



Universidade de Brasília/Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular

HYLANE LUIZ DAMASCENA

**PAPEL DAS ETAPAS PRECOSES DE ATIVAÇÃO DA
PRODUÇÃO DE EROs NA INDUÇÃO DAS NETs**

Brasília

2021

Ficha catalográfica elaborada automaticamente,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

LD155p Luiz Damascena, Hylane
Papel das etapas precoces da ativação da produção de EROs na indução das NETS / Hylane Luiz Damascena; orientador Wagner Fontes. -- Brasília, 2021.
120 p.

Tese (Doutorado - Doutorado em Patologia Molecular) -- Universidade de Brasília, 2021.

1. proteômica. 2. EROs. 3. NETs. 4. neutrófilos. I. Fontes, Wagner , orient. II. Título.

HYLANE LUIZ DAMASCENA

PAPEL DAS ETAPAS PRECOCES DE ATIVAÇÃO DA
PRODUÇÃO DE EROs NA INDUÇÃO DAS NETs

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação “Stricto Sensu” em Patologia Molecular da Universidade de Brasília, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutora em Patologia Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Wagner Fontes

Brasília

2021

HYLANE LUIZ DAMASCENA

PAPEL DAS ETAPAS PRECOSES DE ATIVAÇÃO DA PRODUÇÃO DE EROs NA
INDUÇÃO DAS NETs

Tese apresentada no Programa de Pós-graduação “Stricto Sensu” em Patologia Molecular da Universidade de Brasília, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Patologia Molecular apresentada em 8 de dezembro de 2021 para a banca examinadora constituída pelos seguintes membros:

Prof. Dra. Luciane Alarcão Dias-Melicio
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho
Faculdade de Medicina de Botucatu
Programa de Pós-graduação em Patologia

Prof. Dra. Maria Rita Rodrigues
Universidade Federal de Alfenas
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas

Prof. Dra. Fabiane Hiratsuka Veiga de Souza
Universidade de Brasília
Faculdade de Ceilândia
Programa de Pós-graduação em Patologia Molecular

Prof. Dra. Consuelo Medeiros Rodrigues de Lima
Universidade de Brasília
Programa de Pós-graduação em Ensino de Biologia

AGRADECIMENTOS

À Deus que me permiti viver essa bela existência podendo por meio da ciência conhecer suas belas obras.

Aos meus pais, Alcides e Terezina que sempre me incentivaram e me deram todo o apoio, sem o qual eu não conseguiria chegar até aqui. Aos meus irmãos, em especial Hyara e Francisca, aos meus cunhados, e a minha sobrinha Kalyne. E todos aos meus ancestrais que de alguma forma fazem parte da minha história.

Ao meu eterno namorado e marido João Paulo, por estar ao meu lado e aos meus sogros.

Aos meus amigos que compartilharam e compartilham as aventuras da vida.

Aos amigos que o doutorado me proporcionou, que tornaram os longos experimentos mais divertidos e mais leves. Além de todo o apoio para a concretização dessa pesquisa: Adriano, Isabelle, Katyelle, Philipe, Wendy. Obrigada Dream Team.

Ao meu orientador prof. Dr. Wagner Fontes pela oportunidade de crescimento por meio da sua paciência e generosidade em compartilhar os seus conhecimentos.

Ao grupo de pesquisa LBQP que fizeram parte da minha trajetória. Em especial a prof.^a. Dra. Mariana Castro por sua parceria na compra dos anticorpos e a Dra. Simone Nardin Weis por sua ajuda no software de análise proteômica.

Ao prof. Dr. Paulo Souza e a prof.^a. Dra. Fabiane Hiratsuka pela parceria nos experimentos de EROs, os quais permitiram delinear este estudo.

A prof.^a. Dra.Sônia Bão e sua aluna Karen pela parceria nos experimentos de imagem das NETs.

Agradeço as professoras doutoras: Luciane, Maria Rita, Fabiane e Consuelo por terem aceito o convite para participarem da minha banca.

Agradeço ao programa de pós graduação em patologia molecular, as agências de fomento CNPq e FAPDF e a todos que contribuíram para a realização deste trabalho.

“A persistência é o menor caminho do êxito”

Charles Chaplin

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
1.1 Neutrófilos	17
1.1.1 Morfologia dos neutrófilos.....	18
1.1.2 Mecanismo de adesão e migração dos neutrófilos	19
1.1.3 Complexo NADPH oxidase	20
1.2 Armadilhas Extracelulares de neutrófilos (NETs).....	23
1.2.1 Classificação das NETs	24
1.2.2 NETs e doenças associadas	25
1.2.3 NETs e Espécies Reativas de Oxigênio	26
1.3 O 13-acetato-de-forbol éster 12-miristato (PMA)	27
1.3.1 A Proteína cinase C	28
1.4 Ativação de neutrófilos por PMA	29
1.4.1 Polimerização da actina e ativação da NADPH oxidase	30
1.4.2 Proteínas cinase ativadas por mitógenos (MAPK)	31
1.4.3 Fosfatidilinositol-3-cinase (PI3K).....	32
1.4.4 Cromatina.....	33
1.4.5 Gasdermina D.....	33
1.5 Apocinina.....	35
2. JUSTIFICATIVAS	36
3. OBJETIVOS.....	36
3.1 Objetivos específicos	37
4. MATERIAIS E MÉTODOS	37
4.1 Coleta de amostra.....	37
4.2 Separação dos neutrófilos	37
4.3 Ativação celular	38
4.4 Quantificação de EROs pelo teste de NBT	39
4.5 Quantificação de EROs por Ressonância Paramagnética Eletrônica (EPR)	39
4.6 Quantificação de NETs por espectrofluorimetria	41
4.7 Análise de NETs por confocal	41
4.8 Fagocitose	41
4.9 Migração celular em tempo real por RTCA	42

4.10	Preparação para proteômica	42
4.10.1	Lise celular	42
4.10.2	Digestão das proteínas	42
4.10.3	Dessanilização	43
4.11	Análise proteômica	43
4.11.1	Bioinformática	44
4.11.2	Análise das vias	45
4.12	Análise estatística	45
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
5.1	Apocinina aplicada antes do PMA reduz a taxa de crescimento da produção de EROs	45
5.2	A produção de EROs pode ser revertida?	48
5.3	A regulação inicial de EROs influencia na formação de NETs	49
5.4	A regulação de EROs influencia na atividade fagocítica	51
5.5	A cinética de EROs regula o perfil de abundância das proteínas?	53
5.6	Quais vias foram reguladas pela cinética de EROs?	54
5.7	A regulação de EROs altera a migração celular?	58
5.8	PMA induz proteínas da cascata de complemento	63
6.	CONCLUSÃO	65
7.	PERSPECTIVAS	65
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Componentes do complexo da NADPH oxidase.	22
Figura 2. Complexo NADPH oxidase após ativação	23
Figura 3. Estrutura da fosfatidilinositol 4,5 bifosfato formando diacilglicerol (DAG).27	
Figura 3. Estrutura da fosfatidilinositol 4,5 bifosfato formando diacilglicerol (DAG).28	
Figura 4. Estrutura dos três grupos das proteínas cinases C.....	29
Figura 5. Esquema mostrando a ativação do PMA até a geração das NETs.....	34
Figura 6. Delineamento experimental.....	38
Figura 7. Cinética da produção de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs).....	47
Figura 8. Imagem mostrando marcação do DNA celular com Sytox green e elastase .	50
Figura 9. Quantificação das NETs	51
Figura 10. Teste de fagocitose.....	52
Figura 11. Perfil proteômico das 268 proteínas reguladas	53
Figura 12. Diagrama de corda das proteínas reguladas	55
Figura 13. Agrupamento por vias de proteínas reguladas e diagrama de Venn	56
Figura 14. Agrupamento das proteínas por vias nos grupos PI, IP, P e I	57
Figura 15. Abundância relativa das proteínas com perfil de abundância $P>PI>IP$ e $Q=I=IP$ diferente de $P=PI$	59
Figura 16. Cinética da taxa de migração de neutrófilos	61
Figura 17. Abundância relativa das proteínas exclusivas do grupo IP	63
Figura 18. Abundância relativa das proteínas do sistema complemento	64

LISTA DE ANEXOS

9. ANEXO	92
9.1. ANEXO A- Curva experimental ajustada com a curva teórica, segundo modelo de Gompertz	92
9.2. ANEXO B- Total de proteínas reguladas.....	93
9.3. ANEXO C- Proteínas reguladas, comparadas aos pares com seus respectivos fold change	117

SÍMBOLOS E SIGLAS

ACTN1: actina alfa 1

ALDOA: frutose bifosfato aldolase

aPKC: PKC atípicas

Arg: arginina

ATG3: autofagia 3

AZU1: azurocidina

C1QC: complemento C1q cadeia C

C3: complemento 3

C4A: Complemento C4A

C4BPA: cadeia alfa da proteína de ligação C4b

C5a: complemento 5

C9: complemento 9

CALM2: calmodulina

CFB: fator de complemento B

CFH: fator de complemento H

CFP: fator de complemento P

CID: colisão com gás inerte

Cit: citrulina

CMH: 1-Hydroxy-3-methoxycarbonyl-2,2,5,5-tetramethylpyrrolidine

CP: ceruloplasmina

cPKC: PCK convencionais

CTSG: catepsina G

DAF: Fator de aceleração do decaimento

DAG: diacilglicerol

DAMPs: padrões moleculares associados a danos

DNA: ácido desoxirribonucléico

DTT: ditioneitol

EPR: Ressonância Paramagnética Eletrônica

ERK: cinase regulada por sinal extracelular

EROs: Espécies reativas de oxigênio

ESL-1: Ligante de E selectina 1

FAD: Flavina Adenina Dinucleotídeo

FDR: *False Discovery Rate* (taxa de detecção falsa)

fMLP: formil peptídeo

GPI: glicose-6-fosfato isomerase

GSR: Glutathione dissulfeto reductase

H2A: histona 2A

H2B: histona 2B

H₂O₂: peróxido de hidrogênio

H3: histona 3

H4: histona 4

HBSS: Solução salina balanceada de Hank

HOCL: ácido hipocloroso

HSP90AB: chaperona 90 AB

HSPA8 /HSPA70: chaperona 70

IgG: Imunoglobulina G

IL-8: interleucina 8

ITGB2: beta integrina 2

JNK/SAPK: cinase c-Jun N-terminal

LAMP2: proteína 2 da membrana associada ao lisossomo

LCB3: Proteína associada a microtúbulos 1A / 1B cadeia leve 3B

LC-MS/MS: Cromatógrafo Líquido Acoplado a Espectrômetro de Massas

LCN2: lipocalina associado a gelatinase neutrofílica

LFA-1: antígeno 1 associado à função linfocitária

LIMS1: domínio LIM zinco contendo 1

LPA: lesão pulmonar aguda

LPS: lipossacarídeo

LTF: lactotransferrina

MAC-1: antígeno de macrófago 1

MAPK: proteína cinase ativada por mitógeno

MDH2: malato desidrogenase

MEK: cinase ativada por mitógeno

MKK: MAP cinase cinase

MKKK: MAP cinase cinase cinase

MPO: mieloperoxidase

NADPH: Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato

NBT: nitroazul de tetrazólio

NCF1: Neutrophil Cytosolic Factor 1

NCF2: Neutrophil Cytosolic Factor 2

NCF4: Neutrophil Cytosolic Factor 4

NE: elastase

NETs: *Neutrophil extracellular traps* (redes extracelulares de neutrófilos)

NF-κB: factor nuclear kappa B

NGLA: lipocalina associado às gelatinas

nPKC: PCK novas

O₂⁻: ânion superóxido

PAD4: Peptidilarginina deaminases 4

PAF: fator de ativação plaquetária

PAMPs: padrões moleculares associados a patógenos

PCK: Proteína cinase C

PGK1: fosfoglicerato cinase

PI3K: fosfatidil inositol 3 cinase

PI3P: fosfatidil inositol 3 fosfato

PIP2: fosfatidilinositol 4,5 bifosfato

PIP3: fosfatidilinositol-3-4-5-trifosfato

PKA: Proteína cinase A

PKB: proteína cinase B

PLC: fosfolipase C

PLS-DA: análise discriminante por quadrados mínimos parciais

PMA: 13-acetato- de forbol éster 12-miristato

PMN: polimorfonucleares

PRRs: receptores de reconhecimento de padrões

PSGL-1: glicoproteína ligante da P-selectina-1

PTX3: pentraxina

SDRA: síndrome do desconforto respiratório agudo

SOD: superóxido dismutase

SRC: tirosina cinase

TCA: ciclo tricarboxílico

TEAB: brometo de tetraetilamônio

TFA: ácido trifluoroacético

TLR2: *Toll-like receptor 2* receptor toll-like 2)

TLR8: *Toll-like receptor 8* (receptor toll-like 8)

TNF- α : Fator de necrose tumoral alfa

TXNRD2: tioredoxina redutase

VCL: vinculina

VIM: vimentina

VS: vesículas secretórias

RESUMO

Neutrófilos são células do sistema imune inato que se destacam por serem as células mais abundantes do sangue periférico. Eles são os primeiros a chegarem no local da infecção e, dentre os mecanismos de defesa, utilizam as armadilhas extracelulares (NETs), que permitem captura e morte extracelular de microrganismos, o que ocorre independente da fagocitose e morte intracelular. Apesar, de ser um mecanismo benéfico para a defesa imune do hospedeiro, as NETs têm sido associadas a diversas doenças, devido à liberação do DNA e proteínas que favorecem a formação de trombos, bem como constituem-se como autoantígenos. Dessa forma, a atuação regulada de NETs é importante para a defesa do hospedeiro, enquanto a resposta acentuada leva a danos. Uma das vias, conhecida como NETose suicida, é dependente de espécies reativas de oxigênio (EROs) e engatilha diversos mecanismos celulares levando à liberação do DNA nuclear. O objetivo do presente trabalho foi elucidar o envolvimento de proteínas e vias de sinalização durante o período inicial da formação de NETs (60 minutos) associadas ao *burst* respiratório, por meio da análise proteômica de neutrófilos ativados por PMA e inibidos por apocinina. A cinética da produção de EROs mostrou que a inibição da NADPH oxidase posterior ao estímulo possui uma menor influência comparada à inibição antes do estímulo. Essa produção observada nos primeiros 20 minutos foi suficiente para desencadear a formação das NETs e favorecer a morte dos microrganismos devido a um maior aprisionamento observado. Além disso, a produção de EROs nos primeiros minutos é capaz de desencadear alterações no proteoma, associadas a formação das NETs. As proteínas alteradas contribuem com a polimerização da actina (LIMS1, ADAM10 e AMBP) que se associaram com a migração celular. Curiosamente, a migração celular tardia (após 20 min) que não foi associada à formação de NETs, parece não ter a participação da polimerização da actina, mas da tubulina e vitronectina. Além disso, pela primeira vez, este estudo mostrou que neutrófilos podem liberar o componente C4 do sistema complemento, sugerindo o possível envolvimento da ativação do complemento na NETose.

ABSTRACT

Neutrophils are the most abundant innate immune cell in the peripheral blood. They are the first to arrive at the infection site and among their defense mechanisms, they use extracellular traps (NETs) that promote extracellular capture and death of microorganisms and occur independently of phagocytosis and intracellular death. Despite being a beneficial mechanism for the immune defense of the host, NETs have been associated with several diseases, due to the release of DNA and proteins that favor the formation of thrombi, as well as being recognized as autoantigens. In this way, the regulated performance of NETs is important for the defense of the host, while an intense deregulated response leads to damage. One of the known pathways of NETs is suicidal NETosis. This formation of NETs is dependent on ROS produced by NADPH oxidase, which triggers several cellular mechanisms leading to the release of nuclear DNA. In order to elucidate the involvement of proteins and pathways during the initial period of NETosis (60 minutes) associated to the respiratory burst, we analyzed the proteomic changes of neutrophils induced by PMA and controlled by apocinin, to produce NETs. Kinetic analysis of ROS production showed that the NADPH oxidase inhibition after the PMA stimulus has less influence on ROS generation, compared to inhibition before stimulus. The production of ROS observed in the first 20min was enough to trigger the formation of NETs, favoring microorganisms' death by entrapment. Furthermore, ROS production in the first minutes is able to initiate proteomic changes associated to NETs formation. Proteins related to actin polymerization (LIMS1, ADAM10 and AMBP) were associated to cellular migration. Curiously, late cellular migration (after 20min.), that was not associated to NETs formation, seems not associated to actin polymerization, however, associated to tubulin and vitronectin. Moreover, this study showed the first time that neutrophils can release the C4 component of the complement system, suggesting the probable activation of complement pathway contributes to NETs extrusio

1. INTRODUÇÃO

1.1. Neutrófilos

O organismo humano possui um sistema de defesa que se divide em resposta inata e resposta adaptativa. A resposta adaptativa é altamente específica e envolve células especializadas, como os linfócitos T e B, enquanto a resposta inata é caracterizada pelas barreiras físicas, químicas, células *Natural Killers* e células fagocitárias (Delves, Peter J; Roitt 2000; Leliefeld et al. 2016). Os neutrófilos são células fagocitárias, que fazem parte da imunidade inata. Também conhecidos como granulócitos neutrófilos ou leucócitos polimorfonucleares (PMNs), eles constituem a primeira defesa contra bactérias e fungos que ultrapassaram as defesas de barreira, atuando principalmente durante a inflamação aguda (Kolaczkowska e Kubes 2013; Mócsai, Walzog, e Lowell 2015).

Os neutrófilos são os mais abundantes no sangue periférico e atuam na resposta inflamatória sistêmica quando ativados, sendo os primeiros a migrarem à área de inflamação. Os receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) presentes nos neutrófilos reconhecem padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) ou padrões moleculares associados a danos (DAMPs) e levam à ativação desses neutrófilos (Kolaczkowska e Kubes 2013).

O recrutamento dos neutrófilos pode ser regulado por hipóxia, citocinas pró-inflamatórias, células endoteliais, fator de ativação plaquetária (PAF), produtos microbianos, como o formil peptídeo (fMLP), dentre outros (Aquino et al. 2016; Gera, Swanson, and Jin 2017). Com o recrutamento, inicia-se uma cascata de eventos, que os levam ao local da infecção ou dano tecidual.

A eliminação dos patógenos e debris teciduais, pelos neutrófilos, ocorre por meio da fagocitose, liberação do conteúdo citotóxico dos grânulos, geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) e a extrusão do DNA genômico nas redes extracelulares de neutrófilos (NETs – *neutrophil extracellular traps*) (Parker et al. 2012; Leliefeld et al. 2016)

1.1.1. Morfologia dos neutrófilos

Na circulação sanguínea, os neutrófilos possuem entre 7-10 μ m de tamanho e núcleo segmentado em dois a cinco lóbulos, ligados por um filamento nuclear (Carvalho et al. 2015; Kolaczowska e Kubes 2013). Seu citoplasma apresenta grânulos e vesículas secretórias que possuem centenas de proteínas, como receptores de membrana que participam na migração dos neutrófilos ao local da infecção, bem como proteínas que participam na eliminação do patógeno. Os grânulos são divididos em peroxidase-positivos (também chamados de primários ou azurofílicos) e os peroxidase-negativos, que se subdividem em grânulos específicos (secundários) e gelatinase (terciários) (Faurischou e Borregaard 2003; Cowland e Borregaard 2016).

Os grânulos primários são formados nos estágios iniciais da diferenciação dos neutrófilos, de pró-mielócito para mielócito (Borregaard et al. 1995; Cowland e Borregaard 2016). Tanto os grânulos primários quanto os secundários são responsáveis por liberarem proteínas antimicrobianas (Faurischou e Borregaard 2003), as quais também estão presentes nas NETs (Urban et al. 2009a). Os primários possuem aproximadamente 69% da MPO total, além de α -defensina, mieloblastina, elastase, azurocidina e catepsina G (Rorvig et al. 2013).

Nos grânulos secundários, que são formados na fase de mielócito e metamielócitos, (B. N. Borregaard et al. 1995; Cowland e Borregaard 2016) possuem cerca de 54% do total de lipocalina associado às gelatinas (NGAL) e 52% da lactoferrina. Também estão presentes a pentraxina 3, haptoglobulinas entre outras (De Castro et al. 1996; Rorvig et al. 2013).

Os grânulos terciários, formados na fase de bastonetes e segmentados (B. N. Borregaard et al. 1995; Cowland e Borregaard 2016), são constituídos por 60% de gelatinase. Além de estarem associados com a degradação da matriz extracelular, a fusão de tais grânulos com a membrana celular expõe receptores na membrana dos neutrófilos, sendo importante para aderência e migração ao sítio de infecção (Lominadze et al. 2005; Rorvig et al. 2009; 2013). Os grânulos ricos em Ficolina 1, têm sido citados como um outro subgrupo devido sua maior capacidade de exocitose, comparados aos grânulos terciários (Rørvig et al. 2009; Rorvig et al. 2013).

As vesículas secretórias são organelas formadas no final da granulopoiese por meio da endocitose. Elas são formadas principalmente de proteínas de membrana, essenciais para a interação dos neutrófilos com o endotélio (Niels Borregaard et al. 1992; Cowland e Borregaard 2016). Após ativação, as vesículas secretórias (VS) se fundem à membrana plasmática expondo proteínas importantes para adesão e fagocitose (N; Borregaard, Miller, e Springer 1987; Cowland e Borregaard 2016). Elas são ricas em albuminas e possuem proteínas como fosfatase alcalina, β -actina, α -actina, TLR2, TLR8, TLR4, CD14, receptor Fc da IgG (IgGFcR), fator de aceleração do decaimento (DAF), dentre outras (Borregaard et al. 1992; Rorvig et al. 2013).

1.1.2. Mecanismo de adesão e migração

Ao serem estimulados na circulação por quimiocinas e citocinas, os neutrófilos se ligam a proteínas de adesão endoteliais, permitindo sua migração ao local da infecção (Yona et al. 2008). Esse processo de recrutamento dos neutrófilos, envolve vários passos, incluindo a quimiotaxia, rolamento, adesão ao endotélio vascular, a transmigração (ou diapedese) (Nathan 2006).

Durante a migração dos neutrófilos, esses se aderem ao endotélio passando a expressar glicoproteínas de membrana, como a PSGL-1 (ligante da P-selectina-1), ESL1 (ligante de E-selectina), CD44 e L-selectina, que se ligam as moléculas de adesão endoteliais, como as selectinas (E, P-selectina) (Norman et al. 2000; Kolaczkowska e Kubes 2013) e as β -integrinas (LFA-1, MAC-1 e gp150/95). A função do antígeno associado à função leucocitária-1 (LFA-1) e gp150/95 ainda não estão bem claras neste processo, porém, sabe-se que antígeno do macrófago-1 (MAC-1) participa da migração e mobilização dos estoques intracelulares (Mócsai, Walzog, e Lowell 2015).

Com a ativação de ambos os tipos celulares, os neutrófilos se aderem cada vez mais ao endotélio, resultando na transmigração dos neutrófilos através da barreira vascular. No tecido, os neutrófilos migram em direção ao local da inflamação guiados por gradientes quimiotáticos.(Gambardella e Vermeren 2013). A via de sinalização da quimiotaxia depende do quimioatraente, sendo que os quimioatraentes alvos finais, provenientes do local da infecção, ativam a via p38 MAPK, enquanto os quimioatraentes intermediários levam a ativação da via PI3K/Akt (Heit et al. 2002). Nesta via, PI3K e

pequenas GTPases, como Ras, Raf, Rho, são componentes de vias que contribuem para o rearranjo do citoesqueleto e migração celular (Gambardella e Vermeren 2013).

Próximo ao sítio de lesão ou infecção os neutrófilos passam a liberar grânulos de gelatinase e específicos, além de ocorrer a montagem do complexo NADPH oxidase, produzindo EROs. O conjunto desses fatores contribui para a eliminação do patógeno. (Klebanoff et al. 2013).

1.1.3. Complexo NADPH oxidase

A Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato (NADPH) oxidase ou NOX, é um complexo enzimático presente nos neutrófilos responsável pela maior parte da produção de EROs. O complexo NADPH oxidase é constituído por duas proteínas de membrana, gp91phox ou NOX2 e p22phox, que quando em repouso, estão associadas em maior parte, às membranas dos grânulos específicos, vesículas secretórias e, em menor proporção, aos grânulos de gelatinase e à membrana plasmática. Em conjunto, as subunidades gp91phox e p22phox são denominadas flavocitocromo b558. Além dessas unidades, o complexo NADPH oxidase apresenta componentes citosólicos, que são as pequenas proteínas G (Rac 1/2), p40phox, p47phox e p67phox (Seguchi e Kobayashi 2002; Nguyen, Green, e Meccas 2017). Quando as células são ativadas, os componentes citosólicos são fosforilados e se translocam para a membrana, ligando-se ao flavocitocromo b558 (DeLeo et al. 1999a; Dang et al. 2011; Bréchar, Plançon, e Tschirhart 2013).

Dentre os componentes citosólicos, o p47phox, também conhecido como Neutrophil Cytosolic Factor 1 (NCF1) é o mais estudado e está associado com a modulação da montagem e ativação da NADPH oxidase (Bréchar, Plançon, e Tschirhart 2013). Quando os neutrófilos estão em repouso, o p47phox se encontra no citosol associado com a p67phox (Neutrophil Cytosolic Factor 2-NCF2), que por sua vez interage com a p40phox (Neutrophil Cytosolic Factor 4 - NCF4) (Belambri et al. 2018). Sabe-se que p47phox é fosforilado com a participação das cinases: proteína cinase C (PKC), proteína cinase A (PKA), fosfatidil inositol 3 cinase (PI3K) e proteínas cinases ativadas por mitógeno (MAPK), ERK1/2 e p38MAPK, permitindo sua translocação para a membrana levando p67phox e p40phox (Dekker et al. 2000; Dang et al. 2006; Zeng et al. 2019).

A p67phox que também é fosforilada por PKC, ERK1/2 e p38MAPK (Dang et al. 2003) interage com a Rac-GTP, que atua como uma proteína adaptadora na montagem do complexo NOX (Ming et al. 2007; Pick 2014). Além disso, a fosforilação de p40phox, a qual também é realizada por PKC, (Bouin et al. 1998; Nguyen, Green, e Meccas 2017) aumenta a ligação da p67phox com a gp91phox, mecanismo provavelmente realizado por uma mudança conformacional da p67phox (Dang et al. 2002). Além disso, a ligação da fosfatidil inositol 3 fosfato (PI3P) ao domínio PX da p40phox, possivelmente facilita a sua interação com os demais componentes (Ellson et al. 2001).

Enquanto a subunidade p22phox é fosforilada por PKC e dependendo do estímulo, também por fosfolipase D (PLD) (Regier et al. 2000), não se sabe ao certo a importância de sua fosforilação, porém ela é importante para a estabilidade do heterodímero flavocitocromo b558 (Zeng et al. 2019).

O principal centro redox do flavocitocromo é o componente gp91phox, sua subunidade Flavina Adenina Dinucleotídeo (FAD) recebe elétrons do NADPH citosólico e transfere para o oxigênio molecular formando o radical superóxido (O_2^-) na outra face da membrana (Zeng et al. 2019). A gp91phox é composta por seis domínios transmembranares com a região C e N-terminal voltados para o citoplasma. Em sua estrutura possui uma região de ligação a flavina adenina dinucleotídeo (FAD) e quatro grupos heme, sendo duas no terceiro e duas no quinto domínio transmembrana (Bedard e Krause 2007). Quando gp91phox é fosforilada por PKC na sua cauda carboxi-terminal, há a potencialização da montagem do complexo NADPH oxidase, pois aumenta a interação com os componentes citosólicos, bem como aumenta a atividade de diaforase (Raad et al. 2009). A diaforase é o primeiro passo de dois para a redução do oxigênio, no qual o NADPH ligado ao C-terminal da gp91phox transfere elétrons para o FAD, passo regulado pela ativação da p67phox (Taylor, Jones, e Segal 1993; A. R. Cross, Yarchover, e Curnutte 1994; Nguyen, Green, e Meccas 2017). Sendo assim, na presença de p67phox há o favorecimento da redução de FAD por NADPH (Nisimoto et al. 1999), enquanto no segundo passo os elétrons são transferidos do FAD para os grupos heme, e dele para o oxigênio (Doussière, Gaillard, e Vignais 1996).

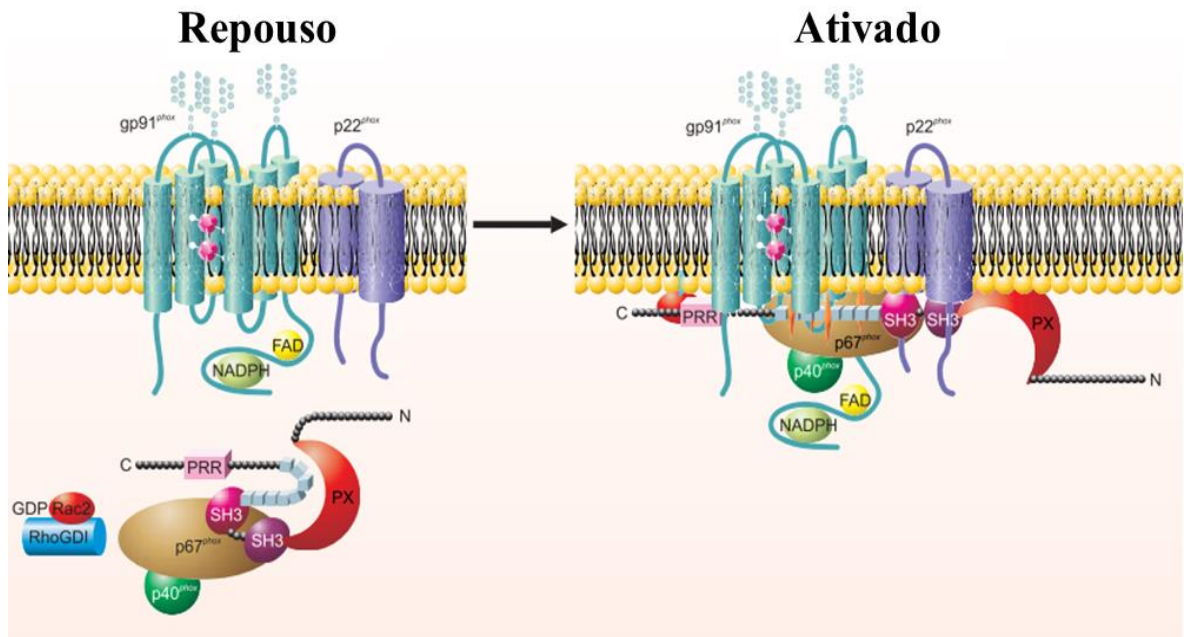


Figura 1. Componentes do complexo da NADPH oxidase. Em repouso a gp91phox e p22phox se encontram nos grânulos específicos, vesículas secretórias e, em menor proporção, aos grânulos de gelatinase e à membrana plasmática. Enquanto os demais componentes (Rac 1/2, p40phox, p47phox e p67phox) se encontram no citosol. Quando ativado, os componentes citosólicos são fosforilados e se ligam nos componentes da membrana. (Nauseef 2008).

Com a montagem do complexo NADPH oxidase, há a produção de EROs, usando NADPH e o oxigênio como substratos (Briggs et al. 1975; Seguchi e Kobayashi 2002). A localização da produção de EROs irá depender do estímulo, podendo ocorrer no fagolisossomo, no meio extracelular ou nos grânulos (Bylund et al. 2010). O oxigênio ao ser reduzido é transformado em radical superóxido ($O_2^{\bullet -}$). Ao sofrer dismutação espontânea ou por meio da superóxido dismutase (SOD), produz o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Esse reage com íons cloreto, gerando ácido hipocloroso (HOCl) em um processo catalisado por mieloperoxidase (MPO) (Klebanoff et al. 2013). O H_2O_2 e $O_2^{\bullet -}$ também geram espécies, como o radical hidroxila (OH^{\bullet}), por meio da reação de Haber-Weiss, na qual H_2O_2 e $O_2^{\bullet -}$ reagem com um metal de transição, ou por meio da reação de Fenton com a oxidação do íon ferro pelo H_2O_2 . Enquanto a geração do oxigênio singlete ocorre por meio da reação do H_2O_2 com o HOCl (El et al. 2005). Algumas EROs, como H_2O_2 , também podem se difundir do fagossomo ou grânulos para o citosol, onde há vários antioxidantes, como catalase (CAT) e glutathiona (GSH) promovendo o balanço redox, por meio da remoção das EROs (Kinnula et al. 2002).

O HOCl, por ser um forte oxidante, é altamente tóxico para os microrganismos (Winterbourn e Kettle 2013). Além disso, HOCl (Akong-Moore et al. 2012) e MPO contribuem para a formação das NETs (Metzler et al. 2014b).

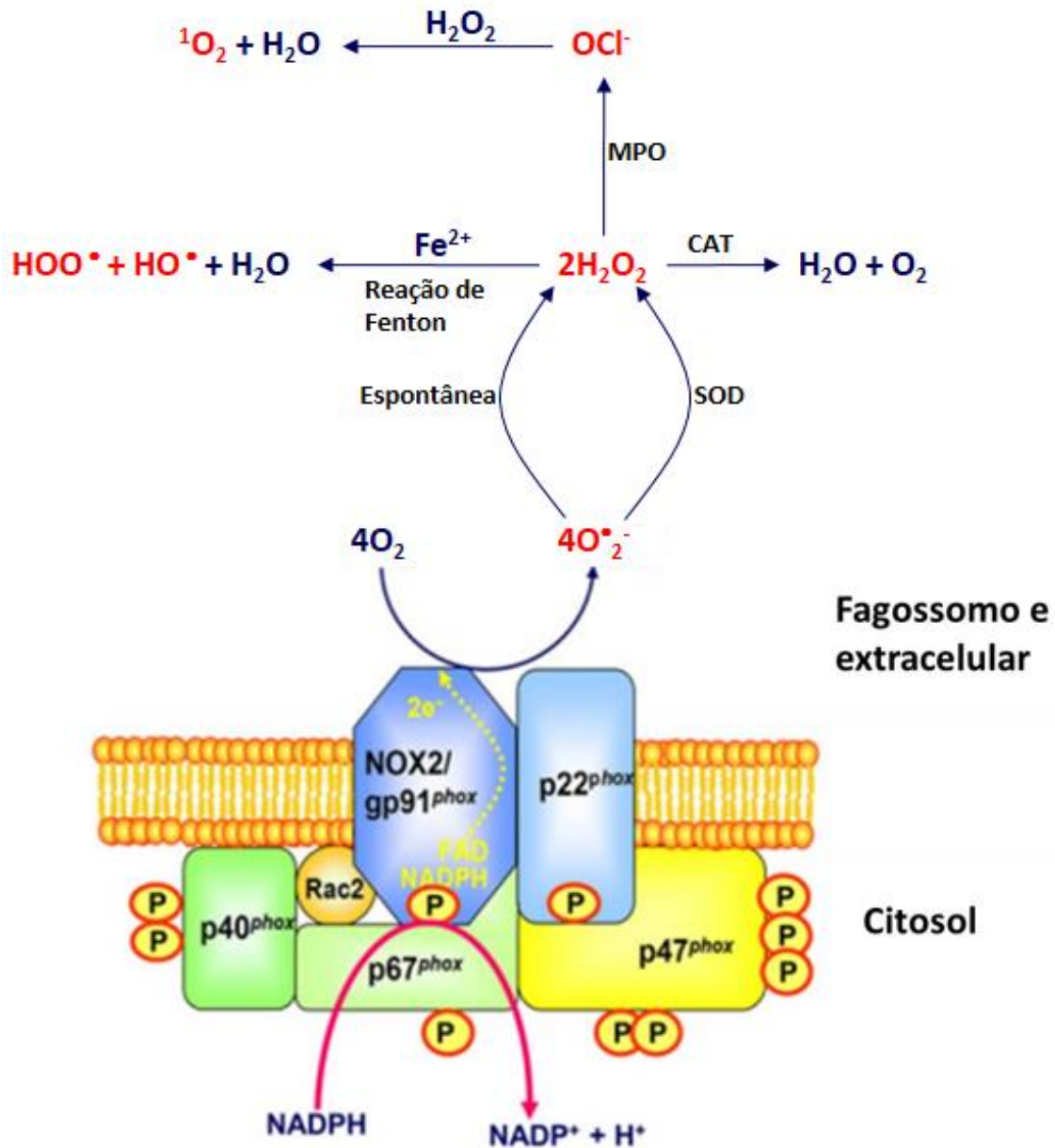


Figura 2. Complexo NADPH oxidase após ativação celular, com formação do radical superóxido, pela transferência de elétrons do NADPH citosólico (Belambri et al. 2018). A partir do radical superóxido são formadas as demais EROs, peróxido de hidrogênio, ácido hipocloroso, radical hidroxila, radical hidroxiperoxila e oxigênio singlete (Kirchner et al. 2012 com modificações)

1.2. Armadilhas Extracelulares de neutrófilos (NETs)

Em 2004 Brinkmann et al., mostrou um outro mecanismo utilizado pelos neutrófilos capaz de causar a morte de patógenos, as redes extracelulares de neutrófilos (NETs). As NETs são formadas por um tipo de rede de cromatina carregado com histonas e proteínas granulares como elastase, mieloperoxidase, catepsina G, proteinase 3, lactoferrina, gelatinase, lisozima C, calprotectina, defensina e catelicidina (Urban et al. 2009b). Essas redes servem como barreira física capazes de evitar a disseminação do patógeno, bem como seus componentes apresentam ação microbicida, levando à morte de patógenos (Brinkmann et al. 2004a; Branzk et al. 2014). Além disso, as NETs também possuem moléculas capazes de atuar como moléculas de reconhecimento de padrões e ativadoras do sistema complemento (Mantovani et al. 2011; Du Clos 2013), como a pentraxina (PTX3) (Jaillon et al. 2007).

Ao serem estimulados, neutrófilos começam a formar NETs rapidamente, dentro de 10 minutos, após ativação com PMA, LPS ou IL-8 (Volker Brinkmann et al. 2004), porém o tempo para a completa formação de NETs e o mecanismo de formação é dependente do estímulo (Parker et al. 2012).

1.2.1. Classificação das NETs

Apesar dos mecanismos que formam as NETs não estarem completamente elucidados, existem dois principais modos de formação, um em que há liberação do DNA dos neutrófilos seguido de sua morte, comumente chamado da NETose suicida e outro em que os neutrófilos permanecem vivos, podendo se movimentar e fagocitar, chamada da NETose vital (Brinkmann 2018). Ainda na NETose vital, um novo mecanismo foi mostrado, no qual há a liberação do DNA mitocondrial e não o nuclear (Yousefi et al. 2009).

Desta forma, atualmente, NETs podem ser classificadas em três modelos: NETs vital independente de EROs, NETs vital dependente de EROs e NETose suicida, que também depende de EROs (Delgado-Rizo et al. 2017).

Na NETose vital independente de EROs, o DNA é liberado em pequenas vesículas sem depender da formação de EROs. Esse processo ocorre dentro de 5-60 min após ativação via receptores toll-like (TLR) e receptores de proteína 3 do complemento (C3),

ativando as vias ERK, PI3K e tirosina cinase (SRC) (Yousefi et al. 2009; Douda et al. 2015). Nessa NETose vital não há alteração da viabilidade dos neutrófilos, pois não há a perda da membrana nuclear nem plasmática. (Pilszczek et al. 2010; Kraaij et al. 2016).

Na NETose vital dependente de EROs, há a liberação do DNA mitocondrial e isso é dependente da produção de EROs mitocondriais. Apesar dos neutrófilos possuírem poucas mitocôndrias, as quais apresentam baixa atividade de fosforilação oxidativa e não possuem função essencial para o suprimento de energia (Maianski et al. 2004), a produção de EROs mitocondriais é suficiente para levar à formação de NETs. Esse processo ocorre dentro de 15 min após estímulo por LPS, C5a ou ionomicina, porém suas vias de ativação não são conhecidas (Douda et al. 2015; Yousefi et al. 2009; Delgado-Rizo et al. 2017).

A NETose suicida é a mais estudada, porém seus mecanismos moleculares não estão completamente elucidados. A NETose suicida faz parte de um processo de morte celular programada que, no modelo clássico, exige a liberação de EROs geradas por NADPH oxidase (Grayson e Kaplan 2016), sendo necessário de 3-4 h para a completa formação de NETs, porém algumas células já apresentam formação com 30-60 minutos após ativação (Gupta et al. 2014; Tatsiy e McDonald 2018; Chatfield et al. 2018; Della Coletta et al. 2015). Nesse mecanismo, a NADPH oxidase é ativada via PCK/Raf/MERK/ERK, essa via leva à ativação da enzima Peptidilarginina deaminase 4 (PAD4), a qual modifica as histonas, convertendo arginina (Arg) em citrulina (Cit), o que promove a perda de carga positiva das histonas, não permitindo sua interação com o DNA, levando à descondensação da cromatina (Wang et al. 2004; Konig and Andrade 2016; Delgado-Rizo et al. 2017). A NETose ocorre por meio de três fases: a primeira é caracterizada por ativação enzimática, como mieloperoxidase, elastase e PAD4, a segunda apresenta inchaço da cromatina com a ruptura do envelope nuclear e na terceira fase observa-se ruptura da membrana plasmática. O tempo de cada fase é dependente do estímulo (Neubert et al. 2018).

1.2.2. NETs e doenças associadas

Apesar, da importância de NETs na morte dos patógenos, elas também são citadas por causarem danos aos hospedeiros. Elas estão relacionadas com doenças autoimunes (Grayson e Kaplan 2016), trombose (Fuchs et al. 2010), doenças inflamatórias sistêmicas não infecciosas como injúrias ocasionados por isquemia/reperfusão, podendo-se citar a

lesão pulmonar aguda/síndrome do desconforto respiratório agudo (LPA/SDRA) (H. Li et al. 2018) e atualmente também foi associado com a síndrome respiratória aguda grave causada pelo novo coronavírus 2019 (COVID-19) (Veras et al. 2020; Ackermann et al. 2021)

Em camundongos com injúria pulmonar aguda induzida por bactérias, a diminuição das NETs e deficiência de PAD4 reduz a injúria pulmonar, porém aumenta a infecção por bactérias (Lefrançais et al. 2018). A associação das NETs com a causa e severidade de algumas doenças, como trombose, doenças autoimunes, cânceres, deve-se à liberação do DNA e enzimas que podem ativar a cascata de coagulação e formar trombos, ou atuar como autoantígenos (Brinkmann 2018). Os mecanismos ainda precisam ser elucidados, mas sabe-se que a atuação regulada das NETs é importante para a defesa do hospedeiro, porém uma função exacerbada causa danos.

1.2.3. NETs e Espécies Reativas de Oxigênio

A produção de espécies reativas de oxigênio é uma das principais formas de atuação dos neutrófilos no combate contra patógenos, mas também é um sinal para a formação das NETs. Estudos mostraram que a inibição de EROs leva à redução na formação das NETs (Fuchs et al. 2007; Parker et al. 2012). Apesar de não se conhecer ao certo como as EROs contribuem para a formação das NETs (Stoiber et al. 2015), sabe-se que mesmo na formação das NETs independente da ativação de NADPH oxidase (NOX) o oxigênio singleto é essencial para sua formação (Nishinaka et al. 2011).

Além disso, a localização e a modulação da produção de EROs (Björnsdottir et al. 2015) são importantes na produção das NETs, pois a inibição da produção intracelular de EROs leva à redução na produção das NETs (Azevedo et al. 2015), bem como uma produção exacerbada de EROs leva à apoptose, e uma produção intermediária leva à produção das NETs (Wang et al. 2019a).

A mieloperoxidase (MPO), que participa da transformação de EROs, e o ácido hipocloroso (HClO), uma de tais espécies, estão presentes nas NETs produzidas em resposta ao estímulo por PMA (Parker et al. 2012; Akong-Moore et al. 2012). A MPO e a serina protease elastase neutrofílica (NE) acumulam-se na região ao redor do núcleo participando da descondensação da cromatina (de Bont et al. 2018a; Parker et al. 2012).

Esse processo da descondensação acontece pela atuação do H_2O_2 , o qual é responsável por ativar e dissociar um complexo de proteases presentes nos grânulos azurofílicos, composto por mieloperoxidase, elastase, azurocidina, catepsina G, lactoferrina, proteinase 3 e lisozima. O H_2O_2 juntamente com a MPO ativam a NE, a qual degrada F-actina permitindo a translocação da NE para o núcleo (Metzler et al. 2014b), onde participa parcialmente da degradação das histonas (Papayannopoulos et al. 2010). Além disso, a glutatonilação da F-actina realizada por influência das EROs também leva à polimerização da actina (Stojkov et al. 2017a), processo essencial para as mudanças estruturais durante o inchaço da cromatina para a formação das NETs (Neubert et al. 2018).

O H_2O_2 também ativa PAD4, levando à citrulinização das histonas (Li et al. 2010). Além disso, essa produção de EROs ocorre ainda na primeira fase da formação das NETs, sendo responsável por engatilhar esses mecanismos que levam à total formação das NETs na terceira fase (Neubert et al. 2018). Um forte indutor muito estudado na produção das NETs dependente de EROs é o PMA.

1.3. O 13-acetato- de forbol éster 12-miristato (PMA)

O 13-acetato- de forbol éster 12-miristato (PMA) é um éster de forbol, componente orgânico de origem vegetal encontrado na família das Euphorbiaceae. Ele é isolado do óleo das sementes de *Croton tiglium*, e é responsável pelas características tóxicas dessa planta, como a ação de irritação da pele e olhos (Goel et al. 2007; Pagani et al. 2017). O PMA é um análogo ao diacilglicerol (DAG), um segundo mensageiro lipídico gerado pela enzima fosfolipase C (PLC) a partir da degradação do fosfatidilinositol 4,5 bifosfato (PIP2), que é responsável pela ativação da proteína cinase C (PKC) (Steinberg 2008).

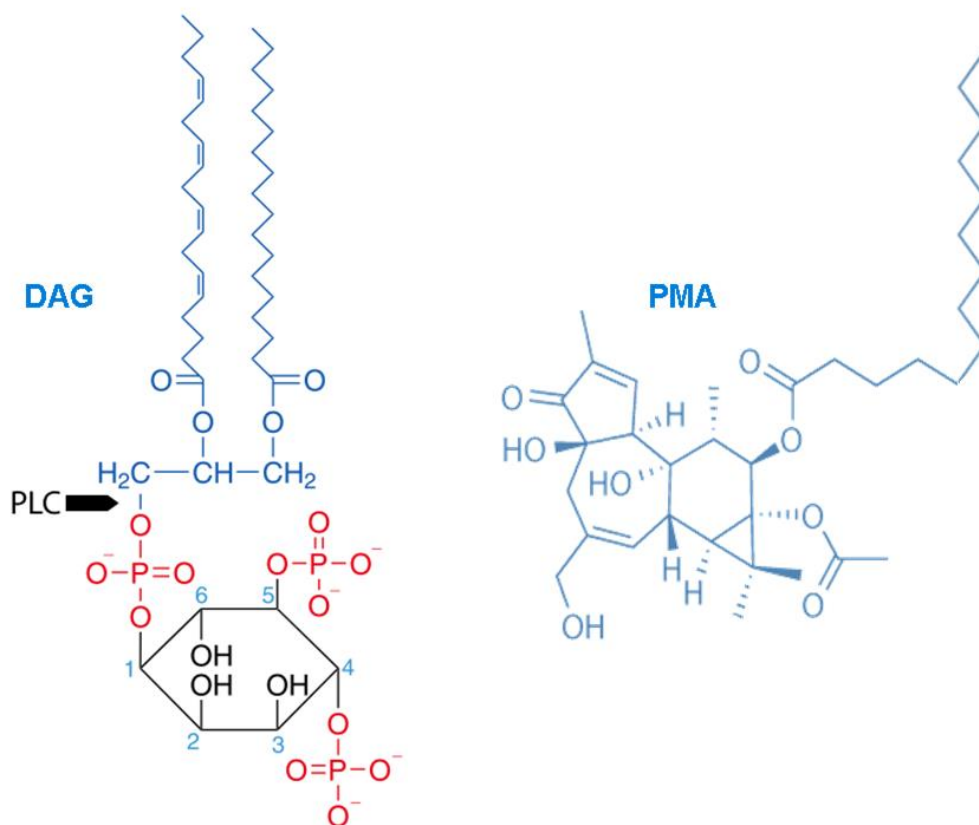


Figura 3. Estrutura da fosfatidilinositol 4,5 bifosfato (PIP₂), mostrando o ponto de clivagem da enzima fosfolipase C (PLC), formando diacilglicerol (DAG) comparado a estrutura do 13-acetato- de forbol éster 12-miristato (PMA) (fonte: figura do autor)

1.3.1. A Proteína cinase C

As proteínas cinase C (PKC) são membros da família proteínas serina/treonina cinases, da qual também fazem parte as proteínas cinases A (PKA) e proteínas cinases B (PKB). As PKC são formadas por isoformas classificadas de acordo o seu domínio regulatório que é variável entre os três subgrupos das PKC. As PKCs *convencionais* ou *cPKCs* possuem quatro isoformas (α , β I, β II, γ) que são ativadas por DAG/PMA e são íon cálcio dependentes. As *novas* nPKC (δ , θ , ξ , η) também são ativadas por DAG/PMA, mas são independentes de cálcio, enquanto as *atípicas* aPKCs (ζ , ν λ) independem tanto de DAG/PMA quanto de cálcio, são ativadas por fosfatidilinositol-3-4-5-trifosfato (PIP₃) ou ceramida. Além disso, todos os três grupos precisam do fosfolípídio, fosfatidilserina para ativação (Steinberg 2008).

PKC isoformas: Estrutura dos domínios

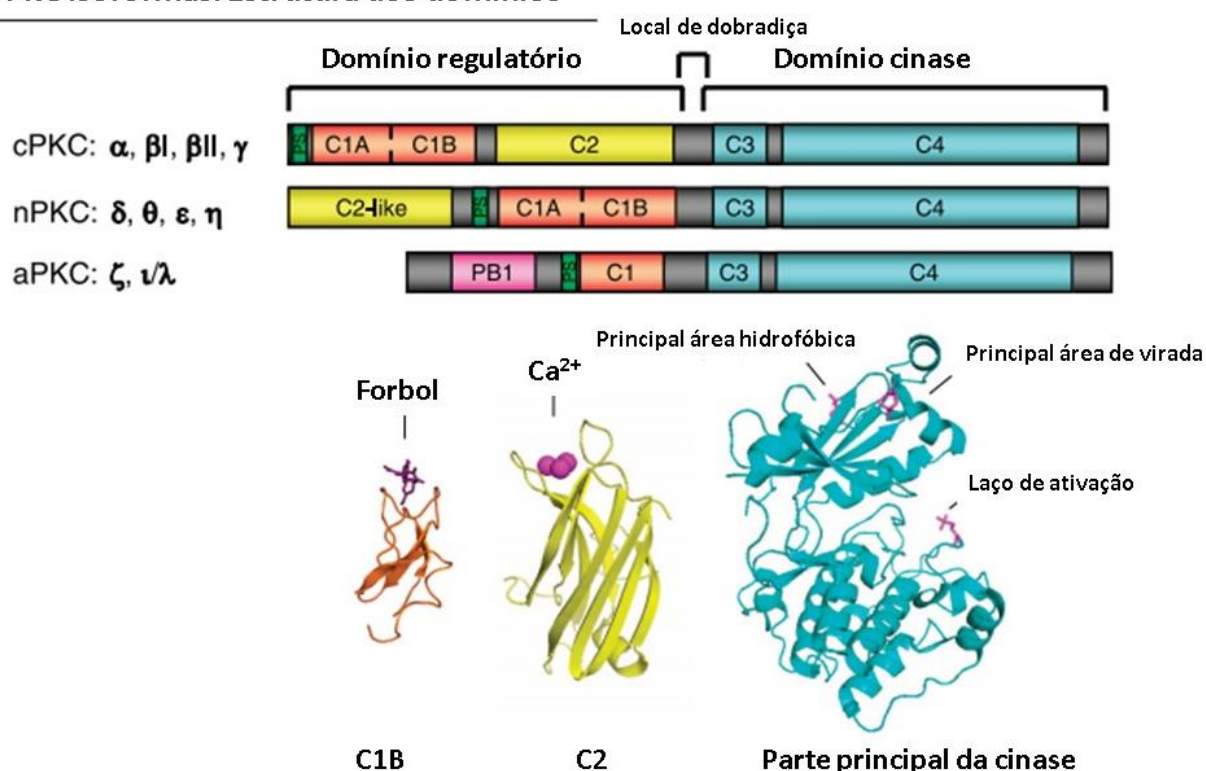


Figura 4. Estrutura dos três grupos das proteínas cinases C, com suas devidas isoformas, bem como a estrutura domínio de cada PKC. Em azul: domínio conservado das PKC. Em amarelo: domínio da ligação do íon cálcio e em vermelho: domínio de ligação do forbol (Steinberg 2008).

Os neutrófilos expressam as PKC α , β I, β II, δ , ζ , as quais participam e regulam diferentes funções dos neutrófilos como adesão, degranulação e ativação da NADPH oxidase (Bertram e Ley 2011).

1.4. Ativação de neutrófilos por PMA

Apesar do PMA ser um estímulo químico, estímulos biológicos como *C. albicans* e *S. agalactiae* induzem uma via relacionada com a do PMA, com a participação de PKC, MPO e NE (Konig et al., 2016, Kenny et al., 2017). Ao atravessar a membrana plasmática de forma independente de receptores ou canais, o PMA ativa a PKC translocando as isoformas do citosol para a membrana celular (Fontes et al. 1997). As cPKCs α e β II

possuem um padrão e localização diferente de translocação da nPKCs δ (Nixon e McPhail 1999). Provavelmente PKC β já é translocada bem antes de 2 minutos de estímulo, ou já se encontra presente na membrana plasmática (Nixon e McPhail 1999; Sheats et al. 2015), enquanto a PKC α ainda está começando a translocação. Já a PKC δ é translocada totalmente nesse período de tempo (Sheats et al. 2015). A translocação de PKC δ leva à fosforilação do substrato C-cinase rico em alanina miristoilada (MARCKS) (Eckert et al. 2010; Sheats et al. 2015), a qual se transloca da membrana plasmática para o citosol, alterando a mobilidade e afinidade das proteínas CD18 e integrina β 2, polimerizando a actina e levando à adesão e à migração (Eckert et al. 2010). Com o aumento das moléculas de adesão, como E-selectina, (Alam et al. 2005), LFA-1 (Shaw et al. 2004) e CD11b/CD18 (Campos et al. 2014), ocorre o rearranjo do citoesqueleto, o qual é importante para a montagem do complexo NADPH oxidase (Bengtsson, Orselius, Wettero 2006).

1.4.1. Polimerização da actina e ativação da NADPH oxidase

Com o rearranjo do citoesqueleto, proteínas como actina, moesina e cofilina, interagem com os componentes citosólicos do NOX, p47^{phox}, p40^{phox} e p67^{phox} permitindo a translocação para a membrana plasmática (Sheppard et al. 2005).

As cPKCs e nPKCs participam da produção de EROs (Capsoni et al. 2012). A translocação de PKC α e β II coincidem com a translocação da p47^{phox}, o que não foi observado com PKC δ (Nixon e McPhail 1999), apesar de Fontayne, Dang, e Benna (2002) terem demonstrado que p47^{phox} pode ser fosforilado pelas isoformas PKC α , β I, β II, δ , ζ . A inibição da isoforma α apresentou um menor impacto na produção de EROs, (Fontayne, Dang, e Benna 2002), enquanto a inibição de PKC β reduz 50% da produção (Dekker et al. 2000), e sugere-se que as isoformas PKC α , β , δ podem atuar como inibitórias, dependendo do sítio de fosforilação na p47^{phox} (Majumdar et al. 1991; Kelher et al. 2016).. Além disso, a hiperfosforilação de p47^{phox} leva a desativação da NADPH oxidase (DeCoursey e Ligeti 2005).

A polimerização da actina também é essencial durante as mudanças estruturais ocorridas quando há o inchaço da cromatina para a formação das NETs (Neubert et al. 2018) e EROs participa deste processo ao levar à glutatilonilação da F-actina, com consequente polimerização (Stojkov et al. 2017a). A PKC β está envolvida no processo

da formação de NETs (Gray et al. 2013; Neeli e Radic 2013) enquanto a inibição de nPKC e aPKC não interferem na produção (Gray et al. 2013).

A produção de EROs consequente à ativação de PKC ocorre por meio da fosforilação das vias MAPK/MERK/ERK/p38/Rac-2 (Tatsiy e McDonald 2018; de Bont et al. 2018b; Pilszczek et al. 2010; Lim et al. 2011), assim como ERK2 fosforila MARCKS (Schönwaßer et al. 1996) que fosforila a via PIP2/PI3K/PIP3/Akt (Ziemba et al. 2016). Como já demonstrado, que inibição da via PI3K não inibe MAPK (Avdi et al. 1996), o que sugere que sua ativação ocorre concomitantemente ou depois de MAPK .

1.4.2. Proteínas cinase ativadas por mitógenos (MAPK)

A via das proteínas cinase ativadas por mitógenos (MAPK) é uma cascata de proteínas cinases, envolvidas na transdução de sinal celular em resposta a sinais extracelulares. Essa via é composta por 3 tipos de proteínas cinases: MAP cinase cinase cinase (MKKK), MAP cinase cinase (MKK) e MAP cinase que são sequencialmente ativadas por fosforilação. Em mamíferos, as três subfamílias de MAPK mais bem caracterizadas, são: MAPK clássica ou cinase regulada por sinal extracelular (ERK1/2), cinase c-Jun N-terminal (JNK/SAPK) e p38 cinase (Zhang and Liu 2002).

Após ativação das isoformas de PKC (Karlsson, Nixon, e McPhail 2000a; W. Zhang e Liu 2002), ativa-se a MAPKKK fibrosarcoma rapidamente acelerado (Raf) seguido da MAPKK cinase ativadora de MAPK (MEK) que ativa ERK 1/2, p38 MAPK e a pequena proteína G Rac-2 (Hakkim et al. 2011; Lim et al. 2011). MEK 1/2 fosforila o componente p67 phox da NADPH oxidase (Dang et al. 2011), e p38 MAPK fosforila o componente p47phox da NADPH oxidase (Dang et al. 2006), levando à sua montagem. A via das MAPK está associada à formação de NETs dependente de NADPH oxidase (Keshari et al. 2013).

Além disso, ao se reduzir a abundância de ERK/MAPK , inibe-se NOX, inibindo a formação de NETs (Chiang, Chuang, e Liu 2011; Mouzaoui et al. 2014; Arumugam et al. 2017). Também é diminuída a citrulinação de histonas H3, MPO-DNA (Al-Khafaji e Tohme 2016) e reduzida a produção de ácido hipocloroso (HClO) (Parker et al. 2012).

1.4.3. Fosfatidilinositol-3-cinase (PI3K)

A fosfatidilinositol-3-cinase (PI3K) é uma família de cinases lipídicas agrupadas em três classes PI3K I, II e III. Devido seu papel especializado na transdução de sinais a PI3K classe I é mais amplamente estudada, sendo dividida em: IA (PI3K α , PI3K β , PI3K δ) e IB (PI3K γ). A PI3K catalisa a fosforilação da posição 3 do anel de inositol do fosfatidilinositol (4,5) bifosfato (PtdIns (4,5)P₂ ou PIP₂), formando fosfatidilinositol (3,4,5) trifosfato (PtdIns (3,4,5)P₃ ou PIP₃). PIP₃ leva à translocação de várias proteínas que possuem o domínio *pleckstrin homology* (domínio PH), que participam na quimiotaxia, migração, degranulação e produção de EROs nos neutrófilos (Puri et al. 2005; Hawkins et al. 2010). Por exemplo, a cinase serina/treonina Akt/PKB que contém o domínio PH é ativada ao ser fosforilada, podendo fosforilar proteínas nucleares e citoplasmáticas como mTORC, bem como inibir proteínas anti-apoptóticas e ativar a via do NF κ b (Hemmings e Restuccia 2016).

O uso de um inibidor não seletivo de PI3K não reduz a produção das NETs induzida por PMA (Van Der Linden et al. 2017), porém a inibição específica da isoforma PI3K γ leva à redução de NETs por PMA (DeSouza-Vieira et al. 2016). Sua presença está associada com a produção de NETs, pois PKC β ativa PI3K por meio da fosforilação (Walser et al. 2013). A PI3K γ ativada modula positivamente a fosforilação de ERK, levando à produção de EROs intracelular nos grânulos por meio da NADPH oxidase, inibindo a apoptose e levando à descondensação da cromatina (Karlsson, Nixon, and McPhail 2000a; Azevedo et al. 2015; DeSouza-Vieira et al. 2016). Essa inibição da apoptose pode estar relacionada com a proteína cinase Akt/PKB, que é ativada ao se ligar ao PIP₃ por meio do domínio PH (Hemmings e Restuccia 2016). Sabe-se que a produção das NETs dependente de NADPH oxidase ativa Akt (Douda et al. 2015; Tatsiy e McDonald 2018).

Tatsiy e McDonald (2018) mostrou que MEK e p38MAPK está envolvida na formação das NETs nos primeiros 15 minutos após estímulo dos neutrófilos, enquanto a via PI3K parece contribuir durante todo o processo da netose. Não se sabe ao certo como essas vias se comunicam para a formação das NETs, mas sabe-se que elas contribuem para a formação de EROs, os quais são responsáveis pela descondensação da cromatina.

1.4.4. Cromatina

A cromatina é organizada com as histonas H3, H4, H2Be H2A, que formam um octâmero unido ao DNA, formando o nucleossoma cuja estrutura é unida à histona H1 (Wang, Wang 2013). As enzimas Peptidilarginina deaminases (PADs) modificam as histonas, desaminando arginina (Arg) em citrulina (Cit), permitindo a descondensação da cromatina (Wang et al. 2004; König, Andrade 2016)

Os neutrófilos expressam alto nível de PAD4 (Nakashima, Hagiwara, e Yamada 2002), a qual é responsável pela citrulinação das histona H3 e H4 (Arita et al. 2006). Isso leva a formação de fibras de 15-25 nm de cromatina, (Brinkmann et al. 2004; Wang et al. 2009) com a ruptura do núcleo celular e consequente da membrana plasmática (Neubert et al. 2018).

Os neutrófilos de camundongos estimulados por PMA têm 48,5% de citrulinação de histonas quando comparados a células não estimuladas (P. Li et al. 2010), porém ainda é um ponto controverso, já que foi observado que neutrófilos humanos estimulados por PMA não geram citrulinação (Neeli e Radic 2013).

1.4.5. Gasdermina D

Recentemente dois estudos mostraram a importância de um outro mecanismo para a liberação das NETs, a proteína gasdermina D. Gasdermina D (GSDMD) é uma proteína que possui dois domínios, a porção N-terminal e C-terminal que são separadas por uma porção ligante. Ela é conhecida por promover um tipo de morte celular, chamada de piroptose. Nessa, a caspase inflamatória 1 é ativada através da via canônica, que ocorre via inflamassoma, ou pela caspase 11 na via não canônica que é independente do inflamassoma. Isso permite a clivagem da gasdermina, que leva à formação de poros na membrana celular (Shi et al. 2015; Kayagaki et al. 2015). Após a clivagem, a porção GSDMD-C permanece no citosol, enquanto o produto de GSDMD-N se oligomeriza na membrana celular, formando poros (Liu et al. 2016).

Um estudo, com neutrófilos estimulados por LPS e bactérias Gram-negativas, mostrou que a GSDMD promove a liberação das NETs pela via não canônica do NLPR3 independente de piroptose (Chen et al. 2018). Enquanto em neutrófilos estimulados por

PMA, a gasdermina foi clivada por meio da ativação das serino-proteases por EROs, o que levou à liberação das NETs (Sollberger et al. 2018).

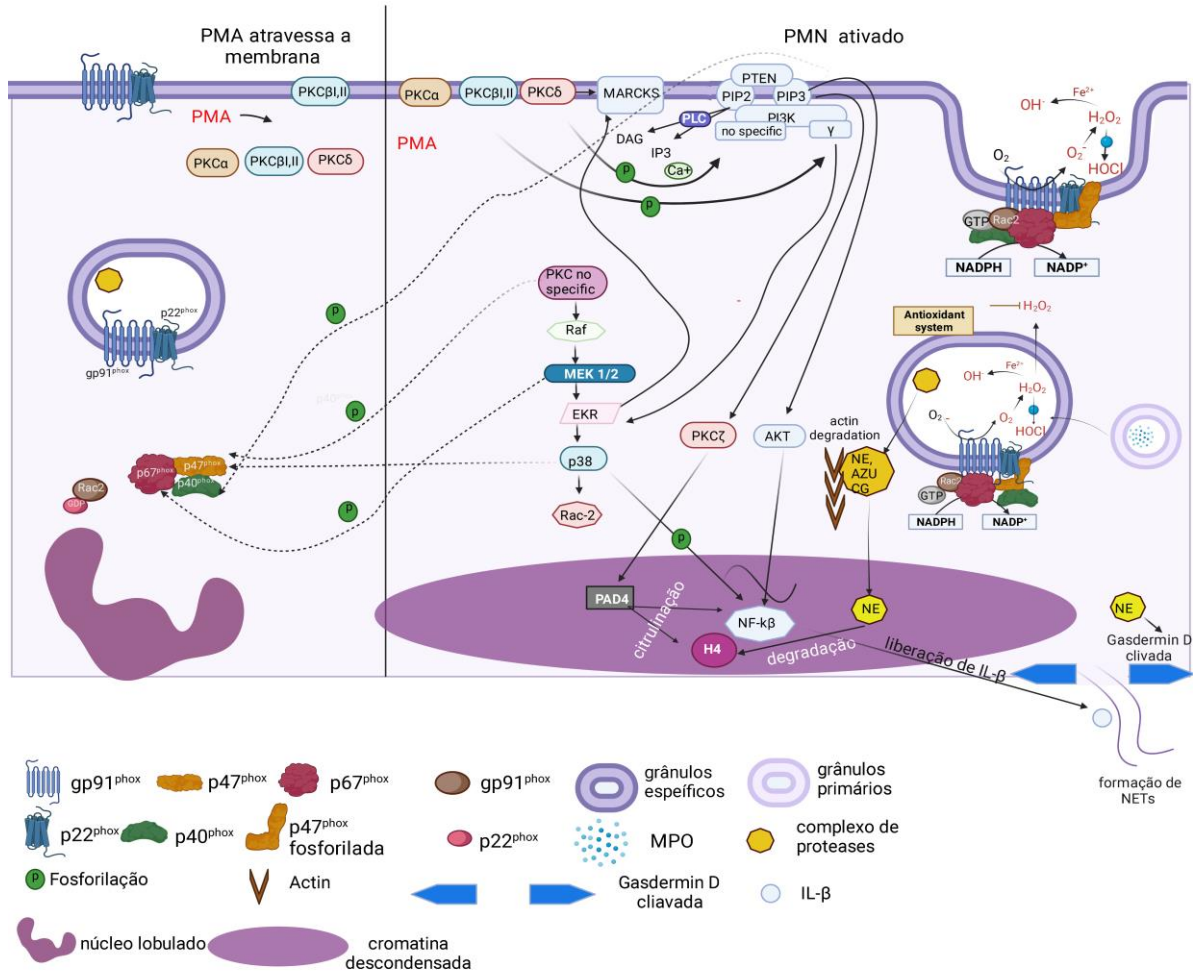


Figura 5. Esquema mostrando a ativação do PMA até a geração das NETs. O PMA atravessa a membrana plasmática e ativa as isoformas PKC (α , β I, β II, δ) que se translocam para a membrana celular, ao mesmo tempo que já existem PKC β presente na membrana. PKC δ fosforila MARCKS que ativa a via PI3K permitindo a fosforilação de PIP2 em PIP3. Por outro lado, PIP3 se liga ao domínio PH de proteínas, como AKT. O PTEN regula a formação de PI3K por meio da desfosforilação de PIP3 em PIP2. O PIP2 é convertido em DAG e IP3 pela fosfolipase C (PLC), que libera Ca⁺. A PKC também ativa a via MAPK. A PKC, PIP3 e MAPK (MEK1 / 2 e p38) são responsáveis por fosforilar os componentes citosólicos da NADPH oxidase (p47 phox, p67phox e p40phox) que se translocam para a membrana, montando o complexo NADPH-oxidase na membrana plasmática e grânulos específicos, permitindo a formação de EROs. O peróxido de hidrogênio (H₂O₂) ativa e dissocia as proteases presentes nos grânulos azurófilos: mieloperoxidase (MPO), elastase neutrofílica (NE), azurocidina (AZU),

cathepsina G (CG), lactoferrina (LTF), proteinase 3 (PR3) e lisozima (LYZ). A dissociação da NE com a degradação da F-actina, permite a translocação de NE para o núcleo, a qual degrada as histonas. Além disso, PIP3 ativa PKC ζ que por sua vez ativa PAD4 que causa a citrulinização de histonas. Criado com BioRender (fonte: figura do autor).

1.5. Apocinina

A apocinina ou acetovanilona (4-hydroxy-3-methoxyacetophenone) é uma acetofenona com massa molecular de 166,17 g/mol. Descrita pela primeira vez em 1883, isolada da planta *Apocynum cannabinum* (Cânhamo canadense). Em 1971, foi encontrada nas raízes da planta nativa do sul da Ásia, *Picrorhiza kurroa* (*Scrophulariaceae*) (Stefanska e Pawliczak 2008). Em 1990, foram descritas sua ação sobre o complexo NADPH oxidase e suas propriedades anti-inflamatórias (Simons, 't Hart, et al. 1990; Hart et al. 1990; Hougee et al. 2006).

Em estudos de isquemia/reperfusão, a apocinina reduz a expressão de receptores que medeiam a inflamação, como TLR4 e óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e a mieloperoxidase – marcador da infiltração de neutrófilos (Uysal et al. 2014; Luo et al. 2015), pois reduz a migração dos neutrófilos ao reduzir a polimerização de actina (Müller et al. 1999).

Em neutrófilos, células endoteliais e monócitos a apocinina inibe a montagem de NADPH oxidase reduzindo a translocação de p47^{phox} (Stolk et al. 1994; Barbieri, Cavalca, Eligini, Brambilla, et al. 2004; L. Zhang et al. 2016; Trevelin et al. 2016). Para sua ação, ela precisa ser oxidada por H₂O₂ e MPO, formando um radical de apocinina, que oxida tios do complexo NADPH oxidase (Heumüller et al. 2008b; Almeida et al. 2012; Simons, Bert, et al. 1990). Além disso, apocinina pode inibir a ativação de NF- κ B em monócitos, ao inibir a ligação de NF- κ B ao DNA (Barbieri, Cavalca, Eligini, Brambiella, et al. 2004) e em neutrófilos estimulados por TNF- α (A. L. Cross et al. 2020)

Em modelos animais e em células não fagocíticas, a apocinina não inibe NADPH oxidase, mas inibe Rho-cinase (Schlüter et al. 2008), atua como um antioxidante e previne a ativação de proteína cinase ativada por mitógeno (p-38MAPK), proteína cinase específica de serina/treonina (ATK) e cinases reguladas por sinal extracelular (ERK1/2)(Heumüller et al. 2008a).

Apocinina é biodisponível, não sendo tóxica, além disso é rapidamente absorvida por administração oral (Wang et al. 2008; Chandasana et al. 2015). No presente estudo, ela é utilizada para inibir o burst respiratório.

2. JUSTIFICATIVAS

As NETs são citadas como “faca de dois gumes”, pois auxiliam na morte de patógenos, mas são associados a diversas doenças, como aterosclerose e trombose. Vários estudos demonstram a relação da produção de EROs intracelular com a formação de NETs, porém ainda não é claro como eles interagem para que as NETs sejam produzidas. Já foi demonstrado que NETs são produzidas dentro de 3-4 horas, mas a primeira fase (60 minutos) de sua formação, a qual é engatilhada por EROs, é importante para regular as demais (Neubert et al. 2018), porém seus mecanismos são pouco estudados. Sabe-se que a PKC β reduz 50% da produção de EROs (Dekker et al. 2000) e que ela ativa Raf/MEK ERK 1/2/p38 MAPK /Rac-2 (Hakkim et al. 2011; Lim et al. 2011), bem como PI3K por meio da fosforilação (Walser et al. 2013). Essas vias fosforilam, os diferentes componentes da NADPH oxidase, ativando o complexo e levando à formação das NETs (Dang et al. 2011; 2006; Karlsson, Nixon, e McPhail 2000a; Azevedo et al. 2015; Rochael et al. 2015)

É importante entender as vias posteriores a formação de EROs que são necessárias para desencadear a formação de NETs, por exemplo, entender se EROs realmente levam à ativação de PAD4 e se ela é realmente necessária; como EROs modulam a polimerização de actina e quando esse processo é desencadeado. E quais as demais proteínas/vias são ativadas por EROs no início do processo que levam à formação das NETs.

3. OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho é avaliar a influência do *burst* respiratório na fase precoce da produção de NETs e no perfil proteico e funcional de neutrófilos, bem como propor possíveis mecanismos moleculares associados a esses processos.

3.1. Objetivos específicos

- Avaliar a cinética da produção de EROs em neutrófilos estimulados com PMA;
- Avaliar o efeito da inibição de NADPH oxidase na cinética de produção de EROs por neutrófilos;
- Avaliar se o inibidor da NADPH oxidase pode reverter a produção de EROs em neutrófilos estimulados com PMA;
- Estudar os efeitos da ativação por PMA e da inibição por apocinina sobre a atividade fagocítica dos neutrófilos;
- Verificar a relação da produção de EROs com a geração de NETs;
- Analisar o perfil proteômico de neutrófilos, buscando correlações entre as vias de fagocitose, migração e produção das NETs com a produção de EROs e sua inibição;
- Correlacionar a produção de NETs, o burst respiratório e as alterações fagocitárias e migratória ao perfil proteômico das condições estudadas.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Coleta de amostra

Foram selecionados oito indivíduos com idade entre 18 e 35 anos, com ausência de histórico de doenças crônicas, ou de manifestações alérgicas, inflamatórias e infecto contagiosas nos últimos 3 meses, não fumantes, que não fizeram uso de álcool nas últimas 48 horas que antecederam a coleta, que não fizeram uso de medicamentos. Todas as coletas foram realizadas no período da manhã. Todos os voluntários preencheram e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), aprovado previamente pelo Comitê de Ética em Pesquisa (parecer 3.368.158).

4.2. Separação dos polimormonucleares

O sangue coletado, por punção venosa periférica com seringa heparinizada (5 UI/mL) foi processado conforme protocolo (de Souza Castro et al. 2006), com adaptações. Os polimorfonucleares foram separados, por gradiente de densidade de Percoll com concentrações de 60% e 70%. A seguir foram realizadas lavagens para a retirada do Percoll da amostra e hemólise para retirada das hemácias residuais. Então foram verificados o número de células e a viabilidade, utilizando azul de tripan e avaliando por microscopia óptica em câmara de Neubauer. A contagem permitiu que os

ensaios subsequentes fossem realizados com um número constante de células. A pureza foi verificada em lâmina ($3,9 \times 10^4$ células) com coloração em panótico. Foi realizada a contagem diferencial de 100 células (Aquino et al. 2016).

Apenas amostras apresentando viabilidade $> 98\%$, pureza $> 93\%$ e contagem $> 1 \times 10^7$ células foram utilizadas nos ensaios subsequentes conforme figura 6.

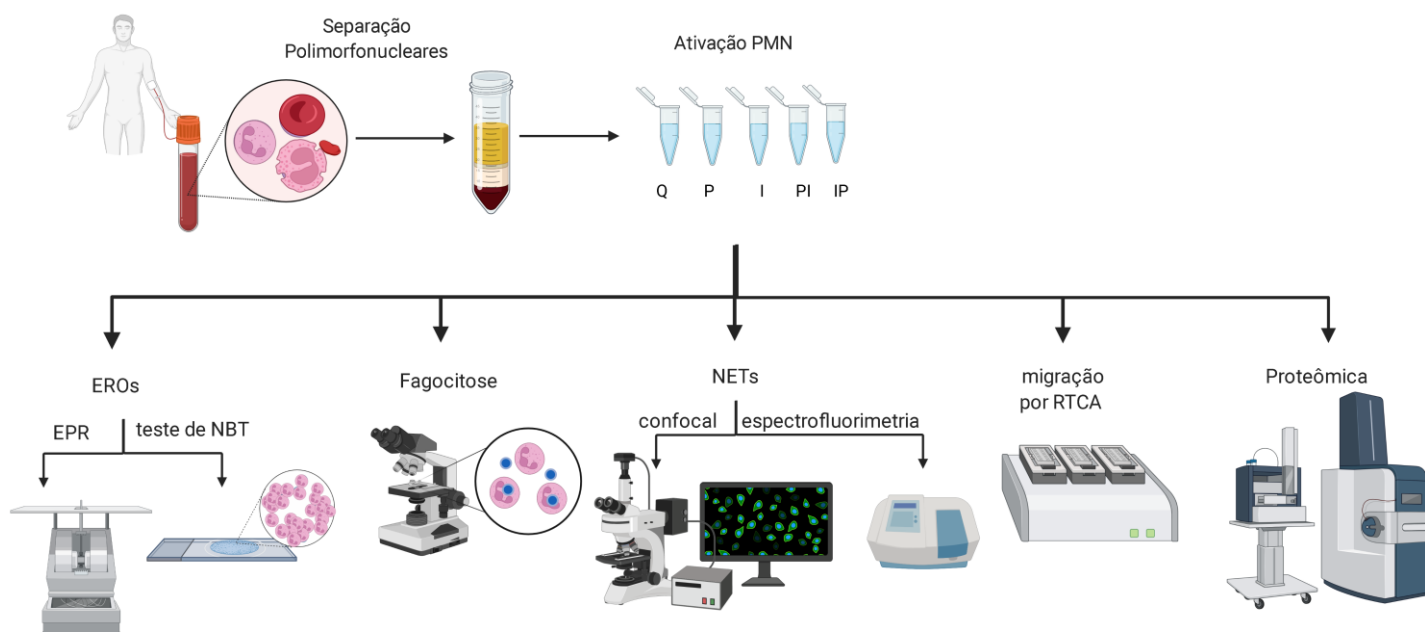


Figura 6. Delineamento experimental. Coleta sanguínea seguida da separação dos polimorfonucleares por gradiente de densidade. Após as células foram ativadas conforme grupo experimental durante 60 minutos, seguindo para análises subsequentes (EROs por EPR e teste de NBT, fagocitose por microscopia óptica, análise e quantificação de NETs por confocal e espectrofluorimetria e proteômica por LC-MS/MS. Criado por BioRender. (fonte: figura do autor).

4.3. Ativação celular

Após a contagem, os polimorfonucleares foram diluídos de forma a se obter a concentração final de 6600 células/ μl em todos experimentos. Então, as células foram estimuladas com PMA (100 nmol/L) e tratadas com apocinina (300 $\mu\text{mol/L}$) (Ferreira Cespedes et al. 2012). Foram preparados grupos experimentais com inibição antes ou depois da ativação com PMA, de forma a se avaliar sua capacidade de prevenir e de

reverter a ativação, respectivamente, durante 60 minutos, período da primeira fase de formação das NETs (Neubert et al. 2018). Foram utilizados os seguintes grupos experimentais:

- Q – Controle de PMN quiescentes;
- P – PMN ativados com PMA 100nmol/L durante 60 minutos;
- I – PMN inibidos com apocinina 300µmol/L durante 60 minutos;
- PI – PMN ativados com PMA 100nmol/L por 20 minutos seguido de inibição com apocinina 300µmol/L durante 40 minutos;
- IP – PMN inibidos com apocinina 300µmol/L por 20 minutos seguido de ativação com PMA 100nmol/L durante 40 minutos.

4.4. Quantificação de EROs pelo teste de NBT

No teste de nitroazul de tetrazólio (NBT) semi-quantitativo, o ânion superóxido ($O_2^{\cdot -}$) reduz o tetrazólio em formazan (Virella, Thompson, e Haskill-Strowd 1990), o qual foi quantificado por contagem em lâmina. Para o preparo das amostras, foram separados $3,9 \times 10^4$ polimorfonucleares para cada condição.

Cada condição foi incubada com o primeiro agente (PMA ou apocinina) a 37°C por 20 minutos. A seguir, foi adicionado o segundo agente e incubado por mais 20 minutos (as condições com apenas 1 agente receberam adição de tampão). Após esses 40 minutos, foram acrescentados 20µL de NBT 0,1% em um volume final de 56 µL, por 20 minutos. Foram preparadas lâminas para cada condição ($3,9 \times 10^4$ células), que foram visualizadas em microscópio óptico em aumento de 100x sendo observadas de forma qualitativa a intensidade e distribuição dos cristais de formazan.

4.5. Quantificação de EROs por Ressonância Paramagnética Eletrônica (EPR)

EPR é uma técnica de espectroscopia muito sensível, que permite a detecção de radicais livres em sistemas biológicos, mesmo em baixas concentrações e com constatação de geração de radicais. Ela se baseia na absorção da radiação eletromagnética, no caso micro-ondas, por amostras que possuem elétrons desemparelhados. A interação das micro-ondas com os elétrons desemparelhados em uma determinada frequência, a qual é determinada pelo tipo de espécie a ser detectada, gera uma energia que permite a transição do momento

paralelo ao campo magnético para uma posição antiparalela. Com a transição, o sistema absorve energia do campo magnético, sendo sua derivada (taxa de variação instantânea do campo magnético, em relação a absorção) detectada (Davies 2016). O uso de spin probes, como o 1-Hydroxy-3-methoxycarbonyl-2,2,5,5-tetramethylpyrrolidine (CMH), permite detectar radicais intra e extracelulares (majoritariamente intracelulares) transitórios, prolongado seu tempo de vida pois o CMH reage com o superóxido, produzindo CM• nitróxido, o qual é detectado e apresenta maior estabilidade que o radical superóxido (Elajaili et al. 2019).

Por limitações do equipamento, foi realizada a leitura de uma amostra por vez. Para deduzir a variação do tempo entre cada amostra, antes de cada leitura, foram adicionados 200µmol/L da sonda CMH aos neutrófilos (2×10^7) e realizada a leitura por 5 minutos, para detectar a produção basal de radicais. A seguir, o ativador ou inibidor foi adicionado e foi realizada a leitura por 60 minutos no espectrômetro Bruker (Bruker EMX plus, Germany), feitas em um Q (fator de qualidade da cavidade estoque da energia de micro-ondas) de 1400. Para as condições duplas (PMA+inibidor e inibidor+PMA), quando o primeiro ativador foi colocado realizou-se a leitura durante 20 minutos, tempo comparável ao utilizado nos demais ensaios. Depois, adicionou-se o segundo modulador e realizou-se a leitura durante os 40 minutos finais (Dikalov et al. 2014 adaptado).

Para comparar a evolução temporal da produção de superóxido gerado entre as amostras, a cinética das curvas foi definida pelo modelo de Gompertz, o qual permite identificar a taxa de crescimento de funções sigmóides, como observado na ativação por PMA, conforme equação (Tjørve e Tjørve 2017):

$$y = ae^{-e^{-k(x-xc)}}$$

Em que

Y , é a taxa de produção,

a , é a taxa máxima de crescimento,

e , é a constante de Euler,

x , é o tempo

xc , é o tempo de inflexão da curva,

k , é a taxa de crescimento.

4.6. Quantificação do DNA extracelular por espectrofluorimetria

Os polimorfonucleares (2×10^5 células/condição) estimulados por 1 hora com PMA e/ou inibidor foram incubados nos 20 minutos finais com Sytox Green (10 $\mu\text{mol/L}$). As leituras foram feitas em microplaca de fluorescência de 96 poços, em espectrofluorímetro com excitação em 485 nm e emissão em 538 nm (Gupta et al. 2005).

4.7. Análise do DNA complexado com a elastase por confocal

Os polimorfonucleares (2×10^5 células/condição) foram aderidos em lamínulas com polilisina 0,001% durante 30 minutos, seguidos por ativação de 1 hora com PMA e/ou inibidor. Após, as células foram fixadas com formaldeído 1% por 30 minutos, seguidos de duas lavagens com HBSS 1X. Para bloquear as interações não específicas com o anticorpo, foi utilizada a solução de bloqueio (BSA 0,1%) durante 30 minutos. As células fixadas foram incubadas com anticorpo anti-elastase 1:1000 (MA5-32548; Invitrogen) por 3 horas em temperatura ambiente, seguidos de uma lavagem com HBSS e incubadas com anticorpo secundário Alexa Fluor 405 1:1000 (A48258; Invitrogen) por 1 hora em temperatura ambiente. Após, foi adicionado Sytox Green (10 $\mu\text{mol/L}$) durante 5 minutos, seguido de duas lavagens com HBSS. As lamínulas foram colocadas em lâminas com 0,5 μL de glicerol 50%. As lâminas foram visualizadas no microscópio confocal Leica TCS SP5. O confocal foi adquirido usando o plano 100x lente com óleo de imersão com zoom 2,0x. O sinal de imunofluorescência do Alexa Fluor 405 e do Sytox Green foram excitados a 450 nm e 485nm, com multilaser argon, respectivamente (Rada 2019 com modificações)

4.8. Fagocitose

Após os 40 minutos de estímulo com PMA ou tratadas com apocinina, as células ($3,25 \times 10^3$), foram incubadas com levedura (*Saccharomyces cerevisiae*) 1:5, por 20 minutos a 37°C para permitir a fagocitose. A seguir foram colocadas em lâminas, coradas com soluções do corante panótico. As contagens foram realizadas no aumento de 100x (Muniz-Junqueira et al. 2003 adaptado), observando-se o número de neutrófilos realizando fagocitose e o número de leveduras contidas nos neutrófilos.

4.9. Migração celular em tempo real por RTCA

Para a avaliação da capacidade de migração realizada em RTCA (do inglês, Real Time Cell Analyzer), primeiro foi necessária a realização da montagem da placa CIM (CIM-Plate 16, ACEA Biosciences Inc., San Diego, CA) na seguinte ordem: nos poços inferiores para a avaliação da migração, foram adicionados 160 µL de fMLP 100nM ou, para o controle negativo, foram adicionados 160 µL de HBSS Ca⁺ Mg⁺. Após encaixar a câmara superior, foram adicionados 25 µL de HBSS Ca⁺ Mg⁺ em todos os poços superiores, seguido de incubação em temperatura ambiente por pelo menos 60 minutos, para a formação do gradiente quimiotático entre as câmaras. Após os PMN serem incubados com PMA e/ou inibidor, uma alíquota de 60 µL de células foi adicionada aos poços superiores da placa, as quais foram imediatamente colocadas no RTCA, para a medição do índice celular durante 2 horas a cada 60 segundos (Cano, Vargas, e Lavoie 2016).

4.10. Preparação para proteômica

4.10.1. Lise celular

Após a separação das células e incubação com os moduladores descritos acima, as alíquotas foram centrifugadas a 1600 rpm por 5 min a 4 °C. O sobrenadante foi retirado e foram realizadas duas lavagens com HBSS seguidas por centrifugação. Em seguida, foram acrescentados ao pellet 200 µL de Tampão de Lise (SDS 2%, DTT 0,1 mol/L, TEAB 20 mmol/L, inibidor de protease 2%) e incubados em *thermomixer* por 10 min a 80°C, 1000 rpm. Então, foram sonicados com cavitação em ponteira por 5 ciclos de 15 segundos a 50% de potência, com intervalos de 15 segundos. As amostras foram congeladas em -80°C e analisadas posteriormente (Wiśniewski et al. 2009b).

4.10.2. Digestão das proteínas

Para a digestão das proteínas, as amostras anteriormente congeladas em -80°C foram descongeladas, centrifugadas a 16000 g por 15 min a 21° C. O sobrenadante foi alíquotado e adicionado DTT 0,1M. Após, foi realizada a quantificação das proteínas no fluorímetro Quibit (Invitrogen), conforme instruções do fabricante e normalizada a concentração de proteínas para 150 µg/µL. As proteínas foram colocadas sobre o sistema de filtro Vivacon 500 com cut-off de 30kDa. Foram realizadas três lavagens com 200 µL de ureia 8M pH 8,0 e centrifugados a 10000 g por 15 min a 21°C. Foram adicionados 150 µL de DTT 0,1 mol/L e mantido em repouso no escuro por 30 minutos. Foram realizadas

mais duas lavagens com 200 μL de ureia 8M e centrifugados a 10000g por 15 min a 21°C. As proteínas foram alquiladas com 150 μl de iodoacetamida 50mM com amberlite 0,5% e mantidas em repouso por 20 minutos seguido de uma lavagem com 100 μl de ureia 8M. Após o descarte foram adicionados 100 μL de TEAB 20 mM e centrifugados a 10000 g por 15 min a 21°C. As amostras foram incubadas com tripsina 1 μg a 37°C por 16 horas (Wiśniewski et al. 2009a)

Após incubação com tripsina, as amostras foram centrifugadas a 14000 g por 10 min a 21° C. Foram adicionados 50 μl de TEAB 20 mM seguido de nova centrifugação. A seguir adicionaram-se mais 45 μl de TEAB 20 mM seguido de centrifugação. Adicionou-se TFA 0,5 % aos peptídios que passaram pelo filtro e secou-se em SpeedVac.

4.10.3. Dessanilização

Os peptídios foram ressuspensos em 50 μL de ácido fórmico 0,1% e foram aplicados nas colunas, previamente preparadas em ponteiras com C8, C18 e resina Poros R2. As amostras foram centrifugadas a 900 g por 4 min a 21°C. Foram seguidos por três lavagens com 200 μL de TFA 0,1 % e centrifugações. A seguir, foram realizados 2 ciclos de eluição com 80 μL de acetonitrila 20% + TFA0,1%; 2 ciclos com acetonitrila 50% + TFA0,1%; 2 ciclos com acetonitrila 90% + TFA0,1%, cada ciclo fora seguido de centrifugações a 600 g por 2 min a 21°C. As amostras foram secas em SpeedVac, ressuspensas em 50 μL de ácido fórmico 0,1% e quantificadas em Quibit. Cada amostra teve a concentração de peptídios ajustada para 0, 5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ em ácido fórmico 0,1%.

4.11. Análise proteômica

O extrato de peptídios em ácido fórmico foi analisado como descrito em (Viana et al. 2018), com adaptações. Foi aplicado em sistema cromatográfico de fase reversa (Dionex UPLC 3000), composto por coluna de aprisionamento de 3 cm x 100 μm contendo partículas de C18 5 μm e coluna analítica de 35 cm x75 μm contendo partículas de C18 3 μm . As colunas estavam conectadas por válvulas em sistema ventilado e receberam fluxo de solvente A composto por ácido fórmico 0,1% em água e solvente B composto por ácido fórmico 0,1% em acetonitrila. Foram realizadas injeções automáticas de 1 μg de peptídios de cada replicata em cada condição. As frações foram eluídas da

coluna analítica diretamente à câmara de ionização de um espectrômetro de massa *ion-trap/orbitrap* Elite. Os componentes eluídos foram ionizados por eletropulverização, acelerados em campo eletromagnético e analisados em sistema orbital de frequências (*orbitrap*), com resolução de MS1 igual a 120000, para determinação das massas moleculares. Para o sequenciamento, os 20 componentes de maior intensidade, acima do limite de intensidade de 3000, foram selecionados e fragmentados por colisão com gás inerte (CID) e submetidos ao sistema de armadilha de íons (*ion trap*). A reanálise de íons já fragmentados foi inibida por exclusão dinâmica, favorecendo a identificação de peptídeos menos abundantes. O conjunto de espectros obtidos foi armazenado em arquivos. RAW, os quais podem ser encontrados no repositório Massive / ProteinXchange, na pasta “LBQP_Hylane_neutrofpMA/Raw_spec_files”.

4.11.1. Bioinformática

Os dados gerados por LC-MSMS foram analisados no programa Progenesis, para quantificação das proteínas detectadas. Os espectros foram alinhados conforme corrida de referência que possuía o maior score, ou seja, com maior número de íons peptídeos, compensando a variação de alinhamento entre as corridas. A seguir, foram filtrados excluídos os de carga >7 , normalizando os dados pela mediana da corrida de referência e o desvio absoluto mediano. Após filtrados pelo fold change ≥ 2 , os peptídeos foram exportados para identificação no programa Peaks, utilizando o banco de dados UNIPROT filtrado para a espécie *Homo sapiens*, com tolerância de erro de massa de 10ppm, fragmentos de 0,5Da, considerando carbamidometilação e oxidação como modificações pós-traducionais fixas e variáveis, respectivamente. Foi utilizado um banco reverso (*decoy*), para determinação de FDR (False Discovery Rate), sendo utilizado o limite de FDR de 1% e com no mínimo dois peptídeos para confiabilidade de identificação de proteínas (Schmidt, Forne, e Imhof 2014).

Após identificação, as proteínas foram importadas novamente para o Progenesis, para finalizar a quantificação das proteínas identificadas. As proteínas foram consideradas significativamente reguladas quando ANOVA $p \leq 0,05$ e fold change ≥ 2 .

4.11.2. Análise das vias

As proteínas reguladas, foram agrupadas por vias moleculares no sistema Panther (<http://www.pantherdb.org/>) (Tang et al. 2016). As vias foram analisadas usando o teste de sobre-representação com anotação no banco Reactome versão 65 (Croft et al. 2014), usando o teste de Fisher corrigido por FDR. As interações entre as proteínas foram analisadas pelo programa STRING (<https://string-db.org/>) (Szklarczyk et al. 2017) usando o score de confiança médio (0.400) e a regulação positiva ou negativa foi expressa por meio da distribuição da taxa de abundância relativa entre as condições. As imagens foram geradas por meio do Cytoscape v3.8.2 (Shannon et al. 2003), o diagrama de corda, gerado por meio do software Circos (Krzywinski et al. 2009) e a o digrama de Venn pelo site Bioinformatics & Evolutionary Genomics. no seguinte link: <https://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>.

4.12. Análise estatística

As proteínas detectadas como reguladas pelo teste ANOVA foram submetidas ao teste *post-hoc* de Tukey para cada par de condições, sendo consideradas significativamente reguladas as que apresentaram p-valor ajustado $\leq 0,05$. Como critério adicional de estringência foi adotado como filtro o *fold change* ≥ 2 .

Os testes das NETs, fagocitose e migração são apresentadas por média \pm erro padrão. Foi realizado o teste de variância ANOVA fator único, e o teste t de Student para verificar o nível de significância, sendo considerado significativo $p \leq 0,05$.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Apocinina aplicada antes do PMA reduz a taxa de crescimento da produção de EROs

A análise da cinética de produção de radical superóxido, ajustada pelo modelo de Gompertz (ANEXO A), mostrou que o aumento na produção de EROs é tempo dependente com um indício de estabilização, e essa produção foi induzida por PMA e prevenida por apocinina. Na **Figura 7A**, nas condições de PMA isolado ou adicionado

antes do inibidor, observa-se o início da produção de EROs nos primeiros minutos, atingindo o pico da velocidade da produção por volta de 10 minutos. Essa cinética é característica da produção intracelular de EROs, a qual é menos intensa no início e apresenta um pico mais tardio, comparada à produção extracelular, que antes de 5 minutos já apresenta o pico máximo de produção (Drábiková et al. 2013; Karlsson, Nixon, e McPhail 2000b). O que condiz com o método utilizado, uma vez que o CMH, detecta majoritariamente EROs intracelulares, devido à sua lipofilicidade (Dikalov et al. 2011). Ressalta-se que, apesar do estímulo utilizado não ter a formação do fagossomo, PMA produz EROs intracelular nos grânulos específicos (Karlsson, Nixon, e McPhail 2000a; Ambruso, Cusack, e Thurman 2004).

Além disso, PMA permite um longo tempo de produção de EROs, perdurando de 20 até 60 minutos (Chapman et al. 2019; Karlsson, Nixon, e McPhail 2000b; Drábiková et al. 2013; Nagarkoti et al. 2019), tendo sido a duração de pelo menos 60 minutos confirmada no presente trabalho, utilizada por ser a fase inicial para a formação das NETs (Neubert et al. 2018). Observamos que há uma tendência à duração maior que 60 minutos, uma vez que ao final do estudo a curva ainda se apresenta ascendente. Nota-se que a adição de PMA após 20 minutos de incubação com o inibidor, desencadeia um aumento tardio (de início aos 35 min) e de menor intensidade na produção de EROs. Comparado a ativadores como fMLP e TNF- α que se ligam a receptores de membrana para ativação, PMA possui picos mais intensos e que perduram por um tempo maior (Boussetta et al. 2010; Björnsdottir et al. 2013). No presente estudo não foi realizada suplementação com oxigênio ao longo da incubação, porém como a ativação de neutrófilos em condições fisiológicas tem início na circulação e continuidade na matriz extracelular, o modelo experimental parece mimetizar tal condição, com decaimento progressivo da pO₂.

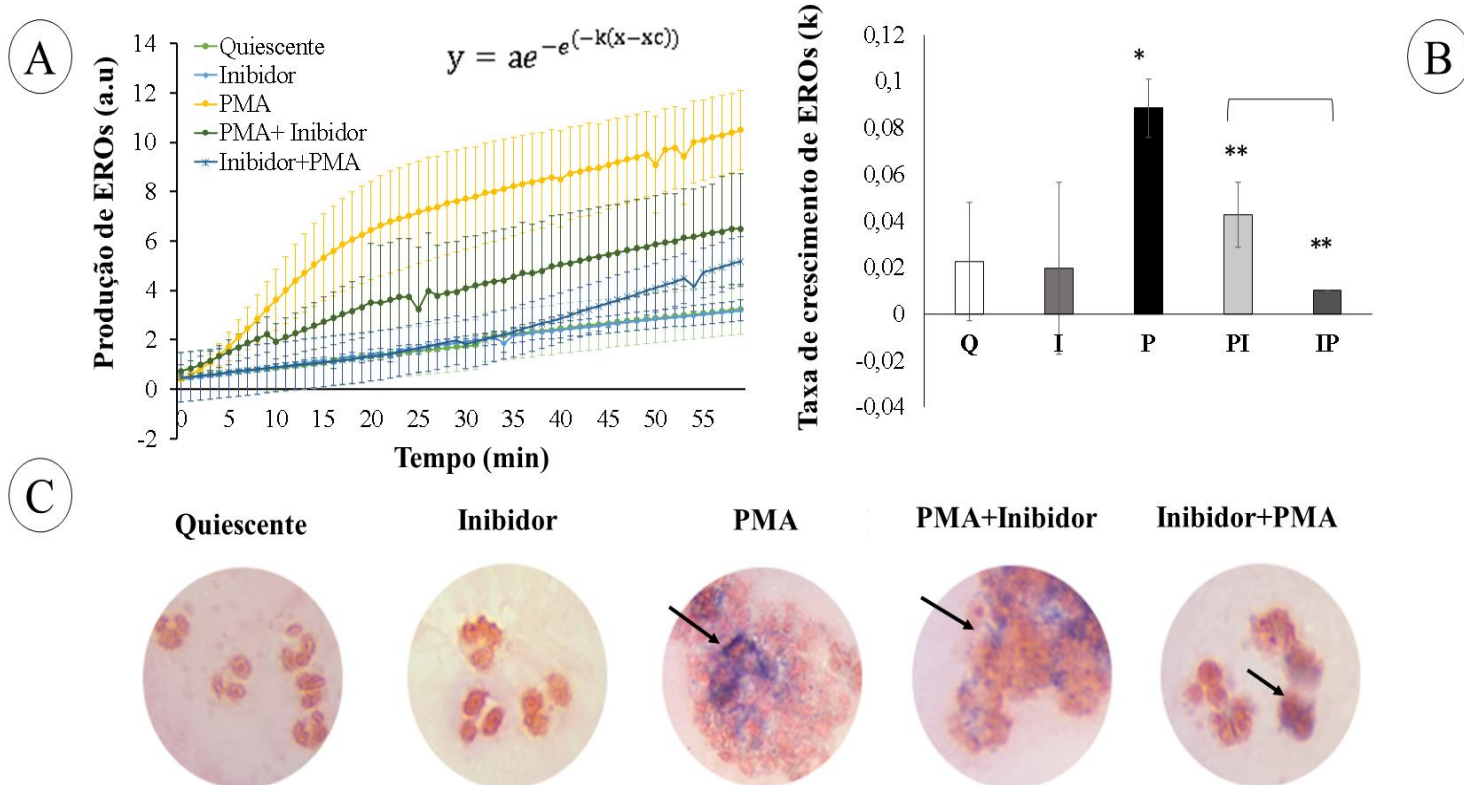


Figura 7. A. Cinética da produção de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) por EPR durante 60 minutos. Ajuste de curva pelo modelo de Gompertz com $r \geq 0,99$. B. Taxa de crescimento (k) de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) conforme modelo de Gompertz. C. Imagens típicas da análise do teste de NBT em microscopia óptica, setas indicando cristais de formazan. PMN ativados por PMA (100 nmol/L) e apocinina (300 μ mol/L) por 1 hora. * Difere estatisticamente do quiescente teste T ($p < 0,05$). ** Difere estatisticamente do PMA pelo teste T ($p < 0,05$).

O uso de apocinina neste estudo levou a uma redução na taxa de crescimento de EROs. Quando foi incubada antes da ativação com PMA (**Fig.7B**), essa taxa é bem menor do que a observada nos grupos P e PI, e a quantidade e intensidade de cristais de formazan observadas foram bem menores (**Fig. 7C**). A apocinina inibe a translocação de p47^{phox} prejudicando a sua colocalização com gp91^{phox} (Stolk et al. 1994; Trevelin et al. 2016). Para essa atividade, a apocinina precisa da formação de EROs, permitindo sua oxidação por H₂O₂ e MPO, formando um radical de apocinina, que oxida tíóis do complexo NADPH oxidase (Heumüller et al. 2008b; Almeida et al. 2012; Simons, Bert, et al. 1990). Os resultados deste estudo mostraram que os 20 minutos de ação da apocinina antes da adição de PMA foram suficientes para prevenir significativamente a produção de EROs, pois a produção detectada no grupo IP foi menor que P e PI ($p = 0,05$). Sendo assim, é

possível deduzir que a produção basal de EROs durante 20 minutos foi suficiente para a formação do radical de apocinina. A apocinina inibe a translocação da p47phox, de forma reversível, ou parcial, visto pela tendência de aumento de EROs após 15 minutos de ativação por PMA, no grupo IP (**Fig.7A**), porém, a visualização dessa reversibilidade pode ter sido limitada pelo tempo de observação.

5.2. A produção de EROs pode ser revertida?

A adição inicial de PMA e, posteriormente, de inibidor levou a uma taxa de crescimento de EROs menor do que a exposição apenas ao PMA ($p=0,05$), porém maior do que o observado no grupo IP. Esperava-se que o grupo PI tivesse uma maior redução de EROs, pois, apocinina precisa de EROs para sua ação (Heumüller et al. 2008b; Almeida et al. 2012; Simons, Bert, et al. 1990). Porém, isso não foi observado (**Fig. 7B**), sugerindo que a produção basal de EROs de neutrófilos seja suficiente para a formação do radical de apocinina nas condições experimentais adotadas.

Como é conhecido, PMA ativa PKC levando à montagem do complexo NADPH oxidase. Dekker et al. (2000) mostrou que neutrófilos, após estímulo com PMA, translocam PKC β do citosol para a membrana plasmática em 0,5 -2 minutos, contribuindo com mais de 50% da produção de EROs. Esse pico de produção de EROs está associado com a translocação da p47phox para a membrana plasmática e para o fagolisossomo (Dusi et al. 1993; Stolk et al. 1994) e a sua fosforilação (DeLeo et al. 1999b; Fontayne et al. 2002; Dekker et al. 2000) que já ocorre nos primeiros minutos de estímulo, com um pico de fosforilação em 20 minutos de ativação perdurando por até 30 minutos (Nagarkoti et al. 2018) catalisada por PKC e por outras cinases (DeCoursey e Ligeti 2005). Desta forma, as informações na literatura até o momento sugerem que os primeiros 20 minutos na ativação por PMA seriam suficientes para a translocação e fosforilação da p47phox. Ainda assim, nossos resultados mostram que a taxa de crescimento de EROs observada no grupo PI é menor que a do grupo P (**Fig. 7B**). Possíveis hipóteses para explicar tal observação seriam a ação antioxidante da apocinina (Heumüller et al. 2008b), permitindo a remoção das EROS, reduzindo a intensidade da produção, ou a translocação de apenas parte do estoque citosólico de p47phox nos minutos iniciais (Dusi et al. 1993; Stolk et al. 1994)

5.3. A regulação inicial de EROs influencia na formação das NETs.

A primeira hora de ativação por PMA é importante para a formação das NETs (Neubert et al. 2018) e os presentes resultados indicam que os primeiros 20 minutos são suficientes para produzir a quantidade de EROs (**Fig.7**), necessária para engatilhar a formação das NETs (**Fig. 8**). Os resultados mostraram que o uso do inibidor após ativação por PMA (PI) alterou a taxa de crescimento de EROs em relação ao PMA (P) (**Fig.7 B**), porém não levando a diferença na produção das NETs (**Figura 8 j-l**). Contudo, sabe-se que apocinina é oxidada por H_2O_2 e MPO, formando um radical de apocinina que oxida tióis do complexo NADPH oxidase (Heumüller et al. 2008a; Almeida et al. 2012). Como PMA é capaz de induzir a produção de oxidantes em poucos minutos (Pilszczek et al. 2010), era esperado que essa produção de EROs pudesse contribuir para a ação da apocinina, o que não foi observado. Os resultados mostraram uma atuação menor da apocinina, quando adicionada após o PMA (PI), do que quando adicionado antes do PMA (IP), engatilhando a formação das NETs (**Fig. 8 e 9**). Nota-se uma mudança morfológica dos lóbulos nucleares, característica do afrouxamento do DNA, durante a formação das NETs além disso, há uma redução na presença de elastase, na periferia do citoplasma, nos grupos P e PI (**Fig. 8 i,l**). Isso provavelmente se deve ao fato de EROs ativarem a elastase, translocando-a dos grânulos para o núcleo, onde contribui para a degradação das histonas (Papayannopoulos et al. 2010; Metzler et al. 2014b).

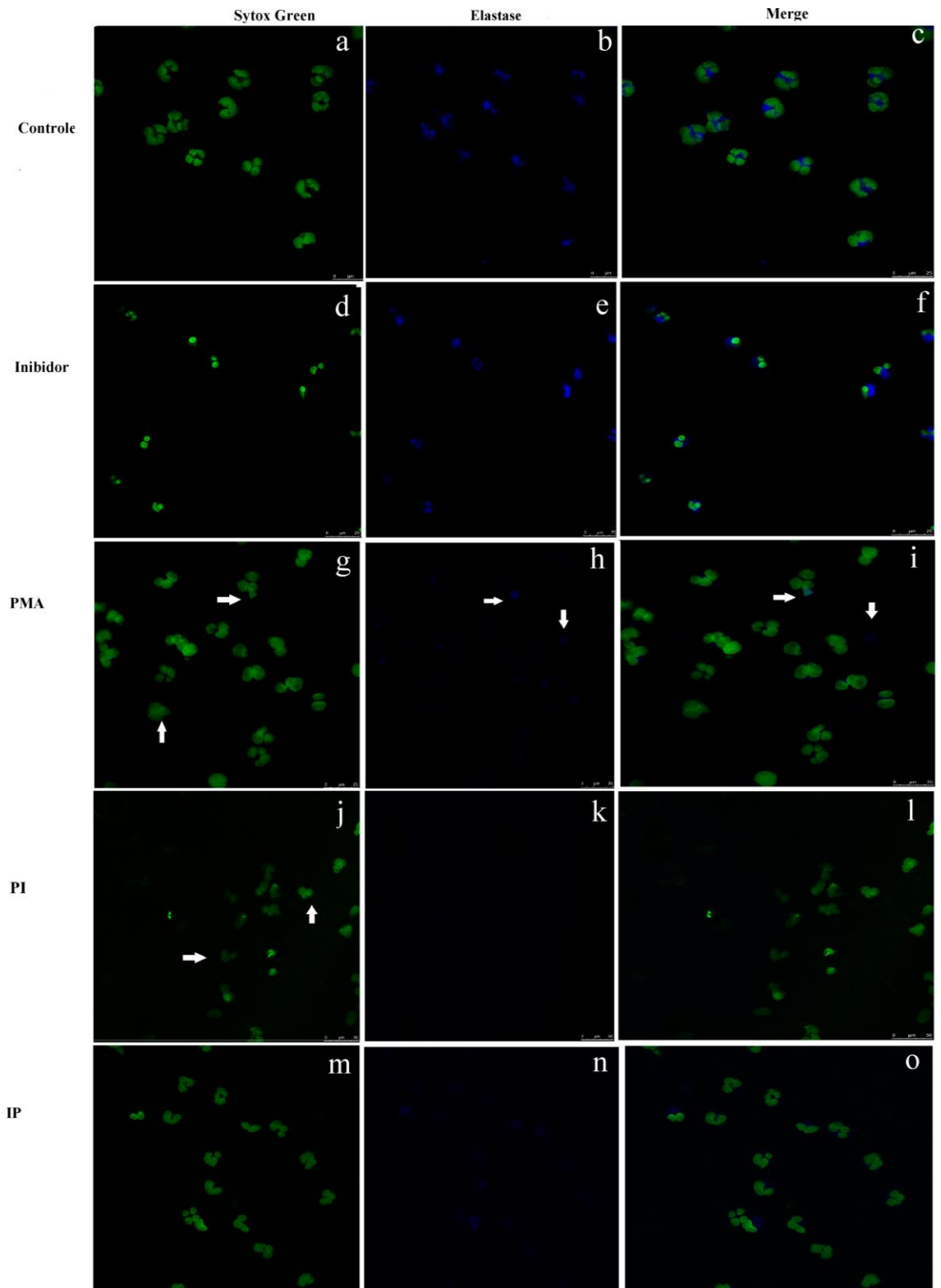


Figura 8. Imagem mostrando marcação do DNA celular com Sytox green (verde) e com o marcador específico de anti-elastase neutrofílica (azul) analisado por microscopia confocal. PMN ativado por PMA (100 nmol/L) e apocinina (300 µmol/L) por 1 hora. **a-c.** Q: quiescente, **d-f.** I: Inibidor, **g-i.** P: PMA, **j-l.** PI: PMA+Inibidor, **m-o.** IP: Inibidor+PMA. Setas mostrando o afrouxamento dos lóbulos nucleares e NETs. Escala

da barra indica 25 μm . E 50 μm no grupo PI. Imagem representativa do experimento realizado em triplicata.

A taxa de crescimento de EROs é menor no grupo IP que nos grupos P e PI, apesar da tendência de aumento na produção de EROs, observado 15 minutos após, ativação pelo PMA (**Fig. 7**). Quanto à morfologia celular (**Fig. 8 m-o**) e à quantificação das NETs (**Fig.9**), foi observada uma similaridade do grupo IP ao quiescente, seguindo padrão similar ao observado na produção de EROs. Portanto, este estudo propõe que a produção de EROs induzida por PMA nos primeiros 20 minutos, o qual já apresenta a taxa máxima de produção intracelular de EROs (Karlsson, Nixon, e McPhail 2000b; Douda et al. 2015), é suficiente para engatilhar os mecanismos de formação das NETs.

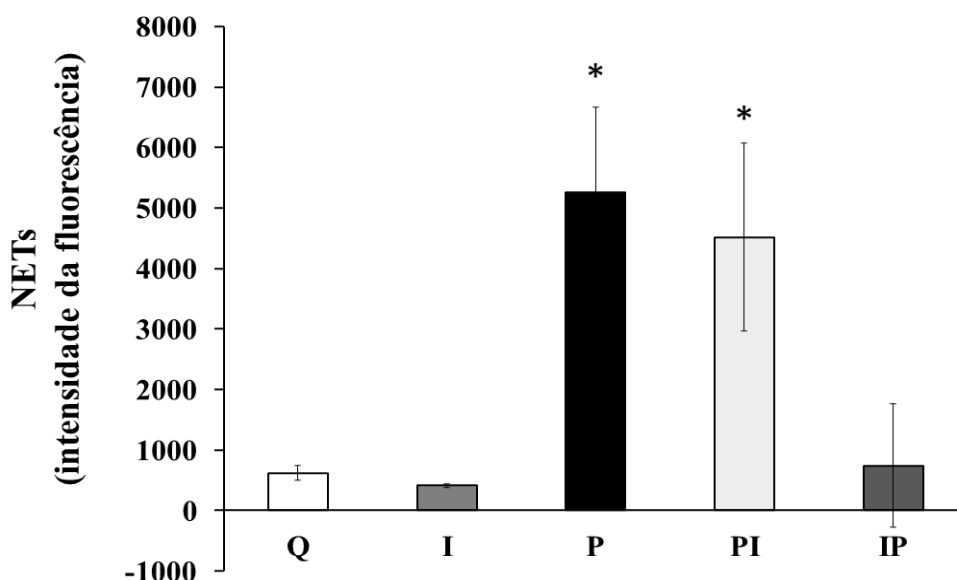


Figura 9. Quantificação da marcação do DNA extracelular PMN ativado por PMA (100 nmol/L) e apocinina (300 $\mu\text{mol/L}$) por 1 hora.. Sinal de fluorescência emitida por Sytox green, analisada em placa de 96 poços, por espectrofotômetro. Q: quiescente, I: Inibidor, P: PMA, PI: PMA+Inibidor, IP: Inibidor+PMA. * Difere estatisticamente do quiescente, inibidor e do IP teste T ($p < 0,05$).

5.4. A regulação de EROs influencia na atividade fagocítica.

As lâminas de neutrófilos incubados com leveduras mostraram que a inibição de NADPH oxidase reprimiu o aumento de fagocitose induzido por PMA. Observou-se uma atividade fagocítica 25% menor em neutrófilos do grupo IP (**Fig.10A**) comparado aos

grupos P e PI, os quais apresentavam fungos em estruturas reticulares, provavelmente NETs, as quais não foram vistas nas demais condições (**Fig.10B**). Stolk et al. 1994, não demonstraram nenhuma interferência da apocinina na fagocitose de neutrófilos incubados com *Staphylococcus aureus* opsonizado, porém Almeida et al. 2012 demonstraram que neutrófilos pré-incubados com apocinina e depois incubado com *Staphylococcus aureus* opsonizado, apresentaram uma redução de 25% na fagocitose, tal resultado é coerente com o encontrado no presente estudo. Essa aparente divergência pode ser devida à diferença nos tempos de pré-incubação com apocinina. enquanto Stolk et al. 1994 usaram apenas *S. aureus* opsonizado e 5 minutos de incubação, Almeida et al. 2012 usaram *S. aureus* opsonizado e 2 horas de incubação. Neste estudo utilizou-se PMA e *S. cerevisiae*, com incubação de 20 minutos.

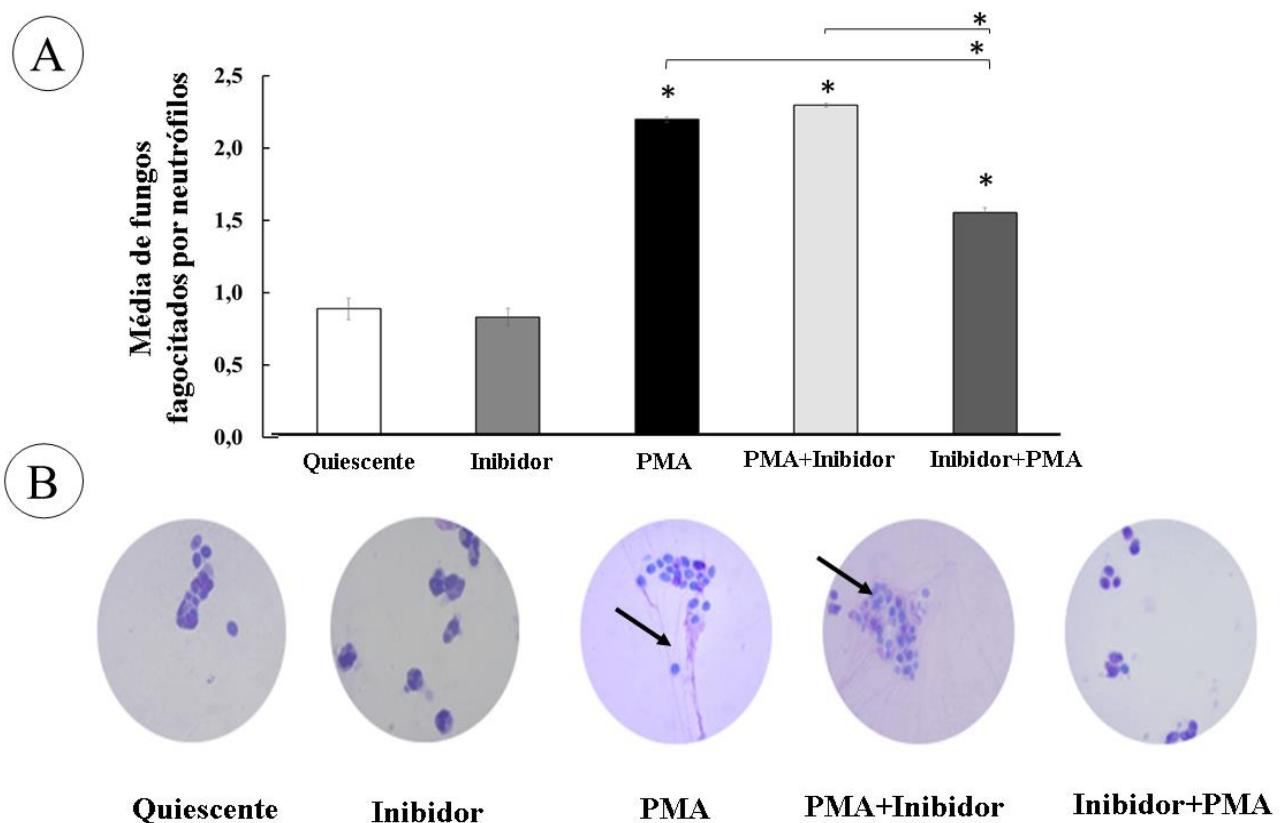


Figura 10. A- Teste de fagocitose de *S. cerevisiae* por polimornucleares incubados com PMA (100 nmol/L) e apocinina (300 μ mol/L) por 1 hora. A- Número médio de leveduras por neutrófilo. B- Imagens de microscopia óptica típicas do teste de

fagocitose representativa de 8 experimentos. * Difere estatisticamente do controle pelo teste T ($p < 0,05$).

5.5. A cinética de EROs regula o perfil de abundância das proteínas?

Na identificação das possíveis vias reguladas por um indutor de NETs e um inibidor da NADPH oxidase, foram identificados na análise proteômica *label-free*, 824 proteínas, dessas 268 foram reguladas (ANEXO B). As proteínas revelaram perfis de agrupamento distinto entre os grupos quiescente (Q), inibidor (I) e inibidor + PMA(IP) versus PMA (P) e PMA+ inibidor (PI) (Fig.11).

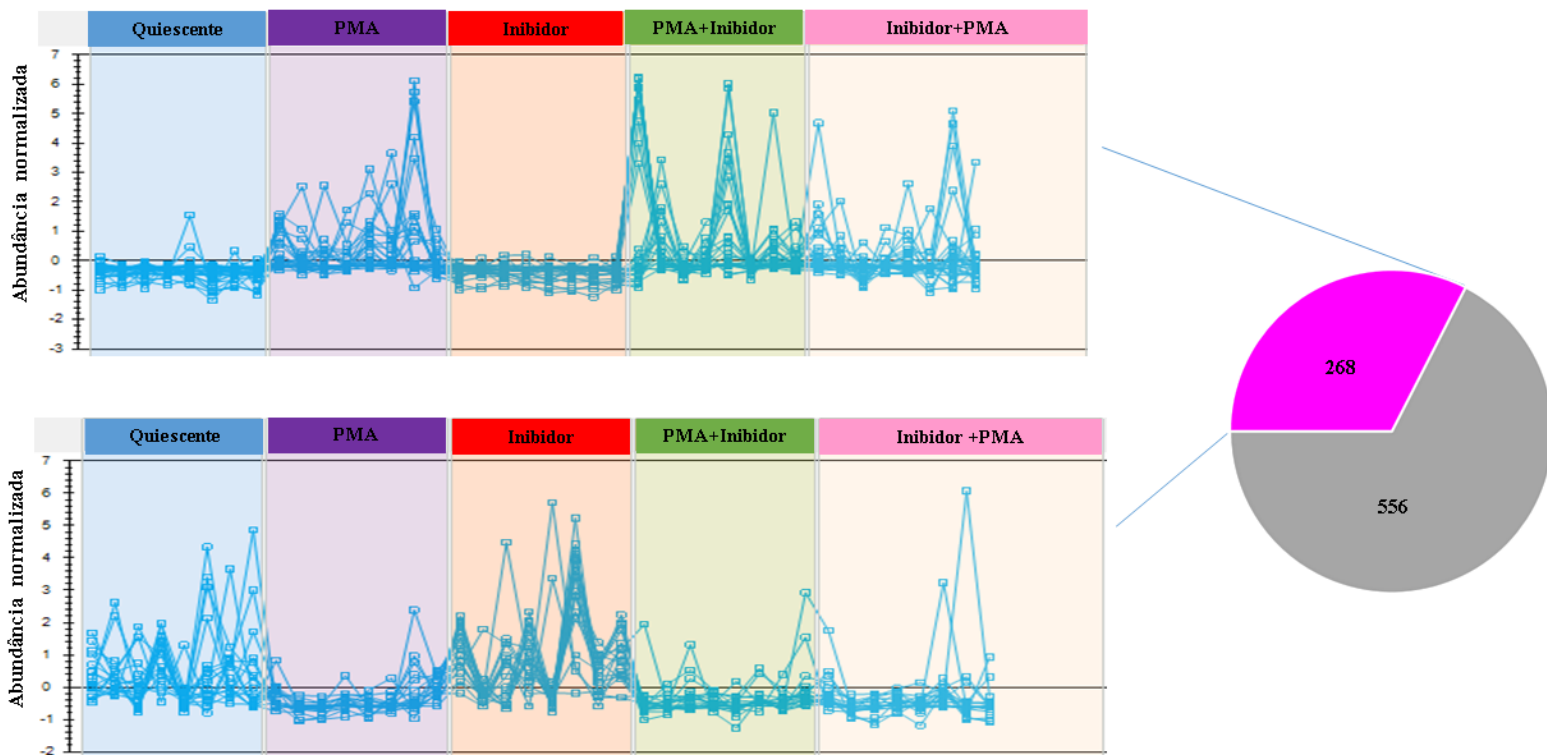


Figura 11. Perfil proteômico das 268 proteínas reguladas, dentre as 824 proteínas que foram identificadas, mostrando dois perfis distintos de abundância, com proteínas reguladas positivamente nos grupos P, PI e IP comparado aos grupos Q e I. Enquanto se observou perfis de proteínas reguladas positivamente entre os grupos Q, I e IP comparado aos grupos P e PI. Q: quiescente, I: Inibidor, P: PMA, PI: PMA+Inibidor, IP: Inibidor+PMA.

Análises realizadas no programa Progenesis. As 268 proteínas mostraram diferença no teste ANOVA $p \leq 0,05$ e fold change ≥ 2 .

Das 268 proteínas, foram verificadas 96 proteínas que apresentaram no mínimo dois peptídeos identificados (**ANEXO A**), as quais seguiram para as análises subsequentes.

5.6. Quais vias foram reguladas pela cinética de EROs?

O PMA é um forte ativador e regulou diversas vias dos neutrófilos, quando comparado ao quiescente, regulando 58 proteínas (**Fig.12**). Enquanto a comparação de quiescente versus inibidor apresentou menos proteínas reguladas que a comparação com PMA (**Fig.12**). Das 9 proteínas reguladas pelo inibidor 5 foram específicas (não foram reguladas em nenhuma outra comparação), sendo 4 reguladas positivamente e 1 regulada negativamente, enquanto o PMA possui 11 proteínas específicas, 3 reguladas positivamente e 7 reguladas negativamente (**Fig.13 C, D**). Ao associar o inibidor com o ativador, verificou-se que PMA compartilha mais proteínas reguladas com os grupos PI

e IP do que o inibidor com ambos. Enquanto PMA compartilha 66 proteínas com PI e IP, o inibidor possui 7 proteínas em comum. (Fig.13 C,D).

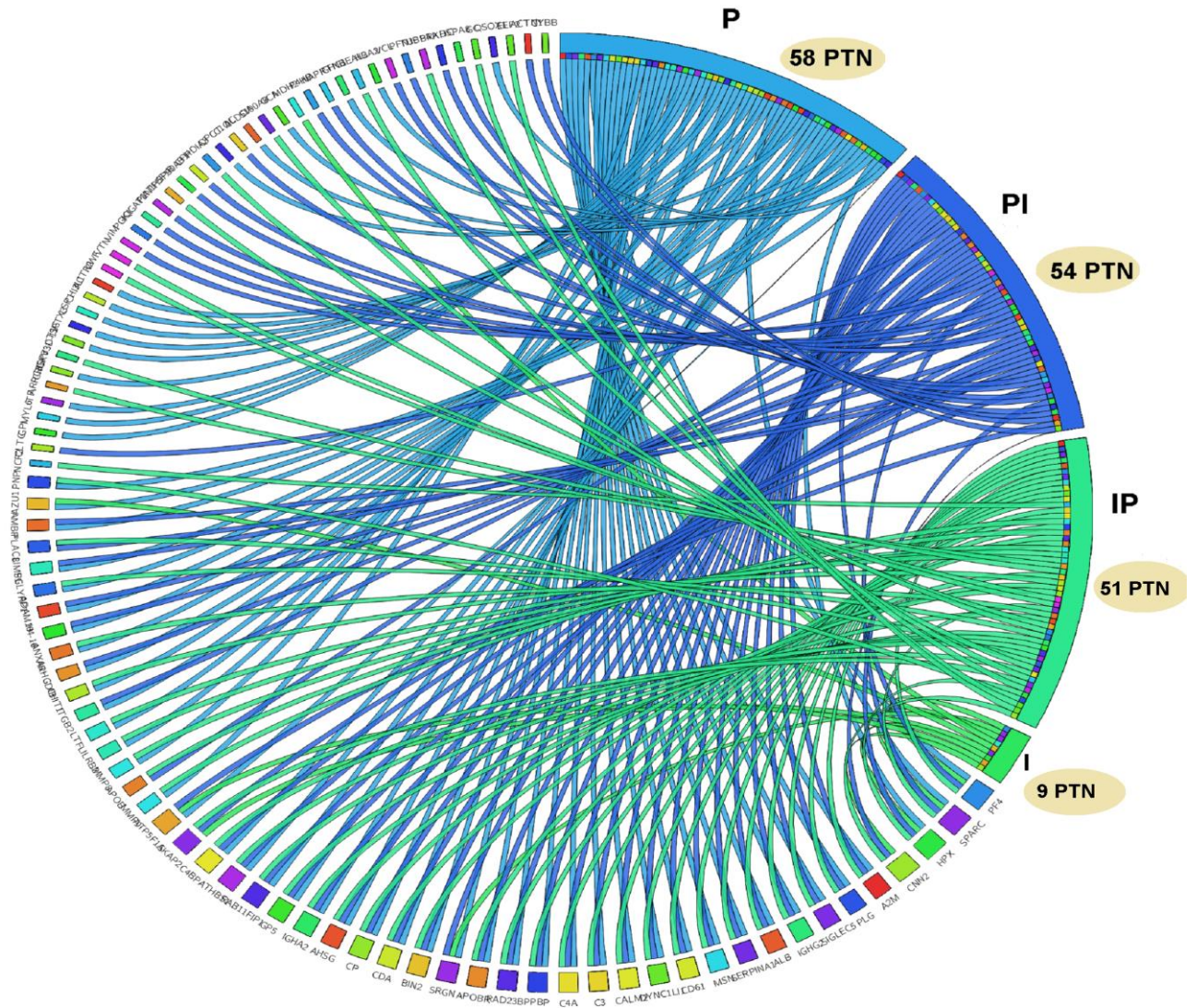


Figura 12. Diagrama de corda, mostrando as proteínas reguladas em cada grupo experimental comparado ao quiescente. P:PMA, PI: PMA+Inibidor, IP: Inibidor+PMA, I: Inibidor. Imagem gerada pelo programa Circus.

As proteínas foram classificadas por vias por meio do programa Panther, avaliando a sobreposição ao banco Reactome, bem como as interações entre as proteínas

foram analisadas pelo programa String. Dentre as vias enriquecidas no conjunto de proteínas reguladas, a ativação dos PMN mostrou associação com os processos de modificação pós-traducional, adesão e migração, degranulação, cascata de complemento, dentre outras (Fig.13A).

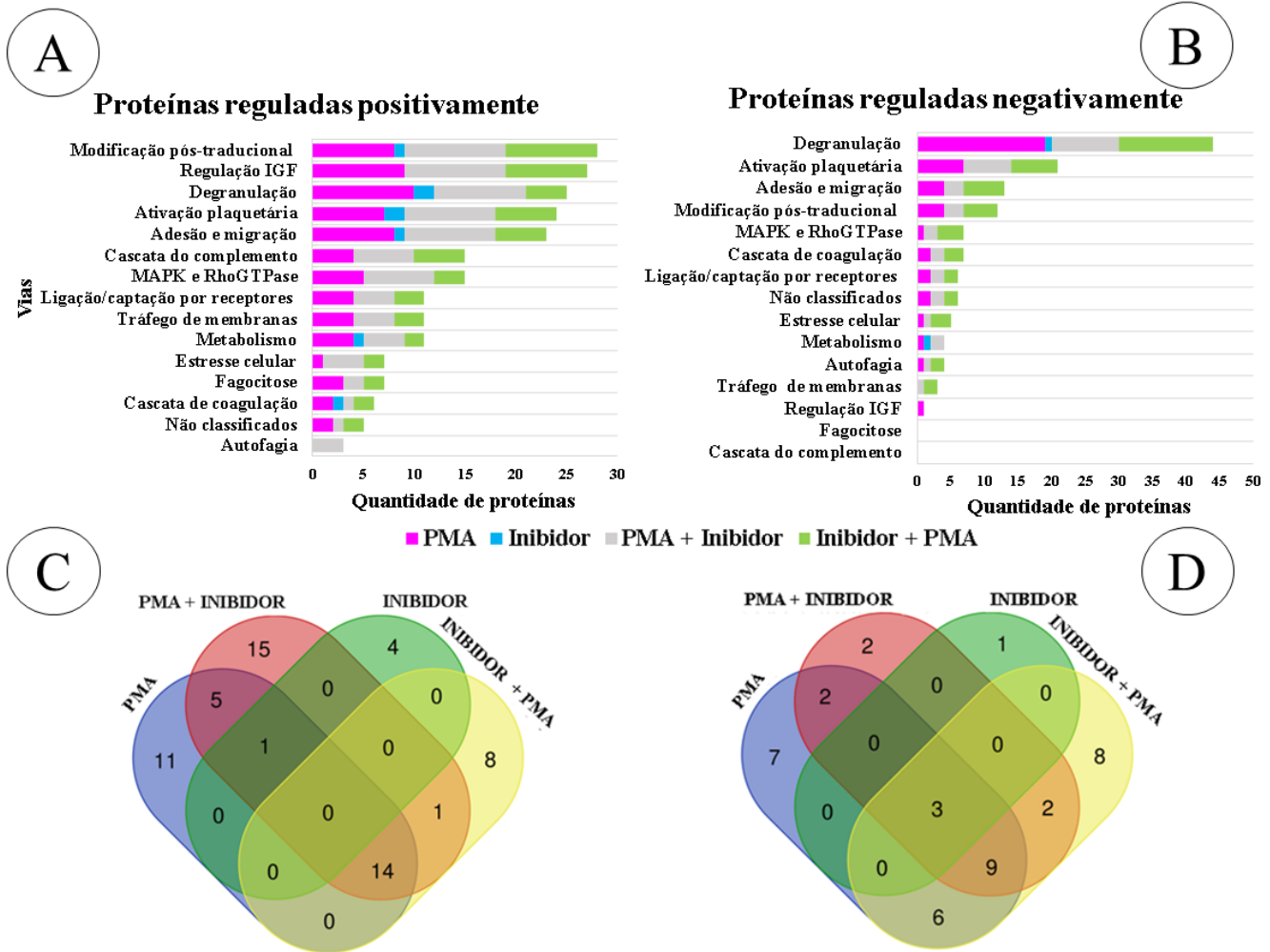


Figura 13. A, B. Agrupamento por vias das proteínas reguladas positivamente e negativamente em cada grupo experimental comparado ao quiescente conforme classificação no programam Panther com sobreposição do banco Reactoma. PMA: rosa, Inibidor: azul, PMA+Inibidor; cinza, Inibidor+PMA: verde. C, D. Diagrama de Venn mostrando a sobreposição das proteínas reguladas positivamente e negativamente em cada grupo experimental comparado ao quiescente. Diagrama gerado no site do Bioinformatics & Evolutionary Genomics.

Para a verificação do perfil de abundância entre grupos das proteínas, que foram classificadas por vias, foi utilizado o *fold change* entre as condições aos pares (ANEXO

C). Com o objetivo de entender as proteínas/vias que foram reguladas pela inibição de EROs, que possam ter relação com a formação de NETs, foram consideradas apenas as proteínas que foram reguladas pelo P em comparação a Q e avaliado seu comportamento em relação às condições I, PI e IP. Como os grupos PI e P não tiveram diferenças significativas entre si na formação de NETs, mas apresentaram diferença dos grupos Q, I e IP, foram consideradas as proteínas que tivessem o padrão de abundância $P \sim PI$ e diferentes significativamente dos grupos Q, I ou IP. Desta forma, foram consideradas as proteínas significativamente reguladas entre os grupos, PI versus IP, P versus IP e PI versus I (**Fig. 14**), e as proteínas reguladas entre Q versus PI, P versus I (**ANEXO C**).

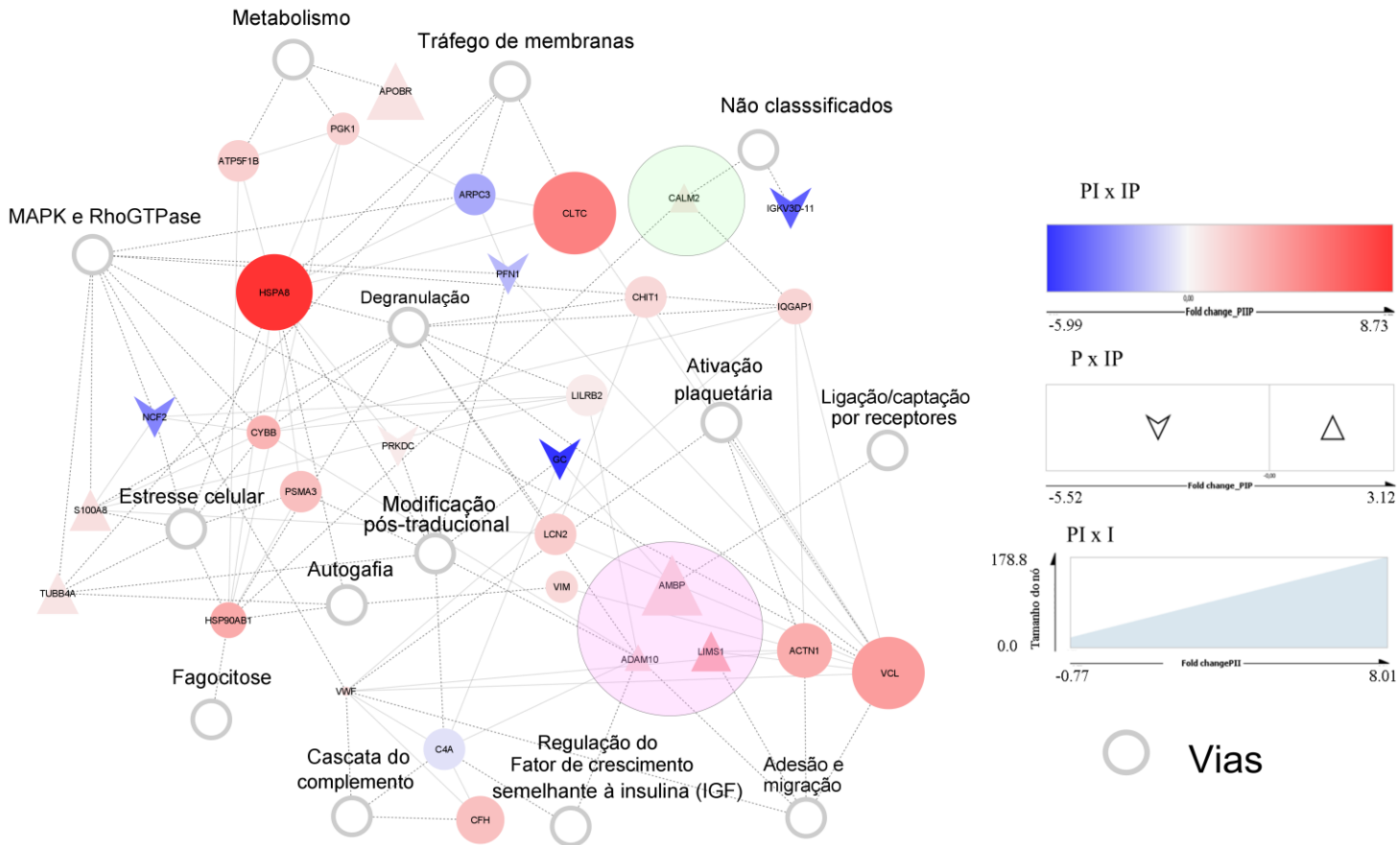


Figura 14. Agrupamento das proteínas por vias em neutrófilos ativados por PI: PMA + Inibidor, IP: Inibidor + PMA, P: PMA, PI: PMA+Inibidor, I: Inibidor. Tamanho do nó se refere ao fold change em PI x I, assim como a cor que representa o fold change das proteínas reguladas positivamente (vermelho) e negativamente (azul) em PI x IP e as setas representam fold change das proteínas reguladas em P x IP. As circunferências em cinza

representam as vias associadas às proteínas e os círculos rosa e verde representam proteínas que participam da dinâmica de actina e migração celular. As vias foram analisadas pelo programa Panther com sobreposição do banco Reactome e as interações por meio da plataforma String. Imagem produzida no programa Cytoscape. Fonte: autor

Dentre as proteínas, descontadas do controle versus P e PI e que foram diferentes entre os grupos PI e IP (**Fig.14**), as proteínas, Proteína 10 contendo o domínio desintegrina e metaloproteínase (ADAM10), alfa-1-microglobulina/bikunina precursor (AMBP) e LIM Zinc Finger domain containing 1 (LIMS1) apresentaram o perfil de abundância positivamente reguladas em P e PI e negativamente reguladas em Q, I e IP. Não foram observadas proteínas com regulação negativa entre os grupos P e PI e positivamente reguladas em Q, I e IP.

Para verificar a influência na redução de EROs, foi considerado o perfil de abundância de proteínas apresentada por P>PI>IP. Nesse perfil, foi encontrada somente a proteína calmodulina (CALM2) que, juntamente com ADAM10, AMBP e LIMS1, participam da dinâmica da actina e migração celular (Verploegen, Van Leeuwen, et al. 2002; Kadrmas e Beckerle 2004).

5.7. A regulação de EROs altera a migração celular?

A proteína LIMS1 pode participar da dinâmica da actina através da produção de EROs (Kadrmas e Beckerle 2004). Enquanto o silenciamento de ADAM10 prejudica a polimerização de actina (Pruessmeyer et al. 2014), a inibição de ADAM10 reduz ICAM-1, alterando a migração celular (Morsing et al. 2021). Enquanto AMBP1 atua como antioxidante, prevenindo a oxidação lipídica (Cederlund et al. 2015). Sabe-se que a polimerização da actina contribui para a formação das NETs estimulada por PMA (X. Wang et al. 2018; Metzler et al. 2014a), participando da primeira fase (60 minutos) (Neubert et al. 2018). Além disso, a inibição na produção de EROs previne a montagem da F-actina, alterando a dinâmica do citoesqueleto durante a formação das NETs, e esse processo parece envolver o processo de glutationilação (Stojkov et al. 2017b), porque EROs produzido pela NADPH oxidase interagem com grupos tióis, interferindo na função de diversas proteínas (Sies e Jones 2020).

A proteômica também mostrou uma regulação da CALM2 em neutrófilos $P > PI > IP > Q \sim I$ (**Fig.15**). Cálcio, que é um efetor de calmodulina, é importante para a formação das NETs (Van Der Linden et al. 2017), além disso, calmodulina participa na produção de EROs e migração de neutrófilos induzida por fMLP (Verploegen, van Leeuwen, et al. 2002). Este estudo demonstrou que a inibição da produção de EROs levou à redução de LIMS1, ADAM10, AMBP e calmodulina induzido por PMA.

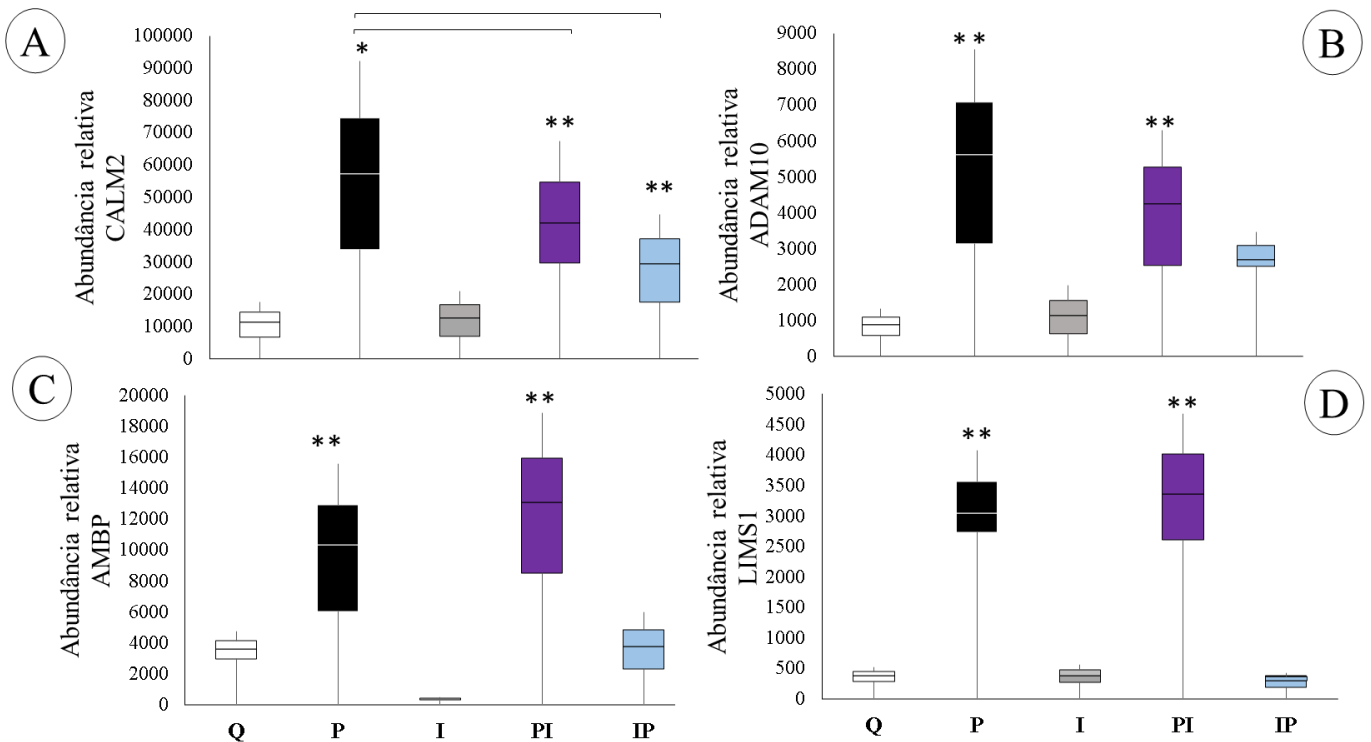


Figura 15. Abundância relativa das proteínas envolvidas na migração celular, entre os grupos Q: Quiescente, I: Inibidor, P: PMA, PI: PMA+Inibidor, IP: Inibidor+PMA. **A.** proteína com perfil de abundância $P > PI > IP > (Q \sim I)$ **B.C.D.** Proteínas com perfil de abundância $(P \sim PI) > (Q \sim I \sim IP)$. * Difere estatisticamente do quiescente e do inibidor teste T ($p < 0,05$). ** Difere estatisticamente do IP pelo teste T ($p < 0,05$). A barra mostra a diferença estatística entre o grupo P versus PI e PI versus IP ($p < 0,05$).

E ao analisar a função migratória dos PMN, PMA estimula a migração celular de neutrófilos em direção ao quimiotático fMLP, e o inibidor parece não impedir o processo, pois não alterou a cinética de migração no grupo PI em comparação ao P(**Fig.16**). Condizendo com a regulação positiva das proteínas LIMS1, ADAM10, AMBP (**Fig.15**) nesses grupos, o que sugere que essas proteínas devem participar do processo inicial da

migração, engatilhado pela produção de EROs e favorecendo a formação das NETs. Porém, ao analisar o grupo IP, parece haver um efeito sinérgico, por I (**Fig.16**), que amplia muito a resposta ao quimiotático, essa ativação posterior da migração no grupo IP, não se relacionou com a produção de EROs ou a formação das NETs. Apesar, desse resultado no grupo IP, essa resposta foi observada após a adição do PMA após 20 minutos de incubação com o I, desta forma, mesmo ocorrendo alterações posteriores a esses 20 minutos no perfil migratório, isso não foi capaz de aumentar a formação das NETs ou o padrão das proteínas citadas acima, durante os 60 minutos observados. Sugerindo, que as proteínas observadas são reguladas nos minutos iniciais, e que a migração tardia (depois de 20 minutos), é regulada por outras proteínas.

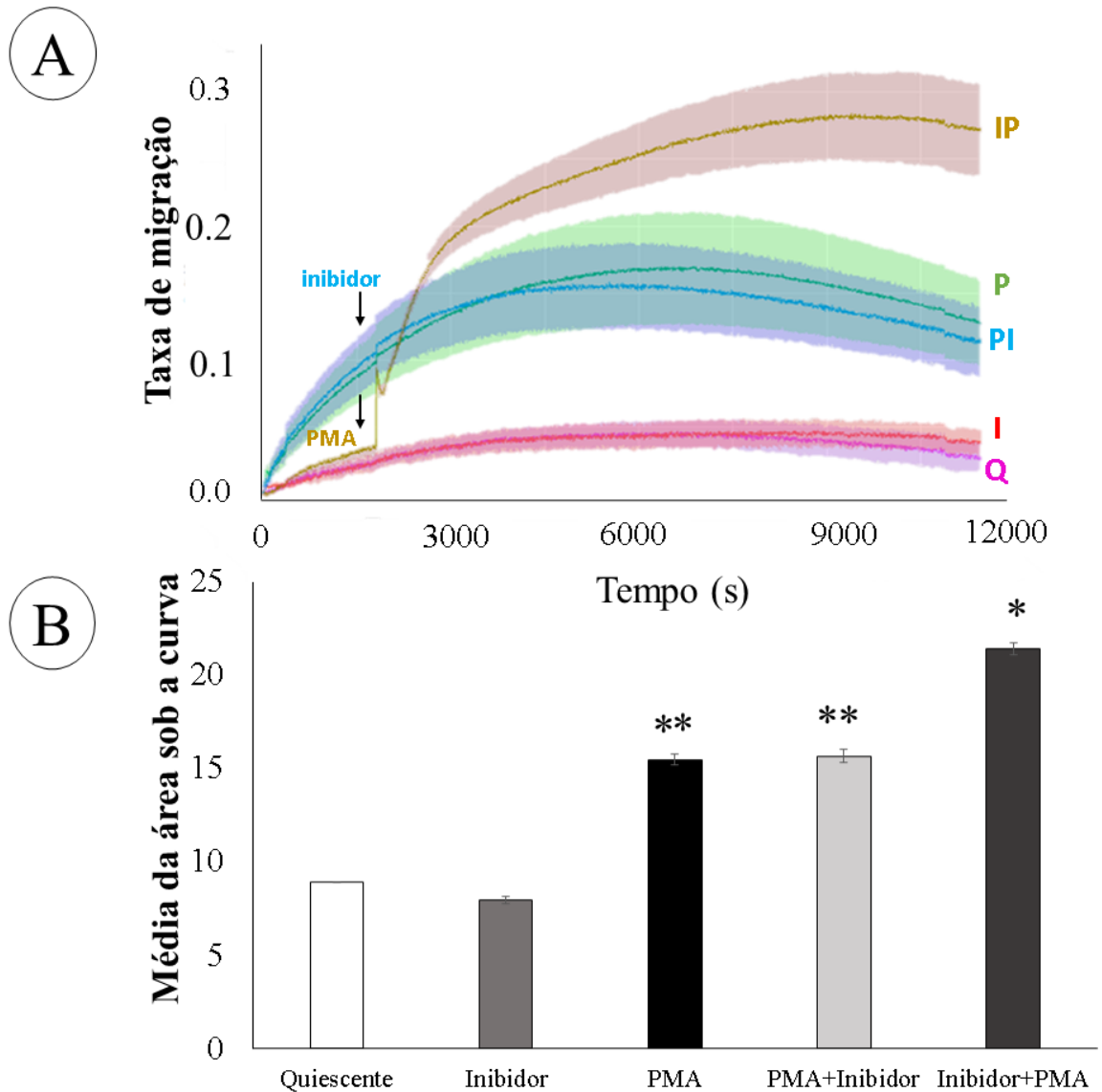


Figura 16. A. Cinética da taxa de migração de neutrófilos em cada grupo experimental durante 3 horas de ativação. Q: Quiescente, I: Inibidor, P: PMA, PI: PMA+Inibidor, IP: Inibidor+PMA. **B.** Média da área sob a curva da cinética da migração celular. * Difere estatisticamente dos grupos Q, I, P, PI pelo teste T ($p < 0,05$). ** Difere estatisticamente dos grupos Q, I, IP pelo teste T ($p < 0,05$).

Ao analisar as proteínas reguladas exclusivamente no grupo IP que foram diferentes do grupo Q, I, P e PI. De maneira interessante, foram encontradas as proteínas apolipoproteína (APOBR), p67phox (NCF2), vitronectina (VTN), tubulina (TUBB4),

calgranulina (S100A8) (**ANEXO C**). Chamando atenção a calgranulina, vitronectina e tubulina (**Fig.17**), as quais são intimamente ligadas à migração celular. A calgranulina pode ser fracamente secretada quando estimulada pelo PMA por meio da produção de EROs (Tardif et al. 2015). Além disso, a calgranulina participa da adesão e migração celular por meio da liberação de L-selectina e ativação da MAC-1, mas não altera a polimerização de actina (Ryckman et al. 2003). Enquanto, a vitronectina também atua na migração dos neutrófilos (Tsuruta et al. 2007; Zuchtriegel et al. 2021) e adesão por meio da ligação com a integrina (Hendey et al. 1996). A tubulina é uma proteína que compõe os microtúbulos, os quais não interferem na formação das NETs (Neubert et al. 2018) e, apesar de não ser necessária para a migração dependente da polimerização e despolimerização da actina (Kaverina e Straube 2011) nos primeiros 30 minutos após ativação (Stroka, Hayenga, e Aranda-Espinoza 2013), ela é importante para a polarização (Eddy, Pierini, e Maxfield 2002; Yoo et al. 2012), permitindo a eficiência e direcionamento da migração celular juntamente com a actina (Kaverina e Straube 2011).

De forma interessante, os resultados apresentados, mostraram que as proteínas relacionadas à polimerização da actina (CALM2, ADAM10, AMBP e LIMS1) foram negativamente reguladas no grupo IP, enquanto outras proteínas (VTN ↑, TUBB4 ↓, S100A8 ↓) foram exclusivamente reguladas nesse grupo (**Fig.17 A, C**). Porém, só a tubulina parece ter sua regulação contrária a resposta (Sobierajska et al. 2019; Yan et al. 2015), ou seja, a sua regulação negativa associada à intensificação da migração, como observado no estudo. Esses dados juntamente com os demais resultados apresentados, sugere que EROs regula a migração celular, por meio da polimerização da actina (Hattori, Subramanian, Sakai, e Luo 2010), e o aumento migratório no grupo IP comparado aos demais grupos, deve ter ocorrido pela maior atração dos neutrófilos ao quimioatraente, exercido pelos microtúbulos (Yoo et al. 2012) favorecido pelo método experimental, com o quimiotático (fMLP) na câmara debaixo do fluxo migratório. Porém, ao reduzir o burst respiratório, há a formação de múltiplos pseudópodes prejudicando o correto direcionamento dos neutrófilos que em vivo, prejudica a migração para o sítio inflamatório (Hattori, Subramanian, Sakai, Jia, et al. 2010).

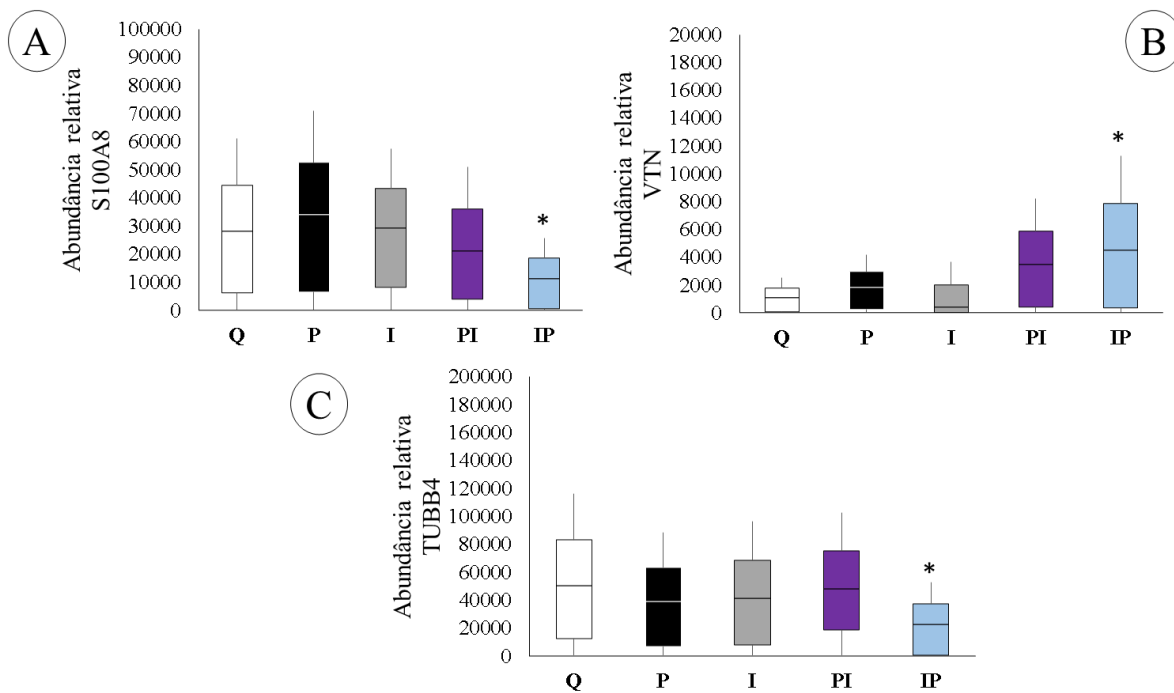


Figura 17. Abundância relativa das proteínas reguladas exclusivamente no grupo IP. Q: Quiescente, P:PMA, I:Inibidor, PI: PMA+Inibidor, IP: Inibidor +PMA. * Difere estatisticamente do Q, P, I e PI teste T ($p < 0,05$).

5.8. Cascata de complemento

Ao avaliar as proteínas que foram engatilhadas pelo PMA, no grupo IP, ou seja, proteínas que tiveram o perfil de abundância P~IP (**ANEXO C**) que foram diferentes entre os demais grupos, curiosamente, encontrou-se a proteína Complemento C4A(C4A). Já foi demonstrado que as células do sistema imune, como os neutrófilos produzem proteínas do sistema complemento (Lubbers et al. 2017). Embora só o complemento 3 (C3), e os fatores de complemento B e P (CFB e CFP) tenham sido previamente detectados como liberados por neutrófilos (Yuen et al. 2016), este estudo comprova a presença de outras proteínas dessa via em PMN. Cadeia alfa da proteína de ligação C4b (C4BPA), Complemento C4A(C4A) e Complemento C3 (C3) estão reguladas positivamente em P, PI e IP comparados a Q (**Fig.17**), sendo que C4A foi maior em IP comparado a PI(**Fig.13**).

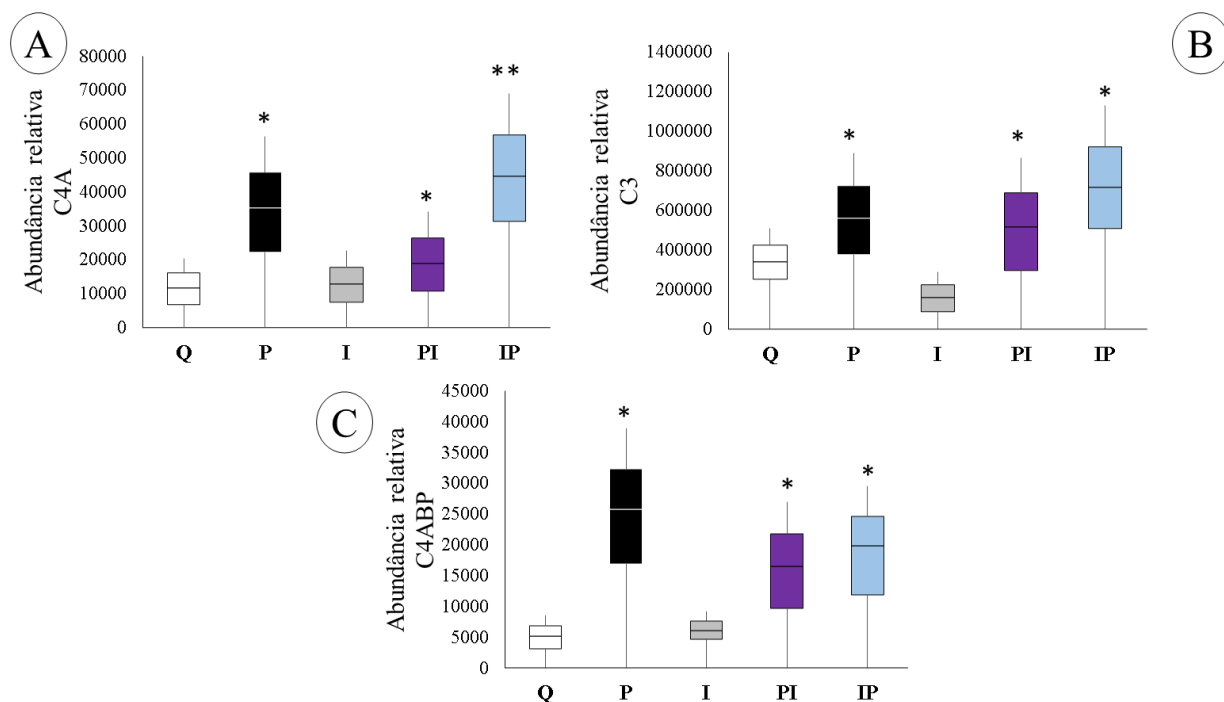


Figura 18. Abundância relativa das proteínas associadas ao sistema complemento que foram diferentes em comparação ao grupo quiescente. Q: Quiescente, P:PMA, I:Inibidor, PI: PMA+Inibidor, IP: Inibidor +PMA. * Difere estatisticamente do quiescente teste T ($p < 0,05$). ** Difere estatisticamente do PI ($p < 0,05$)

Embora, C4BP e C3 não estejam relacionados com a formação das NETs, já que não houve diferença entre P e/ou PI com IP, houve sobreposição do perfil de abundância de C4A com o perfil produção de EROs e formação das NETs. A cascata de complemento já foi citada por poder participar na liberação das NETs, bem como, por ser ativada por NETs (de Bont, Boelens, e Pruijn 2019)

Proteínas do sistema complemento são secretadas com NETs e, por outro lado, a opsonização de bactérias com complemento induz uma NETose muito mais potente (Yuen et al. 2016). As proteínas C4A, C4BP e C3 participam da via clássica do sistema complemento, que pode ativar C9 levando à formação de poros na membrana, induzindo a lise celular (Morgan 2016). C4 tem sido citado por participar em várias doenças autoimunes, com uma diferença entre C4a e C4b (N. Li et al. 2017). Desta forma, sugere-se que a proteína do sistema complemento C4A, detectada pela primeira vez em PMNs, pode participar na formação das NETs, o que pode favorecer a lise celular e/ou gerar retroalimentação positiva na formação das NETs, porém é necessário verificar se sua

atuação seria intracelular ou se neutrófilos realmente liberam essas proteínas e confirmar a atuação delas em NETs.

6. CONCLUSÃO

PMA é um potente ativador da produção de EROS e NETs, enquanto a inibição de NADPH oxidase antes do estímulo previne produção de NETs, porém isso não ocorre com a inibição após estímulo.

Portanto, com base nos resultados deste estudo, propõe-se que o pico inicial da produção de EROs, que ocorre até os 20 minutos após ativação, é suficiente para regular o perfil de abundância de proteínas e engatilhar a formação das NETs, aprimorando também o aprisionamento de microrganismos pelos PMN, como consequência da liberação das NETs. Além disso, a formação das NETs aparentemente, ocorre através da regulação da dinâmica do citoesqueleto com a participação da LIMS, ADAM10, AMBP e calmodulina, e essa regulação altera a migração celular no momento inicial (20 minutos iniciais). Outras proteínas, como a tubulina e vitronectina podem contribuir para a migração celular tardia (após 20 min.), sem associação com a formação das NETs. Além disso, dois componentes do sistema complemento foram identificados pela primeira vez em PMNs e sugere-se que haja correlação com a produção de EROs e formação das NETs. Porém, são necessários mais estudos para confirmar a associação dessas vias com a formação de NETs na fase inicial.

O estudo apresentou limitações em relação ao método de cinética de EROs, o qual detectou apenas superóxido, bem como a interrupção na curva de PI e IP para adição do segundo modulador (realizada também no ensaio de migração). Além disso, o tempo da cinética de EROs foi realizado durante 60 minutos, não sendo verificado qual o tempo máximo da produção.

7. PERSPECTIVAS

Para desenvolvimento de trabalhos futuros, o presente estudo propõe:

- Ensaios que confirmem a liberação de proteínas do sistema complemento por neutrófilos e a relação de cada uma delas com a formação de NETs ou sua ação nas NETs liberadas.

- Ensaio de inibição das proteínas de polimerização da actina e sua interferência durante a fase inicial de produção de NETs, detalhando correlações entre alterações de citoesqueleto, produção de NETs e migração de neutrófilos.
- Ensaio de cinética de produção de ROS com um tempo superior a 60 minutos, verificando o possível aumento de EROs na ativação após inibição, bem como as possíveis vias reversíveis.
- Ensaio para detalhar as vias relacionadas à migração tardia, e a dependência da sua ativação em relação a inibição de EROS.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ackermann, Maximilian, Hans Joachim Anders, Rostyslav Bilyy, Gary L. Bowlin, Christoph Daniel, Rebecca De Lorenzo, Mikala Egeblad, et al. 2021. “Patients with COVID-19: in the dark-NETs of neutrophils”. *Cell Death and Differentiation*. Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/s41418-021-00805-z>.
- Akong-Moore, Kathryn, Ohn A. Chow, Maren von Köckritz-Blickwede, e Victor Nizet. 2012. “Influences of chloride and hypochlorite on neutrophil extracellular trap formation”. *PLoS ONE* 7 (8): 2005–7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042984>.
- Al-Khafaji, Ahmed B, e Samer Tohme. 2016. “Superoxide Induces Neutrophil Extracellular Trap Formation in a TLR-4 and NOX-Dependent Mechanism”. *Molecular Medicine* 22 (1): 1. <https://doi.org/10.2119/molmed.2016.00054>.
- Alam, C. A.S., M. P. Seed, C. Freemantle, J. Brown, M. Perretti, M. Carrier, A. Divwedi, et al. 2005. “The inhibition of neutrophil-endothelial cell adhesion by hyaluronan independent of CD44”. *Inflammopharmacology* 12 (5–6): 535–50. <https://doi.org/10.1163/156856005774382733>.
- Almeida, Ana Carolina de, Maria Marluce dos Santos Vilela, Antonio Condino-Neto, e Valdecir F. Ximenes. 2012. “The Importance of Myeloperoxidase in Apocynin-Mediated NADPH Oxidase Inhibition”. *ISRN Inflammation*, 1–7. <https://doi.org/10.5402/2012/260453>.
- Ambruso, Daniel R., Nancy Cusack, e Gail Thurman. 2004. “NADPH oxidase activity of neutrophil specific granules: Requirements for cytosolic components and evidence of assembly during cell activation”. *Molecular Genetics and Metabolism* 81 (4): 313–21. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2004.01.009>.

- Aquino, Elaine N, Anne C.D. Neves, Karina C. Santos, Carlos E. Uribe, Paulo E.N. Souza, José R. Correa, Mariana S. Castro, e Wagner Fontes. 2016. “Proteomic Analysis of Neutrophil Priming by PAF”. *Protein & Peptide Letters* 23 (2): 142–51. <https://doi.org/10.2174/0929866523666151202210604>.
- Arita, Kyouhei, Toshiyuki Shimizu, Hiroshi Hashimoto, Yuji Hidaka, Michiyuki Yamada, e Mamoru Sato. 2006. “Structural basis for histone N-terminal recognition by human peptidylarginine deiminase 4”. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (14): 5291–96. <https://doi.org/10.1073/pnas.0509639103>.
- Arumugam, Suyavaran, Kesthuru Girish Subbiah, Kempaiah Kemparaju, e Chinnasamy Thirunavukkarasu. 2017. “Neutrophil extracellular traps in acrolein promoted hepatic ischemia reperfusion injury: Therapeutic potential of NOX2 and p38MAPK inhibitors”. *Journal of Cellular Physiology* 233 (4): 3244–61. <https://doi.org/10.1002/jcp.26167>.
- Avdi, Natalie J., Brent W. Winston, Marijane Russel, Scott K. Young, Gary L. Johnson, e G. Scott Worthent. 1996. “Activation of MEKK by formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine in human neutrophils: Mapping pathways for mitogen-activated protein kinase activation”. *Journal of Biological Chemistry* 271 (52): 33598–606. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.52.33598>.
- Azevedo, Estefania P., Natalia C. Rochael, Anderson B. Guimarães-Costa, Thiago S. De Souza-Vieira, Juliana Ganilho, Elvira M. Saraiva, Fernando L. Palhano, e Debora Foguel. 2015. “A metabolic shift toward pentose phosphate pathway is necessary for amyloid fibril- and phorbol 12-myristate 13-Acetate-induced neutrophil extracellular trap (NET) formation”. *Journal of Biological Chemistry* 290 (36): 22174–83. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.640094>.
- Barbieri, Silvia S.; Viviana; Cavalca, Sonia; Eligini, Marta; Brambiella, Alessia; Caiani, Elena; Tremole, e Susanna Colli. 2004. “APOCYNIN PREVENTS CYCLOOXYGENASE 2 EXPRESSION IN HUMAN MONOCYTES THROUGH NADPH OXIDASE AND GLUTATHIONE REDOX-DEPENDENT MECHANISMS SILVIA”. *Free Radical Biology & Medicine* 37 (2): 156–65. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2004.04.020>.
- Barbieri, Silvia S.; Viviana; Cavalca, Sonia; Eligini, Marta; Brambilla, Alessia; Caiani, Elena Tremoli, e Susanna Colli. 2004. “Apocynin prevents cyclooxygenase 2 expression in human monocytes through NADPH oxidase and glutathione redox-dependent mechanisms”. *Free Radical Biology and Medicine* 37 (2): 156–65. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2004.04.020>.
- Bedard, Karen, e Karl Heinz Krause. 2007. “The NOX family of ROS-generating NADPH

- oxidases: Physiology and pathophysiology”. *Physiological Reviews*.
<https://doi.org/10.1152/physrev.00044.2005>.
- Belambri, Sahra A., Loïc Rolas, Houssam Raad, Margarita Hurtado-Nedelec, Pham My Chan Dang, e Jamel El-Benna. 2018. “NADPH oxidase activation in neutrophils: Role of the phosphorylation of its subunits”. *European Journal of Clinical Investigation* 48 (January): 1–9. <https://doi.org/10.1111/eci.12951>.
- Bengtsson, Torbjörn, Kristina Orselius, e Jonas Wetterö. 2006. “Role of the actin cytoskeleton during respiratory burst in chemoattractant-stimulated neutrophils”. *Cell Biology International* 30 (2): 154–63. <https://doi.org/10.1016/j.cellbi.2005.10.017>.
- Bertram, Anna, e Klaus Ley. 2011. “Protein Kinase C Isoforms in Neutrophil Adhesion and Activation”. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis* 59 (2): 79–87. <https://doi.org/10.1007/s00005-011-0112-7>.
- Björnsdóttir, Halla, Daniel Granfeldt, Amanda Welin, Johan Bylund, e Anna Karlsson. 2013. “Inhibition of phospholipase A2 abrogates intracellular processing of NADPH-oxidase derived reactive oxygen species in human neutrophils”. *Experimental Cell Research* 319 (5): 761–74. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2012.12.020>.
- Björnsdóttir, Halla, Amanda Welin, Erik Michaëlsson, Veronica Osla, Stefan Berg, Karin Christenson, Martina Sundqvist, Claes Dahlgren, Anna Karlsson, e Johan Bylund. 2015. “Neutrophil NET formation is regulated from the inside by myeloperoxidase-processed reactive oxygen species”. *Free Radical Biology and Medicine* 89 (dezembro): 1024–35. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.10.398>.
- Bont, Cynthia M. de, Wilbert C. Boelens, e Ger J.M. Pruijn. 2019. “NETosis, complement, and coagulation: a triangular relationship”. *Cellular and Molecular Immunology*. <https://doi.org/10.1038/s41423-018-0024-0>.
- Bont, Cynthia M. de, Werner J.H. Koopman, Wilbert C. Boelens, e Ger J.M. Pruijn. 2018a. “Stimulus-dependent chromatin dynamics, citrullination, calcium signalling and ROS production during NET formation”. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* 1865 (11): 1621–29. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2018.08.014>.
- Borregaard, By Niels, Maxwell Sehested, Boye S Nielsen, Henrik Sengelov, e Lars Kjeldsen. 1995. “Biosynthesis of Granule Proteins in Normal Human Bone Marrow Cells. Gelatinase Is a Marker of Terminal Neutrophil Differentiation”. *Blood* 85 (3): 812–17. <https://doi.org/10.12968/bjon.2010.19.7.47432>.
- Borregaard, N.; L. J; Miller, e T. A Springer. 1987. “Chemoattractant-regulated mobilization of

- a novel intracellular compartment in human neutrophils”. *Science* 237 (4819): 1204–6. <https://doi.org/10.1126/science.3629236>.
- Borregaard, Niels, Lars Kjeldsen, Kare Rygaard, Lone Bastholm, Morten H Nielsen, Henrik Sengelev, Ole W Bjerrum, e Anders H Johnsen. 1992. “Stimulus-dependent secretion of plasma proteins from human neutrophils”. *Journal of Clinical Investigation* 90: 86–96.
- Bouin, Anne Pascale, Nathalie Grandvaux, Pierre V Vignais, e Alexandra Fuchs. 1998. “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”. *Journal of Biological Chemistry* 273 (46): 30097–103. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.46.30097>.
- Boussetta, Tarek, Marie-Anne Gougerot-Pocidallo, Gilles Hayem, Silvia Ciappelloni, Houssam Raad, Riad Arabi Derkawi, Odile Bournier, et al. 2010. “The prolyl isomerase Pin1 acts as a novel molecular switch for TNF-alpha-induced priming of the NADPH oxidase in human neutrophils.” *Blood* 116 (26): 5795–5802. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-03-273094>.
- Branzk, Nora, Aleksandra Lubojemska, Sarah E Hardison, Qian Wang, G Maximiliano, Gordon D Brown, e Venizelos Papayannopoulos. 2014. “Funders Group Neutrophils sense microbial size and selectively release neutrophil extracellular traps in response to large pathogens”. *Nat Immunol.* 15 (11): 1017–25. <https://doi.org/10.1038/ni.2987>.Neutrophils.
- Bréchar, Sabrina, Sébastien Plançon, e Eric J. Tschirhart. 2013. “New Insights into the Regulation of Neutrophil NADPH Oxidase Activity in the Phagosome: A Focus on the Role of Lipid and Ca²⁺ Signaling”. *Antioxidants & Redox Signaling* 18 (6): 661–76. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.4773>.
- Briggs, Richard T., David B. Drath, Manfred L. Karnovsky, e Morris J. Karnovsky. 1975. “Localization of NADH oxidase on the surface of human polymorphonuclear leukocytes by a new cytochemical method”. *Journal of Cell Biology* 67 (3): 566–86. <https://doi.org/10.1083/jcb.67.3.566>.
- Brinkmann, Volker;, Ulrike; Reichard, Christian; Goosmann, Beatrix; Fauler, Yvonne; Uhlemann, David S; Weiss, Yvette; Weinrauch, e Arturo Zychlinsky. 2004. “Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria”. *Science* 303 (5663): 1532–35.
- Brinkmann, Volker. 2018. “Neutrophil Extracellular Traps in the Second Decade Structure and Generation of Neutrophil Extracellular Traps”. *J Innate Immun* 10: 414–21. <https://doi.org/10.1159/000489829>.
- Brinkmann, Volker, Ulrike Reichard, Christian Goosmann, Beatrix Fauler, Yvonne Uhlemann,

- David S. Weiss, Yvette Weinrauch, e Arturo Zychlinsky. 2004. “Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria”. *Science* 303 (5663): 1532–35. <https://doi.org/10.1126/science.1092385>.
- Bylund, Johan, Kelly L. Brown, Charlotta Movitz, Claes Dahlgren, e Anna Karlsson. 2010. “Intracellular generation of superoxide by the phagocyte NADPH oxidase: How, where, and what for?” *Free Radical Biology and Medicine*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.09.016>.
- Campos, V, R. C.N. Melo, L P Silva, E N Aquino, M. S. Castro, e W Fontes. 2014. “Characterization of neutrophil adhesion to different titanium surfaces”. *Bulletin of Materials Science* 37 (1): 157–66. <https://doi.org/10.1007/s12034-014-0611-3>.
- Cano, Patricia M., Amandine Vargas, e Jean Pierre Lavoie. 2016. “A real-time assay for neutrophil Chemotaxis”. *BioTechniques* 60 (5): 245–51. <https://doi.org/10.2144/000114416>.
- Capsoni, F., A. M. Ongari, E. Reali, F. Bosè, e G F Altomare. 2012. “The protein kinase c inhibitor aeb071 (sotrastaurin) modulates migration and superoxide anion production by human neutrophils in vitro”. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology* 25 (3): 617–26. <https://doi.org/10.1177/039463201202500308>.
- Carvalho, Leonardo Olivieri, Elaine Nascimento Aquino, Anne Caroline Dias Neves, e Wagner Fontes. 2015. “The Neutrophil Nucleus and Its Role in Neutrophilic Function”. *Journal of Cellular Biochemistry* 116 (9): 1831–36. <https://doi.org/10.1002/jcb.25124>.
- Castro, M.S. De, W. Fontes, L. Morhy, e C. Bloch Jr. 1996. “Complete amino acid sequences of two γ -thionins from maize (*Zea mays* L.) seeds”. *Protein and Peptide Letters* 3 (4).
- Cederlund, Martin, Adnan Deronic, Jan Pallon, Ole E. Sørensen, e Bo Åkerström. 2015. “A1M/ α 1-microglobulin is proteolytically activated by myeloperoxidase, binds its heme group and inhibits low density lipoprotein oxidation”. *Frontiers in Physiology* 6 (FEB): 11. <https://doi.org/10.3389/FPHYS.2015.00011/BIBTEX>.
- Chandasana, Hardik, Yashpal S. Chhonker, Veenu Bala, Yarra D. Prasad, Telaprolu K. Chaitanya, Vishnu L. Sharma, e Rabi S. Bhatta. 2015. “Pharmacokinetic, bioavailability, metabolism and plasma protein binding evaluation of NADPH-oxidase inhibitor apocynin using LC-MS/MS”. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 985: 180–88. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2015.01.025>.
- Chapman, Elinor A., Max Lyon, Deborah Simpson, David Mason, Robert J. Beynon, Robert J. Moots, e Helen L. Wright. 2019. “Caught in a trap? Proteomic analysis of neutrophil

- extracellular traps in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus”. *Frontiers in Immunology* 10 (MAR). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00423>.
- Chatfield, Simon M., Kathrin Grebe, Lachlan W Whitehead, Kelly L. Rogers, Thomas Nebl, James M Murphy, e Ian P. Wicks. 2018. “Monosodium Urate Crystals Generate Nuclease-Resistant Neutrophil Extracellular Traps via a Distinct Molecular Pathway”. *The Journal of Immunology* 200: 1801–16. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1701382>.
- Chen, Kaiwen W, Mercedes Monteleone, Dave Boucher, Gabriel Sollberger, Divya Ramnath, Nicholas D. Condon, Jessica B. von Pein, Petr Broz, Matthew J. Sweet, e Kate Schroder. 2018. “Noncanonical inflammasome signaling elicits gasdermin D-dependent neutrophil extracellular traps”. *Science Immunology* 3 (26): 1–11. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.aar6676>.
- Chiang, Chi Huei, Chiao Hui Chuang, e Shiou Ling Liu. 2011. “Apocynin attenuates ischemia-reperfusion lung injury in an isolated and perfused rat lung model”. *Translational Research* 158 (1): 17–29. <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2011.02.002>.
- Clos, Terry W. Du. 2013. “Pentraxins: Structure, Function, and Role in Inflammation”. *ISRN Inflammation*, 1–22. <https://doi.org/10.1155/2013/379040>.
- Coletta, Amanda Manoel Della, Tatiana Fernanda Bachiega, Juliana Carvalho de Quaglia e Silva, Ângela Maria Victoriano de Campos Soares, Julio De Faveri, Silvio Alencar Marques, Mariângela Esther Alencar Marques, Valdecir Farias Ximenes, e Luciane Alarcão Dias-Melicio. 2015. “Neutrophil Extracellular Traps Identification in Tegumentary Lesions of Patients with Paracoccidioidomycosis and Different Patterns of NETs Generation In Vitro”. Organizado por Joseph M. Vinetz. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 9 (9): e0004037. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004037>.
- Cowland, Jack B., e Niels Borregaard. 2016. “Granulopoiesis and granules of human neutrophils”. *Immunological Reviews* 273 (1): 11–28. <https://doi.org/10.1111/imr.12440>.
- Croft, David, Antonio Fabregat Mundo, Robin Haw, Marija Milacic, Joel Weiser, Guanming Wu, Michael Caudy, et al. 2014. “The Reactome pathway knowledgebase”. *Nucleic Acids Research* 42 (D1): 472–77. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1102>.
- Cross, A. L., J. Hawkes, H. L. Wright, R. J. Moots, e S. W. Edwards. 2020. “APPA (apocynin and paeonol) modulates pathological aspects of human neutrophil function, without supressing antimicrobial ability, and inhibits TNF α expression and signalling”. *Inflammopharmacology* 28 (5): 1223–35. <https://doi.org/10.1007/s10787-020-00715-5>.
- Cross, A. R., Jennifer L Yarchover, e J. T. Curnutte. 1994. “The superoxide-generating system of

- human neutrophils possesses a novel diaphorase activity. Evidence for distinct regulation of electron flow within NADPH oxidase by p67-phox and p47-phox". *Journal of Biological Chemistry* 269 (34): 21448–54.
- Dang, Pham My Chan, Andrew R Cross, Mark T Quinn, e Bernard M Babior. 2002. "Assembly of the neutrophil respiratory burst oxidase: A direct interaction between p67PHOX and cytochrome b558 II". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (7): 4262–65. <https://doi.org/10.1073/pnas.072345299>.
- Dang, Pham My Chan, Françoise Morel, Marie Anne Gougerot-Pocidallo, e Jamel El Benna. 2003. "Phosphorylation of the NADPH oxidase component p67PHOX by ERK2 and P38MAPK: Selectivity of phosphorylated sites and existence of an intramolecular regulatory domain in the tetratricopeptide-rich region". *Biochemistry* 42 (15): 4520–26. <https://doi.org/10.1021/bi0205754>.
- Dang, Pham My Chan, Houssam Raad, Riad Arabi Derkawi, Tarek Boussetta, Marie H elne Pacllet, Sahra Amel Belambri, Karama Makni-Maalej, et al. 2011. "The NADPH oxidase cytosolic component p67phox is constitutively phosphorylated in human neutrophils: Regulation by a protein tyrosine kinase, MEK1/2 and phosphatases 1/2A". *Biochemical Pharmacology* 82 (9): 1145–52. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2011.07.070>.
- Dang, Pham My Chan, Allan Stensballe, Tarek Boussetta, Houssam Raad, Cedric Dewas, Yolande Kroviarski, Gilles Hayem, Ole N. Jensen, Marie Anne Gougerot-Pocidallo, e Jamel El-Benna. 2006. "A specific p47phox-serine phosphorylated by convergent MAPKs mediates neutrophil NADPH oxidase priming at inflammatory sites". *Journal of Clinical Investigation* 116 (7): 2033–43. <https://doi.org/10.1172/JCI27544>.
- Davies, Michael J. 2016. "Detection and characterisation of radicals using electron paramagnetic resonance (EPR) spin trapping and related methods". *Methods*. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2016.05.013>.
- DeCoursey, T. E., e E. Ligeti. 2005. "Regulation and termination of NADPH oxidase activity". *Cellular and Molecular Life Sciences* 62 (19–20): 2173–93. <https://doi.org/10.1007/s00018-005-5177-1>.
- Dekker, Lodewijk V., Michael Leitges, Gabriel Altshuler, Nishil Mistry, Aileen Mcdermott, Jurgen Roes, e Anthony W. Segal. 2000. "Protein kinase C-β contributes to NADPH oxidase activation in neutrophils". *Biochemical Journal*. <https://doi.org/10.1042/bj3470285>.
- DeLeo, F R, L A Allen, M Apicella, W M Nauseef, Battouli Saïd-Salim, Stephen F. Porcella, R. Daniel Long, et al. 1999a. "NADPH oxidase activation and assembly during phagocytosis."

Journal of immunology 163 (12): 6732–40. https://doi.org/ji_v163n12p6732 [pii].

- Delgado-Rizo, Vidal, Marcos A; Martínez-Guzmán, Liliana; Iñiguez-Gutierrez, Alejandra; Garcia-Orozco, Anabell; Alvarado-Navarro, e Mary Fafutis-Morris. 2017. “Neutrophil Extracellular Traps and Its Implications in Inflammation: An Overview”. *Frontiers in Immunology* 8: 1–20. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00081>.
- Delves, Peter J; Roitt, Ivan M. 2000. “First of Two Parts THREE LEVELS OF DEFENSE”. *The New England Journal of Medicine* 343 (1): 37–49.
- DeSouza-Vieira, Thiago, Anderson Guimarães-Costa, Natalia C. Rochael, Maria N. Lira, Michelle T. Nascimento, Phillipe de Souza Lima-Gomez, Rafael M. Mariante, Pedro M. Persechini, e Elvira M. Saraiva. 2016. “Neutrophil extracellular traps release induced by Leishmania : role of PI3K γ , ERK, PI3K σ , PKC, and [Ca²⁺]”. *Journal of Leukocyte Biology* 100 (4): 801–10. <https://doi.org/10.1189/jlb.4a0615-261rr>.
- Dikalov, Sergey I.; Igor A.; Kirilyuk, Maxim; Voinov, e Igor A. Grigor. 2011. “EPR Detection of Cellular and Mitochondrial Superoxide Using Cyclic Hydroxylamines”. *Free Radical Research* 45 (4): 417–30. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2013.08.045>.The.
- Douda, David Nobuhiro, Meraj A. Khan, Hartmut Grasmann, e Nades Palaniyar. 2015. “SK3 channel and mitochondrial ROS mediate NADPH oxidase-independent NETosis induced by calcium influx”. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112 (9): 2817–22. <https://doi.org/10.1073/pnas.1414055112>.
- Doussi re, Jacques, Jacques Gaillard, e Pierre V. Vignais. 1996. “Electron transfer across the O₂-generating flavocytochrome b of neutrophils. Evidence for a transition from a low-spin state to a high-spin state of the heme iron component”. *Biochemistry* 35 (41): 13400–410. <https://doi.org/10.1021/bi960916b>.
- Dr bikov , Katar na, Tom s Pere ko, Radom r Nos l’, Juraj Harmatha, Jan Šmidrkal, e Viera Jan cinov . 2013. “Study of possible mechanisms involved in the inhibitory effects of coumarin derivatives on neutrophil activity”. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2013 (novembro): 136570. <https://doi.org/10.1155/2013/136570>.
- Dusi, S., V. Della Bianca, M. Grzeskowiak, e F. Rossi. 1993. “Relationship between phosphorylation and translocation to the plasma membrane of p47phox and p67phox and activation of the NADPH oxidase in normal and Ca(2+)-depleted human neutrophils.” *Biochemical Journal* 290: 173–78.
- Eckert, Rachael E, Laura E Neuder, Joungjoa Park, Kenneth B Adler, e Samuel L Jones. 2010. “Myristoylated alanine-rich C-kinase substrate (MARCKS) protein regulation of human

- neutrophil migration”. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 42 (5): 586–94. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2008-0394OC>.
- Eddy, Robert J, Lynda M Pierini, e Frederick R Maxfield. 2002. “Microtubule asymmetry during neutrophil polarization and migration”. *Molecular Biology of the Cell* 13 (12): 4470–83. <https://doi.org/10.1091/mbc.E02-04-0241>.
- El, Jamel, Pham My, Chan Dang, Anne Gougerot, e Carole Elbim. 2005. “Phagocyte NADPH oxidase: a multicomponent enzyme essential for host defenses”. *Arch Immunol Ther Exp* 53: 199–206.
- Elajaili, Hanan B., Laura Hernandez-Lagunas, Kalina Ranguelova, Sergey Dikalov, e Eva Nozik-Grayck. 2019. “Use of electron paramagnetic resonance in biological samples at ambient temperature and 77 K”. *Journal of Visualized Experiments* 2019 (143). <https://doi.org/10.3791/58461>.
- Ellson, Chris D., Stéphanie Gobert-Gosse, Karen E. Anderson, Keith Davidson, Hediye Erdjument-Bromage, Paul Tempst, Jan W. Thuring, et al. 2001. “PtdIns(3)P regulates the neutrophil oxidase complex by binding to the PX domain of p40phox”. *Nature Cell Biology* 3 (7): 679–82. <https://doi.org/10.1038/35083076>.
- Faurschou, Mikkel, e Niels Borregaard. 2003. “Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation”. *Microbes and Infection* 5 (14): 1317–27. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2003.09.008>.
- Ferreira Cespedes, Graziely, Esteban Nicolas Lorenzon, Eduardo Festozo Vicente, Maria Jose Soares Mendes-Giannini, Wagner Fontes, Mariana de Souza Castro, e Eduardo Maffud Cilli. 2012. “Mechanism of Action and Relationship Between Structure and Biological Activity of Ctx-Ha: A New Ceratotoxin-like Peptide from *Hypsiboas albopunctatus*”. *Protein & Peptide Letters* 19 (6): 596–603. <https://doi.org/10.2174/092986612800494011>.
- Fontayne, Alexandre, Pham My-phan Dang, e Jamel El Benna. 2002. “Phosphorylation of p47 phox Sites by PKC α , β II, δ , and ζ : Effect on Binding to p22 phox and on NADPH Oxidase Activation”. *Society*, n° 20: 7743–50.
- Fontayne, Alexandre, Pham My Chan Dang, Marie Anne Gougerot-Pocidallo, e Jamel El Benna. 2002. “Phosphorylation of p47phox sites by PKC α , β II, δ , and ζ : Effect on binding to p22phox and on NADPH oxidase activation”. *Biochemistry* 41 (24): 7743–50. <https://doi.org/10.1021/bi011953s>.
- Fontes, Wagner, Marcelo V. Sousa, Jeferson B. Aragão, e Lauro Morhy. 1997. “Determination of the amino acid sequence of the plant cytolysin enterolobin”. *Archives of Biochemistry*

and Biophysics 347 (2): 201–7. <https://doi.org/10.1006/abbi.1997.0358>.

- Fuchs, TA., A. Brill, D. Duerschmied, D. Schatzberg, M. Monestier, D. D. Myers, S. K. Wroblewski, T. W. Wakefield, J. H. Hartwig, e D. D. Wagner. 2010. “Extracellular DNA traps promote thrombosis”. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107 (36): 15880–85. <https://doi.org/10.1073/pnas.1005743107>.
- Fuchs, Tobias A., Ulrike Abed, Christian Goosmann, Robert Hurwitz, Ilka Schulze, Volker Wahn, Yvette Weinrauch, Volker Brinkmann, e Arturo Zychlinsky. 2007. “Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps”. *Journal of Cell Biology* 176 (2): 231–41. <https://doi.org/10.1083/jcb.200606027>.
- Gambardella, L., e S. Vermeren. 2013. “Molecular players in neutrophil chemotaxis--focus on PI3K and small GTPases”. *Journal of Leukocyte Biology* 94 (4): 603–12. <https://doi.org/10.1189/jlb.1112564>.
- Gera, Nidhi, Kenneth D. Swanson, e Tian Jin. 2017. “ β -Arrestin 1-dependent regulation of Rap2 is required for fMLP-stimulated chemotaxis in neutrophil-like HL-60 cells”. *Journal of Leukocyte Biology* 101 (1): 239–51. <https://doi.org/10.1189/jlb.2A1215-572R>.
- Goel, Gunjan, Harinder P.S. Makkar, George Francis, e Klaus Becker. 2007. “Phorbol esters: Structure, biological activity, and toxicity in animals”. *International Journal of Toxicology*. <https://doi.org/10.1080/10915810701464641>.
- Gray, Robert D., Christopher D. Lucas, Annie Mackellar, Feng Li, Katia Hiersemenzel, Chris Haslett, Donald J. Davidson, e Adriano G. Rossi. 2013. “Activation of conventional protein kinase C (PKC) is critical in the generation of human neutrophil extracellular traps”. *Journal of Inflammation (United Kingdom)* 10 (1): 1. <https://doi.org/10.1186/1476-9255-10-12>.
- Grayson, P. C., e M. J. Kaplan. 2016. “At the Bench: Neutrophil extracellular traps (NETs) highlight novel aspects of innate immune system involvement in autoimmune diseases”. *Journal of Leukocyte Biology* 99 (2): 253–64. <https://doi.org/10.1189/jlb.5BT0615-247R>.
- Gupta, Anurag Kumar, Stavros Giaglis, Paul Hasler, e Sinuhe Hahn. 2014. “Efficient neutrophil extracellular trap induction requires mobilization of both intracellular and extracellular calcium pools and is modulated by cyclosporine A”. *PLoS ONE* 9 (5): 19–21. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0097088>.
- Gupta, Anurag Kumar, Paul Hasler, Wolfgang Holzgreve, Stefan Gebhardt, e Sinuhe Hahn. 2005. “Induction of neutrophil extracellular DNA lattices by placental microparticles and IL-8 and their presence in preeclampsia”. *Human Immunology* 66 (11): 1146–54. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2005.11.003>.

- Hakim, Abdul, Tobias A. Fuchs, Nancy E. Martinez, Simone Hess, Heino Prinz, Arturo Zychlinsky, e Herbert Waldmann. 2011. "Activation of the Raf-MEK-ERK pathway is required for neutrophil extracellular trap formation". *Nature Chemical Biology* 7 (2): 75–77. <https://doi.org/10.1038/nchembio.496>.
- Hart, Bert A T;, Jos M; Simons, Shoshan; Knaan-Shanzer, Nicolas P M; Bakker, e Rudi P. Labadie. 1990. "Antiarthritic activity of the newly developed neutrophil oxidative burst antagonist apocynin". *Free Radical Biology & Medicine* 9: 127–31. <https://doi.org/10.1016/j.ultrasmedbio.2003.08.008>.
- Hattori, Hidenori, Kulandayan K. Subramanian, Jiro Sakai, Yonghui Jia, Yitang Li, Timothy F. Porter, Fabien Loison, et al. 2010. "Small-molecule screen identifies reactive oxygen species as key regulators of neutrophil chemotaxis". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (8): 3546. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0914351107>.
- Hattori, Hidenori, Kulandayan K Subramanian, Jiro Sakai, e Hongbo R Luo. 2010. "Reactive oxygen species as signaling molecules in neutrophil chemotaxis". *Communicative & Integrative Biology* 3 (3): 278. <https://doi.org/10.4161/CIB.3.3.11559>.
- Hawkins, Phillip T., Len R. Stephens, Sabine Suire, e Michael Wilson. 2010. "PI3K Signaling in Neutrophils". In *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 183–202. Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/82_2010_40.
- Heit, Bryan, Samantha Tavener, Eko Raharjo, e Paul Kubes. 2002. "An intracellular signaling hierarchy determines direction of migration in opposing chemotactic gradients". *Journal of Cell Biology* 159 (1): 91–102. <https://doi.org/10.1083/jcb.200202114>.
- Hemmings, Brian A, e David F Restuccia. 2016. "PI3K-PKB / Akt Pathway". In *Cold Spring Harbor Laboratory*, 1–4.
- Hendey, Bill, Moira Lawson, Eugene E. Marcantonio, e Frederick R. Maxfield. 1996. "Intracellular Calcium and Calcineurin Regulate Neutrophil Motility on Vitronectin Through a Receptor Identified by Antibodies to Integrins αv and $\beta 3$ ". *Blood* 87 (5): 2038–48. <https://doi.org/10.1182/BLOOD.V87.5.2038.2038>.
- Heumüller, Sabine, Sven Wind, Eduardo Barbosa-Sicard, Harald H.H.W. Schmidt, Rudi Busse, Katrin Schröder, e Ralf P. Brandes. 2008a. "Apocynin is not an inhibitor of vascular NADPH oxidases but an antioxidant". *Hypertension* 51 (2): 211–17. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.107.100214>.
- Heumüller, Sabine, Sven Wind, Eduardo Barbosa-Sicard, Harald H H W Schmidt, Rudi Busse,

- Katrin Schröder, e Ralf P. Brandes. 2008b. “Apocynin is not an inhibitor of vascular NADPH oxidases but an antioxidant”. *Hypertension* 51 (2): 211–17. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.107.100214>.
- Hougee, Sander, Anita Hartog, Annemarie Sanders, Yvo M F Graus, Maarten A. Hoijer, Johan Garssen, Wim B. Van Den Berg, Henk M. Van Beuningen, e H. Friso Smit. 2006. “Oral administration of the NADPH-oxidase inhibitor apocynin partially restores diminished cartilage proteoglycan synthesis and reduces inflammation in mice”. *European Journal of Pharmacology* 531 (1–3): 264–69. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2005.11.061>.
- Jaillon, Sébastien, Giuseppe Peri, Yves Delneste, Isabelle Frémaux, Andrea Doni, Federica Federica Moalli, Cecília Cecilia Garlanda, et al. 2007. “The humoral pattern recognition receptor PTX3 is stored in neutrophil granules and localizes in extracellular traps”. *The Journal of Experimental Medicine* 204 (4): 793–804. <https://doi.org/10.1084/jem.20061301>.
- Kadmas, Julie L., e Mary C. Beckerle. 2004. “The LIM domain: From the cytoskeleton to the nucleus”. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 5 (11): 920–31. <https://doi.org/10.1038/nrm1499>.
- Karlsson, A., J. B. Nixon, e L. C. McPhail. 2000a. “Phorbol myristate acetate induces neutrophil NADPH-oxidase activity by two separate signal transduction pathways: Dependent or independent of phosphatidylinositol 3-kinase”. *Journal of Leukocyte Biology* 67 (3): 396–404. <https://doi.org/10.1002/jlb.67.3.396>.
- Kaverina, Irina, e Anne Straube. 2011. “Regulation of cell migration by dynamic microtubules”. *Seminars in Cell and Developmental Biology*. NIH Public Access. <https://doi.org/10.1016/j.semdb.2011.09.017>.
- Kayagaki, Nobuhiko, Irma B. Stowe, Bettina L. Lee, Karen O’Rourke, Keith Anderson, Søren Warming, Trinna Cuellar, et al. 2015. “Caspase-11 cleaves gasdermin D for non-canonical inflammasome signalling”. *Nature* 526 (7575): 666–71. <https://doi.org/10.1038/nature15541>.
- Kelher, Marguerite R., Nathan J. D. McLaughlin, Anirban Banerjee, David J. Elzi, Fabia Gamboni, Samina Y. Khan, Xianzhong Meng, Sanchayita Mitra, e Christopher C. Silliman. 2016. “LysoPCs induce Hck- and PKC δ -mediated activation of PKC γ causing p47 phox phosphorylation and membrane translocation in neutrophils”. *Journal of Leukocyte Biology* 101 (1): 261–73. <https://doi.org/10.1189/jlb.3a0813-420rrr>.
- Keshari, Ravi S., Anupam Verma, Manoj K. Barthwal, e Madhu Dikshit. 2013. “Reactive oxygen species-induced activation of ERK and p38 MAPK mediates PMA-induced NETs release

- from human neutrophils”. *Journal of Cellular Biochemistry* 114 (3): 532–40. <https://doi.org/10.1002/jcb.24391>.
- Kinnula, Vuokko L., Ylermi; Soini, Kirsi ; Kvisti-Makela, Eeva-Riita; Savolainen, e Pirjo. Koistinen. 2002. “Antioxidant Defense Mechanisms in Human Neutrophils”. *ANTIOXIDANTS & REDOX SIGNALING* 4 (1): 27–34.
- Kirchner, Tina, Sonja Mller, Matthias Klinger, Werner Solbach, Tamás Laskay, e Martina Behnen. 2012. “The impact of various reactive oxygen species on the formation of neutrophil extracellular traps”. *Mediators of Inflammation* 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/849136>.
- Klebanoff, S. J., A. J. Kettle, H. Rosen, C. C. Winterbourn, e W. M. Nauseef. 2013. “Myeloperoxidase: a front-line defender against phagocytosed microorganisms”. *Journal of Leukocyte Biology* 93 (2): 185–98. <https://doi.org/10.1189/jlb.0712349>.
- Kolaczkowska, Elzbieta, e Paul Kubes. 2013. “Neutrophil recruitment and function in health and inflammation”. *Nature Reviews Immunology* 13 (3): 159–75. <https://doi.org/10.1038/nri3399>.
- Konig, Maximilian F., e Felipe Andrade. 2016. “A critical reappraisal of neutrophil extracellular traps and NETosis mimics based on differential requirements for protein citrullination”. *Frontiers in Immunology* 7 (NOV). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00461>.
- Kraaij, Tineke, Fredrik C. Tengström, Sylvia W.A. Kamerling, Charles D. Pusey, H. Ulrich Scherer, Rene E.M. Toes, Ton J. Rabelink, Cees van Kooten, e Y. K. Onno Teng. 2016. “A novel method for high-throughput detection and quantification of neutrophil extracellular traps reveals ROS-independent NET release with immune complexes”. *Autoimmunity Reviews* 15 (6): 577–84. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2016.02.018>.
- Krzywinski, Martin, Jacqueline Schein, Inanç Birol, Joseph Connors, Randy Gascoyne, Doug Horsman, Steven J Jones, e Marco A Marra. 2009. “Circos: An information aesthetic for comparative genomics”. *Genome Research* 19 (9): 1639–45. <https://doi.org/10.1101/gr.092759.109>.
- Lefrançais, Emma, Beñat Mallavia, Hanjing Zhuo, Carolyn S. Calfee, e Mark R. Looney. 2018. “Maladaptive role of neutrophil extracellular traps in pathogen-induced lung injury”. *JCI Insight* 3 (3). <https://doi.org/10.1172/jci.insight.98178>.
- Liefeld, Pieter H.C., Catharina M.; Wessels, Luke P. H.; Leenen, Leo; Koenderman, e Janesh Pillay. 2016. “The role of neutrophils in immune dysfunction during severe inflammation”. *critical care* 20 (73): 2–9. <https://doi.org/10.1186/s13054-016-1250-4>.

- Li, Haitao, Xiaoting Zhou, Hongyi Tan, Yongbin Hu, Lemeng Zhang, Shuai Liu, Minhui Dai, et al. 2018. “Neutrophil extracellular traps contribute to the pathogenesis of acid-aspiration-induced ALI/ARDS”. *Oncotarget* 9 (2): 1772–84. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.22744>.
- Li, Na, Jun Zhang, Dan Liao, Lu Yang, Yingxiong Wang, e Shengping Hou. 2017. “Association between C4, C4A, and C4B copy number variations and susceptibility to autoimmune diseases: a meta-analysis”. *Nature Publishing Group*. <https://doi.org/10.1038/srep42628>.
- Li, Pingxin, Ming Li, Michael R. Lindberg, Mary J. Kennett, Na Xiong, e Yanming Wang. 2010. “PAD4 is essential for antibacterial innate immunity mediated by neutrophil extracellular traps”. *The Journal of Experimental Medicine* 207 (9): 1853–62. <https://doi.org/10.1084/jem.20100239>.
- Lim, M. B. H., J. W. P. Kuiper, A. Katchky, H. Goldberg, e M. Glogauer. 2011. “Rac2 is required for the formation of neutrophil extracellular traps”. *Journal of Leukocyte Biology* 90 (4): 771–76. <https://doi.org/10.1189/jlb.1010549>.
- Linden, Maarten Van Der, Geertje H.A. Westerlaken, Michiel Van Der Vlist, Joris Van Montfrans, e Linde Meyaard. 2017. “Differential Signalling and Kinetics of Neutrophil Extracellular Trap Release Revealed by Quantitative Live Imaging”. *Scientific Reports* 7 (1): 6529. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-06901-w>.
- Liu, Xing, Zhibin Zhang, Jianbin Ruan, Youdong Pan, Venkat Giri Magupalli, Hao Wu, e Judy Lieberman. 2016. “Inflammasome-activated gasdermin D causes pyroptosis by forming membrane pores”. *Nature* 535 (7610): 153–58. <https://doi.org/10.1038/nature18629>.
- Lominadze, George, David W. Powell, Greg C. Luerman, Andrew J. Link, Richard A. Ward, e Kenneth R. McLeish. 2005. “Proteomic Analysis of Human Neutrophil Granules”. *Molecular & Cellular Proteomics* 4 (10): 1503–21. <https://doi.org/10.1074/mcp.M500143-MCP200>.
- Lubbers, R., M. F. van Essen, C. van Kooten, e L. A. Trouw. 2017. “Production of complement components by cells of the immune system”. *Clinical and Experimental Immunology* 188 (2): 183–94. <https://doi.org/10.1111/cei.12952>.
- Luo, Chenfang, Dongdong Yuan, Weicheng Zhao, Huixin Chen, Gangjian Luo, Guangjie Su, e Ziqing Hei. 2015. “Sevoflurane ameliorates intestinal ischemia-reperfusion-induced lung injury by inhibiting the synergistic action between mast cell activation and oxidative stress”. *Molecular Medicine Reports* 12 (1): 1082–90. <https://doi.org/10.3892/mmr.2015.3527>.
- Maianski, N. A., J. Geissler, S. M. Srinivasula, E. S. Alnemri, D. Roos, e T. W. Kuijpers. 2004.

- “Functional characterization of mitochondria in neutrophils: A role restricted to apoptosis”. *Cell Death and Differentiation* 11 (2): 143–53. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401320>.
- Majumdar, S.; M. W; Rossi, T; Fujiki, W.A.; Phillips, S; Disa, Queen C.F., Jr; Johnston, O.M; Rosen, B.E; Corkey, e H.M Korchak. 1991. “Protein Kinase C Isotypes and Signaling in Neutrophils”. *The Journal of Biological Chemistry* 266 (14): 9285–94.
- Mantovani, Alberto, Marco A. Cassatella, Claudio Costantini, e Sébastien Jaillon. 2011. “Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity”. *Nature Reviews Immunology* 11 (8): 519–31. <https://doi.org/10.1038/nri3024>.
- Metzler, Kathleen D., Christian Goosmann, Aleksandra Lubojemska, Arturo Zychlinsky, e Venizelos Papayannopoulos. 2014a. “Myeloperoxidase-containing complex regulates neutrophil elastase release and actin dynamics during NETosis”. *Cell Reports* 8 (3): 883–96. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.06.044>.
- Ming, Wenyu, Shijun Li, Daniel D Billadeau, Lawrence A Quilliam, e Mary C Dinauer. 2007. “The Rac Effector p67phox Regulates Phagocyte NADPH Oxidase by Stimulating Vav1 Guanine Nucleotide Exchange Activity”. *Molecular and Cellular Biology* 27 (1): 312–23. <https://doi.org/10.1128/mcb.00985-06>.
- Mócsai, Attila, Barbara Walzog, e Clifford A. Lowell. 2015. “Intracellular signalling during neutrophil recruitment”. *Cardiovascular Research* 107 (3): 373–85. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvv159>.
- Morgan, B. Paul. 2016. “The membrane attack complex as an inflammatory trigger”. *Immunobiology*. Elsevier GmbH. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2015.04.006>.
- Morsing, Sofia K H, Timo Rademakers, Sanne L N Brouns, Anne-Marieke D Van Stalborch, Marjo M P C Donners, e Jaap D Van Buul. 2021. “ADAM10-Mediated Cleavage of ICAM-1 Is Involved in Neutrophil Transendothelial Migration”. <https://doi.org/10.3390/cells10020232>.
- Mouzaoui, Souad, Bahia Djerdjouri, Nesrine Makhezer, Yolande Kroviarski, Jamel El-Benna, e Pham My Chan Dang. 2014. “Tumor necrosis factor- α -induced colitis increases NADPH oxidase 1 expression, oxidative stress, and neutrophil recruitment in the Colon: Preventive effect of apocynin”. *Mediators of Inflammation*. <https://doi.org/10.1155/2014/312484>.
- Müller, Andreas A, Susanne A Reiter, Karin G Heider, e Hildebert Wagner. 1999. “Plant-derived acetophenones with antiasthmatic and anti-inflammatory properties: Inhibitory effects on chemotaxis, right angle light scatter and actin polymerization of polymorphonuclear granulocytes”. *Planta Medica* 65 (7): 590–94. <https://doi.org/10.1055/s-1999-14029>.

- Muniz-Junqueira, M I, L M Pecanha, V L da Silva-Filho, M C de Almeida Cardoso, e C E Tosta. 2003. “Novel microtechnique for assessment of postnatal maturation of the phagocytic function of neutrophils and monocytes”. *Clin Diagn Lab Immunol* 10 (6): 1096–1102. <https://doi.org/10.1128/CDLI.10.6.1096>.
- Nagarkoti, Sheela, Megha Dubey, Deepika Awasthi, Vikas Kumar, Tulika Chandra, Sachin Kumar, e Madhu Dikshit. 2018. “S-Glutathionylation of p47phox sustains superoxide generation in activated neutrophils”. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* 1865 (2): 444–54. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2017.11.014>.
- Nagarkoti, Sheela, Megha Dubey, Samreen Sadaf, Deepika Awasthi, Tulika Chandra, Kumaravelu Jagavelu, Sachin Kumar, e Madhu Dikshit. 2019. “Catalase S-Glutathionylation by NOX2 and Mitochondrial-Derived ROS Adversely Affects Mice and Human Neutrophil Survival”. *Inflammation* 42 (6): 2286–96. <https://doi.org/10.1007/s10753-019-01093-z>.
- Nakashima, Katsuhiko, Teruki Hagiwara, e Michiyuki Yamada. 2002. “Nuclear localization of peptidylarginine deiminase V and histone deimination in granulocytes”. *Journal of Biological Chemistry* 277 (51): 49562–68. <https://doi.org/10.1074/jbc.M208795200>.
- Nathan, Carl. 2006. “Neutrophils and immunity: Challenges and opportunities”. *Nature Reviews Immunology* 6 (3): 173–82. <https://doi.org/10.1038/nri1785>.
- Nauseef, William M. 2008. “Biological roles for the NOX family NADPH oxidases”. *Journal of Biological Chemistry* 283 (25): 16961–65. <https://doi.org/10.1074/jbc.R700045200>.
- Neeli, Indira, e Marko Radic. 2013. “Opposition between PKC isoforms regulates histone deimination and neutrophil extracellular chromatin release”. *Frontiers in Immunology* 4 (FRB): 1–9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00038>.
- Neubert, Elsa, Daniel Meyer, Francesco Rocca, Gökhan Günay, Anja Kwaczala-Tessmann, Julia Grandke, Susanne Senger-Sander, et al. 2018. “Chromatin swelling drives neutrophil extracellular trap release”. *Nature Communications* 9 (1): 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06263-5>.
- Nguyen, Giang T., Erin R. Green, e Joan Mecsas. 2017. “Neutrophils to the ROScUE: Mechanisms of NADPH Oxidase Activation and Bacterial Resistance”. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 7 (August). <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00373>.
- Nishinaka, Yoko, Toshiyuki Arai, Souichi Adachi, Akifumi Takaori-Kondo, e Kouhei Yamashita. 2011. “Singlet oxygen is essential for neutrophil extracellular trap formation”. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 413 (1): 75–79.

<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.08.052>.

- Nisimoto, Yukio, Shabnam Motalebi, Chang Hoon Han, e J David Lambeth. 1999. "The p67(phox) activation domain regulates electron flow from NADPH to flavin in flavocytochrome b558". *Journal of Biological Chemistry* 274 (33): 22999–5. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.33.22999>.
- Nixon, Jennifer B, e L C McPhail. 1999. "Protein kinase C (PKC) isoforms translocate to Triton-insoluble fractions in stimulated human neutrophils: correlation of conventional PKC with activation of NADPH oxidase." *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 163 (8): 4574–82.
- Norman, Keith E, Andreas G Katopodis, Gebhard Thoma, Frank Kolbinger, Anne E Hicks, Matthew J Cotter, A Graham Pockley, e Paul G Hellewell. 2000. "P-selectin glycoprotein ligand-1 supports rolling on E- and P-selectin in vivo." *Blood* 96 (10): 3585–91.
- Pagani, Alberto, Simone Gaeta, Andrei I Savchenko, Craig M Williams, e Giovanni Appendino. 2017. "An improved preparation of phorbol from croton oil". *Beilstein Journal of Organic Chemistry* 13: 1361–67. <https://doi.org/10.3762/bjoc.13.133>.
- Papayannopoulos, Venizelos, Kathleen D. Metzler, Abdul Hakkim, e Arturo Zychlinsky. 2010. "Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps". *Journal of Cell Biology* 191 (3): 677–91. <https://doi.org/10.1083/jcb.201006052>.
- Parker, H., M. Dragunow, M. B. Hampton, A. J. Kettle, e C. C. Winterbourn. 2012. "Requirements for NADPH oxidase and myeloperoxidase in neutrophil extracellular trap formation differ depending on the stimulus". *Journal of Leukocyte Biology* 92 (4): 841–49. <https://doi.org/10.1189/jlb.1211601>.
- Pick, Edgar. 2014. "Role of the Rho GTPase Rac in the activation of the phagocyte NADPH oxidase: Outsourcing a key task". *Small GTPases*. <https://doi.org/10.4161/sgtp.27952>.
- Pilszczek, Florian H.; Davide; Salina, Karen K. H.; Poon, Candace; Fahey, Bryan G.; Yipp, Christopher D.; Sibley, Stephen M.; Robbins, et al. 2010. "A Novel Mechanism of Rapid Nuclear Neutrophil Extracellular Trap Formation in Response to Staphylococcus aureus Florian". *The Journal of Immunology*, 7413–25. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1000675>.
- Pruessmeyer, Jessica, Franz Martin Hess, Henriette Alert, Esther Groth, Tobias Pasqualon, Nicole Schwarz, Stella Nyamoya, et al. 2014. "Leukocytes require ADAM10 but not ADAM17 for their migration and inflammatory recruitment into the alveolar space". *Blood*. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-09-511543>.
- Puri, Kamal D., Teresa A. Doggett, Ching Yu Huang, Jason Douangpanya, Joel S. Hayflick,

- Martin Turner, Josef Penninger, e Thomas G. Diacovo. 2005. “The role of endothelial PI3K activity in neutrophil trafficking”. *Blood* 106 (1): 150–57. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-01-0023>.
- Raad, Houssam, Marie H el ene Paquet, Tarek Boussetta, Yolande Kroviarski, Fran oise Morel, Mark T. Quinn, Marie Anne Gougerot-Pocidallo, Pham My Chan Dang, e Jamel El-Benna. 2009. “Regulation of the phagocyte NADPH oxidase activity: Phosphorylation of gp91phox/NOX2 by protein kinase C enhances its diaphorase activity and binding to Rac2, p67phox, and p47phox”. *FASEB Journal* 23 (4): 1011–22. <https://doi.org/10.1096/fj.08-114553>.
- Rada, Bal azs. 2019. “Neutrophil extracellular traps”. In *Methods in Molecular Biology*, 1982:517–28. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9424-3_31.
- Regier, Debra S, Dianne G Greene, Susan Sergeant, Algirdas J Jesaitis, e Linda C. McPhail. 2000. “Phosphorylation of p22(phox) is mediated by phospholipase D-dependent and -independent mechanisms. Correlation of NADPH oxidase activity and p22(phox) phosphorylation”. *Journal of Biological Chemistry* 275 (37): 28406–12. <https://doi.org/10.1074/jbc.M004703200>.
- Rochael, Natalia C., Anderson B. Guimar aes-Costa, Michelle T.C. Nascimento, Thiago S. Desouza-Vieira, Matheus P. Oliveira, Luiz F. Garciae Souza, Marcus F. Oliveira, e Elvira M. Saraiva. 2015. “Classical ROS-dependent and early/rapid ROS-independent release of Neutrophil Extracellular Traps triggered by Leishmania parasites”. *Scientific Reports* 5 (December): 1–11. <https://doi.org/10.1038/srep18302>.
- Rorvig, S., C. Honore, L.-I. Larsson, S. Ohlsson, C. C. Pedersen, L. C. Jacobsen, J. B. Cowland, P. Garred, e N. Borregaard. 2009. “Ficolin-1 is present in a highly mobilizable subset of human neutrophil granules and associates with the cell surface after stimulation with fMLP”. *Journal of Leukocyte Biology* 86 (6): 1439–49. <https://doi.org/10.1189/jlb.1008606>.
- Rorvig, S., O. Ostergaard, N. H. H. Heegaard, e N. Borregaard. 2013. “Proteome profiling of human neutrophil granule subsets, secretory vesicles, and cell membrane: correlation with transcriptome profiling of neutrophil precursors”. *Journal of Leukocyte Biology* 94 (4): 711–21. <https://doi.org/10.1189/jlb.1212619>.
- R orvig, Sara, Christian Honore, Lars-Inge Larsson, Sophie Ohlsson, Corinna C. Pedersen, Lars C. Jacobsen, Jack B. Cowland, Peter Garred, e Niels Borregaard. 2009. “Ficolin-1 is present in a highly mobilizable subset of human neutrophil granules and associates with the cell surface after stimulation with fMLP”. *Journal of Leukocyte Biology* 86 (6): 1439–49. <https://doi.org/10.1189/jlb.1008606>.

- Ryckman, Carle, Karen Vandal, Pascal Rouleau, Mariève Talbot, e Philippe A. Tessier. 2003. "Proinflammatory Activities of S100: Proteins S100A8, S100A9, and S100A8/A9 Induce Neutrophil Chemotaxis and Adhesion". *The Journal of Immunology* 170 (6): 3233–42. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.170.6.3233>.
- Schlüter, Torsten, Antje C. Steinbach, Anja Steffen, Rainer Rettig, e Olaf Grisk. 2008. "Apocynin-induced vasodilation involves Rho kinase inhibition but not NADPH oxidase inhibition". *Cardiovascular Research* 80 (2): 271–79. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvn185>.
- Schmidt, Andreas, Ignasi Forne, e Axel Imhof. 2014. "Bioinformatic analysis of proteomics data". *BMC Systems Biology* 8 (Suppl 2): 1–7.
- Schönwaßer, Dorothee C., Ruth H. Palmer, Thomas Herget, e Peter J. Parker. 1996. "p42 MAPK phosphorylates 80 kDa MARCKS at Ser-113". *FEBS Letters* 395 (1): 1–5. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(96\)00991-X](https://doi.org/10.1016/0014-5793(96)00991-X).
- Seguchi, Harumichi, e Toshihiro Kobayashi. 2002. "Study of NADPH oxidase-activated sites in human neutrophils". *Journal of Electron Microscopy*. <https://doi.org/10.1093/jmicro/51.2.87>.
- Shannon, Paul, Andrew Markiel, Owen Ozier, Nitin S. Baliga, Jonathan T. Wang, Daniel Ramage, Nada Amin, Beno Schwikowski, e Trey Ideker. 2003. "Cytoscape: A software Environment for integrated models of biomolecular interaction networks". *Genome Research* 13 (11): 2498–2504. <https://doi.org/10.1101/gr.1239303>.
- Shaw, Sunil K, Shuo Ma, Michael B Kim, Ravi M Rao, Charles U Hartman, Richard M Froio, Lin Yang, et al. 2004. "Coordinated redistribution of leukocyte LFA-1 and endothelial cell ICAM-1 accompany neutrophil transmigration". *Journal of Experimental Medicine* 200 (12): 1571–80. <https://doi.org/10.1084/jem.20040965>.
- Sheats, Mary K, Eui Jae Sung, Kenneth B Adler, e Samuel L Jones. 2015. "In Vitro Neutrophil Migration Requires Protein Kinase C-Delta (δ -PKC)-Mediated Myristoylated Alanine-Rich C-Kinase Substrate (MARCKS) Phosphorylation". *Inflammation* 38 (3): 1126–41. <https://doi.org/10.1007/s10753-014-0078-9>.
- Sheppard, Forest R., Marguerite R. Kelher, Ernest E. Moore, Nathan J. D. McLaughlin, Anirban Banerjee, e Christopher C. Silliman. 2005. "Structural organization of the neutrophil NADPH oxidase: phosphorylation and translocation during priming and activation". *Journal of Leukocyte Biology* 78 (5): 1025–42. <https://doi.org/10.1189/jlb.0804442>.
- Shi, Jianjin, Yue Zhao, Kun Wang, Xuyan Shi, Yue Wang, Huanwei Huang, Yinghua Zhuang, Tao Cai, Fengchao Wang, e Feng Shao. 2015. "Cleavage of GSDMD by inflammatory

- caspases determines pyroptotic cell death”. *Nature* 526 (7575): 660–65. <https://doi.org/10.1038/nature15514>.
- Sies, Helmut, e Dean P. Jones. 2020. “Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents”. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 21 (7): 363–83. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-0230-3>.
- Simons, Jos M.; Bert A. 't Hart, Theo R.A.M. Ip Vai Ching, Hans Van Dijk, e Rudi P. Labadie. 1990. “Metabolic activation of natural phenols into selective oxidative burst agonists by activated human neutrophils”. *Free Radical Biology and Medicine* 8 (3): 251–58. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(90\)90070-Y](https://doi.org/10.1016/0891-5849(90)90070-Y).
- Simons, Jos M.; A Hart; Bert, R A M; Theo, Vai; Ching, Hans Van; Djik, e Labadie Rudi P. 1990. “METABOLIC ACTIVATION OF NATURAL PHENOLS INTO SELECTIVE OXIDATIVE BURST AGONISTS BY ACTIVATED HUMAN NEUTROPHILS”. *Free Radical Biology & Medicine* 8: 251–58.
- Sobierajska, Katarzyna, Wojciech M. Ciszewski, Marta E. Wawro, Katarzyna Wieczorek-Szukała, Joanna Boncela, Izabela Papiewska-Pajak, Jolanta Niewiarowska, e M. Anna Kowalska. 2019. “TUBB4B Downregulation Is Critical for Increasing Migration of Metastatic Colon Cancer Cells”. *Cells* 8 (8). <https://doi.org/10.3390/cells8080810>.
- Sollberger, Gabriel, Axel Choidas, Garth Lawrence Burn, Peter Habenberger, Raffaella Di Lucrezia, Susanne Kordes, Sascha Menninger, et al. 2018. “Gasdermin D plays a vital role in the generation of neutrophil extracellular traps”. *Science Immunology* 3 (26). <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.aar6689>.
- Souza Castro, Mariana de, Natan Monsores de Sá, Renata Pedroza Gadelha, Marcelo Valle de Sousa, Carlos André Ornela Ricart, Belchor Fontes, e Wagner Fontes. 2006. “Proteome analysis of resting human neutrophils.” *Protein and peptide letters* 13 (5): 481–87.
- Stefanska, J., e R. Pawliczak. 2008. “Apocynin: Molecular aptitudes”. *Mediators of Inflammation* 2008: 1–10. <https://doi.org/10.1155/2008/106507>.
- Steinberg, Susan F. 2008. “Structural Basis of Protein Kinase C Isoform Function”. *Physiological Reviews* 88 (4): 1341–78. <https://doi.org/10.1152/physrev.00034.2007>.
- Stoiber, Walter, Astrid Obermayer, Peter Steinbacher, e Wolf Dietrich Krautgartner. 2015. “The role of reactive oxygen species (ROS) in the formation of extracellular traps (ETs) in humans”. *Biomolecules* 5 (2): 702–23. <https://doi.org/10.3390/biom5020702>.
- Stojkov, Darko, Poorya Amini, Kevin Oberson, Christiane Sokollik, Andrea Duppenhaler, Hans Uwe Simon, e Shida Yousefi. 2017a. “ROS and glutathionylation balance cytoskeletal

- dynamics in neutrophil extracellular trap formation”. *Journal of Cell Biology* 216 (12): 4073–90. <https://doi.org/10.1083/jcb.201611168>.
- Stolk, J., T. J. Hiltermann, J. H. Dijkman, e A. J. Verhoeven. 1994. “Characteristics of the inhibition of NADPH oxidase activation in neutrophils by apocynin, a methoxy-substituted catechol.” *American journal of respiratory cell and molecular biology* 11 (1): 95–102. <https://doi.org/10.1165/ajrcmb.11.1.8018341>.
- Stroka, Kimberly M., Heather N. Hayenga, e Helim Aranda-Espinoza. 2013. “Human Neutrophil Cytoskeletal Dynamics and Contractility Actively Contribute to Trans-Endothelial Migration”. *PLOS ONE* 8 (4): e61377. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0061377>.
- Szklarczyk, Damian, John H. Morris, Helen Cook, Michael Kuhn, Stefan Wyder, Milan Simonovic, Alberto Santos, et al. 2017. “The STRING database in 2017: Quality-controlled protein-protein association networks, made broadly accessible”. *Nucleic Acids Research* 45 (D1): D362–68. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw937>.
- Tang, Haiming, Paul D. Thomas, Diane Kang, Caitlin Mills, Anushya Muruganujan, Xiaosong Huang, e Huaiyu Mi. 2016. “PANTHER version 11: expanded annotation data from Gene Ontology and Reactome pathways, and data analysis tool enhancements”. *Nucleic Acids Research* 45 (D1): D183–89. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw1138>.
- Tardif, Mélanie R, Julie Andrea Chapeton-Montes, Alma Posvanzdic, Nathalie Pagé, Caroline Gilbert, e Philippe A Tessier. 2015. “Secretion of S100A8, S100A9, and S100A12 by Neutrophils Involves Reactive Oxygen Species and Potassium Efflux”. <https://doi.org/10.1155/2015/296149>.
- Tatsiy, Olga, e Patrick P. McDonald. 2018. “Physiological stimuli induce PAD4-Dependent, ROS-Independent NETosis, with early and late events controlled by discrete signaling pathways”. *Frontiers in Immunology* 9 (SEP): 1–12. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02036>.
- Taylor, William R, David T Jones, e Anthony W. Segal. 1993. “A structural model for the nucleotide binding domains of the flavocytochrome b–245 β -chain”. *Protein Science*. Cambridge University Press. <https://doi.org/10.1002/pro.5560021013>.
- Tjørve, Kathleen M.C., e Even Tjørve. 2017. “The use of Gompertz models in growth analyses, and new Gompertz-model approach: An addition to the Unified-Richards family”. *PLoS ONE* 12 (6): 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178691>.
- Trevelin, Silvia Cellone, Célio Xavier Dos Santos, Raphael Gomes Ferreira, Larissa De Sá Lima, Rangel Leal Silva, Cristoforo Scavone, Rui Curi, et al. 2016. “Apocynin and Nox2 regulate

- NF- κ B by modifying thioredoxin-1 redox-state”. *Scientific Reports* 6. <https://doi.org/10.1038/srep34581>.
- Tsuruta, Yuko, Young-Jun Park, Gene P. Siegal, Gang Liu, e Edward Abraham. 2007. “Involvement of Vitronectin in Lipopolysaccharide-Induced Acute Lung Injury”. *The Journal of Immunology* 179 (10): 7079–86. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.10.7079>.
- Urban, Constantin F., David Ermert, Monika Schmid, Ulrike Abu-Abed, Christian Goosmann, Wolfgang Nacken, Volker Brinkmann, Peter R. Jungblut, e Arturo Zychlinsky. 2009a. “Neutrophil extracellular traps contain calprotectin, a cytosolic protein complex involved in host defense against *Candida albicans*”. *PLoS Pathogens* 5 (10). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000639>.
- Uysal, A., E. Sahna, I. M. Ozguler, O. Burma, e N. Ilhan. 2014. “Effects of apocynin, an NADPH oxidase inhibitor, on levels of ADMA, MPO, iNOS and TLR4 induced by myocardial ischemia reperfusion”. *Perfusion (United Kingdom)* 30 (6): 472–77. <https://doi.org/10.1177/0267659114559260>.
- Veras, Flavio Protasio, Marjorie Cornejo Pontelli, Camila Meirelles Silva, Juliana E Toller-Kawahisa, Mikhael de Lima, Daniele Carvalho Nascimento, Ayda Henriques Schneider, et al. 2020. “SARS-CoV-2-triggered neutrophil extracellular traps mediate COVID-19 pathology”. *Journal of Experimental Medicine* 217 (12). <https://doi.org/10.1084/jem.20201129>.
- Verploegen, Sandra, Caroline M. van Leeuwen, Hanneke W. M. van Deutekom, Jan-Willem J. Lammers, Leo Koenderman, e Paul J. Coffey. 2002. “Role of Ca²⁺/calmodulin regulated signaling pathways in chemoattractant induced neutrophil effector functions”. *European Journal of Biochemistry* 269 (18): 4625–34. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2002.03162.x>.
- Verploegen, Sandra, Caroline M. Van Leeuwen, Hanneke W.M. Van Deutekom, Jan Willem J. Lammers, Leo Koenderman, e Paul J. Coffey. 2002. “Role of Ca²⁺/calmodulin regulated signaling pathways in chemoattractant induced neutrophil effector functions: Comparison with the role of phosphatidylinositol-3 kinase”. *European Journal of Biochemistry* 269 (18): 4625–34. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2002.03162.x>.
- Viana, A. G.A., A. M.A. Martins, A H Pontes, W Fontes, M S Castro, C. A.O. Ricart, M. V. Sousa, et al. 2018. “Proteomic landscape of seminal plasma associated with dairy bull fertility”. *Scientific Reports* 8 (1): 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-34152-w>.
- Virella, Gabriel, Tab Thompson, e Rebecca Haskill-Strowd. 1990. “A new quantitative nitroblue

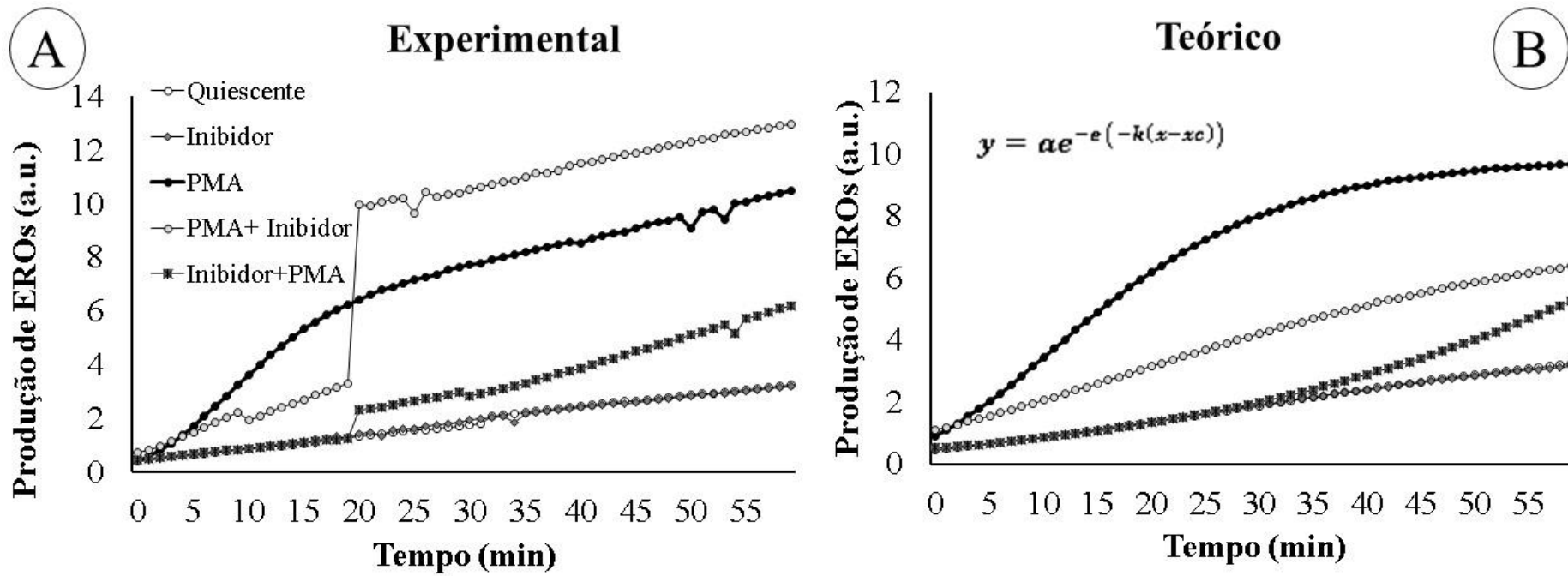
- tetrazolium reduction assay based on kinetic colorimetry”. *Journal of Clinical Laboratory Analysis* 4 (2): 86–89. <https://doi.org/10.1002/jcla.1860040203>.
- Walser, Romy, John E. Burke, Elena Gogvadze, Thomas Bohnacker, Xuxiao Zhang, Daniel Hess, Peter Küenzi, et al. 2013. “PKC β Phosphorylates PI3K γ to Activate It and Release It from GPCR Control”. *PLoS Biology*. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001587>.
- Wang, Qun;, Robrt E.; Smith, Ron; Luchtefeld, Albert Y.; Sun, Agnes; Simonyi, Rensheng; Luo, e Grace Y. Sun. 2008. “Bioavailability of apocynin through its conversion to glycoconjugate but not to diapocynin”. *phytotherapy*, 496–503. <https://doi.org/10.1016/j.dcn.2011.01.002>.The.
- Wang, Shu, e Yanming Wang. 2013. “Peptidylarginine deiminases in citrullination, gene regulation, health and pathogenesis”. *Biochim Biophys Acta* 1829 (10): 1126–35. <https://doi.org/10.1038/mp.2011.182>.doi.
- Wang, Xiaoping, Jianqing Zhao, Cong Cai, Xiaojuan Tang, Lei Fu, Anding Zhang, e Li Han. 2018. “A label-free quantitative proteomic analysis of mouse neutrophil extracellular trap formation induced by streptococcus suis or phorbol myristate acetate (PMA)”. *Frontiers in Immunology* 9 (NOV): 1–14. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02615>.
- Wang, Yan, Yuqing Wang, Jia Wu, Chen Liu, Yu Zhou, Ligu Mi, Yu Zhang, e Wei Wang. 2019. “PRAK Is Required for the Formation of Neutrophil Extracellular Traps”. *Frontiers in Immunology* 10 (junho): 1252. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01252>.
- Wang, Yanming, Ming Li, Sonja Stadler, Sarah Correll, Pingxin Li, Danchen Wang, Ryo Hayama, et al. 2009. “Histone hypercitrullination mediates chromatin decondensation and neutrophil extracellular trap formation”. *Journal of Cell Biology* 184 (2): 205–13. <https://doi.org/10.1083/jcb.200806072>.
- Wang, Yanming, Joanna Wysocka, Joyce Sayegh, Young-ho Lee, Julie R Perlin, Lauriebeth Leonelli, Lakshmi S Sonbuchner, et al. 2004. “Human PAD4 Regulates Histone Arginine Methylation Levels via Demethyliminination”. *Science* 306 (5694): 279–83. <https://doi.org/10.1086/275028>.
- Winterbourn, Christine C., e Anthony J. Kettle. 2013. “Redox Reactions and Microbial Killing in the Neutrophil Phagosome”. *Antioxidants & Redox Signaling* 18 (6): 642–60. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.4827>.
- Wiśniewski, Jacek R, Alexandre Zougman, Nagarjuna Nagaraj, e Matthias Mann. 2009a. “Universal sample preparation method for proteome analysis”. *Nature Methods* 6 (abril): 359.

- Yan, Lin Lin, Yuan Jiao Huang, Xiang Yi, Xue Min Yan, Yan Cai, Qin He, e Zi Jian Han. 2015. “Effects of silencing S100A8 and S100A9 with small interfering RNA on the migration of CNE1 nasopharyngeal carcinoma cells”. *Oncology Letters* 9 (6): 2534–40. <https://doi.org/10.3892/ol.2015.3090>.
- Yona, Simon, Hsi-Hsien Lin, Pietro Dri, John Q. Davies, Richard P. G. Hayhoe, Sion M. Lewis, Sigrid E. M. Heinsbroek, et al. 2008. “Ligation of the adhesion-GPCR EMR2 regulates human neutrophil function”. *The FASEB Journal* 22 (3): 741–51. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2009.03.008>.
- Yoo, Sa Kan, Pui ying Lam, Mark R. Eichelberg, Lauren Zasadil, William M. Bement, e Anna Huttenlocher. 2012. “The role of microtubules in neutrophil polarity and migration in live zebrafish”. *Journal of Cell Science* 125 (23): 5702–10. <https://doi.org/10.1242/jcs.108324>.
- Yousefi, S., C. Mihalache, E. Kozlowski, I. Schmid, e H. U. Simon. 2009. “Viable neutrophils release mitochondrial DNA to form neutrophil extracellular traps”. *Cell Death and Differentiation* 16 (11): 1438–44. <https://doi.org/10.1038/cdd.2009.96>.
- Yuen, Joshua, Fred G Pluthero, David N Douda, Magdalena Riedl, Ahmed Cherry, Marina Ulanova, Walter H.A. Kahr, Nades Palaniyar, e Christoph Licht. 2016. “NETosing neutrophils activate complement both on their own NETs and bacteria via alternative and non-alternative pathways”. *Frontiers in Immunology* 7 (APR): 137. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00137>.
- Zeng, Melody Y, Irina Miralda, Cortney L Armstrong, Silvia M Uriarte, e Juhi Bagaitkar. 2019. “The roles of NADPH oxidase in modulating neutrophil effector responses”. *Molecular Oral Microbiology* 34: 27–38. <https://doi.org/10.1111/omi.12252>.
- Zhang, Lingping, Wenbin Dong, Qingping Li, Lan Kang, Lianyu Zhang, Youying Lu, e Xuesong Zhai. 2016. “Mechanism of p47phox-induced increase of reactive oxygen species in peripheral blood mononuclear cells from premature infants on oxygen therapy”. *Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine* 29 (21): 3490–94. <https://doi.org/10.3109/14767058.2015.1135119>.
- Zhang, Wei, e Hui Tu Liu. 2002. “MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells”. *Cell Res.* 12: 9–18. <https://doi.org/10.1007/BF00568631>.
- Ziemba, Brian P, John E Burke, Glenn Masson, Roger L Williams, e Joseph J Falke. 2016. “Regulation of PI3K by PKC and MARCKS: Single-Molecule Analysis of a Reconstituted Signaling Pathway”. *Biophysical Journal* 110 (8): 1811–25. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2016.03.001>.

Zuchtriegel, Gabriele, Bernd Uhl, Robert Pick, Michaela Ramsauer, Julian Dominik, Laura A. Mittmann, Martin Canis, et al. 2021. "Vitronectin stabilizes intravascular adhesion of neutrophils by coordinating β 2 integrin clustering". *Haematologica* 106 (10): 2641–53. <https://doi.org/10.3324/haematol.2019.226241>.

9. ANEXOS

9.1. ANEXO A- Curva experimental que foi ajustada com a curva teórica, segundo modelo de Gompertz. **A**- Curva experimental; **B**-curva teórica conforme modelo de Gompertz.



9.2. ANEXO B- Total de proteínas reguladas

Nº acesso	NOME DO GENE	PROTEÍNA	PEPTÍDEOS	SCORE DE CONFIANÇA	ANOVA (P)	MÁXIMO FOLD CHANGE	REGULADA+	REGULADA-
P00747	PLG	Plasminogen	3	199.81	1,37E-06	7,442711595	P	I
O15389	SIGLEC5	Sialic acid-binding Ig-like lectin 5	2	154.15	2,29E-06	8,49715761	I	P
P01859	IGHG2	Immunoglobulin heavy constant gamma 2	8	503.18	2,53E-06	4,538183143	PI	I
A0A0C4DGB6	ALB	Serum albumin	34	2276.33	4,64E-06	3,564891688	P	I
P02776	PF4	Platelet factor 4	8	852.66	1,57E-05	9,921863968	I	PI
P01009	SERPINA1	Alpha-1-antitrypsin	5	465.55	3,42E-05	4,584340558	P	I
P26038	MSN	Moesin	7	482.08	3,75E-05	20,94773484	PI	I
H3BM21	CD61	Integrin beta (Fragment)	4	228.09	5,02E-05	13,66585384	P	I
E9PHI6	DYNC1LI1	Cytoplasmic dynein 1 light intermediate chain 1	2	188.51	8,14E-05	34,14463145	I	P
Q96HY3	CALM2	CALM2 protein	2	227.76	8,64E-05	5,723389725	P	Q
P19878	NCF2	Neutrophil cytosol factor 2	3	193.34	0,000135	32,72370292	IP	I
P01024	C3	Complement C3	17	1241.19	0,000144	3,272366345	IP	I
J3KS13	CLTC	Clathrin heavy chain 1	2	99.08	0,000156	289,9186041	PI	Q
A0A140TA44	C4A	Complement C4-A	6	382.3	0,000173	2,809461036	IP	Q
P14780	MMP9	Matrix metalloproteinase-9	16	1074.23	0,000299	4,494917936	I	P
P02775	PPBP	Platelet basic protein	6	566.32	0,000355	7,259812659	I	PI
P04114	APOB	Apolipoprotein B-100	4	198.12	0,000446	3,158109288	PI	Q
H0Y579	RAD23B	UV excision repair protein RAD23 homolog B (Fragment)	3	246.15	0,000448	5,011544834	I	IP

Q0VD83	APOBR	Apolipoprotein B receptor	2	161.56	0,000489	76,15700808	P	Q
P22894	MMP8	Neutrophil collagenase	10	797.46	0,000509	4,204055813	I	P
A0A0G2JNE7	LILRB2	Leukocyte immunoglobulin-like receptor subfamily B member 2	2	300.77	0,000632	2,731820718	I	P
P10124	SRGN	Serglycin	2	122.85	0,000696	5,22057854	I	P
P06744	GPI	Glucose-6-phosphate isomerase	3	133.68	0,000736	69,18239724	P	IP
G8JLA2	MYL6	Myosin light polypeptide 6	3	172.78	0,00094	4,915554504	P	I
P02787	TF	Serotransferrin	4	278.34	0,001065	16,26761745	P	I
E7EQB2	LTF	Lactotransferrin (Fragment)	64	3879.9	0,001131	3,218701323	I	P
B7ZKW8	RCSD1	CapZ-interacting protein	3	215.74	0,001185	29,36028022	I	P
O15145	ARPC3	Actin-related protein 2/3 complex subunit 3	2	92.52	0,001316	20,71109057	IP	I
P54108	CRISP3	Cysteine-rich secretory protein 3	4	383.55	0,001457	3,742260319	I	P
A0A0A0MRZ8	IGKV3D-11	Immunoglobulin kappa variable 3D-11	2	162.92	0,001491	47,87356432	IP	I
A0A0A0MT10	BIN2	Bridging integrator 2 (Fragment)	3	198.39	0,001798	3,744918693	I	IP
P08311	CTSG	Cathepsin G	2	120.39	0,001837	26029,54767	P	I
P26022	PTX3	Pentraxin-related protein PTX3	2	164.7	0,001872	3,965791227	I	P
D3DSM0	ITGB2	Integrin beta	2	163	0,001879	7,443332358	P	I
D6REY1	CHIT1	Chitotriosidase-1	4	265.37	0,001911	4,795699487	I	P
C9JU59	LSP1	Lymphocyte-specific protein 1 (Fragment)	2	120.79	0,001979	20,56646075	P	Q
P32320	CDA	Cytidine deaminase	2	98.76	0,001992	2,732907193	Q	IP
P36222	CHI3L1	Chitinase-3-like protein 1	6	411.58	0,002067	4,277186879	I	P
E9PFZ2	CP	Ceruloplasmin	5	349.32	0,002217	4,318127907	IP	I
P61160	ACTR2	Actin-related protein 2	3	178.62	0,002277	5,379675419	P	Q
P04275	VWF	von Willebrand factor	6	361.49	0,003026	4,342327945	I	IP
P04004	VTN	Vitronectin	2	107.91	0,003324	4,84931672	IP	Q
P08670	VIM	Vimentin	8	495.9	0,003367	5,126462235	PI	Q
P00558	PGK1	Phosphoglycerate kinase 1	3	160.95	0,00373	4,652322923	PI	Q

P52566	ARHGDIB	Rho GDP-dissociation inhibitor 2	3	202.28	0,00396	3,499286821	P	I
P09486	SPARC	SPARC	3	279.14	0,004022	10,55598061	I	PI
P04083	ANXA1	Annexin A1	7	477.59	0,004215	6,507880045	IP	I
P02765	AHSG	Alpha-2-HS-glycoprotein	2	273.4	0,004258	5,217989972	P	I
P46940	IQGAP1	Ras GTPase-activating-like protein IQGAP1	6	341.83	0,005906	6,93996474	PI	Q
Q9Y490	TLN1	Talin-1	19	1326.36	0,005992	12,4474577	PI	Q
P62805	H4-16	Histone H4	3	183.73	0,006182	24,22164161	P	Q
P06576	ATP5F1B	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	3	162.57	0,006242	3,636998878	Q	IP
P08238	HSP90AB1	Heat shock protein HSP 90-beta	2	165.65	0,006392	34,00218614	PI	Q
O14672	ADAM10	Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 10	2	130.57	0,00667	6,428849882	P	Q
P50395	GDI2	Rab GDP dissociation inhibitor beta	2	130.3	0,00679	9,975712584	P	PI
P08603	CFH	Complement factor H	5	298.37	0,00711	16,04621871	PI	Q
P30101	PDIA3	Protein disulfide-isomerase A3	3	205.73	0,007307	5,017297479	P	IP
C9JS14	QPCT	Glutaminyl-peptide cyclotransferase (Fragment)	2	86.56	0,007541	4,996048321	I	P
O75594	PGLYRP1	Peptidoglycan recognition protein 1	5	383.03	0,007616	2,799925898	I	P
P02747	C1QC	Complement C1q subcomponent subunit C	2	132.98	0,007834	7,352567746	PI	I
A0A0G2JMB2	IGHA2	Immunoglobulin heavy constant alpha 2 (Fragment)	2	245.95	0,008163	3,796664527	P	I
P80188	LCN2	Neutrophil gelatinase-associated lipocalin	13	1185.89	0,008252	6,154615379	PI	P
A0A0M3HER1	LIMS1	LIM and senescent cell antigen-like- containing domain protein 1 (Fragment)	2	122.12	0,008639	10,57999152	PI	IP
P40197	GP5	Platelet glycoprotein V	3	205.04	0,009073	8,351720651	I	PI
Q6WKZ4	RAB11FIP1	Rab11 family-interacting protein 1	2	124.32	0,009345	6,496450206	Q	IP
P07996	THBS1	Thrombospondin-1	18	1328.31	0,00945	6,274853437	I	PI

H3BR68	ALDOA	Fructose-bisphosphate aldolase A (Fragment)	2	175.51	0,009537	7,671909525	P	I
Q9NZF1	PLAC8	Placenta-specific gene 8 protein	4	209.5	0,009934	3,859640847	P	IP
P05109	S100A8	Protein S100-A8	4	148.05	0,010255	2,593981741	P	IP
P04003	C4BPA	C4b-binding protein alpha chain	2	196.55	0,011748	4,249521706	P	I
S4R471	AMBP	Protein AMBP (Fragment)	2	168.13	0,012366	41,83551723	PI	I
H7BXD5	GCA	Grancalcin	4	208.74	0,012486	12,52553473	P	I
A0A3B3IS95	MDH2	L-lactate dehydrogenase	3	219.59	0,012627	4,573047028	P	I
P20160	AZU1	Azurocidin	9	621.62	0,012898	5,382740274	I	P
I3L312	P4HB	Protein disulfide-isomerase (Fragment)	3	159.08	0,013576	3,023082358	PI	I
C9J8U2	NAPRT	Nicotinate phosphoribosyltransferase domain containing 1, isoform CRA_e	3	204.39	0,015734	4,050243044	Q	PI
P01857	IGHG1	Immunoglobulin heavy constant gamma 1	4	208.32	0,016011	3,431419784	P	I
G3V4X5	PSMA3	Proteasome endopeptidase complex	2	100.97	0,016235	5,592095808	PI	IP
Q6ZNJ1	NBEAL2	Neurobeachin-like protein 2	2	185.42	0,021166	3,097657592	P	IP
A0A2R8Y7C0	HBA2	Hemoglobin subunit alpha (Fragment)	3	117.85	0,021234	63,09675277	P	PI
O75563	SKAP2	Src kinase-associated phosphoprotein 2	2	124.66	0,02138	3,745099954	I	IP
P18206	VCL	Vinculin	4	212.97	0,024134	6200,834109	PI	Q
P07737	PFN1	Profilin-1	4	229.69	0,024138	3,788316379	IP	PI
M0R042	TUBB4A	Tubulin beta chain (Fragment)	2	130.75	0,027915	2,17347259	Q	IP
P02790	HPX	Hemopexin	2	147.52	0,028154	17,35809883	Q	IP
P00491	PNP	Purine nucleoside phosphorylase	2	147.35	0,029143	2,724477314	Q	P
P78527	PRKDC	DNA-dependent protein kinase catalytic subunit	2	151.46	0,030981	3,228629494	PI	P
E9PN89	HSPA8	Heat shock cognate 71 kDa protein (Fragment)	2	80.58	0,031255	439,790087	PI	Q
D6RBJ7	GC	Vitamin D-binding protein	2	126.37	0,031315	230,1735972	IP	I
O00391	QSOX1	Sulfhydryl oxidase 1	2	85.73	0,034083	7,486184894	I	P
P13639	EEF2	Elongation factor 2	2	195.4	0,035673	10,40757245	IP	I

P12814	ACTN1	Alpha-actinin-1	4	325.73	0,036936	25,38219158	PI	I
P25705	ATP5F1A	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	2	101.86	0,042922	3,253863803	P	Q
P04839	CYBB	Cytochrome b-245 heavy chain	4	282.29	0,047259	17,73976813	PI	P
A0A087X1X5	CNN2	Calponin (Fragment)	4	305.71	0,047626	2,620236116	Q	P
P01023	A2M	Alpha-2-macroglobulin	10	696.07	6,69E+07	3,597190873	P	Q
Proteínas com peptídeo único								
Nº acesso	Nome do gene	Proteína	Peptídeos	Score de confiança	Anova (p)	Máximo fold change	Regulada+	Regulada-
H3BS49	RAB27A	Ras-related protein Rab-27A (Fragment)	1	121.17	4,77E-06	6,49610699	P	I
P61978	HNRNPK	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	1	26.78	2,82E-05	106,5428429	I	P
D6RG15	TWF2	Twinfilin-2	1	34.79	4,71E-05	356,4845732	P	I
Q9NQC3	RTN4	Reticulon-4	1	71.03	4,98E-05	12,49516919	P	I
H0Y2P0	CD44	CD44 antigen (Fragment)	1	98.87	8,9E-05	55,23938324	P	I
P11169	SLC2A3	Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 3	1	90.1	0,000302	44,43051112	P	I
Q96GS4	BORCS6	BL	1	99.69	0,000326	341,2402768	P	Q
Q01082	SPTBN1	Spectrin beta chain, non-erythrocytic 1	1	43.18	0,000393	48,00200218	P	I
A0A087X1N8	SERPINB6	Serpin B6	1	33.29	0,000536	3,582016945	I	P
A0A0A0MRG2	APP	Amyloid-beta A4 protein	1	42.81	0,000601	14,31805954	I	P
P04899	GNAI2	Guanine nucleotide-binding protein G(i) subunit alpha-2	1	100.15	0,000739	20,49913929	PI	I
Q8IXZ2	ZC3H3	Zinc finger CCCH domain-containing protein 3	1	22.74	0,001252	15,69021484	IP	P
P49411	TUFM	Elongation factor Tu, mitochondrial	1	61.58	0,001342	26,45089223	IP	I
F6S2S5	LASP1	LIM and SH3 domain protein 1	1	97.56	0,002984	48,07393751	PI	I
A0A087WSY6	IGKV3D-15	Immunoglobulin kappa variable 3D-15	1	97.42	0,003427	6,714500871	P	Q
P27105	STOM	Erythrocyte band 7 integral membrane protein	1	42.61	0,003521	8,100893768	Q	IP

H7C1A7	RENBP	N-acylglucosamine 2-epimerase (Fragment)	1	69.47	0,003559	5,179596349	P	IP
E9PNJ4	STIM1	Stromal interaction molecule 1	1	36.73	0,003751	12,15024826	I	IP
E7EVW7	HCLS1	Hematopoietic lineage cell-specific protein	1	75.01	0,004079	9,978055135	PI	Q
C9J0D1	H2AZ2	Histone H2A	1	52.2	0,004131	112,7697502	PI	I
A0A3B3ITU4	C1R	Complement C1r subcomponent (Fragment)	1	73.14	0,004229	23,96899446	IP	I
E7EWC2	IQGAP2	Ras GTPase-activating-like protein IQGAP2 (Fragment)	1	85.16	0,004775	Infinity	P	I
C9JDZ3	MME	Neprilysin (Fragment)	1	115.98	0,005329	7,865181954	IP	P
F8VNZ9	DGKA	Diacylglycerol kinase alpha (Fragment)	1	83.53	0,005595	6,581297913	PI	Q
P35858	IGFALS	Insulin-like growth factor-binding protein complex acid labile subunit	1	60.85	0,00577	39,35519723	Q	I
D6RHJ3	CANX	Calnexin (Fragment)	1	104.73	0,006012	6,775144055	P	Q
D6R9A6	HMGB2	High mobility group protein B2 (Fragment)	1	86.35	0,006102	14,69840746	IP	PI
O14980	XPO1	Exportin-1	1	28.25	0,006195	8,464433494	I	IP
Q9Y6V0	PCLO	Protein piccolo	1	30.38	0,00631	10,03388763	P	I
F5H6N9	MEFV	Pyrin	1	37.64	0,006456	7,830547091	I	IP
C9JCK5	PSMA2	Proteasome endopeptidase complex	1	68.32	0,007113	5,66860395	I	IP
P13807	GYS1	Glycogen [starch] synthase, muscle	1	78.29	0,007358	Infinity	P	I
P01871	IGHM	Immunoglobulin heavy constant mu	1	117.02	0,007399	6,200321777	IP	I
Q5VU61	TPM3	Tropomyosin alpha-3 chain	1	61.93	0,007791	44,92636935	P	Q
Q9UEY8	ADD3	Gamma-adducin	1	70.51	0,007937	81,25689731	I	IP
O75947	ATP5PD	ATP synthase subunit d, mitochondrial	1	75.74	0,008516	2,771469038	P	IP
P19086	GNAZ	Guanine nucleotide-binding protein G(z) subunit alpha	1	85.38	0,00855	43,27384562	Q	I
B7Z4L4	RPN1	Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit 1	1	80.58	0,009477	52,81126963	P	Q
Q9NRX4	PHPT1	14 kDa phosphohistidine phosphatase	1	51.2	0,009483	4,706396826	Q	PI

H0YI36	ARHGAP9	Rho GTPase-activating protein 9 (Fragment)	1	76.66	0,010773	8,63171442	P	PI
P11021	HSPA5	Endoplasmic reticulum chaperone BiP	1	47	0,010788	507,0119596	PI	P
K7EL96	PLIN3	Perilipin-3 (Fragment)	1	98.29	0,010822	11,17297996	IP	Q
P31930	UQCRC1	Cytochrome b-c1 complex subunit 1, mitochondrial	1	107.17	0,010965	2,652805536	P	IP
Q562R1	ACTBL2	Beta-actin-like protein 2	1	53.18	0,011392	250,0433371	Q	PI
Q96CX2	KCTD12	BTB/P	1	49.13	0,011446	11,22636986	I	IP
A0A087WUI2	HNRNPA2B1	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1	1	84.91	0,011812	9,312356923	I	IP
P05556	ITGB1	Integrin beta-1	1	68.32	0,012017	10,16608752	P	I
C9J8H1	ATP6V1E1	V-type proton ATPase subunit E 1 (Fragment)	1	73.68	0,012355	2,694667109	I	IP
P16284	PECAM1	Platelet endothelial cell adhesion molecule	1	65.09	0,012801	13,27356853	I	IP
H7C1S1	NCF1	Neutrophil cytosol factor 1 (Fragment)	1	93.46	0,013987	2,506691897	P	I
J3QTI8	OLR1	Oxidized low-density lipoprotein receptor 1 (Fragment)	1	42.54	0,014512	7,818109415	I	P
Q14739	LBR	Lamin-B receptor	1	34.7	0,015085	Infinity	P	IP
E7ESD2	WASHC2A	WASH complex subunit 2A	1	66.99	0,015846	37,81503928	P	Q
E7ETC2	PPP3CA	Serine/threonine-protein phosphatase	1	81.18	0,016475	254,4580355	PI	I
Q13045	FLII	Protein flightless-1 homolog	1	27.34	0,01661	Infinity	P	I
F8WE04	HSPB1	Heat shock protein beta-1	1	80.17	0,017655	19,69474979	P	I
P13667	PDIA4	Protein disulfide-isomerase A4	1	118.51	0,017884	3,260861094	P	IP
Q9BR76	CORO1B	Coronin-1B	1	89.61	0,017908	Infinity	P	Q
O60749	SNX2	Sorting nexin-2	1	52.18	0,017914	49,71717081	PI	IP
O43815	STRN	Striatin	1	117.47	0,018295	542,5502243	PI	I
C9J4S4	RAB7A	Ras-related protein Rab-7a	1	26.66	0,019258	14,05138725	I	PI
H7C059	ATG7	Ubiquitin-like modifier-activating enzyme ATG7 (Fragment)	1	68.54	0,019413	100,4234799	I	IP
A0A140T9T7	TAP1	Antigen peptide transporter 1	1	109.75	0,01965	3,049894611	PI	IP

E7EQN5	ARHGAP4	Rho GTPase-activating protein 4	1	67.23	0,019785	6,294642874	I	IP
O00560	SDCBP	Syntenin-1	1	30.26	0,019978	Infinity	PI	P
O75558	STX11	Syntaxin-11	1	85.96	0,020371	129,0111052	P	PI
F8VZG5	AK2	Adenylate kinase 2, mitochondrial	1	50.09	0,020659	23,14628753	P	IP
H0YMA0	SNRPA1	U2 small nuclear ribonucleoprotein A' (Fragment)	1	56.47	0,020703	2,762360367	PI	IP
A0A0C4DH38	IGHV5-51	Immunoglobulin heavy variable 5-51	1	73.24	0,020785	2,729250795	PI	I
A0A1X7SBS1	HNRNPU	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U	1	46.65	0,020948	3,942356741	Q	IP
Q8WXI7	MUC16	Mucin-16	1	43.81	0,021093	42,79422196	PI	IP
B5MCX3	SEPT2	Septin-2	1	74.09	0,021119	35,1043	P	PI
X6R6Z1	ILF2	Interleukin enhancer-binding factor 2 (Fragment)	1	71.49	0,021121	2,080603535	Q	IP
P04217	A1BG	Alpha-1B-glycoprotein	1	80.54	0,021377	8,051076504	P	IP
Q16610	ECM1	Extracellular matrix protein 1	1	66.3	0,021574	Infinity	Q	I
P11678	EPX	Eosinophil peroxidase	1	68.51	0,021915	Infinity	PI	P
Q7Z434	MAVS	Mitochondrial antiviral-signaling protein	1	48.86	0,021962	6,020013618	I	IP
K7EQ17	NOL4	Nucleolar protein 4 (Fragment)	1	38.82	0,022076	913,1542942	I	P
H0YGG5	A2ML1	Alpha-2-macroglobulin-like protein 1 (Fragment)	1	22.67	0,022078	21,94803461	Q	PI
E9PPB3	SORL1	Sortilin-related receptor	1	62.78	0,023021	3,43770618	I	P
Q7Z794	KRT77	Keratin, type II cytoskeletal 1b	1	50.9	0,023565	23,74191857	P	Q
O43707	ACTN4	Alpha-actinin-4	1	67.52	0,023688	7,512459611	P	IP
A0A087WVM2	CD177	CD177 antigen	1	88.91	0,023873	219,7245407	PI	I
K7ERF0	ICAM3	Intercellular adhesion molecule 3 (Fragment)	1	103.58	0,024674	68,23589127	I	P
P50225	SULT1A1	Sulfotransferase 1A1	1	50.6	0,024981	2,92165713	Q	P
Q02413	DSG1	Desmoglein-1	1	67.67	0,027015	304,3537118	IP	Q
P51991	HNRNPA3	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3	1	63.23	0,027269	8,077705982	P	PI

F5GXY2	LDHA	L-lactate dehydrogenase A chain (Fragment)	1	90.67	0,027784	4,22072967	Q	PI
M0QYG6	MCEMP1	Uncharacterized protein (Fragment)	1	107.62	0,028189	4,232207502	PI	I
P25098	GRK2	Beta-adrenergic receptor kinase 1	1	68.69	0,028283	10,16670637	IP	Q
P48735	IDH2	Isocitrate dehydrogenase [NADP], mitochondrial	1	73.94	0,02844	10,08055067	IP	I
O43747	AP1G1	AP-1 complex subunit gamma-1	1	81.13	0,028832	2,989440904	I	P
P59665	DEFA1	Neutrophil defensin 1	1	68.7	0,02936	4,841169407	Q	IP
C9JJ34	RANBP1	Ran-specific GTPase-activating protein (Fragment)	1	73.96	0,029498	8,021630108	Q	P
A0A087X253	AP2B1	AP complex subunit beta	1	41.62	0,029777	2,595624379	Q	IP
H0YLH9	IL16	Pro-interleukin-16 (Fragment)	1	108.27	0,02995	59,06683064	PI	I
P36871	PGM1	Phosphoglucomutase-1	1	29.45	0,03023	754,3145589	IP	Q
D6RD66	WDR1	WD repeat-containing protein 1 (Fragment)	1	101.31	0,030298	Infinity	P	Q
P46013	MKI67	Proliferation marker protein Ki-67	1	25.74	0,030955	8,126736697	I	Q
O14983	ATP2A1	Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 1	1	52.49	0,031095	6,566480144	P	PI
B7ZL14	FNBP1	FNBP1 protein	1	90.71	0,031441	9,131498916	PI	IP
A0A3B3ISK1	COPA	Coatomer subunit alpha	1	119.83	0,031769	6,26931411	I	IP
A0A087WZB5	PARVB	Beta-parvin	1	54.36	0,032231	35,23534942	P	IP
E9PNV5	NAV2	Neuron navigator 2 (Fragment)	1	25.17	0,032343	5,703736112	I	P
F2Z393	TALDO1	Transaldolase	1	50.98	0,032577	Infinity	IP	P
F8VSC4	METAP2	Methionine aminopeptidase 2 (Fragment)	1	31.34	0,033088	6,570307847	PI	IP
B4E1S2	ANXA4	Annexin	1	38.92	0,033191	14,42774329	IP	PI
H0YNE9	RAB8B	Ras-related protein Rab-8B (Fragment)	1	34.27	0,033518	23,28798402	PI	Q
J3KTC3	HPR	Haptoglobin-related protein	1	49.99	0,033919	187,4784851	IP	I
K7ER96	TXNL1	Thioredoxin-like protein 1 (Fragment)	1	66.76	0,034258	3,514243847	PI	P
P04179	SOD2	Superoxide dismutase [Mn], mitochondrial	1	22.09	0,03433	160,820978	P	Q

A0A0B4J1R6	TKT	Transketolase	1	29.35	0,034513	3122,239184	P	PI
E9PGM1	EIF4G1	Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 1	1	40.96	0,034609	3,657529753	I	PI
A0A0A0MRJ8	ARHGAP30	Rho GTPase-activating protein 30	1	29.31	0,034672	2,490498345	Q	I
Q14165	MLEC	Malectin	1	90.7	0,035257	3,273256117	PI	IP
P31942	HNRNPH3	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H3	1	59.07	0,035388	7,823117036	I	P
Q5JR95	RPS8	40S ribosomal protein S8	1	79.38	0,035599	3,082646788	Q	IP
Q14315	FLNC	Filamin-C	1	31.66	0,035684	26489,40129	IP	I
P07954	FH	Fumarate hydratase, mitochondrial	1	83.4	0,035991	2,220492574	Q	IP
E9PEW8	HBD	Hemoglobin subunit delta (Fragment)	1	35.03	0,036128	446,6344936	Q	PI
P13224	GP1BB	Platelet glycoprotein Ib beta chain	1	52.18	0,03633	Infinity	I	IP
K7ENW1	TNPO2	Transportin-2 (Fragment)	1	30.61	0,036451	6,363361778	I	P
D6RAU2	RACK1	Receptor of-activated protein C kinase 1	1	71.99	0,037094	8,895534395	I	PI
J3QKZ9	EIF4A1	Eukaryotic initiation factor 4A-I (Fragment)	1	77.59	0,037434	3,916719517	PI	IP
H7C1D4	TSN	Translin (Fragment)	1	76.88	0,037471	7,397307514	I	P
Q5SQT6	PPA1	Inorganic pyrophosphatase	1	78.21	0,037539	51,64239639	P	PI
P00390	GSR	Glutathione reductase, mitochondrial	1	48.21	0,037744	3,061910891	IP	Q
Q9ULZ3	PYCARD	Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD	1	36.98	0,038356	5,929649606	Q	IP
P0DPH7	TUBA3C	Tubulin alpha-3C chain	1	29.48	0,038671	20,71414683	Q	PI
A0A0U1RQX0	TXNRD2	Thioredoxin reductase 2, mitochondrial (Fragment)	1	28.46	0,039398	8,352033483	PI	I
P02748	C9	Complement component C9	1	70.95	0,039423	2,255209071	IP	Q
O95678	KRT75	Keratin, type II cytoskeletal 75	1	33.92	0,039521	5,674854301	P	Q
O75636	FCN3	Ficolin-3	1	52.07	0,040026	17,17516011	Q	I
A0A0G2JR51	NCF4	Neutrophil cytosol factor 4 (Fragment)	1	33.48	0,040171	22,5826053	IP	P
P26641	EEF1G	Elongation factor 1-gamma	1	134.83	0,040487	2,714163096	Q	IP

P04439	HLA-A	HLA class I histocompatibility antigen, A-3 alpha chain	1	86.88	0,040566	4,461847874	P	Q
P49913	CAMP	Cathelicidin antimicrobial peptide	1	89.32	0,041009	9,517411093	I	IP
P02533	KRT14	Keratin, type I cytoskeletal 14	1	45.85	0,041163	Infinity	PI	Q
B4E0K5	MAPK14	Mitogen-activated protein kinase	1	48.31	0,041175	102,8081768	IP	I
Q92616	GCN1	eIF-2-alpha kinase activator GCN1	1	43.8	0,041198	2,033028088	I	PI
G5EA31	SEC24C	Protein transport protein Sec24C	1	93.45	0,041453	6,591369245	PI	IP
P61981	YWHAG	14-3-3 protein gamma	1	125.43	0,041607	184,742385	IP	I
Q70J99	UNC13D	Protein unc-13 homolog D	1	93.85	0,041985	3,939929681	Q	IP
H0YAC1	KLKB1	Plasma kallikrein (Fragment)	1	46.21	0,042145	38,91567753	Q	P
C9JVG3	UGP2	UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase (Fragment)	1	84.86	0,042441	13,71480036	PI	P
O00151	PDLIM1	PDZ and LIM domain protein 1	1	87.94	0,042542	7,787156731	P	PI
E7ETM8	NEXN	Nexilin (Fragment)	1	51.01	0,04286	3,472167096	P	IP
P01031	C5	Complement C5	1	80.44	0,043175	2,297256569	PI	IP
Q14766	LTBP1	Latent-transforming growth factor beta-binding protein 1	1	81.59	0,043596	2,034311172	I	PI
E9PIT3	F2	Prothrombin	1	101.6	0,043924	6,249227914	IP	Q
P35573	AGL	Glycogen debranching enzyme	1	69.75	0,043992	7,252143833	I	P
P48595	SERPINB10	Serpin B10	1	130.29	0,045854	3,731441885	Q	IP
P01602	IGKV1-5	Immunoglobulin kappa variable 1-5	1	25.36	0,046066	5,858919063	PI	Q
Q9UH99	SUN2	SUN domain-containing protein 2	1	126.79	0,046151	2,683527552	Q	IP
Q86YZ3	HRNR	Hornerin	1	121.33	0,046272	Infinity	PI	I
S4R3H4	ACIN1	Apoptotic chromatin condensation inducer in the nucleus	1	117.24	0,046346	5,114356874	I	P
F5GX73	MGST1	Microsomal glutathione S-transferase 1 (Fragment)	1	89.44	0,047377	2,472956252	PI	P
G3V5X6	HNRNPC	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins C1/C2 (Fragment)	1	113.41	0,047914	3,02120587	I	IP
P53396	ACLY	ATP-citrate synthase	1	29.28	0,048038	380,2171822	Q	PI

B6VEX4	ABI1	Abl interactor 1	1	59.93	0,048186	3,492587496	Q	P
A0A087WVQ9	EEF1A1	Elongation factor 1-alpha 1	1	30.27	0,048733	3,382164234	Q	IP
P30520	ADSS2	Adenylosuccinate synthetase isozyme 2	1	31.05	0,048833	6,112360491	PI	P
P27449	ATP6V0C	V-type proton ATPase 16 kDa proteolipid subunit	1	44.01	0,048871	6,425359688	PI	I
A8MU58	AIMP2	Aminoacyl tRNA synthase complex-interacting multifunctional protein 2	1	48.53	0,048902	4,805134822	IP	P
B4DQI4	ABHD14B	Protein ABHD14B	1	71.39	0,04903	Infinity	P	I
P23142	FBLN1	Fibulin-1	1	63.9	0,049063	347,3720883	I	Q
E9PDE4	CAST	Calpastatin	1	56.12	0,049232	5,321295463	Q	PI
P35542	SAA4	Serum amyloid A-4 protein	1	109.68	0,049337	14,02144401	P	PI
Q9NUQ3	TXLNG	Gamma-taxilin	1	24.08	0,049537	Infinity	P	I
C9JRH2	RCC1	Regulator of chromosome condensation (Fragment)	1	86.49	0,04962	5,570044229	I	P
O00743	PPP6C	Serine/threonine-protein phosphatase 6 catalytic subunit	1	45	0,049847	4,637426523	PI	P
F8WAS2	ITIH1	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H1	1	25.12	0,049997	Infinity	IP	I
Nº acesso	Nome do gene	Proteína	Peptídeos	Score de confiança	Anova (p)	Máximo fold change	Regulada+	Regulada-
P00747	PLG	Plasminogen	3	199.81	1,37E-06	7,442711595	P	I
O15389	SIGLEC5	Sialic acid-binding Ig-like lectin 5	2	154.15	2,29E-06	8,49715761	I	P
P01859	IGHG2	Immunoglobulin heavy constant gamma 2	8	503.18	2,53E-06	4,538183143	PI	I
A0A0C4DGB6	ALB	Serum albumin	34	2276.33	4,64E-06	3,564891688	P	I
P02776	PF4	Platelet factor 4	8	852.66	1,57E-05	9,921863968	I	PI
P01009	SERPINA1	Alpha-1-antitrypsin	5	465.55	3,42E-05	4,584340558	P	I
P26038	MSN	Moesin	7	482.08	3,75E-05	20,94773484	PI	I
H3BM21	CD61	Integrin beta (Fragment)	4	228.09	5,02E-05	13,66585384	P	I
E9PHI6	DYNC1LI1	Cytoplasmic dynein 1 light intermediate chain 1	2	188.51	8,14E-05	34,14463145	I	P

Q96HY3	CALM2	CALM2 protein	2	227.76	8,64E-05	5,723389725	P	Q
P19878	NCF2	Neutrophil cytosol factor 2	3	193.34	0,000135	32,72370292	IP	I
P01024	C3	Complement C3	17	1241.19	0,000144	3,272366345	IP	I
J3KS13	CLTC	Clathrin heavy chain 1	2	99.08	0,000156	289,9186041	PI	Q
A0A140TA44	C4A	Complement C4-A	6	382.3	0,000173	2,809461036	IP	Q
P14780	MMP9	Matrix metalloproteinase-9	16	1074.23	0,000299	4,494917936	I	P
P02775	PPBP	Platelet basic protein	6	566.32	0,000355	7,259812659	I	PI
P04114	APOB	Apolipoprotein B-100	4	198.12	0,000446	3,158109288	PI	Q
H0Y579	RAD23B	UV excision repair protein RAD23 homolog B (Fragment)	3	246.15	0,000448	5,011544834	I	IP
Q0VD83	APOBR	Apolipoprotein B receptor	2	161.56	0,000489	76,15700808	P	Q
P22894	MMP8	Neutrophil collagenase	10	797.46	0,000509	4,204055813	I	P
A0A0G2JNE7	LILRB2	Leukocyte immunoglobulin-like receptor subfamily B member 2	2	300.77	0,000632	2,731820718	I	P
P10124	SRGN	Serglycin	2	122.85	0,000696	5,22057854	I	P
P06744	GPI	Glucose-6-phosphate isomerase	3	133.68	0,000736	69,18239724	P	IP
G8JLA2	MYL6	Myosin light polypeptide 6	3	172.78	0,00094	4,915554504	P	I
P02787	TF	Serotransferrin	4	278.34	0,001065	16,26761745	P	I
E7EQB2	LTF	Lactotransferrin (Fragment)	64	3879.9	0,001131	3,218701323	I	P
B7ZKW8	RCSD1	CapZ-interacting protein	3	215.74	0,001185	29,36028022	I	P
O15145	ARPC3	Actin-related protein 2/3 complex subunit 3	2	92.52	0,001316	20,71109057	IP	I
P54108	CRISP3	Cysteine-rich secretory protein 3	4	383.55	0,001457	3,742260319	I	P
A0A0A0MRZ8	IGKV3D-11	Immunoglobulin kappa variable 3D-11	2	162.92	0,001491	47,87356432	IP	I
A0A0A0MT10	BIN2	Bridging integrator 2 (Fragment)	3	198.39	0,001798	3,744918693	I	IP
P08311	CTSG	Cathepsin G	2	120.39	0,001837	26029,54767	P	I
P26022	PTX3	Pentraxin-related protein PTX3	2	164.7	0,001872	3,965791227	I	P
D3DSM0	ITGB2	Integrin beta	2	163	0,001879	7,443332358	P	I
D6REY1	CHIT1	Chitotriosidase-1	4	265.37	0,001911	4,795699487	I	P

C9JU59	LSP1	Lymphocyte-specific protein 1 (Fragment)	2	120.79	0,001979	20,56646075	P	Q
P32320	CDA	Cytidine deaminase	2	98.76	0,001992	2,732907193	Q	IP
P36222	CHI3L1	Chitinase-3-like protein 1	6	411.58	0,002067	4,277186879	I	P
E9PFZ2	CP	Ceruloplasmin	5	349.32	0,002217	4,318127907	IP	I
P61160	ACTR2	Actin-related protein 2	3	178.62	0,002277	5,379675419	P	Q
P04275	VWF	von Willebrand factor	6	361.49	0,003026	4,342327945	I	IP
P04004	VTN	Vitronectin	2	107.91	0,003324	4,84931672	IP	Q
P08670	VIM	Vimentin	8	495.9	0,003367	5,126462235	PI	Q
P00558	PGK1	Phosphoglycerate kinase 1	3	160.95	0,00373	4,652322923	PI	Q
P52566	ARHGDIB	Rho GDP-dissociation inhibitor 2	3	202.28	0,00396	3,499286821	P	I
P09486	SPARC	SPARC	3	279.14	0,004022	10,55598061	I	PI
P04083	ANXA1	Annexin A1	7	477.59	0,004215	6,507880045	IP	I
P02765	AHSG	Alpha-2-HS-glycoprotein	2	273.4	0,004258	5,217989972	P	I
P46940	IQGAP1	Ras GTPase-activating-like protein IQGAP1	6	341.83	0,005906	6,93996474	PI	Q
Q9Y490	TLN1	Talin-1	19	1326.36	0,005992	12,4474577	PI	Q
P62805	H4-16	Histone H4	3	183.73	0,006182	24,22164161	P	Q
P06576	ATP5F1B	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	3	162.57	0,006242	3,636998878	Q	IP
P08238	HSP90AB1	Heat shock protein HSP 90-beta	2	165.65	0,006392	34,00218614	PI	Q
O14672	ADAM10	Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 10	2	130.57	0,00667	6,428849882	P	Q
P50395	GDI2	Rab GDP dissociation inhibitor beta	2	130.3	0,00679	9,975712584	P	PI
P08603	CFH	Complement factor H	5	298.37	0,00711	16,04621871	PI	Q
P30101	PDIA3	Protein disulfide-isomerase A3	3	205.73	0,007307	5,017297479	P	IP
C9JS14	QPCT	GlutaminyI-peptide cyclotransferase (Fragment)	2	86.56	0,007541	4,996048321	I	P
O75594	PGLYRP1	Peptidoglycan recognition protein 1	5	383.03	0,007616	2,799925898	I	P

P02747	C1QC	Complement C1q subcomponent subunit C	2	132.98	0,007834	7,352567746	PI	I
A0A0G2JMB2	IGHA2	Immunoglobulin heavy constant alpha 2 (Fragment)	2	245.95	0,008163	3,796664527	P	I
P80188	LCN2	Neutrophil gelatinase-associated lipocalin	13	1185.89	0,008252	6,154615379	PI	P
A0A0M3HER1	LIMS1	LIM and senescent cell antigen-like-containing domain protein 1 (Fragment)	2	122.12	0,008639	10,57999152	PI	IP
P40197	GP5	Platelet glycoprotein V	3	205.04	0,009073	8,351720651	I	PI
Q6WKZ4	RAB11FIP1	Rab11 family-interacting protein 1	2	124.32	0,009345	6,496450206	Q	IP
P07996	THBS1	Thrombospondin-1	18	1328.31	0,00945	6,274853437	I	PI
H3BR68	ALDOA	Fructose-bisphosphate aldolase A (Fragment)	2	175.51	0,009537	7,671909525	P	I
Q9NZF1	PLAC8	Placenta-specific gene 8 protein	4	209.5	0,009934	3,859640847	P	IP
P05109	S100A8	Protein S100-A8	4	148.05	0,010255	2,593981741	P	IP
P04003	C4BPA	C4b-binding protein alpha chain	2	196.55	0,011748	4,249521706	P	I
S4R471	AMBP	Protein AMBP (Fragment)	2	168.13	0,012366	41,83551723	PI	I
H7BXD5	GCA	Grancalcin	4	208.74	0,012486	12,52553473	P	I
A0A3B3IS95	MDH2	L-lactate dehydrogenase	3	219.59	0,012627	4,573047028	P	I
P20160	AZU1	Azurocidin	9	621.62	0,012898	5,382740274	I	P
I3L312	P4HB	Protein disulfide-isomerase (Fragment)	3	159.08	0,013576	3,023082358	PI	I
C9J8U2	NAPRT	Nicotinate phosphoribosyltransferase domain containing 1, isoform CRA_e	3	204.39	0,015734	4,050243044	Q	PI
P01857	IGHG1	Immunoglobulin heavy constant gamma 1	4	208.32	0,016011	3,431419784	P	I
G3V4X5	PSMA3	Proteasome endopeptidase complex	2	100.97	0,016235	5,592095808	PI	IP
Q6ZNJ1	NBEAL2	Neurobeachin-like protein 2	2	185.42	0,021166	3,097657592	P	IP
A0A2R8Y7C0	HBA2	Hemoglobin subunit alpha (Fragment)	3	117.85	0,021234	63,09675277	P	PI
O75563	SKAP2	Src kinase-associated phosphoprotein 2	2	124.66	0,02138	3,745099954	I	IP
P18206	VCL	Vinculin	4	212.97	0,024134	6200,834109	PI	Q
P07737	PFN1	Profilin-1	4	229.69	0,024138	3,788316379	IP	PI

M0R042	TUBB4A	Tubulin beta chain (Fragment)	2	130.75	0,027915	2,17347259	Q	IP
P02790	HPX	Hemopexin	2	147.52	0,028154	17,35809883	Q	IP
P00491	PNP	Purine nucleoside phosphorylase	2	147.35	0,029143	2,724477314	Q	P
P78527	PRKDC	DNA-dependent protein kinase catalytic subunit	2	151.46	0,030981	3,228629494	PI	P
E9PN89	HSPA8	Heat shock cognate 71 kDa protein (Fragment)	2	80.58	0,031255	439,790087	PI	Q
D6RBJ7	GC	Vitamin D-binding protein	2	126.37	0,031315	230,1735972	IP	I
O00391	QSOX1	Sulfhydryl oxidase 1	2	85.73	0,034083	7,486184894	I	P
P13639	EEF2	Elongation factor 2	2	195.4	0,035673	10,40757245	IP	I
P12814	ACTN1	Alpha-actinin-1	4	325.73	0,036936	25,38219158	PI	I
P25705	ATP5F1A	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	2	101.86	0,042922	3,253863803	P	Q
P04839	CYBB	Cytochrome b-245 heavy chain	4	282.29	0,047259	17,73976813	PI	P
A0A087X1X5	CNN2	Calponin (Fragment)	4	305.71	0,047626	2,620236116	Q	P
P01023	A2M	Alpha-2-macroglobulin	10	696.07	6,69E+07	3,597190873	P	Q

Proteínas com peptídeo único

Nº acesso	Nome do gene	Proteína	Peptídeos	Score de confiança	Anova (p)	Máximo fold change	Regulada+	Regulada-
H3BS49	RAB27A	Ras-related protein Rab-27A (Fragment)	1	121.17	4,77E-06	6,49610699	P	I
P61978	HNRNPK	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	1	26.78	2,82E-05	106,5428429	I	P
D6RG15	TWF2	Twinfilin-2	1	34.79	4,71E-05	356,4845732	P	I
Q9NQC3	RTN4	Reticulon-4	1	71.03	4,98E-05	12,49516919	P	I
HOY2P0	CD44	CD44 antigen (Fragment)	1	98.87	8,9E-05	55,23938324	P	I
P11169	SLC2A3	Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 3	1	90.1	0,000302	44,43051112	P	I
Q96GS4	BORCS6	BL	1	99.69	0,000326	341,2402768	P	Q
Q01082	SPTBN1	Spectrin beta chain, non-erythrocytic 1	1	43.18	0,000393	48,00200218	P	I
A0A087X1N8	SERPINB6	Serpin B6	1	33.29	0,000536	3,582016945	I	P

A0A0A0MRG2	APP	Amyloid-beta A4 protein	1	42.81	0,000601	14,31805954	I	P
P04899	GNAI2	Guanine nucleotide-binding protein G(i) subunit alpha-2	1	100.15	0,000739	20,49913929	PI	I
Q8IXZ2	ZC3H3	Zinc finger CCCH domain-containing protein 3	1	22.74	0,001252	15,69021484	IP	P
P49411	TUFM	Elongation factor Tu, mitochondrial	1	61.58	0,001342	26,45089223	IP	I
F6S2S5	LASP1	LIM and SH3 domain protein 1	1	97.56	0,002984	48,07393751	PI	I
A0A087WSY6	IGKV3D-15	Immunoglobulin kappa variable 3D-15	1	97.42	0,003427	6,714500871	P	Q
P27105	STOM	Erythrocyte band 7 integral membrane protein	1	42.61	0,003521	8,100893768	Q	IP
H7C1A7	RENBP	N-acylglucosamine 2-epimerase (Fragment)	1	69.47	0,003559	5,179596349	P	IP
E9PNJ4	STIM1	Stromal interaction molecule 1	1	36.73	0,003751	12,15024826	I	IP
E7EVW7	HCLS1	Hematopoietic lineage cell-specific protein	1	75.01	0,004079	9,978055135	PI	Q
C9J0D1	H2AZ2	Histone H2A	1	52.2	0,004131	112,7697502	PI	I
A0A3B3ITU4	C1R	Complement C1r subcomponent (Fragment)	1	73.14	0,004229	23,96899446	IP	I
E7EWC2	IQGAP2	Ras GTPase-activating-like protein IQGAP2 (Fragment)	1	85.16	0,004775	Infinity	P	I
C9JDZ3	MME	Nepriylsin (Fragment)	1	115.98	0,005329	7,865181954	IP	P
F8VNZ9	DGKA	Diacylglycerol kinase alpha (Fragment)	1	83.53	0,005595	6,581297913	PI	Q
P35858	IGFALS	Insulin-like growth factor-binding protein complex acid labile subunit	1	60.85	0,00577	39,35519723	Q	I
D6RHJ3	CANX	Calnexin (Fragment)	1	104.73	0,006012	6,775144055	P	Q
D6R9A6	HMGB2	High mobility group protein B2 (Fragment)	1	86.35	0,006102	14,69840746	IP	PI
O14980	XPO1	Exportin-1	1	28.25	0,006195	8,464433494	I	IP
Q9Y6V0	PCLO	Protein piccolo	1	30.38	0,00631	10,03388763	P	I
F5H6N9	MEFV	Pyrin	1	37.64	0,006456	7,830547091	I	IP
C9JCK5	PSMA2	Proteasome endopeptidase complex	1	68.32	0,007113	5,66860395	I	IP

P13807	GYS1	Glycogen [starch] synthase, muscle	1	78.29	0,007358	Infinity	P	I
P01871	IGHM	Immunoglobulin heavy constant mu	1	117.02	0,007399	6,200321777	IP	I
Q5VU61	TPM3	Tropomyosin alpha-3 chain	1	61.93	0,007791	44,92636935	P	Q
Q9UEY8	ADD3	Gamma-adducin	1	70.51	0,007937	81,25689731	I	IP
O75947	ATP5PD	ATP synthase subunit d, mitochondrial	1	75.74	0,008516	2,771469038	P	IP
P19086	GNAZ	Guanine nucleotide-binding protein G(z) subunit alpha	1	85.38	0,00855	43,27384562	Q	I
B7Z4L4	RPN1	Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit 1	1	80.58	0,009477	52,81126963	P	Q
Q9NRX4	PHPT1	14 kDa phosphohistidine phosphatase	1	51.2	0,009483	4,706396826	Q	PI
HOYI36	ARHGAP9	Rho GTPase-activating protein 9 (Fragment)	1	76.66	0,010773	8,63171442	P	PI
P11021	HSPA5	Endoplasmic reticulum chaperone BiP	1	47	0,010788	507,0119596	PI	P
K7EL96	PLIN3	Perilipin-3 (Fragment)	1	98.29	0,010822	11,17297996	IP	Q
P31930	UQCRC1	Cytochrome b-c1 complex subunit 1, mitochondrial	1	107.17	0,010965	2,652805536	P	IP
Q562R1	ACTBL2	Beta-actin-like protein 2	1	53.18	0,011392	250,0433371	Q	PI
Q96CX2	KCTD12	BTB/P	1	49.13	0,011446	11,22636986	I	IP
A0A087WUI2	HNRNPA2B1	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1	1	84.91	0,011812	9,312356923	I	IP
P05556	ITGB1	Integrin beta-1	1	68.32	0,012017	10,16608752	P	I
C9J8H1	ATP6V1E1	V-type proton ATPase subunit E 1 (Fragment)	1	73.68	0,012355	2,694667109	I	IP
P16284	PECAM1	Platelet endothelial cell adhesion molecule	1	65.09	0,012801	13,27356853	I	IP
H7C1S1	NCF1	Neutrophil cytosol factor 1 (Fragment)	1	93.46	0,013987	2,506691897	P	I
J3QTI8	OLR1	Oxidized low-density lipoprotein receptor 1 (Fragment)	1	42.54	0,014512	7,818109415	I	P
Q14739	LBR	Lamin-B receptor	1	34.7	0,015085	Infinity	P	IP
E7ESD2	WASHC2A	WASH complex subunit 2A	1	66.99	0,015846	37,81503928	P	Q
E7ETC2	PPP3CA	Serine/threonine-protein phosphatase	1	81.18	0,016475	254,4580355	PI	I

Q13045	FLII	Protein flightless-1 homolog	1	27.34	0,01661	Infinity	P	I
F8WE04	HSPB1	Heat shock protein beta-1	1	80.17	0,017655	19,69474979	P	I
P13667	PDIA4	Protein disulfide-isomerase A4	1	118.51	0,017884	3,260861094	P	IP
Q9BR76	CORO1B	Coronin-1B	1	89.61	0,017908	Infinity	P	Q
O60749	SNX2	Sorting nexin-2	1	52.18	0,017914	49,71717081	PI	IP
O43815	STRN	Striatin	1	117.47	0,018295	542,5502243	PI	I
C9J4S4	RAB7A	Ras-related protein Rab-7a	1	26.66	0,019258	14,05138725	I	PI
H7C059	ATG7	Ubiquitin-like modifier-activating enzyme ATG7 (Fragment)	1	68.54	0,019413	100,4234799	I	IP
A0A140T9T7	TAP1	Antigen peptide transporter 1	1	109.75	0,01965	3,049894611	PI	IP
E7EQN5	ARHGAP4	Rho GTPase-activating protein 4	1	67.23	0,019785	6,294642874	I	IP
O00560	SDCBP	Syntenin-1	1	30.26	0,019978	Infinity	PI	P
O75558	STX11	Syntaxin-11	1	85.96	0,020371	129,0111052	P	PI
F8VZG5	AK2	Adenylate kinase 2, mitochondrial	1	50.09	0,020659	23,14628753	P	IP
HOYMA0	SNRPA1	U2 small nuclear ribonucleoprotein A' (Fragment)	1	56.47	0,020703	2,762360367	PI	IP
A0A0C4DH38	IGHV5-51	Immunoglobulin heavy variable 5-51	1	73.24	0,020785	2,729250795	PI	I
A0A1X7SBS1	HNRNPU	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U	1	46.65	0,020948	3,942356741	Q	IP
Q8WXI7	MUC16	Mucin-16	1	43.81	0,021093	42,79422196	PI	IP
B5MCX3	SEPT2	Septin-2	1	74.09	0,021119	35,1043	P	PI
X6R6Z1	ILF2	Interleukin enhancer-binding factor 2 (Fragment)	1	71.49	0,021121	2,080603535	Q	IP
P04217	A1BG	Alpha-1B-glycoprotein	1	80.54	0,021377	8,051076504	P	IP
Q16610	ECM1	Extracellular matrix protein 1	1	66.3	0,021574	Infinity	Q	I
P11678	EPX	Eosinophil peroxidase	1	68.51	0,021915	Infinity	PI	P
Q7Z434	MAVS	Mitochondrial antiviral-signaling protein	1	48.86	0,021962	6,020013618	I	IP
K7EQ17	NOL4	Nucleolar protein 4 (Fragment)	1	38.82	0,022076	913,1542942	I	P
HOYGG5	A2ML1	Alpha-2-macroglobulin-like protein 1 (Fragment)	1	22.67	0,022078	21,94803461	Q	PI

E9PPB3	SORL1	Sortilin-related receptor	1	62.78	0,023021	3,43770618	I	P
Q7Z794	KRT77	Keratin, type II cytoskeletal 1b	1	50.9	0,023565	23,74191857	P	Q
O43707	ACTN4	Alpha-actinin-4	1	67.52	0,023688	7,512459611	P	IP
A0A087WVM2	CD177	CD177 antigen	1	88.91	0,023873	219,7245407	PI	I
K7ERF0	ICAM3	Intercellular adhesion molecule 3 (Fragment)	1	103.58	0,024674	68,23589127	I	P
P50225	SULT1A1	Sulfotransferase 1A1	1	50.6	0,024981	2,92165713	Q	P
Q02413	DSG1	Desmoglein-1	1	67.67	0,027015	304,3537118	IP	Q
P51991	HNRNPA3	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3	1	63.23	0,027269	8,077705982	P	PI
F5GXY2	LDHA	L-lactate dehydrogenase A chain (Fragment)	1	90.67	0,027784	4,22072967	Q	PI
M0QYG6	MCEMP1	Uncharacterized protein (Fragment)	1	107.62	0,028189	4,232207502	PI	I
P25098	GRK2	Beta-adrenergic receptor kinase 1	1	68.69	0,028283	10,16670637	IP	Q
P48735	IDH2	Isocitrate dehydrogenase [NADP], mitochondrial	1	73.94	0,02844	10,08055067	IP	I
O43747	AP1G1	AP-1 complex subunit gamma-1	1	81.13	0,028832	2,989440904	I	P
P59665	DEFA1	Neutrophil defensin 1	1	68.7	0,02936	4,841169407	Q	IP
C9JJ34	RANBP1	Ran-specific GTPase-activating protein (Fragment)	1	73.96	0,029498	8,021630108	Q	P
A0A087X253	AP2B1	AP complex subunit beta	1	41.62	0,029777	2,595624379	Q	IP
H0YLH9	IL16	Pro-interleukin-16 (Fragment)	1	108.27	0,02995	59,06683064	PI	I
P36871	PGM1	Phosphoglucomutase-1	1	29.45	0,03023	754,3145589	IP	Q
D6RD66	WDR1	WD repeat-containing protein 1 (Fragment)	1	101.31	0,030298	Infinity	P	Q
P46013	MKI67	Proliferation marker protein Ki-67	1	25.74	0,030955	8,126736697	I	Q
O14983	ATP2A1	Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 1	1	52.49	0,031095	6,566480144	P	PI
B7ZL14	FNBP1	FNBP1 protein	1	90.71	0,031441	9,131498916	PI	IP
A0A3B3ISK1	COPA	Coatomer subunit alpha	1	119.83	0,031769	6,26931411	I	IP
A0A087WZB5	PARVB	Beta-parvin	1	54.36	0,032231	35,23534942	P	IP

E9PNV5	NAV2	Neuron navigator 2 (Fragment)	1	25.17	0,032343	5,703736112	I	P
F2Z393	TALDO1	Transaldolase	1	50.98	0,032577	Infinity	IP	P
F8VSC4	METAP2	Methionine aminopeptidase 2 (Fragment)	1	31.34	0,033088	6,570307847	PI	IP
B4E1S2	ANXA4	Annexin	1	38.92	0,033191	14,42774329	IP	PI
HOYNE9	RAB8B	Ras-related protein Rab-8B (Fragment)	1	34.27	0,033518	23,28798402	PI	Q
J3KTC3	HPR	Haptoglobin-related protein	1	49.99	0,033919	187,4784851	IP	I
K7ER96	TXNL1	Thioredoxin-like protein 1 (Fragment)	1	66.76	0,034258	3,514243847	PI	P
P04179	SOD2	Superoxide dismutase [Mn], mitochondrial	1	22.09	0,03433	160,820978	P	Q
A0A0B4J1R6	TKT	Transketolase	1	29.35	0,034513	3122,239184	P	PI
E9PGM1	EIF4G1	Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 1	1	40.96	0,034609	3,657529753	I	PI
A0A0A0MRJ8	ARHGAP30	Rho GTPase-activating protein 30	1	29.31	0,034672	2,490498345	Q	I
Q14165	MLEC	Malectin	1	90.7	0,035257	3,273256117	PI	IP
P31942	HNRNPH3	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H3	1	59.07	0,035388	7,823117036	I	P
Q5JR95	RPS8	40S ribosomal protein S8	1	79.38	0,035599	3,082646788	Q	IP
Q14315	FLNC	Filamin-C	1	31.66	0,035684	26489,40129	IP	I
P07954	FH	Fumarate hydratase, mitochondrial	1	83.4	0,035991	2,220492574	Q	IP
E9PEW8	HBD	Hemoglobin subunit delta (Fragment)	1	35.03	0,036128	446,6344936	Q	PI
P13224	GP1BB	Platelet glycoprotein Ib beta chain	1	52.18	0,03633	Infinity	I	IP
K7ENW1	TNPO2	Transportin-2 (Fragment)	1	30.61	0,036451	6,363361778	I	P
D6RAU2	RACK1	Receptor of-activated protein C kinase 1	1	71.99	0,037094	8,895534395	I	PI
J3QKZ9	EIF4A1	Eukaryotic initiation factor 4A-I (Fragment)	1	77.59	0,037434	3,916719517	PI	IP
H7C1D4	TSN	Translin (Fragment)	1	76.88	0,037471	7,397307514	I	P
Q5SQT6	PPA1	Inorganic pyrophosphatase	1	78.21	0,037539	51,64239639	P	PI
P00390	GSR	Glutathione reductase, mitochondrial	1	48.21	0,037744	3,061910891	IP	Q

Q9ULZ3	PYCARD	Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD	1	36.98	0,038356	5,929649606	Q	IP
P0DPH7	TUBA3C	Tubulin alpha-3C chain	1	29.48	0,038671	20,71414683	Q	PI
A0A0U1RQX0	TXNRD2	Thioredoxin reductase 2, mitochondrial (Fragment)	1	28.46	0,039398	8,352033483	PI	I
P02748	C9	Complement component C9	1	70.95	0,039423	2,255209071	IP	Q
O95678	KRT75	Keratin, type II cytoskeletal 75	1	33.92	0,039521	5,674854301	P	Q
O75636	FCN3	Ficolin-3	1	52.07	0,040026	17,17516011	Q	I
A0A0G2JR51	NCF4	Neutrophil cytosol factor 4 (Fragment)	1	33.48	0,040171	22,5826053	IP	P
P26641	EEF1G	Elongation factor 1-gamma	1	134.83	0,040487	2,714163096	Q	IP
P04439	HLA-A	HLA class I histocompatibility antigen, A-3 alpha chain	1	86.88	0,040566	4,461847874	P	Q
P49913	CAMP	Cathelicidin antimicrobial peptide	1	89.32	0,041009	9,517411093	I	IP
P02533	KRT14	Keratin, type I cytoskeletal 14	1	45.85	0,041163	Infinity	PI	Q
B4E0K5	MAPK14	Mitogen-activated protein kinase	1	48.31	0,041175	102,8081768	IP	I
Q92616	GCN1	eIF-2-alpha kinase activator GCN1	1	43.8	0,041198	2,033028088	I	PI
G5EA31	SEC24C	Protein transport protein Sec24C	1	93.45	0,041453	6,591369245	PI	IP
P61981	YWHAG	14-3-3 protein gamma	1	125.43	0,041607	184,742385	IP	I
Q70J99	UNC13D	Protein unc-13 homolog D	1	93.85	0,041985	3,939929681	Q	IP
HOYAC1	KLKB1	Plasma kallikrein (Fragment)	1	46.21	0,042145	38,91567753	Q	P
C9JVG3	UGP2	UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase (Fragment)	1	84.86	0,042441	13,71480036	PI	P
O00151	PDLIM1	PDZ and LIM domain protein 1	1	87.94	0,042542	7,787156731	P	PI
E7ETM8	NEXN	Nexilin (Fragment)	1	51.01	0,04286	3,472167096	P	IP
P01031	C5	Complement C5	1	80.44	0,043175	2,297256569	PI	IP
Q14766	LTBP1	Latent-transforming growth factor beta-binding protein 1	1	81.59	0,043596	2,034311172	I	PI
E9PIT3	F2	Prothrombin	1	101.6	0,043924	6,249227914	IP	Q
P35573	AGL	Glycogen debranching enzyme	1	69.75	0,043992	7,252143833	I	P
P48595	SERPINB10	Serpin B10	1	130.29	0,045854	3,731441885	Q	IP

P01602	IGKV1-5	Immunoglobulin kappa variable 1-5	1	25.36	0,046066	5,858919063	PI	Q
Q9UH99	SUN2	SUN domain-containing protein 2	1	126.79	0,046151	2,683527552	Q	IP
Q86YZ3	HRNR	Hornerin	1	121.33	0,046272	Infinity	PI	I
S4R3H4	ACIN1	Apoptotic chromatin condensation inducer in the nucleus	1	117.24	0,046346	5,114356874	I	P
F5GX73	MGST1	Microsomal glutathione S-transferase 1 (Fragment)	1	89.44	0,047377	2,472956252	PI	P
G3V5X6	HNRNPC	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins C1/C2 (Fragment)	1	113.41	0,047914	3,02120587	I	IP
P53396	ACLY	ATP-citrate synthase	1	29.28	0,048038	380,2171822	Q	PI
B6VEX4	ABI1	Abl interactor 1	1	59.93	0,048186	3,492587496	Q	P
A0A087WVQ9	EEF1A1	Elongation factor 1-alpha 1	1	30.27	0,048733	3,382164234	Q	IP
P30520	ADSS2	Adenylosuccinate synthetase isozyme 2	1	31.05	0,048833	6,112360491	PI	P
P27449	ATP6V0C	V-type proton ATPase 16 kDa proteolipid subunit	1	44.01	0,048871	6,425359688	PI	I
A8MU58	AIMP2	Aminoacyl tRNA synthase complex-interacting multifunctional protein 2	1	48.53	0,048902	4,805134822	IP	P
B4DQ14	ABHD14B	Protein ABHD14B	1	71.39	0,04903	Infinity	P	I
P23142	FBLN1	Fibulin-1	1	63.9	0,049063	347,3720883	I	Q
E9PDE4	CAST	Calpastatin	1	56.12	0,049232	5,321295463	Q	PI
P35542	SAA4	Serum amyloid A-4 protein	1	109.68	0,049337	14,02144401	P	PI
Q9NUQ3	TXLNG	Gamma-taxilin	1	24.08	0,049537	Infinity	P	I
C9JRH2	RCC1	Regulator of chromosome condensation (Fragment)	1	86.49	0,04962	5,570044229	I	P
O00743	PPP6C	Serine/threonine-protein phosphatase 6 catalytic subunit	1	45	0,049847	4,637426523	PI	P
F8WAS2	ITIH1	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H1	1	25.12	0,049997	Infinity	IP	I

9.3. ANEXO C- Proteínas reguladas, comparadas aos pares com seus respectivos fold change (FC)

P x Q	FC log2	PI x QI	FC log2	Ix Q	FC log2	IPx Q	FC log2	P x I	FC log2	P x PI	FC log2	P x IP	FC log2	PIxI	FC log2	IP xI	FC log2	PI x IP	FC log2
A2M	1,84 69	A2M	1,81 29	ATP5F1A	1,11 09	A2M	1,627 38	AZU1	- 2,4283 4	ACTN1	- 3,72 7	ACTR2	0,92 4	A2M	1,8 1	ALB	1,58 6	ACTN1	3,29 54
ACTR2	2,42 75	ACTN1	3,749 3	AZU1	1,07 57	AHSG	1,3039 3	A2M	1,844 25	ACTR2	0,95 54	ADAM10	1,90 5	ACTN1	4,6 7	A2M	1,62 5	ADAM10	1,39 85
ADAM10	2,68 46	ADAM10	2,177 9	CNN2	- 0,77 3	ALB	1,0914 5	ACTR2	2,2177 5	ALDOA	2,18 97	AMBP	1,24 9	ADAM10	1,3	AHSG	1,94 6	AMBP	1,38 73
AHSG	1,74 14	AHSG	1,327 6	HPX	- 3,75 7	ANXA1	2,6735 3	ADAM10	1,8058 1	ATP5F1A	0,55 6	APOBR	1,25 1	AHSG	1,9 7	ANXA1	2,70 2	APOBR	0,94 72
ALB	1,33 94	ALB	1,092 9	MDH2	- 1,55 7	APOB	1,6342 4	AHSG	2,3834 9	C1QC	- 1,48 5	ATP5F1A	0,87 1	ALB	1,5 9	APOB	1,58 6	ARPC3	- 2,38 9
ALDOA	1,94 36	AMBP	2,348 8	PF4	0,66 52	APOBR	5,0003 9	ALB	1,8338 6	CALM2	0,46 24	CALM2	1,18 1	AMBP	5,3 9	APOBR	4,05 7	ATP5F1B	1,76 97
AMBP	2,21 01	APOB	1,659 1	SKAP2	0,61 45	ARPC3	4,0563 6	ALDOA	2,9395 9	CFH	- 2,70 5	CP	- 1,17 6	APOB	1,6 1	ARPC3	4,37 2	C4A	- 0,66 2
APOBR	6,25 09	APOBR	5,947 6	SPARC	0,57	ATP5F1B	- 1,8627	AMBP	5,2479 5	CHI3L1	- 1,42 5	EEF2	- 2,65 1	APOBR	5	ATP5F1B	- 1,86	CALM2	0,71 85
ARHGDI B	1,70 44	ARHGDI B	1,636	SRGN	0,82 45	BIN2	- 1,6528	APOBR	5,3071 6	CHIT1	- 2,20 4	GC	- 5,52	ARHGDI B	1,7 4	AZU1	- 1,67	CFH	2,47 02
ATP5F1 A	1,70 22	ATP5F1 A	1,146 2			C3	1,2992 6	ARHGDI B	1,8070 6	CLTC	- 3,31 5	GDI2	3,14 4	AZU1	- 1,2 8	BIN2	-1,9	CHIT1	1,35 93
AZU1	- 1,35 26	BIN2	- 1,523			C4A	1,4902 9	ATP5F1 A	0,5913	CTSG	4,79 76	GPI	6,11 2	BIN2	- 1,7 8	C1QC	2,60 4	CLTC	5,23 87

BIN2	- 1,48 13	C1QC	1,070 2			C4BPA	1,5240 1	BIN2	- 1,7333 8	CYBB	- 4,14 9	H4-16	3,12	C1QC	2,8 8	C3	1,71	CYBB	2,98 41
C3	0,96 44	C3	1,055 9			CALM2	1,3360 2	C3	1,3754 3	GDI2	3,31 84	HBA2	4,71 4	C3	1,4 7	C4A	1,29 3	GC	- 5,99 1
C4A	1,27 87	C4A	0,827 9			CD61	2,7201 3	C4A	1,0813 7	GPI	4,40 78	IGHG1	0,70 7	C4BPA	1,7 6	C4BPA	1,65 5	HSP90A B1	3,41 61
C4BPA	1,95 58	C4BPA	1,624 6			CDA	- 1,4504	C4BPA	2,0873	HBA2	5,97 95	IGKV3 D-11	- 5,41 9	CALM2	1,6	CD61	3,29 8	HSPA8	8,73 45
CALM2	2,51 69	CALM2	2,054 5			CHIT1	- 1,2457	CALM2	2,0660 5	HSP90A B1	- 2,90 3	LIMS1	3,06 6	CD61	3,5 6	CDA	- 1,29	IGKV3D- 11	-4,72
CD61	3,19 48	CD61	2,984 5			CNN2	- 0,9565	CD61	3,7725	IGHG1	0,78 14	LSP1	2,50 5	CDA	- 0,6 1	CHI3L1	-1,1	IQGAP1	1,56 54
CDA	- 1,06 71	CDA	- 0,767			CP	1,7947 1	CDA	- 0,9097 9	IQGAP1	-1,73	MMP8	- 1,17 2	CFH	3,8 6	CHIT1	- 1,42	LCN2	1,91 24
CHI3L1	- 1,69 76	CFH	4,004 2			DYNC1LI 1	- 1,3206	CHI3L1	- 2,0966 6	LCN2	- 2,62 2	MYL6	1,49 1	CLTC	8,0 1	CP	2,11	LILRB2	0,58 25
CHIT1	- 2,09 08	CLTC	8,179 5			EEF2	3,2432 8	CHIT1	- 2,2617 4	LILRB2	- 1,14 7	NBEAL 2	1,63 1	CP	1,8 4	CRISP3	- 1,27	LIMS1	3,40 33
CNN2	- 1,38 97	CNN2	- 0,792			GC	6,5080 5	CRISP3	- 1,9039 1	LSP1	2,05 63	NCF2	- 2,64 5	CRISP3	- 0,7 3	DYNC1LI 1	- 1,54	NCF2	- 3,51 5
CRISP3	- 1,56 11	CP	1,525 8			GP5	- 2,0512	CTSG	14,667 9	LTF	- 1,10 7	PDIA3	2,32 7	CYBB	2,1 6	EEF2	3,38	PFN1	- 1,92 2
CTSG	7,11 66	CYBB	2,310 1			HPX	- 4,1175	DYNC1LI 1	- 5,0935 9	MMP8	- 1,73 8	PFN1	- 1,20 2	DYNC1LI 1	- 2,5 7	GC	7,84 7	PGK1	1,62 94
DYNC1LI 1	- 4,86 97	DYNC1LI 1	- 2,342			IGHA2	1,0376 5	GCA	3,6468	MMP9	-1,69	PLAC8	1,94 8	GP5	- 3,0 6	GP5	- 2,38	PRKDC	0,57 99
GCA	3,46 29	GP5	- 2,736			IGHG2	1,6774 9	GP5	- 2,9722 7	MYL6	1,22 62	PNP	- 0,96 1	HSP90A B1	2,4	IGHA2	1,38 3	PSMA3	2,48 34

GP5	- 2,64 63	HPX	- 2,953			IGKV3D- 11	4,8441 7	GPI	2,9003 8	NBEAL2	0,77 38	PRKDC	- 1,11 1	HSPA8	7,2 5	IGHG1	1,07 2	S100A8	1,06 42
GPI	2,54 36	HSP90A B1	5,087 6			LILRB2	-0,777	H4-16	4,5520 3	PLAC8	1,01 05	PTX3	- 1,66 1	IGHA2	1,9	IGHG2	1,73 7	TUBB4A	0,83 79
H4-16	4,59 82	HSPA8	8,780 7			LTF	- 0,8287	HBA2	2,2016 8	PNP	- 1,06 2	QPCT	- 1,67 4	IGHG2	2,1 8	IGKV3D- 11	5,58 1	VCL	3,98 88
HBA2	4,14 87	IGHA2	1,551 3			MMP8	- 0,6435	IGHA2	1,9247 3	PRKDC	- 1,69 1	S100A 8	1,37 5	IQGAP1	2,4 1	ITGB2	2,31 3	VIM	1,41 08
HPX	- 2,55 92	IGHG2	2,122 8			MMP9	- 1,2726	IGHG1	1,7788 1	QSOX1	-2,17	TUBB4 A	0,71 8	ITGB2	2,8 2	LILRB2	- 0,89	VWF	1,34 84
IGHA2	1,57 93	IQGAP1	2,794 9			MSN	3,8461 2	IGHG2	1,8973 5	TF	2,03 16	VTN	- 1,51 2	LIMS1	2,9 1	LTF	-1		
IGHG1	0,84 36	ITGB2	1,685 8			NBEAL2	- 1,2359	ITGB2	2,8959 5	VCL	-6,22			MDH2	2,0 4	MDH2	1,68 3		
IGHG2	1,83 81	LIMS1	3,130 8			NCF2	4,8285 9	LILRB2	- 1,4498 6	VIM	- 1,33 5			MSN	4,3 9	MMP8	-0,9		
ITGB2	1,76 35	MSN	4,225 9			PDIA3	- 2,1456	LIMS1	2,5718 2					NAPRT	- 1,9 5	MMP9	- 1,65		
LILRB2	- 1,34 13	NAPRT	- 2,018			PF4	- 2,0552	LSP1	3,6519 1					P4HB	1,6	MSN	4,00 9		
LIMS1	2,79 32	P4HB	1,034 1			PGLYRP 1	- 0,9248	LTF	- 1,6864 8					PF4	- 3,3 1	NBEAL2	- 1,16		
LSP1	4,36 22	PF4	- 2,645			PLAC8	- 1,9425	MDH2	2,1931 6					PGK1	2	NCF2	5,03 2		
LTF	- 1,51 72	PFN1	- 1,455			PLG	2,2952 7	MMP8	- 2,0717 8					PLG	2,6 8	PF4	- 2,72		
MMP8	- 1,81 53	PGK1	2,218			PNP	- 0,4846	MMP9	- 2,1682 9					PPBP	- 2,8 6	PFN1	1,22 7		

MMP9	- 1,79 47	PLAC8	- 1,004			PPBP	- 2,6367	MSN	4,3476 2				PTX3	- 0,9 1	PGLYRP 1	- 1,09		
MSN	4,18 48	PLG	2,084 6			RAB11FI P1	- 2,6997	MYL6	2,2973 5				QPCT	- 0,9 6	PLAC8	- 1,46		
MYL6	2,27 89	PPBP	- 2,644			RAD23B	- 2,1737	P4HB	1,3865 8				RAB11FI P1	- 2,4 2	PLG	2,89 1		
PF4	- 2,27 66	PRKDC	0,889 4			S100A8	- 1,2089	PF4	- 2,9417 5				RAD23B	- 1,9 9	PPBP	- 2,85		
PGLYRP 1	- 1,32 28	RAB11FI P1	- 2,467			SERPINA 1	1,5745 6	PGLYRP 1	- 1,4853 9				SERPINA 1	1,9 8	QSOX1	- 1,16		
PLG	2,29 99	RAD23B	-1,84			SIGLEC5	- 2,2628	PLG	2,8958 3				SIGLEC5	- 1,4 4	RAB11FI P1	- 2,65		
PNP	- 1,44 6	SERPINA 1	1,462 9			SKAP2	- 1,2906	PNP	- 1,1105 6				SKAP2	- 1,3 6	RAD23B	- 2,33		
PPBP	- 2,36 77	SIGLEC5	- 1,149			SPARC	- 2,0626	PPBP	- 2,5831 9				SPARC	-3,4	RCSD1	- 3,77		
PTX3	- 1,56 66	SKAP2	- 0,747			THBS1	- 1,5242	PRKDC	- 1,2375 8				SRGN	- 1,8 7	S100A8	- 0,98		
QPCT	- 2,10 74	SPARC	-2,83			TUBB4A	-1,12	PTX3	- 1,9876 1				THBS1	- 2,6 5	SERPINA 1	2,09 5		
QSOX1	- 2,29 77	SRGN	- 1,045			VTN	2,2777 8	QPCT	- 2,3207 9				TLN1	2,6 5	SIGLEC5	- 2,56		
RAB11FI P1	- 2,11 99	THBS1	- 2,444			VWF	- 1,6794	QSOX1	- 2,9042 3				VCL	6,7 8	SKAP2	- 1,91		
RAD23B	- 1,65 51	TLN1	3,637 8					RAB11FI P1	- 2,0713 8				VIM	1,9 6	SPARC	- 2,63		
SERPINA 1	1,67 66	VCL	12,59 8					RAD23B	- 1,8065 9				VWF	- 0,7 7	SRGN	- 1,64		

SIGLEC5	- 2,79 44	VIM	2,358					RCSD1	- 4,8757 9							THBS1	- 1,73		
SPARC	- 2,64 48							SERPINA 1	2,1967 1							TUBB4A	- 0,86		
SRGN	- 1,55 98							SIGLEC5	- 3,0869 8							VTN	1,05 7		
TF	3,87 26							SKAP2	- 1,1289 6							VWF	- 2,12		
THBS1	- 2,41 73							SPARC	- 3,2147 9										
								SRGN	- 2,3842 1										
								TF	4,0239 3										
								THBS1	- 2,6232 4										
								VWF	- 1,0908 5										

