



**Universidade de Brasília**

**Faculdade de Medicina**

**Programa de Pós-graduação em Patologia Molecular**

Isabelle Souza Luz

**Análise proteômica e funcional das diferenças sexo-específicas de  
neutrófilos quiescentes e ativados**

Orientador: Prof. Dr. Wagner Fontes

Brasília, 2021



**Universidade de Brasília**

**Faculdade de Medicina**

**Programa de Pós-graduação em Patologia Molecular**

Isabelle Souza Luz

**Análise proteômica e funcional das diferenças sexo-específicas de neutrófilos quiescentes e ativados**

Laboratório de Bioquímica e Química de Proteínas

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia Molecular da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Patologia Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Wagner Fontes

Brasília, 2021

# **BANCA EXAMINADORA**

**Prof. Dr. Wagner Fontes (presidente, orientador)**

Universidade de Brasília

Departamento de Biologia Celular

---

**Profª. Dra. Fabiane Hiratsuka Veiga de Souza**

Universidade de Brasília

Faculdade UnB Ceilândia

---

**Prof. Dr. Thiago Mattar Cunha**

Universidade de São Paulo

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

---

**Profª. Dra. Mariana de Souza Castro (suplente)**

Universidade de Brasília

Departamento de Ciências Fisiológicas

---

## AGRADECIMENTOS

Ao maior incentivador dessa jornada, professor Wagner Fontes. Obrigada por me permitir encontrar o meu lugar no mundo ao me aceitar como aluna de iniciação científica quando ainda estava no segundo semestre da graduação. Agradeço pela paciência inabalável enquanto aprendo os fundamentos do processo científico; pelo modo leve que me ensina a ver os obstáculos e pelo socorro que me prestou em tempos difíceis. Agradeço por toda vez que **logo após** me mostrar qualquer coisa, dizer: “*Agora é sua vez*”, com o passar do tempo, o sentimento de completo desespero se tornou expectativa e entusiasmo. Agradeço por todas as oportunidades, projetos e “*maluquices com pouquíssimo tempo de execução, mas que podem render um bom resultado*” que me obrigaram a ter disciplina e dedicação.

Minha profunda gratidão aos meus pais, exemplos de responsabilidade e competência, que sempre me apoiaram e permitiram ter dedicação exclusiva aos estudos. Ao meu pai, Roberto, cujas histórias desde criança contavam sobre Fleming, Edison e Lavoisier. E minha mãe Iza que sempre nos levava para o laboratório e fez a primeira lâmina que eu vi em um microscópio na vida.

Aos meus colegas de trabalho Katyelle Botelho, Hylane Damascena, Reynaldo Mello, Adriano Rios, Phillippe Braga, Wendy Dawson, Gislene Baptista e Gabriel Freitas que se tornaram meus amigos queridos, muito obrigada por todo auxílio, amizade e companhia. Agradeço especialmente à Katyelle por ter dividido comigo os primeiros passos da iniciação científica, pela parceria e jeito generoso e divertido que foi tão importante no início da minha jornada no laboratório; ao Reynaldo por não conseguir fazer absolutamente nada sem testar os conhecimentos que geralmente me faltam; à Hylane por estar sempre disponível pra me ajudar em experimentos paralelos e discutir figuras e resultados; ao Gabriel por sempre doar sangue para os meus testes intermináveis, reclamando só um pouquinho, mas sempre prestativo. Obrigada pelo que me ensinaram e por todas as vezes que vocês entenderam meus momentos de introspecção sem ressentimento.

Às doutoras Luz e Liudy por terem me ensinado tanto no início.

Ao meu namorado Denis Neves, que por muitas vezes foi minha única fonte de incentivo fora do lab. Muito obrigada por tanto carinho, cuidado e pelos finais de semana que me preparavam para mais uma semana de pesquisa.

Agradeço a minha outra metade de infância, Alana Luz, pelo exemplo de dedicação e persistência, por me socorrer em tempos que definem o caos e pelos meus amados sobrinhos Maria Clara, Manu e Saulo.

Ao Gustavo Pompeu por ter sido fundamental para interpretação estatística desse trabalho, me ajudando principalmente com o R.

Ao meu melhor amigo Raphael Xavier, pela nossa amizade continuar completamente a mesma, independente de distância e tempo, e por sempre demonstrar que acredita em mim.

Aquelas que entraram na minha vida por meio de colaborações, me ensinaram muito e sempre serão muito queridas, Ana Paula, Daiane, Elisa, Karla, Mariana e Priscila. À toda equipe do LBQP, eu agradeço de coração o convívio fraterno. Obrigada Simone, Jaques, João, Nuno, Raphaela, Nathália, Débora, Bruna, Carlos, seu Antônio, prof. Mariana, prof. Consuelo, prof. Carlos André, Lucas, Giovanna, etc.

Por fim, agradeço à Universidade de Brasília, minha segunda casa desde a graduação, a todos os funcionários que nos servem diariamente, ao Programa de pós-graduação em Patologia Molecular e à CAPES pelo apoio financeiro que tornou esse mestrado possível.

“Cada um de nós é um ser ínfimo ao qual é permitido realizar, sobre a película exterior de um dos planetas mais pequenos, algumas dezenas de viagens ao redor da estrela local. [...] Somos efêmeros, criaturas transitórias, flocos de neve caídos no fogo da lareira. Se entendemos um pouco que seja das nossas origens, esse é um dos grandes triunfos da reflexão e coragem humanas. Quem somos e por que motivo estamos aqui é algo que só nos será possível descortinar juntando as peças do quadro geral – que deve abarcar eternidades, milhões de espécies e uma profusão de mundos. Nesta perspectiva, não admira que sejamos muitas vezes um mistério para nós mesmos e que, apesar das nossas manifestas pretensões, estejamos tão longe de sermos senhores mesmo dentro da nossa própria casinha.”

**- Sombras dos antepassados esquecidos**

## RESUMO

Como uma variável biológica, o sexo modula o sistema imunitário e pode estar envolvido nas diferenças observadas entre homens e mulheres de manifestação e desenvolvimento de doenças infecciosas, autoimunes e câncer. Os mecanismos responsáveis por tal disparidade não são suficientemente explorados e estão longe de serem completamente elucidados. Como células dominantes da resposta imune inata, os neutrófilos são leucócitos dinâmicos, efetores primários da defesa inata do organismo, moduladores da imunidade adaptativa e mantenedores da homeostasia de diferentes tecidos. Esses PMN participam da fisiopatologia de diversas doenças, incluindo aquelas que apresentam um significativo viés sexual, como sepse e as doenças autoimunes. A maioria dos estudos sobre o dimorfismo sexual é direcionada para características pontuais e evidencia diferenças marcantes, ressaltando a necessidade de uma compreensão abrangente da regulação da biologia dos neutrófilos pelo sexo. Assim sendo, este trabalho utilizou a proteômica *label-free* como ferramenta exploratória para identificar mediadores basilares do dimorfismo sexual, de neutrófilos quiescentes e ativados com fMLP, que foram então estudados em maiores detalhes através de testes funcionais. 1410 proteínas foram identificadas; 308 estavam diferencialmente abundantes entre as quatro condições e as 163 identificadas com mais de dois peptídeos únicos foram submetidas à análise ANOVA de duas vias para avaliação do efeito dos fatores e da interação sobre o perfil proteico. Entre os principais processos biológicos enriquecidos estavam aqueles relacionados à atividade antioxidante, exocitose/transporte de vesículas e adesão. A análise proteômica seguida por testes funcionais resultou na caracterização de neutrófilos femininos quiescentes com maiores quantidades de EROs, menores níveis das proteínas associadas à atividade antioxidante GR, ALB, HP e G6PDH, menor capacidade antioxidante total e menor atividade fagocitária. Dessa forma, este trabalho apresenta aspectos fundamentais para a funcionalidade de neutrófilos como sexo-específicos, o que pode ser fundamental para a compreensão do dimorfismo sexual imunitário observado em vários contextos fisiopatológicos.

**Palavras-chave:** neutrófilo, dimorfismo sexual, proteômica, antioxidante, migração, fagocitose, imunidade inata.

## **ABSTRACT**

As a biological variable, sex contributes to shape immune responses and may be involved in the differences observed between men and women in the manifestation and development of cancer, infectious and autoimmune diseases. The mechanisms underlying such disparity are not sufficiently explored and are far from being fully elucidated. Neutrophils are dynamic leukocytes, primary effectors of the innate defense, modulators of adaptive immunity and maintainers of homeostasis of different tissues. PMNs participate in the pathophysiology of several diseases, including those that present a significant sexual bias, such as sepsis and autoimmune diseases. Most studies on sexual dimorphism focused on specific aspects and show marked differences, highlighting the need for a comprehensive understanding of the regulation of neutrophil sexual dimorphism. Therefore, we used label-free proteomics as an exploratory tool to identify basilar mediators of sexual dimorphism of resting and fMLP-activated neutrophils, which led to follow-up functional tests. 1410 proteins were identified, 308 were differentially abundant among the four conditions and 163 presented more than two unique peptides and were submitted to two-way ANOVA analysis to assess the effect of the factors and of the interaction on the protein profile. Among the main enriched biological processes were those related to antioxidant activity, exocytosis/vesicle transport and adhesion. Proteomic analysis followed by functional tests resulted in the characterization of resting female neutrophils as containing higher amounts of ROS, decreased levels of the proteins GR, ALB, HP and G6PDH, decreased antioxidant proteins, total antioxidant capacity and phagocytosis. This work presents fundamental aspects for the functionality of neutrophils as sex-specific, which are relevant for the understanding of the immune sexual dimorphism observed in several pathophysiological contexts.

**Keywords:** neutrophil, sexual dimorphism, proteomics, antioxidant, chemotaxis, phagocytosis, innate immunity.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. A origem das células imunes .....	19
Figura 2. O complexo produtor de EROs.....	24
Figura 3. Alguns sistemas responsáveis pela neutralização de EROs .....	26
Figura 4. As principais etapas do projeto.....	32
Figura 6. Para separação dos PMNs a partir do sangue periférico. ....	34
Figura 7. A avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio .....	35
Figura 8. A extração de neutrófilos através de um gradiente de densidade .....	39
Figura 9. Resumo da estratégia de análise dos dados proteômicos .....	42
Figura 10. Análise de ontologia gênica das proteínas reguladas pelo sexo .....	43
Figura 11. Avaliação da produção de EROs .....	44
Figura 12. A organização das proteínas identificadas como DA.....	45
Figura 13. Avaliação da capacidade antioxidante total.....	46
Figura 14. A análise individual das proteínas granulares.....	49
Figura 15. A avaliação das capacidades migratória e fagocitária.....	50
Figura 16. A abundância da proteína OLFM4.....	51

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA – *Análise de Variância*

ANXA1 – *Anexina 1*

CAT – *Catalase*

CSF – *Colony-stimulation factor (Fator de crescimento de colônias)*

CTSG – *Catepsina G*

DAG – *Diacilglicerol*

DAMP – *Damage Associated Molecular Patterns (Padrões moleculares associados a dano)*

DC – *Dendritic cell (Célula Dendrítica)*

DDA – *Data-dependent acquisition*

DGC – *Doença granulomatosa crônica*

ELANE – *Elastase neutrofílica*

EROs – *Espécies reativas de oxigênio*

FDR – *False Discovery rate (Taxa de descoberta falsa)*

fMLP – *formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine*

FPR – *Formyl peptide receptor (Receptor de peptídeo formilado)*

G6PD – *Glicose-6-fosfato desidrogenase*

G-CSF – *Granulocyte colony-stimulation factor (Fator de crescimento de colônias de granulócitos)*

GDP – *Guanosine diphosphate (Guanosina difosfato)*

GM-CSF – *Granulocyte-macrophage colony-stimulation factor (Fator de crescimento de colônias de granulócitos e macrófagos)*

GPCR – *G-protein coupled receptor (Receptor acoplado à proteína G)*

GPx – *Glutathione peroxidase*

GR – *Glutathione reductase*

Grx – *Glutaredoxina*

GSH – *Glutathione reduced*

GSSG – *Glutathione oxidized*

GTP – *Guanosine triphosphate (Guanosine triphosphate)*

HCD – *High collision dissociation (dissociação colisional de alta energia)*

HP – *Haptoglobina*

IFN – *Interferon*

IP3 – *Inositol Triphosphate (Inositol triphosphate)*

KEAP1 – *Kelch-like ECH-associated protein 1*

LF – *Lactoferrina*

MMP9 – *Matrix metalloproteinase 9 (Metalloproteinase 9 da matriz)*

MPO – *Mieloperoxidase*

NADPH – *Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida)*

NET – *Neutrophil extracellular traps (Armadilhas extracelulares de neutrófilos)*

NK – *Célula exterminadora Natural Killer*

NRF2 – *Nuclear factor erythroid 2-related factor 2*

OLFM4 – *Olfactomedin 4*

PAF – *Platelet-activating factor (Fator de agregação plaquetária)*

PAMP – *Pathogen Associated Molecular Patterns (Padrões moleculares associados a patógenos)*

PBMC – *Peripheral blood mononuclear cell (Célula mononuclear de sangue periférico)*

PIP-2 – *Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (Fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato)*

PKC – *Protein kinase C (Proteína cinase C)*

PLC – *Phospholipase C (Fosfolipase C)*

PMN – *Leucócitos Polimorfonucleares*

PRDX – *Peroxirredoxina*

RRP – *Receptores de Reconhecimento de padrões*

TAGLN2 – *Transgelina*

TLR – *Toll-Like Receptors (Receptores do tipo Toll)*

TNF – *Tumor necrosis factor (Fator de Necrose Tumoral)*

Trx – *Tiorredoxina*

VCL – *Vinculina*

# SUMÁRIO

BANCA EXAMINADORA	3
AGRADECIMENTOS	4
RESUMO	7
ABSTRACT	8
LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	10
SUMÁRIO	13
1. INTRODUÇÃO	15
1.1. O sexo como determinante-chave da resposta imunitária	15
1.2. Dimorfismo sexual na resposta imune inata	15
1.3. A atividade efetora dos neutrófilos	17
1.3.1. Leucócitos polimorfonucleares (PMN)	17
1.3.2. Neutrófilos: origem e maturação	20
1.3.3. Grânulos citoplasmáticos, vesículas secretórias e degranulação	21
1.3.4. Produção de espécies reativas de oxigênio	22
1.3.5. Mecanismos antioxidantes de neutrófilos	25
1.3.6. Fagocitose	27
1.3.7. Ativação de neutrófilos por fMLP	28
1.4. O estudo do dimorfismo sexual em neutrófilos humanos	28
2. JUSTIFICATIVA	30
3. OBJETIVOS	31
3.1. Objetivo geral	31
3.2. Objetivos específicos	31
4. METODOLOGIA	32
4.1. Delineamento experimental	32
4.2. Seleção de doadores e coleta de sangue	33

4.3.	Separação de Polimorfonucleares (PMNs)	33
4.4.	Ativação celular <i>in vitro</i> com N-formilmetionil-leucil-fenilalanina (fMLP)	34
4.5.	Produção de espécies reativas de oxigênio e Fagocitose	35
4.6.	Lise celular, extração e quantificação de proteínas	35
4.7.	Capacidade antioxidante total	36
4.8.	Migração de neutrófilos em tempo real por RTCA	36
4.9.	Preparação das proteínas para análise LC-MS/MS	37
4.10.	Análise por LC-MS/MS	37
4.11.	Análise estatística e bioinformática	38
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
5.1.	Separação dos neutrófilos e extração de proteínas	40
5.2.	Proteômica exploratória para avaliar o dimorfismo sexual de neutrófilos	41
5.3.	O dimorfismo sexual nos níveis de Espécies reativas de oxigênio e na Capacidade antioxidante de neutrófilos	43
5.4.	O dimorfismo sexual na regulação de proteínas de grânulos e do citoesqueleto: avaliação da fagocitose e migração	48
5.5.	A regulação específica da proteína OLFM4	51
6.	CONCLUSÕES	53
7.	PERSPECTIVAS	54
8.	ANEXOS	55
8.1.	ANEXO I – CURVA PADRÃO DO TROLOX	55
8.2.	ANEXO II – SCRIPT R PARA ANÁLISE ANOVA DE DUAS VIAS	56
8.3.	ANEXO III – LISTA DE PROTEÍNAS SUBMETIDA À ANÁLISE ANOVA DE DUAS VIAS	57
9.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61

---

# **1. INTRODUÇÃO**

## **1.1. O sexo como determinante-chave da resposta imunitária**

O sexo é uma característica biológica definida pela configuração cromossômica que, por sua vez, define características sexuais secundárias como diferenças anatômicas e fisiológicas importantes para a modulação de múltiplos aspectos da resposta imune (KLEIN, 2012). Assim sendo, o dimorfismo sexual imunitário é observado em animais de diversas espécies, entre eles: insetos, lagartos, aves e mamíferos (KLEIN; FLANAGAN, 2016).

Homens e mulheres respondem de maneira diferente às doenças, tratamentos e vacinas (MARKLE; FISH, 2014; RUGGIERI et al., 2016). O dimorfismo sexual na imunidade se reflete na diferença de prevalência, manifestação, severidade e resultado de doenças autoimunes e infecciosas entre homens e mulheres. De modo geral, o sexo masculino é mais suscetível a doenças infecciosas enquanto mulheres apresentam respostas imunes mais robustas, resultando em maior proteção contra determinadas infecções virais, bacterianas e parasitárias (MARRIOTT; HUET-HUDSON, 2006). Em contrapartida, o sexo feminino apresenta uma incidência acentuada de desordens autoimunes: mulheres representam pelo menos 85% dos casos de doenças como esclerodermia, lúpus eritematoso sistêmico, doença de Addison e no mínimo 65% dos casos de esclerose múltipla e artrite reumatoide (COOPER; STROEHLA, 2003). No contexto atual da pandemia causada pela disseminação mundial do vírus SARS-CoV-2, a diferença sexual também foi observada de modo que a taxa de letalidade da COVID-19 é consistentemente maior em homens em todas as faixas de idade consideradas (20-80 anos) (GREEN et al., 2021). Apesar da relevância clínica, por serem pouco explorados pela pesquisa biomédica (BEERY; ZUCKER, 2011), os mecanismos responsáveis pelo dimorfismo sexual do sistema imunitário estão longe de serem completamente elucidados.

## **1.2. Dimorfismo sexual na resposta imune inata**

A imunidade inata é responsável pela resposta inicial à infecção e por isso representa a linha de frente de defesa do organismo, além de ser necessária para ativação da resposta imune adaptativa (ITO et al., 2013). Com seu componente celular constituído

por granulócitos, monócitos, macrófagos, células dendríticas (do inglês, DCs), células *natural killers* (NKs) e adipócitos, as ações clássicas do sistema imune inato incluem indução e regulação da inflamação, fagocitose de patógenos, produção de citocinas pró e/ou anti-inflamatórias e a apresentação de antígenos (KUMAR; KAWAI; AKIRA, 2009). Além disso, estudos emergentes têm evidenciado o papel de células imunes inatas, especialmente de granulócitos, também na manutenção da homeostase, contribuindo para o funcionamento normal de tecidos saudáveis (GROENEWEG; HIDALGO; AGONZALEZ, 2020).

A ativação das células do sistema imune inato acontece através de receptores da família de Receptores de Reconhecimento de Padrões (RRPs) que se ligam a estruturas moleculares específicas de patógenos ou de dano tecidual do hospedeiro denominadas Padrões Moleculares Associados a Patógenos (do inglês, PAMPs) e Padrões Moleculares Associados a Dano (do inglês, DAMPs), respectivamente (KUMAR; KAWAI; AKIRA, 2009, 2011). Presentes em macrófagos, DCs e neutrófilos, os receptores do tipo Toll, TLR (do inglês, Toll-like receptors) constituem a classe de RRP mais estudada e são capazes de ativar importantes vias de sinalização que culminam, por exemplo, na ativação de NF- $\kappa$ B (FUKATA; VAMADEVAN; ABREU, 2009): uma família de complexos de proteínas que atuam como fatores de transcrição e modulam consideravelmente a inflamação (ZHANG; LENARDO; BALTIMORE, 2017). Outra consequência do reconhecimento de PAMPs por TLRs é a produção e liberação de citocinas e quimiocinas. As citocinas são polipeptídeos mediadores da resposta imune cuja função principal é a sinalização celular (BIRON, 1998). Dentre elas, o Fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) se destaca como principal citocina mediadora da resposta inflamatória aguda a determinados patógenos, está associada a complicações sistêmicas após infecções graves (ZELOVÁ; HOŠEK, 2013) e influencia a atividade de neutrófilos, como o aumento da sua citotoxicidade (COMEN et al., 2016). Outra importante classe de citocinas são os Interferons (IFN), reconhecidos pela atividade antiviral, mas que também regulam a inflamação em outros cenários. Os interferons do tipo I (como IFN- $\alpha$  e IFN- $\beta$ ) bem como o TNF- $\alpha$  participam da fisiopatologia de doenças que apresentam características sexo-específicas como Artrite reumatoide e Lúpus eritematoso sistêmico (GLENNON-ALTY et al., 2021; HIGGS et al., 2012; HYRICH et al., 2009; LICHTMAN; HELFGOTT; KRIEGEL, 2012). Diversos estudos descrevem diferenças sexo-específicas na abundância de TLRs, em vias metabólicas associadas com a ativação desses receptores na resposta a Interferon do tipo I (GUPTA et al., 2020; KLEIN; JEDLICKA; PEKOSZ, 2010). Em mamíferos, além do

receptor TLR7 (do inglês, Toll-like receptor 7) ser mais abundante em células de fêmeas, observou-se que células mononucleares do sangue periférico (PBMC) estimuladas com agonistas de TLR7 produzem mais IFN- $\alpha$  quando comparadas às mesmas células de machos (BERGHÖFER et al., 2006). Em contraste, em neutrófilos humanos, o TLR4 é expresso em maior abundância em neutrófilos masculinos e induz maior produção de TNF quando comparados aos neutrófilos femininos (AOMATSU et al., 2013b). Outros dados de estudos em PBMCs indicam maior produção de Interleucina-10 (IL-10) e TNF em machos em comparação com células mononucleares de fêmeas (AOMATSU et al., 2013a; TORCIA et al., 2012).

Em nível celular, as variações determinadas pelo sexo modulam não só a quantidade de células imunes inatas como também suas funções: M. Abdullah et al. identificaram contagens mais altas de granulócitos em mulheres enquanto homens apresentaram uma porcentagem média de células NK mais alta (ABDULLAH et al., 2012). Apesar de não terem identificado diferença nos números de granulócitos e células NK, outro estudo reportou grande diferença na atividade de células NK, sendo esta muito maior em homens do que em mulheres (YOVEL; SHAKHAR; BEN-ELIYAHU, 2001).

### **1.3. A atividade efetora dos neutrófilos**

#### **1.3.1. Leucócitos polimorfonucleares (PMN)**

A hematopoiese é o processo responsável pela origem dos diferentes elementos figurados do sangue, entre os quais estão aqueles que compõem a imunidade inata: basófilos, neutrófilos, eosinófilos e monócitos, além de mastócitos, macrófagos e células dendríticas mieloides, que habitam os tecidos. Ademais, células dendríticas linfoides, células NK e adipócitos também compõem o repertório celular do sistema imune inato (**Figura 1**). O reconhecimento recente de adipócitos como parte da imunidade inata é revisado por BLASZCZAK; JALILVAND; HSUEH, 2021. Mastócitos, basófilos, eosinófilos e neutrófilos são células ricas em grânulos citoplasmáticos e por isso são denominados granulócitos (SIEMIŃSKA; POLJAŃSKA; BARAN, 2021). Basófilos, eosinófilos e neutrófilos possuem ainda, o material genético empacotado em forma de lóbulos, e portanto, são designados como granulócitos polimorfonucleares (PMN): em humanos, os basófilos representam menos de 1 % da série branca circulante e apresentam núcleo segmentado ou bilobulado; eosinófilos também possuem o núcleo bilobulado e

normalmente correspondem a menos de 5 % da série branca circulante, já os neutrófilos são os leucócitos mais abundantes da corrente sanguínea e possuem o núcleo dividido em três a cinco lóbulos (WICKRAMASINGHE; ERBER, 2011).

Até recentemente, PMN foram subestimados como células simples, definitivamente diferenciadas e de respostas inespecíficas, limitadas às fases iniciais da inflamação e do combate às infecções. Recentemente, a complexidade do papel dos PMN tem sido cada vez mais explorada, evidenciando a heterogeneidade e versatilidade de funções, atuando inclusive na modulação da resposta imune adaptativa, como células

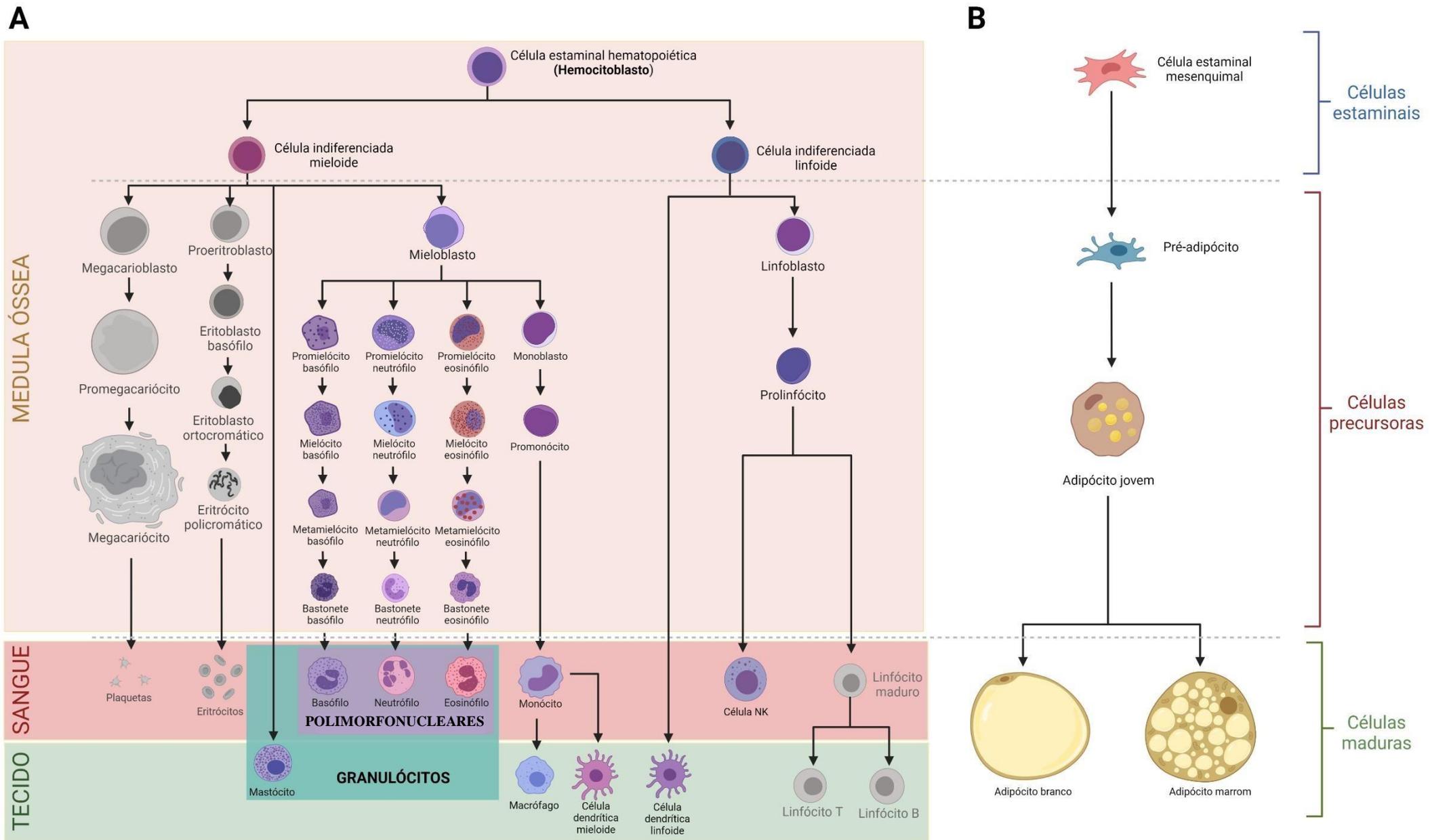


Figura 1. **A origem das células imunes.** A hematopoiese é o processo responsável pela produção dos elementos figurados da corrente sanguínea, que incluem a grande maioria das células imunitárias (A). Já a adipogênese é o processo de diferenciação celular que gera o adipócito: tipo celular recentemente descrito como importante mediador da resposta imunitária (B). As células que constituem a cadeia de diferenciação das células imunes inatas estão destacadas (colorido) e entre elas, as células que possuem grânulos citoplasmáticos são classificadas como granulócitos. Outra classificação que leva em conta a morfologia nuclear classifica basófilos, neutrófilos e eosinófilos como leucócitos polimorfonucleares. Imagem feita com Biorender.

apresentadoras de antígenos (APCs) (LIN; LORÉ, 2017). Além disso, cada vez mais são discutidos os papéis dos PMN na fisiopatologia de uma grande variedade de doenças e quadros inflamatórios agudos e crônicos, entre eles: câncer, distúrbios autoimunes, injúria de isquemia e reperfusão e na COVID-19 (FRANCISCHETTI et al., 2010; LOURDA et al., 2021; SEMAN; ROBINSON, 2021; SIONOV, 2021; YANG et al., 2017).

As novidades quanto ao papel de células imunes inatas no organismo incluem as descobertas da ação de granulócitos e monócitos fora do contexto inflamatório ou patogênico, migrando ativamente para tecidos saudáveis e contribuindo para a manutenção da homeostase de diversos órgãos (GROENEWEG; HIDALGO; AGONZALEZ, 2020); e da memória imunológica inata, cuja reprogramação funcional baseada em modificações epigenéticas é capaz de evocar ações orientadas – com intensidades ajustadas – à segunda resposta a determinado antígeno, resultando em aumento da proteção mediante reinfecções (NETEA et al., 2020). Esse fenômeno foi denominado como *Imunidade Treinada* pela primeira vez em 2011 e sua investigação pode resultar em novas estratégias de imunização baseadas no sistema imune inato (NETEA; QUINTIN; VAN DER MEER, 2011).

### 1.3.2. Neutrófilos: origem e maturação

Os neutrófilos são os leucócitos predominantes no sangue de mamíferos saudáveis, representando até 70 % das células brancas da circulação sanguínea periférica. Em condições fisiológicas, PMN maduros apresentam um diâmetro que varia entre 7- 10 µm com meia-vida de 13-19 h (KOLACZKOWSKA; KUBES, 2013; LAHOZ-BENEYTEZ et al., 2016). Neutrófilos são as primeiras células a serem recrutadas para o sítio da inflamação e são capazes de combater patógenos por meio de diferentes mecanismos estímulo-específicos, sendo os quatro principais: degranulação, produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), fagocitose e liberação de armadilhas extracelulares de neutrófilos (do inglês, NETs) (KOLACZKOWSKA; KUBES, 2013). Como discutido no tópico anterior, os neutrófilos são produzidos na medula óssea a partir de progenitores mieloides e a maturação envolve diferentes estágios celulares: hemocitoblasto, célula indiferenciada mieloide, mieloblasto, promielócito neutrófilo, mielócito neutrófilo, metamielócito neutrófilo, bastonete neutrófilo e enfim, o neutrófilo maduro (**Figura 1A**)(YVAN-CHARVET; NG, 2019). Em condições fisiológicas, mais de  $10^{11}$  neutrófilos são produzidos diariamente e o processo de origem e maturação desse tipo celular é regulado pelos fatores de crescimento de colônias (do inglês, CSFs): Fator estimulador

de colônias de granulócitos (do inglês, G-CSF) e Fator estimulador de colônias de granulócitos-macrófagos (do inglês, GM-CSF) (CORNISH et al., 2009), além de fatores de transcrição como PU.1 e CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP)  $\alpha$ - $\zeta$  (DAHL et al., 2003).

Em 2014, um estudo incluiu a análise de múltiplos parâmetros do sistema imune e, analisando as citocinas presentes no plasma, encontrou uma diferença sexo-específica em que mulheres apresentam maiores níveis de GM-CSF comparados aos homens, o que poderia influenciar o fenótipo das células circulantes (FURMAN et al., 2014). Apesar da relação de causalidade não ter sido explorada, três anos depois, foi reportada a diferença de maturação entre neutrófilos femininos e masculinos, com os primeiros apresentando um fenótipo mais maduro e responsivo (BLAZKOVA et al., 2017).

### **1.3.3. Grânulos citoplasmáticos, vesículas secretórias e degranulação**

Durante o processo de diferenciação de neutrófilos descrito acima, são formados, de forma hierárquica, os três tipos de grânulos citoplasmáticos — reservatórios de proteínas essenciais para atividades como transmigração e eliminação de patógenos (KOLACZKOWSKA; KUBES, 2013). Os grânulos são classificados de acordo com o tipo de proteínas que carregam, densidade e pela ordem em que serão mobilizados para fusão com a membrana plasmática: os primeiros grânulos formam-se durante o estágio de promielócito, são conhecidos como primários ou azurofílicos e contêm enzimas como mieloperoxidase (MPO) e elastase neutrofílica (do inglês, ELANE). Entre os estágios mielócito-metamielócito são produzidos os grânulos secundários ou específicos, contendo lactoferrina (LF) e haptoglobina (HP) entre outras proteínas, e por fim, durante a fase de bastonete neutrófilo formam-se os grânulos terciários ou de gelatinases que comportam, principalmente, metaloproteinase-9 (MMP9) e lisozimas. A liberação desses grânulos segue a ordem contrária daquela em que foram produzidos, assim sendo, os primeiros grânulos a se fundirem com a membrana após determinado estímulo são os terciários e, os últimos, os azurofílicos (BORREGAARD, 2010).

Além dos grânulos, os neutrófilos também possuem outro tipo de organela armazenadora de proteínas — mais especificamente, proteínas de membrana — denominadas vesículas secretórias (BORREGAARD; SØRENSEN; THEILGAARD-MÖNCH, 2007). As vesículas secretórias são formadas por endocitose durante os

estágios finais da maturação celular e são as mais facilmente mobilizadas e excitadas em resposta a sinalização quimiotática ou aumento do  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, antes mesmo da liberação de grânulos terciários, ainda durante os processos de rolamento, adesão e migração. Contendo receptores como a integrina  $\beta 2$  e receptores de peptídeos formilados (do inglês, FPRs) (RØRVIG et al., 2013), a mobilização dessas vesículas permite a incorporação das moléculas antes confinadas no lúmen à membrana plasmática, o que medeia a transição de um neutrófilo quiescente e com poucos receptores para uma célula altamente responsiva (BORREGAARD; MILLER; SPRINGER, 1987).

As proteínas contidas nos grânulos de PMN constituem um grande arsenal microbicida que atua direta ou indiretamente sobre os patógenos e participa de outras atividades efetoras dos neutrófilos como liberação de NETs, produção de EROs e fagocitose. A degranulação define o processo de liberação regulada dessas proteínas após a ativação de vias que culminam na fusão das membranas dos grânulos com a membrana plasmática celular (liberação extracelular) ou com a membrana de fagossomos (liberação intracelular) facilitando a eliminação de partículas fagocitadas (EICHELBERGER; GOLDMAN, 2020; LACY, 2006). Apesar da relevância na defesa contra organismos invasores, a degranulação excessiva caracteriza desordens inflamatórias como o choque séptico, artrite reumatoide e lesão aguda do pulmão. Como exemplo, a NE presente em grânulos azurofílicos, danifica o pulmão durante o combate à infecção por *Burkholderia thailandensis*, contribuindo significativamente com a letalidade (SAHOO et al., 2014).

Quanto ao dimorfismo sexual, foram encontradas evidências de maior expressão de genes de proteínas presentes em grânulos azurofílicos, como ELANE, MPO e catepsina G (CTSG) em camundongos machos jovens, o que parece estar correlacionado com os maiores níveis dessas proteínas também no soro de machos em comparação com fêmeas (LU et al., 2021).

#### **1.3.4. Produção de espécies reativas de oxigênio**

A formação e liberação de espécies reativas de oxigênio (EROs) é uma das atividades principais dos neutrófilos e caracteriza a “explosão respiratória” ou “explosão oxidativa”. EROs são formadas a partir da redução parcial do oxigênio molecular em uma reação catalisada pelo complexo enzimático NADPH oxidase, também conhecido como NOX (DUPRÉ-CROCHET; ERARD; NÜBE, 2013). A liberação de EROs acontece tanto dentro de grânulos secundários e fagossomos (KARLSSON; DAHLGREN, 2002),

auxiliando na eliminação de microrganismos fagocitados quanto extracelularmente, quando por exemplo, o patógeno é grande demais para ser fagocitado (WARNATSCH et al., 2017). A importância desse mecanismo se reflete na doença granulomatosa crônica (DGC), derivada de uma falha genética que impede a correta montagem do complexo produtor de EROs, em consequência, o indivíduo portador fica sujeito a infecções recorrentes de certas bactérias e fungos (SONG et al., 2011). Enquanto a falta de EROs permite a colonização de tecidos por determinados patógenos, a produção excessiva prejudica tecidos saudáveis e outras células imunes presentes no sítio inflamatório, incluindo o próprio neutrófilo, o que prolonga a inflamação (MITTAL et al., 2014). Além de serem importantes para a atividade microbicida, as EROs atuam também na homeostase (NATHAN; CUNNINGHAM-BUSSEL, 2013) e, como moléculas sinalizadoras, são capazes de ampliar outras funções de PMN como ativação da liberação de grânulos e NETs, bem como de citocinas pró-inflamatórias (NGUYEN; GREEN; MECSAS, 2017).

O complexo NOX é formado por cinco proteínas (gp91<sup>phox</sup>, p22<sup>phox</sup>, p67<sup>phox</sup>, p47<sup>phox</sup> e p40<sup>phox</sup>) e pela GTPase Rac2. Os integrantes desse complexo enzimático se localizam em diferentes componentes celulares e, mediante sinalização de *priming* ou ativação, sofrem modificações conformacionais e são mobilizados para a membrana plasmática celular ou de fagossomos, onde o complexo é montado, levando à formação e liberação de EROs. O *priming* descreve um estado fenotípico intermediário e reversível entre o neutrófilo quiescente e ativado, incitado por alguns agentes específicos como o fator de agregação plaquetária (PAF) e GM-CSF, e que gera intensificação da resposta a um estímulo de ativação posterior (BASS et al., 2008; CONDLIFFE; KITCHEN; CHILVERS, 1998).

Os componentes gp91<sup>phox</sup> e p22<sup>phox</sup> formam o centro catalítico do complexo (cytb<sub>558</sub>), sendo a gp91<sup>phox</sup> responsável pela transferência de elétrons do NADPH para o O<sub>2</sub>, gerando o ânion superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>). Em estado quiescente, essas proteínas são encontradas nas membranas dos PMN, incluindo a de grânulos secundários e de vesículas secretórias. Já os componentes p40<sup>phox</sup>, p47<sup>phox</sup> e p67<sup>phox</sup> formam o complexo regulatório, residem no citosol e mediante ativação, são mobilizados para as membranas a fim de interagir com o centro catalítico cytb<sub>558</sub> (CROSS; SEGAL, 2004; EL-BENNA et al., 2016; GROEMPING; RITTINGER; MECHANISMEN, 2005; NUNES; DEMAUREX; DINAUER, 2013).

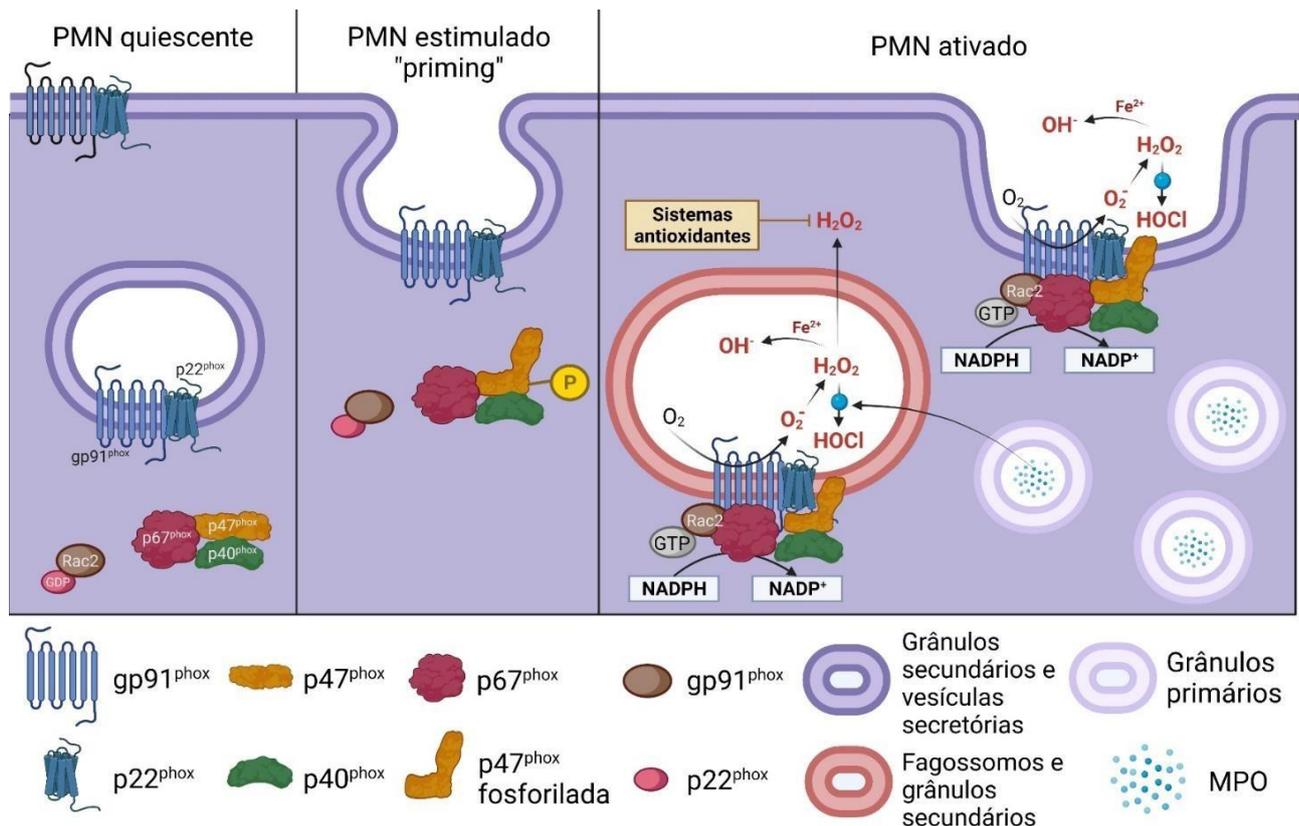


Figura 2. O complexo produtor de EROs NADPH oxidase é formado por diferentes proteínas que, em estado quiescente, residem em locais celulares diferentes. O *priming* induz a fosforilação parcial de p47<sup>phox</sup> e a ativação de PMN gera a ativação de Rac2 e a mobilização do complexo regulatório para as membranas celulares e de fagossomos, onde o complexo é montado, viabilizando, a produção e liberação de EROs no espaço extracelular ou dentro de fagossomos.

Os estágios do complexo NOX nos diferentes estados dos PMN estão ilustrados na **Figura 2**. Em suma, para montagem e ativação da NADPH oxidase, é necessário que primeiro, a Rac2, localizada no citoplasma ligada a difosfato de guanossina (GDP), seja ativada através da troca do GDP por trifosfato de guanossina (GTP), simultaneamente à fosforilação de múltiplos resíduos de serina da p47<sup>phox</sup>. Em seguida, Rac2-GTP e o complexo regulatório fosforilado são translocados até a membrana celular ou de fagossomos onde são ancoradas ao centro catalítico pela interação p47<sup>phox</sup>-p22<sup>phox</sup>, concluindo a montagem do complexo (HEYWORTH et al., 1994; LEWIS et al., 2010; NGUYEN; GREEN; MECSAS, 2017).

O ânion superóxido produzido pelo complexo NADPH oxidase dá início a uma cadeia de formação de outras EROs a partir de reações espontâneas ou catalisadas por enzimas — como a MPO — ou pela presença de Fe<sup>3+</sup> (**Figura 2**) (MITTAL et al., 2014). Apesar de ser um potente oxidante, O<sub>2</sub><sup>•-</sup> possui meia-vida extremamente curta, de 2-4 μs e rapidamente sofre dismutação espontânea ou enzimática para o peróxido de hidrogênio

(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) que por sua vez, pode oxidar Fe<sup>3+</sup> e assim gerar o altamente reativo radical hidroxila (OH<sup>•</sup>), por meio da reação de Fenton. A degranulação de neutrófilos também participa da produção de agentes oxidantes: a MPO presente em grânulos azurofílicos converte H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em ácido hipocloroso (HOCl), outro potente oxidante essencial na eliminação de patógenos (LEVINE; SEGAL, 2016; NGUYEN; GREEN; MECSAS, 2017; ROSEN; KLEBANOFF, 2013; SARAN; BORS, 1989).

### **1.3.5. Mecanismos antioxidantes de neutrófilos**

É impossível que a toxicidade inerente das EROs e de seus subprodutos seja direcionada exclusivamente para os patógenos que induziram a explosão respiratória. Dessa maneira, o sítio inflamatório e todas as células hospedeiras presentes também estarão submetidas às ações dos oxidantes, daí a importância da regulação e controle desse processo (WINTERBOURN; KETTLE; HAMPTON, 2016). O radical hidroxila (OH<sup>•</sup>), por exemplo, pode reagir com praticamente todas as macromoléculas biológicas que sustentam a vida celular, como lipídeos, proteínas e DNA (GLENNON-ALTY et al., 2018). O peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) é abundante durante a explosão respiratória, possui longa meia-vida e participa da formação de HOCl; por ambos não apresentarem carga, conseguem se difundir livremente pelas membranas. Isso significa que durante a explosão respiratória, os neutrófilos também estão sujeitos às ações das EROs e da entrada de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e HOCl em seu citoplasma, como consequência, pode haver peroxidação lipídica, oxidação proteica, dano em ácidos nucleicos e por fim, indução de apoptose (ULFIG; LEICHERT, 2021).

Assim sendo, a existência de mecanismos de proteção capazes de manter o equilíbrio redox das células, tem importante influência na inflamação como resultado do seu papel fundamental na manutenção das funções e da vida de neutrófilos, de outras células imunitárias e do endotélio. Para tal, diversos tipos de antioxidantes atuam na chamada “homeostase de EROs”, incluindo vitaminas, enzimas e moléculas antioxidantes (MARENCO et al., 2016).

Quanto à dismutação enzimática, a superóxido dismutase (SOD) foi a primeira enzima antioxidante a ser caracterizada (MCCORD; FRIDOVICH, 1969) e atua no controle do estresse oxidativo catalisando a dismutação do superóxido em H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que, por

sua vez, pode ser convertido em H<sub>2</sub>O tanto pelas enzimas catalase (CAT) e glutatona peroxidase (GPx) quanto por peroxirredoxinas (PRDX) (FORMAN; MAIORINO; URSINI, 2010; PERKINS et al., 2015). Mesmo que as ações enzimáticas descritas acima não sejam suficientes, existe um sistema paralelo das pequenas proteínas tiorredoxina (Trx) e glutarredoxina (Grx) que reduzem proteínas que tenham sido oxidadas (HOLMGREN et al., 2005).

Em relação às moléculas antioxidantes, o tripeptídeo Glutationa (GSH) se destaca não só em neutrófilos, mas em todo organismo — presente intra e extracelularmente — pelo seu papel na detoxificação celular. A GSH é o substrato da GPx durante a neutralização do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e reage diretamente com superóxido, gerando a glutatona oxidada (GSSG) que pode ser reciclada novamente a GSH pela enzima glutatona redutase (GR), com o NADPH como substrato (**Figura 3**). Além disso, parece estar envolvida na neutralização de HOCl (BILZER; LAUTERBURG, 1991).

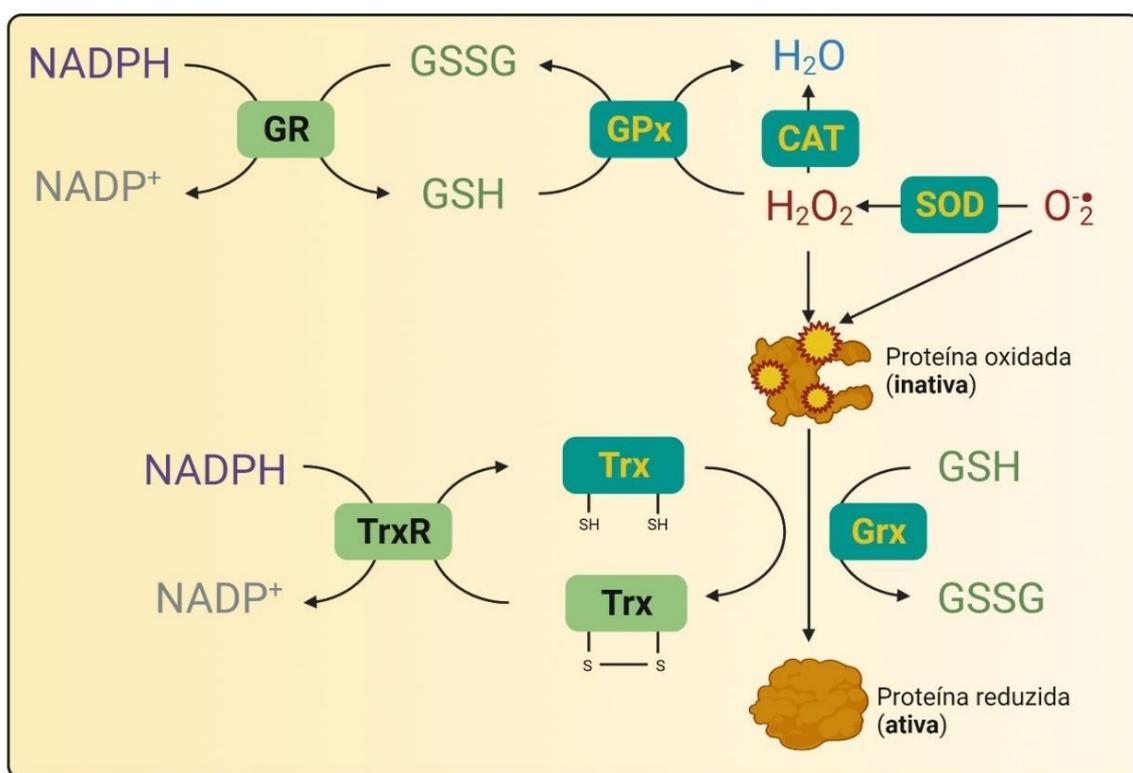


Figura 3. Alguns sistemas responsáveis pela neutralização de EROs. A SOD converte o superóxido em peróxido de hidrogênio, que por sua vez pode ser neutralizado tanto pela CAT quanto pela GPx. As EROs que conseguem evadir tais sistemas podem gerar dano celular ao oxidar, por exemplo, proteínas e afetar sua função. Um sistema paralelo composto por Trx e Grx é capaz de reduzir as proteínas e restaurar suas conformações originais. A GSH atua como substrato tanto para Grx quanto para GPx, sendo sua reciclagem feita por GR, que por sua vez, assim como TrxR, necessita de NADPH como combustível redutor. Imagem feita com Biorender.

### 1.3.6. Fagocitose

Neutrófilos, macrófagos e células dendríticas constituem um grupo de células imunitárias classificadas como fagócitos profissionais (LEE; HARRISON; GRINSTEIN, 2003). A fagocitose é um processo mediado por receptores, essencial para a linha de frente da imunidade pois resulta na eliminação de patógenos e participa da ativação e modulação da imunidade adaptativa quando citocinas pró-inflamatórias são liberadas durante o processo e produtos da degradação por fagocitose são apresentados como antígenos para células linfoides. A variedade de alvos, receptores e interações revela uma grande complexidade, ainda pouco explorada, em que os processos de engolfamento não são idênticos. Mesmo assim, o estudo da fagocitose permitiu a identificação das principais etapas, sendo elas: a interação entre a partícula e o receptor, a extensão de pseudópodes em torno do alvo e, enfim, o completo engolfamento que resulta na formação do fagossomo (VAN KESSE; BESTEBROER; VAN STRIJP, 2014).(FLANNAGAN; JAUMOUILLÉ; GRINSTEIN, 2012; VAN KESSE; BESTEBROER; VAN STRIJP, 2014)

Microrganismos podem ser reconhecidos diretamente, como quando polissacarídeos presentes na membrana de leveduras são reconhecidos pelo receptor de manose ou por dectina-1; ou por meio da opsonização, em que moléculas solúveis presentes na circulação se depositam na superfície de antígenos, mediando a fagocitose do alvo através da ligação entre opsonina e receptor, como acontece nas ligações entre IgG e Fc $\gamma$ ; IgA e Fc $\alpha$ ; e entre moléculas do sistema complemento e os receptores do complemento (CR1, CR3 e CR4) (FLANNAGAN; JAUMOUILLÉ; GRINSTEIN, 2012). Os efeitos da ativação dos receptores desencadeiam uma cascata de eventos moleculares dependentes do tipo de receptor, a sinalização mais bem descrita é a resultante da ligação de IgG a Fc $\gamma$ , que inclui a fosforilação de domínios internos do receptor, ativação de tirosinas cinases e recrutamento de proteínas adaptadoras. Apesar das diferentes vias, todas culminam na formação dos filamentos de actina necessários para formação dos pseudópodes.

Após a internalização, o fagossomo começa a adquirir as características necessárias para que o patógeno engolfado possa ser neutralizado em um processo chamado de maturação do fagossomo mediada principalmente pelas Rab GTPases. Para a maturação, diversas proteínas são adquiridas pelo fagossomo — por meio da mobilização e fusão com grânulos e lisossomos — como ATPases vacuolares e

cathepsinas, que participam da acidificação e degradação das partículas, respectivamente, além da montagem do complexo NOX também acontecer na membrana dos fagossomos, aumentando sua capacidade microbicida (KINCHEN; RAVICHANDRAN, 2008; NORDENFELT; TAPPER, 2011; SEGAL; DORLING; COADE, 1980).

### **1.3.7. Ativação de neutrófilos por fMLP**

O fMLP (n-formil-metionil-leucil-fenilalanina) é um tripeptídeo isolado a partir de culturas de bactérias gram-positivas reconhecido como potente quimioatraente e ativador de neutrófilos a partir da sua ligação a receptores de peptídeos formilados FPRs (MARASCO et al., 1984). O FPR é uma glicoproteína com sete alças transmembranares pertencente à classe dos receptores acoplados a proteína G (do inglês, GPCR)(PANARO; MITOLO, 1999).

A ligação do fMLP ao seu receptor engatilha diversas vias metabólicas que culminam em diferentes respostas celulares, caracterizando a ativação do neutrófilo. Entre elas estão a polarização morfológica necessária para migração celular em direção a um gradiente quimiotático, a ativação do complexo NADPH oxidase e consequente produção e liberação de EROs, mobilização e exocitose dos grânulos citoplasmáticos e vesículas secretórias e a liberação de outros mediadores inflamatórios como a interleucina-8 (IL-8), leucotrieno A<sub>4</sub> (LTA<sub>4</sub>), leucotrieno B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>) e TNF- $\alpha$  (DORWARD et al., 2015).

A ligação do tripeptídeo ao receptor FPR induz fosfolipase C (do inglês, PLC) a clivar o fosfolipídio membranar fosfatidilinositol (4,5) -bifosfato (PIP<sub>2</sub>) em inositol trifosfato (IP<sub>3</sub>) e diacilglicerol (DAG). Os produtos IP<sub>3</sub> e DAG geram, por sua vez, aumento do Ca<sup>2+</sup> intracelular e ativação da proteína cinase C (PKC), respectivamente. Tais eventos são fundamentais para ativação da via MAP-cinase e da amplificação de sinal que convergem no fenótipo do neutrófilo ativado (DEWAS et al., 2000; HONEYCUTT; NIEDEL, 1986; OHTA; OKAJIMA; UI, 1985).

## **1.4. O estudo do dimorfismo sexual em neutrófilos humanos**

Em 2010, a revista *Nature* lançou uma série de artigos para expor o viés sexual existente na pesquisa biomédica, onde o estudo da biologia do sexo feminino, tanto em humanos quanto em animais, é preterido em relação ao masculino (NATURE, 2010). Uma das sugestões é a de se analisar ambos os sexos durante a pesquisa, mas essa abordagem ainda não foi adotada, e por isso, muito pouco se sabe sobre os mecanismos

que regem o dimorfismo sexual em diversas áreas e em particular, na imunologia (FLANAGAN, 2014).

Muitas diferenças sexo-específicas de neutrófilos humanos e de animais encontradas na literatura foram mencionadas ao longo dos tópicos anteriores. Tais estudos focaram em atividades efectoras ou características fenotípicas específicas, mas a diferença entre metodologias dificulta a correlação dos dados. Como o dimorfismo sexual em neutrófilos ainda está longe de ser bem compreendido, estudos de descoberta, com abordagens mais abrangentes são de suma importância para desvendar as principais características afetadas pelo sexo e assim, direcionar investigações capazes de elucidar os mecanismos responsáveis por tais eventos, potencialmente revelando importantes alvos terapêuticos.

Nesse contexto, os estudos ômicos — caracterização de grupos de biomoléculas a fim de compreender composição, estrutura, função, localização e interação que regem determinado fenótipo — podem ser excelentes pontos de partida. De fato, um trabalho recente gerou dados multiômicos (transcriptoma, metaboloma, lipidoma e epigenoma) a partir da análise de neutrófilos murinos presentes na medula óssea e concluiu que essas células são extremamente dimórficas em função do sexo, apontando diferentes aspectos para serem explorados em investigações futuras (LU et al., 2021). Entretanto, não se sabe como essas diferenças se refletem no neutrófilo circulante de camundongos.

Quanto aos neutrófilos circulantes de humanos saudáveis, apenas uma publicação recente explorou o dimorfismo sexual de forma abrangente seguido de testes funcionais: Gupta, et al. (2020) analisaram o transcriptoma de neutrófilos e encontraram diferenças importantes em relação ao status de maturação, produção de IFN e bioenergética.

A abordagem proteômica ainda não foi utilizada para comparar neutrófilos femininos e masculinos e a regulação de proteínas em função do sexo pode fornecer hipóteses importantes para direcionar investigações funcionais e fenotípicas. Dessa forma, este trabalho tem como objetivo comparar o proteoma de neutrófilos circulantes quiescentes e ativados a fim de encontrar alvos capazes de elucidar o efeito do sexo sobre a biologia dos neutrófilos e na regulação da sua ativação.

## **2. JUSTIFICATIVA**

Como uma variável biológica, o sexo modula o sistema imunitário e pode estar envolvido nas diferenças observadas entre homens e mulheres quanto a manifestação e desenvolvimento de doenças infecciosas, autoimunes e câncer. Os mecanismos responsáveis por tal disparidade não são suficientemente explorados e estão longe de serem completamente elucidados. Como células dominantes da resposta imune inata, os neutrófilos participam tanto da fisiopatologia de inúmeras desordens orgânicas, quanto da manutenção da homeostase de diversos órgãos. Ainda assim, muito pouco se sabe sobre o dimorfismo sexual de neutrófilos. Dessa forma, um estudo comparativo abrangente entre neutrófilos femininos e masculinos tem importantes implicações para a compreensão da saúde e da doença, além de apresentar potencial em revelar alvos terapêuticos sexo-específicos.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo geral**

Identificar diferenças moleculares sexo-específicas de neutrófilos humanos quiescentes e ativados com fMLP por proteômica bottom-up e realizar comparações funcionais para caracterização do dimorfismo sexual em PMN.

#### **3.2. Objetivos específicos**

- I.** Identificar as proteínas de neutrófilos humanos com abundâncias significativamente diferentes entre os sexos;
- II.** Identificar as proteínas de neutrófilos humanos ativados com fMLP com abundâncias significativamente diferentes entre os sexos;
- III.** Avaliar a interação entre os fatores sexo e ativação na abundância de proteínas e
- IV.** Avaliar possíveis mecanismos moleculares responsáveis pelo dimorfismo sexual de neutrófilos humanos.

## 4. METODOLOGIA

### 4.1. Delineamento experimental

A **Figura 4** resume a estratégia experimental utilizada. Em resumo, após a seleção de doadores (n=16, oito de cada sexo) segundo critérios para evitar interferência de fatores externos e variação hormonal (descritos no tópico 4.2), os neutrófilos foram isolados e divididos entre grupos controle e estimulados com fMLP. As células de cada grupo foram submetidas à lise para extração de proteínas. As proteínas foram tratadas e digeridas com tripsina para identificação e quantificação segundo a estratégia proteômica bottom-up. Os dados obtidos foram tratados e analisados com o auxílio de diversas ferramentas de bioinformática que permitiram uma análise abrangente sobre as possíveis diferenças em função do sexo em neutrófilos humanos. A partir dessa análise, hipóteses foram levantadas e novos testes funcionais (n=3) foram planejados para investigação de determinadas atividades efetoras, cujos resultados estão discutidos no tópico 5.

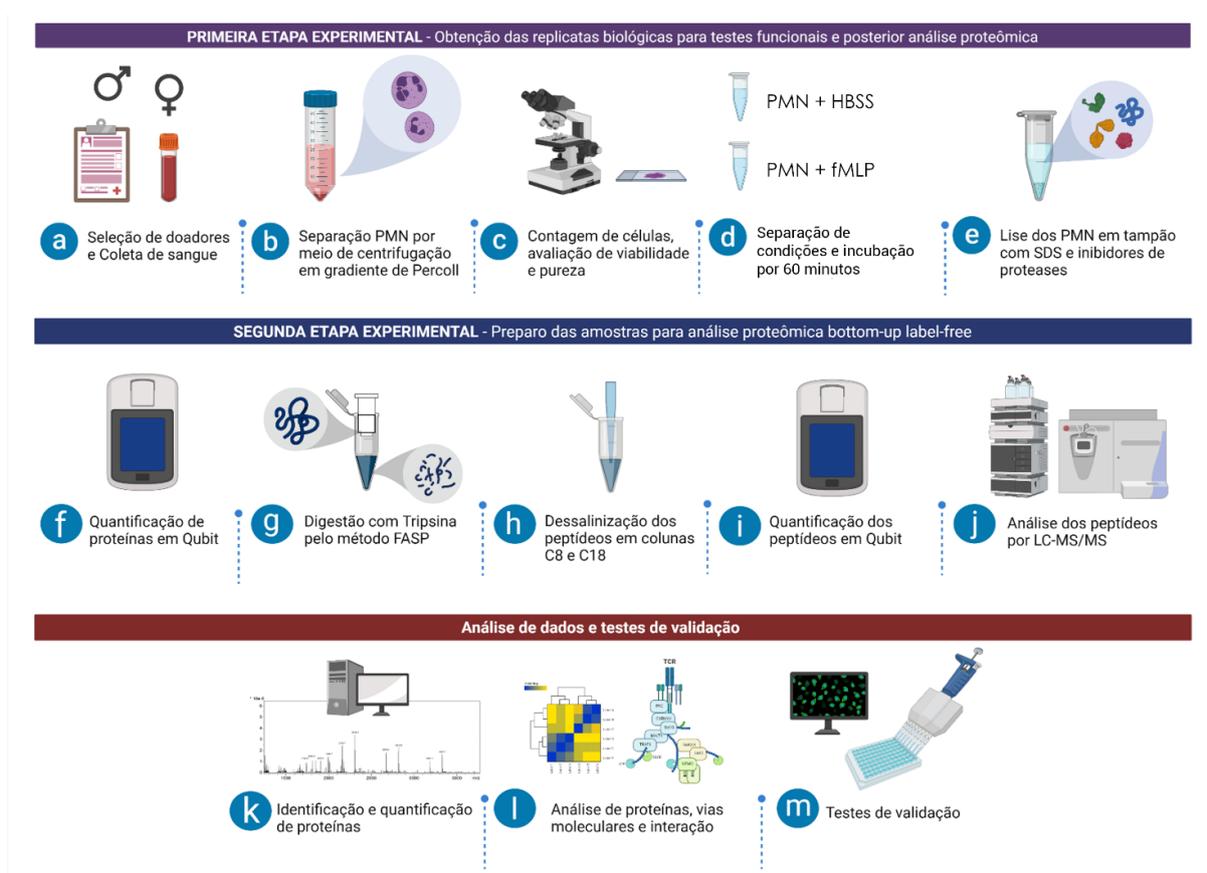


Figura 4. As principais etapas do projeto: Obtenção das amostras, preparo das proteínas e análise dos dados proteômicos. A partir da correlação de resultados de proteômica foram formuladas novas hipóteses para identificar o dimorfismo sexual em neutrófilos, que foram testadas em ensaios funcionais para validação. Imagem feita com BioRender.

## 4.2. Seleção de doadores e coleta de sangue

O sangue utilizado para obtenção de neutrófilos foi coletado de 16 doadores voluntários entre 18 e 35 anos. Oito doadores do sexo masculino e oito do sexo feminino.

Todos os doadores preencheram uma ficha de anamnese e os critérios de higiene foram: não apresentar histórico de doenças crônicas, alérgicas ou inflamatórias; não estar fazendo uso de nenhum tipo de anticoncepcional ou medicamento; não fumantes; não ter ingerido bebidas alcoólicas nas 48 horas anteriores à coleta e em jejum no momento da coleta por pelo menos oito horas. Além disso, as mulheres deveriam estar no intervalo entre o primeiro e sexto dia do ciclo menstrual, período em que os hormônios LH, FSH, progesterona e estrógeno estão em níveis mais baixos e com menor variação comparado com o restante do ciclo hormonal (SCHMALENBERGER et al., 2021), como mostrado na **Figura 5**.

A coleta do sangue foi realizada por punção venosa periférica utilizando seringa heparinizada e 20 mL de sangue foram coletados de cada doador. 12 mL de sangue foram destinados à separação de PMNs e o restante foi centrifugado a 1600 rpm por 5 minutos para obtenção de plasma autólogo e utilizado na ativação celular. Este procedimento foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade de Brasília, registro CEP-CFM-45/2010.

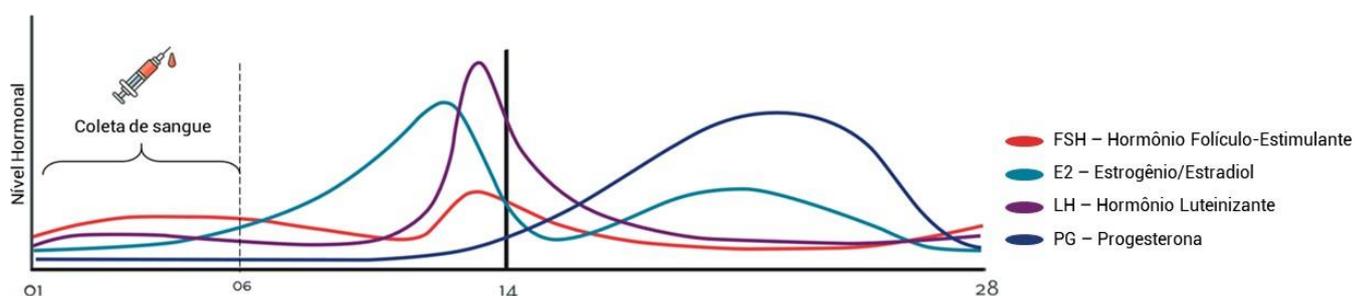


Figura 5. O período de coleta do sangue feminino foi definido como sendo aquele com os menores níveis hormonais: do primeiro ao sexto dia do ciclo menstrual, como indicado na figura. Imagem adaptada de [helloclue.com](http://helloclue.com).

## 4.3. Separação de Polimorfonucleares (PMNs)

Os PMNs foram isolados do sangue periférico por meio de centrifugação em gradiente de densidade de Percoll em tubo Falcon de 50 mL (60 % sobre 70 % de Percoll para sangue masculino e 58 % sobre 70 % para sangue feminino) durante 15 minutos a 1300 rpm em temperatura ambiente, como mostra a **Figura 6**. O gradiente inclui Percoll como agente de separação por densidade e Hanks Balanced Salt Solution (HBSS) como

solução mantenedora de pH 7.35-7.45, pressão osmótica e demais condições fisiológicas das células (AQUINO et al., 2016). Ao final da centrifugação, foram realizadas duas lavagens com HBSS e duas etapas de hemólise hipotônica para eliminar completamente Percoll e hemácias, respectivamente (TELES et al., 2012). O pellet de células foi ressuspenso em HBSS e duas alíquotas foram retiradas. A primeira (6  $\mu$ L) foi dividida em 3 poços de uma lâmina, secados com ar quente e corados com Kit Panótico para avaliação da morfologia e da pureza da amostra. A segunda alíquota (1  $\mu$ L) foi ressuspenso em 49  $\mu$ L de azul de tripan 0,2 % para avaliação da viabilidade celular e da quantidade de células.

#### 4.4. Ativação celular *in vitro* com N-formilmetionil-leucil-fenilalanina (fMLP)

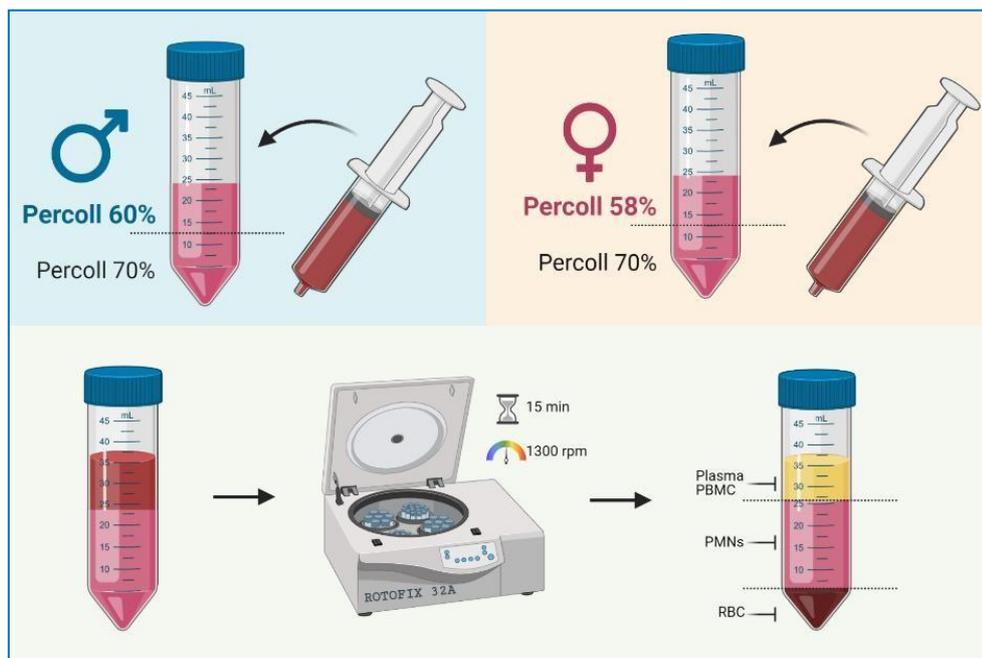


Figura 6. Para separação dos PMNs a partir do sangue periférico, 12mL de sangue foram centrifugados sobre gradiente de Percoll (60 % sobre 70 % para sangue masculino e 58 % sobre 70 % para sangue feminino). Imagem feita com BioRender.

Antes da ativação celular com o tripeptídeo fMLP (N-formilmetionil-leucil-fenilalanina) foram adicionados HBSS com  $Ca^{2+}Mg^{2+}$  e plasma autólogo à suspensão de células de modo que a concentração final da suspensão fosse 6667 células/ $\mu$ L e para restauração de íons e fatores plasmáticos necessários durante a ativação. O volume total foi então dividido igualmente em duas condições: Controle e fMLP. Para ativação, fMLP 100 nM (Sigma F3506) e HBSS foram adicionados aos grupos fMLP e controle, respectivamente. As condições foram incubadas a 37 °C durante 60 minutos, sob agitação de 350 rpm em Thermomixer.

#### 4.5. Produção de espécies reativas de oxigênio e Fagocitose

A avaliação da produção de EROs foi realizada através do teste de NBT (AFZAL; JESHTADI; MOHMED, 2014). A **Figura 7** ilustra a metodologia utilizada: após 40 minutos de ativação, uma alíquota de 36  $\mu\text{L}$  de células foi retirada de cada condição e ressuspendida em novo microtubo contendo 20  $\mu\text{L}$  de solução de NBT 6 mM solubilizado em DMSO. Imediatamente após uma delicada homogeneização, 6  $\mu\text{L}$  da suspensão de células em NBT foram divididos em três poços de uma lâmina limpa e incubada em banho- maria a 37 ° C durante 20 minutos, completando os 60 minutos de ativação. Ao final do tempo de incubação, as lâminas foram secadas com ar quente, fixadas por meio de adição de metanol 100 % por 1 minuto e coradas com adição de safranina por 5 minutos. Para avaliação da fagocitose, após 20 minutos de incubação, uma alíquota de 5  $\mu\text{L}$  de células 6600 c/  $\mu\text{L}$  foi incubada com 5  $\mu\text{L}$  de uma suspensão de leveduras 33000 leveduras/  $\mu\text{L}$  (neutrófilo:leveduras = 1:5) em lâmina por 40 minutos. Logo após, as lâminas foram tratadas como descrito para NBT mas coradas com o kit Panótico.

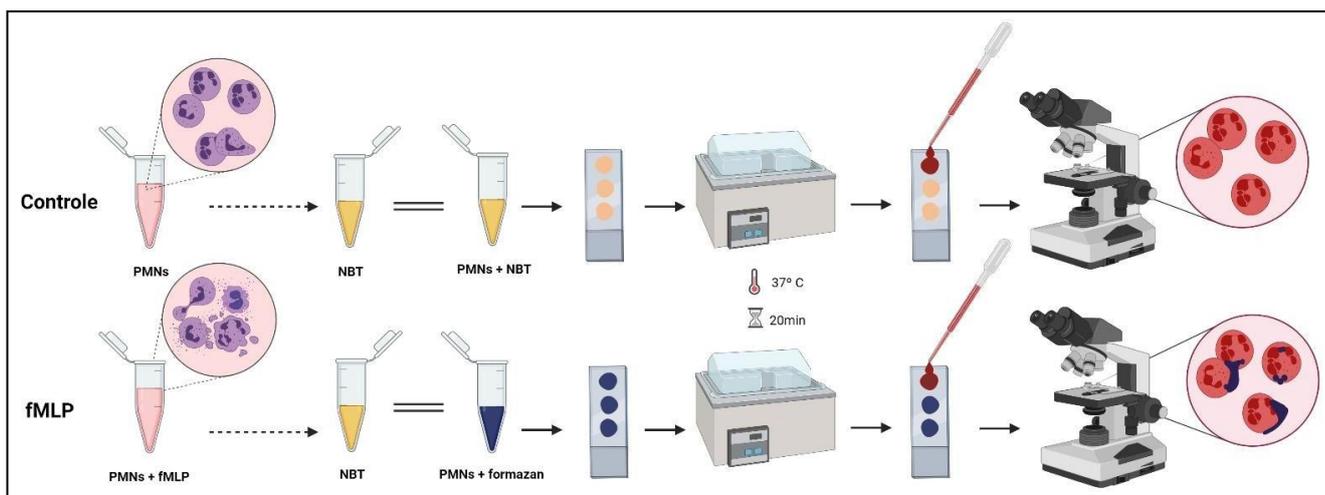


Figura 7. A avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio foi feita através do teste de NBT. Após 40 minutos de ativação, uma alíquota é retirada de cada condição e ressuspendida com uma solução de NBT. Logo em seguida são retirados 6  $\mu\text{L}$  e divididos em 3 poços de uma lâmina limpa, que é deixada em banho-maria durante 20 min. Após os 20 minutos, as lâminas são secadas com ar quente, fixadas com metanol e coradas com Safranina para análise microscópica. Imagem feita com Biorender.

#### 4.6. Lise celular, extração e quantificação de proteínas

A extração das proteínas das células, bem como as etapas de preparação (tópico 4.7) e de análise por LC-MS/MS (tópico 4.8) foram feitas como descrita em WEIS et al., 2021. Em resumo, as amostras foram incubadas com 200  $\mu\text{L}$  de tampão de lise contendo SDS 2 %, DTT 0,1 M, inibidores de protease 3X (Roche 04 906 837 001) e TEAB 0,02 M durante 10 minutos a 80 °C e 1000 rpm. Ao final da incubação, cada amostra foi

sonicada em tip-sonicador durante o tempo total de 1 min 15 s com ciclos de 15 segundos seguidos por intervalos de 15 segundos e amplitude de 60 %.

#### **4.7. Capacidade antioxidante total**

Em função dos resultados de proteômica, mais três amostras de extrato celular ( $3,0 \times 10^5$  células) de cada sexo foram preparadas conforme descrito nos tópicos 4.3. e 4.4 para avaliação da capacidade antioxidante total. Após os 60 minutos de incubação, as células foram lavadas duas vezes com HBSS 1x, lisadas com SDC 4 % e armazenadas em freezer  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  até o momento da análise. O método se baseia na descoloração do  $\text{ABTS}^+$  como descrito por (EREL, 2004): as amostras foram centrifugadas a 10000 G durante 5 minutos a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  e 5  $\mu\text{L}$  do sobrenadante foram incubados com 195  $\mu\text{L}$  do radical  $\text{ABTS}^+$  — cuja absorbância a 734 nm foi de  $0,70 \pm 0,05$  UA — em temperatura ambiente durante 6 min em placa de 96 poços. Após o período de incubação, a descoloração da solução de ABTS foi avaliada por meio da leitura de absorbância a 734 nm. Uma curva padrão foi feita com o análogo da vitamina E, Trolox (**ANEXO I**), que apresenta capacidade antioxidante e induz a descoloração do ABTS. Os resultados das amostras foram expressos em equivalência à concentração molar de Trolox por 10000 células.

#### **4.8. Migração de neutrófilos em tempo real por RTCA**

A avaliação da capacidade de migração foi feita em RTCA (do inglês, Real Time Cell Analyzer) como descrito em (CANO; VARGAS; LAVOIE, 2016). A montagem da placa CIM (CIM-Plate 16; ACEA Biosciences Inc., San Diego, CA) foi feita na seguinte ordem: 160  $\mu\text{L}$  de fMLP 100 nM foram adicionados aos poços inferiores para avaliação da migração e 160  $\mu\text{L}$  de HBSS foi adicionado ao poço inferior para o controle negativo. A câmara superior foi encaixada sobre a câmara contendo os poços inferiores e 25  $\mu\text{L}$  de HBSS foram adicionados a todos os poços superiores e a placa foi incubada a temperatura ambiente por pelo menos 60 minutos, antes dos neutrófilos serem adicionados, para formação do gradiente quimiotático entres as câmaras. Imediatamente após a ativação celular descrita no tópico 4.4, uma alíquota de 60  $\mu\text{L}$  de células do sistema de ativação foi adicionada aos poços superiores da placa e a análise programada para medição do índice celular a cada 60 segundos durante o período de 2 horas. Ao final das corridas as placas CIM foram reutilizadas com base no protocolo descrito por (STEFANOWICZ-HAJDUK et al., 2016) com poucas modificações. Em resumo, os poços e os eletrodos das duas câmaras da placa foram lavados três vezes com PBS seguidas de duas lavagens com água milli-Q. Após as lavagens, a placa foi montada e foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  de solução Tripsina-EDTA (tripsina 0,25%, EDTA 0,53 mM). A placa foi então incubada

em temperatura ambiente por 40min e em seguida, cada câmara foi lavada três vezes com água milli-Q e guardadas para reutilização.

#### **4.9. Preparação das proteínas para análise LC-MS/MS**

As amostras lisadas foram submetidas a centrifugação de 16000 G por 5 minutos a 24 ° C. Uma alíquota do sobrenadante foi usada para quantificação de proteínas em Qubit (Invitrogen) e em seguida, alíquotas correspondentes a 100 µg de proteínas de cada amostra foram submetidas a desnaturação, redução, alquilação e finalmente digestão trípica em filtro VIVACON 500 com cut-off de 30kDa (Sartorius) por meio do uso de Ureia 8 M, DTT 0,1 M, Iodoacetamida 50 mM e tripsina 0.02 µg/uL respectivamente (FIRMINO et al., 2018; WEIS et al., 2021).

A etapa de digestão foi seguida pela etapa de purificação de peptídeos, também chamada de dessalinização. Para isso, uma coluna constituída por discos de matriz C18, C8 e Resina Poros R2 foi montada em uma ponteira P200 e condicionada com metanol para cada amostra. Após o condicionamento, o extrato de peptídeos proveniente da digestão foi aplicado na coluna e lavados com TFA 0,1% por três vezes. Para eluição dos peptídeos purificados, foram utilizadas três soluções com níveis crescentes de acetonitrila (20 %, 50 % e 90 %). As suspensões foram secadas em speed-vac e os peptídeos foram novamente quantificados em Qubit e ressuspensos em TFA 0,1 % em concentração 0,5 µg/µL e armazenados a -80 °C até análise por LC-MS/MS.

#### **4.10. Análise por LC-MS/MS**

A análise LC-MS/MS foi realizada em um sistema de nano cromatografia de fase reversa acoplado a um espectrômetro de massa do tipo LTQ-Orbitrap Elite (Thermo Fischer Scientific, Alemanha) como descrito por (FIRMINO et al., 2018; WEIS et al., 2021). A partir das amostras de peptídeos purificados, 1 g da mistura de peptídeos foi injetado em uma coluna trap (3 cm x 100 µm, preenchida por partículas de 5µm de C18) e em seguida, em uma coluna analítica (23 cm x 75 µm preenchida por partículas de 3 µm de C18) que culmina em uma fonte de íons do tipo ESI (do inglês, Electrospray ionization) do espectrômetro de massa. A aquisição foi feita de modo dependente de dados (DDA), em que o software seleciona em MS1 os íons precursores a serem fragmentados por dissociação colisional de alta energia (do inglês, HCD) com base na abundância — os 20 mais intensos — e a quantificação label-free foi baseada na quantidade de espectros de MS2.

#### 4.11. Análise estatística e bioinformática

Todos os gráficos representam o valor médio  $\pm$  erro padrão e foram feitos no programa GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, San Diego, California EUA). Foram considerados significativas as comparações com valor de  $p \leq 0,05$ . Para comparações de apenas um par de médias dos testes funcionais, foi feito o teste-t e para avaliação do efeito das duas variáveis explicativas — sexo e ativação — foi realizada o teste ANOVA de duas vias através do programa R Studio (R CORE TEAM, 2021).

A análise bioinformática e estatística a que foram submetidos os resultados de proteômica estão ilustrados na **Figura 9**. Os dados de LC-MS foram importados para o software Progenesis QI (versão 1.0; Non-Linear Dynamics, a Waters Company, Reino Unido) para alinhamento dos cromatogramas e quantificação de peptídeos, cujos dados juntamente com aqueles de MS2 foram exportados para o software PEAKS 7.0 (Bioinformatics Solutions Inc., Ontário, Canadá) para identificação a partir da pesquisa em banco de dados. A significância estatística da identificação foi baseada em um FDR (do inglês, False Discovery Rate) de 0,01. As proteínas identificadas foram novamente importadas pelo Progenesis para análise de variância simples one-way ANOVA. Os dados de abundância das proteínas identificadas com mais de dois peptídeos únicos que apresentaram regulação significativa ( $p \leq 0,05$ ) entre os grupos foram exportados para análise ANOVA de duas vias no programa R (**ANEXO II**) e os grupos de proteínas reguladas em função dos fatores e da interação foram analisados quanto enriquecimento gênico pelo programa ShinyGO (XIJIN GE; JUNG; YAO, 2019).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Separação dos neutrófilos e extração de proteínas

Neutrófilos podem ser estudados por meio de culturas — através da diferenciação de células HL-60 com DMSO ou ácido retinóico — cujas limitações impedem o estudo de determinadas funções e da biologia completa de neutrófilos (HAUERT et al., 2002; MARTIN; BRADLEY; COTTER, 1990); ou por isolamento a partir do sangue periférico (NAUSEEF, 2007). A segunda opção inclui metodologias que podem ser classificadas em dois grupos principais: aquelas baseadas em anticorpos, cuja vantagem é a obtenção de uma população altamente pura, porém limitam o rendimento obtido; e as baseadas em gradientes de densidade, com a vantagem de se conseguir um grande número de células (HSU et al., 2021). Por apresentarem densidades similares, neutrófilos e outros PMN menos abundantes, como os eosinófilos, não podem ser completamente separados em função da densidade. No entanto, por serem os PMN dominantes em mais de 95 %, tais métodos ainda garantem pureza suficiente às suspensões de neutrófilos.

A separação de neutrófilos a partir do sangue periférico em gradiente de Percoll é um método bem estabelecido pelo grupo (AQUINO et al., 2016; CASTRO et al., 2006; FONSECA; FONTES, 2017; TELES et al., 2012). Com esta metodologia, foi possível obter amostras com alto rendimento celular para análise proteômica, que resultou na identificação de 1410 proteínas, entre as quais, 687 foram identificadas com pelo menos dois peptídeos únicos (**Figura 8A**) e utilizadas para análise de enriquecimento gênico, discutida a seguir. Como uma limitação do método, a pureza média das amostras femininas e masculinas foi de  $96 \pm 0,8$  % células e  $94 \pm 1,4$  % células, respectivamente, sendo os eosinófilos os principais contaminantes (**Figura 8B**). Em um estudo de 2016, a avaliação da pureza de amostras de neutrófilos mostrou que a contaminação de  $1,52 \pm 1,12$  % de eosinófilos foi irrelevante, não interferindo na expressão de genes ou produção de citocinas (CALZETTI et al., 2017). Tendo obtido uma quantidade de eosinófilos inferior à citada na literatura, os dados de ontologia gênica (GO) do total de proteínas identificadas no presente estudo destacaram o enriquecimento de genes característicos não apenas de leucócitos/granulócitos, mas especificamente de neutrófilos, como mostrado na **Figura 8A**.

A partir das lâminas de pureza (**Figura 8B**), foi possível avaliar a morfologia dos

neutrófilos de ambos os sexos, mas nenhuma diferença significativa foi observada. Um dos primeiros estudos sobre o dimorfismo sexual em neutrófilos humanos foi o de

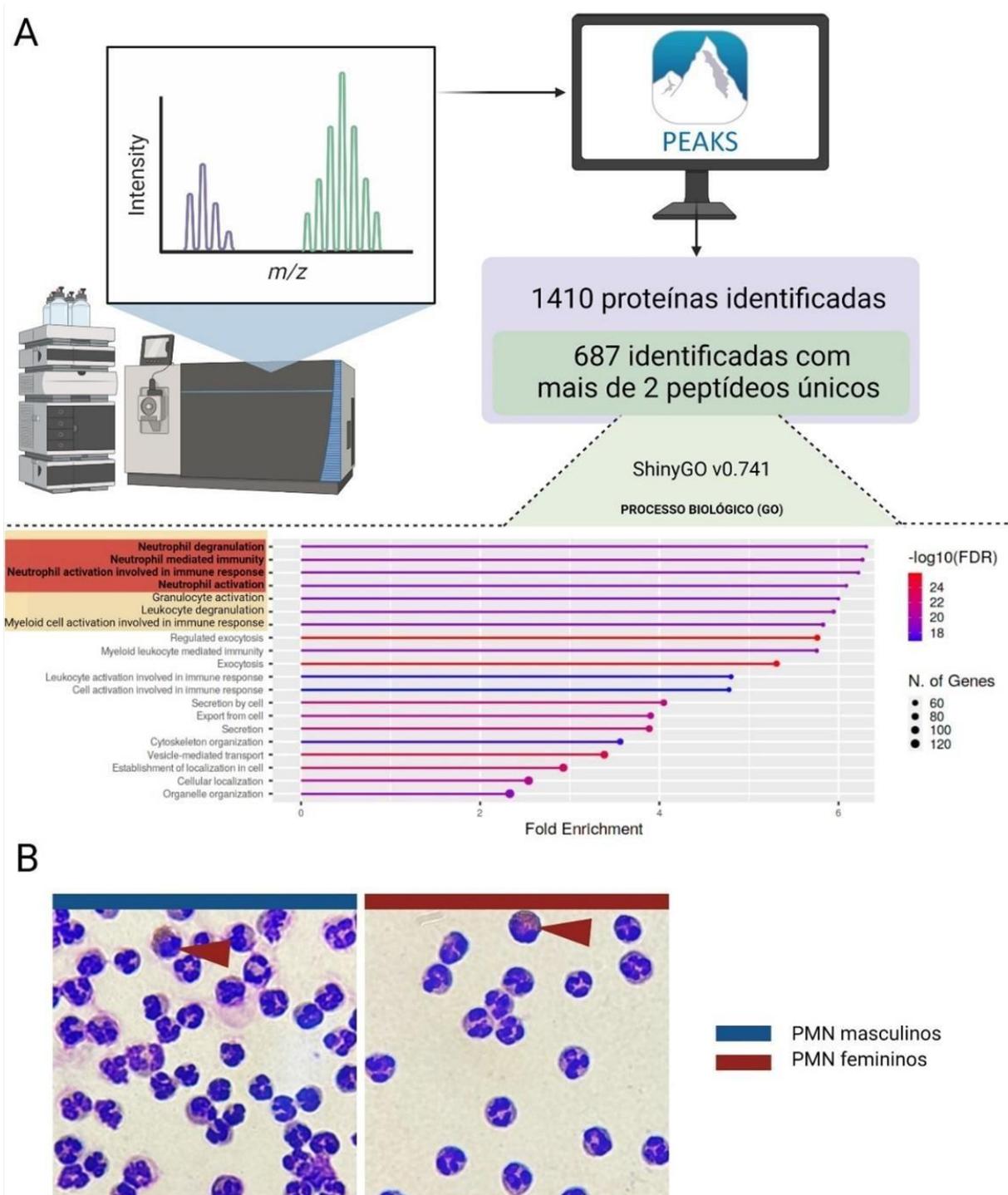


Figura 8. A extração de neutrófilos através de um gradiente de densidade resultou em uma fração de PMN enriquecida de neutrófilos. O método foi validado pela análise de termos GO (A) em que termos relacionados a biologia de neutrófilos, especificamente, aparecem como aqueles mais enriquecidos quando todas as proteínas identificadas foram analisadas. Além disso, a análise de lâminas de morfologia/ pureza de ambos os sexos (B) comprovam o isolamento majoritário de PMN neutrófilos. Setas vermelhas indicam o outro tipo celular mais encontrado nas suspensões celulares: eosinófilos. Imagem feita com Biorender

Davidson e Smith, em 1954, quando reportaram pela primeira vez a presença de uma estrutura anexa a um dos lóbulos nucleares, denominada “*drumstick*” exclusivamente em neutrófilos femininos (DAVIDSON; SMITH, 1954). Mais tarde, outros autores observaram esta estrutura como *mais comum* em neutrófilos femininos, mas presente em ambos e até hoje nenhuma consequência funcional foi encontrada (BRAHIMI et al., 2013; TOMONAGA et al., 1961).

## **5.2. Proteômica exploratória para avaliar o dimorfismo sexual de neutrófilos**

Como leucócitos dinâmicos, efetores primários da defesa inata do organismo, moduladores da imunidade adaptativa e mantenedores da homeostasia de diferentes tecidos, os neutrófilos participam da fisiopatologia de diversas doenças, incluindo aquelas que apresentam um significativo viés sexual, como sepse e as doenças autoimunes. Sob estímulo ou ativação, o neutrófilo aumenta sua atividade transcricional que resulta em diferentes mudanças funcionais e fenotípicas, majoritariamente mediadas por proteínas (LUERMAN et al., 2010).

Apesar da relevância clínica, as diferenças sexo-específicas de neutrófilos humanos e de animais são pouco exploradas (FLANAGAN, 2014; NATURE, 2010). A maioria dos estudos sobre o dimorfismo sexual é direcionada para características pontuais e evidencia diferenças marcantes, ressaltando a necessidade de uma compreensão abrangente da regulação da biologia dos neutrófilos pelo sexo, que por sua vez pode ser viabilizada por estudos ômicos e, em particular, pela proteômica, já que nem sempre existe proporcionalidade consistente entre expressão gênica e perfil proteico (FESSLER et al., 2002; LIAN et al., 2001). Assim sendo, este trabalho utilizou a proteômica label-free como ferramenta exploratória para identificar mediadores basilares do dimorfismo sexual que foram então estudados em maiores detalhes através de testes de *follow-up* ou validação. Para tal, foi utilizada uma estratégia estatística baseada em duas etapas (**Figura 9**). Devido ao desafio de análise do efeito múltiplo de dois fatores em níveis inferiores ao de proteínas, a primeira etapa consistiu na análise de variância simples (one-way ANOVA) pelo programa Progenesis para identificação de íons, peptídeos e por fim de proteínas diferencialmente abundantes (DA) entre os quatro grupos estudados. Das 308

proteínas DA, 163 estavam dentro do critério de identificação com base em dois peptídeos ou mais e esses dados seguiram para agrupamento segundo os efeitos isolados e combinados das variáveis *sexo* e *ativação*. O ANOVA de duas vias apontou 32 proteínas com abundância regulada pelo sexo, 18 que sofreram a influência do efeito combinado ou interação entre os dois fatores e 129 DA em resposta à ativação com fMLP (**Figura 9**) (**ANEXO III**).

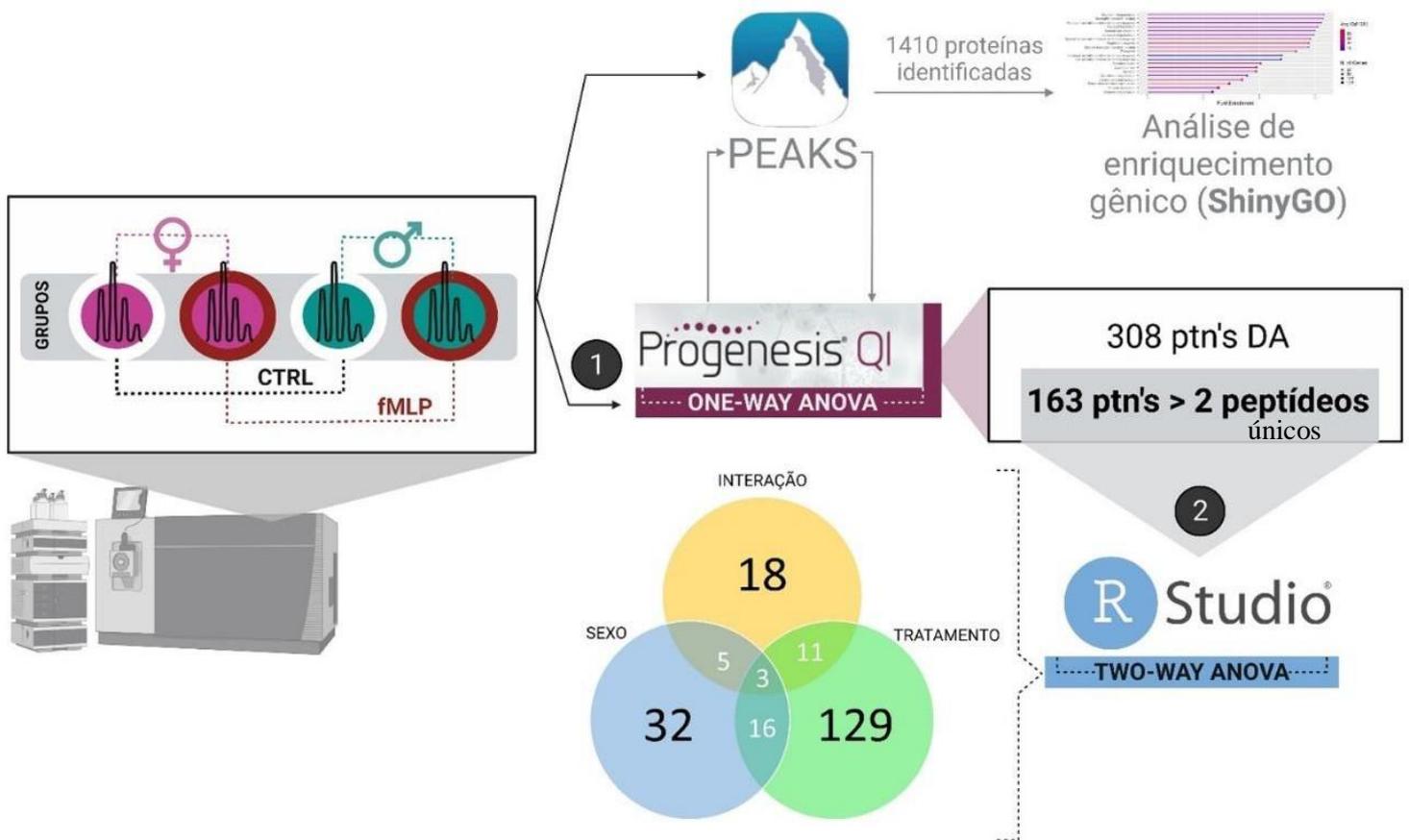


Figura 9. Resumo da estratégia de análise dos dados proteômicos. Os dados de LC-MS foram corrigidos quanto a variações no tempo de retenção pelo programa Progenesis Q1 onde também foi realizada a quantificação de peptídeos, cujos dados de MS/MS foram exportados para o programa PEAKS para identificação de proteínas. Esses dados foram importados novamente para o Progenesis para análise one-way-ANOVA e a quantificação de proteínas diferencialmente abundantes (DA) entre os grupos foi utilizada para análise ANOVA de duas vias em R, o que resultou em uma lista com 32 proteínas DA em função do sexo e 18 proteínas reguladas a partir da interação entre os fatores sexo e tratamento. Imagem feita com Biorender.

### 5.3.O dimorfismo sexual nos níveis de Espécies reativas de oxigênio e na Capacidade antioxidante de neutrófilos

O grupo de proteínas DA em função do sexo foi submetido à análise de ontologia gênica pelo programa ShinyGO (GE et al., 2020). Entre os principais processos biológicos enriquecidos estavam aqueles relacionados à atividade antioxidante, exocitose/transporte de vesículas e adesão (**Figura 10**). Em relação à detoxificação celular, a análise de função molecular especificou a atividade antioxidante mediada por glutatona, tal regulação chegou a ser identificada em nível de metabólitos em um estudosobre o dimorfismo sexual em neutrófilos da medula de camundongos (LU et al., 2021),mas nenhuma investigação funcional foi desenvolvida.

Em mamíferos, as proteínas envolvidas na resposta a estresse celular são reguladas através da interação entre interruptores moleculares constituídos por múltiplos resíduos de cisteínas que são alvos de espécies oxidantes, cuja ação resulta em mudanças conformacionais da proteína inibidora Keap1 que, em condições normais, funciona como um sinalizador para degradação do fator de transcrição NRF2 (SAHA et al., 2020). Quando os níveis de agentes oxidantes, como as EROs, aumentam, a mudança conformacional em Keap1 interrompe a repressão de NRF2, que fica livre para induzir a expressão de diversos genes necessários para sustentação da capacidade antioxidante

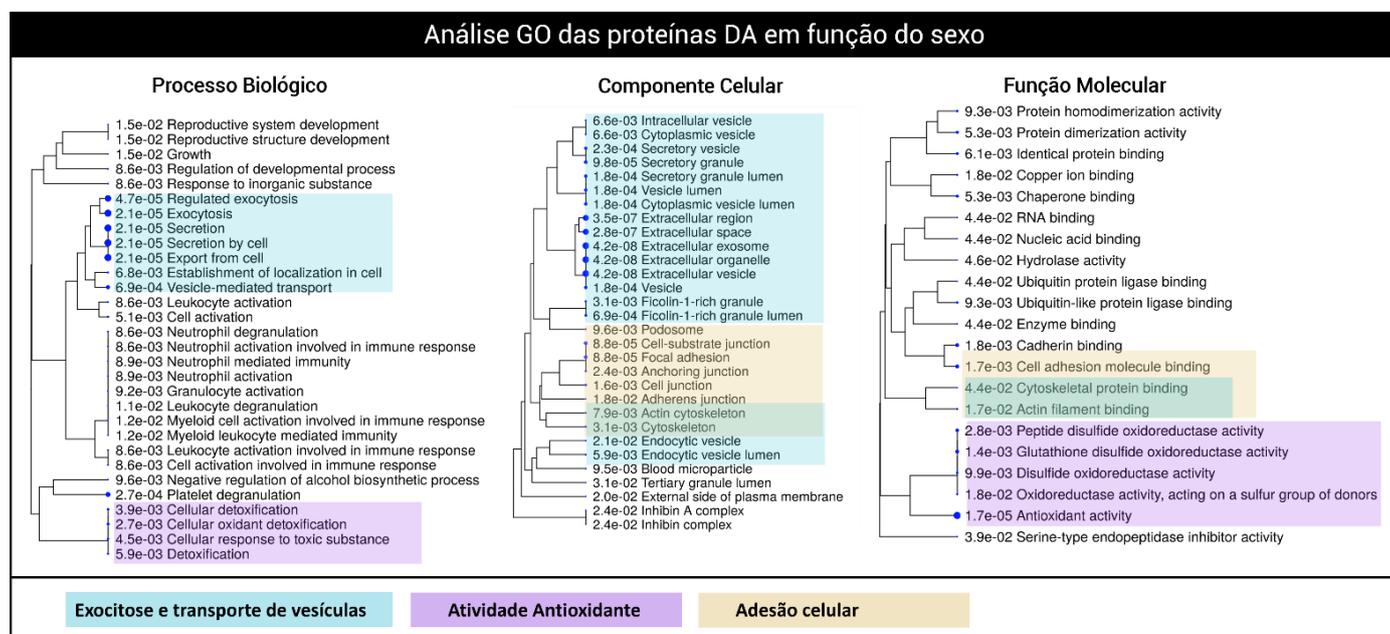


Figura 10. Análise de ontologia gênica das proteínas reguladas pelo sexo pelo programa ShinyGO revelou o enriquecimento de processos como exocitose, atividade antioxidante e adesão celular. Pontos maiores representam menores valores de p-valor.

(ZHANG; HANNINK, 2003). Dentre tais produtos gênicos estão as enzimas para síntese de GSH, bem como da Glutathione redutase (GR) e de enzimas que geram NADPH, a principal fonte de poder redutor, como a glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD). A catalase, glutathione peroxidase, superóxido dismutase, tioredoxinas e glutarredoxinas também participam da preservação do equilíbrio redox dos neutrófilos (MULLARKY; CANTLEY, 2015).

Já que os mecanismos antioxidantes são desencadeados por mudanças nos níveis de EROs, a primeira análise de *follow-up* feita foi quanto à produção de espécies reativas de oxigênio, realizada pelo teste de NBT, baseado na contagem de células contendo formazan, um cristal azul escuro formado pela redução do NBT pelas EROs (AFZAL; JESHTADI; MOHMMED, 2014). Os resultados mostraram neutrófilos femininos

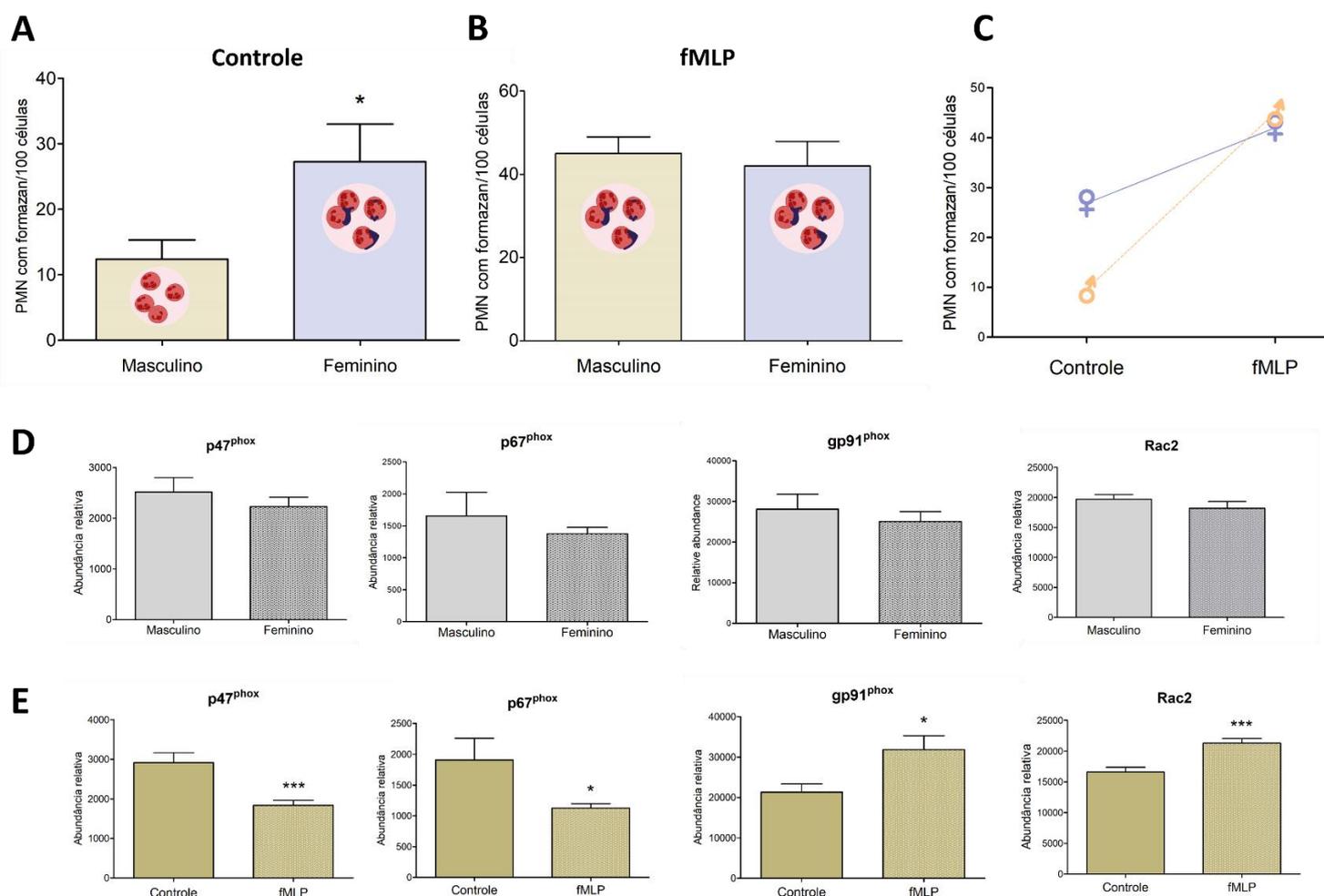


Figura 11. Avaliação da produção de EROs em neutrófilos humanos femininos e masculinos quiescentes (A) e após 60 minutos de ativação com fMLP 100nM (B). A análise ANOVA de duas vias foi realizada para avaliação da interação entre os fatores, sendo esta significativa ( $p < 0,05$ ) (C). A análise proteômica identificou quatro proteínas do complexo NADPH oxidase como independentes do sexo (D) e regulados somente em função da ativação com fMLP (E). \* $p < 0,05$  \*\*\* $p < 0,001$ .

quiescentes com maiores quantidade de formazan ( $p < 0,05$ ) em comparação com neutrófilos do controle masculino (**Figura 11A**), o que levou à primeira hipótese de que PMN femininos produzem mais EROs e estavam em um estado de *priming*. Entretanto, quando foram avaliados quanto à produção de EROs após estímulo com fMLP, enquanto PMN masculinos efetivaram a explosão respiratória, com aumento significativo na presença de formazan em comparação com seu controle ( $p < 0,0001$ ), curiosamente, a ativação de neutrófilos femininos com fMLP parece não ter afetado a quantidade de formazan tanto em relação ao seu controle como em comparação com os neutrófilos masculinos ativados (**Figura 11B**). Dessa maneira, quando todos os dados foram submetidos à análise ANOVA de duas vias (**Figura 11C**), a abundância de EROs parece ser determinada pelo modelo de interação entre os fatores.

A proteômica identificou a regulação dos componentes do complexo produtor de EROs, gp91<sup>phox</sup>, p67<sup>phox</sup>, p47<sup>phox</sup> e Rac2 como independente do sexo (**Figura 11D**) e diferencialmente abundantes em função do tratamento (**Figura 11E**). Além disso, as

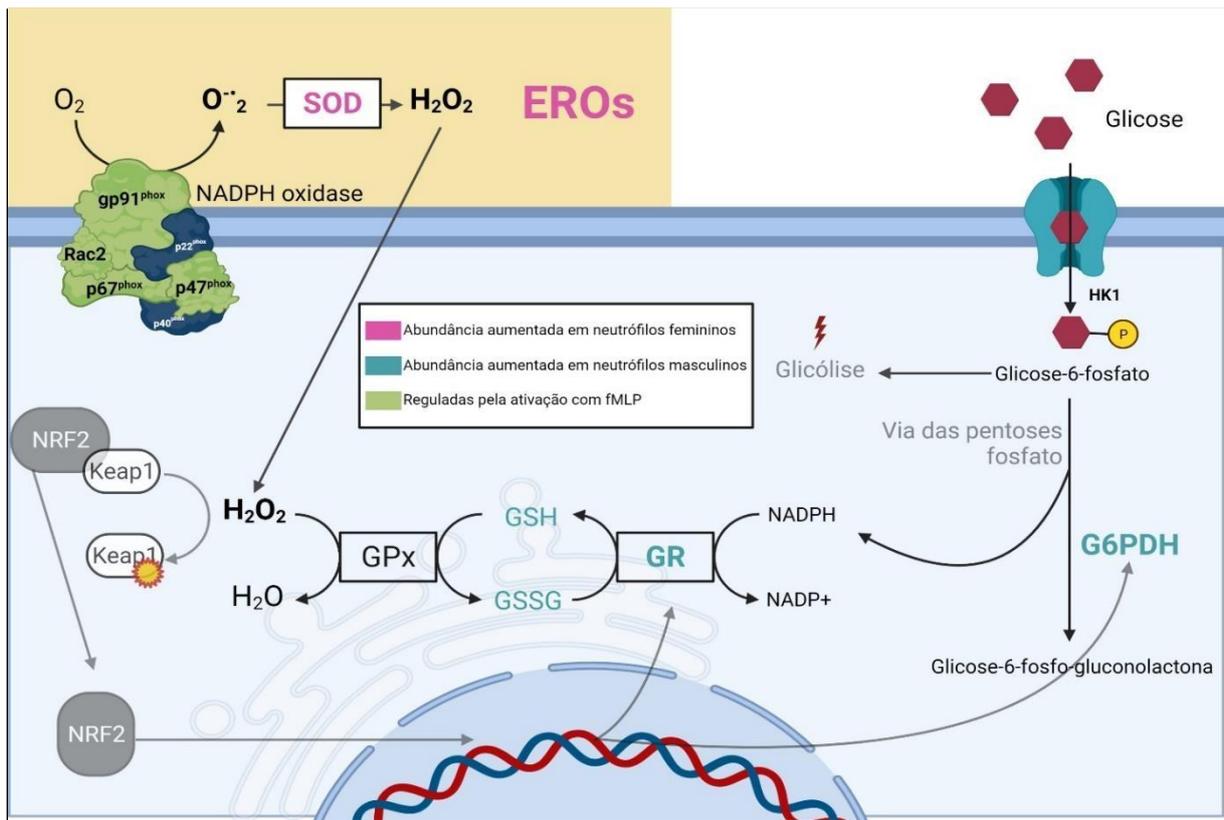


Figura 12. A organização das proteínas identificadas como DA sugere que neutrófilos masculinos possam apresentar capacidade antioxidante superior aos neutrófilos femininos, o que pode estar correlacionado com os maiores níveis basais de EROs observados em neutrófilos femininos apesar de não terem sido identificadas mudanças em função do sexo nas proteínas do complexo NADPH oxidase. Em amarelo, estão representados os espaços extracelulares, incluindo aqueles que formam os lúmens de fagossomos e grânulos secundários. Imagem feita com Biorender.

proteínas GR, G6PDH, albumina (ALB) e Haptoglobina (HP) apresentaram abundâncias sexo-específicas, estando aumentadas em neutrófilos masculinos e apenas uma proteína antioxidante estava aumentada em neutrófilos femininos: a SOD1.

Para representar melhor como essas proteínas específicas interagem no contexto celular e qual poderia ser o fenótipo apresentado em função da regulação, nós ilustramos as vias de produção de superóxido e  $H_2O_2$ , regulação de NRF2 e de detoxificação a partir de SOD1 e GSH, na **Figura 12**. As proteínas G6PDH e GR aumentadas em neutrófilos masculinos, bem como outras proteínas anteriormente reportadas como importantes para neutralização ou inibição da produção de EROs como a ALB (DANIELS et al., 1996; NATHAN et al., 1993) e HP (THEILGAARD-MO et al., 2006) possivelmente sugerem que neutrófilos masculinos são mais eficientes em neutralizar EROs em comparação com os neutrófilos femininos. Tal hipótese é coerente com a maior amplitude de variação da resposta oxidativa em neutrófilos masculinos, quando ativados. Apesar da **Figura 12** ilustrar a via de ativação de NRF2, o presente trabalho não seria capaz de afirmar se o aumento das proteínas citadas em neutrófilos masculinos de fato decorre da regulação gênica por NRF2.

Juntos, os fatos de o complexo NOX parecer inalterado pelo sexo e da regulação de proteínas antioxidantes apresentarem um viés sexual para neutrófilos masculinos sugerem que a diferença de abundância de EROs mostrada pelo teste de NBT não reflete

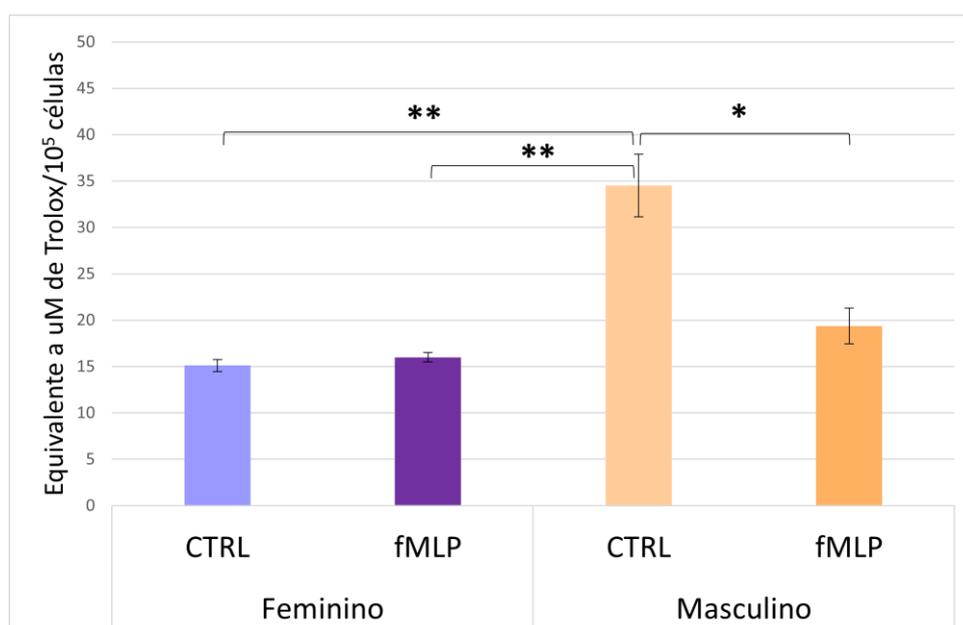


Figura 13. Avaliação da capacidade antioxidante total de neutrófilos humanos. Neutrófilos quiescentes masculinos apresentaram maior capacidade antioxidante em comparação com os femininos.

maior produção de EROs pelos PMN femininos quiescentes, e sim possivelmente resulta da menor capacidade de neutralizá-las. Apesar da relação de causalidade não ter sido comprovada, a partir do método de descoloração do ABTS<sup>+</sup> nós confirmamos que os neutrófilos femininos realmente apresentam capacidade antioxidante total (CAT) significativamente menor que os masculinos quiescentes (**Figura 13**). A partir dos resultados da avaliação de CAT e tendo em vista os resultados de proteômica que apontam especificamente para aquele envolvendo glutathiona (**Figuras 10 e 12**), o próximo ensaio teve como objetivo quantificar o total de glutathiona (GSH/GSSG) presente em neutrófilos masculinos e femininos. Apesar dos testes precisarem ser repetidos em função da padronização do número de células, os dados preliminares também apontam para uma diferença significativa, em que neutrófilos femininos apresentam menores níveis de glutathiona quando comparados com os PMN masculinos. Como o complexo NOX volta sua produção de EROs para os espaços extra-citosólicos, incluindo aqueles que formam os fagossomos e grânulos secundários (KARLSSON; DAHLGREN, 2002), ainda é preciso esclarecer se essas diferenças expõem o neutrófilo feminino a algum nível de estresse oxidativo ou celular.

Em concordância com nossas hipóteses, a diferença entre a capacidade antioxidante em neutrófilos humanos foi avaliada em um estudo sobre o estresse oxidativo após exercício físico e os resultados mostraram que, em condições basais, os neutrófilos masculinos apresentam maior atividade da glutathiona peroxidase em comparação com os femininos (FERRER et al., 2009). A nossa análise proteômica indicou maiores níveis de G6PDH, e nós hipotetizamos que esse aumento viabiliza — ao proporcionar o aporte de NADPH — uma maior atividade de GR, também encontrada em maiores níveis em neutrófilos masculinos, que por sua vez, é essencial para a reciclagem da GSH, o combustível redutor da GPx, resultando em uma atividade mais intensa em relação à GPx de PMN femininos (**Figura 12**). Em relação ao maior nível de SOD em neutrófilos femininos, esse achado também é embasado pela literatura, que reporta aumento significativo na atividade de SOD em neutrófilos de mulheres saudáveis entre 19 e 70 anos (SARAYMEN et al., 2003). Apesar de ser uma enzima essencial para a neutralização de EROs, a SOD catalisa a dismutação do superóxido, liberado pelo complexo NOX — e que por apresentar carga, permanece confinado no espaço extracelular — em outro tipo de EROs, o peróxido de hidrogênio, que consegue atravessar membranas livremente. Dessa maneira, neutrófilos femininos apresentarem aumento de

SOD em conjunto com baixos níveis de GR, G6PD e menor capacidade antioxidante total pode resultar em maiores níveis de estresse celular, o que precisa ser investigado, uma vez que o estresse oxidativo leva à apoptose e neutrófilos humanos femininos parecem apresentar menores taxas de apoptose espontânea (MOLLOY et al., 2003).

Em 2003, Molloy et al. compararam os níveis de intermediários oxidativos entre neutrófilos saudáveis masculinos e femininos e embora não tenham encontrado diferenças entre as condições não estimuladas, quando foram incubados com os hormônios estradiol e progesterona, neutrófilos femininos apresentaram aumento da produção desses intermediários (MOLLOY et al., 2003). No presente trabalho, reconhecemos que os hormônios sexuais constituem um aspecto essencial para modulação da resposta imune e que podem ser responsáveis por diversos aspectos que caracterizam o dimorfismo sexual em neutrófilos, mas a identificação da origem das variações encontradas foge do escopo deste estudo. Além disso, a coleta do sangue feminino foi realizada no período específico em que os hormônios apresentam as menores taxas, para evitar o efeito da presença acentuada de algum desses agentes e para preservar a homogeneidade dentro do grupo de dados femininos.

#### **5.4.O dimorfismo sexual na regulação de proteínas de grânulos e do citoesqueleto: avaliação da fagocitose e migração**

Além da atividade antioxidante, a análise de ontologia gênica (**Figura 10**) apontou processos biológicos enriquecidos como “*Regulated exocytosis*”, “*Exocytosis*” e “*Vesicle-mediated transport*” que se comunicam com o enriquecimento dos componentes celulares como “*Intracellular vesicle*”, “*Secretory granule*”, “*Extracellular space*” e “*Cytoplasmic vesicle*” e podem estar diretamente relacionados com o resultado das funções moleculares “*Cytoskeletal protein binding*” e “*Actin filament binding*”. Avaliando a correlação entre esses conjuntos de termos destacados em azul na **Figura 10**, foi possível inferir que seriam, em sua maioria, proteínas presentes em grânulos e relacionadas com a degranulação, o que foi confirmado após análise individual, discutida a seguir.

Entre as proteínas que correspondem às classificações citadas estavam: Olfactomedina 4 (OLFM4), uma glicoproteína encontrada em grânulos específicos de neutrófilos (CLEMMENSEN et al., 2012b); Anexina 1 (ANXA1), presente em grânulos

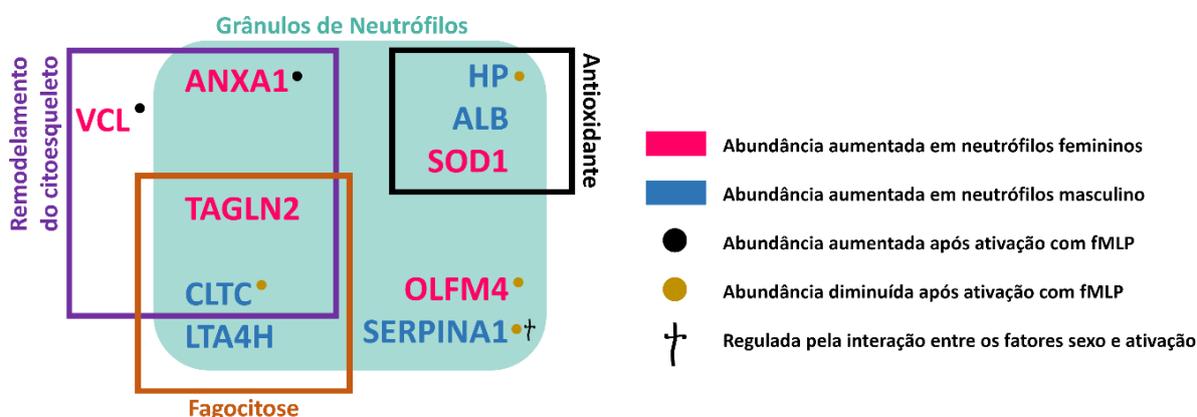


Figura 14. A análise individual das proteínas granulares de neutrófilos indica possíveis funções sobre as quais elas também podem atuar, como a fagocitose e a regulação do remodelamento do citoesqueleto, além da atividade antioxidante.

terciários (PERRETTI et al., 2000); as proteínas associadas ao citoesqueleto e adesão de neutrófilos, Vinculina (VCL) (WILSON et al., 2020) e Transgelina 2 (TAGLN2) (LIU et al., 2020); HP e ALB, também presentes em grânulos específicos (LOMINADZE et al., 2005). A partir da análise individual da sobreposição de funções sobre as quais as proteínas granulares (**Figura 14**) também poderiam atuar, foi possível destacar que aquelas associadas a adesão e remodelamento do citoesqueleto estavam em sua maioria, aumentadas em neutrófilos femininos, enquanto CLTC e LTA4H, proteínas envolvidas na etapa inicial da fagocitose, durante o processo de endocitose (PERRY; DAUGHERTY; MARTIN, 1999) e na produção de LTB<sub>4</sub>, capaz de intensificar a fagocitose (EMITS et al., 1989), respectivamente, estavam aumentadas em neutrófilos masculinos. Já que tal regulação foi encontrada, nós investigamos se haveria diferenças quanto às capacidades fagocitárias e de migração tanto em neutrófilos quiescentes quanto após ativação com fMLP, uma vez que ambas as atividades dependem fortemente do remodelamento do citoesqueleto, polarização celular e adesão.

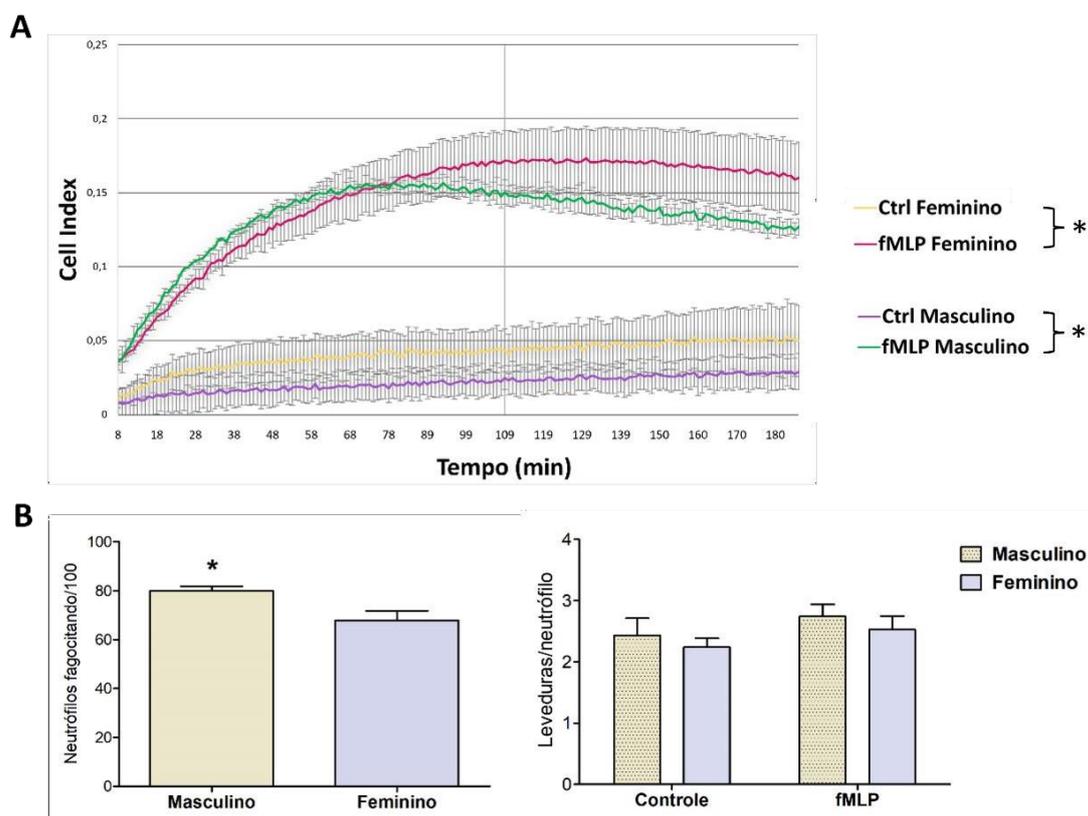


Figura 15. A avaliação das capacidades migratória e fagocitária de neutrófilos humanos femininos e masculinos. Enquanto não houve dimorfismo sexual na capacidade migratória (A), sendo esta aumentada significativamente na presença do quimioatratante fMLP independentemente do sexo, a capacidade fagocitária de neutrófilos masculinos apresentou aumento em relação aos neutrófilos femininos (B) e nenhuma diferença foi vista em relação à quantidade de leveduras fagocitadas pelos neutrófilos.

Os resultados dos testes funcionais confirmaram que fMLP é um potente agente quimiotático para neutrófilos humanos e que este aspecto, dentro do intervalo de 3 horas em que foi avaliado, não foi afetado de forma significativa pelo sexo (**Figura 15A**). A comparação entre a capacidade de migração de neutrófilos humanos de ambos os sexos não foi previamente realizada, mas recentemente um estudo comparativo do transcriptoma de neutrófilos humanos encontrou diferenças na expressão de genes relacionados ao status de maturação e à resposta à IFN do tipo I (GUPTA et al., 2020) e discutiram que tais achados poderiam implicar em neutrófilos femininos com respostas pró-inflamatórias mais proeminentes incluindo migração e estado de ativação aumentado em relação aos masculinos. Neste sentido, o presente trabalho apresenta evidências funcionais de que a capacidade migratória estimulada por fMLP não difere em função do sexo (**Figura 15A**) e que, neutrófilos femininos apresentam menor capacidade de

fagocitose da levedura *Saccharomyces cerevisiae* (**Figura 15B**), o que pode estar relacionado com os fatos de que (1) proteínas importantes para o processo foram encontradas diminuídas em neutrófilos femininos (**Figura 14**) e/ou (2) neutrófilos femininos apresentaram menor capacidade antioxidante e menores níveis da enzima GR, que já foi reportada anteriormente como importante para atividades efetoras de neutrófilos como fagocitose e a sustentação da própria explosão respiratória (YAN et al.,2012, 2013), que foi identificada apenas em neutrófilos masculinos (**Figura 11**).

### 5.5. A regulação específica da proteína OLFM4

A partir da análise das proteínas cuja regulação depende de ambos os fatores, foi possível destacar a proteína Olfactomedina 4 (OLFM4). Nesse estudo a OLFM4 foi encontrada como regulada pelo sexo ( $p < 0,05$ ), de modo que neutrófilos femininos apresentaram maiores níveis de OLFM4 e a ativação ( $p < 0,05$ ) foi responsável pela diminuição da abundância, sendo que em neutrófilos masculinos a diminuição causada pela ativação foi mais intensa (**Figura 16**).

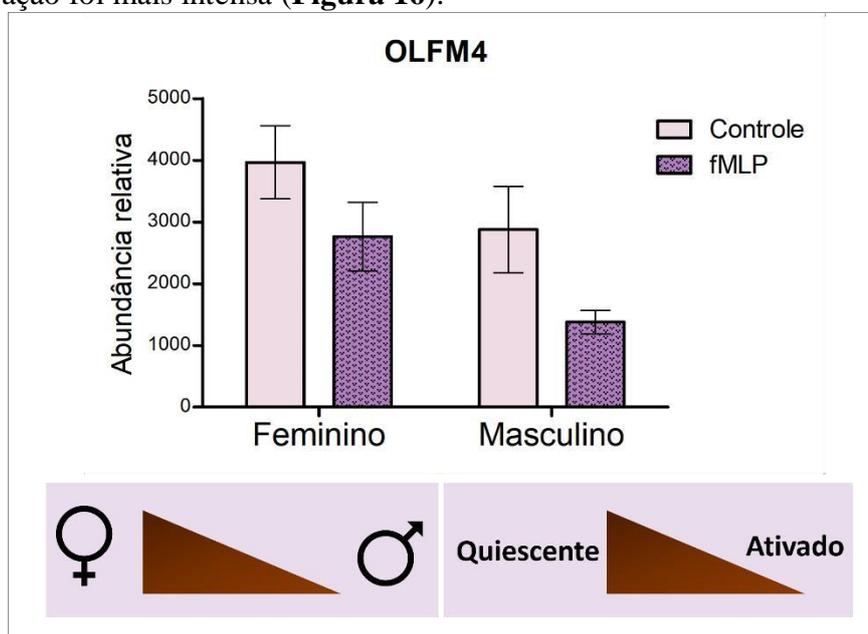


Figura 16. A abundância da proteína OLFM4 é regulada tanto pelo sexo quanto pela ativação. A ativação com fMLP causou a diminuição dos níveis de OLFM4, que são menores em neutrófilos masculinos, independente da ativação, quando comparados com os níveis identificados em neutrófilos femininos.

A OLFM4 é uma glicoproteína presente nos grânulos específicos de neutrófilos e que vem sendo associada a diferentes contextos patológicos, além de definir uma subpopulação de neutrófilos em humanos e em camundongos (ALDER et al., 2019; CLEMMENSEN et al., 2012). Em contraste com o que foi encontrado no presente trabalho, o mesmo estudo que comprovou a localização de OLFM4 em grânulos específicos e, ao considerar o sexo dos doadores, nenhuma diferença sexo-específica foi observada quanto à sua abundância (CLEMMENSEN et al., 2012). Os níveis diminuídos em função da ativação, independentemente do sexo, provavelmente indicam a degranulação de grânulos secundários, pois tal processo faz parte da via desencadeada por fMLP (MÓCSAI et al., 2000). Dessa forma, os resultados que mostram maiores níveis de OLFM4 em neutrófilos femininos podem indicar: (1) maior quantidade de grânulos específicos em neutrófilos femininos;(2) enriquecimento de neutrófilos OLFM4<sup>+</sup> em mulheres e/ou (3) neutrófilos masculinos como mais eficientes em exocitar grânulos específicos ou especificamente a OLFM4. Durante a sepse, a expressão do gene OLFM4 está entre os que mais aumentam (WONG et al., 2009) e em um estudo mais recente foi identificado como o gene com maior regulação positiva entre os pacientes que morreram comparados aos que sobreviveram, além disso, maiores níveis de neutrófilos OLFM4<sup>+</sup> estão correlacionados com uma pior resposta após o choque séptico (ALDER et al., 2017). Apesar de algumas controvérsias em relação aos dados clínicos humanos, alguns trabalhos mostram que a sepse apresenta características sexo-específicas que indicam o sexo masculino como fator preditivo para pior prognóstico, com taxas muito mais altas de mortalidade quando comparadas às femininas (NASIR et al., 2015; SCHRÖDER et al., 1998). Tais resultados podem sugerir um papel importante da OLFM4 na compreensão do dimorfismo sexual imunitário mediado por neutrófilos em que a liberação de OLFM4 parece contribuir com os danos decorrentes de infecções severas, como a sepse.

## 6. CONCLUSÕES

A abordagem proteômica *label-free* como ferramenta exploratória em conjunto com a análise ANOVA de duas vias definiu diferentes pontos de partida para investigação molecular e funcional do dimorfismo sexual de neutrófilos humanos. Entre eles, foi possível associar a menor capacidade antioxidante, observada em nível molecular e comprovada por testes funcionais a uma maior quantidade e EROs em neutrófilos femininos quiescentes. Como células imunitárias, uma das principais funções dos neutrófilos é a produção de EROs. Assim sendo, investigações futuras são necessárias para avaliar se tal aumento constitui estresse oxidativo para o neutrófilo feminino, como a diminuição da capacidade antioxidante está associada a esse fenótipo e quais seriam as implicações fisiológicas.

Outros achados incluem a influência apenas da ativação na migração, que não tinha sido explorada anteriormente, apesar de não apresentar dimorfismo sexual e da menor capacidade fagocitária de neutrófilos femininos, possivelmente associada com a menor abundância de GR e menor capacidade antioxidante.

Este trabalho apresenta aspectos fundamentais para a funcionalidade de neutrófilos como sexo-específicos, sendo eles: capacidade antioxidante, fagocitose, adesão e regulação do citoesqueleto, além da identificação de proteínas como a OLFM4, que pode ser fundamental para a compreensão do dimorfismo sexual imunitário observado em vários contextos fisiopatológicos.

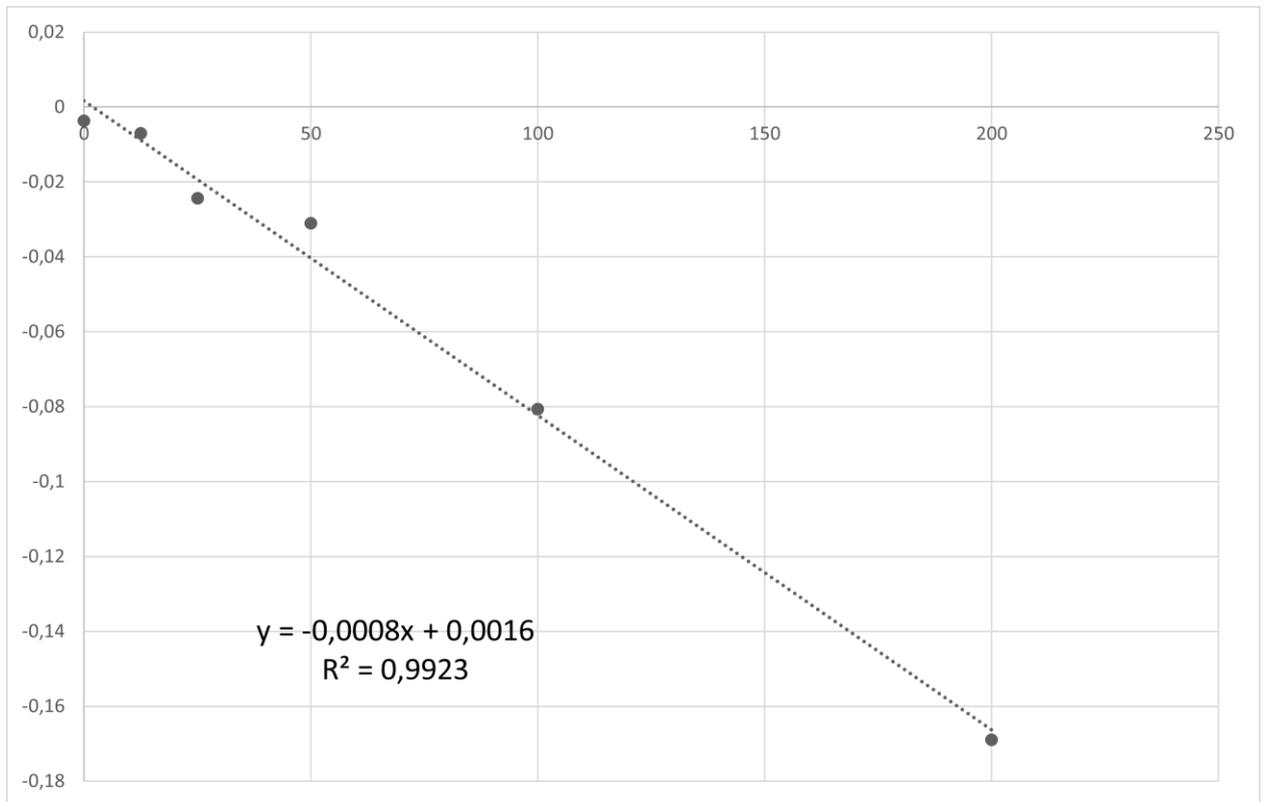
## **7. PERSPECTIVAS**

O presente trabalho propõe os seguintes ensaios para aprofundamento da análise do dimorfismo sexual em neutrófilos humanos, antes da publicação do artigo:

1. Ensaio de detecção de EROs por citometria para validar os achados do teste de NBT;
2. Ensaio de peroxidação lipídica a fim de esclarecer se neutrófilos femininos estão submetidos à estresse celular em repouso e após ativação com fMLP;
3. Ensaio de quantificação de Glutathiona;
4. Ensaio para quantificação, marcação e inibição de OLFM4 e
5. Ensaio de degranulação.

## 8. ANEXOS

### 8.1. ANEXO I – CURVA PADRÃO DO TROLOX



## 8.2. ANEXO II – SCRIPT R PARA ANÁLISE ANOVA DE DUAS VIAS

```
# install and run packages deployer and tidyverse to work with data frames, tcltk to allow messages.
#install.packages("dplyr")
library(dplyr)
#install.packages("tidyverse")
library(tidyverse)
#install.packages("tcltk")
library(tcltk)

# Transfers the data from a CSV file to a dataframe
# .csv file must be prepared containing: 1st column = replicate IDs, 2nd column = factor1, 3rd column = factor2, other
columns = proteins.
# One easy way to generate this CSV from the Progenesis output is to follow these steps in Excel:
# IMPORTANT: Excel in non-English languages might corrupt CSV files, changing the separators. If you get error messages,
check if the column separators are commas (,) and the row separators are (CR) or (CR+LF) hidden characters.
# 1- Delete all columns except "Protein ID" and all "Normalized abundance" columns
# 2- Delete rows 1 and 2
# 3- Insert two rows after the new row 1, write the names of the factors in the cells A2 and A3 (e.g.: sex and activator)
# 4- Write rep_ID in cell A1 (be sure that the replicate IDs are unique, i.e. no repeated IDs)
# 5- Select all, Copy, Create a new tab
# 6- Paste transposed (paste special - transpose)
# 7- Fill-in all the factors in the new tab (all cells in columns B and C that correspond to a replicate) (e.g. the sex
and the activator used for each replicate)
# 8- Save just this new tab as a .CSV file and use this file here.
# the first column is kept as text, not converted to factor, as it represents replicate ID.
Progenesis_data <- read.csv2(file.choose(), as.is=1)

# find out the number of repetitions
# the number of repetitions is the number of columns -3 (the three first columns are not proteins, all other columns
are proteins).
# here nrep is considered as equal to the number of columns, since the counting in the loop will start at 4 (the
column of the first protein)
nrep <- ncol(Progenesis_data)

# find out the names of the factors, which are the headers of columns 2 and 3
factor1 <- names(Progenesis_data)[2]
factor2 <- names(Progenesis_data)[3]

# prepare the "pvals" dataframe to receive the p-values (name of the first column), adding 3 rows at the bottom, named
"sex", "activator" and "sex:activator interaction"
pvals <- data.frame ("p_values" = c(factor1, factor2 , paste(factor1, ":", factor2, "interaction"))

# loop: repeat for each protein
i=4
for(i in 4:nrep) {
  # extract the protein accession ID from the dataframe to use it in ANOVA.
  prot_acc <- names(Progenesis_data)[i]
  # Calculates 2-way ANOVA: creates the formula in the variable "form" then uses in in aov
  form <- as.formula(paste(prot_acc, " ~ ", factor1," * ", factor2))
  res.aov2 <- aov(form, data = Progenesis_data)
  # get just the p-values from the result (first element, and from that element, the fifth column)
  pvalues.res.aov2 <- summary(res.aov2)[[1]][5]
  # delete row "Residuals" (row4), but keep dataframe structure and row names
  pvalues.res.aov2 <- pvalues.res.aov2[-c(4), , drop=FALSE]
  # rename the column to match the protein ID
  names(pvalues.res.aov2)[1] <- prot_acc
  # Add a column to pvalues.res.aov2 identical to the p_values column in pvals for matching during merge
  pvalues.res.aov2 <- add_column(pvalues.res.aov2, "p_values" = c("sex", "activator" , "sex : activator
interaction"))
  #merges the calculated p-values into the dataframe that will contain all p-values for all proteins
  pvals <- merge(x=pvalues.res.aov2,
                y=pvals,
                by="p_values",
                all=TRUE)
}
write.csv(pvals, file ="anova2_resultado.csv")
```

**8.3.ANEXO III – LISTA DE PROTEÍNAS SUBMETIDA À ANÁLISE  
ANOVA DE DUAS VIAS**

<b>TWO-WAY ANOVA (P-VALOR)</b>				
<b>Uniprot Accession</b>	<b>Nome do Gene</b>	<b>Sexo</b>	<b>Tratamento</b>	<b>Interação</b>
B4E2M9	<b>ERI2</b>	0,219253146	0,554722794	0,223786215
B3KN06	<b>CORO1C</b>	0,051017147	0,622516547	0,744131524
P61160	<b>ACTR2</b>	0,601089056	0,033293312	0,966057715
O14745	<b>SLC9A3R1</b>	0,596250633	0,032251712	0,606901036
E1A689	<b>APOB</b>	0,296665796	0,048196041	0,926457284
B4DTT0	<b>GNS</b>	0,020034205	0,349903568	0,994348544
AOA0S2Z3S6	<b>CYBB</b>	0,466987853	0,016163753	0,964220795
AOA140GX62	<b>GP1BB</b>	0,309302416	0,03782945	0,208342758
B3KPS3	<b>TUBA1B</b>	0,855827309	0,008757061	0,615397155
P27105	<b>STOM</b>	0,0523292	0,26007083	0,03797554
B4DFP1	<b>PGM1</b>	0,358894512	0,012310361	0,653627815
B4DN57	<b>CNN2</b>	0,774635284	0,018743049	0,26082781
P08567	<b>PLEK</b>	0,015241038	0,221697608	0,152034347
B5TY33	<b>MAPK14</b>	0,81309803	0,005790782	0,852468313
P78417	<b>GSTO1</b>	0,043702025	0,027199431	0,812051277
P25815	<b>S100P</b>	0,593764553	0,292086603	0,143296243
B3KNB4	<b>YWHAG</b>	0,714775988	0,023298851	0,313402903
Q5SSJ5	<b>HP1BP3</b>	0,813863673	0,01457518	0,359928038
AOA024R936	<b>NCF2</b>	0,441316413	0,037755721	0,241754028
B4DE36	<b>GPI</b>	0,43690361	0,009846325	0,199212335
B2R825	<b>PYGL</b>	0,62370905	0,470848528	0,014797852
V9HWG7	<b>HEL-S-52</b>	0,35904413	0,005956103	0,566005717
P52566	<b>ARHGDIB</b>	0,936138799	0,003230004	0,635573596
V9HWH1	<b>HEL57</b>	0,015748585	0,216395945	0,427354714
B4DE30	<b>CCT5</b>	0,714073877	0,004834148	0,391834824
V9HWC9	<b>SOD1</b>	0,018452765	0,242100821	0,101540202
M0QYG8	<b>GMFG</b>	0,457759893	0,027935143	0,028436757
V9HW25	<b>HEL-S-273</b>	0,002323538	0,634072387	0,679159874
P27824	<b>CANX</b>	0,937313372	0,004113302	0,386302421
B4DUF9	<b>DBNL</b>	0,85481235	0,007340966	0,381403258
B4E380	<b>H3-3B</b>	0,882194493	0,003744272	0,888664632
Q59FC6	<b>HSP90B1</b>	0,262870546	0,007562727	0,813214399
B4DHN5	<b>SDCBP</b>	0,204615557	0,290226715	0,017435474
H6VRG2	<b>KRT1</b>	0,022150664	0,062214269	0,602148479
P35908	<b>KRT2</b>	0,052734785	0,035719931	0,877688414
P04004	<b>VTN</b>	0,086798518	0,091812235	0,09133815
D6RDU5	<b>SEPTIN11</b>	0,809497198	0,003487025	0,959204887
Q86UX7	<b>FERMT3</b>	0,180987449	0,070514533	0,133570197
AOA2R8YEU4	<b>TPM4</b>	0,06098546	0,863051511	0,139547735
B7Z1C9	<b>CCT7</b>	0,069836506	0,017409208	0,915270386
P25705	<b>ATP5F1A</b>	0,34242873	0,005808567	0,377142088

Q53G71	<b>CALR</b>	0,021552249	0,760888924	0,319817968
B7Z5A2	<b>TAGLN2</b>	0,026928707	0,827872627	0,510556851
Q5T7C4	<b>HMGB1</b>	0,176547283	0,032913707	0,150984814
B7ZAY2	<b>RAP1B</b>	0,137286828	0,007359631	0,404787917
Q6IS14	<b>EIF5AL1</b>	0,267057441	0,003260839	0,213047648
Q93079	<b>HIST1H2BH</b>	0,259660573	0,183449303	0,0691404
P13645	<b>KRT10</b>	0,017944733	0,047368352	0,380364789
B2RC45	<b>SERPINB10</b>	0,174667893	0,007981904	0,476946437
AOA0F7NGI8	<b>LRRFIP1</b>	0,455842512	0,001595083	0,960311014
Q6IPN0	<b>RTN4</b>	0,008652479	0,108460306	0,978285786
B3KSI4	<b>TKT</b>	0,513625779	0,004552006	0,486489946
P14317	<b>HCLS1</b>	0,754849173	0,010590199	0,145998898
P16403	<b>H1-2</b>	0,126445297	0,001017188	0,040241824
B8ZZW7	<b>PTMA</b>	0,073419623	0,558874731	0,065839332
AOA3B3ISK1	<b>COPA</b>	0,39024968	0,001567465	0,600893049
Q96RE1	<b>EEF1A1</b>	0,374395	0,008368507	0,056714605
B7Z2X4	<b>GSN</b>	0,016744714	0,033295771	0,767777854
B7ZKW8	<b>RCSD1</b>	0,452879612	0,003509252	0,520918621
Q7L5N7	<b>LPCAT2</b>	0,386752258	0,007075111	0,224583485
A8K2L4	<b>LSP1</b>	0,526188577	0,002888631	0,934569095
B4DN70	<b>ARF1</b>	0,617152336	0,0019361	0,793839453
V9HW90	<b>HEL-75</b>	0,018984217	0,235498647	0,042965887
B4E1V1	<b>ANO6</b>	0,068027125	0,062425978	0,136997725
P07900	<b>HSP90AA1</b>	0,641105582	0,011397809	0,038526643
D0PNI1	<b>YWHAZ</b>	0,283467283	0,008309425	0,228073451
O94804	<b>STK10</b>	0,748345228	0,002401157	0,385572814
Q96C19	<b>EFHD2</b>	0,103027664	0,011656012	0,492397639
AOA024R1Y2	<b>ACLY</b>	0,031004187	0,876355244	0,004821017
F6KPG5	<b>ALB</b>	0,044121791	0,076921926	0,305890201
Q6ICQ8	<b>ARHG</b>	0,0821368	0,006791011	0,677801133
Q70J99	<b>UNC13D</b>	0,389764828	0,013652881	0,15998878
E9PKE3	<b>HSPA8</b>	0,762407354	0,001305481	0,659221005
B2R8I2	<b>HRG</b>	0,298578092	0,061925858	0,393282436
AOA2R8Y5M6	<b>BCAP31</b>	0,492617757	0,003055135	0,167320027
AOA140VJW5	<b>DARS1</b>	0,04021575	0,730148905	0,054906628
Q6IBB0	<b>IFITM2</b>	0,708503485	0,002161075	0,299276347
A8K2W3	<b>CAVIN2</b>	0,122990575	0,077778276	0,112391828
B4DQQ2	<b>HNRNPC</b>	0,160289244	0,016893081	0,067178603
H0YE29	<b>ARHGAP1</b>	0,516726297	0,003240482	0,204896605
B7Z438	<b>SUCLG1</b>	0,871270363	0,000248504	0,127150314
O43707	<b>ACTN4</b>	0,372538398	0,001275984	0,226682054
B4E1I8	<b>LRG1</b>	0,45518408	0,004278193	0,573542578
B2R4C5	<b>LYZ</b>	0,216447739	0,00202926	0,191182778
P08754	<b>GNAI3</b>	0,674820847	0,001637443	0,088759986
Q8WUM4	<b>PDCD6IP</b>	0,805592382	0,063512536	0,006966699
P20700	<b>LMNB1</b>	0,731380803	0,001697773	0,143209755

F8WDD7	<b>ARPC4</b>	0,876035391	0,00071662	0,492737372
Q99878	<b>H2AC14</b>	0,066956137	0,058938854	0,066634028
E9PGT1	<b>TSN</b>	0,356915237	0,001239074	0,988662128
Q13177	<b>PAK2</b>	0,825594328	0,000730089	0,481587575
Q9NYL9	<b>TMOD3</b>	0,467325673	0,001137753	0,318552856
A3ROT8	<b>HIST1H1E</b>	0,546397593	0,004562623	0,277266156
H0YC35	<b>CLU</b>	0,14429902	0,027638917	0,161368769
A0A140VJQ2	<b>NPM1</b>	0,406051642	0,005268055	0,05094853
H7BZ76	<b>LTBP1</b>	0,140310984	0,024362018	0,466908628
O15143	<b>ARPC1B</b>	0,852642208	0,001385355	0,171342273
V9HWI5	<b>HEL-S-15</b>	0,039849831	0,061255018	0,111790982
A0A024R969	<b>CHI3L1</b>	0,020460008	0,005228207	0,552853787
B4E3Q9	<b>VCL</b>	0,020326718	0,001097111	0,541277272
Q6UX06	<b>OLFM4</b>	0,019477821	0,030776146	0,784312248
P09960	<b>LTA4H</b>	0,009484557	0,330961628	0,171166237
P05107	<b>ITGB2</b>	0,906050692	0,000437523	0,571879788
P05204	<b>HMG2</b>	0,002974323	0,037664855	0,056564489
O60493	<b>SNX3</b>	0,688854515	0,000742447	0,598361424
Q05655	<b>PRKCD</b>	0,619873596	0,00027148	0,414920357
B3VMW0	<b>LTF</b>	0,805623997	0,000426822	0,711225319
P29966	<b>MARCKS</b>	0,260163705	0,000751075	0,149427125
P06702	<b>S100A9</b>	0,969417817	0,000118404	0,469131798
D6RG15	<b>TWF2</b>	0,086557465	0,006892408	0,029131842
B4E2U0	<b>PGD</b>	0,768503887	0,00072	0,118499687
Q10588	<b>BST1</b>	0,556483262	0,001558994	0,461445394
P49755	<b>TMED10</b>	0,255316011	0,000339195	0,769914855
B4DZH9	<b>EHD1</b>	0,168045369	0,007205577	0,106890654
A0A0C4DGL8	<b>HP</b>	0,006107852	0,002871068	0,200255402
O15145	<b>ARPC3</b>	0,073832926	0,011218067	0,023512965
A0A024R5M3	<b>CTTN</b>	0,265386337	0,015756329	0,197785543
J3KPA1	<b>CRISP3</b>	0,384291318	9,95E-05	0,349411574
B4E388	<b>HSPA1A</b>	0,744065114	0,000396971	0,23760759
P35527	<b>KRT9</b>	0,144305643	0,001233839	0,109042456
H7C1S1	<b>NCF1</b>	0,316993789	0,000608681	0,296373186
F8W6I7	<b>HNRNPA1</b>	0,051282871	0,051085617	0,027500217
A4UCS5	<b>PRDX3</b>	0,221978033	0,041518194	0,29592614
V9HWF6	<b>HEL-S-153w</b>	0,811588425	0,000287162	0,801051213
H0Y512	<b>APMAP</b>	0,033226992	0,000543911	0,114311515
V9HWB4	<b>HEL-S-89n</b>	0,091799941	0,008396161	0,053244648
B4DM82	<b>PPIA</b>	0,644867772	7,92E-05	0,774503368
H0Y796	<b>F13A1</b>	0,000824182	0,288891672	0,236551302
B4DRT3	<b>PKM</b>	0,059610361	0,000442328	0,914003979
Q6IAT1	<b>GDI2</b>	0,144841375	0,000222648	0,38646876
P20160	<b>AZU1</b>	0,340137662	0,000776356	0,092798348
B3KX11	<b>CCT3</b>	0,695379983	0,000718394	0,686474615
B7Z2Z8	<b>CCT4</b>	0,179355948	0,000155099	0,327023127

A8K2H9	<b>KRTAP4-4</b>	0,162040997	0,040698679	0,365801851
Q9NS13	<b>APOB48R</b>	0,232565126	0,000893766	0,078693332
Q2Q9B7	<b>G6PD</b>	0,054495317	0,000594626	0,025100493
H7C0P6	<b>MAP4K4</b>	0,033564002	0,009268827	0,064774323
O75594	<b>PGLYRP1</b>	0,202912501	0,00025198	0,799192091
O75015	<b>FCGR3B</b>	0,967340409	4,14E-05	0,215793016
V9HWC0	<b>HEL70</b>	0,087345309	0,000596499	0,683764562
AOA024R1Z6	<b>VAT1</b>	0,267555317	0,000157748	0,398909299
AOA0G2JRN3	<b>SERPINA1</b>	0,021284722	0,00256729	0,021393363
P80723	<b>BASP1</b>	0,045486673	0,000129733	0,31463141
P07602	<b>PSAP</b>	0,772332818	8,93E-05	0,128971291
J3KNB4	<b>CAMP</b>	0,595699899	7,87E-05	0,131645399
P11215	<b>ITGAM</b>	0,461132623	4,45E-05	0,265133667
Q05CU9	<b>MNDA</b>	0,204637495	4,05E-05	0,853502502
P04083	<b>ANXA1</b>	0,020192328	0,001362739	0,122524431
Q00610	<b>CLTC</b>	0,00039339	0,022953281	0,164386423
M0R0M7	<b>STXBP2</b>	0,061244876	0,059762318	0,061062841
K7EPV6	<b>SLC44A2</b>	0,637302739	4,23E-05	0,506667557
B4DLN6	<b>P4HB</b>	0,143440453	0,000178696	0,031014152
A8K9E4	<b>MMP8</b>	0,258274977	2,59E-05	0,873140362
Q59FK3	<b>ANXA11</b>	0,272084431	0,001026827	0,027673872
P59665	<b>DEFA1B</b>	0,111530274	8,64E-05	0,571966026
Q59E58	<b>HNRNPM</b>	0,311306149	1,23E-05	0,066288023
P01859	<b>IGHG2</b>	0,000120388	0,004922635	0,004881029
P05771	<b>PRKCB</b>	0,619076861	7,08E-06	0,600237672
V9HWP0	<b>HEL-S-92n</b>	0,063210541	0,000648998	0,315193107
AOA0S2Z3D9	<b>ARHGDI</b>	0,065327753	1,82E-05	0,19568963
P00558	<b>PGK1</b>	0,30328059	8,64E-07	0,901048528
P81605	<b>DCD</b>	0,002638037	1,39E-05	0,02428108
P16401	<b>H1-5</b>	0,604915999	1,87E-08	0,160226116

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDULLAH, M. et al. Gender effect on in vitro lymphocyte subset levels of healthy individuals. **Cellular Immunology**, v. 272, n. 2, p. 214–219, 2012.

AFZAL, M. M.; JESHTADI, A.; MOHMED, A. K. Study of neutrophilic function by nitroblue tetrazolium test in septicemias and immuno deficiency diseases. **Journal of Research in Health Sciences International**, 2014.

ALDER, M. N. et al. Olfactomedin-4 Is a Candidate Marker for a Pathogenic Neutrophil Subset in Septic Shock. **Critical Care Medicine**, v. 45, n. 4, p. e426–e432, 1 abr. 2017.

ALDER, M. N. et al. Olfactomedin 4 marks a subset of neutrophils in mice. **Innate Immunity**, v. 25, n. 1, p. 22–33, 2019.

AOMATSU, M. et al. Gender difference in tumor necrosis factor- $\alpha$  production in human neutrophils stimulated by lipopolysaccharide and interferon- $\gamma$ . **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 2013a.

AOMATSU, M. et al. Gender difference in tumor necrosis factor- $\alpha$  production in human neutrophils stimulated by lipopolysaccharide and interferon- $\gamma$ . **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 441, n. 1, p. 220–225, 8 nov. 2013b.

AQUINO, E. N. et al. Proteomic analysis of neutrophil priming by PAF. **Protein & Peptide Letters**, v. 23, n. May 2016, p. 142–151, 2016.

BASS, J. I. F. et al. GM-CSF enhances a CpG-independent pathway of neutrophil activation triggered by bacterial DNA. **Molecular Immunology**, v. 46, n. 1, p. 37–44, nov. 2008.

BEERY, A. K.; ZUCKER, I. Sex bias in neuroscience and biomedical research. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 35, n. 3, p. 565–572, 2011.

BERGHÖFER, B. et al. TLR7 Ligands Induce Higher IFN- $\alpha$  Production in Females. **The Journal of Immunology**, v. 177, n. 4, p. 2088–2096, 2006.

BILZER, M.; LAUTERBURG, B. H. Glutathione metabolism in activated human neutrophils: stimulation of glutathione synthesis and consumption of glutathione by reactive oxygen species. **European Journal of Clinical Investigation**, 1991.

- BIRON, C. A. Role of early cytokines, including alpha and beta interferons (IFN- $\alpha/\beta$ ), in innate and adaptive immune responses to viral infections. **Seminars in Immunology**, v. 10, n. 5, p. 383–390, 1998.
- BLASZCZAK, A. M.; JALILVAND, A.; HSUEH, W. A. Adipocytes, Innate Immunity and Obesity: A Mini-Review. **Frontiers in Immunology**. Frontiers Media S.A., 24 jun. 2021.
- BLAZKOVA, J. et al. Multicenter Systems Analysis of Human Blood Reveals Immature Neutrophils in Males and During Pregnancy. **The Journal of Immunology**, v. 198, n. 6, p. 2479–2488, 15 mar. 2017.
- BORREGAARD, N. Neutrophils, from Marrow to Microbes. **Immunity**, 24 nov. 2010.
- BORREGAARD, N.; MILLER, L. J.; SPRINGER, T. A. Chemoattractant-Regulated Mobilization of a Novel Intracellular Compartment in Human. **New Series**, 1987.
- BORREGAARD, N.; SØRENSEN, O. E.; THEILGAARD-MÖNCH, K. Neutrophil granules: a library of innate immunity proteins. **Trends in Immunology**, v. 28, n. 8, p. 340–345, 2007.
- BRAHIMI, M. et al. Can sex be determined from a blood smear? **Turkish Journal of Hematology**, v. 30, n. 1, p. 53–57, 2013.
- CALZETTI, F. et al. The importance of being “pure” neutrophils. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 139, n. 1, p. 352- 355.e6, 1 jan. 2017.
- CANO, P. M.; VARGAS, A.; LAVOIE, J. P. A real-time assay for neutrophil Chemotaxis. **BioTechniques**, v. 60, n. 5, p. 245–251, 1 maio 2016.
- CASTRO, M. et al. Proteome Analysis of Resting Human Neutrophils. **Protein & Peptide Letters**, 2006.
- CLEMMENSEN, S. N. et al. Olfactomedin 4 defines a subset of human neutrophils. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 91, n. 3, p. 495–500, 2012.
- COMEN, E. et al. TNF is a key cytokine mediating neutrophil cytotoxic activity in breast cancer patients. **npj Breast Cancer**, v. 2, n. 1, 14 dez. 2016.

CONDLIFFE, A. M.; KITCHEN, E.; CHILVERS, E. R. Editorial Review Neutrophil priming: pathophysiological consequences and underlying mechanisms. **ClinicalScience**, 1998.

COOPER, G. S.; STROEHLA, B. C. The epidemiology of autoimmune diseases. **Autoimmunity Reviews**, v. 2, n. 3, p. 119–125, 2003.

CORNISH, A. L. et al. G-CSF and GM-CSF as therapeutic targets in rheumatoid arthritis. **Nature Reviews Rheumatology**, 2009.

CROSS, A. R.; SEGAL, A. W. The NADPH oxidase of professional phagocytes - Prototype of the NOX electron transport chain systems. **Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics**, 28 jun. 2004.

DAHL, R. et al. Regulation of macrophage and neutrophil cell fates by the PU.1:C/EBP $\alpha$  ratio and granulocyte colony-stimulating factor. **Nature Immunology**, v. 4, n. 10, p. 1029–1036, 1 out. 2003.

DANIELS, I. et al. Hydrogen peroxide generation by polymorphonuclear leukocytes exposed to peritoneal dialysis effluent. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 3, n. 6, p. 682–688, 1996.

DAVIDSON, W. M.; SMITH, D. R. A morphological sex difference in the polymorphonuclear neutrophil leucocytes. **British Medical Journal**, v. 2, n. 4878, p. 6–8, 1954.

DEWAS, C. et al. The Mitogen-Activated Protein Kinase Extracellular Signal-Regulated Kinase 1/2 Pathway Is Involved in formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanine-Induced p47 phox Phosphorylation in Human Neutrophils. **The Journal of Immunology**, v. 165, n. 9, p. 5238–5244, 2000.

DORWARD, D. A. et al. The role of formylated peptides and formyl peptide receptor 1 in governing neutrophil function during acute inflammation. **American Journal of Pathology**, v. 185, n. 5, p. 1172–1184, 2015.

DUPRÉ-CROCHET, S.; ERARD, M.; NÜBE, O. ROS production in phagocytes: why, when, and where? **Journal of Leukocyte Biology**, v. 94, n. 4, p. 657–670, 2013.

EICHELBERGER, K. R.; GOLDMAN, W. E. Manipulating neutrophil degranulation as a bacterial virulence strategy. **PLoS Pathogens**, v. 16, n. 12, p. 1–7, 2020.

EL-BENNA, J. et al. Priming of the neutrophil respiratory burst: role in host defense and inflammation. **Immunological Reviews**, 2016.

EMITS, T. D. et al. Enhanced Bactericidal Activity of Macrophages by Exogenous Leukotriene B4. **Dermatologica**, 1989.

EREL, O. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. **Clinical Biochemistry**, v. 37, n. 4, p. 277–285, abr. 2004.

FERRER, M. D. et al. Antioxidant regulatory mechanisms in neutrophils and lymphocytes after intense exercise. **Journal of Sports Sciences**, v. 27, n. 1, p. 49–58, 2009.

FESSLER, M. B. et al. Lipopolysaccharide stimulation of the human neutrophil. An analysis of changes in gene transcription and protein expression by oligonucleotide microarrays and proteomics. **Chest. Anais...American College of Chest Physicians**, 2002.

FIRMINO, M. et al. Label-free quantitative proteomics of rat hypothalamus under fever induced by LPS and PGE2. **Journal of Proteomics**, 2018.

FLANAGAN, K. L. Sexual dimorphism in biomedical research: A call to analyse by sex. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, Oxford University Press, 2014.

FLANNAGAN, R. S.; JAUMOUILLÉ, V.; GRINSTEIN, S. The cell biology of phagocytosis. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, 2012.

FONSECA, M. P.; FONTES, W. Proteômica Abrangente de Alta Resolução Na Análise de Neutrófilos Humanos Ativados Pelo Peptídeo Formyl Methyl Leucyl Phenylalanine (fMLP). **Patologia Molecular**, v. PhD, 2017.

FORMAN, H. J.; MAIORINO, M.; URSINI, F. **Signaling functions of reactive oxygen species** **Biochemistry**, 9 fev. 2010.

FRANCISCHETTI, I. et al. Os leucócitos e a resposta inflamatória na lesão de isquemia-reperfusão. **Rev Bras Cir Cardiovasc**, 2010.

FUKATA, M.; VAMADEVAN, A. S.; ABREU, M. T. Toll-like receptors (TLRs) and Nod-like receptors (NLRs) in inflammatory disorders. **Seminars in Immunology**, ago. 2009.

FURMAN, D. et al. Systems analysis of sex differences reveals an immunosuppressive role for testosterone in the response to influenza vaccination. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 111, n. 2, p. 869–874, 2014.

GE, S. X. et al. ShinyGO: A graphical gene-set enrichment tool for animals and plants. **Bioinformatics**, 2020.

GLENNON-ALTY, L. et al. Neutrophils and redox stress in the pathogenesis of autoimmune disease. **Free Radical Biology and Medicine**, Elsevier Inc., 1 set. 2018.

GLENNON-ALTY, L. et al. Type I interferon regulates cytokine-delayed neutrophil apoptosis, reactive oxygen species production and chemokine expression. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 203, n. 2, p. 151–159, 1 fev. 2021.

GREEN, M. S. et al. Sex differences in the case-fatality rates for COVID-19-A comparison of the age-related differences and consistency over seven countries. **PLoS one**, v. 16, n. 4, p. e0250523, 2021.

GROEMPING, Y.; RITTINGER, K.; MECHANISMEN, A. B. Activation and assembly of the NADPH oxidase: a structural perspective. **Biochem. J.** 2005.

GROENEWEG, L.; HIDALGO, A.; A-GONZALEZ, N. Emerging roles of infiltrating granulocytes and monocytes in homeostasis. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 77, n. 19, p. 3823–3830, 2020.

GUPTA, S. et al. Sex differences in neutrophil biology modulate response to type I interferons and immunometabolism. p. 1–11, 2020.

HAUERT, A. B. et al. Differentiated HL-60 cells are a valid model system for the analysis of human neutrophil migration and chemotaxis. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, 2002.

HEYWORTH, P. G. et al. Rac translocates independently of the neutrophil NADPH oxidase components p47(phox) and p67(phox). Evidence for its interaction with

flavocytochrome b558. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 49, p. 30749–30752, 1994.

HIGGS, B. W. et al. Identification of activated cytokine pathways in the blood of systemic lupus erythematosus, myositis, rheumatoid arthritis, and scleroderma patients. **Rheumatic Diseases**, 2012.

HOLMGREN, A. et al. Thiol redox control via thioredoxin and glutaredoxin systems. **Cellular Information Processing**, 2005.

HONEYCUTT, P. J.; NIEDEL, J. E. Cytochalasin B enhancement of the diacylglycerol response in formyl peptide-stimulated neutrophils. **Journal of Biological Chemistry**, v. 261, n. 34, p. 15900–15905, 1986.

HSU, A. Y. et al. Isolation of Human Neutrophils from Whole Blood and Buffy Coats. **Journal of Visualized Experiments**, n. 175, 17 set. 2021.

HYRICH, K. L. et al. Benefit of anti-TNF therapy in rheumatoid arthritis patients with moderate disease activity. **Rheumatology**, v. 48, n. 10, p. 1323–1327, 2009.

ITO, T. et al. The linkage of innate and adaptive immune response during granulomatous development. **Frontiers in Immunology**, v. 4, n. JAN, p. 1–9, 2013.

KARLSSON, A.; DAHLGREN, C. Assembly and activation of the Neutrophil NADPH Oxidase in granule membranes. **Antioxidants & Redox Signaling**, 2002.

KINCHEN, J. M.; RAVICHANDRAN, K. S. Phagosome maturation: Going through the acid test. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, out. 2008.

KLEIN, S. L. Sex influences immune responses to viruses, and efficacy of prophylaxis and therapeutic treatments for viral diseases. v. 34, n. 12, p. 1050–1059, 2012.

KLEIN, S. L.; FLANAGAN, K. L. Sex differences in immune responses. **Nature Reviews Immunology**, v. 16, n. 10, p. 626–638, 2016.

KLEIN, S. L.; JEDLICKA, A.; PEKOSZ, A. The Xs and Y of immune responses to viral vaccines. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 10, n. 5, p. 338–349, 2010.

KOLACZKOWSKA, E.; KUBES, P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. **Nature Reviews Immunology**, mar. 2013.

- KUMAR, H.; KAWAI, T.; AKIRA, S. Pathogen recognition in the innate immune response. **Biochemical Journal**, v. 420, n. 1, p. 1–16, 2009.
- KUMAR, H.; KAWAI, T.; AKIRA, S. Pathogen recognition by the innate immune system. **International Reviews of Immunology**, v. 30, n. 1, p. 16–34, 2011.
- LACY, P. Mechanisms of degranulation in neutrophils. **Allergy, Asthma and Clinical Immunology**, v. 2, n. 3, p. 98–108, 2006.
- LAHOZ-BENEYTEZ, J. et al. Human neutrophil kinetics: Modeling of stable isotope labeling data supports short blood neutrophil half-lives. **Blood**, v. 127, n. 26, p. 3431–3438, 30 jun. 2016.
- LEE, W. L.; HARRISON, R. E.; GRINSTEIN, S. Phagocytosis by neutrophils. **Microbes and Infection** Elsevier Masson SAS, 2003.
- LEVINE, A. P.; SEGAL, A. W. The NADPH Oxidase and Microbial Killing by Neutrophils, With a Particular Emphasis on the Proposed Antimicrobial Role of Myeloperoxidase within the Phagocytic Vacuole. **Microbiology Spectrum**, v. 4, n. 4, 12 ago. 2016.
- LEWIS, E. M. et al. Phosphorylation of p22phox on threonine 147 enhances NADPH oxidase activity by promoting p47phox binding. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 5, p. 2959–2967, 29 jan. 2010.
- LIAN, Z. et al. Genomic and proteomic analysis of the myeloid differentiation program. **Blood**, 2001.
- LICHTMAN, E. I.; HELFGOTT, S. M.; KRIEGEL, M. A. Emerging therapies for systemic lupus erythematosus - Focus on targeting interferon-alpha. **Clinical Immunology**, jun. 2012.
- LIN, A.; LORÉ, K. Granulocytes: New members of the antigen-presenting cell family. **Frontiers in Immunology**, Frontiers Media S.A., 11 dez. 2017.
- LIU, J. et al. Transgelins: Cytoskeletal Associated Proteins Implicated in the Metastasis of Colorectal Cancer. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, Frontiers Media S.A., 7 out. 2020.

LOMINADZE, G. et al. Proteomic analysis of human neutrophil granules. **Molecular and Cellular Proteomics**, v. 4, n. 10, p. 1503–1521, 2005.

LOURDA, M. et al. High-dimensional profiling reveals phenotypic heterogeneity and disease-specific alterations of granulocytes in COVID-19. **PNAS**, 2021.

LU, R. J. et al. Multi-omic profiling of primary mouse neutrophils predicts a pattern of sex- and age-related functional regulation. **Nature Aging**, v. 1, n. 8, p. 715–733, ago. 2021.

LUERMAN, G. C. et al. Application of proteomics to neutrophil biology. **Journal of Proteomics**, v. 73, n. 3, p. 552–561, 2010.

MARASCO, W. A. et al. Purification and identification of formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine as the major peptide neutrophil chemotactic factor produced by *Escherichia coli*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 259, n. 9, p. 5430–5439, 1984.

MARENGO, B. et al. Redox homeostasis and cellular antioxidant systems: Crucial players in cancer growth and therapy. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, Hindawi Publishing Corporation, 2016.

MARKLE, J. G.; FISH, E. N. Sex matters in immunity. **Trends in Immunology**, v. 35, n. 3, p. 97–104, 2014.

MARRIOTT, I.; HUET-HUDSON, Y. M. Sexual dimorphism in innate immune responses to infectious organisms. **Immunologic Research**, v. 34, n. 3, p. 177–192, 2006.

MARTIN, S. J.; BRADLEY, J. G.; COTTER, T. G. HL-60 cells induced to differentiate towards neutrophils subsequently die via apoptosis. **Clin. exp. Immunol.** 1990.

MCCORD, J. M.; FRIDOVICH, I. Superoxide Dismutase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 244, n. 22, p. 6049–6055, nov. 1969.

MITTAL, M. et al. Reactive oxygen species in inflammation and tissue injury. **Antioxidants and Redox Signaling**, 1 mar. 2014.

MÓCSAI, A. et al. Kinase Pathways in Chemoattractant-Induced Degranulation of Neutrophils: The Role of p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Activated by Src Family Kinases. **The Journal of Immunology**, v. 164, n. 8, p. 4321–4331, 15 abr. 2000.

MOLLOY, E. J. et al. Sex-specific alterations in neutrophil apoptosis: The role of estradiol and progesterone. **Blood**, v. 102, n. 7, p. 2653–2659, 1 out. 2003.

MULLARKY, E.; CANTLEY, L. C. Diverting Glycolysis to Combat Oxidative Stress Physiology of ROS. **Innovative Medicine**, p. 3–21, 2015.

NASIR, N. et al. Mortality in Sepsis and its relationship with Gender. v. 31, n. 5, p. 1201–1206, 2015.

NATHAN, C. et al. Albumin inhibits neutrophil spreading and hydrogen peroxide release by blocking the shedding of CD43 (sialophorin, leukosialin). **Journal of Cell Biology**, v. 122, n. 1, p. 243–256, 1993.

NATHAN, C.; CUNNINGHAM-BUSSEL, A. Beyond oxidative stress: An immunologist's guide to reactive oxygen species. **Nature Reviews Immunology**, maio 2013.

NATURE. Editorial: Putting gender on the agenda. **Nature**, n. 7299, p. 465–466, 2010.

NAUSEEF, W. M. Isolation of Human Neutrophils from Venous Blood. **Methods in Molecular Biology**. Neutrophil Methods and Protocols, 2007.

NETEA, M. G. et al. Defining trained immunity and its role in health and disease. **Nature Reviews Immunology**, Nature Research, 1 jun. 2020.

NETEA, M. G.; QUINTIN, J.; VAN DER MEER, J. W. M. Trained immunity: A memory for innate host defense. **Cell Host and Microbe**, 19 maio 2011.

NGUYEN, G. T.; GREEN, E. R.; MECSAS, J. Neutrophils to the ROScUE: Mechanisms of NADPH oxidase activation and bacterial resistance. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 7, n. AUG, 2017.

NORDENFELT, P.; TAPPER, H. Phagosome dynamics during phagocytosis by neutrophils. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 90, n. 2, p. 271–284, ago. 2011.

NUNES, P.; DEMAUREX, N.; DINAUER, M. C. Regulation of the NADPH Oxidase and Associated Ion Fluxes During Phagocytosis Traffic, nov. 2013.

OHTA, H.; OKAJIMA, F.; UI, M. Inhibition by islet-activating protein of a chemotactic peptide-induced early breakdown of inositol phospholipids and Ca<sup>2+</sup> mobilization in

guinea pig neutrophils. **Journal of Biological Chemistry**, v. 260, n. 29, p. 15771–15780, 1985.

PANARO, M. A.; MITOLO, V. Cellular responses to FMLP challenging: A mini-review. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, v. 21, n. 3, p. 397–419, 1999.

PERKINS, A. et al. Peroxiredoxins: Guardians against oxidative stress and modulators of peroxide signaling. **Trends in Biochemical Sciences**, Elsevier Ltd, 1 ago. 2015.

PERRETTI, M. et al. Annexin I is stored within gelatinase granules of human neutrophil and mobilized on the cell surface upon adhesion but not phagocytosis. **Cell Biology International**, v. 24, n. 3, p. 163–174, 2000.

PERRY, D. G.; DAUGHERTY, G. L.; MARTIN, W. J. Clathrin-Coated Pit-Associated Proteins Are Required for Alveolar Macrophage Phagocytosis Alveolar Macrophage. **The journal of immunology**, 1999.

R CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, 2021.

RØRVIG, S. et al. Proteome profiling of human neutrophil granule subsets, secretory vesicles, and cell membrane: correlation with transcriptome profiling of neutrophil precursors. v. 94, n. October, p. 711–721, 2013.

ROSEN, H.; KLEBANOFF, S. J. Bactericidal activity of a superoxide anion-generating system A Model for the Polymorphonuclear Leukocyte\*. **J. Exp. Med**, 1979.

RUGGIERI, A. et al. The influence of sex and gender on immunity, infection and vaccination. **Annali dell'Istituto Superiore di Sanita**, 2016.

SAHA, S. et al. An Overview of Nrf2 Signaling Pathway and Its Role in Inflammation. **Molecules (Basel, Switzerland)** NLM (Medline), 2020.

SAHOO, M. et al. Neutrophil Elastase Causes Tissue Damage That Decreases Host Tolerance to Lung Infection with Burkholderia Species. **PLoS Pathogens**, v. 10, n. 8, 2014.

SARAN, M.; BORS, W. Oxygen radicals acting as chemical messengers: a hypothesis. **Free Rnd. Res. Comms**. 1989.

- SARAYMEN, R. et al. Influence of sex and age on the activity of antioxidant enzymes of polymorphonuclear leukocytes in healthy subjects. **Yonsei Medical Journal**, p. 9–14, 2003.
- SCHMALENBERGER, K. M. et al. How to study the menstrual cycle: Practical tools and recommendations. **Psychoneuroendocrinology**, v. 123, n. September 2020, p. 104895, 2021.
- SCHRÖDER, J. et al. Gender differences in human sepsis. **Archives of Surgery**, v. 133, n. 11, p. 1200–1205, 1998.
- SEGAL, A. W.; DORLING, J.; COADE, S. Kinetics of fusion of the cytoplasmic granules with phagocytic vacuoles in human polymorphonuclear leukocytes. **Biochemical and Morphological Studies** 42. 980.
- SEMAN, B. G.; ROBINSON, C. M. The enigma of low-density granulocytes in humans: Complexities in the characterization and function of LDGs during disease. **Pathogens**, MDPI, , 1 set. 2021.
- SIEMIŃSKA, I.; POLJAŃSKA, E.; BARAN, J. Granulocytes and cells of granulocyte origin—the relevant players in colorectal cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 7, 2021.
- SIONOV, R. V. Leveling Up the Controversial Role of Neutrophils in Cancer: When the Complexity Becomes Entangled. **Cells**, v. 10, n. 9, p. 2486, 20 set. 2021.
- SONG, E. K. et al. Chronic granulomatous disease: A review of the infectious and inflammatory complications. **Clinical and Molecular Allergy**, 31 maio 2011.
- STEFANOWICZ-HAJDUK, J. et al. Reuse of E-plate cell sensor arrays in the xCELLigence real-time cell analyzer. **BioTechniques**, v. 61, n. 3, p. 117–122, 1 set. 2016.
- TELES, L. M. B. et al. Comparison of the neutrophil proteome in trauma patients and normal controls. **Protein & Peptide Letters**, 2012.
- THEILGAARD-MO, K. et al. Haptoglobin is synthesized during granulocyte differentiation, stored in specific granules, and released by neutrophils in response to activation. v. 108, n. 1, p. 353–361, 2006.

TOMONAGA, M. et al. Leukocyte Drumsticks in Chronic Granulocytic Leukemia and Related Disorders. 1961

TORCIA, M. G. et al. Sex differences in the response to viral infections: TLR8 and TLR9 ligand stimulation induce higher IL10 production in males. **PLoS ONE**, v. 7, n. 6, p. 1–8, 2012.

ULFIG, A.; LEICHERT, L. I. The effects of neutrophil-generated hypochlorous acid and other hypohalous acids on host and pathogens. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Springer Science and Business Media Deutschland GmbH, 1 jan. 2021.

VAN KESSE, K. P. M.; BESTEBROER, J.; VAN STRIJP, J. A. G. Neutrophil-mediated phagocytosis of Staphylococcus aureus. **Frontiers in Immunology**, v. 5, n. SEP, 2014.

WARNATSCH, A. et al. Reactive Oxygen Species Localization Programs Inflammation to Clear Microbes of Different Size. **Immunity**, v. 46, n. 3, p. 421–432, 21 mar. 2017.

WEIS, S. N. et al. In-depth quantitative proteomic characterization of organotypic hippocampal slice culture reveals sex-specific differences in biochemical pathways. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 1–18, 2021.

WICKRAMASINGHE, S. N.; ERBER, W. N. **Normal blood cells**. Second Edition ed. [s.l.] Elsevier Ltd, 2011.

WILSON, Z. S. et al. Context-Dependent Role of Vinculin in Neutrophil Adhesion, Motility and Trafficking. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, 1 dez. 2020.

WINTERBOURN, C. C.; KETTLE, A. J.; HAMPTON, M. B. Reactive Oxygen Species and Neutrophil Function. **Annual Review of Biochemistry**, v. 85, p. 765–792, 2 jun. 2016.

WONG, H. R. et al. Genomic expression profiling across the pediatric systemic inflammatory response syndrome, sepsis, and septic shock spectrum. **Critical Care Medicine**, v. 37, n. 5, p. 1558–1566, 2009.

XIJIN GE, S.; JUNG, D.; YAO, R. ShinyGO: a graphical enrichment tool for animals and plants. **Bioinformatics**, 2019.

YAN, J. et al. Glutathione Reductase Facilitates Host Defense by Sustaining Phagocytic Oxidative Burst and Promoting the Development of Neutrophil Extracellular Traps. **The Journal of Immunology**, v. 188, n. 5, p. 2316–2327, 2012.

YAN, J. et al. Glutathione reductase is essential for host defense against bacterial infection. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 61, n. 614, p. 320–332, 2013.

YANG, Z. et al. Comparisons of neutrophil-, monocyte-, eosinophil-, and basophil-lymphocyte ratios among various systemic autoimmune rheumatic diseases. **APMIS**, v. 125, n. 10, p. 863–871, 1 out. 2017.

YOVEL, G.; SHAKHAR, K.; BEN-ELIYAHU, S. The effects of sex, menstrual cycle, and oral contraceptives on the number and activity of natural killer cells. **Gynecologic Oncology**, v. 81, n. 2, p. 254–262, 2001.

YVAN-CHARVET, L.; NG, L. G. Granulopoiesis and Neutrophil Homeostasis: A Metabolic, Daily Balancing Act. **Trends in Immunology** Elsevier Ltd, 1 jul. 2019.

ZELOVÁ, H.; HOŠEK, J. TNF- $\alpha$  signalling and inflammation: Interactions between old acquaintances. **Inflammation Research**, jul. 2013.

ZHANG, D. D.; HANNINK, M. Distinct Cysteine Residues in Keap1 Are Required for Keap1-Dependent Ubiquitination of Nrf2 and for Stabilization of Nrf2 by Chemopreventive Agents and Oxidative Stress. **Molecular and Cellular Biology**, v. 23, n. 22, p. 8137–8151, 15 nov. 2003.

ZHANG, Q.; LENARDO, M. J.; BALTIMORE, D. 30 Years of NF- $\kappa$ B: A Blossoming of Relevance to Human Pathobiology. **Cell**, Cell Press, 12 jan. 2017.