



PHILLIPPE BRAGA SANTOS

Programa de Patologia Molecular, Laboratório de Química e Bioquímica de Proteínas,
Universidade de Brasília – UnB.

Análise proteômica e funcional dos neutrófilos ativados por IL-8

Brasília-DF

2022

PHILLIPPE BRAGA SANTOS

Análise proteômica e funcional dos neutrófilos ativados por IL-8

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Universidade de Brasília, como requisito para a obtenção
do título de mestre em Patologia Molecular.

Orientador: Dr. **Wagner Fontes**

Brasília-DF

2022

PHILLIPPE BRAGA SANTOS

Análise proteômica e funcional dos neutrófilos ativados por IL-8

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Faculdade Anhanguera de Brasília, como requisito parcial para a obtenção do título de graduado em Biomedicina.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Wagner Fontes (Presidente)

Prof. Dr. Carlos André (Membro)

Prof. Dra. Hylane Luiz Damascena (Membro)

Prof. Dr. Lucas Oliveira (Suplente)

Brasília, 30 de novembro de 2022

DEDICATÓRIA

Ouço falarem que o esforço vence o talento
Gosto desse argumento
Eu nunca quis ser melhor que ninguém
Apenas tive o comprometimento

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pois Ele é o meu guia hoje e sempre. Agradeço também a Virgem Maria, por sempre passar na frente em todas as etapas da minha vida, como também todos os santos. Sou imensamente grato a minha família, que sempre me apoiou nessa jornada, por mais complicada que ela seja em especial agradeço minha mãe, Maria Inês, meu pai, Leonício, meu irmão, Raphael, minha irmã, Poliana e minha cunhada, Elis, Sem vocês nada disso teria acontecido, obrigado por me apoiarem sempre!!! Agradeço também aos meus amigos do Dream Team, Isabelle, Katyelle, Adriano, Hylane e Wendy Dawson, sem vocês não conseguiria escrever e evoluir dentro da ciência. Agradeço também a Greice, pois ela me ajudou sempre e me ensinou tudo aquilo que sei com muita calma e paciência. Também agradeço ao professor Wagner, o meu orientador, que acreditou em mim mesmo quando eu não acreditava que eu era capaz. Ressalto também que em pouco tempo, eu sou eternamente grato pela Pâmela Rodrigues, pois ela me deu sentido e coragem para continuar. Obrigado pela paciência e todos os ensinamentos que vocês me passaram!

Sumário

1.1	Sistema imune	13
1.2	Neutrófilos	14
2.1	Objetivo geral	32
2.2	Objetivos específicos:	32
2.3	Delineamento experimental	33
2.4	Separação de Polimorfonucleares	33
2.5	Contagens de lâminas e morfologia	34
2.6	Ativação celular	34
2.7	Testes de NBT para avaliação qualitativa e quantificação relativa da produção de EROs	34
2.8	Ressonância Paramagnética Eletrônica (EPR)	35
2.9	Proteômica	36
2.10	Estatística	39
2.11	Figuras	39
4.1	Rendimento, Pureza, Viabilidade e Ativação dos Neutrófilos:	39
4.2	Análise da Produção de Espécies Reativas de Oxigênio por Neutrófilos	40
4.3	Proteômica	48
Anexo		72

ÍNDICE DE FIGURAS

Sumário

Figura 1. Células do sistema imune. Fonte: SANTOS, 2022.....	13
Figura 2. Processo de maturação celular dos granulócitos. Fonte: SANTOS, 2022.....	14
Figura 3 Morfologia dos neutrófilos maduros. Fonte: SANTOS, 2022.....	15
Figura 4: Processo de migração celular dos neutrófilos para o tecido inflamado. Fonte: SANTOS, 2022.....	20
Figura 5. Etapas da formação NETs: A. presença de patógenos induz atividade de oxidases; b. fusão dos lóbulos e descondensação da cromatina; c- formação das redes extracelulares presentes com DNA, histonas e outras proteases. A produção das NETs por neutrófilos estimulados por IL-8 não necessitam da NADPH oxidase. Fonte: SANTOS, 2022.....	21
Figura 6 Mecanismos de fagocitose dos neutrófilos. Fonte: SANTOS, 2022.....	22
Figura 7. Complexo de NADPH oxidase montado nas membranas dos neutrófilos mostrando interações entre os componentes e sítios de fosforilação envolvidos na ativação do complexo. Fonte: SANTOS, 2022.....	25
Figura 8. Estrutura tridimensional (3D) da interleucina-8 (UNIPROT, 2022).....	26
Figura 9. Estrutura molecular IL-8 fonte: Uniprot (P10145), acesso em 2022.....	26
Figura 10. Mecanismo de ativação dos neutrófilos estimulados por IL-8. Fonte: SANTOS, 2022.....	28
Figura 11 Fluxograma da metodologia. Fonte: SANTOS, 2022.....	30
Figura 12. a-) Contagem de neutrófilos vivos e mortos. b-) Dados de proteômica analisados pela plataforma ShinyGO, confirmando a ativação por IL-8. c-) Avaliação da lâmina de pureza através da microscopia, confirmando neutrófilos.....	30
Figura 13 Imagens de microscopia óptica de neutrófilos submetidos ao teste do NBT. (a) NBT IL-8 50 ng/mL. (b) NBT IL-8 100 ng/mL. (c) NBT quiescente(. Aumento: 400x, coloração: Safranina.....	38
Figura 14. Contagem média de neutrófilos ativados (contendo cristais de formazan) avaliados por microscopia óptica. (azul) Grupo quiescente (vermelho) Grupo exposto a IL-8 As barras de erro indicam o erro padrão da média. O * indica a diferença significativa ($p < 0.05$). Grupo quiescente vs grupo exposto a IL-8 100 ng/mL vs IL-8 50 ng/mL.....	38
Figura 15 Teste de NBT espectrofotométrico. O traçado roxo indica células ativadas por IL-8 e o traçado azul indica células quiescentes. O asterisco indica os comprimentos de onda que apresentaram diferenças significativas entre os grupos ($P < 0.05$). As barras de erro indicam o erro padrão da média. (a) NBT 50 ng/mL vs NBT 100 ng/mL (b) Quiescente vs IL-8 50 ng/mL (c) Quiescente vs IL-8 100 ng/mL.....	39
Figura 16. Avaliação da cinética de produção de EROs por EPR.....	41
Figura 17. Gráfico de barras dos parâmetros obtidos por ajuste das medidas por EPR ao modelo de Gompertz com barras de erro e marcar de significância estatística das diferenças entre condições.....	42
Figura 18 Dados ShinyGo – mostrando dados da resposta ao estresse dos neutrófilos estimulados por IL-8.....	44
Figura 19 Representação da abundância de proteínas dos neutrófilos estimulados por IL-8.....	44
Figura 20. Cascata de ativação das vias de NADPH oxidase dos neutrófilos ativados por IL-8. Fonte: SANTOS, 2022.....	47
Figura 21: Análise de função molecular por ontologia gênica das proteínas significativamente reguladas entre as condições.....	49
Figura 22 Análise dos processos biológicos por ontologia gênica das proteínas significativamente reguladas entre as condições.....	50
Figura 23 Análise de componente celular por ontologia gênica das proteínas significativamente reguladas entre as condições.....	50
Figura 24 Análise por ReactomePathway.....	51
Figura 25. Análise por string.....	54
Figura 26. Vias dos neutrófilos ativados por IL-8 e as possíveis interações proteicas na produção de EROs. SANTOS, 2022.....	63

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 Grânulos primários dos neutrófilos.....	17
Tabela 2 Grânulos secundários dos neutrófilos.....	19
Tabela 3 Grânulos terciários dos neutrófilos.....	19
Tabela 4 Proteínas de membrana dos neutrófilos.....	27
Tabela 5. Proteínas com abundância diferencial significativa aumentada e diminuída entre neutrófilos quiescentes e estimulados por IL-8.....	46
Tabela 6. Vias enriquecidas com o seu nome, p valor e código uniprot.....	53
Tabela 7. Interação proteína/proteína verificada no string, diferenciando grupo, nome, código e funções.	54

Erro! Indicador não definido.

SIGLAS E ABREVIações

IL-8	Interleucina-8
PMNS	Polimorfonucleares
NK	Natural Killers
CFU-GM	Progenitor Granulócito-Macrofágo
ATP	Trifosfato De Adenosina
GTP	Trifosfato De Guanosina
MMP-9	Metalopeptidase de matriz-9
CR1	Receptor 1 De Complemento
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HOCl	Ácido Hipocloroso
R1Ila	Receptor de Peptídeo Fc
CD13	Aminopectidase N
NETS	Armadilhas Extracelulares dos Neutrófilos
PAMPs	Padrões Moleculares Associados a Patógenos
IgG	Imunoglobulina G
TLR	Receptores do tipo Toll-like
LAMPs	Proteína de Membrana Associada aos Lissosomos
PI3K	Fosfatidilinositol-3 Cinase
MAPK	Proteína Cinase Ativada por Mitógenos
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
M/Z	Massa/carga
TLCE	Termo de consentimento livre e esclarecido
CMH	1-Hydroxy-3-methoxycarbonyl-2, 2, 5,5-tetramethyl pyrrolidine
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
IAA	Iodacetamida
ACN	Acetonitrila
ANOVA	Análise de variância

10

NBT	Nitroazul tetrazólio
HRG	Glicoproteína Rica em Histidina
ORM-1	Glicoproteína-alfa-ácida-1
SIGLEC-5	Receptores de Lectina5 semelhante à Imunoglobulina 5
TNF	Fator de Necrose Tumoral
fMLP	N-Formilmetionina-Leucil-Fenilalanina
PKC	Proteína Cinase C
GPCR	Receptores Acoplados à proteína G
RNS	Espécies Reativas de Nitrogênio

SANTOS, PHILLIPPE BRAGA. Análise proteômica e funcional dos neutrófilos ativados por IL-8: 2021. 71. Trabalho de mestrado em Patologia Molecular – Universidade de Brasília, Brasília, 2022

RESUMO

Os neutrófilos são células do sistema imune inato que apresentam grânulos citoplasmáticos e núcleo multilobulado, sendo classificadas como polimorfonucleares (PMN). Os PMNs podem ser ativados por bactérias, fungos ou por mediadores pró-inflamatórios como, por exemplo, espécies reativas de oxigênio (ERO), e interleucinas, dentre elas a interleucina-8 (IL-8). A IL-8 é uma quimiocina da família CXCL e apresenta grande afinidade por neutrófilos por meio dos receptores CXCR1 e CXCR2, desencadeando atividades como quimiotaxia, modulações do cálcio intracelular, desgranulação, dentre outras. Neutrófilos são os primeiros a chegar ao local da infecção, auxiliando no combate a patógenos e reparo dos tecidos lesionados. Como alguns estudos evidenciam falhas de regulação nessas células, a informação sobre os mecanismos de ativação, como a produção de espécies reativas de oxigênio, ganha relevância. Essas falhas estão associadas a patologias severas como, por exemplo, síndrome da angústia respiratória aguda, artrite reumatoide e síndrome da resposta inflamatória sistêmica. Ao analisar os mecanismos moleculares dos neutrófilos ativados pela IL-8 por meio de análise proteômica comparativa e associando tais dados às funções efetoras dos neutrófilos por meio de testes funcionais, observamos alterações relevantes com potenciais aplicações no futuro. Na análise proteômica do presente trabalho foram identificadas 653 proteínas, sendo 39 proteínas significativamente reguladas, das quais 16 apresentaram abundância diminuída e 23 com abundância aumentada. Tais proteínas evidenciaram diferentes processos biológicos enriquecidos, como desgranulação, estresse celular, exocitose e transporte mediado por vesículas. Além disso, foi abordada neste trabalho a controvérsia na literatura quanto à ativação das vias de NADPH oxidase dos neutrófilos por IL-8, pois alguns estudos defendem a ideia de que os neutrófilos expostos à IL-8 não ativam as vias de NADPH oxidase, enquanto outros afirmam que tal ativação ocorre. Para isso foram utilizadas duas concentrações de IL-8 (100 ng/mL e 50 ng/mL) e testes por microscopia, espectrofotometria (NBT) e ressonância eletrônica paramagnética (EPR). Os ensaios de EPR demonstraram diferença significativa na produção de EROs entre o controle e ambas concentrações de IL-8, bem como entre as duas concentrações de IL-8, já o teste de NBT evidenciou apenas diferença significativa entre controle e IL-8 (100 ng/ml). Dessa forma, além de esclarecer a controvérsia na literatura, o conjunto dos testes moleculares e funcionais permitiu propor hipóteses associando as proteínas ORM1, SERPINA1, HP e HRG aos processos de modulação de espécies reativas de oxigênio. Dessa forma, acreditamos que o presente trabalho foi capaz de criar novos insights mostrando diferentes aspectos na interação dos neutrófilos estimulados por IL-8.

SANTOS, PHILLIPPE BRAGA. Proteomic and functional analysis of IL-8 activated neutrophils: 2021. 71. Master's work in Molecular Pathology – University of Brasília, Brasília, 2022.

ABSTRACT

Neutrophils are cells of the innate immune system that have cytoplasmic granules and a multilobulated nucleus, being classified as polymorphonuclear (PMN). PMNs can be activated by bacteria, fungi or by inflammatory mediators such as reactive oxygen species (ROS) and interleukins, namely interleukin-8 (IL-8). IL-8 is a chemokine of the CXCL family and has great affinity for the CXCR1 and CXCR2 receptors, triggering activities as intracellular calcium modulation, degranulation, migration and others. Neutrophils are the first to arrive at the site of infection, helping to fight pathogens and repair injured tissues. As some studies show failures in neutrophil regulation mechanisms, such as the production of reactive oxygen species in some diseases, information about such mechanisms gains relevance. These failures are associated with pathologies such as, the acute respiratory distress syndrome, rheumatoid arthritis and the systemic inflammatory response syndrome. By analyzing the IL-8 activated neutrophil molecular mechanisms by proteomics and associating such data to the results of functional tests, we observed relevant changes with potential applications in the future. In the proteomic analysis of the present work, 653 proteins were identified, 39 of which were significantly regulated proteins, being 23 with increased and 16 with decreased abundance. Such proteins revealed enriched biological processes such as degranulation, cellular stress, exocytosis and vesicle-mediated transport. Furthermore, the controversy in the literature regarding the activation of NADPH oxidase pathways in neutrophils by IL-8 was addressed in this work, as some studies support the idea that neutrophils exposed to IL-8 do not activate NADPH oxidase pathways, while others claim that such activation occurs. For this, two concentrations of IL-8 (100 ng/mL and 50 ng/mL) and tests by microscopy, spectrophotometry (NBT) and paramagnetic electron resonance (EPR) were used. The EPR assays showed a significant difference in the production of ROS between the control and both concentrations of IL-8, as well as between the two concentrations of IL-8, whereas the NBT test showed only a significant difference between control and IL-8 (100 ng/ml). Thus, in addition to clarifying the controversy in the literature, the set of molecular and functional tests allowed us to propose hypotheses associating the proteins ORM1, SERPINA1, HP and HRG to the processes of modulation of reactive oxygen species. Thus, we believe that the present work was able to create new insights showing different aspects of the interaction of neutrophils stimulated by IL-8.

1. Introdução

1.1 Sistema imune

O organismo humano apresenta um sistema de defesa com diferentes linhas de combate. A imunidade inata é considerada a primeira linha de defesa, incluindo barreiras físicas, químicas e biológicas (epitélio e compostos bacterianos), como também células fagocitárias (neutrófilos e monócitos), *Naturais Killers* (NK), citocinas (produtos pró-inflamatórios) e proteínas do sangue (componentes do sistema complemento). Já a imunidade adquirida (também chamada de imunidade específica) apresenta diferentes substâncias e células específicas para o combate dos patógenos, como por exemplo, os linfócitos T e B¹

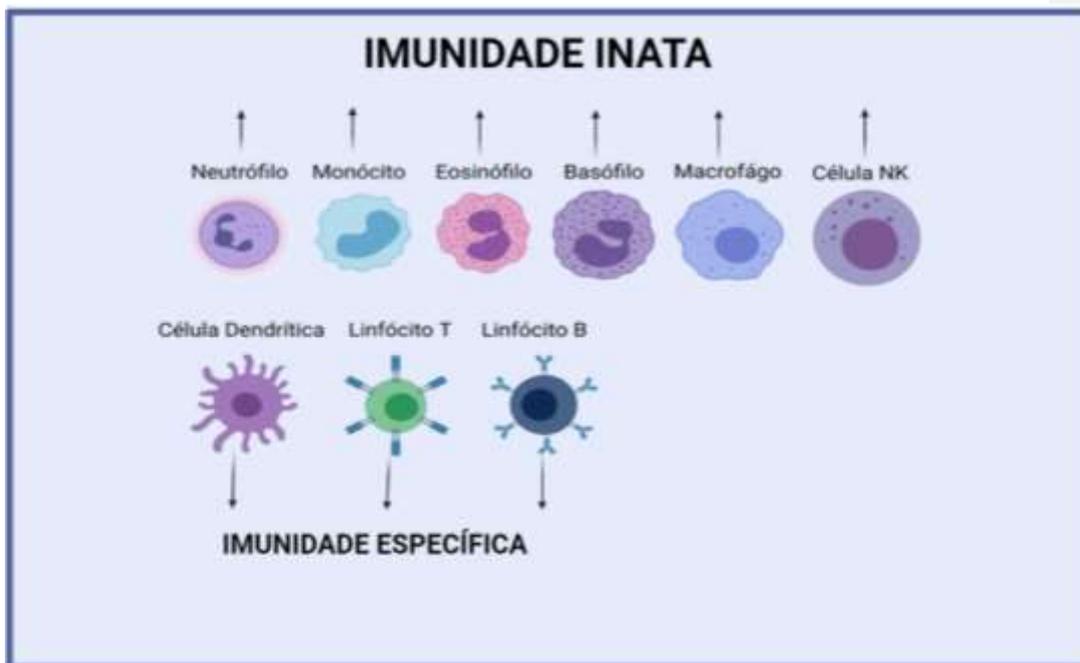


Figura 3. Células do sistema imune.

A imunidade inata pode responder a diferentes eventos, como por exemplo, a contaminação por microrganismos (bactérias, fungos e parasitas) ou a traumas. Após a invasão por patógenos, ou lesão tecidual mesmo que sem infecção, os tecidos afetados sofrem uma resposta inflamatória e apresentam os sinais clássicos de calor, rubor, edema e dor

localizada, conseqüentes à vasodilatação e migração de células no tecido afetado. Em seqüência, ocorre a recuperação do tecido injuriado. Os mecanismos de combate e reparo do tecido lesionado são essenciais para se debelar a infecção, mas o prolongamento desta ação na fase aguda pode vir a gerar desequilíbrio dos mecanismos pró- e anti-inflamatório, podendo causar danos ao organismo²⁻⁴

1.2 Neutrófilos

No processo inflamatório, alguns tipos celulares são ativados, dentre quais podemos destacar os neutrófilos. Os neutrófilos são os leucócitos mais abundantes na corrente sanguínea, representando cerca de 40 a 70 % em condições normais para humanos. No processo de injúria tecidual, os neutrófilos são as primeiras células a migrarem para o tecido lesionado, pois conseguem ter uma resposta rápida e eficiente devido à sua plasticidade estrutural^{1,4-6}.

1.2.1 Maturação Celular

Os neutrófilos são produzidos na medula óssea por meio da granulopoiese. Essas células passarão por cinco diferentes etapas (figura 2) para chegar ao estágio final, que são neutrófilos segmentados. A partir dos mieloblastos, são formados os promielócitos, que serão influenciados pelo fator estimulador de colônia granulócito-macrofágo (CFU-GM e CSF-GM). Nesse período, são formados os grânulos primários e posteriormente são formados os grânulos secundários, na fase chamada de mielocítica. Em seguida, são formados os metamielócitos, nessa etapa o núcleo dos PMNs diminui e a divisão nuclear cessa⁷.

Logo após, são formados os bastonetes, e a síntese de proteínas granulares é interrompida. Após esse processo, o núcleo começa a apresentar um aspecto segmentado, quando são formados os neutrófilos segmentados. A maturação celular dos neutrófilos se torna completa após a formação de grânulos terciários, sendo os neutrófilos maduros frequentemente a forma liberada na circulação sanguínea⁷⁻⁷⁸

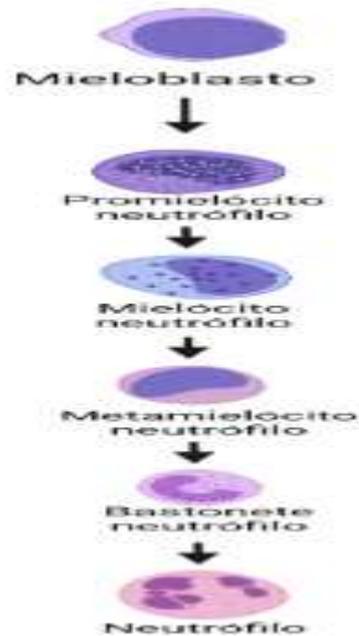


Figura 2. Processo de maturação celular dos granulócitos.

Os neutrófilos são considerados células esféricas, com tamanho variado entre 12 a 15 μm de diâmetro, com um núcleo multilobulado (pode apresentar de 3 a 5 lóbulos) e com grânulos citoplasmáticos (figura 3). As microvilosidades presentes na membrana dos neutrófilos apresentam projeções curtas e irregulares. Essas microvilosidades são essenciais, pois os neutrófilos se tornam mais flexíveis, fazendo com que as células se adaptem a pequenos espaços durante o processo inflamatório, realizando diapedese e transmigração, sem que haja lise celular^{8,9}.

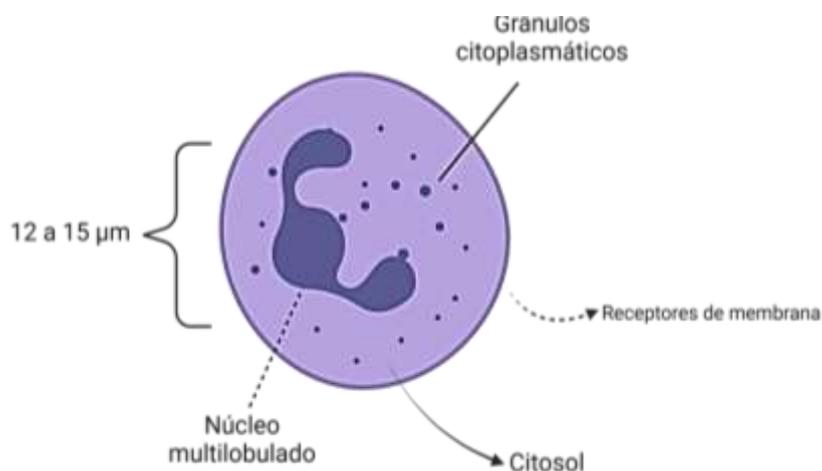


Figura 3 Morfologia dos neutrófilos maduros.

1.2.2 Características Morfológicas, Funcionais e Moleculares de Neutrófilos Ativos

Os neutrófilos respondem a diferentes estímulos, com um conjunto de alterações fenotípicas, funcionais e moleculares. Algumas diferenças que podem ser apresentadas entre os neutrófilos estimulados e quiescentes estão na despolimerização e reorganização da actina, presença de bolhas, citonemas, extensões túbulo vesiculares, movimentação dos grânulos para as extremidades, aumento do cálcio citosólico, entre outras atividades¹⁰. Tais alterações levam a respostas funcionais, sendo a desgranulação, a formação de armadilhas extracelulares, a fagocitose, a apoptose e a produção de EROs algumas das mais marcantes em neutrófilos¹¹.

1.2.2.1 Desgranulação

Os polimorfonucleares (PMNs) apresentam três diferentes tipos de grânulos que são classificados em grânulos primários, secundários e terciários, e vesículas secretoras, diferenciados pelo seu conteúdo proteico e momento de formação durante a maturação¹²⁻⁷⁸. A ordem de liberação das proteínas presentes nos grânulos é inversa à ordem de formação. Segundo Faurschou, as vesículas secretoras são as primeiras a terem seu conteúdo liberado, em seguida ocorre a exocitose dos grânulos terciários, secundários e por fim os primários^{12,13}.

As proteínas presentes nos grânulos dos neutrófilos são diversificadas e podem apresentar diferentes funcionalidades, como por exemplo, atividades antibacterianas, proteases, espécies reativas de oxigênio (EROs), entre outras¹³.

O processo de estimulação dos neutrófilos frequentemente ocorre por meio da ativação dos seus receptores por meio de secretagogos (auxilia no processo de secretar substâncias proteicas ou enzimáticas). Essa interação induz a exocitose de vesículas secretórias e uma parte dos grânulos terciários presentes em neutrófilos. Após esse processo, ocorre a translocação das vesículas e grânulos para membrana plasmática da célula, ou para o fagossomo. Para que ocorra o processo de translocação dos grânulos são necessárias diversas alterações moleculares, como por exemplo, aumento do cálcio intracelular, hidrólise de ATP e GTP^{14,15}.

Com a fusão das vesículas e dos grânulos à membrana plasmática, alguns receptores considerados essenciais para o processo de adesão firme dos neutrófilos (CD11/CD18), como também componentes do complexo de NADPH oxidase são incorporados a essa membrana. Além disso, os grânulos terciários podem ajudar em outras atividades, como transmigração e diapedese, pela liberação de proteases como a metalopeptidase-9 de matriz (MMP-9), que auxilia na degradação da matriz extracelular^{12,15}.

A desgranulação dos neutrófilos é um processo finamente regulado, desde a mobilização de grânulos até seu acesso à membrana por meio de remodelamento de componentes do citoesqueleto, impedindo a célula de liberar o conteúdo presente nos grânulos sem uma sinalização prévia¹⁴.

A IL-8 é um sinalizador capaz de induzir a desgranulação em neutrófilos, pois quando os neutrófilos são estimulados por IL-8, foi detectada a liberação de proteínas e enzimas de grânulos^{16,17}.

1.2.2.1.1 Grânulos Azurofílicos

Os grânulos primários ou azurofílicos, também conhecidos como peroxidase-positivos, apresentam produtos importantes no combate contra microrganismos, como fosfatase alcalina, mieloperoxidase (MPO) e peptídeos antibacterianos, alfa-defensina, proteinase-3, catepsina G e Elastase (Serprocidinas). Apesar de não apresentarem quantidade significativa de componentes do complexo NADPH oxidase, os grânulos primários participam da produção de EROs. A MPO é uma enzima que participa dos mecanismos de estresse oxidativo, catalisando a transformação de peróxido de hidrogênio, (H₂O₂) e íon cloreto em ácido hipocloroso (HOCl), o qual apresenta potente efeito bactericida¹⁸. As alfa-defensinas são peptídeos citotóxicos que formam poros na membrana de microrganismos. A tabela 1 mostra algumas proteínas que estão presentes nos grânulos primários dos neutrófilos¹.

Tabela 1 Grânulos primários dos neutrófilos

PROTEÍNAS DE MEMBRANA	PROTEÍNAS DE MATRIZ
Estomatina	Ubiquitina
H ⁺ - ATPase tipo V	Sialidase
Presenilina1	Proteinase-3
CD68	MPO
CD63	Elastase
	Defesinas
	Catepsina
	Alfa-1-antitripsina
	Azurocidina

1.2.2.1.2 Grânulos Específicos

Os grânulos secundários ou específicos, também conhecidos como grânulos peroxidase-negativos, possuem produtos considerados importantes no combate a microrganismos, como os componentes membranares do complexo NADPH oxidase e proteínas antimicrobianas, dentre elas a lactoferrina. A lactoferrina ajuda na proteção das células contra agentes oxidantes, além disso, também pode estimular o crescimento de várias células do sistema imune (linfócitos, macrófagos) podendo estimular a resposta imune humoral durante a produção dos anticorpos¹⁹. A tabela 2 mostra algumas proteínas que estão presentes nos grânulos específicos¹.

Tabela 2 Grânulos secundários dos neutrófilos

COMPOSIÇÃO PROTEICA DOS GRÂNULOS SECUNDÁRIOS	
PROTEÍNAS DE MEMBRANA	PROTEÍNAS DE MATRIZ
Rap 1 e 2	Lactoferrina
fMLP-R	Alfa-1-antitripsina
CD15	ORM1
CD11b	Albumina
CD18	Gelatinase
CD66	Catelicidina
Citocromo b558	Lipocalina
Trombosporina-R	Lisozima
Leucolisina-R	Fosfatase alcalina

SCAMP	
Fibronectina-R	

1.2.2.1.3 Grânulos Gelatinase

Já os grânulos terciários ou de gelatinase apresentam enzimas que ajudam na degradação da matriz extracelular. As proteínas presentes nos grânulos terciários podem atuar no transporte de cátions divalentes, como também podem auxiliar os receptores da membrana dos neutrófilos, facilitando diversas ações, como diapedese e migração²⁰. A tabela 3 mostra algumas proteínas presentes nos grânulos terciários dos neutrófilos¹.

Tabela 3 Grânulos terciários dos neutrófilos

COMPOSIÇÃO PROTEICA DOS GRÂNULOS TERCIÁRIOS	
PROTEÍNAS DE MEMBRANA	PROTEÍNAS DE MATRIZ
SCAMP	Catepsina
Vamp-2	Gelatinase
fMLP-R	CRISP-3
NRCAMP-1	Aciltransferase
uPa-R	β2-microglobulina
Citocromo b558	

1.2.2.1.4 Vesículas Secretoras

Além dos grânulos, os neutrófilos apresentam vesículas secretórias que aparecem em neutrófilos maduros e auxiliam nas primeiras fases da resposta inflamatória. Podemos evidenciar diferentes proteínas, como β-integrinas (CD11B/CD18), receptor de complemento (CR1), receptor de fMLP, receptor para a região Fc (RIIIa) de anticorpos, aminopeptidase N (CD13), complexo TLR CD14, entre outros^{1,21}.

1.2.3.2 Adesão, Rolamento e Migração.

Os neutrófilos que estão presentes na corrente sanguínea são recrutados e mobilizados, iniciando a resposta inflamatória nos tecidos lesionados. Dessa forma a célula começa a se preparar para a migração celular (quimiotaxia). Esse processo consiste em quatro etapas sendo eles, rolamento, adesão e diapedese^{4,22}.

O processo de rolamento ocorre com a interação entre neutrófilos e endotélio por meio da ligação entre selectinas e seus ligantes. Selectinas do tipo P CD62P e do tipo E CD62E estão presentes na membrana de células endoteliais e do tipo L CD62L na membrana de leucócitos. P- e E-selectinas se ligam a PSGL-1, uma glicoproteína de membrana de neutrófilos, mas E-selectinas podem se ligar a outras proteínas ou glicolipídios de neutrófilos²³. Já a L-selectina se liga a carboidratos das células endoteliais de forma rápida e fraca, uma vez que a CD62L é clivada. Devido ao fluxo sanguíneo e à ligação dos neutrófilos utilizando as selectinas ser fraca, ocorre o rompimento dessa ligação, fazendo com que o neutrófilo sofra o processo de rolamento sobre o endotélio. Durante o processo de rolamento, os neutrófilos são ativados a partir das próprias selectinas²⁴, das integrinas²⁵ e da interação com diferentes moléculas quimioatraentes, como a IL-8^{4,22}.

Com os neutrófilos ativados e em processo de rolamento, passa a ocorrer uma ligação forte com o endotélio, utilizando as moléculas de integrinas (moléculas de adesão), que vão auxiliar diretamente no processo de extravasamento celular, pois elas são capazes de estabilizar as ligações entre as superfícies das membranas do endotélio e dos neutrófilos^{4,22}.

Esse episódio vai facilitar a migração das células do meio intravascular para o meio extravascular, com ajuda das enzimas GTPase do tipo Rhoa, uma enzima responsável por se ligar com a miosina e ativá-la. Essa ativação vai gerar um processo de protusão celular, fazendo com que a célula se projete em direção à maior concentração de quimioatraentes. Após esse processo, os neutrófilos chegam até o sítio injuriado, continuam o processo de desgranulação, liberação de produtos pró e anti-inflamatórios, liberação de armadilhas extracelulares (NETS) e fagocitose^{4,22}. A fig. 4 abaixo ilustra o processo de migração dos neutrófilos para o tecido inflamado de forma simplificada.

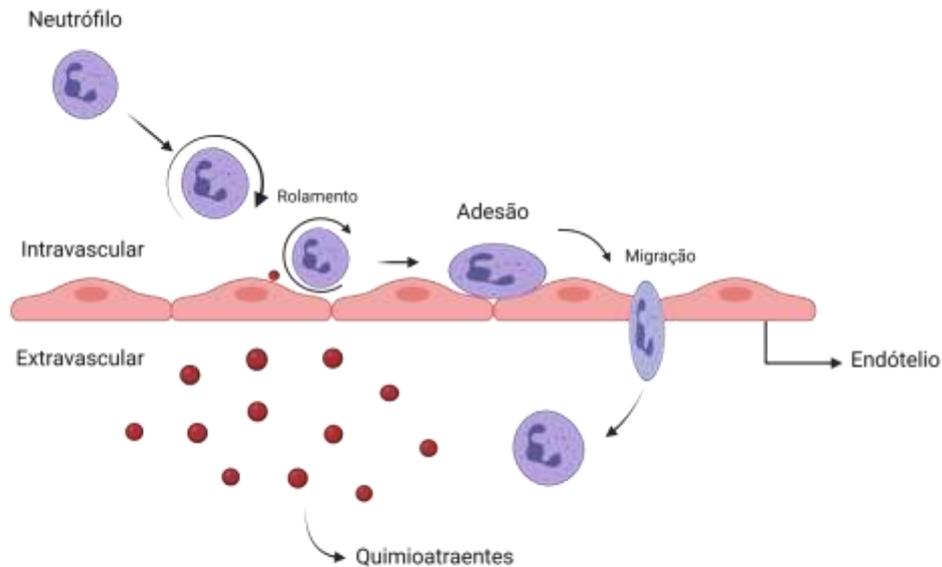


Figura 4: Processo de migração celular dos neutrófilos para o tecido inflamado.

1.2.2.2 *Armadilhas Extracelulares - NETs*

NETs são mecanismos utilizados por neutrófilos, que auxiliam no processo de imobilização dos diferentes patógenos. Esse processo consiste na liberação do material genético (DNA), histonas, elastase e catepsina G na forma de redes extracelulares, auxilia no aprisionamento dos microrganismos e pode causar morte celular dos neutrófilos (netose) ⁴.

NETs são formadas a partir dos neutrófilos maduros que sofreram ativação celular. Esse neutrófilo maduro ativado vai aderir ao endotélio, migrar para o tecido lesionado e em seguida irá ativar uma cascata de sinalização, a qual compreende a citrulinização das histonas por meio da proteína arginina deiminase 4 (PAD4), levando descondensação da cromatina que levará a ruptura nuclear e da membrana plasmática. Assim, é criado um complexo entre proteínas e DNA, que serão lançadas na região extracelular. Esse processo pode ocorrer por diferentes mecanismos, isso vai depender do tipo de estímulo que o neutrófilo recebe ^{2,26}.

As NETs são classificadas em vitais ou suicidas, significando que podem levar à morte do neutrófilo ou pode haver citoplastos anucleados remanescentes, ainda capazes de realizar fagocitose. NETs também podem ser disparadas por mecanismos dependentes ou independentes de EROs²⁷. Brinkmann et al., 2004 demonstram que a produção de NETs pode ser estimulada por IL-8, e que essa interação não envolve o complexo de NADPH oxidase. Estudos recentes mostraram que a formação de NETs em neutrófilos estimulados por IL-8 ocorre por meio dos receptores CXCR2, sendo considerado um evento precoce da morte celular²⁸. A figura 5 ilustra o processo de liberação das NETs pelos neutrófilos.

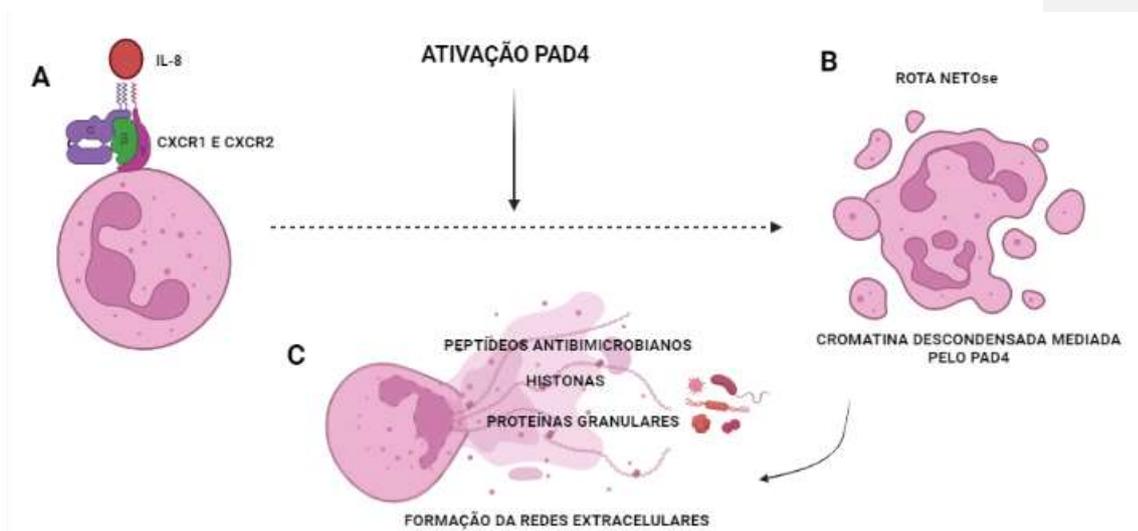


Figura 5. Etapas da formação NETs: A. estímulo por IL-8 induz ativação de PAD4; B. fusão dos lóbulos e descondensação da cromatina; C. formação das redes extracelulares presentes com DNA, histonas e proteases. A produção das NETs por neutrófilos estimulados por IL-8 não necessita da NADPH oxidase.

1.2.2.3 *Fagocitose*

A fagocitose é um dos mecanismos utilizados pelos neutrófilos no controle e combate aos patógenos (Figura 7). Essa resposta ocorre por meio de diferentes processos moleculares, sendo os principais o reconhecimento dos receptores do tipo PAMPs (padrões moleculares associados a patógenos) e o reconhecimento por meio das opsoninas, como sistema complemento, ou da IgG. Esses mecanismos podem ser classificados como interação direta (PAMPs) e interação indireta (IgG e sistema complemento)^{1,29}.

A interação direta pode ocorrer por meio do reconhecimento dos receptores do tipo Toll-like (TLR). Os TLRs apresentam mais de 10 tipos diferentes de receptores, podendo reconhecer diferentes tipos de patógenos. Já a interação indireta vai ocorrer por meio da participação dos receptores do sistema complemento (CR1 e CR3) e/ou dos receptores do tipo FCγRIIa (CD32) e FCγRIIIb (CD16)^{1,29}.

O processo de fagocitose por interação indireta envolve três mecanismos importantes, opsonização, internalização e maturação do fagossomo. A opsonização consiste em envolver os patógenos com opsoninas (anticorpos, C3b ou C5b). As opsoninas envolvendo os patógenos serão reconhecidas pelos receptores mencionados acima. Em seguida, os neutrófilos passam por modificações morfológicas, (modelação do citoesqueleto de actina e lipídios) auxiliando na extensão da membrana e facilitando o processo de engolfamento de partículas invasoras. Logo após o processo de engolfamento, as membranas dos neutrófilos serão fechadas nas extremidades distais, criando assim o fagossomo^{29,30}.

Após serem internalizados, os fagossomos sofrerão maturação pela fusão com endossomos e grânulos. Essa maturação vai apresentar diferentes produtos antimicrobianos, bem como produção de espécies reativas de oxigênio e presença de proteínas Rab GTPases, transferrinas e proteínas associadas ao lisossomo (LAMPs) e entre outras proteínas que são importantes no processo da fagocitose^{1,29}.

Estudos mostraram que o estímulo de neutrófilos por IL-8 afeta o processo de fagocitose. O estudo de Richardson (1995) mostrou que os neutrófilos, quando expostos a microrganismos (conídios de *Aspergillus fumigatus*) e IL-8 aumentam o processo de fagocitose, bem como o número de organismos fagocitados³¹. Além disso, os resultados de proteômica obtidos em nosso estudo e mostrados adiante mostraram proteínas que estão ligadas ao processo de estresse celular na fagocitose, o que é coerente com a hipótese referente à capacidade dos neutrófilos responderem à IL-8 com ativação do complexo NADPH oxidase, podendo auxiliar no processo inflamatório.

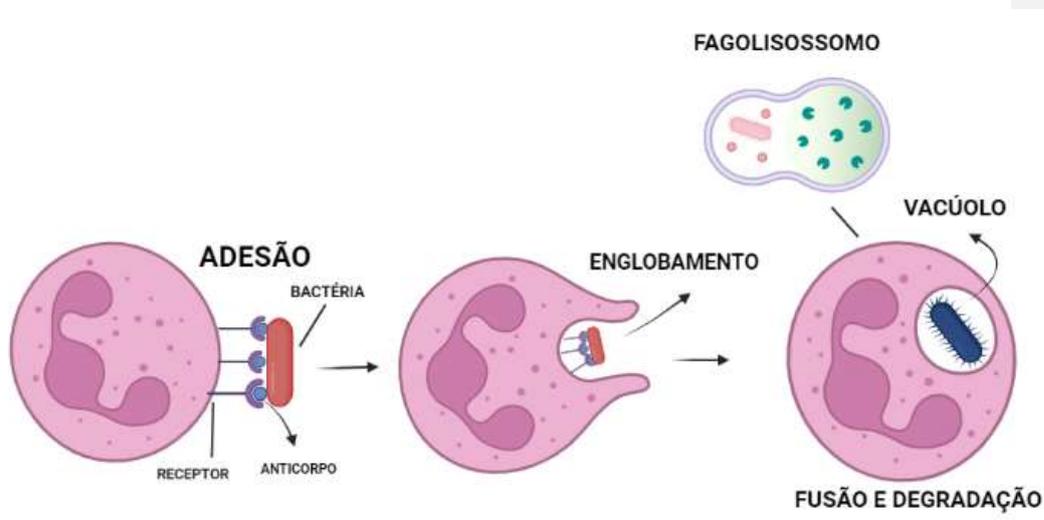


Figura 6 Mecanismos de fagocitose dos neutrófilos

1.2.2.4 Apoptose

Apoptose é uma forma de morte celular programada, importante para a resolução do processo inflamatório agudo. Após o processo de eliminação dos agentes invasores, neutrófilos e seus produtos devem ser retirados do local que estava inflamado, pois a sua permanência pode contribuir para um dano tecidual mais severo, causando uma inflamação mais intensa, ou a transformação em processo crônico^{32,33}.

A apoptose pode utilizar as vias intrínseca ou extrínseca. A via extrínseca depende da ligação de receptores do tipo Fas aos seus ligantes, que fazem parte da família do TNF e seu receptor na membrana da célula. Tal ligação induz uma cascata de sinalização para a ativação de caspase-8 e caspase-3^{32,33}.

Já a via intrínseca é desencadeada por danos intra- ou extracelulares, como hipóxia e danos ao DNA, entre outros. Tais danos desencadeiam vias que levam a alterações no potencial e permeabilidade de membrana mitocondrial, com consequente redução na produção de ATP, geração de EROs e liberação de proteínas mitocondriais para o citosol, como o citocromo C. A presença de citocromo C no citosol leva à ativação, por clivagem, de caspase-9, que ativa caspase-3^{32,33}.

Tanto a via intrínseca quanto a extrínseca chegam à via de execução, por meio da caspase-3. A via de execução vai levar à ativação de proteases e nucleases e consequente

reorganização de proteínas do citoesqueleto e nucleares e degradação do DNA nuclear. As alterações de citoesqueleto culminarão com alterações morfológicas e formação dos corpos apoptóticos^{34,35}.

Estudos mostraram que a exposição de neutrófilos à IL-8 pode levar à supressão da apoptose, por meio da interação com o receptor IL-8RA (CXCR1). Esse episódio ocorre de forma independente do estresse oxidativo. Leuenroth et al., 1998 mostraram que a diminuição da apoptose está relacionada a alterações nas vias Fas e FasL. Dessa forma, levanta-se a hipótese de que a presença de IL-8 não somente recruta neutrófilos, mas também contribui no retardo da apoptose, aumentando a probabilidade de contato do neutrófilo com o patógeno e sua ação antimicrobiana⁷⁸.

1.2.2.5 ***Produção de EROs***

Sabemos que no processo inflamatório, as células imunes, como os neutrófilos, liberam mediadores inflamatórios capazes de controlar a inflamação causada por agentes invasores ou traumas. Dentre tais mediadores, as espécies reativas de oxigênio representam uma maquinaria potente, para combater a infecção, amplificando a inflamação através dos seus mecanismos que serão abordados em tópicos abaixo.²²

1.2.2.5.1 Complexo NADPH oxidase

Este complexo é um sistema enzimático e multicomponente (Figura 7) ativado após o reconhecimento de partículas invasoras ou trauma, e vai ser organizado na membrana plasmática e na membrana de grânulos secundários e vesículas secretórias. Esse sistema apresenta diversas proteínas que, em neutrófilos quiescentes, estão divididas em dois componentes celulares: membranas e citosol. As proteínas que estão presentes nas membranas, são chamadas de p22phox e gp91phox, já as proteínas localizadas no citosol, são a p40phox, p47phox, p67phox e Rac-2²²

A ativação do complexo NADPH oxidase tem início com a fosforilação da proteína p47phox nos resíduos de serina. Em seguida, as regiões ricas em prolina da p47phox vão interagir com a região SH3 localizada na proteína p67phox, colaborando para o aumento da afinidade entre as proteínas p67phox e p22phox. Durante esse processo, ocorre a interação da proteína p40phox com a p67phox por meio das regiões C terminal PX. Enquanto isso, a proteína Rac vai interagir com a proteína p67phox nas regiões N terminal, para auxiliar na estabilização dessa ligação durante ativação do complexo de NADPH oxidase^{22,36}.

Uma vez ativado, esse complexo vai catalisar a produção de ânion superóxido a partir de oxigênio molecular, obtendo elétrons pela conversão de NADPH em NADP^+ , num processo também chamado de explosão respiratória (fig. 7).

O radical superóxido produzido pelo complexo NADPH oxidase será utilizado para a formação de várias espécies reativas de oxigênio. O radical superóxido é um produto oxidante com uma meia vida extremamente curta, que sofre dismutação catalisada pela SOD para peróxido de hidrogênio, que em seguida pode gerar o radical hidroxila através da reação de Fenton. Sabemos que esses produtos oxidantes terão suma importância durante a inflamação, pois atuará na eliminação dos patógenos. A explosão oxidativa, tanto intracelular (em grânulos), quanto extracelular, podem levar aos efeitos descritos acima ²².

A ativação do complexo NADPH oxidase pode ser desencadeada por diferentes sinalizadores¹¹ e gerando radicais livre através de reações espontâneas por enzimas que intermediam essas reações, como por exemplo, a MPO e Fe^{3+} . Essas reações são consideradas curtas, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (ou seja, possui meia-vida curta) podendo assim sofrer o processo de dismutação enzimáticas e sofrendo ação pelo Fe^{3+} e dessa forma, convertendo o peróxido de hidrogênio em outro radical (hidroxila OH^\cdot). Além desse processo, existem outros que envolvem a MPO, que vai converter o peróxido de hidrogênio em ácido hipocloroso (também considerado um potente radical livre). Então, sabemos que esse processo pode ser gerado através de vários ativadores para combater assim a lesão. Segundo Reali et al., 1993, os neutrófilos ativados por IL-8 podem ter a via de NADPH oxidase ativada, possivelmente pelas vias de transdução de sinal que envolvem o metabolismo da PI3K e PKC. Essa ativação é considerada menor em magnitude (quando comparado com outros estímulos, por exemplo fMLP) e possui um tempo diferente (produção significativa começando com uma concentração de 10ng/mL e com máximo de 100 ng/mL) ³⁷. Em contrapartida, Guichard et al., 2005 definem de outra maneira a resposta dos neutrófilos estimulados por IL-8, segundo eles a IL-8 não tem a capacidade de ativar completamente a NADPH oxidase em neutrófilos, mas pode levar a uma fosforilação parcial dos componentes da NADPH oxidase, podendo potencializar essa via quando ocorre um segundo estímulo, por exemplo, fMLP ³⁸. Dessa forma, existe controvérsia acerca desse tema, pois os trabalhos citados utilizaram condições semelhantes. Tal controvérsia será um dos pontos discutidos no decorrer deste trabalho.

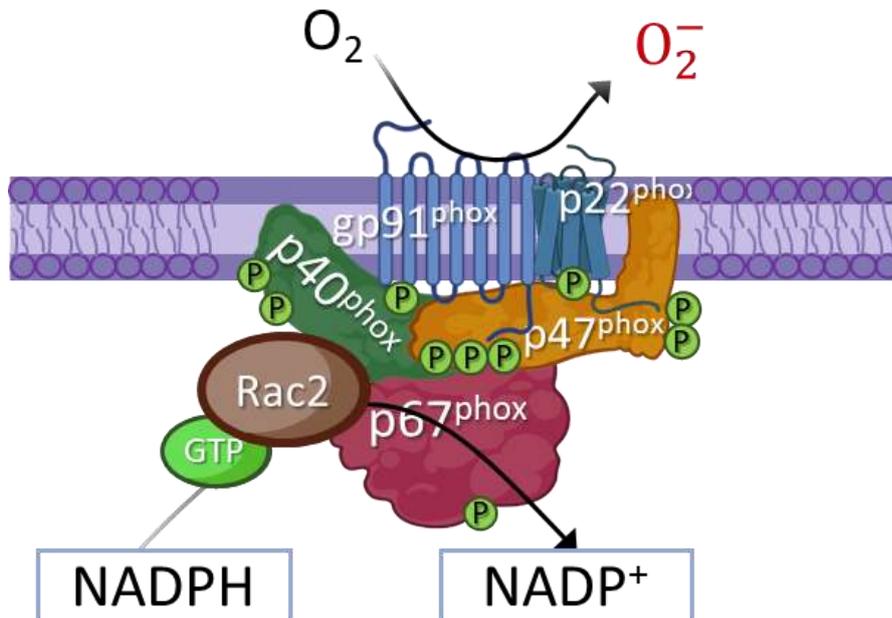


Figura 7. Complexo de NADPH oxidase montado nas membranas dos neutrófilos mostrando interações entre os componentes e sítios de fosforilação envolvidos na ativação do complexo.

1.2.3 Ativadores e receptores

1.2.3.1 Moduladores que ativam neutrófilos

Sabe-se que no processo inflamatório, existem diferentes mediadores pró-inflamatórios e anti-inflamatórios, como por exemplo, IL-8, PAF, TNF- α , IL-10 e LTB4 e também produtos exógenos (que atuam em processos infecciosos), como fMLP e LPS^{11,38-40}.

1.2.3.2 Interleucina-8

Segundo Palomino, há duas famílias de quimiocinas com base no primeiro resíduo de cisteína. As quimiocinas da família CC estão codificadas no cromossomo 17 e apresentam dois resíduos de cisteína adjacentes em sua região N-terminal, já a família CXC possui um resíduo separando as duas primeiras cisteínas e sua codificação está no cromossomo 4^{1,41-43}. A IL-8/CXCL8 é uma citocina quimiotática, traduzida para um produto de 99 aminoácidos, sofre processamento proteolítico pós-traducional, sendo que a forma madura compreende os aminoácidos 23 a 99. A região CXC localiza-se entre os resíduos 33 e 37^{11,38-40}.

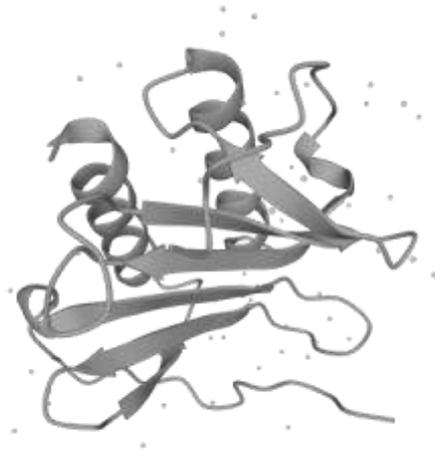


Figura 8. Estrutura tridimensional (3D) da interleucina-8 (UNIPROT, 2021).

A produção dessa molécula ocorre em todas as células nucleadas, porém as principais fontes desse peptídeo são os monócitos e macrófagos. Após a estimulação das células, a IL-8 é secretada ativamente, sendo liberada em formas que variam de 77 a 72 aminoácidos. A presença dos aminoácidos ELR adjacentes à região CXC é essencial para as atividades biológicas da IL-8. Esses aminoácidos são específicos, e podem auxiliar diretamente na ligação da IL-8 aos seus receptores CXCR1 e CXCR2 ^{11,39,40}.

```

      10          20          30          40          50
MTSKLAVALL AAFLISAALC EGAVLPRSAK ELRCQC IKTY SKPFHPKFIK
      60          70          80          90
ELRVIESGPH CANTEIIVKL SDGRELCLDP KENWVQRVVE KFLKRAENS
  
```

Figura 9. Estrutura molecular IL-8 fonte: Uniprot (P10145), acesso em 2022.

A IL-8 também está associada a diferentes doenças, em que é observada a sua super expressão, como psoríase, artrite reumatoide, síndrome da angústia respiratória aguda e etc. ¹¹. Além disso, Palomino cita em seu estudo que foram observados altos níveis de IL-8 após choque séptico ou administração sistêmica de endotoxinas.

O tipo celular com resposta mais intensa à IL-8 são os neutrófilos, pois a interação entre os neutrófilos e IL-8 pode desencadear diferentes atividades de forma intensa, como por exemplo, a quimiotaxia de neutrófilos e entre outras atividades A IL-8, como outras citocinas da família CXC, se liga a receptores acoplados à proteína G, de forma semelhante aos receptores de diversas outras moléculas capazes de ativar neutrófilos³⁹.

1.2.3.3 *Receptores de membrana*

No início do processo inflamatório e em várias etapas intermediárias, os neutrófilos dependem do reconhecimento de sinais para que consigam detectar lesão, localizar patógenos, aderir ao endotélio, migrar adequadamente no tecido, amplificar ou reduzir sua resposta, antecipar ou retardar mecanismos de morte celular. O reconhecimento da maioria desses sinais pelos neutrófilos se dá por meio de diferentes receptores de membrana. Entre eles, podemos encontrar nas membranas dos neutrófilos os receptores acoplados à proteína G (GPCRs). Esses receptores possuem 7 alças transmembranares e reconhecem produtos bacterianos e moléculas quimiotáticas, tais como IL-8 e fMLP. Também existem outros receptores que incluem receptores Fc que estão envolvidos no reconhecimento de diferentes patógenos opsonizados com Ig, receptores de adesão, receptores de citocinas e receptores do sistema imune primário, que vão agir na regulação de várias funções neutrofílicas²³.

Dentre tais receptores destacamos os receptores de quimiocinas que pertencem à família CXC. A interação dos neutrófilos com a IL-8 ocorre por meio dos receptores CXCR1(CD181, IL) e CXCR2 (CD182), que são receptores acoplados a proteína G (heterotriméricos, sensíveis à toxina pertussis, pertencentes) . Sabemos que quando ocorre a ligação com a IL-8, o receptor sofre dissociação, sua estrutura trimérica separa-se da região com sete alças transmembrana e os componentes do trímero também se separam, liberando a unidade G α i e as unidades $\beta\gamma$, que permanecem unidas entre si. A ativação dos receptores pode desencadear principalmente a migração, rearranjo do citoesqueleto, mudanças na concentração de cálcio intracelular, desgranulação, ativação de integrinas e da fosfolipase A2(PLA2)ou fosfolipase C. Os receptores CXCR2 podem participar da produção de EROs^{28,44}

A tabela 4 mostra algumas proteínas de membrana

Tabela 4 Proteínas de membrana dos neutrófilos

PROTEÍNAS DE MEMBRANA
SCAMP

CD11b/CD18
CR1
Vamp-2
fMLP-R
CD13
CD14
NRCAMP-1
uPa-R
Citocromo b558

1.2.3.4 *Ativação dos Neutrófilos por IL-8*

A ligação de IL-8 aos receptores CXCR1 e CXCR2 em neutrófilos gera uma dissociação da proteína G, de forma que a subunidade α inibe adenilato ciclase, diminuindo a concentração de AMP cíclico, cujas consequências em neutrófilos ainda não são claras na literatura ¹¹. As subunidades $\beta\gamma$ estão associadas com a subsequente ativação da fosfolipase C ¹⁰, que cliva fosfatidil inositol bifosfato (PIP2) em diacilglicerol (DAG) e inositol trifosfato (IP3), que por sua vez, vai resultar no processo de mobilização do cálcio intracelular e, na ativação da calmodulina. O DAG, outro metabólito gerado pela ação da fosfolipase A2, ativa a via PKC, que é um regulador central de várias funções dos neutrófilos, como ativação da cascata de MAP cinases, remodelamento do citoesqueleto, ativação de integrinas e retroalimentação positiva da própria via da PI3K ^{10,38-40}.

Como consequência, essas vias acarretam diferentes atividades, como por exemplo, Mac-1, que vai estimular no processo de adesão dos neutrófilos ao fibrinogênio ou ao endotélio; ativação das proteínas cinases ativadas por mitogênicos (MAPK) e fosfatidilinositol-3 cinase (PI3K) participam nas sinalizações que ocorrem de dentro para fora da célula e ativação do transportador de íons específicos NHE1, que pode auxiliar no processo de alcalinização intracelular dos neutrófilos ⁴⁵. A figura 10 ilustra a cascata de ativação das vias utilizadas pelos neutrófilos quando ativados por IL-8.

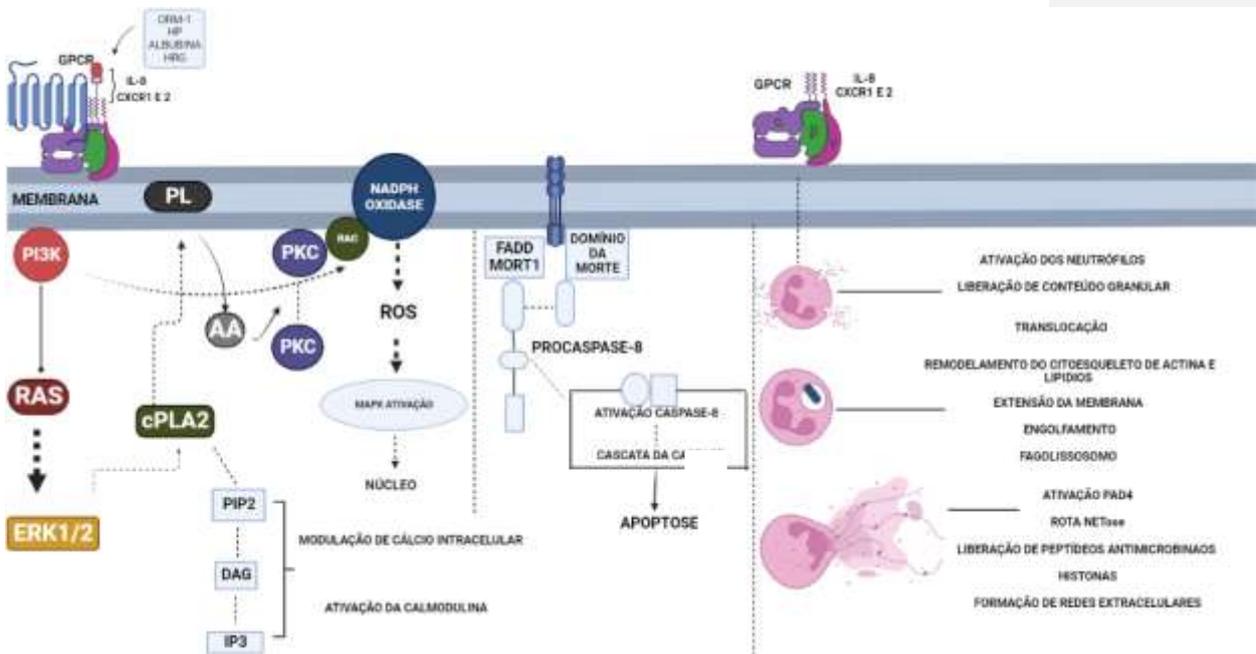


Figura 10. Mecanismo de ativação dos neutrófilos estimulados por IL-8

2. **Justificativa:**

A IL-8 tem grande afinidade por neutrófilos e pode desencadear diversas ações após essa interação. Dentre tais interações, estudos mais recentes demonstraram que a IL-8 pode estar envolvida na falha de sinalização dos neutrófilos, observada em patologias como a síndrome da angústia respiratória aguda (SARA), artrite reumatoide e psoríase.

A existência de controvérsia acerca da ativação do complexo NADPH oxidase em neutrófilos expostos à IL-8 e pontos ainda não esclarecidos na literatura, como possíveis diferenças nos mecanismos desencadeados por CXCR1 e CXCR2, ou o papel da adenilato cinase, que é inibida quando a subunidade Gai é liberada, ou mesmo as consequências da liberação de B-arrestina motivam um estudo molecular mais detalhado, que possa fornecer informações sobre proteínas cujas abundâncias estão alteradas em função do estímulo de neutrófilos por IL-8.

Desse modo, o intuito deste trabalho é descrever os efeitos da IL-8 na produção de EROs por neutrófilos, por meio de testes funcionais (como citometria, NBT e EPR), para evidenciar a capacidade de ativação dos neutrófilos, bem como detalhar os mecanismos moleculares desencadeados pela IL-8 em neutrófilos por meio de uma análise proteômica comparativa.

O presente trabalho contribui para a melhor compreensão da regulação da ativação dos neutrófilos pela IL-8, além de revelar possíveis alvos diagnósticos e terapêuticos para as condições associadas a falhas em tal regulação, pois as proteínas avaliadas podem vir a ser caracterizadas como marcadores moleculares diagnósticos em diferentes respostas, como as doenças inflamatórias sistêmicas, pós-trauma e doenças autoimunes.

3. **Objetivos:**

2.1 **Objetivo geral**

Avaliar a ativação dos neutrófilos mediada pela IL-8 e verificar possíveis alterações dos mecanismos efetores e moleculares, comparando as alterações com neutrófilos quiescentes.

2.2 **Objetivos específicos:**

- Analisar a produção de EROs após ativação dos neutrófilos pela IL-8, por meio de diferentes testes, para avaliação qualitativa da distribuição de EROs intracelular e quantitativa, por ressonância paramagnética eletrônica (EPR).
- Expandir as informações sobre mecanismos moleculares de neutrófilos que sofrem influência da IL-8 por meio da análise proteômica comparativa.

4. **Materiais e métodos**

2.3 Delineamento experimental

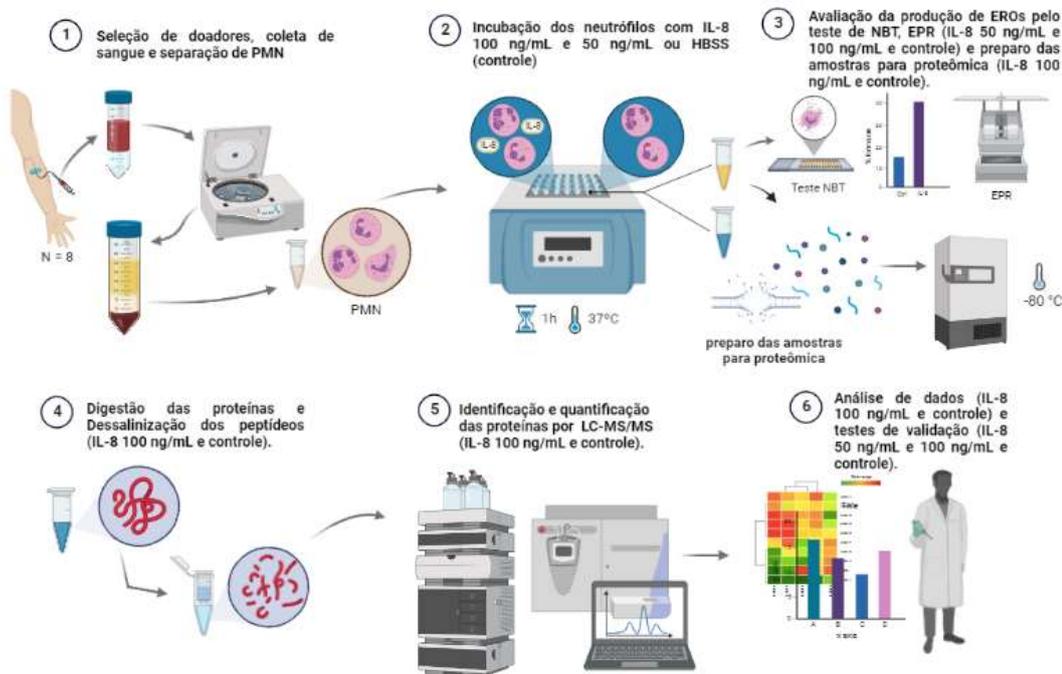


Figura 11 Fluxograma da metodologia.

2.4 Separação de Polimorfonucleares

Foi coletado sangue periférico de 8 doadores, utilizando seringas esterilizadas contendo heparina. Os doadores não apresentavam histórico de doenças crônicas, doenças inflamatórias e também não estavam em uso de medicamentos. Todos os participantes voluntários assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TLCE), aprovado pelo comitê de ética (processo 13364819.0.0000.5558). Os PMNs foram isolados por meio de centrifugação sobre gradiente descontínuo de Percoll nas concentrações de 60% e 70%, em solução de salina de Hanks (HBSS), a partir de 12 mL de sangue. Após a centrifugação, os PMNs ficaram acima dos eritrócitos, formando assim uma nuvem esbranquiçada.

Os PMNs foram retirados do gradiente e lavados por duas vezes em HBSS, para retirar o excesso de Percoll. As Eventuais hemácias residuais foram removidas por lise hipotônica com água mili-Q (25 seg) e restauração da osmolaridade com HBSS 2X gelado⁴⁶.

2.5 Contagens de lâminas e morfologia

Os PMNS isolados foram corados com azul de tripan (45 microlitros de tripan e 5 microlitros de células) e contados em câmara de Neubauer, visando verificar o rendimento, como também a viabilidade celular. A verificação da morfologia e pureza foi utilizada para constatar a presença de neutrófilos e não de outros tipos celulares. Foram adicionados 2 microlitros de células em triplicata na lâmina e o material foi centrifugado por 10 min a 800RPM. A lâmina foi corada pelo método Panótico e a leitura foi realizada em microscópio óptico, na objetiva de 100x.

2.6 Ativação celular

Amostras contendo >97% neutrófilos, >96% viáveis foram ressuspensas em solução de plasma autólogo diluído a 50% em HBSS com Ca^{2+} e Mg^{2+} de forma a se obter a concentração final de 6600 células/ul divididas em alíquotas (neutrófilos quiescentes e neutrófilos expostos à IL-8 nas concentrações de 50 ou 100 ng/mL. As amostras foram incubadas durante um total de 60 minutos a 37 °C sob agitação suave.

2.7 Testes de NBT para avaliação qualitativa e quantificação relativa da produção de EROs

Após os primeiros 40 minutos de ativação, foram retirados 36 microlitros de células de cada alíquota e adicionados em uma placa de 96 poços com uma solução de NBT de forma a se obter a concentração final de 1.79 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de NBT. A partir desta solução, foram retirados 6 microlitros de cada alíquota e repassadas para uma lâmina, cada alíquota distribuída em 3 regiões na mesma lâmina, com 2 μL cada região. Os tubos, as placas e as lâminas foram incubadas durante mais de 20 min a 37° C sob agitação suave, totalizando 60 minutos de ativação.

As lâminas foram fixadas com metanol durante 1 minuto e coradas com safranina durante 5 minutos. Logo após, as lâminas foram lavadas pelo lado inverso e colocadas para secar em temperatura ambiente, sendo posteriormente analisadas por microscopia óptica. As alíquotas com NBT presentes na placa de 96 poços, foram analisadas no espectrofotômetro Spectramax (Soft Pro 6.3), em uma faixa de absorvância de 350 a 790 nm com intervalos de 10 nanômetros^{1,4}.

2.8 Ressonância Paramagnética Eletrônica (EPR)

A técnica de EPR consiste na análise por espectroscopia, permitindo detectar os radicais livres em diferentes amostras biológicas. Essa técnica é muito sensível, podendo identificar os radicais em pequenas concentrações e avaliar sua cinética de produção.

Essa análise ocorre por meio do processo de absorção da radiação eletromagnética, identificando micro-ondas por meio dos elétrons desemparelhados presentes nas amostras avaliadas. A interação entre as micro-ondas e os elétrons desemparelhados cria uma frequência específica que será definida pelo tipo de reativo que foi detectado na amostra ⁴⁷.

Esse processo vai colaborar para a transição que ocorre entre o momento paralelo ao campo magnético para uma posição antiparalela. Após a transição, o sistema criado, vai absorver energia do campo magnético, criando uma derivada (taxa de variação instantânea do campo magnético em relação à absorção) que é detectada. Para avaliação dos radicais presentes nos neutrófilos, foi utilizado CMH (1-Hydroxy-3-methoxycarbonyl-2, 2, 5,5-tetramethylpyrrodine), que permite a detecção dos radicais livres transitórios, prolongando o tempo de vida desses radicais. O CMH vai reagir com o superóxido e produzir CMH-nitróxido, o qual é detectado pelo equipamento, e apresenta maior estabilidade que o radical superóxido ⁴⁷.

As amostras foram analisadas uma por vez, devido às limitações do equipamento. Como todas as condições de uma mesma replicata foram preparadas num mesmo experimento de isolamento de células (para evitar variações experimentais na etapa de isolamento), foi necessário deduzir a variação do tempo entre cada amostra avaliada, antes da leitura. Dessa forma, para realizar a leitura, eram adicionados 200 mmol/L da sonda CMH aos neutrófilos (2×10^7 células) da primeira condição a ser analisada, e realizada uma leitura por 5 minutos, para identificar a produção basal de radicais livres presentes nas amostras. Em seguida, era adicionado o ativador (IL-8 50ng/mL, IL-8 100 ng/mL, TNF-alfa ou HBSS-Quiescente) e realizada mais uma leitura por 60 minutos no espectrômetro Bruker (BrukerEMX plus, Germany), feitas em um Q (fator que determina a qualidade da cavidade estoque da energia das micro-ondas) de 1100 ⁴⁸. A seguir, o procedimento era repetido para cada uma das demais condições dessa mesma replicata biológica. Dessa forma, a leitura inicial de 5 minutos pode ser utilizada como fator de normalização para o valor inicial de produção de EROs, compensando o tempo de espera de cada amostra.

Para comparar a evolução temporal da produção de superóxido gerado entre os neutrófilos quiescentes e neutrófilos expostos à IL-8, foi adotado o modelo de Gompertz. Esse modelo permite definir parâmetros de cinética, tais como a taxa de crescimento de funções sigmóides, conforme a equação $y = a \cdot e^{-e^{-k(x-c)}}$. Nesta equação, "x" representa o tempo, "y"

representa a produção de radical superóxido, “a” representa a produção máxima de radical superóxido, “e” representa a constante de Euler, “k” representa a taxa de produção e “c” representa o tempo de inflexão da curva ⁴⁹. O ajuste das curvas foi feito com base em múltiplas iterações utilizando-se o software SciDavis ⁵⁰. Os pontos de inflexão e a integral no intervalo de 0 a 60 min das curvas foram calculados e foram realizados testes estatísticos (avaliação de normalidade e testes ANOVA e t de student) para avaliar a significância das diferenças entre os parâmetros do modelo de Gompertz ⁵⁰.

2.9 Proteômica

A proteômica é um método microanalítico utilizado para analisar de forma quantitativa e qualitativa as proteínas que estão presentes em amostras. Esse método pode utilizar diferentes ferramentas de análise, sendo a espectrometria de massa a mais frequente. A espectrometria de massa vai criar íons de compostos orgânicos, que serão analisados a partir da sua relação massa/carga (m/z). A detecção de m/z e respectivas intensidades para cada componente iônico permitirão a análise quantitativa; e qualitativa ⁵¹

Dentre as diversas abordagens de proteômica baseada em espectrometria de massa, foi utilizado, a proteômica label-free, em que as amostras foram analisadas sem marcações, o que simplifica seu preparo ⁵². Desse modo, essa *técnica* vai avaliar o conjunto de proteínas de uma amostra que foi submetida à digestão e dessalinização antes da análise por espectrometria de massa. Os peptídeos obtidos foram parcialmente separados por cromatografia, injetados e analisados pelo espectrômetro de massa (orbitrap elite, por exemplo). Esse equipamento foi capaz de detectar m/z dos peptídeos, em alta resolução (determinando sua massa molecular), como também pode fragmentar tais peptídeos, determinando os espectros dos fragmentos, chamados de MS2 (ou MS/MS). Os dados coletados, avaliados por software de bioinformática, permitem a identificação das proteínas presentes na amostra e a quantificação relativa entre condições ^{1,4}.

2.9.1 Lise celular

As alíquotas contendo as células sem NBT foram centrifugadas durante 5 minutos a 1600 RPM a 4°C. Após a centrifugação, o sobrenadante das alíquotas foi coletado, e foram adicionados 200 microlitros do tampão de lise (TEAB 20 mmol/L, inibidores de protease e fosfatase 2%, DTT 0,1 mol/L e SDS 2%) e armazenado a -80 °C para estudos posteriores. Já as amostras com as células foram lavadas e centrifugadas por duas vezes com 1000 microlitros de HBSS gelado para remoção de proteínas plasmáticas. Posteriormente foram adicionados 200 microlitros de tampão de lise e incubadas (Thermomixer) durante 10 min a

80°C com rotação de 1.000 rpm e, por fim, lisadas por cavitação com sonda de ultrassom (50% de potência, 5 ciclos de 15 s com intervalos de 30 s) e armazenadas no freezer -80°C para análise posterior.

2.9.2 Digestão

Após a lise das células, as amostras foram centrifugadas e o sobrenadante foi recolhido. Para quantificação das proteínas, foram retirados 10 µL de cada alíquota, diluídos em uma proporção de 1:50 em 450 µL de água milli-q. 5µL das amostras diluídas foram acrescentadas à solução do reagente do próprio Qubit (Qubit *working solution*). Logo após a solução foi aplicada no sistema Qubit (Thermo Fisher Scientific) para quantificação das proteínas, determinando o volume que contém 100 ug de proteínas.

Após a quantificação, as amostras contendo 100 ug de proteínas foram diluídas em 200 µL de ureia, em seguida foram adicionadas em um filtro (Vivaspin, poro de 30 KDa) e centrifugadas durante 15 minutos a 10000 x g. Essa etapa é repetida três vezes para remover o detergente dodecil sulfato de sódio (SDS), que é incompatível com a digestão por tripsina.

Após a retirada do SDS, foi realizada a alquilação de cisteínas livres (que já haviam sido reduzidas por DTT 0,1 M no tampão de lise) com 100 µL da solução de Iodacetamida (IAA) 50 mM, aplicados no filtro e posteriormente incubados no Thermomixer durante 20 minutos em uma temperatura de 21°C e sem agitação e sem exposição à luz. Após a incubação, as amostras foram centrifugadas e lavadas. Após este processo, o tampão foi novamente substituído, desta vez por 100 µL de TEAB 0,02 passando por novas centrifugações. Após as centrifugações foi descartado o solvente filtrado e adicionados 60 µL de tripsina 0.02 µg/µL. Essas amostras ficaram incubadas com tripsina durante 9h a 37°C.

Após a incubação de 9h, foi adicionada água milli-Q no filtro e centrifugado durante 1 minuto. Foi acrescentado após a centrifugação TFA 20%, para assim parar a reação da tripsina. Em seguida, as amostras foram desidratadas no Speed-Vac e preparadas para o processo de dessalinização.

2.9.3 Dessalinização:

Para dessalinização das amostras, foram utilizadas ponteiras empacotadas com camadas de discos Empore C8 e C18 e resina poros R2, formando micro-colunas. Cada amostra foi condicionada em 50 µL de ácido fórmico a 0,1% e foram adicionados nas colunas preparadas nas ponteiras empacotadas. Essas amostras passaram por centrifugação de 14 min a 900g. Em seguida, houve três lavagens das amostras com 200 µL de TFA 0,1% e centrifugações.

Logo após, as amostras foram eluídas 2 vezes com 80 µL com acetonitrila (ACN) 90% e TFA 0,1% e foram centrifugadas novamente por 2min a 600g, 21 °C. Em seguida, as amostras foram secadas em SpeedVac, ressuspensas com 50 µL de ácido fórmico 0,1% e novamente quantificadas pelo Qubit, agora em nível de peptídeos.

As amostras avaliadas tiveram a concentração ajustada para 3µg/6µL em ácido fórmico 0,1% e aplicadas 50 µL de cada amostra na placa de 96 poços. Essa placa foi guardada em -80 °C para posteriormente serem aplicadas no sistema de cromatografia acoplado à espectrometria de massa.

2.9.4 Cromatografia e espectrometria de massa

Após o processo digestão e dessalinização, os extratos contendo os peptídeos foram aplicados em um cromatógrafo de fase reversa (DionexUPLC3000), composto por coluna de concentração (2 cm x 100µm) contendo partículas de C18 (5µm) acoplada a uma coluna analítica (25 cm x 75 µm) contendo partículas de C18 (3 µm). Foram utilizados dois tipos de solventes (A e B). O solvente A foi composto por ácido fórmico 0,1% em água, já o solvente B foi composto por ácido fórmico 0,1 % em ACN.

Foram realizadas injeções de forma automática de 2µg de cada amostra, sob fluxo de 230 nL/min seguidas por gradiente de concentração de 10% a 35% ao longo de 150 min. As frações foram eluídas da coluna diretamente na câmara de ionização do espectrômetro de massa (Orbitrap Elite). Os produtos eluídos foram ionizados por eletropulverização e acelerados em um campo eletromagnético e, em seguida, analisados por um sistema orbital de frequências, para determinar as massas moleculares em alta resolução.

A faixa de leitura de m/z utilizada foi de 300 a 1650, com resolução definida para 120000. Foi realizada fragmentação em modo de análise dependente de dados (DDA) dos 15 componentes mais intensos, por fragmentação com a colisão de um gás inerte (CID). Depois desse processo, os fragmentos foram analisados por um mecanismo de armadilha de íons, que faz a captação de dados para o sequenciamento.

2.9.5 Bioinformática

Os dados obtidos por LC-MS/MS foram analisados com auxílio dos programas (Peaks e Progenesis) de bioinformática, para identificar e quantificar as proteínas detectadas e sua reprodutibilidade. Foram utilizados outros programas de bioinformática para avaliar as vias utilizadas pelas proteínas e interação entre as proteínas (BlastKoala, String, Reactome, Panther)^{53,54}.

2.10 Estatística

Os dados referentes à contagem de células foram avaliados como médias e erro padrão da média. A normalidade das distribuições foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk e a homogeneidade de variâncias pelo teste de Levene. Como as medidas mostraram distribuição normal e homoscedástica (variâncias homogêneas), as diferenças entre pares de condições foram avaliadas pelo teste T de student e as diferenças entre conjuntos de 3 condições foram avaliadas pelo teste de análise de variância (ANOVA) de uma via. Foi utilizado o p-valor ($p < 0,01$ e $p < 0,05$) para indicar a diferença significativa entre os grupos avaliados⁸⁰.

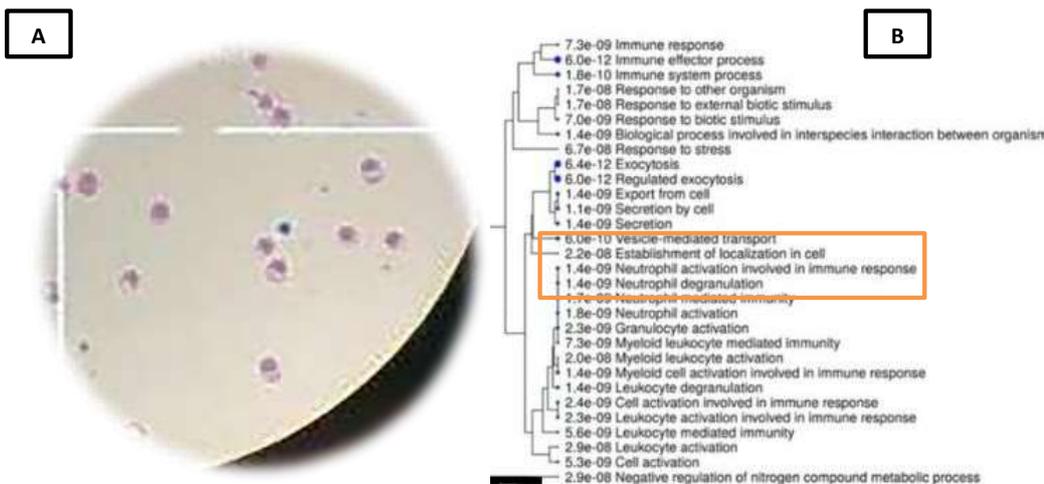
2.11 Figuras

As figuras ilustradas neste trabalho foram feitas utilizando o programa Biorender.

5. Resultados e Discussão

4.1 Rendimento, Pureza, Viabilidade e Ativação dos Neutrófilos:

Foram obtidas em média $1,70E+10^6$ células por replicata, com pureza média de 96,6 % de neutrófilos, viabilidade média de 98 %. Esses parâmetros foram observados por microscopia óptica, como mostrado na figura 12A e 12C. A ativação dos neutrófilos por IL-8 também foi confirmada em uma avaliação geral do perfil proteômico, por meio da análise por ShinyGo. A figura 12B demonstra os dados avaliados.



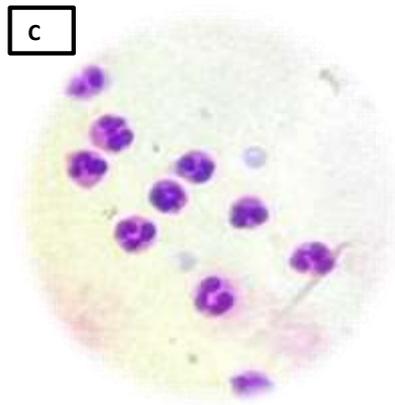


Figura 12. Avaliação morfológica dos neutrófilos a-) Contagem de neutrófilos vivos e mortos. b-) Dados de proteômica analisados pela plataforma ShinyGO, coerentes com a ativação por IL-8. c-) Avaliação da lâmina de pureza através da microscopia, confirmando neutrófilos

4.2 Análise da Produção de Espécies Reativas de Oxigênio por Neutrófilos

Para avaliar a liberação de espécies reativas de oxigênio, foram utilizadas diferentes ferramentas, como o teste de NBT, e ressonância paramagnética eletrônica (EPR). Esses métodos foram combinados, por fornecerem informações complementares, com o objetivo de esclarecer a controvérsia encontrada na literatura. O teste de NBT permite avaliar a produção de formazan (composto insolúvel em água e apresenta uma coloração azul) produzido a partir do azul de nitrotetrazólio (NBT) ao reagir com radical superóxido. O acúmulo de cristais de formazan pode ser observado por microscopia óptica, fornecendo informações sobre sua distribuição e intensidade nas células e fora delas, bem como a contagem de células contendo cristais. Uma quantificação relativa foi obtida por lise celular seguida de solubilização dos cristais e leitura em espectrofotômetro. Já uma quantificação mais exata da produção de radicais superóxido, com avaliação ao longo do tempo, foi proporcionada por EPR. A produção de espécies reativas de oxigênio por neutrófilos expostos à IL-8 na concentração de 50 ng/mL não foi detectável como significativamente maior que o controle, quando avaliada pela técnica de NBT, em contrapartida a técnica de EPR mostrou um resultado diferente, pois a produção das espécies reativas de oxigênio foi maior nos neutrófilos expostos à IL-8 na concentração de 50 ng/mL quando comparado ao controle. Já os neutrófilos ativados por IL-8 em uma concentração de 100 ng/mL foram capazes de produzir significativamente mais EROs comparados ao controle nas duas técnicas utilizadas.

4.2.1 Análise qualitativa por microscopia óptica

A observação por microscopia óptica das células incubadas com NBT foi capaz de identificar a presença de depósitos de formazan de uma forma expressiva próximo à membrana celular em neutrófilos expostos à IL-8 na concentração de 100 ng/mL (Figura 13C), sendo observada uma produção de EROs, em média, em 30,06% do total dos neutrófilos. Já os neutrófilos quiescentes apresentaram um perfil diferente, com uma produção de EROs pouco intensa, próxima ao núcleo da célula (Figura 13A), apresentando uma produção de espécies reativas de oxigênio, em média, por 12,73% dos PMN'S. A diferença entre o grupo controle e o grupo IL8-100 foi significativa ($p < 0.01$). Os neutrófilos que foram expostos à IL-8 em uma concentração de 50 ng/mL (Figura 13B) também foram comparados com os neutrófilos quiescentes e não apresentaram diferenças significativas na produção de espécies reativas de oxigênio.

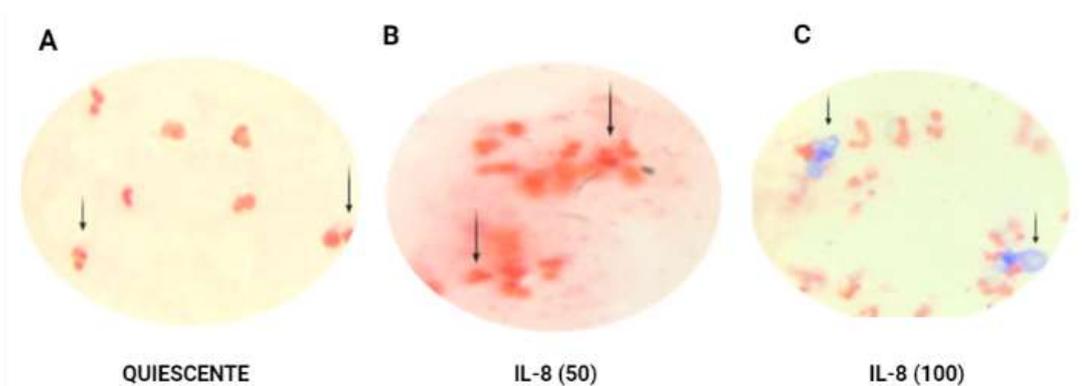


Figura 13 Imagens de microscopia óptica de neutrófilos submetidos ao teste do NBT. (a) quiescente ng/mL. (b) IL-8 50 (c) NBT IL-8 100 ng/mL. Aumento: 400x, coloração: Safranina. As setas apontam a diferença dos neutrófilos com produção de cristais de formazan de forma intensa (fig C) e neutrófilos que não produzem cristais de formazan de forma intensa ou não produzem, respectivamente (Fig A e Fig B).

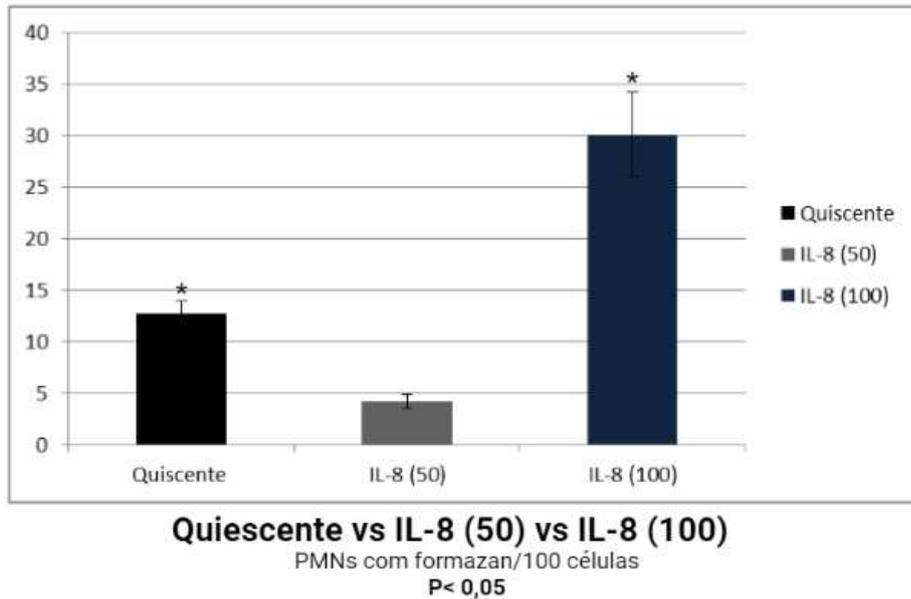


Figura 14. Contagem média de neutrófilos ativados (contendo cristais de formazan) avaliados por microscopia óptica nas condições (preto) neutrófilos quiescentes; (cinza) neutrófilos expostos a IL-8 (50); (azul escuro) neutrófilos expostos a IL-8 (100). As barras de erro indicam o erro padrão da média. O * indica a diferença significativa ($p < 0.05$) entre o grupo quiescente vs grupo exposto a IL-8 100 ng/mL.

4.2.2 Análise quantitativa relativa por espectrofotometria

A quantificação relativa de formazan por espectrofotometria comparando as duas concentrações de IL-8 (50ng/mL e 100ng/mL) aos neutrófilos quiescentes confirmou o resultado observado na análise qualitativa. Os resultados apresentados na figura 15 demonstram que as faixas de absorvância apresentaram diferenças significativas entre o grupo quiescente e o grupo exposto a IL-8 100 ng/mL estão compreendidas entre os seguintes comprimentos de onda: 360 nm a 510 nm; 570 nm a 630 nm; 650 nm a 720 nm ($p < 0.05$). Já o grupo exposto à IL-8 em uma concentração de 50 ng/mL comparado ao grupo quiescente, não apresentou nenhum valor com diferença significativa na faixa de leitura entre 350 e 790 nm.

Apesar de possíveis problemas inerentes ao método, como lise celular incompleta, sequestro de formazan por ácidos nucleicos e proteínas, ou solubilização incompleta do formazan⁵⁵ a diferença significativa observada entre o grupo controle e o grupo IL-8 100 ng/mL compreende o comprimento de onda de 570 nm, frequentemente referido na literatura como o máximo de absorção do formazan⁵⁵.

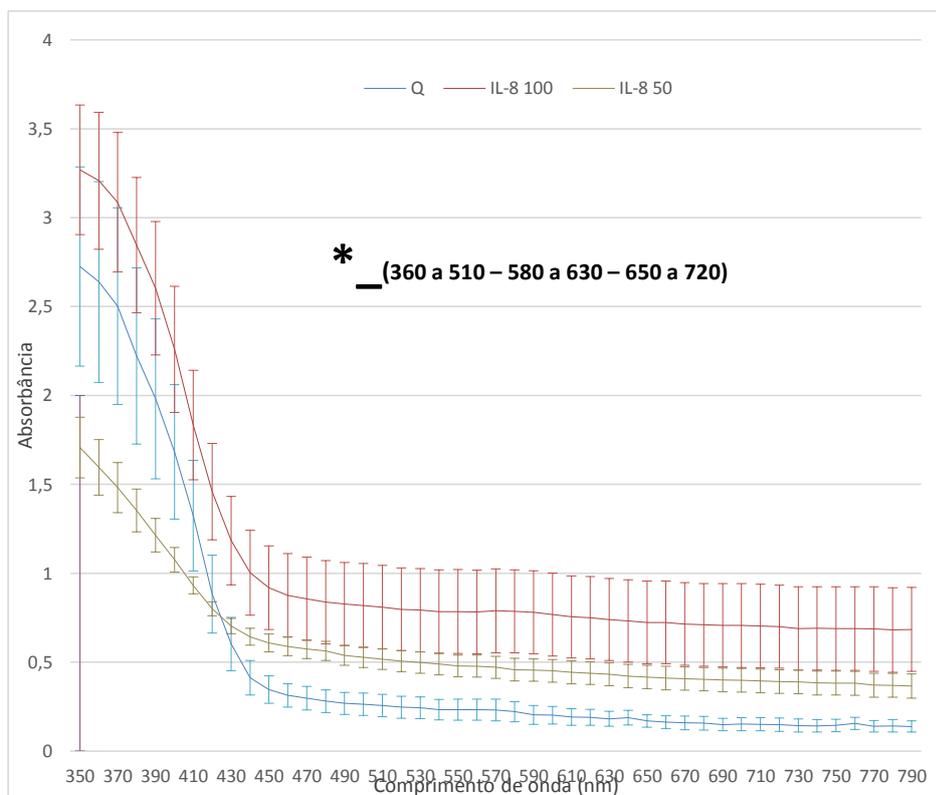


Figura 15 Teste de NBT espectrofotométrico. O traçado roxo indica células ativadas por IL-8 (100 ng/mL) e o traçado azul indica células quiescentes. O asterisco indica os comprimentos de onda que apresentaram diferenças significativas entre os grupos ($P < 0.05$). As barras de erro indicam o erro padrão da média.

4.2.3 Análise por EPR

A análise por EPR foi capaz de avaliar a produção de espécies reativas de oxigênio de forma quantitativa e em tempo real comparando a produção de EROs produzidos por neutrófilos quiescentes e neutrófilos expostos a IL-8 com diferentes concentrações. A EPR é uma análise cinética que, ajustada pelo modelo de Gompertz, mostrou que ocorreu um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio dos neutrófilos após estímulo por IL-8. Essa ativação é dependente do tempo, conforme os parâmetros de ascendência da curva. Em nosso estudo, observamos que o início da produção de EROs ocorreu nos primeiros minutos da ativação.

Sabemos que a cinética dos momentos iniciais cursa com produção menos intensa de EROs, o que é uma característica de produção de espécies reativas de oxigênio intracelular pois, segundo Reali (1995), a produção de EROs desencadeada pela IL-8 é dose-dependente e só é detectada após um período de incubação, considerado mais longo (> 15 minutos),

sugerindo que a IL-8 possa induzir apenas o estágio posterior, ou seja após a montagem do complexo de NADPH oxidase, demora-se mais para ocorrer o processo para a produção de EROs. Estudos mostram que pode existir uma produção de ROS mediada por diferentes sistemas de transdução de sinal que pode induzir uma produção bifásica de ânion superóxido (uma fase inicial rápida, cerca de 3min ou menos e uma fase sustentada, com duração maior que 40min) ³⁷. A fase inicial está predominantemente associada à produção intracelular de ROS (em grânulos), enquanto a fase sustentada inclui a produção extracelular e desgranulação. A partir desses dados, foi definido o marcador utilizado neste trabalho, uma vez que o CMH é capaz de detectar de forma mais precisa EROs intracelular, pois ele tem uma característica lipofílica ⁴⁸.

Com base nas informações obtidas neste estudo, conseguimos perceber que os resultados de EPR observados apresentaram dados diferentes dos descritos por Reali, pois ela, em seu estudo sugere que a produção de ânion superóxido tem início após 15 minutos de ativação, em neutrófilos estimulados por IL-8. Além disso, ela mostrou que a ativação por IL-8 em neutrófilos é menos potente quando comparada a outros estímulos, como por exemplo fMLP. Possivelmente a ativação menos intensa da produção de EROs em neutrófilos estimulados por IL-8, comparada ao fMLP, seja devido a proteínas com características imunomoduladoras, ou inibitórias de espécies reativas de oxigênio, como será discutido adiante em função dos achados de proteômica, mas são necessários estudos mais profundos para avaliar tal hipótese. Em nosso estudo, a exposição ao TNF-alfa, usado como controle positivo, mostrou alta variabilidade entre replicatas, impossibilitando a diferenciação dos resultados em relação ao grupo IL-8 50, porém significativamente diferente das três outras condições em todos os pontos da curva ($p < 0,05$) (Figura 16). Já os parâmetros do modelo de Gompertz apresentaram diferenças significativas entre as condições, o que foi importante para compreender melhor como pode ocorrer a cinética da produção de EROs em neutrófilos ativados por IL-8. A produção momentânea máxima de EROs, apresentou diferença significativa ($p < 0,01$) entre todas as condições, ou seja, conseguimos avaliar com este parâmetro, a produção momentânea máxima de EROs que os neutrófilos conseguem atingir. Ao avaliar os grupos, verificamos que a produção máxima de EROs foi maior em neutrófilos expostos a IL-8 (100) do que às demais condições avaliadas. Percebemos que a produção de EROs por neutrófilos estimulados por IL-8 (100) foi maior do que em neutrófilos quiescentes, estimulados por TNF e neutrófilos estimulados por IL-8 (50). Já a produção total de EROs, calculada integrando-se a área sob a curva no período de 0 a 60 minutos, apresentou um perfil similar, com diferenças significativas entre todos os grupos, exceto entre IL-8 50 e TNF. Com

base nesses resultados, sugerimos a hipótese que a produção momentânea máxima de EROs por neutrófilos estimulados por IL-8 seja dose-dependente.

Já a taxa de crescimento da produção EROs não apresentou nenhuma diferença significativa entre as condições avaliadas. Dessa forma, provavelmente não ocorreu uma mudança notável na aceleração da produção de EROs. A diferença na produção máxima se manifesta, portanto, em tempos diferentes.

O tempo de inflexão da curva, verificamos uma diferença significativa ($p < 0,05$) entre neutrófilos controle e neutrófilos expostos a IL-8 50 ng/mL. Os resultados apresentados mostraram que houve um aumento no tempo de inflexão da curva no grupo IL-8 50 e este parâmetro estaria relacionado ao início da produção de EROs. Ou seja, a IL-8 (50) vai apresentar uma maior persistência de produção acelerada (isto é, a curva de produção demora mais para mudar de ascendente para estável) comparado aos neutrófilos controle. Esses resultados confirmam os estudos de Reali (1995), que mostram uma ativação mais demorada comparada a outros estímulos, como por exemplo, fMLP. Porém os presentes resultados ainda não permitiram definir qual o mecanismo utilizado para ter uma produção de EROs mais lenta.

Quanto ao início da produção de EROs em neutrófilos estimulados por IL-8, o método utilizado neste estudo é considerado mais sensível para detectar a produção de espécies reativas de oxigênio quando comparado ao método utilizado por Reali ³⁷, que utilizou o método de espectrofotometria para detecção da redução de ferrocitocromo c, possivelmente explicando a detecção em momentos mais precoces no presente estudo.

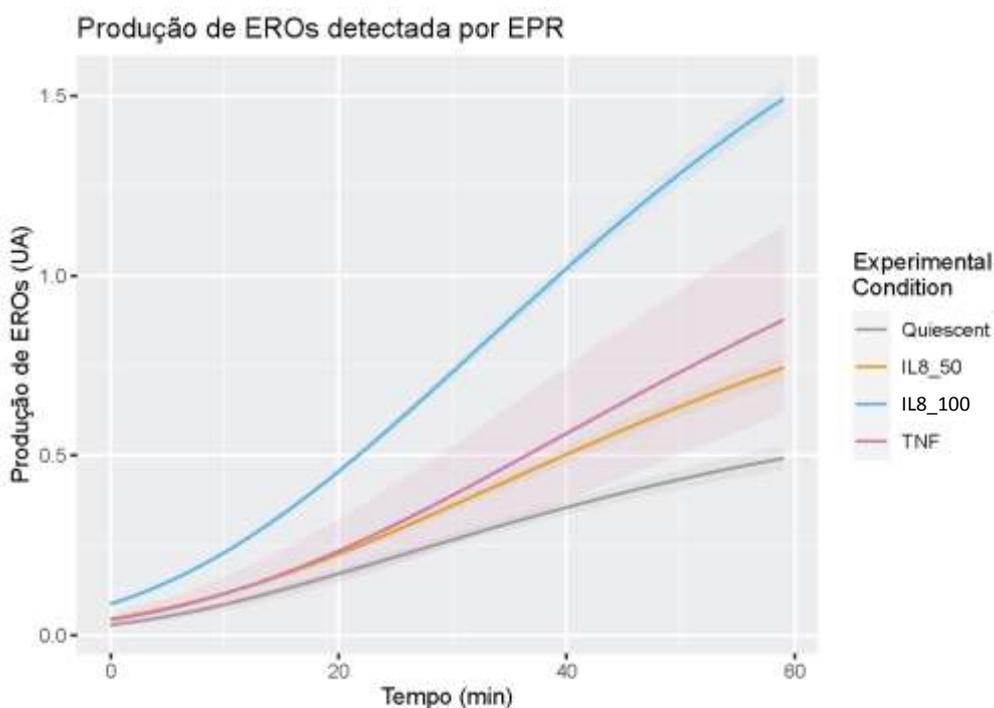


Figura 16. Avaliação da cinética de produção de EROs por EPR

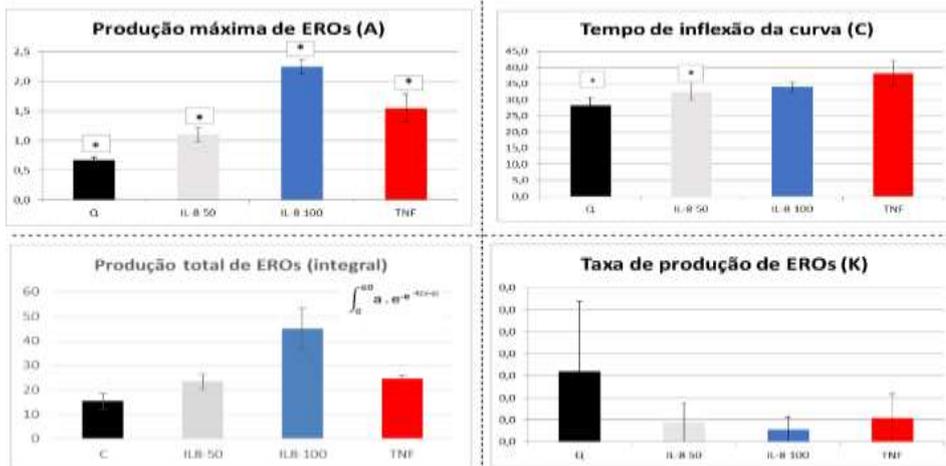


Figura 17. Gráfico de barras dos parâmetros obtidos por ajuste das medidas por EPR ao modelo de Gompertz com barras de erro e marca de significância estatística das diferenças entre condições. As barras expressam a mediana de cada parâmetro, a barra de erro representa o erro padrão da média. * = condições diferentes entre si; *-T = diferente das demais condições, exceto TNF; *-50 = diferente das demais condições exceto IL-8 50 ($p < 0.01$);

4.2.4 Consolidação dos resultados

Os resultados de avaliação das espécies reativas de oxigênio foram capazes de diferenciar a produção de EROs dos neutrófilos por IL-8 em concentrações diferentes (50 ng/mL e 100 ng/mL) e de ambas em relação aos neutrófilos quiescentes por meio de diferentes testes. Nossos estudos mostram que houve produção de EROs por neutrófilos nos grupos estimulados por IL-8 em uma concentração de 100 ng/mL, detectado pela marcação com NBT, pois através dessa técnica observamos vários pontos de significância, como mostrado acima. Nesses estudos, conseguimos perceber que o grupo controle apresentou formazan de forma pouco intensa, próximo do núcleo, possivelmente devido à produção basal de EROs. Já os neutrófilos expostos a IL-8 (100 ng/mL) apresentaram cristais de formazan de forma expressiva, próximos à membrana da célula. Enquanto isso, os estudos de espectrofotometria validaram os resultados obtidos nas lâminas, pois foram observadas diferenças significativas apenas entre os neutrófilos quiescentes e neutrófilos ativados por IL-8 em uma concentração de 100 ng/ml.

Já nos estudos de EPR, os neutrófilos ativados por IL-8 em diferentes concentrações comparados com as células quiescentes apresentaram diferenças significativas entre o grupo

quiescente e as duas concentrações utilizadas quanto à produção máxima, produção total e tempo de inflexão da curva.

Sabemos que na literatura existe uma controvérsia quanto à ativação dos neutrófilos por IL-8, pois alguns autores defendem a ideia de que a IL-8 não ativa as vias de NADPH oxidase dos neutrófilos, indicando que ela agiria apenas como inicializadora (*priming agent*) para outros estímulos³⁸. Já outros autores defendem a ideia de que a IL-8 pode ativar as vias de NADPH oxidase, condicionada a uma determinada concentração e tempo³⁷.

O estudo de Guichard e colaboradores mostra que os neutrófilos estimulados com IL-8 não tiveram as vias de NADPH oxidase ativadas em uma concentração máxima de 50 ng/mL, por até 60 min, mas ocorre fosforilação e translocação parcial dos componentes de NADPH oxidase por meio de diferentes vias, como ERK1/2. Já Reali mostrou que os neutrófilos que foram estimulados por IL-8 ativaram o complexo de NADPH oxidase em uma determinada concentração (produzindo ânion superóxido a partir de 10 ng/mL de IL-8) por meio da via PKC. Além disso, outros estudos também complementaram e mostraram que os neutrófilos quando ativados por diferentes concentrações de IL-8 podem alterar diferentes funcionalidades na célula. Yuo et al., 1991 mostraram que os neutrófilos ativados com uma concentração 0,5 a 5 ng/mL de IL-8 apresentam aumento de cálcio intracelular, como também pequenas mudanças na membrana da célula. Também foi mostrado que nessas concentrações de IL-8, os neutrófilos não são capazes de atuar no processo de liberação do ânion superóxido. Neste mesmo estudo, Yuo mostra que concentrações mais altas de IL-8 (50 – 5.000 ng/mL) podem desencadear diferentes atividades, como na liberação do ânion superóxido e despolarização da membrana celular.

A ativação dos neutrófilos por IL-8 ocorre por meio dos receptores acoplados à proteína G (CXCR 1 e CXCR2), seguida de ativação da via PI3K que em seguida pode ativar as vias Ras, ERK1/2, seguida por ativação da fosfolipase A2^{38,56}. A ativação da fosfolipase A2 leva à clivagem de fosfolípidios de membrana que em seguida pode levar à produção de ácido araquidônico e, por fim, à via PKC^{37,56}. A ativação de isoformas de PKC vai disparar vias importantes em diferentes atividades dos neutrófilos, como a cascata de MAP cinases a partir de Raf e o remodelamento de actina, que participam da fosforilação e translocação de componentes do complexo de NADPH oxidase para membranas, levando à liberação de espécies reativas de oxigênio. Tais mecanismos são consenso na literatura, até mesmo nos dois artigos discordantes quanto à produção de EROs consequente ao estímulo por IL-8. Também é importante ressaltar que a ativação dos neutrófilos por IL-8 pode apresentar um perfil dose dependente, e que a produção de espécies reativas de oxigênio após ativação dos

neutrófilos por IL-8 pode apresentar uma menor duração e magnitude quando comparada com outros estímulos, por exemplo, fMLP⁵⁷.

Ainda sobre a liberação das espécies reativas de oxigênio, os nossos resultados de proteômica mostraram proteínas reguladas que podem modular a liberação de EROs, como por exemplo, *serpina1* e *orm1*. Porém não se sabe ao certo como ocorrem esses processos de imunomodulação. Além disso, as análises por ShinyGo, mostraram que as proteínas consideradas reguladas neste trabalho podem estar presentes no processo de estresse celular. Isso sugere que os neutrófilos ativados por IL-8 podem desencadear uma resposta ao estresse celular.

Sabendo que a liberação de espécies reativas de oxigênio por neutrófilos ativados por IL-8 é menor quando comparada com outros ativadores, como por exemplo, fMLP, os resultados obtidos permitem propor a hipótese de que essa menor liberação possa estar ligada com as proteínas reguladas que atuam na modulação dos processos na produção de EROs^{37,57}. Outra possibilidade seria a modulação da via PI3K, diminuindo a disponibilidade de PIP2 ao ser estimulada, portanto reduzindo a disponibilidade do substrato para a formação de DAG e IP3 que fariam a retroalimentação positiva do processo. Além disso, os resultados funcionais (NBT e EPR) foram capazes de mostrar a produção de espécies reativas de oxigênio em neutrófilos ativados por IL-8. Conseguimos compreender que os neutrófilos após a estimulação podem produzir EROs durante o período de incubação (até 60 minutos) e sua liberação foi considerada maior quando comparado com outro ativador (TNF). O nosso confirma a proposta de Reali, comprovando a produção de EROs por 3 abordagens experimentais e complementando informações, como a ativação precoce (aumento na produção de EROs detectado já nos primeiros 5 minutos de ativação), diferença quantitativa entre o estímulo por IL-8 nas concentrações de 50 ng/mL e 100 ng/mL e definição dos parâmetros de cinética afetados pelo estímulo. Acerca de todas as informações, sabemos que ainda são necessárias investigações mais profundas para determinar as diferentes ações que ocorreram com os neutrófilos estimulados por IL-8 e suas ações funcionais, como também a ação dessas proteínas na liberação de ROS. Proteômica

O presente estudo foi capaz de identificar, por análise proteômica *shotgun label-free*, 624 proteínas (consideradas aquelas que apresentaram 2 ou mais peptídeos) com o uso da ferramenta de bioinformática Peaks. Um total de 139 proteínas foram consideradas reguladas (quantificadas pelo programa Progenesis) com uma abundância diferencial significativa ($q < 0.05$, corrigido para repetições) entre as condições quiescente e IL-8 (100). Porém das 139 proteínas reguladas, apenas 39 proteínas foram consideradas neste estudo, pois consideramos

neste trabalho aquelas proteínas reguladas que apresentaram 2 peptídeos ou mais em sua identificação.

Dessas 39 proteínas reguladas, 16 delas apresentaram uma abundância diferencial diminuída (*down*-reguladas) e 23 delas apresentaram uma abundância diferencial aumentada (*up*-reguladas) na condição exposta à IL-8 com uma concentração de 100 ng/mL, comparada ao controle quiescente, conforme mostrada na figura 18.

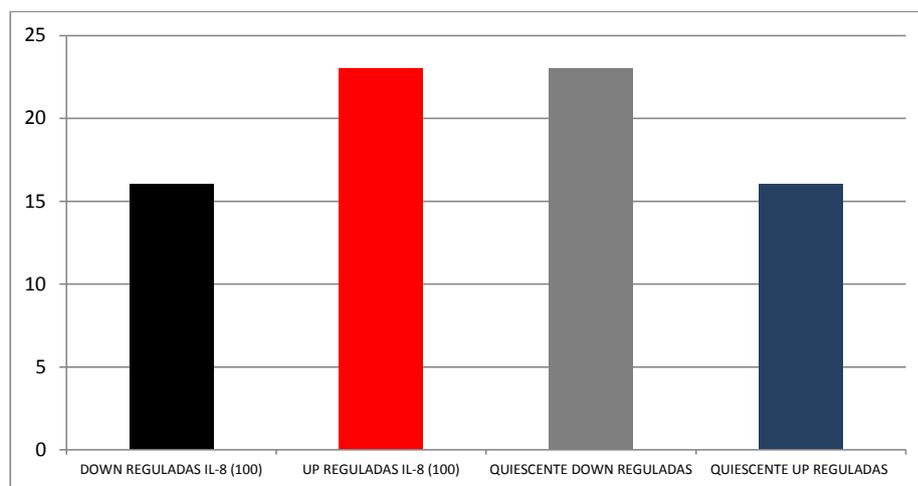


Figura 18 Representação da abundância de proteínas dos neutrófilos estimulados por IL-8.

A figura 18 com mais detalhes quais as proteínas que apresentaram uma abundância aumentada e/ou diminuída em IL-8 em comparação com os neutrófilos quiescentes.

Para entender e discutir melhor a interação dos neutrófilos por IL-8 em uma visão molecular, Degroote et al., ano foram responsáveis por uma análise proteômica de neutrófilos de equinos estimulados por diferentes sinalizadores, dentre eles, a IL-8. Nesse estudo (DEGROOTE et al., 2020) ⁵³, eles identificaram 58 proteínas com aumento de abundância, associadas a processos diretamente relacionados aos enriquecidos no presente trabalho, como resposta imune, desgranulação dos neutrófilos, ativação dos neutrófilos e resposta ao estresse celular, sinalização de receptor e transdução de sinal. Em nosso estudo foram utilizados neutrófilos humanos e, apesar de termos identificado algumas funções reguladas, o perfil proteômico foi diferente.

Contudo, podemos hipotetizar que o perfil proteico dos neutrófilos dos equinos pode apresentar diferenças em relação aos neutrófilos de humanos quando estimulados por IL-8

possivelmente por serem organismos diferentes. Mas, para que isso seja comprovado, é necessário pesquisas mais profundas para comparar e avaliar o perfil dos neutrófilos de equinos e humanos.

Tabela 5. Proteínas com abundância diferencial significativa aumentada e diminuída entre neutrófilos quiescentes e estimulados por IL-8.

<i>Uniprot ID</i>	<i>Gene</i>	<i>Descrição</i>	<i>Fold change</i>
UP REGULADAS			
H3BR04	ALDOA	Fructose-bisphosphate aldolase A	2.44
P01009	SERPINA1	Alpha-1-antitrypsin	13.94
V9HWF6	ORM1	Alpha-1-acid glycoprotein	2.65
P02768	ALB	Serum albumin	2.25
B4E1B2	TF	cDNA FLJ53691, highly similar to Serotransferrin	3.78
B4DPN0	APOH	cDNA FLJ51265, moderately similar to Beta-2-glycoprotein 1	2.25
E1A689	APOB	Mutant Apo B 100	3.42
P01023	A2M	Alpha-2-macroglobulin	2.67
P02671	FGA	Fibrinogen alpha chain	1.88
B4E1D3	FGB	cDNA FLJ53952, highly similar to Fibrinogen beta chain	2.97
B4DDT3	F2	cDNA FLJ54622, highly similar to Prothrombin	3.89
B2R8I2	HRG	cDNA, FLJ93914, highly similar to Homo sapiens histidine-rich glycoprotein	1.77
A0A024R936	NCF2	Neutrophil cytosolic factor 2	1.86
P07996	THBS1	Thrombospondin-1	1.27
B3KP77	HP	cDNA FLJ31310 fis, clone LIVER1000165, highly similar to Haptoglobin	2.69
Q05315	CLC	Galectin-10	1.99
P11678	EPX	Eosinophil peroxidase	2.26
P13645	KRT10	Keratin, type I cytoskeletal 10	1.46
Q0VAS5	H4-16	Histone H4	1.91
Q7Z374	IGHA2	Uncharacterized protein DKFZp686C02218	2.52
A0A5E4	IGLC2	Uncharacterized protein	3.17
Q6N093	IGHG2	Uncharacterized protein	1.49
Q6GMX0	IGKC	Uncharacterized protein	8.07
DOWN REGULADAS			

A0A2R8Y6G6	ENO1	Alpha-enolase	54.41
B4DNK4	PKM	Pyruvate kinase	1.90
B4DE36	GPI	Glucose-6 phosphate isomerase	24.96
B4DVZ8	LTA4H	Leukotriene A4 hydrolase	15.83
B3KTN4	CS	Citrate synthase	2.24
Q53FI1	LCP1	L-plastin varian	2.35
P61160	ACTR2	Actin-related protein 2	1.93
P35579	MYH9	Myosin-9	1.71
P08246	ELANE	Neutrophil elastase	3.45
B7Z7V0	MMP9	cDNA FLJ52524, moderately similar to Matrix metalloproteinase-9	2.75
Q6UX06	OLFM4	Olfactomedin-4	4.77
J3KNB4	CAMP	Cathelicidin antimicrobial peptide	11.41
D6REY1	CHIT1	Chitotriosidase-1	2.53
E7EQB2	LTF	Lactotransferrin	12.37
O00160	MYO1F	Unconventional myosin-I	2.92

As proteínas que foram identificadas como "*up*-reguladas" podem estar relacionadas a diferentes atividades dos neutrófilos, como a de neutrófilos. Já as proteínas que estão como "*down*-reguladas" estão relacionadas a atividades dos neutrófilos como, metabolismo celular, sinalização, agregação e entre outras atividades.



Figura 19 Dados ShinyGo – mostrando dados da resposta ao estresse dos neutrófilos estimulados por IL-8

Dentre tais proteínas, sabemos que os neutrófilos estimulados por IL-8 podem interagir através de diferentes vias, como ilustrado na Figura 20. Por exemplo, a proteína NCF2, uma proteína presente na montagem do complexo NADPH oxidase, a fosforilação parcial da via ERK1/2, ativação da fosfolipase (A2) (responsável pelo aumento do cálcio citosólico) e ativação da PKC (podem ser responsáveis pela ativação do complexo NADPH oxidase). Esse esquema demonstra as vias que podem ser utilizadas para ativação do complexo de NADPH oxidase dos neutrófilos estimulados por IL-8, além disso, essa figura demonstra como as proteínas citadas podem atuar na inibição ou imunomodulação de EROS nas vias. Portanto, os resultados da proteômica serão discutidos nos tópicos abaixo para entender melhor o mecanismo de inibição que pode ocorrer nas vias utilizadas por neutrófilos após a estimulação por IL-8.

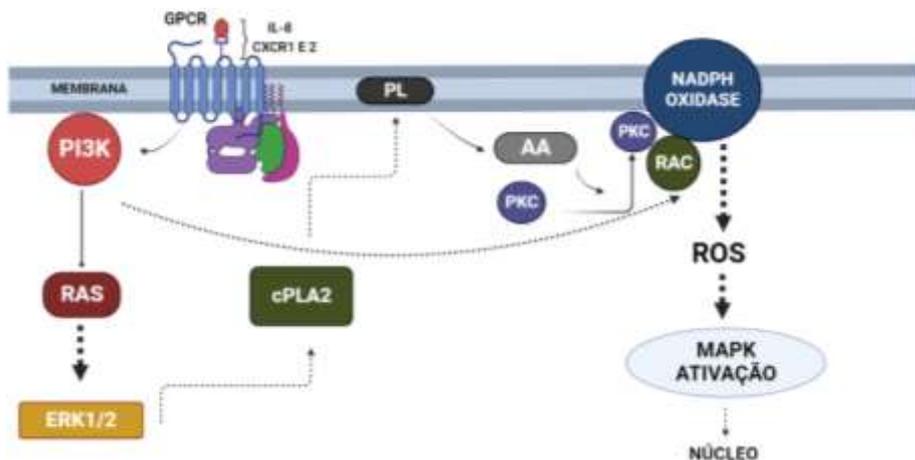


Figura 20. Cascata de ativação das vias de NADPH oxidase dos neutrófilos ativados por IL-8

4.2.5 Agrupamento de proteínas por Gene Ontology

Na análise feita por *Gene Ontology*, as proteínas reguladas foram agrupadas quanto à função molecular, processos biológicos e componentes celulares.

Quanto à função molecular, 47,8% das proteínas estão ligadas a processos catalíticos, podendo destacar as hidrolases, isomerases, liases, oxidoredutases e transferases. Já 41,3% das proteínas estão relacionadas a diferentes atividades que envolvem ligação, como por exemplo, ligação a compostos orgânicos cíclicos e heterocíclicos (ácidos nucleicos e esteróis) e ligações a proteínas do citoesqueleto (actina), e também atividades enzimáticas (GTPase e protease). 19,6% são proteínas que participam na regulação das atividades enzimáticas e de transcrição. 6,5% são proteínas com atividades de transdução molecular e transportadora, pois estão envolvidas nas atividades de receptores de sinalização e transporte

transmembrana. 4,3% são proteínas com atividades estruturais e 2,2% são proteínas com atividades reguladoras da tradução. Os resultados apresentados estão descritos na figura 21 abaixo.

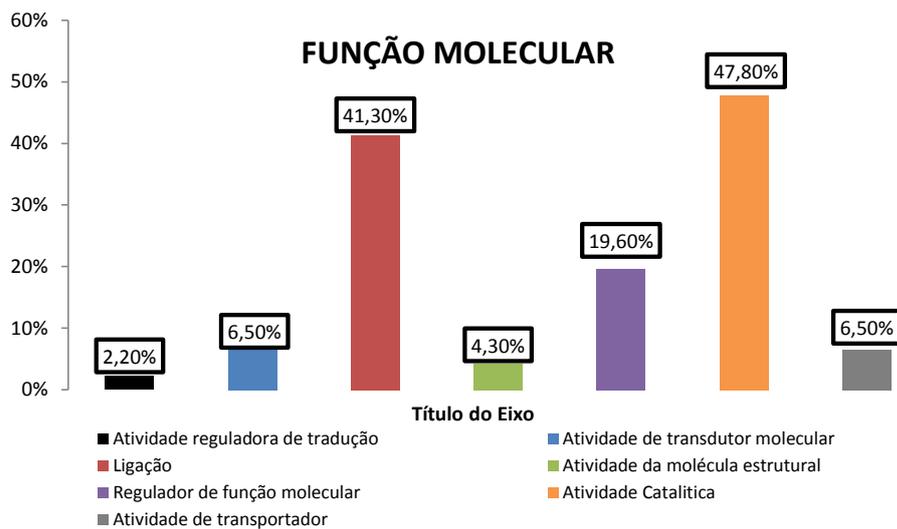


Figura 21: Análise de função molecular por ontologia gênica das proteínas significativamente reguladas entre as condições.

Já em relação aos processos biológicos, 69,6% das proteínas estão envolvidas em processos celulares, como transporte mediado por vesículas e resposta celular a estímulos. 52,2% são proteínas envolvidas no processo metabólico celular. 41,3% são proteínas que participam de processos de regulação biológica celular, 30,4% são proteínas que estão envolvidas em resposta ao estímulo em diferentes atividades celulares, como por exemplo, resposta ao estresse e a estímulos endógenos. 19,6% são proteínas de localização, 10,9% são proteínas que participam nas sinalizações e desenvolvimento celular, 8,7% são proteínas que atuam no sistema imune, 4,3% são proteínas que participam dos processos de adesão e interações interespecies entre os organismos e 2,2% são proteínas que atuam em processos de desenvolvimento celular. A figura 22 mostra os resultados apresentados acima

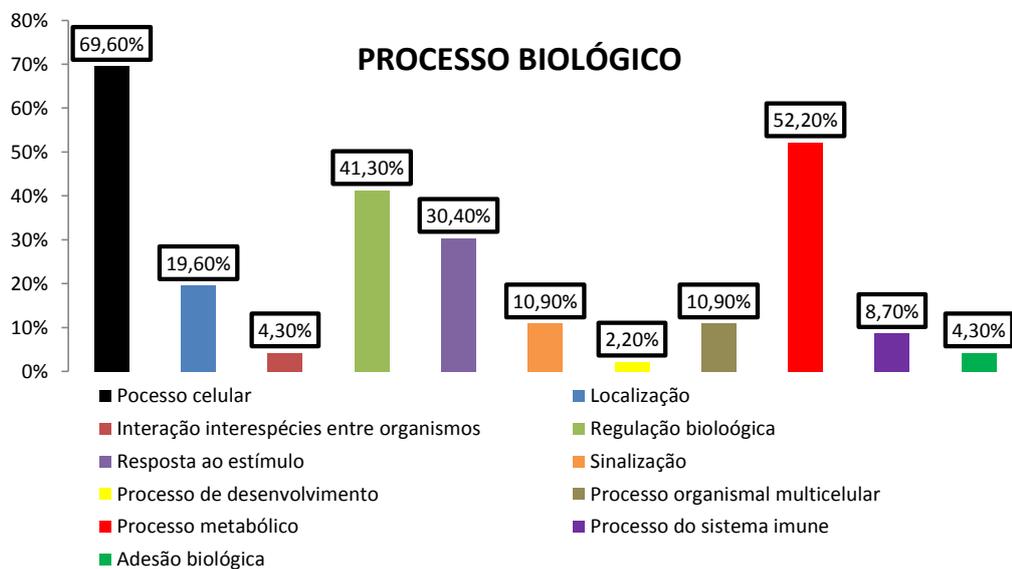


Figura 22 Análise dos processos biológicos por ontologia gênica das proteínas significativamente reguladas entre as condições.

Quanto ao agrupamento em componentes celulares 67,4% são proteínas que estão presentes nas entidades anatômicas. Essas entidades são representadas por diferentes compartimentos celulares, como por exemplo, citosol, cromatina, matriz extracelular, membranas, organelas e entre outros. Já 41,3% das proteínas estão presentes nas regiões intracelulares e 15,2% fazem parte de complexos proteicos. A figura 23 abaixo mostra os resultados apresentados acima.

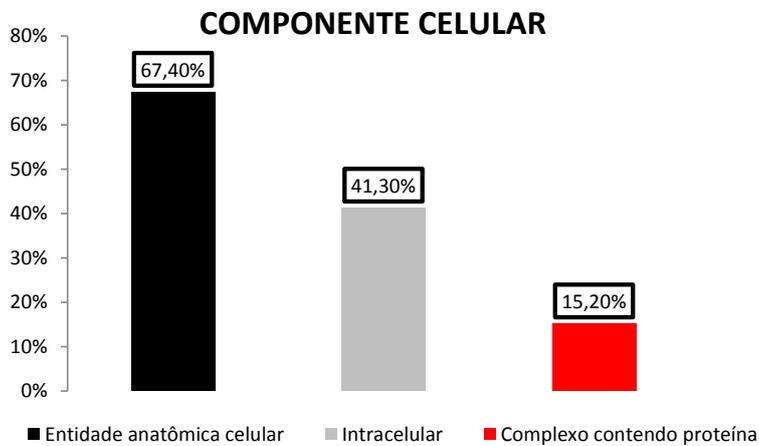
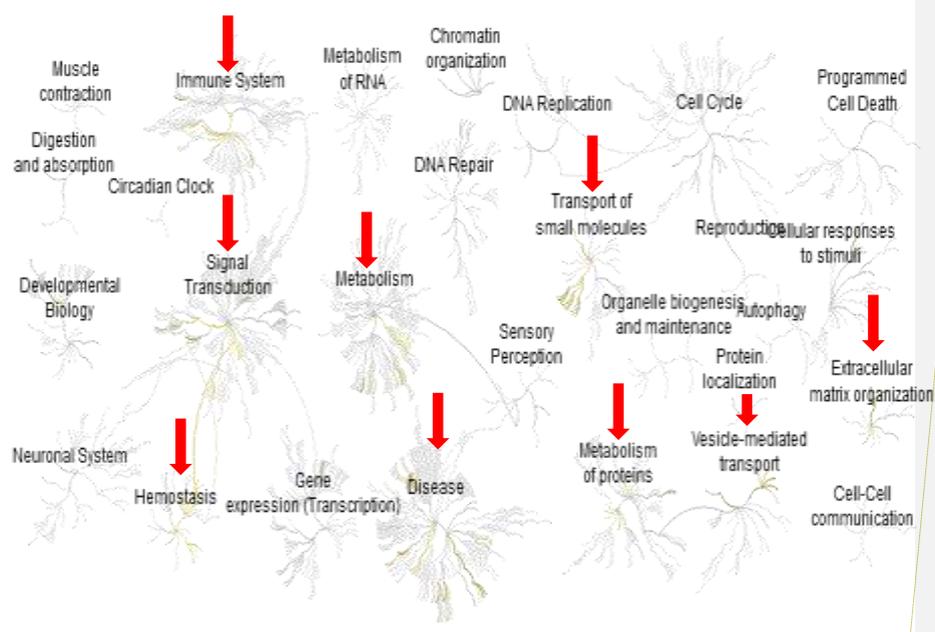


Figura 23 Análise de componente celular por ontologia gênica das proteínas significativamente reguladas entre as condições..

Os resultados obtidos por meio da análise de ontologia gênica nos mostram que as proteínas reguladas pela exposição à IL-8 estão voltadas para diferentes atividades na maquinaria dos neutrófilos sendo elas, processos metabólicos, sinalização, processos celulares, entre outros. Mas, dentre todos os grupos avaliados, chamamos atenção as proteínas que estão envolvidas no estresse celular e que podem estar ligadas com espécies reativas de oxigênio, Além disso, esse programa nos mostrou que houve uma distribuição ampla entre os compartimentos celulares, como por exemplo, membrana, citosol e diferentes organelas. As correlações entre essas proteínas serão discutidas nos tópicos adiante (string).

4.2.6 Agrupamento de proteínas por vias (Reactome)



Formatado: Fonte: (Padrão) Arial, 12 pt

Figura 24 Análise por Reactome Pathway.

Para visualização de enriquecimento de vias metabólicas e de sinalização, uma análise foi feita utilizando-se a plataforma Reactome para avaliar as 39 proteínas identificadas como reguladas nos neutrófilos humanos após a estimulação com IL-8. Essa análise revelou a participação das proteínas em diferentes processos celulares como, metabolismo e metabolismo de proteínas (enriquecidas principalmente no metabolismo da glicose (glicólise e gliconeogênese), doenças (sinalização da MAPK oncogênico), sistema imune (envolvidas no processo de desgranulação dos neutrófilos e produção de EROs e espécies reativas de nitrogênio (ERNs), organização da matriz extracelular (ligadas no processo de degradação da matriz extracelular), transporte mediado por vesículas (ligadas ao processo de ligação e absorção de ligantes por receptores *scavengers*), transporte de pequenas moléculas (transporte e ligação com ferro), expressão gênica, transdução de sinal (sinalização por receptores acoplados à proteína G (GPCR) e homeostasia. Os resultados obtidos pelo reactome mostram que as proteínas identificadas como reguladas estão ligadas de alguma forma com a produção de EROs, como mostrado nas vias do sistema imune, além disso, foi mostrado também nessa análise que ocorreu a sinalização pelos receptores GPCR, como esperado, uma vez que os neutrófilos foram ativados pela IL-8 por meio desses receptores. Tais vias, associadas aos resultados de produção de EROs já descritos, reforçam a hipótese de ativação

do complexo NADPH oxidase e sugerem que o caminho envolva tanto o metabolismo do fosfoinosítídeo quanto a ativação da PKC ³⁷. As alterações no metabolismo primário podem estar associadas ao desvio para a via das pentoses, levando à produção de NADPH fonte de potencial redutor para o complexo NADPH oxidase. A figura 24 ilustrada a cima mostra as vias visualizadas pelo reactome e a tabela 6 mostra as vias enriquecidas e o código de cada proteína associada a elas.

Tabela 6. Vias enriquecidas com o seu nome, p valor e código uniprot.

Pathway Name	Entities pValue	Submitted entities found (CODIGO UNIPROT)
Neutrophil degranulation	7.15E-11	P11678, P01009 P61160 E7EQB2 V9HWF6 A0A2R8Y6G6 B3KP77 D6REY1 B4DE36 P16403 H3BR04 J3KNB4 P08246 B4DVZ8 B4DNK4 Q6UX06 B7Z7V0
Response to elevated platelet cytosolic Ca ²⁺	1.89E-10	P07996 P01023 P01009 P02768 H3BR04 B4E1D3 V9HWF6 P02671 B4E1B2 B2R8I2 B4DPN0
Immune System	2.65E-05	P01009 E7EQB2 P61160 V9HWF6 B3KP77

		D6REY1 Q53FI1 B4DE36 B4DDT3 B3KTN4 B4E1D3 P08246 E1A689 B4DVZ8 A0A024R936 B4DNK4 P35579 P11678 A0A2R8Y6G6 P02671 P16403 H3BR04 J3KNB4 Q6UX06 B7Z7V0
Glycolysis	7.50E-05	B4DE36 P16403 H3BR04 A0A2R8Y6G6 B4DNK4
Glucose metabolism	2.16E-04	B4DE36 P16403 H3BR04 A0A2R8Y6G6 B4DNK4
Signaling by GPCR	0.015777644	P01023 P02768 P16403 B4DDT3 H3BR04 E1A689 B4DPN0
ROS and RNS production in phagocytes	0.017058695	J3KNB4 A0A024R936
Oncogenic MAPK signaling	0.07860643	B4E1D3 P02671
Degradation of the	0.042391437	P01023 P08246

extracellular matrix		B7Z7V0
Binding and Uptake of Ligands by Scavenger Receptors	0.034589067	P02768 E1A689 B3KP77

4.2.7 Agrupamento de proteínas por interações (String)

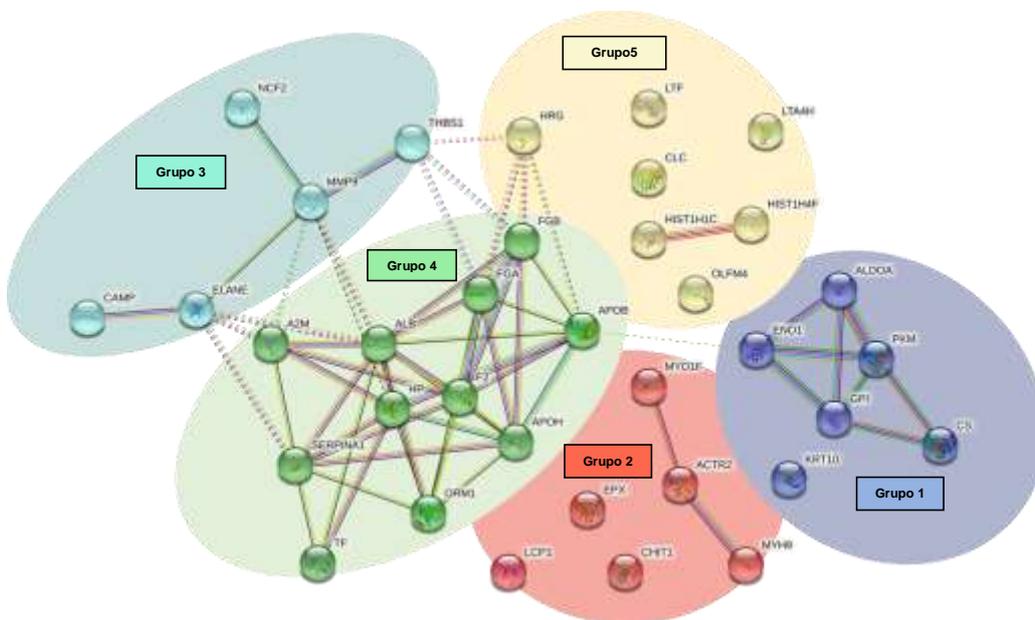


Figura 25. Análise por string

Tabela 7. Interação proteína/proteína verificada no string, diferenciando grupo, nome, código e funções.

GRUPO	NOME	CÓDIGO	FUNÇÕES
Grupo 1	Aldolase	226	Funções Metabólicas
	Enolase 1	2023	
	Piruvato Quinase M1/2	5315	

	Glicose-6-fosfato-isomerase	2821	
	Citrato Sintase	1431	
Grupo 2	Miosina Cadeia pesada 9	4627	Função de Migração, Adesão e Remodelamento do citoesqueleto
	Actina 2	10097	
	Miosina 1F	4542	
Grupo 3	Elastase de neutrófilo	1991	Função de Fagocitose, Organização da matriz extracelular, produção de Eros
	Peptídeo antimicrobiano Cathelicidina	820	
	Metalopeptidase 9	4318	
	Thrombospondina 1	7057	
	Fator de neutrófilo Citosólicos 2	4688	
Grupo 4	Alfa-2-Macroglobulina	2	Função de Agregação, Sinalização e Regulação
	Albumina	213	
	Serpina1	5265	
	Lactotransferrina	4057	
	Alfa-1-Ácida Glicoproteína	5004	
	Haptoglobina	3240	
	Fator de Coagulação 2	2147	
	Fibrionogênio Alfa	2243	
Fibrionogênio Beta	2244		

	Apoliproteína H	350	
	Apoliproteína B	338	
Grupo 5	Histona H4-16	121504	Função de liberação de Net e Atividade antimicrobiana
	Histona H1-2	3006	

A análise por String foi feita por meio do agrupamento em clusters pelo método *k-means* para classificação de proteínas pela proximidade de interação com uma alta confiança (0.700). Nesta ferramenta foram avaliadas 35 proteínas, formando 5 clusters. Dessas 35 proteínas, algumas não apresentaram interação com outras proteínas, possivelmente pela configuração de alta confiança utilizada para análise.

Os clusters formados pelo String (representados na figura 16 acima como grupos) apresentaram interações proteicas que podem estar ligadas a diferentes atividades, como por exemplo, metabolismo, regulação e entre outras.

O grupo 1 apresenta proteínas ligadas ao metabolismo dos neutrófilos, sendo que todas apresentaram abundância diminuída exceto uma (aldolase), provavelmente por que essa proteína além de ser importante para via glicolítica, ela pode usar um fator sensorial para identificar disponibilidade de glicose, como também pode regular a proteína cinase ativada por AMP (AMPK).⁵⁸ Outra hipótese é que ela seja usada como mecanismo de regulação da produção de EROs, pela inibição de G6PD na via das pentoses⁸⁸

Sabemos que os neutrófilos utilizam principalmente carboidratos, mas podem usar diferentes moléculas (lipídeos e proteínas) para produção de energia, e essas células podem responder a diferentes estímulos aumentando o processo de captação de glicose. No artigo de Bernhard, ele mostra que os neutrófilos estimulados por IL-8 apresentam mudanças na quimiotaxia e netose, que podem estar ligadas a alterações no pH (alcalinização) e no metabolismo (maior captação de glicose) da célula. A alcalinização pode ser considerada um processo transitório e uma importante modificação no metabolismo dos neutrófilos, dependente do cálcio intracelular e do canal de íons específicos (NHE1). Além disso, foi mostrado nesse estudo que os neutrófilos sofreram uma ativação precoce e uma rápida despolarização nos potenciais de membrana, que podem estar associadas com ativação da NADPH oxidase por meio da extrusão de elétrons¹⁰.

Desse modo, as proteínas do grupo 1 confirmam a influência de IL-8 no processo de metabolismo energético da célula, principalmente na via glicolítica⁵⁹. Essa ativação pode gerar a despolarização, podendo atuar na captação da glicose¹⁰.

O grupo 2 contém proteínas que estão ligadas aos processos de migração, adesão e remodelamento do citoesqueleto dos neutrófilos. Neste grupo todas as proteínas apresentaram abundância diminuída. Uma das atividades mais marcantes dos neutrófilos estimulados por IL-8 é a quimiotaxia¹¹. Desse modo, podemos propor a hipótese de que a diminuição dessas proteínas esteja ligada a processo de turnover de proteínas associado ao remodelamento do citoesqueleto necessário à migração, adesão e translocação de componentes celulares como grânulos e complexos proteicos. Mas, para elucidar essa hipótese, serão necessários estudos mais profundos acerca do tema.

Alguns estudos como o de Zehrer e et al., 2018 apresentaram alguns resultados que são coerentes com a nossa hipótese, pois em seus estudos eles mostraram que a MYH9 (cadeia pesada da miosina não-muscular) é considerada essencial para o tráfego de neutrófilos na imunidade inata, e que a deficiência dessa proteína pode acarretar problemas graves na migração dos neutrófilos⁶⁰.

Já o grupo 3 apresenta características de ativação de espécies reativas de oxigênio na fagocitose e organização da matriz extracelular, entre outras atividades. Neste grupo existem 2 proteínas com abundância aumentada (NCF2 e THBS1) e 3 proteínas com abundância diminuída (ELANE, CAMP e MMP-9). Dentre elas, a NCF2, também chamada de p67 phox é um dos componentes do complexo de NADPH oxidase. Quando ocorre ativação dos neutrófilos por IL-8, inicia-se o processo de fosforilação e translocação da p67 phox para a membrana plasmática, nas jangadas lipídicas^{36,38}. O estudo de Guichard mostrou que a P67 phox de neutrófilos passa pelo processo de fosforilação sequencial de uma forma dependente do tempo em microdomínios resistentes a detergentes para a montagem do complexo de NADPH oxidase, que foi aumentada significativamente 10 minutos após ser estimulado por IL-8 em uma concentração de 50 ng/mL. Mas é importante lembrar que o estudo de Guichard coloca esse processo como apenas uma inicialização do complexo, insuficiente para a produção de EROs. Diferentemente, nos nossos resultados, o aumento de abundância da p67 phox mostrado na proteômica é coerente com o aumento na produção de EROs, como já descrito para isquemia/reperfusão, outra condição que induz ativação de neutrófilos. Apesar da discordância entre nossos resultados de produção de EROs representados pelos testes de NBT e EPR e os apresentados por Guichard, a concordância com os apresentados por Reali, a coerência com este achado na proteômica e entre as diversas abordagens de avaliação de

EROs dão suporte à hipótese de que o estímulo por IL-8 é capaz de desencadear a produção de EROs pelo complexo NADPH oxidase. Principalmente o teste de EPR, que por ser um método mais sensível, mostrou a capacidade da produção de EROs em neutrófilos por IL-8 nas duas concentrações utilizadas.

A CAMP (Cathelicidin Antimicrobial Peptide) é um peptídeo de defesa liberado pelos neutrófilos na desgranulação, podendo atuar como imunomodulador (auxiliando na regulação da resposta imune hiperativa) e antimicrobiano⁶¹.

A metaloproteinase-9 (MMP-9) é uma endopeptidase com atividade proteolítica contra proteínas da matriz extracelular. A MMP-9 está presente nos grânulos terciários dos neutrófilos, sendo liberada após estimulação por IL-8 por meio do receptor CXCR2 e pode ocorrer por duas vias distintas. A primeira é a via PKC e ERK1/2, já a segunda envolve as cinases da família Src^{62,63}. Foi demonstrado que a IL-8 é capaz de ativar os neutrófilos a liberar MMP-9 de forma independente do fluxo de cálcio intracelular, portanto mostrando que a regulação dos grânulos terciários segue uma linha diferente na regulação de outros grânulos, como o primário. Outros estudos como o de Steen mostraram que a atividade da MMP-9 foi capaz de aumentar a potência da IL-8 em 10 a 27 vezes na ativação dos neutrófilos. Outro fator interessante foi mostrado no artigo de Walter, pois ele mostrou em seu estudo que o aumento da expressão de MMP-9 pode ser correlacionado com os níveis reduzidos de EROs no câncer associado à colite⁶⁴.

Tais fatos são coerentes com nosso resultado (abundância diminuída de MMP-9 no grupo IL-8), uma vez que a liberação de MMP-9 diminui sua concentração intracelular. Além disso, podemos propor, associando nossos resultados à literatura^{62,63}, que o balanço entre uma possível limitação da produção de EROs e a potencialização da resposta à IL-8 após a desgranulação pode estar associada ao padrão da cinética de produção de EROs mostrado na figura 16.

A elastase de neutrófilos é outra protease, armazenada nos grânulos azurofílicos e, quando liberada, pode participar de diferentes atividades, como a formação de NETs (constituídas por cromatina, elastase e catepsina G), degradação de fatores de virulência e matar bactérias. Sua liberação por neutrófilos após estimulação com IL-8 já foi descrita, o que é coerente com os nossos resultados de proteômica. Essa proteína pode ser inibida por proteínas consideradas antiproteases, como a serpina-1, presente no mesmo grânulo^{56,65}.

As proteínas do grupo 4 estão ligadas a processos de agregação, sinalização e regulação, e estão todas com abundância aumentada. Dentre tais proteínas, algumas chamam a atenção quanto à sua atividade de supressão e/ou inibição (os mecanismos serão explicados

tópicos abaixo), como serpina1, orm1, albumina, alfa-2-macroglobulina e haptoglobina, pois estudos indicam que essas proteínas possivelmente podem atuar na supressão ou inibição das espécies reativas de oxigênio produzidos pelos neutrófilos. A serpina1, também conhecida como alfa-1-antitripsina (AAT) é uma glicoproteína contendo um resíduo de cisteína livre, podendo ser encontrada em todos os subtipos de grânulos dos neutrófilos e também em vesículas secretoras. Achados de Bergin et al sugerem que a maioria das serpinas presentes nos neutrófilos estão localizadas na membrana celular, dentro das jangadas lipídicas. Essa proteína tem como atividade principal a inibição de serino-proteases, especialmente a elastase de neutrófilos, mas também pode atuar na inibição de outras proteínas, como proteinase-3 e catepsina G. Além disso, os neutrófilos podem ser considerados fontes de transcrição de serpina1 curtas com atividades ainda não elucidadas^{56,66}.

Além dos fatores abordados, essa proteína também pode atuar no processo de modulação dos níveis de EROs, pois pode ser facilmente oxidada em um resíduo de metionina. Essa oxidação faz com que a serpina sequestre as espécies reativas de oxigênio^{56,6781-82-83}. Uma hipótese plausível para justificar a abundância da serpina1 se dá pelo fato de que a produção de serpina1 aumenta à medida que os neutrófilos vão entrando na circulação⁵⁶ e, apesar de estar presente nos grânulos dos neutrófilos, possivelmente não seja liberada no processo de desgranulação por ficar presa nas jangadas lipídicas⁶⁶ das membranas dos grânulos, que se incorporam à membrana plasmática na desgranulação.

As serpinas podem apresentar papéis diferentes, como atividade antioxidante e antiproteínase, sequestrando EROs e inibindo elastase, proteinase-3 e catepsina G (que estão presentes no mesmo grânulo). Sabemos também que a Serpina1 pode ser oxidada, automontada ou complexada com lipídios e outras moléculas, isso favorece que essa proteína tenha uma influência na sua atividade biológica e suas funções vão depender das características quantitativas e qualitativas^{56,66,68}. O fato de a serpina estar presa às jangadas lipídicas, colocalizada com o complexo de NADPH oxidase^{56,66,68}, reforça a hipótese de que essa proteína atue na modulação de EROs. Dessa forma, complementa-se a hipótese proposta acima, propondo que a serpina funcione como mecanismo de proteção dos neutrófilos, inibindo proteases e EROs dentro dos grânulos, mas cessando tal inibição após a desgranulação, à medida que EROs e proteases se afastam da célula, mas a serpina continua ligada à membrana. Além disso, os resultados da análise por String mostram que a serpina1 interage indiretamente com a lipoproteína APOB. Isso se torna interessante, pois estudos mostram que as serpinas ligadas a lipoproteínas de alta densidade podem auxiliar no processo de infiltração dos neutrófilos e na diminuição de proteínas pró-inflamatórias⁵⁶.

Outros estudos, como o de Siddiqui e colaboradores mostraram que, apesar de a serpina atuar na inibição das espécies reativas de oxigênio, as EROs podem danificar essas proteínas, inativando-as. A serpina pode ser desativada pelo ácido hipocloroso, que causa oxidação de um resíduo reativo de metionina (Met 358), com perda da atividade inibidora de elastase⁶⁷ e não se sabe ao certo se isso acontece nas regiões intracelulares ou extracelulares⁶⁷. Já o superóxido e o ácido hipocloroso, podem desativar também a alfa-2-macroglobulina. Esse processo pode estar associado ao aparecimento de diversas doenças, como aterosclerose e artrite reumatoide⁶⁹.

Em nosso estudo de proteômica, a proteína alfa-2-macroglobulina foi identificada com abundância aumentada. Essa proteína é capaz de inibir quase todas as proteinases, inclusive elastase neutrofílica e, como descrito acima, pode sequestrar EROs, sendo inativada no processo. Essa proteína é predominantemente plasmática, produzida pelo fígado, macrófagos e fibroblastos. Foi previamente descrita em micropartículas de neutrófilos⁷⁰, mas não se especifica se foi produzida pelos neutrófilos ou internalizada a partir de sua interação com os receptores LRP-1. Por outro lado, sua similaridade estrutural e relação evolutiva com proteínas do sistema complemento⁸⁴, que recentemente foram descritas por nosso grupo como produzidas por neutrófilos⁸⁵ sugere a possibilidade de síntese pelo neutrófilo. Dessa forma, se fazem necessários testes mais específicos e profundos para confirmar se de fato essa proteína pode ser produzida por neutrófilos estimulados por IL-8⁶⁹⁻⁷¹.

A haptoglobina (HP) é uma proteína antioxidante de fase aguda, que atua em doenças infecciosas e inflamatórias⁷². Também é produzida por neutrófilos, armazenada em grânulos específicos e liberada durante a desgranulação⁸⁶. Estudos de Oh e colaboradores examinaram vários efeitos causados pela HP nos neutrófilos e identificaram que essa proteína pode atuar na inibição da produção das espécies reativas de oxigênio em neutrófilos após ativação por diferentes sinalizadores (fMLP, ácido araquidônico e zimosan opsonizado). Tal inibição da produção de EROs pode ocorrer na região dos receptores ligantes na cascata de ativação para a produção de EROs^{72-74,87}.

Observando esses resultados, podemos hipotetizar que os neutrófilos que forem estimulados por IL-8 podem apresentar um perfil semelhante na produção de EROs ao do fMLP, visto que ativação deles também ocorrem através de receptores ligantes (CXCR1 e CXCR2). Porém, para que esses resultados sejam validados, é necessário pesquisas mais profundas para entender melhor o dinamismo dessa proteína na cascata de ativação.

A orm-1, também conhecida como proteína orosomucoide ou glicoproteína-alfa-ácida-1 (alfa-1-AGP) é considerada uma glicoproteína plasmática, que reage durante a fase aguda nos

processos biológicos do organismo humano, que também pode ser encontrada nos grânulos secundários dos neutrófilos em maior abundância que outras proteínas plasmáticas e é liberada por desgranulação⁸⁶⁻⁸⁷. A proteína orm-1 pode estar ligada a diferentes atividades dos neutrófilos, como inibição e/ou diminuição da produção do ânion superóxido em neutrófilos induzida por PMA e por zimosan, promoveu agregação e inibiu quimiotaxia por fMLP⁸⁸.

Segundo Costello, o processo de inibição da produção de EROs pela orm-1 foi considerado transitório e diretamente proporcional à concentração de orm-1 e inversamente proporcional à concentração dos estímulos adicionados e o seu mecanismo de inibição não está em função a carga negativa da proteína, mas provavelmente pelo fato de estar ligado aos penúltimos resíduos de galactose presentes nela (COSTELLO, 1984). Em outro estudo, Lainé, mostrou que a proteína ORM-1 possui a capacidade de inibir a produção de espécies reativas de oxigênio, e que o processo pode variar de acordo com a intensidade da estimulação. Por exemplo, ao testar baixas concentrações de ativador (fMLP ou PMA) eles observaram que a resposta de inibição ocorreu dependente da intensidade da resposta dos neutrófilos diferentes estímulos⁸⁸. Sabemos que a Orm-1 pode se ligar a receptores de lectina5 semelhante à imunoglobulina (siglect-5) em neutrófilos, desencadeando o aumento do cálcio intracelular em neutrófilos, ao mesmo tempo em que diminui a produção de EROs. Apesar de o aumento de cálcio intracelular estar comprovadamente associado ao desencadeamento, há evidências de sua distribuição irregular na célula e suas vias de sinalização ainda apresentam questões em aberto, e provavelmente a inibição das vias de superóxido também podem ocorrer nesses receptores⁷⁵. Assim, este resultado de nosso estudo pode sugerir que os neutrófilos estimulados por IL-8 são capazes de produzir a proteína orm-1 com taxa maior do que a expelida por desgranulação, ou sua ligação aos receptores seria intensa a ponto de resistir à exposição a desnaturantes, o que explicaria a abundância aumentada após o estímulo por IL-8, apesar da desgranulação. Esse seria mais um mecanismo de modulação da produção de EROs. Mas, é necessário realizar pesquisas mais profundas para validar essa expressão e entender melhor como ocorre o processo de inibição de EROs de neutrófilos pela proteína orm-1 por meio dessa atividade⁷⁶⁻⁸⁸⁻⁸⁹.

Outra proteína que está presente neste grupo é a albumina. Além de ser a proteína plasmática mais abundante, essa proteína também apresenta atividades de supressão de espécies reativas de oxigênio. Segundo Nathan e colaboradores a albumina pode suprimir a explosão respiratória dos neutrófilos em resposta ao fator de necrose tumoral (TNF), peptídeo formilado e componente do complemento C5a, como também pode bloquear a ação da elastase. Esse mecanismo de supressão só ocorre se a albumina for utilizada antes do início

da explosão respiratória, provavelmente através da ligação com o receptor CD43. (NATHAN et al., 1993). A transferrina, proteína presente no grupo 4, é considerada uma glicoproteína que medeia várias atividades nos neutrófilos, podendo desempenhar um papel duplo na imunidade e exercendo papéis importantes, como efeitos antimicrobianos. Os estudos Kuzmicka e colaboradores mostraram que a sobrecarga de ferro pode inibir a produção de nets e espécies reativas de oxigênio dos neutrófilos de camundongos. Visto isso, podemos propor a hipótese que o aumento da transferrina pode estar ligado ao processo de inibição da liberação de EROs, pois como foi discutido em tópicos a cima, a estimulação dos neutrófilos por IL-8 apresenta uma ativação da produção de EROs menor quando comparado com outros estímulos ⁹⁰.

A proteína glicoproteína rica em histidina (HRG), também do grupo 4, está ligada ao processo de supressão de produção das espécies reativas de oxigênio. Muko e colaboradores mostraram que HRG diminui a adesão e produção de EROs por neutrófilos em resposta a LPS e diminui a quimiotaxia à IL-8, porém aumenta a fagocitose por meio do receptor CLEC1A e maturação de lisossomos desencadeadas por LPS ⁹¹. HRG também é uma glicoproteína plasmática, considerada um importante biomarcador para sepse⁹². É produzida por hepatócitos e macrófagos, porém até o presente momento não havia sido descrita nenhuma evidência dessa proteína nos neutrófilos, sendo assim, o presente trabalho descreve pela primeira vez a HRG em neutrófilos humanos, identificada com 03 peptídios, através das ferramentas de bioinformática (Peaks e Progenesis). Ainda assim, por mais que houve a identificação dessa proteína, se torna necessário uma investigação mais detalhada para definir seu papel no mecanismo de produção de ROS induzido por IL-8, como também a liberação dessa proteína por neutrófilos. Outro fator interessante é que a proteína HRG interage com THBS-1 e fibrinogênio (que também são proteínas encontradas no plasma, mas também já foram relatadas em neutrófilos⁷⁷⁻⁹³).

Considerando as atividades, em conjunto, das proteínas encontradas no grupo 4, associadas às outras observações de proteômica e liberação de EROs do presente estudo, propomos a hipótese de que a exposição à IL-8 teria um efeito auto-regulador da produção de EROs, pois além da produção estimulada via PKC é observada a alteração significativa na abundância de proteínas que inibem a produção e outras que sequestram EROS, sendo uma possível explicação para os níveis reduzidos de EROs quando comparados a outros estímulos^{37,38}. O fato de diversas dessas proteínas serem proteínas plasmáticas, algumas muito abundantes, chama a atenção para a necessidade de estudos de seguimento validando a origem neutrofílica das mesmas, apesar de terem sido tomados os devidos cuidados de

lavagens repetidas das células e de se tratar de um estudo comparativo em que o grupo controle também foi exposto ao plasma.

Já as proteínas do grupo 5 podem estar ligadas ao processo de liberação de NETs e atividade antimicrobiana em geral. As proteínas que participam desse cluster estão com 1 proteína com abundância aumentada (HIST 4.16) e 1 proteína com abundância diminuída (HIST 1-2).

.Notou-se que, dentre as proteínas reguladas, algumas apresentam atividades que podem interferir na produção de EROs. Dentre elas, podemos citar ORM-1, HP, HRG, Albumina e SERPINA1. Cada proteína pode apresentar uma característica diferente na interferência da produção de EROs, por exemplo, a Serpina 1 é uma proteína presente nos grânulos e nas jangadas lipídicas. Nas jangadas lipídicas, ela está colocalizada com o complexo NADPH oxidase e apresenta atividade quelante de EROs, possivelmente funcionando como mecanismo de proteção dos neutrófilos, inibindo proteases e EROs dentro dos grânulos, mas cessando tal inibição após a desgranulação, à medida que EROs e proteases se afastam da célula, mas a serpina continua ligada à membrana. Na figura 25 ilustramos que as serpinas podem estar presentes dentro das jangadas lipídicas. Sabendo disso, a presença dessa proteína pode favorecer com a inibição de EROs através do processo de inibição da via dos fosfolipídios, podendo evitar a liberação de ácido araquidônico e assim impedir com que não ocorra ativação da via PKC que, por essa via, poderia auxiliar na montagem do complexo NADPH oxidase e conseqüentemente na produção de EROs. Conseqüentemente, a inibição a montante pode reduzir a produção de EROs além da simples captura das espécies. É importante ressaltar que essa inibição pode ser reversível, conforme descrito nos tópicos acima.

Já as demais proteínas (orm-1, hp, hrg, albumina e tf), também podem atuar no processo de interferência na liberação de EROs. Segundo estudos^{56,66-67-81-82- 83-68-69-72-74-87-88} essas proteínas podem atuar na inibição ou diminuição de EROs através da interferência em receptores dos neutrófilos, como receptores de fMLP, ácido araquidônico, zimosan opsonizado e dentre outras. Nesse caso, como os neutrófilos são ativados pela IL-8 pelos receptores CXCR2, provavelmente essas proteínas podem auxiliar na inibição ou diminuição de EROs nesse primeiro momento de ativação, podendo bloquear a interação dos receptores de membrana dos neutrófilos com a IL-8, podendo favorecer a inibição da via PI3K e evitando que ocorra a ativação da via PKC, que conseqüentemente pode diminuir ou inibir a produção de EROs em neutrófilos ativados por IL-8.

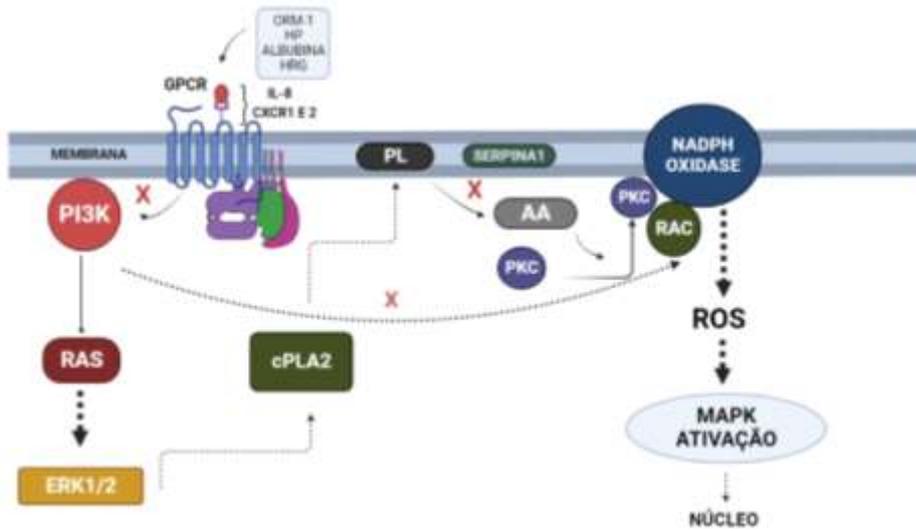


Figura 46. Vias dos neutrófilos ativados por IL-8 e as possíveis interações proteicas na inibição e/ou imunomodulação na produção de EROs.

6. Conclusão

Em conclusão, os nossos resultados mostraram, por diferentes técnicas, que os neutrófilos estimulados por IL-8 apresentaram produção de EROs. Pela técnica de NBT, os nossos resultados mostraram que ocorreu uma diferença significativa de forma qualitativa e quantitativa entre neutrófilos estimulados por IL-8 em uma concentração de 100 ng/ml e neutrófilos quiescentes ($p < 0,01$). Já os resultados de EPR mostraram diferenças significativas na produção de EROs pelos neutrófilos estimulados por IL-8 nas duas concentrações utilizadas (100 ng/ml e 50 ng/ml), bem como entre elas e o grupo controle. Esta abordagem evidenciou também padrões de cinética da produção de EROs, mostrando que a IL-8 aumenta significativamente, entre as 4 condições mencionadas acima, a taxa máxima e a intensidade de produção em que ocorre a inflexão da curva de produção de EROs. Na análise proteômica, avaliamos os neutrófilos estimulados por IL-8 (100 ng/ml) e neutrófilos quiescentes utilizando a técnica label free. Foram identificadas 39 proteínas reguladas, identificadas com 2 ou mais peptídeos e FDR $< 1\%$. A análise do perfil da interação dessas proteínas, associada ao agrupamento por vias e termos GO revelou alguns mecanismos conhecidos e/ou esperados para a resposta à IL-8, como desgranulação dos neutrófilos, aumento do cálcio citosólico, quimiotaxia como também fatores ligados à produção de espécies reativas de oxigênio. Além

dos resultados esperados, foram obtidos resultados inovadores, como a identificação de diversas proteínas reguladas que apresentam atividade moduladora da produção de EROs e a identificação de uma proteína (HRG) descrita aqui pela primeira vez em neutrófilos. Esses resultados nos permitiram agregar e discutir hipóteses de modulação da imunidade inata. A hipótese de modulação da produção de EROs concentra-se no achado de diversas proteínas reguladas que atuam tanto na inibição e/ou supressão da NADPH oxidase quanto no sequestro de EROs e podem levar à quantidade final de EROs detectável menor que a gerada por outros estímulos como fMLP e PMA. Quanto à controvérsia na literatura acerca da produção de EROs, os nossos resultados foram capazes de mostrar que a IL-8 nas concentrações de 50 e 100 ng/mL induz os neutrófilos a produzirem espécies reativas de oxigênio. Dessa forma, podemos concluir que os neutrófilos produzem EROs em resposta à IL-8, dependente da concentração e tempo de incubação, seguindo um perfil descrito pelo modelo de Gompertz. Desse modo, o presente trabalho resultou em uma análise que reuniu várias respostas após a ativação dos neutrófilos por IL-8, criando novos insights para pesquisas que utilizarão esse tema como base.

LIMITAÇÕES NO TRABALHO:

As principais limitações deste estudo referem-se à validação, por ensaios funcionais, de proteínas encontradas na proteômica e à diferenciação entre espécies reativas de oxigênio intracelulares e extracelulares. A primeira permitiria testar as hipóteses de modulação da produção de EROs pelas proteínas que têm potencial de realizar tais funções, a segunda permitiria avaliar de forma ainda mais detalhada a produção de EROs na membrana de grânulos e na membrana celular.

PERPECTIVAS:

A perspectiva futura para este trabalho será avaliar as proteínas que podem estar ligadas com o processo de imunomodulação e/ou inibição da produção de espécies reativas de oxigênio, avaliação de EROS intracelular e extracelular. Em nosso estudo proteômico, identificamos diversas proteínas de grânulos. Por ser pouco estudada a resposta molecular dos neutrófilos estimulados por IL-8, num estudo futuro pode-se avaliar melhor o perfil das proteínas que são liberadas após a ativação e analisar a funcionalidade de cada proteína através de testes funcionais (como por exemplo, análise de imunofluorescência), pois sabemos que a produção de EROs, bem como a produção de NETs pelos neutrófilos estimulados por IL-8 podem ter a participação de proteínas granulares. O estudo da ação dessas proteínas pode

apresentar novos insights sobre a participação dessas proteínas de grânulos nos mecanismos supracitados.

Bibliografia

1. Neves, A. C. D. Influência do estímulo por PAF no perfil de abundância proteica em neutrófilos : uma abordagem proteômica. (2016).
2. Brinkmann, V. *et al.* Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria. *Science* (80-.). **303**, 1532–1535 (2004).
3. Carvalho, L. O., Aquino, E. N., Neves, A. C. D. & Fontes, W. The Neutrophil Nucleus and Its Role in Neutrophilic Function. *J. Cell. Biochem.* **116**, 1831–1836 (2015).
4. Fonseca, M. P. Proteômica Abrangente de Alta Resolução Na Análise de Neutrófilos Humanos Ativados Pelo Peptídeo Formyl Methyl Leucyl Phenylalanine (fMLP). *Patol. Mol.* **150** (2017).
5. Othman, A., Sekheri, M. & Filep, J. G. Roles of neutrophil granule proteins in orchestrating inflammation and immunity. *FEBS Journal* (2021) doi:10.1111/febs.15803.
6. Pillay, J. *et al.* In vivo labeling with ²H₂O reveals a human neutrophil lifespan of 5.4 days. *Blood* **116**, 625–627 (2010).
7. Lawrence, S. M., Corriden, R. & Nizet, V. The Ontogeny of a Neutrophil: Mechanisms of Granulopoiesis and Homeostasis. (2018) doi:10.1128/MMBR.00057-17.
8. Shao, J. Y., Ting-Beall, H. P. & Hochmuth, R. M. Static and dynamic lengths of neutrophil microvilli. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 6797–6802 (1998).
9. Lehman, H. K. & Segal, B. H. The role of neutrophils in host defense and disease. *J. Allergy Clin. Immunol.* **145**, 1535–1544 (2020).
10. Bernhard, S. *et al.* Interleukin 8 elicits rapid physiological changes in neutrophils that are altered by inflammatory conditions. *J. Innate Immun.* **13**, 225–241 (2021).
11. Palomino, D. C. Arolin, T. & Marti, L. C. avalheir. Chemokines and immunity. *Einstein (Sao Paulo)*. **13**, 469–473 (2015).
12. Borregaard, N. & Cowland, J. B. Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. *Blood* **89**, 3503–3521 (1997).
13. Faurschou, M. & Borregaard, N. Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. *Microbes Infect.* **5**, 1317–1327 (2003).
14. Lacy, P. Mechanisms of degranulation in neutrophils. *Allergy, Asthma and Clinical Immunology* vol. 2 98–108 (2006).
15. Ligeti, E. & Mócsai, A. Exocytosis of neutrophil granulocytes. *Biochem. Pharmacol.* **57**,

- 1209–1214 (1999).
16. Segura, R. M. *et al.* Interleukin-8 and markers of neutrophil degranulation in pleural effusions. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **157**, 1565–1572 (1998).
 17. Taub, D. D., Anver, M., Oppenheim, J. J., Longo, D. L. & Murphy, W. J. T lymphocyte recruitment by interleukin-8 (IL-8): IL-8-induced degranulation of neutrophils releases potent chemoattractants for human T lymphocytes both in vitro and in vivo. *J. Clin. Invest.* **97**, 1931–1941 (1996).
 18. McKenna, S. M. & Davies, K. J. A. The inhibition of bacterial growth by hypochlorous acid. Possible role in the bactericidal activity of phagocytes. *Biochem. J.* **254**, 685–692 (1988).
 19. Sgarbieri, V. C. Propriedades fisiológicas-funcionais das proteínas do soro de leite. *Rev. Nutr.* **17**, 397–409 (2004).
 20. Borregaard, N., Sørensen, O. E. & Theilgaard-Mönch, K. Neutrophil granules: a library of innate immunity proteins. *Trends Immunol.* **28**, 340–345 (2007).
 21. Uriarte, S. M. *et al.* Comparison of Proteins Expressed on Secretory Vesicle Membranes and Plasma Membranes of Human Neutrophils. *J. Immunol.* **180**, 5575–5581 (2008).
 22. Gabrilovich, D. I. *The Neutrophil: new outlook for old cells.* (World Scientific Publishing Co. Pte Ltd, 2005).
 23. Futosi, K., Fodor, S. & Mócsai, A. Reprint of Neutrophil cell surface receptors and their intracellular signal transduction pathways. *Int. Immunopharmacol.* **17**, 1185–1197 (2013).
 24. Ivetic, A., Green, H. L. H. & Hart, S. J. L-selectin: A major regulator of leukocyte adhesion, migration and signaling. *Front. Immunol.* **10**, 1–22 (2019).
 25. Bouti, P. *et al.* β 2 Integrin Signaling Cascade in Neutrophils: More Than a Single Function. *Front. Immunol.* **11**, 1–20 (2021).
 26. Cheng, O. Z. & Palaniyar, N. NET balancing: A problem in inflammatory lung diseases. *Front. Immunol.* **4**, 1–14 (2013).
 27. Papayannopoulos, V. Neutrophil extracellular traps in immunity and disease. *Nature Reviews Immunology* vol. 18 (2018).
 28. An, Z. *et al.* Neutrophil extracellular traps induced by IL-8 aggravate atherosclerosis via activation NF- κ B signaling in macrophages. *Cell Cycle* **18**, 2928–2938 (2019).
 29. Lee, W. L., Harrison, R. E. & Grinstein, S. Phagocytosis by neutrophils. *Microbes Infect.* **5**, 1299–1306 (2003).
 30. Uribe-Querol, E. & Rosales, C. Phagocytosis: Our Current Understanding of a Universal Biological Process. *Front. Immunol.* **11**, (2020).
 31. Richardson, M. D. & Patel, M. Stimulation of neutrophil phagocytosis of aspergillus

- fumigatus conidia by interleukin-8 and n-formylmethionyl-leucylphenylalanine. *Med. Mycol.* **33**, 99–104 (1995).
32. Geering, B. & Simon, H. U. Peculiarities of cell death mechanisms in neutrophils. *Cell Death Differ.* **18**, 1457–1469 (2011).
 33. Ooi, H. K. & Ma, L. Modeling heterogeneous responsiveness of intrinsic apoptosis pathway. *BMC Syst. Biol.* **7**, (2013).
 34. Elmore, S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol. Pathol.* **35**, 495–516 (2007).
 35. Pérez-Figueroa, E., Álvarez-Carrasco, P., Ortega, E. & Maldonado-Bernal, C. Neutrophils: Many Ways to Die. *Front. Immunol.* **12**, 1–19 (2021).
 36. El-Benna, J. *et al.* Priming of the neutrophil respiratory burst: role in host defense and inflammation. *Immunol. Rev.* **273**, 180–193 (2016).
 37. REALI, E. *et al.* IL-8 enhances antibody-dependent cellular cytotoxicity in human neutrophils. *Immunol. Cell Biol.* **73**, 234–238 (1995).
 38. Guichard, C. *et al.* Interleukin-8-induced priming of neutrophil oxidative burst requires sequential recruitment of NADPH oxidase components into lipid rafts. *J. Biol. Chem.* **280**, 37021–37032 (2005).
 39. Remick, D. G. Interleukin-8. *Crit. Care Med.* **33**, 466–467 (2005).
 40. Zeilhofer, H. U. Abbreviations f-MLP N-formylmethionylleucylphenylalanine GRK-2 G protein-coupled receptor kinase-2 IP 3 inositol 1,4,5-triphosphate. *Curr. Opin. Hematol.* **7**, 178–182 (2000).
 41. Cassateua, M. A. Neutrophil-derived proteins: selling cytokines by the pound. *Adv. Immunol.* **73**, 369–509 (1999).
 42. Kobayashi, S. D., Voyich, J. M. & DeLeo, F. R. Regulation of the neutrophil-mediated inflammatory response to infection. *Microbes Infect.* **5**, 1337–1344 (2003).
 43. Theilgaard-Mönch, K., Porse, B. T. & Borregaard, N. Systems biology of neutrophil differentiation and immune response. *Curr. Opin. Immunol.* **18**, 54–60 (2006).
 44. Raghuvanshi, S. K. *et al.* The Chemokine Receptors CXCR1 and CXCR2 Couple to Distinct G Protein-Coupled Receptor Kinases To Mediate and Regulate Leukocyte Functions. *J. Immunol.* **189**, 2824–2832 (2012).
 45. Takami, M., Terry, V. & Petruzzelli, L. Signaling Pathways Involved in IL-8-Dependent Activation of Adhesion Through Mac-1. *J. Immunol.* **168**, 4559–4566 (2002).
 46. N. Aquino, E. *et al.* Proteomic Analysis of Neutrophil Priming by PAF. *Protein Pept. Lett.* **23**, 142–151 (2016).

47. Elajaili, H. B., Hernandez-Lagunas, L., Ranguelova, K., Dikalov, S. & Nozik-Grayck, E. Use of electron paramagnetic resonance in biological samples at ambient temperature and 77 K. *J. Vis. Exp.* **2019**, (2019).
48. Dikalov, S. I. & Harrison, D. G. Methods for detection of mitochondrial and cellular reactive oxygen species. *Antioxidants Redox Signal.* **20**, 372–382 (2014).
49. Tjørve, K. M. C. & Tjørve, E. The use of Gompertz models in growth analyses, and new Gompertz-model approach: An addition to the Unified-Richards family. *PLoS One* **12**, 1–17 (2017).
50. Standish, R. SciDAVis - Scientific Data Analysis and Visualization. (2017).
51. Aslam, B., Basit, M., Nisar, M. A., Khurshid, M. & Rasool, M. H. Proteomics: Technologies and their applications. *J. Chromatogr. Sci.* **55**, 182–196 (2017).
52. Zhu, W., Smith, J. W. & Huang, C. M. Mass spectrometry-based label-free quantitative proteomics. *J. Biomed. Biotechnol.* **2010**, (2010).
53. Degroote, R. L., Weigand, M., Hauck, S. M. & Deeg, C. A. IL8 and PMA Trigger the Regulation of Different Biological Processes in Granulocyte Activation. *Front. Immunol.* **10**, 1–13 (2020).
54. Medicina, F. De & Luz, I. S. Análise proteômica e funcional das diferenças sexo-específicas de neutrófilos quiescentes e ativados Análise proteômica e funcional das diferenças sexo-específicas de neutrófilos quiescentes e ativados. (2021).
55. Benov, L. Improved Formazan Dissolution for Bacterial MTT Assay. *Microbiol. Spectr.* **9**, (2021).
56. Janciauskiene, S. *et al.* Alpha1-antitrypsin binds hemin and prevents oxidative activation of human neutrophils: putative pathophysiological significance. *J. Leukoc. Biol.* **102**, 1127–1141 (2017).
57. Yuo, A. *et al.* Stimulation and priming of human neutrophils by interleukin-8: Cooperation with tumor necrosis factor and colony-stimulating factors. *Blood* **78**, 2708–2714 (1991).
58. Zhang, C.-S. *et al.* Fructose-1,6-bisphosphate and aldolase mediate glucose sensing by AMPK. *Nature* **548**, 112–116 (2017).
59. Kumar, S. & Dikshit, M. Metabolic Insight of Neutrophils in Health and Disease. *Front. Immunol.* **10**, 2099 (2019).
60. Zehrer, A. *et al.* A Fundamental Role of Myh9 for Neutrophil Migration in Innate Immunity. *J. Immunol.* **201**, 1748–1764 (2018).
61. Minns, D. *et al.* The neutrophil antimicrobial peptide cathelicidin promotes Th17 differentiation. *Nat. Commun.* **12**, 1–16 (2021).

62. Chakrabarti, S. Regulation of matrix metalloproteinase-9 release from IL-8-stimulated human neutrophils. *J. Leukoc. Biol.* **78**, 279–288 (2005).
63. Van den Steen, P. E., Proost, P., Wuyts, A., Van Damme, J. & Opdenakker, G. Neutrophil gelatinase B potentiates interleukin-8 tenfold by aminoterminal processing, whereas it degrades CTAP-III, PF-4, and GRO- α and leaves RANTES and MCP-2 intact. *Blood* **96**, 2673–2681 (2000).
64. Walter, L. *et al.* Matrix metalloproteinase 9 (MMP9) limits reactive oxygen species (ROS) accumulation and DNA damage in colitis-associated cancer. *Cell Death Dis.* **11**, (2020).
65. Keshari, R. S. *et al.* Cytokines Induced Neutrophil Extracellular Traps Formation: Implication for the Inflammatory Disease Condition. *PLoS One* **7**, (2012).
66. Bergin, D. A. *et al.* α -1 antitrypsin regulates human neutrophil chemotaxis induced by soluble immune complexes and IL-8. *J. Clin. Invest.* **120**, 4236–4250 (2010).
67. Taggart, C. *et al.* Oxidation of either Methionine 351 or Methionine 358 in α 1-Antitrypsin Causes Loss of Anti-neutrophil Elastase Activity. *J. Biol. Chem.* **275**, 27258–27265 (2000).
68. Clemmensen, S. N. *et al.* Alpha-1-antitrypsin is produced by human neutrophil granulocytes and their precursors and liberated during granule exocytosis. *Eur. J. Haematol.* **86**, 517–530 (2011).
69. Siddiqui, T. *et al.* Reactive oxygen species and anti-proteinases. *Arch. Physiol. Biochem.* **122**, 1–7 (2016).
70. Dalli, J. *et al.* Microparticle alpha-2-macroglobulin enhances pro-resolving responses and promotes survival in sepsis. *EMBO Mol. Med.* **6**, 27–42 (2014).
71. Salvesen, G., Virca, G. D. & Travis, J. Interaction of A2-Macroglobulin With Neutrophil and Plasma Proteinases. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **421**, 316–326 (1983).
72. I-Hsiang Lai, Jung Hsu Tsao, Yi Ping Lu, Jai Wei Lee, Xin Zhao, Feng LinChien, S. J. T. M. Neutrophils as one of the major haptoglobin sources in mastitis affected milk. *Vet. Res. BioMed Cent.* (2009) doi:10.1051/vetres:2008055.
73. Oh, S. K., Pavlotsky, N. & Tauber, A. I. Specific binding of haptoglobin to human neutrophils and its functional consequences. *J. Leukoc. Biol.* **47**, 142–148 (1990).
74. Korobko, V. *et al.* p55 Receptor Human Neutrophils: Pivotal Role of the TNF TNF-Induced Haptoglobin Release from. (2021).
75. Ligresti, G., Aplin, A. C., Dunn, B. E., Morishita, A. & Nicosia, R. F. The acute phase reactant orosomucoid-1 is a bimodal regulator of angiogenesis with time- and context-dependent inhibitory and stimulatory properties. *PLoS One* **7**, (2012).

76. Costello, M. J., Gewurz, H. & Siegel, J. N. Inhibition of neutrophil activation by alpha1-acid glycoprotein. *Clin. Exp. Immunol.* **55**, 465–72 (1984).
77. Kono, M. *et al.* Morphological and flow-cytometric analysis of haemin-induced human neutrophil activation: Implications for transfusion-related acute lung injury. *Blood Transfus.* **11**, 53–60 (2013).
78. ABBAS, A. K. **Imunologia Celular e Molecular**. Elsevier, 2005.
79. Leuenroth., Lee. Grutkoski, P., Keeping, H., Simms, H, H. Interleukin-8-induced suppression of polymorphonuclear leukocyte apoptosis is mediated by suppressing CD95 (Fas/Apo-1) Fas-1 interactions. *Rev, Surgery.* **124** (2): 409-17 (1988).
80. Jiawen Liu, Seungho Shin, Sukkee Um, Comprehensive statistical analysis of heterogeneous transport characteristics in multifunctional porous gas diffusion layers using lattice Boltzmann method for fuel cell applications, *Renewable Energy*, Volume 139, 2019, Pages 279-291, ISSN 0960-1481,
81. Bucurenci N., Blake D. R., Chidwick K., Winyard P. G. (1992). Inhibition of neutrophil superoxide production by human plasma alpha 1-antitrypsin. **FEBS Lett.** **300** 21–24. 10.1016/0014-5793(92)80156-B .
82. Tilg H., Vannier E., Vachino G., Dinarello C. A., Mier J. W. (1993). Antiinflammatory properties of hepatic acute phase proteins: preferential induction of interleukin 1 (IL-1) receptor antagonist over IL-1 beta synthesis by human peripheral blood mononuclear cells. **J. Exp. Med.** **178** 1629–1636. 10.1084/jem.178.5.1629
83. Lewis E. C., Mizrahi M., Toledano M., Defelice N., Wright J. L., Churg A., *et al.* (2008). Alpha1-antitrypsin monotherapy induces immune tolerance during islet allograft transplantation in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **105** 16236–16241. 10.1073/pnas.0807627105.
84. Vandooren, J, and Y Itoh. 2021. “Alpha-2-Macroglobulin in Inflammation, Immunity and Infections.” *Frontiers in Immunology* **12**.
85. DAMASCENA, Hylane Luiz. Papel das etapas precoces de ativação da produção de EROs na indução das NETs. 2021. 121 f., il. Tese (Doutorado em Patologia Molecular) — Universidade de Brasília, Brasília, 2021.
86. Theilgaard-Mönch K, Jacobsen LC, Rasmussen T, Niemann CU, Udby L, Borup R, Gharib M, Arkwright PD, Gombart AF, Calafat J, Porse BT, Borregaard N. Highly glycosylated alpha1-acid glycoprotein is synthesized in myelocytes, stored in secondary granules, and released by activated neutrophils. **J Leukoc Biol.** 2005 Aug;**78**(2):462-70. doi: 10.1189/jlb.0105042. Epub 2005 Jun 7. PMID: 15941779.
87. Fournier T, Medjoubi NN, Porquet D. Alpha-1-acid glycoprotein. *Biochim Biophys Acta.* 2000;**1482**:157–171. doi: 10.1016/S0167-4838(00)00153-9.
88. Lainé E, Couderc R, Roch-Arveiller M, Vasson MP, Giroud JP, Raichvarg D. Modulation of human polymorphonuclear neutrophil functions by alpha 1-acid glycoprotein. *Inflammation.* 1990 Feb;**14**(1):1-9. doi: 10.1007/BF00914025. PMID: 2157658.

89. Gunnarsson P, Levander L, Pålsson P, Grenegård M. The acute-phase protein alpha 1-acid glycoprotein (AGP) induces rises in cytosolic Ca²⁺ in neutrophil granulocytes via sialic acid binding immunoglobulin-like lectins (siglecs). *FASEB J.* 2007 Dec;21(14):4059-69. doi: 10.1096/fj.07-8534com. Epub 2007 Aug 3. PMID: 17675532.

90. Kuźmicka, Weronika & Manda-Handzlik, Aneta & Mroczek, Agnieszka & Cieloch, Adrianna & Moskalik, Aneta & Demkow, Urszula & Wachowska, Malgorzata & Ciepiela, Olga. (2021). Iron excess affects release of NETs and ROS but does not influence other functions of neutrophils. *Immunology and Cell Biology.* 100. 10.1111/imcb.12509.

91. Muko R, Matsuda H, Oikawa MA, Shin T, Matsuda K, Sato H, Sunouchi T, Tanaka A. Histidine-Rich Glycoprotein Functions as a Dual Regulator of Neutrophil Activity in Horses. *J Equine Vet Sci.* 2021 Jul;102:103620. doi: 10.1016/j.jevs.2021.103620. Epub 2021 Apr 16. PMID: 34119191.

92. Kuroda K, Ishii K, Mihara Y, Kawanoue N, Wake H, Mori S, Yoshida M, Nishibori M, Morimatsu H. Histidine-rich glycoprotein as a prognostic biomarker for sepsis. *Sci Rep.* 2021 May 13;11(1):10223. doi: 10.1038/s41598-021-89555-z. PMID: 33986340; PMCID: PMC8119687.

93. Takahashi Y, Wake H, Sakaguchi M, Yoshii Y, Teshigawara K, Wang D, Nishibori M. Histidine-Rich Glycoprotein Stimulates Human Neutrophil Phagocytosis and Prolongs Survival through CLEC1A. *J Immunol.* 2021 Feb 15;206(4):737-750. doi: 10.4049/jimmunol.2000817. Epub 2021 Jan 15. PMID: 33452125; PMCID: PMC7851742.