



**Universidade de Brasília**

**Faculdade de Medicina**

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

**Micaella Pereira da Fonseca**

**Proteômica abrangente de alta resolução na análise de  
neutrófilos humanos ativados pelo peptídeo *formyl Methyl  
Leucyl Phenylalanine* (fMLP)**

Supervisor: Pr. Dr. Wagner Fontes- Brasil

Co-supervisor: Professor Peter Roepstorff –Dinamarca (*Sandwich*)

**Brasília, 2017.**



**Universidade de Brasília**

**Faculdade de Medicina**

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

**Micaella Pereira da Fonseca**

**Proteômica abrangente de alta resolução na análise de  
neutrófilos humanos ativados pelo peptídeo *formyl Methyl***

***Leucyl Phenilalanine (fMLP)***

Supervisor: Pr. Dr. Wagner Fontes- Brasil

Co-supervisor: Peter Roepstorff –Dinamarca (*Sandwich*)

TESE APRESENTADA AO PROGRAMA DE  
PÓS GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA  
MOLECULAR DA FACULDADE DE  
MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE  
BRASÍLIA PARA A OBTENÇÃO DO TÍTULO  
DE DOUTORA EM PATOLOGIA MOLECULAR  
COM ÊNFASE EM IMUNOLOGIA.

**Brasília, 2017.**

## DEDICATÓRIA

*Dedico esse trabalho à Deus,  
aos meus pais, minha avó e em especial ao  
meu futuro esposo, o grande amor da minha vida.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela oportunidade de ter saúde e poder realizar esta etapa espetacular na minha vida profissional. Agradeço a meu futuro esposo Andreas por estar presente na minha vida nessa reta final (*Thank you so much my love*). Aos meus pais Célia e Vieira por me proporcionarem uma vida cheia de oportunidades, a minha querida avó Cecília que mesmo não sabendo nada de imunologia sempre perguntava como iam meus experimentos no laboratório, e a toda a minha família linda que sempre acreditou em mim. E não posso esquecer das minhas amigas Raissa, Carol, Cris, Kika, Pri e Sté. E agradeço ao meu companheiro fiel de quatro patas Drago pelas longas noites ao meu lado durante minha escrita.

Agradeço a oportunidade de ter convivido e aprendido com pessoas maravilhosas ao longo da minha carreira acadêmica. Meu muito obrigado a Diana, Marininha, Simone, Alininha, Jaques, Alan, Anne, Elaine, Liz, Everton, Jaques, Arthur, Rayner, Garcia, Adriana, Rafael, Sol, Hugo, Jéh, Mandacaru, Agenor, Helder, Fran, Thaís, Trutinha, Nicholas, Wesley, Isabelle, Adriano, Greicy, Edna, Camila, Muhammad, Samina, Carlos Morris,

Agradeço em especial ao meu orientador professor Wagner Fontes pela paciência e amizade durante esses 9 anos de laboratório. O agradecimento se estende a professora Mariana e Consuelo que sempre foram presentes na minha vida acadêmica e pessoal. Ao CA, um dos melhores parceiros de bancada que já conheci, saiba que suas perguntas sobre cada protocolo me fizeram crescer um pouco mais. Ao professores do LBQp Fabi, Sebastian, Luís, Pedro e Marcelo o meu muito obrigado por participarem da minha formação.

Agradeço em especial ao meu orientador do doutorado sanduíche o professor Peter Roepstorff, da Universidade do Sul da Dinamarca (SDU) pela oportunidade de ter vivido uma das experiências mais marcantes na minha vida acadêmica. Agradeço também aos amigos e parceiros de laboratório Livia, Renata e Vladimir que foram essenciais para que meu doutorado sanduíche fosse muito produtivo. Agradeço a Lene e Karin pelo carinho, Vibike que é a mestre dos espectrômetros, ao Arek meu querido amigo de bancada de todas as horas, Pavel, Otilia, Soren, Taewook, Patricia, *In memoriam* ao meu amigo Vasco, ao melhor estatístico do mundo Veit, Lílian, Stefan, Pernille, Simom,

Giuseppe Palmisano, Martin Larsen, Pia Jensen, Sijle, Rebeca, as melhores parceiras de escritório Sanne e Cristina, Anne Louise, Maria, Andrea, Lene, Tina, Jakub, Asif, Wojtek, Camilla, Jonas, Joy Morten, Giorgio, Eva, Komal, Marcella, Thiago.

Agradeço a minha família internacional TJ, Maddy, Krist, Lucina, Ana, Mikk, Jacopolo, Richard, Juan, Edu, Simona, Benny, Davi, Nikolai, Hannah, Matilde, Kamilla, Rasmus, Emil, Hjalti, Caroline, Simon,

Agradeço ao corpo técnico por todo apoio e dedicação ao longo do meu doutorado e especial ao Nuno Manuel, Antônio Rufino, Marisia, Margareth.

Agradeço aos professores que trabalharam em colaboração com este presente trabalho em especial a Aline Martins pelas análises de metabolômica, Ao professor José Raimundo pelas análises de microscopia de varredura, a professora Beatriz Dolabella pelo uso do *tip* sonificador.

Agradeço as agências de fomento CAPES e CNPq pelas bolsas de doutorado e a FAPDF pela ajuda de custo na compra de reagentes. Agradeço ao todo o corpo docente do programa de Patologia molecular da UNB e aos professores do departamento de biologia celular.

## RESUMO

Os neutrófilos são granulócitos polimorfonucleares que utilizam mecanismos intra e extracelulares para eliminar patógenos. A ativação de neutrófilos pela N-formil-Metionil-Leucyl-Phenylalanine (fMLP), uma molécula quimiotática liberada de bactérias Gram-positivas, disparadores de explosão respiratória, modificações morfológicas, degranulação e liberação de NETs. No entanto, a desregulamentação de neutrófilos está envolvida com várias patologias, em parte, devido à exacerbação da descarga de espécies reativas de oxigênio e enzimas citolíticas. Embora haja um número considerável de estudos sobre condições, as questões sobre como essas desregulações permanecem sem resposta; Para os caminhos exatos que são percorridos por esses caminhos intracelulares ainda estão preenchidos com lacunas. Atualmente, a comunidade científica vem usando uma ferramenta de análise conhecida como espectrometria de massa (MS) para desempenhar melhor o papel dos neutrófilos na resposta imune; a realização de estudos relacionados aos neutrófilos de proteômica comparativa são ferramentas essenciais para a compreensão dos mecanismos intracelulares que regem a resposta inflamatória. Usando ferramentas proteômicas de alta resolução, o presente trabalho identificou 8362 proteínas no total, na ativação de neutrófilos por fmp de 100 nmL / L. Em conclusão este trabalho representa a eficiência dos métodos de análise proteômica proporcionaram a identificação de 8362 proteínas, sendo 301 proteínas reguladas diante do estímulo com fMLP. Pois, proteínas importantes para a resposta inflamatória dos neutrófilos foram identificadas, mostrando que a análise comparativa dos mapas proteômicos utilizando diferentes métodos de aquisição e extração proteicas atuaram de forma complementar na robustez da identificação mais abrangente de proteínas de neutrófilos, tanto quiescentes quanto ativadas com fMLP. Ademais, E que existe uma forte conexão entre a família das pequenas GTPases com a maioria dos processo desencadeados pela ativação de vias por fMLP, como por exemplo as evidências de alterações estruturais em MEV. Com as análises conjugadas será possível sugerir pontos de modulação da resposta inflamatória promovidas por agentes ativadores relacionados a receptores ligados a proteína G. A identificação de regulações por subunidades do proteossoma 26S tendo extensa participação nas vias reguladas, o que pode ser um indicativo para um mecanismo de regulação por esse complexo. Outrossim, a proteômica se mostra uma ferramenta essencial para a análise de vias, pois proporciona a identificação de proteínas que estão em pequenas quantidades como citocinas liberadas pela ativação. No mais, os mecanismos de morte celular programada com divergência entre vias de ativação e bloqueio da apoptose, podendo acarretar desregulação pois os dados tentem a sugerir um fino balanço entre as vias de vida e morte. O presente trabalho apresenta um conjunto de proteínas com diversas funções relacionadas aos processos da resposta inflamatória, que incluem a atividade oxidativa, motilidade, metabolismo energético e sinalização intra e intercelular. Este estudo adiciona dados relacionados à ativação de neutrófilos por fMLP, também revelando proteínas que não foram previamente identificadas em neutrófilos, ampliando as possibilidades de modulação da resposta inflamatória. Nosso estudo também contempla o maior número de proteínas nos neutrófilos ativados por fMLP, ampliando assim as possibilidades de sugerir uma modulação da resposta inflamatória em neutrófilos.

## ABSTRACT

Neutrophils are polymorphonuclear granulocytes that use intra- and extracellular mechanisms to eliminate pathogens. Activation of neutrophils by N-formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanine (fMLP), a chemotactic molecule released from gram-positive bacteria, triggers respiratory burst, morphological modifications, degranulation and NETs' release. However, neutrophils' deregulation are involved with several pathologies, in part, due to the exacerbated discharge of reactive oxygen species and cytolytic enzymes; in other words, prolonged lifespan of activated neutrophils and their migration to non-injured tissues may result in severe clinical conditions. Although there are a considerable number of studies on conditions, questions about how such deregulations still remain unanswered; For the exact pathways that are traversed by these intracellular pathways are still filled with gaps. Currently, the scientific community has been using an analysis tool known as mass spectrometry (MS) to better play the role of neutrophils in the immune response; studies related to comparative proteomics neutrophils are essential tools for understanding the intracellular mechanisms governing the inflammatory response. In conclusion, this work represents the efficiency of the methods of proteomic analysis, which allowed the identification of 8362 proteins, 301 of which were regulated proteins before the stimulation with fMLP. Because proteins important for the inflammatory response of neutrophils were identified, showing that the comparative analysis of proteomic maps using different methods of protein acquisition and extraction acted in a complementary way in the robustness of the more comprehensive identification of neutrophil proteins, both quiescent and activated with fMLP . In addition, there is a strong connection between the family of small GTPases with most of the processes triggered by the activation of fMLP pathways, such as the evidence of structural alterations in SEM. With the conjugated analyzes it will be possible to suggest modulation points of the inflammatory response promoted by activating agents related to G protein-linked receptors. The identification of 26S proteasome subunit regimens having extensive participation in the regulated pathways, which may be indicative of a mechanism of regulation by this complex. In addition, the mechanisms of programmed cell death with divergence between activation pathways and apoptosis blockade, may lead to deregulation as the data try to suggest a fine balance between the life and death pathways. The present work presents a set of proteins with diverse functions related to the processes of the inflammatory response, which include oxidative activity, motility, energetic metabolism and intra and intercellular signaling. This study adds data related to the activation of neutrophils by fMLP, also revealing proteins that were not previously identified in neutrophils, increasing the possibilities of modulation of the inflammatory response. Our study also contemplates the largest number of proteins in the neutrophils activated by fMLP, thus increasing the possibilities of suggesting a modulation of the inflammatory response in neutrophils.

## ÍNDICE DO TEXTO

|  | <i>pág.</i> |
|--|-------------|
| 1. INTRODUÇÃO  | 17          |
| 1.1. Resposta imune inata  | 17          |
| 1.2. Neutrófilos   | 18          |
| 1.3. Mediadores da inflamação  | 24          |
| 1.4. Mecanismos efetores na resposta contra agentes estranhos ao organismo | 32          |
| 1.5. E quando os neutrófilos falham: implicações clínicas                  | 38          |
| 1.6. Proteômica  | 40          |
| 1.7. Identificação de proteínas  | 47          |
| 1.8. Métodos de quantificação  | 48          |
| 1.9. Estudos de modificações traducionais                                  | 51          |
| 2. JUSTIFICATIVA   | 56          |
| 3. OBJETIVOS   | 59          |
| 4. MATERIAIS E MÉTODOS   | 61          |
| 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO  | 87          |
| 6. CONCLUSÕES  | 127         |
| 7. ANEXOS  | 129         |
| 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS  | 145         |



## ÍNDICE DE FIGURAS

|   |                                      |
|---|--------------------------------------|
| Figura 1. Descrição gráfica da morfologia de polimorfonucleares neutrófilos.....  | 19                                   |
| Figura 2. Quimiotaxia de neutrófilos..  | 21                                   |
| Figura 3. Estrutura química do fMLP e Receptor FPR em humanos.)   | 28                                   |
| Figura 4. Via de ativação sugerida para estímulos conhecidos por fMLP em neutrófilos humanos. ....  | 31                                   |
| Figura 5. Mecanismos efetores de neutrófilos durante a resposta inflamatória.).....   | 32                                   |
| Figura 6. Composição de grânulos citoplasmáticos em neutrófilos, onde a seta direciona o sentido da desgranulação (Pham, 2006).....         | 34                                   |
| Figura 7. Fluxograma básico em espectrometria de massas <i>bottom up</i> . o. ....  | 42                                   |
| Figura 8. Esquema de processo de ionização por <i>eletronspray</i> acoplado a um espectrômetro..  | 45                                   |
| Figura 9. Esquema de um quadrupolo de condução. ....  | 46                                   |
| Figura 10. Esquema gráfico de estrutura interna de um espectrômetro de massas. ....   | 46                                   |
| Figura 11. Representação gráfica de um analisador Orbitrap. ....  | 47                                   |
| Figura12. Descrição das séries de fragmentação.....   | 49                                   |
| Figura 13. Métodos de quantificação <i>label free</i> ..  | 50                                   |
| Figura 14. Kit comercial iTRAQ para quantificação isobárica.....  | 51                                   |
| Figura 15. Estratégia experimental..  | 58                                   |
| Figura 16. Isolamento celular.....  | 60                                   |
| Figura 17. Frasco de hidrólise..  | 68                                   |
| Figura 18. Quantificação Qubit..  | 69                                   |
| Figura 19. Etapas da digestão em filtro.....  | 70                                   |
| Figura 20. Fluxograma de enriquecimento sequencial.....   | 76                                   |
| Figura 22. Gráfico de citometria de fluxo.....  | <b>Erro! Indicador não definido.</b> |
| Figura 22. Total de identificações de proteínas..   | 93                                   |
| Figura 23. Termos GO de compartimento celular para o conjunto de proteínas totais não modificados em neutrófilos humanos. ....              | 95                                   |
| Figura 24. . Total de proteínas não enriquecidas reguladas. ....  | 97                                   |
| Figura 25. Distribuição espacial de total de proteínas identificadas em neutrófilos quiescentes e ativados..                                | 99                                   |
| Figura 26. Gráfico de distribuição de classes de proteínas para termos Gene Ontology gerados para as proteínas totais não enriquecidas..... | 101                                  |
| Figura 27. Representação esquemática de via intracelulares envolvidas na ativação celular..   | 103                                  |
| Figura 28. Análise de interação proteína-proteínas de proteínas reguladas em vias de estresse para proteínas não enriquecidas..             | 105                                  |
| Figura 29. Gráfico de citometria de fluxo.....  | 107                                  |
| Figura 30. Caracterização da ativação de neutrófilos utilizando NBT.....  | 108                                  |
| Figura 31. Mapa de interações proteicas string para proteínas relacionadas a transdução de sinal..  | 112                                  |
| Figura 31. Imagens convencionais de Microscopia eletrônica de varredura (MEV) adquiridas a partir de neutrófilos humanos. ....              | 115                                  |

|  |     |
|--|-----|
| Figura 33. Interação de proteínas relacionadas a secreção em neutrófilos ativados com fMLP.<br>..... | 117 |
| Figura 34. Vias de ativação em neutrófilos.. ..  | 127 |

## ÍNDICE DE TABELAS

|   |    |
|---|----|
| Tabela 1. Dados coletados durante o preparo de amostra para o experimento <i>label free</i> usando Orbitrap Velos. ....                     | 89 |
| Tabela 2. Dados coletados durante o preparo de amostra para o experimento <i>label free</i> usando Orbitrap Q Exactive. ....                | 90 |
| Tabela 3. Dados coletados durante o preparo de amostra para o experimento <i>label free</i> usando Orbitrap Elite. ....                     | 90 |
| Tabela 4. Dados coletados durante o preparo de amostra para o experimento iTRAQ total e modificações usando Orbitrap Q Exactive. ....       | 91 |
| Tabela 5. Dados coletados durante o preparo de amostra para o experimento análise de secretoma usando Orbitrap Fusion Lumos. ....           | 91 |
| Tabela 6. Dados coletados durante o preparo de amostra para o experimento análise de PRM <i>label free</i> usando Orbitrap Q Exactive. .... | 92 |

## **SIGLAS E ABREVIACOES**

*AAA: Amino Acid Analysis (análise de aminoácidos)*

*ACN: Acetonitrila*

*ANOVA: Análise de variância*

*ATP: Adenosine triphosphate*

*Bcl-2: B cell lymphocytic leukemia proto-oncogene-2*

*C-18: Resina de fase reversa*

*Ca<sup>2+</sup>: ion de cálcio*

*CaCo: Cacosilato*

*CAM-1: Moléculas de adesão celular*

*CD11b/CD18: integrina*

*CD15: carboidrato de adesão*

*CD-16 Receptor Fc de baixa afinidade, liga-se  porção Fc do Ac IgG*

*CD-62L Selectina leucocitria ou L-selectina*

*CD62P: P-selectina*

*CD-64 : Proteína integral de membrana*

*CDC: cell division control protein (proteína de controle da divisão celular)*

*CellQuest: Programa utilizado na citometria de fluxo*

*CFS-GM: colony forming unit granulocyte macrophage*

*CID: Collision Induced Dissociation (energia de colisão de baixo impacto)*

*CXC: Cystene- (other aminoacid) - cystene*

*CXC: Ligao cisteína - X - cisteína*

*DAG: Diacylglicerol*

*DDA: data dependente acquisition*

*DG: Diacylglycerol*

*DGC: Chronic Granulomatous Disease*

*DHR: Dihidrorhodamina*

*DNA: Deoxiribonucleic acid*

*DPOC: Doença Pulmonar Obstrutiva Crnica*

*DTT: Dithiothreitol*

*EDTA: Ethylenediamine Tetra Acetic Acid*

*ERK: Extracellular Signal Regulated Protein Kinase*  
*ESI: Electrospray*  
*EthAc: Ethyl Acetate*  
*FACs: Citometria-separação de células por fluorescência*  
*FDR: false Discovery rate*  
*FITC: Isotiocianato de fluoresceína*  
*fMLP: formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine*  
*FPR: Formylated Peptide Receptor*  
*FSC: forward Scatter Cell*  
*FT: do inglês, Flow Through*  
*FTMS:Fourrier transform mass spectrometer*  
*FWHM:Full width half medium*  
*GDP: Guanosina difosfato*  
*GEF: guanine nucleotide exchange factor;*  
*GM-CSF :Fator estimulador de colônia de granulócitos e monócitos*  
*GO: Gene Ontology*  
*GPcR: G protein acoupled receptor*  
*GTP: Guanosina trifosfato*  
*H2O2: peróxido de hidrogênio*  
*HATs: Histonas acetiltransferases*  
*HBSS: Hank´s Balanced Salt Solution*  
*HBSS: Hank's Buffered Salt Solution*  
*HCD:high collision energy*  
*HCl: ácido clorídrico*  
*HDACs: Histonas desacetilases*  
*HILIC: Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography*  
*HPLC: High Performance Liquid Chromatography*  
*IAA: Iodoacetamida*  
*ICAM-1: Intercellular adhesion molecule 1*  
*IEF: Isoelectric Focusing*  
*IL- 16: Interleucina 16*  
*IL-117R: Interleucina 17 receptor*

*IL-12: Interleukim 12*  
*IL-1a: Interleucina 1a*  
*IL-1b: Interleukim 1β*  
*IL-8: Interleucina 8*  
*IMAC: Immobilized Metal Affinity*  
*IP3: Inositol 3 phosphate*  
*IP3K: inositol 3 phosphate kinase*  
*ITAM: Immunoreceptor Tyrosine Based activation motifs*  
*iTRAq: Isobaric Tag for Relative and Absolute Quantification*  
*LC-MS/MS: Liquid chromatography-MS/MS*  
*LFA-1: Lymphocyte Function Associated Antigen - 1*  
*LFA-1: Lymphocyte Function Associated Antigen - 1*  
*LTB4: Leukotriene B4*  
*LTQ: Linear Trap Quadrupole ou Linear ion trap*  
*m/z: massa sobre carga*  
*MALDI-TOF: Matrix Assisted Laser Desorption Timeof Flight*  
*MAPK: Mitogen Activated Protein Kinase*  
*Mcl-1: myeloid cell leukemia-1*  
*MCP-1: Monocyte chemotactic protein-1*  
*MEK: Mitogen activated protein kinase*  
*MEK1\2: Mitogen activated Protein kinase 1\2*  
*MEKK: mitogen-activated protein kinase kinase;*  
*MEV: Microscopia Eletrônica de Varredura*  
*MKK4: Mitogen Activate Protein Kinase Kinase - 4*  
*MKK6: Mitogen Activate Protein Kinase Kinase - 6*  
*MMP: Matrix metalloproteínase*  
*MOF: multiple organs failure*  
*MPO: mieloperoxidase*  
*NaCl: Cloreto de sódio*  
*NADPH: Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate Oxidase*  
*NBT: Nitroblue Tetrazolium*  
*NCBI: National Center for Biotechnology*

*NET: Neutrophil Extracellular Traps*  
*NGAL: neutrophil gelatinase associated lipocalin*  
*NGAL: neutrophil gelatinase associated lipocalin*  
*O<sub>2</sub><sup>-</sup>: ânion superóxido*  
*PI: Phosphatidylinositol*  
*PI3K: phosphatidylinositol 3 kinase*  
*PIP2: phosphatidylinositol 4,5 biphosphate*  
*PIP3: Fosfatidilinositol 3,4,5 triphosphate*  
*PKC: Proteína cinase C*  
*PLA: Fosfolipase A*  
*PLC: Fosfolipase C*  
*PLCb: Fosfolipase C<sub>β</sub>*  
*PMA: Phorbol Myristate Acetate*  
*PMF (MS): Peptide Mass Fingerprints*  
*PMN: Polimorfonucleares*  
*ppm: part per million*  
*PRM: Parallel reaction monitoring*  
*PTM: Posttranslational modification*  
*RAC: pertence a família das GTPases.*  
*RAP: do inglês, Receptor Associated Protein*  
*RE: Retículo endoplasmático*  
*ROS: Reactive Oxygen Species*  
*RP: reverse phase*  
*SARA: Síndrome da Angústia Respiratória Respiratória Aguda*  
*SDC: sodium deoxy cholate*  
*SDS: sodium dodecyl sulfate*  
*SDU: University of Southern Denmark*  
*MEV: microscopia eletrônica de varredura*  
*SIMAC: Sequential IMAC*  
*SIRS: Síndrome da Angustia Respiratória Sistêmica*  
*SIRS: Systemic Inflammatory Response Syndrome*  
*SOCE/ROCE: calcium channels*

*STAT: Signal Transducers and Activators of Transcription*

*TEAB: Tetraethylammonium bromide*

*TFA: Trifluoroacetic acid*

*TGF- $\beta$ : Transforming growth factor beta*

*TiO<sub>2</sub>: Dióxido de titânio*

*TLR: Receptor Toll-like*

*TMT: Tandem mass tags*

*TNF- $\alpha$ : Tumor Necrosis Factor  $\alpha$*

*UI/mL: unidades por mililitro*



# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Resposta imune Inata

A imunidade inata é definida como a primeira linha de defesa do corpo contra patógenos, sendo caracterizada como uma resposta imediata, máxima e não específica. Ademais, esse tipo de resposta não resulta em memória imunológica, visto que os mecanismos de proteção utilizados são principalmente a autofagia e a secreção (Lawrence, Willoughby et al. 2002).

O sistema imune inato é composto por quatro barreiras – anatômica, fisiológica, fagocítica e inflamatória – sendo que cada uma possui um papel essencial na proteção contra invasores. Na barreira anatômica, o tecido epitelial atua blindando o acesso de microrganismos, podendo ser auxiliado pela presença de cílios que agem como filtro e de muco produzido pelas mucosas. Já na fisiológica, os agentes são, por exemplo, proteínas secretadas pelas mucosas, auxiliados pelo baixo pH que promove a acidez estomacal (Goldsby 2002) .

A barreira fagocítica, por outro lado, conta com a diferenciação de monócitos em macrófagos tissulares para a eliminação de restos celulares e apresentação de antígenos. Além disso, essa barreira é composta por células dendríticas, responsáveis pela apresentação de antígenos e por promover a modulação do sistema imune adaptativo (Clark, Angel et al. 2000). Essa barreira também é composta por neutrófilos que fagocitam corpos estranhos e liberam espécies reativas de oxigênio (ROS) com ação microbicida (Kuijpers, van den Berg et al. 2001).

O sistema imune inato ainda é assistido por uma barreira inflamatória que, na presença de danos tissulares, ativa o recrutamento de fagócitos pelo extravasamento de fluido vascular sérico dos tecidos para regiões intercelulares. Esse recrutamento induz a liberação de citocinas, que são proteínas sinalizadoras da inflamação (Quinn and Gauss 2004).

O recrutamento de células do sistema imune pelas citocinas induz uma sequência de eventos conhecida como resposta inflamatória. Esse processo é modulado principalmente pela participação dos neutrófilos, que migram para a região de dano tecidual e realizam a liberação de proteínas com atividade microbicida, espécies reativas de oxigênio e proteases (Gabrilovich 2005) a fim de mitigar os danos causados pela agressão inicial.

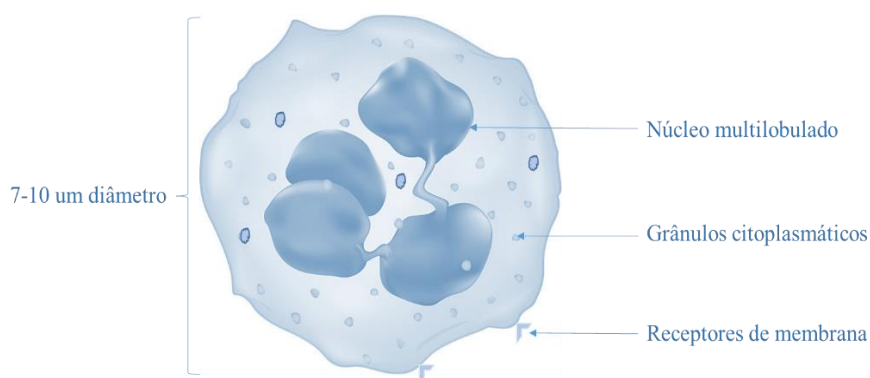
A inflamação pode ser definida como o mecanismo pelo qual o corpo responde danos e/ou invasores, sendo descrita pela primeira vez há mais de 2000 anos. O processo inflamatório é caracterizado por cinco sinais cardinais: edema, eritema, calor local, dor e perda de função (Mittal, Siddiqui et al. 2014).

## **1.2. Neutrófilos**

Neutrófilos são leucócitos produzidos na medula óssea a partir da sinalização de mediadores liberados por células dentríticas, como o fator estimulador de colônia de granulócitos (G-CSF) e fator estimulador de colônias de granulócitos-macrófagos (GM-CSF) (Nauseef and Borregaard 2014). O processo de produção dessas células tem início a partir da diferenciação de células pluripotentes, que dão origem a formas de neutrófilos imaturos, os mielócitos. Essas células, por sua vez, passam por diversos estágios de

modificação morfológica e, após a maturação, podem ser liberados na circulação (Cornish, Campbell et al. 2009).

As células maduras liberadas na corrente sanguínea apresentam como características morfológicas: diâmetro de 7-10  $\mu\text{m}$ , núcleo multilobulado, e diferentes grânulos citoplasmáticos. Devido a esses atributos, elas são classificadas como granulócitos polimorfonucleares (PMNs)(Kolaczkowska and Kubes 2013). Ademais, essas características são denominadas basais, devido as intensas modificações sofridas por essas células diante da sua ativação por agentes externos.



**Figura 1. Descrição gráfica da morfologia de polimorfonucleares neutrófilos.** A gravura representa de forma tridimensional a morfologia celular de uma célula quiescente.

PMNs representam a subpopulação de leucócitos mais abundante do sangue periférico (50-70% do total), possuindo um tempo de vida médio de 8 horas na circulação. Após esse período, mecanismos de morte programada são ativados, sendo os resíduos reabsorvidos pelo baço. Conquanto, se ativados, os neutrófilos inibem essas vias de morte programada, podendo ter uma sobrevivência de até 5 dias nos tecidos inflamados (Kolaczkowska and Kubes 2013).

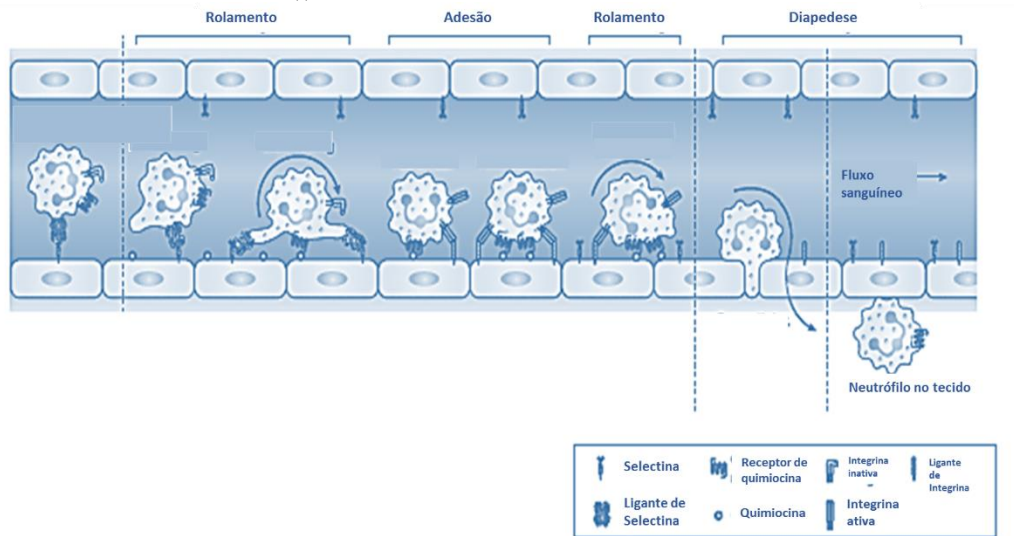
Devido à sua morfologia diferenciada, presença de múltiplos grânulos citoplasmáticos (Rorvig, Ostergaard et al. 2013) e plasticidade estrutural (Lee, Patel et al. 2011), essas células conseguem responder de forma rápida e eficiente à ativação. Tais características conferem ao neutrófilo a função de célula efetora essencial na resposta inflamatória (Mittal, Siddiqui et al. 2014)

### **Mobilização de neutrófilos na resposta inflamatória**

O recrutamento e mobilização de neutrófilos na resposta inflamatória é iniciado com a quimiotaxia. Esse é o evento no qual as células se mobilizam para as regiões de dano e promovem uma sequência de ações até a resolução da inflamação. O processo de migração celular é dividido em quatro etapas distintas: rolamento, ativação, adesão e extravasamento.

A primeira etapa dessa mobilização celular é denominada rolamento, e ocorre de forma rápida. Durante o desencadeamento do processo inflamatório, os neutrófilos migram para a região marginal dos vasos na microcirculação, e o contato com os receptores de membrana endotelial desencadeia o disparo de diversas vias intracelulares (figura 2) (Tang, Wang et al. 2014; Wright, Moots et al. 2014).

**Figura 2. Quimiotaxia de neutrófilos.** Descrição de todo o processo desde o Rolamento, arraste, firme adesão até o processo de migração para os tecidos adjacentes. A figura descreve a importância das proteínas de membrana de ambos neutrófilo e parede do vaso no processo de migração. (modificado de (Kolaczowska and Kubes 2013)).



Inicialmente, a interação dos leucócitos com o endotélio ativado dispara uma ativação celular basal, induzindo a formação de uma ligação fraca. Essa interação é facilmente revertida, sendo denominada ligação de velcro ou adesiva.

Ademais, essa adesão é promovida por selectinas, que são uma família de glicoproteínas presentes constitutivamente na membrana de forma inativa. As selectinas podem ser do tipo P (CD62P) e E (CD62E) – presentes no endotélio ativado –, ou do tipo L (CD62L) – encontrada apenas em neutrófilos (Gabrilovich 2005; Nauseef and Borregaard 2014). Além disso, elas possuem domínios de lectina que proporcionam sua ligação a carboidratos sialilados.

A fragilidade desse tipo de ligação juntamente com a força de arraste do fluxo sanguíneo pode levar ao rompimento das interações entre os leucócitos e o endotélio, acrescida da atividade proteolítica por metaloproteases que em neutrófilos ativados são

responsáveis pelas mudanças conformacionais de glicoproteínas como o CD62L (Zhao, Shey et al. 2001). Caso isso ocorra, a célula é arrastada sobre o tecido ativado, fazendo com que o neutrófilo role sobre a superfície endotelial (Gabrilovich 2005). Esse processo é estabilizado por regiões de extensão de membrana chamadas de uropódios (Nauseef and Borregaard 2014); tal estabilidade promove a ativação de vias de migração celular.

### **Ativação**

O rolamento pela parede do endotélio vascular ativo proporciona aos neutrófilos o contato com moléculas de sinalização, promovendo sua ativação. Essas moléculas podem ser citocinas ou quimiocinas como interleucina-8 (IL-8) e proteína inflamatória do macrófago (MIP-1 $\beta$ ), as quais atuam como quimiotraentes celulares (Gabrilovich 2005).

Ao serem ativados, esses leucócitos polimorfonucleares mobilizam vias de modificações morfológicas e funcionais, como a via das proteínas-quinase ativadas por mitógenos (MAPK) (Reglero-Real, Marcos-Ramiro et al. 2012). Esse remodelamento acontece por mudanças no citoesqueleto, o qual é composto basicamente por proteínas da família das tubulinas (TBA1B, TBA4A, TBA1A) que, por sua vez, estão associadas à actina e filamentos intermediários (Verhey and Gaertig 2007). Filamentos podem ser do tipo intermediário como a vimentina (VIME) que estão diretamente relacionados aos processos de despolimerização da actina (Moisan and Girard 2006). O movimento sincronizado de reorganização desses filamentos é orquestrado por pequenas GTPases ativadas (Rhoa, Rac e CDC42) (Weninger, Biro et al. 2014) que participam na reorganização da actina e promovem a modificação da estrutura interna da célula.

A reestruturação da arquitetura de sustentação favorece a mobilização celular, transporte e fusão de grânulos à membrana plasmática; os grânulos contêm novos receptores que foram produzidos mediante a ativação. A expressão desses novos receptores do tipo integrinas na membrana proporcionará aos neutrófilos uma adesão firme (Jethwaney, Islam et al. 2007; Amulic, Cazalet et al. 2012; Niyonsaba, Madera et al. 2013; Schmidt, Moser et al. 2013).

### **Adesão celular**

As integrinas são moléculas de adesão necessárias ao processo de migração celular. Elas constituem uma família de proteínas heterodiméricas que possuem uma cadeia  $\alpha$  e uma cadeia  $\beta$ , entretanto são classificadas de acordo apenas com sua cadeia  $\beta$ . A estrutura das integrinas ativas do tipo  $\beta$ -integrinas em leucócitos (LFA-1 e Mac-1 ) favorece a ligação dos mesmos as imunoglobulinas do endotélio ativado (Jethwaney, Islam et al. 2007) – a superfamília das imunoglobulinas é representada por proteínas de adesão intercelular (ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3 e VCAM), que são expressas em células endoteliais vasculares (Goldsby 2002; Jannat, Robbins et al. 2010).

### **Extravasamento celular/ Diapedese**

A firme adesão gerada pela interação de integrinas tende a estabilizar as ligações entre a superfície de membrana do endotélio e os neutrófilos, facilitando a sua migração para o tecido; esse movimento de migração celular através do endotélio é chamado diapedese.

O processo de migração é assistido por pequenas GTPase do tipo Rho. Essa enzima se liga a proteína miosina e a ativa, suscitando um comportamento do tipo motor

de protrusão celular; ou seja, essas interações fazem a célula se projetar para frente. A velocidade média das migrações é de 10um por min, com picos de até 30um (Weninger, Biro et al. 2014).

A sequência de eventos apresentados acima, proporciona a mobilização dos neutrófilos para o ambiente extravascular. Isso faz com que os leucócitos vençam a barreira endotelial e se instalem no sítio de injúria, dando início a sofisticados mecanismos intra e extracelulares dando continuidade ao processo inflamatório de três principais formas: desgranulação (três tipos de grânulos: azurofílicos, específicos e de gelatinase), liberação de armadilhas extracelulares (NETs compostas de DNA, histonas e enzimas) e fagocitose (Kolaczkowska and Kubes 2013). Abaixo se encontra uma ilustração desses três processos:

### **1.3. Mediadores da inflamação**

Durante a inflamação, as células do sistema imune liberam uma variedade de mediadores inflamatórios. Esses mediadores servem para direcionar os mecanismos efetores de células como os neutrófilos na resposta imune inata. Tais mediadores podem ser: quimiocinas ou citocinas e moléculas pró-inflamatórias.

As quimiocinas são uma família de pequenos polipeptídios que possuem entre 90 e 130 aminoácidos, e tropismo por receptores em forma de serpentininas intermembranares (Gabrilovich 2005). Essa família de proteínas apresenta quatro resíduos de cisteínas conservadas que podem ser separados em duas subfamílias; sendo, essa divisão baseada na posição de dois dos quatro resíduos invariáveis de cisteínas: C-C e C-X-C. Enquanto



esta apresenta as cisteínas intercaladas por algum outro aminoácido, aquela é caracterizada pelo posicionamento das cisteínas lado a lado.

Citocinas, por outro lado, são representadas por uma variedade de moléculas pró-inflamatórias produzidas por células do tecido sanguíneo, e que agem como reguladoras da resposta imune. Representantes dessa família são classificados muitas vezes como moléculas de ação peliotrópica; ou seja, podem ser consideradas pró- e/ou anti-inflamatórias, atuando diretamente na regulação da atividade das PMNs.

A classe de citocinas pró-inflamatórias é composta por interleucinas (IL-1, IL-6, IL-12), interferon  $\gamma$  e  $\alpha$ , e fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), que podem apresentar atividade redundante, pois regulam também a atividade das células pelas quais foram liberadas, contribuindo para a potencialização da resposta inflamatória.

Entretanto, existe uma classe de moléculas pró-inflamatórias que apresenta resposta imediata de neutrófilos. Essas moléculas podem ser da classe de peptídeos formilados, que são oriundas de micro-organismos, se ligam a receptores de membrana nos neutrófilos e ativam a resposta de uma maquinaria bioquímica complexa, que resulta na amplificação do sinal inicial.

Entre essas moléculas, podemos citar o peptídeo bacteriano N-formil-metionil-leucil-fenilalanina (fMLP), que se liga aos receptores de membrana para peptídeos formilados (FPRs) na célula (Benna, Dang et al. 1997; Ferretti, Nalli et al. 2001; Cicchetti, Allen et al. 2002; Selvatici, Falzarano et al. 2006; Liao, Chen et al. 2011; Cai, Tang et al. 2013). Nesse caso, a ligação promove a ativação completa dos mecanismos efetores em neutrófilos.

### **Atiavador formil-Metionil-Leucil-Fenilalanina (fMLP)**

O fMLP é um tripeptídeo n-formilado (nomenclatura IUPAC N- formyl-L-Methionyl-L- Leucil-L-Phenylalanine), encontrado em sobrenadantes de culturas de bactérias gram-positivas (revisado por (Le, Murphy et al. 2002). A descrição biológica da IUPAC condensada é: ( HCO-Met-Leu-Phe-OH), também denominado fMLF, uma vez que o código internacional de uma letra para fenilalanina é F, apesar de sua inicial em inglês ser P.

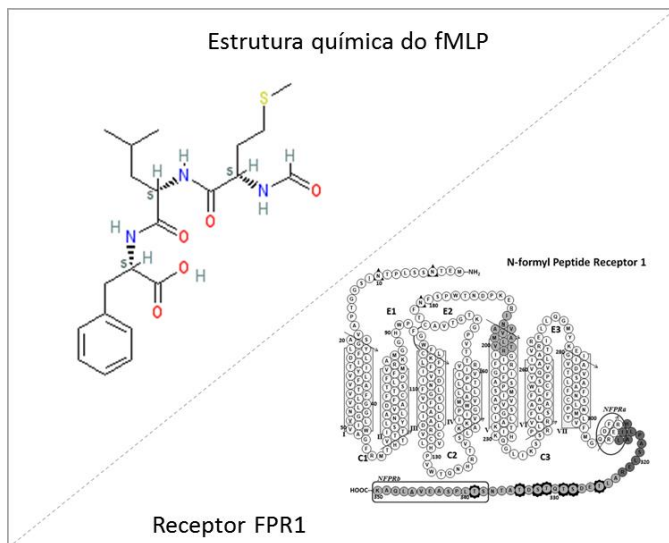
Em estudos feitos com neutrófilos, foi observado que a estimulação feita em concentrações nanomolares de fMLP causa a ativação e dessensibilização dos outros receptores de membrana (Dorward, Lucas et al. 2015). A ativação produz uma descarga rápida e quase completa de vesículas secretórias dessas células (Selvatici, Falzarano et al. 2006). Os componentes dessas vesículas secretórias potencializam a firme adesão aos receptores de membrana endoteliais – expondo a integrina  $\beta 2$  (Mac-1) – e, conseqüentemente, contribuem para a migração e movimentação celular até o sítio da injúria (Fauschou and Borregaard 2003).

Os mecanismos de resposta em neutrófilos a estímulos pró-inflamatórios geralmente são desencadeados pela interação entre o estimulador e os receptores de membrana, os quais funcionam como mensageiros. O sinal é levado para o ambiente intracelular por proteínas que estão acopladas a esses receptores, sendo a sinalização amplificada por mensageiros secundários e cascatas de sinalização até chegar ao nível de resposta funcional.

Receptores para peptídios formilados (Figura 3) são encontrados na superfície da membrana dos neutrófilos. Quando interagem com agonistas como peptídios formilados

tais como o fMLP, eles desencadeiam a mobilização imediata dos estoques de cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) pela ativação de fosfolipases como PLC, que atua na formação de IP3 e DAG a partir de PIP2. IP3 o produto dessa ativação se liga ao seu receptor na membrana do retículo endoplasmático culminando na mobilização dos estoques de cálcio (Cai, Tang et al. 2013). Ademais, essa interação proporciona a ativação do complexo NADPH-oxidase, culminando na produção de ROS.

Esses receptores, do tipo FPR pertencem à superfamília dos receptores acoplados à proteína G (GPCRs), os quais possuem 7 alças transmembranares (Ye, Boulay et al. 2009). Dentro da família dos receptores FPR, existem três representantes homólogos: FPR1, FPR2 e FPR3. Destes, apenas FPR1 e FPR2 são expressos em neutrófilos humanos. Esses receptores estão agrupados no cromossomo 19q13.3 (Le, Oppenheim et al. 2001), e devido à similaridade de sequência entre FPR1 e FPR2 ambos exibem uma resposta de igual magnitude na sinalização intracelular (Forsman, Andreasson et al. 2012). Receptores FPR1 são altamente expressos em glioma maligno. A estrutura dessa família de receptores é apresentada na figura 3 com a caracterização gráfica da estrutura tridimensional e composição química do ligante.



**Figura 3. Estrutura química do fMLP e Receptor FPR em humanos.** O fMLP é o antagonista do receptor FPR1 em neutrófilos. A figura ao lado representa as estruturas químicas de ambos. À esquerda temos o fMLP, um tripeptídeo formilado. À direita o receptor FPR1 que está presente em neutrófilos humanos. (adaptação de figura de Maaty, 2013)

### Ativação de neutrófilos por fMLP

A ativação de neutrófilos ocorre pela interação entre o peptídeo formilado a seu específico receptor na célula, os receptores conhecidos com FPR. No momento da ligação entre o peptídeo formilado e o receptor ocorre uma sinalização imediata para as proteínas G, que se encontra acoplada ao receptor FPR. Sendo a proteína G um complexo heterotrimérico composta pelas subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ . A subunidade  $G\alpha$  liga-se ao GTP ou GDP e as subunidades  $\beta$  e  $\gamma$  ficam ligadas, denominadas  $G\beta\gamma$ . No momento em que ocorre a estimulação do receptor pelo peptídeo formilado, ocorre a substituição de GDP por GTP e a dissociação do complexo em subunidades,  $G\alpha GTP$  e  $G\beta\gamma$  (Ferretti, Nalli et al. 2001; Zen and Liu 2008). Como a proteína G está acoplada à porção intracelular dos

receptores FPR, G $\alpha$ GTP e G $\beta\gamma$ , as subunidades do complexo, ao serem liberadas, atuam como mensageiros na cascata de sinalização dentro dos neutrófilos.

A subunidade G $\alpha$ GTP liberada inibe adenilato ciclase, reduzindo os níveis de AMPc, fenômeno cujas consequências ainda são pouco conhecidas em neutrófilos (Futosi, 2013). Ademais, a G $\alpha$ GTP ativa uma isoforma de fosfolipase C (PLC $\beta$ 1) responsável pela clivagem do fosfolípido de membrana fosfatidilinositol (4,5)-bifosfato (PIP2) em inositol trifosfato (IP3) e diacilglicerol (DAG) (Sato, 2012).

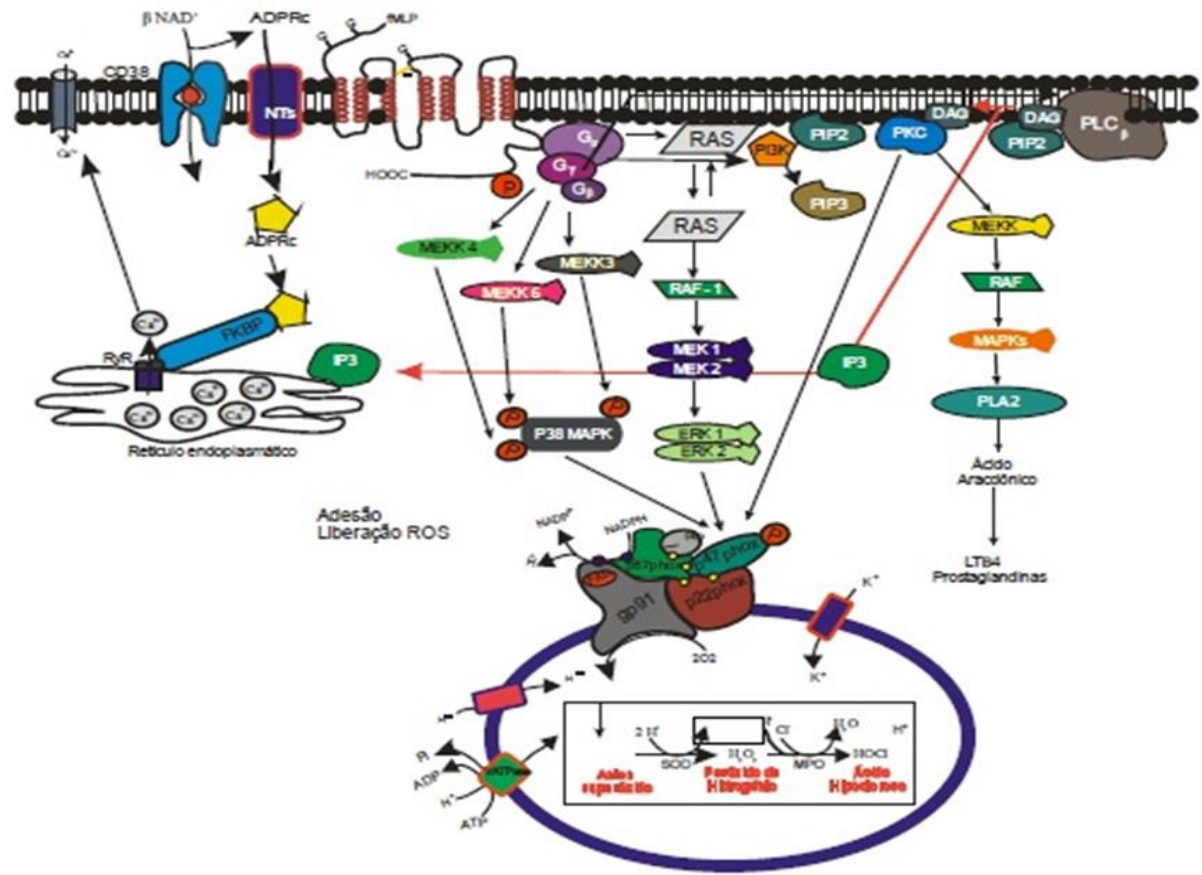
Os IP3, um dos produtos gerados pela hidrólise de PIP2, é translocado para a membrana do retículo endoplasmático (RE). O acoplamento de IP3 à membrana induz a mobilização de Ca<sup>2+</sup> intracelular, o qual é responsável pela regulação de diversos processos celulares (Cicchetti, Allen et al. 2002). Segundo Cai e colaboradores, quando ocorre o esgotamento desses estoques do RE após a mobilização, outra via é ativada desencadeando a entrada de cálcio extracelular por canais específicos na membrana (Cai, Tang et al. 2013).

O DAG, o outro produto da hidrólise de PIP2, juntamente com o cálcio intracelular, ao ser liberado, ativam a proteína cinase C (PKC) (Selvatici, Falzarano et al. 2006)). Então, a enzima PKC ativa amplifica a sinalização intracelular pela ativação da via central das MAP-cinases por via da ativação de MEKK. O produto da ativação dessa via é a produção de leucotrienos B4 (LTB4) e prostaglandinas (Le, Murphy et al. 2002).

Outrossim, PKC ainda incita a ativação das pequenas GTPases como Ras e Rac, participando ativamente na produção de cAMP, o qual é descrito na literatura como segundo mensageiro intracelular essencial na amplificação de sinal (Ferretti, Nalli et al. 2001). Entretanto, existem pontos na sinalização do cálcio que ainda estão pouco

esclarecidos; pois, segundo Cai e colaboradores (Cai, Tang et al. 2013) há duas rotas de influxo de  $Ca^{2+}$  (por SOCE e ROCE) e não somente uma como era conhecido, dificultando ainda mais a compreensão das vias envolvidas neste processo de ativação por fMLP.

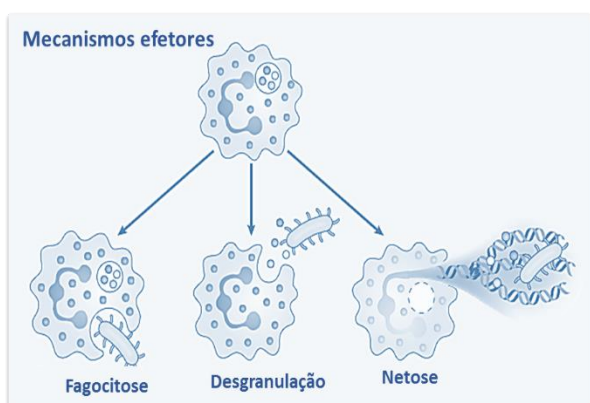
Na figura 4 a seguir temos o resumo das respostas da ativação por fMLP em neutrófilos. Também contempla as consequências relativas à ativação de neutrófilos via FPR também estão associados à subunidade  $G\beta\gamma$ , que é reconhecida por desencadear diversas vias de modificação morfológica e pela produção de espécies reativas de oxigênio quando, MEK 1 ativa ERK1/2 tornando-a fosforilada (Roux and Blenis 2004), eles se ligam ao componente do complexo NADPH oxidase p47phox, dando início à montagem desse complexo. Outros componentes do conjunto NADPH oxidase, como a p67phox, também são fosforilados e se unem ao complexo. Assim, a junção tanto de componentes de membrana quanto dos citossólicos ativos promovem a liberação de ROS (Dewas, Fay et al. 2000). Ademais, a ativação por fMLP aumenta os níveis de Arf 6, e PIP5K1A, que atua na produção de PIP2 a partir da estimulação de PIP5K. Uma vez que PI3K foi ativada por  $G\beta\gamma$ , na produção de PIP3. PIP3 atua na ativação de pequenas GTPases e na ativação de RhoA. As proteínas Arf6, RhoA e PKC atuam na ativação de PLD que é importante na regulação de estresse oxidativo e quimiotaxia em neutrófilos (Chang, Huang et al. 2011).



**Figura 4. Via de ativação sugerida para estímulos conhecidos por fMLP em neutrófilos humanos.** Vias propostas por Neves e colaboradores baseadas na literatura. As vias demonstradas pela figura descrevem a sinalização partindo da conexão de fMLP nos receptores de FPR. Então, temos a demonstração das vias que são ativadas diante do estímulo. As proteínas ligadas a proteínas G como RAS e PIP2 são responsáveis pela dispersão do sinal na região intracelular.

## 1.4. Mecanismos efetores na resposta contra agentes estranhos ao organismo

A linha de defesa liderada por neutrófilos possui mecanismos efetores de ação rápida e eficaz, ocorrendo frequentemente de forma sequencial. Esses eventos tendem a somar seus efeitos ao longo da resposta inflamatória. A atividade efetora tem início com o engolfamento de partículas estranhas ou micro-organismos, passa pela liberação de grânulos intracelulares e ainda conta com um mecanismo do tipo armadilha extracelular do tipo rede. Abaixo é apresentado um esquema dos mecanismos efetores e a seguir um detalhamento melhor cada mecanismo.



**Figura 5. Mecanismos efetores de neutrófilos durante a resposta inflamatória.** A ativação de neutrófilos desencadeia a ativação de vias que culminam em respostas efetoras. Essas respostas podem ser de três principais tipos: Fagocitose, desgranulação e liberação de armadilhas extracelulares do tipo NETs. (adaptado de Kolaczowska 2013).

### Fagocitose

A atividade efetora pode ter início com o englobamento de patógenos ou debrís teciduais – também denominado de fagocitose – é assistido pela extensão de pseudópodos membranares que auxiliam na internalização e formação de fagossomos. Esses pseudópodos, são a peça chave do processo de fagocitose pois, promovem a alteração da

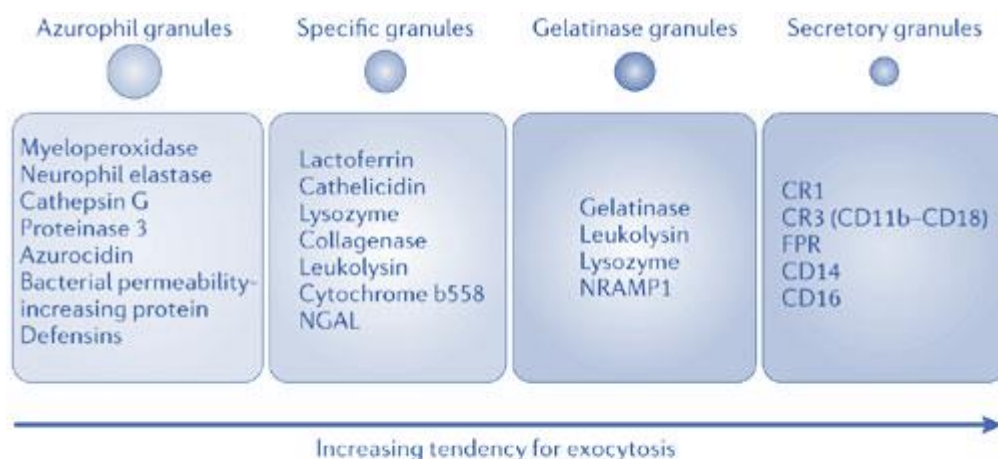


dinâmica da actina e filamentos intermediários (Cicchetti, Allen et al. 2002), além de dar assistência à liberação de grânulos.

### **Desgranulação**

Os grânulos citoplasmáticos dos neutrófilos são reservatórios de proteínas auxiliares usados na eliminação de patógenos, trabalhos em proteômica como os dos autores Rorvig demonstram a identificação desses grânulos em neutrófilos (Rorvig, 2013). Esses grânulos são produzidos na etapa final de maturação dos neutrófilos na medula óssea (Mocsai 2013; Rorvig, Ostergaard et al. 2013), sendo compartimentalizados segundo as características funcionais das proteínas. Posto isso, eles podem ser classificados como: azurofílicos, secundários, gelatinases e vesículas secretórias.

Os grânulos azurofílicos possuem em seu lúmen proteínas como mieloperoxidase (MPO), elastase neutrofílica (NE), azurodicina, catepsina G,  $\alpha$  defensinas, e CD63. Grânulos secundários, por outro lado, são compostos por NGAL, lactoferrina, pentatraxina 3, haptoglobina, e receptores do tipo FPR1 e FPR2. Já os grânulos de gelatinase são conhecidos por apresentarem em sua composição as gelatinases MMP-9 e lisozima, enquanto que nas vesículas secretórias são encontrados receptores para peptídeos formilados FPR, HSA, VNN2, e catepsinas (Rorvig, Ostergaard et al. 2013). A figura abaixo apresenta a composição de cada classe de grânulos:



**Figura 6. Composição de grânulos citoplasmáticos em neutrófilos, onde a seta direciona o sentido da desgranulação (Pham, 2006).** A composição de granulos é descrita acima, e a ordem de desgranulação vai da esquerda para direita seguindo sempre essa direção. Desta forma a desgranulação é chamada de evento sequencial.

O processo de liberação de grânulos ocorre com a ativação de vias que promovem a sua migração até a membrana plasmática (Selvatici, Falzarano et al. 2006). Proteínas sinalizadoras do tipo fosfolipases atuam na regulação da dinâmica da actina pela ativação de pequenas GTPases, proporcionando a integração desses grânulos à membrana. A fusão ocorre pela movimentação desses grânulos através da via integrada que regula as proteínas estruturais e filamentos intermediários de forma a mover esses grânulos até a região de membrana (Cicchetti, Allen et al. 2002). Alguns desses grânulos fundem-se a endossomos, liberando proteases que auxiliarão na eliminação de partículas fagocitadas pelos neutrófilos na resposta inflamatória (Selvatici, Falzarano et al. 2006).

### **Armadilhas extracelulares - NETs**

Durante a resposta inflamatória, neutrófilos também podem utilizar a estratégia de imobilização de patógenos através da liberação de armadilhas extracelulares. Essas armadilhas são compostas principalmente por material genético (DNA), histonas, elastase e catepsina G. Esse material funciona como uma armadilha extracelular para aprisionamento de microorganismos (Kolaczkowska and Kubes 2013), que pode ou não resultar na morte celular do neutrófilo.

O processo de formação de NETs ocorre da seguinte forma: a produção de NET requer que os neutrófilos estejam maduros. Inicialmente o neutrófilo ativado perde a estrutura do envelope nuclear, expondo assim a cromatina ao material do citosol. Assim, ocorre a fusão da cromatina com o conteúdo dos grânulos. Uma vez que os grânulos são compostos por proteases como MPO e Elastase neutrofílica (NE), as mesmas agem na clivagem da histonas promovendo a descondensação da cromatina. Então é formado um complexo proteínas-DNA com o auxílio de PAD4, que são lançadas para o ambiente extracelular, (Cheng, 2013 (Cheng and Palaniyar 2013; Branzk, Lubojemska et al. 2014). Porém a formação das NET é dependente do tipo de estímulo empregado.

### **Estresse oxidativo e moléculas microbidas**

Além de utilizar estratégias como as NETs para combater ameaças externas, os neutrófilos também liberam moléculas microbidas tais como ROS e peptídios antimicrobianos. Esses leucócitos são potentes produtores dessas moléculas citotóxicas, que podem ser tanto dependentes quanto independentes de oxigênio (Mittal, Siddiqui et al. 2014). A liberação de espécies reativas de oxigênio durante a resposta inflamatória em

neutrófilos é conhecida como explosão respiratória ou estresse oxidativo (Faurischou and Borregaard 2003 (Faurischou and Borregaard 2003); Zen and Liu 2008; Davis, Wen et al. 2011; Kolaczowska and Kubes 2013).

A produção dessas moléculas microbidas é iniciada pela ativação do complexo enzimático nicotinamida adenosina dinucleotídeo fosfatase-oxidase (NADPHox), sendo sua maquinaria proteica composta por quatro oxidases específicas (p22phox, p47phox, p67phox e gp91phox) e a pequena GTPase (Rac1/2). Alguns desses componentes são encontrados na membrana, enquanto outros apenas no citosol (Branzk, Lubojemska et al. 2014). Esse complexo é responsável pela transferência de elétrons para o O<sub>2</sub>, formando assim o ânion superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>); este é rapidamente convertido em espécies tóxicas de oxigênio, potencializando a resposta inflamatória executada pelos neutrófilos (Mittal, Siddiqui et al. 2014).

### **Apoptose e resolução da inflamação associados à ativação de neutrófilos**

Um outro aspecto de vital importância na regulação do sistema imune é a retomada da homeostase celular nos sítios da inflamação. Como já foi discutido anteriormente, durante o processo inflamatório, células de defesa migram para regiões tissulares de injúria a fim de eliminar invasores externos. Entretanto, após efetuarem a limpeza da área afetada, as células fagocitárias precisam ser retiradas do local; caso contrário, a permanência dos neutrófilos ou de suas proteínas por períodos prolongados pode agravar o dano tecidual e, se acompanhada da migração reversa, desencadear uma resposta sistêmica, agravando o quadro de inflamação. Um mecanismo utilizado pelo sistema

imune para retornar aos níveis basais de homeostase é o processo de morte celular programada, também conhecido como apoptose (Fullerton, O'Brien et al. 2013).

A apoptose é um mecanismo de destruição celular altamente ordenado, que requer vias de sinalização precisas. Entre as rotas que podem induzir morte programada em neutrófilos, podemos citar duas vias de regulação, a intrínseca e a extrínseca. A via extrínseca é regulada pelo ligante Fas, a proteína extracelular se liga a receptores de TNF na membrana da célula, induzindo sinalizações *down-stream* para a via intrínseca.(Geering and Simon 2011).

Já na via intrínseca, a mitocôndria, por sua vez, solta seu DNA após ativação através das proteínas de sinalização mediada por dano induzido stress, perdendo seu potencial de membrana. Essa perda de potencial culmina na liberação do citocromo c. Uma vez que o citocromo c é liberado e encontra-se no citosol, ele atua na ativação de procaspase-9, transformando-a em caspase 9 que, por sua vez, ativa atua na clivagem da procaspase-3, a qual é regulada por proteínas inibidoras de apoptose. A ativação da caspase 3 induz a morte celular por apoptose (Ooi and Ma 2013).

Segundo Fullerton e colaboradores, o processo de apoptose é um mecanismo que possibilita a preservação do equilíbrio entre a eliminação de patógenos e a integridade tecidual da região inflamada. Entretanto, caso ocorra desregulação das vias desse processo ou de rotas que induzem a ação dos neutrófilos, doenças de inflamação crônica podem se instalar (Fullerton, O'Brien et al. 2013).

Apesar do grande entendimento dos mecanismos pelos quais a célula responde ao fMLP, muitas lacunas ainda precisam ser preenchidas. Como visto acima, esses processos de sinalização são diversos e apresentam interconexões entre suas vias – sendo que a complexidade das interações entre os mensageiros secundários dificulta a elucidação

dessas rotas com exatidão. Entretanto, o conhecimento sobre os mecanismos moleculares desde o receptor até os subsequentes produtos das vias orquestradas pela ativação por fMLP é essencial para que possam ser feitas inferências sobre a modulação da resposta inflamatória por meio de fármacos.

### **1.5. E quando os neutrófilos falham: implicações clínicas**

Como descrito ao longo desta tese, a participação dos neutrófilos é essencial na resposta inflamatória. A atividade efetora de neutrófilos envolve mecanismos que são regulados pela sinalização de diversos fatores, como citocinas e proteínas. Entretanto, a atividade fagocítica vem sendo correlacionada a diversas patologias, as quais podem levar pacientes à morte por sepse ou falência múltipla de órgãos (MOF).

Um dos mecanismos que pode apresentar falha consiste na produção excessiva de espécies reativas de oxigênio. É de conhecimento que os altos níveis de peróxidos podem acarretar dano tecidual. Tal fato associado à possibilidade de migração reversa de neutrófilos para a corrente sanguínea (Nourshargh, Renshaw et al. 2016) e ao prolongamento da vida dos neutrófilos por retardo da apoptose (Geering and Simon 2011) resulta em quadros clínicos graves, como a síndrome de resposta inflamatória sistêmica (SIRS) (Castellheim, Brekke et al. 2009).

Por outro lado, a deficiência de proteínas do complexo NADPH oxidase em pacientes com doenças crônicas, como a doença granulomatosa crônica (DGC), resulta na baixa produção de ROS. Essa deficiência é gerada por uma mutação na p40phox (Nauseef and Borregaard 2014) que impede a montagem do complexo, provocando assim uma resposta ineficiente na eliminação de microorganismos por tal mecanismo.

Ademais, a falha em mecanismos essenciais como quimiotaxia e desgranulação também promove a deficiência da resposta efetora, além de aumentar a suscetibilidade a processos infecciosos e agravar quadros inflamatórios.

Outrossim, fatores agravantes de doenças podem estar relacionados à morte celular programada, pois a regulação da apoptose é um processo que garante o controle tanto do número quanto do nível da atividade da resposta de neutrófilos nos sítios de injúria. A regulação negativa da via de morte programada induz a manutenção dessas células na região afetada mesmo depois da eliminação dos microorganismos, podendo ocasionar lesão em tecidos saudáveis. No caso de respostas inflamatórias em tecido pulmonar, essa situação pode ocasionar uma grave lesão, gerando um quadro de diminuição da capacidade respiratória provocado pela destruição tecidual causando septicemia (SEPSE) devido ao aumento na quantidade de Fas solúvel. ((Paunel-Gorgulu, Flohe et al. 2011).

Existem ainda macromoléculas que desregulam a atividade dos neutrófilos durante a fase aguda da inflamação, e promovem o aumento no processo inflamatório. Proteínas como S100A8/A9 podem atuar como um potente amplificador da inflamação na auto-imunidade, e a deficiência do seu modulador MMP-8 (uma mieloperoxidase) pode provocar severa resposta inflamatória pulmonar (Oury, González-López et al. 2012).

Contudo, embora haja um número considerável de estudos sobre essas condições, questões sobre como tais desregulações ocorrem ainda permanecem sem respostas, pois os caminhos exatos que são percorridos por essas vias intracelulares ainda não são descritos com clareza à luz da atividade proteica e vias envolvidas.

Atualmente, a comunidade científica vem utilizando uma ferramenta de alta resolução para a análise de proteínas em sistemas biológicos, conhecida como proteômica de alta resolução baseada em espectrometria de massas (MS). É utilizada para tentar compreender melhor o papel das proteínas envolvidas em distúrbios relacionados à homeostase em sistemas biológicos, e se apresenta como uma ferramenta essencial para esclarecer os mecanismos de neutrófilos na resposta imune. Por permitir identificação e quantificação de grande quantidade de proteínas, tornou-se uma ferramenta importante na análise de sistemas biológicos complexos. Permite desde abordagens com hipóteses amplas, por exemplo para a descoberta de novos mediadores em vias, até o teste de hipóteses específicas, direcionadas a um ou poucos alvos pré-determinados.

## **1.6. Proteômica de neutrófilos**

Para se conhecer o papel das vias que orquestram o processo de resposta do sistema imune é imprescindível identificar as proteínas que participam dessas rotas de sinalização. Entre as ferramentas atualmente utilizadas para a análise de proteínas está a espectrometria de massas, que possibilita identificar e quantificar proteínas de um organismo, célula e/ou compartimentos celulares.

Na literatura encontramos vários artigos relacionados a utilização dessa ferramenta no estudo de neutrófilos. Luerman e colaboradores (Luerman, Uriarte et al. 2010) apresentam uma visão geral das publicações de proteômica de neutrófilos até 2010. O trabalho reúne temas como a identificação de proteínas presentes em grânulos citoplasmáticos, análises de proteínas da membrana plasmática, polipeptídeos envolvidos na cascata das MAPK, e proteínas presentes tanto no citoesqueleto como nas vesículas



secretoras. Além disso, eles apresentam uma análise proteômica de modificações pós-traducionais por diferentes estímulos em neutrófilos.

Ademais, outros estudos, por outro lado, tentaram caracterizar proteínas relacionadas a resposta pós-trauma. Teles e colaboradores, por exemplo, identificaram várias proteínas potencialmente envolvidas na sinalização inflamatória após o trauma, as quais estão relacionadas ao remodelamento do citoesqueleto e influxo de cálcio (Teles, Aquino et al. 2012). Alguns autores ainda relatam a inibição da apoptose de neutrófilos em resposta ao trauma (Zhou, Krovvidi et al. 2013).

Conquanto, não se tem muita informação sobre análises proteômicas comparativas antes e após a estimulação, deixando ainda muitas brechas na elucidação de vias intracelulares. Perguntas sobre proteínas envolvidas na regulação de vias intracelulares dos neutrófilos podem ser alvo de estudos da proteômica comparativa, onde se possa propor a montagem de novos caminhos para a compreensão desses pontos não esclarecidos.

## **1.7. Proteômica por espectrometria de massas**

Proteômica é estudo de proteínas de uma determinada mistura a fim de identificar, quantificar e caracterizar as proteínas que a compõem; utilizando para isso tecnologias avançadas como a espectrometria de massas (MS) (Roepstorff 2012). Aqui será feita uma introdução aos princípios dos métodos de proteômica utilizados no presente trabalho.

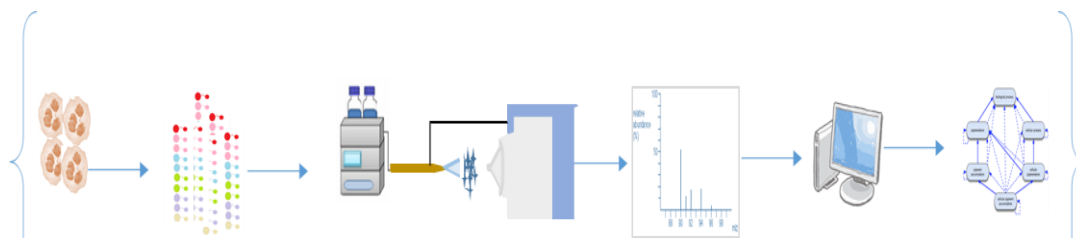
A espectrometria de massas é um método de alta sensibilidade e resolução, utilizado para determinação da massa molecular de analitos. Ademais, os avanços em tecnologia dentro do campo da MS proporcionam hoje a identificação de componentes proteicos em ínfimas concentrações, como em atomols. Sendo assim, essa técnica

consiste em uma ferramenta analítica que possibilita ao pesquisador a obtenção de dados sobre composição proteica em nível de sequenciamento de aminoácidos de um determinado analito, de forma rápida e podendo ser em alta resolução.

Contudo, para atingir altos nível de identificação em experimentos de proteômica exploratória, comumente utilizasse a análise a nível de peptídios (*bottom up*), analisando as proteínas em uma escala global com a técnica *shotgun*, ou pode ser utilizado para monitoramento de espécies proteicas conhecidas numa análise direcionada chamada *Targeted proteomics*. Pois, essa técnica baseia-se na tentativa de identificação do maior número de proteínas em um organismo, tipo celular, e/ou organela (Picotti, Clement-Ziza et al. 2013).

### **Espectrometria de massas- Conceitos e processos**

A espectrometria de massas aplicada a proteômica contém diferentes etapas de execução, estas que são essenciais para que ao final se obtenha o maior rendimento possível de identificações. Então, afim de esclarecer sobre processos envolvidos na abordagem proteômica *bottom up*, tanto *Shotgun* quanto *targeted*, seguem o fluxo básico de trabalho dentro de uma análise proteômica para análise de proteínas (Messana, Cabras et al. 2013).



**Figura 7. Fluxograma básico em espectrometria de massas *bottom up*.** O esquema apresentado é uma sequência de etapas essenciais para a análise de macromoléculas usando espectrometria de massas. As etapas apresentadas representam uma visão geral do processo e podem conter variações não detalhadas neste esquema, como a marcação isotópica ou a definição de alvos, por exemplo.

### **Processamento de amostras *Bottom up***

Conforme o fluxograma acima, a etapa inicial ao trabalho é o preparo de amostra a ser analisada. A extração das proteínas a partir de suas fontes é essencial para uma completa cobertura do proteoma. Nessa etapa é feita a utilização de tampões de extração com agentes caotrópicos e/ou detergentes e realizar a redução de pontes dissulfeto e alquilação das cisteínas a fim de otimizar recuperação de proteínas totais da amostra, bem como expor os sítios para clivagem enzimática descrita a seguir ((Boyle 2005).

Tendo então extraído e desnaturado as proteínas, o passo seguinte é a fragmentação destas a peptídeo. Tal etapa geralmente é feita utilizando-se a enzima tripsina – que age como agente catalisador da hidrólise da ligação peptídica após resíduos dos aminoácidos lisina (K) e arginina (R) que não sejam sucedidos por uma prolina (P), assim os peptídeos trípticos terão ao menos um resíduo de lisina ou arginina na posição carboxi terminal (Boyle 2005).

Após a clivagem proteica, que partiu de uma mistura de proteínas, a amostra representa uma mistura complexa de peptídeos. Torna-se necessário, portanto, o uso de técnicas que simplifiquem a mistura no momento da aquisição de forma a permitir a análise da maioria de seus componentes pelo tempo de retenção. Sendo assim, a cromatografia líquida (LC) vem sendo utilizada como um dos métodos coadjuvante nas análises de espectrometria de massas atuando na separação da amostra para a diminuição da complexidade.

### **Cromatografia Líquida (LC)**

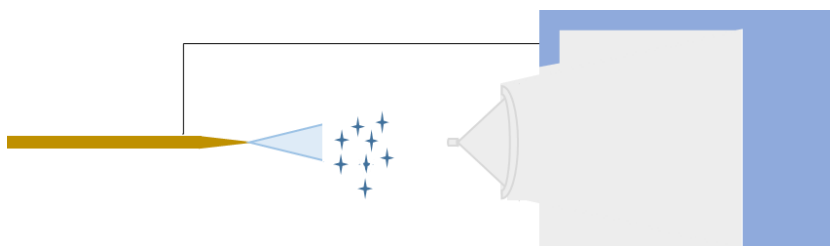
A cromatografia líquida de alta eficiência (*High Performance Liquid Chromatography* (HPLC)) é utilizada como um método preparativo e analítico para a

separação de peptídios através de suas características químicas. Uma das abordagens mais utilizadas em proteômica é a cromatografia líquida de fase reversa [reverse phase (RP)]. A cromatografia de fase reversa utiliza como fator de separação o grau de hidrofobicidade da amostra peptídica na interação com uma fase estacionária hidrofóbica. A eluição dos analitos é realizada por solventes orgânicos, como acetonitrila, que compete com os analitos pela interação com a fase estacionária (Boyle, 2005). A cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS) em proteômica frequentemente utiliza colunas microcapilares que proporcionam uma maior resolução e sensibilidade para análises proteicas (Makarov, 2006).

### **Espectrômetros de massas**

O espectrômetro de massas é um instrumento composto basicamente de três partes: fonte de ionização, analisador e detector. Resumidamente, um espectrômetro funciona da seguinte maneira: analitos são ionizados por uma fonte de ionização e sua relação massa/carga é inferida através da passagem desse íon por um campo elétrico ou magnético. Essa primeira determinação da massa/carga ( $m/z$ ) é um evento denominado em proteômica como MS1 (Makarov, Denisov et al. 2006).

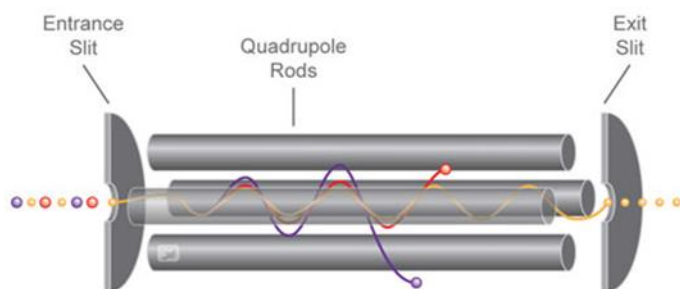
Uma das formas de ionização utilizadas denomina-se eletro pulverização (*Electrospray ionization* (ESI)), consiste na dessorção de analitos contidos em gotículas na presença de um campo elétrico. A dessorção é desencadeada pela evaporação do solvente da fase móvel levando ao aumento de concentração das partículas carregadas de forma tão intensa que ocorre a dessorção inserindo carga aos peptídios, tornando-os íons (Banerjee and Mazumdar 2012).



**Figura 8. Esquema de processo de ionização por *eletrospray* acoplado a um espectrômetro.** O esquema mostra em amarelo a coluna analítica com o contato elétrico em preto acoplado ao espectrômetro. A passagem da corrente elétrica pela amostra torna os peptídios carregados.

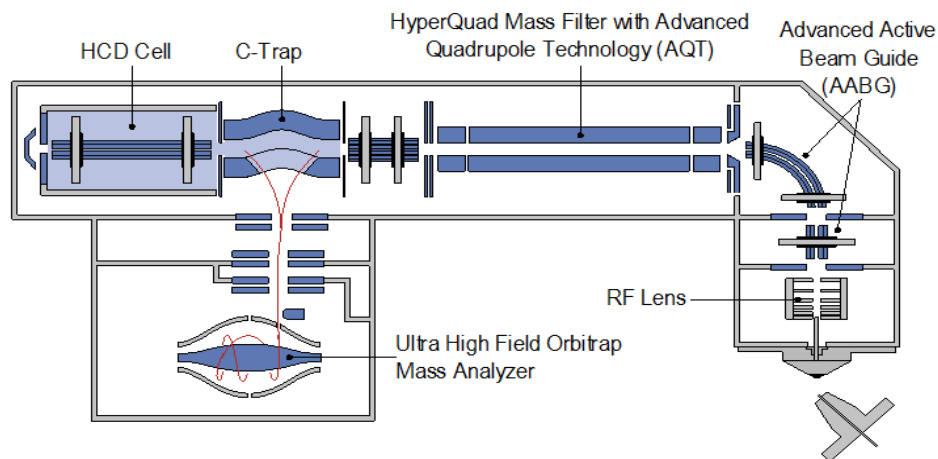
Os peptídios ionizados são conduzidos por campos elétricos controlados ao analisador do espectrômetro. No analisador, os íons são caracterizados em função de sua massa molecular e sua carga (razão massa/carga ou  $m/z$ ), seja por tempo de voo em um tubo de vácuo, por oscilação em resposta a um campo elétrico ou pela frequência de oscilação orbital (a depender do tipo de analisador utilizado). Atualmente, os espectrômetros de massas possuem diversas configurações, podendo possuir dois ou mais analisadores simultaneamente, denominados híbridos (figura 10). Esse tipo de configuração híbrida otimiza a resolução, proporcionando aumento na sensibilidade do estudo.

O analisador quadrupolo apresenta alta velocidade e contém 4 seções magnéticas (quadrupolo) que alternam polaridades durante a análise produzindo um campo (Figura 9). Esse campo magnético estabiliza a trajetória dos íons de uma determinada massa carga em uma fração de tempo, sendo assim, este analisador funciona como filtro de massas (Snyder and Cooks 2017).

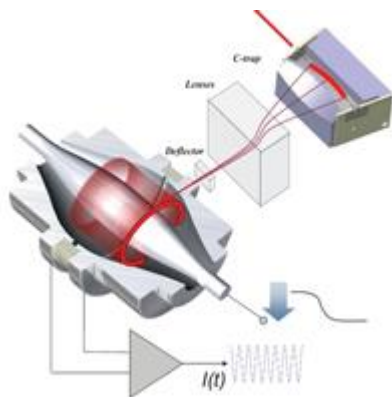


**Figura 9. Esquema de um quadrupolo de condução.** Essa câmara contém duas hastes magnéticas RC, e outras duas DC. Esse compartimento pode ser usado como filtro de massa uma vez que pode se alterar as polaridades.

Já o Orbitrap, é um analisador de alta resolução, do tipo armadilha de íons que contém um eixo elétrico central envolto pelos eletrodos, aprisionando os íons numa órbita (Figura 11) e analisando sua razão massa/carga pela frequência com que oscilam na armadilha. Os dados brutos são computados usando a transformada de Fourier para o cálculo da massa sobre carga (Makarov, Denisov et al. 2006).



**Figura 10. Esquema gráfico de estrutura interna de um espectrômetro de massas.** A representação é de um Orbitrap Q Exactive HF. Esses espectrômetros são híbridos, combinando um analisador por quadrupolo e um analisador orbitrap (Thermo Fischer Scientific, Bremen, Alemanha).



**Figura 11. Representação gráfica de um analisador Orbitrap.** Os íons são lançados de forma tangencial dentro da câmara pela C-trap e circulam e são aprisionados em uma órbita no eletrodo central. A trajetória é representada pelas linhas vermelhas. A frequência das oscilações é computada e os dados são usados para calcular a massa sobre carga dos íons. (Reprodução de imagem do site Thermo)

### Métodos de aquisição em espectrômetros do tipo Orbitrap

Tendo em vista que o espectrômetro não consegue isolar e fragmentar todos os peptídios que estão sendo eluídos da LC por limitações físicas (tempo de leitura e fragmentação), tornam-se necessários métodos de aquisição que determinem quais peptídios serão fragmentados. Isso restringe a faixa de varredura e minimiza perdas de informação do analíto (Makarov, Denisov et al. 2006).

Para análises do tipo bottom-up utilizando espectrômetros Orbitrap híbridos, podemos falar de 2 tipos de métodos de aquisição: *Data Dependent Acquisition* (DDA). A aquisição por dados dependentes (*Data Dependent Acquisition* (DDA)), é a estratégia pela qual o software que comanda o instrumento seleciona os íons predefinidos no *full scan* (MS1) para fragmentação. A seleção é baseada em uma lista de características do peptídios em MS1. Os íons selecionados para a etapa de fragmentação são chamados de íons precursores.

## 1.8. Identificação de proteínas

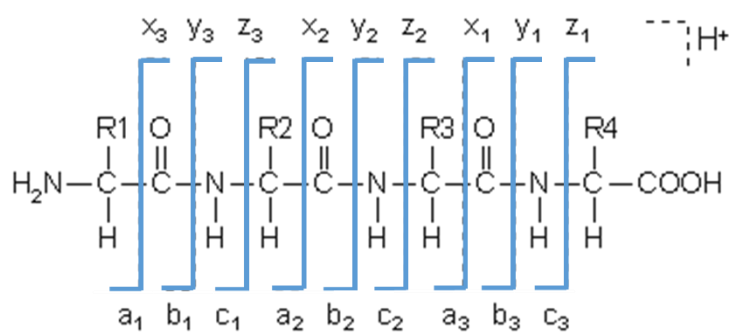
### Métodos de fragmentação de peptídios

Espectrômetros híbridos têm a capacidade de detectar os íons (MS1) e fragmentá-los. A fragmentação é o evento conhecido com MS-MS ou MS2. Os analitos detectados em MS1, são também chamados de íons precursores, pois podem sofrer fragmentação dentro do próprio espectrômetro de massas.

Dentre os diversos tipos de fragmentação possíveis, a fragmentação pela colisão contra um gás inerte (Nitrogênio, Argônio ou Hélio, por exemplo) é conhecida como *Collision induce dissociation* (CID). O produto dessa fragmentação é analisado novamente, gerando um espectro dos fragmentos, que permite a obtenção de informações sobre a sequência do peptídio.

A teoria sobre sequenciamento de proteínas usando séries de fragmentação foi descrita por Peter Roepstorff, em 1984 (Roepstorff and Fohlman 1984). A ideia é qualificar cada fragmento com uma letra para que a identificação dos fragmentos seja facilitada. A nomenclatura característica para os fragmentos dos íons é demonstrada na figura 12 abaixo.





**Figura12. Descrição das séries de fragmentação.** Esquema ilustrativo dos tipos de séries de fragmentação propostos pela nomenclatura de Roepstorff-Fohlman-Biemann. São as séries a, b, c e x, y, z. (Adaptado de Steen, 2004 e Roepstorff 1984).

Resumidamente, se a carga permanece no N-terminal as séries serão a-, b- e c-íons serão produzidos. Alternativamente a carga pode permanecer no C-terminal produzindo então os íons x, y- e z. Na maioria dos casos, os íons b e y são produzidos por energias de colisão CID (Roepstorff and Fohlman 1984; Steen and Mann 2004). Sendo assim, através da determinação da massa dos analitos e seus fragmentos, as proteínas podem ser identificadas através de um alinhamento com um banco de dados (Makarov, Denisov et al. 2006; Makarov, Denisov et al. 2006).

Entretanto, abordagens proteômicas não são apenas qualitativas. Em geral, as análises tentam medir a abundância das proteínas identificadas entre diferentes condições do estudo através de diferentes abordagens, como será apresentado no tópico de resultados deste trabalho.

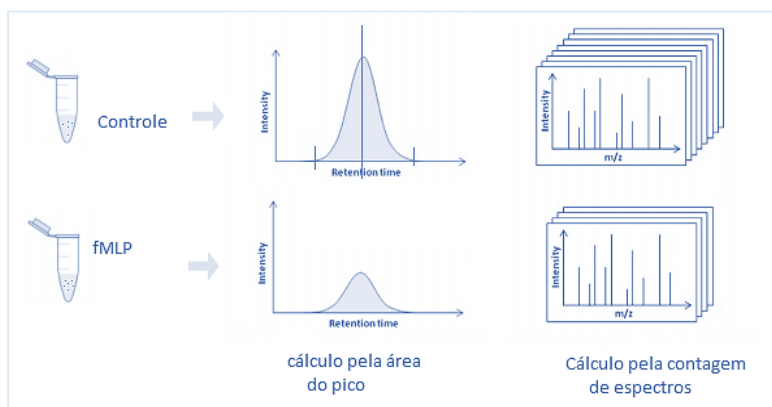
## 1.9. Métodos de quantificação

A proteômica quantitativa utiliza diversas ferramentas a fim de quantificar a abundância relativa das proteínas presentes em duas ou mais condições. Essas ferramentas podem ser do tipo que não necessitam de qualquer marcação prévia (*label-*

*free*), ou podem também ser feitas a partir de marcações metabólicas ou químicas. Dentre os tipos de marcações, podemos destacar a marcação química do tipo isobárica para quantificação relativa e absoluta (iTRAQ™, do inglês, *isobaric tags for relative and absolute quantitation*)(Evans, Noirel et al. 2012) e TMT (do inglês, Tandem Mass Tag™ (TMT™).

### Quantificação por métodos *Label-free*

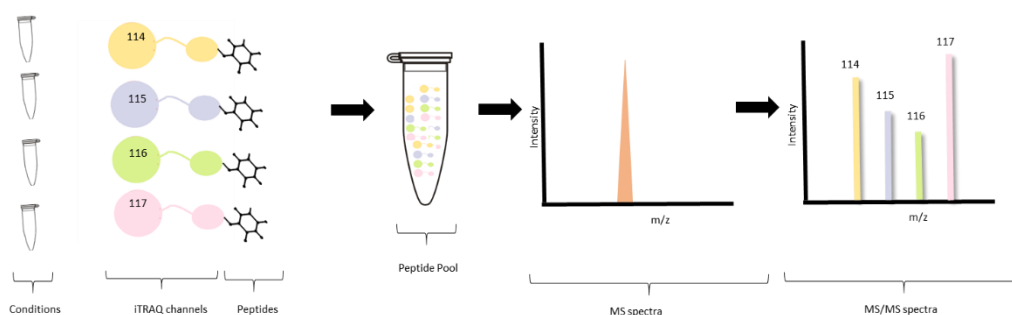
A quantificação *label-free* é feita a partir do cálculo da área do pico detectado em MS1 (razões  $m/z$ ), ou pela contagem de espectros obtidos em MS2 (espectros de fragmentação de precursores selecionados em MS1). A figura 13 ilustra esses dois tipos de quantificação *label-free*. Ademais, nessa técnica, as diferentes amostras são preparadas e analisadas em momentos distintos; apenas a análise dos dados é feita em conjunto. Sendo assim, este tipo de metodologia é altamente dependente da reprodutibilidade dos sistemas cromatográficos (Megger, Bracht et al. 2013).



**Figura 13. Métodos de quantificação *label free*.** Os métodos comparativos *label free* sem utilizar qualquer marcação. A quantificação é feita baseada tanto por cálculo da intensidade da área do pico a nível de MS1; quanto pela contagem de espectros em nível de MS2.

## Quantificação por marcação química com etiqueta (*tag*) isobárica

Para quantificar proteínas minimizando o efeito da cromatografia na reprodutibilidade, foram desenvolvidos métodos de marcação química para peptídios.



**Figura 14.** Kit comercial iTRAQ para quantificação isobárica. Esquema simplificado de como ocorre marcação e combinação das amostras após a reação química individual de cada grupo.

Na abordagem utilizando etiquetas, os reagentes permitem a análise simultânea de até 10 amostras biológicas. Essas marcações (*tags* isobáricas) são compostas de três partes: um grupo repórter ligado a um grupo de balanço e à parte reativa, que se liga ao peptídeo por um grupo amino reagente (Li 2011; Evans 2012). Como a soma das massas do grupo repórter e grupo de balanço é constante, antes da fragmentação (MS2) todas as etiquetas têm a mesma massa (daí o termo isobáricas).

As marcações isobáricas (*tags*) são utilizadas a fim de facilitar a quantificação relativa das amostras, tendo em vista que ao serem marcadas isoladamente com as diferentes *tags*, as condições podem ser unidas em um único frasco e analisadas concomitantemente no cromatógrafo e espectrômetro de massas diminuindo as variáveis intrínsecas da cromatografia (Palmisano and Thingholm 2010) (Palmisano 2010).

Sendo assim, a amostra – composta das diferentes condições, cada qual com uma marcação específica – ao ser visualizada nos analisadores de massa é observada como um único pico no evento de MS1, pois os mesmos peptídios nas diferentes amostras possuem relação m/z e tempo de retenção idênticos. No MS2 as marcações são fragmentadas, gerando dois conjuntos de dados: picos de íons repórteres e picos de íons dos fragmentos dos peptídios. O processo de quantificação dos peptídios marcados baseia-se na intensidade dos íons repórteres gerados (Rauniyar and Yates, 2014).

### **1.10. Estudos de modificações pós-traducionais**

As abordagens descritas acima visam identificar e medir a abundância relativa de um conjunto de proteínas, à medida que elas mudam em resposta a um estímulo. Entretanto, nem todas as respostas a um ambiente em constante mudança acontecem pela variação na abundância dessas macromoléculas, algumas ocorrem pela modificação de proteínas já existentes. Esse é o caso das alterações devidas a modificações pós-traducionais (PTM, do inglês, *posttranslational modification*).

Sendo assim, o estudo de PTMs visa elucidar os mecanismos pelos quais essas modificações modulam vias de sinalização. Como a fosforilação é um dos tipos de modificações pós-traducionais mais comuns em organismos eucarióticos, e sabe-se que papel chave na interação proteína-proteína em vias de sinalização intracelular (Roux and Thibault 2013), faz-se necessária a análise desse tipo de modificação para se ampliar o espectro de informações sobre como as vias de sinalização em neutrófilos funcionam.

A fosforilação pode ocorrer de maneira única ou múltipla em uma proteína, mudando tanto sua estrutura – consequentemente sua função – quanto as interações com seus ligantes (Liu and Chance 2014).

A espectrometria de massas vem sendo utilizada como o teste *gold standard* na identificação de PTMs como as fosforilações; pois, a baixa estequiometria dessas modificações prejudica sua análise por outras técnicas. Mesmo sendo a PTM mais abundante em células eucarióticas, os fosfopeptídios têm baixa abundância dentro de um proteoma total. Essa baixa abundância requer o seu enriquecimento prévio, a fim de facilitar a identificação dessas modificações pós-traducionais e os seus sítios específicos (Mertins, Qiao et al. 2013).

Dentre outras modificações, encontramos a glicosilação como não menos importante para células do sistema imune. A glicosilação é uma modificação pós traducional essencial presente em mais da metade de proteínas eucarióticas. Processos de glicosilação não são codificados pelo genoma, eles estão ligados ao processamento de proteínas no reticulo endoplasmático (RE) e endereçamento proteico no aparato de golgi.

Glicosilação está intimamente associada à sinalização celular, uma vez que as proteínas secretadas passam pelo processo de glicosilação intracelular (Johannssen, 2016). Uma das funções das glicoproteínas em neutrófilos está relacionada à adesão celular e sinalização (Babu, 2009). Os grupos de glicanos presentes em proteínas de membrana representam uma importante parte dos mecanismos celulares, uma vez que a maior parte dos receptores de membrana são compostos glicosilados e auxiliam no processo de reconhecimento e ativação de células de defesa.

## 2. JUSTIFICATIVA

Na literatura, pode se encontrar descrições de diferentes doenças relacionadas à desregulação dos neutrófilos, que são ativados através de vias de sinalização muito complexas. A atividade efetora de neutrófilos envolve mecanismos que são regulados pela sinalização de diversos fatores, onde a deficiência na regulação desses termos pode ser a explicação para a ação descontrolada desses fagócitos.

Além do mais, a participação dos neutrófilos vem sendo correlacionada a diversas patologias, as quais podem levar pacientes a morte por sepse ou falência múltipla de órgãos (MOF). Falhas na regulação da produção de ânions superóxido associadas ao retardo na apoptose e à migração reversa podem acarretar a extensão do dano tecidual para outras regiões, e resultar em quadros clínicos graves, como a síndrome de resposta inflamatória sistêmica (SIRS) (Castellheim, Brekke et al. 2009). A resposta inflamatória sistêmica pode atingir os pulmões, situação que pode ocasionar uma grave lesão, com quadro de diminuição da capacidade respiratória. Esse quadro é denominado Síndrome da Angústia Respiratória Aguda (SARA)(Matute-Bello, Liles et al. 2000).

Embora haja um número considerável de estudos sobre essas condições, questões sobre como tais desregulações ocorrem ainda permanecem sem respostas, pois os caminhos exatos que são percorridos por essas vias intracelulares ainda estão repletos de lacunas.

Atualmente, a comunidade científica vem utilizando a espectrometria de massas (MS) para uma melhor compreensão da ativação de neutrófilos durante a resposta inflamatória. Como as proteínas são as principais responsáveis pelos mecanismos de sinalização e regulação, e que as fosforilações possuem um importante papel regulador

dentro da sinalização celular (Palmisano and Thingholm 2010), podemos citar a proteômica quantitativa de descoberta associada à proteômica de modificações pós-traducionais como as ferramentas adequadas para a detecção de pontos relevantes nesse funcionamento celular. A espectrometria de massas se apresenta como ferramenta de extrema importância para o estudo da integração de proteínas e vias (Choudhary and Mann 2010), mostrando-se mais sensível na identificação de modificações pós-traducionais do que a técnica com anticorpos, com a identificação até mesmo dos sítios de modificações em aminoácidos (Cox and Mann 2011), possibilitando assim a qualificação e quantificação das modificações presentes.

Diante do exposto, partindo da hipótese de que há diferenças na abundância de proteínas em neutrófilos ativados a proposta deste trabalho foi realizar uma análise de proteômica quantitativa de descoberta, baseada na análise comparativa de neutrófilos humanos quiescentes e ativados por fMLP. A abordagem proteômica utilizada foi do tipo LC-MS/MS, que consiste em uma análise das proteínas presentes nessas células utilizando espectrômetros de massas híbridos do tipo LQT Orbitrap.

Em adição a isso, também é proposto a análise do fosfoproteoma e glicoproteoma e acetiloma de forma qualitativa de neutrófilos quiescentes e ativados por fMLP, devido ao papel regulador dessas modificações na sinalização celular (Palmisano and Thingholm 2010). Através dessa caracterização em larga escala de proteínas diferencialmente abundantes, e da identificação e quantificação relativa das proteínas com peptídeos fosforilados será possível ampliar o espectro de informações acerca das vias intracelulares que orquestram a resposta inflamatória em neutrófilos. Tal informação irá contribuir para o desenvolvimento de novos métodos diagnósticos e alvos terapêuticos para doenças relacionadas a processos inflamatórios.

### **3. OBJETIVOS**

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

O objetivo geral do trabalho apresentado é a análise comparativa do proteoma total e secretoma e análise qualitativa do proteoma enriquecido para fosfoproteoma, do glicoproteoma, do acetiloma de neutrófilos humanos quiescentes e estimulados *in vitro* por fMLP, visando o esclarecimento de mecanismos intracelulares envolvidos na ativação dessas células.

#### **3.2. Objetivos específicos**

- Desenvolvimento e adaptação de protocolos de preparo de amostra (separação de células, ativação, lise, digestão), aquisição de dados (proteômica baseada em gel, proteômica *gel-free shotgun* e *targeted* e análise de PTMs) e análise de dados para o presente estudo;
- Análise comparativa do proteoma total de neutrófilos quiescentes e ativados com fMLP de forma qualitativa e quantitativa em amostras *label free* e marcadas com *tags* isobáricas; e análise qualitativa do fosfoproteoma, glicoproteoma e acetiloma de neutrófilos quiescentes e ativados com fMLP;
- Análise comparativa do secretoma de neutrófilos quiescentes e ativados com fMLP,
- Caracterizar vias intracelulares envolvidas no processo de ativação de neutrófilos humanos por fMLP utilizando ferramentas de bioinformática para a integração dos resultados obtidos.



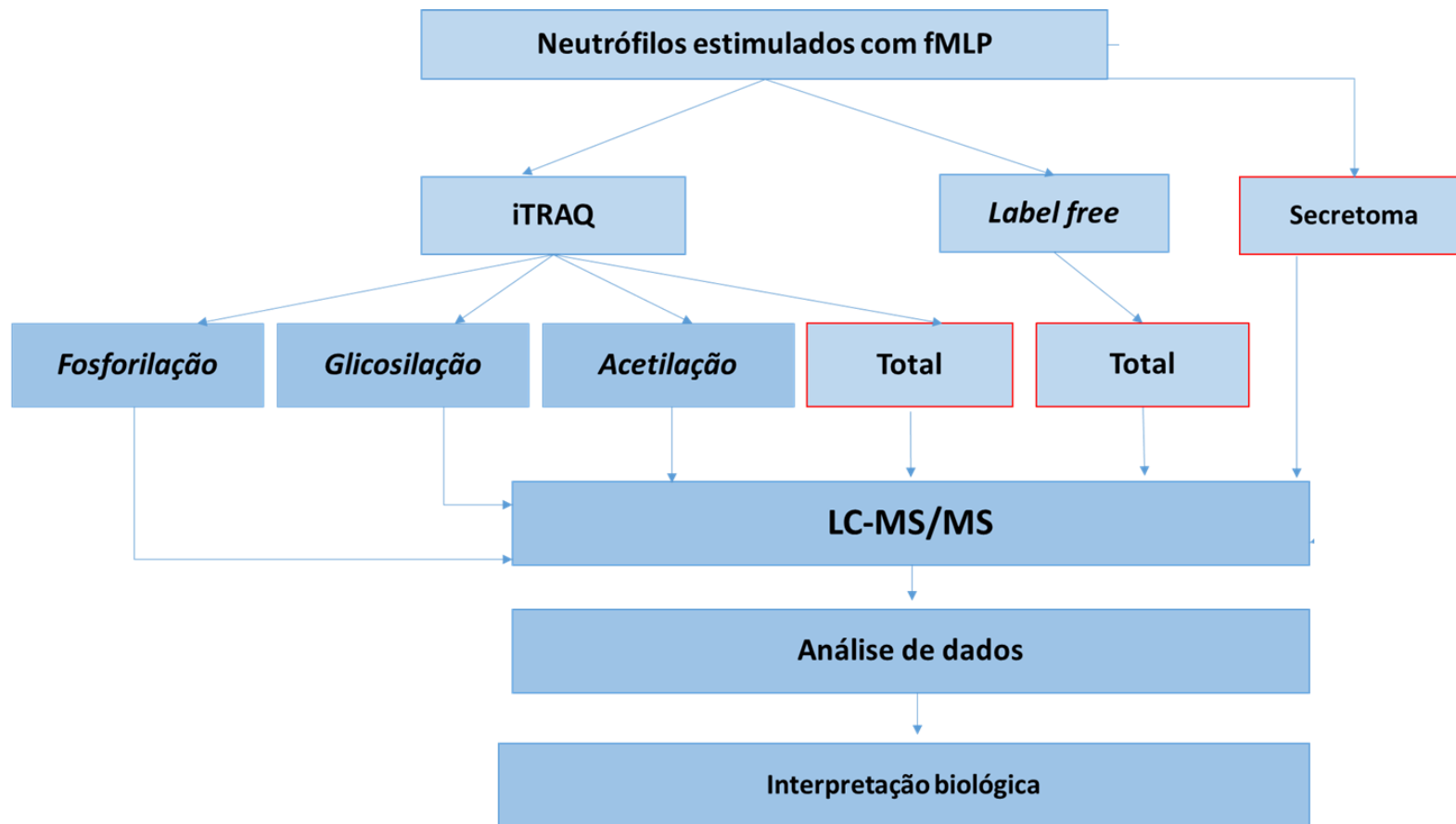
## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### Estratégia experimental

O proteoma de neutrófilos humanos avaliados neste trabalho foi estudado utilizando múltiplas fontes de informação, a fim de avaliar a abundância de proteínas e qualificar as modificações pós-traducionais (PTMs), tais como fosforilação, glicosilação e acetilação; e abundância de proteínas secretadas por neutrófilos, para compreender as atividades das redes de interação de proteína em neutrófilos.

Os dados de microscopia eletrônica de varredura foram utilizados para caracterizar as modificações morfológicas produzidas pela ativação de neutrófilos humanos por fMLP e as análise de espécies reativas de oxigênio para analisar a produção diante do mesmo estímulo.

Ademais, todos os dados de proteômica foram validados utilizando-se testes estatísticos e as proteínas reguladas foram quantificadas usando abordagens *label free* e amostras marcadas com *tags* isobáricas para a quantificação. Sendo aceitas com p-valor < 0,05 como valor suficiente para ensaios em proteômica. A estratégia experimental foi resumida na figura 16 a seguir, o fluxograma resume o processamento total das amostras proteicas até a aquisição de dados utilizando espectrometria de massas.



**Figura 15. Estratégia experimental.** . O presente trabalho contou com a parte quantitativa das proteínas totais tanto label free quanto iTRAQ, e do secretoma; e da parte qualitativa com a identificação de modificações pós traducionais como fosforilação, glicosilação e acetilação.

## 4.1. Preparo de amostra

### *Coleta de sangue e isolamento celular*

Neutrófilos foram isolados do sangue venoso periférico de cinco doadores voluntários da faixa etária entre 18 e 40 anos, que não apresentavam histórico de doenças crônicas ou alérgicas, inflamatórias ou quaisquer tipos de doenças que necessitem de uso periódico de medicação, não fumantes, e que não tivessem feito uso de bebidas alcoólicas pelo menos nas 48 horas anteriores à coleta. Dentro das especificações de higiene descritas acima, os doadores assinaram de um termo de consentimento livre e esclarecido. O procedimento foi executado mediante a aprovação pelo comitê de Ética da Universidade de Brasília (número de registro: CEP-CFM-45/2010), em conformidade com a Declaração de Helsinki.

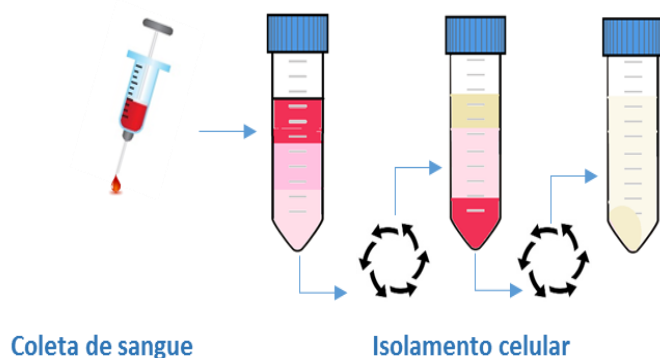
A coleta do sangue foi realizada por punção venosa periférica utilizando seringa heparinizada (5UI/mL) (Brown, Lever et al. 2003). As células foram isoladas utilizando a diferença de densidade das mesmas, através de um duplo gradiente contendo Percoll - 60% e 70% (Aquino, 2015), (*GE Healthcare*)- misturado a uma solução tampão HBSS modificada- contendo Cloreto de Potássio; Fosfato de Potássio monobásico; NaCl; Fosfato de Sódio dibásico; D-glicose; vermelho de fenol; Bicarbonato de sódio; água milli-Q; pH entre 7.2 e 7.4; (*Sigma Aldrich*) para manter as condições fisiológicas das células durante todo o experimento. As densidades dos gradientes foram otimizadas e pré-estabelecidas para este experimento.

A montagem de um duplo gradiente foi feita em tubos falcon de polipropileno de 50mL (TPP), sendo que o sangue venoso foi adicionado sobre o duplo gradiente, já

previamente montado, sendo utilizados para isso 12mL de cada componente (gradiente 60% e 70%; e sangue venoso), todas as soluções utilizadas para a etapa inicial do procedimento de isolamento encontravam-se a temperatura ambiente e esterilizadas usando filtro Millipore de 0.22um.

Após a montagem do gradiente, os tubos contendo o mesmo foram centrifugados a 200g por 15 minutos a temperatura ambiente; ao final do tempo de centrifugação, formaram-se várias fases. A região na parte superior do tubo correspondente plasma e células mononucleares foi descartada. Os neutrófilos encontravam-se na região entre os gradientes de 60 e 70%, o conteúdo total do halo de neutrófilos juntamente com parte do gradiente de 70% foi colhido para um tubo falcon novo para o procedimento de lavagem. As células foram submetidas a 2 lavagens com tampão HBSS 1x, e centrifugadas a 300g por 5 minutos para a retirada completa do *percoll*.

As hemácias residuais foram retiradas por lise hipotônica durante 15 segundos, e a osmolaridade do meio foi recuperada pelo uso de solução tampão de HBSS modificado na concentração 2X. O procedimento de isolamento é resumido na figura a17 e imagem de experimento em anexos.



**Figura 16. Isolamento celular.** O sangue venoso foi coletado e depositado sob o duplo gradiente de densidade (representados em rosa). Seguido de uma centrifugação a 200g por 15 minutos. A etapa seguinte foi a coleta dos neutrófilos da região descrita em rosa no segundo falcon, seguidas de lavagens e lise de hemácias.

Após o processo de lavagem, as hemácias residuais foram removidas por lise hipotônica (Neves, 2012). Os procedimentos descritos acima, exceto o isolamento, foram realizados em condições de baixas temperaturas; pois, neutrófilos são células que respondem prontamente a qualquer estímulo externo, e a extensiva manipulação celular em temperaturas fisiológicas poderia disparar processos de ativação basal nas células.

#### *Avaliação pureza e viabilidade celular*

A fim de avaliar de forma qualitativa e quantitativa as células que foram isoladas no procedimento anterior; então foram retiradas 3 alíquotas de 10ul cada para os procedimentos descritos a seguir.

A pureza do isolamento foi avaliada com a utilização da técnica de *Citospin* para a fixação das células em lamina , seguido da coloração das mesmas com o reagente em solução Wright (*BIOCLIN*), onde os 10 ul de suspensão de células foi aplicado sobre a superfície de uma lâmina e centrifugado a 300g. As células fixadas a superfície foram então coradas com o corante Wright, após a secagem da lâmina foram contadas 100 células, sendo utilizadas apenas as amostras que apresentavam a pureza acima de 98%.

A viabilidade das células foi avaliada em câmara de Neubauer, sendo utilizado o reagente azul de tripan como corante. O Azul de tripan é um reagente cristalino solúvel em água, que penetra em células que apresentam rompimento na parede celular, sendo então caracterizadas como células mortas as que apresentarem coloração azul no citoplasma. Para isso, foram contadas 100 células por campo, sendo aceita como suspensão de células viáveis apenas as que apresentaram acima de 97% de células vivas.

Para a avaliação quantitativa, a alíquota de células foi ressuspensa em solução de Turk (composta por ácido acético glacial, azul de metileno e água destilada filtrada). Onde 10  $\mu$ l dessa suspensão foi aplicada em uma câmara de Neubauer.

#### **4.2. Ativação de células *in vitro***

O processo de ativação celular *in vitro* foi executado utilizando a concentração de 100 nmol/L de fMLP (Sigma F3506) com a duração de 30 minutos de incubação. O tempo de exposição do peptídeo ao neutrófilos foi determinado em prévios experimentos executados no laboratório de bioquímica e química de proteínas (Dias, 2015). As células utilizadas nesses foram incubadas a temperatura de 37°C e 25°C por 30 minutos, (Botha, Moore et al. 1995). As duas temperaturas de ativação são descritas na literatura com temperatura de ativação para neutrófilos humanos. Ressaltando que a diferença de temperatura de ativação não foi alvo de comparação da análise e apenas entra como variável para expandir o número de proteínas encontradas pelo estímulo. A ideia de analisar duas temperaturas diferentes em um mesmo experimento foi comparar as diferentes informações da literatura, visando esclarecer melhor sobre a ativação em diferentes temperaturas.

O número de Neutrófilos utilizados nos experimentos de ativação foram alíquotas de no mínimo  $3 \times 10^6$  células para espectrometria de massas,  $2.5 \times 10^5$  células para as análises ortogonais de NBT,  $3 \times 10^6$  citometria de fluxo e  $1.5 \times 10^6$  microscopia eletrônica de varredura.

### *Isolamento de secretado celular*

Ao final do experimento de ativação as amostras foram centrifugadas. A centrifugação sedimentou as células e possibilitou a coleta do sobrenadante contendo o secretado celular. O secretado foi submetido então a redução de volume por centrifugação a vácuo. Ao final do experimento a amostra foi congelada a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### *Citometria de fluxo*

A aquisição de dados em citometria de fluxo foi efetuada em um citômetro de fluxo do tipo Calibur (FACScalibur, BD Biosciences, Heidelberg, Germany). Essa técnica é utilizada em larga escala para a avaliação dos mais variados ensaios celulares, que podem ser feitos com marcação de anticorpos que emitem fluorescência como é o caso dos FITC e PE, como também pode ser feita a partir de moléculas que se ligam e reagem a espécies reativas de oxigênio. Para este experimento foi utilizado o reagente dihidrorodamina 1,2,3 (1,2,3 DHR).

Sendo assim, utilizamos a citometria de fluxo para realizar experimentos de validação de ativação celular. Para isso foram feitas alíquotas de no mínimo  $3 \times 10^5$  células para cada condição (quiescente, ativado pelo fMLP, e ativado pelo PMA). Neutrófilos quiescentes foram mantidos para controle negativo, controle positivo com neutrófilos ativados com PMA 100 ng/mL, e experimental com neutrófilos ativados com fMLP 100nmol/L). A concentração de fMLP (100 nmol/L) foi mantida para todos os experimentos para equalizar os resultados (Zen and Liu 2008).

Para fins de avaliação quantitativa, foram utilizados como parâmetros a contagem de 10000 eventos celulares sendo lidos em um comprimento de onda de 530nm (comprimento de onda de emissão do DHR). O resultado final é representado em gráficos de intensidade.

#### *Teste de NBT colorimétrico*

Para a avaliação da ativação celular foram utilizados  $2 \times 10^5$  neutrófilos para cada condição: controle negativo com neutrófilos quiescentes, controle positivo com neutrófilos ativados com PMA 100 ng/mL, neutrófilos ativados com fMLP 100nmol/L), e o reagente NBT (do inglês, *nitroblue tetrazolium*) que é um corante incolor que ao reagir com peróxidos é precipitado na forma de formazam que apresenta coloração azul e pode ser detectado em um comprimento de onda de 550 nm (Peixoto, 2002).

Os neutrófilos foram ativados cada um com suas respectivas concentrações de ativadores e incubados juntamente com a amostra controle por 10 minutos a 37°C. Em seguida, foi acrescentado 50ul de NBT 0,1% e incubou-se por mais 20 minutos. Ao final do processo de incubação as amostras foram centrifugadas a 9500rpm e o sobrenadante foi removido. Ao pellet de células foi adicionado 900ul de ácido acético 50% e os tubos foram sonicados durante 1 min. Após a sonicação as amostras foram novamente centrifugadas, e o sobrenadante retirado. O sobrenadante foi adicionado a uma placa de 96 poços em triplicatas e a leitura foi realizada para um comprimento de onda de 550nm em uma leitora de placas.

Microscopia eletrônica de varredura



Os neutrófilos humanos foram utilizados em microscopia eletrônica de varredura para caracterizar modificações morfológicas induzidas após a ativação. Os neutrófilos de controle e os neutrófilos ativados por fMLP (100 nmol / L), sendo  $1,8 \times 10^6$  de cada grupo foram fixados com solução tampão de Karnovsky (paraformaldeído a 12%, 8% de glutaraldeído em tampão de cacodilato 0,1 M) por 120 minutos. Após fixada com poli-L-lisina 0,1% e trióxido de Osmium 2%. Em seguida, tratou-se com passos de acetona e secou-se em ponto crítico seco com CO<sub>2</sub> líquido no aparelho Blazers e metalizado com ouro. A aquisição de imagens foi realizada usando (microscópio MEV JEOL 840 A) usando 20kV (Galkina, Stadnichuk et al. 2010).

### **4.3. Extração de proteínas**

Para o desenvolvimento desse trabalho foram utilizados 3 diferentes métodos de solubilização proteica com 3 tampões de lise, visando ampliar a recuperação de proteínas nas análises de espectrometria de massas. Os tampões contendo SDS e SDS Ureia foram utilizados para extratos totais e o tampão Ureia para o secretado. Os métodos utilizados para a lise e extração de proteínas são descritos a seguir:

#### *Tampão com Dodecil sulfato de Sódio*

Após a incubação, os neutrófilos foram centrifugados. O sobrenadante correspondente ao secretado celular durante o processo de ativação foi separado em um

tubo a parte. A fração correspondente aos neutrófilos foram lisadas utilizando o tampão de lise (2% SDS, 0.3 M de DTT em tampão 0.02 M TEAB ) e mantida em banho de gelo.

Então, cada amostra foi submetida ao processo de sonicação. O sonicador utilizado para o processo foi um Tip Sonicador composto por uma tip de sonicação de 1/8, que proporcionou a sonicação das amostras em pequenos volumes. A etapa de sonicação foi feita com a intensidade do equipamento a 60% do potencial com 5 ciclos de 15 segundos em banho de gelo. Após a etapa de sonicação as amostras foram aquecidas a 80°C por 10 minutos e então estocadas a -80°C até a etapa de digestão.

#### *Mistura dos tampões com Dodecil sulfato de Sódio e Uréia*

Após a incubação, os neutrófilos foram centrifugados. O sobrenadante correspondente ao secretado celular durante o processo de ativação foi separado em um tubo a parte. A fração correspondente aos neutrófilos foram lisadas utilizando o tampão de lise (6M Ureia, 2M Tiourea, 0.5M EDTA; 0.1 M DTT, 1% de inibidores de proteases e 1% de inibidores de fosfatases em tampão TRIS) por 60 minutos a temperatura ambiente. Depois o tampão de lise (2% SDS, 0.3M DTT em tampão 0.02 M TEAB) foi adicionado e a amostra foi incubada por mais 30 minutos. Então, as amostras foram estocadas a -80°C até a etapa de digestão.

#### *Tampão Uréia*

Após a incubação, os neutrófilos foram centrifugados. O sobrenadante correspondente ao secretado celular durante o processo de ativação foi separado em um tubo a parte e seco em atmosfera de vácuo. Após seco, o secretado celular das amostras foram solubilizados utilizando o tampão (6M Ureia, 2M Tiourea, ; 0.01 M DTT, 1% de

inibidores de proteases e 1% de inibidores de fosfatases em 0.02M de TEAB) por 30 minutos a temperatura ambiente, então as amostras foram sonicadas por 10 segundos em banho de gelo duas vezes (protocolo EMBO- SDU) . Então, as amostras foram estocadas a -80°C até a etapa de digestão.

### ***Quantificação de extratos proteicos e secretado***

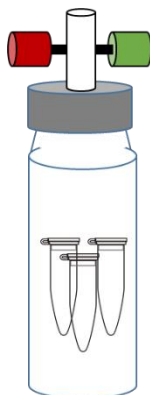
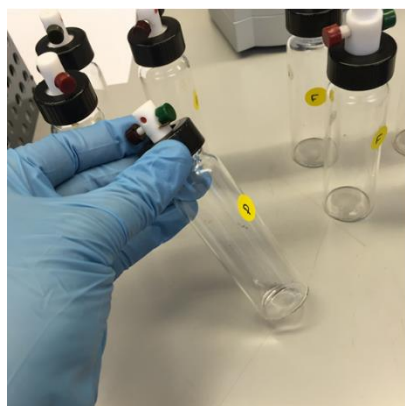
As amostras produzidas neste trabalho foram quantificadas usando dois diferentes métodos: A quantificação por análise de aminoácidos e pela técnica de detecção de fluorescência usada pelo Qubit Invitrogen. As análises foram complementares e são descritas a seguir.

#### ***Análise de aminoácidos***

Para determinar a concentração proteica nos extratos, foi utilizada a técnica de análise de aminoácidos que consiste na detecção das massas dos aminoácidos provenientes de uma reação de hidrólise da amostra em questão.

Para isso, uma alíquota de 2ul do extrato proteico foi seca em atmosfera de vácuo usando centrifugação. Após a secagem os tubos foram identificados. As amostras então foram colocadas em tubos de vidro com válvulas próprios para atmosfera de vácuo, e no fundo de cada tubo de vidro (Figura 17) foi adicionado tampão de hidrólise (6N HCl; 0.1% Fenol e 0.1% de ácido Tioglicólico). As amostras foram colocadas em atmosfera de Argônio. Seguido pela etapa de sucção do Argônio por bombas de vácuo. Assim que as amostras encontravam-se então em atmosfera de vácuo, para o processo de hidrólise. Lembrando que os tubos contendo as amostras secas foram perfurados na tampa para

auxiliar o processo de hidrólise. Então os tubos contendo as amostras em vácuo foram colocados em um forno para incubação a 110° C por 18 horas.



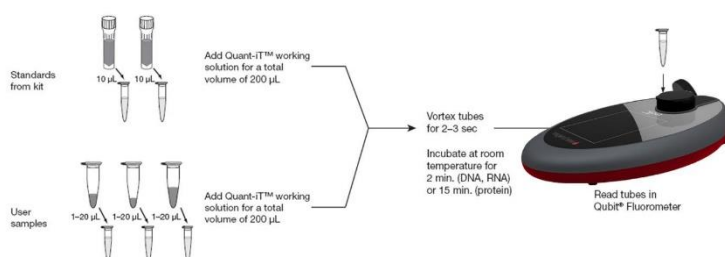
**Figura 17. Frasco de hidrólise.** O recipiente é de vidro pois os componentes da hidrólise são ácido fortes. A direita está o esquema representando a amostras inserida no frasco de hidrólise onde as válvulas em verde e vermelho matém a atmosfera de vácuo dentro do recipiente.

Após a etapa de hidrólise as amostras foram secas e dissolvidas em tampão de corrida (*Biochrom 2.20 citrate buffer*) e transferidos para um injetor acoplado ao equipamento. A análise dos aminoácidos se deu pela reação de derivatização dos mesmo com o composto Nihidrina, tornando assim os aminoácidos detectáveis no comprimento de onda 440-570 nm (Davies, 1973). A análise dos aminoácidos *facility* de análise de aminoácidos do laboratório do *Protein Research Group* em Odense Dinamarca. Após a detecção as massas foram calculadas e a quantificações das amostras foram obtidas baseada no valor referência da aquisição em AAA.

#### *Qubit para quantificação de proteínas e peptídios*

Uma alíquota de 2ul da amostra foi retirada e diluídas em tampão de análise e adicionadas ao reagente fluorescente vendido comercialmente pela Invitrogen. Em um volume final de 200ul as amostras foram analisadas no equipamento portátil Qubit.

Após a leitura de cada amostra o cálculo da concentração final foi feito multiplicando o valor da leitura pelo fato de diluição conforme protocolo do fabricante. Um adendo ao método, para amostras com concentrações acima dos níveis de tolerância de dodecilsulfato de sódio, as mesmas foram diluídas 10 vezes antes da adição dos reagentes do protocolo. O protocolo do fabricante é detalhado a seguir na figura 18.



**Figura 18. Quantificação Qubit.** A figura mostra o esquema de análise indicado pelo fabricante, onde as amostras são misturadas ao marcador fluorescente e após a incubação a intensidade é adquirida no equipamento (Invitrogen).

#### **4.4. Digestão trípica de proteínas**

As amostras proteicas produzidas por esse trabalho foram submetidas a procedimentos de clivagem trípica em solução, sendo de dois tipos: clássica e a em filtro.

##### *Digestão em solução (clássica)*

Para esta etapa foram utilizadas alíquotas de ao menos 40 µg das proteínas provenientes do secretado celular. Os extratos celulares foram diluídos em tampão 0.02 M de TEAB devido a tolerância da tripsina a altas concentrações de ureia presentes no tampão de análise. As amostras então foram adicionadas com 0.1M de Iodoacetamida (IAA) e incubadas por 20 minutos. Após o processo de incubação, 1:100 (µg/µg) de

tripsina foi adicionado à solução. O processo de digestão teve 17 horas de duração a temperatura ambiente, pois ureia em altas temperaturas pode promover modificações nos peptídios. Ao final do processo de incubação a solução foi acidificada com 5% de ácido trifluoracético (TFA) para a parada da reação e para evitar clivagem inespecíficas após o tempo de incubação. Após um minuto de reação a amostra foi estocada a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

#### *Digestão em solução com o uso de filtro concentrador*

Para esta etapa foram utilizadas alíquotas de 100  $\mu\text{g}$  das proteínas, diluídas em ureia 8M e aplicadas em etapas de acordo com a capacidade de saturação do filtro aos componentes do tampão utilizado para a extração das mesmas. O filtro em questão é uma VIVACON 30K (Sartorius) que consiste em uma membrana de celulose do tipo Hydrosart com um poro de 30 kDa.



**Figura 19. Etapas da digestão em filtro.** A etapa 1 é carregamento da amostra no filtro para o processo de lavagem, redução e alquilação. A etapa 2 é a incubação de da amostra reduzida e alquilada com a enzima de clivagem. Na etapa 3 temos a eluição do peptídios.

O lisado celular foi clivado enzimaticamente com tripsina usando um filtro concentrador Vivacon 500 para as etapas de limpeza, concentração e digestão da amostra, como foi descrito por Leon *at el.* 2013. Resumidamente, o lisado proteico foi carregado no filtro e centrifugado a  $10000 \times g$ , e incubado posteriormente com 200 mmol/L DTT por 10 minutos a  $30^{\circ}\text{C}$  como demonstrado na figura 19. Após a etapa de incubação, e com

as proteínas agora reduzidas centrifugamos novamente, e incubamos com 0.05M Iodoacetamida (IAA) por 20 minutos no escuro a temperatura ambiente. Após a etapa de alquilação, as amostras foram lavadas para a retirada de IAA residual. Para amostras *label free* e iTRAQ a lavagem foi feita com o tampão 1% SDC em TEAB 20mmol/L, já as amostras do PRM as lavagens foram feitas com apenas o tampão TEAB 20mmol/L. Para a etapa de clivagem, 0.02 ug/ug de tripsina em tampão TEAB foram adicionados e incubado por 15 horas. A etapa de digestão foi interrompida após o tempo de incubação com TFA. E os peptídios foram eluídos. Para amostras tratadas com SDC o mesmo foi removido por uma etapa de partição de fase com a adição de acetato de etila.

#### **4.5. Marcação química com reagente isobárico**

Uma vez quantificadas, as amostras foram processadas com tripsina, uma vez que a molécula de análise em experimentos *shotgun* são peptídios.

As amostras *label free* foram analisadas em aquisições individuais pelo fato dos peptídios serem analisados in natura, sem qualquer marcação química (Megger, Bracht et al. 2013). No caso das análises de peptídios marcados, as amostras foram analisadas em forma de *pool*. Amostras de cada condição encontram-se marcadas com etiquetas químicas diferenciadas, podemos combinar as amostras e analisá-las em uma única corrida cromatográfica (de Godoy, Olsen et al. 2006; de Godoy, Olsen et al. 2008; de Godoy 2014). As amostras para a marcação isobárica foram colocadas em eppendorf *low binding* para não ocorresse perda de amostra por adsorção a parede do tubo.

Em seguida são contemplados os procedimentos de marcação isobárica tanto para iTRAQ quanto para TMT, tendo em vista que as marcações foram feitas utilizando o protocolo padrão de marcação dos fabricantes, com pequenas modificações na marcação com TMT..

## **iTRAQ**

Para a marcação com iTRAQ, todos os reagentes utilizados foram com alto grau de pureza. Para a realização da marcação tanto os marcadores quanto solventes e buffers foram aclimatados a temperatura ambiente. A marcação isobárica tem como base a marcação de aminas primárias, e o sucesso da marcação depende de características intrínseca ao tampão em que a amostra se encontra. Para evitar qualquer tipo de depleção na marcação as amostras foram previamente limpas em um processo utilizando colunas C18 como demonstrado anteriormente no presente trabalho. A etapa inicial consiste na diluição do marcador com 50  $\mu$ L de isopropanol seguido de incubação os tubos contendo os reagentes precisam ser centrifugados.

O peptídios de cada amostra foram redissolvidos em 20ul de 0.5M TEAB com pH acima de 8.0. As amostras foram incubadas por 1 minuto. O pH de cada amostra foi checado após a redissolução das mesmas. Cuidadosamente cada amostra foi marcada com respectivo canal de marcação separadamente. Onde, o reagente foi adicionado ao tubo da amostra e incubado por 1 hora. Após a incubação foi feito um mini pool com as amostras e as mesmas foram dessalinizadas e a marcação foi checada utilizando um Orbitrap Velos (dados não mostrados). Após a checagem da marcação as amostras foram combinadas e um único tubo. As amostras combinadas foram secas por centrifugação a vácuo.



## TMT

Para a marcação com TMT, todos os reagentes utilizados foram com alto grau de pureza. Para a realização da marcação tanto os marcadores quanto solventes e buffers foram aclimatados a temperatura ambiente. A marcação isobárica tem como base a marcação de aminas primárias, e o sucesso da marcação depende de características intrínseca ao tampão em que a amostra se encontra. Para evitar qualquer tipo de depleção na marcação as amostras foram previamente limpas em um processo utilizando colunas C18 como demonstrado anteriormente no presente trabalho.

A etapa inicial da marcação com TMT o reagente já em temperatura ambiente precisa ser diluído em acetonitrila anidra e deixar incubando por 5 minutos com leve vortex para evitar a perda de material na tampa do tubo. Após a incubação os tubos contendo os reagentes precisam ser centrifugados.

O peptídios de cada amostra foram redissolvidos em 75ul de 0.1M TEAB com pH acima de 8.0. As amostras foram incubadas por 1 minuto. O pH de cada amostra foi checado após a redissolução das mesmas. Cuidadosamente cada amostra foi marcada com respectivo canal de marcação separadamente. Onde, o reagente foi adicionado ao tubo da amostra e incubado por 1 hora. Após a etapa de incubação foram adicionados 5% de hidroxilamina na amostra e incubado por 15 minutos, pois a hidroxilamina promove inativação das moléculas de TMT livres presentes na amostra. Após a incubação foi feito um mini pool com as amostras e as mesmas foram dissalinizadas e a marcação foi checada utilizando um Orbitrap Velos (dados não mostrados). Após a checagem da marcação as amostras foram combinadas e um único tubo. As amostras combinadas foram secas por centrifugação a vácuo.

Para otimizar a cobertura de identificação o fracionamento das amostras marcadas foi feito utilizando a estratégia HILIC, que aumenta a eficiência para a análise de proteoma complexos (Picotti, Bodenmiller et al. 2009).

#### **4.6. Purificação de peptídeos**

Os peptídeos provenientes da etapa de digestão foram então dessalinizados em colunas contendo a resina Poros R2. A resina contém partículas C18 com caudas hidrofóbicas que interagem com os peptídeos, proporcionando a retiradas de sal da amostra e sua subsequente eluição.

Resumidamente, o procedimento de dessalinização foi executado a partir de ponteiros do tipo *gel loader ou P200* empacotadas com a resina Poros R2, formando uma mini coluna de dessalinização. Em cada uma dessas mini colunas foi aplicado 100ug de digesto proteico (peptídeos). Os peptídeos trípticos foram aplicados na coluna já equilibrada. Logo, os peptídeos se ligaram por grau de hidrofobicidade as caudas da resina. Os peptídeos ligados a coluna foram lavados em três etapas, estas que consistiam em utilizar a concentração de 0.1% de TFA para a retirada total de sais e resíduos de reagentes provenientes de etapas anteriores. Após o processo de lavagem os peptídeos foram eluídos da coluna com o auxílio de uma solução de 80% de acetonitrila (Thingholm, Jorgensen et al. 2006). Os peptídeos eluídos foram secos em *speedvac*, e posteriormente armazenados a -80°C.

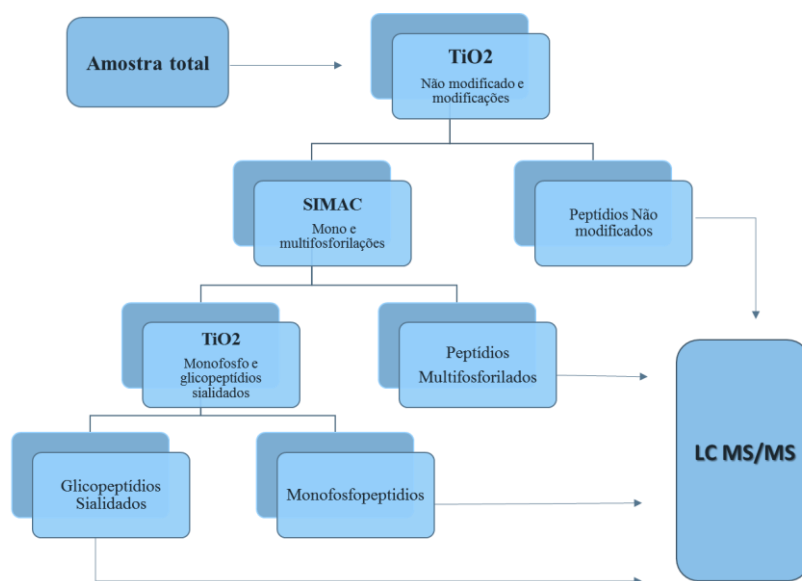
#### **4.7. Enriquecimento de modificações pós traducionais**

##### *Enriquecimento usando imunoprecipitação com anticorpo anti-acetilisina*

O enriquecimento para proteínas acetiladas é feito com o auxílio do anticorpo anti-acetilisina. A amostra contendo os peptídios dessalinizados foram redissolvidas em tampão de imunoprecipitação (pH 8) e então incubadas com o anticorpo anti-acetilisina (Immune Chem Pharmaceuticals Inc., Burnaby, Canadá) por 12 horas em agitação a 4°C. Após a incubação, as amostras foram centrifugadas e recolhido o sobrenadante em um novo eppendorf (FT tampão-Acetilação).

##### *Enriquecimento sequencial para mono-multifosforilações e glicopeptídios sializados*

As amostras foram enriquecidas para diferentes modificações pós traducionais de forma sequencial. O método utilizado foi publicado pelo grupo do professor Martin Larsen da Universidade do sul da Dinamarca, local onde realizei meu doutorado sanduíche. A seguir o fluxo de trabalho na figura 20, para o enriquecimento sequencial proposto por Melo-Braga em 2014 (Melo-Braga, Schulz et al. 2014).



**Figura 20. Fluxograma de enriquecimento sequencial.** Uma estratégia que utiliza tanto SIMAC quanto TiO<sub>2</sub> para o enriquecimento de diferentes modificações pós traducionais. As etapas sequenciais possibilitam o maior aproveitamento das amostras. Sendo assim possível uma maior cobertura do proteoma.

#### *Enriquecimento de modificados- Dióxido de titânio (TiO<sub>2</sub>)*

O método consiste primeiramente no enriquecimento de fosfopeptídios, glicopeptídios sializados e na separação peptídios não modificados numa etapa de enriquecimento com partículas de TiO<sub>2</sub>.

#### *Deglicosilação*

Os fosfopeptídios e glicopeptídios contendo ácido siálico eluídos no enriquecimento com TiO<sub>2</sub>, foram ressuspensos em 50uL de TEAB 20 mM (pH 8.0), tratados com N-glicosidase F (2 uL) e Sialidase A (0.5 uL) e incubados por 18 horas a 37°C.

### *Enriquecimento SIMAC para multifosforilações*

Para a etapa inicial do procedimento as partículas revestidas de ferro (PhosSelect IMAC *beads* –Sigma Aldrich, St. Louis, MO), Os fosfopeptídios e peptídios deglicosilados oriundos da deglicosilação, foram acidificados para a retirada dos monofosforilados e peptídios deglicosilados. A fração multifosforilada foi dessalinizada e analisada posteriormente por LC-MS/MS. O eluído-IMAC foi combinado com o filtrado contendo peptídios deglicosilados e monofosforilados foram então secos e submetidos a um novo enriquecimento com TiO<sub>2</sub>.

### *Enriquecimento TiO<sub>2</sub> para monofosforilados e peptídios deglicosilados*

As frações destinadas ao segundo enriquecimento com TiO<sub>2</sub> (Eluído-IMAC) foram secas e solubilizadas em 10 µL de 0,1% TFA. O pH da amostra foi ajustado utilizando 200µL da solução (70%ACN em 2%TFA). Depois seguiu-se o mesmo protocolo do primeiro enriquecimento. Onde ao passar pela coluna os monofosforilados se aderiram e os deglicosilados foram filtrados. Deste segundo enriquecimento são os peptídios deglicosilados. Enquanto a fração aderida TiO<sub>2</sub> foi eluída da mesma forma que na etapa anterior do titânio, onde obtivemos a fração de peptídios monofosforilados. As duas frações foram dessalinizadas separadamente e enviadas para o fracionamento com HILIC.

## **4.8. Fracionamento de amostra usando método HILIC**

O fracionamento de proteínas é uma técnica utilizada para simplificação de amostras. A utilização de partículas com grupos carregados negativamente, possibilitam as amostras serem separadas por hidrofobicidade.

Resumidamente, os peptídios trípticos marcados e não marcados foram fracionados usando HILIC (HPLC Agilent 1200 Serie, Agilent, Santa Clara CA). Antes de cada amostra o sistema foi estabilizado com “Branco” (40 µL ACN 100%; 0.4 µL TFA 10%; 3.5µL água). As amostra foram carregadas uma a uma em uma coluna capilar (450 µm OD x 320 µm ID x 17 cm) empacotada com TSK Amide-80- uma partícula de 3µm- (Tosoh Bioscience, Stuttgart, Germany). Os peptídios em um volume de 3.5µL foram ressuspensos em 40µL ACN 100% e 0.4µL TFA 10% e eluídos durante 48 minutos com os tampões de Solução A (ACN 90%/TFA 0.1%) para a Solução B (ACN 0,1%/TFA 0.1%).

As frações foram coletadas por um sistema automatizado e aplicadas em uma placa de 96 poços nova. Após o fracionamento as amostras foram secas a vácuo. As frações foram combinadas manualmente usando ácido fórmico 0.1% de acordo com a absorbância de cada fração. As absorbâncias acima de 750 mAU, foram recolhidas isoladamente.

#### **4.9. Espectrometria de massas**

O processamento dos extratos proteicos totais foi realizado pelos processos de digestão, marcação ou não de peptídios e fracionamento, os peptídios trípticos foram submetidos ao processo de dessalinização. Para as amostras marcadas foram utilizados métodos de fracionamento em colunas de fase normal do tipo HILIC para simplificação das amostras (Melo-Braga, Schulz et al. 2014), visando obter o maior número possível de medidas nas análises por LC-MS/MS.

Para a aquisição de dados de amostras de peptídios modificados e não modificados foram utilizados espectrômetros de massa de alta resolução da família Orbitrap. Esses equipamentos são de alta acurácia, proporcionando a identificação de milhares de proteínas em um único experimento (Marakarov, 2006 (Makarov, Denisov et al. 2006)). Ademais, utilizamos a combinação de métodos complementares que possibilitassem a maior cobertura de identificação.

#### *LC MS/MS de proteínas totais não enriquecidas Label free*

Peptídios trípticos (2 $\mu$ g) foram submetidos a uma nano cromatografia em fase reversa acoplada a um espectrômetro de massa de alta resolução do tipo LTQ Orbitrap Velos e Elite (Thermo). Os peptídios dessalinizados de cada fração advinda de cada amostra foram injetadas em uma coluna preparativa (3cm comprimento x 100 $\mu$ m diâmetro interno) feita a partir de um empacotamento manual de da resina *reprosil pur* C18 AQ 5 $\mu$ m em tampão A (0,1% ácido fórmico, 5% acetonitrila) para limpar a amostra. Então, injetadas em uma coluna analítica de 20 cm de comprimento e empacotada com resina *reprosil pur* C18 AQ 3 $\mu$ m. Os peptídios foram eluídos usando um nano HPLC nano LC (Dionex 3000) acoplado a um espectrômetro de massa do tipo LTQ Orbitrap Velos (Thermo) com o uso de cromatografia em fase reversa usando um gradiente de 240 minutos de duração. A fase móvel A consistia de 0,1% (v/v) de ácido fórmico diluído em água, e a fase móvel B consistia de 0,1% de ácido fórmico em 95% de acetonitrila. A condição do gradiente foi: 5% a 35% de solvente B em 50 minutos, até 100% de B em 1 minuto e manutenção dessa concentração durante 10 minutos antes de se repetir o equilíbrio da coluna. Os peptídios foram eluídos, sendo diretamente introduzidos a partir

da ponta da coluna (em agulha) para o espectrômetro de massa por meio da fonte de íons do tipo *nanospray*. O contato elétrico foi fornecido por uma junção líquida colocada entre a coluna *preparatória* e a coluna analítica.

A voltagem de ionização na source foi selecionada para 2.1 kV e temperatura capilar de transferência de íons ajustada para 275°C. Os valores alvos para “Ion Trap MSn AGC” foi de 10.000, enquanto pesquisa de AGC –FTMS foi estabelecida em 1.000.000. Os dados foram adquiridos pelo método DDA em modo *high-low* (orbitrap-ion trap), ou seja, os dados foram analisados baseados em um método analisa os íons de MS1 em alta resolução no analisador Orbitrap e os 15 íons MS1 mais intensos são selecionados para fragmentação. Os fragmentos ionizados (MS2) são analisados no *ion trap* em menor resolução, porém maior rapidez.

Os espectros (MS1) foram gerados no analisador Orbitrap (300 a 1650 m/z) em uma resolução de 60.000 (FWHM a 400 m/z), sendo que para cada espectro MS1 os 15 íons mais intensos foram submetidos a uma fragmentação do tipo CID no analisador “trap” no modo linear com uma janela de isolamento de 2.5Da; energia de colisão normalizada de 35%; ativação Q de 0,25 e tempo de ativação de 30s. A exclusão dinâmica foi habilitada, sendo configurada da seguinte forma: contagem de repetição = 1; tamanho da lista de exclusão = 500; duração da exclusão = 90s e faixa da massa de exclusão de 10ppm. Os dados foram coletados no modo de profile (modo necessário para a quantificação *label-free* por extração de área total) tanto para MS1 quanto para MS2.



## *LC MS/MS de proteoma total e enriquecimentos iTRAQ*

Os peptídios dessalinizados de cada fração de cada amostra, tanto dos peptídios não modificados quanto dos enriquecimentos foram injetadas em uma coluna preparativa (3cm comprimento x 100µm diâmetro interno) feita a partir de um empacotamento manual de resina *reprosil pur* C18 AQ 5µm em tampão A (0,1% ácido fórmico, 5% acetonitrila) para limpar a amostra. Então, injetadas em uma coluna analítica de 20 cm de comprimento e empacotada com resina *reprosil pur* C18 AQ 3µm. Os peptídios foram eluídos usando um nano HPLC Easy-nLC II (Thermo, Dinamarca) com o uso de cromatografia em fase reversa usando um gradiente de 240 minutos de duração. O gradiente foi otimizado assim, de 0 até 34% de tampão B (95% Acetonitrila, 0,1 ácido fórmico) .A condição do gradiente foi: 0% a 34% de solvente B em 50 minutos, até 100% de B em 1 minuto e manutenção dessa concentração durante 10 minutos antes de se repetir o equilíbrio da coluna com o fluxo de 250nL/min direcionando as moléculas para dentro do espectrômetro de massas Orbitrap Q Exactive Plus (Thermo Fischer Scientific, Bremen, Germany).

Os espectros (MS1) foram gerados no analisador Orbitrap (400-1400 m/z) em uma resolução de 70.000 (FWHM a 400 m/z), AGC de  $1 \times 10^6$  ions com o tempo de injeção (TI) de 120 milissegundos. Então, para cada espectro MS1 os 10 íons mais intensos foram submetidos a uma fragmentação MS2 com energia de colisão HCD, com 1750 FWHM de resolução e o a faixa de varredura de 200-2000 m/z; energia de colisão normalizada de 35%; e tempo de ativação de 30s. A exclusão dinâmica foi habilitada, sendo configurada da seguinte forma: contagem de repetição = 1; tamanho da lista de exclusão = 500; duração da exclusão = 90s e faixa da massa de exclusão de 10ppm.

## *LC MS/MS do Secretoma*

Os peptídios dessalinizados de cada fração de cada amostra, foram injetadas em uma coluna preparativa (3cm comprimento x 100µm diâmetro interno) feita a partir de um empacotamento manual de resina *reprosil pur* C18 AQ 5µm em tampão A (0,1% ácido fórmico, 5% acetonitrila) para limpar a amostra. Então, injetadas em uma coluna analítica de 15 cm de comprimento e empacotada com resina *reprosil pur* C18 AQ 3µm. Os peptídios foram eluídos usando um nano HPLC Easy-nLC II (Thermo, Dinamarca) com o uso de cromatografia em fase reversa usando um gradiente de 135 minutos de duração. O gradiente foi otimizado assim, de 0 até 34% de tampão B (95% Acetonitrila, 0.1% ácido fórmico) em 50 minutos de gradiente com o fluxo de 250nL/min direcionando as moléculas para dentro do espectrômetro de massas Orbitrap Fusion Lumos (Thermo Fischer Scientific Bremen, Germany).

Os espectros (MS1) foram gerados no analisador Orbitrap (400-1600 m/z ) em uma resolução de 120.000 (FWHM a 400 m/z), AGC de  $1 \times 10^7$  ions com o tempo de injeção (TI) de 50 milissegundos. Então, para cada espectro MS1 os 15 íons mais intensos foram submetidos a uma fragmentação MS2 com energia de colisão HCD, com 30000 FWHM de resolução e o a faixa de varredura de 110- 2000 m/z; energia de colisão normalizada de 38%; e tempo de exclusão dinâmica de 30s.

### **4.10. Identificação de proteínas e análise de dados**

#### *Identificação de proteínas e quantificação label free*

Os arquivos *Raw* adquiridos nas experiências foram submetidos ao alinhamento de cromatografia iônica precursora no software *Progenesis IQ*. Os espectros alinhados

foram filtrados pelo estado de carga e submetidos à análise ANOVA. As características diferenciais ( $p < 0,05$ ) foram identificadas por sequenciamento *de novo* e pesquisa de banco de dados usando o *software Peaks v.7*. Os parâmetros de pesquisa foram: banco de dados NCBIInr, taxonomia *Homo sapiens*; Carbamidometilação de cisteínas como modificação fixa e oxidação de metionina como modificação variável; Máximo de 2 clivagens perdidas; Tolerância de erro de precursor de 10 ppm, tolerância de erro de fragmento de 0,5 Da. Os resultados dos Picos foram validados com base nos *scores* de íons peptídicos, número de peptídios únicos e *false Discovery rate* (FDR = 0.01). Os peptídios identificados foram exportados novamente para *Progenesis* para PCA multivariada e análise de agrupamento, bem como o teste de ANOVA foi aplicado no nível de proteína ( $q \text{ valor} \leq 0,05$ ).

Em mais detalhes, as amostras de peptídios não modificados e não marcados foram adquiridas utilizando três diferentes espectrômetros, Orbitrap Velos, Q Exactive e Elite. Para análises de peptídios não modificados não marcados, o processamento dos peptídios de cada amostra foi analisado separadamente gerando um arquivo com extensão (.raw). A partir dos dados gerados pelos analisadores de massas, os arquivos de cada amostra foram encaminhados para a etapa de processamento computacional.

O tratamento de dados *label free* apresenta diversas peculiaridades intrínsecas a cada algoritmo de análise. Para esse conjunto de dados foram utilizadas inicialmente ferramentas que proporcionam a avaliação tanto de reprodutibilidade como de eficiência de parâmetros dos analisadores de massa. A avaliação da qualidade dos dados gerados tanto da condição controle como da experimental (fMLP) atribui maior confiabilidade ao conjunto de dados; pois, em abordagens *label free* o critério de reprodutibilidade reflete

diretamente na identificação e quantificação final das proteínas. Para esse tipo de análise foram utilizados softwares como RawMeat, Xcalibur e Perseus.

Os dados gerados por analisadores de massas forneceram informações sobre os peptídeos no que tange a seu tempo de retenção na coluna analítica e sua relação massa/carga. Caso o peptídeo tenha sido fragmentado, também são informadas as sequências e outros parâmetros que conferem exatidão e acurácia na identificação destes fragmentos. As abordagens de aquisição de amostras utilizadas para este trabalho geraram milhares de bits de informação, sendo necessários auxílio de ferramentas robustas para analisar os dados. Diante disso, foram utilizadas ferramentas de bioinformática para deconvoluir os dados dos arquivos (.raw). Esses softwares são compostos por algoritmos treinados a fazer a comparação de dados experimentais com dados teóricos presentes em bancos de dados. Para os dados *label-free* foi utilizado o software *Progenesis-LC*.

O *Progenesis-LC* é uma ferramenta de análise de dados *label-free* que proporciona o refinamento da análise baseado no desenho experimental. Esse refinamento promove maior confiabilidade aos resultados de identificação e quantificação. A identificação e quantificação de dados é feita pela ferramenta auxiliar PEAKS. A junção dessas duas ferramentas de análise, auxilia tanto na identificação como na quantificação no *Progenesis-LC*.

Os dados gerados pela análise inicial em nível de peptídeos deram origem a uma lista de dados estatisticamente filtrados (ANOVA, p-valor menor ou igual a 0.05). Esses dados foram utilizados pelo software PEAKS a fim de identificar e quantificar proteínas pelo sequenciamento *de novo* de peptídeos a partir de espectros de MS/MS e da correlação entre as razões de massa/carga dos peptídeos experimentais contra os teóricos do banco de dados.

A partir dessa análise estatística das identificações, foi feita uma análise para falsos positivos (FDR, do inglês, *False Discovery Rate*). FDR se baseia na relação de sequências decoy – dados gerados pela inversão das sequências identificadas no experimento – que também foram identificadas, quando alinhadas com o banco de dados do organismo. A porcentagem dessas sequências identificadas lhe dá uma estimativa sobre quantos falsos positivos existem na sua amostra; sendo possível assim restringir os parâmetros de identificação e diminuir a porcentagem de erros. Segundo dados da literatura os valores de FDR devem sempre estar abaixo de 1% para aumentar a confiabilidade nas análises proteômicas (Maiolica, Junger et al. 2012).

#### *Identificação de proteínas e quantificação de marcação isobárica*

Para a análise de dados das amostras marcadas com iTRAQ com peptídios não modificados e enriquecidos, foi utilizado o espectrômetro de massas Q-Exactive (Thermo scientific) e para a aquisição dos dados do secretoma, marcado com TMT, o espectrômetro utilizado foi o Orbitrap Fusion Lumos, um dos mais novos espectrômetros da família Orbitrap.

Os arquivos *Raw* adquiridos nos experimentos foram submetidos a buscas de banco de dados usando o *software Proteome Discoverer 1.4* (Thermo Fischer, Alemanha) com os mecanismos de busca *Mascot* e *Sequest HT* no. Os parâmetros de pesquisa foram: banco de dados NCBIInr, taxonomia *Homo sapiens*; Carbamidometilação de cisteínas como modificação fixa e oxidação de metionina como modificação variável; Máximo de 2 clivagens perdidas; Tolerância de erro de precursor de 10ppm, precisão de fragmento de 15ppm. Os resultados do *Proteome Discoverer* foram validados com base nos escores de íons peptídicos, na classificação do motor de busca, no estado da carga e no Delta Cn.

Os dados de quantificação dos íons repórter para os peptídios identificados do Proteome Discoverer foram exportados para o software Inferno RDN para analisar o significado da abundância diferencial proteica. As intensidades de íons do relatório foram centralizadas, transformadas logarítmicas, normalizadas e inferidas ao nível da proteína usando o modo médio do peptídio acumulado do software. O teste Anova foi aplicado para verificar o significado da regulação proteica (valor  $p \leq 0.05$ ).

Os dados confrontados com o banco de dados foram filtrados baseados no cálculo de *False Discovery Rate* (FDR), que estima a porcentagem de falsos positivos identificados na amostra, sendo utilizados o valor máximo de FDR de 0.01 para as amostras desse presente trabalho. Para que o conjunto de dados fosse de alta confiança, alguns filtros de dados adicionais foram utilizados: *Peptide rank*, *Peptide Confidence (high)*, *Search Engine Rank* (1 para peptídios não modificados), *Peptide score* (22), *Score versus Charge state* e o *Peptide Delta Cn* (máximo de 1).

Os dados filtrados foram tratados previamente no programa Excel para que as lista de peptídios fosse combinadas entre as amostras, uma vez que a marcação com o reagente iTRAQ foi feita de forma cruzada. A marcação cruzada é um tipo de marcação onde os canais de marcação são sorteados entre as amostras dentro de uma replicata, sendo assim o canal 114 por exemplo foi para marcação da condição quiescente da replicata biológica 1, entretanto na replicata 2 o canal 114 representa a condição fMLP. Representando assim uma marcação cruzada, inviabilizando o programa *Proteome Discoverer* (PD) de analisar as amostras. Sendo assim, para a análise estatística foram utilizados algoritmos externos ao programa PD. Os programas de análise utilizado neste presente trabalho para análises de amostras marcadas foram ferramenta de análise baseada

na linguagem R. Os filtros estatísticos foram feitos utilizando ANOVA, sendo aceitos como válidos apenas peptídios que apresentaram p-valor menor ou igual a 0.05.

#### **4.11. Agrupamentos de proteínas**

A estratégia de agrupamento dos dados para análise foi feita baseada na junção das proteicas identificadas nos experimentos de proteínas totais e secretoma. As proteínas identificadas foram classificadas de acordo com os termos de ontologia do gene (GO) para anotações de proteínas (Chitale 2009). Neste estudo, as anotações foram aplicadas usando os *softwares Reactome e Panther*, que avaliam a confiabilidade da predição com base na sequência da proteína, do termo GO, dos domínios proteicos e das suas interações.

Os dados inseridos em cada programa foram as entradas *uniprot* e o nome do gene referente a cada proteína. O agrupamento feito por essas ferramentas é baseado em informações de bancos de dados experimentais, portanto a inferência de informações é baseada em resultados prévios, tornando essas ferramentas um pouco limitada para novas descobertas.

A discussão foi gerada baseada na junção dos dados de proteínas que foram reguladas pelo estímulo com fMLP, onde todas as proteínas reguladas tanto de total quanto do secretoma foram analisadas e agrupadas para a interpretação biológica dos dados e esclarecimento sobre as vias intracelulares.

## **5. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Neutrófilos humanos são os leucócitos mais abundantes do sangue periférico, e são responsáveis pela linha de frente de defesa do sistema imune inato. A ativação de desse tipo de célula de defesa é descrita como rápida e eficaz, promovendo diversas modificações na célula e em seus mecanismos de comunicação com outras células. Os mecanismos disparados pela ativação envolvem diferentes tipos de vias intracelulares. Inicialmente, essas mudanças são estimuladas pela ativação de receptores de membrana por moléculas extracelulares, promovendo a transdução de sinal para o ambiente intracelular. Apesar de existir um amplo número de estudos envolvendo as proteínas envolvidas nessas modificações, muitas lacunas precisam ainda ser preenchidas. Sendo assim, a junção de uma análise da biologia de sistemas celulares de neutrófilos acrescida da identificação das proteínas envolvidas nesses processos foi elaborada com a intenção de aumentar o espectro de informações sobre os caminhos de sinalização envolvidos na resposta imune.

### **Amostras proteicas**

Neutrófilos quiescentes e ativados com fMLP foram submetidos à extração de proteínas pela utilização de detergentes e agentes caotrópicos. As células foram lisadas tanto por sonicação em tampão dodecil sulfato de sódio (SDS), quanto com uma mistura de SDS e agentes como uréia e tiouréia como descritos nos métodos. A utilização de diferentes tipos de tampões de extração foram essenciais para ampliar a cobertura do



proteoma. Uma vez que a quantidade de proteínas identificadas na mistura de tampões foi superior à do tampão unicamente com SDS.

Após o processo de lise, as proteínas foram quantificadas por dois diferentes métodos. A quantificação pela análise de aminoácidos demonstrou que o método de extração é reprodutível, pois a quantidade de células que foi usada para cada amostras foi de no mínimo  $5 \times 10^6$  células. A variação entre as quantidades iniciais de células não influenciaram no resultado final da proteômica pois as análises foram normalizadas pela quantificação proteica. A quantificação para cada ensaio é apresentada abaixo nas tabelas de 1 a 5.

**Tabela 1. Dados coletados durante o preparo de amostra para o experimento *label free* usando Orbitrap Velos.**

| <i>Label free</i> Orbitrap VELOS |          |                 |       |          |                      |             |                      |
|----------------------------------|----------|-----------------|-------|----------|----------------------|-------------|----------------------|
| Label                            | Condição | Sangue vol (mL) | lises | células  | vol de ptn sol. (uL) | AAA (ug/uL) | Concen. Injeção (ug) |
| 01_RQ                            | Controle | 21              | 2     | 6.00E+06 | 200                  | 2.27        | 2                    |
| 05_EQ                            | Controle | 15              | 2     | 5.00E+06 | 200                  | 0.95        | 2                    |
| 09_CQ                            | Controle | 14              | 2     | 4.90E+06 | 200                  | 1.6         | 2                    |
| 13_AQ                            | Controle | 24              | 2     | 1.00E+07 | 200                  | 2.4         | 2                    |
| 17_DQ                            | Controle | 18              | 2     | 5.10E+06 | 200                  | 2.49        | 2                    |
| 03_RF                            | fMLP     | 21              | 2     | 6.00E+06 | 200                  | 1.53        | 2                    |
| 07_EF                            | fMLP     | 15              | 2     | 5.00E+06 | 200                  | 0.84        | 2                    |
| 11_CF                            | fMLP     | 14              | 2     | 4.90E+06 | 200                  | 1.46        | 2                    |
| 15_AF                            | fMLP     | 24              | 2     | 1.00E+07 | 200                  | 2.39        | 2                    |
| 19_DF                            | fMLP     | 18              | 2     | 5.10E+06 | 200                  | 2.2         | 2                    |

**Tabela 2. Dados coletados durante o preparo de amostra para o experimento *label free* usando Orbitrap Q Exactive.**

| <i>Label free</i> Orbitrap Q EXACTIVE |          |                 |       |          |                      |                  |                      |
|---------------------------------------|----------|-----------------|-------|----------|----------------------|------------------|----------------------|
| Label                                 | Condição | Sangue vol (mL) | lises | células  | vol de ptn sol. (uL) | AAA conc (ug/uL) | Concen. Injeção (ug) |
| 1C                                    | Controle | 22              | 2     | 1.00E+07 | 200                  | 0.45             | 2                    |
| 2C                                    | Controle | 20              | 2     | 7.50E+06 | 200                  | 0.5              | 2                    |
| 3C                                    | Controle | 18              | 2     | 7.00E+06 | 200                  | 0.57             | 2                    |
| 4C                                    | Controle | 22              | 2     | 8.00E+06 | 200                  | 0.64             | 2                    |
| 5C                                    | Controle | 22              | 2     | 9.00E+06 | 200                  | 0.75             | 2                    |
| 1F                                    | fMLP     | 22              | 2     | 1.00E+07 | 200                  | 0.56             | 2                    |
| 2F                                    | fMLP     | 20              | 2     | 7.50E+06 | 200                  | 0.55             | 2                    |
| 3F                                    | fMLP     | 18              | 2     | 7.00E+06 | 200                  | 0.48             | 2                    |
| 4F                                    | fMLP     | 22              | 2     | 8.00E+06 | 200                  | 0.63             | 2                    |
| 5F                                    | fMLP     | 22              | 2     | 9.00E+06 | 200                  | 0.51             | 2                    |

**Tabela 3. Dados coletados durante o preparo de amostra para o experimento *label free* usando Orbitrap Elite.**

| <i>Label free</i> Orbitrap ELITE |          |                 |       |          |                     |            |                      |
|----------------------------------|----------|-----------------|-------|----------|---------------------|------------|----------------------|
| Label                            | Condição | Sangue vol (mL) | lises | células  | Buffer de lise (uL) | Qubit (ug) | Concent injeção (uL) |
| 1C                               | Controle | 22              | 2     | 5.00E+06 | 500                 | 1.25       | 2                    |
| 2C                               | Controle | 22              | 2     | 5.00E+06 | 500                 | 1.2        | 2                    |
| 3C                               | Controle | 22              | 2     | 5.00E+06 | 500                 | 1.1        | 2                    |
| 1F                               | fMLP     | 22              | 2     | 5.00E+06 | 500                 | 1.9        | 2                    |
| 2F                               | fMLP     | 22              | 2     | 5.00E+06 | 500                 | 1.8        | 2                    |
| 3F                               | fMLP     | 22              | 2     | 5.00E+06 | 500                 | 1.4        | 2                    |

**Tabela 4. Dados coletados durante o preparo de amostra para o experimento iTRAQ total e modificações usando Orbitrap Q Exactive.**

| iTRAQ total e modificações pós traducionais |          |                 |       |          |                     |                  |              |               |
|---|----------|-----------------|-------|----------|---------------------|------------------|--------------|---------------|
| Label                                       | Condição | Sangue vol (mL) | lises | células  | Buffer de lise (uL) | AAA conc (ug/uL) | iTRAQ chanel | Conc. Injeção |
| 1C  | Controle | 22              | 2     | 1.00E+07 | 200                 | 0.32             | 114          | 2             |
| 2C  | Controle | 20              | 2     | 7.50E+06 | 200                 | 0.75             | 115          | 2             |
| 3C  | Controle | 18              | 2     | 7.00E+06 | 200                 | 0.88             | 116          | 2             |
| 4C  | Controle | 22              | 2     | 8.00E+06 | 200                 | 1.15             | 177          | 2             |
| 5C  | Controle | 22              | 2     | 9.00E+06 | 200                 | 1.67             | 117          | 2             |
| 1F  | fMLP     | 22              | 2     | 1.00E+07 | 200                 | 0.38             | 116          | 2             |
| 2F  | fMLP     | 20              | 2     | 7.50E+06 | 200                 | 1.07             | 117          | 2             |
| 3F  | fMLP     | 18              | 2     | 7.00E+06 | 200                 | 0.44             | 114          | 2             |
| 4F  | fMLP     | 22              | 2     | 8.00E+06 | 200                 | 0.97             | 115          | 2             |
| 5F  | fMLP     | 22              | 2     | 9.00E+06 | 200                 | 1.16             | 115          | 2             |

**Tabela 5. Dados coletados durante o preparo de amostra para o experimento análise de secretoma usando Orbitrap Fusion Lumos.**

| Secretoma TMT |          |                 |       |          |                |                     |               |          |            |
|---------------|----------|-----------------|-------|----------|----------------|---------------------|---------------|----------|------------|
| Label         | Condição | Sangue vol (mL) | lises | células  | Secretado (uL) | Buffer de lise (uL) | Qubit (ug/uL) | ug label | TMT chanel |
| 1C            | Controle | 22              | 3     | 1.00E+07 | 500            | 20                  | 1.25          | 20       | 126        |
| 2C            | Controle | 20              | 3     | 7.00E+06 | 500            | 20                  | 1.2           | 20       | 127N       |
| 3C            | Controle | 18              | 3     | 7.00E+06 | 500            | 20                  | 1.1           | 20       | 127C       |
| 4C            | Controle | 22              | 3     | 7.00E+06 | 500            | 20                  | 1.9           | 20       | 128N       |
| 5C            | Controle | 22              | 3     | 1.10E+07 | 500            | 20                  | 1.8           | 20       | 128C       |
| 1F            | fMLP     | 22              | 3     | 1.00E+07 | 500            | 20                  | 1.4           | 20       | 129N       |
| 2F            | fMLP     | 20              | 3     | 7.00E+06 | 500            | 20                  | 1.9           | 20       | 129C       |
| 3F            | fMLP     | 18              | 3     | 7.00E+06 | 500            | 20                  | 1.2           | 20       | 130N       |
| 4F            | fMLP     | 22              | 3     | 7.00E+06 | 500            | 20                  | 1.7           | 20       | 130C       |
| 5F            | fMLP     | 22              | 3     | 1.10E+07 | 500            | 20                  | 2.4           | 20       | 131        |

**Tabela 6. Dados coletados durante o preparo de amostra para o experiment análise de PRM label free usando Orbitrap Q Exactive.**

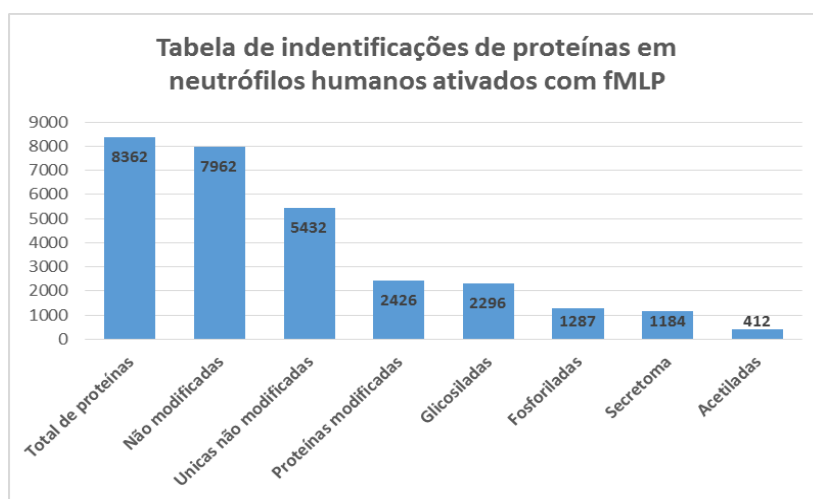
| PRM Label free |          |                 |       |          |             |                   |                      |
|----------------|----------|-----------------|-------|----------|-------------|-------------------|----------------------|
| Label          | Condição | Sangue vol (mL) | lises | células  | lisado (uL) | Qubitconc (ug/uL) | Concen. Injeção (ug) |
| 1C             | Controle | 22              | 3     | 1.00E+07 | 200         | 0.45              | 2                    |
| 2C             | Controle | 20              | 3     | 5.80E+06 | 200         | 0.5               | 2                    |
| 3C             | Controle | 22              | 3     | 7.00E+06 | 200         | 0.58              | 2                    |
| 4C             | Controle | 18              | 3     | 7.00E+06 | 200         | 0.57              | 2                    |
| 5C             | Controle | 22              | 3     | 7.00E+06 | 200         | 0.53              | 2                    |
| 6C             | Controle | 22              | 3     | 1.16E+07 | 200         | 0.64              | 2                    |
| 7C             | Controle | 22              | 3     | 5.00E+06 | 200         | 0.57              | 2                    |
| 8C             | Controle | 22              | 3     | 5.00E+06 | 200         | 0.75              | 2                    |
| 1F             | fMLP     | 22              | 3     | 1.00E+07 | 200         | 0.56              | 2                    |
| 2F             | fMLP     | 20              | 3     | 5.80E+06 | 200         | 0.55              | 2                    |
| 3F             | fMLP     | 22              | 3     | 7.00E+06 | 200         | 0.27              | 2                    |
| 4F             | fMLP     | 18              | 3     | 7.00E+06 | 200         | 0.48              | 2                    |
| 5F             | fMLP     | 22              | 3     | 7.00E+06 | 200         | 0.47              | 2                    |
| 6F             | fMLP     | 22              | 3     | 1.16E+07 | 200         | 0.63              | 2                    |
| 7F             | fMLP     | 22              | 3     | 5.00E+06 | 200         | 0.54              | 2                    |
| 8F             | fMLP     | 22              | 3     | 5.00E+06 | 200         | 0.51              | 2                    |

### **Perfis do Proteoma total, de modificações pós traducionais e secretoma de neutrófilos humanos**

Utilizando a estratégia descrita acima este presente trabalho identificou um total de 8362 proteínas combinando dados de peptídios não modificados, modificados e secretoma. Sendo então a maior identificação de proteínas em neutrófilos até então na literatura.

A análise de proteínas totais desse trabalho identificou o total de 7962 proteínas, sendo que apenas 5432 proteínas apresentaram peptídios únicos, combinando os dados

de amostras marcadas e não marcadas, bem como as diversas abordagens de espectrometria. Foram identificadas no total 2426 proteínas contendo peptídios modificados, produto dos enriquecimentos de fosfopeptídios 1487, glicopeptídios sializados 2296, acetilpeptídios 412 e, nas amostras de proteínas não enriquecidas identificadas no secretoma, 1660 proteínas foram identificadas, sendo 1184 proteínas únicas, conforme ilustra a figura 22.

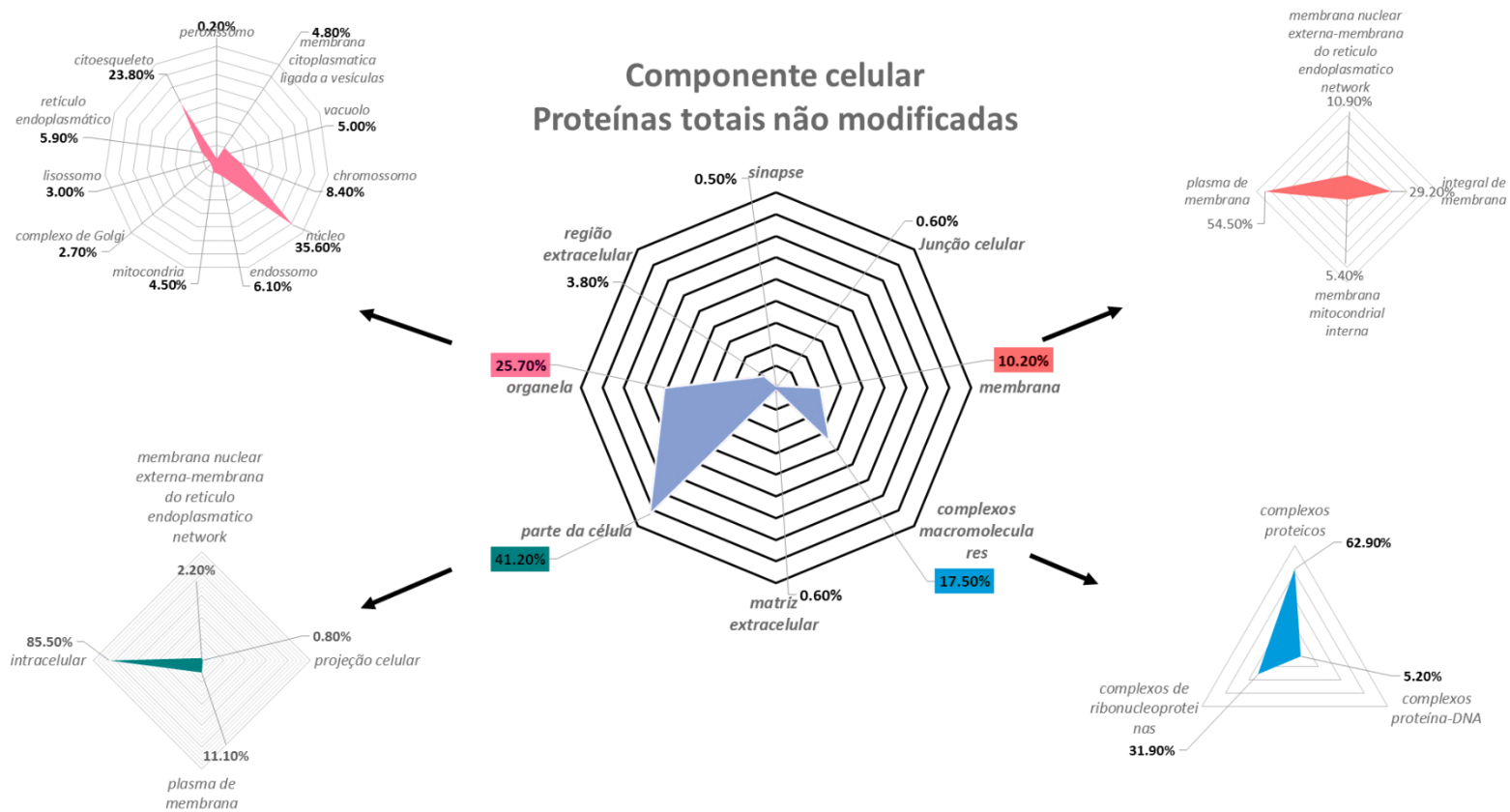


**Figura 21. Total de identificações de proteínas.** Plotagem de dados de identificação de proteínas baseado em ferramentas de bioinformáticas como Peaks e Proteome Discoverer.

As proteínas totais únicas identificadas a partir de análises para proteínas não enriquecidas (5432 proteínas) são resultado de uma análise de agrupamentos de dados após o processo de identificação. Tal identificação de proteínas totais representa uma análise abrangente em neutrófilos humanos, e estas foram agrupadas pelas suas entradas Uniprot.

O agrupamento dos dados para termos GO de compartimento celular (figura 23) nos oferece a distribuição espacial das proteínas não enriquecidas. A distribuição das proteínas identificadas mostrou predomínio tanto em membrana quanto na região intracelular. Podemos notar que a identificação de 29% das proteínas de membrana

identificadas sendo proteínas integrais de membrana, corroborando a eficiência do método de extração das mesma durante a lise celular. As proteínas de membrana desempenham um papel essencial na sinalização inicial de neutrófilos ((Goldsby 2002)). Além da sinalização inicial, diversos outros eventos que envolvem o fMLP estão associados à membrana, como o rolamento, a adesão firme, os mecanismos de fusão de grânulos e de liberação de NETs.



**Figura 22. Termos GO de compartimento celular para o conjunto de proteínas totais não modificados em neutrófilos humanos.** Os dados plotados nessa figura mostram na parte central a distribuição de termos de componente celular em um primeiro nível de categorização. As figuras laterais são a representação dos subníveis de termos GO segundo a divisão proposta no programa *Panther*.

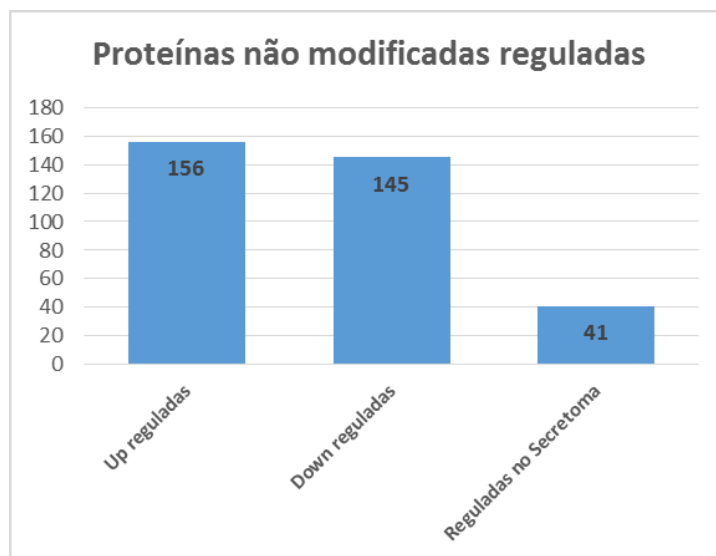
## **Análise quantitativa de perfis proteicos de neutrófilos humanos ativado por fMLP**

Na tentativa de elucidar os caminhos percorridos pelo estímulo inicial, este trabalho utilizou a estratégia de quantificação das proteínas de forma relativa, avaliando cada um dos conjuntos de dados apresentados anteriormente separadamente usando testes quantitativos para identificar as proteínas reguladas. Contudo, os dados de proteômica foram validados usando testes estatísticos, sendo aceitas apenas proteínas com p-valor  $<0.05$ . Os espectros de modificações pós traducionais encontram-se em fase de análise, e pela limitação do tempo os dados de quantificação destes grupos não serão apresentados no presente trabalho. Após a análise estatística essas proteínas identificadas como reguladas foram agrupadas segundo os critérios expostos nos métodos do presente trabalho.

Comparando neutrófilos quiescentes e ativado por estratégias em proteômica, este presente trabalho identificou proteínas com abundância regulada em neutrófilos. Os dados revelaram a presença de 301 proteínas reguladas na análise de proteínas não enriquecidas, dentre essas temos 156 *Up*-reguladas (reguladas positivamente) e 145 *down*-reguladas (reguladas negativamente). Os termos *up* e *down* são referentes as diferenças entre os perfis de células após a ativação com o peptídeo fMLP; sendo o termo *up* aplicado para proteínas que apresentaram uma maior abundância e *down* para proteínas que apresentam menor abundância quando comparadas ao proteoma de células quiescentes. As listas de proteínas reguladas separadas em *up* e *down* são apresentadas no anexo. No mais, as amostras do secretoma foram quantificadas utilizando a estratégia descrita no presente trabalho e foram identificadas 41 proteínas reguladas para o estímulo.



As lista total de proteínas reguladas é apresentada ao final desse trabalho (anexo) para apreciação.



**Figura 23. . Total de proteínas não enriquecidas reguladas.** Sendo que *up* e *down* reguladas são para análises em células e a última barra representa as proteínas totais reguladas no secretoma. As proteínas foram categorizadas como reguladas diante de análises estatísticas onde a diferença de abundância de proteínas tendo como referência a célula quiescente possibilitaram a inferência de regulações tanto positivas quanto negativas diante do estímulo com fMLP

Tendo em vista que estímulos em neutrófilos desencadeados por fMLP têm efeitos rápidos, na escala de segundos, esta análise que tem como referência um ponto específico após essa ativação visou elucidar os mecanismos presentes no neutrófilo pós ativação. O tempo de 30 minutos de ativação foi escolhido para permitir que alterações na expressão gênica fossem detectadas em nível proteômico. Ademais a identificação da regulação de 301 proteínas não enriquecidas frente ao estímulo com fMLP mostrou características de um momento específico de ativação como demonstrado na figura 24 acima.

De posse desses dados elaborou-se uma descrição desse momento de ativação descrevendo as proteínas presentes de forma a correlacionar os efeitos e possíveis causas,

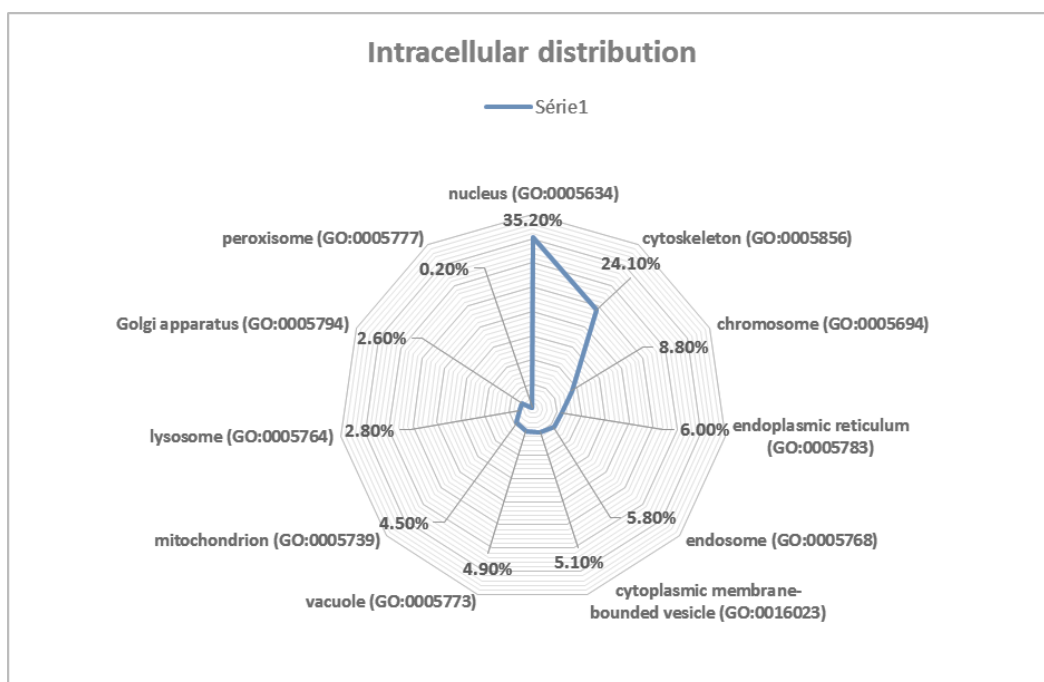
gerando assim uma discussão sobre quais os caminhos essa ativação inicial pelo receptor FPR desencadeou após 30 minutos de ativação.

Para iniciar a discussão sobre os agrupamentos dessas proteínas apresentaremos uma análise sobre as características gerais das classes proteínas encontradas reguladas nos experimentos com espécies proteicas não enriquecidas.

### ***Distribuição espacial de proteínas reguladas em neutrófilos***

A comparação entre neutrófilos quiescentes e ativados proporcionou a identificação de proteínas com abundância regulada participantes de diferentes vias de sinalização em neutrófilos. Os processos intracelulares encontrados envolvem diferentes classes de proteínas, desde proteínas estruturais, moléculas carreadoras, moléculas ligantes, receptores, enzimas e proteínas ligantes de ácidos nucleicos .

A análise de termos Gene Ontology (GO) para componentes celulares revelou que 87,9% do total e 85,3% das reguladas estão espacialmente localizadas no ambiente intracelular. Para as proteínas localizadas na região extracelular temos 6.1% do total e 5.7% do grupo de proteínas reguladas. Para membrana temos 10.0% para proteínas totais e 10.1% para o grupo de reguladas. Esse aumento mesmo que pequeno pode indicar a atividade das vias na região de membrana, contraposto a uma diminuição nos outros componentes. Sabemos que a ativação por fMLP ativa vias de remodelamento e secreção, e estas alteram os padrões de atividades de diversas proteínas de membrana ou ligadas à membrana. Dentre as proteínas intracelulares identificadas, a distribuição espacial intracelular revela que proteínas relacionada ao núcleo representam 35.6% em proteínas totais e 35.2% proteínas reguladas (figura 25).



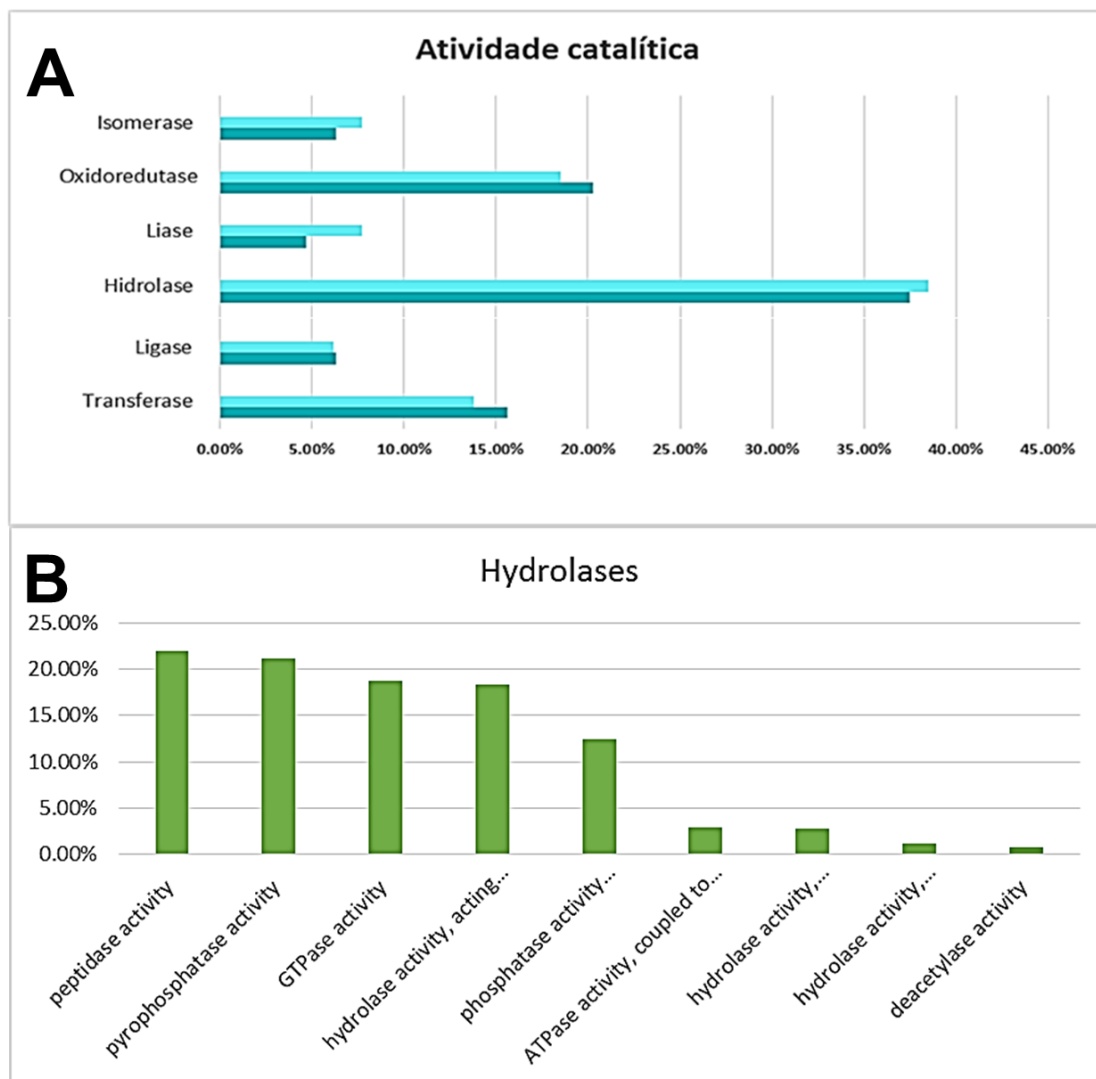
**Figura 24. Distribuição espacial de total de proteínas identificadas em neutrófilos quiescentes e ativadas.** As proteínas utilizadas para a geração dos termos GO foram todas as proteínas não enriquecidas identificadas no presente trabalho. Os termos plotados na figura representam as classes mais abundantes dentre as proteínas reguladas.

As proteínas identificadas como reguladas apresentam um perfil de distribuição espacial que proporciona a inferência de atividades ligadas à membrana e ao núcleo como as mais evidentes dentro da plotagem feita baseada nos termos GO para componente celular. Tendo em vista que as proteínas de membrana são a porta de entrada para o estímulo com fMLP decidimos analisar também a distribuição de processos e classes enzimáticas dessas proteínas.

### *Processos celulares envolvidos na ativação de neutrófilos*

A resposta efetora de neutrófilos está ligada a diversas proteínas que são participantes de um conjunto de vias de ativação atuam de forma colaborativa para desempenhar os mecanismos de defesa contra os microrganismos e moléculas não próprias. São ativados mecanismos como remodelamento do citoesqueleto, produção e liberação de grânulos, produção de espécies reativas de oxigênio e liberação de citocinas e fatores de regulação, durante as diferentes fases de inflamação (Prossnitz and Ye 1997; Niggli 2003; Amulic, Cazalet et al. 2012; Kolaczkowska and Kubes 2013).

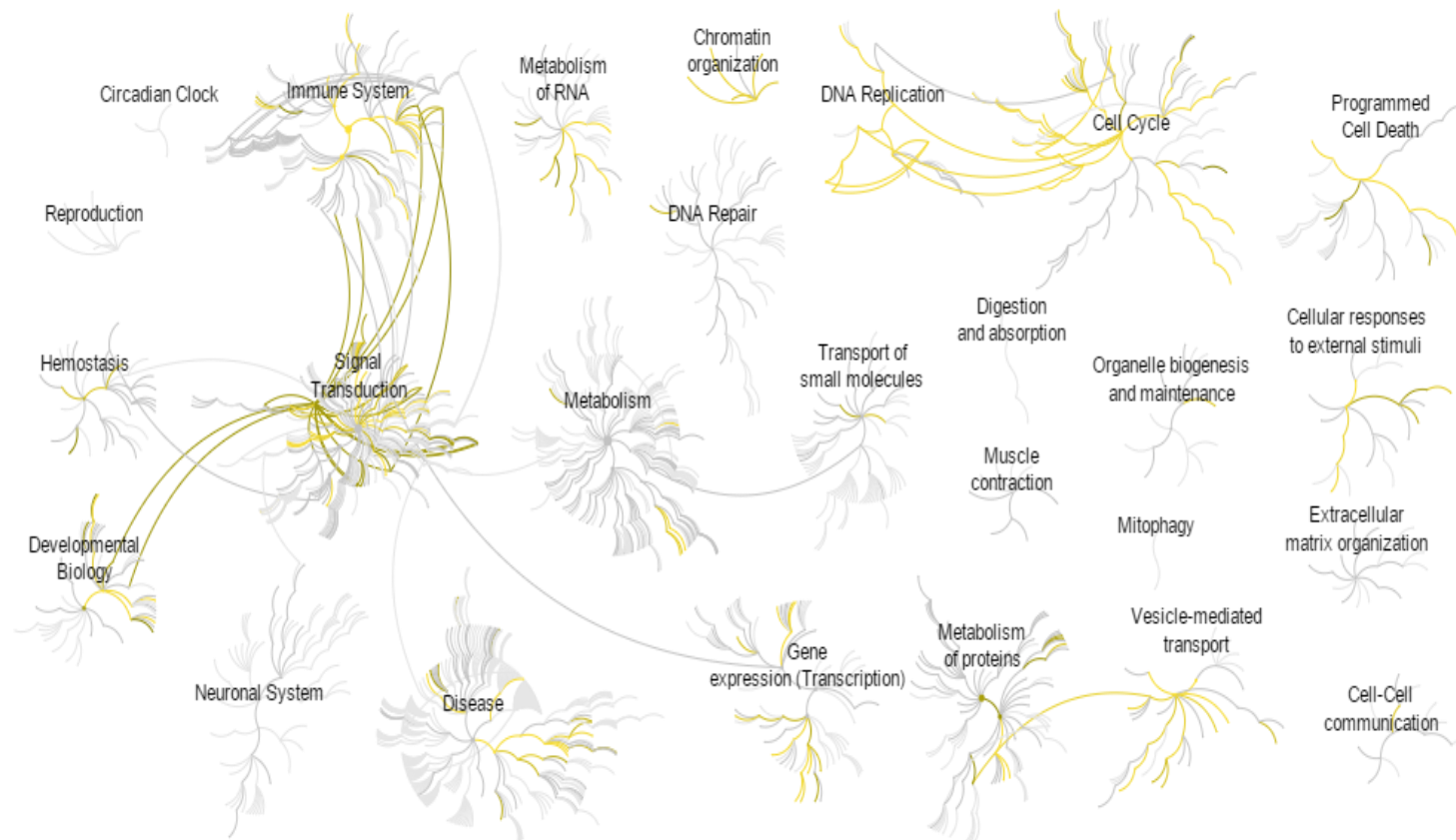
Sabemos que a ativação celular por fMLP é um processo desencadeado pela ligação ao receptor de membrana FPR, seguido da transdução do sinal via subunidades de proteína G, e rapidamente é espalhado para muitas vias diferentes por diversas ações enzimáticas. A distribuição em classes de proteínas com atividade catalítica revela predomínio de hidrolases e oxidoredutases (figura 26).



**Figura 25. Gráfico de distribuição de classes de proteínas para termos Gene Ontology gerados para as proteínas totais não enriquecidas. Em A, Os dados utilizaram as proteínas totais divididas em Up e down reguladas. A faixa azul clara representa up regulação, enquanto a down regulação é representada pela faixa azul escura do gráfico. A análise de dados demonstrou que classe que deaminases é a que mais difere em número de proteínas up e down, sendo maior o número de proteínas down reguladas. Em B temos a classificação das hidrolases, onde as peptidases são as mais abundantes.**

A classe de enzimas mais representadas dentro da análise de proteínas reguladas foi a das hidrolases, seguida pelas oxidoreduções, proteínas essenciais para a atividade efetora de neutrófilos. Dentre as hidrolases as proteínas hidrolases com atividade peptidases foram as mais abundantes.

A fim de analisar o significado biológico das proteínas identificadas como reguladas pela ativação celular, foram utilizados programas de pós análise que possibilitam a comparação do conjunto de dados com as anotações referentes a cada proteína em bancos de dados como o UniProt. O conjunto de dados foi analisado para caracterizar as interações proteína-proteína e as vias de sinalização utilizando, respectivamente, o *software Panther* e *Reactome*.



**Figura 26. Representação esquemática de via intracelulares envolvidas na ativação celular.** Mapa de vias intracelulares gerado pelo programa REACTOME. Esse mapa é a representação gráfica de todas as vias presentes em células humanas. Em Cinza são as vias do proteoma, e em amarelo temos a vias representadas pelo conjunto de dados do presente trabalho. Em amarelo temos todas as vias que foram correlacionadas as proteínas reguladas identificadas no presente trabalho.

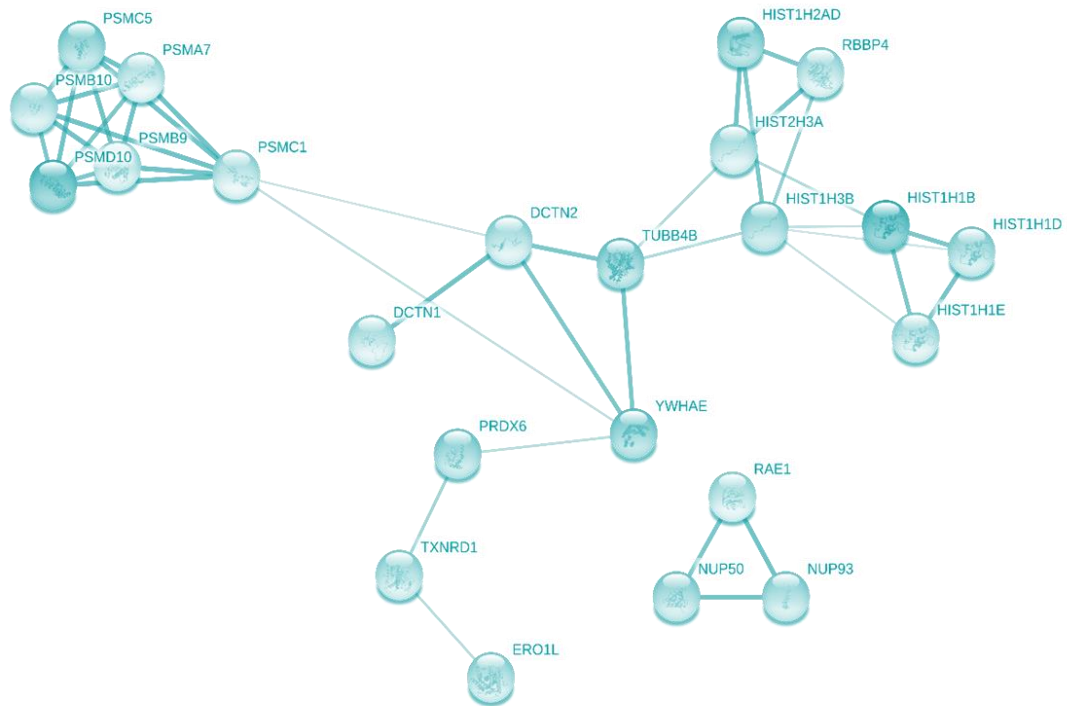
A comparação entre os perfis proteicos de neutrófilos humanos ativados com o peptídeo fMLP que revelou 301 proteínas reguladas nesse trabalho proporcionou a avaliação da integração dessas proteínas a partir de pós análises utilizando programas com o Reactome na figura 27 acima. A análise revelou a participação dessas proteínas em vias de sinalização, estresse oxidativo do sistema imune inato e adaptativo, ciclo celular, metabolismo celular e de proteínas, expressão gênica, organização da matriz extracelular, metabolismo de RNAs, replicação de DNA, transporte de pequenas moléculas, desenvolvimento biológico e morte celular programada.

### ***Resposta celular ao estresse em consequência da perda do estado de homeostase***

Neutrófilos são células de vida curta, que apresentam um fino balanço intracelular que mantém a homeostase. Estímulos externos, mesmo que pequenos, em ínfimas concentrações conseguem perturbar equilíbrio interno da célula, promovendo uma descarga de sinalização intensa e precisa. O fMLP, como já citado diversas vezes, possui a capacidade de perturbar esse equilíbrio, de forma que a célula inicia uma série de respostas celulares que tendem a restabelecer a homeostase. Essa resposta a estímulos externos é caracterizada como um estado de stress para a célula.

Proteínas relacionadas à resposta ao estresse foram identificadas pela utilização dos programas de interações proteína-proteína, bem como por programas que inferem a participação de proteínas em vias de ativação como o Reactome. As proteínas relacionadas a estresse oxidativo foram plotadas usando o programa *String* a fim de revelar os padrões de agrupamentos dessas proteínas de acordo com função e proximidade de interação (figura 28).





**Figura 27. Análise de interação proteína-proteínas de proteínas reguladas em vias de estresse para proteínas não enriquecidas.** As proteínas foram agrupadas usando o String para a classificação de proximidade de interação.

Sabemos que neutrófilos ativados com fMLP apresentaram diversas proteínas reguladas envolvidas no estresse oxidativo. A produção de espécies reativas de oxigênio é crítica para a eliminação de agentes patogênicos por degradação enzimática e para resolução do processo de inflamação (Faurischou and Borregaard 2003; Zen and Liu 2008; Davis, Wen et al. 2011; Kolaczkowska and Kubes 2013). No presente trabalho encontramos proteínas reguladas relacionadas a estresse oxidativo.

O estado de perturbação celular em neutrófilos é conhecido por inicialmente produzir uma descarga quase que imediata de espécies reativas de oxigênio para o interior

de grânulos e para o ambiente extracelular. Esse evento, que gera estresse oxidativo por escape de EROs, é dependente da ativação do complexo NADPH oxidase e demanda mecanismos de proteção evitando danos à própria célula (Mittal, Siddiqui et al. 2014).

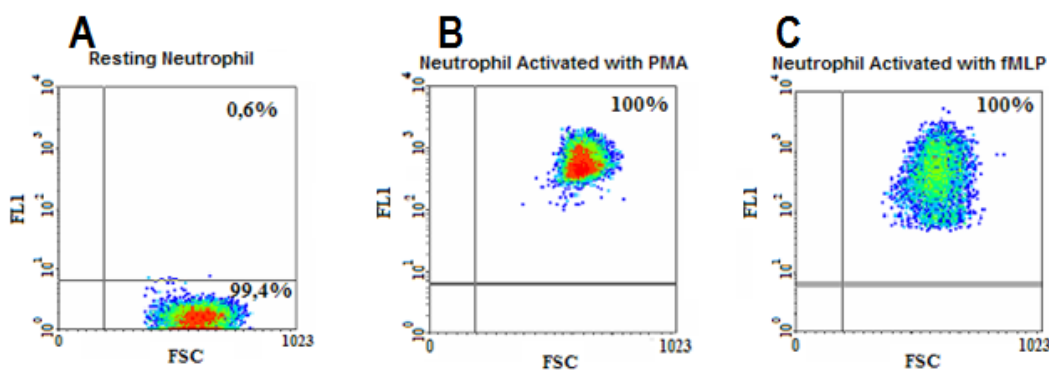
Neutrófilos podem ser ativados por concentrações nanomolares de peptídios formilados como fMLP. A resposta a esse N-formil peptídio estimula uma cascata de eventos biológicos intra e extracelulares. A ativação celular incita mecanismos de remodelamento, produção e liberação de grânulos, além da produção de espécies reativas de oxigênio e liberação de citocinas. Essa sequência de eventos culmina na regulação de diferentes fases do processo inflamatório (Prossnitz and Ye 1997; Niggli 2003; Amulic, Cazalet et al. 2012; Kolaczkowska and Kubes 2013).

Os neutrófilos obtidos no final do processo de separação foram submetidos a métodos de avaliação tanto de pureza quanto de viabilidade, a fim de validar o experimento. A pureza encontrada em lâminas coradas com Wright foi superior a 98% em esfregaço, e a viabilidade foi maior que 95%, quando contados em câmara de Neubauer com o corante azul de tripan, tanto antes como depois da ativação, demonstrando que o procedimento de isolamento não promoveu morte de neutrófilos e foi eficaz no isolamento desse tipo celular.

Para este trabalho, alíquotas com concentrações definidas de células (6700 células/uL) foram separadas, sendo ativadas *in vitro* por 100 nmol/L de fMLP. Neutrófilos quiescentes foram mantidos nas mesmas condições para controle negativo, e neutrófilos ativados com PMA 100 ng/mL foram usados como controle positivo. A concentração do ativador fMLP foi definida baseada no consenso entre vários trabalhos da literatura (Botha, Moore et al. 1995; Dewas, Fay et al. 2000; Le, Murphy et al. 2002; Zen and Liu 2008).

Neutrófilos produzem uma descarga quase imediata de espécies reativas de oxigênio durante a ativação. Sendo assim, ROS são excelentes marcadores de ativação celular (Mittal, Siddiqui et al. 2014). A fim de avaliar a ativação dos neutrófilos humanos ativados com fMLP, este trabalho utilizou diferentes formas de mensurar os produtos oxidativos das células: citometria de fluxo e os testes de NBT em lâmina e espectrofotométrico.

O método utilizado para a avaliação dos peróxidos por citometria de fluxo foi baseado na leitura de Rodamina 123 – produto da reação de DHR 123 e ROS. A produção de ROS foi verificada como positiva em 100% das células, com discreta diferença na distribuição da população de células ativadas entre o controle positivo (PMA) e o fMLP (Figura 29).

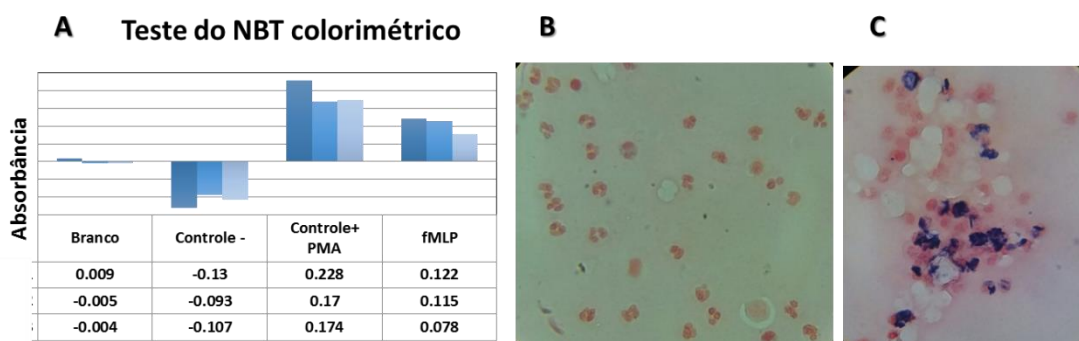


**Figura 28. Gráfico de citometria de fluxo.** O gráfico acima é uma representação da aquisição de 10000 eventos por condição. Neutrófilos quiescentes foram mantidos em tampão HBSS para controle negativo, controle positivo com neutrófilos ativados com PMA 100 ng/mL, e experimental com neutrófilos ativados com fMLP 100nmol/L). Podemos visualizar em A o estado quiescente das células, em B temos o controle positivo com a intensidade de fluorescência elevada e alta produção de espécies reativas de oxigênio. Em C temos os neutrófilos ativados com fMLP demonstrando a total ativação das células no quadrante superior direito do gráfico, demonstrando que a concentração de 100 nmol/L é suficiente para ativar neutrófilos humanos e promover a liberação de espécies reativas de oxigênio.

Em concentração nanomolar, N-formil peptídeos culminaram na rápida liberação de espécies reativas de oxigênio, processo deliberado pela fosforilação de proteínas

citossólicas que, ao serem ativadas, migram para a membrana formando o complexo conhecido como NADPHoxidase, tendo como produto dessa atividade a produção de espécies reativas de oxigênio.

A produção de radicais superóxido também foi avaliada pelo método do NBT espectrofotométrico e em lâmina. Esse método proporciona detecção de formazan, que são cristais de coloração azul intenso, gerados na presença de superóxidos, que precipitam em solução aquosa. A leitura da amostra foi feita em um espectrofotômetro com comprimento de onda de 550nm e confirmou os resultados observados por citometria, com maior produção de formazan no controle positivo, seguida por uma produção também intensa desencadeada por fMLP, ambos mais intensos que o controle negativo (Figura 30). Para a análise em lâminas foram contadas 100 células nas quais evidenciou-se cristais de formazan em mais que 90%, observando também sua disposição, em geral na periferia (Figura 30). Os resultados de PMA para NBT em lâmina foram descartados devido à elevada proporção de células com membranas rompidas.



**Figura 29. Caracterização da ativação de neutrófilos utilizando NBT.** (A) gráfico que descreve as leituras em 550nm do formazan em solução com neutrófilos quiescentes (controle), Ativados com PMA e ativados com fMLP. A coluna (branco) refere-se à leitura das soluções na ausência de células. (B) neutrófilos quiescentes em lâmina. (C) neutrófilos ativados com fMLP. Neutrófilos ativados com PMA perdem totalmente a conformação ficando indistinguível em lâmina (dados não apresentados).

O processo inflamatório induzido pela ativação das células por fMLP, produz a modificação de diversas vias intracelulares em neutrófilos. Inicialmente, essas mudanças são estimuladas pela ativação de receptores de membrana do tipo FPR transmitindo o sinal *down-stream* e amplificando o sinal no ambiente intracelular. Essa sinalização ativa uma intensa maquinaria proteica de resposta, causando alterações nos níveis basais de proteínas. Sendo assim, foram produzidas amostras proteicas de neutrófilos estimulados com fMLP, a fim de avaliar as modificações que ocorrem no proteoma dessa célula após sua ativação.

Baseado nos agrupamentos por função, este estudo encontrou um grupo de proteínas com funções oxidativas, como PPRDX6, TXNRD1 que apresentaram uma *down*-regulação diante do estímulo. A Peroxiredoxina 6, da família PRDX desempenha um importante papel na redução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; pois, no momento da ativação PRDX6 é translocada para a membrana para atuar na produção de espécies reativas de oxigênio (Ambruso, Ellison et al. 2012).

Outras classes de proteínas como agentes redutores foram também representadas. As proteínas ERO1L e GSTP1 são agente redutores que se encontram *up*-reguladas para o estímulo. A identificação de proteínas redutoras em um estado de ativação pode nos falar sobre a ativação de um sistema de proteção. A proteína ERO1L foi descrita como uma oxidoreductase que atua no RE, na formação de pontes de sulfeto e tem expressão aumentada em câncer de mama (Tanaka, 2015), porém ainda não havia sido relacionada à atividade de neutrófilos ativados com fMLP. E tendo em vista que ela apresenta um aumento na regulação diante do estímulo podemos propor que o neutrófilo ao mesmo tempo que produz uma enorme descarga de ROS por meio disso regula e ativa

mecanismos de citoproteção. Porém são necessários mais estudos que descrevam melhor o papel da ERO1L em neutrófilos.

Ademais, ainda falando de atividade protetora contra o dano oxidativo podemos citar a presença de atividade antioxidante relacionada ao metabolismo de porfirinas, detectada na análise pelo Reactome. Sabemos que, a extensão do dano oxidativo é dependente do balanço entre antioxidantes e EROs, esse trabalho identificou a proteína Heme oxigenase 2 (HMOX2) up regulada. HMOX2 age como agente catalisador da reação envolvendo a biliverdina redutase A (BLVRA), que encontra-se *down*-regulada no presente trabalho. Esse aumento de stress é relacionado a outras vias, como o desencadeamento de apoptose pela ativação de caspases inativas do citosol (Jansen, 2012). Demonstrando assim a importância do mecanismo oxidativo na resposta efetora de neutrófilos.

Contudo, a liberação de espécies reativas de oxigênio foi apresentada por pesquisadores como uma via controversa, pois ela também promove danos a tecidos adjacentes como também à própria célula. A liberação de ROS pode desencadear danos extensos no DNA, que podem ativar vias de reparo. Ademais, a liberação de espécies reativas de oxigênio está associada à reação de neutrófilos a agentes estranhos com a liberação de vesículas secretórias. Esses eventos disparam uma sequência de mecanismos de modificação celular que auxiliam a célula a reagir a esses agentes estranhos.

### ***Da transdução de sinal às modificações da morfologia, tráfego de membrana***

O processo de liberação de espécies reativas de oxigênio como descrito acima é uma resposta imediata à sinalização mediada pelo receptor FPR. Esse tipo de ativação

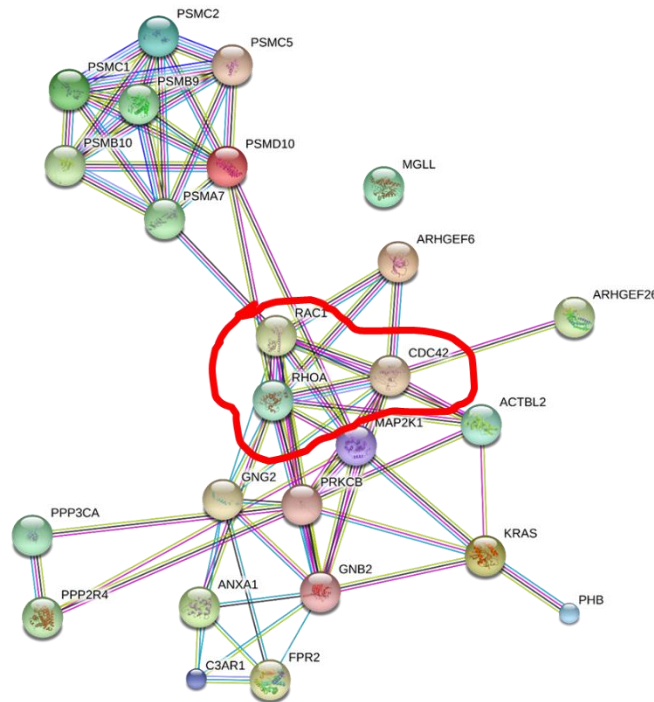
promove intenso estado de estresse em todo o ambiente celular. Esse estado de oxidação está relacionado com a ativação de outras vias celulares, e apresenta participação ativa no remodelamento do citoesqueleto e na desgranulação ((Lacy 2006), Mittal 2014).

A remodelação do citoesqueleto induzida por fMLP foi descrita em uma publicação em 1995 onde Fernandez-Segura e colaboradores que apresentaram os diferentes formatos que o neutrófilos podem assumir após a ativação estimulados por fMLP. Esse processo ocorre devido à ativação de vias relacionadas à polimerização da F-actina, que leva ao remodelamento alterando o formato celular. Nesse trabalho ela apresentou células ativadas apresentando projeções de membrana (Fernandez-Segura, 1995). Mais tarde essas projeções foram mais detalhadas por Galkina e colaboradores que sugeriram a presença de diferentes grupos de proteínas atuando na modificação do citoesqueleto, auxiliando em processos secretórios e tráfego através da membrana (Galkina, 2010). Sendo então a modificação morfológica um evento essencial para a atividade efetora de neutrófilos bem como uma confirmação do processo de ativação.

As principais classes de proteínas envolvidas no remodelamento do citoesqueleto são proteínas ligadas à liberação de vesículas secretórias, à mobilização de grânulos para a membrana e também à motilidade de fagócitos (Lacy 2006) . O contato com uma pequena quantidade de ativador promove grandes mudanças na estrutura e no transporte dentro da célula.

O citoesqueleto está em constante mudança após a ativação, e de acordo com Niggli e colaboradores, essas modificações são fruto da ativação de uma série de vias intracelulares, que incluem a cascata MAPK, que estimula a polimerização da actina e orchestra a reformulação espacial de filamentos intermediários para a reestruturação do citoesqueleto (Niggli 2003). Alguns desses mecanismos de regulação são orquestrados

por proteínas da família das pequenas GTPases. O presente estudo mostrou a regulação de Cdc42 e Arp 2/3, e outras pequenas GTPases da família RhoA e Ras, como as proteínas RAB24, RAB35, RAB5A, RAB5C (Baker, 2016). Também detectamos a regulação de RALA e RAS, que são proteínas relacionadas ao controle de exocitose quando ativadas pela atividade de fosfolipase D1 que é dependente de Arf6 (Vitale, Mawet et al. 2005)



**Figura 30. Mapa de interações proteicas string para proteínas relacionadas a transdução de sinal.** Onde no campo em vermelho temos as proteínas da família das pequenas GTPases que representam a classe responsável pela dispersão do sinal na região intracelular.

Sabe-se que as proteínas responsáveis pelas modificações morfológicas têm uma grande participação da família das pequenas GTPases. As pequenas GTPases comandam o remodelamento celular e o presente trabalho identificou a proteína RAC1 como regulada em neutrófilos ativados. A família RAC sinaliza para desencadear várias modificações, incluindo a formação de pseudópodes celulares, que auxiliam na



motilidade celular e secreção. RAC1 está relacionada a proteínas como RHOA e PRKCB participando da polaridade planar das células/ extensão convergente (PCP / CE) que regula as células da forma celular. Esse tipo de modificação está envolvido em atividades de tráfego de membrana e nas atividades secretórias.

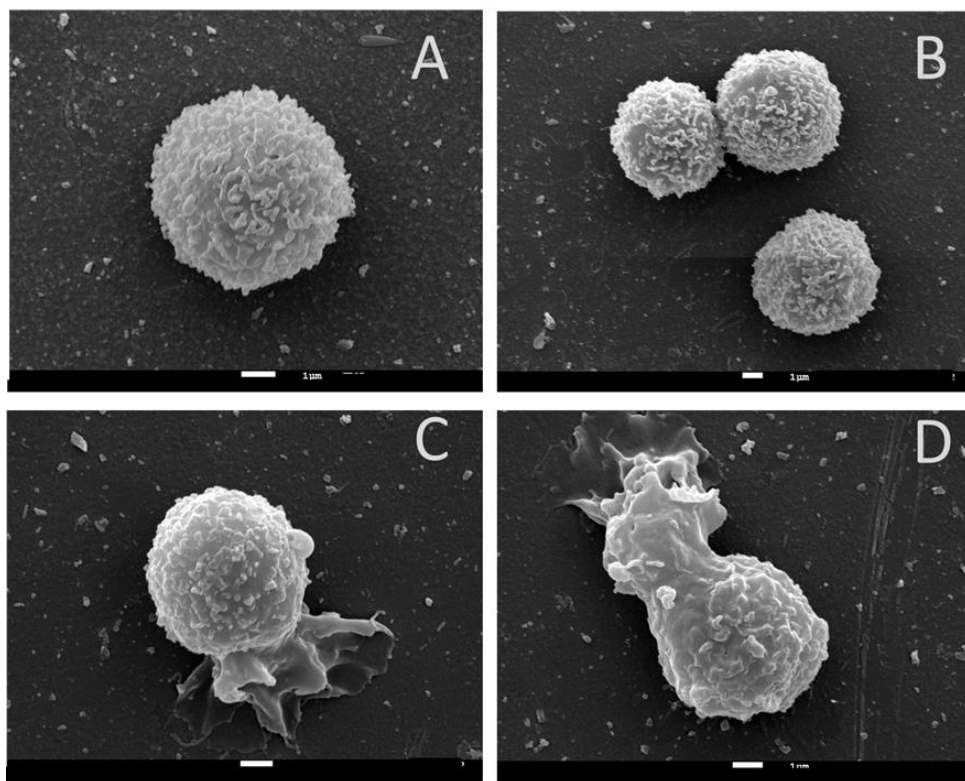
Nosso estudo também contemplou a identificação de diversas proteínas sinalizadoras para o remodelamento, como a proteína estrutural TBB4B, da família das tubulinas, que estão em constante processo de polimerização e rotatividade diante de um estímulo (Verhey and Gaertig 2007). A atividade de tubulinas é assistida por filamentos intermediários como VIME (Vimentin) regulado para menor abundância em neutrófilos ativado (Moisan and Girard 2006), participando de eventos como remodelação do citoesqueleto e exocitose de grânulos. A VIME foi encontrada *down* regulada no presente trabalho, assim como VAPA e VASP, sugerindo que essas proteínas que estão ativamente envolvidas em eventos de secreção podem ter sido lançadas para região extracelular e no momento de 30 minutos elas se apresentaram de forma reduzida no ambiente intracelular.

Outrossim, uma classe bem conhecida de proteínas que atua na mobilização de grânulos é a classe de miosinas. Em nosso presente trabalho encontramos a proteína com a YWHAE (14-3-3 proteína epsilon), encontrada *down*-regulada. Os trabalhos anteriores descrevem que após a ativação essa proteína é fosforilada e sinaliza para Raf-1 (Malumbres, 1998). Raf-1 também é relacionada à atividade supressora da apoptose. Na literatura, YWHAE também regula MAPK como um substrato (Lominadze, Powell et al. 2005) e está envolvida no processo de ativação de miosinas, mostrando a importância dessas proteínas na transdução do sinal atuando nas mudanças na forma das células. A *down*-regulação de YWHAE pode estar relacionada com a sua ativação, pois com a adição de um grupo fosfato a essa proteína a mesmas podem ter sido enriquecidas na

porção de fosfoproteínas. Estes dados são apenas sugeridos devido aos dados de fosfoproteínas ainda estarem em fase de análise.

Além do que, essa sinalização para reorganização do citoesqueleto é a etapa preparatória para a secreção. Onde as proteínas ativadas por RAC1 e RHOA amplificam a sinalização proporcionando assim que o citoesqueleto se reorganize e sinalize para as vias de secreção como resposta dos neutrófilos ao estímulo (Hall, 2005). A interação proteína-proteína mostra a importância dessas moléculas como principais etapas regulatórias no rearranjo de filamentos intermediários, aqueles que são responsáveis contração celular por motilidade (Niggli 2003).

Como foram observadas diversas proteínas envolvidas no remodelamento estrutural do neutrófilo, as amostras foram avaliadas por microscopia de varredura (figura 31) para confirmar a alteração da morfologia celular afim de corroborar a reorganização do citoesqueleto diante do estímulo, bem como detalhar as características morfológicas de superfície associadas à ativação por fMLP.



**Figura 31. Imagens convencionais de Microscopia eletrônica de varredura (MEV) adquiridas a partir de neutrófilos humanos.** As células foram tratadas com poli-L-lisina f. Os neutrófilos tratados foram fixados após o processo de incubação e cobertos com ouro coloidal a serem analisados por MEV. A figura mostra as células em ambos os estados. Em A e B, neutrófilos humanos em repouso. C e D, os neutrófilos incubados durante 30 minutos com 100 nmol de fMLP a 37 ° C.

Como o esperado, os neutrófilos ativados apresentaram uma conformação diferenciada da condição quiescente. Neutrófilos ativados por fMLP mostram protrusões na superfície da célula (figura 31). A estrutura celular muda frente ao estresse por ativação, o que é muito importante em processos como quimiotaxia, liberação de vesículas secretoras e fagocitose.

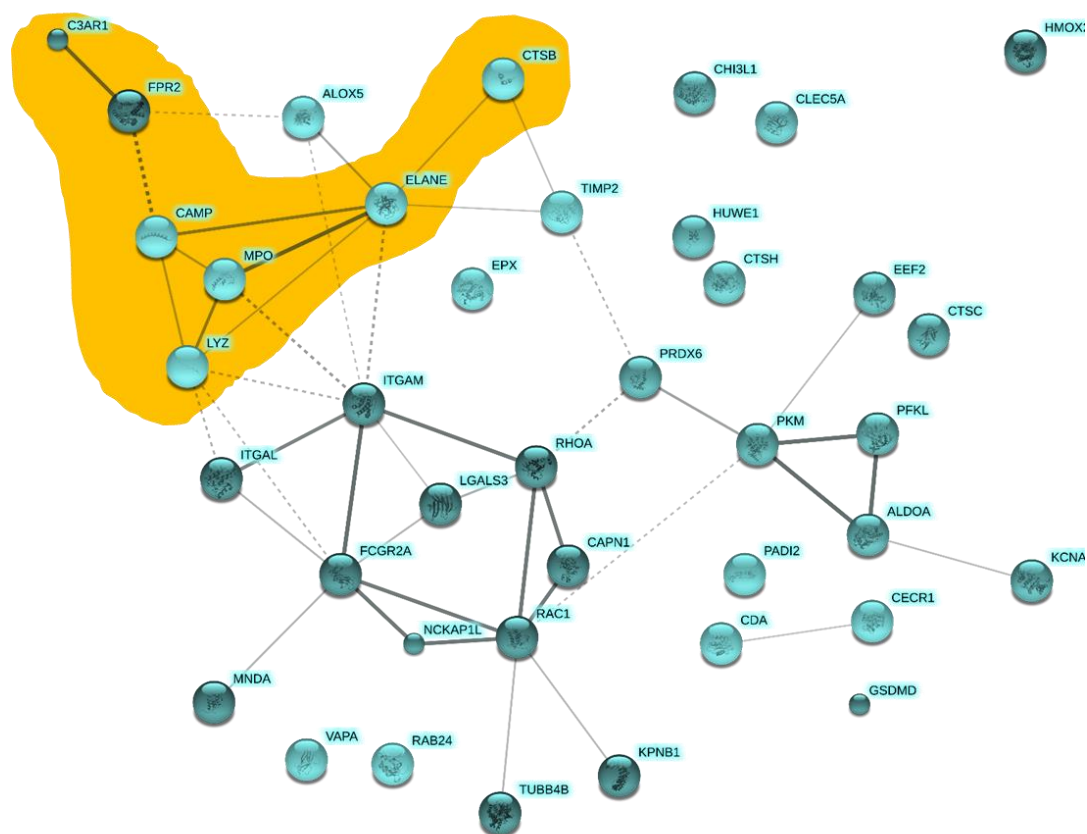
### *Regulação do sistema imune e secreção*

Neutrófilos são células importantes no sistema imunológico tanto primário ou inato quanto adaptativo, atuando diretamente no sistema inato e modulando o adaptativo para o equilíbrio da inflamação. O neutrófilo age tanto como célula efetora que desempenha o mecanismo de captura e destruição, como recrutadora de células do sistema imune durante uma resposta inflamatória com a liberação de moléculas secretórias, (Matsushima, Geng et al. 2013) . Na resposta imune inata os neutrófilos têm papel central no processo, onde os mecanismos de secreção representam a chave para a resolução da inflamação. O mecanismos de secreção em neutrófilos, conhecidos como desgranulação, atuam na morte de microrganismos pela presença de proteases e espécies reativas de oxigênio nos grânulos (Lacy, 2006).

A desgranulação em neutrófilos promovida por fMLP é uma atividade orquestrada pela ativação de vias ligadas à proteína RAC. Os mecanismos que precedem a desgranulação foram descritos anteriormente e envolvem esse processo de sinalização para o remodelamento do citoesqueleto. Ademais outras classes de proteínas encontram-se envolvidas na desgranulação. Em nosso presente trabalho identificamos 48 proteínas reguladas, relacionadas à via da desgranulação. Algumas das proteínas encontradas reguladas foram agrupadas em proteínas sinalizadoras da família das pequenas GTPases já citadas anteriormente, como RAC1, CDC42, RHOA, RAB5C, RAB24 que auxiliam no remodelamento do citoesqueleto e no processo de fusão dos grânulos à membrana citoplasmática com a posterior liberação do seu conteúdo (Rorvig, Ostergaard et al. 2013). Além dessas proteínas encontramos a regulação de CECR1, que é uma adenosina deaminase e contribui para

a degradação de adenosina extracelular. Essa proteína CECR1 foi identificada *down* regulada em nosso trabalho, sugerindo que o mecanismo de secreção também atuam na citoproteção contra danos oxidativos, porém a proteína CECR1 não foi identificada na análise de secretoma.

Outrossim, este trabalho identificou e quantificou proteínas componentes dos grânulos como MPO, FPR2, CTSC, ELANE e LYZ. Essas proteínas foram descritas como componentes de grânulos e são exocitadas na presença de fMLP. Porém ELANE, CTSC e FPR2 foram encontradas *up* reguladas no presente estudo. E as respostas para esse tópico ficam em aberto pois são necessárias análises mais detalhadas sobre a expressão gênica desencadeada por essa ativação via fMLP para verificar se a síntese de novo dessas proteínas foi ativada. Representadas na figura



**Figura 32. Interação de proteínas relacionadas a secreção em neutrófilos ativados com fMLP.** As proteínas relacionadas a secreção pelo programa Reactome foram plotadas no programa string para visualização de interações proteína- proteína. Onde em amarelo as proteínas são componentes de grânulos.

Ademais, neutrófilos ativados liberam muitos componentes para a região externa que servem com sinalização para regulação do sistema imune inato e adaptativo (Kumar, 2010). A regulação do sistema imune conta com a participação de receptores de membrana presentes nas células e agonistas liberados por células como o neutrófilo, e que agem como coadjuvantes na regulação dos processos inflamatórios pela ativação e modulação de vias (Mantegazza, Magalhaes et al. 2013). O processo de recrutamento é essencial para a regulação da inflamação, pois ele possibilita a ação conjunta de células para a resolução da inflamação. Sendo assim, via de MHC classe I conta com a participação de diferentes proteínas que atuam desde o processamento de partículas engolfadas até a secreção de agonistas para o recrutamento. Este trabalho identificou a regulação de importantes proteínas que atuam nas vias de apresentação do MHC como a Calnexina (CANX) e a Tapasina TAPBP. A participação dessas duas proteínas é conhecida com uma ação conjunta no complexo de “loading” para a secreção de moléculas ligados ao MHC (Mantegazza, Magalhaes et al., 2013).

A via do MHC I também recebe ajuda de proteínas de Ubiquitinas como HUWE1, UBE2V1 que trabalham em conjunto com ubiquitinas ligase CBL e CBLB; enfatizando que as proteínas citadas acima foram identificadas e detectadas como reguladas no presente trabalho. Ubiquitinas ligase trabalham em conjunto com subunidades do Proteassome 26S também identificadas pelo nosso trabalho, atuando na parcial degradação de peptídios no citosol para posterior apresentação dos mesmos com antígenos secretados no ambiente extracelular para a sinalização e regulação de células do sistema imunológico, como células B (Lutz-Nicoladoni, Wolf et al. 2015).

A participação de vias do MHC II, também é representada nesse trabalho pela identificação de proteínas da família das Catepsinas. As catepsinas são proteases sensíveis

à degradação e um papel importante na apresentação do antígeno porém não foram demonstrados em neutrófilos até este presente trabalho (Villadangos, Bryant et al. 1999); Então, CTSB *down*-reguladas, CTSC e CTSH *up*-reguladas representam um papel importante das vias responsivas para a secreção . As catepsinas também estão relacionadas também a regulação de processo de apoptose (Turk, Stoka et al. 2012). E a *down* regulação de catepsinas pode estar relacionada à atividade secretória, tendo em vista que as catepsinas estão presentes nos grânulos de neutrófilos maduros (Pham, 2006).

E ainda falando sobre os processos de secreção regulados pela ativação de fMLP em neutrófilos, encontramos um mecanismo importante proteína que atua na regulação da inflamação. De acordo com a literatura, o bloqueio das vias de beta-catenina aumentaram a inflamação nos pulmões aumentando as citocinas (Dai, Liu et al. 2016). Este conjunto de dados apresentou regulação das proteínas relacionadas a essa via, como PP3CA, AP2A1 e PRKCB. Os dados também sugerem regulação em subunidades do proteassoma 26S como PSMB9, PSMB10 e PSMC5. A identificação dessas regulações corrobora a amplificação do sinal de inflamação diante do estímulo aplicado.

A liberação de citocinas diante de um estímulo serve para a amplificação do sinal da inflamação, pois elas são caracterizadas como moléculas pró-inflamatórias (Goldsby 2002). Para corroborar a regulação dessa via na ativação com neutrófilos este conjunto de dados identificou algumas proteínas relacionadas à sinalização de citocinas, como o transdutor de sinal como STAT5A, a integrina ITGAM, TGFB1. Este estudo revelou também a redução da abundância de IL16 um quimioatraente que é secretado por neutrófilos diante de estímulos externos (Roth, Solbach et al. 2016), os receptores IL1RN relacionados ao inflamassoma, IL23R relacionado à desgranulação (Smith, 2007) e IL17RE também foram regulados pela ação do fMLP e os mesmos são relacionados à

sinalização liberação de citocinas. A via de sinalização por citocinas está vinculada à via de apresentação de antígenos pela proteína transportadora CBL, sendo as vesículas secretórias CBL-dependentes (Lutz-Nicoladoni, Wolf et al., 2015).

Os processos de secreção em neutrófilos ativados por fMLP também foram verificados com base na análise do secretoma de células ativadas. Essa análise resultou em dados que corroboram o estado de regulação de proteínas encontradas em amostras totais de neutrófilos também analisadas neste trabalho. Para embasar nossa sugestão citamos por exemplo a *up* regulação da proteína C3AR1 no secretoma que corrobora o estado *down* regulado da mesma em amostras de neutrófilos totais ativados por fMLP. A proteína C3 um receptor do sistema complemento e é expressa em PMN (Palmer, Diehn et al. 2006).

Ademais, as proteínas HP, LTF,GC e MMP9 foram encontradas com abundância aumentada no secretoma de neutrófilos ativados, como esperado. Essas proteínas são proteínas constituintes de grânulos (Rorvig, Ostergaard et al. 2013) e corroboram o processo de desgranulação em nosso presente trabalho. A tabela de proteínas reguladas no secretoma encontra-se na sessão de anexos do presente trabalho.

Contudo, os processos descritos até então na ativação dos neutrófilos e que foram corroborados por este trabalho representam grandes mudanças no ambiente intracelular, pois a ativação de RAC1 promove intensa sinalização para diversas vias, inclusive para vias ligadas a expressão gênica.



## ***Regulação gênica e vias de reparo***

Neutrófilos ao serem ativados desencadeiam vias de regulação e expressão gênica. Quando a sinalização intracelular atinge os fatores nucleares relacionados à RNA polimerase II no processo de transcrição, mesmo que neutrófilos desempenhem uma resposta máxima contra organismos patogênicos sem a necessidade de síntese *de novo*, existem outros mecanismos relacionados à estimulação de neutrófilos que exigiram a síntese de novas proteínas. Síntese *de novo* tem como proteína efetora uma RNA helicase conhecida como UPF1, que tem um papel importante no controle de qualidade dos produtos pós-transcrição. O papel da UPF1 é liderado com as proteínas truncadas (Hug and Caceres 2014). Em neutrófilos ativados com fMLP foi identificada a regulação de UPF1 indicando que os processos desencadeados por essa ativação culminaram na ativação de processos de transcrição. Ademais, a síntese *De novo* de proteínas relacionadas UPF1, que é uma RNA helicase, tem um papel importante no controle de qualidade dos produtos pós-transcrição. O papel da UPF1 é liderado com as proteínas truncadas (Hug and Caceres 2014). Esses mecanismos não haviam sido descrito em neutrófilos até o presente trabalho.

Outrossim, este trabalho identificou a regulação de proteínas como MAGOH, que é uma proteína ligante de RNA no processo de síntese. MAGOH encontra-se relacionada a proteínas da via *Non sense medianting decay* (NMD). As vias NMD em frente à ativação desencadeiam uma cascata de mecanismos para lidar com o estado do estresse na tentativa de recuperar a homeostase (Kataoka, Diem et al. 2001).

Adicionalmente, as modificações intensas no citoesqueleto durante a ativação celular ocorrem em paralelo com mecanismos de reparo e modificação de proteínas,

mantendo caminhos de sinalização em operação apesar das proteínas dobradas ou inativas. O papel das subunidades do proteassoma 26S é crucial na manutenção da homeostase via degradação de proteínas mal formadas. Uma vez que ocorra a acumulação de proteínas não corretas no ambiente intracelular, podem se acarretar diversos efeitos deletérios para a célula.

Os intermediários que operam no dobramento de proteínas são fundamentais para conseguir proteínas enoveladas corretamente, facilitando modificações pós-traducionais. Então, quando a sinalização dos neutrófilos ativados atinge o retículo Endoplasmático, promove uma cascata de eventos. O processo de novas proteínas requeridas pelo processo de ativação é intenso no ER. Além disso, as proteínas secretoras precisam ser modificadas após a tradução, sendo assim as proteínas chaperona como Calnexin CANX, ajudam a célula em um processo de glicosilação. A CANX é uma ligante de cálcio e trabalha com o calreticulum dentro do ER auxiliando nas modificações pós-tradução (Muller-Taubenberger, Lupas et al. 2001). A participação de calnexina no processo de maturação de proteínas é um mecanismo essencial para o neutrófilo, pois os mecanismos de secreção são altamente requisitados durante o processo de ativação.

No mais, a ativação de neutrófilos por fMLP nesse trabalho traz algumas classificações um tanto quanto intrigantes em primeiro momento quando no mapa de vias da figura encontramos diversas vias do ciclo celular representadas. E de fato nas análises de vias encontramos representada na regulação de neutrófilos por fMLP a via da fase G2/Mitose. No entanto podemos verificar que essa via tem extrema importância na mitose pois controla a correta replicação do DNA, evitando aberrações. Sabemos que a ativação de neutrófilos é relacionada a danos ao DNA resultante da ação de moléculas liberadas durante o stress oxidativo. Esse tipo de dano promovido por neutrófilos ativados por

fMLP foi reportado em neutrófilos-like HL60 em 1994; nesse trabalho foi citado que a geração de O<sub>2</sub> era responsável por desencadear danos ao DNA (Takeuchi, Nakajima et al. 1994). Mais tarde em 2012 estes danos do processo de ativação foram também relacionados à liberação de NETs (Kaplan and Radic 2012).

Então o significado biológico de vias de ciclo celular reguladas em neutrófilos que são células diferenciadas e maduras pode estar relacionado à participação dessas proteínas no reparo de danos ao DNA provocados pela ativação. Podemos citar a proteína VRK1, uma serina treonina cinase reguladora do processo de divisão celular que atua no processo de reparo de DNA (Sanz-Garcia, Vazquez-Cedeira et al. 2011), foi identificada com up regulada no presente trabalho, sugerindo que os danos ao DNA desencadearam a ativação de mecanismos de reparo (Kametani, Takahata et al. 2016).

As vias ativadas pelo estímulo de fMLP nas vias intracelulares causa enorme requerimento de energia da célula para manutenção da atividade. E vias relacionadas ao metabolismo celular podem explicar um pouco mais sobre o metabolismo da célula em neutrófilos ativados por fMLP.

### ***Metabolismo celular***

Os mecanismos iniciados pela ativação por fMLP nos neutrófilos promovem a regulação intensa no metabolismo celular. Nós sabemos que os neutrófilos têm poucas mitocôndrias, então a glicose exógena é altamente necessária. (Kramer, Ravi et al. 2014) A intensa ativação da via glicolítica acontece nos estágios iniciais da ativação. A regulação metabólica frente à ativação por fMLP mostrou regulação negativa em proteínas não enriquecidas como GYS1, PFKAL, ALDOA e KPYM. O estado de

regulação pode ser explicado pela alta exigência de glicólise durante a ativação, onde muitas dessas proteínas são fosforiladas para se tornarem ativas (Pearce, 2013).

Adicionalmente, as vias ligadas à tradução foram representadas por proteínas ribossomais como RPS3A, RPS7, RP27A, RPS18 que são responsáveis pelas maquinaria de tradução de novas proteínas que é altamente requerida na resposta inflamatória (Palmer, Diehn et al. 2006) e em nossos dados apenas a unidade RPS3A foi down regulada. Além disso, a via de tradução é auxiliada por proteínas sintetases como CARS, GARS e KARS que são responsáveis pela regulação da expressão gênica, ademais GARS é responsável pela redução da expressão gênica (Niehues, Bussmann et al. 2015) e em nossos resultados ela encontra-se down regulada, corroborando a atividade positiva de tradução em neutrófilos ativados por fMLP. Não foram encontradas referências na literatura que ligassem sua atividade a neutrófilos sendo então um dado novo para a regulação de neutrófilos.

### *Apoptose*

O processo de ativação celular desencadeia a reestruturação constante do citoesqueleto de neutrófilos. Os mecanismos de transporte e secreção de vesículas demandam uma intensa atividade de regulação na estabilização de filamentos intermediários. Essa intensa modificação pode ser prejudicial aos filamentos, além disso a exocitose promove lesões na região da membrana. Essas modificações intensas levam a célula a um estado elevado de estresse que, associado ao estresse oxidativo, age como regulador de sobrevivência dos neutrófilos.

Uma vez que neutrófilos são células de vida curta, alguns fatores oxidativos agem de forma a prolongar a sobrevivência dessas células. Sabemos que a morte programada em

neutrófilos está relacionada à resolução da inflamação, e que fatores como o aumento dos níveis de espécies oxidativas além da capacidade antioxidante promove dano. Os níveis elevados de fatores oxidativos sinalizam para a ativação de uma via conhecida como morte celular programada (Li, 2008), limitando o dano tecidual.

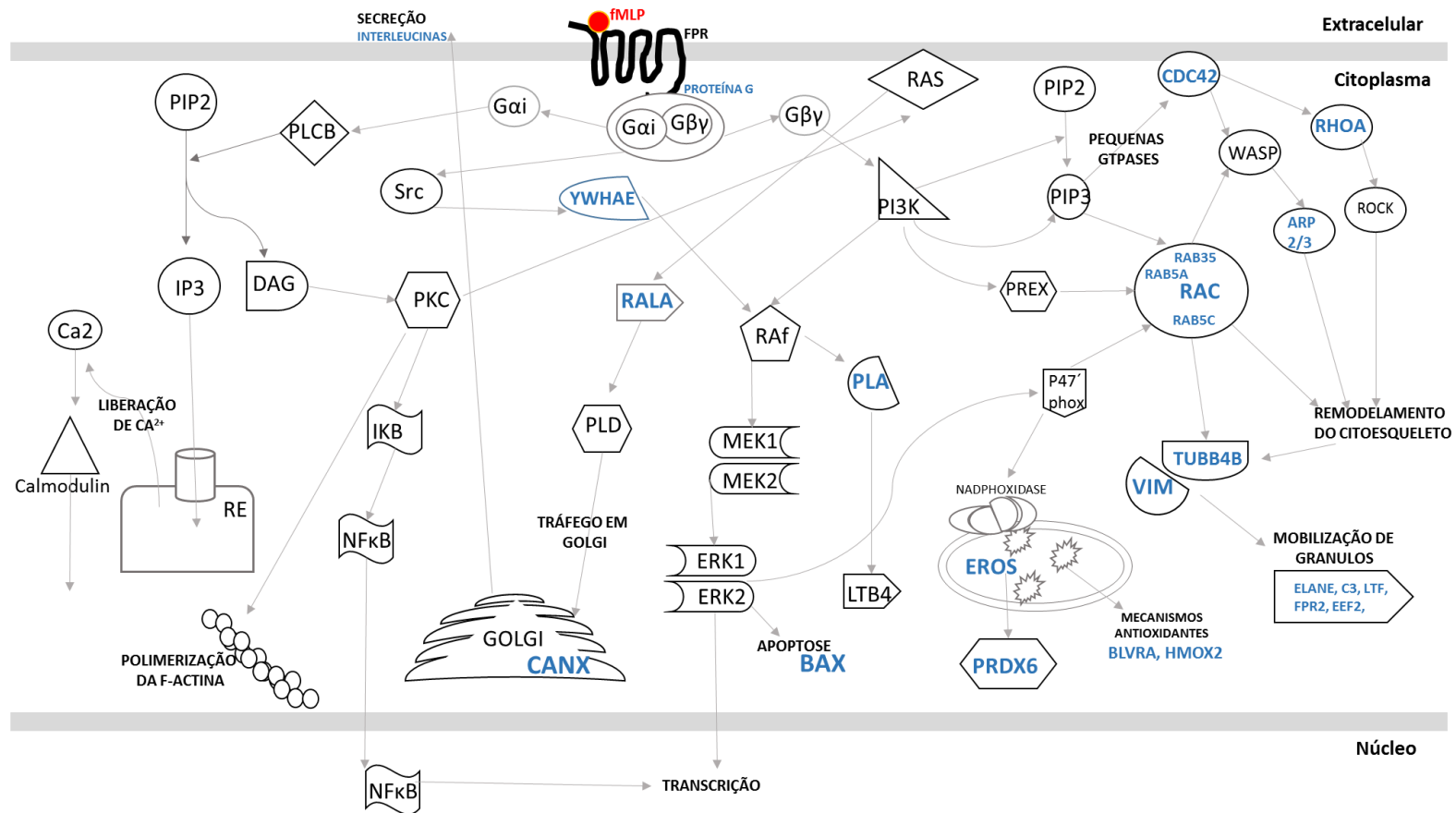
Algumas vias de regulação da apoptose foram encontradas neste presente trabalho, como o aumento na abundância de Heme oxigenase 1 que implica na regulação para apoptose (Li, 2008). O balanço entre antioxidantes como a biliverdina redutase A (BLVRA) que tem ação cito-protetora também é relacionado à ação de Heme oxigenase que age como agente de degradação de biliverdina aumentando o estresse oxidativo que culminará na ativação de caspases inativas do citosol e finalmente a morte celular por apoptose (Jansen, 2012), controlando assim as extensões dos danos oxidativos no processo da recuperação da homeostase local.

Outrossim, os dados do presente trabalho estão de acordo com a literatura sobre o prolongamento de sobrevivência de neutrófilos no processo de ativação neutrófilos por fMLP pela regulação de BAX. Em nosso estudo BAX encontra-se down regulada, e sabe-se que a sobrevivência de neutrófilos é regulada por um fino balanço entre BAX e Mcl-1 (Fulop, 2002). E com a baixa abundância de BAX temos então, aos 30 minutos de ativação com fMLP, a sobrevivência da célula sendo prolongada pela baixa concentração de fatores pró apoptóticos, tendo em vista que BAX é responsável pela ativação da via das caspases na fase executora da apoptose (Otonello, 2002). E temos a participação de proteínas do proteossoma 26S sendo relacionadas as vias de apoptose.

Contudo a presença de fMLP em contato com células polimorfonucleares neutrófilos desencadeou diferentes respostas na célula permeando entre diferentes vias de ativação atuando como uma maquinaria complexa e cheia de interconexões. O mapa a

seguir é um diagrama esquemático simples sugerindo a participação de algumas proteínas que foram citadas no contexto da discussão e da literatura sobre as vias de ativação de neutrófilos diante desse estímulo.

Na figura abaixo temos a representação gráfica das vias ativadas pelo fMLP. AS proteínas em azul da figura 34 abaixo representam as proteínas reguladas pelo estímulo no presente trabalho.



**Figura 33. Vias de ativação em neutrófilos.** Descrição de vias de ativação presentes na literatura, somados aos dados adquiridos pelos no presente trabalho. E em azul temos as representação de algumas das proteínas que foram encontradas reguladas neste presente trabalho. Nesta figura temos a representação também dos produtos dessas vias.

## 6. CONCLUSÕES

Em conclusão, o peptídeo n-formilado fMLP em pequenas concentrações ativou diversas vias intracelulares envolvendo diferentes grupos proteicos e diversos mecanismos efetores. Obteve-se um número considerável de evidências para corroborar que o fMLP causa elevados níveis de stress e resulta em mecanismos antioxidativos para lidar com o processo inflamatório e finalmente a conclusão do processo com a ativação de vias de apoptose.

A eficiência dos métodos de análise proteômica proporcionaram a identificação de 8362 proteínas, sendo 301 proteínas reguladas diante do estímulo com fMLP. Pois, proteínas importantes para a resposta inflamatória dos neutrófilos foram identificadas, mostrando que a análise comparativa dos mapas proteômicos utilizando diferentes métodos de aquisição e extração proteicas atuaram de forma complementar na robustez da identificação mais abrangente de proteínas de neutrófilos, tanto quiescentes quanto ativados com fMLP.

Ademais, existe uma forte conexão entre a família das pequenas GTPases com a maioria dos processo desencadeados pela ativação de vias por fMLP, como por exemplo as evidências de alterações estruturais em MEV. Com as análises conjugadas será possível sugerir pontos de modulação da resposta inflamatória promovidas por agentes ativadores relacionados a receptores ligados a proteína G.

A identificação de regulações por subunidades do proteassoma 26S tendo extensa participação nas vias reguladas, o que pode ser um indicativo para um mecanismo de regulação por esse complexo.



Outrossim, a proteômica se mostra uma ferramenta essencial para a análise de vias, pois proporciona a identificação de proteínas que estão em pequenas quantidades como citocinas liberadas pela ativação

No mais, os mecanismos de morte celular programada com divergência entre vias de ativação e bloqueio da apoptose, podendo acarretar desregulação pois os dados tentem a sugerir um fino balanço entre as vias de vida e morte.

O presente trabalho apresenta um conjunto de proteínas com diversas funções relacionadas aos processos da resposta inflamatória, que incluem a atividade oxidativa, motilidade, metabolismo energético e sinalização intra e intercelular. Este estudo adiciona dados relacionados à ativação de neutrófilos por fMLP, também revelando proteínas que não foram previamente identificadas em neutrófilos, ampliando as possibilidades de modulação da resposta inflamatória.

A conclusão deste trabalho representa marco para a pesquisa com neutrófilos humanos, pois os dados resultaram em uma análise compreensiva de resposta de neutrófilos a indução da inflamação por fMLP. Obtivemos o maior número de proteínas identificadas em neutrófilos até o presente momento, tornado esse trabalho o mais representativo em proteômica de neutrófilos.

## 7. ANEXOS

### Anexo 1. Lista de proteínas reguladas na análise de extratos totais não enriquecidos down reguladas.

| Entrada Uniprot | Nome da proteína  | Nome do gene | LOG2 COEF | pValue |
|-----------------|---|--------------|-----------|--------|
| 1433E_HUMAN     | 14-3-3 protein epsilon  | YWHAE        | -1.0766   | 0.040  |
| 1433F_HUMAN     | 14-3-3 protein eta (Protein AS1)  | YWHAH        | -0.0388   | 0.017  |
| PRS8_HUMAN      | 26S protease regulatory subunit 8 (26S proteasome AAA-ATPase subunit RPT6)              | PSMC5        | -0.0444   | 0.046  |
| PSD10_HUMAN     | 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 10 (26S proteasome regulatory subunit p28) | PSMD10       | -0.1081   | 0.008  |
| RS3A_HUMAN      | 40S ribosomal protein S3a (Small ribosomal subunit protein eS1)                         | RPS3A        | -0.0353   | 0.012  |
| ACTC_HUMAN      | Actin, alpha cardiac muscle 1 (Alpha-cardiac actin)                                     | ACTC1        | -0.0402   | 0.048  |
| TCP4_HUMAN      | Activated RNA polymerase II transcriptional coactivator p15                             | SUB1         | -0.0576   | 0.022  |
| LYPA1_HUMAN     | Acyl-protein thioesterase 1 (APT-1) (hAPT1)   | LYPLA1       | -0.1415   | 0.024  |
| CECR1_HUMAN     | Adenosine deaminase CECR1 (EC 3.5.4.4) (Cat eye syndrome critical region protein 1)     | CECR1        | -0.1355   | 0.027  |
| PUR8_HUMAN      | Adenylosuccinate lyase (ADSL) (ASL)   | ADSL         | -0.0679   | 0.048  |
| ARF3_HUMAN      | ADP-ribosylation factor 3   | ARF3         | -0.0512   | 0.044  |
| AK1A1_HUMAN     | Alcohol dehydrogenase [NADP(+)]   | AKR1A1       | -1.2608   | 0.020  |
| A16A1_HUMAN     | Aldehyde dehydrogenase family 16 member A1  | ALDH16A1     | -0.1274   | 0.022  |
| AMPD2_HUMAN     | AMP deaminase 2   | AMPD2        | -0.0219   | 0.022  |
| ANXA1_HUMAN     | Annexin A1  | ANXA1        | -3.2867   | 0.040  |
| ANXA5_HUMAN     | Annexin A5  | ANXA5        | -0.0648   | 0.010  |
| APIG1_HUMAN     | AP-1 complex subunit gamma-1  | APIG1        | -2.7300   | 0.020  |

|              |  |            |         |       |
|--------------|--|------------|---------|-------|
| AP2A1_HUMAN  | AP-2 complex subunit alpha-1 (100 kDa coated vesicle protein A)  | AP2A1      | -0.1796 | 0.033 |
| BAX_HUMAN    | Apoptosis regulator BAX (Bcl-2-like protein 4) (Bcl2-L-4)  | BAX BCL2L4 | -3.3209 | 0.030 |
| LOX5_HUMAN   | Arachidonate 5-lipoxygenase (5-LO) (5-lipoxygenase)  | ALOX5      | -0.0402 | 0.012 |
| PFKAL_HUMAN  | ATP-dependent 6-phosphofructokinase, liver type (ATP-PFK)  | PFKL       | -0.0709 | 0.047 |
| BZW1_HUMAN   | Basic leucine zipper and W2 domain-containing protein 1 (Protein Orf)  | BZW1       | -0.1301 | 0.046 |
| BIEA_HUMAN   | Biliverdin reductase A (BVR A)   | BLVRA      | -0.0744 | 0.049 |
| CIB1_HUMAN   | Calcium and integrin-binding protein 1 (CIB)   | CIB1       | -0.1276 | 0.000 |
| CPZIP_HUMAN  | CapZ-interacting protein (Protein kinase substrate CapZIP)   | RCSD1      | -1.1219 | 0.000 |
| CAMP_HUMAN   | Cathelicidin antimicrobial peptide (18 kDa cationic antimicrobial protein) (CAP-18)  | CAMP CAP18 | -5.3188 | 0.010 |
| CATB_HUMAN   | Cathepsin B  | CTSB       | -0.1047 | 0.030 |
| B3KXH0_HUMAN | cDNA FLJ45395 fis, clone BRHIP3027191, highly similar to 150 kDa oxygen-regulated protein (Orp150)   | *          | -2.2499 | 0.050 |
| B3KXW9_HUMAN | cDNA FLJ46228 fis, clone TESTI4014908, highly similar to Dedicator of cytokinesis protein 2  | *          | -3.7081 | 0.040 |
| Q6ZR44_HUMAN | cDNA FLJ46672 fis, clone TRACH3009008, highly similar to Thioredoxin reductase   | *          | -5.9174 | 0.050 |
| B4DDH3_HUMAN | cDNA FLJ50749, highly similar to NADPH--cytochrome P450 reductase  | *          | -1.4527 | 0.050 |
| B4E335_HUMAN | cDNA FLJ52842, highly similar to Actin, cytoplasmic 1  | *          | -3.9402 | 0.040 |
| B4DQW4_HUMAN | cDNA FLJ53640, highly similar to Vitamin K-dependent gamma-carboxylase   | *          | -5.0305 | 0.020 |
| B7Z5V2_HUMAN | cDNA FLJ54141, highly similar to Ezrin<br>cDNA FLJ56133, highly similar to Serine/threonine-protein phosphatase 2A 65 kDa regulatory subunit A | *          | -2.9810 | 0.010 |
| B4DQY1_HUMAN | alpha isoform  | *          | -0.5588 | 0.030 |
| B4DR70_HUMAN | cDNA FLJ58049, highly similar to RNA-binding protein FUS   | *          | -3.9968 | 0.040 |
| B4DZQ7_HUMAN | cDNA FLJ58652, highly similar to Probable ATP-dependent RNA helicase DDX17   | *          | -1.5880 | 0.040 |
| B4DNX5_HUMAN | cDNA FLJ59941, highly similar to Drebrin-like protein  | *          | -5.6682 | 0.040 |
| CHM4B_HUMAN  | Charged multivesicular body protein 4b (Chromatin-modifying protein 4b)  | CHMP4B     | -1.9507 | 0.010 |
| CLM1_HUMAN   | CMRF35-like molecule 1 (CLM-1)   | CD300LF    | -0.1345 | 0.020 |
| CSN3_HUMAN   | COP9 signalosome complex subunit 3 (SGN3) (Signalosome subunit 3)  | COPS3      | -0.1204 | 0.029 |
| CSN4_HUMAN   | COP9 signalosome complex subunit 4 (SGN4) (Signalosome subunit 4)  | COPS4      | -0.0743 | 0.020 |

|                  |   |          |         |       |
|------------------|---|----------|---------|-------|
| CLC5A_HUMAN      | C-type lectin domain family 5 member A (C-type lectin superfamily member 5)                                       | CLEC5A   | -0.1050 | 0.042 |
| SYCC_HUMAN       | Cysteine--tRNA ligase, cytoplasmic (EC 6.1.1.16) (Cysteinyl-tRNA synthetase) (CysRS)                              | CARS     | -0.0564 | 0.005 |
| CDD_HUMAN        | Cytidine deaminase  | CDA CDD  | -1.5623 | 0.050 |
| COX5B_HUMAN      | Cytochrome c oxidase subunit 5B, mitochondrial (Cytochrome c oxidase polypeptide Vb)                              | COX5B    | -0.0598 | 0.011 |
| ODO2_HUMAN       | Dihydropyridyllysine-residue succinyltransferase component of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex, mitochondrial | DLST     | -0.0318 | 0.031 |
| MP2K1_HUMAN      | Dual specificity mitogen-activated protein kinase kinase 1 (MAP kinase kinase 1)                                  | MAP2K1   | -0.0854 | 0.005 |
| DYN2_HUMAN       | Dynamin-2   | DNM2     | -0.0461 | 0.039 |
| DYN3_HUMAN       | Dynamin-3   | DNM3     | -0.0511 | 0.008 |
| HUWE1_HUMAN      | E3 ubiquitin-protein ligase HUWE1   | HUWE1    | -0.1041 | 0.003 |
| EMAL4_HUMAN      | Echinoderm microtubule-associated protein-like 4 (EMAP-4)   | EML4     | -0.1019 | 0.024 |
| ELMD2_HUMAN      | ELMO domain-containing protein 2  | ELMOD2   | -0.1104 | 0.002 |
| A4UCS8_HUMAN     | Enolase   | A4UCS8   | -3.3348 | 0.040 |
| ECI1_HUMAN       | Enoyl-CoA delta isomerase 1, mitochondrial  | ECI1     | -0.1332 | 0.004 |
| V9HWE9_HUMAN     | Epididymis secretory protein Li 22  | HEL-S-22 | -0.6418 | 0.020 |
| ERLN1_HUMAN      | Erlin-1 (Endoplasmic reticulum lipid raft-associated protein 1)   | ERLIN1   | -0.0720 | 0.014 |
| FNBP1_HUMAN      | Formin-binding protein 1 (Formin-binding protein 17) (hFBP17)   | FNBP1    | -0.0756 | 0.006 |
| ALDOA_HUMAN      | Fructose-bisphosphate aldolase A  | ALDOA    | -0.0639 | 0.025 |
| LEG3_HUMAN       | Galectin-3 (Gal-3) (35 kDa lectin)  | LGALS3   | -0.0788 | 0.003 |
| ADDG_HUMAN       | Gamma-adducin (Adducin-like protein 70)   | ADD3     | -0.1587 | 0.022 |
| GBRAP_HUMAN      | Gamma-aminobutyric acid receptor-associated protein (GABA(A) receptor-associated protein)                         | GABARAP  | -0.0755 | 0.012 |
| GSDMD_HUMAN      | Gasdermin-D (Gasdermin domain-containing protein 1)   | GSDMD    | -0.0631 | 0.011 |
| GPAT3_HUMAN      | Glycerol-3-phosphate acyltransferase 3 (GPAT-3)   | GPAT3    | -0.0638 | 0.007 |
| GYS1_HUMAN       | Glycogen [starch] synthase, muscle  | GYS1     | -0.1150 | 0.032 |
| A0A090N8G0_HUMAN | Glycyl-tRNA synthetase  | GARS     | -5.2516 | 0.020 |
| RASK_HUMAN       | GTPase KRas (K-Ras 2) (Ki-Ras) (c-K-ras) (c-Ki-ras)   | KRAS     | -0.0297 | 0.003 |

|              |  |          |          |       |
|--------------|--|----------|----------|-------|
| G3V3J9_HUMAN | Guanine nucleotide-binding protein subunit gamma   | CNG2     | -0.7862  | 0.050 |
| G3V2C9_HUMAN | Guanine nucleotide-binding protein subunit gamma (Fragment)                                    | GNG2     | -1.6643  | 0.010 |
| Q5SWC8_HUMAN | Heterochromatin protein 1-binding protein 3 (Fragment)   | HP1BP3   | -1.1632  | 0.030 |
| HPCL1_HUMAN  | Hippocalcin-like protein 1 (Calcium-binding protein BDR-1)                                     | HPCAL1   | -0.0581  | 0.038 |
| H14_HUMAN    | Histone H1.4   | HIST1H1E | -0.1069  | 0.019 |
| B2R5B3_HUMAN | Histone H2A  | *        | -6.5540  | 0.010 |
| Q9HA11_HUMAN | Histone H2A  | *        | -5.3504  | 0.008 |
| H31_HUMAN    | Histone H3.1   | HIST1H3A | -0.0535  | 0.019 |
| H32_HUMAN    | Histone H3.2   | HIST2H3A | -1.0893  | 0.050 |
| RBBP4_HUMAN  | Histone-binding protein RBBP4 (Chromatin assembly factor 1 subunit C)                          | RBBP4    | -0.1123  | 0.036 |
| HIPK1_HUMAN  | Homeodomain-interacting protein kinase 1   | HIPK1    | -0.3033  | 0.017 |
| HSDL2_HUMAN  | Hydroxysteroid dehydrogenase-like protein 2  | HSDL2    | -0.1148  | 0.044 |
| IL1RA_HUMAN  | Interleukin-1 receptor antagonist protein (IL-1RN)   | IL1RN    | -0.0972  | 0.038 |
| ASGL1_HUMAN  | Isoaspartyl peptidase/L-asparaginase   | ASRGL1   | -0.0683  | 0.031 |
| DHRS7_HUMAN  | Isoform 2 of Dehydrogenase/reductase SDR family member 7                                       | DHR7     | -1.0111  | 0.040 |
| C9JXK0_HUMAN | Lamin-B receptor (Fragment)  | LBR      | 0.0000   | 0.050 |
| LIRA6_HUMAN  | Leukocyte immunoglobulin-like receptor subfamily A member 6 (Immunoglobulin-like transcript 8) | LILRA6   | -0.0681  | 0.017 |
| PPAC_HUMAN   | Low molecular weight phosphotyrosine protein phosphatase (LMW-PTP)                             | ACP1     | -0.0460  | 0.029 |
| SYK_HUMAN    | Lysine--tRNA ligase (EC 6.1.1.6) (Lysyl-tRNA synthetase) (LysRS)                               | KARS     | -0.0676  | 0.029 |
| LYSC_HUMAN   | Lysozyme C   | LYZ LZM  | -1.2744  | 0.040 |
| Q6FHZ0_HUMAN | Malate dehydrogenase   | MDH2     | -1.5091  | 0.020 |
| STEAP4_HUMAN | Metalloreductase STEAP4  | STEAP4   | -0.0616  | 0.050 |
| MOES_HUMAN   | Moesin (Membrane-organizing extension spike protein)   | MSN      | -0.0390  | 0.007 |
| MGLL_HUMAN   | Monoglyceride lipase (MGL)   | MGLL     | -0.1019  | 0.003 |
| MNDA_HUMAN   | Myeloid cell nuclear differentiation antigen   | MNDA     | -0.0286  | 0.041 |
| PERM_HUMAN   | Myeloperoxidase (MPO)  | MPO      | -11.7467 | 0.010 |

|              |  |          |         |       |
|--------------|--|----------|---------|-------|
| NUMA1_HUMAN  | Nuclear mitotic apparatus protein 1 (NuMA protein)                         | NUMA1    | -0.0981 | 0.012 |
| NUP93_HUMAN  | Nuclear pore complex protein Nup93   | NUP93    | -0.2529 | 0.018 |
| PDLI7_HUMAN  | PDZ and LIM domain protein 7 (LIM mineralization protein)                  | PDLIM7   | -0.0857 | 0.011 |
| PPIL3_HUMAN  | Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase-like 3 (PPIase)                        | PPIL3    | -0.1248 | 0.031 |
| PRDX6_HUMAN  | Peroxiredoxin-6  | PRDX6    | -0.0314 | 0.013 |
| PX11B_HUMAN  | Peroxisomal membrane protein 11B (Peroxin-11B)                             | PEX11B   | -0.0474 | 0.018 |
| ETHE1_HUMAN  | Persulfide dioxygenase ETHE1, mitochondrial                                | ETHE1    | -0.0556 | 0.040 |
| SHIP1_HUMAN  | Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate 5-phosphatase 1                   | INPP5D   | -0.0740 | 0.010 |
| PECA1_HUMAN  | Platelet endothelial cell adhesion molecule (PECAM-1) (CD antigen CD31)    | PECAM1   | -0.0383 | 0.013 |
| PA1B3_HUMAN  | Platelet-activating factor acetylhydrolase IB subunit gamma                | PAFAH1B3 | -0.0912 | 0.011 |
| PTBP1_HUMAN  | Polypyrimidine tract-binding protein 1 (PTB)                               | PTBP1    | -0.0471 | 0.012 |
| DDX17_HUMAN  | Probable ATP-dependent RNA helicase DDX17                                  | DDX17    | -0.0693 | 0.007 |
| PHB_HUMAN    | Prohibitin   | PHB      | -0.0666 | 0.025 |
| IL16_HUMAN   | Pro-interleukin-16 [Cleaved into: Interleukin-16 (IL-16)]                  | IL16     | -0.0580 | 0.024 |
| PSB10_HUMAN  | Proteasome subunit beta type-10  | PSMB10   | -0.0936 | 0.011 |
| PSB9_HUMAN   | Proteasome subunit beta type-9   | PSMB9    | -0.0415 | 0.025 |
| LMAN1_HUMAN  | Protein ERGIC-53 (ER-Golgi intermediate compartment 53 kDa protein) (Gp58) | LMAN1    | -0.2104 | 0.032 |
| KPCB_HUMAN   | Protein kinase C beta type (PKC-B) (PKC-beta)                              | PRKCB    | -0.1165 | 0.014 |
| MGN_HUMAN    | Protein mago nashi homolog   | MAGOH    | -0.0537 | 0.007 |
| PPM1A_HUMAN  | Protein phosphatase 1A   | PPM1A    | -0.0506 | 0.026 |
| Q75L23_HUMAN | Putative uncharacterized protein PSMC2 (Fragment)                          | PSMC2    | -0.5580 | 0.008 |
| KPYM_HUMAN   | Pyruvate kinase PKM (p58)  | PKM      | -1.1839 | 0.020 |
| RAB24_HUMAN  | Ras-related protein Rab-24   | RAB24    | -0.0883 | 0.017 |
| RAB5A_HUMAN  | Ras-related protein Rab-5A   | RAB5A    | -0.0253 | 0.004 |
| RACK1_HUMAN  | Receptor of activated protein C kinase 1                                   | RACK1    | -0.0677 | 0.035 |
| RPE_HUMAN    | Ribulose-phosphate 3-epimerase   | RPE      | -0.1892 | 0.041 |

|              |  |         |         |       |
|--------------|--|---------|---------|-------|
| METK2_HUMAN  | S-adenosylmethionine synthase isoform type-2 (AdoMet synthase 2)                     | MAT2A   | -0.0729 | 0.036 |
| J3KSR8_HUMAN | Serine/arginine-rich-splicing factor 1 (Fragment)                                    | SRSF1   | -4.3039 | 0.010 |
| PTPA_HUMAN   | Serine/threonine-protein phosphatase 2A activator                                    | PPP2R4  | -0.0449 | 0.034 |
| PP2BA_HUMAN  | Serine/threonine-protein phosphatase 2B catalytic subunit alpha isoform              | PPP3CA  | -0.0771 | 0.045 |
| 3BP1_HUMAN   | SH3 domain-binding protein 1 (3BP-1)   | SH3BP1  | -0.0400 | 0.034 |
| SIAS_HUMAN   | Sialic acid synthase (N-acetylneuraminase synthase)                                  | NANS    | -0.0746 | 0.018 |
| STA5A_HUMAN  | Signal transducer and activator of transcription 5A                                  | STAT5A  | -0.0363 | 0.003 |
| SMAP_HUMAN   | Small acidic protein   | SMAP    | -0.0997 | 0.008 |
| SMD2_HUMAN   | Small nuclear ribonucleoprotein Sm D2 (Sm-D2) (snRNP core protein D2)                | SNRPD2  | -0.0665 | 0.028 |
| SUCB2_HUMAN  | Succinate--CoA ligase [GDP-forming] subunit beta, mitochondrial                      | SUCLG2  | -0.0327 | 0.023 |
| STX11_HUMAN  | Syntaxin-11  | STX11   | -0.0369 | 0.034 |
| TRXR1_HUMAN  | Thioredoxin reductase 1, cytoplasmic (TR)  | TXNRD1  | -0.0199 | 0.028 |
| TSP1_HUMAN   | Thrombospondin-1   | THBS1   | -0.0556 | 0.003 |
| THYN1_HUMAN  | Thymocyte nuclear protein 1 (Thymocyte protein Thy28)                                | THYN1   | -6.2503 | 0.020 |
| TCRG1_HUMAN  | Transcription elongation regulator 1 (TATA box-binding protein-associated factor 2S) | TCERG1  | -0.0644 | 0.046 |
| TGFB1_HUMAN  | Transforming growth factor beta-1 (TGF-beta-1)                                       | TGFB1   | -0.0514 | 0.025 |
| C9JX21_HUMAN | Transforming protein RhoA  | RHOA    | -1.4584 | 0.030 |
| TRADD_HUMAN  | Tumor necrosis factor receptor type 1-associated DEATH domain protein                | TRADD   | -0.0365 | 0.028 |
| Q5CAQ5_HUMAN | Tumor rejection antigen (Gp96) 1   | TRA1    | -0.8813 | 0.040 |
| PTN18_HUMAN  | Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 18                                    | PTPN18  | -0.2684 | 0.039 |
| RU17_HUMAN   | U1 small nuclear ribonucleoprotein 70 kDa (U1 snRNP 70 kDa)                          | SNRNP70 | -0.0678 | 0.014 |
| UBP14_HUMAN  | Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 14   | USP14   | -0.0537 | 0.025 |
| UB2V1_HUMAN  | Ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 1 (UEV-1)                                    | UBE2V1  | -0.2231 | 0.025 |
| MY18A_HUMAN  | Unconventional myosin-XVIIIa (Molecule associated with JAK3 N-terminus)              | MYO18A  | -0.2332 | 0.007 |
| VPS11_HUMAN  | Vacuolar protein sorting-associated protein 11 homolog (hVPS11)                      | VPS11   | -0.1691 | 0.037 |
| VPS18_HUMAN  | Vacuolar protein sorting-associated protein 18 homolog (hVPS18)                      | VPS18   | -0.0848 | 0.012 |

|             |   |        |         |       |
|-------------|---|--------|---------|-------|
| VP26B_HUMAN | Vacuolar protein sorting-associated protein 26B (Vesicle protein sorting 26B) | VPS26B | -0.0571 | 0.001 |
| VPS4A_HUMAN | Vacuolar protein sorting-associated protein 4A                                | VPS4A  | -0.0933 | 0.000 |
| VASP_HUMAN  | Vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP)                                  | VASP   | -1.0987 | 0.000 |
| VAPA_HUMAN  | Vesicle-associated membrane protein-associated protein A (VAMP-A)             | VAPA   | -0.1029 | 0.013 |
| VIME_HUMAN  | Vimentin  | VIM    | -0.0621 | 0.046 |
| VDAC2_HUMAN | Voltage-dependent anion-selective channel protein 2 (VDAC-2) (hVDAC2)         | VDAC2  | -0.0344 | 0.038 |
| VDAC3_HUMAN | Voltage-dependent anion-selective channel protein 3 (VDAC-3) (hVDAC3)         | VDAC3  | -0.0405 | 0.042 |
| ZN132_HUMAN | Zinc finger protein 132   | ZNF132 | -0.0999 | 0.035 |
| ZN512_HUMAN | Zinc finger protein 512   | ZNF512 | -0.0965 | 0.004 |

## Anexo 2. Lista de proteínas reguladas na análise de extratos totais não enriquecidos up reguladas

| Entrada Uniprot | Nome da proteína  | Nome do gene | LOG2 COEF | pValue |
|-----------------|---|--------------|-----------|--------|
| AKCL2_HUMAN     | 1,5-anhydro-D-fructose reductase (AF reductase)                                       | AKR1E2       | 0.0959    | 0.048  |
| CH10_HUMAN      | 10 kDa heat shock protein, mitochondrial (Hsp10)                                      | HSPE1        | 0.0637    | 0.023  |
| PRS4_HUMAN      | 26S protease regulatory subunit 4   | PSMC1        | 0.1093    | 0.013  |
| RS18_HUMAN      | 40S ribosomal protein S18 (Ke-3)  | RPS18        | 0.0573    | 0.014  |
| B5MCP9_HUMAN    | 40S ribosomal protein S7  | RPS8         | 3.1024    | 0.030  |
| RL27A_HUMAN     | 60S ribosomal protein L27a (Large ribosomal subunit protein uL15)                     | RPL27A       | 0.0993    | 0.006  |
| ARPC2_HUMAN     | Actin-related protein 2/3 complex subunit 2 (Arp2/3 complex 34 kDa subunit) (p34-ARC) | ARPC2        | 0.0570    | 0.010  |
| ARP3_HUMAN      | Actin-related protein 3 (Actin-like protein 3)  | ACTR3        | 0.0454    | 0.046  |



|              |  |         |        |       |
|--------------|--|---------|--------|-------|
| B4E1L0_HUMAN | Adenylosuccinate synthetase isozyme 2  | ADSS    | 0.6611 | 0.040 |
| APMAP_HUMAN  | Adipocyte plasma membrane-associated protein (Protein BSCv)                          | APMAP   | 0.1320 | 0.042 |
| ARF4_HUMAN   | ADP-ribosylation factor 4  | ARF4    | 0.0633 | 0.015 |
| ARL1_HUMAN   | ADP-ribosylation factor-like protein 1   | ARL1    | 0.0671 | 0.009 |
| ARL11_HUMAN  | ADP-ribosylation factor-like protein 11  | ARL11   | 0.1552 | 0.044 |
| F5GXS2_HUMAN | Alpha-actinin-4  | ACTN4   | 4.8564 | 0.040 |
| ACTN4_HUMAN  | Alpha-actinin-4 (Non-muscle alpha-actinin 4)   | ACTN4   | 0.0202 | 0.046 |
| AP3S1_HUMAN  | AP-3 complex subunit sigma-1 (AP-3 complex subunit sigma-3A)                         | AP3S1   | 0.0379 | 0.022 |
| API5_HUMAN   | Apoptosis inhibitor 5 (API-5)  | API5    | 0.0593 | 0.027 |
| AIFM1_HUMAN  | Apoptosis-inducing factor 1, mitochondrial   | AIFM1   | 0.0250 | 0.039 |
| ACTBL_HUMAN  | Beta-actin-like protein 2 (Kappa-actin)  | ACTBL2  | 0.0714 | 0.039 |
| BROX_HUMAN   | BRO1 domain-containing protein BROX (BRO1 domain- and CAAX motif-containing protein) | BROX    | 0.0991 | 0.046 |
| C3AR_HUMAN   | C3a anaphylatoxin chemotactic receptor (C3AR) (C3a-R)                                | C3AR1   | 0.1416 | 0.009 |
| KCC1A_HUMAN  | Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type 1                                   | CAMK1   | 0.0827 | 0.001 |
| CALX_HUMAN   | Calnexin   | CANX    | 1.2965 | 0.010 |
| CAN1_HUMAN   | Calpain-1 catalytic subunit  | CAPN1   | 0.0690 | 0.010 |
| CAH4_HUMAN   | Carbonic anhydrase 4   | CA4     | 0.1731 | 0.023 |
| B7Z5V3_HUMAN | cDNA FLJ53088, highly similar to Ras-related protein Rab-18                          | *       | 2.1028 | 0.030 |
| B4DGP9_HUMAN | cDNA FLJ54102, highly similar to Beta-soluble NSF attachment protein                 | *       | 5.3705 | 0.030 |
| B4DNT8_HUMAN | cDNA FLJ54370, highly similar to Heat shock 70 kDa protein 1                         | *       | 1.1486 | 0.010 |
| CDC42_HUMAN  | Cell division control protein 42 homolog   | CDC42   | 0.0425 | 0.021 |
| CCAR1_HUMAN  | Cell division cycle and apoptosis regulator protein 1                                | CCAR1   | 0.1658 | 0.008 |
| MO2R1_HUMAN  | Cell surface glycoprotein CD200 receptor 1   | CD200R1 | 0.2402 | 0.022 |
| CH3L1_HUMAN  | Chitinase-3-like protein 1   | CHI3L1  | 0.0829 | 0.040 |
| CISY_HUMAN   | Citrate synthase, mitochondrial  | CS      | 0.0665 | 0.043 |
| COPE_HUMAN   | Coatomer subunit epsilon (Epsilon-coat protein) (Epsilon-COP)                        | COPE    | 0.0774 | 0.015 |

|              |   |           |        |       |
|--------------|---|-----------|--------|-------|
| F120A_HUMAN  | Constitutive coactivator of PPAR-gamma-like protein 1   | FAM120A   | 0.2873 | 0.004 |
| CSN4_HUMAN   | COP9 signalosome complex subunit 4  | COPS4     | 6.1189 | 0.030 |
| H2AW_HUMAN   | Core histone macro-H2A.2 (Histone macroH2A2) (mH2A2)  | H2AFY2    | 0.0929 | 0.032 |
| PEBB_HUMAN   | Core-binding factor subunit beta (CBF-beta)   | CBFB      | 0.0734 | 0.028 |
| CDD_HUMAN    | Cytidine deaminase  | CDA       | 0.0779 | 0.044 |
| A2A369_HUMAN | Dedicator of cytokinesis protein 8  | DOCK8     | 2.7258 | 0.050 |
| DRS7B_HUMAN  | Dehydrogenase/reductase SDR family member 7B  | DHRS7B    | 0.3126 | 0.014 |
| DRG2_HUMAN   | Developmentally-regulated GTP-binding protein 2 (DRG-2)   | DRG2      | 0.0353 | 0.012 |
| DPYL5_HUMAN  | Dihydropyrimidinase-related protein 5 (DRP-5)   | DPYSL5    | 0.1089 | 0.030 |
| CATC_HUMAN   | Dipeptidyl peptidase 1  | CTSC      | 0.0519 | 0.012 |
| G3V1D3_HUMAN | Dipeptidyl peptidase 3 (HCG2016942, isoform CRA_c)  | DPP3      | 1.3370 | 0.030 |
| PRI2_HUMAN   | DNA primase large subunit   | PRIM2     | 0.0801 | 0.016 |
| DCTN1_HUMAN  | Dynactin subunit 1 (150 kDa dynein-associated polypeptide)  | DCTN1     | 0.0351 | 0.020 |
| DCTN2_HUMAN  | Dynactin subunit 2 (50 kDa dynein-associated polypeptide)   | DCTN2     | 0.0593 | 0.035 |
| DYN1_HUMAN   | Dynamamin-1   | DNM1      | 0.0676 | 0.006 |
| CBL_HUMAN    | E3 ubiquitin-protein ligase CBL   | CBL       | 0.0794 | 0.025 |
| CBLB_HUMAN   | E3 ubiquitin-protein ligase CBL-B   | CBLB      | 0.0854 | 0.001 |
| RFFL_HUMAN   | E3 ubiquitin-protein ligase rififylin   | RFFL      | 0.0802 | 0.026 |
| EMAL2_HUMAN  | Echinoderm microtubule-associated protein-like 2 (EMAP-2) (HuEMAP-2)                                    | EML2      | 0.0224 | 0.049 |
| EEF2_HUMAN   | Elongation factor 2 (EF-2)  | EEF2      | 0.0362 | 0.026 |
| PERE_HUMAN   | Eosinophil peroxidase (EPO) (EC 1.11.1.7)   | EPX       | 0.0281 | 0.005 |
| ERO1A_HUMAN  | ERO1-like protein alpha (ERO1-L) (ERO1-L-alpha)   | ERO1A     | 0.1561 | 0.037 |
| FEN1_HUMAN   | Flap endonuclease 1 (FEN-1)   | FEN1      | 0.0513 | 0.036 |
| Q9H7J2_HUMAN | FLJ00087 protein (Fragment)   | FLJ00087  | 2.1571 | 0.020 |
| GBRL2_HUMAN  | Gamma-aminobutyric acid receptor-associated protein-like 2 (GABA(A) receptor-associated protein-like 2) | GABARAPL2 | 0.0648 | 0.047 |

|              |  |             |        |       |
|--------------|--|-------------|--------|-------|
| Q2VF42_HUMAN | Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase (EC 1.1.1.49) (Fragment)     | G6PD        | 1.2160 | 0.010 |
| C7DJS1_HUMAN | Glutathione S-transferase pi (Fragment)                          | GSTP1       | 2.7699 | 0.010 |
| NMT1_HUMAN   | Glycylpeptide N-tetradecanoyltransferase 1                       | NMT1        | 0.0764 | 0.030 |
| H0YFC6_HUMAN | GTP-binding nuclear protein Ran (Fragment)                       | RAN         | 1.2295 | 0.020 |
| GBB2_HUMAN   | Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) subunit beta-2 | GNB2        | 1.5346 | 0.030 |
| D3DV69_HUMAN | HCG1996054, isoform CRA_d  | hCG_1996054 | 1.4723 | 0.020 |
| HMOX2_HUMAN  | Heme oxygenase 2 (HO-2)  | HMOX2       | 0.0494 | 0.043 |
| ROAA_HUMAN   | Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B (hnRNP A/B)          | HNRNPAB     | 0.3371 | 0.011 |
| HNRH1_HUMAN  | Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H (hnRNP H)              | HNRNPH1     | 0.0187 | 0.005 |
| HNRPR_HUMAN  | Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein R (hnRNP R)              | HNRNPR      | 0.0564 | 0.024 |
| HNRL2_HUMAN  | Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U-like protein 2         | HNRNPUL2    | 4.3655 | 0.020 |
| HMGB2_HUMAN  | High mobility group protein B2 (High mobility group protein 2)   | HMGB2       | 0.0433 | 0.044 |
| H13_HUMAN    | Histone H1.3 (Histone H1c) (Histone H1s-2)                       | HIST1H1D    | 0.0398 | 0.028 |
| H15_HUMAN    | Histone H1.5 (Histone H1a) (Histone H1b) (Histone H1s-3)         | HIST1H1B    | 0.0276 | 0.003 |
| H2A1D_HUMAN  | Histone H2A type 1-D (Histone H2A.3) (Histone H2A/g)             | HIST1H2AD   | 0.0496 | 0.013 |
| E9PRF4_HUMAN | Histone-lysine N-methyltransferase SETDB1 (Fragment)             | SETDB1      | 1.2819 | 0.040 |
| HCDH_HUMAN   | Hydroxyacyl-coenzyme A dehydrogenase, mitochondrial (HCDH)       | HADH        | 0.0708 | 0.041 |
| IMB1_HUMAN   | Importin subunit beta-1 (Importin-90)                            | KPNB1       | 0.3673 | 0.048 |
| ITAL_HUMAN   | Integrin alpha-L (CD11 antigen-like family member A)             | ITGAL       | 0.0833 | 0.025 |
| ITAM_HUMAN   | Integrin alpha-M (CD11 antigen-like family member B)             | ITGAM       | 0.0508 | 0.004 |
| B4DY09_HUMAN | Interleukin enhancer-binding factor 2                            | ILF2        | 1.4507 | 0.030 |
| I17RE_HUMAN  | Interleukin-17 receptor E (IL-17 receptor E) (IL-17RE)           | IL17RE      | 0.2003 | 0.036 |
| IL23R_HUMAN  | Interleukin-23 receptor (IL-23 receptor) (IL-23R)                | IL23R       | 0.1021 | 0.006 |
| ADDA_HUMAN   | Isoform 2 of Alpha-adducin                                       | ADD1        | 1.0544 | 0.050 |
| SORCN_HUMAN  | Isoform 3 of Sorcin  | SRI         | 1.4874 | 0.010 |
| LAP2B_HUMAN  | Lamina-associated polypeptide 2, isoforms beta/gamma             | TMPO        | 0.0851 | 0.000 |

|                  |   |         |        |       |
|------------------|---|---------|--------|-------|
| LBR_HUMAN        | Lamin-B receptor (Integral nuclear envelope inner membrane protein)                               | LBR     | 0.1296 | 0.038 |
| H3BSW0_HUMAN     | Leucine-rich repeat-containing protein 57 (Fragment)  | LRRC57  | 5.2870 | 0.040 |
| FCG2A_HUMAN      | Low affinity immunoglobulin gamma Fc region receptor II-a   | FCGR2A  | 0.0742 | 0.050 |
| LCP2_HUMAN       | Lymphocyte cytosolic protein 2 (SH2 domain-containing leukocyte protein of 76 kDa)                | LCP2    | 0.0555 | 0.010 |
| TIMP2_HUMAN      | Metalloproteinase inhibitor 2 (CSC-21K)   | TIMP2   | 0.0371 | 0.043 |
| MARE1_HUMAN      | Microtubule-associated protein RP/EB family member 1 (APC-binding protein EB1)                    | MAPRE1  | 0.1080 | 0.041 |
| RAE1L_HUMAN      | mRNA export factor (Rae1 protein homolog) (mRNA-associated protein mrnp 41)                       | RAE1    | 0.1137 | 0.046 |
| Q6PJT4_HUMAN     | MSN protein (Fragment)  | MSN     | 1.0369 | 0.030 |
| G3V1V0_HUMAN     | Myosin light polypeptide 6  | MYL6    | 5.7682 | 0.030 |
| B2R6A3_HUMAN     | Na(+)/H(+) exchange regulatory cofactor NHE-RF  | *       | 5.9430 | 0.000 |
| MAOM_HUMAN       | NAD-dependent malic enzyme, mitochondrial (NAD-ME)  | ME2     | 0.0283 | 0.003 |
| NAA10_HUMAN      | N-alpha-acetyltransferase 10  | NAA10   | 0.0620 | 0.001 |
| NCKPL_HUMAN      | Nck-associated protein 1-like   | NCKAP1L | 0.0872 | 0.029 |
| ELNE_HUMAN       | Neutrophil elastase   | ELANE   | 2.1336 | 0.000 |
| FPR2_HUMAN       | N-formyl peptide receptor 2 (FMLP-related receptor I) (FMLP-R-I) (Formyl peptide receptor-like 1) | FPR2    | 0.0396 | 0.019 |
| NUP50_HUMAN      | Nuclear pore complex protein Nup50 (50 kDa nucleoporin)   | NUP50   | 0.1106 | 0.043 |
| NUCB1_HUMAN      | Nucleobindin-1 (CALNUC)   | NUCB1   | 0.0246 | 0.029 |
| NP1L1_HUMAN      | Nucleosome assembly protein 1-like 1 (NAP-1-related protein) (hNRP)                               | NAP1L1  | 0.0332 | 0.030 |
| FKBP8_HUMAN      | Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP8 (PPIase FKBP8)  | FKBP8   | 0.1196 | 0.002 |
| PLIN3_HUMAN      | Perilipin-3   | PLIN3   | 6.1426 | 0.010 |
| DHB4_HUMAN       | Peroxisomal multifunctional enzyme type 2 (MFE-2)   | HSD17B4 | 0.0448 | 0.040 |
| PLAP_HUMAN       | Phospholipase A-2-activating protein (PLA2P) (PLAP)   | PLAA    | 0.1406 | 0.027 |
| PABP1_HUMAN      | Polyadenylate-binding protein 1 (PABP-1) (Poly(A)-binding protein 1)                              | PABPC1  | 0.1051 | 0.038 |
| CATH_HUMAN       | Pro-cathepsin H [Cleaved into: Cathepsin H mini chain; Cathepsin H                                | CTSH    | 0.0421 | 0.005 |
| A0A024R5L0_HUMAN | Prolylcarboxypeptidase (Angiotensinase C), isoform CRA_a  | PRCP    | 1.4453 | 0.020 |

|                  |   |          |        |       |
|------------------|---|----------|--------|-------|
| PSA7_HUMAN       | Proteasome subunit alpha type-7   | PSMA7    | 0.0428 | 0.026 |
| BUD31_HUMAN      | Protein BUD31 homolog (Protein EDG-2) (Protein G10 homolog)                               | BUD31    | 0.0829 | 0.019 |
| DEK_HUMAN        | Protein DEK   | DEK      | 0.0453 | 0.022 |
| PDIA3_HUMAN      | Protein disulfide-isomerase A3  | PDIA3    | 0.0660 | 0.043 |
| PDIA6_HUMAN      | Protein disulfide-isomerase A6  | PDIA6    | 0.1107 | 0.013 |
| PARK7_HUMAN      | Protein DJ-1 (DJ-1)   | PARK7    | 0.0848 | 0.032 |
| THMS2_HUMAN      | Protein THEMIS2   | THEMIS2  | 0.0657 | 0.022 |
| PADI2_HUMAN      | Protein-arginine deiminase type-2   | PADI2    | 2.0085 | 0.040 |
| RBBP9_HUMAN      | Putative hydrolase RBBP9  | RBBP9    | 0.0440 | 0.004 |
| Q6P1L4_HUMAN     | PYGL protein (Fragment)   | PYGL     | 5.6625 | 0.020 |
| A0A024R1U4_HUMAN | RAB5C, member RAS oncogene family, isoform CRA_a  | RAB5C    | 0.9184 | 0.040 |
| RAC1_HUMAN       | Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1  | RAC1     | 0.0349 | 0.002 |
| RRAGA_HUMAN      | Ras-related GTP-binding protein A (Rag A)   | RRAGA    | 0.1073 | 0.013 |
| RAB35_HUMAN      | Ras-related protein Rab-35 (GTP-binding protein RAY)                                      | RAB35    | 0.0540 | 0.032 |
| RALA_HUMAN       | Ras-related protein Ral-A   | RALA     | 0.1223 | 0.032 |
| RENT1_HUMAN      | Regulator of nonsense transcripts 1   | UPF1     | 0.0871 | 0.004 |
| RHG17_HUMAN      | Rho GTPase-activating protein 17 (Rho-type GTPase-activating protein 17)                  | ARHGAP17 | 0.0623 | 0.031 |
| ARHGQ_HUMAN      | Rho guanine nucleotide exchange factor 26 (SH3 domain-containing guanine exchange factor) | ARHGEF26 | 0.1105 | 0.003 |
| ARHG6_HUMAN      | Rho guanine nucleotide exchange factor 6  | ARHGEF6  | 0.0693 | 0.016 |
| RBM25_HUMAN      | RNA-binding protein 25 (Arg/Glu/Asp-rich protein of 120 kDa)                              | RBM25    | 0.0987 | 0.034 |
| SCAM2_HUMAN      | Secretory carrier-associated membrane protein 2   | SCAMP2   | 0.1361 | 0.034 |
| VRK1_HUMAN       | Serine/threonine-protein kinase VRK1  | VRK1     | 0.2648 | 0.041 |
| ESTD_HUMAN       | S-formylglutathione hydrolase (FGH)   | ESD      | 0.0478 | 0.010 |
| SSBP_HUMAN       | Single-stranded DNA-binding protein, mitochondrial (Mt-SSB)                               | SSBP1    | 0.0877 | 0.027 |
| PDS5B_HUMAN      | Sister chromatid cohesion protein PDS5 homolog B  | PDS5B    | 0.0693 | 0.026 |

|              |  |           |        |       |
|--------------|--|-----------|--------|-------|
| SPR2E_HUMAN  | Small proline-rich protein 2E (SPR-2E)   | SPRR2E    | 0.0731 | 0.019 |
| SF3A2_HUMAN  | Splicing factor 3A subunit 2   | SF3A2     | 0.0440 | 0.022 |
| SF3B6_HUMAN  | Splicing factor 3B subunit 6   | SF3B6     | 0.2786 | 0.000 |
| SAE1_HUMAN   | SUMO-activating enzyme subunit 1 (Ubiquitin-like 1-activating enzyme E1A)          | SAE1      | 0.0875 | 0.016 |
| UBC9_HUMAN   | SUMO-conjugating enzyme UBC9   | UBE2I     | 0.1349 | 0.037 |
| STX3_HUMAN   | Syntaxin-3   | STX3      | 0.1419 | 0.031 |
| TPSN_HUMAN   | Tapasin (TPN)  | TAPBP     | 0.0704 | 0.043 |
| TRA2B_HUMAN  | Transformer-2 protein homolog beta (TRA-2 beta)                                    | TRA2B     | 0.0581 | 0.043 |
| RHOA_HUMAN   | Transforming protein RhoA (Rho cDNA clone 12) (h12)                                | RHOA      | 0.0585 | 0.031 |
| TMM43_HUMAN  | Transmembrane protein 43 (Protein LUMA)  | TMEM43    | 0.1247 | 0.002 |
| ECHA_HUMAN   | Trifunctional enzyme subunit alpha, mitochondrial (78 kDa gastrin-binding protein) | HADHA     | 0.0415 | 0.033 |
| TBB4B_HUMAN  | Tubulin beta-4B chain (Tubulin beta-2 chain) (Tubulin beta-2C chain)               | TUBB4B    | 0.0597 | 0.004 |
| CN166_HUMAN  | UPF0568 protein C14orf166 (CLE7 homolog) (CLE)                                     | C14orf166 | 0.0651 | 0.034 |
| RD23A_HUMAN  | UV excision repair protein RAD23 homolog A (HR23A) (hHR23A)                        | RAD23A    | 0.0395 | 0.016 |
| DHB12_HUMAN  | Very-long-chain 3-oxoacyl-CoA reductase  | HSD17B12  | 0.0583 | 0.029 |
| KCNAB2_HUMAN | Voltage-gated potassium channel subunit beta-2                                     | KCNAB2    | 0.0339 | 0.017 |
| VATE1_HUMAN  | V-type proton ATPase subunit E 1 (V-ATPase subunit E 1)                            | ATP6V1E1  | 0.0162 | 0.035 |
| WASC5_HUMAN  | WASH complex subunit 5 (Strumpellin)   | WASHC5    | 0.1289 | 0.007 |
| WDR26_HUMAN  | WD repeat-containing protein 26  | WDR26     | 0.1514 | 0.032 |
| ZYX_HUMAN    | Zyxin (Zyxin-2)  | ZYX       | 0.0670 | 0.020 |

\* Ausência de nome de gene em banco de dados

**Anexo 3. Lista de proteínas reguladas no Secretoma.**

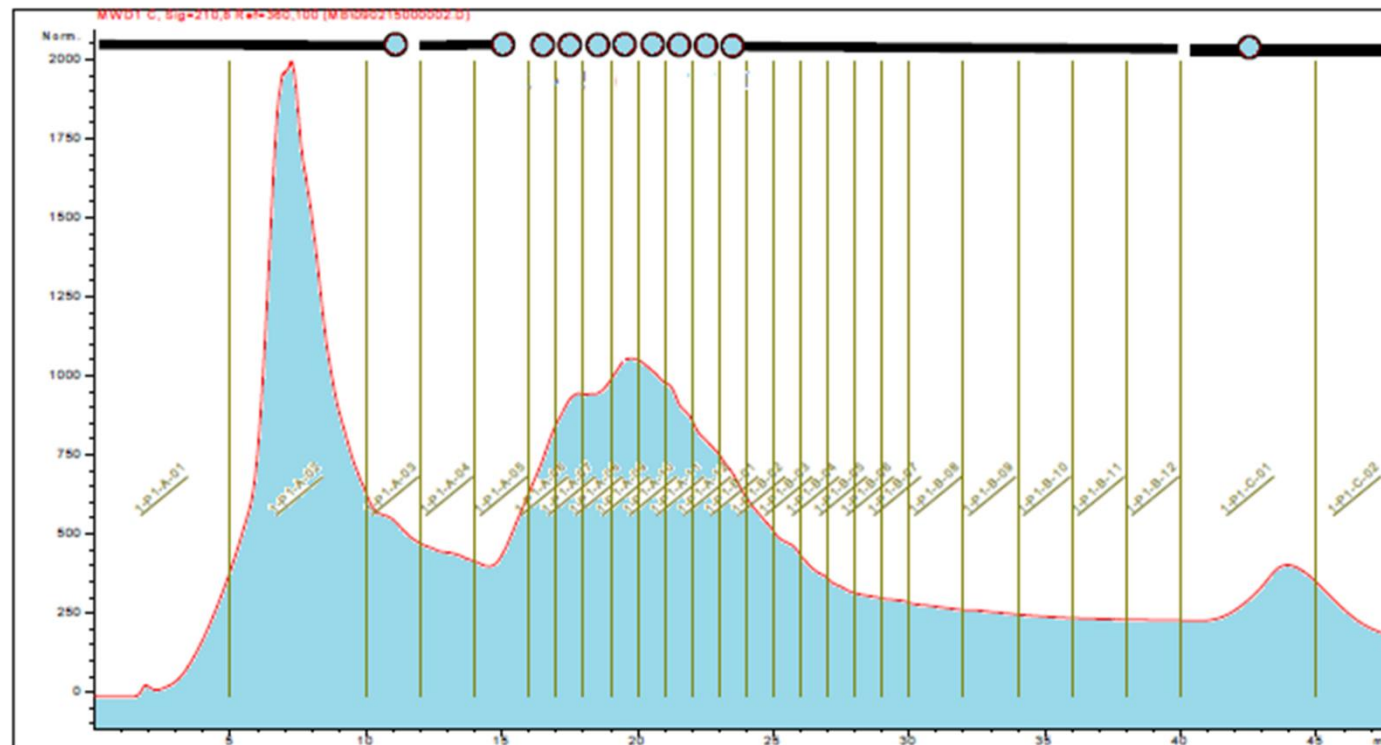
| Entrada                         | UNIPROT ID  | Nome da proteína                                 | Nome do gene    | T1vsT0 mean log-ratio | T1vsT0 q-value (min(limma,rank products)) |
|---------------------------------|-------------|--|-----------------|-----------------------|---|
| <i>Down reguladas secretoma</i> |             |  |                 |                       |   |
| P60709                          | ACTB_HUMAN  | Actin, cytoplasmic 1                             | ACTB            | -16303.1              | 0.00089                                   |
| P35030                          | TRY3_HUMAN  | Trypsin-3  | PRSS3 PRSS4     | -5915.02              | 0.00493                                   |
| Q9Y490                          | TLN1_HUMAN  | Talin-1  | TLN1            | -5680.08              | 0.00004                                   |
| P18206                          | VINC_HUMAN  | Vinculin   | VCL             | -5324.64              | 0.00005                                   |
| P04264                          | K2C1_HUMAN  | Keratin, type II cytoskeletal 1                  | KRT1 KRTA       | -4879.16              | 0.00049                                   |
| P14618                          | KPYM_HUMAN  | Pyruvate kinase PKM                              | PKM             | -4445.04              | 0.00005                                   |
| P32119                          | PRDX2_HUMAN | Peroxiredoxin-2                                  | PRDX2           | -3986.74              | 0.00015                                   |
| P00558                          | PGK1_HUMAN  | Phosphoglycerate kinase 1                        | PGK1 PGKA       | -3777.74              | 0.00625                                   |
| P52790                          | HXK3_HUMAN  | Hexokinase-3                                     | HK3             | -3285.12              | 0.00039                                   |
| P09960                          | LKHA4_HUMAN | Leukotriene A-4 hydrolase                        | LTA4H LTA4      | -2942.52              | 0.00038                                   |
| O15144                          | ARPC2_HUMAN | Actin-related protein 2/3 complex subunit 2      | ARPC2           | -2458.68              | 0.00083                                   |
| P06737                          | PYGL_HUMAN  | Glycogen phosphorylase, liver form               | PYGL            | -2310.62              | 0.00065                                   |
| P22314                          | UBA1_HUMAN  | Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 1      | UBA1 A1S9T UBE1 | -2248.48              | 0.00103                                   |
| P29350                          | PTN6_HUMAN  | Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 6 | PTPN6 HCP PTP1C | -1931.72              | 0.00194                                   |
| P28676                          | GRAN_HUMAN  | Grancalcin                                       | GCA GCL         | -1770.98              | 0.00275                                   |
| Q06830                          | PRDX1_HUMAN | Peroxiredoxin-1                                  | PRDX1 PAGA      | -1565.92              | 0.00297                                   |
| P27105                          | STOM_HUMAN  | Erythrocyte band 7 integral membrane protein     | STOM BND7 EPB72 | -1391.28              | 0.01676                                   |

|        |             |  |             |          |         |
|--------|-------------|--|-------------|----------|---------|
| P34932 | HSP74_HUMAN | Heat shock 70 kDa protein 4                  | HSPA4 APG2  | -1110.8  | 0.00591 |
| P47756 | CAPZB_HUMAN | F-actin-capping protein subunit beta         | CAPZB       | -1064.08 | 0.03047 |
| Q16851 | UGPA_HUMAN  | UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase | UGP2 UGP1   | -966.82  | 0.01175 |
| P30041 | PRDX6_HUMAN | Peroxiredoxin-6                              | PRDX6       | -961.4   | 0.01676 |
| P28065 | PSB9_HUMAN  | Proteasome subunit beta type-9               | PSMB9       | -923.6   | 0.01054 |
| P07195 | LDHB_HUMAN  | L-lactate dehydrogenase B chain              | LDHB        | -911.48  | 0.00998 |
| P12956 | XRCC6_HUMAN | X-ray repair cross-complementing protein 6   | XRCC6 G22P1 | -790.62  | 0.03086 |
| P16157 | ANK1_HUMAN  | Ankyrin-1                                    | ANK1 ANK    | -745.02  | 0.03086 |

*Up reguladas secretoma*

|        |             |  |                 |          |         |
|--------|-------------|--|-----------------|----------|---------|
| P63208 | SKP1_HUMAN  | S-phase kinase-associated protein 1            | SKP1            | 156.24   | 0.03321 |
| P25311 | ZA2G_HUMAN  | Zinc-alpha-2-glycoprotein                      | AZGP1 ZAG ZNGP1 | 638.7    | 0.00493 |
| P04217 | A1BG_HUMAN  | Alpha-1B-glycoprotein (Alpha-1-B glycoprotein) | A1BG            | 979.66   | 0.00814 |
| P02774 | VTDB_HUMAN  | Vitamin D-binding protein                      | GC              | 1259.58  | 0.00485 |
| P01857 | IGHG1_HUMAN | Immunoglobulin heavy constant gamma 1          | IGHG1           | 1382.14  | 0.00049 |
| P16035 | TIMP2_HUMAN | Metalloproteinase inhibitor 2                  | TIMP2           | 1802.48  | 0.01054 |
| O00602 | FCN1_HUMAN  | Ficolin-1                                      | FCN1 FCNM       | 1939.56  | 0.00049 |
| P36222 | CH3L1_HUMAN | Chitinase-3-like protein 1                     | CHI3L1          | 2151.98  | 0.04819 |
| P01024 | CO3_HUMAN   | Complement C3                                  | C3 CPAMD1       | 2185.52  | 0.01079 |
| P0CG05 | IGLC2_HUMAN | Immunoglobulin lambda constant 2               | IGLC2           | 2400.48  | 0.00038 |
| P01009 | A1AT_HUMAN  | Alpha-1-antitrypsin                            | SERPINA1        | 2978.6   | 0.00075 |
| P02763 | A1AG1_HUMAN | Alpha-1-acid glycoprotein 1                    | ORM1 AGP1       | 7272.18  | 0.00010 |
| P00738 | HPT_HUMAN   | Haptoglobin                                    | HP              | 15484.4  | 0.00001 |
| P14780 | MMP9_HUMAN  | Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9)             | MMP9 CLG4B      | 38504.98 | 0.00000 |
| P02768 | ALBU_HUMAN  | Serum albumin                                  | ALB             | 86379.16 | 0.00000 |
| P02788 | TRFL_HUMAN  | Lactotransferrin (Lactoferrin)                 | LTF GIG12 LF    | 98076.42 | 0.00000 |





Cromatograma iTRAQ para peptídios não modificados

Anexo 4. Cromatograma de amostras não enriquecidas de neutrófilos humanos.

## 8. REFERÊNCIAS

- Ambruso, D. R., M. A. Ellison, et al. (2012). "Peroxiredoxin 6 translocates to the plasma membrane during neutrophil activation and is required for optimal NADPH oxidase activity." Biochim Biophys Acta **1823**(2): 306-315.
- Amulic, B., C. Cazalet, et al. (2012). "Neutrophil Function: From Mechanisms to Disease." Annual Review of Immunology **30**(1): 459-489.
- Banerjee, S. and S. Mazumdar (2012). "Electrospray ionization mass spectrometry: a technique to access the information beyond the molecular weight of the analyte." Int J Anal Chem **2012**: 282574.
- Benna, J. E., P. M. Dang, et al. (1997). "Phosphorylation of the respiratory burst oxidase subunit p67(phox) during human neutrophil activation. Regulation by protein kinase C-dependent and independent pathways." J Biol Chem **272**(27): 17204-17208.
- Boyle, J. (2005). "Lehninger principles of biochemistry (4th ed.): Nelson, D., and Cox, M." Biochemistry and Molecular Biology Education **33**(1): 74-75.
- Branzk, N., A. Lubojemska, et al. (2014). "Neutrophils sense microbe size and selectively release neutrophil extracellular traps in response to large pathogens." Nat Immunol **15**(11): 1017-1025.
- Brown, R. A., R. Lever, et al. (2003). "Effects of heparin and related molecules upon neutrophil aggregation and elastase release in vitro." Br J Pharmacol **139**(4): 845-853.
- Cai, C., S. Tang, et al. (2013). "Requirement for both receptor-operated and store-operated calcium entry in N-formyl-methionine-leucine-phenylalanine-induced neutrophil polarization." Biochem Biophys Res Commun **430**(2): 816-821.
- Castellheim, A., O. L. Brekke, et al. (2009). "Innate immune responses to danger signals in systemic inflammatory response syndrome and sepsis." Scand J Immunol **69**(6): 479-491.
- Chang, L. C., T. H. Huang, et al. (2011). "Signaling mechanisms of inhibition of phospholipase D activation by CHS-111 in formyl peptide-stimulated neutrophils." Biochem Pharmacol **81**(2): 269-278.
- Cheng, O. Z. and N. Palaniyar (2013). "NET balancing: a problem in inflammatory lung diseases." Front Immunol **4**: 1.
- Chitale, M., Hawkins, T., Park, C., and Kihara, D. (2009). "ESG: extended similarity group method for automated protein function prediction." Bioinformatics **25**(14): 1739-1745.
- Choudhary, C. and M. Mann (2010). "Decoding signalling networks by mass spectrometry-based proteomics." Nat Rev Mol Cell Biol **11**(6): 427-439.
- Cicchetti, G., P. G. Allen, et al. (2002). "Chemotactic signaling pathways in neutrophils: from receptor to actin assembly." Crit Rev Oral Biol Med **13**(3): 220-228.
- Clark, G. J., N. Angel, et al. (2000). "The role of dendritic cells in the innate immune system." Microbes Infect **2**(3): 257-272.
- Cornish, A. L., I. K. Campbell, et al. (2009). "G-CSF and GM-CSF as therapeutic targets in rheumatoid arthritis." Nat Rev Rheumatol **5**(10): 554-559.
- Cox, J. and M. Mann (2011). "Quantitative, high-resolution proteomics for data-driven systems biology." Annu Rev Biochem **80**: 273-299.

- Dai, W., F. Liu, et al. (2016). "Blockade of Wnt/beta-Catenin Pathway Aggravated Silica-Induced Lung Inflammation through Tregs Regulation on Th Immune Responses." Mediators Inflamm **2016**: 6235614.
- Davis, B. K., H. Wen, et al. (2011). "The Inflammasome NLRs in Immunity, Inflammation, and Associated Diseases." Annual Review of Immunology **29**(1): 707-735.
- Dewas, C., M. Fay, et al. (2000). "The mitogen-activated protein kinase extracellular signal-regulated kinase 1/2 pathway is involved in formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine-induced p47phox phosphorylation in human neutrophils." J Immunol **165**(9): 5238-5244.
- Dorward, D. A., C. D. Lucas, et al. (2015). "The role of formylated peptides and formyl peptide receptor 1 in governing neutrophil function during acute inflammation." Am J Pathol **185**(5): 1172-1184.
- Evans, C., J. Noirel, et al. (2012). "An insight into iTRAQ: where do we stand now?" Anal Bioanal Chem **404**(4): 1011-1027.
- Faurschou, M. and N. Borregaard (2003). "Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation." Microbes Infect **5**(14): 1317-1327.
- Ferretti, M. E., M. Nalli, et al. (2001). "Modulation of neutrophil phospholipase C activity and cyclic AMP levels by fMLP-OMe analogues." Cell Signal **13**(4): 233-240.
- Forsman, H., E. Andreasson, et al. (2012). "Structural characterization and inhibitory profile of formyl peptide receptor 2 selective peptides descending from a PIP2-binding domain of gelsolin." J Immunol **189**(2): 629-637.
- Fullerton, J. N., A. J. O'Brien, et al. (2013). "Pathways mediating resolution of inflammation: when enough is too much." J Pathol **231**(1): 8-20.
- Gabrilovich, D. I. (2005). The neutrophils: New outlook for old cells. Imperial College Press.
- Galkina, S. I., V. I. Stadnichuk, et al. (2010). "Microbial alkaloid staurosporine induces formation of nanometer-wide membrane tubular extensions (cytonemes, membrane tethers) in human neutrophils." Cell Adh Migr **4**(1): 32-38.
- Geering, B. and H. U. Simon (2011). "Peculiarities of cell death mechanisms in neutrophils." Cell Death Differ **18**(9): 1457-1469.
- Goldsby, R. A. (2002). Kuby imunologia, Livraria e editora Revinter.
- Hug, N. and J. F. Caceres (2014). "The RNA helicase DHX34 activates NMD by promoting a transition from the surveillance to the decay-inducing complex." Cell Rep **8**(6): 1845-1856.
- Jannat, R. A., G. P. Robbins, et al. (2010). "Neutrophil adhesion and chemotaxis depend on substrate mechanics." J Phys Condens Matter **22**(19): 194117.
- Jethwaney, D., M. R. Islam, et al. (2007). "Proteomic analysis of plasma membrane and secretory vesicles from human neutrophils." Proteome Sci **5**: 12.
- Kametani, Y., C. Takahata, et al. (2016). "FEN1 participates in repair of the 5'-phosphotyrosyl terminus of DNA single-strand breaks." Carcinogenesis **37**(1): 56-62.
- Kaplan, M. J. and M. Radic (2012). "Neutrophil extracellular traps: double-edged swords of innate immunity." J Immunol **189**(6): 2689-2695.
- Kataoka, N., M. D. Diem, et al. (2001). "Magoh, a human homolog of Drosophila mago nashi protein, is a component of the splicing-dependent exon-exon junction complex." EMBO J **20**(22): 6424-6433.
- Kolaczowska, E. and P. Kubes (2013). "Neutrophil recruitment and function in health and inflammation." Nat Rev Immunol **13**(3): 159-175.
- Kramer, P. A., S. Ravi, et al. (2014). "A review of the mitochondrial and glycolytic metabolism in human platelets and leukocytes: implications for their use as bioenergetic biomarkers." Redox Biol **2**: 206-210.

- Kuijpers, T. W., J. M. van den Berg, et al. (2001). "The impact of platelet-activating factor (PAF)-like mediators on the functional activity of neutrophils: anti-inflammatory effects of human PAF-acetylhydrolase." *Clin Exp Immunol* **123**(3): 412-420.
- Lacy, P. (2006). "Mechanisms of degranulation in neutrophils." *Allergy Asthma Clin Immunol* **2**(3): 98-108.
- Lawrence, T., D. A. Willoughby, et al. (2002). "Anti-inflammatory lipid mediators and insights into the resolution of inflammation." *Nat Rev Immunol* **2**(10): 787-795.
- Le, Y., P. M. Murphy, et al. (2002). "Formyl-peptide receptors revisited." *Trends Immunol* **23**(11): 541-548.
- Le, Y., J. J. Oppenheim, et al. (2001). "Pleiotropic roles of formyl peptide receptors." *Cytokine Growth Factor Rev* **12**(1): 91-105.
- Lee, Y. J., D. Patel, et al. (2011). "Local rheology of human neutrophils investigated using atomic force microscopy." *Int J Biol Sci* **7**(1): 102-111.
- Liao, C. H., J. J. Chen, et al. (2011). "5-hydroxy-2-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-3,7-dimethoxy-4H-chromen-4-one (MSF-2) suppresses fMLP-mediated respiratory burst in human neutrophils by inhibiting phosphatidylinositol 3-kinase activity." *J Cell Physiol* **226**(6): 1519-1530.
- Liu, Y. and M. R. Chance (2014). "Integrating phosphoproteomics in systems biology." *Comput Struct Biotechnol J* **10**(17): 90-97.
- Lominadze, G., D. W. Powell, et al. (2005). "Proteomic analysis of human neutrophil granules." *Mol Cell Proteomics* **4**(10): 1503-1521.
- Lutz-Nicoladoni, C., D. Wolf, et al. (2015). "Modulation of Immune Cell Functions by the E3 Ligase Cbl-b." *Front Oncol* **5**: 58.
- Makarov, A., E. Denisov, et al. (2006). "Performance evaluation of a hybrid linear ion trap/orbitrap mass spectrometer." *Anal Chem* **78**(7): 2113-2120.
- Makarov, A., E. Denisov, et al. (2006). "Dynamic range of mass accuracy in LTQ Orbitrap hybrid mass spectrometer." *J Am Soc Mass Spectrom* **17**(7): 977-982.
- Mantegazza, A. R., J. G. Magalhaes, et al. (2013). "Presentation of phagocytosed antigens by MHC class I and II." *Traffic* **14**(2): 135-152.
- Matsushima, H., S. Geng, et al. (2013). "Neutrophil differentiation into a unique hybrid population exhibiting dual phenotype and functionality of neutrophils and dendritic cells." *Blood* **121**(10): 1677-1689.
- Matute-Bello, G., W. C. Liles, et al. (2000). "Modulation of neutrophil apoptosis by granulocyte colony-stimulating factor and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor during the course of acute respiratory distress syndrome." *Crit Care Med* **28**(1): 1-7.
- Megger, D. A., T. Bracht, et al. (2013). "Label-free quantification in clinical proteomics." *Biochim Biophys Acta* **1834**(8): 1581-1590.
- Melo-Braga, M. N., M. Schulz, et al. (2014). "Comprehensive quantitative comparison of the membrane proteome, phosphoproteome, and sialome of human embryonic and neural stem cells." *Mol Cell Proteomics* **13**(1): 311-328.
- Mertins, P., J. W. Qiao, et al. (2013). "Integrated proteomic analysis of post-translational modifications by serial enrichment." *Nat Methods* **10**(7): 634-637.
- Messana, I., T. Cabras, et al. (2013). "Unraveling the different proteomic platforms." *J Sep Sci* **36**(1): 128-139.
- Mittal, M., M. R. Siddiqui, et al. (2014). "Reactive oxygen species in inflammation and tissue injury." *Antioxid Redox Signal* **20**(7): 1126-1167.
- Mocsai, A. (2013). "Diverse novel functions of neutrophils in immunity, inflammation, and beyond." *J Exp Med* **210**(7): 1283-1299.

- Moisan, E. and D. Girard (2006). "Cell surface expression of intermediate filament proteins vimentin and lamin B1 in human neutrophil spontaneous apoptosis." *J Leukoc Biol* **79**(3): 489-498.
- Muller-Taubenberger, A., A. N. Lupas, et al. (2001). "Calreticulin and calnexin in the endoplasmic reticulum are important for phagocytosis." *EMBO J* **20**(23): 6772-6782.
- Nauseef, W. M. and N. Borregaard (2014). "Neutrophils at work." *Nat Immunol* **15**(7): 602-611.
- Niehues, S., J. Bussmann, et al. (2015). "Impaired protein translation in Drosophila models for Charcot-Marie-Tooth neuropathy caused by mutant tRNA synthetases." *Nat Commun* **6**: 7520.
- Niggli, V. (2003). "Microtubule-disruption-induced and chemotactic-peptide-induced migration of human neutrophils: implications for differential sets of signalling pathways." *J Cell Sci* **116**(Pt 5): 813-822.
- Niggli, V. (2003). "Signaling to migration in neutrophils: importance of localized pathways." *Int J Biochem Cell Biol* **35**(12): 1619-1638.
- Niyonsaba, F., L. Madera, et al. (2013). "The innate defense regulator peptides IDR-HH2, IDR-1002, and IDR-1018 modulate human neutrophil functions." *Journal of Leukocyte Biology*.
- Nourshargh, S., S. A. Renshaw, et al. (2016). "Reverse Migration of Neutrophils: Where, When, How, and Why?" *Trends Immunol* **37**(5): 273-286.
- Ooi, H. K. and L. Ma (2013). "Modeling heterogeneous responsiveness of intrinsic apoptosis pathway." *BMC Syst Biol* **7**: 65.
- Oury, T. D., A. González-López, et al. (2012). "MMP-8 Deficiency Increases TLR/RAGE Ligands S100A8 and S100A9 and Exacerbates Lung Inflammation during Endotoxemia." *PLoS One* **7**(6): e39940.
- Palmer, C., M. Diehn, et al. (2006). "Cell-type specific gene expression profiles of leukocytes in human peripheral blood." *BMC Genomics* **7**: 115.
- Palmisano, G. and T. E. Thingholm (2010). "Strategies for quantitation of phosphoproteomic data." *Expert Rev Proteomics* **7**(3): 439-456.
- Paunel-Gorgulu, A., S. Flohe, et al. (2011). "Increased serum soluble Fas after major trauma is associated with delayed neutrophil apoptosis and development of sepsis." *Crit Care* **15**(1): R20.
- Picotti, P., B. Bodenmiller, et al. (2009). "Full dynamic range proteome analysis of *S. cerevisiae* by targeted proteomics." *Cell* **138**(4): 795-806.
- Picotti, P., M. Clement-Ziza, et al. (2013). "A complete mass-spectrometric map of the yeast proteome applied to quantitative trait analysis." *Nature* **494**(7436): 266-270.
- Prossnitz, E. R. and R. D. Ye (1997). "The N-formyl peptide receptor: a model for the study of chemoattractant receptor structure and function." *Pharmacol Ther* **74**(1): 73-102.
- Quinn, M. T. and K. A. Gauss (2004). "Structure and regulation of the neutrophil respiratory burst oxidase: comparison with nonphagocyte oxidases." *J Leukoc Biol* **76**(4): 760-781.
- Reglero-Real, N., B. Marcos-Ramiro, et al. (2012). "Endothelial membrane reorganization during leukocyte extravasation." *Cell Mol Life Sci* **69**(18): 3079-3099.
- Roepstorff, P. (2012). "Mass spectrometry based proteomics, background, status and future needs." *Protein Cell* **3**(9): 641-647.
- Roepstorff, P. and J. Fohlman (1984). "Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides." *Biomed Mass Spectrom* **11**(11): 601.
- Rorvig, S., O. Ostergaard, et al. (2013). "Proteome profiling of human neutrophil granule subsets, secretory vesicles, and cell membrane: correlation with transcriptome profiling of neutrophil precursors." *J Leukoc Biol* **94**(4): 711-721.

- Roth, S., W. Solbach, et al. (2016). "IL-16 and MIF: messengers beyond neutrophil cell death." *Cell Death Dis* **7**: e2049.
- Roux, P. P. and J. Blenis (2004). "ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions." *Microbiol Mol Biol Rev* **68**(2): 320-344.
- Roux, P. P. and P. Thibault (2013). "The coming of age of phosphoproteomics--from large data sets to inference of protein functions." *Mol Cell Proteomics* **12**(12): 3453-3464.
- Sanz-Garcia, M., M. Vazquez-Cedeira, et al. (2011). "Substrate profiling of human vaccinia-related kinases identifies coilin, a Cajal body nuclear protein, as a phosphorylation target with neurological implications." *J Proteomics* **75**(2): 548-560.
- Schmidt, S., M. Moser, et al. (2013). "The molecular basis of leukocyte recruitment and its deficiencies." *Molecular Immunology* **55**(1): 49-58.
- Selvatici, R., S. Falzarano, et al. (2006). "Signal transduction pathways triggered by selective formylpeptide analogues in human neutrophils." *Eur J Pharmacol* **534**(1-3): 1-11.
- Snyder, D. T. and R. G. Cooks (2017). "Single Analyzer Precursor Ion Scans in a Linear Quadrupole Ion Trap Using Orthogonal Double Resonance Excitation." *J Am Soc Mass Spectrom*.
- Steen, H. and M. Mann (2004). "The ABC's (and XYZ's) of peptide sequencing." *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**(9): 699-711.
- Takeuchi, T., M. Nakajima, et al. (1994). "Calyculin A, a non-phorbol ester type tumor promotor, induced oxidative DNA damage in stimulated human neutrophil-like cells." *Biochem Biophys Res Commun* **205**(3): 1803-1807.
- Tang, M., M. Wang, et al. (2014). "Evolutionarily conserved coupling of adaptive and excitable networks mediates eukaryotic chemotaxis." *Nat Commun* **5**: 5175.
- Thingholm, T. E., T. J. Jorgensen, et al. (2006). "Highly selective enrichment of phosphorylated peptides using titanium dioxide." *Nat Protoc* **1**(4): 1929-1935.
- Turk, V., V. Stoka, et al. (2012). "Cysteine cathepsins: from structure, function and regulation to new frontiers." *Biochim Biophys Acta* **1824**(1): 68-88.
- Verhey, K. J. and J. Gaertig (2007). "The tubulin code." *Cell Cycle* **6**(17): 2152-2160.
- Villadangos, J. A., R. A. Bryant, et al. (1999). "Proteases involved in MHC class II antigen presentation." *Immunol Rev* **172**: 109-120.
- Vitale, N., J. Mawet, et al. (2005). "The Small GTPase RalA controls exocytosis of large dense core secretory granules by interacting with ARF6-dependent phospholipase D1." *J Biol Chem* **280**(33): 29921-29928.
- Weninger, W., M. Biro, et al. (2014). "Leukocyte migration in the interstitial space of non-lymphoid organs." *Nat Rev Immunol* **14**(4): 232-246.
- Wright, H. L., R. J. Moots, et al. (2014). "The multifactorial role of neutrophils in rheumatoid arthritis." *Nat Rev Rheumatol* **10**(10): 593-601.
- Ye, R. D., F. Boulay, et al. (2009). "International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXIII. Nomenclature for the formyl peptide receptor (FPR) family." *Pharmacol Rev* **61**(2): 119-161.
- Zen, K. and Y. Liu (2008). "Role of different protein tyrosine kinases in fMLP-induced neutrophil transmigration." *Immunobiology* **213**(1): 13-23.
- Zhao, L., M. Shey, et al. (2001). "Regulation of membrane metalloproteolytic cleavage of L-selectin (CD62L) by the epidermal growth factor domain." *J Biol Chem* **276**(33): 30631-30640.