49]. Embora o entendimento da estrutura da NADPHoxidase tenha avançado substancialmente, os mecanismos de ativação, montagem e fosforilação dos componentes são pouco conhecidos.

Alguns estudos sugerem que isoformas diferentes de PKC podem ativar dois *pools* da NADPHoxidase, um intracelular, na membrana dos grânulos e o outro localizado na membrana plasmática. Verificou-se que as duas frações da oxidase são dependentes de de ERK/MAP cinase e fosfatase 1 e/ou 2, porém apenas a fração intracelular foi dependente de IP3 cinase [50].

1.6.6. Disfunções na Explosão Respiratória

1.6.6.1. Doença Granulomatosa Crônica

A doença granulomatosa crônica (DGC) é uma rara deficiência na produção ROS, causada por mutações genéticas dos componentes da NADPHoxidase. Mutações no gene da gp91phox, situado no braço curto do cromossomo X, são responsáveis por 60 a 65% dos casos de DGC. O restante dos 35% dos pacientes apresenta uma herança autossômica recessiva de mutações nos genes p47phox, p22phox ou p67phox [51, 52].

Pacientes com mutações no gene da gp91phox apresentam geralmente 30% da capacidade total de produção de ROS [53].

A DGC é caracterizada clinicamente por severas e recorrentes infecções fúngicas e bacterianas, difíceis de tratar pelos meios convencionais. Essas infecções predominam nos linfonodos, tecidos subcutâneos, pulmões e fígado. Ocorrem também manifestações gastrintestinais como diarreia, abscessos perianais e obstruções devido à formação de granulomas. Essa doença é reconhecida ainda na infância, geralmente nas crianças ainda menores de dois anos [52].

1.6.6.2.ANCAs

Há evidências de que anticorpos citoplasmáticos anti-neutrófilos (ANCA), produzidos em algumas doenças autoimunes como a vasculite, induzem uma adesão prolongada dos neutrófilos ao endotélio e ativam a produção de radicais livres, causando danos aos tecidos. Ocorre também uma desregulação da apoptose e uma ineficiente remoção dessas células pelos macrófagos. Todos esses fatores contribuem para uma lesão tecidual associada à doença inflamatória [54].

Os ANCA pertencem a um grupo de anticorpos, direcionados para proteínas citoplasmáticas de neutrófilos e monócitos. Eles têm sido descritos em várias doenças incluindo vasculites sistêmicas idiopáticas, doenças do tecido conjuntivo, algumas infecções e doenças autoimunes. Esses anticorpos reconhecem como antígenos a proteinase 3, MPO, catepsina G, lactoferrina, BPI e algumas outras proteínas do neutrófilo[55]. Os mecanismos de ação desses anticorpos ainda são pouco conhecidos. Um modelo em camundongos indica que após estímulo de neutrófilos com citocinas ocorre translocação de proteinase 3 e MPO para a membrana celular. Então os ANCA-PR3 e ANCA-MPO se ligam a essas proteínas e ativam os granulócitos, desencadeando uma prematura degranulação e causando danos endoteliais [56]. Além disso, Radford (1999) e colaboradores verificaram a translocação de PKC β II após ativação com ANCA e sugeriram que tirosina cinases e PKC β II, induzem a produção de O $_2^{\cdot-}$ em neutrófilos ativados com ANCA de pacientes com vasculite sistêmica [57].

1.6.6.3.SIRS, SARA e SDMO

Várias pesquisas realizadas nos últimos anos tentam explicar a evolução inesperada de pacientes com trauma grave, representada por grande destruição tecidual, choque hemorrágico, dentre outras características, devido a uma ativação inadequada

ou exagerada da resposta inflamatória. Várias substâncias são produzidas nesse contexto, destacando-se as citocinas, radicais superóxido, produtos de degradação de membrana celular como leucotrienos e PAF. Essas substâncias ativam células da resposta inflamatória como os monócitos/macrófagos, neutrófilos e as células endoteliais, que passam a expressar receptores de membranas diversos e a produzirem mais substâncias ativadoras dessas e de outras células da resposta inflamatória. Desencadeia-se assim, no organismo, uma resposta inflamatória intensa e difusa (sistêmica), que se expressa clinicamente como a Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica (SRIS), que muitas vezes escapa ao controle exercido pela auto-regulação natural do organismo e passa a causar lesão de tecidos e órgãos. Inicialmente, o órgão mais frequentemente acometido é o pulmão, onde se observa infiltrado pulmonar difuso, associado à insuficiência respiratória, quadro este denominado Síndrome da Angústia Respiratória Aguda (SARA) [58].

Dada a função natural dos neutrófilos na defesa do organismo, seu papel na SRIS parece contraditório, e é explicado como resultado de uma hiperatividade, não controlada, que se torna prejudicial ao organismo. Tal ação está diretamente relacionada à estimulação de polimorfonucleares, levando à iniciação de diversas vias metabólicas, à expressão de receptores de membrana e à produção de radicais livres, de proteases e de citocinas que dão prosseguimento à ativação de mais neutrófilos, num ciclo vicioso que, somadas às ações das demais células inflamatórias, podem levar à Síndrome da Disfunção de Múltiplos Órgãos (SDMO) [59].

1.7. Estimulação e Ativação do Neutrófilo na Resposta Inflamatória

Devido à sua capacidade de fagocitose, produção de ROS, enzimas e peptídeos com grande poder microbicida, os neutrófilos podem ser classificados como células efetoras na destruição de microrganismos. Porém, eles são considerados de ação indiscriminada, pois têm pouca ou nenhuma capacidade de realizar uma inibição seletiva de suas respostas específicas. Entretanto, torna-se evidente que as respostas do neutrófilo devem ser finamente moduladas, já que a resposta inflamatória é limitada. Os fatores implicados nessa função modulatória são conhecidos como agentes

estimulatórios, nos quais se incluem diversas citocinas e formil peptídeos. Assim, a habilidade desses agentes em modular uma resposta gradativa permite à célula responder proporcionalmente à severidade do estímulo [60].

Inicialmente, acreditava-se que o padrão para uma resposta do neutrófilo era a ativação completa. Ou seja, após a ação de um estímulo apropriado, o neutrófilo que circulava no sangue seria atraído a um sítio de infecção e ativado totalmente. Esse processo envolveria a polarização morfológica da célula e subsequente quimiotaxia, fagocitose, produção de radicais tóxicos de oxigênio, e liberação de enzimas granulares no meio extracelular. Mais tarde, outros estudos evidenciaram que a ativação não correspondia a um processo “tudo-ou-nada” e introduziram alguns conceitos complementares de ativação [60].

Atualmente, a ativação é reconhecida como um processo que ocorre em um gradiente contínuo, observado em dois estágios [61]. Os neutrófilos primeiramente sofrem um estímulo que não os ativa diretamente, mas que os leva a um estado estimulado. Quando esses neutrófilos estimulados encontram um segundo estímulo apropriado, um estado completamente ativado é alcançado. De modo geral, o agente estimulatório por si só não promove uma resposta funcional notória, exceto quando está em elevadas concentrações, fato que leva a célula do estado normal ao estado de completa ativação, diretamente [60].

Além disso, foi evidenciado que os neutrófilos estimulados podem retornar ao estado de repouso. Porém, uma vez chegado ao estado ativado não há retorno ao estado inicial [62].

Atualmente, acredita-se que os neutrófilos possuam três fenótipos diferentes, classificados como quiescente, estimulado e ativado, como mostra a figura 5. O primeiro é visto na ausência de estímulos, em que os PMNs circulantes se mostram não aderentes ao endotélio e sem alterações na expressão de receptores de membrana. Estímulos pró-inflamatórios podem deixar as células num estágio de estimulação, induzindo sua aderência ao endotélio e aumentando a expressão de moléculas de adesão. Então essas células podem voltar ao estado quiescente ou sofrer um segundo estímulo, para que alcancem a completa ativação. Neutrófilos estimulados mostram-se mais sensíveis à degranulação e à ativação da NADPH oxidase após a ação um segundo estímulo. Agentes estimuladores que não despertariam essas funções no neutrófilo quiescente conseguem desencadeá-las no neutrófilo estimulado. Os neutrófilos completamente ativados além de apresentarem capacidade de aderir firmemente ao

endotélio, também realizam a diapedese, chegam ao sítio de infecção e iniciam a fagocitose e a explosão respiratória [47].

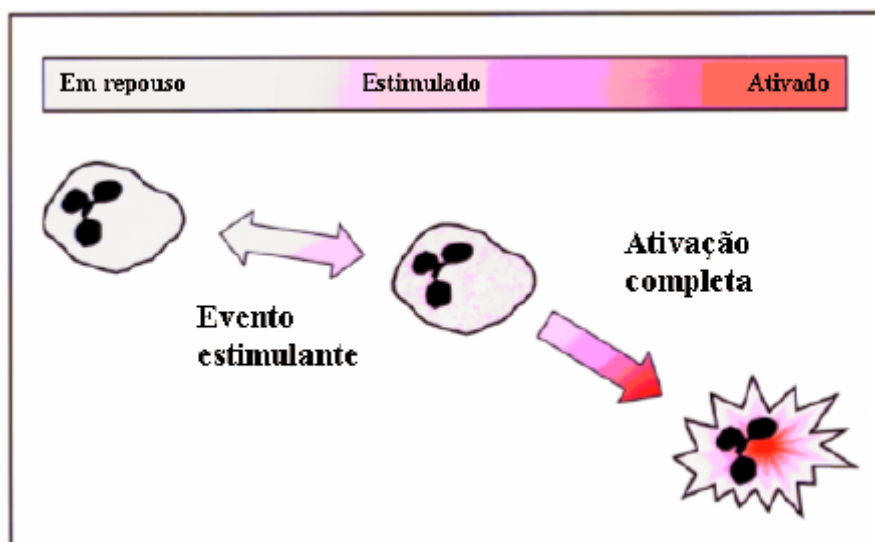


Figura 5. Ativação do polimorfonuclear em um processo contínuo caracterizado por dois estágios. Através de uma série de estímulos ele pode alcançar o estado estimulado e voltar a seu estado de repouso, caso não receba um segundo estímulo. Na oportunidade de receber esse estímulo posterior, a célula passa do estado estimulado para outro – ativado, sem possibilidade de retorno ao estado anterior. Modificado a partir da referência [60].

Botha, et al, 1995, realizaram alguns testes *in vitro* com os ativadores PAF, fMLP, PAF + fMLP e PMA para se verificar o perfil de ativação neutrofílica pela explosão respiratória frente a diferentes estímulos. Foi verificado que o fator de agregação plaquetária, PAF, é um fraco ativador da explosão respiratória. Acredita-se que esse fator apenas deixe o neutrófilo num estado de estimulação, não alcançando o estado completamente ativado. O fMLP em baixas concentrações também exerceu função semelhante ao PAF na geração de ROS. Já o estímulo com PAF seguido de fMLP, deixou a célula num estágio estimulado e, após o segundo estímulo, o estágio completamente ativado foi alcançado. Em contrapartida, a ativação com 1 $\mu\text{mol/L}$ de PMA levou o neutrófilo a uma completa ativação sem passar pelo estado intermediário de estimulação [59].

A estimulação com PMA em doses mais baixas também já foi verificada por Siddiqui, e colaboradores, 1995. Eles demonstraram que o PMA na concentração subestimulatória de 1 nmol/L , induziu uma pequena produção de superóxido, que foi potenciada após um estímulo secundário com ácido fosfatídico [63].

Um outro estudo de ativação *in vitro* também mostrou que TNF α é um fraco ativador da explosão respiratória e da degranulação. Porém quando se adicionou partículas de *Saccharomyces cerevisiae* (zimosan), houve um aumento significativo da produção de peróxido de hidrogênio, fagocitose e degranulação. Esses autores sugerem que o TNF α atua estimulando a aderência ao endotélio e às partículas fagocitadas, aumentando assim a capacidade fagocitária do neutrófilo [64]. As vias de ativação envolvidas na estimulação inicial por TNF α ainda não são bem conhecidas. Além disso, é muito difícil distinguir quais vias sinalização estão envolvidas no estado estimulado e no estado completamente ativado do neutrófilo. Forsberg et al (2001) verificaram que a estimulação prévia de neutrófilos com TNF α , induz um aumento de três vezes no número de receptores CR3 na membrana, indicando ser esse um dos possíveis mecanismos pelo qual a fagocitose é aumentada após estimulação com TNF α [65]. Um outro estudo também mostrou que a adição de EGF (*epidermal growth factor*) a neutrófilos estimulados com TNF α resultou em um aumento da explosão respiratória e da capacidade fagocitária além de uma maior expressão de receptores C3 [66]

Lipopolissacarídeo (LPS) extraído de uma cepa virulenta de *Burkholderia cepacia*, também foi usado como agente estimulador de neutrófilos induzindo aumento da expressão de CR3 e β 2-integrina. Ele também foi capaz de deixar o neutrófilo num estado de estimulação inicial, para posterior ativação com o segundo estímulo fMLP, induzindo um aumento significativo da explosão respiratória [67].

1.8. O PMA e o Neutrófilo

O PMA é um éster de forbol análogo do diacilglicerol, muito utilizado como controle positivo de ativação “*in vitro*” em experimentos com neutrófilos humanos. Os ésteres de forbol são produtos naturais isolados de *Croton tiglium* e de outras plantas da família **Euphorbiaceae**. Eles são encontrados nas sementes dessa planta e são os principais produtos obtidos da extração do óleo das sementes de cróton. Esse óleo tem grande poder tóxico sobre a pele e olhos, causando dermatites e conjuntivites com intensa reação inflamatória. Quando ingerido induz grande ação laxativa e a fumaça originada da queima do óleo também tem ação irritante sobre os olhos. Os ésteres de

forbol, sobretudo o PMA, são os responsáveis pelas características tóxicas das sementes e do óleo de cróton [68].

O PMA é um mediador solúvel que atravessa a membrana plasmática e ativa diretamente isoformas de PKC intracelulares. Esse agente não induz a explosão respiratória em baixas doses, mas em altas concentrações (100nM - 1µM) induz diretamente uma liberação máxima de ROS [59].

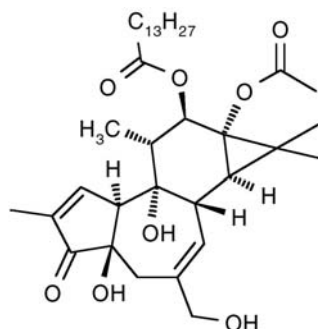


Figura 6. Estrutura molecular do 12-miristato,13-acetato de forbol (PMA)

1.8.1. PKC estrutura, família e função

A proteína cinase C (PKC) faz parte de uma família de proteínas serina/treonina cinases e sua ativação medeia inúmeras respostas intracelulares. Essa enzima participa de várias funções no neutrófilo, como ativação da NADPHoxidase, remodelamento do citoesqueleto de actina e degranulação [69, 70]. A forma ativada da PKC fosforila os resíduos de serina e treonina de suas proteínas-alvo, sendo que as histonas, as MARCKS (myristoylated, alanine-rich C kinase substrate) e a MAP cinase-cinase-cinase (Raf) são seus substratos mais conhecidos. A translocação da PKC para o local específico relacionado à sua função difere bastante entre as isoformas.

Onze isoenzimas de PKC foram identificadas em mamíferos e podem ser divididas em três famílias de acordo com o mecanismo de regulação por cálcio, fosfolípídeos e DAG (figura 7). As cPKCs, ditas *convencionais*, envolvem as isoformas α , β I, β II e γ , são dependentes de cálcio e ativadas por PMA ou DAG. Contudo, as PKCs classificadas como *novas* (PKC δ , ϵ , η e θ) são independentes de cálcio, mas ativadas por DAG. Já as cinases *atípicas*, que correspondem às isoformas ζ e ι , não respondem ao cálcio, PMA ou DAG, porém, como todas as isoformas de PKC, requerem fostatidilserina para ativação máxima. Diferenças na distribuição pelos tecidos, localização intracelular e atividade enzimática sugerem uma função celular

específica para cada isoforma de PKC. Até o momento já foram descritas cinco isoformas de PKC no neutrófilo humano, α , β I, β II, δ e ζ [57].

Ao longo dos anos, diferentes grupos de pesquisa vêm estudando os mecanismos de regulação da atividade da PKC. Essa proteína é composta de 2 subunidades: a) subunidade regulatória que apresenta os domínios C1, responsável pela ligação com o diacilglicerol (DAG) e com o éster de forbol (PMA), e o C2, responsável pela ligação com o cálcio; e b) a subunidade catalítica altamente conservada dentre as diferentes isoformas, que apresenta os domínios C3 e C4 responsáveis pela ligação do ATP e do substrato, respectivamente [71].

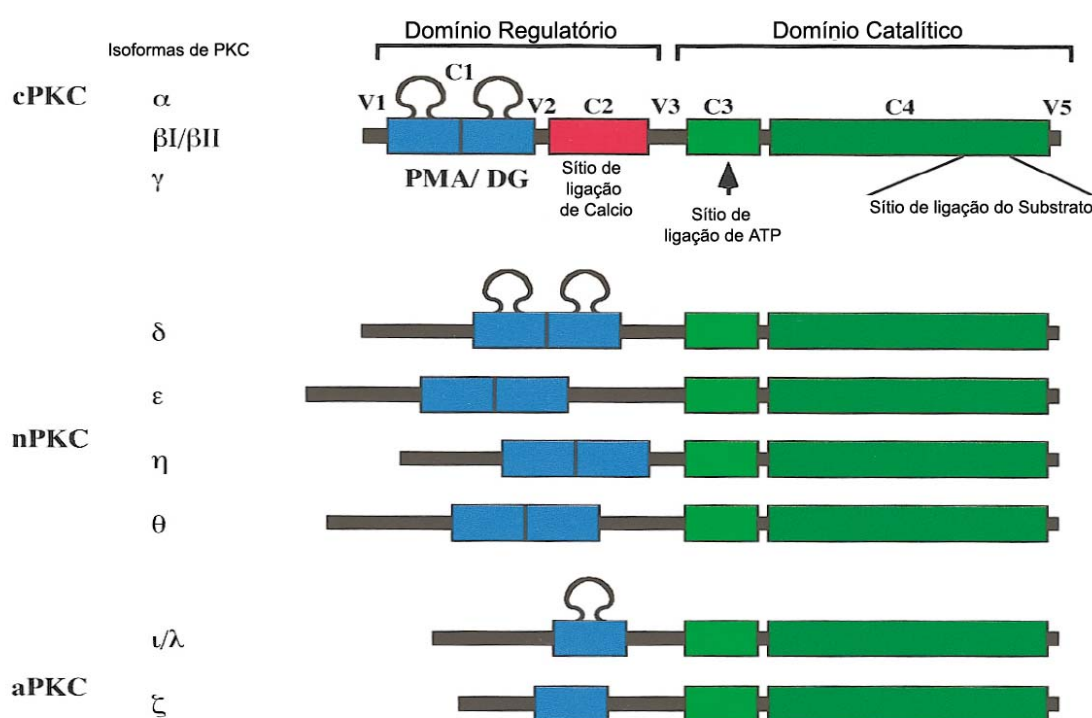


Figura 7. Esquema da estrutura primária das diferentes isoformas da PKC, mostrando o domínio catalítico, com sítio de ligação para o ATP e para os substratos da cinase; e o domínio regulatório de ligação para PMA/DAG e cálcio. Modificado a partir da referência [71].

Os cofatores clássicos que regulam a enzima alostericamente são: fosfatidilserina, cálcio e ésteres de forbol/DAG. A ligação da DAG ou ésteres de forbol ao domínio C1, favorece a ligação de fosfatidilserina a esse domínio e causam um aumento significativo na afinidade de PKC por membranas, facilitando sua translocação citosólica para as membranas. Esses dois cofatores regulam PKC pelo mesmo mecanismo, contudo eles têm efeitos biológicos diferentes, pois a ativação iniciada por DAG e o recrutamento para as membranas é rápida, já que DAG tem uma

meia vida curta, sendo inativado velozmente. Em contraste, ésteres de forbol não são metabolizados rapidamente e resultam numa constitutiva ativação de PKC. Além disso, o PMA é duas vezes mais potente que o DAG e aumenta em 4 vezes a afinidade de fosfatidilserina pelo domínio C1. A ligação do cálcio ao domínio C2 causa um aumento na afinidade de PKC por lipídeos aniônicos de membranas, devido à atração do cátion Ca^{+2} pelos lipídeos de carga negativa [72].



Figura 8. Domínio C1 da PKC δ ligada ao PMA. A ligação de um éster de forbol cobre um sítio hidrofílico do domínio C1 e cria uma superfície hidrofóbica de interação com a membrana. Modificado a partir da referência [72].

1.8.2. Interação com o endotélio após ativação com PMA.

Quando o neutrófilo é exposto ao PMA, rapidamente ocorre um aumento da adesão ao endotélio, mesmo que este não esteja ativado. Essa interação parece ser mediada pela ativação das $\beta 2$ integrinas, LFA-1 e Mac-1. Sugere-se que o aumento da adesão via $\beta 2$ integrinas decorre de um aumento da avidéz destas moléculas por seus ligantes. A fosforilação de Mac-1 por PMA, via PKC convencionais, tem sido proposta para explicar essa mudança de afinidade. Esse aumento na afinidade é independente do nível de integrinas expresso na superfície celular. CD11b é constitutivamente fosforilada, enquanto a fosforilação da subunidade beta (CD18) tem sido demonstrada em resposta ao PMA [8].

A fosforilação de Mac-1 (CR3) também se correlaciona cineticamente com um aumento de afinidade pelo iC3b. A ativação do complemento desempenha uma importante função na amplificação da resposta inflamatória devido à opsonização, estimulação da quimiotaxia e ativação dos demais leucócitos. Um segundo aspecto da regulação dos recetores de complemento por PMA é a competência fagocítica. Há um aumento de trinta vezes na capacidade de promover fagocitose, via CR1 após ativação por PMA [8].

1.8.3. Montagem de actina e quimiotaxia em neutrófilos ativados com PMA

Downey e colaboradores (1992), hipotetizaram que a polimerização da actina em resposta ao PMA pode ser mediada pela ativação das isoformas novas, nPKC. Este grupo verificou que em neutrófilos humanos ativados com 10^{-8} mol/L de PMA há uma expressiva reorganização de F-actina localizada difusamente no citoplasma para agregados situados nas áreas de enrugamento na membrana.[70]

A exposição de neutrófilo a ésteres de forbol induz um enrugamento por toda a membrana plasmática, suprimindo a polaridade e originando movimentos randômicos que afetam diretamente a motilidade celular. Porém, mesmo em altas concentrações de PMA, demonstrou-se que estas células não perderam sua resposta à quimiotaxia. Estes autores sugerem que a morfologia polar e a distribuição de actina produzida por peptídeos quimiotáticos favorecem a locomoção, enquanto os movimentos não polares produzidos por PMA podem ser mais favoráveis à adesividade e a outras funções como a fagocitose e a pinocitose [73].

1.8.4. Ativação da NADPHoxidase após ativação com PMA

O complexo NADPHoxidase pode ser ativado em fagócitos por um grande número de fatores solúveis ou não, como formil peptídeos (fMLP), LTB₄, PAF, diacilglicerol(DAG), ionomicina, e ativadores de PKC, como o acetato de forbol miristato (PMA). A fosforilação de proteínas e a translocação dos componentes citosólicos para a membrana, são dois eventos que acompanham a ativação da NADPHoxidase. A montagem do complexo oxidativo é acompanhada da ativação de

muitas proteínas cinases, tais como, tirosinas cinases, PKA, PKC e MAP cinases, as quais fosforilam proteínas componentes do sistema NADPH oxidase [43].

Lodewijk V. Dekker et al. demonstraram que PKC- β é ativada nas mesmas condições de ativação da NADPH oxidase em neutrófilos. Utilizando inibidores específicos de PKC- β e ratos nocauteados para este isotipo de PKC, verificou-se que PKC- β contribui para a ativação da NADPH oxidase em resposta ao PMA e à ativação do receptor Fc γ . Em neutrófilos não ativados, PKC- β_I e β_{II} estão presentes predominantemente no citosol, mas são recrutados para a membrana plasmática em resposta ao éster de forbol. Esse trabalho também sugere que PKC- β contribui com 55% da ativação da oxidase por PMA, enquanto PKC- δ contribui com 30 a 40% da ativação. Juntas, PKC- β e PKC- δ contribuem com 90% da ativação da NADPH oxidase, em neutrófilos ativados por PMA [74].

Alem disso, Ana Karlsson, (2000) e colaboradores sugeriram que o PMA ativa dois *pools* distintos da NADPH oxidase, um localizado na membrana plasmática e outro nas membranas intracelulares dos grânulos. Eles demonstraram que a liberação extracelular do superóxido foi independente de IP3 cinase, enquanto a fração intracelular de ROS foi diminuída com a inibição de IP3 cinase. Ambos os *pools* foram dependentes de ERK/MAP cinase e fosfatase 1 e/ou 2 [50].

Brown e colaboradores (2003), também relataram a função de PKC- δ na geração intracelular de ROS pela montagem do complexo NADPH-oxidase em neutrófilos humanos ativados por PMA. [75].

Quando os neutrófilos são ativados com PMA ou fMLP, observa-se a fosforilação de p47phox no citosol e na membrana, que é inibida por inibidores de PKC, mas, em contraste, quando há ativação por GM-CSF a fosforilação parcial desse componente não é inibida por inibidores de PKC, e sim por inibidores de tirosina cinases e IP3 cinases. Isto sugere que a fosforilação de p47phox pode ser controlada por várias vias de sinalização e que muitas proteínas cinases podem participar deste processo [43]. Além disso, p67phox, p40phox e p22phox são fosforidadas por vias dependentes de PKC [76-78].

1.8.5. A via das MAPcinases e o PMA

As cascatas das *mitogen-activated proteins kinase* (MAPKs) são organizadas por uma sinalização que envolve três proteínas cinases: uma MAP cinase cinase cinase (MKKK), uma MAP cinase cinase (MKK) e uma MAPcinase. A ativação desta cascata leva à expressão de fatores de transcrição, regulando a atividade transcricional de vários genes envolvidos na proliferação, regulação do ciclo celular, diferenciação e apoptose. As três subfamílias mais bem caracterizadas das MAPKs são: p42/p44MAPK (ERK1/2), p38MAPK e JNK [79].

Estudos com fMLP e PAF sugerem que a ativação de MAPK é através de Ras, MKKK(Raf) e MEKK1, por ativação de um receptor de membrana acoplado a proteína G. Então ocorre a geração de pequenas moléculas que agem como segundos mensageiros e podem regular uma rede altamente interconectada de cinases, do receptor de membrana ao núcleo [80].

Existem relatos de que PKC α , β e γ ativadas estimulam Ras, que ativam *downstream* Raf1 e MEK1. Além disso, o PMA mostrou induzir parcialmente a ativação de p38MAPK na liberação de superóxido, indicando também que mecanismos independentes da ativação de p38MAPK podem mediar a liberação de ROS [81]. p38MAPK fosforila p47 e p67phox, durante a montagem do complexo NADPH oxidase, ocasionando a produção de ROS. A ativação de p38MAPK também induz quimiotaxia e adesão de neutrófilos, devido a ativação de uma proteína cinase 2 ativada por MAPK (MAPKAPK-2), que modula a polimerização de actina [81], conforme figura 9.

P42 MAPK fosforila diretamente PLA₂ citosólica, permitindo a liberação de ácido aracdônico para a síntese de prostaglandinas e leucotrienos. A ativação de PLA₂ também induziu um aumento da produção de ROS após ativação com PMA. Demonstrou-se ainda que o PMA induziu a translocação de PLC do citosol para as frações de membrana após sua fosforilação por ERK, por um mecanismo dependente de PKC. Por último, se verificou neste trabalho que ERKs podem ser ativadas por Ras e Raf-1 independentemente de PKC [82]. A ativação de MEKK, MEK e análogos pode ocorrer depois da ativação de PLC, PLD e PKC, ou alternativamente serem ativadas em paralelo aos mecanismos iniciais de ativação. A localização de PKC, PLA₂, PLC e PLD nas vias de ativação das MAPK ainda são controversas, apesar da fosforilação direta de PLA₂ e PLC por p42MAPK [83].

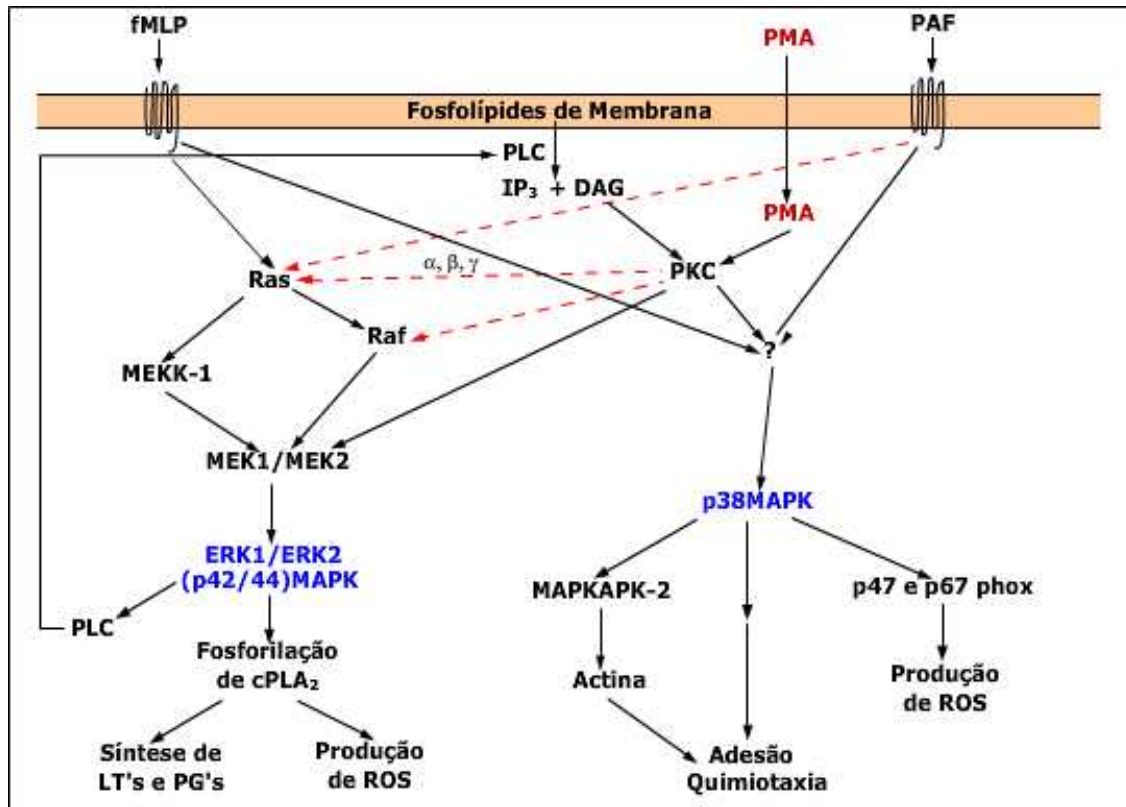


Figura 9. Vias de ativação das MAP cinases por PMA, PAF e fMLP. Setas em vermelho indicam mecanismos ainda não confirmados

1.9. Estratégias de estudo de mecanismos de ativação do neutrófilo

Apesar do importante papel do neutrófilo na resposta inflamatória, observa-se em algumas situações, uma hiperatividade não controlada que pode levar à síndrome da resposta inflamatória sistêmica e até mesmo à falência múltipla dos órgãos, com elevada taxa de mortalidade. As vias de sinalização do neutrófilo durante um processo inflamatório ainda são pouco conhecidas. Existem vários pontos obscuros no conhecimento dessas vias envolvendo os processos de estimulação e ativação de neutrófilos. Há uma grande dificuldade em se distinguir quais vias são ativadas, uma vez que, fisiologicamente, várias citocinas, formilpeptídeos e outras moléculas estão envolvidas ao mesmo tempo. Além disso, o interrelacionamento dessas vias dificulta o estudo de todas as funções celulares ativadas ou inibidas, durante ativação.

A estimulação *in vitro* com o PMA, permite que tenhamos uma melhor compreensão das vias de sinalização desencadeadas pela ativação das diversas isoformas de PKC, minimizando a interferência de outros agentes ativadores. A

abordagem proteômica permite a comparação simultânea de um grande número de proteínas, eliminando influências da variabilidade de expressão observada entre diferentes indivíduos e permite localizar proteínas diferencialmente expressas, bem como marcadores moleculares potencialmente aplicáveis a métodos diagnósticos.

1.10. Citometria de Fluxo

A citometria de fluxo é uma tecnologia, baseada no emprego de radiação laser, fluxo hidrodinâmico, ótica, substâncias fluorescentes (fluorocromos) e recursos de informática, utilizada para determinar algumas características estruturais e funcionais de partículas biológicas. Essas partículas biológicas entendem-se como vários tipos de células, protozoários, bactérias etc. Esta tecnologia é usada para determinar os componentes e propriedades de células e organelas celulares que fluem em uma suspensão celular. Os citômetros de fluxo têm como princípio básico aspirar células ou partículas de uma suspensão previamente preparada e forçá-las a passar por uma câmara especial (*flow cell*) que faz com que as células fiquem envolvidas e centralizadas num fluxo contínuo de líquido (*sheath fluid*) e saiam desta câmara uma atrás da outra de modo que uma única célula seja interceptada pelo laser. Uma vez interceptada pelo laser, dois tipos de fenômenos físicos ocorrem e fornecem informações acerca da célula.

Primeiro, uma parte da luz é espalhada (*scatter*) de acordo com as características morfológicas e estruturais da célula. O *Forward Scatter Cell* (FSC – célula de leitura de espalhamento frontal) se relaciona com o tamanho e o *Side Scatter Cell* (SSC – célula de leitura de espalhamento lateral) com a granularidade da célula ou partícula.

Segundo, as células previamente coradas com fluorocromos, uma vez excitadas pelo laser, emitem luz de acordo com suas características fluorescentes e são utilizadas para se examinar aspectos bioquímicos, biofísicos e moleculares das células. Uma série de lentes colocadas próximas desta zona de interceptação (célula-laser) coletam a luz emitida e enviam-na para tubos fotomultiplicadores (TFMs) que convertem o sinal luminoso em pulsos elétricos, os quais são proporcionais à quantidade de luz dispersa (FSC e SSC) ou fluorescente captada pelos TFMs.

O fotodiodo de detecção do FSC se localiza na mesma direção da incidência do laser, e define o tamanho celular pela quantidade de luz que tangencia a célula e chega ao detector. Já a granularidade é medida pela dispersão da luz que incide sobre a célula. O detector fica situado perpendicularmente (*side*) à direção de incidência do laser e capta os feixes desviados, conforme a figura abaixo [84].

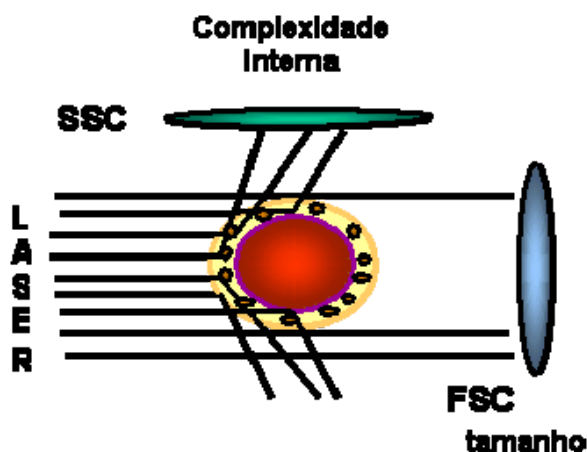


Figura 10. Análise das características físicas das células – tamanho e complexidade interna (granulosidade). FSC é medido em função da captação dos sinais luminosos do laser que tangenciam a célula e SSC é medido pela dispersão do laser incidente

Para a seleção e captação dos sinais luminosos, filtros óticos são usados para bloquear determinados comprimentos de onda da luz incidente e deixar passar somente a luz de comprimento de onda desejado. Eles são colocados em canais, direcionando a luz para os sensores TFM. Os filtros mais comumente usados são os de 488nm, que selecionam a luz azul, 530nm para detectar a fluorescência verde, 670 e 580 para filtrar as luzes vermelha e amarela respectivamente. Os sinais elétricos gerados pelos TFMs são amplificados, convertidos para a forma digital e enviados para um computador. A amostragem dos dados, as análises e a interpretação podem, então, ser realizadas através de *softwares* específicos. Cinco parâmetros são considerados básicos e podem ser medidos simultaneamente, são eles: tamanho celular (FS); granularidade interna das células (SS); fluorescência verde; fluorescência amarela; Fluorescência vermelha [85]. Existem aparelhos mais sofisticados com maior número de canais para a detecção de vários comprimentos de onda, para os mais variados fluorocromos.

Além de analisar células, alguns citômetros de fluxo têm a propriedade de separar uma população celular de acordo com parâmetros pré-estabelecidos. A separação de células (*sorting*) pode ser baseada nas propriedades funcionais, bioquímicas ou morfológicas das células. As mesmas não sofrem qualquer dano durante o processo e a população obtida pode ser posteriormente utilizada em qualquer outro ensaio

experimental *in vitro* ou *in vivo*, já que todo o processo pode ser feito sob condições estéreis [85].

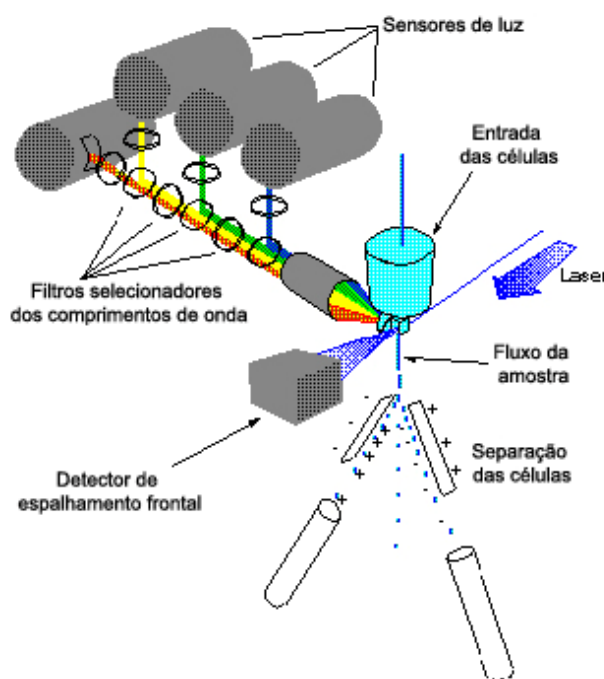


Figura 11. Estrutura básica de um citômetro de fluxo. As células passam por uma câmara de fluxo, onde há a incidência de um laser. A fluorescência emitida é captada e posteriormente selecionada por vários filtros óticos, de acordo com o comprimento de onda de emissão de vários fluorocromos. O tamanho celular é medido pela refração da célula ao passar pela câmara de fluxo. Uma etapa de separação dos tipos celulares pode ser feita após a incidência do laser.

Este método permite avaliar as capacidades funcionais do neutrófilo, tendo como vantagens a necessidade de pequena quantidade celular para análise e a redução de interferências dos artefatos produzidos por métodos de purificação. Além disso, com o surgimento de novos fluorocromos é possível analisar simultaneamente vários parâmetros da mesma população celular. [86]

A ativação do neutrófilo “*in vitro*” com PMA, induz a montagem do complexo NADPHoxidase e conseqüentemente, uma intensa produção de radicais livres, que podem ser convertidos a peróxido de hidrogênio pela ação da superóxido dismutase (SOD). $O_2^- + O_2^- + 2H^+ \xrightarrow{(SOD)} H_2O_2 + O_2$

A dihidrorodamina 123 (DHR) reage especificamente com H_2O_2 produzindo o fluoróforo, rodamina 123 [87], que é detectado no canal FL1 do citômetro de fluxo utilizado.

Niwa e colaboradores (1996) mostraram que PKC ativada por PMA e tirosina cinase (TK) induzem um aumento na atividade da SOD [88], e conseqüentemente induzem a explosão respiratória em neutrófilos.

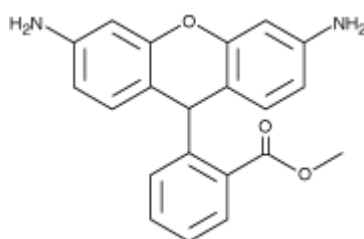


Figura 12 . Estrutura molecular da DHR1,2,3. λ excitação=488nm, λ emissão= 525nm

Neste trabalho, a dihidrorodamina 1,2,3, foi utilizada como marcador para se avaliar a produção de peróxido de hidrogênio intracelular pelo neutrófilo. Desta maneira, podemos ter uma estimativa da produção de radicais livres, da ativação da NADPHoxidase e do burst respiratório celular, nos estados quiescente e ativado “in vitro”.

Para se verificar a porcentagem de células vivas após a separação e a ativação “in vitro” com PMA, foi utilizado o iodeto de propídio, um marcador de alta massa molecular que se liga ao DNA das células mortas que ainda estejam íntegras [89].

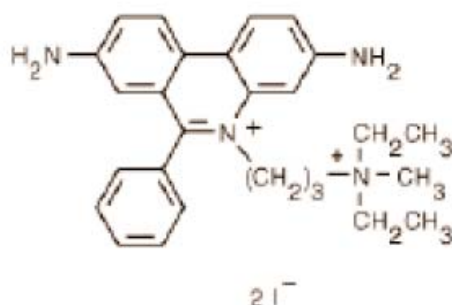


Figura 13. Molécula de Iodeto de Propídio λ excitação= 536nm, λ emissão=623nm

1.11. Proteômica

A proteômica pode ser entendida como a análise, em larga escala, do conjunto de proteínas expressas a partir do genoma de um organismo ou célula, em um dado sistema biológico. Ao contrário do genoma, que tem caráter permanente e invariável, o proteoma é extremamente dinâmico, dependendo do estágio de desenvolvimento e diferenciação, assim como das condições temporais e específicas do ambiente.

A compreensão dos estudos genômicos não pode ser restrita à análise do DNA e do mRNA, pois o nível de mRNA não permite que se faça o prognóstico do nível de expressão protéica, uma vez que a função protéica é controlada por muitas modificações pós-traducionais. Além disso, a maturação e a degradação protéica são processos variáveis que alteram dramaticamente a quantidade final da proteína ativa, independentemente do nível de mRNA [90].

A análise proteômica permite saber se um produto gênico está sendo expresso, a concentração relativa deste produto e as modificações pós-traducionais que podem ocorrer nestas proteínas. Além disso, o proteoma pode mostrar como os processos metabólicos, regulatórios e de sinalização se tornam disfuncionais em dados estados patológicos e como podem ser manipulados na busca por soluções terapêuticas [91].

O estudo proteômico divide-se basicamente em duas etapas: a primeira consiste na separação das proteínas a partir de um extrato celular, baseando-se em propriedades intrínsecas de cada proteína como o peso molecular e o estado de suas cargas; e a segunda na identificação de cada proteína usando técnicas de espectrometria de massa.

1.11.1. Eletroforese Bidimensional

O método mais comumente aplicado para analisar o estado de expressão da maioria das proteínas de uma célula é baseado na eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida (2D-PAGE) . Nessa técnica, as células e organelas devem ser completamente lisadas e os seus conteúdos solubilizados para obtenção de um extrato representativo de proteínas.[90]

Em uma primeira dimensão, as proteínas são separadas pela sua capacidade de protonação, em intervalos definidos de pH, através de seu ponto isoelétrico (pI), numa

fase chamada isoeletrofocalização (IEF). Em seguida, as proteínas são submetidas a uma segunda separação em um gel desnaturante de poliacrilamida com sódiododecilsulfato (SDS), de acordo com suas massas moleculares. Por último os géis são corados, utilizando um método que detecte a maioria das proteínas separadas e permita quantificação e compatibilização com as próximas etapas. [90]

1.11.2. Análise de Imagens

Este tipo de análise é muito útil para se comparar cada proteína ou conjunto de proteínas (*spots*) visualizadas em vários géis. Existem alguns programas de computação, como o *Image Master Platinum GE*[®], que agrupa os géis de acordo com a condição experimental, por exemplo, antes e após um estímulo, e depois se faz um pareamento entre os géis de cada condição e entre os géis representativos das duas condições.

Essa ferramenta também permite a quantificação de cada spot, gerando dados de proteínas diferencialmente expressas em cada condição e de proteínas ausentes ou presentes em apenas uma das condições estudadas.

1.11.3. Espectrometria de massa

Os *spots*, visualizados pela coloração, num gel 2D-PAGE, são cortados e digeridos, geralmente pela enzima tripsina, originando peptídeos que se ionizam em um espectrômetro de massa (MALDI – *matrix-assisted laser desorption ionization*). A ionização por MALDI usa pulsos de *laser* os quais excitam uma matriz que é, adsorvida aos peptídeos das proteínas digeridas. A matriz adsorvida aos peptídeos é convertida em uma fase gasosa contendo íons, o que induz a ionização dos peptídeos. Esses íons são então acelerados em um campo elétrico, para serem posteriormente detectados. O tipo de análise chamado TOF (*time of flight*) mede a razão massa/carga de um íon peptídico de acordo com o tempo que ele percorre uma região livre de campo elétrico até o detector[92].

Depois dessa etapa, segue-se a análise da impressão digital de fragmentos peptídicos (*peptide mass fingerprinting*). Uma série de massas de peptídeos, obtidas por

análise de espectrometria de massa, pode servir como uma impressão digital, pois o digesto triptico é específico para cada proteína [90]. Portanto, uma série de massas determinadas a partir de MALDI-TOF é comparada com aquelas calculadas a partir da digestão teórica de seqüências existentes em bancos de dados disponíveis na *Internet*, levando à identificação da proteína. Tal identificação pode ainda ser aperfeiçoada acrescentando-se ao conjunto de massas de peptídeos, fragmentos de seqüência obtidos através de *sequence tags* (pedaços de seqüências), o que permite a identificação com apenas um fragmento, ou ainda outros dados obtidos na eletroforese como pI e massa molecular aproximada da proteína estudada.

1.11.4. Análise Proteômica de Neutrófilos

A análise proteômica de leucócitos tem contribuído para mapear o perfil protéico de células inflamatórias, colaborando no entendimento dos mecanismos envolvidos na função leucocitária. A descoberta de novas proteínas e a expressão diferencial protéica pode esclarecer mecanismos e vias de sinalização envolvidas nos processos inflamatórios, possibilitando o desenvolvimento de novos fármacos e de marcadores moleculares para o acompanhamento e diagnóstico de doenças.[93]

Em 2005, Lominadze, et al, publicaram um extenso trabalho de análise proteômica de grânulos de neutrófilos, em que 286 proteínas, pertencentes a três tipos de grânulos, foram identificadas. Esses resultados contribuíram para um melhor entendimento da localização das proteínas luminais e de membranas em cada tipo de grânulo. Porém, os mecanismos moleculares que controlam a exocitose e a fusão homotípica ou heterotípica dos grânulos ainda são pouco conhecidos.

Os mapas bidimensionais de neutrófilos também têm sido uma ferramenta valiosa para a descoberta de proteínas diferencialmente expressas em pacientes com neutropenia severa crônica [94] e na doença de Behçet [95].

Alguns experimentos realizados em polimorfonucleares humanos ativados com LPS envolvendo Transcriptômica e Proteômica também já foram descritos. Nesses estudos, verificou-se um aumento na expressão de reguladores inflamatórios e uma baixa correlação com os respectivos mRNAs [96]. Um outro estudo de transcriptômica nas fases da diferenciação granulocítica, utilizando técnicas de *microarray*, já identificaram mais de 11310 genes envolvidos na diferenciação, dos quais 6700 foram

diferencialmente regulados, incluindo proteínas efetoras ainda não identificadas e receptores de superfície de neutrófilos [97].

O mapa proteômico de ratos, publicado por Piubeli em 2002, mostrou a identificação de 52 proteínas e apresentou géis de boa qualidade, porém com a presença de poucos spots. Provavelmente devido à utilização de um método de coloração sem a presença de prata, mas que favorece a identificação por espectrometria de massa [98].

Estudos mais recentes, descrevem a primeira publicação de associação de um gel 2D com um banco de dados de proteínas identificadas do neutrófilo humano [99]. O estabelecimento de uma referência pode contribuir para estudos de comparação entre os estados de ativação destes granulócitos, como o realizado neste trabalho, levando à identificação de marcadores diagnóstico ou alvos terapêuticos para um melhor controle das funções do neutrófilo.

2. OBJETIVOS E JUSTIFICATIVAS

2.1. Objetivo Geral

- Estudo inicial das vias de sinalização desencadeadas pelo PMA, associando à identificação de proteínas do neutrófilo com o objetivo de esclarecer vias metabólicas ainda pouco conhecidas.

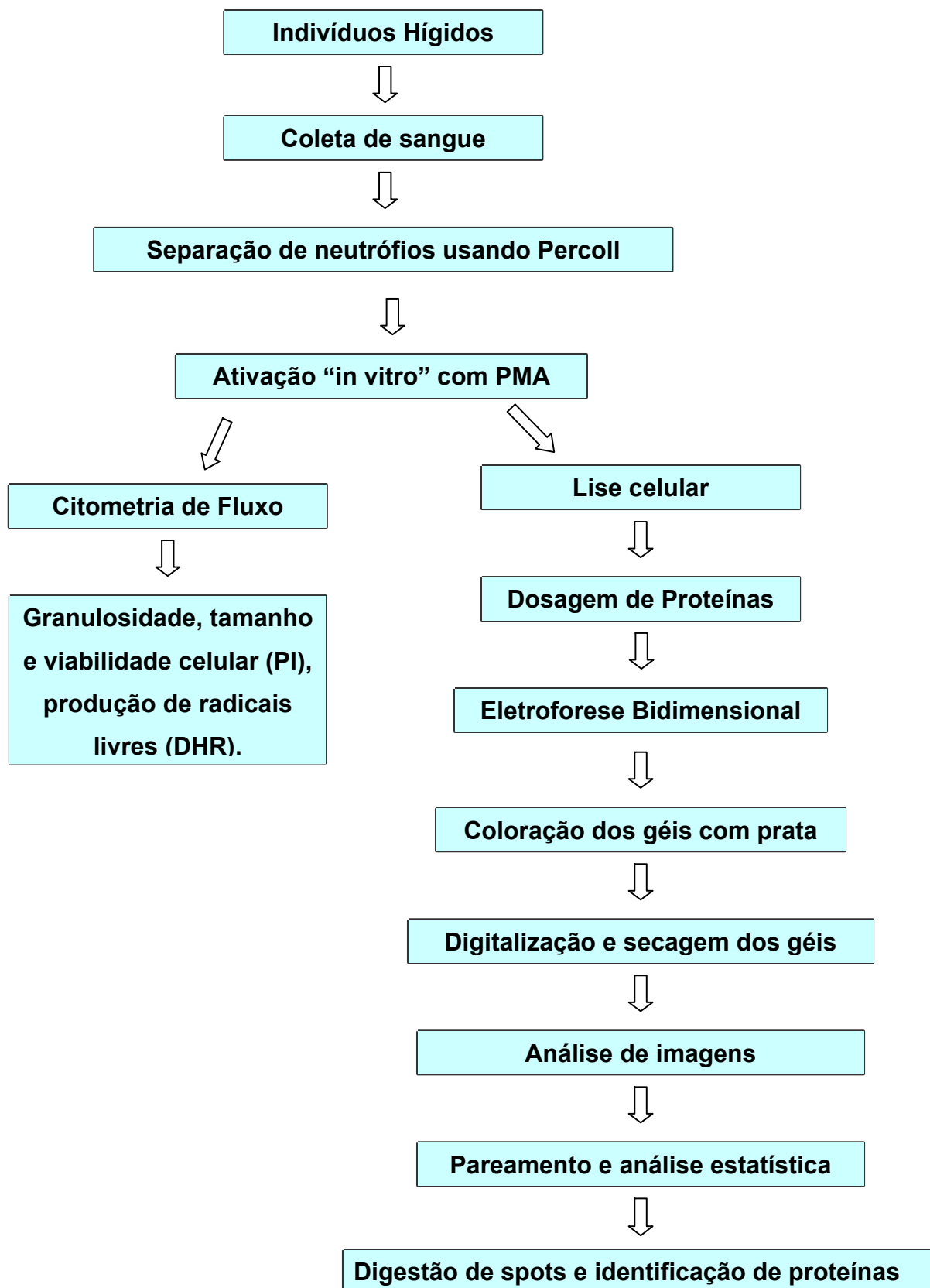
2.2. Objetivos Específicos

- Padronização da técnica de purificação de neutrófilos utilizando um gradiente de percoll (Amersham Biosciences).
- Elaboração dos mapas proteômicos ácidos bidimensionais de neutrófilos humanos não ativados e ativados com PMA.
- Análise de imagens dos géis bidimensionais, utilizando o programa Image Master Platinum versão 6.0 (Amersham Biosciences) para se verificar as variações de expressão das proteínas.
- Identificação inicial dos spots protéicos dos géis 2D por espectrometria de massa.

A consecução desses objetivos poderá permitir comparações entre as duas condições estudadas, sendo possível estabelecer as semelhanças e diferenças em relação às proteínas expressas, que poderão contribuir para a identificação de marcadores moleculares ou alvos farmacológicos, úteis no desenvolvimento de terapias relacionadas a disfunções inflamatórias.

3. METODOLOGIA

3.1. Fluxograma geral dos procedimentos:



3.2. Coleta de sangue

Foram colhidos 15mL de sangue de três indivíduos doadores voluntários, sem histórico de doenças crônicas, alérgicas e infectocontagiosas e que não faziam uso de medicamentos. A heparina foi utilizada como anticoagulante na concentração de 5UI/mL de sangue.

A coleta foi realizada lentamente em seringa plástica heparinizada, a fim de se evitar ativação celular pela turbulência do fluxo. Então se homogeneizou a amostra levemente e foram adicionados três mililitros de sangue diretamente sobre o gradiente de percoll previamente preparado, como descrito a seguir.

3.3. Separação de neutrófilos

Foi preparado um gradiente de percoll (Amersham Biosciences) com o objetivo de purificar neutrófilos, através de sua densidade, a partir de sangue venoso periférico heparinizado. O Percoll é composto de partículas de sílica inerte, não tóxicas, que não aderem a membranas, sendo ideal para purificação de células e organelas [100]. O gradiente foi composto por soluções a 60% e a 70% de percoll, diluído em solução balanceada de sais (HBSS). As soluções do gradiente foram preparadas conforme a tabela:

Tabela 1: Reagentes e soluções para a montagem do gradiente de percoll.

Reagentes	60%(3mL)	70%(3mL)
Percoll 100% dens:1,130g/mL	1800 µL	2100µL
HBSS (solução balanceada de sais)1X	990 µL	645µL
HBSS (solução balanceada de sais) 10X	210µL	255µL

Solução de HBSS pH 7,2-7,4:

Cloreto de potássio 0,4g/L

Fosfato de potássio monobásico 0,06g/L

NaCl 8g/L

Fosfato de sódio dibásico 0,048g/L

d-glicose 1g/L

Vermelho de fenol 11mg/L

Bicarbonato de sódio 0,35g/L

Durante a montagem de um gradiente, adicionou-se lentamente 3mL da solução de percoll 70% ao fundo de um tubo falcon de 15mL, que já continha 3mL da solução de percoll a 60%. Em seguida, 3mL de sangue heparinizado foram colocados cuidadosamente por cima da montagem e centrifugados a 400g, por 35 minutos, a 22°C, em centrífuga de caçamba móvel Hitashi-Himac SCR, com aceleração/desaceleração lenta, igual a dois. Após a centrifugação, obteve-se um halo de neutrófilos situado entre os gradientes de 60% e 70% de percoll, que foi coletado para um novo tubo. As hemácias sedimentaram no fundo do tubo e o plasma, juntamente com as plaquetas e os demais leucócitos, permaneceram na porção superior do gradiente

A fração do plasma foi desprezada e o halo de neutrófilos foi retirado diretamente com uma pipeta. As células recolhidas foram lavadas duas vezes com 10mL de HBSS para a retirada de resquícios de percoll e as hemácias residuais foram lisadas com 3mL de água milliQ durante 15 segundos. A osmolaridade foi restaurada após esse tempo, por adição de 9mL de NaCl 1,2%. Ao final, obteve-se um pellet de neutrófilos que foi ressuspenso em 500µL de PBS com cálcio e magnésio. Uma alíquota de 100µL (contendo em média 2×10^5 células) desta amostra foi separada para as análises de citometria de fluxo, viabilidade celular, pureza e rendimento da separação.

A pureza foi verificada por contagem diferencial de leucócitos em lâmina corada com Wright e por citometria de fluxo através dos parâmetros intrínsecos: tamanho e granulosidade celular. Contaram-se 100 células visualizadas no esfregaço e depois se verificou a porcentagem referente a neutrófilos. A contagem foi realizada em triplicata e uma média das três contagens foi considerada

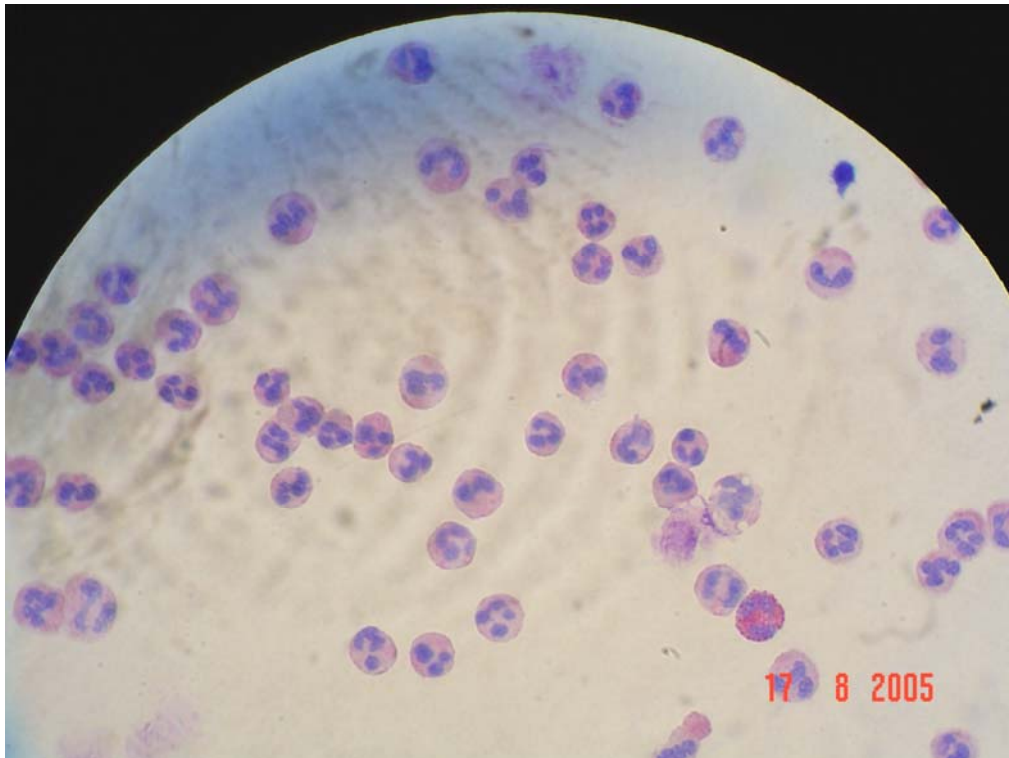


Figura 14. Exemplo de lâmina corada com Wright obtida para a contagem diferencial. Aumento 100x

A viabilidade foi verificada pela citometria de fluxo, utilizando o iodeto de propídio e em câmara de Neubauer utilizando nigrosina 0,05%, como corante de exclusão (figura 15). Foram pipetados 5 μ L da alíquota de suspensão de células para 20 μ L de solução de nigrosina 0,05% diluída em PBS pH 7,2. Homogeneizou-se a suspensão, que foi adicionada a uma câmara de Neubauer até o completo preenchimento de um campo de leitura. As células que apresentavam o interior corado de preto foram consideradas mortas e as células não coradas foram consideradas vivas (figura 15). Um total de 100 células foram contadas e a porcentagem de células vivas foi calculada. Esta análise foi realizada em triplicata e o resultado final foi uma média das três contagens.

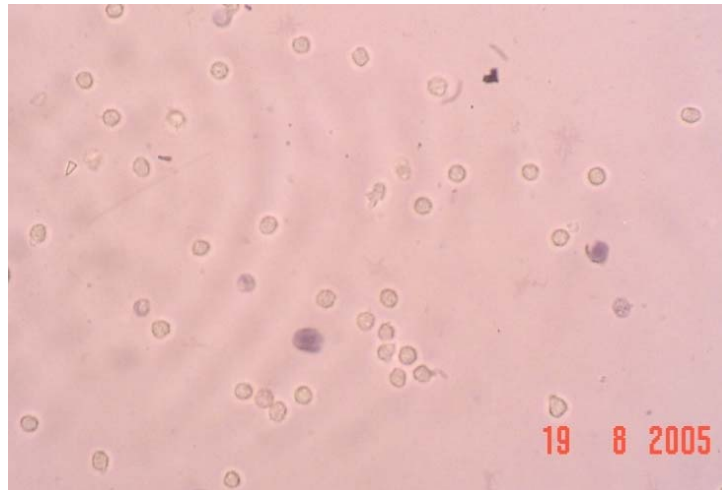


Figura 15. Campo visualizado durante a contagem de células coradas com nigrosina 0,05% Aumento de 40X

O rendimento da separação foi determinado em hemocitômetro, diluindo-se 10 μ L da alíquota de células em 50 μ L de líquido de Turck. Esta suspensão foi homogeneizada e adicionada à câmara de Neubauer até o preenchimento do campo de leitura. O número de células presentes em cada região L do campo foi contado.

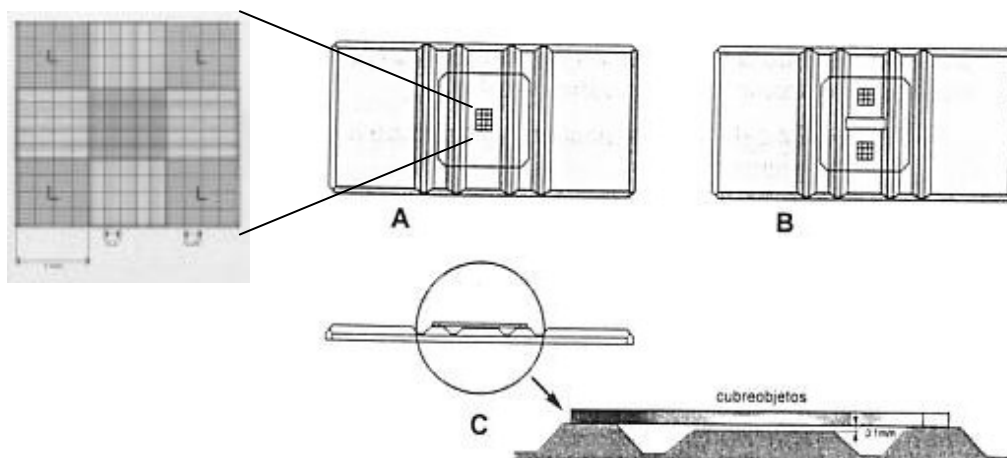


Figura 16. (A) Câmara de Neubauer com um campo de leitura e (B) com dois campos de leitura, (C) mostra a profundidade da câmara, de 0,1mm.

A área de cada quadrado L é de 1mm², como mostra a figura 16. A profundidade da câmara é de 0,1mm. Logo ao contar quatro áreas L, estamos contando o número de células presentes em 0,4mm³, que corresponde ao número de células em 0,4 μ L. Então se multiplicou por 2,5 para saber o número de células por μ L,

além de multiplicar pelo fator de diluição 6 vezes (10 μ L células : 50 μ L solução de Turck).

Cálculo: $2,5 \times 6 \times (L1+L2+L3+L4) = \text{número de células} / \mu\text{L}$

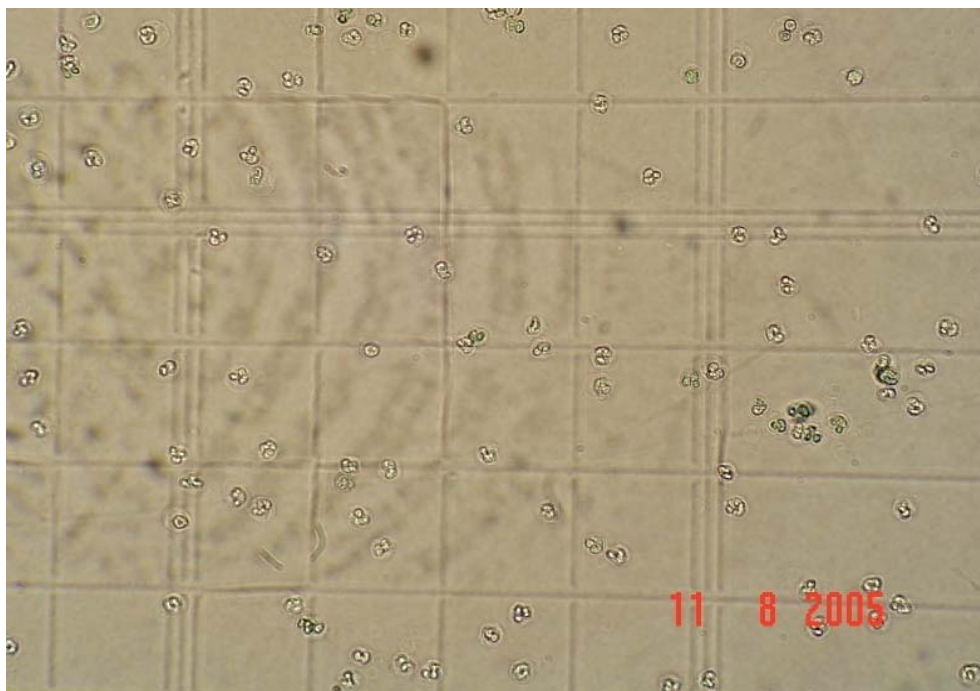


Figura 17. Visualização de neutrófilos em Hemocitômetro, para contagem do número de células. Aumento de 40X.

Após a otimização da técnica, foram necessários 12 mL de sangue de cada indivíduo, em média, para se obter a quantidade de $2 \cdot 10^7$ células, necessária para análise proteômica.

3.4. Ativação celular

As células purificadas de cada indivíduo foram divididas igualmente em dois grupos: um denominado Normal, que serviu como controle de não ativação e o segundo classificado como PMA, que passou por ativação “in vitro” com PMA 100ng/mL. Foi retirada uma alíquota de $8 \cdot 10^4$ células para as análises de citometria de fluxo.

55 μ L de PMA 1ng/ μ L foram adicionados à 495 μ L da suspensão de células (10^7 células) em PBS, e 55 μ L de PBS foram adicionados a outra suspensão de células (10^7

celulas) também em 495 μL de PBS (controle não-ativado). Os dois eppendorfs permaneceram por 30 minutos sob leve homogeneização, a 25°C.

3.5. Citometria de fluxo

Após a ativação celular “in vitro” com PMA 100ng/mL as análises citométricas foram realizadas.

Dezoito microlitros de DHR 250 μM foram adicionados a 250 μL de suspensão de células ($2 \cdot 10^4$) em PBS (controle negativo) e a 250 μL de suspensão de células ativadas com PMA 100ng/mL, e incubados por 30 minutos. Em seguida, realizou-se a aquisição celular de 10.000 eventos no aparelho CyFlow Space (Partec) e foi feita uma análise inicial utilizando os parâmetros intrínsecos celulares: tamanho e granulosidade, para se verificar a pureza da separação e o aspecto morfológico do neutrófilo.

A explosão respiratória celular também foi analisada através da reação do peróxido de hidrogênio com o fluorocromo DHR1,2,3. A fluorescência foi lida a 530nm no canal FL1. Utilizou-se laser de íon argônio, com emissão no comprimento de onda de 488nm, muito utilizado para a excitação de vários fluorocromos, como as rodaminas, brometo de etídeo, iodeto de propídeo, FITC etc.

A uma outra alíquota de um mililitro de suspensão celular ($2 \cdot 10^4$) não ativada acrescentou-se um microlitro de PI 1mg/mL e incubou-se por cinco minutos no gelo. Depois foi feita a aquisição de 10.000 células para a análise da viabilidade celular. A fluorescência foi lida a 623 nm, no canal FL2. O mesmo procedimento foi repetido para uma outra suspensão de neutrófilos ativados por 30 minutos com PMA.

3.6. Lise celular

Após ativação celular com PMA 100ng/mL e a incubação por 30 minutos, os dois eppendorfs, referentes aos grupos Normal e PMA foram centrifugados e descartamos os sobrenadantes. Acrescentou-se 450 μL de tampão de lise (uréia 7M, tiouréia 2M, pharmalyte pH4-7 0,5%, triton X-100 1%, inibidores de protease 1% e

nuclease 1%) ao pellet de neutrófilos obtido em cada tubo. Então as amostras passaram por agitação em vórtex durante 5 minutos e incubou-se por 30 minutos à temperatura ambiente, sob agitação. Por último, foram adicionados 50 μL de DTT 0,1mg/ μL e 3 μL de EDTA 0,16M a cada amostra, novamente agitados sob vórtex por cinco minutos e incubados sob agitação, por uma hora e meia.

O tampão de lise é uma solução usada para promover lise celular e o rompimento de organelas, além de solubilizar grande parte das proteínas. Os inibidores de protease também são importantes para se evitar a degradação de proteínas por proteases. O pré-tratamento das amostras com tampão de lise envolve também o rompimento de agregados protéicos promovidos por lipídios de membrana pouco solúveis, a desnaturação protéica e a quebra de interações moleculares entre as proteínas.[101, 102]

3.7. Dosagem de Proteínas das Amostras

Após obtenção dos extratos protéicos dos grupos controle e ativado com PMA de cada indivíduo, realizou-se a dosagem de proteínas pelo método descrito por Bradford [103]. Foi feita uma curva de calibração com albumina bovina no mesmo tampão de lise, apresentando coeficiente R acima de 0,99. Cada amostra foi dosada em triplicata e se calculou o volume a ser retirado de cada eppendorf para que se obtivesse 50 μg de proteínas. Completou-se o volume para 350 μL com solução de lise (uréia 7M, tiouréia 2M, DTT 1% pharmalyte pH4-7 0,5%, triton X-100 1%, inibidores de protease 1%).

3.8. Focalização Isoelétrica (IEF ou 1ª Dimensão):

Foram focalizados juntos, um strip da amostra Normal e um strip da amostra PMA, de um mesmo indivíduo. Esse procedimento foi realizado em triplicata para cada indivíduo. O protocolo de isoeletrofocalização utilizado foi o mesmo para todas as amostras.

Cinquenta microgramas de proteínas foram aplicadas num sarcófago (canaleta de cerâmica contendo pólos positivo e negativo), seguindo-se à sobreposição de gel em forma de strip, com 18 cm de comprimento, 0,3 cm de largura, e intervalo de pH de 4 a 7 (Immobiline DryStrip, Amersham Biosciences, UK). Sobre essa disposição foram colocados 400 µl de óleo mineral (PlusOne), para se evitar o ressecamento do strip durante o processo. Em seguida, os sarcófagos foram submetidos à IEF no instrumento IPG-Phor II (Amersham Biosciences, UK). Nesse aparelho, as amostras passaram por uma etapa de reidratação de 12 horas e depois se iniciaram as etapas de focalização: uma, em gradiente crescente até 500 V por 500 Vh; outra, em gradiente crescente até 3500 V por 3500 Vh, e a última, constante de 8000 V por 40000 Vh. Durante a hidratação e a focalização as amostras foram mantidas a 20°C, e a corrente limite a que ficaram submetidas foi de 75 µA por strip.

3.9. Etapa de Equilíbrio:

Com o término da etapa da focalização isoelétrica, os strips foram retirados do IPG-PhorII e imersos em 5 ml de solução de equilíbrio (uréia 6M, SDS 10%, glicerol, TRIS 1,5 M pH 8,8), com DDT 1%, agente redutor de pontes dissulfeto, onde permaneceram por 20 minutos, sob agitação leve, a 20 °C. Completado o tempo de redução, transferiram-se os strips para uma solução de equilíbrio contendo, além dos componentes mencionados anteriormente, Iodoacetamida 135mM, com o objetivo de alquilar os grupos -SH reduzidos, também por 20 minutos.

3.10. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE ou 2ª Dimensão):

Preparou-se um gel de poliacrilamida 12% entre duas placas de vidro, utilizando o sistema Protean II (BioRad, Hercules, CA, USA) para todos os géis de 2ª dimensão desenvolvidos neste trabalho.

O marcador de massa molecular (Amersham Pharmacia- Biotech) é uma mistura de proteínas de massas moleculares conhecidas, tais como: fosforilase b (94000 Da),

albumina (67000 Da), ovoalbumina (43000 Da), anidrase carbônica (30000 Da), inibidor de tripsina (20100 Da), e lactalbumina (14400 Da), adicionado a um poço ao lado do strip, na segunda dimensão, para permitir uma estimativa da massa molecular das proteínas separadas no gel. Findo o tempo de equilíbrio, cada strip foi colocado em um poço adaptado para encaixá-lo e coberto com agarose morna, misturada ao azul de bromofenol, com objetivo de fixar o strip no gel de poliacrilamida, após seu resfriamento.

Em seguida, o gel foi transferido para uma cuba contendo 2 L de tampão de corrida Tris base 0,55mol/L - Glicina 1,92mol/L pH 8,3. Adaptou-se o gel a uma cuba superior que foi totalmente preenchida com 500mL do mesmo tampão de corrida, fechando sua tampa e a conectando à fonte elétrica. Esta estrutura também foi acoplada a um aparelho de refrigeração a base de água (Multitemp II Cooling Bath, Amersham Biosciences), que manteve toda a montagem a uma temperatura constante de 15 °C. A corrida foi realizada com amperagem de 20mA e a voltagem de 500 V. O azul de bromofenol foi utilizado como agente visualizador da frente de corrida, durante a eletroforese.

3.11. Coloração dos Géis

Os géis foram corados utilizando uma técnica com prata amoniacal em pH básico, segundo Lansen, et al. [104], que aumenta consideravelmente a sensibilidade na visualização e na resolução dos spots.

Após o término da segunda dimensão, cada um dos géis foi colocado em uma cuba plástica contendo a primeira solução fixadora com 12% de ácido tricloroacético e 50% de metanol, permanecendo em agitação por 1 hora.

Em seguida, eles foram transferidos para uma segunda solução fixadora (5% ácido acético e 50% etanol), também sob agitação constante por 1 hora e lavados duas vezes com água, por cinco minutos. Depois os géis foram colocados em uma solução de coloração, contendo: 0,89% de AgNO_3 , 0,3% de NH_4OH e 0,08% de NaOH . Ao final desse tempo, eles foram novamente lavados em água milli Q por 5 minutos e mergulhados em 250mL solução reveladora, que consistiu de 0,017% de ácido cítrico e 0,236% de formaldeído P.A. Com a visualização adequada dos *spots*, retirou-se a

solução reveladora e a solução de parada da reação (30% de etanol, 7% de ácido acético glacial e 2,5% de glicerol 87%) foi acrescentada por 20 minutos. Finalmente, os géis foram colocados por 1 hora dentro de uma solução de lavagem e hidratação, contendo 30% de etanol 95% e 2,5% de glicerol 87%.

3.12. Digitalização e Secagem dos Géis:

Cada gel teve sua imagem digitalizada e armazenada em computador, por meio de *scanner* modelo Image Scan UMAX GE[®] (USA), com uma resolução de 300 dpi e alta nitidez. Foram armazenadas, para todos os géis, imagens coloridas nos formatos JPG e PSD, e imagens em 256 tons de cinza no formato TIF.

Após ser digitalizado, cada gel foi colocado entre 2 folhas de celofane hidratadas em solução de 32% de etanol e 1% de glicerol 87%. Após 48 horas em câmara fria, cada gel foi recortado e guardado em pasta plástica.

3.13. Análise Computacional das Imagens dos Géis:

As imagens dos géis, salvas no formato TIF, foram utilizadas para análise com auxílio do *software* Image Master 2D Platinum versão 5.0 (Amersham Biosciences) para iniciar a análise dos géis do grupo Normal e do grupo PMA. Por meio dos recursos fornecidos por este programa, os spots foram detectados automaticamente em todos os géis, após seleção dos parâmetros mais adequados para cada gel.

A análise de imagens compreendeu as seguintes etapas:

- Revisão manual da detecção para incluir spots não detectados, separar dois spots juntamente delimitados, eliminar *background* de coloração e artefatos detectados erroneamente como spots.
- Seleção dos pares de spots marcadores (*Landmarks*), que foram considerados pares de referência para os pareamentos nas próximas etapas.
- Pareamento automático de cada gel PMA com o seu controle Normal (não ativado), de cada indivíduo.(etapa 1)

- Pareamento automático de todos os géis da classe Normal com o gel Normal escolhido como referência.(etapa 2)
- Refinamento manual dos pareamentos para se eliminar erros do pareamento automático.

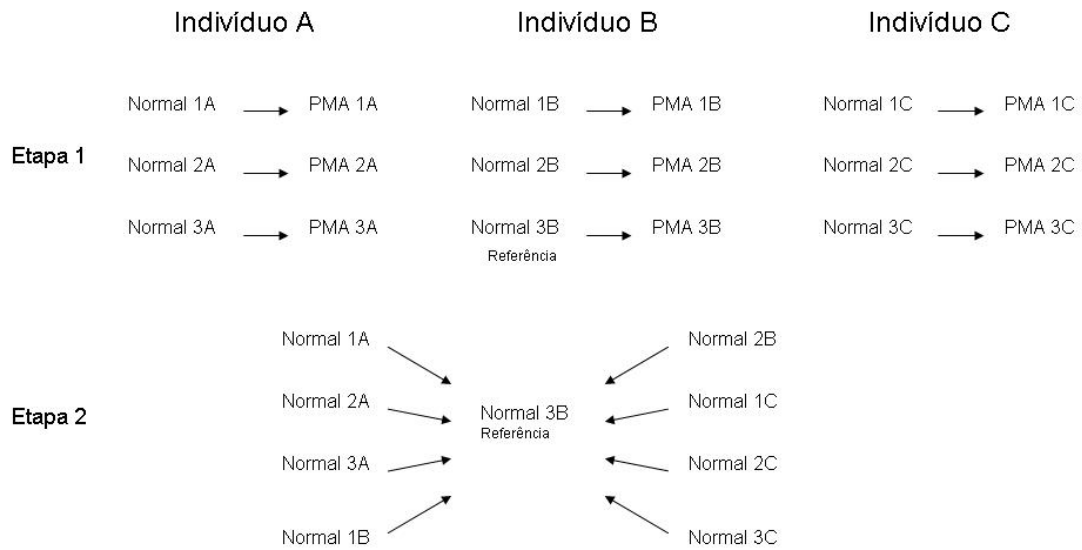


Figura 18. Esquema geral do pareamento

Uma vez que todos os géis do grupo Normal foram pareados com os seus correspondentes no estado ativado; e todos os géis do grupo Normal foram pareados com um mesmo gel Normal escolhido como referência (3B), foi possível fazer um alinhamento dos spots para se verificar a presença de um mesmo spot em todos os géis. Figura abaixo.

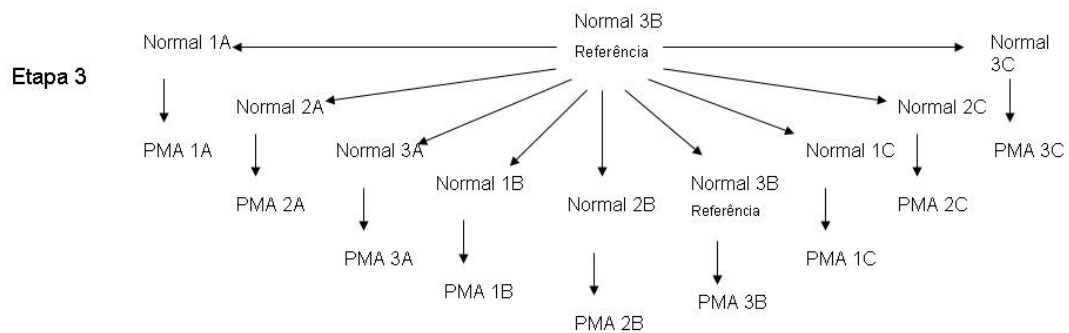


Figura 19. Esquema da rede de pareamentos

Para se obter os dados com a porcentagem de volume dos spots presentes ou não em cada gel da rede formada foi necessário criar no programa Image Master uma classe geral, dividida em subclasses que continham um gel do grupo Normal já pareado com o seu respectivo gel PMA.

Essa estratégia foi escolhida para a análise de imagens, devido a sua possibilidade de identificar a presença ou ausência de cada spot em todos os géis, o que permitirá uma comparação com dados futuros de variabilidade de expressão do spot na população e em outros estados de ativação e/ou estimulação.

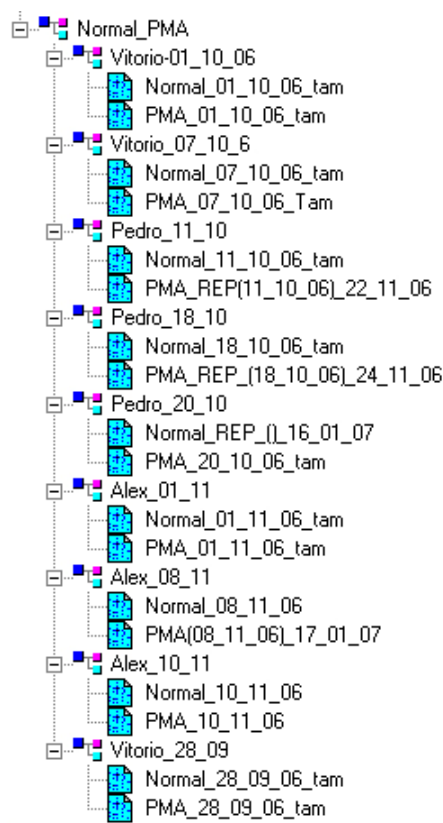


Figura 20. Esquema de divisão da classe e subclasses criadas durante a análise de imagens.

3.13.1. Análise Estatística

Ainda dentro da classe gerada, obteve-se uma tabela com os dados da porcentagem de volume de cada spot em cada gel. Este relatório foi utilizado para cálculos de análise estatística no programa SPSS[®] Base 10.0. A distribuição gaussiana dos dados foi verificada considerando os valores de porcentagem de volume dos spots nos nove géis do grupo Normal e nos nove géis do grupo PMA. O teste de Kolmogorov-Smirnov foi utilizado para verificação da distribuição gaussiana, levando em conta os critérios de: média dos spots correspondente à mediana, simetria da curva de Gauss e proporção altura versus largura da curva. O teste t pareado foi utilizado para os dados que apresentaram distribuição normal e o teste de Wilcoxon foi empregado para os dados não paramétricos. O nível de significância $p < 0,05$ foi considerado para os dois testes.

3.14. Digestão de spots protéicos

Cada spot foi retirado de um gel de neutrófilo não ativado, cortado em cubos pequenos, e transferido para um eppendorf de 0,5mL, para a digestão tríptica. Adicionou-se 50µL de acetonitrila 100%, que foram retirados e descartados. Novamente foram adicionados 50 µL de acetonitrila 100% e então secaram-se os spots em *Speed Vac*. Depois, os spots passaram por dois ciclos de lavagem com 50µL de NH₄HCO₃ 100mM, por 10 minutos e 50µL de acetonitrila. Os spots secos foram hidratados em 50 µL de tampão contendo tripsina suína modificada (Promega) 12,5ng/µL, bicarbonato de amônio 50mM, cloreto de cálcio 5mM e incubados por 50 minutos no gelo. Então se acrescentou 10µL do mesmo tampão de digestão sem tripsina e incubou-se por 37°C *overnight*.

Os peptídeos obtidos foram extraídos com 20 µL de NH₄HCO₃ 20mM, e com água: acetonitrila: ácido acético (50:50:5 v/v/v) em sonificador por vinte minutos. Todo o sobrenadante foi coletado e secado em *Speed Vac*. Cada digesto seco foi solubilizado em 10µL de TFA 0,1% e aderidos em microcolunas de fase reversa Zip Tip (Millipore, Billerica, MA, USA), após seu equilíbrio. A coluna foi então lavada por três vezes com solução de TFA 0,1% para se retirar o sal da amostra. Logo em seguida, os peptídeos foram eluídos da coluna diretamente para 2 µL da solução de matriz ácido alfa-ciano-4-hidroxicinâmico 10mg/ml aplicados sobre a placa de aço do espectrômetro de massa.

3.15. Espectrometria de massa (MALDI-TOF)

Os espectros peptídicos das amostras foram obtidos em um espectrômetro de massa tipo MALDI-TOF, modelo Reflex IV (Bruker Daltonics, Bremen, Germany), em modo positivo e refletor, após calibração externa utilizando uma mistura padrão de peptídeos, *pepmix*. Os espectros obtidos foram calibrados internamente com picos originários da digestão de queratina e tripsina e editados manualmente com a seleção de picos monocarregados e característicos de distribuição isotópica. A edição foi realizada usando os programas Xmass e Biotools.

As buscas em bancos de dados foram realizadas através do programa MASCOT (www.matrixscience.com), usando o banco de dados não redundante do NCBI,

National Center for Biotechnology Information. Os parâmetros de busca foram: tolerância de desvio de massa molecular entre 50 e 100 ppm, espécie *Homo sapiens*, máximo de uma clivagem tríptica perdida, carbamidometilação como modificação constante de cisteínas e oxidação de metionina como modificação variável.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Coleta de sangue

O sangue foi coletado em seringa plástica, sob fluxo lento de sucção para se evitar a ativação dos neutrófilos. Além disso, a concentração de heparina usada (5UI/ml) foi menor que a usual de 25UI/mL. A baixa concentração de heparina é necessária para se evitar alguns efeitos deste anticoagulante, como a inibição da adesão e da degranulação, sobretudo que podem ocorrer em concentrações a partir de 10UI/mL [105].

4.2. Separação celular e citometria de fluxo

Tendo em vista as grandes dificuldades de cultura “in vitro” de neutrófilos, sua fácil ativação em resposta às manipulações e sua curta sobrevivência “ex vivo” [106], foi necessário implementar uma técnica de separação celular a partir de sangue venoso periférico, para viabilizar a utilização destas células logo após a purificação.

O nosso grupo de pesquisa já iniciou um trabalho de proteômica de neutrófilos de pacientes traumatizados, com amostras fornecidas pelo Laboratório de Investigação Médica (LIM-62) da Universidade de São Paulo, obtidas através de uma outra técnica de separação celular usando gradiente com Ficoll-Paque Plus e sedimentação prévia com Dextran.. Entretanto, Venaille e colaboradores (1994) compararam estes dois métodos e verificaram que a utilização de Percoll era a mais adequada para separação celular de neutrófilos por causar menor ativação celular durante o processo [107].

Inicialmente, nos foi cedido um protocolo de separação de neutrófilos [108], que utiliza quatro gradientes de percoll nas concentrações de 45%, 54%, 63% e 72% diluídos em HBSS sem cálcio e magnésio, pH 7,4. Nos testes iniciais, verificamos que a contaminação com hemácias permanecia muito grande e para melhorar a separação diminuimos a concentração do último gradiente de 72% para 71% e depois para 70% de percoll.

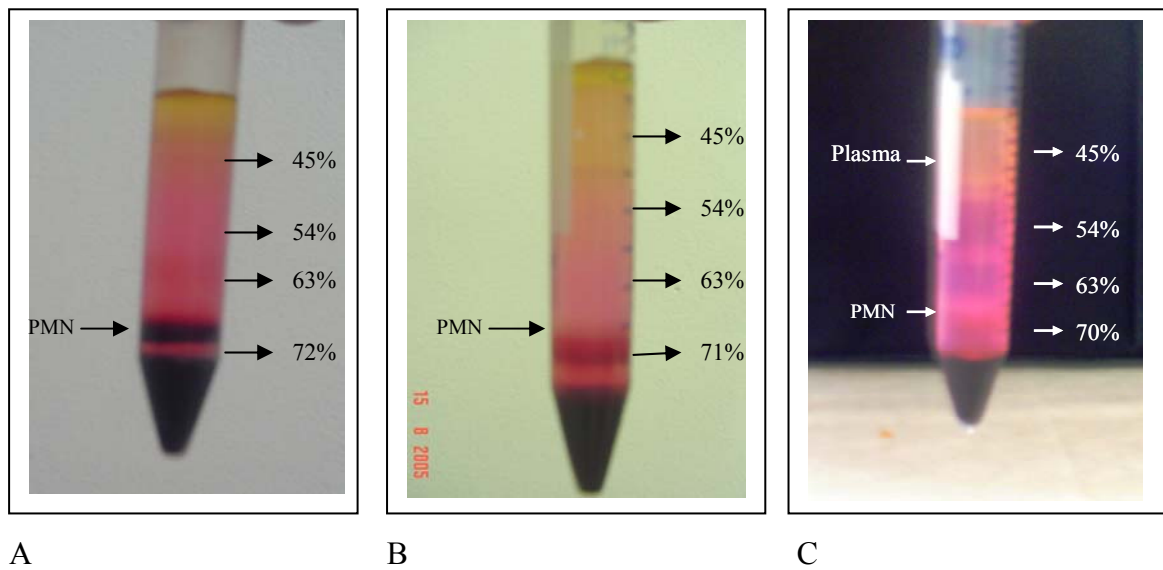


Figura 21. Perfil de separação de neutrófilos utilizando quatro gradientes de percoll diluídos em HBSS, sendo que (A) possui o quarto gradiente na concentração de 72% de percoll, (B) 71% de percoll e (C) 70% de percoll.

Os testes de separação celular foram acompanhados de análises de citometria, para se verificar a pureza da separação, a viabilidade celular e a ativação não desejável destas células durante o processo de purificação. A pureza e viabilidade também foram confirmadas por contagem diferencial de neutrófilos em esfregaço corado com Wright e pelo teste de exclusão de nigrosina 0,05% em hemocitômetro, respectivamente.

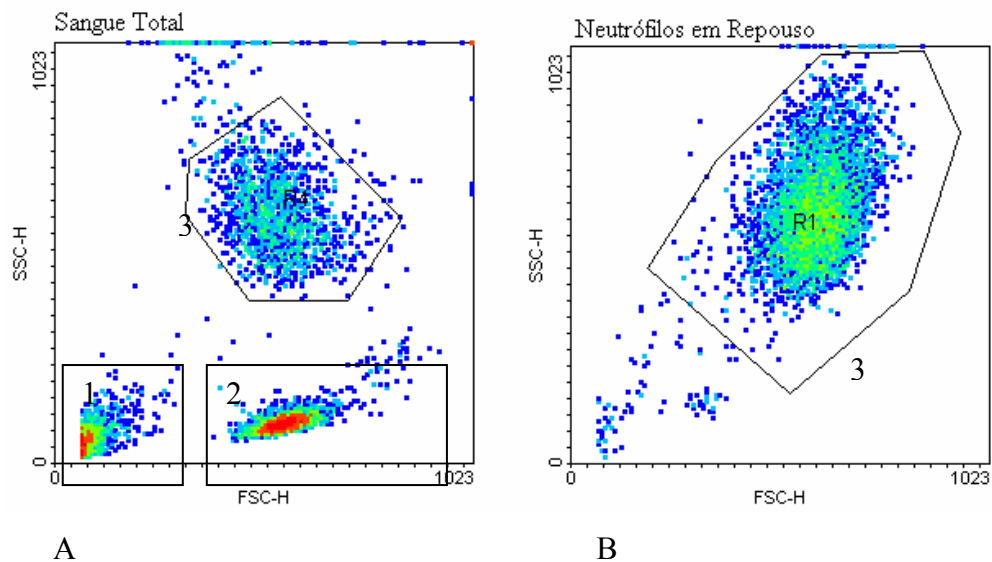


Figura 22. Tamanho e granulosidade celular de sangue, sedimentado por 30 minutos (A) e dos granulócitos separados por gradiente de percoll (B). Em 1 temos hemácias e debris, em 2 mononucleares e em 3 granulócitos

Foram feitos vários testes de otimização deste protocolo, incluindo a lise de hemácias residuais com água, cloreto de amônio 0,144M e solução de lise BD[®]. Verificamos que a lise com água por 15 segundos, com solução BD[®] e com cloreto de amônio 0,144M por 2 minutos, apresentaram a mesma eficiência em lisar eritrócitos. Porém, na análise de viabilidade por exclusão de nigrosina, percebemos que a lise com cloreto de amônio causava uma discreta diminuição para 95% na viabilidade destas células, comparada com as lises com água (97% de viabilidade) e solução BD (96% de viabilidade). Além disso, a lise de hemácias com solução BD[®] induziu uma ativação de 9,46% da população de neutrófilos. Esta ativação foi verificada através da oxidação da DHR 1,2,3, pelo peróxido de hidrogênio produzido após indução da explosão respiratória no neutrófilo, conforme figura abaixo.

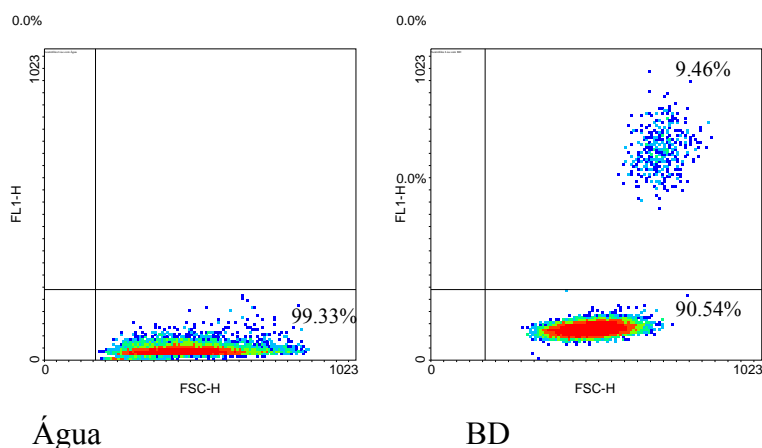


Figura 23. Tamanho celular por intensidade de fluorescência da DHR no canal FL1. células lisadas com água por 15 segundos e lise com solução de lise BD[®]

Então optamos por fazer a lise de eritrócitos com 3mL de água miliQ, durante 15 segundos e reconstituição da osmolaridade para 0,9% com 9mL de salina 1,2%. Também foi verificado que este tempo de 15 segundos de lise com água poderia ser estendido até no máximo 30 segundos, a fim de não comprometer a viabilidade, granulosidade e tamanho celular (dados não mostrados).

Devido a um grande dispêndio de tempo e maior quantidade de reagentes gastos para a montagem dos quatro gradientes descritos acima, um novo protocolo foi testado utilizando apenas dois gradientes de percol diluídos em HBSS nas concentrações de 60 e 70%.

Posteriormente também foi testado um terceiro protocolo [100], que utilizava também dois gradientes de percoll, 58% e 69%, e solução 0,15M NaCl como diluente do percoll. Observamos que a utilização de dois gradientes ao invés de quatro, não alterou o rendimento da separação e não aumentou a contaminação com hemácias ou outros leucócitos, além de ter facilitado a etapa de preparo do gradiente e diminuído o gasto de reagentes. Quanto ao uso de salina 0,15M ou HBSS na montagem dos gradientes, verificamos que não havia mudanças na granulocidade, tamanho, viabilidade ou estado basal de produção de peróxido de hidrogênio, para qualquer uma das duas soluções usadas (dados não mostrados).

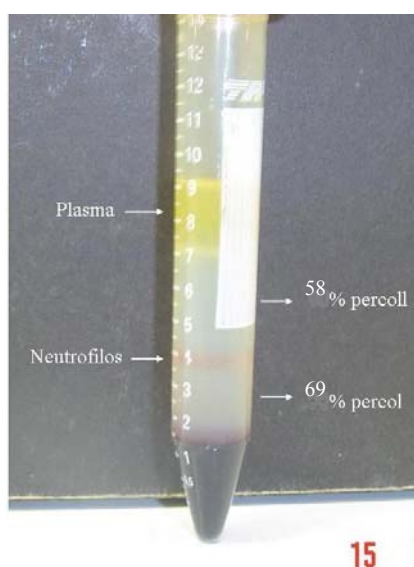


Figura 24. Perfil da separação de neutrófilos utilizando dois gradientes, nas concentrações de 58% e 69% de percoll, diluídos em NaCl 0,15M.

Neste trabalho, utilizamos dois gradientes de percoll, 60% e 70%, diluído em HBSS, lise com água por 15 segundos e ressuspensão das células em PBS com cálcio e magnésio. A pureza obtida em cada separação não foi inferior a 97% de neutrófilos, avaliada por citometria de fluxo e por contagem diferencial em lâmina. O principal contaminante encontrado após a lise de hemácias foi o eosinófilo, já que este tipo celular possui tamanho, granulocidade e densidade muito próximos aos do neutrófilo [109]. Contudo, indivíduos sadios têm uma porcentagem de eosinófilos (2-3%) no sangue total bem menor que a de neutrófilos (50-60%), o que contribui para a diminuição da porcentagem de contaminação. Já os linfócitos são os menores leucócitos sanguíneos e também possuem a menor densidade, por isso, permanecem no plasma juntamente com as plaquetas após a centrifugação do gradiente.

Tabela 2: Leucócitos e as densidades celulares correspondentes

Tipo celular	Densidade (g/mL)
Linfócito	1,065
granulócitos	1,075 – 1,080

Ref [109]

A quantidade de células obtida por mililitro de sangue purificado mostrou ser variável de indivíduo para indivíduo. Isto pode ser devido a características particulares, como: os hábitos alimentares, idade, sexo, atividades diárias, condições psicológicas, etc. Obtivemos, em média, $1,5 - 2 \cdot 10^6$ neutrófilos por cada mililitro de sangue total. O valor de referência estimado de um adulto saudável é de $2,4 \cdot 10^6$ a $6 \cdot 10^6$ por mililitro de sangue. Ou seja, obtivemos uma recuperação de 34 a 63% do total de neutrófilos presentes no sangue total. $2 \cdot 10^7$ células de cada indivíduo foram utilizadas para o controle Normal e para a ativação “in vitro” com PMA.

4.3. Ativação in vitro

Realizamos inicialmente um teste de ativação in vitro com PMA nas concentrações de 0,1ng/mL, 1ng/mL, 10ng/mL, 50ng/mL e 100ng/mL, por 30 minutos, com o objetivo de verificar as concentrações de estimulação do PMA, sem que a célula alcançasse o estado completamente ativado.

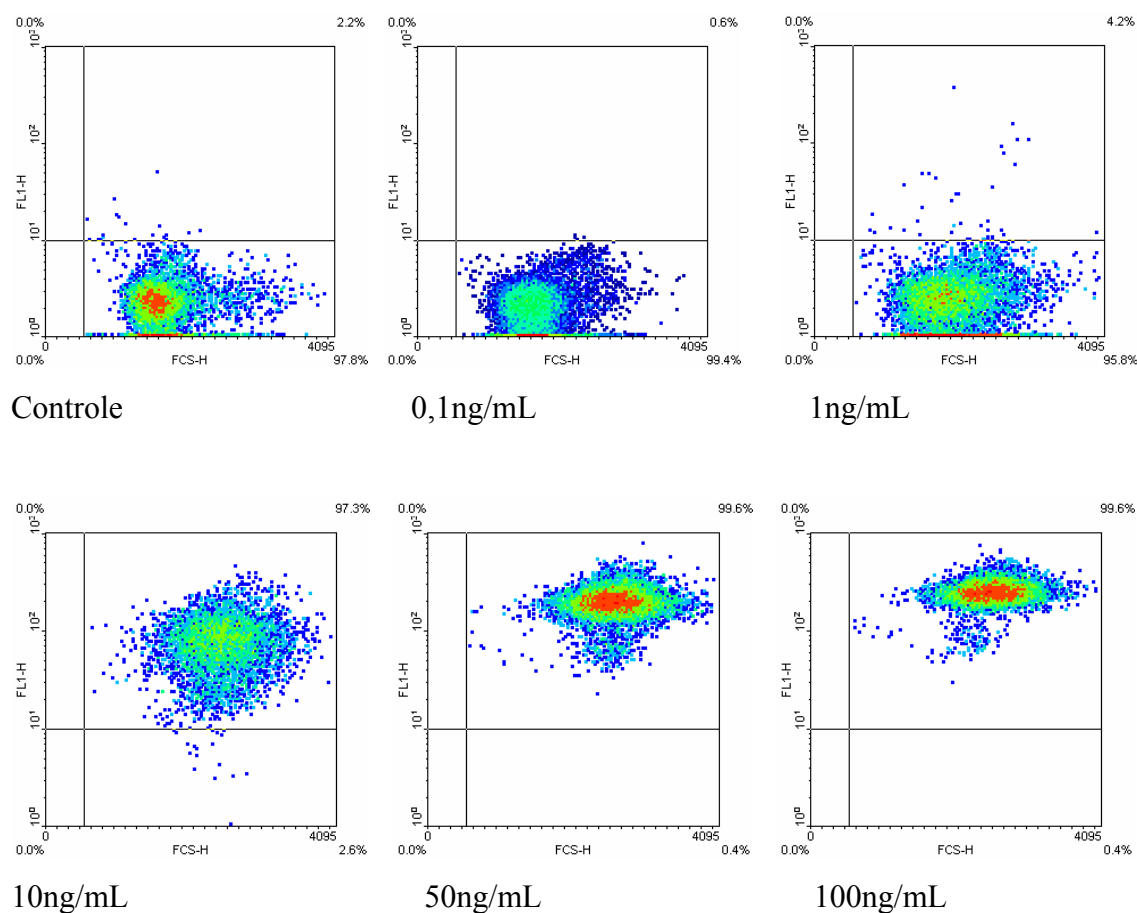


Figura 25. Tamanho celular por intensidade de fluorescência da DHR 1,2,3, mostrando a estimulação de neutrófilos com PMA nas concentrações indicadas

Verificamos que na concentração de 10ng/mL de PMA ocorre o início da estimulação com um pequeno aumento na produção de peróxido de hidrogênio intracelular.

No entanto, Sidiqi e colaboradores, 1995, também realizaram testes de estimulação com PMA em concentrações de 1nMol/L, o que equivale a 0,6ng/mL, seguido de um segundo estímulo com ácido fosfatídico ou Dic8-DAG, um análogo de DAG permeável a membranas [63]. A concentração de PMA usada como estimulante por este autor, antes da adição do segundo estímulo, mostrou uma fraca produção de radicais superóxido. Nossos resultados não mostraram aumento na produção de peróxido *intracelular* em condições semelhantes. Porém, nesse trabalho, a técnica utilizada para dosar a produção de radicais livres foi através da redução de citocromo c, que mede a quantidade total de radical superóxido liberado para o meio *extracelular* pelo neutrófilo. Pela citometria de fluxo medimos apenas a quantidade de radicais superóxido transformados em peróxido de hidrogênio intracelular devido à ação da enzima SOD. Além disso, o peróxido de hidrogênio pode ser consumido por outras vias

paralelas, como reagir com o próprio radical superóxido produzindo radicais hidroxila, ou sob a ação da MPO, para a produção de radicais halogenados. Também vale salientar que o tempo de estímulo com PMA utilizado por Sidiqui foi de 40 minutos, enquanto usamos 30 minutos nos nossos experimentos.

Realizamos posteriormente um teste de ativação com PMA por 30 minutos, nas concentrações de 100, 200 e 400ng/mL, para se verificar a concentração necessária para atingir a completa ativação da explosão respiratória.

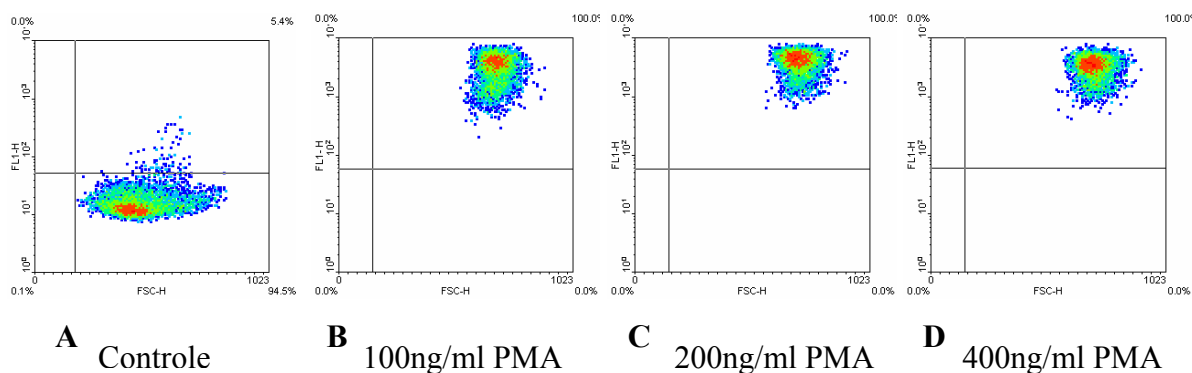


Figura 26. Tamanho celular versus fluorescência de DHR1,2,3 após ativação com 100,200 e 400 ng/mL de PMA.

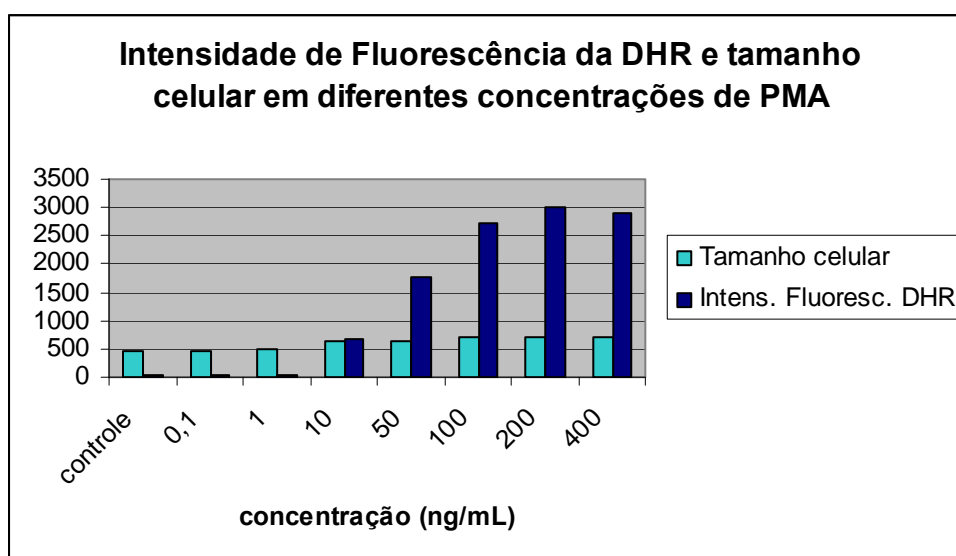


Figura 27. Intensidade de fluorescência (FL1) e tamanho celular (FSC), após ativação em diferentes concentrações de PMA.

Percebemos que a concentração de 100ng/mL, também utilizada por Anna Karlsson, e colaboradores (2000), foi suficiente para induzir significativamente a queima respiratória em neutrófilos ativados com PMA, deixando-os num estágio

completamente ativado [50]. Então optamos por realizar a ativação in vitro com PMA 100ng/mL.

Também é possível verificar pela citometria um pequeno aumento no tamanho celular (FSC), após ativação em concentrações crescentes de PMA. Esse fenômeno já foi descrito na literatura e pode ser atribuído a um enrugamento em toda a membrana, como um preparo da célula para migração ou emissão de pseudópodes [73].

Alguns testes citométricos com os ativadores PAF 20nMol/L, fMLP 100nM/L, PAF 20nMol/L + fMLP 100nM/L e PMA 100ng/mL, também foram realizados previamente para se verificar o perfil de ativação neutrofilica pela explosão respiratória frente a diferentes estímulos. A necessidade da presença de cálcio e magnésio na solução de ressuspensão das células (PBS) durante a ativação in vitro também foi avaliada.

Sabe-se que o PAF é um fraco ativador da explosão respiratória. Acredita-se que esse fator induz o neutrófilo a um estado de estimulação, não alcançando o estado completamente ativado. Sugere-se que o fMLP em baixas concentrações também exerça função semelhante ao PAF, mas em concentrações mais elevadas, como 100nM também é capaz de induzir uma completa ativação do polimorfonuclear. Já o estímulo com PAF seguido de fMLP, deixa a célula num estágio estimulado e, após o segundo estímulo, atinge-se o estágio completamente ativado. Em contrapartida, a ativação com PMA 100ng/mL leva o neutrófilo a uma completa ativação sem passar pelo estado de estimulação [59].

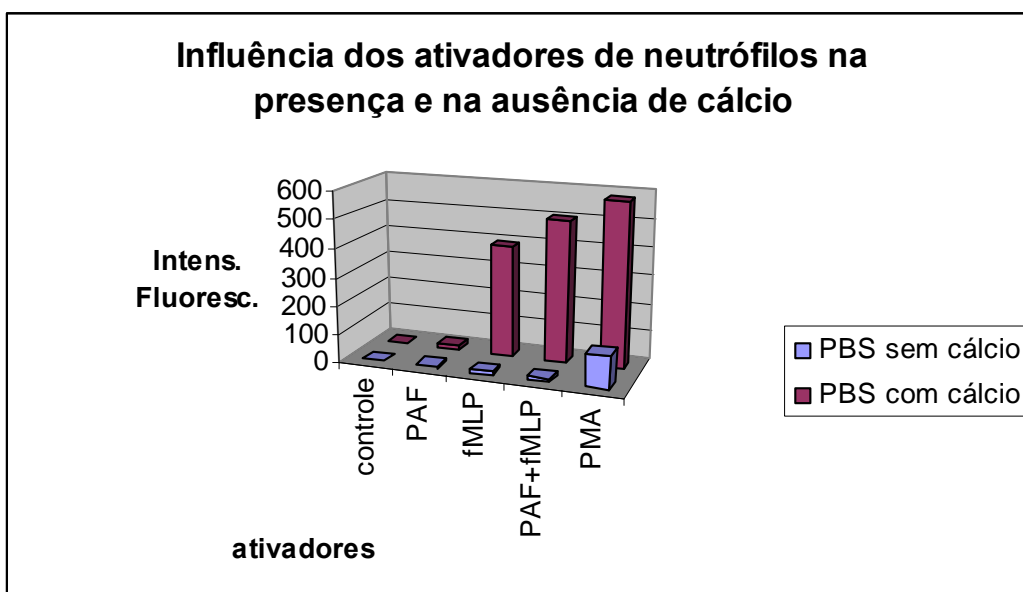


Figura 28. Tamanho, granulosidade, produção de H_2O_2 e porcentagem de células fluorescentes, em soluções de PBS sem cálcio e com cálcio.

Observamos que as células ressuspensas em PBS com cálcio e magnésio, responderam mais intensamente à produção de radicais livres, que as células mantidas em PBS sem cálcio e magnésio, após a ativação com PMA, PAF, PAF+fMLP e fMLP.

O íon cálcio, participa de algumas vias de ativação do neutrófilo, incluindo a ativação da NADPH oxidase, adesão ao endotélio vascular, degranulação, ativação da PLA_2 e síntese de IL-8 [110].

O mecanismo molecular que envolve a mobilização de cálcio após a ativação por receptores de quimioatraentes, como fMLP, $C5a$, LTB_4 , PAF e quimiocinas, é bem caracterizado. Estes receptores possuem sete domínios transmembrana acoplados a proteína G, que são controlados por várias subunidades $G\alpha$ e $G\beta\gamma$, resultando na ativação de fosfolipase C, a qual medeia a produção de IP_3 , por hidrólise de fosfolípidos de membrana. O IP_3 interage com receptores que induzem a mobilização do cálcio das vesículas intracelulares, resultando numa descarga de cálcio no citosol [110].

Contudo, poucos estudos diferenciam o envolvimento do cálcio na explosão oxidativa desencadeada por PMA. Karlsson, e colaboradores (2000) demonstraram que a ativação intracelular da NADPH oxidase por PMA também é dependente da IP_3 cinase, enquanto a fração relacionada à membrana plasmática não depende de IP_3 cinase. Além disso, os dois *pools* da oxidase foram dependentes de ERK/MAP cinase e fosfatase 1 e/ou 2 [50]. Um outro estudo mostrou que a ativação intracelular da NADPH oxidase por zimosan, foi dependente da PKC δ e de fosfatidilinositóis, produtos da IP_3 cinase [69].

Em nossas análises citométricas, verificamos que o PMA induziu um aumento de produção de H_2O_2 intracelular, mesmo na ausência de cálcio. Porém, após a inclusão do cálcio na solução de ressuspensão de neutrófilos, observamos um aumento de aproximadamente cinco vezes na atividade da NADPHoxidase. Sugerimos que a ativação da fração intracelular de NADPHoxidase na ausência de cálcio pode ter ocorrido via PKC δ uma vez que esta isoforma não é dependente de cálcio e pode ser ativada pelo PMA em neutrófilos. A presença do cálcio pode ter contribuído para a ativação de outras isoformas de PKC dependentes de cálcio, como as PKCs convencionais α , β e γ , levando à completa ativação da NADPHoxidase. Esta proposta está de acordo com o observado por Ryves e Evans, de que as isoformas α , β e γ são dependentes de cálcio enquanto as PKCs δ e ϵ , não dependeram do cálcio após ativação por ésteres de forbol [111].

A ativação de neutrófilos com fMLP, PMA e zimosan opsonizado induz uma produção de íons superóxido que se correlaciona com ativação de PKCs e com a fosforilação da subunidade p47^{phox} da NADPHoxidase. Estudos recentes mostram que PKC β é a principal isoforma envolvida na ativação da NADPHoxidase [74]. Entretanto, a função de cada isotipo de PKC e a influência do cálcio neste processo ainda são pouco conhecidos.

Alguns autores relataram que a fosforilação de determinados sítios de p47^{phox} por PKCs podem atenuar ou aumentar a atividade da oxidase [112] [113]. Fontayne e colaboradores mostraram também que as isoformas de PKC α , β e δ são capazes de ativar o complexo NADPHoxidase em neutrófilos intactos, porém a PKC ζ induziu o maior nível de ativação da NADPHoxidase, em relação às outras isoformas de PKC [113].

Como descrito anteriormente, há várias divergências na literatura com relação à função dos isotipos de PKC na ativação da explosão respiratória, sendo necessários mais estudos para se entender a participação destas enzimas no processo oxidativo.

4.4. Lise celular e Dosagem de proteínas

Durante a execução deste trabalho, alguns testes de lise celular foram realizados com o intuito de se conseguir obter a maior quantidade de proteínas possível. Os parâmetros analisados foram: o tempo de duração da lise celular (2h, 6h ou 12h) na temperatura ambiente mantendo apenas agitação, e lise utilizando três ciclos de ultra-som e resfriamento em nitrogênio líquido.

Verificamos que a lise celular com três ciclos de ultra-som por 10 minutos e resfriamento em nitrogênio líquido, por cinco minutos apresentou o menor rendimento de proteínas, quantificadas pelo método de Bradford [103], se comparada com mesma quantidade de células lisadas à temperatura ambiente, em qualquer tempo de agitação. Em relação à lise celular executada em 2h e em 6h à temperatura ambiente, não observamos variações significativas na quantidade de proteínas obtidas (dados não mostrados). Porém, a lise mantida a temperatura ambiente por 12h também apresentou uma pequena perda de proteínas, provavelmente por ação de proteases. Sendo assim, o tempo de lise foi fixado em 2h.

Os neutrófilos contêm grandes quantidades de proteases, mesmo no estado não ativado. Por isso, a adição de inibidores de proteases ao tampão de lise celular e o tempo máximo de 80 minutos entre a coleta do sangue e a lise, levou a um aumento notável da quantidade de proteínas presentes nos géis.

4.5. Géis

4.5.1. Padronização de géis

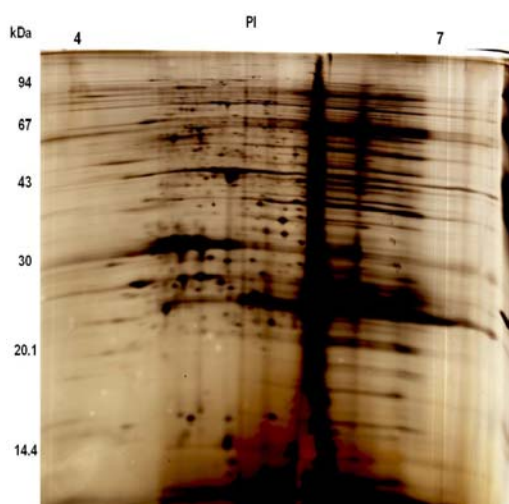
O nosso grupo de trabalho, já possuía um protocolo de focalização de géis ácidos, pH 4-7, utilizando o aparelho IPGPHOR II, para amostras de neutrófilos fornecidas pelo Laboratório de Investigação Médica (LIM-62) da Universidade de São Paulo. No entanto algumas imperfeições devido a fatores experimentais intrínsecos precisaram ser melhorados.

Inicialmente testamos a quantidade de proteína a ser aplicada na IEF: 30 ou 50µg. A focalização de 50µg de proteínas, melhor analisada após segunda dimensão, se

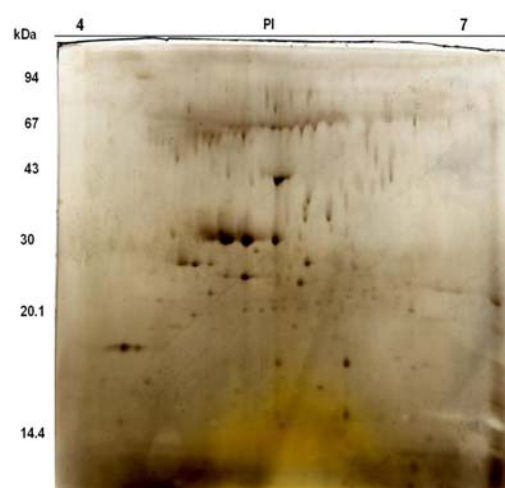
mostrou mais adequada, com maior número de spots visíveis na coloração de prata alta sensibilidade (CPA), que a IEF com 30µg de proteínas.

Em seguida, tentamos focalizar seis strips juntos, sendo três do grupo Normal e três do grupo PMA, de um mesmo indivíduo. Ao final da eletroforese, sempre verificávamos que alguns géis, cerca de três ou quatro, apareciam bem focalizados e outros parcialmente focalizados.

Além disso, alguns desses géis apresentaram spots em cometa, apenas na parte superior do gel. Percebemos que esta ocorrência aparecia mais freqüentemente nos dois géis que foram montados em placas, tipo sanduíche, na segunda dimensão. Passamos então a fazer dois géis de cada vez, montados em placas separadas, mas seguindo os mesmos protocolos de focalização e 2D-PAGE. A manutenção constante da amperagem em 20 miliA, durante toda a corrida da segunda dimensão, também melhorou significativamente a distribuição dos spots no gel.



A



B

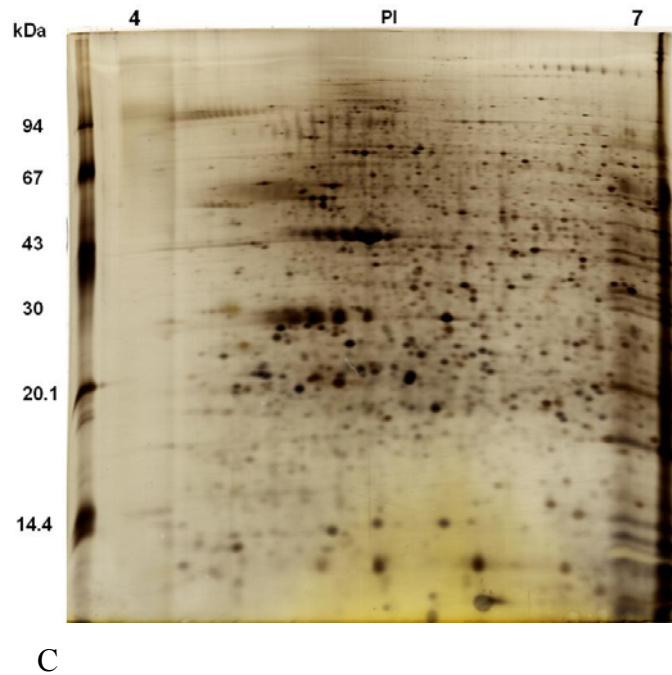


Figura 29. Otimização das condições de preparo do gel. Em A, focalização de seis strips no aparelho IPGphorII. Em B, segunda dimensão executada em placas tipo sanduíche. Em C padrão de qualidade alcançado quando dois strips foram focalizados juntos e a segunda dimensão executada em géis montados em placas separadas.

Também foi confeccionado um gel mais concentrado, com 300 μg de proteínas para ser utilizado na digestão e identificação protéica (figura 30) O protocolo de focalização utilizado foi o mesmo, porém houve um atraso de 6hs nesta etapa, provavelmente pela grande quantidade de proteínas adicionada, bem maior que a quantidade usual de 50 μg .

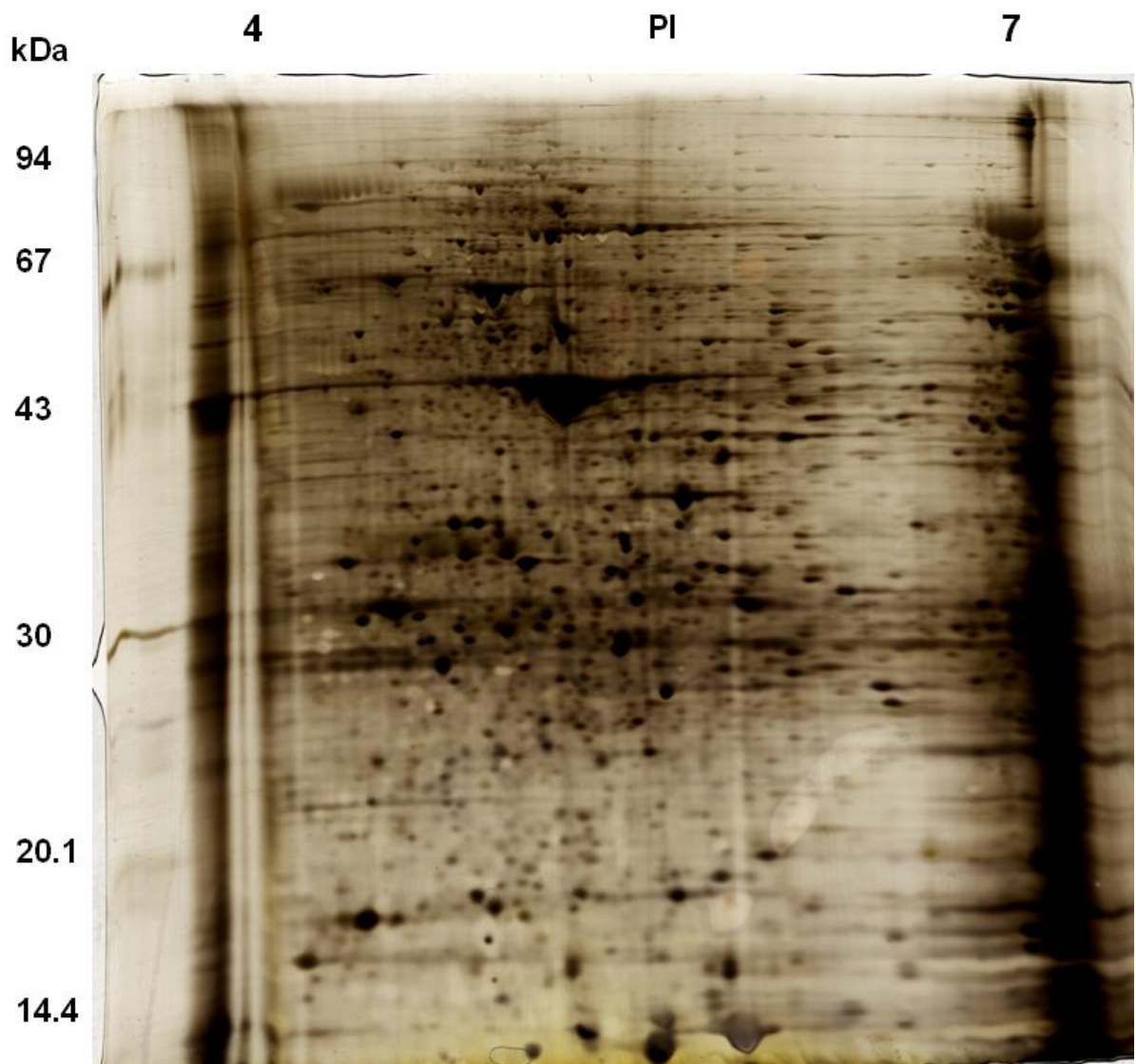
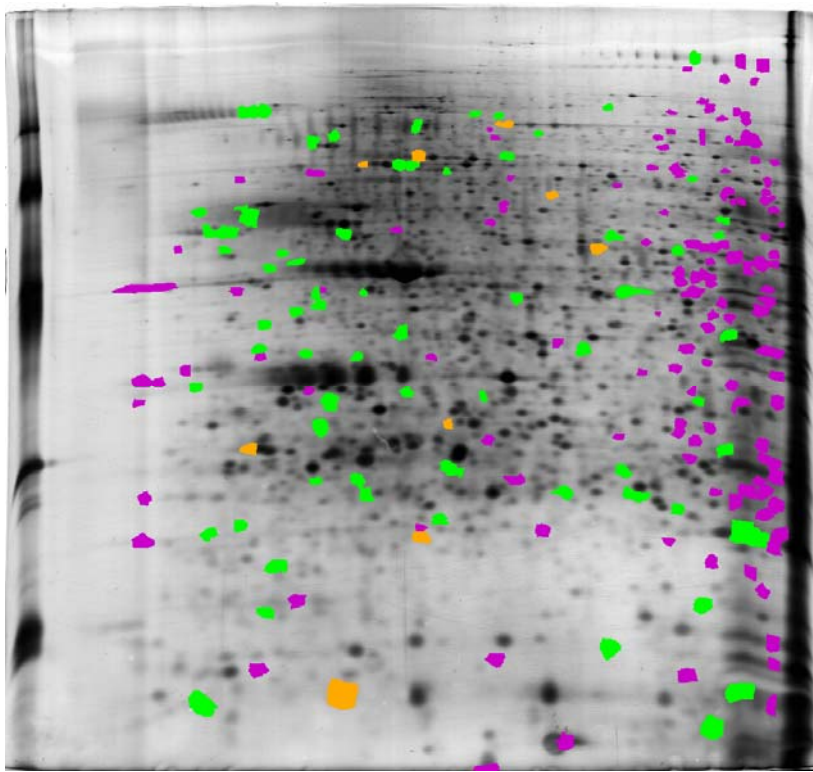


Figura 30. Perfil bidimensional do proteoma de neutrófilos normais (300 μ g de proteínas) corado por CPA, para a identificação de spots por PMF.

4.5.2. Análise dos géis

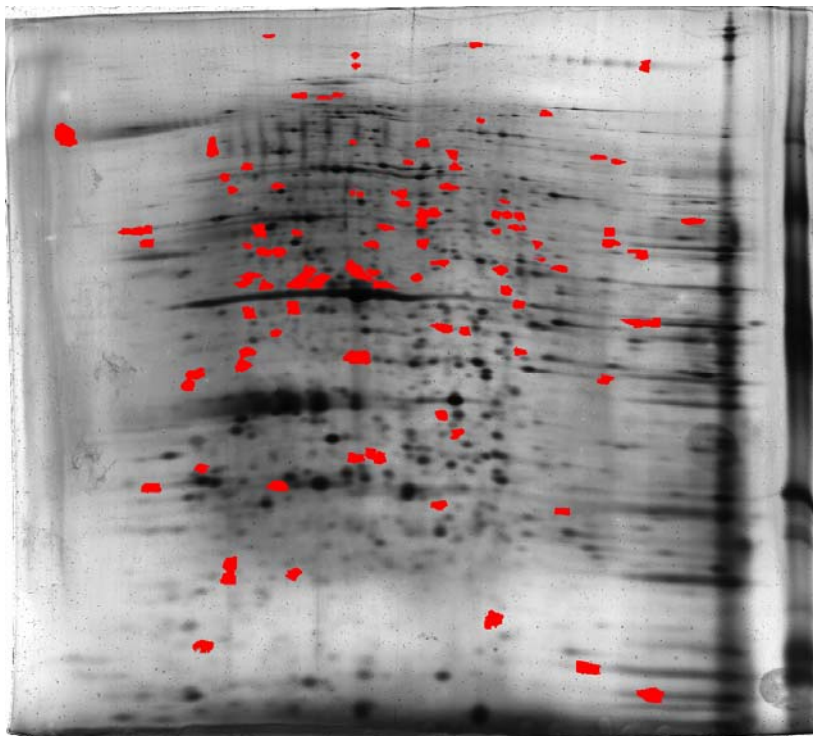
Em média, 1800 spots são detectados pela coloração com prata alta sensibilidade, em géis de neutrófilos. Após a análise estatística, 141 spots foram classificados como exclusivos do grupo Normal e 109 spots foram considerados exclusivos da condição PMA. Grande parte dos spots exclusivos da condição Normal está localizada na faixa final de pH imobilizado do strip, próxima de sete. Vale a pena salientar que muitas destas proteínas tiveram uma limitação na detecção, em alguns géis, devido à localização próxima das proteínas de pI acima de 7, não focalizadas. Figura 31.

Após análise estatística, considerando o nível de significância de $p \leq 0,05$, 83 spots apresentaram expressão diferencial, dos quais 13 spots tiveram expressão aumentada após ativação com PMA e 70 diminuíram com a ativação. Estes cálculos levaram em conta a triplicata experimental (repetição de 3 géis de cada indivíduo) e a triplicata biológica (neutrófilos de 3 indivíduos) na condição Normal e após a ativação in vitro. Logo podemos inferir a confiabilidade das variações identificadas, porém ainda não podemos afirmar quanto à possibilidade de aplicação de tais ocorrências como marcadores diagnósticos ou terapêuticos, pois não temos ainda um estudo de variabilidade populacional comparativo (trabalho em andamento).



- Exclusivo da condição Normal
- Expressão aumentada após ativação com PMA
- Expressão diminuída após ativação com PMA

Figura 31. Gel bidimensional de neutrófilo normal



- Exclusivo da condição PMA

Figura 32. Gel bidimensional de neutrófilo ativado com PMA 100ng/mL

Os valores dados em porcentagem de volume dos spots presentes nos nove géis do grupo Normal e nos nove géis do grupo PMA foram utilizados para os cálculos estatísticos. O valor zero foi atribuído aos spots ausentes em qualquer um dos géis.

Inicialmente, esses dados foram agrupados em Normal e PMA, para a verificação da distribuição gaussiana em cada grupo. Em seguida, aplicou-se o teste t pareado, para os dados que apresentaram uma distribuição normalizada.

O teste t pareado baseia-se na comparação de duas populações, onde se tem amostras aos pares, em que cada par pode corresponder à mesma amostra analisada em situações diferentes, por exemplo. Este teste permite avaliar se as diferenças entre as duas condições experimentais são realmente significativas e não aleatórias [114].

Então, calcula-se a diferença entre cada par de spots ($\text{Normal}_n - \text{PMA}_n$) de um gel antes e outro depois da ativação *in vitro*, podendo haver diferenças positivas e negativas, devido ao aumento ou diminuição da expressão protéica em uma das condições. Depois é feita a média e o desvio padrão destas diferenças, e finalmente o nível de significância é calculado para cada pareamento de spots nos dois grupos. A recomendação para o uso do teste t pareado, é que os dados tenham uma distribuição normalizada, pois a presença de muitos valores extremos diminui a confiabilidade na comparação das diferenças. O teste de Wilcoxon é um teste análogo ao teste t pareado, porém pode ser usado para dados não paramétricos, pois é baseado em posições (Ranking), para cada valor, de acordo com a ordem crescente dos valores. Então se calcula a soma das posições para cada condição analisada e comparam-se os valores obtidos. O teste de Wilcoxon foi usado neste trabalho apenas para os valores não paramétricos.

As tabelas abaixo apresentam os spots diferencialmente expressos, mostrando a média da diferença entre as duas condições para cada *spot* e o nível de significância. Valores negativos sugerem que a expressão foi aumentada na condição PMA, já que durante os cálculos, os valores PMA foram subtraídos dos valores Normal.

Tabela 3: Spots com expressão aumentada após ativação com PMA

Spots com expressão aumentada na condição PMA		
Nº Match	Média (/100)	P≤0,05
218	-0,0102	0,046
334	-0,0146	0,046
356	-0,0366	0,043
490	-0,0565	0,025
680	-0,0584	0,05
768	-0,0278	0,05
904	-0,0127	0,042
1180	-0,0096	0,046
1237	-0,1319	0,043
1416	-0,0198	0,04
1548	-0,1314	0,05
1677	-0,0172	0,028
1679	-0,0245	0,043

Tabela 4: Spots com expressão aumentada no neutrófilo Normal

Spots com expressão aumentada na condição Normal		
Nº Match	Média (/100)	P≤0,05
76	0,035	0,043
155	0,0125	0,043
171	0,0353	0,012
172	0,0359	0,004
174	0,0572	0,034
186	0,0178	0,043
189	0,0069	0,043
216	0,0199	0,05
251	0,0124	0,026
264	0,0315	0,019
285	0,0787	0,028
329	0,0318	0,012
354	0,084	0,012
357	0,0393	0,01
392	0,0095	0,043
421	0,0143	0,043
547	0,0786	0,025
548	0,0859	0,03
577	0,0453	0,043
616	0,065	0,028
618	0,0497	0,043
619	0,0622	0,028
625	0,036	0,05

N° Match	Média (/100)	P≤0,05
642	0,0442	0,028
646	0,0259	0,043
695	0,0251	0,043
704	0,0123	0,028
725	0,0206	0,043
751	0,0196	0,028
820	0,1288	0,027
834	0,0198	0,043
840	0,0186	0,05
847	0,018	0,039
868	0,0133	0,05
892	0,0164	0,046
928	0,03	0,043
948	0,047	0,005
955	0,0657	0,005
985	0,0279	0,043
987	0,0391	0,046
1003	0,0509	0,028
1009	0,0649	0,043
1084	0,1099	0,039
1100	0,0455	0,038
1112	0,008	0,043
1115	0,0306	0,021
1125	0,0226	0,043
1145	0,0175	0,043
1179	0,0434	0,008
1240	0,0803	0,046
1283	0,0279	0,018
1295	0,0223	0,043
1316	0,0271	0,043
1320	0,0778	0,043
1338	0,0303	0,024
1350	0,0242	0,046
1351	0,0949	0,046
1376	0,0317	0,043
1388	0,017	0,043
1397	0,0125	0,043
1410	0,1385	0,043
1414	0,0225	0,043
1448	0,0193	0,028
1483	0,134	0,043
1487	0,0293	0,049
1514	0,0352	0,037
1547	0,1095	0,043
1556	0,2145	0,028
1568	0,1156	0,046
1663	0,0449	0,028

4.6. Identificação de proteínas

Durante este trabalho realizamos a digestão triptica de trinta e cinco spots, sendo que seis proteínas foram identificadas por *peptide mass finger print* (PMF). Na figura 34 temos um exemplo de busca utilizando o programa Mascot para a identificação proteica por PMF.

Estes resultados foram somados a outras vinte e duas proteínas já identificadas pelo nosso grupo de trabalho contribuindo para a elucidação do mapa proteômico do neutrófilo humano. A figura abaixo mostra a localização dos spots equivalentes às 28 proteínas já identificadas pela equipe.

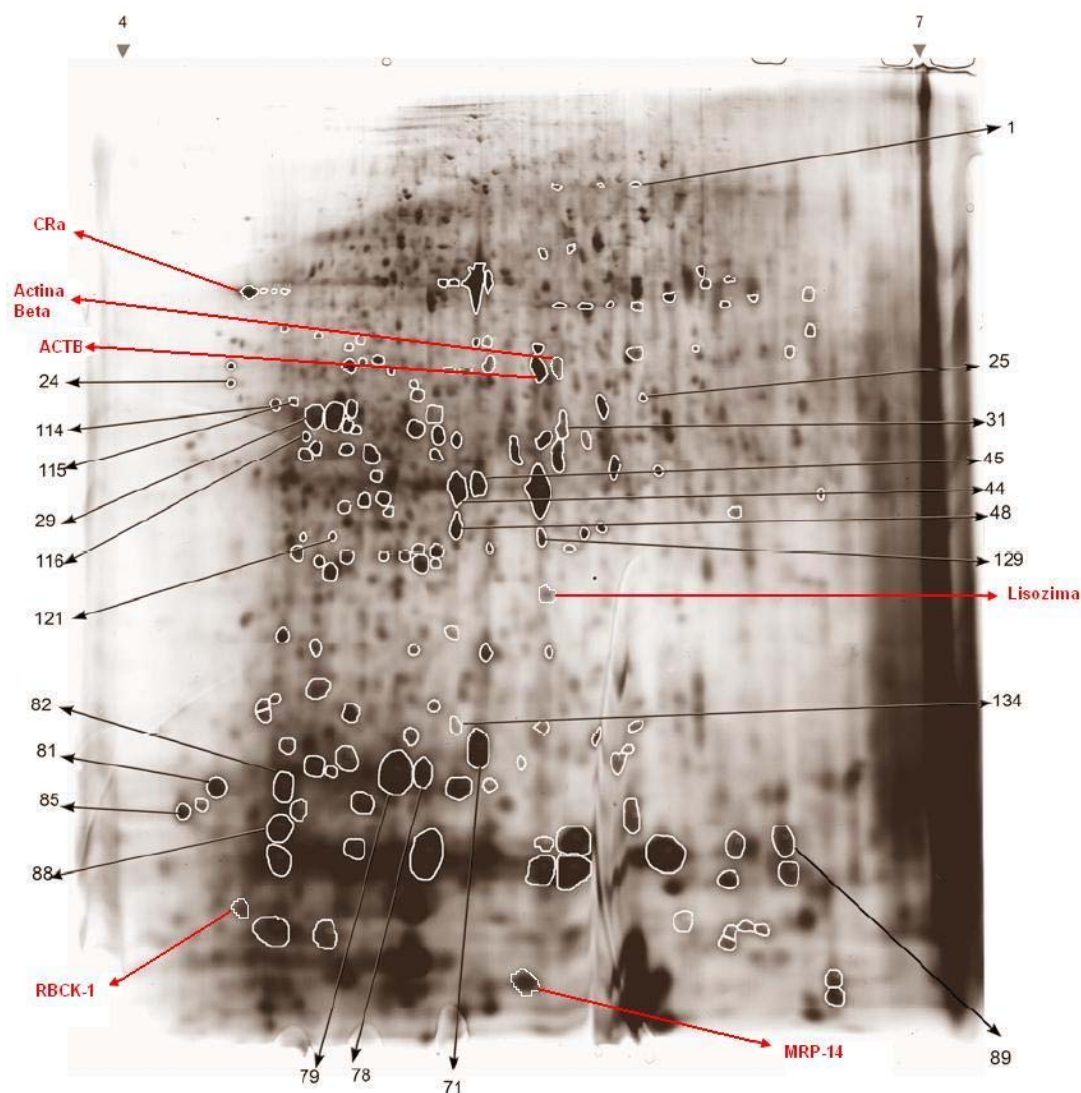
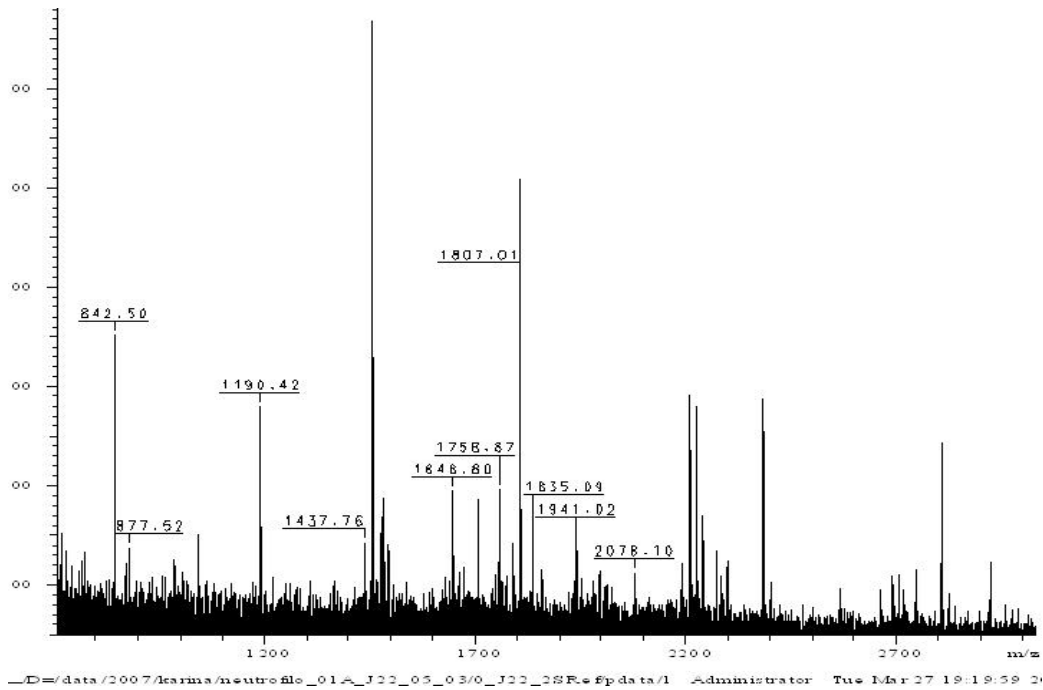


Figura 33. Proteínas identificadas no neutrófilo Normal. A numeração dos spots é a mesma dada pelo programa, a partir do pareamento dos spots dos géis do grupo NORMAL. Em vermelho, as proteínas identificadas neste trabalho.

Tabela 5: Proteínas identificadas do Netrófilo quiescente e seus respectivos códigos de acesso ao banco de dados NCBI, nome, ponto isoelétrico, massa, Score, porcentagem de cobertura da sequência e número de peptídeos pareados com a proteína constante no banco de dados [99]

Spot	Accession number	Name	pI	Mr (kDa)	a) Score	b) C (%)	Matched peptides
1	gi 21221094	putative serine protease	4.78	114	460	47	38
24	Q96CS1	hypothetical protein	6.46	45	118	51	15
25	gi 20380411	hypothetical protein	6.16	60	106	30	12
29	gi 7020414	unnamed protein	5.24	49	74	35	8
31	gi 1695876	Interleukin-13 receptor	5.60	49	65	22	6
44	gi 30157637	phosphoglycerate mutase	8.72	39	76	26	7
45	gi 11342670	azurocidin 1 pre-protein	9.75	27	77	55	7
48	gi 4557293	autoimmune regulator AIRE	6.36	36	79	43	12
71	gi 30159334	ARP2 actin-related protein	8.54	17	70	30	7
78	gi 4827034	tumor necrosis factor	7.63	20	73	52	11
79	gi 3970971	supported protein of EST	4.89	19	64	50	7
81	gi 21739673	hypothetical protein	5.04	18	68	42	7
82	gi 346339	pur beta human protein	4.96	12	74	39	7
85	gi 438069	thiol antioxidant protein	6.84	22	73	58	9
88	gi 29739484	cytoskeletal keratin	7.63	18	79	36	13
89	gi 7657092	interleukin-1 protein	5.89	18	75	47	9
114	gi 11359883	hypothetical protein	4.45	55	248	45	25
115	gi 24211557	chloride channel protein 5	4.69	46	403	84	39
116	gi 23490080	hypothetical protein	10.9	10	86	40	7
121	gi 17438583	nucleophosmin protein	4.54	28	359	90	28
129	gi 13477275	GLUD-1 glutamate dehydrogenase	6.71	29	200	80	19
134	gi 14278516	collagenase-3 protein	5.16	19	128	38	5



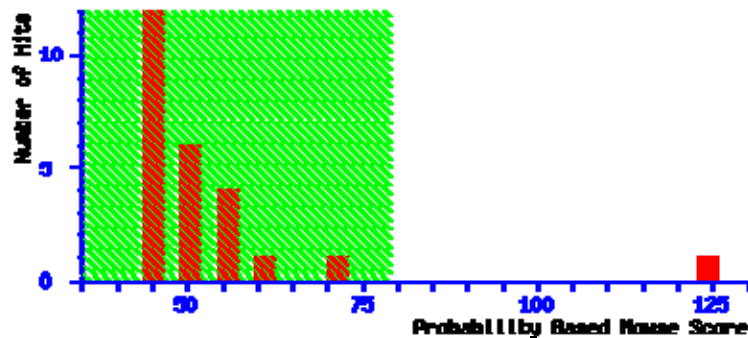
Espectro obtido no programa Xmass, após digestão triptica de um spot.

MATRIX Mascot Search Results

User : karina
 Email : karina.santos@gmail.com
 Database : NCBI nr 20070302 (4696381 sequences; 1624698435 residues)
 Timestamp : 5 Mar 2007 at 19:13:54 GMT
 Top Score : 124 for [gi|20150229](#), Chain A, Crystal Structure Of The Mrp14 Complexed With Chaps

Probability Based Mowse Score

Protein score is $-10 \cdot \log(P)$, where P is the probability that the observed match is a random event. Protein scores greater than 79 are significant ($p < 0.05$).



Concise Protein Summary Report

Format As Concise Protein Summary

Significance threshold $p <$ Max. number of hits

1. [gi|20150229](#) Mass: 13159 Score: **124** Expect: 1.9e-06 Queries matched: 6
 Chain A, Crystal Structure Of The Mrp14 Complexed With Chaps

[gi|82407447](#) **Mass:** 13086 **Score:** 124 **Expect:** 1.9e-06 **Queries matched:** 6
Chain C, Crystal Structure Of Human Calprotectin(S100a8S100A9)

[gi|4506773](#) **Mass:** 13291 **Score:** 122 **Expect:** 3e-06 **Queries matched:** 6
S100 calcium-binding protein A9 [Homo sapiens]

[gi|60831867](#) **Mass:** 13406 **Score:** 122 **Expect:** 3e-06 **Queries matched:** 6
S100 calcium binding protein A9 [synthetic construct]

[gi|7417329](#) **Mass:** 13310 **Score:** 96 **Expect:** 0.0012 **Queries matched:** 5
migration inhibitory factor-related protein 14 variant E [Homo sapiens]

[gi|109016333](#) **Mass:** 13521 **Score:** 74 **Expect:** 0.21 **Queries matched:** 4
PREDICTED: S100 calcium binding protein A9 (calgranulin B) isoform 1 [Macaca mulatta]

Search Parameters

Type of search : Peptide Mass Fingerprint
Enzyme : Trypsin/P
Fixed modifications : Carbamidomethyl (C)
Variable modifications : Oxidation (M)
Mass values : Monoisotopic
Protein Mass : Unrestricted
Peptide Mass Tolerance : ± 0.15 Da
Peptide Charge State : 1+
Max Missed Cleavages : 0
Number of queries : 12
Selected for scoring : 11

Mascot: <http://www.matrixscience.com/>

Protein View

Match to: [gi|20150229](#) Score: 124 Expect: 1.9e-06
Chain A, Crystal Structure Of The Mrp14 Complexed With Chaps

Nominal mass (M_r): 13159; Calculated pI value: 5.71
NCBI BLAST search of [gi|20150229](#) against nr
Unformatted [sequence string](#) for pasting into other applications

Taxonomy: [Homo sapiens](#)

Links to retrieve other entries containing this sequence from NCBI Entrez:

[gi|20150230](#) from [Homo sapiens](#)
[gi|20150231](#) from [Homo sapiens](#)
[gi|20150232](#) from [Homo sapiens](#)
[gi|20150233](#) from [Homo sapiens](#)
[gi|20150234](#) from [Homo sapiens](#)
[gi|20150235](#) from [Homo sapiens](#)
[gi|20150236](#) from [Homo sapiens](#)

Fixed modifications: Carbamidomethyl (C)
Variable modifications: Oxidation (M)
Cleavage by Trypsin/P: cuts C-term side of KR
Number of mass values searched: 12
Number of mass values matched: 6
Sequence Coverage: 67%

Matched peptides shown in **Bold Red**

1 TCKMSQLERN **IETIINTFHQ YSVKLGHPDT LNQGEFKELV RKDLQNFLKK**
51 ENKNEK**VIEH IMEDLDTNAD QLSFEEFIM LMARLTWASH EKMHEGDEGP**
101 **GHHK**PGLGE GTP

Sort Peptides By



Residue Number



Increasing Mass



Decreasing Mass

Start - End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss Sequence
10 - 24	1807.0091	1806.0019	1805.9312	0.0707	0 R.NIETIINTFHQYSVK.L
25 - 37	1455.7516	1454.7443	1454.7154	0.0289	0 K.LGHPDTLNQGEFK.E
43 - 49	877.5181	876.5108	876.4705	0.0403	0 K.DLQNFLK.K
57 - 71	1758.8658	1757.8585	1757.8142	0.0444	0 K.VIEHIMEDLDTNADK.Q Oxidation (M)
72 - 84	1646.8013	1645.7940	1645.7844	0.0097	0 K.QLSFEEFIMLMAR.L
93 - 105	1483.7575	1482.7502	1482.6059	0.1444	0 K.MHEGDEGPGHHHK.P Oxidation (M)

No match to: 1190.4234, 1437.7570, 1706.9097, 1786.9262, 1835.0865, 2078.1004

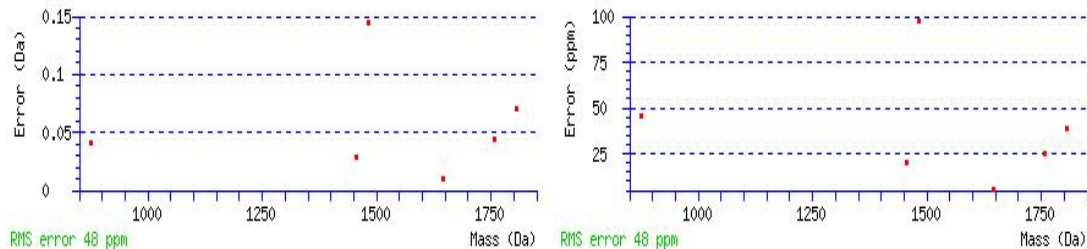


Figura 34. Exemplo de uma busca de impressão digital usando o programa Mascot, a partir de peptídeos selecionados de um espectro de massa (A). A busca resulta numa lista de proteínas candidatas contendo informações incluindo um valor numérico que determina a probabilidade de uma identificação ser randômica (Mowse score). Outros dados importantes são apresentados como: os peptídeos que parearam com a proteína constante no banco de dados (em vermelho) e sua localização dentro da seqüência da mesma, a porcentagem de cobertura da seqüência e o erro experimental.

Dentre as proteínas já identificadas do neutrófilo normal, verificamos que uma proteína hipotética, referente ao spot 14, apresentou diminuição da expressão na condição PMA. Embora o genoma humano esteja bem caracterizado, um grande número de proteínas ainda permanece hipotético. As proteínas hipotéticas geralmente não têm similaridade com proteínas conhecidas de outros organismos. Este fato sugere que estas proteínas possuem função característica e são particulares de espécie.

Das proteínas identificadas no neutrófilo normal, que não apresentaram variações de expressão na condição PMA, existem onze relacionadas ao processo inflamatório, agindo como citocinas, proteases, fatores de transcrição, compostos vasoativos ou protetoras do neutrófilo contra danos oxidativos. Duas estão relacionadas a funções metabólicas e seis são classificadas como estruturais.

Dentre as proteínas identificadas por Fontes et al., 2006, nota-se um receptor para IL-13 identificado pela primeira vez em neutrófilos. Esta identificação também demonstra que a nossa metodologia foi eficiente para a detecção de proteínas de membrana. Além disso, também foram identificados um peptídeo antimicrobiano, a azurocidina, e uma proteína antioxidante, a peroxiredoxina 2, associadas com a proteção celular contra agentes internos e externos [99].

A proteína relacionada à actina (ARP2), também identificada por Fontes e colaboradores, faz parte de um complexo (ARP2/3), localizado na superfície celular e relacionado à montagem de actina nos processos de adesão e migração. O receptor de

TNF e o regulador autoimune (AIRE), também não haviam sido descritos anteriormente em neutrófilos. O AIRE foi classificado como um fator de transcrição que pode estar envolvido na regulação do sistema imune. A interleucina 1- ϵ , que ativa NF-kappa β , por uma via diferente de IL1- α e β , somada a uma isoforma da colagenase também foram identificadas por estes autores [99].

Dos trinta e cinco spots digeridos com tripsina, apenas seis proteínas foram identificadas por finger print. O pequeno número de spots identificados pode ser devido à baixa concentração da proteína no gel; inadequada transferência do strip após a IEF para o gel da segunda dimensão; digestão incompleta pela tripsina e a ineficiente ionização dos peptídeos durante a análise de espectrometria de massa. O fato de que um spot pode conter mais de uma proteína também pode levar a uma falha na identificação. A tabela abaixo mostra as proteínas identificadas neste trabalho e seus respectivos códigos de acesso ao banco de dados NCBI, massa molecular, ponto isoelétrico porcentagem de cobertura em relação à proteína que consta no banco e o *score* que indica a confiabilidade do resultado.

Tabela 6: Proteínas identificadas do Neutrófilo quiescente e seus respectivos códigos de acesso ao banco de dados NCBI, massa molecular e ponto isoelétrico experimentais e teóricos, porcentagem de cobertura da seqüência teórica e score da identificação.

Proteína	No de acesso (NCBI)	MM exp. (Da)	MM teórica (Da)	PI exp.	PI teórico	% cobertura	Mascot Score
Calgranulina B (MRP 14)	gi 20150229	13.000	13.159	5,70	5.71	67	125
Actina Beta	gi 14250401	42.500	41.321	5.55	5.56	27	103
ACTB	gi 15277503	42.000	40.536	5.50	5.55	20	73
RBCK1	gi 13784935	19.000	25.923	5,00	5,28	22	68
G129a lisozima, cadeia A	gi 17942566	30.000	15.161	5.40	9,28	40	66
Isoforma CRA_a	gi 119585739	68.000	69.671	5,40	5,59	9	65

Uma proteína de 13,1 KDa, pI 5.71, com Mascot score de 125, foi identificada por PMF correspondendo à calgranulina B, ou S100A9. Esta proteína pertence à família S100 de proteínas ligantes de cálcio. As calgranulinas A e B compõem o heterodímero chamado de calprotectina, que se liga ao cálcio, presente no citoplasma de neutrófilos e na membrana de monócitos. A concentração de calprotectina em neutrófilos é abundante, e constitui 40% do total de proteínas citosólicas. Ela é secretada

extracelularmente por neutrófilos estimulados e tem funções: antimicrobiana, indutora de apoptose e efeitos “cytokine-like”[115]. Após a ativação com PMA, não encontramos variação na expressão da calgranulina B. Sugerimos que acontece um aumento de expressão ao mesmo tempo em que esta proteína é secretada, o que não modificaria seus níveis intracelulares.

As proteínas da família S100 são reguladas pelo cálcio, sofrendo uma mudança de conformação após sua ligação. Elas possuem um motivo “EF-hand” de ligação de cálcio, onde os resíduos de aminoácidos participam como ligantes na coordenação do metal. Em condições fisiológicas, a maioria das proteínas da família S100 formam complexos não covalentes para exercer suas funções biológicas. S100A8 e S100A9 formam heterodímeros estáveis na ausência de cálcio, mas a tetramerização de dois heterodímeros é estritamente dependente de cálcio [116]. Um estudo demonstrou que a formação de tetrâmeros é um pré-requisito essencial para a atividade biológica deste complexo. A não formação do tetrâmero foi associada à perda de atividade funcional de (S100A8/S100A9)₂ na promoção da formação de microtúbulos [117]. O tetrâmero induzido por cálcio mostrou estar colocalizado com microtubulos durante a ativação de monócitos. Ele também está envolvido na organização do citoesqueleto e diretamente se liga à tubulina promovendo sua polimerização. Contudo pouco se sabe sobre os mecanismos de ação destes heterodímeros e de seus efeitos moduladores sobre a formação de microtúbulos [117].

A fosforilação de S100A8 por uma via dependente de PKC, também foi sugerida como modulatória na translocação do complexo do citoplasma para a membrana durante a ativação do neutrófilo. Além disso, S100A8 e S100A9 fosforiladas, apresentaram um aumento de afinidade por cálcio [118]. Verificou-se também que S100A8 e S100A9 translocam-se para a membrana plasmática e se associam a filamentos intermediários do citoesqueleto, por um mecanismo dependente do influxo de cálcio extracelular [119]. São necessários mais estudos para que se compreenda melhor o mecanismo de ação das calprotectinas no neutrófilo humano e a influência do cálcio neste processo.

Lominadze, et al., demonstraram que MRP14 é substrato para p38MAPcinase [120]. Esta via de sinalização faz parte de várias funções críticas na regulação da resposta inflamatória no neutrófilo, incluindo, quimiotaxia, adesão, explosão respiratória, degranulação e reorganização do citoesqueleto, sendo importante entender os mecanismos moleculares de que p38MAPcinase participa.

As MAPcinases constituem uma grande família de cinases, incluindo duas distintas isoformas (42 e 44kDa), também chamadas de ERK1/2. Ambas são reguladas pela fosforilação de resíduos específicos de treonina e tirosina e a desfosforilação inativa estas proteínas. Estudos mostram que MAPK42/44kDa são ativadas por PMA, por um mecanismo dependente de PKC. Também foi verificado que esta ativação não foi dependente de cálcio [121].

O complexo MRP14/MRP8 também participa da ativação de NADPHoxidase, por aumentar a afinidade de p67phox pelo citocromo b₅₅₈ [120]. Em um outro estudo, verificou-se também que MRP-14 é um estimulador seletivo de adesão, pois regula a afinidade da β 2-integrina, MAC-1 [122].

A segunda proteína identificada, RBCK1, foi recentemente classificada como uma proteína que se liga a PKC β I e zeta, sendo capaz de ativá-la [123]. Ela também possui uma região “Ring-B-Box-Coiled-coil”, encontrada frequentemente em fatores de transcrição, que tem atividade de se ligar ao DNA e ativar a transcrição. Tatematsu (1998) e colaboradores verificaram a atividade transcricional de RBCK1 em co-expressão com várias proteínas cinases em células mamárias. PKA mostrou aumentar a atividade transcricional de RBCK1 em oito vezes, enquanto MEK1 e MEKK1, cinases da via das MAPcinases, reprimiram a atividade desta enzima (figura35). Estes autores sugerem que RBCK1 pode ser um fator de transcrição envolvido na cascata de sinalização de PKA, MEK1 e MEKK1, mediando o crescimento e diferenciação celular [124]. PKA é uma enzima que diminui a avidéz de β 2-integrinas, diminuindo a capacidade de adesão dos neutrófilos ao endotélio [125].

O provável fator de transcrição, RBCK1, foi identificado aqui pela primeira vez em neutrófilos, segundo a literatura analisada, contribuindo para o esclarecimento da via de ativação destas cinases, já descrita anteriormente em granulócitos. Apesar do score significativo, esta proteína apresentou uma massa molecular experimental de 19kDa, bem menor que o valor teórico de 25.9 kDa. Estas variações podem ser devidas a modificações pós-traducionais, que efetivamente alteram as massas moleculares das proteínas. Os peptídeos experimentais que parearam com os peptídeos da digestão teórica, estavam situados mais próximos da região amino terminal, sendo portanto sugerida, uma clivagem pós-traducional mais próxima da região carboxi terminal. Além disso, esta proteína não apresentou expressão diferencial em neutrófilos ativados com PMA. Tokunaga e colaboradores sugerem que a RBCK2, uma proteína codificada por um *splicing* do mesmo gene da RBCK1, interagem entre si formando um complexo que

impede a atividade transcricional de RBCK1 [126]. Por último, os erros experimentais durante a confecção do gel e a corrida da segunda dimensão podem ter influenciado na definição dos marcadores de massa molecular.

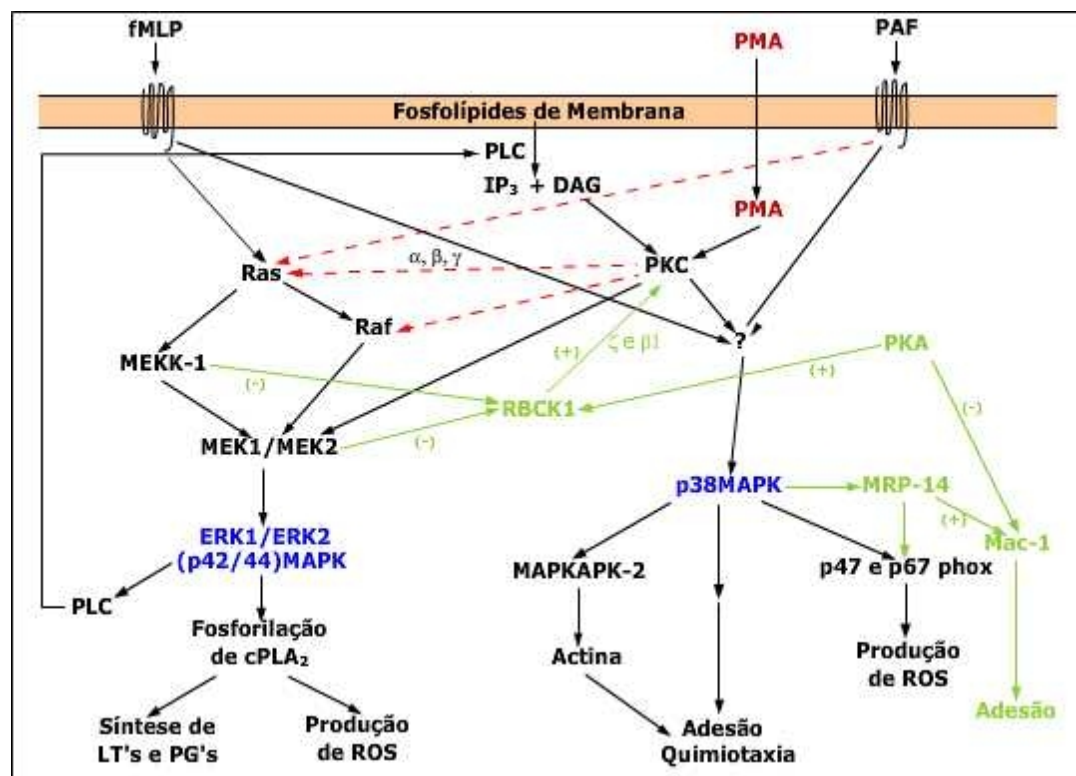


Figura 35. Esquema da via das MAPKinasas com participação da RBCK1 e MRP14. Em verde, as contribuições propostas neste trabalho com a identificação de RBCK1 e MRP14. Setas vermelhas tracejadas indicam mecanismos ainda não confirmados. Sinais positivos e negativos indicam a ativação ou inibição da atividade das enzimas apontadas.

A lisozima é uma proteína antimicrobiana catiônica, de 15 kDa, presente em todos os tipos de grânulos, com concentrações máximas em grânulos específicos, de acordo com seu perfil biossintético. Este peptídeo cliva polímeros de peptideoglicanos das paredes celulares bacterianas e exerce atividade bactericida especialmente em bactérias Gram positivas como a não-patogênica *Bacillus subtilis* [13]. A lisozima também apresentou uma diferença significativa entre a massa molecular e PI experimentais e teóricos, sugerindo modificações pós-traducionais. Muitas proteínas granulares são sintetizadas como pró-formas, sofrendo clivagens proteolíticas dentro dos grânulos, principalmente a remoção de peptídeos amino-terminais, até chegarem à forma ativa. Este mecanismo previne a autotoxicidade celular e garante o direcionamento da proteína aos grânulos de armazenamento e o enovelamento correto,

após sua biossíntese [20]. Alguns estudos mostram que após a fagocitose, enzimas proteolíticas, como catepsina G, D, elastase e proteinase 3 são descarregadas no vacúolo fagocítico potenciando a atividade antimicrobiana da lisozima [127], e que o processamento de lisozimas por proteases gera vários peptídeos antimicrobianos [128]. Portanto, sugerimos que a lisozima identificada do neutrófilo quiescente com massa 30 kDa pode corresponder ao seu estado não ativado ainda na forma de um pró-peptídeo inativo.

As actinas são proteínas altamente conservadas, que estão envolvidas na motilidade de vários tipos de células e expressas em todos os eucariotos. A polimerização dos monômeros de actina leva a formação de um filamento estrutural, chamado F-actina, na forma de duas hélices. As principais isoformas de actina encontradas em vertebrados são α , β e γ . As alfa actinas são encontradas no tecido muscular, sendo o principal constituinte do aparato contrátil. Já as actinas β e γ fazem parte do citoesqueleto e funcionam como mediadoras da motilidade celular. A β -actina, identificada neste trabalho, é o principal isotipo presente nos neutrófilos [129].

Três proteínas foram relatadas por Cicchetti, et al. (2002) como participantes da montagem dos filamentos de actina nos neutrófilos. A primeira, (*actin filament-capping protein*) proteína protetora de actina, se liga com alta afinidade à extremidade final do filamento de actina e bloqueia a adição de novos monômeros, esta proteína é retirada por fosfolípidos de membrana, permitindo a elongação do filamento. A segunda proteína, também identificada pelo nosso grupo, é um complexo nucleador de actina, Arp2/3, que se liga ao filamento de actina e gera um novo filamento adjacente, com extremidade livre para adição de novos monômeros. Por último, temos uma proteína que tem a função de se ligar e estabilizar as junções entre os diversos filamentos de actina, chamada de proteína ligadora de filamentos de actina (*actin filament cross-linking protein*), gerando as estruturas encontradas em uma célula em migração [129].

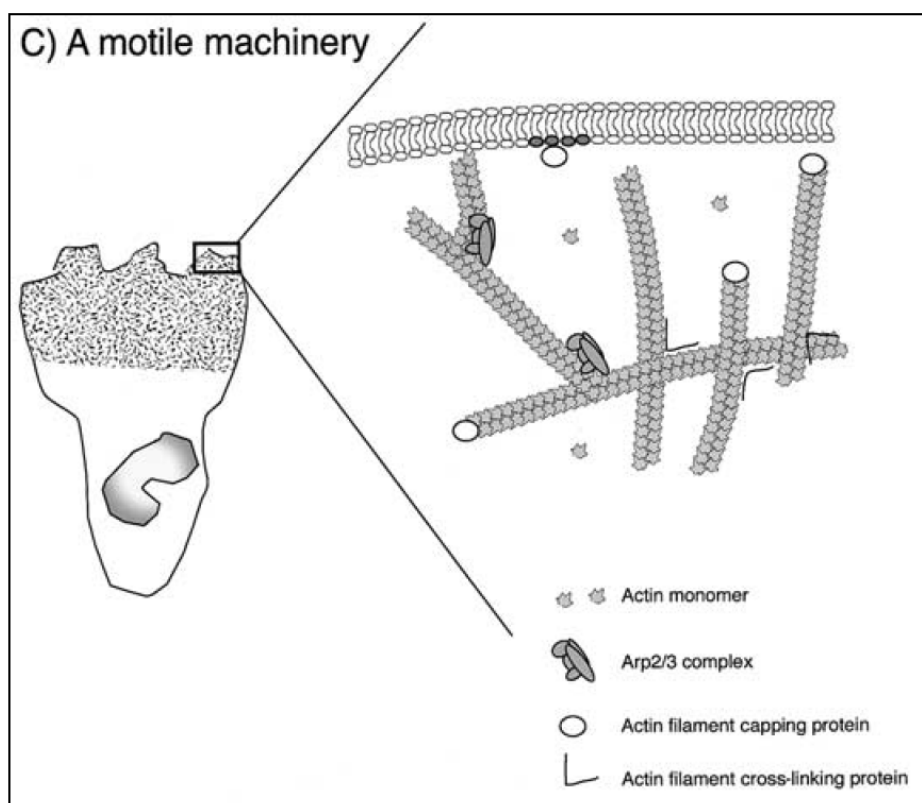


Figura 36. Regulação do alongamento de um filamento de actina em neutrófilos. Arp2/3 se liga lateralmente a um filamento de actina e se inicia o crescimento de um novo filamento adjacente. A proteína protetora do filamento de actina é retirada por fosfolípidos de membrana deixando a extremidade livre para a adição de novos monômeros, e a ligação entre os diferentes filamentos de actina é feita pela proteína ligadora de actina [129].

As duas proteínas estruturais, β -actina e ARP2, identificadas pelo nosso grupo de trabalho estão incluídas na proposta de Cicchetti, et al. (2002), para a montagem do sistema de mobilidade de neutrófilos. Não verificamos diferença de expressão dessas duas proteínas após a ativação do neutrófilo com PMA. Entretanto, a ativação da via das MAP cinases depois deste estímulo, pode levar à ativação do maquinário descrito, induzindo a polimerização de actina e o início de várias funções relacionadas à motilidade como a quimiotaxia, adesão e migração do neutrófilo. Sugerimos que as proteínas estruturais identificadas não apresentam expressão diferencial devido ao fato de serem componentes de um sistema motor, que é regulado durante o seu processo de montagem.

A CRA isoforma a, ou APPL1, também identificada neste trabalho, possui um domínio de ligação a tirosinas fosforiladas (PTB), além de um zíper de leucinas e um domínio homólogo à plecstrina, (PH). De acordo com a literatura consultada, muito pouco se conhece sobre esta proteína e não encontramos nenhuma descrição da sua presença em neutrófilos, sendo registrada aqui pela primeira vez. Todavia, encontramos

relatos da participação da CRAa em vias de sinalização relacionadas à Rab5GTPase, também verificada em neutrófilos, o que corrobora seu achado neste tipo celular.

A Rab5 GTPase regula a fusão entre fagossomos e organelas citoplasmáticas, principalmente grânulos secundários e azurófilos, em neutrófilos humanos [130]. Em células HeLa, CRAa se liga especificamente à forma ativa de Rab5 GTPase, situada nos endossomas, que em resposta a um estímulo extracelular, hidrolisa o GTP liberando CRAa e permitindo sua posterior translocação para o núcleo, onde age como regulador da expressão gênica. A interação com Rab5 é essencial para a localização de CRAa nos endossomas e para o funcionamento do seu ciclo endossoma-núcleo. CRAa se mostrou essencial para a proliferação celular e esta função requer ligação à Rab5 [131].

Sugerimos que várias outras proteínas identificadas podem ter regulações pós traducionais, uma vez que a correlação entre genoma, ou mesmo transcriptoma e proteoma é muito baixa, conforme mostra o estudo realizado por Fessler et al, comparando com os níveis de expressão protéica em neutrófilos ativados com LPS utilizando *microarray* e proteômica. Esses autores mostram que a ativação do neutrófilo com LPS alterou os níveis de transcrição gênica e de expressão de proteínas, porém a concordância entre os níveis de mRNA e proteínas é muito baixo [96].

Sugerimos também, que a RBCK1 pode fazer parte da complexa via das MAP cinases em neutrófilos, e que sua regulação, juntamente com a MRP-14, podem ser mediadas por fosforilação, o que explicaria o fato de não apresentarem diferença de expressão no neutrófilo ativado por PMA. Há descrições na literatura, que várias proteínas quinases envolvidas neste processo são reguladas dessa maneira. Como exemplo, lisados de neutrófilos não ativados apresentaram quantidades equivalentes de p42/44MAPK e p38MAPK se comparado com amostras ativadas com PAF e fMLP. Além disso, a fosforilação significativa de resíduos de tirosina destas proteínas foi verificada nos neutrófilos ativados, indicando uma regulação pós traducional [83].

5. CONCLUSÕES

A partir dos procedimentos realizados e dos resultados obtidos, algumas conclusões podem ser feitas:

A otimização da técnica de separação celular no estudo da proteômica de neutrófilos, permitiu um melhor controle experimental, evitando a ativação indesejada durante o processo de purificação a partir do sangue total. As adversidades de curto tempo de sobrevivência do neutrófilo, somadas às dificuldades de cultivo *in vitro*, foram contornadas devido à agilidade de se executar a separação celular, ativação *in vitro* e lise celular em um intervalo de no máximo duas horas.

A citometria de fluxo foi um instrumento de grande valia para o controle de estimulação e ativação celular devido à sua grande sensibilidade, necessitando de pequenas quantidades celulares, além do fato de permitir o estudo de vários parâmetros celulares ao mesmo tempo. Também foi possível verificar através da citometria de fluxo, um achado inesperado e que necessita de estudo posteriores, referente ao aumento significativo da atividade da NADPHoxidase intracelular na presença de cálcio após ativação com PMA.

Por último, a análise proteômica foi uma abordagem apropriada para o estudo desenvolvido pois permitiu avaliar o conjunto de proteínas expressas, bem como analisar as diferenças de expressão entre os neutrófilos normais e ativados com PMA.

Todos esses resultados contribuem para o esclarecimento das vias de ativação induzidas pelo PMA, auxiliando no entendimento dos neutrófilos no processo inflamatório.

6. PERSPECTIVAS

Dentre as perspectivas para o futuro estão a continuação da identificação de proteínas de neutrófilos do grupo Normal e do grupo PMA, finalizando a identificação do mapa proteômico ácido de neutrófilos nestas duas condições. Além destes trabalhos, ainda está em andamento um estudo da variabilidade individual dos spots do grupo normal na população, o que nos vai permitir inferir sobre a expressão diferencial populacional de proteínas de neutrófilo e comparar tais resultados à expressão diferencial em situações de ativação, indicando com maior clareza os melhores candidatos a marcadores moleculares.

A análise proteômica de neutrófilos ativados *in vitro* com outros estimuladores e ativadores como PAF, fMLP, TNF α e LPS também estão em andamento e contribuirão para desvendar as diversas semelhanças e as diferenças entre neutrófilos estimulados e ativados, o que é expresso pelo polimorfonuclear em seu estado estimulado e o que ele expressa quando ativado, separadamente. Isso será de grande importância para complementar os resultados encontrados neste trabalho e no trabalho com os neutrófilos não ativados. Além disso, já estão sendo realizados os primeiros géis para a análise proteômica de neutrófilos humanos, tanto não-ativados quanto estimulados e ativados, em pI básico.

A longo prazo, os estudos e achados desta linha de pesquisa poderão ser unidos às ferramentas tecnológicas da microbiologia, farmacologia, e biologia molecular, para obtenção de fármacos ou anticorpos a serem utilizados na Medicina para diagnóstico, prognóstico ou mesmo tratamento de doenças inflamatórias sistêmicas.

7. REFERÊNCIAS

1. Kuijpers, T. and D. Roos, *Neutrophils*. Encyclopedia of life sciences, 2001.
2. Goldsby, R., T. Kindt, and B. Osborn, *Kuby Immunologia*. 4a ed. Vol. 1. 2002.
3. Babior, B.M., *NADPH oxidase: an update*. Blood, 1999. **93**(5): p. 1464-76.
4. Gabler, W.L., W.W. Bullock, and H.R. Creamer, *Phorbol myristate acetate induction of chemotactic migration of human polymorphonuclear neutrophils*. Inflammation, 1993. **17**(4): p. 521-30.
5. Cassatella, M.A., *Neutrophil-derived proteins: selling cytokines by the pound*. Adv Immunol, 1999. **73**: p. 369-509.
6. Zen, K. and C.A. Parkos, *Leukocyte-epithelial interactions*. Curr Opin Cell Biol, 2003. **15**(5): p. 557-64.
7. Wagner, J.G. and R.A. Roth, *Neutrophil migration mechanisms, with an emphasis on the pulmonary vasculature*. Pharmacol Rev, 2000. **52**(3): p. 349-74.
8. Rosales, C.B., E. J., *The Neutrophil - The natural Immune System*. 1° ed. Vol. 1. 1993, New York: Oxford University Press 307.
9. McKenzie, S.E. and A.D. Schreiber, *Fc gamma receptors in phagocytes*. Curr Opin Hematol, 1998. **5**(1): p. 16-21.
10. Lee, W.L., R.E. Harrison, and S. Grinstein, *Phagocytosis by neutrophils*. Microbes Infect, 2003. **5**(14): p. 1299-306.
11. Jaconi, M.E., et al., *Cytosolic free calcium elevation mediates the phagosome-lysosome fusion during phagocytosis in human neutrophils*. J Cell Biol, 1990. **110**(5): p. 1555-64.
12. Sengelov, H., L. Kjeldsen, and N. Borregaard, *Control of exocytosis in early neutrophil activation*. J Immunol, 1993. **150**(4): p. 1535-43.
13. Faurschou, M. and N. Borregaard, *Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation*. Microbes Infect, 2003. **5**(14): p. 1317-27.
14. Bainton, D.F. and M.G. Farquhar, *Origin of granules in polymorphonuclear leukocytes. Two types derived from opposite faces of the Golgi complex in developing granulocytes*. J Cell Biol, 1966. **28**(2): p. 277-301.
15. Kjeldsen, L., et al., *Structural and functional heterogeneity among peroxidase-negative granules in human neutrophils: identification of a distinct gelatinase-containing granule subset by combined immunocytochemistry and subcellular fractionation*. Blood, 1993. **82**(10): p. 3183-91.
16. Borregaard, N., et al., *Biosynthesis of granule proteins in normal human bone marrow cells. Gelatinase is a marker of terminal neutrophil differentiation*. Blood, 1995. **85**(3): p. 812-7.
17. Borregaard, N., et al., *Stimulus-dependent secretion of plasma proteins from human neutrophils*. J Clin Invest, 1992. **90**(1): p. 86-96.
18. Borregaard, N., L.J. Miller, and T.A. Springer, *Chemoattractant-regulated mobilization of a novel intracellular compartment in human neutrophils*. Science, 1987. **237**(4819): p. 1204-6.
19. Cowland, J.B. and N. Borregaard, *The individual regulation of granule protein mRNA levels during neutrophil maturation explains the heterogeneity of neutrophil granules*. J Leukoc Biol, 1999. **66**(6): p. 989-95.
20. Arnljots, K., et al., *Timing, targeting and sorting of azurophil granule proteins in human myeloid cells*. Leukemia, 1998. **12**(11): p. 1789-95.

21. Cieutat, A.M., et al., *Azurophilic granules of human neutrophilic leukocytes are deficient in lysosome-associated membrane proteins but retain the mannose 6-phosphate recognition marker*. *Blood*, 1998. **91**(3): p. 1044-58.
22. Faurschou, M., et al., *Defensin-rich granules of human neutrophils: characterization of secretory properties*. *Biochim Biophys Acta*, 2002. **1591**(1-3): p. 29-35.
23. Ganz, T., et al., *Defensins. Natural peptide antibiotics of human neutrophils*. *J Clin Invest*, 1985. **76**(4): p. 1427-35.
24. Owen, C.A. and E.J. Campbell, *The cell biology of leukocyte-mediated proteolysis*. *J Leukoc Biol*, 1999. **65**(2): p. 137-50.
25. Chertov, O., et al., *Identification of defensin-1, defensin-2, and CAP37/azurocidin as T-cell chemoattractant proteins released from interleukin-8-stimulated neutrophils*. *J Biol Chem*, 1996. **271**(6): p. 2935-40.
26. Sengelov, H., et al., *Mobilization of granules and secretory vesicles during in vivo exudation of human neutrophils*. *J Immunol*, 1995. **154**(8): p. 4157-65.
27. Jesaitis, A.J., et al., *Ultrastructural localization of cytochrome b in the membranes of resting and phagocytosing human granulocytes*. *J Clin Invest*, 1990. **85**(3): p. 821-35.
28. Masson, P.L., J.F. Heremans, and E. Schonke, *Lactoferrin, an iron-binding protein in neutrophilic leukocytes*. *J Exp Med*, 1969. **130**(3): p. 643-58.
29. Kjeldsen, L., et al., *Isolation and primary structure of NGAL, a novel protein associated with human neutrophil gelatinase*. *J Biol Chem*, 1993. **268**(14): p. 10425-32.
30. Lollike, K., et al., *Lysozyme in human neutrophils and plasma. A parameter of myelopoietic activity*. *Leukemia*, 1995. **9**(1): p. 159-64.
31. Sengelov, H., et al., *Subcellular localization and dynamics of Mac-1 (alpha m beta 2) in human neutrophils*. *J Clin Invest*, 1993. **92**(3): p. 1467-76.
32. Kjeldsen, L., et al., *Subcellular localization and release of human neutrophil gelatinase, confirming the existence of separate gelatinase-containing granules*. *Biochem J*, 1992. **287** (Pt 2): p. 603-10.
33. Laudanna, C., et al., *Sulfatides trigger increase of cytosolic free calcium and enhanced expression of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-8 mRNA in human neutrophils. Evidence for a role of L-selectin as a signaling molecule*. *J Biol Chem*, 1994. **269**(6): p. 4021-6.
34. Berton, G., et al., *Beta 2 integrin-dependent protein tyrosine phosphorylation and activation of the FGR protein tyrosine kinase in human neutrophils*. *J Cell Biol*, 1994. **126**(4): p. 1111-21.
35. Fuortes, M., W.W. Jin, and C. Nathan, *Adhesion-dependent protein tyrosine phosphorylation in neutrophils treated with tumor necrosis factor*. *J Cell Biol*, 1993. **120**(3): p. 777-84.
36. Fallman, M., et al., *Complement receptor-mediated phagocytosis is associated with accumulation of phosphatidylcholine-derived diglyceride in human neutrophils. Involvement of phospholipase D and direct evidence for a positive feedback signal of protein kinase*. *J Biol Chem*, 1992. **267**(4): p. 2656-63.
37. Hellberg, C., et al., *Ca²⁺ signalling mechanisms of the beta 2 integrin on neutrophils: involvement of phospholipase C gamma 2 and Ins(1,4,5)P₃*. *Biochem J*, 1996. **317** (Pt 2): p. 403-9.
38. Suchard, S.J., et al., *Phospholipase D-mediated diradylglycerol formation coincides with H₂O₂ and lactoferrin release in adherent human neutrophils*. *J Biol Chem*, 1994. **269**(11): p. 8063-8.

39. Blackwood, R.A. and J.D. Ernst, *Characterization of Ca²⁺(+)-dependent phospholipid binding, vesicle aggregation and membrane fusion by annexins*. *Biochem J*, 1990. **266**(1): p. 195-200.
40. Rothman, J.E., *The protein machinery of vesicle budding and fusion*. *Protein Sci*, 1996. **5**(2): p. 185-94.
41. Martin-Martin, B., et al., *Involvement of SNAP-23 and syntaxin 6 in human neutrophil exocytosis*. *Blood*, 2000. **96**(7): p. 2574-83.
42. Ambruso, D.R., N. Cusack, and G. Thurman, *NADPH oxidase activity of neutrophil specific granules: requirements for cytosolic components and evidence of assembly during cell activation*. *Mol Genet Metab*, 2004. **81**(4): p. 313-21.
43. El-Benna, J., et al., *Phagocyte NADPH oxidase: a multicomponent enzyme essential for host defenses*. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, 2005. **53**(3): p. 199-206.
44. van der Vliet, A., et al., *Formation of reactive nitrogen species during peroxidase-catalyzed oxidation of nitrite. A potential additional mechanism of nitric oxide-dependent toxicity*. *J Biol Chem*, 1997. **272**(12): p. 7617-25.
45. Jiang, Q. and J.K. Hurst, *Relative chlorinating, nitrating, and oxidizing capabilities of neutrophils determined with phagocytosable probes*. *J Biol Chem*, 1997. **272**(52): p. 32767-72.
46. Nisimoto, Y., et al., *The p67(phox) activation domain regulates electron flow from NADPH to flavin in flavocytochrome b(558)*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(33): p. 22999-3005.
47. Sheppard, F.R., et al., *Structural organization of the neutrophil NADPH oxidase: phosphorylation and translocation during priming and activation*. *J Leukoc Biol*, 2005. **78**(5): p. 1025-42.
48. Gillibert, M., et al., *Another biological effect of tosylphenylalanylchloromethane (TPCK): it prevents p47phox phosphorylation and translocation upon neutrophil stimulation*. *Biochem J*, 2005. **386**(Pt 3): p. 549-56.
49. Lambeth, J.D., *NOX enzymes and the biology of reactive oxygen*. *Nat Rev Immunol*, 2004. **4**(3): p. 181-9.
50. Karlsson, A., J.B. Nixon, and L.C. McPhail, *Phorbol myristate acetate induces neutrophil NADPH-oxidase activity by two separate signal transduction pathways: dependent or independent of phosphatidylinositol 3-kinase*. *J Leukoc Biol*, 2000. **67**(3): p. 396-404.
51. Patino, P.J., et al., *Molecular characterization of autosomal recessive chronic granulomatous disease caused by a defect of the nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (reduced form) oxidase component p67-phox*. *Blood*, 1999. **94**(7): p. 2505-14.
52. Roos, D., et al., *Mutations in the X-linked and autosomal recessive forms of chronic granulomatous disease*. *Blood*, 1996. **87**(5): p. 1663-81.
53. Roos, D., R. van Bruggen, and C. Meischl, *Oxidative killing of microbes by neutrophils*. *Microbes Infect*, 2003. **5**(14): p. 1307-15.
54. Morgan, M.D., et al., *Can neutrophils be manipulated in vivo?* *Rheumatology (Oxford)*, 2005. **44**(5): p. 597-601.
55. Malenica, B., M. Rudolf, and A. Kozmar, *Antineutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA): diagnostic utility and potential role in the pathogenesis of vasculitis*. *Acta Dermatovenerol Croat*, 2004. **12**(4): p. 294-313.
56. Lamprecht, P., *[New aspects in ANCA-associated vasculitides]*. *Med Klin (Munich)*, 2004. **99**(9): p. 518-22.

57. Radford, D.J., J.M. Lord, and C.O. Savage, *The activation of the neutrophil respiratory burst by anti-neutrophil cytoplasm autoantibody (ANCA) from patients with systemic vasculitis requires tyrosine kinases and protein kinase C activation*. Clin Exp Immunol, 1999. **118**(1): p. 171-9.
58. Lopes, A.C. and V.A. Neto, *Tratado de Clínica Médica*. 2006. p. 4589 - 4606.
59. Botha, A.J., et al., *Postinjury neutrophil priming and activation states: therapeutic challenges*. Shock, 1995. **3**(3): p. 157-66.
60. Swain, S.D., T.T. Rohn, and M.T. Quinn, *Neutrophil priming in host defense: role of oxidants as priming agents*. Antioxid Redox Signal, 2002. **4**(1): p. 69-83.
61. Brown, G.E., et al., *Distinct ligand-dependent roles for p38 MAPK in priming and activation of the neutrophil NADPH oxidase*. J Biol Chem, 2004. **279**(26): p. 27059-68.
62. Kitchen, E., et al., *Demonstration of reversible priming of human neutrophils using platelet-activating factor*. Blood, 1996. **88**(11): p. 4330-7.
63. Siddiqui, R.A., et al., *Phorbol ester-induced priming of superoxide generation by phosphatidic acid-stimulated neutrophils and granule-free neutrophil cytoplasts*. J Leukoc Biol, 1995. **58**(2): p. 189-95.
64. Klebanoff, S.J., et al., *Stimulation of neutrophils by tumor necrosis factor*. J Immunol, 1986. **136**(11): p. 4220-5.
65. Forsberg, M., et al., *Tumour necrosis factor-alpha potentiates CR3-induced respiratory burst by activating p38 MAP kinase in human neutrophils*. Immunology, 2001. **103**(4): p. 465-72.
66. Lewkowicz, P., et al., *Epidermal growth factor enhances TNF-alpha-induced priming of human neutrophils*. Immunol Lett, 2005. **96**(2): p. 203-10.
67. Hughes, J.E., et al., *Priming of neutrophil respiratory burst activity by lipopolysaccharide from Burkholderia cepacia*. Infect Immun, 1997. **65**(10): p. 4281-7.
68. www.bodd.cf.ac.uk/BotDermFolder/BotDermE/EUPH-4.html, Botanical Dermatology Database. [cited].
69. Sergeant, S. and L.C. McPhail, *Opsonized zymosan stimulates the redistribution of protein kinase C isoforms in human neutrophils*. J Immunol, 1997. **159**(6): p. 2877-85.
70. Downey, G.P., et al., *Phorbol ester-induced actin assembly in neutrophils: role of protein kinase C*. J Cell Biol, 1992. **116**(3): p. 695-706.
71. Cunha, K.C.S., *Sobrevida das células ganglionares da retina induzida pelo PMA: envolvimento de PKC delta e JNK*. 2006, Universidade Federal Fluminense: Niterói. p. 76.
72. Newton, A.C., *Protein kinase C: structural and spatial regulation by phosphorylation, cofactors, and macromolecular interactions*. Chem Rev, 2001. **101**(8): p. 2353-64.
73. Roos, F.J., A. Zimmermann, and H.U. Keller, *Effect of phorbol myristate acetate and the chemotactic peptide fNLPNTL on shape and movement of human neutrophils*. J Cell Sci, 1987. **88 (Pt 3)**: p. 399-406.
74. Dekker, L.V., et al., *Protein kinase C-beta contributes to NADPH oxidase activation in neutrophils*. Biochem J, 2000. **347 Pt 1**: p. 285-9.
75. Brown, G.E., et al., *A novel assay system implicates PtdIns(3,4)P(2), PtdIns(3)P, and PKC delta in intracellular production of reactive oxygen species by the NADPH oxidase*. Mol Cell, 2003. **11**(1): p. 35-47.
76. Bouin, A.P., et al., *p40(phox) is phosphorylated on threonine 154 and serine 315 during activation of the phagocyte NADPH oxidase. Implication of a*

- protein kinase c-type kinase in the phosphorylation process.* J Biol Chem, 1998. **273**(46): p. 30097-103.
77. Regier, D.S., et al., *A phosphatidic acid-activated protein kinase and conventional protein kinase C isoforms phosphorylate p22(phox), an NADPH oxidase component.* J Biol Chem, 1999. **274**(51): p. 36601-8.
 78. Benna, J.E., et al., *Phosphorylation of the respiratory burst oxidase subunit p67(phox) during human neutrophil activation. Regulation by protein kinase C-dependent and independent pathways.* J Biol Chem, 1997. **272**(27): p. 17204-8.
 79. Chen, L.W., M.W. Lin, and C.M. Hsu, *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, 2005. **12**(2): p. 311-9.
 80. Hale, K.K., et al., *Differential expression and activation of p38 mitogen-activated protein kinase alpha, beta, gamma, and delta in inflammatory cell lineages.* J Immunol, 1999. **162**(7): p. 4246-52.
 81. Krump, E., et al., *Chemotactic peptide N-formyl-met-leu-phe activation of p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) and MAPK-activated protein kinase-2 in human neutrophils.* J Biol Chem, 1997. **272**(2): p. 937-44.
 82. Hazan, I., et al., *Cytosolic phospholipase A2 and its mode of activation in human neutrophils by opsonized zymosan. Correlation between 42/44 kDa mitogen-activated protein kinase, cytosolic phospholipase A2 and NADPH oxidase.* Biochem J, 1997. **326 (Pt 3)**: p. 867-76.
 83. Nick, J.A., et al., *Common and distinct intracellular signaling pathways in human neutrophils utilized by platelet activating factor and FMLP.* J Clin Invest, 1997. **99**(5): p. 975-86.
 84. Darzynkiewicz, Z.C., H.A.; Robinson, J.A. , *Methods in Cell Biology.* 3 ed. Vol. 63. 2001: Academic Press 650.
 85. Bertho, A.L. *Conceitos Básicos de Citometria de Fluxo.* [cited.
 86. van Eeden, S.F., et al., *The use of flow cytometry to measure neutrophil function.* J Immunol Methods, 1999. **232**(1-2): p. 23-43.
 87. Walrand, S., et al., *Flow cytometry study of polymorphonuclear neutrophil oxidative burst: a comparison of three fluorescent probes.* Clin Chim Acta, 2003. **331**(1-2): p. 103-10.
 88. Niwa, Y., et al., *Role of cytokines, tyrosine kinase, and protein kinase C on production of superoxide and induction of scavenging enzymes in human leukocytes.* Clin Immunol Immunopathol, 1996. **79**(3): p. 303-13.
 89. Haugland, R.P., *Handbook of fluorescent probes.* Molecular Probes Inc, 1996.
 90. Quadroni, M. and P. James, *Proteomics and automation.* Electrophoresis, 1999. **20**(4-5): p. 664-77.
 91. Anderson, N.L., A.D. Matheson, and S. Steiner, *Proteomics: applications in basic and applied biology.* Curr Opin Biotechnol, 2000. **11**(4): p. 408-12.
 92. McDonald, W.H. and J.R. Yates, 3rd, *Proteomic tools for cell biology.* Traffic, 2000. **1**(10): p. 747-54.
 93. Wang, X., H. Zhao, and R. Andersson, *Proteomics and leukocytes: an approach to understanding potential molecular mechanisms of inflammatory responses.* J Proteome Res, 2004. **3**(5): p. 921-9.
 94. Kasper, B., et al., *Cytosolic proteins from neutrophilic granulocytes: a comparison between patients with severe chronic neutropenia and healthy donors.* Electrophoresis, 1997. **18**(1): p. 142-9.

95. Yamashita, S., et al., *Analysis of neutrophil proteins of patients with Behcet's disease by two-dimensional gel electrophoresis*. Biol Pharm Bull, 2000. **23**(5): p. 519-22.
96. Fessler, M.B., et al., *A genomic and proteomic analysis of activation of the human neutrophil by lipopolysaccharide and its mediation by p38 mitogen-activated protein kinase*. J Biol Chem, 2002. **277**(35): p. 31291-302.
97. Theilgaard-Monch, K., et al., *The transcriptional program of terminal granulocytic differentiation*. Blood, 2005. **105**(4): p. 1785-96.
98. Piubelli, C., et al., *Proteome analysis of rat polymorphonuclear leukocytes: a two-dimensional electrophoresis/mass spectrometry approach*. Electrophoresis, 2002. **23**(2): p. 298-310.
99. de Souza Castro, M., et al., *Proteome analysis of resting human neutrophils*. Protein Pept Lett, 2006. **13**(5): p. 481-7.
100. www.gehealthcare.com/cellprep. [cited.
101. Herbert, B., *Advances in protein solubilisation for two-dimensional electrophoresis*. Electrophoresis, 1999. **20**(4-5): p. 660-3.
102. Pasquali, C., I. Fialka, and L.A. Huber, *Preparative two-dimensional gel electrophoresis of membrane proteins*. Electrophoresis, 1997. **18**(14): p. 2573-81.
103. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding*. Analytical Biochemistry, 1976. **72**: p. 248-254.
104. LARSEN, P.M.F., S.; LARSEN, W.M., *Protocolo de Coloração por Prata Alta Sensibilidade - Comunicação Pessoal*.
105. Brown, R.A., et al., *Effects of heparin and related molecules upon neutrophil aggregation and elastase release in vitro*. Br J Pharmacol, 2003. **139**(4): p. 845-53.
106. Payne, C.M., et al., *Programmed cell death of the normal human neutrophil: an in vitro model of senescence*. Microsc Res Tech, 1994. **28**(4): p. 327-44.
107. Venaille, T.J., et al., *Effects of different density gradient separation techniques on neutrophil function*. Scand J Clin Lab Invest, 1994. **54**(5): p. 385-91.
108. Silva, T.A., *Protocolo de separação de neutrófilos, utilizando percol*. 2005, Departamento de Patologia Molecular - Faculdade de Medicina UnB: Brasilia.
109. Kjellen, L. and H. Pertoft, *Density gradients prepared from colloidal silical particles coated by polyvinylpyrrolidone (Percoll). II. Radioactive labeling of Percoll*. Anal Biochem, 1978. **88**(1): p. 283-4.
110. Tintinger, G., H.C. Steel, and R. Anderson, *Taming the neutrophil: calcium clearance and influx mechanisms as novel targets for pharmacological control*. Clin Exp Immunol, 2005. **141**(2): p. 191-200.
111. Ryves, W.J., et al., *Activation of the PKC-isotypes alpha, beta 1, gamma, delta and epsilon by phorbol esters of different biological activities*. FEBS Lett, 1991. **288**(1-2): p. 5-9.
112. Dang, P.M., et al., *Protein kinase C zeta phosphorylates a subset of selective sites of the NADPH oxidase component p47phox and participates in formyl peptide-mediated neutrophil respiratory burst*. J Immunol, 2001. **166**(2): p. 1206-13.
113. Fontayne, A., et al., *Phosphorylation of p47phox sites by PKC alpha, beta II, delta, and zeta: effect on binding to p22phox and on NADPH oxidase activation*. Biochemistry, 2002. **41**(24): p. 7743-50.
114. *SPSS Base 10.0 Applications Guide*. 1999.

115. Striz, I. and I. Trebichavsky, *Calprotectin - a pleiotropic molecule in acute and chronic inflammation*. *Physiol Res*, 2004. **53**(3): p. 245-53.
116. Donato, R., *Functional roles of S100 proteins, calcium-binding proteins of the EF-hand type*. *Biochim Biophys Acta*, 1999. **1450**(3): p. 191-231.
117. Leukert, N., et al., *Calcium-dependent tetramer formation of S100A8 and S100A9 is essential for biological activity*. *J Mol Biol*, 2006. **359**(4): p. 961-72.
118. Guignard, F., J. Mauel, and M. Markert, *Phosphorylation of myeloid-related proteins MRP-14 and MRP-8 during human neutrophil activation*. *Eur J Biochem*, 1996. **241**(1): p. 265-71.
119. Lemarchand, P., et al., *Translocation of a small cytosolic calcium-binding protein (MRP-8) to plasma membrane correlates with human neutrophil activation*. *J Biol Chem*, 1992. **267**(27): p. 19379-82.
120. Lominadze, G., et al., *Myeloid-related protein-14 is a p38 MAPK substrate in human neutrophils*. *J Immunol*, 2005. **174**(11): p. 7257-67.
121. Zhang, H., et al., *Involvement of tyrosine kinases, Ca²⁺ and PKC in activation of mitogen-activated protein (MAP) kinase in human polymorphonuclear neutrophils*. *J Physiol*, 1998. **513 (Pt 2)**: p. 359-67.
122. Newton, R.A. and N. Hogg, *The human S100 protein MRP-14 is a novel activator of the beta 2 integrin Mac-1 on neutrophils*. *J Immunol*, 1998. **160**(3): p. 1427-35.
123. Tokunaga, C., et al., *Molecular cloning and characterization of a novel protein kinase C-interacting protein with structural motifs related to RBCC family proteins*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998. **244**(2): p. 353-9.
124. Tatematsu, K., et al., *Transcriptional activity of RBCK1 protein (RBCC protein interacting with PKC 1): requirement of RING-finger and B-Box motifs and regulation by protein kinases*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998. **247**(2): p. 392-6.
125. Jones, S.L., *Protein kinase A regulates beta2 integrin avidity in neutrophils*. *Journal of Leukocyte Biology*, 2002. **71**: p. 1042-1048.
126. Tokunaga, C., et al., *Molecular cloning and characterization of RBCK2, a splicing variant of a RBCC family protein, RBCK1*. *FEBS Lett*, 1998. **435**(1): p. 11-5.
127. Thorne, K.J., R.C. Oliver, and A.J. Barrett, *Lysis and killing of bacteria by lysosomal proteinases*. *Infect Immun*, 1976. **14**(2): p. 555-63.
128. Ibrahim, H.R., et al., *Processing of lysozyme at distinct loops by pepsin: a novel action for generating multiple antimicrobial peptide motifs in the newborn stomach*. *Biochim Biophys Acta*, 2005. **1726**(1): p. 102-14.
129. Cicchetti, G., P.G. Allen, and M. Glogauer, *Chemotactic signaling pathways in neutrophils: from receptor to actin assembly*. *Crit Rev Oral Biol Med*, 2002. **13**(3): p. 220-8.
130. Perskvist, N., et al., *Rab5a GTPase regulates fusion between pathogen-containing phagosomes and cytoplasmic organelles in human neutrophils*. *J Cell Sci*, 2002. **115**(Pt 6): p. 1321-30.
131. Miaczynska, M., et al., *APPL proteins link Rab5 to nuclear signal transduction via an endosomal compartment*. *Cell*, 2004. **116**(3): p. 445-56.