

**ANÁLISE PROTEÔMICA COMPARATIVA ENTRE
NEUTRÓFILOS QUIESCENTES E ESTIMULADOS
COM FATOR DE AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA
(PAF)**

Elaine Nascimento Aquino

Orientador: Prof. Dr. Wagner Fontes

Programa de pós-graduação em Patologia Molecular
Laboratório de Bioquímica e Química de Proteínas
Departamento de Biologia Celular
Instituto de Ciências Biológicas
Universidade de Brasília

**ANÁLISE PROTEÔMICA COMPARATIVA ENTRE
NEUTRÓFILOS QUIESCENTES E ESTIMULADOS
COM FATOR DE AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA
(PAF)**

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

Brasília, 2008

DEDICATÓRIA

A Deus,

Pelo amor, Pela salvação,
Pela vida e por ter me guiado
E me ajudado a superar todos os obstáculos.

Aos meus pais, José Hugo e Marizete,

Pelo amor, Pela educação, pelo apoio,
Por palavras de perseverança,
Por ter me oferecido o melhor deles para que eu tivesse o melhor:
Melhor estudo, melhor conforto, uma vida de qualidade.
Toda a minha gratidão a eles.
Por serem meus pais.

Ó profundidade das riquezas,
tanto da sabedoria, como da ciência de Deus!
Quão insondáveis são os seus juízos,
e quão inescrutáveis os seus caminhos!
Romanos 11.33

E peço isto:
que o vosso amor cresça
mais e mais em ciência
e em todo o conhecimento.
Filipenses 1.9

AGRADECIMENTOS

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

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

Às Professoras Viviany e Mirian que me incentivaram a realizar esse mestrado.

À Professora Mariana pela compreensão e dispensas para a realização do trabalho final.

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

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

Ao Carlos Garcia, Alexandre e Carlos Enrique pelos ensinamentos e produção de alguns dados.

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

Ao Nuno e Antônio Rufino, pelo apoio técnico prestado.

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

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

Ao Laboratório de *Protein Research Group* – *Southern Denmark University*, na Dinamarca pelas identificações de proteínas.

ABSTRACT

Human neutrophils are differentiated cells in peripheral blood, which constitute 40 – 70% of circulating white blood cells, counted under normal conditions. Neutrophils are the first cells recruited from the bloodstream to sites of infection. These cells exhibit three different phenotypes: quiescent, primed and activated. Several proinflammatory molecules can induce the primed and activated state, including the PAF. The PAF, a proinflammatory lipid mediator, has potent direct effects on neutrophils and can induce chemotaxis, actin polymerization, production of small amount of ROS and aggregation, and other priming-type actions.

In this study, human neutrophils were prepared from peripheral venous blood of healthy volunteers (> 97% purity, > 98% viability) and were obtained by density centrifugation on Percoll gradient. 10^7 cells were stimulated with 20 nM PAF for 30 minutes. Cytometric analysis was executed for measurement of respiratory burst, viability and purity of neutrophils. Quiescent and PAF stimulated neutrophils were submitted to two-dimensional electrophoresis to, compare their proteomic map and to identify proteins by PMF and MS/MS.

The comparison between the two conditions revealed 108 spots differentially expressed, among which 66 spots were upregulated after PAF stimulation and 42 were downregulated in this condition ($p < 0,05$). Moreover, 114 spots were regarded as belonging only to quiescent gels, and 129 spots were exclusive of the PAF stimulated neutrophil map.

We identified 50 proteins, 3 with increased expression after stimulation, 2 with decreased expression, 1 exclusive of the quiescent condition and 42 without differential expression. Proteins with increased expression were: **vimentin**, the intermediate filament, classified as a component of the cytoskeleton; **tubulin beta**, present in microtubules, also a component of the cytoskeleton; and **SNAP- α** , involved in the fusion of granules to the plasma membrane. Proteins that decreased expression: **complex Arp2/3 subunit 5**, a protein that changes the direction of polymerization of the actin and **S10A9-Human**, a protein with a possible chemotactic function. Protein exclusive: **annexin A5**, that inhibits the action of phospholipase A_2 .

This study presents a further step towards the understanding of stimulation pathways in neutrophils during an inflammatory process.

RESUMO

Os neutrófilos humanos são células já diferenciadas do sangue periférico, constituindo 40-70% dos leucócitos na circulação em condições normais. É o primeiro tipo celular a atingir o local da infecção. Eles possuem 3 fenótipos diferentes: quiescente, estimulado e ativado. Várias moléculas pró-inflamatórias podem causar estimulação e ativação dos neutrófilos, incluindo o mediador lipídico pró-inflamatório PAF. O PAF tem potentes efeitos diretos sobre o neutrófilo e pode induzir quimiotaxia, polimerização de actina, produção de ROS em pouca quantidade e agregação, além de outras ações de estimulação.

Nesse estudo, os neutrófilos foram purificados a partir do sangue venoso periférico de voluntários saudáveis, obtidos após centrifugação do sangue total pelo gradiente de percoll (pureza > 97% e viabilidade > 98%). 10^7 células foram estimuladas com 20 nM de PAF por 30 minutos. As análises citométricas mensuraram a explosão respiratória, viabilidade e pureza dos neutrófilos. Foram preparados géis bidimensionais de extratos de neutrófilos quiescentes e estimulados por PAF, comparados seus mapas proteômicos e identificadas proteínas por PMF e MS/MS.

A análise comparativa dos géis 2D entre as condições revelou 108 *spots* com expressão diferencial, sendo que 66 *spots* representam um aumento na expressão protéica após estimulação pelo PAF e 42 representam diminuição ($p < 0,05$). Além disso, 114 *spots* foram considerados como pertencentes apenas ao mapa do gel quiescente e 129 *spots* exclusivos do mapa neutrofílico estimulado por PAF.

Foram identificados 50 proteínas, sendo 3 com aumento de expressão após estimulação, 2 com diminuição de expressão, 1 exclusiva da condição quiescente e 42 sem expressão diferencial. Proteínas com aumento de expressão foram: **vimentina**, filamento intermediário, um componente do citoesqueleto; **tubulina beta**, uma proteína presente nos microtúbulos, também considerada um componente do citoesqueleto e **SNAP- α** , uma proteína envolvida no processo de fusão dos grânulos à membrana plasmática. Proteínas que diminuíram a expressão: **subunidade 5 da Arp 2/3**, proteína que muda a direção da polimerização da actina e **proteína S10A9-humana** com possível função quimiotática. Proteína exclusiva: **anexina A5** inibe a ação da fosfolipase A₂. O presente estudo representa uma importante etapa para se compreender as vias de estimulação dos neutrófilos durante o processo inflamatório.

ÍNDICE DO TEXTO

1. INTRODUÇÃO	01
1.1) Fases de maturação	03
1.2) Ativação dos neutrófilos	04
1.3) Apoptose	05
1.4) Mecanismo de estimulação e ativação dos neutrófilos	08
1.4.1) Receptores de adesão e migração dos neutrófilos	09
1.4.2) Fagocitose	12
1.4.3) Grânulos	13
I – <i>Grânulos Azurofílicos</i>	14
II – <i>Grânulos Peroxidase-negativos</i>	15
III – <i>Vesículas Secretoras</i>	16
IV – <i>Mecanismos da Desgranulação.</i>	16
1.4.4) NADPH OXIDASE	17
1.4.5) Fases de Ativação	19
I - <i>Características dos neutrófilos em repouso ou quiescentes</i>	20
a) Citosol	20
b) Membrana	20
c) Grânulos	20
II – <i>Neutrófilos estimulados</i>	21
a) Citosol e membrana	21
b) Vesículas secretoras e Grânulos	22
III – <i>Neutrófilos ativados</i>	23
a) Citosol	23
b) Membrana.	24
c) Grânulos	24
1.5) Fator de agregação plaquetária – PAF	25
1.5.1) Biossíntese do PAF	26
1.5.2) Heterogeneidade do PAF	28
1.5.3) Degradação do PAF	29
1.6) Neutrófilos e PAF	29
1.6.1) Receptor do PAF	29
1.6.2) Vias de sinalização na estimulação dos neutrófilos com PAF	31

1.7) Patologias associadas ao PAF	33
1.8) Abordagens adotadas nos estudos do mecanismo de estimulação de neutrófilos pelo PAF	34
1.8.1) Citometria de Fluxo	35
1.8.2) Proteômica	38
I – Eletroforese Bidimensional	39
II – Análise de Imagens	40
III – Espectrometria de Massa	40
2. OBJETIVOS E JUSTIFICATIVAS	42
2.1) Objetivo Geral	42
2.2) Objetivo Específico	42
3. METODOLOGIA	43
3.1) Delineamento Experimental	43
3.2) Obtenção das Amostras	44
3.3) Separação de Neutrófilos	44
3.4) Contagem Celular	46
3.5) Viabilidade Celular em Nigrosina	46
3.6) Pureza da Amostra (morfologia).	47
3.7) Estimulação dos Neutrófilos <i>in vitro</i>	47
3.8) Teste de produção de ROS por Citometria de Fluxo	48
3.9) Teste de Viabilidade por Citometria de Fluxo	48
3.10) Citometria de Fluxo	49
3.11) Lise de Neutrófilos	49
3.12) Dosagem de Proteínas (Método Bradford)	50
3.13) Focalização Isoelétrica (IEF ou 1ª Dimensão)	50
3.14) Etapa de Equilíbrio	51
3.15) Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE ou 2ª Dimensão)	51
3.16) Coloração de Prata de Alta Sensibilidade	52
3.17) Digitalização e Secagem dos Géis	52
3.18) Análise Computacional das Imagens dos Géis	53
3.19) Análise Estatística.	55
3.20) Digestão de <i>spots</i> protéicos	56
3.21) Espectrometria de massa (MALDI)	57
4. RESULTADOS DISCUSSÃO	58

4.1) Separação dos neutrófilos	58
4.2) Estimulação dos neutrófilos pelo PAF <i>in vitro</i>	60
4.3) Produção dos géis bidimensionais	63
4.4) Análise dos géis	65
4.5) Identificação de proteínas	73
4.6.1) Vimentina	82
4.6.2) Tubulina	83
4.6.3) Proteína de fusão solúvel NSF <i>alfa</i> (SNAP- α)	84
4.6.4) Anexina	86
4.6.5) Proteína relacionada a actina Arp 2/3 complexo de subunidade 5	87
4.6.6) Proteínas da família S100	88
4.6.7) Outras identificações	90
5. CONCLUSÕES	95
6. PERSPECTIVAS	96
7. REFERÊNCIAS	98
8. ANEXOS	109

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Classificação dos leucócitos	01
Figura 2: Defesa imune inata mediada por neutrófilos	02
Figura 3: Modelo proposto de apoptose espontânea dos neutrófilos	07
Figura 4: Esquema das moléculas de adesão entre neutrófilos e endotélios.	11
Figura 5: Esquema do neutrófilo fagocitando microorganismo	13
Figura 6: Formação dos grânulos durante estágios de maturação dos neutrófilos	14
Figura 7: Esquema do complexo NADPH oxidase dissociado nos neutrófilos em repouso	21
Figura 8: Proposta de estimulação dos neutrófilos	23
Figura 9: Esquema da ativação dos neutrófilos	25
Figura 10: Estrutura do PAF e suas modificações	26
Figura 11: Esquema da biossíntese do PAF	28
Figura 12: Esquema de estimulação do PAF.	30
Figura 13: Vias de estimulação dos neutrófilos estimulados pelo PAF	33
Figura 14: Configuração de um citômetro de fluxo	36
Figura 15: Reação de oxidação da 1,2,3 dihidrorodamina (DHR)	38
Figura 16: Molécula de Iodeto de propídeo	38
Figura 17: Câmara de Neubauer	46
Figura 18: Esquema geral do pareamento	54
Figura 19: Gráficos citométricos da viabilidade celular de neutrófilos	59
Figura 20: Gráficos citométricos da estimulação e ativação dos neutrófilos sem Cálcio e Magnésio	61
Figura 21: Gráficos citométricos da estimulação e ativação dos neutrófilos com Cálcio e Magnésio	61
Figura 22: Quantidade de neutrófilos que apresentaram ativação	62
Figura 23: Intensidade fluorescência da DHR	62
Figura 24: Géis bidimensionais com 50µg de proteínas em pH ácido de 4-7	64
Figura 25: Gel bidimensional de neutrófilos quiescentes com 300µg de proteínas corado com prata de alta sensibilidade	65
Figura 26: Géis bidimensionais após a comparação e análise estatística	67
Figura 27: Géis bidimensionais após a comparação e análise estatística	68
Figura 28: Gel bidimensional de pH ácido de 4-7 de neutrófilos quiescentes	75

Figura 29: Modelo de fusão entre membranas	85
Figura 30: Modelo proposto para regulação dos filamentos de actina na migração dos neutrófilos	88
Figura 31: Modelo do complexo mitocondrial F1 produzindo ATP com o transporte de H^+	91
Figura 32: Esquema de degradação de proteína pelo proteassoma	93

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Reagentes e soluções para montagem do gradiente	44
Tabela 2: <i>Spots</i> com expressão aumentada na condição PAF	69
Tabela 3: <i>Spots</i> com expressão diminuída na condição PAF	71
Tabela 4: <i>Spots</i> com expressão aumentada na condição PAF que segue os três critérios	72
Tabela 5: <i>Spots</i> com expressão diminuída na condição PAF que segue os três critérios	73
Tabela 6a: <i>Spots</i> identificados com expressão diferencial	76
Tabela 6b: Proteínas identificadas com expressão diferencial	76
Tabela 7: Proteínas identificadas	77

SIGLAS E ABREVIACÕES

2DE: Eletroforese bidimensional.

↓ ψ m: Perda de potencial de membrana.

ACTB: actina beta.

ACTG: actina gama.

ADP: Adenosina 5-difosfato.

AgNO₃: Nitrato de prata

Akt ou PKB: Proteína quinase B.

ALI: Lesão pulmonar aguda.

AMP: Adenosina monofosfato.

APRT: proteína adenina fosforibosil transferase.

ARDS: Síndrome da angústia respiratória do adulto.

Arp2/3 : complexo nucleador de actina.

ATP: Adenosina 5-trifosfato.

Az. Gr.: Grânulos azurofílicos.

Bad: proteína pro-apoptóticas.

Bak: proteína pro-apoptóticas.

Bax: proteína pro-apoptóticas.

Bcl-2: proteína anti-apoptótica.

BC: Bastonetes.

Bid: proteína pro-apoptóticas.

BPI: Proteína de alta permeabilidade bactericida.

Br⁻: Bromo.

C3b: Fração do sistema complemento C3b.

C3bi: Fração do sistema complemento C3bi.

C3i: Fração do sistema complemento C3i.

C5a: Fração C5a do sistema complemento.

Ca²⁺: Cálcio.

CD4⁺: Linfócitos T auxiliares.

CD8⁺: Linfócitos T citotóxicos.

CD14: Receptor para LPS.

CD16; Fc γ RIIIb: Receptor de porção Fc de IgG RIIIb.

CD63: Antígeno presente na membrana do grânulo azurofílico.

CD68: Antígeno presente na membrana do grânulo azurofílico.

CD95: Receptor apoptótico.

Cdc42: Proteína que compõe o complexo NADPH oxidase.

Células T: Linfócitos do timo.

CGD: Doença crônica granulomatosa.

cGMP: guanosina monofosfato cíclica.

CISM: Complexo de indução a morte.

Cl⁻: Cloro.

CLP: proteína coatisina-like.

CoA: Coenzima A.

CPA: Coloração Prata de Alta Sensibilidade.

cPLA₂: Fosfolipase A₂ citosólica.

CR1: Receptor de complemento 1.

CR3: Receptor de complemento 3.

Cu⁺⁺: Cobre.

DAG: diacilglicerol.

DC: Células dendríticas.

DHR: 1,2,3 dihidrorodamina.

DNA: Ácido desoxirribonucléico.

DTT: Ditioneitol.

EDTA: Ácido etilenodiaminotetraacético.

EGF: fator do grupo epidermal.

EHD2: domínio EF-hand 2.

eIF5A: fator 5A-1 de início de tradução em células eucarióticas.

ESL-1: Receptor neutrofilico para E-selectina.

FADD: Domínio de morte associado a Fas.

Fas: Receptor de morte.

FasL: Ligante do Fas.

Fc: Fragmento cristalizável (receptores para anticorpos).

FcγIII: Receptor de porção Fc de IgG III.

Fe⁺⁺: Ferro.

FL1: Canal receptor de fluorescência lateral 1.

FL2: Canal receptor de fluorescência lateral 2.

fMLP : formil peptídeo met-leu-phe.

FSC: *Forward Scatter Cell* (tamanho celular).

G-CSF: fator de crescimento estimulador de colônia de granulócito.

GDP: Guanosina difosfato.

GEF: Fator de intercâmbio do nucleotídeo guanina.

Gel. Gr.: Grânulos de gelatinase.

GMCSF: fator de crescimento estimulador de colônia de granulócito e macrófago.

GST-P: Glutation S-transferase-P.

GTP: Guanosina trifosfato.

H₂O₂: peróxido de hidrogênio.

HBSS: Solução balanceada de sais.

hCAP-18: Catelicidina.

HCCA: ácido-ciano-4-hidroxicinâmico.

HOCl: ácido hipoclororoso.

HSC 70: choque térmico cognato 71 kDa.

I: Iodo.

ICAM-1; CD45: Antígeno associado a função dos linfócitos 1.

IEF: Focalização isoeletrica.

IgE: Imunoglobina E

IL-1 α : Interleucina 1 *alfa*.

IL-8: Interleucina 8.

IL-18: Interleucina 18.

IMPase: proteína inositol monofosfatase.

inositol-P₂: inositol 4,5 bisfosfato.

InsP₃: inositol 1,4,5 trifosfato.

IP₃: inositol trifosfato.

IPG: gradiente imobilizado de pH.

LAMP 1 e 2 : proteínas de membrana 1 e 2 associadas ao lisossomo.

LFA-1; $\alpha_L\beta_2$; CD11a/CD18: Antígeno associado a função leucocitária 1.

liso-PAF: 1-alkuil-2liso-glicero-3-fosfolina.

LPC: Lisofosfatidilcolina.

LPS: Lipopolissacarídeo.

LTB₄: Leucotrieno B₄.

Mac-1; $\alpha_M\beta_2$; CD11b/CD18: Antígeno de macrófago 1.

MALDI: matrix assistida pelo *laser* dessorção e ionização.

MAPK: Proteína quinase de ativação mitogênica.

MB: Mieloblasto.

MC: Mielócito.

Mg²⁺: Magnésio.

MM: Metamielócitos.

MMP-8: metaloproteases-8.

MMP-9: gelatinase.

MMP-25: leucolisina.

MPO: Mieloperoxidase.

NaCl: Cloreto de sódio.

NaOH: Hidróxido de sódio.

NADPH: forma reduzida do dinucleotídeo nicotinamida-adenina.

NBT: Nitro blue tetrazolium.

NGAL: Neutrófilos associados a gelatinase lipocalina.

NH₄CO₃: Bicarbonato de amônio.

NH₄OH: Hidróxido de amônio.

Nramp-1: Proteína associada a resistência natural dos macrófagos 1.

NSF: N-etilmaleimide-sensitive.

N-WASP: Proteína syndrome neuronal Wiskott-Aldrich.

O₂⁻: Ânion superóxido.

Opz: Zimosan opsonizado.

PA: Proteína quinase ativada.

PA28beta ou psem2: complexo de ativação do proteassoma.

PAF: fator de agregação plaquetária.

PAFR: receptor PAF.

PBS: Tampão salina fosfato.

PECAM-1; CD31: molécula de adesão de plaquetas e células endoteliais 1.

PDI: proteína disulfide-isomerase.

PGE2: prostaglandinas E2.

PGI2: prostaciclina.

Phox: produto gênico fosforilado que compõe uma oxidase de fagócitos.

pI: ponto isoelétrico.

PI: Iodeto de propídeo.

PI3K: Fosfoinositol 3-quinase.

PKC: Proteína quinase C.

Plasma PAF-AH: acetilhidrolase hidrofóbica presente no plasma.

PLC: Fosfolipase C.

PM: Promielócito.

PMA: 13-acetato de fobol éster 12-miristato.

PMF: *peptide mass finger print* (impressão digital do mapa peptídico).

PMN: Polimorfonuclear.

PSA: Persulfato de Amônio.

PSGL-1: Receptor neutrofilico para P-selectina.

PtdinsP₂: fosfatidilinositol 4,5 bisfosfato.

Rab: Proteína associada ao transporte de moléculas pela membrana.

Rac2: Proteína que compõe o complexo NADPH oxidase, ligada a RhoGDP.

Raf-1: Proteína da superfamília Rap das pequenas GTPase.

Rap1: Família GTPase.

Ras: Proteína da superfamília Ras das pequenas GTPase.

RHO GDI 1 e 2: Inibidor da RhoGDP 1 e 2.

Rho-GDP: Proteína ligada a GDP.

RM: Receptor de morte.

RNS: Espécies reativas de nitrogênio.

ROS: Espécies reativas de oxigênio.

S100: Proteína que liga-se a cálcio.

SDS: dodecil sulfato de sódio.

SH3: Domínio homólogo a Src.

SNARE: Receptor SNAP [Proteína de fusão solúvel NSF (N-etilmaleimide-sensitive)].

SNAP: Proteína de fusão solúvel NSF(N-etilmaleimide-sensitive).

SOD: Enzima dismutase.

Spec. Gr.: Grânulos específicos.

SSC: *Side Scatter Cell* (complexidade interna).

TEMED: N,N,N,N tetramethyl enediamine.

TFA: Ácido tricloroacético.

TLR: Receptores Toll-like.

TNF- α : Fator de necrose tumoral *alfa*.

TNFR1: Receptor 1 do fator de necrose tumoral *alfa*.

TOF: Tempo de voo.

TRAIL: receptores relacionados ao TNF ligados a apoptose.

TxA2: tromboxano A2.

V-ATPase H⁺: Proteína ATPase H⁺ tipo vacuolar.

VCAM-1: Molécula de adesão vascular.

VLA-4; $\alpha_4\beta_1$: antígeno muito tardio-4 (integrina).

VLA-5; $\alpha_5\beta_1$: antígeno muito tardio-5 (integrina).

VLA-6; $\alpha_6\beta_1$: antígeno muito tardio-6 (integrina).

VLA-9; $\alpha_9\beta_1$: antígeno muito tardio-9 (integrina).

1. INTRODUÇÃO

A resposta imunológica conta com a participação de diferentes tipos de células e inúmeros fatores que desencadeiam processos de ativação e modulação. As principais células da resposta imunológica são os leucócitos, que estão divididos segundo características do citoplasma em: granulócitos e agranulócitos. Os granulócitos compreendem os neutrófilos, eosinófilos e os basófilos, todos chamados de polimorfonucleares (PMN) pela estrutura nuclear. Os agranulócitos são os monócitos e os linfócitos (Figura 1) (Scroferneker, ; Vilela, 2007).






Classificação dos leucócitos					
Granulócitos (apresentam grânulos no citoplasma)			Agranulócitos (não apresentam grânulos no citoplasma)		
					
	Neutrófilo	Eosinófilo	Basófilo	Linfócito	Monócito
Característica geral	Núcleo geralmente trilobulado.	Núcleo bilobulado	Grânulos citoplasmáticos muito grandes, chegando a mascarar o núcleo.	Núcleo muito condensado, ocupando quase toda a célula.	Núcleo em forma de rim ou ferradura
Nº aproximado em cada mm³	4.800	240	80	2.400	480

Figura 1: Classificação dos leucócitos (Vilela).

Os neutrófilos são os leucócitos mais numerosos do sangue periférico compreendendo cerca de 40% a 70% em condições normais. A vida média desta célula na circulação é de 6 a 10 horas, porém, após a ativação e migração para o tecido, a vida média passa a ser de 2 a 6 dias, retardando assim, a apoptose. Ativação dos neutrófilos ocorre após algum estímulo e possibilita a migração celular para o local da inflamação e a destruição do patógeno, sendo esse mecanismo de ativação fundamental na imunidade inata (Kuijpers, 2001).

O sistema imune controla uma série de células que tem a finalidade de defender o organismo. Os neutrófilos participantes desse processo (células efectoras), migram rapidamente para o local da infecção ou injúria, após a detecção de sinais quimioatraentes. A migração é orientada em direção ao gradiente quimiotático, que atrai

a célula para o rolamento sobre o endotélio, adesão e diapedese e guia a movimentação do neutrófilo no tecido (Wagner e Roth, 2000; Theilgaard-Monch, Porse *et al.*, 2006). Ao chegar ao local injuriado, o neutrófilo reconhece o agente causador da injúria por receptores de membrana, fazendo com que haja o engolfamento da partícula ou microorganismo e sua conseqüente destruição por meio das espécies reativas de oxigênio (ROS) e proteínas proteolíticas e antimicrobianas. Após esse processo, os neutrófilos sofrem apoptose e são fagocitados pelos macrófagos (Figura 2) (Theilgaard-Monch, Porse *et al.*, 2006).

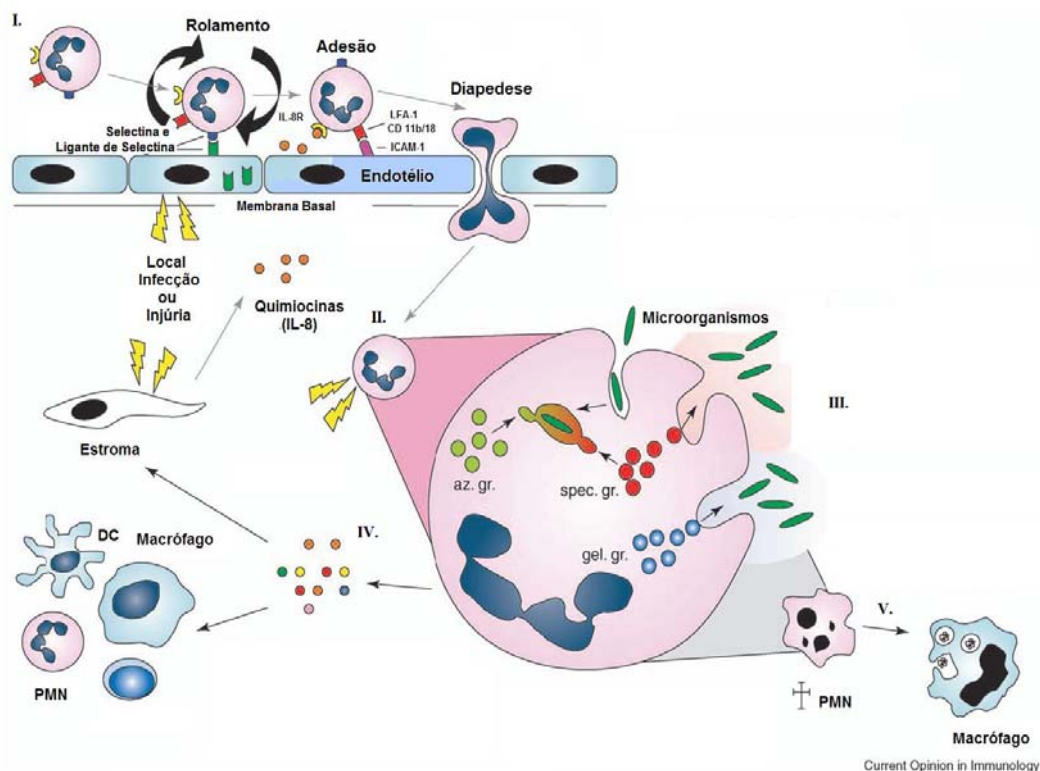


Figura 2: Defesa imune inata mediada por neutrófilos em resposta à infecção ou injúrias. I. Saída do neutrófilo da circulação sanguínea (rolamento, adesão e diapedese); II. Ativação do neutrófilo; III. Fagocitose, destruição, degradação, liberação de espécies reativas de oxigênio (exocitose); IV. Liberação de citocinas com conseqüência ativação de outras células e V. Apoptose dos neutrófilos e fagocitose dos neutrófilos pelos macrófagos. Abreviaturas: az.gr.-grânulos azurofílicos, spec. gr.-grânulos específicos, gel. gr.-grânulos de gelatinase, ICAM-1-antígeno associado a função dos linfócitos 1, LFA-1-antígeno associado a função leucocitária, DC-células dendríticas e PMN-polimorfonuclear neutrófilo. Modificado a partir de Theilgaard-Monch, Porse *et al.*,2006.

A primeira fase da resposta inflamatória é a liberação de quimiotáticos, tais como: C5a, mediadores lipídicos e quimiocinas pelos macrófagos, células teciduais, células-T e bactérias. As quimiocinas são induzidas por citocinas pró-inflamatórias liberadas por tecidos, macrófagos, células-T e bactérias, após a invasão de um microorganismo ou partículas ou após a lesão tecidual. A quantidade e a duração da reação inflamatória depende do estímulo recebido pelas células pró-inflamatórias. Essas diferenças são percebidas na adesão, nos tipos de quimioatraentes liberados, nas diferentes expressões de receptores, nos tipos leucocitários envolvidos, na liberação dos grânulos, na presença ou ausência da fagocitose e na regulação da apoptose (Kuijpers, 2001).

Durante a infecção bacteriana, o lipopolissacarídeo (LPS) e o formil-metionil-leucil-fenilalanina (fMLP) são os agentes ativadores dos neutrófilos realizando a função de quimioatraentes. Quando os neutrófilos chegam ao local da infecção, as bactérias geralmente estarão opsonizadas, o que orienta os neutrófilos a realizar a fagocitose rapidamente, destruindo-as. Logo em seguida, ocorre a apoptose dos neutrófilos. Em uma inflamação sem infecção, outras quimiocinas, como fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucinas, fator de agregação plaquetária (PAF), são liberadas pelos tecidos e leucócitos após injúrias teciduais, ocorrendo a quimiotaxia e a liberação dos grânulos sem a fagocitose. Nos dois tipos de processo inflamatório (infeccioso ou não), o equilíbrio entre recrutamento, liberação de substâncias tóxicas e apoptose dos neutrófilos é de fundamental importância para que o agente inflamatório seja erradicado e a resposta seja gradualmente interrompida. Algumas doenças são agravadas pela perda desse equilíbrio, como bacteremia, que pode evoluir a choque séptico; a coagulação intravascular disseminada, ou a isquemia seguida de reperfusão que pode evoluir para a síndrome da resposta inflamatória sistêmica, que, por sua vez, pode apresentar como complicação a síndrome da angústia respiratória aguda e como possível consequência a síndrome da disfunção de múltiplos órgãos (Kuijpers, 2001).

1.1) Fases de maturação

Neutrófilos são gerados pelas células hematopoiéticas localizadas na medula óssea e sua maturação dura cerca de 2 semanas. O primeiro precursor mielóide reconhecido é o mieloblasto, em seguida, promielócito, mielócito, metamielócito, bastonetes e segmentados. Os grânulos dos neutrófilos são formados no estágio de maturação marcado pela transição de mieloblasto a promielócito, passando a seguir à formação das

proteínas granulares, que dura até o estágio de segmentado. Os mieloblastos têm um grande núcleo com cromatina frouxa ocupando quase todo o citoplasma, e pouco ou nenhum grânulo. Nessa fase, os grânulos estão sendo processados no Complexo de Golgi. No estágio de promielócitos, há a formação dos grânulos azurófilos contendo elastase, catepsina G e proteinase 3. Na fase de mielócito, ocorre a formação de grânulos específicos. Da fase de metamielócito até a de segmentado, observa-se a mudança do núcleo característico do neutrófilo (Borregaard e Cowland, 1997; Kuijpers, 2001; Bjerregaard, Jurlander *et al.*, 2003; Theilgaard-Monch, Porse *et al.*, 2006).

Os fatores de crescimento estimuladores de colônia de granulócitos e de macrófagos-granulócitos (G-CSF e GMCSF) estimulam a proliferação de progenitores mielóides, eritróides e megacariócitos em condições normais. Após 2 dias da maturação completa dos neutrófilos na medula óssea, ocorre a liberação para circulação sanguínea. Em processo inflamatório, o GMCSF regula a quantidade de neutrófilos, acelerando a proliferação de novos progenitores mielóides. Essa liberação pode resultar no aparecimento de neutrófilos em forma de bastonetes na circulação. No entanto, no estágio de recuperação de um grande trauma e queimaduras foi observada a diminuição da proliferação dos progenitores dos PMN, provavelmente pela diminuição de agentes quimiotáticos, liberados pelos tecidos injuriados que foram substituídos por tecidos saudáveis (Botha, Moore *et al.*, 1995; Hill, Naama *et al.*, 1995; Kuijpers, 2001).

1.2) Ativação dos neutrófilos

A resposta inflamatória é um processo complexo que ativa uma série de células, principalmente células do sistema imune. Os neutrófilos, células efetoras da resposta inflamatória, têm sido bastante estudados. Esses estudos têm demonstrado que os neutrófilos são ativados, mas que, na sua grande maioria, essas células passam por uma fase de estimulação, uma fase intermediária entre repouso e ativação, evidenciando que a transição entre esses estados não ocorre de forma “tudo ou nada”. Os autores concordam com a existência de três fenótipos distintos: repouso ou quiescente, estimulado e ativado (Botha, Moore *et al.*, 1995; Swain S.D. , 2002; Sheppard, Kelher *et al.*, 2005).

Os neutrófilos quiescentes são aqueles que circulam livremente na corrente sanguínea, não aderem ao endotélio e possuem a morfologia arredondada. O fenótipo estimulado é observado na primeira etapa de um processo inflamatório. Os neutrófilos expõem receptores para que ocorra a adesão e, posteriormente, a diapedese entre as

células endoteliais, produzindo poucos radicais de oxigênio e a sua morfologia é modificada para que ocorra a migração. Vários agentes estimulam os neutrófilos, tais como PAF, fMLP, TNF- α , GMCSF e LPS em baixas concentrações. No estado ativado, todos os processos que ocorrem nos neutrófilos estimulados são percebidos, porém em maior intensidade, além de ocorrer a fagocitose. Alguns ativadores neutrofilicos podem ser também estimuladores como fMLP, LPS e PMA, tendo como diferença a concentração para a produção de seus efeitos. O PMA é considerado o ativador mais potente, pois ativa os neutrófilos ao máximo (Botha, Moore *et al.*, 1995; Siddiqui, English *et al.*, 1995; Vulcano, Alves Rosa *et al.*, 1998; Swain S.D. , 2002; Sheppard, Kelher *et al.*, 2005).

Os fenótipos podem ser considerados estágios pelos quais os neutrófilos passam para chegar à ativação total. Isso é percebido quando temos um estado estimulado e o neutrófilo encontra mais um estímulo que torna ele ativado. Também é possível o retorno ao estado quiescente a partir do estado estimulado (Botha, Moore *et al.*, 1995; Kitchen, Rossi *et al.*, 1996).

1.3) Apoptose

Apoptose é uma forma de morte celular programada que serve como regulação para processos biológicos. Os neutrófilos são produzidos em média de $1-2 \times 10^{11}$ células/ dia com meia-vida na circulação sangüínea de 6 a 10h. Alguns autores são divergentes quanto à quantidade de produção, referindo 5×10^{10} e meia-vida de até 36 horas, antes da apoptose espontânea (Moulding, Quayle *et al.*, 1996; Scheel-Toellner, Wang *et al.*, 2004).

Na inflamação, o processo de apoptose é retardado e o neutrófilo realiza a migração, desgranulação e fagocitose, só então inicia o processo de apoptose, com o aparecimento de vesículas apoptóticas (apoptosoma), externalização da fosfatidilserina e fagocitose das vesículas apoptóticas pelos macrófagos. O correto controle da apoptose nos neutrófilos é de vital importância para renovação dos neutrófilos circulantes, para eficiência na remoção dos agentes patogênicos e na resolução da resposta inflamatória (Corcoran, Fix *et al.*, 1994; Moulding, Quayle *et al.*, 1996; Kuijpers, 2001; Scheel-Toellner, Wang *et al.*, 2004; Theilgaard-Monch, Porse *et al.*, 2006).

A apoptose pode ser iniciada por dois caminhos: intrínseco e extrínseco. O caminho intrínseco (caminho mitocondrial) acontece pela ativação das caspases, ativação do

complexo de indução à morte (CSIM) e o aparecimento do apoptosoma. O CSIM que está ligado internamente à FADD (Faz-associated death domain) ativa a caspase 8 que decompõe a proteína Bcl-2 expondo o domínio BH3, o Bid é gerado, levando à perda do potencial de membrana das mitocôndrias. A despolarização da membrana mitocondrial e a presença de fatores intrínsecos, como a clivagem de proteínas anti-apoptóticas (como Bcl-2), a liberação de ROS e liberação de proteínas pró-apoptóticas (como citocromo c, Bax, Bid, Bak e Bad) causam danos ao DNA e formação do apoptossoma (Figura 3). Estudos mostram que a ativação das caspases no caminho intrínseco é espontânea (Fadeel, Zhivotovsky *et al.*, 1999; Scheel-Toellner, Wang *et al.*, 2004).

O fator extrínseco é desencadeado por receptores apoptóticos como receptor relacionado ao TNF ligado a indução da apoptose (TRAIL); receptor 1 do fator de necrose tumoral α (TNFR1) e receptor de morte (RM). Por exemplo, a ligação de CD95 ao receptor de morte montado após estimulação intracelular por ROS induz a formação do CSIM [complexo de sinalização da indução à morte (associação do Fas ao seu ligante - FasL)] e a ativação das caspases, principalmente, caspase 8 e 10. A ativação das caspases pelos fatores extrínsecos produz os mesmos resultados da ativação por fatores intrínsecos já descritos (Figura 3) (Akgul, Moulding *et al.*, 2001; O'Neill, Greenan *et al.*, 2004; Scheel-Toellner, Wang *et al.*, 2004).

Estudos com o bloqueio dos receptores conhecidos, como anti-Fas, anti-TRAIL e anti-TNF α , inibindo a apoptose extrínseca têm demonstrado a não prevenção da apoptose espontânea, sugerindo que a apoptose desencadeada pelo caminho intrínseco, seja a principal causa da apoptose espontânea (Scheel-Toellner, Wang *et al.*, 2004).

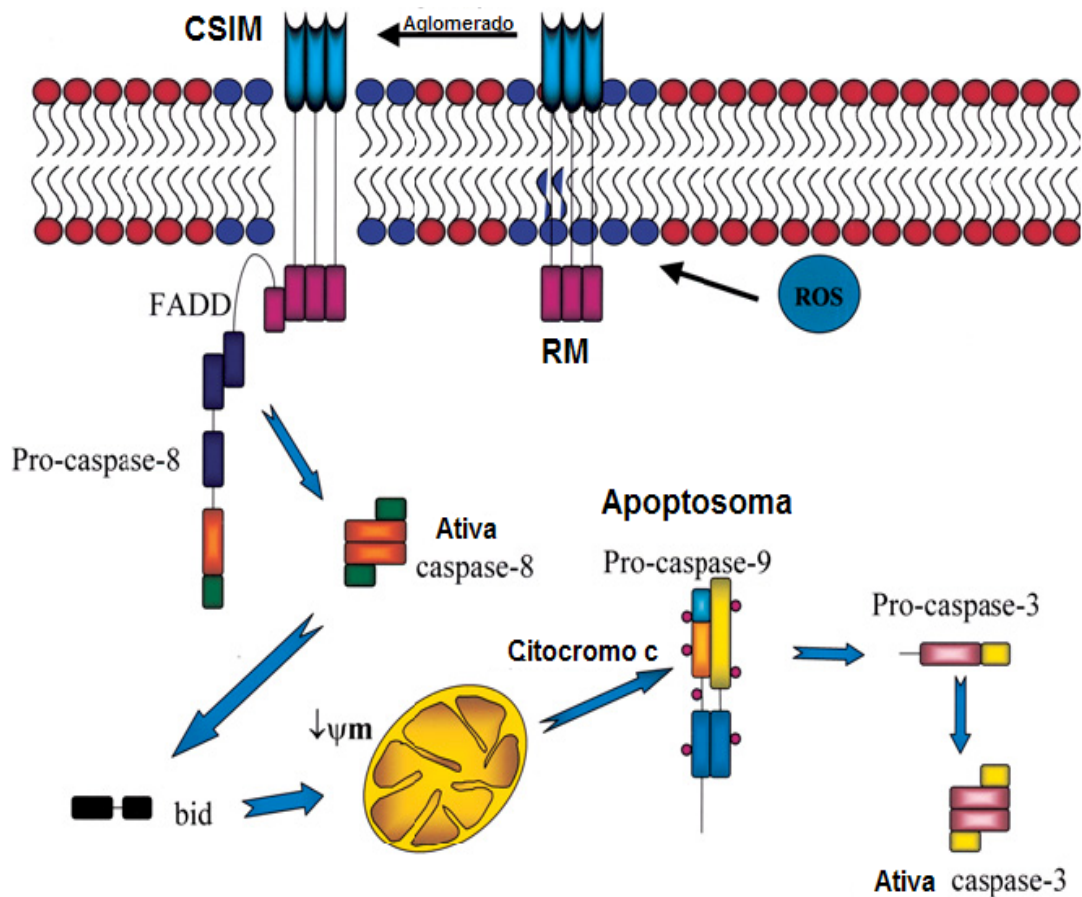


Figura 3: Modelo proposto de apoptose espontânea dos neutrófilos. A ativação das caspases e o acúmulo de ROS intracelular leva à geração de aglomerados de Receptores de Morte (RM), ativação da CISM, perda do potencial de membrana das mitocôndrias ($\downarrow\psi_m$) e liberação do citocromo c, com a formação do apoptossoma. Modificado a partir de Scheel-Toellner, Wang *et al.*, 2004.

Durante o processo inflamatório ocorre o retardo da apoptose, prolongando a vida média dos neutrófilos de 10-36 horas para 6 dias. Esse retardo é induzido durante o processo de inflamação ou por mediadores como fMLP, LPS, PAF e GM-CSF e está associado à inibição das caspases. Estudos mostram que o LPS e GM-CSF estabilizam a membrana da mitocôndria. A migração e a liberação de ROS em pequenas quantidades também inibe a apoptose, mas estudos mostram que quantidades elevadas de espécies reativas de oxigênio promovem a apoptose (Akgul, Moulding *et al.*, 2001; Kuijpers, 2001; Lotz, Aga *et al.*, 2004; O'Neill, Greenan *et al.*, 2004).

No processo de apoptose, após a finalização do processo de inflamação, forma-se o apoptossoma nos neutrófilos que externalizam fosfatidilserina, o que faz com que ele seja fagocitado pelos macrófagos. Pouco ainda se sabe sobre o equilíbrio entre apoptose, inflamação e fagocitose de patógenos. Dessa forma ainda persistem perguntas a respeito

dos neutrófilos na síndrome da angústia respiratória do adulto, onde o retardo na apoptose dos neutrófilos prolonga a causa do dano ao tecido pulmonar (Matute-Bello, Liles *et al.*, 1997; Akgul, Moulding *et al.*, 2001).

1.4) Mecanismo de estimulação e ativação dos neutrófilos

O estado estimulado, comumente conhecido como *primed*, é uma etapa que potencializa uma futura ativação dos neutrófilos. Muitos agentes são estimuladores de neutrófilos, tais como citocinas, mediadores lipídicos, grupos de hormônios de crescimento celular, dentre outros. Os mais estudados são o LPS, liberado pelas bactérias Gram-negativas e o PAF, agente endógeno animal. O neutrófilo estimulado por PAF pode se tornar a célula efetora na patogênese de doenças, tais como síndrome da resposta inflamatória sistêmica, síndrome da angústia respiratória aguda e falência múltipla dos órgãos (Swain S.D. , 2002).

Na maioria dos processos inflamatórios é desencadeado primeiro o processo estimulatório dos neutrófilos (primeiro *hit*) e, em seguida, é atingido o estado ativado pela ligação de um segundo ativador, o que chamamos de segundo *hit*. Na patogênese de inflamação, injúrias teciduais e falência múltipla dos órgãos e, mais especificamente, no trauma é encontrada a estimulação endógena por PAF, entre 3 a 6 horas após o trauma e permanência de até 24 horas. Na estimulação, ocorre a ativação da montagem do complexo NADPH oxidase e liberação de pequenas quantidades de radicais de oxigênio (desgranulação); exposição de moléculas de adesão ao endotélio, conseqüente migração; produção e liberação de lipídeos bioativos; regulação de receptores de superfície; polimerização de actina; eventos de fosforilações; ativação de sinais de tradução de proteínas e mudança na taxa de apoptose (Botha, 1995; Lee, Hybertson *et al.*, 2002; Swain S.D. , 2002).

O segundo *hit* pode ser produzido pela ligação de LPS ou fMLP (produtos bacterianos) ao receptor específico ativando os neutrófilos com conseqüente intensificação da produção e liberação de espécies reativas de oxigênio e da fagocitose (Botha, 1995).

A conseqüência desse processo em dois *hits* é o prolongamento do processo inflamatório mesmo na ausência ou a distância do desencadeante (lesão ou infecção) podendo causar danos teciduais graves e levar à síndrome da angústia respiratória e conseqüente falência múltipla dos órgãos (Botha, 1995).

1.4.1) Receptores de adesão e migração dos neutrófilos

Os neutrófilos possuem uma grande diversidade de receptores, dentre eles estão receptores acoplados à proteína G, onde PAF e fMLP se ligam produzindo, respectivamente, estimulação e ativação; receptores *Toll-like*, principalmente o receptor 4, onde liga-se o LPS e receptores associados a migração, fagocitose e apoptose (Becker, 1987; Aplin, Howe *et al.*, 1998; Andonegui, Bonder *et al.*, 2003; Fernandes, Passos *et al.*, 2005).

As moléculas quimioatraentes, como PAF, leucotrieno B₄ (LTB₄), fMLP e produto do sistema complemento C5a, induzem a expressão de moléculas de adesão em neutrófilos e células endoteliais, com conseqüente migração (Wagner e Roth, 2000; Kuijpers, 2001).

Os neutrófilos circulantes são estimulados ou ativados por algum quimioatraente e começam a se movimentar em direção ao gradiente quimiotático. Essa movimentação começa pela exposição de receptores (L-selectina, PSGL-1 e ESL-1) na membrana dos neutrófilos e são mediados por selectinas, conhecidas como L-selectina, P-selectina e E-selectina. A L-selectina exposta na membrana dos neutrófilos adere ao receptor sialomucina sulfatada no endotélio, assim como a P-selectina e a E-selectina exposta na membrana do endotélio aderem a receptores PSGL-1 e ESL-1, respectivamente, nos neutrófilos. Essas adesões são fracas, mas fundamentais para diminuir a velocidade dos neutrófilos sobre o endotélio. Esse processo é chamado de rolamento. Vários autores acreditam que, durante o rolamento, a L-selectina envia sinais de tradução que estão relacionados à mobilização de integrinas, que irão agir na adesão firme dos PMN ao endotélio, porém esse mecanismo ainda é desconhecido. As integrinas são externalizadas após a ativação e estimulação dos neutrófilos, conforme ilustrado na Figura 4 (Crockett-Torabi, 1998; Wagner e Roth, 2000; Burg e Pillinger, 2001).

As integrinas são grupos de glicoproteínas transmembrânicas encontradas nos PMN que intermediam a adesão célula-célula e adesão à matriz. A família das integrinas possui duas subunidades α e β . Existem 16 tipos de subunidades α e 8 tipos de subunidades β constituindo 23 receptores conhecidos. Na adesão firme do PMN ao endotélio, há a participação de duas integrinas: antígeno de macrófago 1 (Mac-1; $\alpha_M\beta_2$; CD11b/CD18) e antígeno associado à função dos linfócitos 1 (LFA-1; $\alpha_L\beta_2$; CD11a/CD18). Os ligantes endoteliais Mac-1 têm sítios de reconhecimento específicos para fibrinogênio, fator X de coagulação, heparina, LPS, proteína do complemento C3i

e glicosaminoglicano. Assim, o neutrófilo pode agir em várias situações durante uma inflamação, podendo ligar-se ao fibrinogênio e ao fator X da coagulação; agir em uma endotoxemia fagocitando, liberando radicais de oxigênio; ativar a cascata do complemento e aumentar a concentração de ligantes na membrana do endotélio. No endotélio, ocorre a exposição de moléculas de adesão como ICAM-1 (CD45) e 2 que se ligará a MAC-1 ou LFA-1, para a adesão firme. O ICAM-1 pode ativar o citoesqueleto das células endoteliais para que os neutrófilos sejam puxados, favorecendo a diapedese (Figura 4). Os PMN também podem expressar β_1 integrina (VLA-4) e ligar-se à VCAM-1 do endotélio, como demonstrado por estudos *in vitro* (Wagner e Roth, 2000; Burg e Pillinger, 2001).

O evento posterior à adesão firme é a diapedese (migração dos PMN entre as células endoteliais) e a transmigração (movimentação dos neutrófilos na matriz extracelular). Durante a diapedese os neutrófilos passam por um orifício que se abre entre 3 células endoteliais, sendo essa migração mediada pela molécula de adesão de plaquetas e células endoteliais 1 (PECAM-1; CD31) e ICAMs, como representado na Figura 4 (Su, Chen *et al.*, 2000; Wagner e Roth, 2000; Burg e Pillinger, 2001).

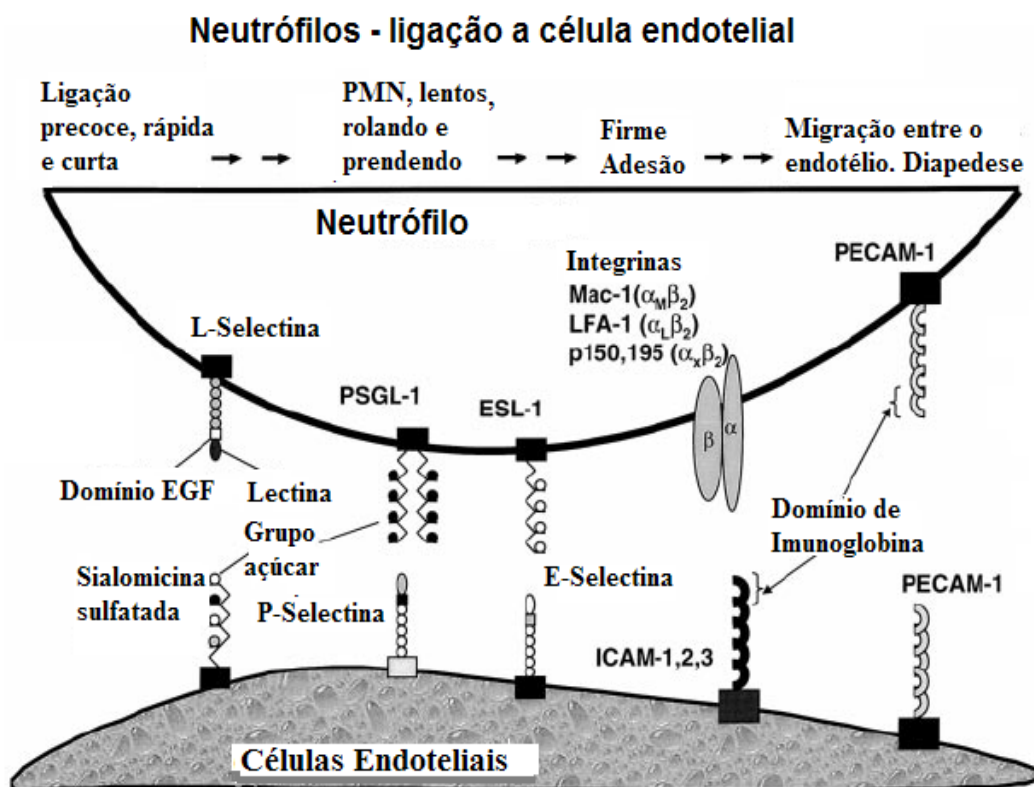


Figura 4: Esquema das moléculas de adesão entre neutrófilos e endotélio. Abreviaturas: fator do grupo epidermal (EGF), ligante glicoprotéico da P-selectina 1 (PSGL-1), ligante da E-selectina 1 (ESL-1). Modificado a partir de Wagner e Roth, 2000.

A transmigração é menos conhecida que a diapedese e a adesão, mas sabe-se que os leucócitos se ligam a componentes da matriz como colágenos, fibronectinas, vitronectinas e laminina via β_1 integrinas. As integrinas β_1 VLA-5 ($\alpha_5\beta_1$) e VLA-6 ($\alpha_6\beta_1$) ligam-se respectivamente a fibronectina e laminina (Su, Chen *et al.*, 2000; Wagner e Roth, 2000). A VLA-4 ($\alpha_4\beta_1$) e VLA-9 ($\alpha_9\beta_1$) interagem com a fibronectina e VCAM-1, também se ligam à proteína tenacina da matriz. Juntamente com as ligações das integrinas à matriz, o citoesqueleto do neutrófilo sofre modificações e polimerização levando à movimentação e os grânulos são liberados causando destruição parcial da matriz, permitindo a locomoção (Wagner e Roth, 2000; Cicchetti, Allen *et al.*, 2002).

1.4.2) Fagocitose

Ao chegar ao local da injúria, os neutrófilos reconhecem o patógeno ou tecido lesado, por meio de receptores e emitem prolongamentos de membrana, engolfando o agente. O engolfamento acontece com partículas opsonizadas e não opsonizadas. O reconhecimento e engolfamento de partículas opsonizadas são mediados por opsoninas, como imunoglobinas G e as frações do sistema complemento C3b e C3bi, que se ligam a receptores para Fc e subgrupos de β_2 integrinas nos neutrófilos. Também há a participação de ligantes ativadores de neutrófilos, como, por exemplo, receptores da família Toll (Toll-like; receptores TLR), TLR2 e TLR4, receptores de partículas e receptores de LPS, respectivamente (Lee, Harrison *et al.*, 2003; El-Benna, Dang *et al.*, 2005).

Durante o processo fagocítico, os neutrófilos emitem pseudópodos, com receptores que ligam os neutrófilos às partículas a serem fagocitadas, interiorizam essas partículas formando vesículas (fagossoma). Junto com esse processo são formados os complexos NADPH oxidase, que produzem radicais de oxigênio, e liberação de proteínas granulares dentro das vesículas levando à destruição do patógeno (Allen, 2003; Lee, Harrison *et al.*, 2003). Porém, antes mesmo do fagossoma estar fechado, tem início a desgranulação, podendo ocorrer o escape de espécies reativas de oxigênio e proteínas granulares para o meio extracelular. Assim, muitas partículas que os neutrófilos não conseguem engolfar, são destruídas por produtos secretados dos grânulos neutrofilicos para o meio extracelular. A secreção de grânulos pode ser estimulada por ativadores e estimuladores de neutrófilos, antes mesmo que ocorra a fagocitose (Figura 5) (Kuijpers, 2001).

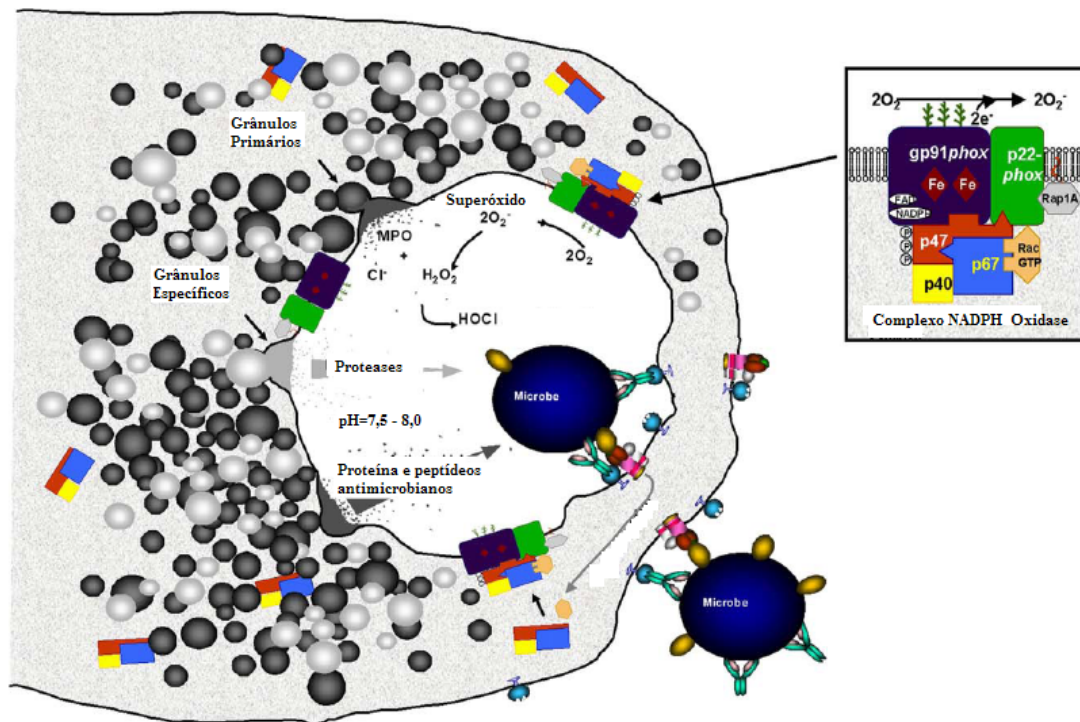


Figura 5: Esquema do neutrófilo fagocitando microorganismo. Fagocitose do microorganismo opsonizado, formando fagossomo. Montagem do complexo NADPH Oxidase na membrana do fagossoma produzindo ânion superóxido no lúmen do fagossoma. Grânulos específicos e azurofílicos (primários) liberando proteínas e peptídeos antimicrobianos e proteases. Grânulos azurofílicos liberando mieloperoxidase (Fernandes, Passos *et al.*) convertendo oxidantes primários em HOCl, altamente tóxico. Modificado a partir de Lee, Harrison *et al.*, 2003.

1.4.3) Grânulos

Os grânulos são formados durante a diferenciação mielóide na medula óssea. A formação se inicia no estágio de promielócito, com o aparecimento de grânulos contendo mieloperoxidase (Fernandes, Passos *et al.*), o que chamamos de grânulos peroxidase-positivo ou grânulos azurofílicos ou grânulos primários. A produção da MPO cessa na transição do estágio promielócito para mielócito e são formados os grânulos peroxidase-negativos, que se dividem em: grânulos específicos (secundários) e grânulos de gelatinase (terciários). Os grânulos específicos, principalmente os que contêm lactoferrina, são formados nos estágios de mielócitos e metamielócitos e os grânulos que contêm gelatinase são formados no estágio de bastonete e segmentados (Figura 6) (Borregaard e Cowland, 1997; Faurschou e Borregaard, 2003).

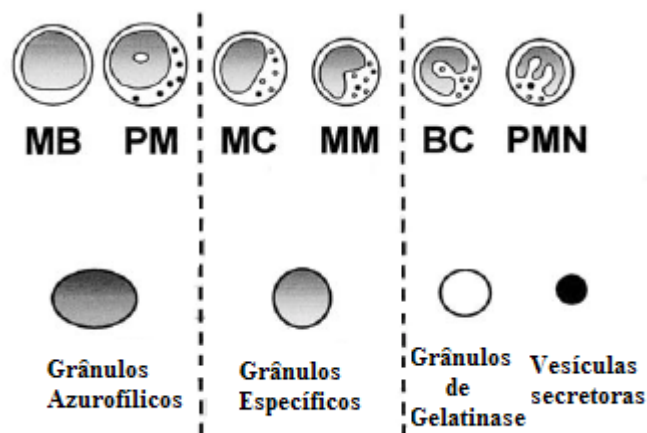


Figura 6: Formação dos grânulos durante estágios de maturação dos neutrófilos. mieloblasto (MB), promielócito (PM), mielócito (MC), metamielócito (MM), bastonete (BC) e polimorfonuclear (PMN). Modificado a partir de Faurschou, Sorensen *et al.*, 2002.

I - Grânulos Azurofílicos

Os grânulos azurofílicos contêm proteínas antimicrobianas. Na membrana granular encontramos antígenos CD63 (liberação dos grânulos), CD68 (endocitose ou tráfico lisossomal), presenilina 1 (ação proteolítica), estomatina (reguladora de íons) e H^+ ATPase tipo vacuolar (bomba de H^+). Os grânulos azurofílicos eram confundidos com lisossomos primários por apresentarem CD63, porém não apresentavam LAM-1 e LAM-2, componentes característicos dos lisossomos e tinham o CD68 em sua membrana, o que distinguiu os grânulos dos lisossomos primários. Os grânulos azurofílicos possuem grande heterogeneidade no tamanho, forma e componentes. Durante a mielopoiese, os grânulos são divididos em 2 conjuntos: os pobres em defensinas, produzidos no início da fase promielócito, e os ricos em defensinas, produzidos entre as fases promielócito/mielócito (Holness e Simmons, 1993; Borregaard e Cowland, 1997; Faurschou, Sorensen *et al.*, 2002; Faurschou e Borregaard, 2003; Mantegazza, Barrio *et al.*, 2004).

Muitas proteínas granulares são sintetizadas como pró-proteínas e sofrem proteólise no compartimento granular. Esses grânulos têm sua exocitose limitada na fase estimulatória dos neutrófilos. Acredita-se que sua ação principal seja a liberação dos seus componentes nos fagolisossomos, levando à destruição dos patógenos e que esses

mecanismos de formação e desgranulação dos componentes granulares azurofílicos sejam importantes para proteção dos neutrófilos da ação dos seus próprios grânulos (Faurischou e Borregaard, 2003).

A denominação dos grânulos azurofílicos de peroxidase-positivo é dada pela presença da mieloperoxidase, uma hemoproteína microbicida. A hemoproteína é liberada no fagossomo e, em pequena quantidade, no espaço extracelular, quando os neutrófilos estão ativados. A mieloperoxidase reage com peróxido de hidrogênio (H_2O_2), produzido pelo complexo NADPH oxidase, na presença de halogênios (Cl^- , Br^- , I^-), formando ácido hipocloroso (HOCl), outros produtos clorados, radicais tirosina e intermediários reativos de nitrogênio, aumentando a toxicidade do meio (Sorensen e Borregaard, 1999; Faurischou e Borregaard, 2003; El-Benna, Dang *et al.*, 2005).

A *alfa*-defensina, componente dos grânulos azurofílicos nos neutrófilos, contém 4 subunidades α -defensina ligadas. A defensina é sintetizada como uma pró-proteína e clivada no grânulo azurofílico. Ela age contra uma ampla variedade de bactérias, fungos, envelopes virais e protozoários. A defensina age na formação de poros transmembrânicos e, quando exocitada, induz a quimiotaxia de monócitos e células T $CD4^+$ e $CD8^+$ (Faurischou, Sorensen *et al.*, 2002; Faurischou e Borregaard, 2003). Outro potente antimicrobiano é a proteína de alta permeabilidade bactericida (BPI), que age principalmente contra bactérias Gram-negativas, ligando-se à parede lipídica das bactérias, causando danos à membrana e mediando a fagocitose (Faurischou, Sorensen *et al.*, 2002; Faurischou e Borregaard, 2003).

Os grânulos azurofílicos possuem três serino-proteases com ação microbicida (proteínase-3, catepsina G e elastase). Elas também possuem ação proteolítica contra a matriz extracelular tendo como substratos elastina, fibronectina, colágeno tipo IV, laminina e vitronectina. Também são encontrados vários inibidores de serino-proteases de neutrófilos no plasma, indício de regulação da ação dessas enzimas. Outro componente é azurocidina que aumenta a permeabilidade vascular durante o extravasamento dos neutrófilos (Campanelli, Detmers *et al.*, 1990; Borregaard e Cowland, 1997; Faurischou e Borregaard, 2003).

II – Grânulos Peroxidase-negativos

Os grânulos peroxidase-negativos compreendem os grânulos específicos e grânulos de gelatinase. Os grânulos específicos possuem componentes antimicrobianos, ao

contrário dos grânulos de gelatinase. Os grânulos de gelatinase são exocitados antes dos grânulos específicos, atuando na movimentação dos neutrófilos na matriz, pois esses grânulos são reservatórios de enzimas de degradação de matriz e de receptores de membrana que prendem os neutrófilos após a movimentação. Os grânulos específicos agem como antimicrobianos após a desgranulação no fagossomo e no meio extracelular. As proteínas que agem como antimicrobianos são: lactoferrina, hCAP-18, NGAL, lisozima, Nramp-1. Os grânulos peroxidase-negativos também possuem 3 metaloproteases chamadas de colagenase da matriz metaloprotease-8 (MMP-8), gelatinase (MMP-9) e leucolisina (MMP-25). Ambos os grânulos peroxidase-negativos possuem o complexo p22gp91^{PHOX} (citocromo b₅₅₈), componente do complexo NADPH oxidase, responsável pelo carregamento de elétrons na explosão respiratória. A principal proteína dos grânulos específicos é a lactoferrina, e dos grânulos gelatinase, a gelatinase, nome dado ao grânulo (Borregaard e Cowland, 1997; Sorensen e Borregaard, 1999; Faurschou e Borregaard, 2003).

III – *Vesículas Secretoras*

As vesículas secretoras são reservatórios de receptores associados à resposta inflamatória. A vesícula é mobilizada por uma grande variedade de estímulos inflamatórios, assim se liga à membrana plasmática expondo os seus componentes. Segundo Borregaard, a mobilização das vesículas secretoras se inicia durante o rolamento dos neutrófilos mediado pelas selectinas, participando ativamente na adesão ao endotélio. As vesículas secretoras são ricas em β_2 -integrina CD11b/CD18 (Mac-1/CR3); receptores 1 do sistema complemento (CR1); receptores de produtos bacterianos fMLP e LPS; CD14; Fc γ III receptor CD16 e metaloprotease leucolisina, mas não possuem proteínas de potencial tóxico (Borregaard e Cowland, 1997; Sorensen e Borregaard, 1999; Faurschou e Borregaard, 2003).

IV – *Mecanismo da Desgranulação*

Os mecanismos de mobilização dos diferentes grânulos neutrofilicos para a desgranulação são diferentes. As vesículas secretoras são facilmente exocitadas, seguidas pelos grânulos de gelatinase, específicos e azurofilicos. Durante a estimulação e ativação dos neutrófilos, quimioatratantes recrutam os neutrófilos ao local da

inflamação. Durante o rolamento dos neutrófilos sobre o endotélio, processo mediado pela L-selectina, E-selectina e P-selectina, vesículas secretoras são mobilizadas expondo β_2 -integrinas CD11b/CD18 na superfície do neutrófilo. A β_2 -integrina exposta participa do processo de firme adesão e diapedese dos neutrófilos (Borregaard e Cowland, 1997; Wagner e Roth, 2000; Faurschou e Borregaard, 2003). Durante o extravasamento dos neutrófilos, os grânulos de gelatinase liberam principalmente metaloproteases e colagenase, que desempenham o papel de degradação da membrana basal vascular. Durante a migração dos neutrófilos pelo interstício, grânulos específicos e azurofílicos são parcialmente excitados. Após a fagocitose, os grânulos específicos e azurofílicos liberam seu conteúdo dentro do fagossomo, contribuindo para destruição do patógeno. Estudos com a ativação dos neutrófilos pelo PMA mostram a liberação de grânulos de gelatinase, moderada exocitose de grânulos específicos e baixa exocitose de grânulos azurofílicos (Borregaard e Cowland, 1997; Faurschou e Borregaard, 2003).

O percurso entre sinalização e desgranulação não foi totalmente elucidado. Sabe-se que é necessária a presença do Ca^{2+} . Vários estímulos induzem o aumento do Ca^{2+} citosólico, incluindo L-selectina, CD11b/CD18, receptores de fMLP e PAF. Várias proteínas são dependentes de Ca^{2+} na ativação dos neutrófilos, como por exemplo anexinas I e XI, proteínas que agem na ligação da vesícula com a membrana plasmática e em altas concentrações de Ca^{2+} ocorre a fusão da vesícula à membrana. Outras proteínas encontradas são a lipocortina III, grancalcina que pode participar na reorganização da actina durante exocitose, diapedese e fagocitose e receptores SNARE, que regulam a desgranulação (Borregaard e Cowland, 1997; Sorensen e Borregaard, 1999; Faurschou e Borregaard, 2003).

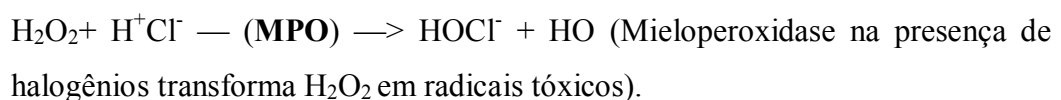
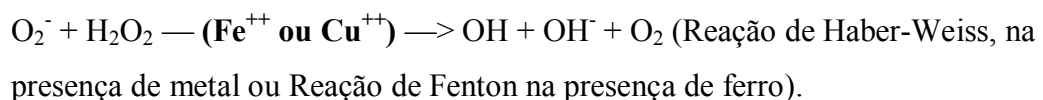
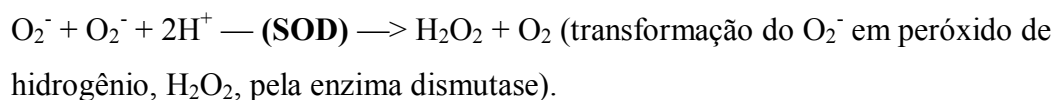
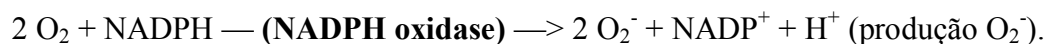
1.4.4) NADPH OXIDASE

Simultaneamente à desgranulação e à exocitose dos grânulos, um complexo associado à membrana é montado levando à produção de espécies reativas de oxigênio (Kuijpers, 2001). Esse complexo é chamado de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase (NADPH oxidase), constituído por grupo de enzimas associadas à membrana plasmática e de grânulos. NADPH oxidase está presente em fagócitos e linfócitos B e produz ânion superóxido (O_2^-), material primário a vários reativos oxidantes como halógenos oxidativos, radicais livres e oxigênio livre, num processo conhecido por explosão respiratória. Esse processo é de grande importância na

destruição de patógenos, porém, provoca danos teciduais. Sua importância foi descoberta graças à investigação da doença crônica granulomatosa (CGD), doença definida pela ausência da explosão respiratória em neutrófilos, e conseqüente pobreza na capacidade bactericida e morte por infecção. Também foram associadas lesões teciduais ao acúmulo de neutrófilos ativados, liberando espécies reativas de oxigênio, causando lesão pulmonar aguda (ALI) (Sheppard, Kelher *et al.*, 2005). Tais situações ressaltam a importância de se desenvolver mecanismos que permitam interferir na regulação do complexo NADPH oxidase (Babior, 1999).

Pesquisas ao longo dos anos mostram que o complexo é composto por 5 componentes: p40^{PHOX} (*PHOX*, *PHagocyte OXidase*), p47^{PHOX}, p67^{PHOX}, p22^{PHOX} e gp91^{PHOX}. Em células quiescentes, 3 componentes estão no citosol: p40^{PHOX}, p47^{PHOX} e p67^{PHOX}. Os outros 2 componentes, p22^{PHOX} e gp91^{PHOX}, estão localizados 15% na membrana plasmática e 85% na membrana de vesículas secretoras e de grânulos específicos. Esses dois componentes formam um heterodímero que compõe o citocromo b558, uma flavohemeproteína. Outras proteínas que compõem o complexo NADPH são a Rac, estando presente em monócitos como Rac1 e nos neutrófilos como Rac2; Cdc42; p29 peroxiredoxina, recentemente identificada, e proteína G (Rap1), componente de membrana junto com o citocromo b₅₅₈ (Babior, 1999; Roos, Van Bruggen *et al.*, 2003; El-Benna, Dang *et al.*, 2005; Sheppard, Kelher *et al.*, 2005).

O ânion superóxido é produzido aproximadamente 50 a 70% no fagossomo, endossomo e grânulos, e 30 a 50% no ambiente extracelular. Algumas reações acontecem no lúmen do fagossomo como (Brown, Stewart *et al.*, 2004; El-Benna, Dang *et al.*, 2005; Sheppard, Kelher *et al.*, 2005).



$H^+ + OCl^- + R-NH_2 \longrightarrow R-NHCl + HO$ (Outras reações com OCl^- e H_2O_2 produzem radicais tóxicos).

Estudos têm mostrado que as ROS reagem rapidamente e não especificamente com biomoléculas, como DNA, proteínas, lipídeos e carboidratos, causando danos como mutação do DNA, peroxidação lipídica e oxidação de proteínas (Lambeth, 2004). Outra consequência da produção de ROS é a discreta acidificação ou neutralização do lúmen do fagossoma para que as proteases liberadas pelos grânulos tenham ambiente com pH ótimo para sua ativação. O balanço entre neutralização e acidificação é dado pelas diferenças de atividade entre SOD e V-ATPase, uma vez que ocorre o consumo de H^+ pela dismutase durante a síntese de peróxido de hidrogênio e a fusão dos grânulos, tem como consequência a inserção de bombas de H^+ (V-ATPase), acidificando o lúmen do fagossoma. Com o fagossoma já maduro, a presença de ROS diminui a eficiência da fusão dos grânulos à membrana fagossomal, resultando na redução de inserção de bombas de H^+ (V-ATPase) e aumento da saída passiva de H^+ , impedindo seu acúmulo (Lee, Harrison *et al.*, 2003).

As espécies reativas de oxigênio são formadas no fagossomo maduro ou em formação. As ROS são substâncias tóxicas às células e existe um estudo relatando a presença da glutathione S-transferase P (GST-P) nos neutrófilos que degradam ROS inativando-as. Essa reação protege os neutrófilos contra a toxicidade da ROS (Schwartz, Park *et al.*, 2005).

1.4.5) Fases de Ativação

Como já foi comentado, os neutrófilos possuem 3 fenótipos: repouso ou quiescente, estimulado e ativado. Esses estágios ou fases da ativação dos neutrófilos são de fundamental importância na modulação da resposta da imunidade inata. Na primeira fase, de repouso, encontramos os neutrófilos na circulação sanguínea, no estágio estimulado, encontramos os neutrófilos realizando rolamento sobre o endotélio, diápeze e migração pelo interstício e no estágio ativado encontramos os neutrófilos onde temos a maior concentração de ativadores e patógenos. Essa separação é didática, podendo ser encontrados neutrófilos estimulados no local injuriado, como na lesão pulmonar aguda (ALI) (Sheppard, Kelher *et al.*, 2005).

I – Características dos neutrófilos em repouso ou quiescentes

a) Citosol

As subunidades da NADPH: p40^{PHOX}, p47^{PHOX} e p67^{PHOX} estão no citosol e estudos têm mostrado que há dimerização entre p67^{PHOX} e p47^{PHOX} e entre p40^{PHOX} e p67^{PHOX} e trimerização entre p67^{PHOX}, p47^{PHOX} e p40^{PHOX}. Temos ainda Rac2 inativada com a ligação do GDP e inibidores de dissociação Rho-GDP (RHOGDI) (Figura 7) (Sheppard, Kelher *et al.*, 2005; Condliffe, Webb *et al.*, 2006).

b) Membrana

Na membrana plasmática encontramos uma pequena concentração de citocromo b₅₅₈ (p22^{PHOX} e gp91^{PHOX}) juntamente com Rap1A (Sheppard, Kelher *et al.*, 2005).

c) Grânulos

A maior parte do citocromo b₅₅₈ está ligado à membrana granular das vesículas secretoras e dos grânulos específicos (Sheppard, Kelher *et al.*, 2005).

Neutr3f3lo em repouso

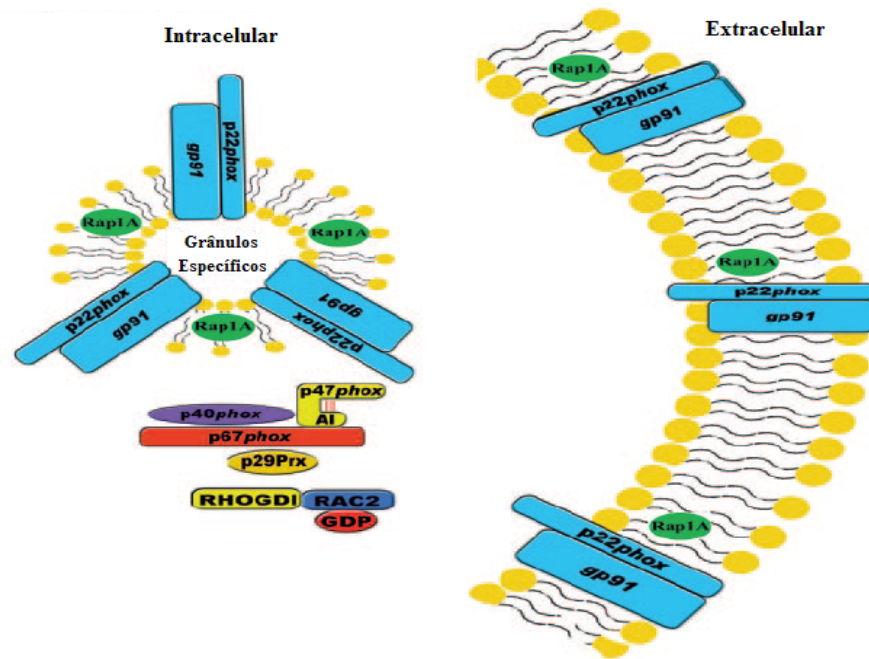


Figura 7: Esquema do complexo NADPH oxidase dissociado nos neutr3f3los em repouso. Modificado a partir de Sheppard, Kelher *et al.*, 2005.

II – Neutr3f3los estimulados

O fen33tipo estimulado 33 marcado pela mudan33a de neutr3f3los n33o aderentes para aderentes e libera33o de pequenas quantidades de ROS. A quantidade de ROS 33 aumentada mais ainda ap33s um segundo est33mulo, o que chamamos de segundo *hit* (Botha, 1995; Sheppard, Kelher *et al.*, 2005). Muitos agentes s33o estimuladores. Segundo Sheppard, os estimuladores s33o divididos em dois tipos: r33pidos, agem em 3-5 minutos e geralmente envolvem a tirosina quinase [PAF, LTB₄, C5a e lisofosf33tidilcolina (LPC)] e os de a33o lenta, que demoram 15-60 minutos para manifestar o seu efeito [LPS, fator de necrose tumoral- α (TNF- α), GM-CSF e IL-8].

a) Citosol e membrana

A liga33o de agentes estimuladores como PAF, C5a, IL-8, LPC e LPS desencadeia a montagem parcial do complexo NADPH oxidase que durar33 at33 2 horas, antes de um segundo est33mulo. Estimuladores de longa dura33o fosforilam e translocam a p47^{PHOX} para membrana plasm33tica, por33m o TNF- α fosforila a p47^{PHOX} parcialmente, n33o ocorrendo a transloca33o. O PAF fosforila a p67^{PHOX} ocorrendo a transloca33o e fosforila p40^{PHOX} e Rac2, mas n33o p47^{PHOX}. Os

neutrófilos incubados com LPS entre 30 e 60 minutos aumentam a associação do citocromo b_{558} com a membrana plasmática e a fosforilação de $p47^{PHOX}$, mas não $p67^{PHOX}$, $p40^{PHOX}$ e Rac2. No entanto, agentes estimuladores, tais como homocisteína, angiotensina II, zimosan opsonizado (OpZ) e estimulação por meio da β_2 -integrina, fosforilam e translocam para membrana a $p67^{PHOX}$ e $p47^{PHOX}$, como ilustra a Figura 8. A liberação do ânion superóxido pelo complexo NADPH oxidase parece ocorrer após a montagem completa, porém, na estimulação dos neutrófilos, essa montagem é parcial. Mas, como foi visto, a estimulação de outras vias, por exemplo, estimulação da β_2 -integrina, fosforila e monta outras subunidades da NADPH oxidase, diferentes dos estimuladores como o PAF, podendo ocorrer a montagem completa (Sheppard, Kelher *et al.*, 2005).

Juntamente com a montagem do complexo NADPH oxidase, outras proteínas são ativadas levando a diversas funções como transcrição, tradução e fosforilações, como por exemplo, a fosforilação da família das MAP quinases, principalmente p38 MAPK e Erk1/2. O aumento da concentração de Ca^{2+} no citosol, devido à estimulação, é necessário para ativação de proteínas dependentes de Ca^{2+} , tais como algumas subunidades da PKC, proteínas que atuam no citoesqueleto e na desgranulação. A reorganização da actina, principalmente a F-actina é necessária para a movimentação dos grânulos e migração (Chen, Lin *et al.*, 2005; Sheppard, Kelher *et al.*, 2005).

b) Vesículas secretoras e Grânulos

As vesículas secretoras e os grânulos de gelatinase degranulam para o meio extracelular realizando a fusão com a membrana plasmática, assim expõem β_2 -integrina mediando a diapedese e a migração pelo tecido. Estudo com a estimulação feita pelo LPS demonstrou a fusão dos grânulos específicos e azurofílicos no fagossoma, aumento na quantidade do citocromo b_{558} na membrana plasmática e a desgranulação bem evidente (Faurichou e Borregaard, 2003; Sheppard, Kelher *et al.*, 2005).

Estimulação dos Neutrófilos

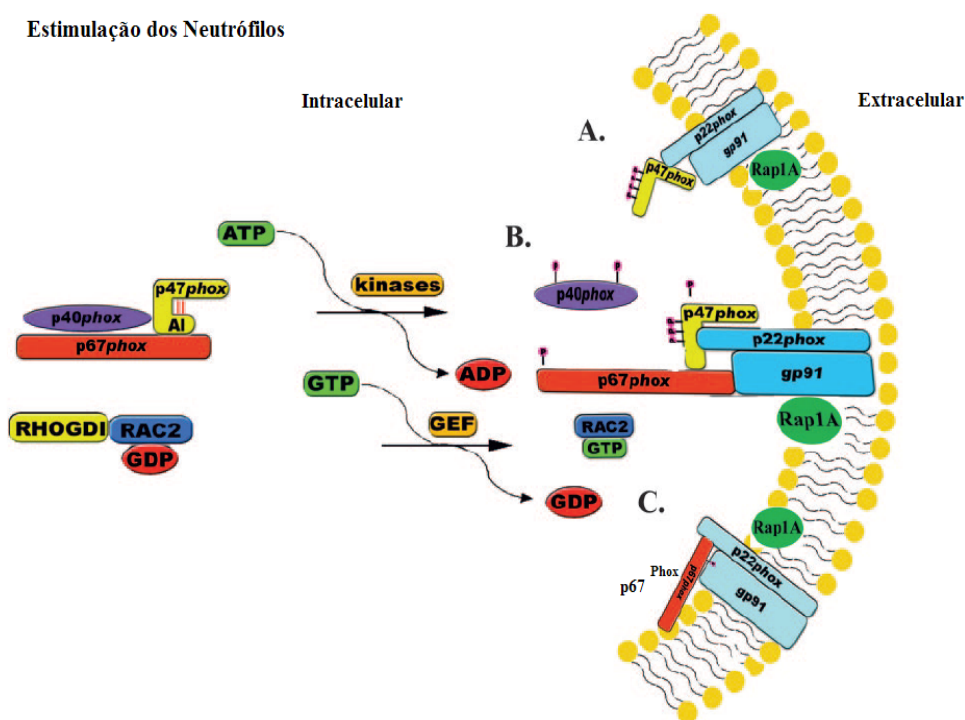


Figura 8: Proposta de estimulação dos neutrófilos. (A). Via proposta com a fosforilação e translocação somente da p47^{PHOX} realizada pelos estimuladores de ação lenta, como LPS, IL-8, GM-CSF. (B). Via proposta com a translocação da p67^{PHOX} e a p47^{PHOX}, realizado pela estimulação através da β_2 -integrina (C). Via proposta com a fosforilação e translocação da p67^{PHOX}, mas não a da p47^{PHOX}, realizado pela estimulação do PAF. (GEF = fator de intercâmbio do nucleotídeo guanina). Modificado a partir de Sheppard, Kelher *et al.*, 2005.

III – Neutrófilos Ativados

A ativação resulta na completa montagem e ação do complexo NADPH oxidase. Agentes comumente ativadores são o PMA e o fMLP. Alguns estimuladores podem ser ativadores com o aumento na concentração, porém, em alguns casos, esse aumento não é fisiológico (Sheppard, Kelher *et al.*, 2005).

a) Citosol

A ativação requer a fosforilação dos resíduos de tirosina e serina da p47^{PHOX}, p67^{PHOX} e p40^{PHOX} via quinases, tais como PKC, quinase p21 ativada, p38 MAPK, PI3-K e proteína quinase ativada PA, seguido por translocações para

membrana plasmática e granular. A ativação do complexo NADPH oxidase, ocorre após sua montagem (Figura 9) (Chen, Lin *et al.*, 2005; Groemping e Rittinger, 2005; Sheppard, Kelher *et al.*, 2005).

b) Membrana

Na ativação, o complexo NADPH oxidase é montado tanto na membrana plasmática como nos grânulos. Há intensa produção de ROS e proteínas são fosforiladas. A F-actina liga-se ao domínio PX da p40^{PHOX} e da p47^{PHOX}, subunidades do complexo NADPH presentes na membrana, via fosfoinositol, e assim a F-actina é reorganizada permitindo a formação de pseudópodes e a fagocitose (Sheppard, Kelher *et al.*, 2005).

c) Grânulos

Os grânulos específicos e azurofílicos se fundem ao fagossomo liberando o seu conteúdo, que contribui para a destruição do patógeno. Também há desgranulação no meio extracelular e a presença de ânion superóxido (Faurichou e Borregaard, 2003; Sheppard, Kelher *et al.*, 2005).

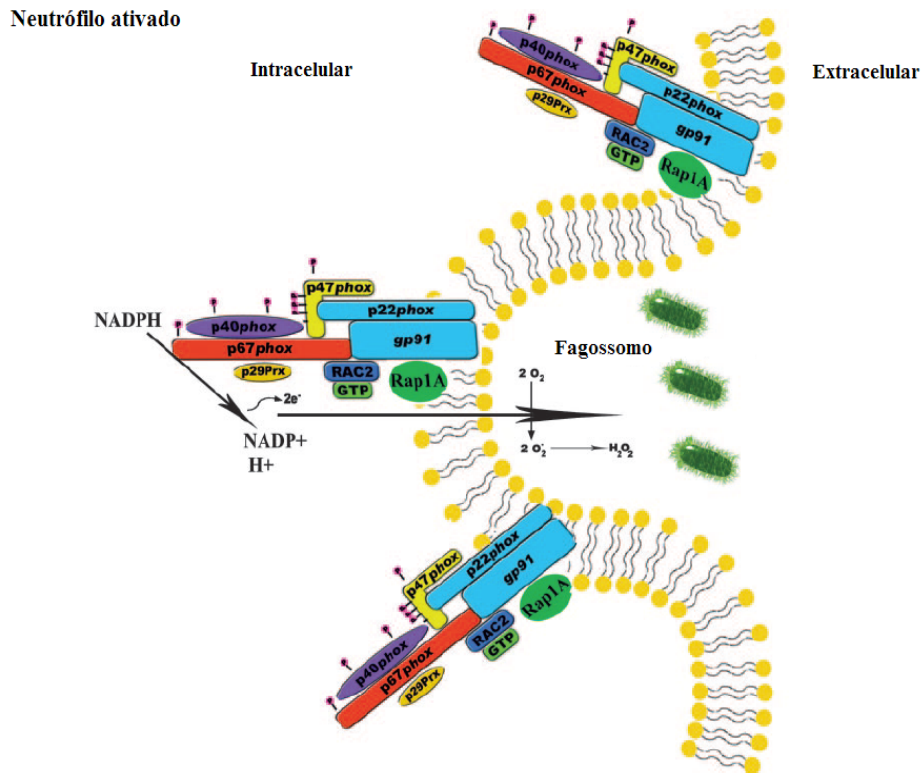


Figura 9: Esquema da ativação dos neutrófilos. Na ativação dos neutrófilos diferentemente da estimulação, o complexo NADPH é montado, ocorre uma intensa liberação de ânion superóxido para formação de ROS e RNS, formação do fagossomo, durante a fagocitose. Modificado a partir de Sheppard, Kelher *et al.*, 2005.

1.5) Fator de agregação plaquetária – PAF

A inflamação é um mecanismo complexo de fundamental importância contra as ofensas e lesões teciduais. Assim, a compreensão das células e de mediadores que modulam os mecanismos inflamatórios torna-se uma ferramenta importante para o tratamento de doenças. O fator de agregação plaquetária (PAF) vem sendo freqüentemente citado como um potente mediador em vários processos patológicos e fisiológicos do processo inflamatório (Mcmanus e Pinckard, 2000).

O PAF foi originalmente encontrado como um composto liberado após a sensibilização dos basófilos de coelho pela estimulação com IgE após a ligação a um antígeno. Desde que foi descoberto na ativação da agregação de plaquetas de coelho, foi chamado de fator de agregação plaquetária. O PAF é um glicerofosfolípídeo de baixa massa molecular com estrutura geral 1-O-alkil-2-acetil-sn-glicero-3-fosfolina, que pode apresentar duas estruturas com diferença de 2 carbonos na cadeia saturada alkil:

16:O-alkil-PAF e 18:O-alkil-PAF. Outras modificações na cadeia são encontradas, como ilustrado na Figura 10. Estudos têm relatado, que o PAF compreende uma família de estruturas que participam de diversos eventos, tais como adesão, sinais intra e intercelulares, tradução, diferenciação celular, apoptose, homeostase cardiovascular, alergia, injúria do tecido pulmonar, rejeição a transplante de órgãos, choque séptico e síndrome da resposta inflamatória, dentre outros (Rodríguez, 1993; Mcmanus e Pinckard, 2000; Rocha, 2004).

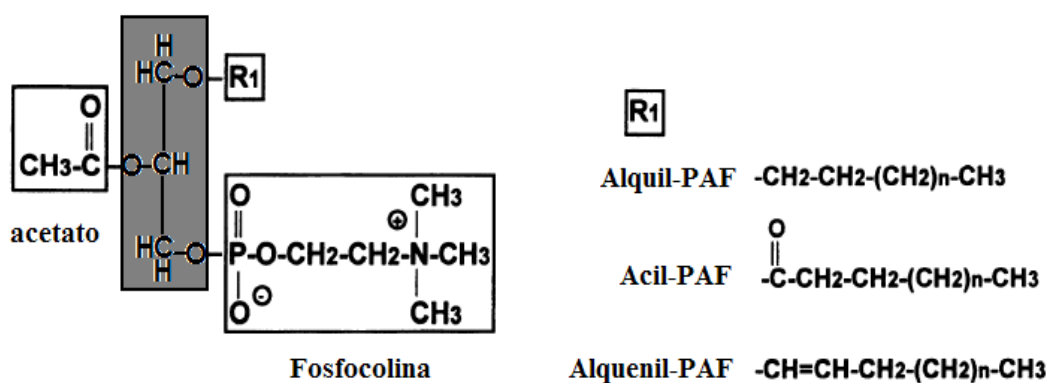


Figura 10: Estrutura do PAF e suas modificações. PAF 1-alkil/acil-2-acetil-sn-glicero-3-fosfocolina. Substituições podem ocorrer ao glicérol dorso espinhal da cadeia (área sombreada) em éter, éster ou vinil éter. Modificações na posição sn-1 (R1), grupo acetil esterificado na posição sn-2 e cabeça polar da fosfocolina. Modificado a partir de McManus e Pinckard, 2000.

1.5.1) Biossíntese do PAF

O PAF é um dos mediadores mais potentes e versáteis encontrados nos mamíferos. O PAF é produzido por uma grande variedade de células, tais como PMN, monócitos/macrófagos, linfócitos, células do endotélio vascular, mastócitos, basófilos eosinófilos e plaquetas, células participantes da inflamação aguda ou crônica. As enzimas e o caminho da biossíntese do PAF são comuns a todas as células produtoras. Nem o PAF e nem suas pré-formas se encontram armazenados nas células, mas é rapidamente sintetizado após a estimulação celular provocada por mediadores inflamatórios como trombina, angiotensina II, vasoprensina, leucotrienos C4 e D4, histamina, bradicinina, elastase, catepsina, peróxido de hidrogênio, plasmina,

interleucina 8 (IL-8), interleucina IL-1 α e TNF- α (Rodríguez, 1993; Mcmanus e Pinckard, 2000; Montrucchio, Alloatti *et al.*, 2000).

A fosfatidilcolina, componente da membrana fosfolipídica, é o substrato para a produção do PAF. Quando as células são estimuladas, a fosfolipase A₂ citosólica (cPLA₂) é ativada. Ligando-se à membrana, a cPLA₂ hidrolisa o acil graxo esterificado na posição sn-2 do fosfolipídeo de membrana, formando 2-lisofosfolipídeo (1-alkil-2-liso-glicero-3-fosfocolina, liso-PAF). Liso-PAF serve como substrato para enzima PAF acetiltransferase que transfere o grupamento acetil a partir da acetil CoA para a hidroxila livre na posição sn-2, resultando no PAF. Em muitas células ocorre a remodelagem do PAF (novo caminho da biossíntese do PAF), ação cíclica de desacetilação e acetilação (degradação e síntese), produzindo variações na cadeia, como variação na articulação, grau de insaturações, modificando o comprimento da cadeia de carbono na posição sn-1 (R1). Outra modificação que contribui para a heterogeneidade da remodelagem do PAF é a clivagem do grupamento acil na posição sn-2 de uma variedade de estruturas distintas de fosfolipídeo contendo colina. Essas modificações podem ser: ligações, duração e grau de insaturações nos álcoois graxos e cadeia acil na posição sn-1 do glicerol (Mcmanus e Pinckard, 2000; Montrucchio, Alloatti *et al.*, 2000).

Juntamente com clivagem da posição sn-2 do ácido graxo, o ácido araquidônico é produzido por muitas células inflamatórias. O ácido araquidônico é metabolizado (ciclo oxigenases ou lipoxigenases) em tromboxano A₂ (TxA₂), leucotrieno B₄ (LTB₄), prostaglandinas E₂ (PGE₂) e prostaciclina (PGI₂). Esses compostos são preferencialmente produzidos por plaquetas, neutrófilos, monócitos/macrófagos e células endoteliais, respectivamente. As ações desses mediadores podem ser somadas com a ação do PAF na resposta inflamatória (Garcia, Fernandez-Gallardo *et al.*, 1990; Mcmanus e Pinckard, 2000).

A produção e liberação do PAF pelos neutrófilos pode ocorrer após a ativação pelo LPS ou fMLP (Rodríguez, 1993; Watanabe, Marathe *et al.*, 2003). Segundo McManus, o PAF pode agir de 4 maneiras após a sua biossíntese: de forma intrácrina, estimulando internamente a célula que o produziu sem ser exposto ao receptor externo; de forma autócrina, estimulando a célula que o produziu sendo liberado e ligando-se ao receptor; de forma juxtácrina, estimula internamente a célula que o produziu, provocando a ligação entre células e parácrina, sendo liberado, ligando-se a outra célula, e estimulando-a (Mcmanus e Pinckard, 2000).

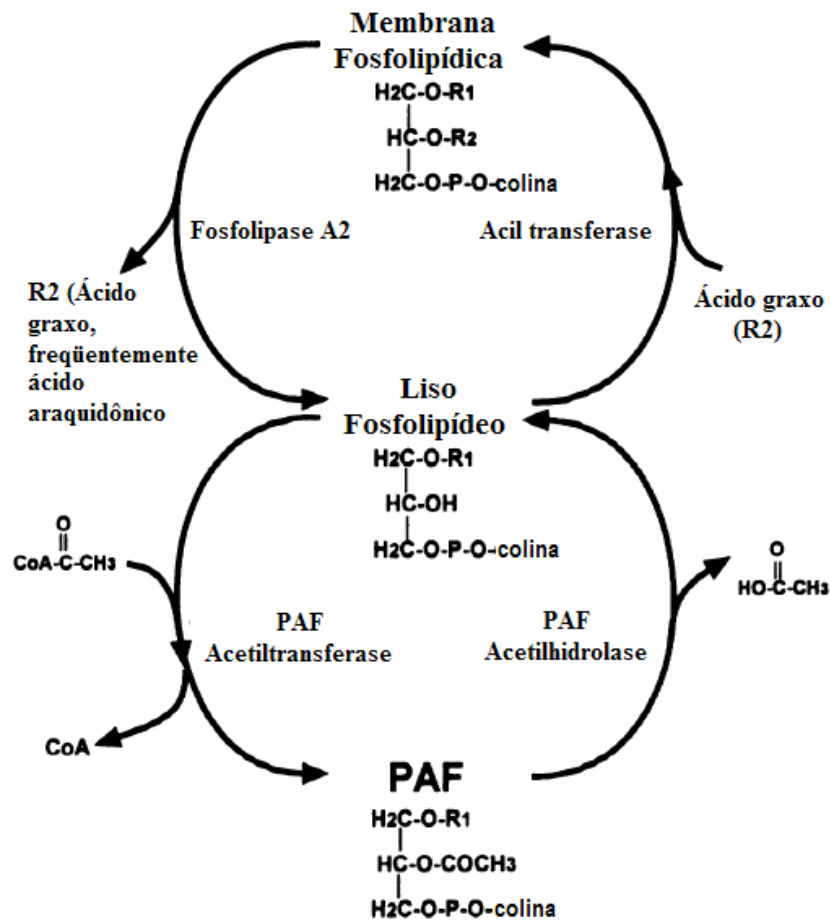


Figura 11: Esquema da biossíntese do PAF. Modificado a partir de McManus e Pinckard, 2000.

1.5.2) Heterogeneidade do PAF

A heterogeneidade do PAF é proveniente das diversas estruturas dos fosfolípidos que dão origem a liso-PAF e pela remodelagem cíclica de desacetilação e acetilação. Nos neutrófilos humanos, já foram encontrados de 15 a 20 novas espécies moleculares entre alquil-PAF, acil-PAF e aquenil-PAF (Mcmanus e Pinckard, 2000).

O tipo e a quantidade de PAF mais prováveis estão relacionados com a composição da membrana fosfolipídica da célula produtora. Nos mastócitos, basófilos e células endoteliais, é produzido primariamente acil-PAF. Nos neutrófilos, eosinófilos e macrófagos são produzidas grandes variedades de alquil-PAF. Por exemplo, neutrófilos humanos estimulados por Ca^{2+} ionóforo ou zimosan opsonizado, produzem 86-70% de alquil-PAF e 14-30% de acil-PAF. Dentro das classes alquil, acil e aquenil – PAF, existem as subclasses: 16:0-, 18:0-, 18:1- da cadeia sn-1. Essas são as variações que

podem ocorrer entre os tipos celulares. Outra variação ocorre entre as espécies animais. Por exemplo, 97% de 16:0-aquil-PAF é produzido por PMN de ratos, e somente 35% do 16:0-aquil-PAF é produzido em PMN de cobaias (Rodríguez, 1993; Mcmanus e Pinckard, 2000).

1.5.3) Degradação do PAF

A degradação do PAF é fundamental para o controle do processo inflamatório. A enzima responsável pela degradação é a PAF acetilhidrolase, enzima que também participa da desacetilação do PAF no processo de remodelagem. Pesquisadores descobriram uma enzima que degrada o PAF, inativando-o irreversivelmente. Essa enzima possui característica hidrofóbica, está presente no plasma (Plasma PAF-AH), liga-se a lipoproteínas e não requer a presença de Ca^{2+} para sua ativação. Ela remove o grupamento acetato na posição sn-2, essencial à estrutura do PAF, e é produzida por monócitos/macrófagos. Estudos têm relatado que a ausência de PAF-AH no sistema respiratório é indício da falha na regulação do PAF e que pode estar correlacionado com patologias, como asma (Mcmanus e Pinckard, 2000; Montrucchio, Alloatti *et al.*, 2000).

1.6) Neutrófilos e PAF

Os neutrófilos, células participantes da resposta inflamatórias, sofrem estimulação após a ligação do PAF ao seu receptor presente na membrana. Esta célula também produz o mediador lipídico e está presente em patologias, sendo o agente injuriante, principalmente quando estimulado pelo PAF (Lee, Hybertson *et al.*, 2002).

A exposição de neutrófilos ao PAF causa quimiotaxia, agregação, explosão respiratória, estimulação, produção de LTB₄, liberação de grânulos e exposição de CD11b e integrina na superfície da célula.

1.6.1) Receptor do PAF

A maioria das ações biológicas do PAF se manifesta no meio intracelular. Essas ações começam com a interação com um receptor presente na membrana das células alvo. O receptor para o PAF (PAFR) é membro da superfamília de receptores que formam 7 α -hélices em forma de serpentina transmembrânica. O receptor PAF contém

342 aminoácidos e tem a massa molecular de 38.982 Da. O quarto *loop* intracelular contém a extremidade com uma cauda carboxila, onde se acopla a proteína capaz de se ligar ao nucleotídeo de guanina (Proteína G). Também foram constatados 9 locais de fosforilação na região carboxi-terminal do receptor. A proteína G, acoplada ao receptor PAFR, é composta de três subunidades α , β e γ . A ligação do PAF ao receptor ativa a subunidade $\beta\gamma$ da proteína G, ativando PI3K e induz a sinalização mediante subunidades insensível a toxina pertussis, subunidades $G_{\alpha q}$ e $G_{\alpha 11}$. A proteína G por sua vez ativa as fosfolipases C e A_2 . A fosfolipase C cliva fosfatidilinositolbifosfato produzindo diacilglicerol (Kerkhoff, Nacken *et al.*) e inositol trifosfato IP_3 . O DAG, por sua característica lipofílica, permanece preso à membrana, onde irá ativar a proteína quinase C (PKC) a fosforilar uma série de proteínas. O IP_3 , que é hidrófilo, difunde-se da membrana e liga-se ao retículo endoplasmático liberando o cálcio das vesículas para o citosol. A ativação da PLA_2 produz ácido araquidônico que é metabolizado pela ciclooxigenase ou lipoxigenase produzindo eicosanóides, principalmente leucotrieno B_4 . Esse caminho de tradução regula várias funções na resposta celular como: adesão, quimiotaxia, fagocitose, destruição do patógeno e explosão respiratória (Figura 12) (Mcmanus e Pinckard, 2000; Montrucchio, Alloatti *et al.*, 2000; Soares, Pinho *et al.*, 2002).

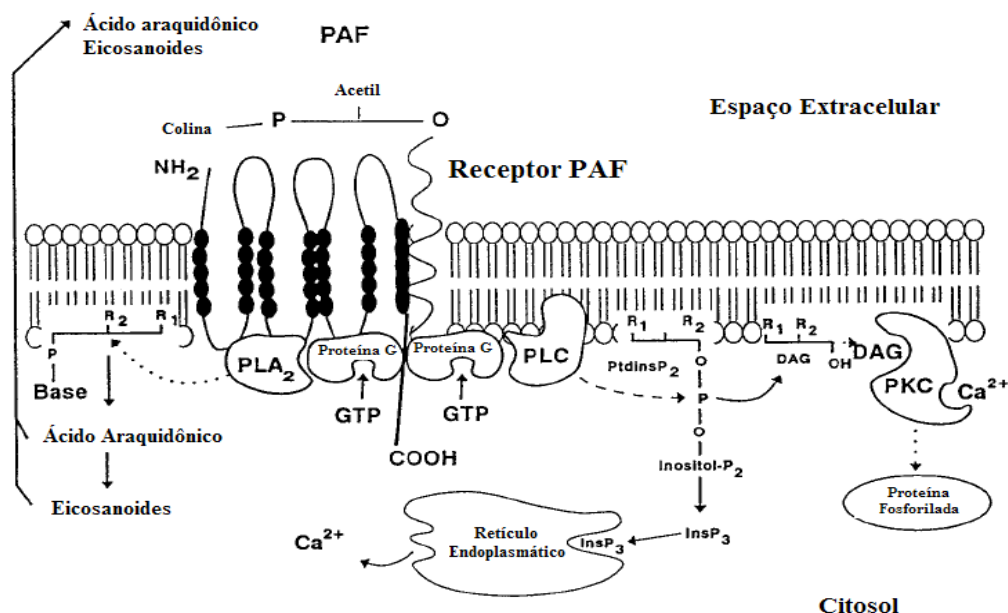


Figura 12: Esquema de estimulação do PAF acoplado ao receptor (PAFR) ativando as fosfolipases por intermédio da proteína G. A fosfolipase C produz DAG e IP_3 pela clivagem do fosfatidilinositol. DAG ativa PKC, que irá fosforilar outras

proteínas. O IP₃ age no retículo endoplasmático provocando a liberação do cálcio. A PLA₂ produz ácido araquidônico que é metabolizado, produzindo eicosanóides. PLA₂, fosfolipase A₂; PLC, fosfolipase C; PtdinsP₂, fosfatidilinositol 4,5 bisfosfato; inositol-P₂, inositol 4,5 bisfosfato; InsP₃, inositol 1,4,5 trifosfato; DAG, diacilglicerol; PKC, proteína quinase C. Modificado a partir de Montrucchio, Alloatti *et al.*, 2000.

1.6.2) Vias de sinalização na estimulação dos neutrófilos com PAF

As vias de sinalização dos neutrófilos são bastante complexas, pois existem vários ativadores. São dependentes de concentração para cada reação fenotípica dos neutrófilos: estímulo, ativação e retorno ao estado de repouso ou apoptose, não sendo totalmente elucidados quanto à complexidade da célula e dos seus ativadores, bem como as vias de sinalização.

Estudos mostram que a resposta inflamatória depende da ativação da superfamília das MAPK (*mitogen-activated protein kinase*). As superfamílias das MAPK são divididas em 3 tipos: MAP quinase quinase quinase (MAPKKK), MAP quinase quinase (MAPKK ou MEK) e MAP quinase (MAPK). As MAPK podem ser classificadas em 5 subfamílias: ERK1/2, p38, JNK, ERK5 e ERK3/4, porém as vias da ERK3/4 e da MAPKKK da ERK5 ainda não foram identificadas. Duas das isorformas da ERK foram identificadas em neutrófilos: ERK1 (p44 MAPK) e ERK2 (p42 MAPK). Na ativação e estimulação dos neutrófilos por fMLP e PAF não foi encontrada ativação das JNKs MAPK, por isso as pesquisas se voltaram para a via de ativação da p38 e ERK1/2 (Nick, Avdi *et al.*, 1997; Chen, Lin *et al.*, 2005).

A via de sinalização intracelular ativada pelo PAF é pouco conhecida, sendo descritos a seguir alguns pontos caracterizados. A estimulação se inicia com a ligação do PAF ao seu receptor (PAFR). Após a seqüência de eventos descritos acima, a produção de PI3K ativa o complexo ERK. A ativação da PI3K e ERK é dependente de fosforilação por tirosina quinase via Ras, Raf-1 e MEK. A PKC, ativada como consequência ao estímulo por DAG, também ativa ERK. Estudos mostraram que essa via não ativa p38 na estimulação pelo PAF. PKC possui 4 isoformas: α , β , δ e ϵ . As isoformas α e β são dependentes de Ca²⁺ e estudos mostram que a ERK pode ser ativada, tanto pela via dependente, como independente de Ca²⁺. A ERK também é ativada via PLA₂. A PLA₂, ativada pela proteína G, também estimula a fosforilação da

p38 através da MEK 3/6 e produz leucotrienos e prostaglandinas nos neutrófilos, por meio da ativação do ácido araquidônico. Estudos relatam que a ativação da p38 é dependente de Ca^{2+} , (Figura 13)(Garcia, Fernandez-Gallardo *et al.*, 1990; Nick, Avdi *et al.*, 1997; Khreiss, Jozsef *et al.*, 2004; Chen, Lin *et al.*, 2005).

Sabe-se que os neutrófilos estimulados com PAF cooperam para sua adesão ao endotélio, expondo receptores e sofrendo retardo na apoptose, porém esse mecanismo não foi totalmente elucidado. A ERK induzida pela estimulação por PAF nos neutrófilos pode contribuir para expressão das moléculas de adesão e retardo da apoptose. A ativação da ERK contribui para o aumento na expressão de CD11b/CD18 (Mac-1), mas não exclui a participação do IP_3 e da p38. Em pacientes asmáticos, pesquisas mostram o aumento de Mac-1 e LFA-1 após a estimulação com PAF. Esse aumento também está associado à produção de LTB₄, pela via da lipoxigenase (Gabrijelcic, Acuna *et al.*, 2003). Sabe-se também que a P-selectina é aumentada no endotélio pela ativação por PAF (Vinson, Rickard *et al.*, 2005). Quanto ao prolongamento da vida-média, alguns autores relatam que a p38 promoveria a apoptose pela clivagem da pró-caspase 3, transformando em caspase 3 e a ERK juntamente com PI3K inibiriam a morte programada. A ativação da ERK e Akt (alvo da PI3K) inibiriam a caspase 3 e a caspase 9, respectivamente, regulando a ação da p38 (Figura 13). Essa regulação se dá pela fosforilação da BAD, proteína que apresenta ação anti-apoptótica e é membro da família bcl-2 (Takahashi, Hato *et al.*, 2001; Khreiss, Jozsef *et al.*, 2004).

Em muitos estudos, o aumento da expressão da p38 está relacionado com a explosão respiratória (NADPH oxidase). Segundo Brown (2004) a p38 é mais pronunciada, tanto em quantidade como em fosforilações, quando estimulada por TNF- α do que pelo PAF. Estudos com fMLP relatam a atividade da p38 relacionada com a ativação de NADPH oxidase, pois o bloqueio da p38, reduz a produção de ROS em 70%, o que também evidenciou que essa não é a única via de ativação. Muitos pontos da ativação da NADPH oxidase pela fosforilação da p38 na estimulação dos neutrófilos pelo PAF ainda estão obscuros. Sabe-se, no entanto, que a estimulação pelo PAF ativa a p38 que fosforila apenas a subunidade p67^{PHOX} da NADPH oxidase e, segundo Sheppard (2005) nessa estimulação também ocorre a fosforilação da p40^{PHOX} e a Rac2 (Figura 13) (Brown, Stewart *et al.*, 2004; Sheppard, Kelher *et al.*, 2005).

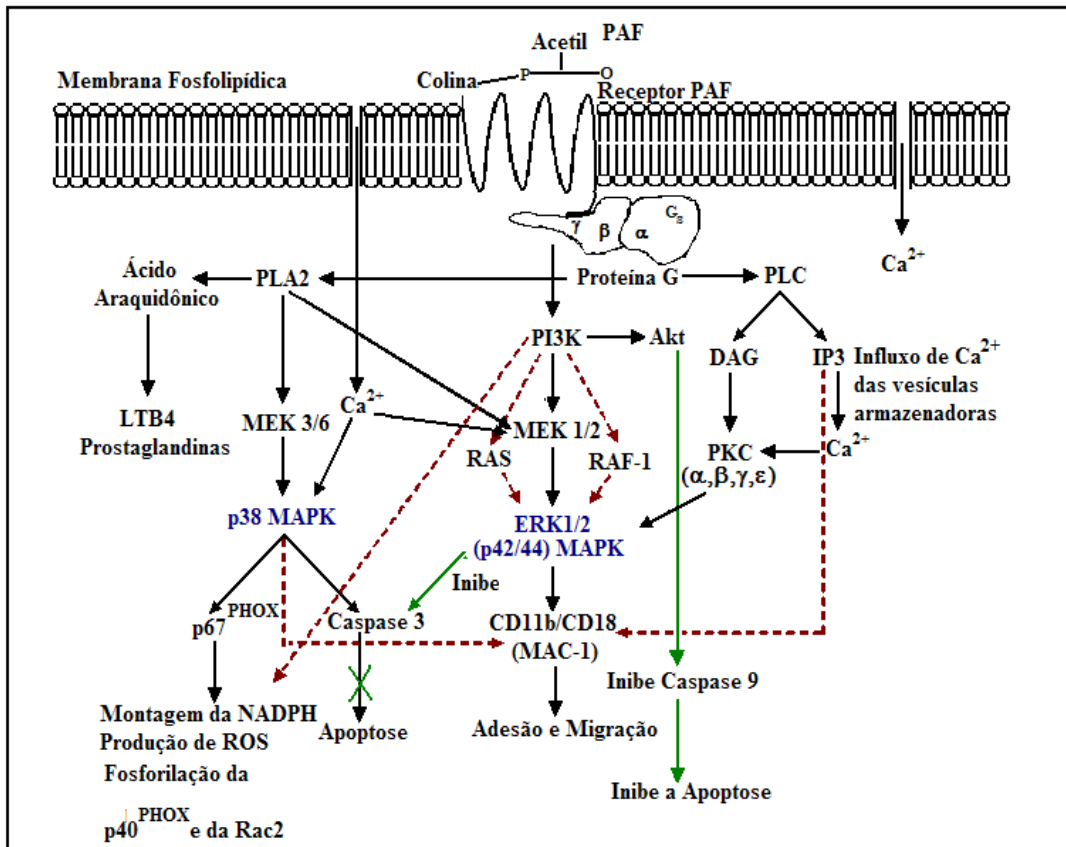


Figura 13: Via de sinalização dos neutrófilos estimulados pelo PAF. Setas pretas indicam mecanismo de ativação, setas tracejadas vermelhas mostram mecanismos ainda não confirmados e setas verdes, mecanismo de inibição.

1.7) Patologias associadas ao PAF

A estimulação dos neutrófilos pelo PAF é bastante estudada devido ao importante papel dessa célula na síndrome da angústia respiratória aguda. A síndrome da angústia respiratória aguda (ARDS) é caracterizada pelo seqüestro dos neutrófilos na microcirculação pulmonar e aumento da permeabilidade microvascular com a formação de edema no espaço alveolar. Foram detectados níveis elevados de PAF na circulação sanguínea em cerca de 50% de indivíduos com ARDS devido à sepsis. Também foi detectado um aumento dos níveis de PAF no lavado broncoalveolar em pacientes que apresentaram ARDS conseqüente a trauma, não séptico. A injúria pulmonar aguda pode evoluir para síndrome da angústia respiratória aguda (ARDS) que diferencia da ALI pela diminuição na capacidade respiratória, e conseqüente falência múltipla dos órgãos. Pesquisas com a injeção intravenosa de PAF demonstram uma leucopenia com seqüestro de neutrófilos no pulmão, aumento na permeabilidade vascular pulmonar e

formação de edemas pulmonares. Outra doença bastante estudada é o trauma, pois também encontramos o neutrófilo como agente patológico causando danos teciduais em órgãos que não foram afetados pelo trauma. Outras doenças estão relacionadas à estimulação por PAF, como choque séptico, rejeição a transplante, doenças cardiovasculares e alergias, dentre outras (Botha, 1995; Miotla, Jeffery *et al.*, 1998; Mcmanus e Pinckard, 2000; Montrucchio, Alloatti *et al.*, 2000).

1.8) Abordagens adotadas nos estudos do mecanismo de estimulação de neutrófilos pelo PAF

Diversas abordagens podem ser aplicadas para o estudo de estimulação dos neutrófilos, no entanto, diversas variáveis precisam ser controladas para a comprovação de causa e consequência do estímulo aplicado à célula. Como foi visto anteriormente, vários componentes podem estimular os neutrófilos como fatores endógenos, por exemplo, PAF, LTB₄, sistema complemento (C5a) e fatores exógenos, como fragmentos de paredes bacterianas (fMLP, LPS) e partículas externas (vidro, titânio) (Kuijpers, 2001).

Em estudos realizados com administração do PAF *in vivo* com injeção intravenosa e administração intratraqueal em camundongos, foi analisada a presença de neutrófilos pelos seguintes métodos: contagem diferencial de leucócitos sanguíneos e contagem de neutrófilos no lavado brônquico. Após a morte, foi realizada histologia pulmonar, com marcadores de mieloperoxidase em tecido e foram realizados estudos em neutrófilos isolados para avaliar função fagocítica e marcadores para espécies reativas de oxigênio (NBT) (Lee, Hybertson *et al.*, 2002).

Já em estudos de estimulação dos neutrófilos *in vitro*, o primeiro passo é o isolamento da célula do sangue periférico ou de células progenitoras (coleta feita da medula óssea), ou ainda estudo com células que já migraram em decorrência de alguma inflamação, por exemplo, células do lavado brônquico. Esse isolamento pode ser feito por método de centrifugação em meio a resinas como Percoll ou Ficoll-Paque ou por citometria de fluxo, separando pela complexidade celular (tamanho e granularidade) ou utilizando anticorpos, ou ainda partículas magnéticas. O isolamento dos neutrófilos deve ser realizado de forma criteriosa para que outras variáveis não venham modificar a morfologia da célula, produzir resposta celular ou morte (apoptose). Após a purificação dos neutrófilos, na maioria dos estudos ocorre a estimulação *in vitro*, podendo ter

variações do estimulador e da concentração administrada (Haslett, Guthrie *et al.*, 1985; Lian, Wang *et al.*, 2001; Lee, Hybertson *et al.*, 2002; Mathison, Befus *et al.*, 2003; Chang, Absood *et al.*, 2004; Alvarez-Larran, Toll *et al.*, 2005; Fernandes, Passos *et al.*, 2005).

Com a posterior definição do estimulador e da concentração, estudos de funções podem ser realizados como: função fagocítica; migração com a marcação específica, por exemplo de integrinas; da produção de ROS, por exemplo marcação de ânion superóxido, de peróxido de hidrogênio e do citocromo c; estudos de apoptose com marcação, utilizando iodeto de propídio (PI) e anexina V; estudos de vias de sinalização com *western blot* e *northern blot*; estudos com marcadores fluorescentes, imunofluorescência; microscopia eletrônica e confocal, dentre outras abordagens. Todos esses estudos focalizam em uma determinada função ou via de sinalização (Botha, Moore *et al.*, 1995; Su, Chen *et al.*, 2000; Lee, Hybertson *et al.*, 2002; Lee, Harrison *et al.*, 2003; Mathison, Befus *et al.*, 2003; Chen, Lin *et al.*, 2005).

1.8.1) Citometria de Fluxo

Um dos grandes desafios do século 21 é integrar as informações moleculares, genômicas, proteômicas referentes aos grupos de biomoléculas em modelos funcionais de células e organismos. Um dos avanços tecnológicos nesse sentido são os citômetros de fluxo, que possibilitam as pesquisas com células vivas, tendo como referência proteínas, fragmentos de DNA e de lipídeos utilizando marcadores fluorescentes específicos. As técnicas fundamentais de citometria de fluxo são aplicadas à biologia e à medicina como nas identificações de antígenos celulares mediante técnicas de imunofluorescência, estudo de DNA e ciclo celulares; na hematologia com contagem celular, diferenciação leucocitária, análise da medula óssea; na farmacologia com estudos de cinética celular, resistência a drogas; na imunologia com o estudos de subpopulações de células T, tipagem tissular, estimulação linfocitária, apoptose; na oncologia com o diagnóstico/prognóstico, monitoramento de tratamento; na microbiologia no diagnóstico bacteriano e viral, sensibilidade a antibióticos e na genética com determinação de cariótipo, diagnóstico de portador, diagnóstico prenatal, tipagem para transplantes (Bertho, ; Nolan e Mandy, 2006).

Diversas abordagens foram mostradas para testes celulares. A utilização do citômetro foi escolhida por ser um teste rápido que possibilita o ensaio sem a destruição

celular, fornecendo dados adicionais de viabilidade e pureza da amostra (Nolan e Mandy, 2006).

O citômetro de fluxo é um instrumento que envolve análises de propriedades ópticas (dispersão de luz e fluorescência) após a incidência de um *laser* sobre partículas que fluem em meio a suspensão líquida, decodificando características estruturais e funcionais das partículas por meio de recursos de informática. O citômetro oferece vantagens em relação a outras técnicas de análises de processos celulares, pois são testes rápidos, simples e necessitam de poucas amostras para a sua utilização, porém são testes de altos custos (Bertho, ; Loureiro, ; Silva, ; Curran, 1999).

O citômetro de fluxo consiste de 5 elementos: fonte(s) de radiação (lâmpada de mercúrio ou *laser*), uma câmara de fluxo, unidades de filtros ópticos para intervalos de comprimento de onda específicos, fotodiodos ou fotomultiplicadores para conversão analógico-digital (Figura 14) (Bertho, ; Loureiro, ; Silva).

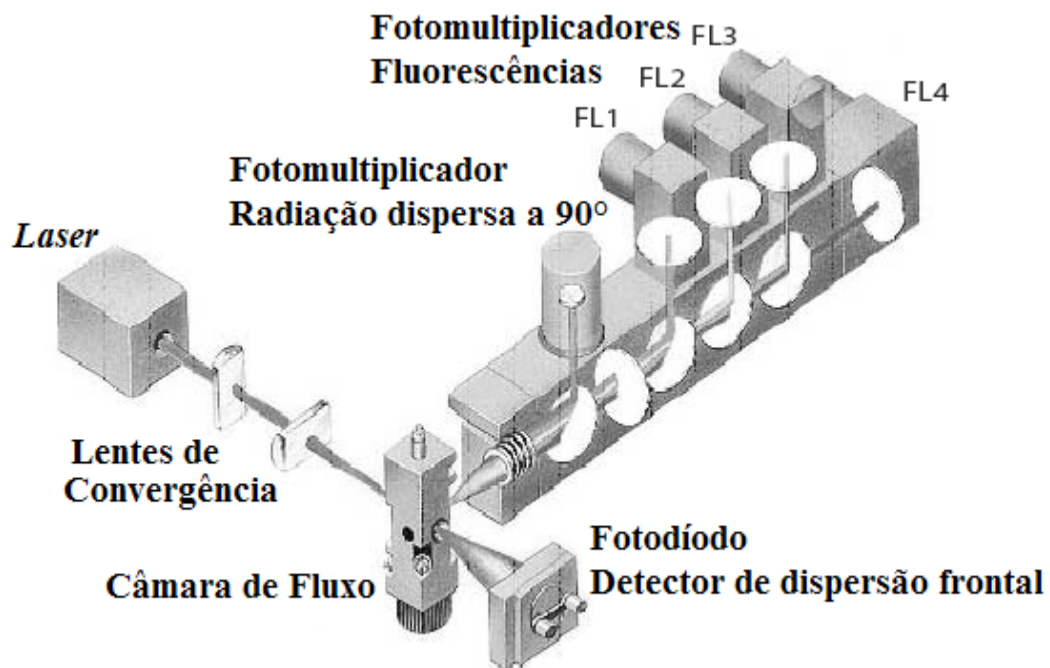


Figura 14: Configuração de um citômetro de fluxo (BD Biosciences/Enzifarma) (Silva).

A suspensão de células ou partículas a serem analisadas é aspirada e passa pelo centro de uma câmara de fluxo envolto por um fluido (*sheath fluid*). As células então saem da câmara uma atrás da outra de modo que o *laser* intercepte apenas uma de cada

vez. Quando as células são interceptadas pelo feixe de luz, ocorre um processo de dispersão fotônica e/ou de emissão de fluorescência, cuja intensidade depende do marcador utilizado (Bertho, ; Loureiro).

Os fótons dispersos frontalmente são detectados pela *Forward Scatter Cell* (FSC), que caracteriza o tamanho celular, os dispersos ortogonalmente (90°) são recebidos por uma série de filtros ópticos e analisados nos fotomultiplicadores de dispersão lateral e fluorescência. A dispersão lateral é detectada pela *Side Scatter Cell* (SSC) caracterizando a complexidade celular como granularidade. De acordo com o fluorocromo utilizado, examinamos características bioquímicas, biofísicas e moleculares das células, com a interceptação do *laser*. São emitidos comprimentos de ondas característicos detectados pelos fotomultiplicadores distintos. Os sinais luminosos recebidos pelos fotomultiplicadores são convertidos em sinais elétricos, e logo em seguida, convertidos em dados digitais. As análises como tamanho celular (FSC), complexidade interna (SSC) e os canais que detectam o comprimento de ondas podem ser medidos simultaneamente (Bertho, ; Loureiro).

No presente estudo, as amostras foram submetidas a análises de tamanho e granularidade para identificação da pureza celular; avaliação da explosão respiratória através da marcação do peróxido de hidrogênio produzido e viabilidade celular com marcação de iodeto de propídeo.

Com a estimulação dos neutrófilos com PAF, uma pequena quantidade de peróxido de hidrogênio é produzida pelo começo da montagem do complexo NADPH oxidase. Assim, a 1,2,3 dihidrorodamina (DHR), marcador intracelular é oxidado na presença de peróxido de hidrogênio, formando a 1,2,3 rodamina, um composto fluorescente capaz de ser excitado pelo *laser* de 488nm, emitindo uma fluorescência captada pelo canal FL1 que recebe emissões no comprimento entre 525-535 nm (Bassoe, Li *et al.*, 2003; Wrona, Patel *et al.*, 2005).

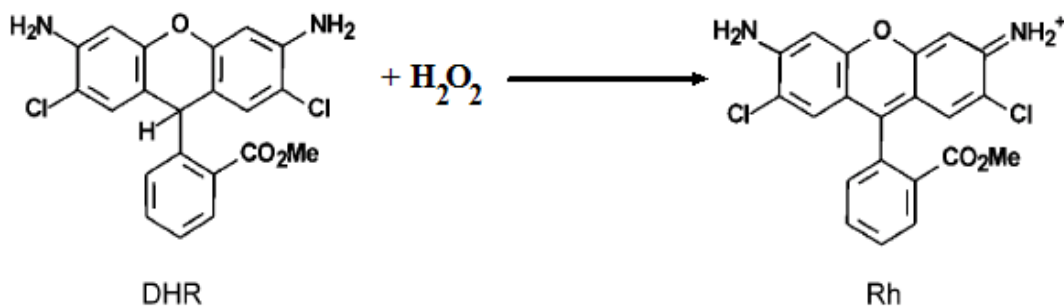


Figura 15: Reação de oxidação da 1,2,3 dihidrorodamina (DHR) na presença de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em 1,2,3 rodamina (Rh), composto altamente fluorescente. Modificado a partir de Wrona, Patel et al., 2005.

Outra avaliação realizada nessa pesquisa é a viabilidade celular. O iodeto de propídeo, um marcador de alta massa molecular, é conhecido como marcador de exclusão, pois ele só fluoresce quando se liga ao DNA dentro das células. Como para sua entrada na célula a membrana celular precisa estar permeabilizada, esse marcador caracteriza apoptose e necrose. O *laser* de 488 nm incide na célula marcada e emite uma fluorescência de 623 nm captada pelo canal FL2 (Liu, He *et al.*, 2007).

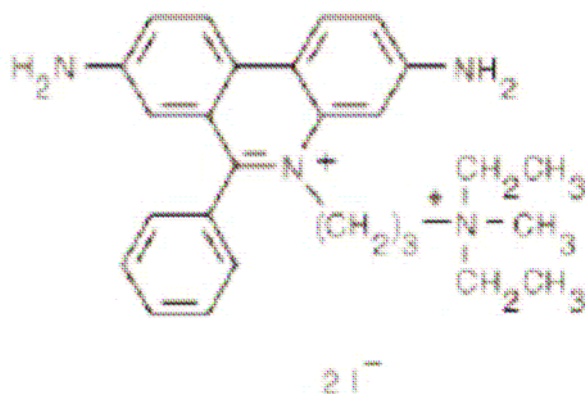


Figura 16: Molécula de Iodeto de propídeo.

1.8.2) Proteômica

Proteômica é definida como a análise de proteínas em larga escala de um determinado organismo, célula ou secreção, expressas a partir de um genoma, em um processo biológico específico. A diferença entre a abordagem genômica e a proteômica reside no escopo do estudo. A abordagem genômica focaliza a caracterização dos genes,

independentemente de seus produtos de expressão, enquanto a proteômica tem como alvo as proteínas expressas e, geralmente, identificadas em função de um genoma previamente determinado. São estudos complementares em que a proteômica soma bastante informações, pois as proteínas fazem parte de um sistema dinâmico de interações e modificações. Devido à característica dinâmica e complexa do proteoma em relação ao genoma, essa abordagem para o estudo das proteínas há alguns anos era considerada impossível, mas com o desenvolvimento de diversas tecnologias como eletroforese bidimensional, bioinformática e espectrometria de massa, dentre outras, hoje podemos realizá-los (Palma, ; Hirsch, Hansen *et al.*, 2004; Blake, 2005).

A proteômica possibilita, em um mesmo estudo, catalogar grandes quantidades de proteínas, demonstrar diferenças de quantidade entre o mesmo tipo de célula, porém, em situações diferentes (por exemplo, célula sadia ou doente, ativadas ou em repouso). Com a possibilidade de vários estudos, as pesquisas em proteômica vêm se tornando mais frequentes e promissoras, principalmente para a indústria farmacêutica. Mas, algumas dificuldades são encontradas na análise proteômica, tais como detectar proteínas em quantidades pequenas, identificar individualmente proteínas em um complexo biológico e problemas relacionados à avaliação de dados brutos. Porém, muitas empresas vêm aperfeiçoando técnicas e criando novos equipamentos para sanar essas dificuldades (Palma, ; Hirsch, Hansen *et al.*, 2004; Blake, 2005).

I - Eletroforese Bidimensional

A eletroforese 2D é um poderoso método de separação de misturas complexas de proteínas. Esse método e suas melhorias são amplamente usados para análise proteômica.

Após a obtenção das proteínas de células ou de fluidos, elas são separadas de acordo com duas propriedades: capacidade de protonação, em intervalos definidos de pH, através do ponto isoelétrico (PI) e pela massa molecular. Com essas duas propriedades, várias proteínas são separadas em gel de poliacrilamida. Para a visualização das proteínas o gel é submetido a uma coloração. Existem diversas colorações que variam de acordo com a sensibilidade para detecção das proteínas (Healthcare, G. E., 2004; Hirsch, Hansen *et al.*, 2004).

II – Análise de Imagens

Comparações manuais entre géis bidimensionais restringiriam os estudos à possibilidade de apenas detectar presença e ausência de *spots* (mancha no gel que representa uma ou uma mistura de proteínas). Com o auxílio da bioinformática foram produzidos *softwares*, que possibilitam delimitar os *spots*, compará-los entre duas condições fornecendo informações além de presença e ausência, como a quantificação de proteínas, com adição de ferramentas estatísticas (Biron D.G. , 2006).

Atualmente, esses *softwares* possibilitam a comparação de múltiplos mapas proteômicos ao mesmo tempo, normalização dos volumes de cada *spot*, comparações estatísticas, mas para isso, a produção de um bom mapa proteômico com o uso da eletroforese 2D é de fundamental importância (Biron D.G. , 2006).

As análises dos dados precisam ser ainda bem elaboradas, com padrões para mapas proteômicos, uso de replicatas técnicas e biológicas, pois há dificuldade de se obter grande quantidade de mapas e manter uma reprodutibilidade na eletroforese 2D (Healthcare, G. E., 2004; Biron D.G. , 2006).

III – Espectrometria de Massa

O espectrômetro de massa é um instrumento analítico que converte componentes sólidos ou líquidos em íons em fase gasosa e mede a sua massa molecular. Os íons são separados de acordo com a razão massa/carga (m/z). Um espectrômetro consiste de 5 componentes: sistema de injeção de amostra, fontes de íons, analisador, detector e processador de sinais (Palma, ; Mann, Hendrickson *et al.*, 2001).

O MALDI (*matrix-assisted laser desorption ionization*) é uma fonte de íons que produz vaporização e ionização de macromoléculas não voláteis da fase sólida para gasosa. O sistema de injeção da amostra geralmente é formado pela mistura do analito com uma matriz, de forma que ambos sejam cristalizados numa placa condutora. Essa matriz protege a amostra evitando degradação quando incidir o *laser*. A fonte de íons é representada pela incidência de um laser sobre a mistura amostra/matriz. A energia incidida pelo *laser* irá transferir energia para amostra através da matriz, que assim será ionizada de forma íntegra (Palma, ; Mann, Hendrickson *et al.*, 2001; Marvin, Roberts *et al.*, 2003).

A função do analisador, por exemplo *Time of Flight* (Kjellen e Pertoft), é separar ou resolver os íons previamente formados. Os íons são acelerados na fonte, por serem expostos a um campo elétrico produzido por uma diferença de potencial; logo em seguida, os íons são soltos em um tubo a vácuo onde irão chegar ao detector de acordo com razão m/z de cada um. No detector, os sinais recebidos serão transformados em espectros com picos contendo m/z correspondentes ao tempo de voo (Palma, ; Mann, Hendrickson *et al.*, 2001; Marvin, Roberts *et al.*, 2003).

O princípio do MALDI-TOF-TOF é o mesmo, porém os peptídeos selecionados são fragmentados por ação de uma alta energia ou pela colisão de um gás inerte como argônio. Os peptídeos tendem a se romper na ligação peptídica, gerando fragmentos menores. Os fragmentos são novamente acelerados soltos no TOF e detectados cada um ao seu tempo pela diferença de m/z . Os sinais também são transformados em espectros contendo picos (Palma, ; Suckau, Resemann *et al.*, 2003).

Um dos métodos de identificação de proteínas utilizando MALDI-TOF é chamado de *peptide mass fingerprint (PMF)*. Os peptídeos utilizados por esse método são obtidos de proteínas que foram degradadas por enzimas específicas, proteases como a tripsina. Os peptídeos tripticos são separados de acordo com m/z no MALDI-TOF e suas massas comparadas com as massas teóricas de peptídeos tripticos de proteínas cujas seqüências estão contidas em bancos de dados. Essa correspondência de massas faz com que a proteína de interesse seja identificada (Mann, Hendrickson *et al.*, 2001; Marvin, Roberts *et al.*, 2003).

O uso da fragmentação (MALDI-TOF-TOF, por exemplo) permite acrescentar dados de seqüências de peptídeos aos resultados obtidos por PMF, tornando a identificação mais específica (Suckau, Resemann *et al.*, 2003).

2 . OBJETIVOS E JUSTIFICATIVAS

2.1) Objetivo Geral

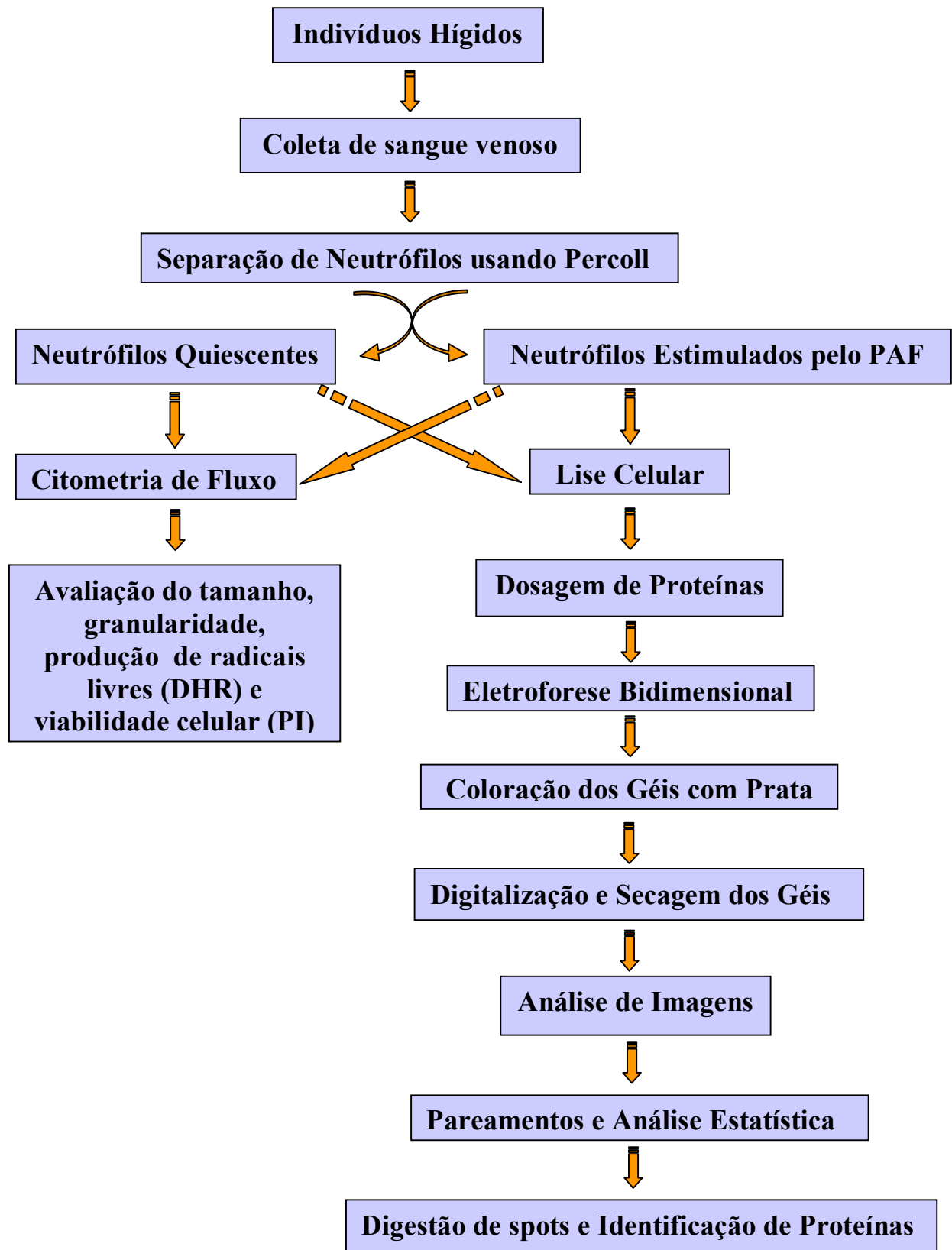
- ↪ Identificar proteínas dos neutrófilos com e sem a estimulação tratados com fator de agregação plaquetária (PAF), visando elucidar o mecanismo de estimulação neutrofilica comparando 2 mapas proteômicos de neutrófilos quiescentes e estimulados com PAF, que permitirão demonstrar as semelhanças e diferenças e, juntamente com as identificações de proteínas, propor ou confirmar a participação de proteínas nas vias metabólicas de neutrófilos, contribuindo assim para a identificação de possíveis marcadores moleculares, alvos para diagnóstico e desenvolvimento de fármacos.

2.2) Objetivos Específicos

- ↪ Padronizar a técnica de estimulação *in vitro* com a utilização do citômetro de fluxo.
- ↪ Elaborar géis bidimensionais reprodutíveis em pH ácido dos neutrófilos estimulados com PAF e quiescentes.
- ↪ Detectar proteínas diferencialmente expressas, com significância estatística comprovada.
- ↪ Identificar proteínas

3. METODOLOGIA

3.1) Delineamento Experimental



3.2) Obtenção das Amostras

Foram coletados 15 mL de sangue por punção venosa de 3 doadores voluntários do sexo masculino com a idade entre 20-50 anos, sem histórico de doenças crônicas, resposta inflamatória evidente e doenças infecto-contagiosas e que não faziam uso de medicamentos. A coleta foi realizada com aspiração suave para não ativar os neutrófilos pelo choque mecânico, em material plástico estéril para evitar a ativação dos neutrófilos. A seringa utilizada foi heparinizada com 5UI/mL, concentração menor que a usual de 25UI/mL. Essa concentração foi otimizada para evitar a coagulação sanguínea e a inibição da desgranulação e adesão dos neutrófilos (Brown, Lever *et al.*, 2003).

3.3) Separação de Neutrófilos

Todo o material utilizado era plástico, estéril e as soluções filtradas por um filtro de 0,22µm. A separação foi realizada dentro do fluxo laminar, para evitar contaminação e conseqüentemente ativação dos neutrófilos (Santos, 2007).

A separação dos leucócitos e eritrócitos foi realizada utilizando gradientes de Percoll (Healthcare, G.). O Percoll é composto de partículas de sílica inerte, não tóxica, que não aderem a membranas, sendo ideal para purificação de células e organelas (Amershan, ; Haslett, Guthrie *et al.*, 1985). O volume coletado foi dividido em 4 tubos, cada tubo contendo 2 gradientes com porcentagem e quantidades de reagentes listados na Tabela 1.

Tabela 1: Reagente e soluções para montagem dos gradientes (Santos, 2007).

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

Solução de HBSS pH 7,2-7,4:

Cloreto de potássio 0,4g/L

Fosfato de potássio monobásico 0,06g/L

NaCl 8g/L

Fosfato de sódio dibásico 0,048g/L
d-glicose 1g/L
Vermelho de fenol 11mg/L
Bicarbonato de sódio 0,35g/L

A montagem do gradiente foi realizada da seguinte forma: a solução de 60% foi adicionada ao fundo do tubo de 15 mL e a solução de 70% inserida abaixo da solução menos densa, com uma seringa de 5 mL e uma agulha de 10 cm. Esse procedimento é feito de forma lenta e cuidadosa, para que não haja mistura das soluções (Santos, 2007).

Após essa montagem, foi coletado o sangue venoso descrito no tópico anterior. 3 mL de sangue bem homogeneizado na própria seringa foram colocados sobre o gradiente. Esse material foi levado para uma centrífuga refrigerada com a caçamba móvel Hitashi-Himac SCR, onde foi submetido a uma força gravitacional de 400g, na temperatura de 22°C, aceleração e desaceleração de índice 2, por 35 minutos (Santos, 2007).

Após a separação, temos: os neutrófilos entre os gradientes de 70% e 60%, os eritrócitos no fundo do tubo, os mononucleares sobre o gradiente de 60% e o plasma sobre os mononucleares. Foi descartado o plasma, os mononucleares e aproximadamente 2 mL de gradiente para garantir a pureza do material. Foram colhidos os neutrófilos (aproximadamente 2 mL) e colocados em outro tubo de 15 mL, onde foi feita a lavagem dos neutrófilos para retirar o excesso de Percoll. Foram adicionados 7 mL de HBSS 1x às células e centrifugadas as amostras por 12 minutos na gravidade de 150g, aceleração e desaceleração de 5, temperatura de 22°C. O sobrenadante foi descartado e foram acrescentados ao sedimento 5 mL de HBSS 1x, repetindo-se a centrifugação anterior. Após essas duas lavagens foi feita uma etapa de hemólise para retirar a contaminação com eritrócitos. Nesse procedimento, foram adicionados 3 mL de água MilliQ por 15 segundos e restaurou-se a osmolaridade acrescentando-se 9 mL de NaCl 1,2%, centrifugou-se a amostra por 12 minutos na gravidade de 150g, aceleração e desaceleração de 5, temperatura 22°C. Descartou-se o sobrenadante e ressuspenderam-se os neutrófilos em 450 µL de PBS com 0,9 mM de Ca^{2+} e 0,5 mM de Mg^{2+} , em temperatura ambiente. Três alíquotas foram reservadas para a contagem de células, morfologia e viabilidade, e simultaneamente realizou-se a estimulação dos neutrófilos (Santos, 2007).

3.4) Contagem Celular

A contagem foi realizada na câmara de Neubauer. Foram retirados 10 μL da suspensão de neutrófilos e adicionados 50 μL de líquido de Turk. Após a homogeneização, foram preenchidos os quadrantes da câmara de Neubauer e realizou-se a contagem imediatamente. Focalizou-se no aumento de 40 \times e foi feita a contagem nas regiões A, B, C e D, de acordo com a Figura 17 (Santos, 2007).

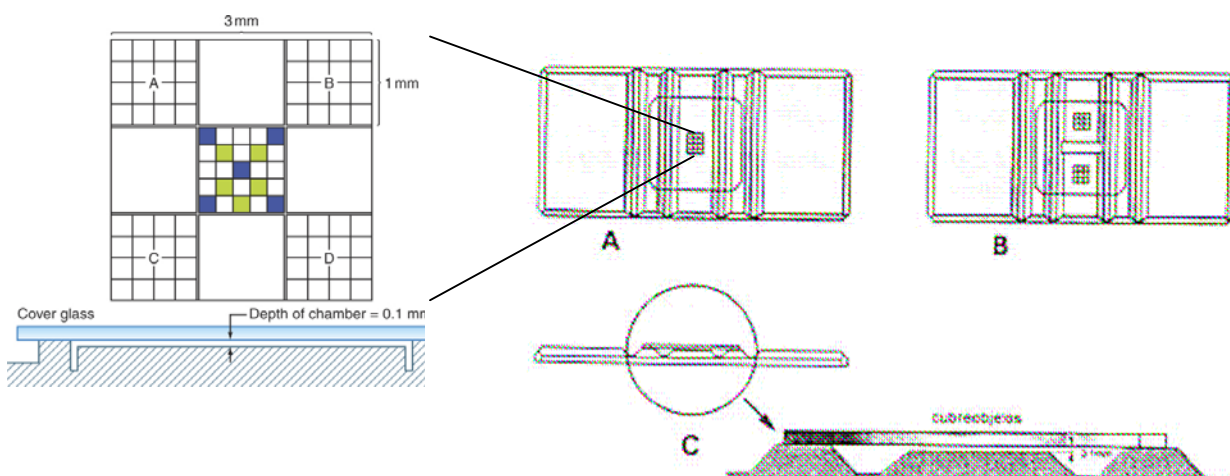


Figura 17. (A) Câmara de Neubauer com um campo de leitura e (B) com dois campos de leitura, (C) mostra a profundidade da câmara de 0,1mm.

A área do quadrante é 1mm^2 . A profundidade da câmara é de 0,1mm. Logo ao contar quatro áreas A, B, C e D, contou-se o número de células em $0,4\text{mm}^3$, que corresponde ao número de células em $0,4\ \mu\text{L}$. Então multiplicou-se por 2,5 para saber o número de células por μL , além de multiplicar pelo fator de diluição 6 vezes (Santos, 2007).

$$\text{Cálculo: } 2,5 \times 6 \times (A+B+C+D) = \text{número de células} / \mu\text{L}.$$

3.5) Viabilidade Celular em Nigrosina

Após a contagem foram adicionadas em um Eppendorf 5 μL de suspensão de células e 20 μL de solução de nigrosina 0,05% em PBS pH 7,2 homogeneizou-se e

preencheu-se uma área de contagem da câmara de Neubauer com esta solução, realizou-se a contagem imediatamente. Contaram-se como vivas, as células com núcleo transparente e como mortas, aquelas que apresentam o núcleo corado de preto, totalizando 100 células. Verificou-se a porcentagem de células mortas e vivas (Santos, 2007).

3.6) Pureza da Amostra (morfologia)

A alíquota direcionada para morfologia foi centrifugada na velocidade de 1800 rpm por 1 minuto.

Retirou-se todo sobrenadante e adicionou-se 20 μL de albumina bovina em temperatura ambiente. Adicionou-se de 5 a 10 μL de suspensão de células sobre o início da lâmina e foi feito um esfregaço (Santos, 2007).

Foi adicionado o corante Wright até cobrir a lâmina toda. Aguardou-se um minuto, adicionaram-se 12 gotas de água destilada sobre a lâmina e soprou-se levemente sobre ela com uma pipeta para homogeneizar o corante, aguardaram-se mais quatro a cinco minutos, enxaguou-se a lâmina delicadamente e esperou-se secar. Foi feita a contagem das células observando suas características morfológicas. Foram contadas 100 células em objetiva de 100 \times , usando óleo de imersão (Santos, 2007).

O principal contaminante é o eosinófilo, já que apresenta densidade muito semelhante à do neutrófilo. Porém, ele apresenta granulação mais grosseira e mais avermelhada. Neutrófilos apresentam grânulos mais finos e núcleo segmentado. Nesta lâmina não é esperada a presença de hemácias (já que foram lisadas), nem plaquetas e nem os mononucleares.

3.7) Estimulação dos Neutrófilos *in vitro*

Após a contagem dos neutrófilos, amostras contendo pelo menos 7×10^6 neutrófilos, apresentando pureza acima de 97% e viabilidade acima de 98% foram selecionadas para a continuidade do estudo, uma vez que são necessárias 1×10^6 células para cada gel, e foram realizadas triplicatas técnicas e biológicas (3 géis de cada indivíduo em cada situação e análise de neutrófilos de 3 indivíduos diferentes). Além disso, foram necessários 3×10^5 neutrófilos para cada ensaio por citometria de fluxo.

Simultaneamente com a caracterização dos neutrófilos, rendimento, pureza e viabilidade, foi realizado a estimulação dos neutrófilos com *1-O-Palmityl-2-acetyl-rac-glycero-3-phosphocholine* (PAF, Sigma P1402). Antes de padronizar a estimulação e ativação, foi realizado um teste comparando a estimulação e ativação dos neutrófilos em meio PBS com e sem cálcio e magnésio. Após essa padronização a estimulação foi realizada da seguinte maneira: 2 alíquotas de 450 μL foram separadas, uma foi adicionada 50 μL PBS com 0,9 mM de Ca^{2+} e 0,5 mM de Mg^{2+} (alíquota controle) e outra 50 μL de PAF, tendo concentração final de 20 nmol/L. As alíquotas foram homogeneizadas por 1 minuto e retirou-se um volume de 50 μL de cada amostra (controle e estimulada), que foi destinada para o ensaio de citometria. As amostras foram incubadas por 40 minutos em temperatura ambiente (Botha, Moore *et al.*, 1995).

3.8) Teste de produção de ROS por Citometria de Fluxo

As alíquotas de cada amostra, sem ativação (controle) e outra estimulada (PAF) contendo aproximadamente 3×10^5 neutrófilos foram reservadas para analisar a estimulação com a marcação por DHR, na concentração final de 15 $\mu\text{mol/L}$ e incubadas por 40 minutos, volume final de 800 μL , em temperatura ambiente (Wrona, Patel *et al.*, 2005). Foram avaliados 10000 eventos, no aparelho CyFlow Space (Partec), produzindo o gráfico de tamanho (FSC) pelo FL1 (canal que capta a absorbância 530 nm, de forma logarítmica) (Bertho).

3.9) Teste de Viabilidade por Citometria de Fluxo

As alíquotas de cada amostra, sem ativação (controle) e outra estimulada (PAF) contendo aproximadamente 3×10^5 neutrófilos foram reservadas para analisar a viabilidade com a marcação por iodeto de propídeo (PI), após 40 minutos de incubação da estimulação. O iodeto de propídeo é um corante de alto massa molecular. Quando a membrana celular está alterada, ele entra na célula e liga-se aos ácidos nucleicos emitindo uma fluorescência vermelha, quando interceptado pelo *laser* (Bertho).

A marcação é feita da seguinte maneira: 1 μL de PI 1 mg/mL para cada 1 mL de célula em PBS, incubado por 5 minutos a 4°C e leitura no citômetro. Foram avaliados 10000 eventos, no aparelho CyFlow Space (Partec), produzindo o gráfico de tamanho

(FSC) pelo canal FL2 (canal que capta a absorvância 630 nm, de forma logarítmica) (Bertho).

3.10) Citometria de Fluxo

Após incubação, foram obtidos os dados citométricos das amostras: controle e estimulada com PAF, no aparelho CyFlow Space (Partec). O tubo com 800 µL da amostra foi conectado à cânula do citômetro onde foram aspiradas as células. Foram contados 10000 eventos.

Utilizou o citômetro de fluxo com o *laser* de 488 nm que intercepta as células. Analisando-se o pequeno desvio do *laser* (FSC), foi possível determinar raios que estavam tangenciando a célula, permitindo a determinação do tamanho celular. A análise dos desvios perpendiculares (SSC) mostrou a granularidade celular. Os canais de FSC e SSC foram captados de forma linear. O mesmo *laser* foi utilizado para a obtenção dos dados de emissão de fluorescência, captados pelo canal FL1 de 530 nm, onde é medida a fluorescência emitida pela oxidação do DHR e para o canal FL2 630 nm, correspondente à fluorescência emitida pelo PI. As construções dos gráficos para as fluorescências foram de forma logarítmica (Bertho).

3.11) Lise de Neutrófilos

Os neutrófilos direcionados para eletroforese, após 30 minutos de incubação (quiescente e PAF), sofreram lise das membranas externas e internas (organelas), com detergentes, degradação dos ácidos nucleicos, desnaturação, solubilização e redução das proteínas e inibição das proteases. As amostras foram centrifugadas; descartado o sobrenadante e ao sedimento obtido foram adicionados 450 µL de tampão de lise. O tampão de lise foi preparado no mesmo dia da obtenção dos neutrófilos e contém: uréia 7 M, tiouréia 2 M, pharmalyte pH4-7 0,5%, triton X-100 1%, inibidores de protease (Healthcare, G.) 1% e nuclease (GE Healthcare) 1%. As amostras foram agitada em vórtex por 5 minutos, logo em seguida incubadas por 1 hora em agitação leve na temperatura ambiente. Após esse tempo foram acrescentados 50 µL de DTT 0,1 mg/µL e 3 µL de EDTA 0,16 M a cada amostra e agitado novamente no vórtex por 5 minutos, incubando por mais 1 hora, nas mesmas condições anteriores. O EDTA e o DTT foram

utilizados após 1 hora para não inibir a ação da nuclease (EDTA) e nem interferir na ação da tiouréia (DTT) (Healthcare, G. E., 2004).

3.12) Dosagem de Proteínas (Método Bradford)

Após obtenção dos extratos protéicos dos grupos controle e estimulado com PAF de cada indivíduo, realizou-se a dosagem de proteínas pelo método descrito por Bradford (Bradford, 1976) e adaptado por Ramagli (1985) para a compatibilidade com o tampão de lise (Ramagli, 1985). Foi feita uma curva de calibração com albumina bovina, cujo coeficiente R aceitável era acima de 0,99. Cada amostra foi dosada em triplicata determinando assim, a concentração de proteína. O volume foi calculado para obtermos 50 µg de proteína e adicionamos a esse volume, tampão de lise (uréia 7 M, tiouréia 2 M, pharmalyte pH4-7 0,5%, triton X-100 1%, inibidores de protease 1% e nuclease 1%) até completar o volume de 350 µL.

3.13) Focalização Isoelétrica (IEF ou 1ª Dimensão)

Alíquotas com 50 µg de proteínas em 350 µL de tampão de lise foram aplicadas no IPG strip holder (canaleta de cerâmica contendo eletrodos), e sobrepostas por um *strip* de 18 cm de comprimento e 0,3 cm de largura e faixa de pH de 4-7 (Immobiline DryStrip, GE Healthcare, UK), sobre o *strip* foram adicionados 400 µL de óleo mineral (PlusOne, GE Healthcare, UK), para evitar ressecamento durante a focalização.

Os sarcófagos foram submetidos à IEF no instrumento IPG-Phor II (GE Healthcare, UK). Nesse aparelho, as amostras passaram por uma etapa de reidratação de 12 horas sob temperatura constante, sem aplicação de voltagem e depois iniciaram-se as etapas de focalização: uma, em gradiente crescente até 500 V por 500 Vh; outra, em gradiente crescente até 3500 V por 3500 Vh, e a última, constante de 8000 V por 40000 Vh. Durante a hidratação e a focalização, as amostras foram mantidas a 20°C, e a corrente limite a que ficaram submetidas foi de 75 µA por *strip*. As amostras controle e PAF de um mesmo indivíduo foram focalizadas simultaneamente (Dunn e Corbett, 1996).

3.14) Etapa de Equilíbrio

Após a focalização os *strips* foram imersos em 5 mL do tampão de equilíbrio que contém uréia 6 M, SDS10%, glicerol, TRIS-HCl 1,5 M pH 8,8, com DTT 1% para reduzir as pontes dissulfeto onde permaneceram por 15 minutos em agitação leve a temperatura ambiente. Em seguida, os *strips* foram imersos no mesmo tampão agora sem DTT, com iodoacetamida 135 mM, objetivando alquilar os grupos -SH reduzidos, incubados no escuro por 15 minutos (Gorg, Obermaier *et al.*, 2000).

3.15) Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE ou 2ª Dimensão)

O gel de poliacrilamida 12% com dimensões de 18 cm × 20 cm × 1 cm foi preparado entre placas de vidro utilizando o sistema Protean II (BioRad, Hercules, CA, USA) para todos os géis de 2ª dimensão desenvolvidos neste trabalho. O gel para eletroforese bidimensional é composto por duas partes, o gel separador onde migram as proteínas de acordo com o tamanho, e o gel concentrador onde concentram-se as proteínas em uma zona mais estreita, para obter uma melhor resolução .

O gel separador é feito em um volume de 40 mL para cada gel, e composto de 13,2 mL de água MilliQ, 40% de acrilamida/Bisacrilamida (PlusOne), 25% de Tris-HCl 1,5 M pH 8.8 (PlusOne), 1% de SDS 10%, 1% de PSA (Persulfato de Amônio) 10% (Sigma) e 0,04% de TEMED (N,N,N,N tetramethyl enediamine, Sigma) (Santos, 2007).

O concentrador é preparado em um volume de 5 mL e polimerizado sobre o separador entre as placas de vidro, junto com o pente que irá formar o poço do marcador de massa molecular e o poço para afixar o *strip* da 1ª dimensão. O concentrador é constituído de 2,8 mL de água MilliQ, 12,6% de Acrilamida/Bisacrilamida, 25% de Tris-HCl 0,5 M pH 6.8, 1% de SDS 10%, 5% de PSA 10% e 0,08% de TEMED (Santos, 2007).

O marcador de massa molecular (Amersham Pharmacia- Biotech) é uma mistura de proteínas de massas moleculares conhecidas: fosforilase b (94000 Da), albumina (67000 Da), ovoalbumina (43000 Da), anidrase carbônica (30000 Da), inibidor de tripsina (20100 Da), e lactalbumina (14400 Da). Essa mistura de proteínas foi adicionada ao poço ao lado do *strip*. O *strip* proveniente da etapa de equilíbrio foi encaixado no poço adaptado sobre o gel concentrador. O *strip* então, foi fixado junto ao gel concentrador utilizando-se agarose 0,3% morna misturada a azul de bromofenol (Santos, 2007).

Após a aplicação das amostras, o gel foi montado na cuba para ser submetido à diferença de potencial elétrico (força que faz migrar as proteínas). Foram adicionados 2 L de tampão corrida (Tris base 0,55 mol/L - Glicina 1,92 mol/L pH 8.3), na parte inferior da cuba e 500 mL do mesmo tampão na parte superior. A fonte elétrica foi programada para fornecer 20 mA em corrente constante e a tensão máxima foi limitada em 500V. Foi acoplado à cuba um aparelho de refrigeração (Multitemp II Cooling Bath, GE Healthcare), para manter a temperatura em 15°C. O azul de bromofenol marcou a frente de corrida, facilitando a visualização da altura da corrida no gel (Santos, 2007).

3.16) Coloração Prata de Alta Sensibilidade

Os géis foram corados utilizando uma técnica de prata de alta sensibilidade que permite a visualização dos *spots* com até 0,1 ng de proteína; essa coloração é feita com prata amoniacal em pH básico (De Souza Castro, De Sa *et al.*, 2006).

Após o término da separação eletroforética, os géis foram mergulhados na solução de fixação (12% de ácido tricloroacético e 50% de metanol), permanecendo em agitação leve por 1 hora. Em seguida, o gel foi imerso em outra solução fixadora (5% ácido acético e 50% etanol) também por 1 hora em agitação leve (De Souza Castro, De Sa *et al.*, 2006).

Os géis foram lavados 2 vezes em água MilliQ por 5 minutos cada. Então, foi adicionada a solução de impregnação de prata contendo: 0,89% de AgNO₃, 0,3% de NH₄OH e 0,08% de NaOH. O gel permaneceu nessa solução por 20 minutos e então passou por uma nova lavagem com água MilliQ por 5 minutos (De Souza Castro, De Sa *et al.*, 2006).

Os géis foram para a etapa de revelação que consistiu de 0,017% de ácido cítrico e 0,236% de formaldeído. Após a visualização completa dos *spots*, o gel foi imediatamente imerso na solução de parada da reação contendo: 30% de etanol, 7% de ácido acético e 2,5% de glicerol 87%, onde permanece por 20 minutos. Finalmente, os géis foram imersos por 1 hora na solução de lavagem e hidratação (30% de etanol 95% e 2,5% de glicerol 87%) (De Souza Castro, De Sa *et al.*, 2006).

3.17) Digitalização e Secagem dos Géis

Após 1 hora de hidratação os géis tiveram suas imagens digitalizadas e armazenadas no computador. Essa digitalização foi feita com uso do *scanner* modelo

Image Scan UMAX GE® (De Souza Castro, De Sa *et al.*), com uma resolução de 300 dpi, captura em modo de transmissão e alta nitidez. Foram armazenadas para cada gel sua imagem colorida em formato JPG de baixa compressão e imagens em 256 tons de cinza no formato TIFF, ambas com 2124 por 2087 pixels.

Os géis então foram secados da seguinte maneira: cada gel foi colocado entre 2 folhas de celofane hidratadas em solução de 32% de etanol e 1% de glicerol 87% sobre uma placa de vidro lisa. Os géis foram então armazenados na câmara fria até secar; quando secos as bordas das folhas de celofane foram cortadas e os géis guardados.

3.18) Análise Computacional das Imagens dos Géis

As imagens dos géis em tons de cinza salvas no formato TIF foram utilizadas para serem analisadas com auxílio do *software* Image Master 2D Platinum versão 5.0 e versão 6.0 (GE Healthcare). Para utilização das imagens dos géis pelo Image Master foi realizada a conversão do formato TIF para o formato MEL (Biosciences).

No Image Master 2D Platinum versão 5.0 cuja versão tem parâmetros com melhor resolução automática para: *smooth* que possibilita discriminar ruído de *spot* e definir *spots* em sobreposição; *saliency* que define a curvatura de um *spot*, também ajudando a retirar ruídos e *min area* que elimina artefatos próximos aos *spots* que não conseguimos eliminar com a *saliency* e nem o *smooth*. Foram feitas as detecções automáticas, isto é, delimitações dos *spots*, segundo parâmetros descritos acima com valores preestabelecidos por nós para cada gel. Esses parâmetros tiveram como critérios: cobertura na delimitação de um maior número de *spots*, exclusão de *background* e melhor separação de *spots* próximos. Porém, os géis passaram por revisões de detecção feitas manualmente com ajuda dos recursos de visualização de *spots* em 3D, mudança de contrastes e/ou de cores e gráficos marcando a intensidade tanto na lateral quanto na parte superior, indicando onde um *spot* começa e termina. As revisões foram feitas para adicionar *spots* não detectados, separar e juntar *spots* e excluir *background* e artefatos da coloração detectados erroneamente (Biosciences).

Após essa criteriosa revisão as imagens foram transferidas para o *software* Image Master 2D Platinum versão 6.0, onde foi processado o pareamento dos *spots* entre os géis, com análises da variação da porcentagem do volume intra e inter classes (Healthcare).

Primeiramente selecionou os *Landmarks* (pares de *spots* marcadores entre géis diferentes), e processou o pareamento automático. O pareamento também passou por revisões criteriosas (Healthcare).

Os géis foram pareados da seguinte forma:

- ❖ Classe dos Controles (quiescentes): onde foi selecionado um gel normal (quiescente) 3B como referência, por ser o gel com maior número de *spots* e mais bem focalizado, pareado com quadruplicata de indivíduo A, duplicata do indivíduos B e a triplicata do indivíduo C. Foi utilizado quadruplicata de 1 indivíduo por ter amostras suficientes e melhora da reprodutividade dos géis desse indivíduo.
- ❖ Classe dos Estimulados com PAF (PAF): onde tinha um gel PAF 2A referência pareado com as triplicatas dos indivíduos A, B e C. Foi utilizado quadruplicata pelo mesmo motivo acima.
- ❖ Pareamento dos géis referências normais e PAF.

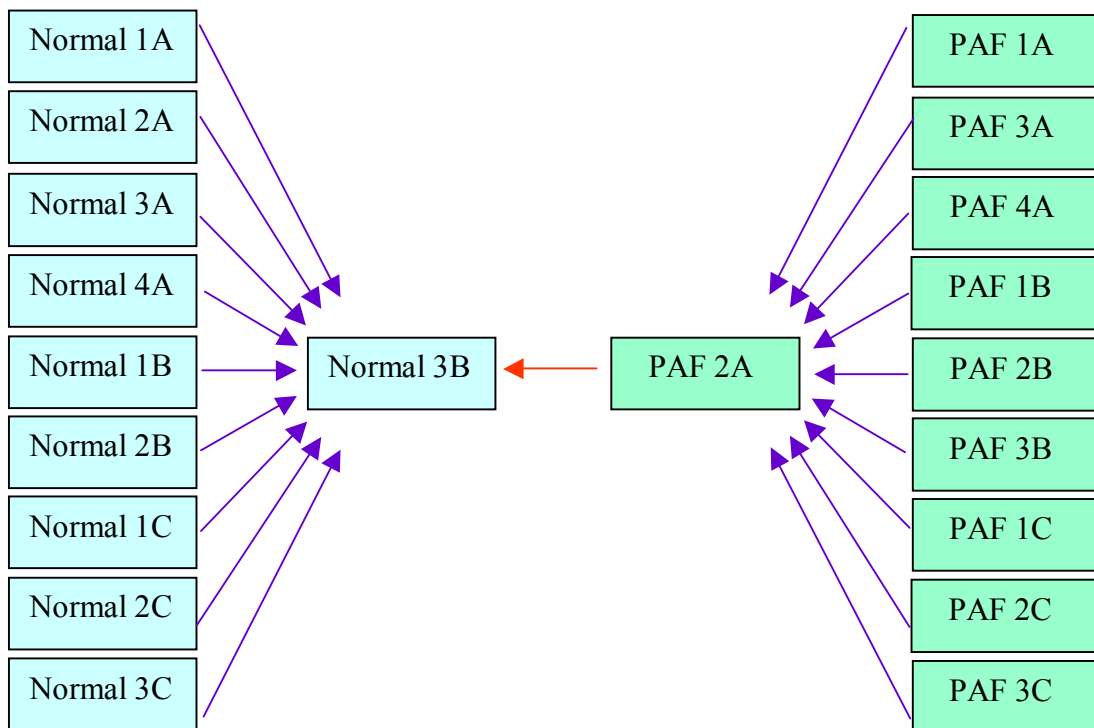


Figura 18: Esquema geral do pareamento. Primeira etapa do pareamento (setas roxas), segunda etapa do pareamento (seta laranja).

A seguir foi feita a revisão do pareamento com auxílio das ferramentas como sobreposição das imagens dos géis pareados com diferentes cores; análise das vizinhanças dos *spots*; vetores que permite visualizar a orientação dos pareamentos; *scatter plot* (gráfico de correlação dos *spots* entres os géis pareados); histogramas com a percentagem do volume, tendo como dados, média e dispersão. Foram obtidas tabelas com as percentagens do volume de cada *spot* pareado, tanto intraclasse, classe normal (quiescentes) e classe PAF, como interclasses, classe quiescente e classe PAF comparados entre si. Esses dados foram exportados para análise estatística (Healthcare, ; Healthcare, G.).

3.19) Análise Estatística

Ainda dentro da classe gerada, obteve-se uma tabela com os dados da percentagem de volume de cada *spot*, em cada gel. Este relatório foi utilizado para cálculos de análise estatística no programa SPSS® Base 13.0. A distribuição gaussiana dos dados foi verificada considerando os valores de percentagem de volume dos *spots* nos dez géis do grupo Normais (quiescente) e nos dez géis do grupo PAF. O teste de Kolmogorov-Smirnov foi utilizado para verificação da distribuição gaussiana, levando em conta os critérios de média dos *spots* correspondente à mediana, simetria da curva de Gauss e proporção altura versus largura da curva. O teste t-pareado foi utilizado para os dados que apresentaram distribuição normal, alguns dados brutos foram transformados para log na base 10 para alcançar a distribuição normal, porém poucos *spots* passaram a ter a distribuição gaussiana com o uso desse recurso. O teste de Wilcoxon foi empregado para os dados não-paramétricos, ambos com o objetivo de avaliar a influência do PAF na expressão diferencial de proteínas. O nível de significância $p \leq 0,05$ foi considerado para os dois testes (Anexo 5).

O Teste T pareado compara duas variáveis, calculando a diferença dos valores das médias entre dois casos; depois calculam-se as médias das diferenças, o desvio padrão e a partir desses dados obtêm-se a significância. Esse teste só pode ser aplicado quando a distribuição gaussiana nas classes estudadas for normal (Spss, 2004).

O Teste Wilcoxon também compara a distribuição de duas variáveis para dados não-paramétricos. Esse teste se baseia na posição de cada valor (Ranking). Então se processa a soma das posições para as condições e compara os valores obtidos (Spss, 2004).

Outro critério adotado como limitante para a consideração da expressão diferencial foi a variação das médias da porcentagem do volume, sendo considerados os *spots* que variaram em no mínimo, de 2 vezes ou $\frac{1}{2}$ entre as classes. Ainda como critério de inclusão dos *spots* como diferencialmente expressos, foi verificado se os *spots* estavam presente em, pelo menos, 5 géis de cada classe (Biron D.G. , 2006).

3.20) Digestão de *spots* protéicos

Foram produzidos 3 géis com 300 μg de proteínas de neutrófilos (quiescentes) chamados de géis normais, utilizados para identificação de proteínas. Tais géis não passaram pelo processo de secagem e tomou-se o cuidado de não utilizar glicerol que dificulta a identificação por espectrometria de massa (Healthcare, G. E., 2004). Com isso, a solução de hidratação só possui 30% de etanol. Cada *spot* foi recortado do gel e dividido em pedaços pequenos. Os *spots* foram lavados com acetronitrila 100%, em seguida, adicionou-se mais uma vez 50 μL de acetronitrila 100% seguidos por secagem em *Speed Vac*. Depois os *spots* passaram por 2 ciclos de lavagens com adição e descarte de 50 μL de NH_4CO_3 100 mM incubados por 10 minutos, intercalados com adição e descarte de 50 μL acetronitrila. No último ciclo adicionou-se a acetronitrila e secou-se novamente na *Speed Vac*. Os *spots* secos foram hidratados com 50 μL de tampão contendo tripsina suína modificada (Promega) 12,5 ng/ μL , bicarbonato de amônio 50 mM, cloreto de cálcio 5 mM e incubados por 50 minutos no gelo. Então, foram adicionados 10 μL do mesmo tampão sem tripsina e incubou-se a 37°C *overnight* (Santos, 2007).

Os peptídeos foram extraídos com água, 20 μL NH_4CO_3 20 mM, 50 μL da solução contendo ácido acético 5% e acetronitrila 50%. A extração foi processada em sonicador por 20 minutos. Os peptídeos extraídos foram colhidos em outro Eppendorf e secos em *Speed Vac*. Cada digesto foi solubilizado em 10 μL de TFA 0,1% e aderidos em microcoluna de fase reversa Zip Tip (Millipore, Billerica, MA, USA). A adesão dos peptídeos se processa da seguinte maneira: a coluna cromatográfica foi lavada com 10 μL de acetronitrila 50%, e equilibrada com 10 μL de TFA 0,1%, então os peptídeos foram aderidos sendo aspirados e descartados no mesmo Eppendorf 20 vezes, logo em seguida retirou-se o excesso de sal da amostra, aspirando e descartando 10 μL de TFA 0,1%. A seguir, os peptídeos foram eluídos em solução contendo 4 μL de matriz HCCA

(ácido-ciano-4-hidroxicinâmico) 10 mg/mL em 0,1% TFA e 50% de acetronitrila e foram aplicados diretamente na placa de aço do espectrômetro de massa (Santos, 2007).

Alguns *spots* foram analisados em colaboração com o *Protein Research Group – Southern Denmark University*, na Dinamarca, com algumas diferenças em relação ao protocolo. Esses *spots* passaram por redução com DTT e alquilação com iodoacetamida e submetidos ao mesmo processo de digestão descrito acima (Shevchenko, Wilm *et al.*, 1996). Após a extração dos peptídeos, as amostras foram liofilizadas e ressuspensas em 20 µL de TFA 0,1%, concentradas e desalinizadas (lavadas com cerca de 30 µL de TFA 0,1%) por meio da microcoluna Poros R2 ou Poros R3 (Thingholm, Jorgensen *et al.*, 2006). A amostra foi eluída da microcoluna para a placa do MALDI com cerca de 1 µL de matriz HCCA (ácido-ciano-4-hidroxicinâmico em 0,1% TFA e 70% de acetronitrila) na concentração de 5 mg/mL.

3.21) Espectrometria de massa (MALDI)

Os espectros peptídicos das amostras foram obtidos em espectrômetros de massa tipo MALDI-TOF, modelo Reflex IV (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) e MALDI-TOF-TOF, modelo Autoflex2 (Bruker Daltonics, Bremen, Germany), em modo positivo e refletor (fonte de íons 1 20kV) com faixa de massa de 800 a 3000 (m/z) após calibração externa utilizando uma mistura padrão de peptídeos, *pepmix*. Os espectros obtidos foram calibrados internamente com picos originários da digestão de queratina e tripsina, selecionados automaticamente e revisados manualmente com a seleção de picos monocarregados característicos de distribuição isotópica. A edição foi realizada usando os programas Flexanalysis e Biotools.

As buscas em bancos de dados foram realizadas com auxílio do programa MASCOT (www.matrixscience.com), usando os bancos de dados não redundantes do NCBI, National Center for Biotechnology e MSDB, mantido pelo Hammersmith Campus of Imperial College London. Os parâmetros de busca foram: tolerância de desvio de massa molecular entre 50 e 200 ppm, taxonomia *Homo sapiens*, máximo de uma clivagem tríptica perdida, carbamidometilação como modificação constante de cisteínas e oxidação de metionina como modificação variável.

Os espectros MS e MS/MS processados na Dinamarca foram obtidos no AB4700 Applied Biosystem MALDI-TOF-TOF. Foi utilizado o método Reflector Positive Mode (fonte 1 20kV) com faixa de massa de 700 a 4000 (m/z) por 1875 a 5625

tiros acumulados (sendo 1875 tiros acumulados por espectro) com intensidade do *laser* entre 2500 a 3500.

Espectros MS/MS foram obtidos pelo método MS/MS-1K Positive Ion Mode (source 1 8kV e source 2 15kV) por 2175 a 6525 tiros acumulados, intensidade do *laser* variável entre 3500 a 4500, usando argônio como gás de colisão para fragmentação CID e escolhendo os picos mais intensos do espectro como critério para fragmentação.

Listas de massas dos espectros MS foram obtidas com espectros MS/MS em arquivo (mgf) utilizando *software* Applied Biosystems Data Explorer versão 4.6 para busca em banco de dados. Buscas foram realizadas no banco de dados SwissProt versão 54.4, pelo Mascot com seguintes parâmetros: significância do *score* $p < 0,05\%$; taxonomia *Homo sapiens*, Carbamidometil (C) para modificação fixa; Oxidação (M) como modificação variável; número de clivagem perdida igual a 1; tolerância de massa peptídica variável entre 20 a 100 ppm ou 20 a 150 mmu.; tolerância de massa de fragmentação variável entre 25 mmu a 90 mmu.

Para redução de redundância e validação foi utilizado o *software* GPMAW na versão 7.1., de acordo manual do *software*, ou seja, seqüência da proteína identificada era clivada teoricamente e então analisada em comparação com dados experimentais. Na comparação entre seqüências com dados experimentais, quando em caso de redundância.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1) Separação dos neutrófilos

Os gradientes de Percoll com HBSS e com NaCl 1,5M foram aperfeiçoados pelo grupo envolvido com o presente trabalho. Nesta pesquisa, utilizou-se o gradiente de Percoll diluído em HBSS nas porcentagens de 70% e 60%, onde obtivemos como resultado neutrófilos isolados com pureza acima de 97%, avaliados pela contagem diferencial, tendo como principal contaminante os eosinófilos, cujo tamanho, granularidade e densidade são próximos aos dos neutrófilos (Kjellen e Pertoft, 1978). Como, em indivíduos saudáveis, os eosinófilos constituem 2-3% das células circulantes no sangue periférico e os neutrófilos entre 50 e 60%, obtivemos uma pequena contaminação, compatível com o que se observa na literatura analisada (Kjellen e Pertoft, 1978; Jethwaney, Islam *et al.*, 2007). Avaliamos também a quantidade de

neutrófilos, onde obtivemos, em média, entre $1,5 - 2 \times 10^6$ neutrófilos por 3 mL de sangue, resultado variável para cada indivíduo, podendo ser explicado devido a características como: idade, sexo, atividades diárias, condições psicológicas, hábitos alimentares, etc. Outra avaliação foi a viabilidade celular, onde obtivemos 98% de neutrófilos viáveis, resultado adquirido pela coloração com nigrosina e contagem na câmara de Neubauer. Esses dados foram importantes para avaliar a qualidade da separação, evitando a contaminação, morte e a limitação na quantidade de células para prosseguir o experimento.

Também foi realizado a comparação da viabilidade dos neutrófilos após estimulação com PAF 20 nMol/L por 40 minutos. Tais resultados foram obtidos pela avaliação citométrica com a utilização do marcador iodeto de propídeo, que entra na célula e liga-se ao DNA quando a membrana plasmática está permeabilizada (Figura 19).

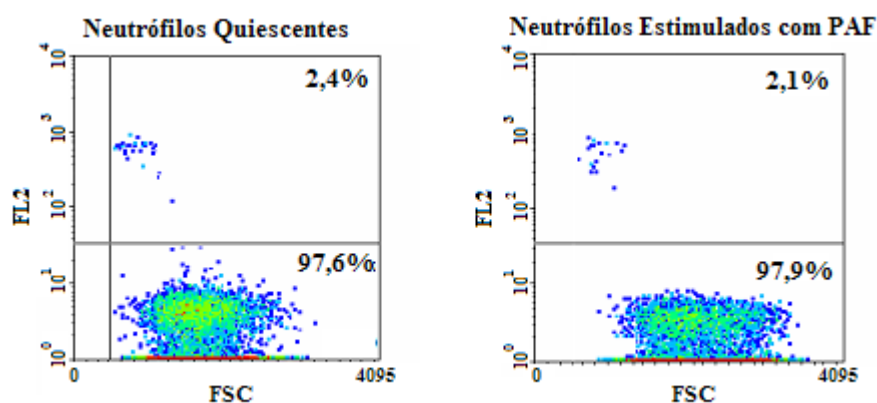


Figura 19: Gráficos citométricos da viabilidade celular de neutrófilos quiescentes (controle) e neutrófilos estimulados com PAF 20 nMol/L por 40 minutos. Tamanho (FSC) *versus* fluorescência com marcação do iodeto de propídeo (FL2).

Observamos viabilidade de 97,6% e 97,9% dos neutrófilos no estágio quiescente e estimulados com PAF, respectivamente, porém essa pequena mortalidade de aproximadamente 2% nas duas populações se dá pelo processo de separação dos neutrófilos. Os resultados estão em acordo com 98% de viabilidade em contagem pela câmara de Neubauer após incubação com nigrosina.

Segundo a literatura, a migração está associada ao retardo da apoptose. O PAF, como estimulador da explosão respiratória e ativador da expressão de marcadores de adesão em neutrófilos, também aumenta a vida-média (Khreiss, Jozsef *et al.*, 2004).

4.2) Estimulação dos neutrófilos pelo PAF *in vitro*

A concentração do PAF foi definida com base na literatura revisada, tendo sido escolhido o valor de 20 nmol/L em função das características de estímulo celular. O pré-requisito adotado foi o de agir como estímulo para NADPH oxidase e, ao mesmo tempo, ser eficaz como um primeiro *hit* para posterior ativação pelo fMLP, caracterizando a ação como estimulante (*priming*). Botha, 1994 utiliza estimulação por PAF na concentração de 20 nmol/L e descreve o preparo para um estímulo subsequente com fMLP. Em outro artigo, Steel e Anderson, 2002, relata que nas concentrações entre 20 nMol/L e 200 nMol/L não havia ativação da NADPH oxidase, mas observou o influxo do Ca^{2+} . Segundo Mathison, 2003, com a utilização de 1 nMol/L de PAF houve um pequeno aumento na produção de superóxido e aumento na expressão da molécula de adesão CD11b e do receptor para lipopolissacarídeo CD14 (Botha, Moore *et al.*, 1995; Steel e Anderson, 2002; Mathison, Befus *et al.*, 2003).

Realizamos um teste para verificar a influência do Ca^{2+} e Mg^{2+} na estimulação e na ativação, estudo realizado em parceria com Santos, 2007. Assim, incubamos os neutrófilos em meio PBS com e sem Ca^{2+} e Mg^{2+} e avaliamos com medidas citométricas a produção de peróxido de hidrogênio após 40 minutos de estimulação com PAF 20 nmol/L, com PAF 20 nmol/L + fMLP 100 nmol/L, com fMLP 100 nmol/L e PMA 100 ng/mL (Figuras 20, 21, 22 e 23).

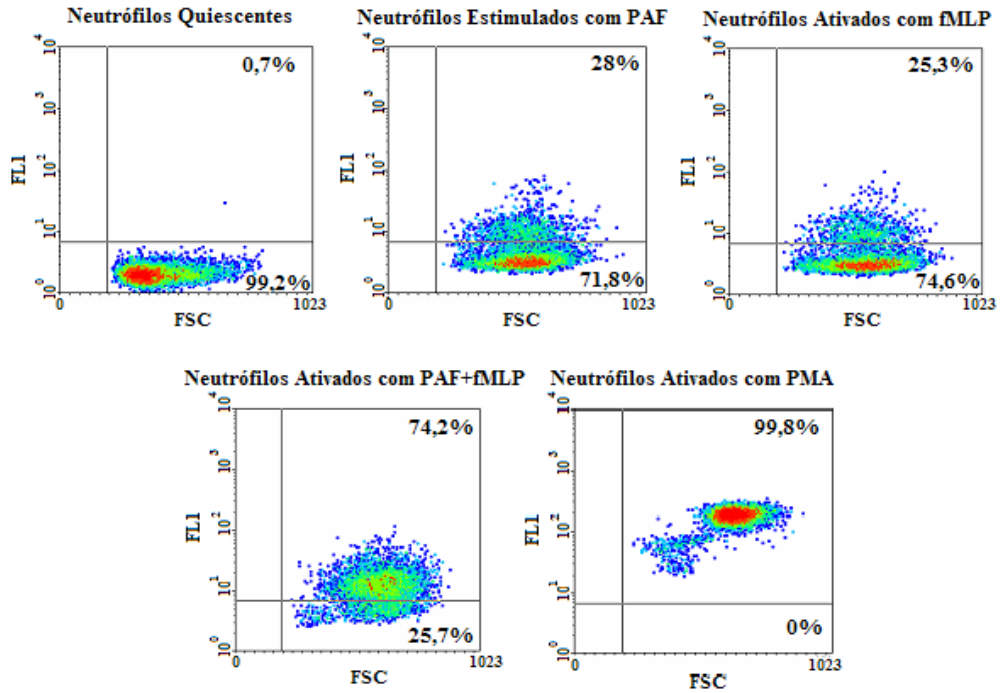


Figura 20: Gráficos citométricos da estimulação e ativação dos neutrófilos incubados **sem Cálcio e Magnésio**. Tamanho celular (FSC) *versus* fluorescência após ligação do DHR com peróxido de hidrogênio (FL1).

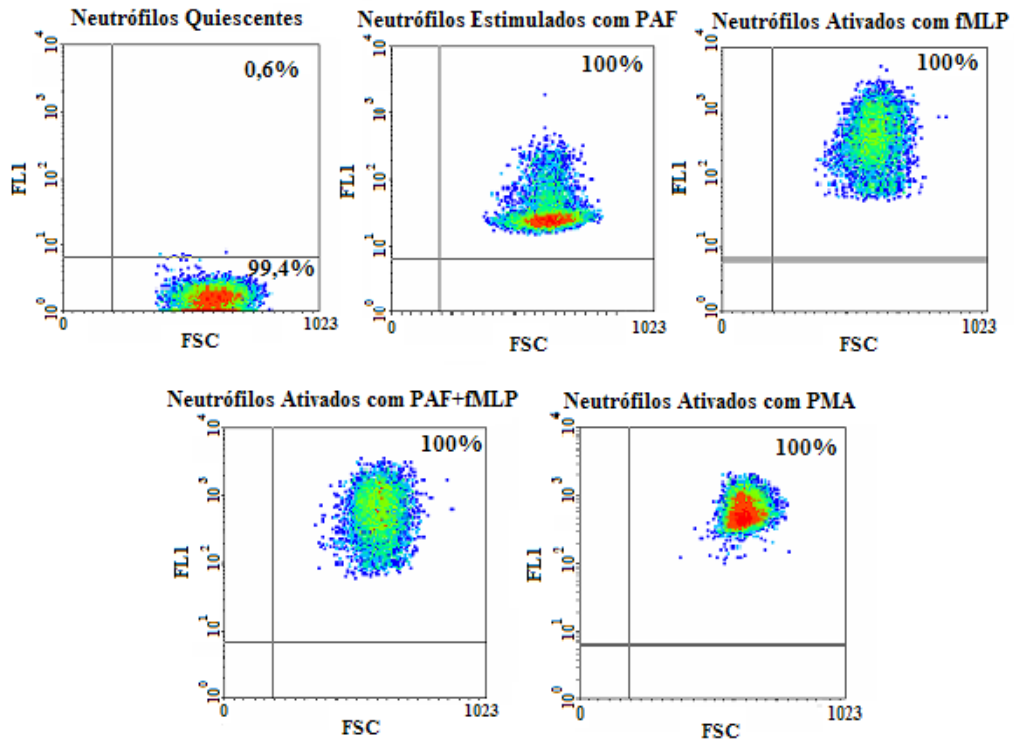


Figura 21: Gráficos citométricos de estimulação e ativação dos neutrófilos incubados **com Cálcio e Magnésio**. Tamanho celular (FSC) *versus* fluorescência após ligação do DHR com peróxido de hidrogênio (FL1).

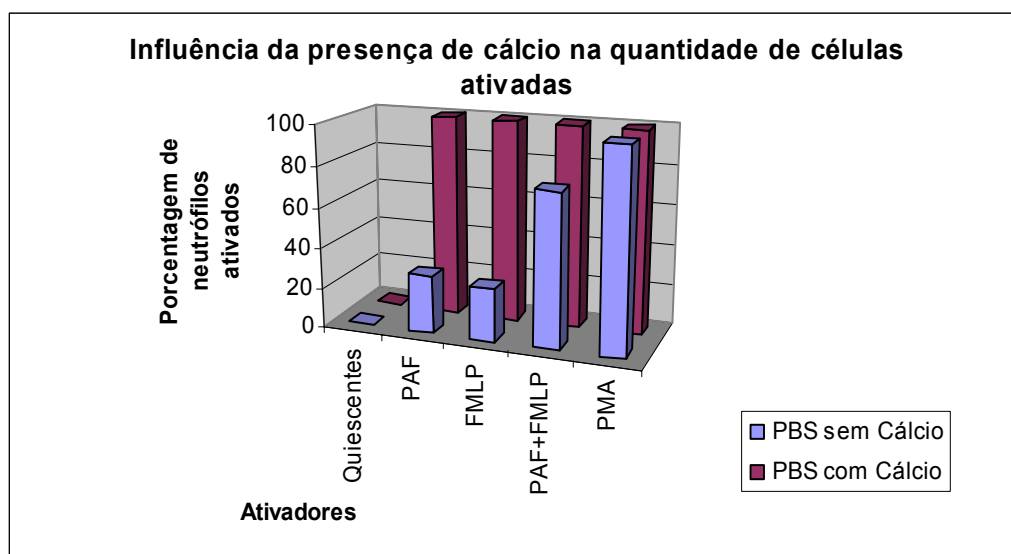


Figura 22: Quantidade de neutrófilos que apresentaram ativação (fluorescência por DHR acima do controle quiescente) em resposta a diversos ativadores, na presença e ausência de cálcio.

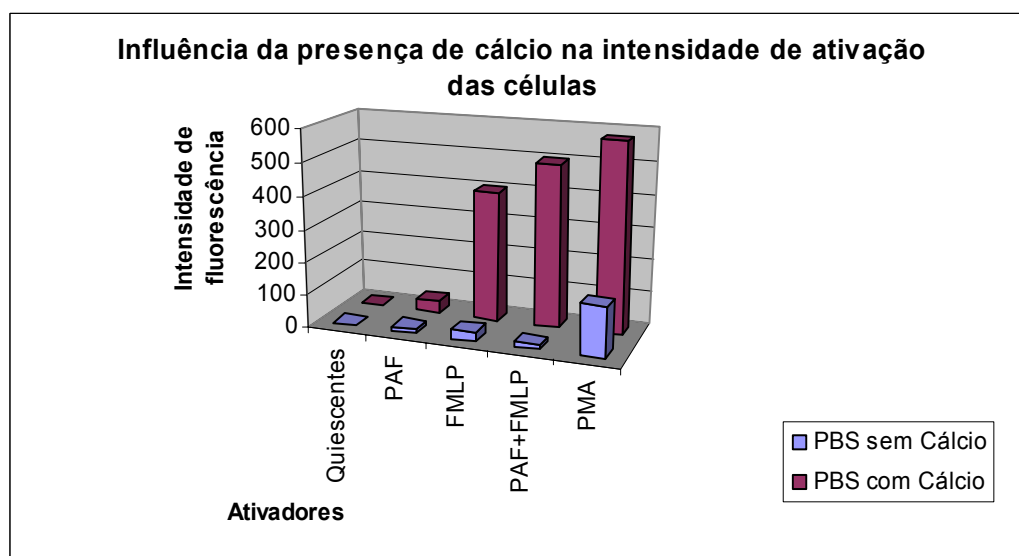


Figura 23: Intensidade fluorescência da DHR (média geométrica das intensidades medidas para cada célula) conseqüente à produção de H_2O_2 por neutrófilos em resposta a diversos ativadores, na presença e ausência de cálcio.

Observamos que os neutrófilos ressuspensos em PBS com cálcio apresentaram maior número de células produzindo peróxido de hidrogênio e maior intensidade média de fluorescência por célula.

De acordo com a literatura, muitas proteínas dependentes de cálcio participam da ativação da NADPH oxidase, adesão ao endotélio, desgranulação, ativação da fosfolipase A₂ e síntese de IL-8. Moléculas e quimioatraentes, tais como LTB₄, C5a, fMLP e PAF (quimiocinas que possuem receptores de membrana acoplados à proteína G), são responsáveis pelo influxo de cálcio. A proteína G ativa a PLC que ativa a formação do IP₃, responsável pela mobilização dos receptores de cálcio na membrana plasmática e pela saída do cálcio de vesículas armazenadoras para o citosol (Tintinger, Steel *et al.*, 2005). O PMA, análogo do DAG, ativa a PKC que pode ser ativada tanto pela via dependente, como pela independente de cálcio. Outro estudo, demonstra que o IP₃ também participa da ativação dos neutrófilos pelo PMA (Karlsson, Nixon *et al.*, 2000).

Com o influxo de cálcio estimulado pelo PAF, a PLA₂ é ativada e fosforila p38, ambas dependentes de cálcio. A ativação da p38 fosforila a subunidade p67^{PHOX} que migra para membrana montando o complexo NADPH oxidase. A ERK também possui uma via de ativação dependente de cálcio, via das subunidades α e β da PKC (Chen, Lin *et al.*, 2005). Porém, existe outro mecanismo de sinalização para a ativação da ERK independente de cálcio.

A pequena quantidade de ROS liberado pelos neutrófilos, após estimulação do PAF em comparação com outros ativadores, não está diretamente associada a influxo de cálcio, mas está relacionada à pequena quantidade de ativação da p38, diferença encontrada em comparação com TNF- α (Brown, Stewart *et al.*, 2004). Porém, outros estudos demonstram diferenças entre PAF e fMLP na ativação das subunidade da proteína G. O PAF ativa parcialmente a proteína G, subunidades insensível a toxina pertussis, diferentemente do fMLP que ativa a proteína G por completo. O resultado dessa ativação parcial é o desencadeamento voltado para via da p38 MAPK (Nick, Avdi *et al.*, 1997; Steel e Anderson, 2002; Chen, Lin *et al.*, 2005). Com isso a estimulação pelo PAF resulta em pequenas alterações de produção de superóxido (Nick, Avdi *et al.*, 1997; Steel e Anderson, 2002).

4.3) Produção dos géis bidimensionais

Foi estabelecida a padronização da lise celular e produção dos géis bidimensionais para pesquisas de estimulação e ativação *in vitro*. Após a estimulação

dos neutrófilos por 30 minutos, realizamos a lise celular, com adição do tampão de lise e, logo em seguida, a dosagem de proteínas pelo método de Bradford.

Os géis, contendo 50 µg de proteínas, foram focalizados em pH ácido de 4-7 no sistema IPGPHOR II por 21 horas em média, uma vez que o procedimento foi limitado por volts-hora. A segunda dimensão foi realizada com corrente constante de 20 mA para cada gel, e submetidos a coloração de prata de alta sensibilidade.

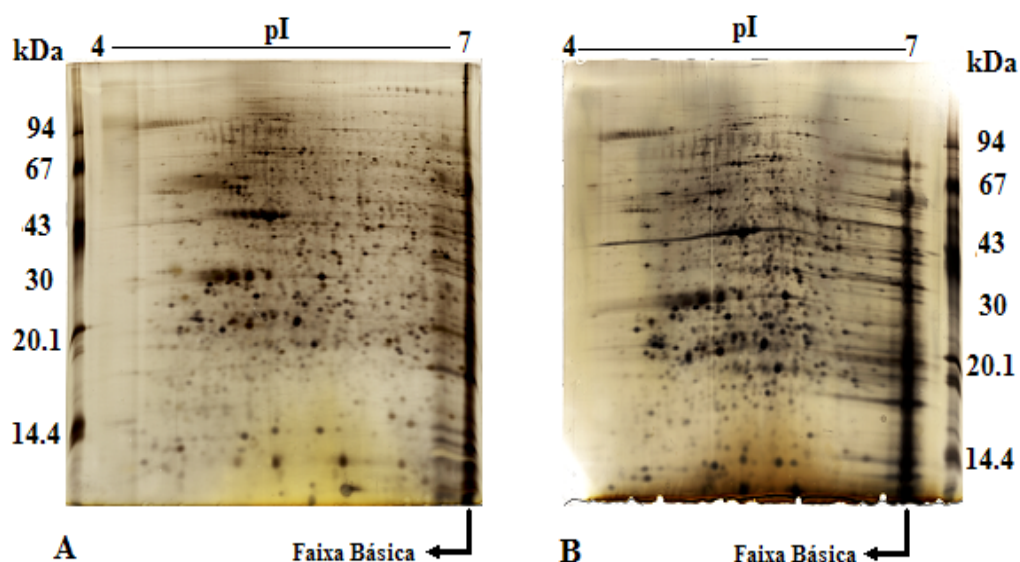


Figura 24: Géis bidimensionais com 50 µg de proteínas em pH ácido de 4-7. (A) gel de neutrófilo quiescente e (B) gel de neutrófilos estimulados com PAF.

Também foram confeccionados 3 géis de neutrófilos quiescentes mais concentrados (300µg) com a mesma coloração (prata de alta sensibilidade) para identificação de proteínas. O protocolo de focalização foi o mesmo, porém houve um atraso de 6 horas, provavelmente pela quantidade de proteína.

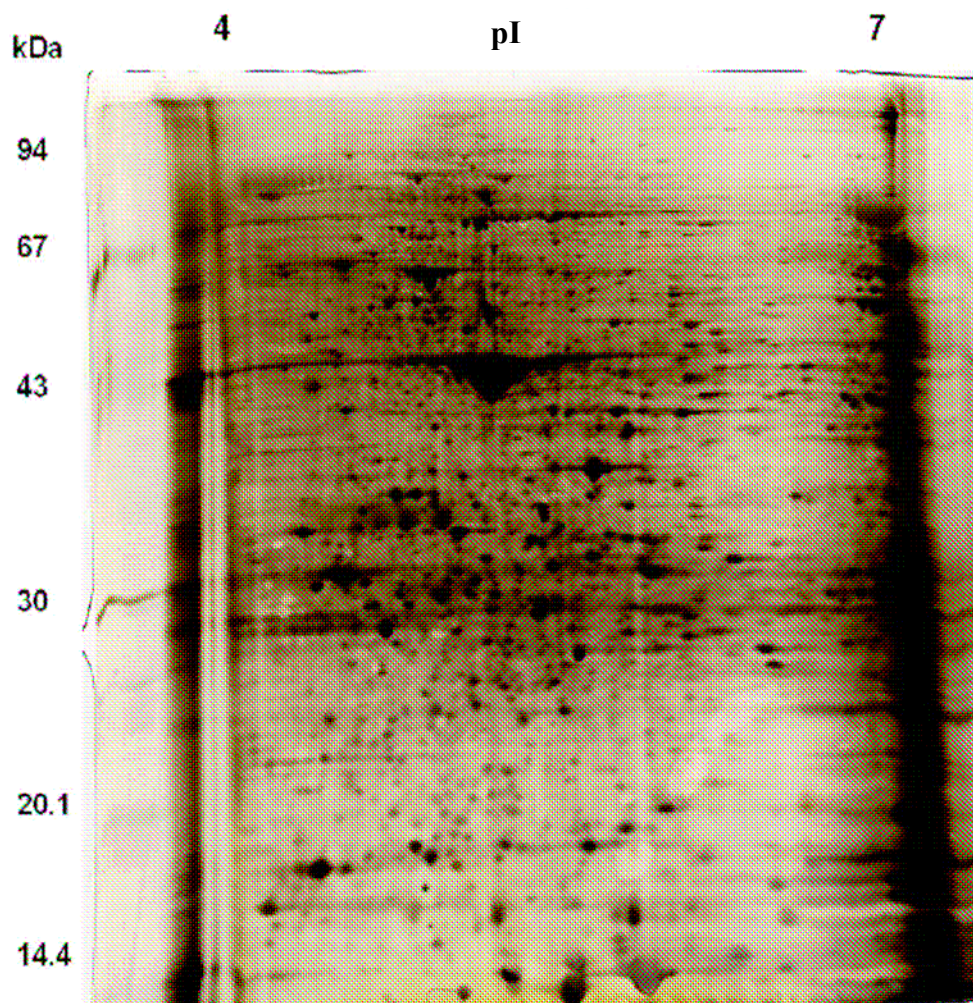


Figura 25: Gel bidimensional de neutrófilos quiescentes com 300 μ g de proteínas corado com prata de alta sensibilidade.

4.4) Análise dos géis

Após a obtenção da imagem dos géis bidimensionais, realizamos a comparação por meio do programa Image Master Platinum versão 5.0 e 6.0. Em média, foram detectados 1500 *spots* em cada gel. Após a comparação dos géis e a realização da análise estatística, obtivemos 392 *spots* exclusivos dos neutrófilos quiescentes e 350 *spots* exclusivos dos neutrófilos estimulados com PAF (Figura 26 e Anexos 1 e 2). Muitos *spots* aparentemente exclusivos da condição quiescente foram encontrados na faixa próxima do pI 7; como essa região apresenta baixa reprodutibilidade, essa quantidade de *spots* diminui com uma avaliação mais estridente. Segundo os critérios utilizados por Biron, 2006, os *spots* só são considerados exclusivos quando não aparecem em nenhum gel da condição comparada e em, pelo menos, 5 géis da outra condição estudada. Os resultados anteriores consideravam *spots* que apareceram em,

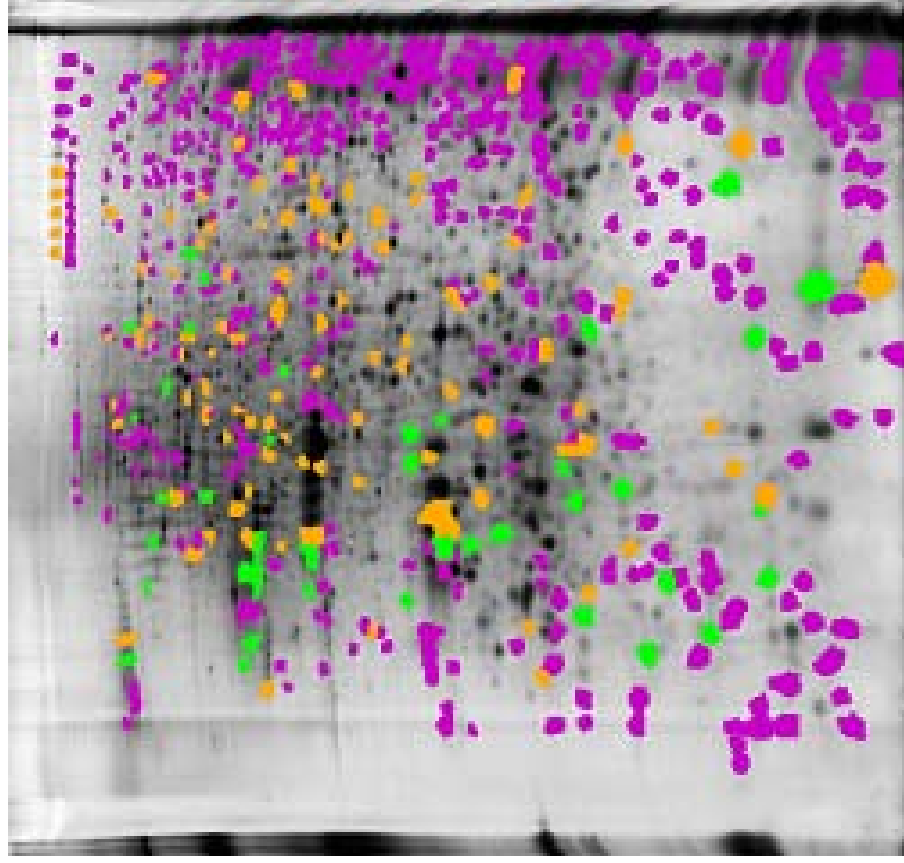
pelo menos, 1 gel da condição estudada e ausente nos géis da condição comparada. Adotando o critério proposto por Biron, 2006, os *spots* exclusivos de neutrófilos quiescentes foram 113 e dos neutrófilos estimulados 134.

Outro dado obtido foi a expressão diferencial utilizando os dados da porcentagem do volume de cada *spot*, com o nível de significância de $p \leq 0,05$. 145 *spots* apresentaram expressão diferencial, sendo 103 *spots* com expressão aumentada após a estimulação dos neutrófilos com PAF e 42 diminuída com a estimulação. Para os *spots* diferentemente expressos também verificou-se o critério de estar presente em, pelo menos, 5 géis de cada condição. Assim, obtivemos os seguintes resultados: dos 103 *spots* com expressão aumentada 66 apareceram em, pelo menos, 5 géis de cada condição e dos 42 *spots* com expressão diminuída, 22 *spots* apareceram em, pelo menos, 5 géis de cada condição (Tabelas 2 e 3).

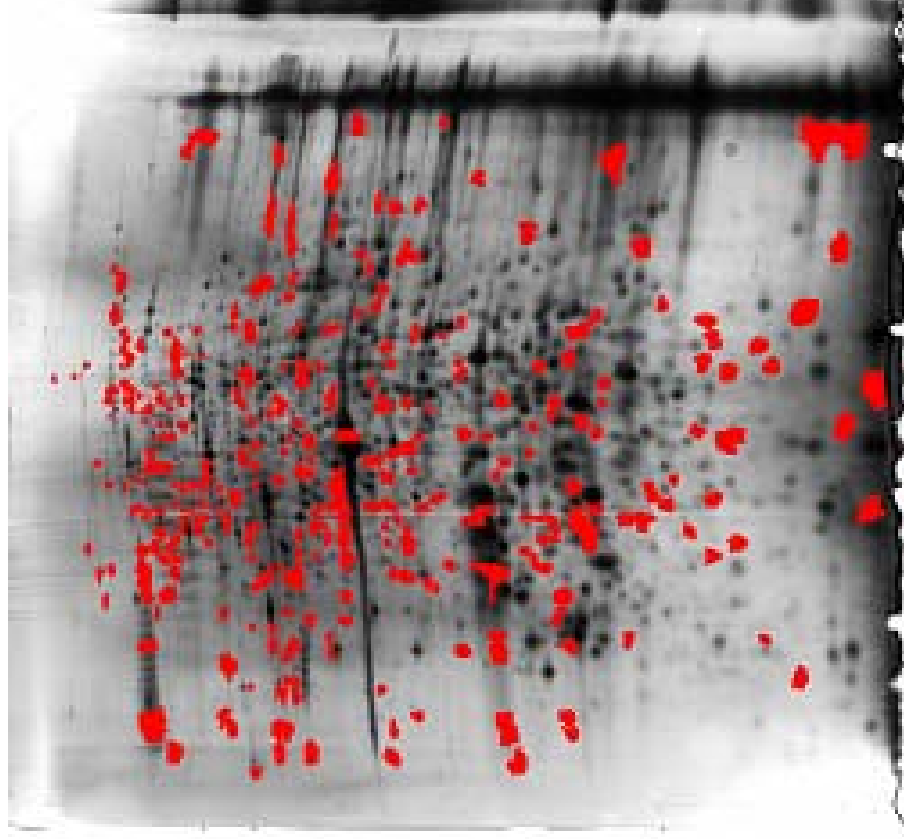
Verificamos também a expressão aumentada ou diminuída pela razão das médias da porcentagem de volume de cada *spot* com variação ≥ 2 ou $\leq 0,5$ entre as condições e constatamos que 316 *spots* apresentaram essa variação, sendo 219 *spots* com expressão aumentada após estimulação e 97 *spots* com expressão diminuída (Anexo 3 e 4).

Verificamos os *spots* que atendiam aos 3 critérios: significância estatística ($p \leq 0,05$), razão das médias ≥ 2 ou $\leq 0,5$ e que estavam presente em, pelo menos, 5 géis de cada condição (Tabelas 4 e 5).

Estes resultados levaram em conta os 10 géis de cada condição, realizadas em triplicatas biológicas (neutrófilos de 3 indivíduos) e triplicatas experimentais (3 géis de cada indivíduo), com exceção de 1 indivíduo para o qual foi utilizada uma quadruplicata. Com essas 3 informações, avaliamos os *spots* de forma criteriosa, para evitar falsos positivos formados pela difícil reprodutibilidade apresentada pelos géis bidimensionais. Logo, podemos inferir a confiabilidade das variações encontradas e orientar as próximas pesquisas, principalmente de variabilidade populacional para encontrar marcadores moleculares para diagnósticos e terapias.

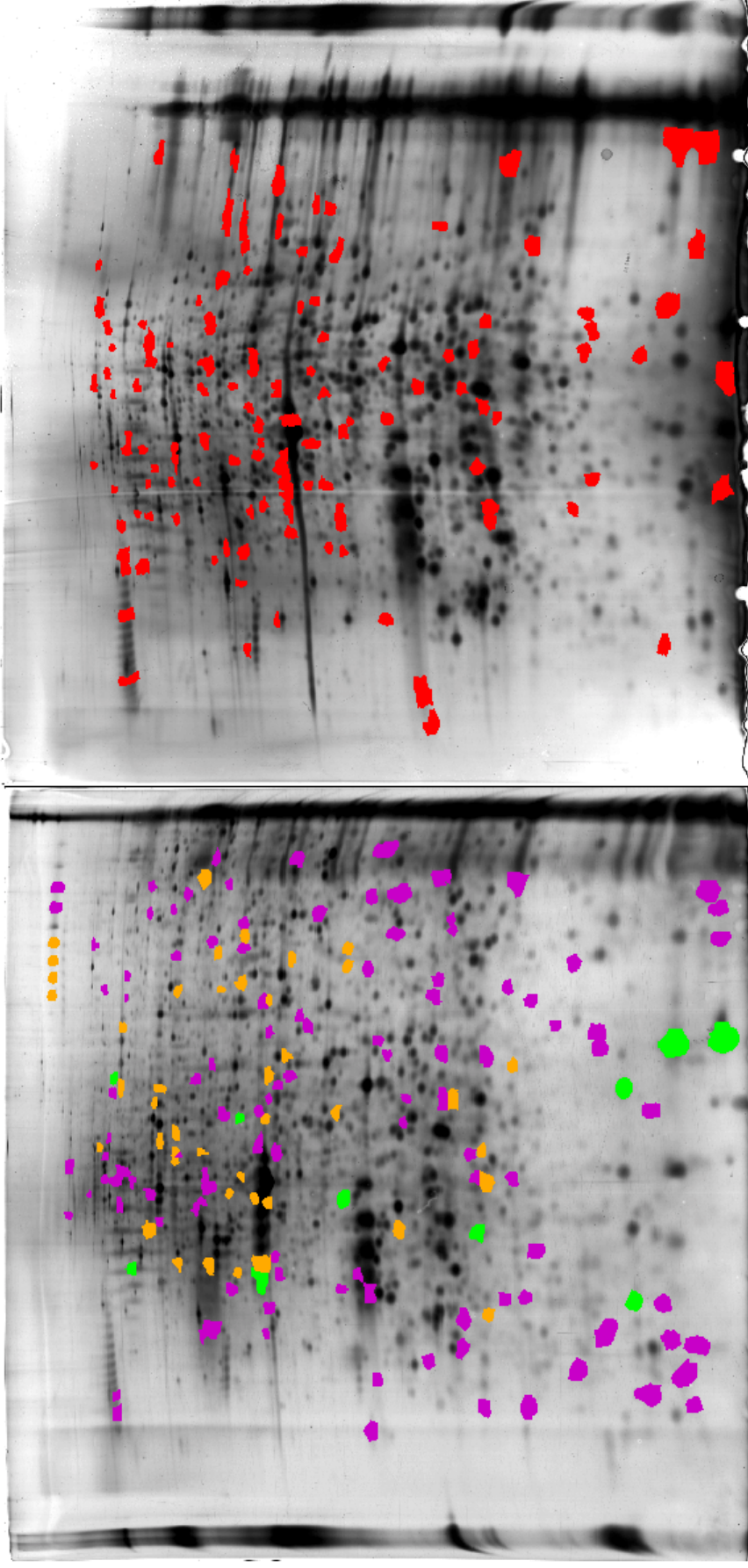


B



A

Figura 26: Géis bidimensionais após a comparação e análise estatística. A – gel bidimensional dos neutrófilos quiescentes; B – gel bidimensional dos neutrófilos estimulados com PAF (20 nMol/L). Legenda: spots em rosa – exclusivos da condição quiescente; spots em amarelo – expressão aumentada após estimulação com PAF; spots em verde – expressão diminuída após estimulação com PAF e spots em vermelho – exclusivos da condição estimulada por PAF.



A

B

Figura 27: Géis bidimensionais após a comparação e análise estatística, com avaliação dos *spots* presentes em, pelo menos, 5 géis de cada condição e para os *spots* com expressão aumentada, além da significância, razão entre $q/PAF \geq 2$ e com expressão diminuída, além da significância, razão $q/PAF \leq 0.5$. A – gel bidimensional dos neutrófilos quiescentes; B – gel bidimensional dos neutrófilos estimulados com PAF (20 nMol/L). Legenda: *spots* em rosa – exclusivos da condição quiescente; *spots* em amarelo – expressão aumentada após estimulação com PAF; *spots* em verde – expressão diminuída após estimulação com PAF e *spots* em vermelho – exclusivos da condição estimulada por PAF.

Tabela 2: *Spots* com expressão aumentada na condição PAF. Realce em verde *spots* com razão das médias quiescentes/PAF \leq 0,5. Realce em amarelo, *spots* que estão presentes em, pelo menos, 5 géis de cada condição. Número do *spot* do gel Master que parecia com outros géis (Nº Match).

Spots com expressão aumentada na condição PAF			
Nº Match	p\leq0,05	Razão das médias Q/P	Presença nos géis Q e P
69	0,011	0,09	4Q 9P
70	0,015	0,18	5Q 9P
71	0,021	0,21	5Q 9P
72	0,013	0,26	6Q 9P
73	0,008	0,22	6Q 9P
142	0,036	0,11	3Q 6P
147	0,005	0,13	5Q 10P
156	0,033	0,73	7Q 10P
177	0,040	0,55	10Q 10P
218	0,029	0,48	8Q 10P
227	0,050	0,32	5Q 8P
250	0,028	0,37	4Q 9P
257	0,043	0,12	1Q 5P
309	0,028	0,19	4Q 7P
313	0,028	0,42	6Q 9P
314	0,043	0,20	2Q 6P
345	0,035	0,46	6Q 10P
362	0,021	0,40	7Q 8P
372	0,011	0,26	5Q 9P
408	0,007	0,55	7Q 10P
413	0,050	0,24	4Q 7P
433	0,017	0,32	5Q 7P
434	0,023	0,44	6Q 9P
442	0,023	0,50	6Q 10P
447	0,036	0,44	5Q 7P
453	0,050	0,37	4Q 7P
482	0,028	0,59	5Q 9P
497	0,038	0,28	3Q 8P
512	0,018	0,09	1Q 7P
521	0,007	0,57	10Q 10P
526	0,004	0,30	6Q 10P
530	0,015	0,15	4Q 9P
538	0,028	0,02	1Q 6P
540	0,037	0,39	5Q 10P
553	0,005	0,33	7Q 10P
561	0,038	0,22	4Q 9P
595	0,021	0,37	6Q 8P
599	0,038	0,32	5Q 8P
610	0,017	0,07	3Q 7P
620	0,020	0,74	10Q 10P
622	0,021	0,26	4Q 9P
636	0,021	0,33	6Q 9P
651	0,340	0,61	8Q 9P
656	0,022	0,72	10Q 10P
661	0,010	0,51	7Q 10P

672	0,002	0,22	5Q 9P
685	0,021	0,32	6Q 9P
694	0,001	0,50	8Q 10P
713	0,018	0,03	2Q 7P
729	0,037	0,36	7Q 10P
741	0,047	0,44	8Q 9P
757	0,028	0,28	2Q 7P
763	0,046	0,53	3Q 6P
765	0,047	0,69	8Q 10P
768	0,047	0,37	7Q 10P
772	0,008	0,10	5Q 9P
775	0,021	0,33	8Q 9P
778	0,005	0,48	6Q 10P
819	0,028	0,29	2Q 7P
854	0,017	0,33	5Q 8P
876	0,050	0,73	9Q 9P
877	0,038	0,18	4Q 9P
915	0,021	0,16	3Q 9P
920	0,050	0,24	3Q 7P
924	0,033	0,54	9Q 9P
941	0,035	0,57	7Q 9P
982	0,010	0,32	6Q 9P
990	0,035	0,20	4Q 8P
1007	0,015	0,22	5Q 9P
1010	0,028	0,29	5Q 9P
1024	0,023	0,71	10Q 8P
1032	0,047	0,81	10Q 10P
1081	0,037	0,65	8Q 9P
1082	0,043	0,83	10Q 10P
1086	0,017	0,20	4Q 8P
1101	0,050	0,25	5Q 8P
1152	0,019	0,32	6Q 9P
1156	0,046	0,21	1Q 7P
1168	0,011	0,90	10Q 9P
1211	0,028	0,09	3Q 6P
1221	0,050	0,13	4Q 8P
1244	0,021	0,14	3Q 8P
1245	0,017	0,06	4Q 7P
1269	0,018	0,23	3Q 7P
1274	0,021	0,41	8Q 9P
1330	0,018	0,77	9Q 6P
1346	0,018	0,29	5Q 7P
1349	0,046	0,47	7Q 9P
1365	0,005	0,37	7Q 10P
1398	0,050	0,46	6Q 9P
1404	0,046	0,08	1Q 6P
1412	0,015	0,12	4Q 8P
1415	0,022	0,67	9Q 8P
1484	0,017	0,03	2Q 8P
1515	0,049	0,76	10Q 10P
1626	0,028	0,07	1Q 7P
1648	0,040	0,39	7Q 9P
1656	0,043	0,25	2Q 5P

1662	0,026	0,47	6Q 9P
1679	0,042	0,32	6Q 8P
1694	0,008	0,09	3Q 9P
1705	0,016	0,95	10Q 8P
1710	0,007	0,05	1Q 10P

Tabela 3: *Spots* com expressão diminuída na condição PAF. Realce em verde *spots* com razão das médias quiescentes/PAF \geq 2 e em amarelo *spots* que estão presentes em, pelo menos, 5 géis de cada condição. Número do *spot* do gel Master que parecia com outros géis (Nº Match).

Spots com expressão diminuída na condição PAF			
Nº Match	p\leq0,05	Razão das médias Q/P	Presença nos géis Q e P
179	0,041	1,03	10Q 7P
192	0,022	3,93	9Q 5P
212	0,043	16,53	6Q 2P
243	0,047	7,92	9Q 3P
255	0,043	5,33	7Q 5P
292	0,036	5,41	7Q 3P
301	0,036	3,43	7Q 4P
368	0,043	1,49	9Q 10P
373	0,036	6,84	7Q 3P
420	0,042	1,91	10Q 9P
424	0,012	21,53	7Q 2P
547	0,038	1,77	8Q 6P
554	0,020	1,66	10Q 9P
563	0,021	25,42	8Q 2P
572	0,047	3,70	7Q 4P
589	0,011	12,12	8Q 4P
629	0,011	1,05	7Q 9P
679	0,030	3,76	7Q 6P
744	0,014	6,46	8Q 6P
751	0,025	3,77	7Q 4P
987	0,017	21,64	8Q 1P
991	0,010	22,56	7Q 2P
994	0,025	3,78	7Q 5P
1054	0,009	4,15	10Q 3P
1067	0,046	29,31	5Q 1P
1127	0,021	4,59	7Q 4P
1179	0,016	1,41	9Q 8P
1314	0,025	9,59	7Q 3P
1337	0,050	2,93	7Q 5P
1348	0,050	11,43	7Q 3P
1364	0,052	1,20	10Q 10P
1400	0,025	4,31	8Q 3P
1435	0,046	4,14	6Q 2P
1448	0,043	26,76	6Q 2P
1479	0,034	1,66	7Q 5P
1491	0,031	1,60	9Q 10P
1501	0,036	1,02	7Q 10P
1507	0,001	3,35	10Q 7P

1517	0,007	12,25	10Q 3P
1543	0,008	2,16	10Q 10P
1580	0,008	2,24	5Q 10P
1703	0,004	1,02	8Q 6P

Tabela 4: *Spots* com expressão aumentada na condição PAF que seguem os três critérios: significância $p \leq 0,05$; razão das médias quiescentes/PAF $\leq 0,50$ e presente em, pelo menos, 5 géis de cada condição.

Spots com expressão aumentada na condição PAF			
Nº Match	$p \leq 0,05$	Razão das médias Q/P	Presença nos géis Q e P
70	0,015	0,18	5Q 9P
71	0,021	0,21	5Q 9P
72	0,013	0,26	6Q 9P
73	0,008	0,22	6Q 9P
147	0,005	0,13	5Q 10P
218	0,029	0,48	8Q 10P
227	0,050	0,32	5Q 8P
313	0,028	0,42	6Q 9P
345	0,035	0,46	6Q 10P
362	0,021	0,40	7Q 8P
372	0,011	0,26	5Q 9P
433	0,017	0,32	5Q 7P
434	0,023	0,44	6Q 9P
442	0,023	0,50	6Q 10P
447	0,036	0,44	5Q 7P
526	0,004	0,30	6Q 10P
540	0,037	0,39	5Q 10P
553	0,005	0,33	7Q 10P
595	0,021	0,37	6Q 8P
599	0,038	0,32	5Q 8P
636	0,021	0,33	6Q 9P
672	0,002	0,22	5Q 9P
685	0,021	0,32	6Q 9P
694	0,001	0,50	8Q 10P
729	0,037	0,36	7Q 10P
741	0,047	0,44	8Q 9P
768	0,047	0,37	7Q 10P
772	0,008	0,10	5Q 9P
775	0,021	0,33	8Q 9P
778	0,005	0,48	6Q 10P
854	0,017	0,33	5Q 8P
982	0,010	0,32	6Q 9P
1007	0,015	0,22	5Q 9P
1010	0,028	0,29	5Q 9P
1101	0,050	0,25	5Q 8P
1152	0,019	0,32	6Q 9P
1274	0,021	0,41	8Q 9P
1346	0,018	0,29	5Q 7P
1349	0,046	0,47	7Q 9P
1365	0,005	0,37	7Q 10P

1398	0,050	0,46	6Q 9P
1648	0,040	0,39	7Q 9P
1662	0,026	0,47	6Q 9P
1679	0,042	0,32	6Q 8P

Tabela 5: *Spots* com expressão diminuída na condição PAF que segue os três critérios: significância $p \leq 0,05$; razão das médias quiescentes/PAF ≥ 2 e presente em, pelo menos, 5 géis de cada condição.

Spots com expressão diminuída na condição PAF			
N° Match	$p \leq 0,05$	Razão das médias Q/P	Presença nos géis Q e P
192	0,022	3,93	9Q 5P
255	0,043	5,33	7Q 5P
679	0,030	3,76	7Q 6P
744	0,014	6,46	8Q 6P
994	0,025	3,78	7Q 5P
1337	0,050	2,93	7Q 5P
1507	0,001	3,35	10Q 7P
1517	0,007	12,25	10Q 3P
1543	0,008	2,16	10Q10P
1580	0,008	2,24	5Q10P

Os *spots* exclusivos foram verificados através da comparação interclasses dos géis de neutrófilos quiescentes e neutrófilos estimulados com PAF, essa verificação se deu com a presença da média das porcentagens de volume da classe estudada e ausência desse *spot* na outra classe.

4.5) Identificação de proteínas

A identificação por PMF foi realizada com a obtenção de peptídeos trípticos por meio da clivagem das proteínas na posição C-terminal da lisina e arginina. O seqüenciamento, realizado na Dinamarca, foi obtido pela fragmentação de um ou mais peptídeos trípticos, gerados por meio da alta energia transmitida pelo *laser* à amostra. Os resultados do seqüenciamento são confirmatórios para identificação por PMF e/ou indicam uma proteína mais provável em uma mistura identificada por PMF ou resultam na identificação de proteínas não encontradas por PMF.

Obtivemos 50 identificações, sendo 3 *spots* (1A, 56A e 57A) com baixa massa molecular, que só estavam presentes no gel carregado com maior concentração de proteínas, por isso não temos a análise estatística desses *spots*. O *spot* 1591, apesar de ter o pareamento, não apresenta significância estatística por causa da proximidade do final do gel, onde temos problemas de resolução entre os géis pareados. O *spot* 579 é

mostrado 2 vezes na tabela 7, pela confirmação de duas identificações uma na Dinamarca e outra no Laboratório de Bioquímica e Química de Proteínas na UnB. O *spot* 1246 também é mostrado 2 vezes, pois, nesse caso, o *spot* apresenta-se como único nos géis de neutrófilos quiescentes e da condição PAF, já no gel carregado houve a possibilidade de separá-lo em dois spots distintos.

Alguns *spots* detectados como separados pela eletroforese contêm as mesmas proteínas ou misturas de proteínas. Vale notar que são *spots* próximos, indício que sugere a separação incompleta pela eletroforese.

O *spot* 553 é uma mistura de isoformas da proteína tubulina, pois a identificação obteve coberturas de massas diferentes entre elas por PMF, tendo sido observadas massas de peptídeos exclusivas de cada uma das isoformas identificadas.

Outro dado importante a ser analisado é a diferença de pI e massa teórica em comparação com o experimental. Quando essa diferença é pequena (cerca de 10% de desvio), acredita-se que seja algum problema experimental de resolução do gel ou modificações pós-traducionais como glicosilações, fosforilações, dentre outras. Porém, quando observamos diferenças de pI que não estão na faixa proposta, por exemplo, o *spot* 511, cuja proteína atribuída a ele apresenta pI em torno de 9 e massa molecular bem maior que a mostrada no gel, suspeita-se de falha na identificação, mas observamos que as proteínas referidas no banco de dados são precursores e os dados de pI e massa apresentados no gel podem ser referentes à proteína madura e não do precursor (Tabela 7 e Figura 27).

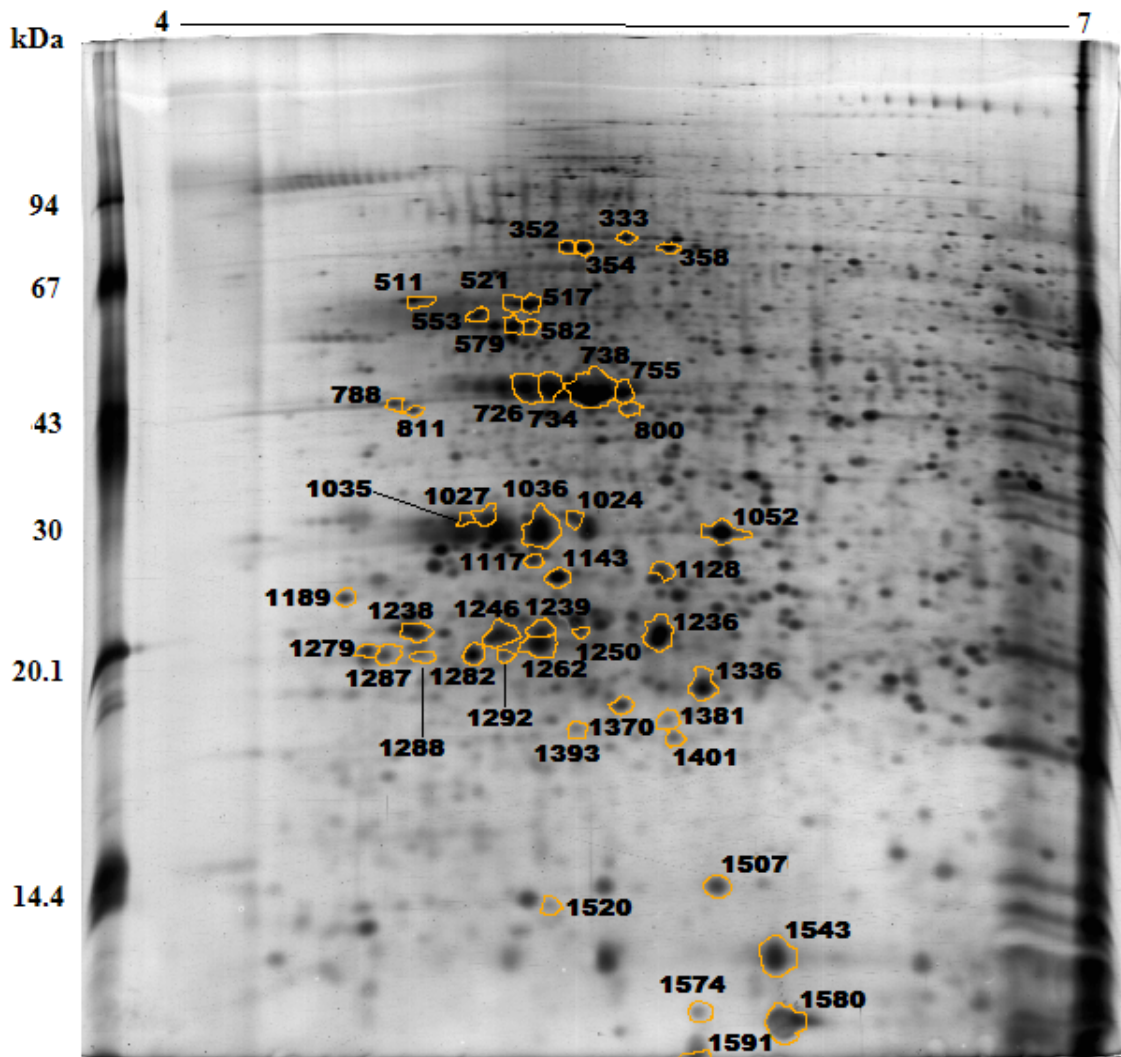


Figura 28: Gel bidimensional de pH ácido de 4-7 de neutrófilos quiescentes. *Spots* identificados em laranja com o seu respectivo número de *match*. O número do *match* da proteína identificada corresponde ao da análise estatística.

Tabela 6a: *Spots* identificados com expressão diferencial. Número do match, significância $p \leq 0,05$, razão das médias Q/P, presença nos géis Q e P e expressão diferencial.

Spots identificados com expressão diferencial				
Nº Match	$p \leq 0,05$	Razão das médias Q/P	Presença nos géis Q e P	Expressão diferencial
521	0,007	0,57	10Q 10P	Aumentada no PAF
553	0,005	0,33	7Q 10P	Aumentada no PAF
1024	0,023	0,71	10Q 8P	Aumentada no PAF
1035	-	-	5Q	Exclusivo dos quiescentes
1507	0,001	3,35	10Q 7P	Diminuída no PAF
1580	0,008	2,24	5Q 10P	Diminuída no PAF

Tabela 6b: Proteínas identificadas com expressão diferencial apresentadas acima, número do match, identificação da proteína/Database, identificação por *peptide mass fingerprint* (PMF), percentagem de cobertura (C), índice MASCOT; número de peptídeos coincidentes por PMF, índice para identificação por sequência (MS/MS), ponto isoelétrico teórico (pI), massa teórica em daltons (Mr).

Nº Match	Identificação da proteína/ Database ID	PMF C (%)	PMF Mascot Score	PMF pareados peptídeos	MS/MS Score	MS/MS pareado peptídeos	pI Teór.	Mr Teór. (Da)
521	Vimentin (VIME_HUMAN)	79	351	42	173	3	5.06	53676
553	Mistura							
	● Tubulin beta chain (TBB5_HUMAN)	70	299	41	257	4 (redundancy between all proteins identified)	4.78	50095
	● Tubulin beta-2C chain (TBB2C_HUMAN)	70	294	38			4.79	50255
	● Tubulin beta-3 chain (TBB3_HUMAN)	34	114	23			4.83	50856
1024	Alpha-soluble NSF attachment protein (SNAA_HUMAN)	75	197	23			5.23	33667

1035	Annexin A5 (ANXA5_HUMAN)	54	219	24	102	2	4.94	35971
1507	Actin-related protein 2/3 complex subunit 5	51	70	6			5.47	16367
1580	S10A9_HUMAN (Protein S100-A9)	87	204	16	286	3	5.71	13291

Tabela 7: Proteínas identificadas, número do match, identificação da proteína/Database, identificação por *peptide mass fingerprint* (PMF), porcentagem de cobertura (C), índice MASCOT; número de peptídeos coincidentes por PMF, índice para identificação por sequência (MS/MS), ponto isoeletrico teórico (pI), massa teórica em daltons (Mr).

Nº Match	Identificação da proteína/ Database ID	PMF C (%)	PMF Mascot Score	PMF pareados peptídeos	MS/MS Score	MS/MS pareado peptídeos	pI Teór.	Mr Teór. (Da)
1A	Mistura <ul style="list-style-type: none"> Protein S100-A12 (S10AC_HUMAN) Protein S100-A6 (S10A6_HUMAN) 	35	69	5	86	1	5.83	10569
		52	59	5	96	2	5.33	10230
56A	Protein S100-A8 (S10A8_HUMAN)	63	112	10	295	5	6.51	10885
57A	Protein S100-A8 (S10A8_HUMAN)	51	96	8	238	4	6.51	10885
333	Mistura <ul style="list-style-type: none"> Heat shock cognate 71 kDa protein (HSP7C_HUMAN) Vacuolar ATP synthase catalytic subunit A (VATA_HUMAN) 	45	191	31			5.37	71082
		33	107	24			5.35	68660
352	Mistura <ul style="list-style-type: none"> Plastin-2 (PLSL_HUMAN) Lamin-B1 (LMNB1_HUMAN) 	64	259	35			5.20	70815
		46	123	26			5.11	66653

354	Plastin-2 (PLSL_HUMAN)	79	461	62	138	3	5.20	70815
358	Heat shock 70 kDa protein 1 (HSP71_HUMAN)	60	361	43	67	2	5.48	70294
511	Mistura							
	● Protein disulfide-isomerase precursor (PDIA1_HUMAN)	71	346	43	238	4	4.76	57480
	● Myeloperoxidase precursor (PERM_HUMAN)	31	111	28			9.19	84784
517	Vimentin (VIME_HUMAN)	84	429	45	465	5	5.06	53676
579	Mistura							
	● ATP synthase subunit beta, mitochondrial precursor (ATPB_HUMAN)	71	298	38	361	4	5.26	56525
	● Tubulin beta-2C chain (TBB2C_HUMAN)	26	77	15			4.79	50255
	● Tubulin beta chain (TBB5_HUMAN)	23	67	13			4.78	50095
579	ATP synthase, H ⁺ transporting, mitochondrial F1 complex, beta subunit precursor [Homo sapiens]	21	94	9			5.26	56525
582	Mistura							
	● Tubulin alpha-1B chain (TBA1B_HUMAN)	58	190	24	325	4	4.94	50804
	● Tubulin alpha-4A chain (TBA4A_HUMAN)	56	177	23			4.95	50634
	● Tubulin alpha-1A chain (TBA1A_HUMAN)	54	164	22			4.94	50788
726	Mistura							
	● ACTB protein [Homo sapiens]	30	78	7			5.55	40536
	● Actin, beta (Homo sapiens)	29	76	7			5.56	41321

734	Redundancy (Actin, cytoplasmic 2 or Actin, cytoplasmic 1 / ACTG_HUMAN or ACTB_HUMAN)	65	177	23	84	2	5.31 or 5.29	42108 or 42052
738	Redundancy (Actin, cytoplasmic 2 or Actin, cytoplasmic 1 / ACTG_HUMAN or ACTB_HUMAN)	47	105	14	67	1	5.31 or 5.29	42108 or 42052
755	Redundancy (Actin, cytoplasmic 2 or Actin, cytoplasmic 1 / ACTG_HUMAN or ACTB_HUMAN)	62	184	25	133	2	5.31 ou 5.29	42108 ou 42052
788	Protein disulfide-isomerase precursor (PDIA1_HUMAN)	40	248	25	43	1	4.76	57480
800	Redundancy (Actin, cytoplasmic 2 or Actin, cytoplasmic 1 / ACTG_HUMAN or ACTB_HUMAN)	56	149	19	96	2	5.31 ou 5.29	42108 ou 42052
811	40S ribosomal protein SA (RSSA_HUMAN)	53	192	18	212	3	4.79	32947
1027	EF-hand domain-containing protein 2 (EFHD2_HUMAN)	43	134	14	74	2	5.15	26794
1036	EF-hand domain-containing protein 2 (EFHD2_HUMAN)	58	108	16			5.15	26794
1052	Annexin A3 (ANXA3_HUMAN)	62	268	23	499	7	5.63	36524
1117	Inositol monophosphatase (IMPA1_HUMAN)	56	159	16			5.16	30568
1128	Proteasome activator complex subunit 2 (PSME2_HUMAN)	51	135	11			5.44	27515
1143	Chloride intracellular channel protein 1 (CLIC1_HUMAN)	51	113	11			5.09	27248

1189	14-3-3 protein epsilon (1433E_HUMAN)	73	130	18	116	4	4.63	29326
1236	Mistura							
	• gamma-actin	26	73	5			5.65	26147
	• ACTG1 protein (Homo sapiens)	23	69	5			5.50	29678
1238	Mistura							
	• 14-3-3 protein zeta/delta (ID 1433Z_HUMAN)	65	177	21	101	1	4.73	27899
	• 14-3-3 protein beta/alpha (ID 1433B_HUMAN)	63	155	22	67	1	4.76	28179
	• 14-3-3 protein gamma (ID 1433G_HUMAN)	58	89	14			4.80	28456
	• 14-3-3 protein eta (ID 1433F_HUMAN)	45	82	13			4.76	28372
1246	Mistura							
	• Rho GDP-dissociation inhibitor 1 (GDIR_HUMAN)	57	137	17	193	5	5.02	23250
	• Ras-related protein Rab-27 (RB27A_HUMAN)	31	67	9			5.09	25137
1246	Mistura							
	• Calpain small subunit 1 (CPNS1_HUMAN)	67	171	22	271	5	5.05	28469
	• Rho GDP-dissociation inhibitor 1 (GDIR_HUMAN)	57	98	15			5.02	23250
1250	Mistura							
	• Ras-related protein Rab-27A (RB27A_HUMAN)	40	103	11			5.09	25137
	• Actin, cytoplasmic 1 (ACTB_HUMAN)	38	90	12			5.29	42052

1262	Mistura							
e	● Rho GDP-dissociation inhibitor 2 (GDIS_HUMAN)	81	167	17			5.10	23031
1239	● Ras-related protein Rab-27 (RB27A_HUMAN)				97	3	5.09	25137
1279	Proteasome subunit alpha type-5 (PSA5_HUMAN)	55	109	14	93	1	4.74	26565
1282	Grancalcin (GRAN_HUMAN)	48	123	17	72	2	5.02	24223
1287	Ras-related protein Rab-3D (RAB3D_HUMAN)	55	164	15			4.76	24480
1288	Mistura							
	● Grancalcin (GRAN_HUMAN)	35	104	13	64	2	5.02	24223
	● EF-hand domain-containing protein 2 (EFHD2_HUMAN)	35	61	9			5.15	26795
1292	Grancalcin (GRAN_HUMAN)	36	124	15			5.02	24223
1336	Glutathione S-transferase P (GSTP1_HUMAN)	52	143	12	247	2	5.43	23569
1370	Ras-related protein Rab-1B	76	211	14			5.55	22328
1381	Adenine phosphoribosyltransferase (APT_HUMAN)	80	168	13	41	1	5.78	19766
1393	BH3-interacting domain death agonist (BID_HUMAN)	52	148	10			5.27	22152
1401	Ferritin light chain (FRIL_HUMAN)	34	75	7	51	1	5.51	20064
1520	Eukaryotic translation initiation factor 5A-1 (IF5A1_HUMAN)	69	113	11			5.08	17049
1543	S10A9_HUMAN (Protein S100-A9)	52	83	8			5.71	13291

1574	Coactosin-like protein (COTL1_HUMAN)	44	61	5	5.54	16049
1591	Mistura					
	● S10A9_HUMAN (Protein S100-A9)	76	102	11	5.71	13291
	● SH3 domain- binding glutamic acid-rich-like protein (SH3L1_HUMAN)	56	59	5	5.22	12766

4.6.1) Vimentina

A proteína vimentina (*spot* 521) apresentou aumento na expressão após estimulação dos neutrófilos com PAF, com significância de 0,007 por meio do teste T pareado, após transformação logarítmica; razão de Q/P=0,57, estando presente nos 10 géis das duas condições.

Os neutrófilos possuem um complexo citoesqueleto que participa de funções primordiais, como migração, movimentação de vesículas, prolongamentos, emissão de pseudópodes e fagocitose. O citoesqueleto dos neutrófilos é formado por 3 elementos de redes: microfilamentos, microtúbulos e filamentos intermediários. Atualmente, a função dos filamentos intermediários é desconhecida. Sabe-se que eles estão envolvidos na arquitetura nuclear e que sua retração e sua extensão estão associadas aos microtúbulos intactos. A vimentina, um filamento intermediário, é encontrado nos neutrófilos. Outro filamento encontrado, porém menos abundante, é a lamina B1 (Pryzwansky e Merricks, 1998; Moisan, Chiasson *et al.*, 2007).

Estudos de ativação dos neutrófilos com fMLP demonstram a fosforilação e a quebra de fragmentos de vimentina durante realização de movimentação celular e liberação de grânulos. Quando os neutrófilos são ativados pelo fMLP, os filamentos intermediários (vimentina) são montados transitoriamente em áreas adjacentes ao núcleo, local desprovido de grânulos e microfilamentos. Os grânulos aderidos aos microfilamentos ficam livres dos filamentos intermediários para migrarem até membrana e serem liberados (Pryzwansky, Wyatt *et al.*, 1995; Pryzwansky e Merricks, 1998).

A montagem dos filamentos intermediários está associada ao aumento da guanosina monofosfato cíclica (cGMP) que ativa a proteína quinase G a fosforilar a

vimentina. Essa elevação da cGMP pela ativação dos neutrófilos por meio do fMLP é mediada pelo influxo de cálcio. Juntamente com a fosforilação, ocorre a fragmentação de partes da vimentina. Essa fragmentação foi demonstrada em processos de mitose e desgranulação após ativação dos neutrófilos com fMLP. A fragmentação é transitória com função de rearranjo celular. Cada fragmento é responsável por um novo filamento intermediário (Wyatt, Lincoln *et al.*, 1991; Pryzwansky, Wyatt *et al.*, 1995; Pryzwansky e Merricks, 1998; Martys, Ho *et al.*, 1999).

O nosso resultado demonstrou a expressão aumentada da vimentina após estimulação com PAF de apenas um *spot* (521), porém o *spot* 517 também identifica a vimentina sem diferença de expressão. Como, após ativação dos neutrófilos por fMLP, encontra-se fosforilação e fragmentação de vimentina, sugerimos que o aumento da expressão de vimentina no *spot* 521 seja devido à fosforilação, sendo separado do *spot* 517 na eletroforese por uma pequena diferença no pI. O *spot* 517 seria o filamento intermediário comum aos dois estágios, quiescente e estimulado. Acreditamos que o mecanismo de fosforilação proposto pelo modelo do fMLP seja semelhante ao estimulado pelo PAF, pois encontramos estudos que relatam a influência do influxo de cálcio e a liberação da elastase via cGMP (Partrick, Moore *et al.*, 1997; Pryzwansky e Merricks, 1998; Martys, Ho *et al.*, 1999; Tintinger, Steel *et al.*, 2005).

4.6.2) Tubulina

O *spot* 553 possui uma mistura de proteínas da mesma família chamada cadeia de tubulina beta, com identificação de *spots* distintos entre eles por PMF. Nesse *spot* obtivemos tubulina beta, tubulina beta 2C e tubulina beta 3. O *spot* 579, próximo ao 553, também apresentou a tubulina 2C e 3 e ATP sintase. Nesse caso, acreditamos que houve uma contaminação no *spot* 579 pelo 553, por não terem sido adequadamente separados durante a eletroforese, pois o *spot* 579 identificado na UnB, a partir de outro gel, mostrou apenas ATP sintase, confirmando a identificação mais provável do laboratório da Dinamarca, que identificou por PMF e por seqüência.

A cadeia de tubulina beta do *spot* 553 apresentou expressão aumentada após estimulação dos neutrófilo com PAF com a significância de 0,005, por meio do teste T pareado; razão Q/P = 0,33 e está presente em 7 géis de neutrófilos quiescentes e 10 géis de neutrófilos estimulados com PAF.

Os microtúbulos são estruturas do citoesqueleto de várias células. Eles desempenham funções de apoio estrutural, localização de organelas, segregação de cromossomos e transporte intracelular. Os microtúbulos são polímeros de heterodímeros de α/β -tubulinas que se associam na disposição cabeça-cauda e também lateralmente, formando tubos ocos (Verhey e Gaertig, 2007).

Estudos realizados com fMLP demonstram que os microtúbulos aumentam tanto em número como em comprimento após a ativação dos neutrófilos. Alguns autores divergem quanto à influência dos microtúbulos na secreção de grânulos, pois a despolimerização dos microtúbulos não inibiu completamente a secreção dos grânulos. Porém, estudos recentes demonstram a participação ativa dos microtúbulos na secreção dos mesmos. Um desses estudos mostra, por meio da microscopia eletrônica, o aumento de grânulos ligados aos microtúbulos após ativação dos neutrófilos com fMLP. Os microtúbulos neutrofilicos possuem configuração radial, indo do centro celular até a membrana plasmática. Com essa configuração propiciam tanto a movimentação dos grânulos do interior para membrana, como a movimentação dos endossomos e fagossomos no sentido inverso (Rothwell, Nath *et al.*, 1989; Pryzwansky e Merricks, 1998).

Segundo Martys (1999), após um estímulo celular, os filamentos intermediários são fragmentados e se posicionam na periferia nuclear e essa movimentação é dependente de microtúbulos. Após o término do estímulo, os fragmentos vão se reorganizando e se reunindo formando novos filamentos intermediários. Os microtúbulos também orientam os filamentos na reorganização.

Muitos autores relatam que a ação dos microtúbulos é dependente de modificações pós-traducionais na tubulina alfa, o que justificaria a identificação da tubulina alfa, que foi encontrada no *spot* 582, porém sem expressão diferencial. Em nossos resultados, houve um aumento na expressão da tubulina beta quando estimulada pelo PAF, em concordância com alguns estudos que relatam o aumento de microtúbulos após ativação dos neutrófilos sem especificação do tipo de tubulina (Nath, Flavin *et al.*, 1981; Rothwell, Nath *et al.*, 1989; Verhey e Gaertig, 2007).

4.6.3) Proteína alfa-solúvel de ligação ao NSF (SNAP- α)

A proteína SNAP- α (*spot* 1024) apresentou aumento de expressão após estímulo dos neutrófilos com o PAF, com significância de 0,023, por meio do teste T pareado,

após transformação logarítmica; razão de Q/P igual 0,71 e presença em 10 géis de neutrófilos quiescentes e 8 géis PAF.

O transporte de material dentro de uma célula é mediado por vesículas membranosas que se fundem à membrana plasmática. Uma parte essencial desse processo é a interação das SNAREs [receptores solúveis para ligação NSF (fator sensível N-etilmaleimide)]. Essa superfamília SNARE compreende 3 tipos: SNAP (cofator que liga as SNAREs), t-SNARE (membrana alvo) e v-SNARE (membrana vesicular) que estão ativamente envolvidas na fusão entre membranas. As SNAREs, t e v, não interagem diretamente, mas é necessário a presença da SNAP para realizar essa interação, também chamada de cofator SNAP (sigla para proteína solúvel de ligação ao NSF). Nos mamíferos, a SNAP subdivide-se em: SNAP- α , SNAP- β e SNAP- γ , sendo a SNAP- α a mais abundante das três isoformas (May, Whiteheart *et al.*, 2001; Ungermann e Langosch, 2005; Leabu, 2006; Barszczewski, Chua *et al.*, 2007).

A ativação das SNAREs e a fusão das membranas consiste na desmontagem e montagem das SNAREs; para isso é necessário o NSF ligado a ATP e um importante adaptador SNAP- α que se ligará às SNAREs. As SNAP- α interagem com as v-SNARE e a t-SNARE, estimula a atividade da ATPase com a conseqüente desmontagem das SNAREs, abrindo poros na membrana e posterior fusão entre elas (Figura 28) (Weber, Parlati *et al.*, 2000; May, Whiteheart *et al.*, 2001; Ungermann e Langosch, 2005).

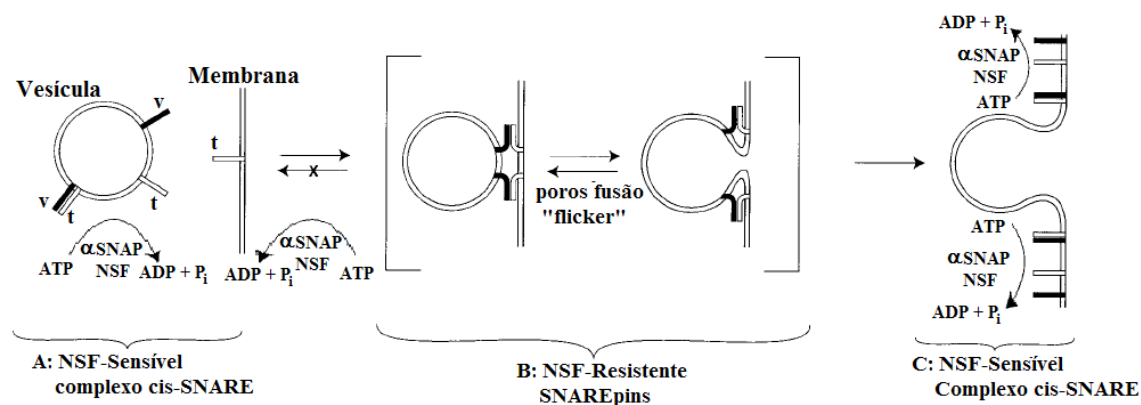


Figura 29: Modelo de fusão entre membranas. v-SNARE (v), t-SNARE (t). (A) O complexo NSF e SNAP- α é montado (cis-SNARE). (B) O Complexo SNAREpins (NSF, SNAP- α e SNARE v ou t) é formado nesse momento, com adição de ATP, não há retorno do processo e são formados poros na membrana. (C) Separação do complexo SNAREpins, com a fusão total das membranas e gasto de ATP. Modificado a partir de Weber, Parlati *et al.*, 2000.

Nos estudos sobre ativação de neutrófilos utilizando fMLP foi observado o aumento da liberação de grânulos em associação com aumento na ligação das SNAREs

tipos t (sintase 6) e v (SNAP-23). A SNAP-23 não participa da exocitose de grânulos azurofílicos (Martin-Martin, Nabokina *et al.*, 2000; Mollinedo, Calafat *et al.*, 2006). Porém, não encontramos pesquisas que relatasse o aumento da SNAP- α com ativação dos neutrófilos e, muito menos, pesquisas relacionando PAF com aumento das SNAREs, porém sabemos que o PAF estimula os neutrófilos a secretarem grânulos e vesículas o que justificaria o aumento do cofator SNAP- α que atuará na ligação entre membranas dos grânulos e das vesículas à membrana plasmática quando ocorrer a desgranulação (Borregaard, Kjeldsen *et al.*, 1995; Borregaard e Cowland, 1997; Faurschou e Borregaard, 2003).

4.6.4) Anexina

A proteína anexina A5 (*spot* 1035) identificada como uma proteína exclusiva da condição dos neutrófilos quiescentes, estando presente em 5 géis e ausente nos 10 géis da condição PAF. Já a anexina A3 (*spot* 1052) não apresentou expressão diferencial.

As anexinas são caracterizadas por se vincularem ao cálcio e ligarem-se a fosfolípidos. Cada anexina possui dois domínios: a cabeça N-terminal e a região C-terminal, que é bastante conservada e liga-se a cálcio. Em humanos, existem 12 genes para anexina (Gerke e Moss, 2002; Moss e Morgan, 2004). Segundo Turnay (2002), pesquisas com anexina *in vitro* têm demonstrado atividade anticoagulante e antiinflamatória, envolvimento em transdução de sinais, fusão de membrana (endocitose e exocitose) e regulação dos canais de cálcio (Turnay, Olmo *et al.*, 2002).

Muito pouco é conhecido sobre a anexina A3. Sabe-se que está presente em neutrófilos e está envolvida na modulação da membrana, permeabilizando-a (Hofmann, Raguene-Nicol *et al.*, 2000; Gerke e Moss, 2002).

A anexina A5 é referida em muitos artigos como relacionada à apoptose, sendo muito utilizada como marcador de apoptose em vários tipos celulares, por causa da sua afinidade a fosfolípidos. Quando o neutrófilo entra em apoptose são formadas vesículas e é externalizada a fosfatidilserina, sinal para o macrófago fagocitá-lo. Esta mesma molécula é utilizada para diagnosticar a apoptose com a ligação da anexina A5. Como a anexina A5 é bastante estável, é utilizada freqüentemente como um marcador fluorescente (Akgul, Moulding *et al.*, 2001; Kietselaer, Hofstra *et al.*, 2003; Boersma, Kietselaer *et al.*, 2005).

Segundo Hirabayachi (2004), a anexina A5 presente no citosol liga-se à fosfolipase A₂ citosólica (cPLA₂) inibindo a sua ativação. Já as anexinas A3 e A2 não têm efeito inibitório. Como já vimos, Chen (2005), a estimulação dos neutrófilos pelo PAF ativa a cPLA₂ a produzir ácido araquidônico e ativa a via da p38 MAPK para agir em várias funções. Os nossos resultados não detectamos a presença da anexina A5 na estimulação dos neutrófilos, o qual inibiria a ação da cPLA₂, impedindo a produção do ácido araquidônico e a ativação da p38 MAPK. Sugerimos então, que na estimulação dos neutrófilos, a anexina A5 seria degradada (Hirabayashi, Murayama *et al.*, 2004; Chen, Lin *et al.*, 2005).

4.6.5) Proteína relacionada a actina Arp 2/3 complexo de subunidade 5

O complexo Arp2/3 (*spot* 1507) foi identificado com expressão diminuída após a estimulação dos neutrófilos pelo PAF, com significância de 0,001 obtida por meio do teste T pareado, razão Q/P igual a 3,35 com presença em 10 géis de neutrófilos quiescentes e 7 géis PAF.

O complexo Arp2/3 é um conjunto de 7 proteínas conservadas, incluindo 2 proteínas relacionadas à actina: Arp2 e Arp subunidades 3 e 5. Elas atuam juntamente com a ligação de GTP, CD42h e N-WASP na polimerização da F-actina, mudando a direção da mesma, formando uma rede de F-actina (Figura 29) (Cicchetti, Allen *et al.*, 2002; Kiselar, Mahaffy *et al.*, 2007).

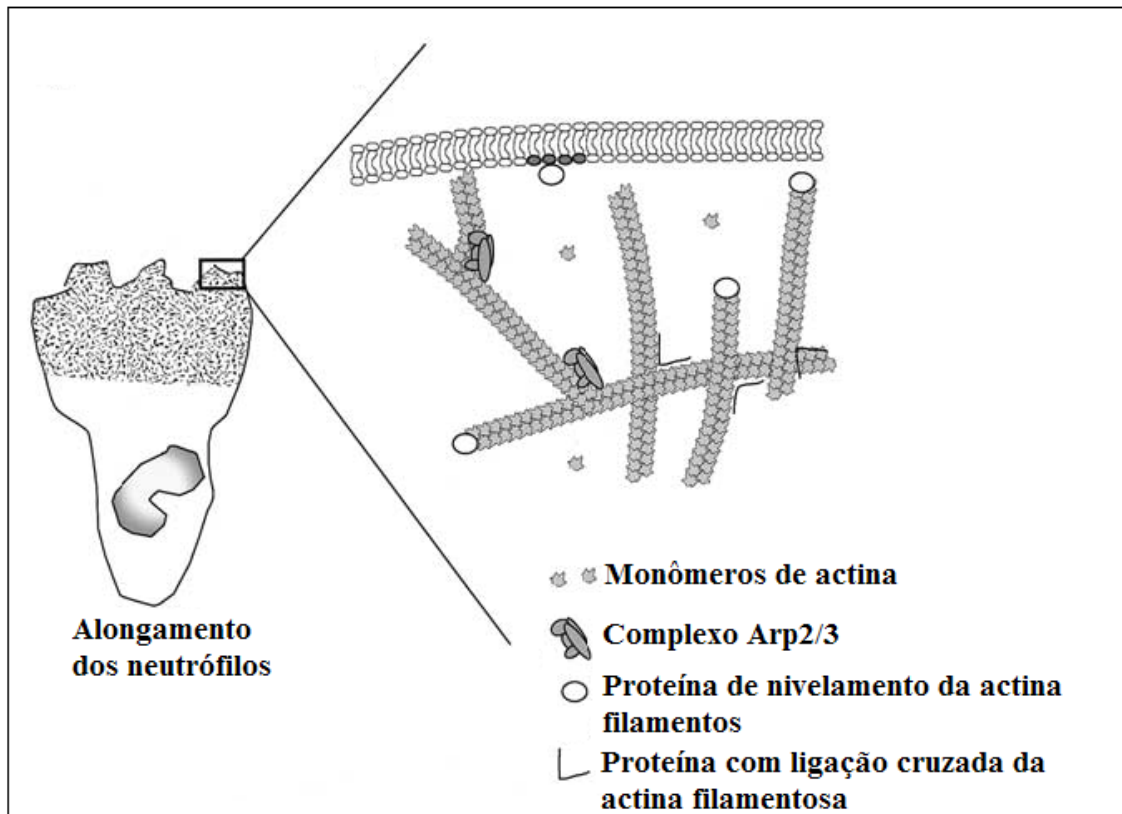


Figura 30: Modelo proposto para regulação dos filamentos de actina na migração dos neutrófilos. O complexo Arp2/3 se liga lateralmente aos filamentos de actina e inicia a polimerização de um novo filamento. As extremidades do filamento ficam livres para adição de outros monômeros de actina e a proteína com ligação cruzada liga as cadeias de actina, estabilizando-as. Modificado a partir de Cicchetti, Allen *et al.*, 2002.

Estudo sobre ativação dos neutrófilos com fMLP mostra a inibição do complexo Arp2/3 e os nossos dados demonstraram a diminuição de expressão do complexo Arp2/3 após estimulação dos neutrófilos com PAF (Glogauer, Hartwig *et al.*, 2000; Cicchetti, Allen *et al.*, 2002). Esse mesmo estudo sugere que a polimerização da actina seja orientada por outras proteínas como a Rac e WASP e não só pela Arp 2/3, o que não inibiria a migração dos neutrófilos. A função da diminuição dessa proteína após estimulação e ativação ainda é desconhecida.

4.6.6) Proteínas da família S100

A proteína S100-A9 está presente em 3 *spots* (1543, 1580 e 1591), sendo a identificação com maior *score* e com dados de seqüência no *spot* 1580. Não descartamos as outras identificações, porém pode ter ocorrido uma contaminação ou

ainda alguma mudança pós-traducional que modifica a massa dessa proteína e assim teríamos 3 isoformas. A identificação do *spot* 1580 foi relatada com uma diminuição de expressão após estimulação dos neutrófilos pelo PAF, a significância foi de 0,008, por meio do teste Wilcoxon, com a razão Q/P igual a 2,24, estando presente em 5 géis de neutrófilos quiescentes e 10 géis de neutrófilos na condição PAF. Os outros *spots* não apresentaram expressão diferencial.

As proteínas S100-A8, S100-A12 e S100-A6 também foram identificadas, porém não temos os dados estatísticos, pois essas proteínas estavam presentes no final do gel carregado, local onde não conseguimos fazer a comparação com outros géis.

A família de proteína S100 compreende proteínas que interagem com o cálcio. Três dessas proteínas estão relacionadas ao estágio mielóide durante a maturação dos neutrófilos MRP8 (S100-A8), MRP14 (S100-A9) e S100A12, mas pesquisas demonstram a presença delas em neutrófilos circulantes e monócitos, ausentes em macrófagos teciduais e linfócitos. Não encontrou-se estudos relacionando a proteína S100-A6 a neutrófilos (Kerkhoff, Klempt *et al.*, 1999; Vandal, Rouleau *et al.*, 2003).

As funções dessas proteínas não foram totalmente elucidadas, mas existem vários estudos tentando mapear as suas funções. Estudos demonstram que S100-A9 e S100-A8 formam um complexo S100A8/A9 quando em presença de cálcio. Esse complexo liga-se ao ácido araquidônico, mas não a seus derivados. Esse mesmo estudo sugere a ação extracelular desse complexo, pois após ativação com fMLP foi secretado o complexo S100A8/A9. Após a ligação do complexo S100A8/A9 com ácido araquidônico e cálcio, ele ativa a montagem do complexo NADPH oxidase. O complexo S100A8/A9 possui afinidade de ligação pela subunidade p67^{PHOX}, o que sugere a sua participação na explosão respiratória, porém a associação da p47^{PHOX} a S100-A8 separa o complexo S100A8/A9 (Kerkhoff, Klempt *et al.*, 1999; Doussiere, Bouzidi *et al.*, 2002; Kerkhoff, Nacken *et al.*, 2005).

Outros estudos demonstram a ação da proteína S100-A9 na ativação da adesão dos neutrófilos ao fibrinogênio pela via da β_2 -integrina, Mac-1 (CD11b/CD18), mas quando S100-A9 e S100-A8 formam o complexo não há mais o estímulo e aderência, tanto em estudos com neutrófilos, como em monócitos (Srikrishna, Panneerselvam *et al.*, 2001; Doussiere, Bouzidi *et al.*, 2002; Ryckman, Vandal *et al.*, 2003).

Um estudo importante realizado com camundongos mediu a presença de S100A8, S100A9 e do complexo S100A8/A9 no soro e em uma bolsa de ar acoplada ao dorso do camundongo, após inoculação com LPS. As três formas S100A9, S100A8 e o

complexo induziram a migração dos neutrófilos para o exsudato na bolsa de ar e para o soro. No soro, a neutrofilia também foi elevada pela ação do LPS. Nesse mesmo estudo, as 2 proteínas isoladas e o complexo induziram a liberação dos neutrófilos da medula óssea, sugerindo novos agentes quimiotáticos. Esse estudo relata a presença da proteína S100-A9 e S100-A8 no meio extracelular, durante uma infecção ou eventos inflamatórios, o que corrobora os nossos resultados que demonstraram uma diminuição na quantidade da proteína S100-A9 intracelular. Sugerimos que possa ter ocorrido a liberação dessa proteína como um agente quimiotático para outros neutrófilos e monócitos, principalmente agindo no recrutamento das células na medula óssea (Ryckman, Vandal *et al.*, 2003; Vandal, Rouleau *et al.*, 2003).

4.6.7) Outras identificações

Das proteínas identificadas neste trabalho, seis proteínas tiveram expressão diferencial entre as condições, as quais foram relatadas acima e 42 não apresentaram diferenças significativas. Porém, podem apresentar modificações pós-traducionais como fosforilações e glicosilações que não foram alvo do presente estudo.

No *spot* 333 foram identificadas 2 proteínas: proteína cognato de choque térmico de 71 kDa (HSC 70) e ATP sintase tipo vacuolar, subunidade catalítica A (V-ATPase). A proteína HSC 70 inibe a apoptose via JNK e via caspase 3 e 9, porém a via da JNK não foi identificada em neutrófilos. A proteína V-ATPase é transmembrânica com múltiplas subunidades, que age acidificando o fagossomo em macrófagos, bombeando prótons no lúmen do fagossoma. Em neutrófilos estão presentes em vesículas secretoras, grânulos primários e terciários (Lee, Harrison *et al.*, 2003; Li, Xiao *et al.*, 2007). O *spot* 358 repete a identificação da HSC 70.

No *spot* 352 foram identificadas 2 proteínas: plastina-2 ou L-plastina e lamina-B1. A plastina faz parte da família das fibrinas e estão expressas exclusivamente em leucócitos, possuem dois domínios que se ligam à actina e dois domínios opostos que se ligam ao cálcio. Em células quiescentes, ela está envolvida na ligação cruzada com fibras de actina. Após estimulação das células, com influxo de cálcio, ela é fosforilada, diminuindo a agregação com a F-actina e ativando integrinas, tendo a sua função na adesão celular (Paclet, Davis *et al.*, 2004). A lamina-B1 é um filamento intermediário encontrado nos neutrófilos. É menos abundante que a vimentina. A vimentina e a lamina-B1 são encontradas muito fragmentadas na superfície dos neutrófilos

apoptóticos (Moisan e Girard, 2006; Moisan, Chiasson *et al.*, 2007). O *spot* 354 repete a identificação da plastina-2.

No *spot* 511 foram identificadas 2 proteínas precursoras: proteína precursora da dissulfeto-isomerase (PDI) e proteína precursora da mieloperoxidase (MO). A PDI é um polipeptídeo residente no retículo endoplasmático, possui 56 kDa. Estudo sugere que essa proteína seja sintetizada em células precursoras dos neutrófilos (Bassuk, Capodici *et al.*, 1990). A proteína PDI encontra-se no retículo endoplasmático e atua durante o dobramento das proteínas, catalisando troca tiol/dissulfeto adicionando pontes de dissulfeto (Ko, Uehara *et al.*, 2002). A identificação do precursor da mieloperoxidase (MPO) é coerente com a literatura porque muitas proteínas de grânulos são sintetizadas como uma pré-proteína e depois metabolizadas nos grânulos. A mieloperoxidase está presente nos grânulos azurofílicos e eles são os últimos a serem exocitados. Por isso, acreditamos que esses grânulos sejam mobilizados apenas na ativação dos neutrófilos. Assim, a mieloperoxidase continuaria como pré-proteína até a ativação (Faurischou e Borregaard, 2003). O *spot* 788 repete a identificação da PDI.

No *spot* 579 foi identificada a proteína precursora da subunidade beta do complexo F1 da ATP sintase mitocondrial (Vinogradov, 1999).

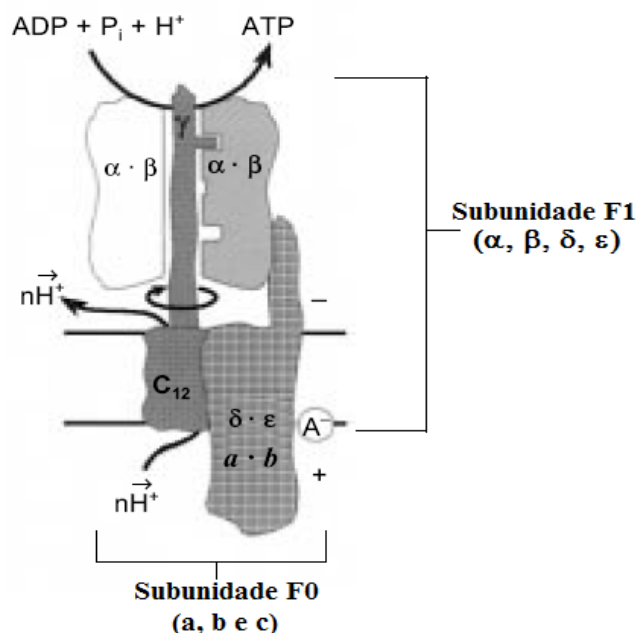


Figura 31: Modelo do complexo mitocondrial F1 produzindo ATP com o transporte de H^+ . O complexo F_0 é composto pelas subunidades a, b e C e estão ligados a membrana. O complexo F_1 é composto pelas subunidades α , β , γ , δ e ϵ . Modificado a partir de Vinogradov, 1999.

Os *spots* 726, 734, 738, 755 e 800 apresentaram misturas de diferentes formas de actina: actina beta (ACTB), actina citoplasmática 1 e 2, monômeros de actinas com subdomínios identificados por 1 e 2, e actina gama (ACTG). As isoformas α , β e γ das actinas são altamente conservadas. As actinas são proteínas de 42 kDa essenciais à mobilidade dos neutrófilos, sendo reguladas por diversas proteínas. As actinas ainda são divididas em actina globular (g-actina) e actina filamentar (F-actina) (Cicchetti, Allen *et al.*, 2002; Dos Remedios, Chhabra *et al.*, 2003). O *spot* 1236 identificamos actina gamma.

No *spot* 811 foi identificada a proteína ribossomal subunidade 40S, que é uma proteína de células eucarióticas que se liga à subunidade 80S para formar o ribossomo e sintetizar as proteínas (Alberts, 1997; El-Benna, Dang *et al.*, 2005).

Nos *spots* 1027 e 1036 foi identificada a proteína contendo o domínio EF-hand 2 (EHD2). Essa proteína está relacionada à fase inicial da endocitose. Ela também ativa a polimerização da actina (Guilherme, Soriano *et al.*, 2004).

No *spot* 1117 foi identificada a proteína inositol monofosfatase (IMPase). O inositol trifosfato (IP_3) é ativado via fosfolipase C aumentando o influxo de cálcio. Nesse mecanismo de ativação do IP_3 foi identificado o inositol bifosfato, que ganha um fosfato para se transformar em inositol trifosfato. A proteína inositol monofosfatase participa da reciclagem do IP_3 para mantê-lo ativo (Montrucchio, Alloatti *et al.*, 2000; Quiroz, Gould *et al.*, 2004).

No *spot* 1128 foi identificada a subunidade 2 do complexo de ativação do proteassoma psem2 (PA28beta). O complexo de ativação se liga a um sítio específico no proteassoma, estimulando-o à degradação de proteínas marcadas por meio da ubiquitinação (Song, Von Kampen *et al.*, 1997). No *spot* 1279 foi identificada a subunidade α tipo-5 do proteassoma. O proteassoma 26S é composto do núcleo proteassoma 20S e duas caps 19S. O proteassoma 20S é uma molécula em forma de barril composta de 4 anéis empilhados, 2 anéis α exteriores e 2 anéis β interiores. Cada anel é composto por 7 diferentes subunidades dos tipos α e β . A subunidade identificada foi a tipo α , anel exterior tipo 5. A degradação não lisossomal das proteínas é processada pelos proteassomas. Essa via é importante na regulação do sistema biológico celular. As proteínas que serão degradadas são ubiquitinadas e processadas pelo proteassoma (Figura 32) (Wojcik e Di Napoli, 2004).

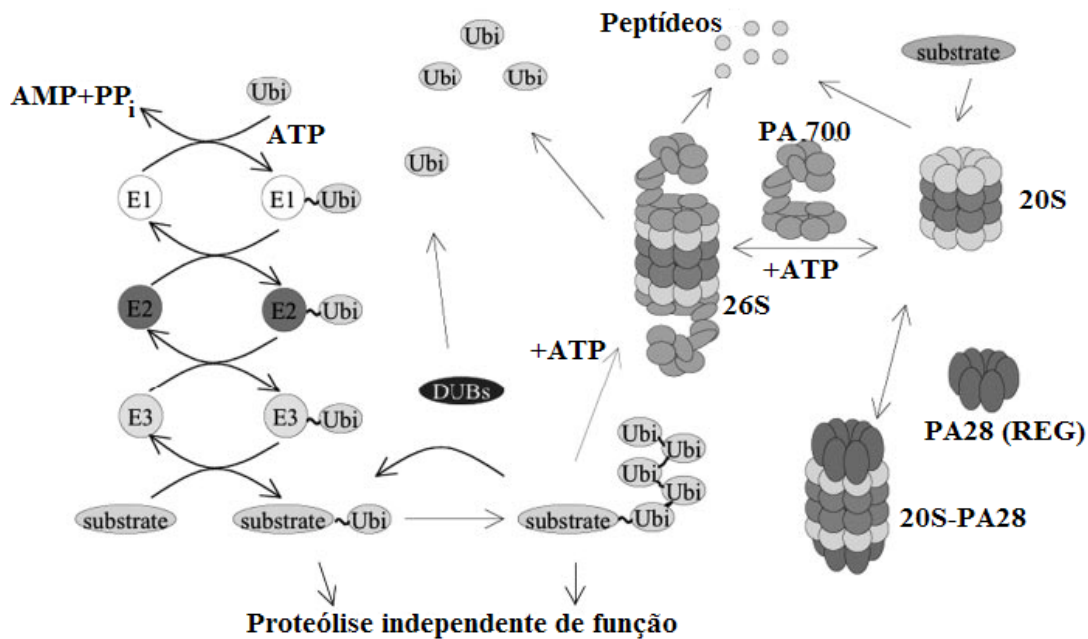


Figura 32: Esquema de degradação de proteína pelo proteassoma. Complexo de ativação do proteassoma PA28. Modificado a partir de Wojcik e Di Napoli, 2004.

No *spot* 1143 foi identificado o canal intracelular de cloreto 1. Os canais de cloreto são ativados permitindo o influxo de cloro. O cloro é produto para produção de ácido hipocloroso que reagem com peróxido de hidrogênio na presença da mieloperoxidase (El-Benna, Dang *et al.*, 2005; Ahluwalia, 2008).

No *spot* 1189 foi identificada a proteína epsilon 14-3-3 e no *spot* 1238 uma mistura das proteínas zeta/delta, beta/alfa, gama e eta 14-3-3. A família de proteína 14-3-3 em mamíferos é composta por 7 isoformas ($\beta, \gamma, \epsilon, \sigma, \zeta, \tau$ e η), sendo as isoformas α e δ são as formas β e γ fosforiladas. Elas atuam em vários processos biológicos como: migração, desgranulação, ativação do complexo NADPH oxidase. São dependentes de fosforilações e são reguladas por cinase e fosfatase que modulam a fosforilação. Participam ativamente das vias da MAPK (Dougherty e Morrison, 2004).

Nos *spots* 1246, 1262 e 1239 estão presentes as proteínas inibidoras de dissociação da Rho-GDP 1 e 2 (Rho-GDI). Existem 3 Rho-GDI em humanos Rho-GDI-1 (ou GDI α), presente em células hematopoiéticas Ly/D4GDI (ou GDI β) e RhoGDI-3 (ou GDI γ) expressa no pulmão, cérebro e testículos. A RhoGDI regula a ativação da Rho GDP ligando-se à GDP, inibindo a ligação da proteína a GTP. Assim, ela impede a liberação da Rac e a migração para membrana plasmática, impedindo a montagem da NADPH oxidase (Ugolev, Molshanski-Mor *et al.*, 2006).

Nos *spots* 1246, 1250, 1262 e 1239, 1287 e 1370 foram identificadas respectivamente as proteínas relacionadas a Ras: Rab-27; Rab-27A; Rab-27; Rab-3D e Rab-1B. A Ras e as Rab são componentes da superfamília das GTPases. A Ras é chave de regulação de várias células em diversas ações como: diferenciação celular, divisão celular, transporte de vesículas e controle do citoesqueleto. As Rab GTPase são reguladoras de múltiplos aspectos da dinâmica do tráfico intracelular. Essa família possui 25 membros. As Rab funcionam como chaves liga-desliga, de forma cíclica entre a ligação GDP e GTP, atuando no transporte, pela liberação de energia. A Ras foi demonstrada como um possível caminho de fosforilação da ERK pela ativação do PI3K, durante a estimulação dos neutrófilos pelo PAF. A Rab, proteína relacionada a Ras, pode ser a proteína que fosforila a Ras após ativação da proteína G e IP3K (Grosshans, Ortiz *et al.*, 2006; Lundquist, 2006).

Outra proteína identificada no *spot* 1246 foi a subunidade 1 da pequena calpaína. A calpaína compreende uma grande família de cisteíno-proteases intracelulares. As calpaínas são importantes reguladoras de substratos celulares e interação na motilidade celular. Elas são necessárias no remodelamento ou no enfraquecimento da ligação do citoesqueleto a integrinas permitindo, a eficiência na migração (Xu e Mellgren, 2002).

Nos *spots* 1282, 1288 e 1292 foi identificada a grancalcina. A grancalcina é uma proteína dependente de cálcio, sendo regulada pela concentração do cálcio. Nos neutrófilos está associada aos grânulos e em, pequena quantidade, à membrana celular, indicando uma possível ação na desgranulação. Ela possui poucos sítios para fosforilações e parece não sofrer glicosilação (Teahan, Totty *et al.*, 1992).

No *spot* 1336 foi identificada a proteína glutationa S-transferase P (GST-P). As vias da glutathione desempenham um papel importante na defesa celular contra ROS. A família GSTs são enzimas envolvidas no metabolismo de ROS (Schwartz, Park *et al.*, 2005).

No *spot* 1381 foi identificada a proteína adenina fosforibosil transferase (APRT). Essa enzima cataliza a conversão da adenina + 5-fosforibosil-1-pirofosfato em AMP (Stockelman, Lorenz *et al.*, 1998). O AMP age como um supressor da biossíntese do ácido araquidônico e do leucotrieno (Flamand, Boudreault *et al.*, 2000).

No *spot* 1393 foi identificada domínio agonista de morte da proteína que interage com BH3 (Bid). O Bid faz parte de uma família de proteínas pró-apoptóticas. O Bid é gerado após clivagem da proteína Bcl-2, pela caspase 8, e exposição do domínio BH3. O Bid faz com que haja perda do potencial de membrana da mitocôndria

liberando o citocromo c e a formação do apoptossoma (Fadeel, Zhivotovsky *et al.*, 1999; Degli Esposti, 2004; Scheel-Toellner, Wang *et al.*, 2004).

No *spot* 1401 foi identificada a cadeia leve de ferritina. A ferritina é uma proteína de grande massa molecular responsável por armazenar ferro. Ela tem duas cadeias: pesada (H-ferritina) e leve (L-ferritina). A ferritina depois da sua ativação libera ferro, o qual pode promover a peroxidação de lipídeos ou participar na reação de Fenton, que consiste na produção das espécies reativas de oxigênio no fagossoma. O ferro liberado pode se ligar à lactoferrina (potente bactericida), ativando-a (Bullen e Armstrong, 1979; Balla, Jacob *et al.*, 1992).

No *spot* 1520 foi identificado o fator 5A-1 de início de tradução em células eucarióticas (eIF5A). A eIF5A está associada à tradução de componentes celulares e regula a estabilidade do RNA transportador. Ele também regula a p53, proteína que está vinculada a sobrevivência celular (Huang, Higginson *et al.*, 2007).

No *spot* 1574 foi identificada a proteína coatisina-like (CLP). A CLP interage com a 5-lipoxigenase, ativando-a. A 5-lipoxigenase sintetiza os leucotrienos. A CLP é o fator de despolarização da F-actina, processo que induz a transformação da actina filamentar em actina globular. Com a interação com a 5-lipoxigenase e a despolimerização da actina, ela atua em processos como: motilidade, fagocitose, produção e liberação de leucotrienos pelos neutrófilos (Li, Liu *et al.*, 2004).

No *spot* 1591 foi identificada a proteína rica em ácido glutâmico ligada ao domínio SH3. Um estudo realizado com hipocampo de ratos também encontrou essa proteína, porém não sabemos a sua função (Chen, Viidik *et al.*, 2007).

5. CONCLUSÕES

A partir dos procedimentos e resultados obtidos neste trabalho, algumas conclusões podem ser feitas.

A técnica de citometria de fluxo foi de grande valia para a confirmação do estado de estimulação dos neutrófilos após a incubação com o PAF. Foi possível a avaliação do aumento da produção de peróxido de hidrogênio, demonstrando a atividade do complexo NADPH oxidase pela marcação indireta. As vantagens desse ensaio foram a pequena quantidade de células, a avaliação intracelular individual sem danos às células e a rapidez dos resultados. Por não danificar a célula, foi possível avaliar a viabilidade celular após o estímulo. Outro dado importante observado foi a necessidade do cálcio

extracelular no mecanismo de estimulação e ativação do complexo NADPH dos neutrófilos após incubação dos ativadores: PAF, fMLP, PAF+fMLP e PMA, dados esses que necessitam de pesquisas posteriores, para identificar as proteínas dependentes de cálcio no processo de estimulação e ativação dos neutrófilos.

A bioinformática também nos proporcionou ferramentas de precisão para que pudéssemos comparar com maior confiabilidade os géis produzidos pela eletroforese bidimensional. Essa comparação nos permitiu gerar dados que, com auxílio da estatística, resultaram na comparação quantitativa de presença, ausência e diferença de volume de *spots* entre as condições estudadas.

E por último, concluindo uma etapa da análise proteômica, foram identificadas as proteínas diferencialmente expressas entre condições e proteínas comuns aos dois estados. Essa abordagem forneceu numerosos dados de proteínas que participam em diferentes vias metabólicas que ajudam a compreender o mecanismo que gera a função celular após a estimulação. Foram observados 114 *spots* exclusivos dos neutrófilos quiescentes e 129 *spots* exclusivos da condição PAF, além de apresentar 66 *spots* com expressão aumentada na condição PAF e 42 *spots* com expressão diminuída, de acordo com a avaliação segundo Biron (2006). Identificamos 50 proteínas, sendo que 6 dessas apresentaram expressão diferencial. As proteínas identificadas com expressão diferencial indicam a via de estimulação dos neutrófilos pelo PAF, para a realização de diversas funções necessárias ao processo inflamatório, principalmente na exocitose de grânulos (vimentina, tubulina e SNAP- α), na movimentação celular (subunidade 5 do complexo Arp2/3), na ativação da fosfolipase A₂ (Anexina A5) e na possível sinalização para migração de outros neutrófilos.

Todos esses resultados auxiliam na compreensão das vias de estimulação dos neutrófilos pelo PAF, contribuindo no esclarecimento do processo inflamatório em diversas doenças, tanto nas doenças onde o neutrófilo é o agente patológico, quanto nos processos inflamatórios desencadeados por microorganismos ou partículas.

6. PERSPECTIVAS

Dentre as perspectivas deste trabalho, estão a continuação das identificações de proteínas e verificação da presença de modificações pós-traducionais das proteínas identificadas dos mapas proteômicos ácidos de neutrófilos quiescentes e estimulados por PAF. Realizar comparações entre mapas proteômicos ácidos de neutrófilos ativados

com PAF, PMA, fMLP, PAF+fMLP, LPS e TNF e comparações de neutrófilos humanos de indivíduos que sofreram politraumatismo, trabalhos em andamento no Laboratório de Bioquímica e Química de Proteínas da UnB.

Identificar proteínas exocitadas após estimulação e ativação dos neutrófilos. Com a produção de gel bidimensional ou utilização de cromatografia.

Identificar a diferença de quantidade e qualidade de íons nos neutrófilos após estimulação e ativação (metalômica) e identificar as proteínas que se ligam a metais (metaloporteômica).

Comparar o processo de apoptose ao longo do tempo entre neutrófilos quiescentes, estimulados e ativados.

Avaliar as proteínas com expressões diferenciais, sob o aspecto da variabilidade populacional, indicando prováveis candidatas a marcadores moleculares para diagnóstico e terapias, associados ao trauma, estudo também em andamento.

Realizar estudos de funções das proteínas mais promissoras identificadas, utilizando diferentes técnicas como: citometria de fluxo; microscopia: eletrônica e confocal; imunofluorescência; *western blot*, dentre outras possibilidades.

A longo prazo, realizar estudo com anti-inflamatórios após a estimulação dos neutrófilos com PAF, visando o possível retorno do estado estimulado ao estado quiescente.

7. REFERÊNCIAS

Ahluwalia, J. Chloride channels activated by swell can regulate the NADPH oxidase generated membrane depolarisation in activated human neutrophils. Biochem Biophys Res Commun, v.365, n.2, Jan 11, p.328-33. 2008.

Akgul, C., D. A. Moulding, *et al.* Molecular control of neutrophil apoptosis. FEBS Lett, v.487, n.3, Jan 5, p.318-22. 2001.

Alberts, B. D., B.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K. And Watson, J.D. Biologia Molecular da Célula. Porto Alegre. 1997

Allen, L. A. Mechanisms of pathogenesis: evasion of killing by polymorphonuclear leukocytes. Microbes Infect, v.5, n.14, Nov, p.1329-35. 2003.

Alvarez-Larran, A., T. Toll, *et al.* Assessment of neutrophil activation in whole blood by flow cytometry. Clin Lab Haematol, v.27, n.1, Feb, p.41-6. 2005.

Amershan, B. Percoll Methodology and applications. Ac.

Andonegui, G., C. S. Bonder, *et al.* Endothelium-derived Toll-like receptor-4 is the key molecule in LPS-induced neutrophil sequestration into lungs. J Clin Invest, v.111, n.7, Apr, p.1011-20. 2003.

Aplin, A. E., A. Howe, *et al.* Signal transduction and signal modulation by cell adhesion receptors: the role of integrins, cadherins, immunoglobulin-cell adhesion molecules, and selectins. Pharmacol Rev, v.50, n.2, Jun, p.197-263. 1998.

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

Balla, G., H. S. Jacob, *et al.* Ferritin: a cytoprotective antioxidant strategem of endothelium. J Biol Chem, v.267, n.25, Sep 5, p.18148-53. 1992.

Barszczewski, M., J. J. Chua, *et al.* A Novel Site of Action for α -SNAP in the SNARE Conformational Cycle Controlling Membrane Fusion. Mol Biol Cell, Dec 19. 2007.

Bassoe, C. F., N. Li, *et al.* Investigations of phagosomes, mitochondria, and acidic granules in human neutrophils using fluorescent probes. Cytometry B Clin Cytom, v.51, n.1, Jan, p.21-9. 2003.

Bassuk, J. A., C. Capodici, *et al.* Protein disulphide isomerase from human peripheral blood neutrophils. J Cell Physiol, v.144, n.2, Aug, p.280-6. 1990.

Becker, E. L. Rous-Whipple award lecture. The formylpeptide receptor of the neutrophil. A search and conserve operation. Am J Pathol, v.129, n.1, Oct, p.15-24. 1987.

Bertho, A. L. Conceitos Básicos de Citometria de Fluxo.

Biosciences, A. ImageMaster 2D Platinum 5.0 User Manual

Biron D.G. , B. C., Lefevre T. , Lebarbenchon C. , Loxdale H. D. , Chevenet F. , Brizard J. And Thomas F. . The pitfalls of proteomics experiments without the correct use of bioinformatics tools. Proteomics, v.6, n.20, p.5577-5596. 2006.

Bjerregaard, M. D., J. Jurlander, *et al.* The in vivo profile of transcription factors during neutrophil differentiation in human bone marrow. Blood, v.101, n.11, Jun 1, p.4322-32. 2003.

Blake, C. A. Physiological proteomics: cells, organs, biological fluids, and biomarkers. Exp Biol Med (Maywood), v.230, n.11, Dec, p.785-6. 2005.

Boersma, H. H., B. L. Kietselaer, *et al.* Past, present, and future of annexin A5: from protein discovery to clinical applications. J Nucl Med, v.46, n.12, Dec, p.2035-50. 2005.

Borregaard, N. e J. B. Cowland. Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. Blood, v.89, n.10, May 15, p.3503-21. 1997.

Borregaard, N., L. Kjeldsen, *et al.* Granules and secretory vesicles of the human neutrophil. Clin Exp Immunol, v.101 Suppl 1, Jul, p.6-9. 1995.

Botha, A. J., F. A. Moore, *et al.* Postinjury neutrophil priming and activation states: therapeutic challenges. Shock, v.3, n.3, Mar, p.157-66. 1995.

Botha, A. J., Moore, F. A., Moore, E. E., Kim, F. J., Banerjee, A. And Peterson, V. M. Postinjury neutrophil priming and activation: an early vulnerable window. Surgery, v.118, n.2, Aug, p.358-64; discussion 364-5. 1995.

Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem, v.72, May 7, p.248-54. 1976.

Brown, G. E., M. Q. Stewart, *et al.* Distinct ligand-dependent roles for p38 MAPK in priming and activation of the neutrophil NADPH oxidase. J Biol Chem, v.279, n.26, Jun 25, p.27059-68. 2004.

Brown, R. A., R. Lever, *et al.* Effects of heparin and related molecules upon neutrophil aggregation and elastase release in vitro. Br J Pharmacol, v.139, n.4, Jun, p.845-53. 2003.

Bullen, J. J. e J. A. Armstrong. The role of lactoferrin in the bactericidal function of polymorphonuclear leucocytes. Immunology, v.36, n.4, Apr, p.781-91. 1979.

Burg, N. D. e M. H. Pillinger. The neutrophil: function and regulation in innate and humoral immunity. Clin Immunol, v.99, n.1, Apr, p.7-17. 2001.

Campanelli, D., P. A. Detmers, *et al.* Azurocidin and a homologous serine protease from neutrophils. Differential antimicrobial and proteolytic properties. J Clin Invest, v.85, n.3, Mar, p.904-15. 1990.

Chang, P. S., A. Absood, *et al.* Magnetic bead isolation of neutrophil plasma membranes and quantification of membrane-associated guanine nucleotide binding proteins. Anal Biochem, v.325, n.2, Feb 15, p.175-84. 2004.

Chen, L. W., M. W. Lin, *et al.* Different pathways leading to activation of extracellular signal-regulated kinase and p38 MAP kinase by formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine or platelet activating factor in human neutrophils. J Biomed Sci, v.12, n.2, p.311-9. 2005.

Chen, W. Q., A. Viidik, *et al.* Hippocampal signaling cascades are modulated in voluntary and treadmill exercise rats. Electrophoresis, v.28, n.23, Dec, p.4392-400. 2007.

Cicchetti, G., P. G. Allen, *et al.* Chemotactic signaling pathways in neutrophils: from receptor to actin assembly. Crit Rev Oral Biol Med, v.13, n.3, p.220-8. 2002.

Condliffe, A. M., L. M. Webb, *et al.* RhoG regulates the neutrophil NADPH oxidase. J Immunol, v.176, n.9, May 1, p.5314-20. 2006.

Corcoran, G. B., L. Fix, *et al.* Apoptosis: molecular control point in toxicity. Toxicol Appl Pharmacol, v.128, n.2, Oct, p.169-81. 1994.

Crockett-Torabi, E. Selectins and mechanisms of signal transduction. J Leukoc Biol, v.63, n.1, Jan, p.1-14. 1998.

Curran, A. D. Flow cytometry in the exploration of the physiopathology of occupational lung disease. Occup Environ Med, v.56, n.11, Nov, p.742-6. 1999.

De Souza Castro, M., N. M. De Sa, *et al.* Proteome analysis of resting human neutrophils. Protein Pept Lett, v.13, n.5, p.481-7. 2006.

Degli Esposti, M. Mitochondria in apoptosis: past, present and future. Biochem Soc Trans, v.32, n.Pt3, Jun, p.493-5. 2004.

Dos Remedios, C. G., D. Chhabra, *et al.* Actin binding proteins: regulation of cytoskeletal microfilaments. Physiol Rev, v.83, n.2, Apr, p.433-73. 2003.

Dougherty, M. K. e D. K. Morrison. Unlocking the code of 14-3-3. J Cell Sci, v.117, n.Pt 10, Apr 15, p.1875-84. 2004.

Doussiere, J., F. Bouzidi, *et al.* The S100A8/A9 protein as a partner for the cytosolic factors of NADPH oxidase activation in neutrophils. Eur J Biochem, v.269, n.13, Jul, p.3246-55. 2002.

Dunn, M. J. e J. M. Corbett. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. Methods Enzymol, v.271, p.177-203. 1996.

El-Benna, J., P. M. Dang, *et al.* Phagocyte NADPH oxidase: a multicomponent enzyme essential for host defenses. Arch Immunol Ther Exp (Warsz), v.53, n.3, May-Jun, p.199-206. 2005.

Fadeel, B., B. Zhivotovsky, *et al.* All along the watchtower: on the regulation of apoptosis regulators. Faseb J, v.13, n.13, Oct, p.1647-57. 1999.

Faurschou, M. e N. Borregaard. Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. Microbes Infect, v.5, n.14, Nov, p.1317-27. 2003.

Faurschou, M., O. E. Sorensen, *et al.* Defensin-rich granules of human neutrophils: characterization of secretory properties. Biochim Biophys Acta, v.1591, n.1-3, Aug 19, p.29-35. 2002.

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

Flamand, N., S. Boudreault, *et al.* Adenosine, a potent natural suppressor of arachidonic acid release and leukotriene biosynthesis in human neutrophils. Am J Respir Crit Care Med, v.161, n.2 Pt 2, Feb, p.S88-94. 2000.

Gabrijelcic, J., A. Acuna, *et al.* Neutrophil airway influx by platelet-activating factor in asthma: role of adhesion molecules and LTB4 expression. Eur Respir J, v.22, n.2, Aug, p.290-7. 2003.

Garcia, M. C., S. Fernandez-Gallardo, *et al.* Biosynthesis of platelet-activating factor (PAF) in human polymorphonuclear leucocytes. The role of lyso-PAF disposal and free arachidonic acid. Biochem J, v.268, n.1, May 15, p.91-8. 1990.

Gerke, V. e S. E. Moss. Annexins: from structure to function. Physiol Rev, v.82, n.2, Apr, p.331-71. 2002.

Glogauer, M., J. Hartwig, *et al.* Two pathways through Cdc42 couple the N-formyl receptor to actin nucleation in permeabilized human neutrophils. J Cell Biol, v.150, n.4, Aug 21, p.785-96. 2000.

Gorg, A., C. Obermaier, *et al.* The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. Electrophoresis, v.21, n.6, Apr, p.1037-53. 2000.

Groemping, Y. e K. Rittinger. Activation and assembly of the NADPH oxidase: a structural perspective. Biochem J, v.386, n.Pt 3, Mar 15, p.401-16. 2005.

Grosshans, B. L., D. Ortiz, *et al.* Rabs and their effectors: achieving specificity in membrane traffic. Proc Natl Acad Sci U S A, v.103, n.32, Aug 8, p.11821-7. 2006.

Guilherme, A., N. A. Soriano, *et al.* EHD2 and the novel EH domain binding protein EHBP1 couple endocytosis to the actin cytoskeleton. J Biol Chem, v.279, n.11, Mar 12, p.10593-605. 2004.

Haslett, C., L. A. Guthrie, *et al.* Modulation of multiple neutrophil functions by preparative methods or trace concentrations of bacterial lipopolysaccharide. Am J Pathol, v.119, n.1, Apr, p.101-10. 1985.

Healthcare, G. ImageMaster 2D Platinum 6.0 User Manual

Healthcare, G. E. 2-D Electrophoresis Principles and Methods. Ac 2004.

Hill, A. D., H. A. Naama, *et al.* The effect of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on myeloid cells and its clinical applications. J Leukoc Biol, v.58, n.6, Dec, p.634-42. 1995.

Hirabayashi, T., T. Murayama, *et al.* Regulatory mechanism and physiological role of cytosolic phospholipase A2. Biol Pharm Bull, v.27, n.8, Aug, p.1168-73. 2004.

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

Hofmann, A., C. Raguene-Nicol, *et al.* The annexin A3-membrane interaction is modulated by an N-terminal tryptophan. Biochemistry, v.39, n.26, Jul 4, p.7712-21. 2000.

Holness, C. L. e D. L. Simmons. Molecular cloning of CD68, a human macrophage marker related to lysosomal glycoproteins. Blood, v.81, n.6, Mar 15, p.1607-13. 1993.

Huang, Y., D. S. Higginson, *et al.* Neuronal growth and survival mediated by eIF5A, a polyamine-modified translation initiation factor. Proc Natl Acad Sci U S A, v.104, n.10, Mar 6, p.4194-9. 2007.

Jethwaney, D., M. R. Islam, *et al.* Proteomic analysis of plasma membrane and secretory vesicles from human neutrophils. Proteome Sci, v.5, p.12. 2007.

Karlsson, A., J. B. Nixon, *et al.* Phorbol myristate acetate induces neutrophil NADPH-oxidase activity by two separate signal transduction pathways: dependent or independent of phosphatidylinositol 3-kinase. J Leukoc Biol, v.67, n.3, Mar, p.396-404. 2000.

Kerkhoff, C., M. Klempt, *et al.* The two calcium-binding proteins, S100A8 and S100A9, are involved in the metabolism of arachidonic acid in human neutrophils. J Biol Chem, v.274, n.46, Nov 12, p.32672-9. 1999.

Kerkhoff, C., W. Nacken, *et al.* The arachidonic acid-binding protein S100A8/A9 promotes NADPH oxidase activation by interaction with p67phox and Rac-2. Faseb J, v.19, n.3, Mar, p.467-9. 2005.

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

Kietselaer, B. L., L. Hofstra, *et al.* The role of labeled Annexin A5 in imaging of programmed cell death. From animal to clinical imaging. Q J Nucl Med, v.47, n.4, Dec, p.349-61. 2003.

Kiselar, J. G., R. Mahaffy, *et al.* Visualizing Arp2/3 complex activation mediated by binding of ATP and WASp using structural mass spectrometry. Proc Natl Acad Sci U S A, v.104, n.5, Jan 30, p.1552-7. 2007.

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

Kjellen, L. e H. Pertoft. Density gradients prepared from colloidal silical particles coated by polyvinylpyrrolidone (Percoll). II. Radioactive labeling of Percoll. Anal Biochem, v.88, n.1, Jul 15, p.283-4. 1978.

Ko, H. S., T. Uehara, *et al.* Role of ubiquilin associated with protein-disulfide isomerase in the endoplasmic reticulum in stress-induced apoptotic cell death. J Biol Chem, v.277, n.38, Sep 20, p.35386-92. 2002.

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

Lambeth, J. D. NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. Nat Rev Immunol, v.4, n.3, Mar, p.181-9. 2004.

Leabu, M. Membrane fusion in cells: molecular machinery and mechanisms. J Cell Mol Med, v.10, n.2, Apr-Jun, p.423-7. 2006.

Lee, W. L., R. E. Harrison, *et al.* Phagocytosis by neutrophils. Microbes Infect, v.5, n.14, Nov, p.1299-306. 2003.

Lee, Y. M., B. M. Hybertson, *et al.* Platelet-activating factor induces lung inflammation and leak in rats: hydrogen peroxide production along neutrophil-lung endothelial cell interfaces. J Lab Clin Med, v.140, n.5, Nov, p.312-9. 2002.

Li, M., Z. Q. Xiao, *et al.* Proteomic analysis of the aging-related proteins in human normal colon epithelial tissue. J Biochem Mol Biol, v.40, n.1, Jan 31, p.72-81. 2007.

Li, X., X. Liu, *et al.* Crystal structure of human coactosin-like protein at 1.9 Å resolution. Protein Sci, v.13, n.11, Nov, p.2845-51. 2004.

Lian, Z., L. Wang, *et al.* Genomic and proteomic analysis of the myeloid differentiation program. Blood, v.98, n.3, Aug 1, p.513-24. 2001.

Liu, J. J., H. He, *et al.* Mitochondria Play a Role in the Development of Non-Apoptotic Programmed Cell Death of Neutrophils Induced by ONO-AE-248. Cell Mol Immunol, v.4, n.6, Dec, p.447-53. 2007.

Lotz, S., E. Aga, *et al.* Highly purified lipoteichoic acid activates neutrophil granulocytes and delays their spontaneous apoptosis via CD14 and TLR2. J Leukoc Biol, v.75, n.3, Mar, p.467-77. 2004.

Loureiro, J. A. S. C. Aplicação da Citometria de Fluxo ao estudo do Genoma Vegetal. Métodos em Biotecnologia - Citometria de Fluxo I.

Lundquist, E. A. Small GTPases. WormBook, p.1-18. 2006.

- Mann, M., R. C. Hendrickson, *et al.* Analysis of proteins and proteomes by mass spectrometry. Annu Rev Biochem, v.70, p.437-73. 2001.
- Mantegazza, A. R., M. M. Barrio, *et al.* CD63 tetraspanin slows down cell migration and translocates to the endosomal-lysosomal-MIICs route after extracellular stimuli in human immature dendritic cells. Blood, v.104, n.4, Aug 15, p.1183-90. 2004.
- Martin-Martin, B., S. M. Nabokina, *et al.* Involvement of SNAP-23 and syntaxin 6 in human neutrophil exocytosis. Blood, v.96, n.7, Oct 1, p.2574-83. 2000.
- Martys, J. L., C. L. Ho, *et al.* Intermediate filaments in motion: observations of intermediate filaments in cells using green fluorescent protein-vimentin. Mol Biol Cell, v.10, n.5, May, p.1289-95. 1999.
- Marvin, L. F., M. A. Roberts, *et al.* Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry in clinical chemistry. Clin Chim Acta, v.337, n.1-2, Nov, p.11-21. 2003.
- Mathison, R. D., A. D. Befus, *et al.* Modulation of neutrophil function by the tripeptide feG. BMC Immunol, v.4, Mar 4, p.3. 2003.
- Matute-Bello, G., W. C. Liles, *et al.* Neutrophil apoptosis in the acute respiratory distress syndrome. Am J Respir Crit Care Med, v.156, n.6, Dec, p.1969-77. 1997.
- May, A. P., S. W. Whiteheart, *et al.* Unraveling the mechanism of the vesicle transport ATPase NSF, the N-ethylmaleimide-sensitive factor. J Biol Chem, v.276, n.25, Jun 22, p.21991-4. 2001.
- Mcmanus, L. M. e R. N. Pinckard. PAF, a putative mediator of oral inflammation. Crit Rev Oral Biol Med, v.11, n.2, p.240-58. 2000.
- Miotla, J. M., P. K. Jeffery, *et al.* Platelet-activating factor plays a pivotal role in the induction of experimental lung injury. Am J Respir Cell Mol Biol, v.18, n.2, Feb, p.197-204. 1998.
- Moisan, E., S. Chiasson, *et al.* The intriguing normal acute inflammatory response in mice lacking vimentin. Clin Exp Immunol, v.150, n.1, Oct, p.158-68. 2007.
- Moisan, E. e D. Girard. Cell surface expression of intermediate filament proteins vimentin and lamin B1 in human neutrophil spontaneous apoptosis. J Leukoc Biol, v.79, n.3, Mar, p.489-98. 2006.
- Mollinedo, F., J. Calafat, *et al.* Combinatorial SNARE complexes modulate the secretion of cytoplasmic granules in human neutrophils. J Immunol, v.177, n.5, Sep 1, p.2831-41. 2006.
- Montrucchio, G., G. Alloatti, *et al.* Role of platelet-activating factor in cardiovascular pathophysiology. Physiol Rev, v.80, n.4, Oct, p.1669-99. 2000.
- Moss, S. E. e R. O. Morgan. The annexins. Genome Biol, v.5, n.4, p.219. 2004.

Moulding, D., J. A. Quayle, *et al.* Regulation of neutrophil apoptosis by sodium butyrate. Biologicals, v.24, n.4, Dec, p.301-6. 1996.

Nath, J., M. Flavin, *et al.* Stimulation of tubulin tyrosinolation in rabbit leukocytes evoked by the chemoattractant formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine. J Cell Biol, v.91, n.1, Oct, p.232-9. 1981.

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

Nolan, J. P. e F. Mandy. Multiplexed and microparticle-based analyses: quantitative tools for the large-scale analysis of biological systems. Cytometry A, v.69, n.5, May, p.318-25. 2006.

O'Neill, A., M. C. Greenan, *et al.* Gene profiling of in vitro and in vivo models of delayed neutrophil apoptosis: a common pathway? Biochem Soc Trans, v.32, n.Pt3, Jun, p.470-3. 2004.

Paclet, M. H., C. Davis, *et al.* N-Formyl peptide receptor subtypes in human neutrophils activate L-plastin phosphorylation through different signal transduction intermediates. Biochem J, v.377, n.Pt 2, Jan 15, p.469-77. 2004.

Palma, M. S. M., M.A.; Marques, M.R.;Souza B.M.;Santos, L.D. And Santos, K.S. . FUNDAMENTOS EM ANÁLISE PROTEÔMICA.

Partrick, D. A., E. E. Moore, *et al.* Nitric oxide attenuates platelet-activating factor priming for elastase release in human neutrophils via a cyclic guanosine monophosphate-dependent pathway. Surgery, v.122, n.2, Aug, p.196-202; discussion 202-3. 1997.

Pryzwansky, K. B. e E. P. Merricks. Chemotactic peptide-induced changes of intermediate filament organization in neutrophils during granule secretion: role of cyclic guanosine monophosphate. Mol Biol Cell, v.9, n.10, Oct, p.2933-47. 1998.

Pryzwansky, K. B., T. A. Wyatt, *et al.* Cyclic guanosine monophosphate-dependent protein kinase is targeted to intermediate filaments and phosphorylates vimentin in A23187-stimulated human neutrophils. Blood, v.85, n.1, Jan 1, p.222-30. 1995.

Quiroz, J. A., T. D. Gould, *et al.* Molecular effects of lithium. Mol Interv, v.4, n.5, Oct, p.259-72. 2004.

Ramagli, L. S. A. R., L.V. Quantitation of microgram amounts of protein in two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis sample buffer. Electrophoresis, v.6, p.559-563. 1985.

Rocha, A. V. Estudos Estereoquímicos e Estruturais para um Mapeamento Farmacofórico de Antagonistas do PAF-Acéter. Instituto de Química, Universidade de Brasília, 2004. 165 p.

Rodríguez, C. G. Biosíntesis del Factor Activador de las Plaquetas en los Leucocitos Polimorfonucleares Humanos. Estudio de los Mecanismos Implicados en la Traducción de la Señal. Facultad de Ciencias Químicas -Departamento de Bioquímica y Biología Molecular Universidad Complutense de Madrid, 1993. 237 p.

Roos, D., R. Van Bruggen, *et al.* Oxidative killing of microbes by neutrophils. Microbes Infect, v.5, n.14, Nov, p.1307-15. 2003.

Rothwell, S. W., J. Nath, *et al.* Interactions of cytoplasmic granules with microtubules in human neutrophils. J Cell Biol, v.108, n.6, Jun, p.2313-26. 1989.

Ryckman, C., K. Vandal, *et al.* Proinflammatory activities of S100: proteins S100A8, S100A9, and S100A8/A9 induce neutrophil chemotaxis and adhesion. J Immunol, v.170, n.6, Mar 15, p.3233-42. 2003.

Santos, K. C. Análise Proteômica Comparativa entre Neutrófilos não Ativados e Neutrófilos Ativados com PMA, Um Análogo do Diacilglicerol. Programa de pós graduação em Patologia Molecular, Laboratório de Bioquímica e Química de Proteínas, Departamento de Biologia Celular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília, 2007.

Scheel-Toellner, D., K. Q. Wang, *et al.* Early events in spontaneous neutrophil apoptosis. Biochem Soc Trans, v.32, n.Pt3, Jun, p.461-4. 2004.

Schwartz, J., S. K. Park, *et al.* Glutathione-S-transferase M1, obesity, statins, and autonomic effects of particles: gene-by-drug-by-environment interaction. Am J Respir Crit Care Med, v.172, n.12, Dec 15, p.1529-33. 2005.

Scroferneker, M. L. E. P., P. R. Imunologia Básica e Aplicada

Sheppard, F. R., M. R. Kelher, *et al.* Structural organization of the neutrophil NADPH oxidase: phosphorylation and translocation during priming and activation. J Leukoc Biol, v.78, n.5, Nov, p.1025-42. 2005.

Shevchenko, A., M. Wilm, *et al.* Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. Anal Chem, v.68, n.5, Mar 1, p.850-8. 1996.

Siddiqui, R. A., D. English, *et al.* Phorbol ester-induced priming of superoxide generation by phosphatidic acid-stimulated neutrophils and granule-free neutrophil cytoplasts. J Leukoc Biol, v.58, n.2, Aug, p.189-95. 1995.

Silva, T. L. R., A. , Hewitt C. And Roseiro, J.C. . Citometria de fluxo - Funcionalidade celular on-line em bioprocessos. Métodos em Biotecnologia - Citometria de Fluxo II.

Soares, A. C., V. S. Pinho, *et al.* Role of the platelet-activating factor (PAF) receptor during pulmonary infection with gram negative bacteria. Br J Pharmacol, v.137, n.5, Nov, p.621-8. 2002.

Song, X., J. Von Kampen, *et al.* Relative functions of the alpha and beta subunits of the proteasome activator, PA28. J Biol Chem, v.272, n.44, Oct 31, p.27994-8000. 1997.

Sorensen, O. e N. Borregaard. Methods for quantitation of human neutrophil proteins, a survey. J Immunol Methods, v.232, n.1-2, Dec 17, p.179-90. 1999.

Spss. SPSS® 13.0 Base User's Guide. Chicago, USA. 2004

Srikrishna, G., K. Panneerselvam, *et al.* Two proteins modulating transendothelial migration of leukocytes recognize novel carboxylated glycans on endothelial cells. J Immunol, v.166, n.7, Apr 1, p.4678-88. 2001.

Steel, H. C. e R. Anderson. Dissociation of the PAF-receptor from NADPH oxidase and adenylate cyclase in human neutrophils results in accelerated influx and delayed clearance of cytosolic calcium. Br J Pharmacol, v.136, n.1, May, p.81-9. 2002.

Stockelman, M. G., J. N. Lorenz, *et al.* Chronic renal failure in a mouse model of human adenine phosphoribosyltransferase deficiency. Am J Physiol, v.275, n.1 Pt 2, Jul, p.F154-63. 1998.

Su, W. H., H. I. Chen, *et al.* Endothelial [Ca(2+)](i) signaling during transmigration of polymorphonuclear leukocytes. Blood, v.96, n.12, Dec 1, p.3816-22. 2000.

Suckau, D., A. Resemann, *et al.* A novel MALDI LIFT-TOF/TOF mass spectrometer for proteomics. Anal Bioanal Chem, v.376, n.7, Aug, p.952-65. 2003.

Swain S.D. , R. T. T., and Quinn M.T. . Neutrophil Priming in Host Defense: Role of Oxidants as Priming Agents. ANTIOXIDANTS & REDOX SIGNALING, v.4, n.1, p.69-83. 2002.

Takahashi, T., F. Hato, *et al.* Activation of human neutrophil by cytokine-activated endothelial cells. Circ Res, v.88, n.4, Mar 2, p.422-9. 2001.

Teahan, C. G., N. F. Totty, *et al.* Isolation and characterization of grancalcin, a novel 28 kDa EF-hand calcium-binding protein from human neutrophils. Biochem J, v.286 (Pt 2), Sep 1, p.549-54. 1992.

Theilgaard-Monch, K., B. T. Porse, *et al.* Systems biology of neutrophil differentiation and immune response. Curr Opin Immunol, v.18, n.1, Feb, p.54-60. 2006.

Thingholm, T. E., T. J. Jorgensen, *et al.* Highly selective enrichment of phosphorylated peptides using titanium dioxide. Nat Protoc, v.1, n.4, p.1929-35. 2006.

Tintinger, G., H. C. Steel, *et al.* Taming the neutrophil: calcium clearance and influx mechanisms as novel targets for pharmacological control. Clin Exp Immunol, v.141, n.2, Aug, p.191-200. 2005.

Turnay, J., N. Olmo, *et al.* Calcium-dependent conformational rearrangements and protein stability in chicken annexin A5. Biophys J, v.83, n.4, Oct, p.2280-91. 2002.

Ugolev, Y., S. Molshanski-Mor, *et al.* Liposomes comprising anionic but not neutral phospholipids cause dissociation of Rac(1 or 2) x RhoGDI complexes and support amphiphile-independent NADPH oxidase activation by such complexes. J Biol Chem, v.281, n.28, Jul 14, p.19204-19. 2006.

Ungermann, C. e D. Langosch. Functions of SNAREs in intracellular membrane fusion and lipid bilayer mixing. J Cell Sci, v.118, n.Pt 17, Sep 1, p.3819-28. 2005.

Vandal, K., P. Rouleau, *et al.* Blockade of S100A8 and S100A9 suppresses neutrophil migration in response to lipopolysaccharide. J Immunol, v.171, n.5, Sep 1, p.2602-9. 2003.

Verhey, K. J. e J. Gaertig. The tubulin code. Cell Cycle, v.6, n.17, Sep 1, p.2152-60. 2007.

Vilela, M. L. A. Anatomia e Fisiologia Humanas Sistema Cardiovascular. 2007 2007.

Vinogradov, A. D. Mitochondrial ATP synthase: fifteen years later. Biochemistry (Mosc), v.64, n.11, Nov, p.1219-29. 1999.

Vinson, S. M., A. Rickard, *et al.* Neutrophil adherence to bladder microvascular endothelial cells following platelet-activating factor acetylhydrolase inhibition. J Pharmacol Exp Ther, v.314, n.3, Sep, p.1241-7. 2005.

Vulcano, M., M. F. Alves Rosa, *et al.* N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (fMLP) inhibits tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) production on lipopolysaccharide (LPS)-stimulated human neutrophils. Clin Exp Immunol, v.113, n.1, Jul, p.39-47. 1998.

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

Watanabe, J., G. K. Marathe, *et al.* Endotoxins stimulate neutrophil adhesion followed by synthesis and release of platelet-activating factor in microparticles. J Biol Chem, v.278, n.35, Aug 29, p.33161-8. 2003.

Weber, T., F. Parlati, *et al.* SNAREpins are functionally resistant to disruption by NSF and alphaSNAP. J Cell Biol, v.149, n.5, May 29, p.1063-72. 2000.

Wojcik, C. e M. Di Napoli. Ubiquitin-proteasome system and proteasome inhibition: new strategies in stroke therapy. Stroke, v.35, n.6, Jun, p.1506-18. 2004.

Wrona, M., K. Patel, *et al.* Reactivity of 2',7'-dichlorodihydrofluorescein and dihydrorhodamine 123 and their oxidized forms toward carbonate, nitrogen dioxide, and hydroxyl radicals. Free Radic Biol Med, v.38, n.2, Jan 15, p.262-70. 2005.

Wyatt, T. A., T. M. Lincoln, *et al.* Vimentin is transiently co-localized with and phosphorylated by cyclic GMP-dependent protein kinase in formyl-peptide-stimulated neutrophils. J Biol Chem, v.266, n.31, Nov 5, p.21274-80. 1991.

Xu, Y. e R. L. Mellgren. Calpain inhibition decreases the growth rate of mammalian cell colonies. J Biol Chem, v.277, n.24, Jun 14, p.21474-9. 2002.

8. ANEXOS

Anexo 1: Tabela dos *spots* exclusivos dos neutrófilos quiescentes. Em cinza *spots* que estavam presente em, pelo menos, 5 géis.

Spots exclusivos dos neutrófilos quiescentes	
Número do spot	Nº de géis com a presença do spot
68	3
76	6
78	5
81	4
83	3
87	3
89	3
90	3
91	3
92	2
94	3
95	4
96	4
101	5
102	8
104	2
130	7
131	4
140	3
146	2
154	1
155	5
159	3
163	8
167	4
173	1
183	1
185	6
187	3
189	7
196	4
200	6
203	1
211	1
214	10
216	8
241	1
244	6
245	4
247	2
259	1
260	3
262	1
263	2
271	2
272	4

283	4
284	4
288	2
289	3
304	2
307	3
312	1
318	3
322	4
323	6
324	4
326	6
327	3
337	6
341	3
342	3
344	1
350	1
351	1
355	4
356	6
365	2
369	4
374	3
380	2
382	1
394	2
395	2
399	1
400	2
409	1
421	5
426	4
428	2
430	5
436	1
437	2
439	4
456	2
460	2
463	4
470	3
475	3
477	1
481	2
484	2
486	5
494	2
500	1
502	3
503	3
505	2

508	6
509	5
510	2
515	3
518	4
522	5
527	4
528	4
534	4
542	1
545	8
546	6
548	8
551	2
559	4
560	2
566	8
569	6
578	3
585	6
594	1
601	3
603	9
605	1
606	2
615	4
637	2
641	2
642	8
648	1
650	2
652	3
654	5
658	2
659	2
669	3
670	3
673	3
688	5
695	6
699	4
718	2
722	2
727	3
728	2
731	2
739	1
740	1
743	9
746	2
749	7
750	4

756	5
759	1
762	4
766	2
767	1
770	5
771	4
776	6
777	6
780	2
783	4
784	4
785	2
786	8
792	3
798	4
799	5
800	5
807	5
823	5
824	1
826	2
830	3
838	1
847	6
853	2
856	2
865	3
867	2
869	6
883	6
889	2
896	2
898	3
903	2
904	8
905	2
922	4
930	3
933	6
934	3
936	2
946	3
950	4
959	4
964	2
980	2
992	1
996	5
999	2
1002	2
1018	2

1021	2
1022	4
1034	2
1035	5
1041	2
1043	2
1044	1
1046	2
1050	4
1058	3
1061	1
1066	5
1068	4
1071	3
1077	6
1078	5
1079	4
1080	1
1084	5
1088	6
1091	5
1093	3
1097	3
1098	4
1104	3
1110	3
1118	8
1125	4
1130	3
1137	4
1144	5
1160	4
1162	2
1163	5
1165	8
1167	1
1169	6
1182	2
1184	1
1194	1
1195	4
1197	1
1198	2
1203	1
1210	2
1214	1
1219	4
1220	7
1224	6
1226	2
1227	1
1235	2

1240	7
1241	3
1242	8
1247	3
1251	8
1255	8
1258	4
1259	4
1263	1
1266	5
1268	2
1270	3
1271	4
1272	5
1273	3
1281	6
1290	2
1291	3
1296	4
1298	2
1302	8
1304	4
1305	1
1306	6
1317	2
1318	2
1319	7
1334	5
1341	3
1343	3
1347	3
1352	7
1355	5
1356	3
1366	1
1369	1
1380	3
1383	4
1387	7
1391	5
1396	8
1408	7
1411	2
1417	6
1418	3
1420	2
1423	7
1429	7
1432	2
1433	7
1434	4
1437	4

1441	3
1443	3
1444	4
1453	3
1459	4
1464	3
1466	2
1467	6
1469	3
1470	7
1471	10
1481	2
1482	2
1483	4
1485	3
1489	9
1490	10
1496	9
1499	4
1503	1
1505	7
1508	4
1511	4
1523	2
1529	7
1530	5
1532	3
1539	4
1541	9
1544	4
1546	5
1547	4
1550	2
1556	7
1557	3
1559	1
1560	6
1561	4
1562	3
1563	8
1567	4
1568	6
1569	3
1570	4
1575	5
1577	4
1579	6
1582	3
1583	3
1585	4
1587	2
1589	3

1619	3
1620	8
1621	3
1622	3
1623	4
1624	4
1630	2
1631	5
1634	4
1636	3
1639	4
1640	2
1643	1
1644	1
1647	5
1650	3
1651	3
1652	9
1658	3
1661	3
1667	2
1677	6
1684	5
1685	3
1686	5
1687	3
1688	4
1689	6
1690	4
1692	4
1699	2
1704	6
1707	7
1709	1

Anexo 2: Tabela dos *spots* exclusivos dos neutrófilos estimulados com PAF. Em cinza *spots* de estavam presente em, pelo menos, 5 géis.

Spots exclusivos dos neutrófilos estimulados com PAF	
Número do <i>spot</i>	Nº de géis com a presença do <i>spot</i>
97	3
105	1
108	3
110	4
111	4
112	8
116	7
117	6
120	2
123	3
129	2
130	7

132	5
139	4
145	3
147	6
148	6
150	5
154	2
162	5
163	4
165	6
166	6
172	4
177	1
178	1
180	1
181	6
182	3
183	3
184	8
188	6
190	3
197	7
198	3
199	4
201	5
203	1
205	4
210	1
211	6
212	4
221	8
227	4
233	1
236	2
238	4
241	4
246	3
247	2
251	4
252	5
254	6
256	4
264	2
268	6
273	8
276	6
282	2
284	2
287	3
288	4
291	4
292	5

296	5
297	3
299	7
302	6
304	9
307	3
308	4
316	1
317	4
321	5
323	2
331	1
335	3
343	5
345	2
358	2
361	4
365	3
374	3
376	4
381	6
386	5
387	2
392	8
397	5
413	2
424	2
434	2
435	2
441	4
443	4
450	3
455	3
467	2
469	3
472	1
476	5
479	9
482	3
487	2
490	5
492	7
494	2
504	8
518	7
522	6
524	7
526	2
527	4
534	4
538	3
540	1

544	1
545	3
546	3
547	4
548	6
550	3
551	3
563	5
569	2
589	1
591	5
592	7
594	5
597	4
598	3
606	6
608	7
615	3
617	7
620	2
623	3
626	3
627	2
630	3
638	3
639	2
643	3
644	5
646	3
648	1
650	8
652	4
657	4
660	6
662	8
664	2
674	2
676	7
679	7
680	4
685	4
689	5
691	4
692	3
696	5
697	6
699	2
700	2
703	6
704	9
721	5
733	5

736	3
739	3
740	6
746	6
757	2
764	2
766	3
768	1
778	4
786	4
790	4
792	1
795	4
796	5
797	8
798	5
799	7
800	6
801	4
803	9
807	5
817	3
818	8
822	7
827	9
829	2
830	6
835	5
837	6
839	4
840	4
841	6
842	3
848	8
855	5
868	2
876	6
882	6
893	8
894	5
898	2
905	6
921	4
923	7
928	5
931	6
933	1
934	4
939	3
940	3
947	5
949	7

951	2
955	2
957	5
958	3
964	3
967	2
970	9
975	9
979	2
980	2
988	4
991	9
998	2
1001	2
1006	9
1007	6
1016	1
1017	6
1021	5
1022	5
1023	2
1033	3
1034	3
1036	2
1037	5
1039	3
1041	4
1068	4
1072	3
1078	4
1083	3
1101	3
1105	1
1128	1
1132	5
1133	7
1135	5
1137	4
1159	2
1164	4
1174	2
1180	2
1191	2
1197	2
1199	5
1200	2
1214	3
1219	5
1223	5
1250	6
1263	3
1265	2

1266	4
1269	2
1270	6
1275	3
1276	3
1286	9
1294	3
1300	2
1303	2
1309	4
1313	2
1315	5
1316	2
1323	1
1328	2
1331	4
1343	4
1345	9
1347	4
1350	4
1351	7
1354	2
1360	3
1361	2
1363	5
1369	6
1373	10
1375	8
1385	4
1391	3
1395	5
1407	3
1413	8
1427	3
1440	4
1443	3
1459	3
1460	6
1474	2
1478	2
1490	3
1499	2
1505	2
1527	8
1533	3
1544	5
1547	8
1553	4
1554	5
1556	7
1562	3
1563	4

1573	2
1576	2
1591	4
1598	2
1601	7
1619	8
1620	5
1628	5
1642	6
1643	3
1648	6
1658	6
1661	5
1754	1
1756	3
1762	4
1764	4
1767	2
1768	2
1769	2
1770	4
1773	1
1774	4
1782	1
1784	7

Anexo 3: Tabela com os *spots* que demonstraram aumento de expressão na condição PAF, pela pesquisa da razão entre quiescente/PAF \leq 0,50. Em cinza *spots* com significância de $p\leq$ 0,05.

Spots com expressão aumentada na condição PAF	
Número do spot	Q/P\leq0,050
63	0,46
67	0,45
69	0,09
70	0,17
71	0,20
72	0,26
73	0,21
86	0,11
122	0,48
142	0,11
147	0,12
149	0,44
168	0,48
181	0,33
186	0,42
194	0,34
202	0,45
210	0,35
215	0,47
218	0,47
227	0,04

230	0,48
235	0,11
238	0,39
248	0,39
250	0,02
253	0,48
257	0,12
258	0,49
274	0,34
276	0,39
287	0,25
290	0,49
303	0,45
308	0,19
309	0,19
311	0,50
313	0,41
314	0,19
320	0,27
345	0,46
362	0,39
371	0,20
372	0,25
379	0,15
386	0,41
393	0,35
397	0,25
398	0,40
410	0,23
413	0,23
429	0,14
433	0,32
434	0,43
442	0,49
447	0,43
448	0,48
450	0,41
453	0,36
461	0,44
474	0,32
497	0,28
499	0,46
507	0,15
512	0,09
519	0,47
526	0,30
530	0,14
531	0,20
537	0,31
538	0,02
540	0,38
553	0,33

561	0,22
571	0,45
574	0,28
587	0,42
588	0,11
590	0,40
595	0,37
596	0,40
599	0,32
602	0,22
610	0,06
612	0,32
613	0,47
622	0,26
624	0,50
636	0,33
672	0,21
674	0,48
685	0,32
687	0,50
694	0,50
712	0,50
713	0,03
715	0,46
717	0,18
724	0,24
729	0,36
735	0,29
737	0,30
741	0,44
754	0,41
757	0,27
761	0,28
768	0,36
769	0,41
772	0,09
773	0,27
774	0,37
775	0,32
778	0,47
794	0,47
806	0,26
813	0,26
819	0,28
845	0,34
851	0,46
852	0,39
854	0,33
877	0,17
884	0,27
888	0,14
894	0,33

908	0,40
915	0,16
920	0,24
925	0,34
947	0,48
954	0,45
968	0,50
969	0,49
971	0,24
979	0,09
981	0,50
982	0,32
986	0,40
990	0,20
995	0,33
1005	0,32
1006	0,15
1007	0,22
1010	0,28
1016	0,41
1059	0,15
1064	0,43
1070	0,27
1072	0,46
1073	0,47
1086	0,20
1092	0,48
	0,42
1099	0,14
1101	0,24
1122	0,22
1138	0,42
1152	0,31
1156	0,20
1193	0,43
1211	0,09
1221	0,13
1233	0,35
1234	0,20
1244	0,13
1245	0,05
1269	0,23
1274	0,40
1278	0,37
1288	0,35
1300	0,30
1338	0,41
1346	0,28
1349	0,47
1365	0,36
1377	0,31
1379	0,23

1382	0,49
1388	0,44
1394	0,41
1398	0,45
1399	0,07
1404	0,07
1410	0,15
1412	0,11
1413	0,35
1442	0,44
1450	0,16
1468	0,24
1484	0,03
1492	0,33
1504	0,21
1513	0,38
1522	0,44
1531	0,43
1536	0,11
1538	0,34
1540	0,18
1552	0,42
1553	0,50
1580	2,23
1626	0,06
1629	0,22
1638	0,15
1648	0,39
1654	0,49
1656	0,24
1662	0,47
1665	0,04
1670	0,18
1673	0,23
1678	0,26
1679	0,32
1680	0,36
1691	0,28
1694	0,09
1695	0,40
1696	0,21
1710	0,04

Anexo 4: Tabela com os *spots* que demonstraram diminuição de expressão na condição PAF, pela pesquisa da razão entre quiescente/PAF \geq 2. Em cinza *spots* com significância de $p\leq 0,05$.

Spots com expressão diminuída na condição PAF	
Número do Spot	Q/P\geq2
129	2,09
169	2,42
192	3,92

199	4,65
212	16,53
243	7,92
255	5,32
261	5,08
264	2,27
265	2,55
266	2,14
292	5,41
301	3,43
325	3,70
329	2,26
336	2,75
352	2,20
353	2,00
373	6,84
387	3,48
401	5,17
418	4,19
420	1,91
424	21,53
459	2,28
466	8,19
472	2,72
483	2,62
485	2,87
556	2,90
562	2,72
563	25,42
572	3,69
579	2,87
580	2,96
582	5,02
583	6,61
586	2,19
589	12,11
609	18,59
614	2,05
634	2,33
646	2,66
667	2,25
679	3,75
703	3,14
714	3,02
744	6,46
751	3,77
758	2,24
782	3,70
793	2,95
816	2,04
831	2,21
840	46,29

846	5,55
849	2,77
886	3,34
906	3,32
912	2,80
937	5,30
987	21,63
991	22,55
994	3,78
1054	4,14
1067	29,30
1069	8,06
1127	4,59
1145	5,97
1155	2,72
1158	3,15
1213	2,00
1228	2,64
1246	5,70
1311	2,09
1314	9,59
1320	2,08
1327	2,21
1337	2,92
1348	11,43
1361	2,13
1397	4,62
1400	4,31
1405	3,64
1427	2,66
1435	4,14
1446	2,80
1447	3,81
1448	26,75
1456	7,83
1507	3,35
1517	12,25
1537	2,00
1543	2,16
1548	2,63
1664	5,52
1698	3,89

Anexo 5: Tabela com os *spots* que apresentaram expressão diferencial $p \leq 0,05$ em diferentes testes estatísticos.

Teste T-Pareado		Teste T-Pareado log		Teste Wilcoxon	
N° Match	$p \leq 0,05$	N° Match	$p \leq 0,05$	N° Match	$p \leq 0,05$
72	0,013	179	0,041	69	0,011
156	0,033	345	0,035	70	0,015
177	0,040	521	0,007	71	0,021
218	0,029	1024	0,023	73	0,008
313	0,043	1168	0,011	142	0,036

368	0,043	1330	0,018	147	0,005
408	0,007	1398	0,050	192	0,022
420	0,042	1415	0,022	212	0,043
434	0,023	1501	0,036	227	0,050
442	0,023	1703	0,004	243	0,047
526	0,004	1705	0,016	250	0,028
547	0,038			255	0,043
553	0,005			257	0,043
554	0,020			292	0,036
620	0,020			301	0,036
651	0,340			309	0,028
661	0,010			314	0,028
672	0,002			362	0,021
679	0,030			372	0,011
694	0,001			373	0,036
744	0,014			413	0,050
778	0,005			424	0,012
876	0,050			433	0,017
924	0,033			447	0,036
941	0,035			453	0,050
982	0,010			482	0,028
1081	0,037			497	0,038
1082	0,043			512	0,018
1152	0,019			530	0,015
1179	0,016			538	0,028
1274	0,021			540	0,037
1349	0,046			561	0,038
1364	0,052			563	0,021
1365	0,005			572	0,047
1412	0,015			589	0,011
1479	0,034			595	0,021
1491	0,031			599	0,038
1507	0,001			610	0,017
1515	0,049			622	0,021
1543	0,008			629	0,011
1648	0,040			636	0,021
1662	0,026			656	0,022
1679	0,042			685	0,021
				713	0,018
				729	0,037
				741	0,047
				751	0,025
				757	0,028
				763	0,046
				765	0,047
				768	0,047
				772	0,008
				775	0,021
				819	0,028
				854	0,017
				877	0,038
				915	0,021

				920	0,050
				987	0,017
				990	0,035
				991	0,010
				994	0,025
				1007	0,015
				1010	0,028
				1032	0,047
				1054	0,009
				1067	0,046
				1086	0,017
				1101	0,050
				1127	0,021
				1156	0,046
				1211	0,028
				1221	0,050
				1244	0,021
				1245	0,017
				1269	0,018
				1314	0,025
				1337	0,050
				1346	0,018
				1348	0,050
				1400	0,025
				1404	0,046
				1435	0,046
				1448	0,043
				1484	0,017
				1517	0,007
				1580	0,008
				1626	0,028
				1656	0,043
				1694	0,008
				1710	0,007