

**ANÁLISE PROTEÔMICA COMPARATIVA ENTRE NEUTRÓFILOS  
QUIESCENTES E NEUTRÓFILOS ATIVADO POR N-FORMIL-  
METIONIL-LEUCIL-FENILALANINA (fMLP)**

Anne Caroline Dias Neves

Orientador: Prof. Dr. Wagner Fontes

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

**ANÁLISE PROTEÔMICA COMPARATIVA ENTRE NEUTRÓFILOS  
QUIESCENTES E NEUTRÓFILOS ATIVADO POR N-FORMIL-  
METIONIL-LEUCIL-FENILALANINA (fMLP)**

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

**Brasília 2010**

## DEDICATÓRIA

Agradeço a Deus em primeiro lugar:  
por oferecer a vida  
a saúde, a paz, a sabedoria e a fé.

Por Ele colocar na minha vida a família maravilhosa que tenho, meus irmãos (Gustavo e Leonardo), meus sobrinhos que são a alegria da minha vida (Alice Vitória e Pedro Henrique), minhas primas e meus tios.

Em especial agradeço á Deus pelos pais maravilhosos que tenho, Raimundo e Fátima, que sempre me apoiaram em todas as decisões, me insentivando e me amando acima de tudo. O amor que sinto por meus pais é inesgotável. São pessoas que me ensinaram a amar, a respeitar, a lutar pelos meus objetivos e acima de tudo amar à Deus.

“Aquele que habita no esconderijo do Altíssimo  
á sombra do Onipotente descansará  
Direi do Senhor:  
é o meu Deus,  
o meu refúgio,  
a minha fortaleza  
e nele confiarei.”  
(Salmo 91)

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus por Ele colocar ao longo da minha vida, pessoas maravilhosas que sempre estiveram do meu lado, tanto nos momentos difíceis como nos momentos felizes. Quero agradecer meus amigos e companheiros de laboratório: Adriana, Gabriel, Rafael, Alininha, Giselle, Fabiane, Alan, Leonardo, Micaela, Fernanda, Lucas, Jac, Humberto, Diana, Antônio e Nuno. E aos professores Marcelo Vale, Carlos André, Sebastien, Pedro e Consuelo.

Em especial agradeço meu orientador Wagner Fontes, por ter aberto as portas do laboratório me dando a oportunidade de conquistar um objetivo de vida. Por ser um orientador sempre presente e amigo. Assim como a professora Mariana, apesar de não ser minha orientadora, mas por sempre está presente dando apoio e incentivo.

Agradeço a Karina pela atenção, paciência, carinho e pela amizade que adquirimos ao longo desse tempo.

Em especial agradeço a Elaine, que sempre esteve presente em todos os momentos da minha vida durante o mestrado, nos momentos difíceis e nos momentos de felicidade, tanto na parte profissional como familiar. Agradeço também os pais da Elaine (José Hugo e Marizete), por me acolher e me apoiarem durante esse tempo.

## RESUMO

Os neutrófilos são células do sistema imune responsáveis pelo combate inicial contra microrganismos, tais como bactérias e fungos. Possuem uma vida curta, em torno de 6 a 10h na circulação periférica sendo os primeiros a chegarem ao local injuriado. Os neutrófilos podem ser ativados por várias substâncias, entre elas o fMLP (N-formil Metionil-Leucil-Fenilalanina), um peptídeo presente em bactérias Gram-positivas responsável pela ativação dos neutrófilos principalmente em pacientes acometidos por sepse. Essa ativação envolve proteínas centrais na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) como ERK, p38MAPK e PKC, envolvidas não só na montagem da NADPH oxidase, mas também na reorganização do citoesqueleto favorecendo os processos de desgranulação, transmigração e diapedese. Além da produção de ROS, também são produzidas inúmeras citocinas e quimiocinas, assim como mediadores da inflamação como prostaglandinas e leucotrienos. O presente estudo tem como objetivo comparar o mapa proteômico ácido de neutrófilos quiescentes com o mapa proteômico ácido de neutrófilos ativados com fMLP, evidenciando proteínas com expressão diferencial significativa. A comparação revelou 157 *spots* exclusivos da condição quiescente, sendo sete identificadas [*CLIC1* (canal de cloreto), *Dimethylglycine Dehydrogenase* (desmetila a N-dimetilglicina em sarcosina e formaldeído), *PIPT $\beta$*  (transporta fosfatidilcolina e fosfatidilinositol sem gasto de energia), *Scinderin* (proteína estrutural responsável pela fragmentação da actina), *Rab 14* e *Rabaptin\_Rab2GTPase* (ambas envolvidas no transporte de grânulos no RE e Complexo de Golgi)] e 77 *spots* exclusivos da condição fMLP, sendo três proteínas identificadas [*Posmeiotic Segregation Increased 2* (envolvido no reparo celular), *Pyrophosphatase* (hidrolisa o pirofosfato em fosfato inorgânico) e *Coactosin like protein* (F-actina envolvida na formação de LTB<sub>4</sub>)]. O mesmo pareamento possibilitou a detecção de *spots* diferencialmente expressos, sendo 24 com expressão significativamente aumentada para fMLP e três identificadas [*Vimentin* (filamento intermediário), *Septin 11* (atua reorganizando os microtubulos e actina durante a desgranulação) e *CLIC4* (canal de cloreto)] e 28 *spots* com expressão diminuída para fMLP, sendo sete identificadas [*Promyelocyte Leukemia Protein* (envolvida na mutação do receptor do ácido retinóico); *Zinc Finger* (proteína efetora com sítio de ligação para PIP<sub>3</sub>); *Modulator of retrovirus infection* (modula o proteossoma diminuindo a degradação de material genético viral), *tubulin1B*, *tubulin1A* e *tubulin4A* (formam os microtubulos presentes no citoesqueleto).

## ABSTRACT

Neutrophils are cells of the immune system that are the first-responders against microorganisms, like bacteria and fungus. They have a short-life, that lasts from 6 up to 10 hours in peripheral blood, migrating quickly to the injured area. Neutrophils can be activated by various substances, like fMLP, a bacterial Gram-positive peptide responsible for the neutrophil activation in patients who were stricken by sepsis. This activation involves central proteins in reactive oxygen species (ROS) production like ERK, p38MAPK and PKC. The activation of neutrophils caused by fMLP is not restricted to the NADPH oxidase assembly, but also includes the cytoskeleton reorganization, favoring the degranulation process, transmigration and cell extravasation. Besides the ROS production, cytokines and chemokines are also produced, along with inflammation mediators like prostaglandines and leukotrienes. This research has as objective to compare the proteomic map of quiescent neutrophils with the proteomic map of fMLP activated ones, highlighting proteins with significant differential expression. The proteomic map pairing of quiescent and fMLP activated neutrophils revealed 157 exclusive spots of the quiescent cells, and 7 from these proteins were identified [CLIC1 (chloride channel), Dimethylglycine Dehydrogenase (demethylates the N-dimethylglycine in sarcosine and formaldehyde), PIPT $\beta$  (transports phosphatidylinositol with no energy cost), Scinderin (structural protein responsible for the fragmentation of actinin), Rab 14 and Rabaptin\_Rab2GTPase (both proteins involved in the transport of granules in the ER and Golgi Apparatus)] and 77 spots exclusive of fMLP activated neutrophils, 3 of which were identified [Posmeiotic Segregation Increased 2 (involved in cell repair), Pyrophosphatase (hydrolyses the pyrophosphate in inorganic phosphate) and Coactosin like protein (F-actin involved in LTB<sub>4</sub> formation)]. This pairing also resulted in detection of differentially expressed proteins, 24 with up regulated expression by fMLP. Also, 28 spots presented down-regulated expression by fMLP. Among the statistically verified spots, three proteins with up-regulated expression by fMLP: Vimentin (intermediary filament), Septin 11 (acts reorganizing the microtubules and actin during degranulation) and CLIC4 (chloride channel) and seven proteins with down-regulated expression by fMLP: Promyelocyte Leukemia Protein (involved in the retinoic acid mutation), Zinc Finger (effector protein with PIP<sub>3</sub> bond site), Modulator of retrovirus infection (protein that regulates the proteasome, diminishing the viral genetic material degradation), tubulin1B, tubulin 1A and tubulin 4A (forms the microtubules present in the cytoskeleton)

## ÍNDICE DO TEXTO

1. INTRODUÇÃO	
1.1. Morfologia	02
1.2. Origem e Maturação	02
1.3. Transmigração e Diapedese de neutrófilos	03
1.4. Grânulos	05
1.4.1. Peroxidase Positivo	06
1.4.2. Peroxidase Negativo	08
1.5. Vesículas Secretoras	12
1.6. Apoptose	13
1.6.1. Fatores Extrínsecos da Apoptose	14
1.6.2. Fatores Intrínsecos da Apoptose	15
1.7. Resposta Inflamatória	17
1.7.1. Capacidade Fagocitária e Bactericida	18
1.7.1.a) Fagocitose	18
1.7.1.b) Degranulação	21
1.7.1.c) Complexo NADPH oxidase	22
1.7.1.d) Homeostase do Fagossomo	28
1.8. fMLP	29
1.8.1. Receptores de Peptídeos Formilados	30
1.8.2. Cascata	32
1.8.3. Importância Clínica	37
1.8.4. fMLP e Outros Ativadores	38
1.9. Métodos de avaliação da Atividade Celular	39
1.9.1. Citometria de Fluxo	39
1.9.2. Nitroblue Tetrazolium (N.B.T)	42
1.10. Proteômica	42

1.10.1. Eletroforese Bidimensional	. . . . .	44
1.10.2. Análise de Imagens	. . . . .	44
1.10.3. Espectrometria de massa	. . . . .	44
2. OBJETIVOS E JUSTIFICATIVAS		
2.1. Objetivo Geral	. . . . .	47
2.2. Objetivo Específico	. . . . .	47
3. METODOLOGIA		
3.1. Delineamento Experimental	. . . . .	49
3.2. Coleta de Sangue	. . . . .	50
3.3. Separação de Neutrófilos	. . . . .	50
3.3.1. Montagem do Gradiente	. . . . .	51
3.3.2. Métodos da avaliação da amostra	. . . . .	52
3.3.2.a) Contagem de células	. . . . .	52
3.3.2.b) Viabilidade Celular	. . . . .	54
3.3.2.c) Pureza da Amostra	. . . . .	54
3.4. Ativação celular	. . . . .	55
3.5. Citometria de fluxo	. . . . .	56
3.6. Redução com Nitroblue Tetrazolium	. . . . .	57
3.7. Extração de Proteínas	. . . . .	57
3.8. Focalização Isoelétrica	. . . . .	58
3.9. Etapa de Equilíbrio	. . . . .	58
3.10. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida	. . . . .	59
3.10.1. Confeção do gel e aplicação da amostra	. . . . .	59
3.10.2. Coloração do gel	. . . . .	60
3.11. Digitalização e Secagem dos géis	. . . . .	62

3.12. Análise Computacional das Imagens	62
3.13. Análise Estatística	63
3.14. Digestão de spots	64
3.15. Extração de Peptídeos	65
3.16. Espectrometria de Massa	66
3.16.1. Critérios de Validação do PMF	68
3.16.2. Critérios de Validação por MS/MS	73
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	
4.1. Separação de Neutrófilos	76
4.2. Ativação Celular	76
4.3. Produção dos Géis Bidimensionais	79
4.4. Análise dos Géis	82
4.5. Identificação das Proteínas	90
4.5.1. Proteínas Exclusivas da condição Quiescente	91
4.5.1.a) <i>Pirophosphatase</i>	92
4.5.1.b) <i>Coactosin – like Protein</i>	93
4.5.1.c) <i>Posmeiotic Segregation Increased 2 - like 3</i>	94
4.5.2. Proteínas Exclusivas da condição fMLP	95
4.5.2.a) <i>CCT3</i>	96
4.5.2.b) <i>Rabaptin RabGTPase 2</i>	98
4.5.2.c) <i>PITPβ</i>	99
4.5.2.d) <i>Scinderin</i>	100
4.5.2.e) <i>Dimethylglycine Dehydrogenase</i>	101
4.5.2.f) <i>CLIC 1</i>	102
4.5.2.g) <i>Rab14</i>	103
4.5.3. Proteínas com Expressão Diminuída para fMLP	105

4.5.3.a)	<i>PML</i>	. . . . .	105
4.5.3.b)	<i>Zinc Finger FYVE domain containing 19</i>	. . . . .	107
4.5.3.c)	<i>Modulator of Retrovirus Infection</i>	. . . . .	108
4.5.4.d)	<i>Tubulin</i>	. . . . .	109
4.5.4.	Proteínas com Expressão Aumentada para fMLP	. . . . .	113
4.5.4.a)	<i>Vimentin</i>	. . . . .	113
4.5.4.b)	<i>Septin 11</i>	. . . . .	115
4.5.4.c)	<i>CLIC4</i>	. . . . .	116
4.6.	Correlação entre proteínas identificadas e a cascata de sinalização de neutrófilos ativados com fMLP	. . . . .	117
5.	CONCLUSÕES	. . . . .	123
6.	PERSPECTIVAS	. . . . .	126
7.	REFERENCIAS	. . . . .	148

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Neutrófilo	02
Figura 2. Defesa Imune Inata mediada por neutrófilos e moléculas de adesão	05
Figura 3. Apoptose em neutrófilos	16
Figura 4. Representação esquemática do citocromo b	24
Figura 5. Proteína p47 phox	25
Figura 6. Proteína p40 phox	25
Figura 7. Proteína p67 phox	26
Figura 8. Complexo NADPH Oxidase	27
Figura 9. NADPH oxidase montada	28
Figura 10. Homeostase do fagossomo	29
Figura 11. Receptor FPR	31
Figura 12. Movimentação de cálcio por CD38	34
Figura 13. Cascata de sinalização induzida por fMLP	36
Figura 14. Componentes do Citômetro de Fluxo	40
Figura 15. Avaliação das características físicas dos neutrófilos	41
Figura 16. Transformação do DHR em Rodamina	42
Figura 17. Componentes do Espectrometro de Massa	45
Figura 18. Ionização da amostra do tipo MALDI	46
Figura 19. Tubo Falcon com as células separadas pelos gradientes	52
Figura 20. Camara de Neubauer	53
Figura 21. Destino das alíquotas e as concentrações de neutrófilos em cada método utilizado	55
Figura 22. Esquema do Sistema Protean II	60
Figura 23. Estratégia de Pareamento	63
Figura 24. Massa e pI teórico e experimental da PML	68
Figura 25. Seqüência da proteína Dimethylglycine Dehidrogenase que sofreu modificações na sua forma precursora, confirmada pelo GPMAW	69
Figura 26. Proteína teórica da PITP $\beta$	70
Figura 27. Análise dos peptídeos identificados de Vimentin	72
Figura 28. Peptídeos identificados de CLIC 1	73
Figura 29. Proteínas candidatas	73
Figura 30. Histograma de Identificação	74

Figura 31. Espectro de massa após a fragmentação	75
Figura 32. Séries Y e B	75
Figura 33. Gráfico dos testes de citometria	77
Figura 34. Influência do estímulo por fMLP na intensidade de ativação celular (A) e na quantidade de células ativadas (B)	78
Figura 35. Fotos de lâminas de neutrófilos pelo método N.B.T	78
Figura 36. Gel de proteínas de neutrófilos ativados com fMLP (50 $\mu$ g)	80
Figura 37. Gel de proteínas de neutrófilos quiescente (300 $\mu$ g)	81
Figura 38. Gel Master da condição quiescente	88
Figura 39. Gel Master da condição ativada com fMLP	89
Figura 40. Quantidade de proteínas identificadas em neutrófilos quiescentes e ativados com fMLP	90
Figura 41. Gráfico da porcentagem de proteínas identificadas por compartimento celular	91
Figura 42. Identificação de peptídeos por PMF da proteína Pyrophosphatase	93
Figura 43. Identificação de peptídeos por PMF da Coactosin Like Protein	94
Figura 44. Identificação de peptídeos por PMF da proteína Posmeiotic Segregation Increased 2 Like 3	95
Figura 45. Identificação de peptídeos por PMF da proteína CCT3	97
Figura 46. Identificação de peptídeos por PMF da proteína Rabaptin GTPase Rab2	98
Figura 47. Identificação de peptídeos por PMF da proteína PITP- $\beta$	99
Figura 48. Identificação de peptídeos por PMF da proteína Scinderin	101
Figura 49. Identificação de peptídeos por PMF da proteína Dimethylglycine Dehydrogenase	102
Figura 50. Identificação de peptídeos por PMF da proteína CLIC-1	103
Figura 51. Identificação de peptídeos por PMF da proteína Rab 14 Human	104
Figura 52. Identificação de peptídeos por PMF da proteína Promyelocytic Leukemia Protein	106
Figura 53. Identificação de peptídeos por PMF da proteína zinc Finger, FYVE domain containing 19	108
Figura 54. Identificação de peptídeos por PMF da proteína Modulator of Retrovírus Infection	109
Figura 55. Identificação de peptídeo por PMF da proteína Tubulin Alpha 1B chain	110
Figura 56. Alinhamento das proteínas TBA1B, TBA4A e TBA1A	111

Figura 57. Identificação de peptídeos por PMF da proteína Vimentin	.	.	114
Figura 58. Identificação de peptídeos por PMF da proteína Septin 11	.	.	116
Figura 59. Identificação de peptídeos por PMF da proteína CLIC-4	.	.	117
Figura 60. Cascata de sinalização do fMLP e proteínas identificadas	.	.	122

## INDICE DE TABELAS

Tabela 1. Proteínas de membrana e da matriz dos grânulos azurofílicos . . . . .	07
Tabela 2. Proteínas de membrana e da matriz dos grânulos específicos e gelatinase . . . . .	10
Tabela 3. Proteínas de membrana das vesículas secretoras . . . . .	12
Tabela 4. Tipos e quantidades dos reagentes do preparo dos neutrófilos . . . . .	51
Tabela 5. Spots exclusivos de fMLP . . . . .	82
Tabela 6. Spots exclusivos de quiescentes . . . . .	83
Tabela 7. Spots com expressão diminuída para fMLP ( $p \geq 2$ ) que passaram em todos os testes estatísticos . . . . .	84
Tabela 8. Spots com expressão aumentada para fMLP ( $p \leq 0,5$ ) que passaram em todos os testes estatísticos . . . . .	85
Tabela 9. Spots com expressão diminuída para fMLP que não passaram pelo teste de quantidade de spot por gel . . . . .	86
Tabela 10. Spots com expressão aumentada para fMLP que não passaram pelo teste de quantidade de spot por gel . . . . .	87
Tabela 11. Proteínas identificadas exclusivas da condição quiescente . . . . .	92
Tabela 12. Proteínas identificadas exclusivas da condição fMLP . . . . .	96
Tabela 13. Proteínas identificadas com expressão diminuída para fMLP . . . . .	105
Tabela 14. Diferenças entre Tubulinas identificadas no <i>spot</i> 582 . . . . .	110
Tabela 15. Proteínas identificadas com expressão aumentada para fMLP . . . . .	113
Tabela 16. Sequenciamento do peptídeo R. ISLPLPNFSSLNLR.E . . . . .	114

## SIGLAS E ABREVIACOES

ADPR: Adenosin Diphosphate Ribose  
AIF: Apoptotic Inducing Factor  
AMPc: Adenosin Monophosphate Cyclic  
ANCAS: Anti-neutrophil Cytoplasmic Antibody  
Apaf: Apoptotic Protease Activating Factor - 1  
APL: Acute Promyelocytic Leukemia  
ATP: Adenosin Triphosphate  
AKT: Activating the serine/treonine kinase  
Bcl-2: B cell lymphocytic leukemia proto-oncogene-2  
Bfl-1: Anti-apoptotic gene A1  
BPI: Bactericidal permeability increasing protein  
CCT-3: Chaperonin Containg TCP-1 subunit 3  
CD11b/CD18: Cluster of Differentiation 11b/ 18 or  $\beta$ -integrin  
CD15: Cluster of Differentiation-15  
CD62P: Cluster of Differentiation 62P or P-selectina  
CFU: Colony Forming Unit  
CFS-GM: Colony Forming Unit-Granulocyte Nacrophage  
CID: Collision Induced Dissociation  
CLIC-1: Intracellular Chloride in Channel – 1  
CLP: Coactosin like protein  
CR1: Complement Receptor 1  
CR3: Complement Receptor 3  
CRISP-3: Cysteine rich secretory protein-3  
CXC: Cysteíne- (other aminoacid) - cysteíne  
DAF: Decay accelerating factor  
DAG: Diacylglycerol  
DGC: Chronic Granulomatous Disease  
DHB: Dihydroxybenzoic acid  
DHR: Dihydrorhodamine  
DISC: Complex Inducing the Death Domains  
DNA: Deoxiribonucleic acid  
DR: Death receptor

DTT: Ditioneitol  
EDTA: Ethylenediamine Tetra Acetic Acid  
EEA: Early Endossomal Antigen 1  
EgL-1: Egg Laying abnormal - 1  
ENA-78: Epithelial Cell derived neutrophil activating peptide 78  
ERK: Extracellular Signal Resgulated Protein Kinase  
ESI-TOF: Electrospray – time of flight  
ESI-MS/MS: Electrospray-MS/MS  
ESL-1: E-selectin ligand-1  
FAD: flavin Adenine Dinucleotide  
FADD = Fas associated death complex  
FcγRIIA: Fcγ Receptor IIA  
FcγRIIIB: Fcγ Receptor IIIB  
PHOX: Phosphorylation  
fMLP: formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine  
FPR: Formylated Peptide Receptor  
FSC: forward Scatter Cell  
GCP-2: granulocyte Chemotactic Protein -2  
GDP: Guanosin Triphosphate  
Gro- $\alpha$ : produto gênico  $\alpha$  relacionado ao crescimento  
Gro- $\beta$ : produto gênico  $\beta$  relacionado ao crescimento  
Gro- $\gamma$ : produto gênico  $\gamma$  relacionado ao crescimento  
GTP: Guanosina trifosfato  
HCAP: Human cathelicidin protein  
HCCA: cyano-4-hydroxycinnamic acid  
HBSS: Hank's Buffered Salt Solution  
HOCl: Hipochlorous Acid  
HPLC: High Performance Liquid Chromatography  
HTLV-1: Human T Lymphotropic Vírus Type - 1  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Hydrogen Peroxide  
ICAM-1: Intercellular adhesion molecule 1  
IEF: Isoelectric Focusing  
IFN: Interferon

IL-1a: Interleukin 1 $\alpha$   
IL-1b: Interleukin 1 $\beta$   
IL-8: Interleukin 8  
IP3: Inositol 3 phosphate  
IP3K: phosphoinositide 3 kinase  
ITAM: Immunoreceptor Tyrosine Based activation motifs  
JAK: Janus Kinases  
LAMP-3: Lysosome associated membrane protein  
LFA-1: Lymphocyte Function Associated Antigen - 1  
LPS: lipopolysaccharide  
LTB4: Leukotriene B4  
MAC: Macrophages Receptor  
MALDI-TOF: Matrix Assisted Laser Desorption Time of Flight  
MAPK: Mitogen Activated Protein Kinase  
Mcl-1: myeloid cell leukemia-1  
MCP-1: Monocyte chemotactic protein-1  
MEK: Map/ERK kinase  
MIP - 2: Macrophage Inflammatory Protein - 2  
MMP: Matrix metalloproteinase  
MPO: myeloperoxidase  
MRI: Modulator of Retrovirus Infection  
MKK4: Mitogen Activate Protein Kinase Kinase - 4  
MKK6: Mitogen Activate Protein Kinase Kinase - 6  
MYD88: Myeloid Differentiation Primary Response Protein 88  
NaCl: Sodium Chloride  
NADPH: Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate Oxidase  
NAD<sup>+</sup>: Nicotinamide Adenine Dinucleotide  
NAP-2: Neutrophil activating protein -2  
NBT: Nitroblue Tetrazolium  
NCBI: National Center for Biotechnology  
NGAL: neutrophil gelatinase associated lipocalin  
NRAMP-1: natural Resistance – associated macrophage protein  
NT: Nucleotide Transporter  
O<sub>2</sub><sup>-</sup>: superoxide anion

PAF: Platelet Activating Factor  
PAMP: Patogeno específico associado a Molécula Padrão  
PAK: Protein Activating Kinase  
PC: Phosphatidylcholine  
PI: Phosphatidylinositol  
PI: Propidium Iodide  
PIP2: Phosphatidylinositol 4,5 biphosphate  
PIP3: Fosfatidilinositol 3,4,5 triphosphate  
PI3K: Phosphoinositide 3 Kinase  
PITP $\beta$ : Phosphatidylinositol transfer Protein –  $\beta$   
PLC: Phospholipase C  
PMA: Phorbol Myristate Acetate  
PMF: Peptide Mass Fingerprints  
PMN: Polymorphonuclear  
PMT: Photomultiplier  
PRR: Type Receptor Recognition  
PSGL-1: P-selectin glycoprotein ligand  
PKC: Protein kinase C  
RAC: Little Protein Rho-Gtpase.  
SARA: Síndrome da Angústia Respiratória Respiratória Aguda  
RAP: Receptor Associated Protein  
ROS: Reactive Oxygen Species  
RyR: Ryanodine Receptor  
SCAMP: Secretory Carrier Membrane Protein  
SDS: Sodium Dodecyl Sulfate  
SSC: Side Scatter Cell  
SIRS: Systemic Inflammatory Response Syndrome  
SNAP-23: Soluble NSF-Attachment Protein-23  
SNARE: Soluble N-ethylmaleimide Sensitive Fusion Protein Attachment Protein Receptor  
SOD: Superoxide Dismutase  
STAT: Signal Transducers and Activators of Transcription  
TCD4: Linfócito T auxiliar  
TCD8: Linfócito T citotóxico  
TCLE: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TFA: Acid Trifluoroacético  
TIRAP: TIR domain containing adaptador protein  
TLR: Receptor Toll-like  
TNF- $\alpha$ : Tumor Necrosis Factor -  $\alpha$   
TNFR1: Tumor Necrosis Factor Receptor - 1  
TPM: Transição de Permeabilidade Mitocondrial  
TRAIL: TNF Related Apoptosis Inducing Ligand  
TRAM: TRIF related adaptador molecule  
TRIF: TIR domain containing adaptador protein inducing IFN $\beta$   
TRAP LC/MS/MS: Íon TRAP Liquid Chromatography MS/MS.  
UI/mL: unidades por mililitro  
VLA-4: Very Late Antigen-4

## 1. INTRODUÇÃO

Os organismos multicelulares possuem mecanismos bioquímicos e celulares responsáveis pela primeira linha de defesa contra microrganismos invasores conhecida como Imunidade Inata ou Nativa. Esse tipo de resposta imunológica envolve uma série de componentes, como as barreiras físicas e químicas (ex: epitélio e substâncias antibacterianas nas superfícies epiteliais), células *Natural Killers* e fagocitárias (neutrófilos e macrófagos), proteínas do sangue (ex: componentes do sistema complemento) e proteínas denominadas citocinas (ex: mediadores inflamatórios) (Abbas, 2005).

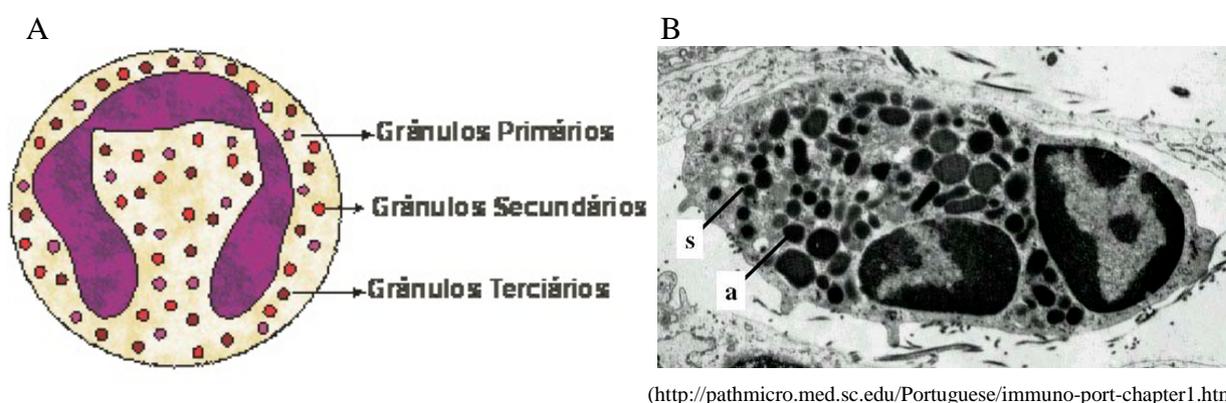
A resposta imune inata é caracterizada pela ação conjunta de todos esses componentes, resultando na eliminação do microrganismo antes da instalação da infecção, protegendo o hospedeiro. Esse combate é realizado por meio da estimulação e ativação dessas células, principalmente dos leucócitos que são classificados em três populações distintas, como granulócitos neutrófilos, granulócitos basófilos e granulócitos eosinófilos. Dentre eles destacamos os neutrófilos ou leucócitos polimorfonucleares (PMNs), que são os mais abundantes da série branca, compreendendo cerca de 40% a 70% na circulação periférica (Kuijpers, 2001; Mönch, 2005; Quinn, 2004)).

Os neutrófilos são células efetoras da imunidade inata que atuam por meio do processo de fagocitose de forma a eliminar microrganismos que romperam as barreiras epiteliais e entraram no tecido ou na circulação. Essas células são ativadas pelo reconhecimento de fragmentos bacterianos como LPS e fMLP, assim como produtos não bacterianos produzidos por tecidos e leucócitos após a injúria tecidual, tais como quimiocinas, PAF, TNF e interleucinas. A resposta dos neutrófilos a esses estímulos é complexa e depende do tipo de estímulo recebido, no qual podemos evidenciar alguns deles: produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) geradas pela ativação do complexo NADPH oxidase, desgranulação de enzimas altamente tóxicas para a maioria dos microrganismos invasores e a produção uma série de mediadores inflamatórios como por exemplo o PAF, interleucinas, LTB4 e prostaglandinas. A produção dos PMNs pela medula óssea é constante e o tempo de vida dessas células é curto, estimado entre 6 a 10 h na circulação e, quando ativadas, migram para os tecidos aumentando o tempo de vida para 2 a 6 dias (Mönch, 2005; Cassatella, 2003).

## 1.1. Morfologia

Caracterizam-se morfologicamente os neutrófilos pelo seu tamanho compreendendo cerca de 12 a 15  $\mu\text{m}$  de diâmetro, com núcleo segmentado e multilobulado (bilobulado, trilobulado ou pentalobulado), nucléolo ausente e presença de grânulos citoplasmáticos (primário, secundário e terciário) (Kuijpers, 2001).

FIGURA 1. Neutrófilo. (A) Desenho do neutrófilo; (B) Eletromicrografia do neutrófilo (s = grânulos específicos; a = grânulos azurofílicos).



(<http://pathmicro.med.sc.edu/Portuguese/immuno-port-chapter1.htm>)

## 1.2. Origem e maturação

Os neutrófilos são gerados na medula óssea por um processo biológico complexo de diferenciação celular mielóide chamado de granulopoese. Durante esse processo grandes mudanças na expressão gênica ocorrem, envolvendo cerca de 11.310 genes, no qual 6.700 tiveram regulação diferenciada incluindo proteínas efetoras e receptores de superfície (Mönch, 2005).

A granulopoese tem duração de 2 semanas e é dividida por dois momentos distintos. Na primeira semana, as células hematopoiéticas pluripotentes (células tronco) que são unidades formadoras de colônias (CFU), amadurecem por ação do fator estimulador de colônia – granulócito macrófago (CSF-GM) sofrendo cinco divisões e se diferenciando em mieloblasto (núcleo grande e ausência de grânulos), promielócitos (formação dos grânulos azurofílicos) e mielócito neutrófilo (formação de grânulos específicos). Na segunda semana, o núcleo do mielócito neutrófilo começa a adquirir proporções menores com conseqüente cessamento da divisão nuclear passando a ser chamado de metamielócito. Durante a formação dos bastonetes neutrófilos, a partir dos metamielócitos, a produção de síntese das proteínas granulares para e o núcleo adquire a forma de bastão. Após esses eventos os neutrófilos

atingem seu potencial antimicrobiano seguindo para a formação característica dos núcleos polimórficos, onde atingirão a corrente sanguínea dois dias após sua completa maturação (Kuijpers, 2001; Mönch, 2005).

Esse processo de diferenciação e maturação requer uma grande produção de neutrófilos pela medula óssea, que contém cerca de 20 vezes mais neutrófilos que na circulação. Normalmente menos de 2% do total de neutrófilos do corpo estão circulando no sangue promovendo o reconhecimento de agentes invasores e atuando na remoção de resíduos celulares (Kuijpers, 2001).

### *1.3. Transmigração e diapedese de neutrófilos*

Neutrófilos ainda presentes na medula óssea apresentaram alguns receptores de IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e TGF- $\beta$ , e receptores de quimiocinas como IL-8Ra, IL-8Rb e CXCL 6. Após a liberação pela medula óssea, os neutrófilos circulam no sangue periférico expressando níveis relativamente altos de receptores de recrutamento como CXCL 8, CXCR 1 e CXCR 2. Esses receptores são polipeptídeos de 8 a 12 kDa e apresentam duas alças dissulfeto internas, caracterizando a superfamília CXC que possui resíduos de cisteínas N-terminais separados por um aminoácido. Enquanto as quimiocinas IL-8 (CXCL 8) e GCP-2 (CXCL 6) se ligam aos receptores do tipo CXCR 1, a NAP-2 (CXCL 7), ENA 78 (CXCL 5), Gro- $\alpha$  (CXCL 1), Gro- $\beta$  (CXCL 2), Gro- $\gamma$  (CXCL3) e novamente GCP-2 (CXCL 6) se ligam aos receptores do tipo CXCR 2 (Mönch,2006; Cassatella, 2001; Abbas, 2005; Hobayashi, 2003).

Dessa maneira, os neutrófilos são capazes de reconhecer, por meio de seus inúmeros receptores, concentrações diferentes de quimiocinas que orientam a movimentação neutrofílica para o sítio inflamatório. Com o aumento da expressão dessas quimiocinas e citocinas, o organismo ativa um sistema de ataque tóxico que envolve fagocitose, produção de espécies reativas de oxigênio e liberação de proteínas antimicrobianas, assim como o recrutamento e imunomodulação de macrófagos, células T e neutrófilos. Segundo DeLeo, a modulação dessa resposta inflamatória por meio desses receptores de neutrófilos (IL-1Ra, TGF-BR2) tem como resultado o aumento da expressão dos receptores acoplados à proteína G e a diminuição da expressão de receptores que medeiam quimiotaxia e ativação celular. Em paralelo é ativado um sistema de reparo celular no qual se tem um aumento de expressão de quimiocinas e citocinas que promovem a angiogênese endotelial (IL8, MIP-2b e MCP-1) e a

proliferação de queratinócitos e fibroblastos (IL8, IL16, MCP-1) (Mönch, 2006; Hobayashi, 2003).

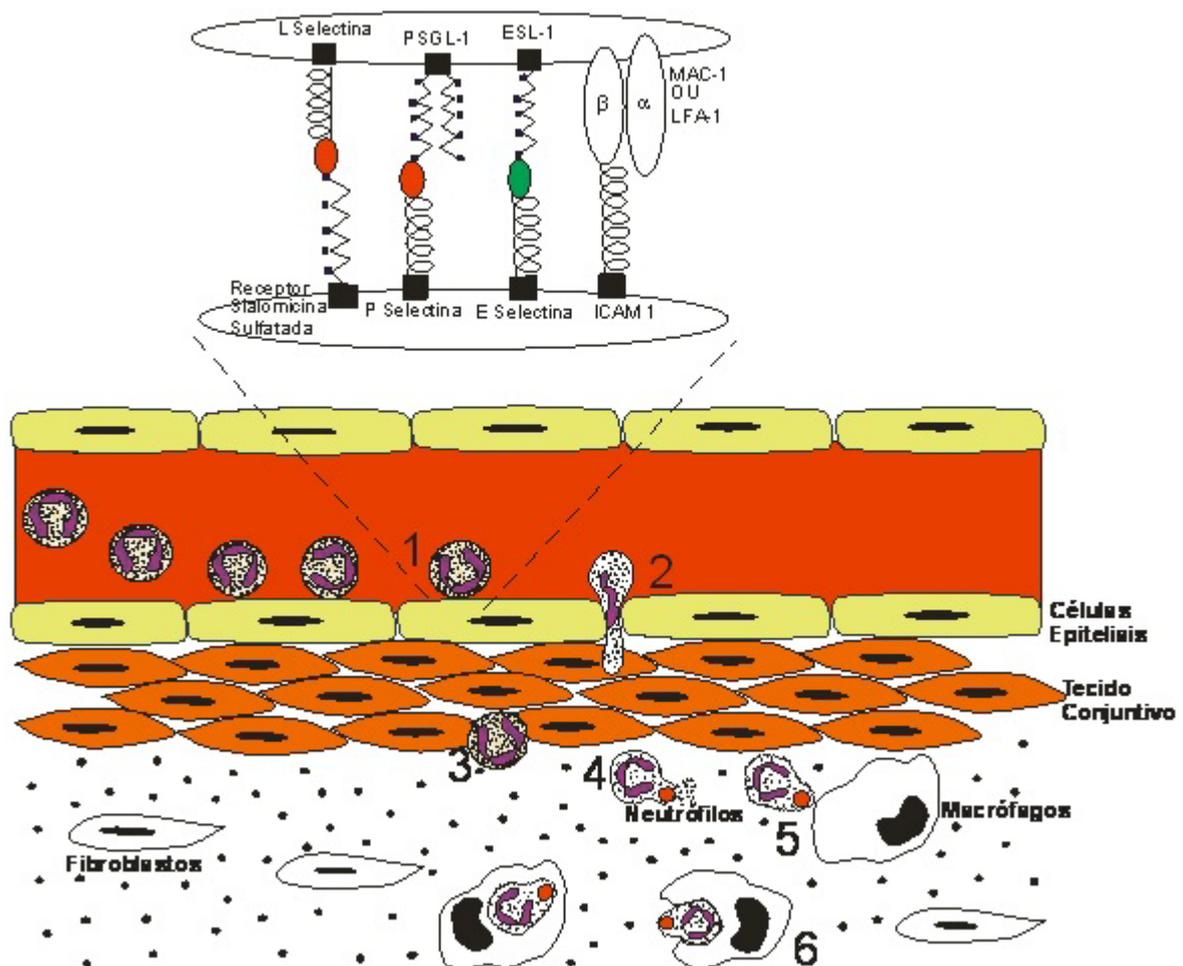
O processo de sinalização quimiotática, geralmente tem início com o reconhecimento de microrganismos pelos macrófagos teciduais que passam a secretar inicialmente as citocinas TNF, IL-1 e quimiocinas. Além desses, outros peptídeos quimiotáticos como fMLP, PAF, Leucotrieno B<sub>4</sub> e C5a (do sistema complemento) também funcionam como quimiotáticos para neutrófilos (Cassatella, 2003).

Neutrófilos quiescentes apresentam L-selectinas expressas na membrana, onde se ligam de forma precoce e rápida (baixa afinidade) com receptores de sialomicina sulfatada do endotélio vascular. Quando se inicia o processo de quimiotaxia, as células endoteliais das vênulas pós capilares adjacentes à infecção passam a expressar, em 1 a 2 h após a estimulação, Selectina-P (CD62P) e Selectina-E (CD62E). Já nos neutrófilos são expressos ligantes glicanos, presente nos receptores PSGL-1 e ESL-1 localizados nas extremidades dos microvilos, compatíveis a CD62P e CD62E, respectivamente. Essas ligações entre carboidrato e selectina conferem uma adesão fraca (de baixa afinidade), que podem ser rompidas pela força do fluxo sanguíneo. Dessa forma, os neutrófilos se separam e se ligam de forma contínua proporcionando o processo de rolagem da célula ao longo da superfície endotelial (Kuijpers, 2001; Gabrilovich, 2005).

Outro receptor de adesão essencial no processo de adesão firme e transmigração dos neutrófilos é  $\alpha$ 2integrina ou MAC-1. Esse receptor expresso em neutrófilos, constitui uma ligação de alta afinidade com ICAM-1 e fibrinogênio, onde segundo Tanya N. Mayadas (Mayadas, 2005) essa ligação mantém os sinais de sobrevivência nas células prolongando o tempo de vida dos neutrófilos. A expressão endotelial de baixa afinidade de ligantes de integrinas, principalmente VCAM-1 (que se liga ao VLA-4) e ICAM-1 (que se liga ao LFA-1 e MAC-1), ocorre naturalmente após a ação das selectinas. Ao mesmo tempo, quimiocinas produzidas por células endoteliais ou provenientes de tecidos subjacentes, migram para a corrente sanguínea e influenciam tanto a célula endotelial para produzir ligantes de integrina quanto neutrófilos aumentando a afinidade das integrinas por seus receptores. Com essas influências quimiotáticas nas moléculas de integrinas, os neutrófilos passam a apresentar uma adesão firme ao endotélio vascular, proporcionando a transmigração e diapedese do mesmo para o local da infecção. No local injuriado os neutrófilos irão reconhecer os microrganismos por meio de seus inúmeros receptores (como por exemplo FPR para reconhecimento de bactérias Gram-positivas) realizando a fagocitose, desgranulação e produzindo espécies

reativas de oxigênio. Conseqüentemente os neutrófilos entrarão em processo de apoptose, onde serão reconhecidos e fagocitados por macrófagos. (Abbas, 2005; Mayadas, 2005; Kuijpers, 2001).

FIGURA 2: Defesa imune inata mediada por neutrófilos e moléculas de adesão. (1) Rolamento por meio da ligações entre L-selectina e Receptor Sialomícina Sulafatada, PSGL-1 e P-selectina, ESL-1 e E-selectina; (2) Firme adesão e transmigração por meio da ligação entre LFA-1 e ICAM-1; (3) Diapedese; (4) Fagocitose e Desgranulação; (5) Apoptose; (6) Fagocitose dos neutrófilos apoptóticos (modificado a partir de Theilgaard-Moch et al, 2006).



#### 1.4. Grânulos

Para que os neutrófilos realizem sua ação fagocitária e bactericida no local da inflamação, é necessário que uma complexa maquinaria bioquímica seja ativada envolvendo a mobilização dos grânulos citoplasmáticos e de vesículas secretórias. Os diversos tipos de

grânulos constituem um importante reservatório não só de proteínas antimicrobianas, proteases e componentes essenciais para a ativação do Complexo NADPH oxidase, como também de um grande número de receptores de membrana responsáveis pela adesão endotelial, componentes proteicos da matriz extracelular e mediadores solúveis da inflamação (Faurischou, 2003).

Segundo Mikkel Faurischou (Faurischou, 2003), os grânulos podem ser classificados em três categorias de acordo com a ordem hierárquica de produção, sendo eles grânulos Primários ou azurofílicos, grânulos secundários ou específicos e grânulos terciários ou de gelatinase. Os grânulos podem ser classificados como Peroxidase positiva (grânulos azurofílicos) e Peroxidase negativa (grânulos específicos e gelatinase). Além desses três tipos de grânulos podemos destacar as vesículas secretoras que são responsáveis pelo aumento do número de receptores de membrana propiciando a amplificação do sinal ativador e promovendo a firme adesão dos neutrófilos no endotélio vascular.

Os grânulos são diferenciados pela sua localização subcelular, composição e pela ordem com que são liberados de forma coordenada e controlada. A regulação desse processo envolve a transcrição programada de cada gene e o tempo de biossíntese de cada proteína, durante a granulopoese. A produção desses grânulos é o que caracteriza a capacidade fagocitária e bactericida dessas células e as tornam verdadeiros fagócitos profissionais (Mönch, 2005; Faurischou, 2003).

As propriedades estruturais de membrana são as mesmas nos três tipos de grânulos, sendo formada por uma bicamada lipídica cuja matriz intracelular é composta de proteínas destinadas a exocitose ou a fusão com o fagossomo (Faurischou, 2003).

A mobilização coordenada dos grânulos pelos compartimentos intracelulares diferem no momento da exocitose. As vesículas secretoras tem maior propensão para a liberação extracelular sendo os primeiros a serem externalizados expondo inúmeros receptores, seguido dos grânulos gelatinase, grânulos específicos e grânulos azurofílicos (Faurischou, 2003).

#### 1.4.1. Peroxidase positivo

São compostos de hidrolases ácidas e de proteínas antimicrobianas, apresentando em sua membrana CD63 (granulofisina ou LAMP-3), com ausência de LAMP-1 e LAMP-2. Assumem uma função especializada em regular os grânulos secretórios e acredita-se

contribuir para o combate e degradação de microrganismos nos fagolisossomos, sofrendo uma limitada exocitose em resposta a estimulação (Faurischou, 2003).

Muitas proteínas dos grânulos azurofílicos são sintetizadas como pró-proteínas em estados inativos e passam por um sistema proteolítico até atingir sua forma ativa dentro dos grânulos (Faurischou, 2003; Borregaard, 2007).

Estão presentes nos grânulos azurofílicos proteínas de membrana (CD63, CD68, presenilina 1, Estomatina e H<sup>+</sup>ATPase do tipo vacuolar) e proteínas citosólicas (MPO (mieloperoxidase),  $\alpha$ -Defensinas, BPI (*bactericidal/permeability-increasing protein*) e Serprocidinas como Proteínase-3, Catepsina G e Elastase). A tabela abaixo mostra todas as proteínas da matriz e da membrana, presente em grânulos azurofílicos, segundo Mikkel Faurischou e colaboradores.

**TABELA 1.** Proteínas de membrana e citosólica dos grânulos azurofílicos (Faurischou, 2003).

PROTEÍNAS DE MEMBRANA	
CD68	
CD63	
Presenilina-1	
Estomatina	
H <sup>+</sup> ATPase do tipo vacuolar	
PROTEÍNAS CITOSÓLICAS	
Ácido $\beta$ -glicerofosfatase	Catepsina
Ácido mucopolissacarídeo	$\alpha$ -Defensina
$\alpha_1$ -antitripsina	Elastase
$\alpha$ -Manosidase	Lisozima
Azurocidina	MPO
BPI	N-acetil- $\beta$ -glicosaminidase
$\beta$ -glicerofosfatase	Proteínase-3
$\beta$ -glicoronidase	Sialidase
Proteína-Ubiquitina	

A mieloperoxidase (MPO) é uma hemoproteína microbicida de 150 KDa, que após ativação do neutrófilo é liberada para o fagossomo ou para o meio extracelular. Atua no peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), formado pela NADPH oxidase, transformando-o em ácido hipocloroso (sistema MPO- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (Faurischou, 2003; Borregaard, 2007).

$\alpha$ -Defensinas são sintetizadas na forma inativa contendo 75 resíduos de aminoácidos cuja ativação é dependente da ação de proteases. Apresentam-se em maior quantidade nesse grânulo, chegando a compor cerca de 5% de teor total de proteínas no neutrófilo. Sua função está relacionada à ação antimicrobiana contra uma variedade de bactérias, fungos,

protozoários e envelope viral. Realiza uma ação sistêmica ao induzir a quimiotaxia de monócitos, células TCD4 e TCD8 após a exocitose desses grânulos (Faurichou, 2003; Gabrilovich, 2005).

BPI (*bactericidal/permeability-increasing protein*) é altamente catiônica com aproximadamente 50 KDa. Essa proteína atua por meio de suas duas extremidades, onde a primeira se localiza na região N-terminal que se liga à carga negativa de resíduos de lipopolissacarídeo (LPS) da membrana externa de bactérias Gram -negativas e a segunda atua mediando a fagocitose pela região C-terminal que promove a fixação de bactérias em neutrófilos e monócitos (Faurichou, 2003).

As serprocidinas são polipeptídeos catiônicos de 25 a 29 KDa conhecidas também como serino-proteases que possuem atividade antibiótica e degradam proteínas do tecido conjuntivo. Classificamos como Proteinase-3 (responsável por clivagem extracelular e ativação do peptídeo HCAP-18 do grânulo específico), Catepsina G e Elastase. Atuam proteoliticamente contra uma variedade de componentes da matriz extracelular como Elastina, Fibronectina, Laminina, Colágeno tipo IV e Vitronectina. Assim como as  $\alpha$ -Defensinas, as serprocidinas atuam de forma sistêmica, ativando células epiteliais e endoteliais, macrófagos, linfócitos e plaquetas (Faurichou, 2003; Gabrilovich, 2005; Almeida, 1997).

Os grânulos azurofílicos possuem outra proteína do tipo serprocidinas chamada azurocidina, que apresenta diversas semelhanças na sequência de aminoácidos e de DNA com algumas serino-proteases. Seu peso molecular é de 29 KDa e seu DNA codifica 225 resíduos de aminoácidos da proteína madura. Tem atividade anti-bacteriana assim como as serino-proteases, porém não apresenta atividade proteolítica devido às mutações ocorridas na molécula de DNA, alterando o sítio catalítico ativo destas famílias de proteínas (Almeida, 1997).

#### 1.4.2. Peroxidase negativo

Os grânulos que compõem o grupo peroxidase negativo (específicos e de gelatinase) são caracterizados por possuírem algumas funções comuns, de acordo com o conteúdo protéico da matriz ( $\beta$ 2 microglobulina, CRISP-3 e gelatinase) e da membrana (CD11b/CD18, citocromo b558, receptor de fMLP, leucolisina, SCAMP e SNAP-23 e 25). Essa semelhança confere uma maior potência em armazenamento de proteases, na ação antimicrobiana pela ativação do complexo NADPH oxidase (via citocromo b558), na transmigração pela

exposição de CD11b/CD18 ou MAC-1 ou  $\beta$ 2 integrina e na expressão significativa não só de outros receptores de membrana logo após a exocitose como também de proteínas livres responsáveis pela quimiotaxia de outras células do sistema imune inato e adaptativo (Faucscho, 2003; Abbas, 2005).

Por outro lado observamos outros tipos de proteínas que estão presentes exclusivamente em grânulos específicos, seja na matriz (colagenase, hCAP-18, histaminase, heparanase, lactoferrina, NGAL, sialidase, uPA e transcobalamina I) ou na membrana (CD15, CD66, CD67, receptor de fibronectina, receptor de laminina, receptor de trombospodina, estomatina, Rap-1 e 2, subunidade  $\alpha$  da proteína G, antígeno NB1 e duas proteínas com massa 19 KDa e 155 KDa) . Observamos que os grânulos gelatinase também apresentam proteínas exclusivas na matriz (acetiltransferase e lisozima) e na membrana (NRAMP-1, receptor de uPA, VAMP-2 e ATPase do tipo vacuolar)(Faucscho, 2003).

A tabela abaixo mostra as proteínas de membrana e da matriz, presente nos grânulos específicos e gelatinase, segundo Nikkel Faucscho e colaboradores (Faucscho, 2003).

**TABELA 2.** Proteínas de membrana e citosólica dos grânulos específicos e gelatinase.

PROTEÍNAS DE MEMBRANA	
Grânulos Específicos	Grânulos Gelatinase
CD11b/CD18	CD11b/CD18
CD 15	Citocromo b558
CD66	fMLP-R
Citocromo b558	Leucolisina-R
fMLP-R	NRAMP-1
Fibronectina-R	SCAMP
Subunidade $\alpha$ da protein G	SNAP 23 e 25
Laminina-R	uPA-R
Leucolisina-R	VAMP-2
antígenoNB1	H <sup>+</sup> ATPase do tipo vacuolar
Proteína 19 KDa	
Proteína 155KDa	
Rap 1 e Rap 2	
SCAMP	
SNAP -23 e 25	
Estomatina	
Trombosporina-R	
PROTEÍNAS CITOSÓLICA	
$\beta$ 2 Microglobulina	Acetiltransferase
Colagenase	$\beta$ 2 Microglobulina
CRISP-3 (SGP-28)	CRISP-3 (SGP-28)
Gelatinase	Gelatinase
hCAP-18	Lisozima
Histaminase	
Heparinase	
Lactoferrina	
NGAL	
uPA	
Sialidase	
Transcobalamina I	

A lactoferrina é uma glicoproteína de 78 KDa pertencente a família ferro-transferrina. É armazenada nos grânulos específicos e possui atividade antimicrobiana contra um amplo espectro de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (Faurichou, 2003).

Já a lisozima é um peptídeo catiônico antimicrobiano de 14 KDa presente em maior quantidade nos grânulos específicos. Tem a função de clivar peptidoglicanos das paredes celulares de bactérias (Faurichou, 2003).

NRAMP-1 ou proteína de resistência natural associada a macrófago-1 está presente nos grânulos gelatinase em neutrófilos quiescentes e se deslocam durante a desgranulação

para a membrana fagossomal, privando os microrganismos fagocitados de metais essenciais como  $\text{Fe}^{+2}$ ,  $\text{Mn}^{+2}$  e  $\text{Zn}^{+2}$  (Faurischou, 2003; Cassatella, 2003).

As metaloproteases (MMPs) constituem uma família de endoproteases dependentes de zinco responsáveis pela degradação de componentes estruturais da matriz extracelular, como colágenos, fibronectina, proteoglicanos e laminina. Acredita-se ser de fundamental importância na degradação da membrana basal vascular e estruturas intersticiais durante a transmigração e diapedese dos neutrófilos. São sintetizadas e armazenadas na sua pró-forma, como proteína inativa, podendo ser ativadas proteoliticamente após a exocitose. As MMPs são divididas em leucolisina (MT6-MMP/MMP-25), Colagenase (MMP-8) presente nos grânulos específicos e Gelatinase (MMP-9) presente nos grânulos gelatinase. Quando os neutrófilos estão em repouso, a leucolisina pode ser encontrada nos grânulos específicos (aproximadamente 10%), nos grânulos gelatinase (40%), nas vesículas secretórias (30%) e na membrana plasmática (20%). Recentemente descobriu-se que as metaloproteases são capazes de promover a remodelação tecidual, angiogênese, diferenciação celular e migração (Faurischou, 2003; Christoph, 2008).

Três novas proteínas de grânulos específicos foram identificadas. A primeira foi chamada de NGAL, pertencente a família Lipocalina. A hipótese, segundo Niels Borregaard (Borregaard, 2007), é que essa proteína participa da regulação da resposta inflamatória por ligação de pequenos mediadores inflamatórios lipofílicos, como PAF, fMLP, LPS e LTB<sub>4</sub>. Já a segunda, hCAP-18 ou FALL-39, faz parte da família das catelicidinas. As hCAP-18 são armazenadas como proteínas intactas inativas em grânulos específicos, onde é exposto a clivagem pela elastase dos grânulos azurofílicos durante o processo de desgranulação, passando para a forma ativada realizando sua ação bactericida. A terceira é uma glicoproteína de grânulos específicos com peso molecular de 28 KDa chamada de SGP28. É pertencente a uma família rica em cisteínas, cuja importância central está voltada para a resistência a infecções causadas por vírus, bactérias e fungos (Borregaard, 2007).

Segundo Dmitry Gabrilovich (Gabrilovich, 2005), os grânulos gelatinase se fundem com a membrana plasmática, devido à sua característica menos densa, expondo receptores de quimioatraentes. Pequena quantidade desses receptores faz com que o neutrófilo receba um pequeno estímulo, a ponto de gerar adesão firme e inicie o processo de migração. Mudanças ocorrem durante esse processo, no qual destacamos a mudança da arquitetura do citoesqueleto e a translocação dos componentes citossólicos para a montagem da NADPH oxidase na membrana plasmática. Dessa maneira se mantêm níveis essenciais para assegurar a liberação

de mediadores citotóxicos e posteriormente potencializar a liberação desse grânulo quando o neutrófilo responder a um estímulo infeccioso ou inflamatório (Gabrilovich, 2005).

### 1.5. Vesículas Secretoras

As vesículas secretoras, assim como os grânulos, aparecem durante a fase de maturação nos neutrófilos segmentados. Durante essa fase são sintetizadas as proteínas de membrana (fosfatase alcalina, CD10, CD11b/CD18, CD13, CD14, CD16, CD45, CR1, receptor de C1q, citocromo b558, DAF, receptor de fMLP, leucolisina, VAMP-2 e H<sup>+</sup>ATPase do tipo vacuolar) (Faurischou, 2003; Borregaard, 2007). Mikkel Faurischou sugere que a formação das vesículas secretoras seja pelo processo de endocitose pelo fato das proteínas da matriz ser proteínas plasmáticas.

**TABELA 3.** Proteínas de membrana das vesículas secretoras (Faurischou, 2003):

PROTEÍNAS DE MEMBRANA	
CD10	CR1
CD11b/CD18	receptor de C1q
CD13	citocromo b558
CD14	DAF
CD16	receptor de fMLP
CD45	leucolisina
VAMP-2	

A síntese de algumas proteínas de membrana é igual à das proteínas dos grânulos específicos e gelatinase, como CD11b/CD18, citocromo b558, receptor de fMLP, leucolisina, VAMP-2 e H<sup>+</sup>ATPase do tipo vacuolar (Faurischou, 2003; Borregaard, 2007).

Quando os neutrófilos recebem um estímulo e iniciam o rolamento por ligação da selectina e seu ligante PSGL-1, ocorre estabilização da interação entre ambas resultando na mobilização das vesículas secretoras para a membrana plasmática ou para o fagolisossomo. A fusão entre vesículas secretoras e membrana plasmática, assim como fagolisossomo, permite a inicialização no processo de montagem da NADPH oxidase pela exposição do componente p22phox. A proteína p22phox está presente em 80% na membrana dos grânulos e 20% expressas na membrana plasmática. A montagem no complexo NADPH oxidase depende da translocação do flavocitocromo b558 para a membrana, onde irá se unir aos demais componentes para gerar peróxido de hidrogênio e consequentemente as demais espécies

reativas de oxigênio altamente tóxico com ação antimicrobicidas (Borregaard, 2007; Scheel-Toellner, 2004).

### *1.6. Apoptose*

Aproximadamente 10 milhões de neutrófilos são produzidos por minuto e liberados para a corrente sanguínea em um fluxo constante em uma pessoa adulta. Essa produção de neutrófilos pela medula óssea mantém níveis constantes e suficientes para uma resposta imune rápida, no intuito de eliminar qualquer agente invasor que possa causar infecção. Quando os neutrófilos não recebem sinais de citocinas ou de outros agentes pró-inflamatórios (IL-1, IL-2, IL-15, INF, G-CSF, GM-CSF e LPS, *in vitro*) sobrevivem no máximo 10 h e entram em processo de apoptose espontânea, sendo removidos no fígado pelas células de Kupffer e nos demais locais por macrófagos ativados. Cahit Akgul (Akgul, 2001) relata que os fibroblastos realizam fagocitose, assim como os macrófagos, para eliminar neutrófilos apoptóticos, necróticos e debris celulares oriundos de trauma, usando  $\alpha\beta$  integrina e receptor de lectina, por meio do reconhecimento de carboidratos na superfície presente nos neutrófilos (Kuijpers, 2001).

Esses neutrófilos apoptóticos assumem características morfológicas e bioquímicas como ativação de caspases, encolhimento celular, formação de vacúolos citoplasmáticos, compactação da cromatina e perda da forma multilobulada do núcleo (Za, 2008; Akgul, 2001).

Acredita-se que a apoptose e a posterior remoção por fagócitos dessas células, esteja relacionada com um sistema de proteção contra o próprio organismo de forma a uma homeostase imunológica, evitando que neutrófilos apoptóticos e necróticos liberem seu conteúdo tóxico no meio extracelular causando danos teciduais (Scheel-Toellner, 2004; Akgul, 2001).

A desregulação desse sistema homeostático promove o acúmulo dessas células de defesa no local da infecção, resultando no desenvolvimento de doenças inflamatórias crônicas, como por exemplo artrite reumatóide, gota, doença pulmonar obstrutiva crônica, vasculite auto-imune e Síndrome da Insuficiência Respiratória Aguda. Observamos também um quadro característico de neutrofilia durante o processo inflamatório, como uma tentativa de repor a quantidade de neutrófilos que estão sendo utilizados nos tecidos. Essa permanência dos neutrófilos nos tecidos dependerá de uma série de fatores locais que possam influenciar

na regulação dos mediadores anti-apoptóticos e pró-apoptóticos que estabelecerá a sobrevivência ou apoptose dessas células (Kobayashi, 2003; Scheel-Toellner, 2004; Akgul, 2001).

Segundo Steven W. Edwards (Edwards, 2004), dentro de um tecido inflamado temos o trabalho conjunto desses dois tipos de mediadores que irá definir a homeostase, fazendo um equilíbrio entre eliminação de microrganismos e apoptose de neutrófilos. Ele destacou dois pontos cruciais desse processo, onde o primeiro envolve a quantidade reduzida de oxigênio podendo desempenhar um papel importante na sobrevivência dos neutrófilos, e por outro lado a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) por neutrófilos ativadas podendo ser um mediador pró-apoptótico que promoverá a trimerização dos receptores de morte, que será explicado mais adiante.

São sugeridos dois mecanismos que iniciam o processo de apoptose, sendo eles designados por fatores Extrínseco e Intrínseco. D.Scheel Toellner (Scheel-Toellner, 2004), relatou que a apoptose de neutrófilos envolve a ativação da caspase 3, a perda do potencial de membrana mitocondrial e liberação do citocromo c.

As caspases são proteases que contêm cisteínas no seu sítio ativo e clivam substratos que possuem resíduos de ácido aspártico em seqüências específicas. Em células não apoptóticas, as caspases existem como precursoras monoméricas inativas. Após sofrerem clivagem proteolítica com a remoção do pró-domínio, o monômero forma um dímero ativo com atividade de protease (Kuijpers, 2001; Slee, 1999).

#### 1.6.1. Fatores extrínsecos da apoptose

Os fatores extrínsecos são caracterizados pela presença de uma série de receptores de morte expressas na superfície dos neutrófilos, como por exemplo, DR (*Death Receptor*), TNFR (receptor de fator de necrose tumoral 1), TRAIL (fator de necrose tumoral relacionados a indução do ligante) e Fas (Kuijpers, 2001; Akgul, 2001).

A ligação do ligante de Fas ao seu receptor CD95 (Fas) tem como resultado a trimerização ou aglomeração dos receptores de membrana, ocasionando o recrutamento de uma proteína adaptadora chamada FADD (*Fas associated death complex*). Tal proteína possui dois domínios, sendo eles DD (que recrutam e ativam os complexos indutores dos domínios de morte (DISC)) e DED (interagem formando um complexo DED-DED sequestrando a pró-caspase 8 para o complexo DISC). A pró-caspase 8 sofrerá autoproteólise e ficará ativada, desencadeando a ativação da caspase 3 efetora e promovendo o processo de apoptose (Akgul,

2001, Scaffidi, 1998). A figura 3 mostra esquematicamente a ativação da apoptose por meio de receptores de morte envolvendo as caspases 8 e 3, sendo representado pelas setas vermelhas.

#### 1.6.2. Fatores intrínsecos da apoptose

Segundo D.Scheel Toellner (Scheel-Toellner, 2004), existe um mecanismo intrínseco ou mitocondrial responsável pela ativação e potencialização da resposta apoptótica, onde a trimerização dos receptores para formar DISC acontece devido à produção elevada de ROS.

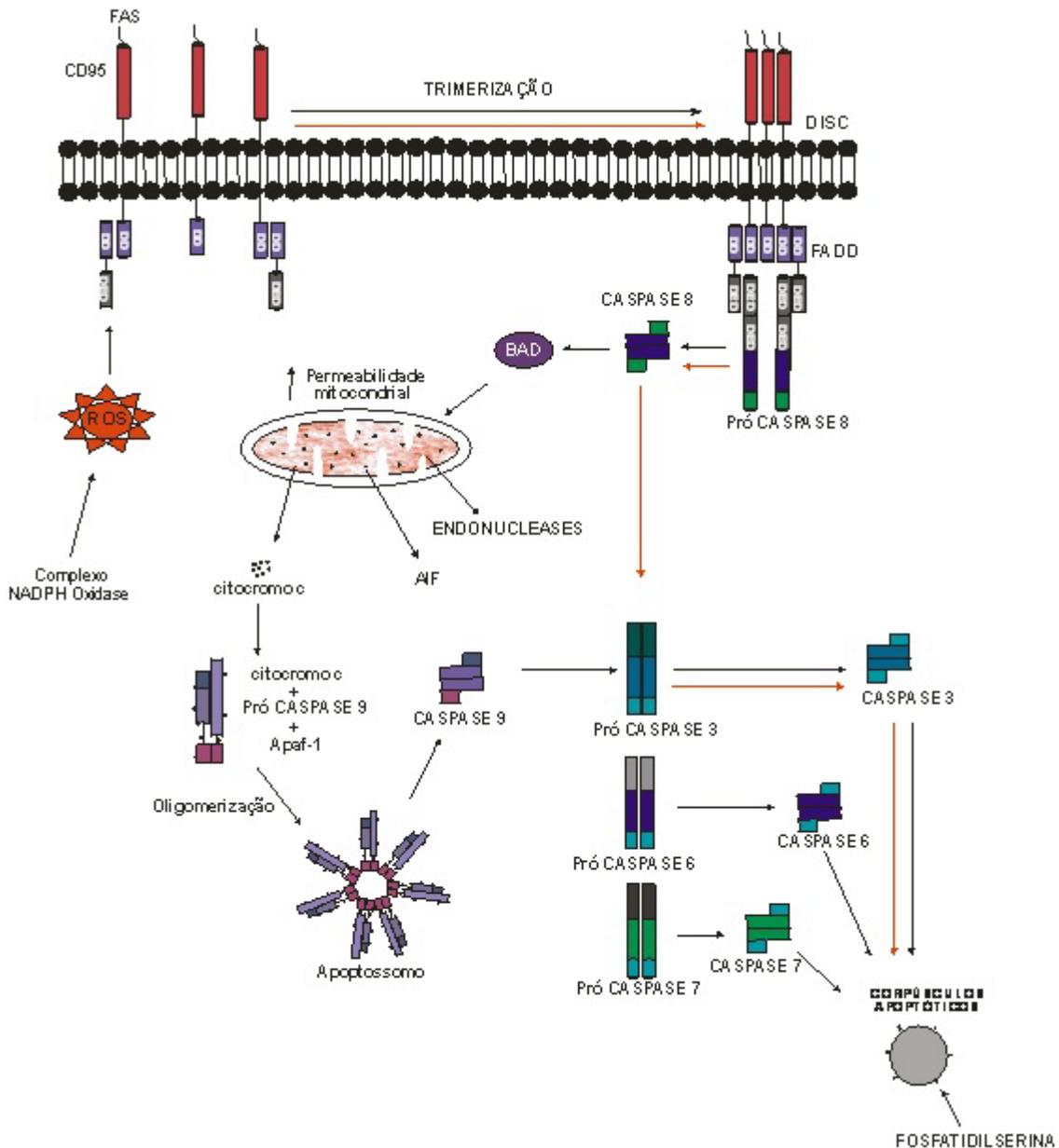
Muitas vezes a ligação de fatores extrínsecos ao seu receptor não é suficiente para desencadear o processo de apoptose e ativação completa da via das caspases. Existe então um processo complementar que amplifica o sinal externo promovendo a interação entre a mitocôndria e as caspases, mediada pelas proteínas da família Bcl-2 (fatores intrínsecos) (Toellner, 2004; Akgul, 2001).

A família Bcl-2 (*B-cell Lymphocytic – leukaemia – proto – oncogene – 2*) tem a função de controlar a capacidade dessas proteínas se dimerizarem e funcionarem como reguladoras da apoptose. Essa família é composta por mediadores pró-apoptóticos (Bax, Bak, DIVA, Bcl-Xs, Bik, Bim, Bad, Bid e Egl-1) e anti-apoptóticos (Bcl-2, Bcl-XL, Mcl-1, CED 9, A1 ou Bfl-1) que funcionam como um ponto de controle das caspases e da disfunção mitocondrial (Chao, 1998).

Mediadores pró-apoptóticos são clivados (Bax, Bad, Bid e Bak) e induzem a liberação de citocromo c mitocondrial para o meio citoplasmático por um processo chamado Transição da Permeabilidade Mitocondrial (TPM). A TPM promoverá a formação de um canal de alta condutância com perda do potencial para fosforilação oxidativa resultando na ativação de caspases e na liberação de substâncias mitocondriais, como AIF (proteína indutora de apoptose), endonucleases, Smac/Diablo, Htr/Omi, além do citocromo c que se ligará ao fator ativador de proteases pró-apoptótico-1 (Apaf-1). Essa ligação vai promover mudanças conformacionais dependentes de ATP e oligomerização, formando o chamado apoptossomo. Esse apoptossomo ativará a caspase 9 que por sua vez desencadeará um sinal para a ativação das caspases 3, 6 e 7 resultando no processo apoptótico (Slee, 1999; Damiani, 2004). A figura 3 mostra a trimerização dos receptores de morte pela indução de ROS até a formação do

apoptossomo e corpúsculos apoptóticos por meio das caspases 3, 6 e 7, sendo representados pelas setas pretas.

FIGURA 3. Apoptose em neutrófilos. Ligação de FAS ao receptor de membrana neutrofílico CD95, resultando na trimerização formando complexo DISC e ativando a via extrínseca (envolvendo as caspases 8 e 3) e a via intrínseca (envolvendo o aumento da permeabilidade mitocondrial e as caspases 9, 3, 6 e 7). Modificada a partir de Scheel-Toellner, 2004.



Nos neutrófilos apoptóticos, observaram-se alterações moleculares na superfície como expressão diminuída de alguns membros da família de imunoglobulinas (CD31, CD50, CD66acde, CD66b, CD 63 e CD 87) e de receptores de superfície celular (CD15, CD16, CD32, CD35, CD88 e CD120b). Outro componente a ser destacado é a fosfatidilserina, que

durante o processo de formação dos corpúsculos apoptóticos é exposta na membrana plasmática dos neutrófilos (Akgul, 2004; Damiani, 2004). Segundo Adriana Pires (Pires, 2008) a fosfatidilserina está localizada exclusivamente na face interna da membrana plasmática dos neutrófilos e quando os mesmos entram em processo de apoptose, ocorre a perda da simetria dos fosfolipídeos com a exposição da fosfatidilserina para a face externa da membrana plasmática. A exposição da fosfatidilserina é importante para o reconhecimento da superfície dos neutrófilos pelos macrófagos, resultando na fagocitose antes da perda da integridade da membrana.

Dentre os mediadores anti-apoptóticos pertencentes da família Bcl-2, destacamos o Mcl-1 e A1 (Bfl-1). Essas proteínas são encontradas em uma variedade de células e tecidos, inclusive nos neutrófilos recém liberados da medula óssea e se mantêm na membrana por pouco tempo (1 a 5 h). Possuem massa aproximada de 37 e 20 KDa respectivamente e não apresentam o domínio BH4 característico da família Bcl-2, que pode estar envolvido no controle do canal aniônico da mitocôndria. A ausência desse domínio sugere que esses dois receptores interajam com outros tipos de Bcl-2 e Bcl-XL (Scheel-Toellner, 2004; Edwards, 2004).

Muitas vias de sinalização foram implicadas na regulação da expressão de Mcl-1 em diferentes células sob diferentes condições fisiológicas, incluindo MEK/ERK, p38MAPK, IP3K/Hkt e JAK/STAT3. A análise da sequência de Mcl-1 revelou que existem vários locais de fosforilações, onde sua função pode ser modificada de acordo com a quantidade de fosforilações presentes (Edwards, 2004).

Acredita-se que a perda gradual desses receptores de sobrevivência, esteja relacionada com a apoptose espontânea dos neutrófilos, tendo em vista que células não apoptóticas expressam altos níveis de Mcl-1 enquanto que células apoptóticas têm expressão diminuída. Assim, as propriedades biológicas de Mcl-1 as tornam proteínas ideais para regular a cinética de apoptose dos neutrófilos. Steven W. Edwards sugere que durante o processo de ativação inflamatória, os neutrófilos estimulem a transcrição e expressão Mcl-1 de forma a aumentar a sobrevivência da célula (Scheel-Toellner, 2004; Edwards, 2004).

### *1.7. Resposta Inflamatória*

A resposta inflamatória é consequência da ação conjunta dos componentes efetores do sistema imune, que promovem a liberação de mediadores pró-inflamatórios durante uma

agressão tecidual, seja ela infecciosa ou não. Essa ação resulta na liberação de inúmeras substâncias e no aparecimento clássico dos sintomas clínicos como calor, rubor, edema, dor e perda da função. Fagócitos profissionais (neutrófilos) em constante ativação causam lesões no local da lesão, por meio da ação fagocitária e bactericida como desgranulação e liberação de ROS podendo se estender para outros locais do corpo passando a caracterizar a Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica (SRIS).

#### 1.7.1. Capacidade fagocitária e bactericida

A ativação do sistema imune inato representa uma estratégia contra a infecção por bactérias, fungos e patógenos virais, resultando no recrutamento de células específicas principalmente os neutrófilos. Eles atuam de forma coordenada contra o invasor, de acordo com dois princípios destrutivos: geração de espécies reativas de oxigênio pela ativação do Complexo NADPH oxidase e liberação de enzimas hidrolíticas, como por exemplo a mieloperoxidase, através da exocitose dos grânulos ou desgranulação (Ross, 2003; Gabrilovich, 2005).

Mark Quinn e Katherine Gauss (Quinn, 2004) separam o mecanismo de ação dos neutrófilos como dependente de oxigênio envolvendo a produção de espécies reativas de oxigênio e mecanismos independentes de oxigênio incluindo quimiotaxia, fagocitose, desgranulação e liberação de enzimas líticas e peptídeos bactericidas.

##### 1.7.1.a) *Fagocitose*

Os neutrófilos possuem uma variedade grande de receptores de membrana que atuam como sensores microbianos durante a fagocitose de microorganismos, estabelecendo uma interação direta pelo reconhecimento de padrões moleculares específicos para alguns patógenos (PAMPs) ou indireta através da mediação por opsoninas (IgG ou componentes da cascata do complemento fixadas na superfície do patógeno) ( Flannagan, 2009; Diacovich, 2010).

A interação direta desencadeia uma série de cascatas de transdução de sinais, que são iniciadas por receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) nos quais os receptores Toll-like (TLRs) são os mais caracterizados, existindo atualmente 10 tipos em humanos. Os tipos TLR 3, 7, 8 e 9 detectam ácidos nucleicos microbianos enquanto que TLR 2, 4 e 5

reconhecem lipoproteínas, lipopolissacarídeos (LPS) e flagelos, respectivamente (Diacovich, 2010; Kuijpers, 2001).

Receptores do tipo *Toll-like* possuem um mecanismo de transdução de sinal complexo, onde há participação de moléculas adaptadoras que modulam a resposta imune inata como a sinalização e secreção de citocinas, maturação do fagossomo, ativação do receptor NOD-like (NLRs) e inflamação. Dentre esses receptores podemos destacar o MYD88 (*myeloid differentiation primary response protein 88*), TIRAP (*TIR domain containing adaptor protein*), TRAM (*TRIF related adaptor molecule*) e TRIF (*TIR domain containing adaptor protein inducing IFN $\beta$* ) (Diacovich, 2010).

Abul Abbas (Abbas, 2005) mostra uma via que se uniu ao Sistema Complemento, que é uma cascata iniciada por uma Lectina plasmática, por ligação a resíduos de manose presentes em glicoproteínas e glicolípídeos microbianos. Já Diacovich especificou mais esse assunto, destacando uma família de PRRs que envolvem receptores do tipo C lectinas chamada NLRs (NOD like receptor). Dentre essas NLRs, foi evidenciado os membros NOD1 (*Shigella flexneri*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Chlamydia* spp.) e NOD2 (*Salmonella*, *Listeria monocytogenes* e *Streptococcus pneumoniae*), que estão envolvidos no reconhecimento de bactérias (peptídeoglicanos). Outra função observada por Diacovich é o reconhecimento de moléculas virais no citoplasma que desencadeia a secreção de citocinas inflamatórias, como por exemplo a Interleucina 1 $\beta$  (IL1 $\beta$ ).

Já a interação indireta, envolve receptores Fc (Fc $\gamma$ Rs) e receptor do complemento (CR1 e CR3). Os receptores de opsonina presente em neutrófilos quiescentes como Fc $\gamma$ RIIa (CD32) e Fc $\gamma$ RIIIb (CD16) possuem baixa afinidade para ligação com IgG, salvo nos casos em que se ligam a complexos imunes contendo várias moléculas de IgG. Kuijpers relata que após um longo tempo de ativação dos neutrófilos por IFN e fatores de crescimento, observa-se o aparecimento do receptor do tipo Fc $\gamma$ RI de alta afinidade para ligação com IgG (Kuijpers, 2001; Lee, 2003).

Tendo visto os receptores, pode-se comentar pontos cruciais para que a fagocitose ocorra de forma eficaz: opsonização, internalização de partículas e maturação do fagossomo.

Antes da internalização, as superfícies dos microrganismos são cobertas por opsoninas (C3b e C5b) que se ligarão aos receptores do tipo CR1 e CR3 nos fagócitos. A interação entre eles proporcionará a ativação de vários componentes que fazem parte da cascata do sistema complemento, tendo início com a formação de C3a (recruta neutrófilos) e C3b. C3b clivará C5 em C5a (estimula a motilidade e a firme adesão nos neutrófilos) e C5b.

O C5b por sua vez, induzirá a formação de um complexo (formação de poro na membrana do microrganismo) unindo-se a C6, C7, C8 e C9 que posteriormente causará a lise do microrganismo (Kuijpers, 2001; Abbas, 2005).

Já os receptores do tipo Fc $\gamma$  presente em neutrófilos, se ligam por meio da porção Fc dos anticorpos do tipo IgG, iniciando a fosforilação dos ITAMs (*Immunoreceptor Tyrosine based Activation Motifs*) pela família Src quinases. A fosforilação de ITAMs ativa a tirosina quinase SYK, que por sua vez ativa a PI3K (*Phosphatidylinositol 3 kinase*) que é responsável pela fosforilação de PIP2 (*Phosphatidylinositol 4,5 biphosphate*) em PIP3 (*Phosphatidylinositol 3,4,5 triphosphate*). PIP3 ativará a PKC (*Protein Kinase C*), ativando posteriormente a PLC (*Phospholipase C*) gerando DAG (*Diacylglycerol*) e IP3 (*Inositol 3 phosphate*) a partir de PIP2. Mas essa cascata ainda não é bem compreendida (Flannagan, 2009; Abbas, 2005; Lee, 2003).

A ligação entre partícula opsonizada e receptores de membrana parafaz com que o número de receptores ao redor da área de contato aumente, proporcionando posteriormente a emissão de pseudópodes para a interiorização do microrganismo. A ligação consecutiva promoverá o encaixe do pseudópode ao redor da partícula, onde a membrana irá se fundir originando o fagossomo. Sabe-se que a remodelação da actina durante a extensão dos pseudópodes em neutrófilo ativado por Fc $\gamma$ Rs, é conduzida por Rac1 e/ou Rac 2 e Cdc 42. Destaca-se também a importância da atuação de fosfoinosítídeos (desencadeia de forma indireta o remodelamento da actina) e do metabolismo de outros fosfolipídeos como a fosfolipase A e D, para a conclusão bem sucedida da fagocitose (Flannagan, 2009; Diacovich, 2010).

Após a internalização do microrganismo, e possivelmente antes da formação completa do fagossomo, ocorrem vários eventos onde o fagossomo recém formado vai adquirir maquinaria necessária para combater e eliminar esses microrganismos internalizados. Essa maturação do fagossomo envolve tanto componentes da via endocítica (lisossomo) quanto componentes da via secretória (vesículas secretórias e grânulos). Inicialmente o fagossomo precoce pode ser identificado pela acidez do seu lúmen em torno de 6,0 a 6,5 e pela presença de moléculas associadas como EEA1 (*early endossomal antigen 1*), receptor de transferrina e pequenas GTPases como Rab5. Os fagossomos adquirem então seus efeitos antimicrobianos através da fusão com vesículas secretórias e grânulos, caracterizando os fagossomos maduros cujo pH fica em torno de 5,5 a 6,0 e pela presença de proteínas como Rab 7, Rab 9 e LAMPs (*lysosomal associated membrane protein*). Após o amadurecimento

do fagossomo, o mesmo se funde com o lisossomo através da Rab7A, onde ocorre a inserção da V-ATPases que promove o transporte de H<sup>+</sup>. Essa translocação de prótons resultará na acidificação acentuada no lumen (pH abaixo de 5,0) juntamente com a presença de altas concentrações de várias enzimas ativas como proteases e hidrolases, originando o fagolisossomo (Flannagan, 2009; Lee, 2003).

Segundo H.Lee (Lee, 2003), as alterações nos níveis de cálcio livre citosólico são essenciais para a secreção de grânulos e fusão do grânulo com o fagossomo em neutrófilos. Postula que uma família de receptores de cálcio chamado Sinaptotagminas II, medeia a sensibilidade de cálcio funcionando como um sensor, sendo encontrada associada com grânulos específicos e na translocação dos grânulos para o fagossomo de forma dependente de cálcio.

#### 1.7.1.b) *Desgranulação*

Além da fagocitose outros dois processos ocorrem simultaneamente, sendo: a liberação do conteúdo granular (desgranulação) e a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS)

Como foi visto anteriormente o processo de fusão de vesículas secretórias e grânulos ocorre durante a maturação dos fagossomos, assim como a liberação dos mesmos por meio de fusão com a membrana plasmática pelo processo no qual é conhecido como desgranulação.

Segundo M.Faurschou (Faurschou, 2003) ocorre uma ordem de desgranulação, onde os neutrófilos ativados possuem uma maior propensão para a liberação das vesículas secretórias, seguido por grânulos gelatinase, específicos e azurofílicos. Observou também que os neutrófilos estimulados *in vitro*, em concentrações nanomolares de mediadores inflamatórios como o fMLP, promovem uma descarga rápida e quase completa liberando uma grande quantidade de vesículas secretórias sem que haja a liberação dos outros grânulos. Componentes das vesículas secretórias potencializam a firme adesão (ativação) com o endotélio vascular expondo receptores de membrana como integrina (CR3 ou MAC-1), CR1, receptor de fMLP e LPS .

Enquanto a porção C3b (fragmento maior aderido à membrana do microrganismo) desencadeia uma cascata do sistema complemento com a formação de poros na membrana, a porção C3a (fragmento menor) irá atuar no recrutamento dos neutrófilos se ligando ao receptor CR3 ou MAC-1. A ligação de MAC-1 ativará uma cascata de eventos iniciada com a

fosforilação da proteína tirosina quinase citoplasmática, que ativada irá fosforilar uma série de proteínas, incluindo fosfolipases C e D. A clivagem desses fosfolipídeos resultará na geração do segundo mensageiro IP<sub>3</sub>, que por sua vez estimulará a liberação de cálcio intracelular, a partir do retículo endoplasmático, e influenciará no aumento do influxo de cálcio através da membrana. Outros fosfolipídeos ligados a proteínas, chamadas anexinas I e XI, estão envolvidos no processo de reorganização da actina dependente de cálcio, onde a principal função dessa família de fosfolipídeos é a agregação das vesículas e a fusão das membranas quando expostas a altas concentrações de cálcio *in vitro*. Da mesma maneira a proteína chamada Grancalcina atua auxiliando na reorganização da actina durante os processos primordiais como estimulação, ativação, diapedese, fagocitose e desgranulação dos neutrófilos (Faurichou, 2003). O aumento de cálcio intracelular também é observado quando ocorre estimulação através da proteína G acoplada ao receptor de fMLP. Esses ensaios programados de desgranulação podem ser observados *in vitro* com alterações de concentrações de cálcio intracelular.

H.Lee (Lee, 2003) especifica esse mecanismo de desgranulação seqüencial, atribuindo um grau de especificidade de eventos de fusão, onde se tem as SNAREs (*Soluble N-ethylmaleimide Sensitive Fusion Protein Attachment Protein Receptor*), como um forte candidato para unir as duas membranas e promover a sua fusão. Trabalhando em conjunto com as SNAREs, está a família das GTPases Rab que interage com um número grande de proteínas denominadas efetoras Rab5, incluindo Rabaptin-5, Rabenosyn-5, EEA-1 e PI3K. Sabe-se que é possível a interação com outros tipos de Rab de forma que funcionem em conjunto para facilitar o encaixe á membrana, mas não se sabe ao certo.

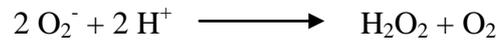
#### 1.7.1.c) *Complexo NADPH oxidase*

Durante o processo de fagocitose de microrganismos invasores, os neutrófilos aumentam o consumo de oxigênio molecular (O<sub>2</sub>), gerando ânion superóxido e peróxido de hidrogênio, por meio da ativação do complexo NADPH oxidase.

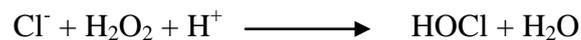
Segundo Gabrilovich (Gabrilovich, 2005), a NADPH oxidase é um complexo multienzimático que possui um centro redox, responsável pela transferência de elétrons da NADPH para O<sub>2</sub> formando ânion superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>).



O ânion superóxido por sua vez será rapidamente convertido a peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) espontaneamente ou pela enzima superóxido dismutase (SOD) que é abundante nas células.



Com a liberação de peróxido de hidrogênio, os grânulos neutrofilicos irão se fundir com a membrana resultando na liberação dos seus componentes, incluindo altas concentrações da enzima mieloperoxidase. O peróxido de hidrogênio em grande quantidade reagirá com íons cloreto para formar ácido hipocloroso (HOCl) por ação da Mieloperoxidase (MPO). A formação desse ácido é de fundamental importância para a destruição de vírus, fungos e bactérias, pois é um potente oxidante citotóxico (Gabrilovich, 2005).



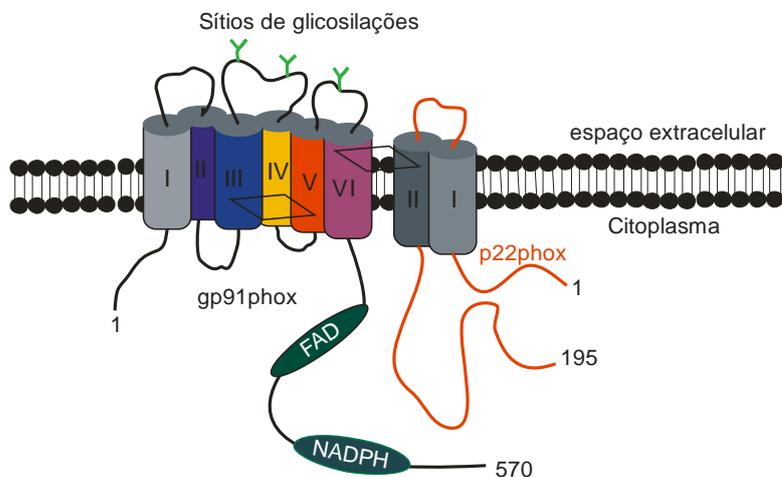
Para que esse processo de formação de espécies reativas de oxigênio aconteça é imprescindível a montagem do complexo anteriormente citado. Dividimos o complexo em dois grupos de proteínas de acordo com a localização: proteínas de membrana (p22 phox e gp91) e proteínas do citoplasma (p40 phox, p47 phox e p67phox) (Kuijpers, 2001).

Segundo D.Jethwaney (Jethwaney, 2007) os componentes de membrana dos neutrófilos em repouso, gp91 e p22 phox estão presentes cerca de 80% e 85%, respectivamente, nos grânulos específicos e o restante se expressa na membrana plasmática.

A partir de estudos com pacientes acometidos pela doença granulomatosa crônica (predisposição para infecções bacterianas e fúngicas), foi identificado um único peptídeo heterodimérico, constituído de duas cadeias (proteína não glicosilada de 22 KDa) e (glicoproteína com 91 KDa), sendo tais cadeias caracterizadas posteriormente como p22 e gp 91 phox (Gabrilovich, 2005; Dahlgren, 1999).

A gp 91 é codificada pelo gene CYBB localizado no cromossomo X, com comprimento de 30 Kb possuindo 13 exons. A tradução resulta uma proteína de 570 aminoácidos, que sofrerá modificações pós traducionais de glicosilações de 3 a 5 sítios em potencial voltados para o meio extracelular.

FIGURA 4. Representação esquemática do citocromo b. Interação entre os componentes da p22phox (I e II) e gp91(I,II,III, IV, V e VI) por grupo heme. (modificado de Gabrilovich, 2005)



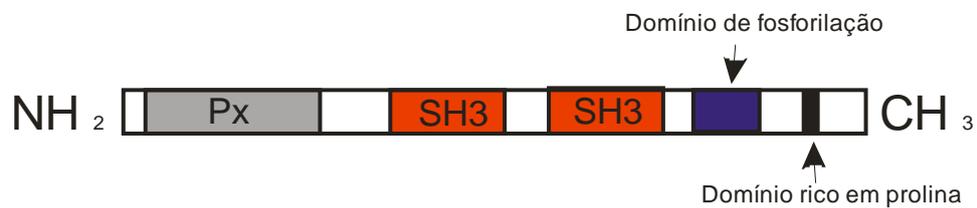
A característica anfipática da proteína permite que sua conformação tridimensional tome proporções distintas, onde a parte N-terminal hidrofóbica possui dois domínios caracterizados pelo grupo heme que liga as hélices transmembrânicas III e V da gp91 e outro entre a hélice VI da gp91 e II da p22phox (figura 4). Por outro lado a parte C-terminal hidrofílica é expressa para o meio intracelular, onde são observados a presença de dois sítios de ligação, um para FAD e outro para NADPH (Gabrilovich, 2005). Dirk Ross (Ross, 2003) observou a formação de um loop de 20 aminoácidos na região do sítio de ligação para NADPH na gp91. Esse loop é reorganizado quando se inicia o processo de ativação do complexo NADPH oxidase, onde a p67phox ativada se liga a gp91 para formar o sítio ativo com alta afinidade para ligação da NADPH.

Já a p22 phox é codificada pelo gene CYBA, localizado no cromossomo 16q24, medindo 8,5 Kb e 6 exons codificando uma proteína madura com 195 resíduos de aminoácidos. A característica principal dessa proteína é sua composição rica em prolina envolvida na interação com os domínios SH3 da p47phox. Esse domínio SH3 é responsável pela estabilização da proteína durante a interação com outros domínios, seja ele da mesma proteína ou não. Um exemplo clássico dessa estabilização será vista mais adiante no componente p47phox (Ross, 2003; Quinn, 2004).

Dentre as proteínas plasmáticas, a p47 phox (gene NCF 1 presente no cromossomo 7) é responsável por iniciar a ativação do Complexo NADPH oxidase, sendo então uma proteína central no processo de produção de espécies reativas de oxigênio. A análise da conformação primária mostrou que entre os 390 aminoácidos que compõem a proteína madura, é caracterizado um sítio em potencial para fosforilação e dois domínios SH3. Na

extremidade C terminal está presente um domínio rico em prolina (interage com domínio SH3 de outra proteína, provavelmente a p67 phox), enquanto que na extremidade N terminal observa-se um domínio PX responsável pela interação com um fosfoinosítídeo (figura 5). Quinn sugere que a PIP2 atue como um segundo mensageiro fosfolipídico interagindo com o domínio PX da p47phox durante a ativação do neutrófilo (Gabrilovich, 2005; Ross, 2003; Quinn, 2004).

FIGURA 5. Proteína p47phox. Localização dos domínios PX, SH3, domínio rico em prolina e local de fosforilação (Gabrilovich, 2005)



O domínio PX constitui não só a proteína p47 phox, como também na p40 phox. Esse domínio PX interage com o domínio TPR da p67phox estabilizando a interação entre ambas (figura 6). Essa proteína apresenta 339 aminoácidos codificada pelo gene NCF 4 do cromossomo 22, caracterizada pela presença de dois sítios de fosforilações (Thr 154 e ser 315, fosforiladas pela PKC). Além do domínio PX na extremidade N terminal, a p47 phox apresenta um domínio SH3 no centro e outro na extremidade C terminal chamado PC, que se liga a p67 phox. Gabrilovich propõe que essa proteína é responsável pela estabilização dos outros componentes citoplasmáticos desse complexo (Gabrilovich, 2005; Ross, 2003).

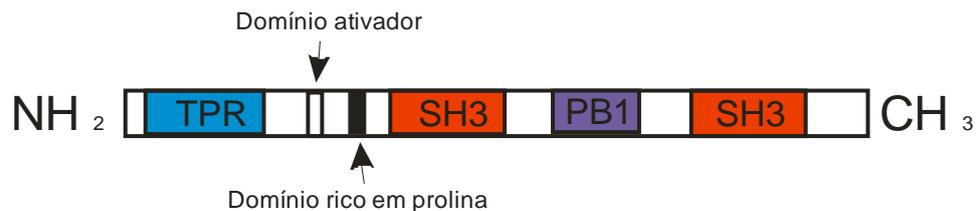
FIGURA 6. Proteína p40phox. Localização dos domínios PX, SH3 e PC (Gabrilovich, 2005)



A proteína p67 phox (gene NCF 2) é a mais complexa das três proteínas citoplasmáticas, pois possui ao longo dos seus 526 aminoácidos dois domínios SH3 sendo um C terminal para ligação com fosfoinosítídeos, um domínio TPR na extremidade N terminal para ligação de alta afinidade com NADPH, um domínio rico em prolina com ligação para domínios SH3, um domínio ativador e um domínio PB1 (figura 7). Observou-se também

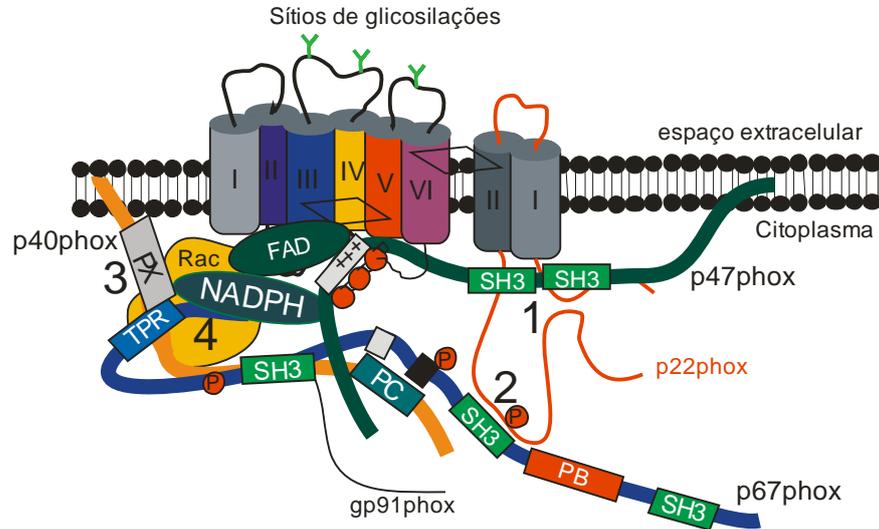
várias fosforilações, onde destacamos uma na extremidade N terminal e outra na extremidade C terminal, promovidas pelas enzimas ERK e p38MAPK, respectivamente (Gabrilovich, 2005; Ross, 2003).

FIGURA 7 Proteína p67phox. Localização dos domínios TRP, SH3, PB1, domínio rico em prolina e domínio ativador (Gabrilovich, 2005)



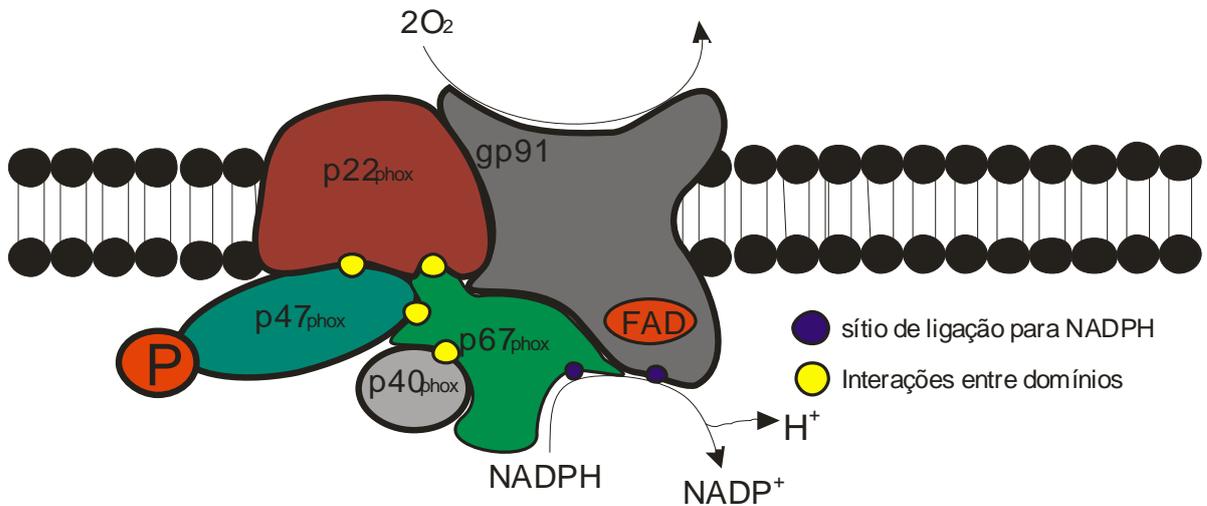
A ativação do Complexo NADPH oxidase tem início com a fosforilação da proteína citoplasmática p47 Phox nos resíduos de serina (303, 304, 315, 320, 328, 359, 370 e 379), podendo ser fosforilada por: PKC, ERK1/2, PAK, AKT e p38MAPK. Sabe-se que nem todas as fosforilações ocorrem para que se ative a p47 Phox, simplesmente os resíduos 303, 304 e 328 fosforilados são suficientes para tal ativação. O domínio rico em prolina da p47 Phox vai interagir com o domínio SH3 da p67 Phox, fazendo com que haja um aumento da afinidade entre p67 Phox e p22 Phox (figura 8. 1). Verificou-se por microscopia de força atômica, que a p47 Phox depois de ativada, fosforila a p67 Phox. Ao mesmo tempo o outro domínio SH3 da p47 Phox se liga aos domínios ricos em prolina da p22 Phox (figura 8. 2) enquanto que a p40 Phox, por meio do domínio C terminal PX, também se liga a p67 Phox (figura 8. 3).

Figura 8: Complexo NADPH oxidase. (1)Interação entre p47phox e p22phox; (2) Interação entre p47phox e p22phox; (3) Interação entre p67phox e p40phox; (4) Interação entre p40phox e p67phox com Rac (modificado de Gabrilovich, 2005.)



A interação de Rac na região N terminal da p67 phox é essencial na estabilização da ligação para que ocorra o transporte de elétrons. A união dos sítios de ligação para NADPH de alta afinidade com a proteína citoplasmática p67 Phox e outra de baixa afinidade com a proteína de membrana gp 91, forma um sitio catalítico ativo eficaz (figura 8. 4). O loop existente no sítio da gp91 é reorganizado durante a ativação do complexo ou simplesmente funciona como um mecanismo de controle independente. Gabrilovich e Ross propõem que tanto a p40 Phox quanto a p47 Phox estabilizam as interações entre os componentes do complexo, onde a p40 Phox se dissocia dos demais componentes durante o processo de ativação. A figura 8 foi feita baseado no modelo proposto por Mark Quinn em 2004.

Figura 9. Modelo da NADPH oxidase montada. O esquema mostra os sítios de ligação para NADPH (azul) e a interação entre os domínios (amarelo) (modificada a partir de Quinn, 2004)

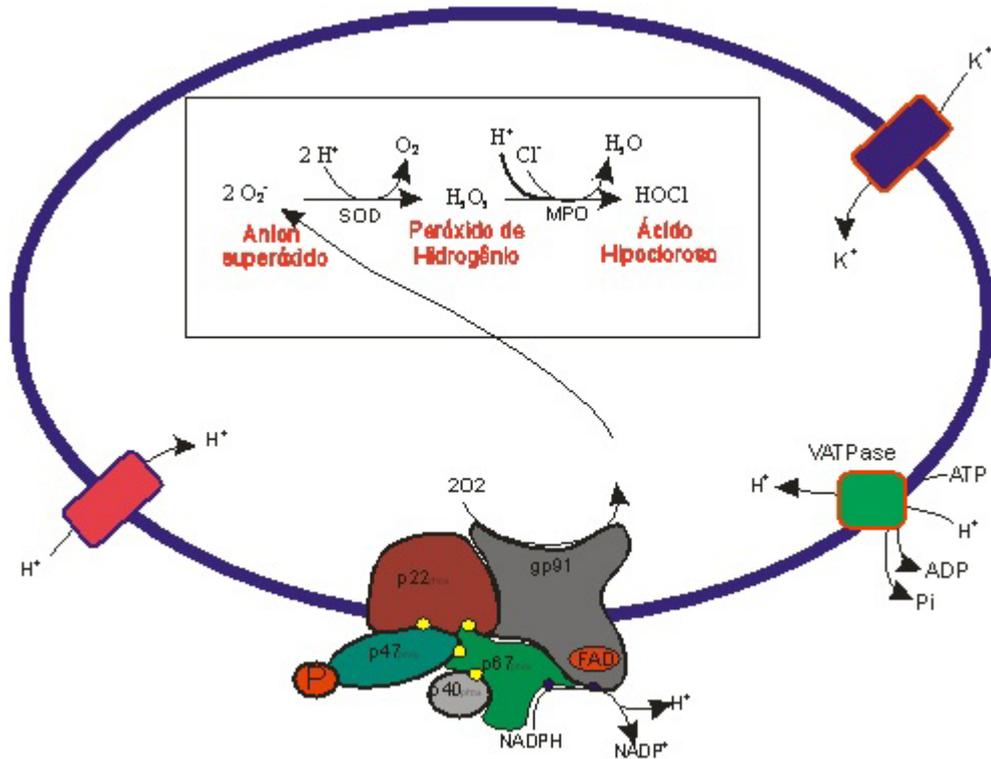


Como foi citado anteriormente, a ativação desse complexo multienzimático requer a translocação de um subconjunto específico de grânulos citoplasmáticos para a membrana plasmática, tendo como consequência o aumento da especificidade e expressão dos receptores e exposição de substâncias tóxicas. Durante o processo de transdução de sinais, o envolvimento da Rac1 e/ou Rac2 parece estar relacionado tanto ao processo de reorganização da actina como à ativação do complexo NADPH oxidase (Gabrilovich, 2005; Ross, 2003).

#### 1.7.1.d) Homeostase do fagossomo

Durante o processo de fagocitose e de adesão, ocorrem paralelamente outros dois eventos, a fusão de membranas (com o amadurecimento dos fagossomos e desgranulação, respectivamente) e ativação do complexo NADPH oxidase (com a produção de espécies reativas de oxigênio em ambos os casos). Esses eventos proporcionam as características efetoras microbicidas mantendo um local ideal para o combate aos microrganismos invasores, com o equilíbrio do pH abaixo de 5,0 nos fagossomos (figura 10). O ambiente ácido é proporcionado pelo transporte de prótons promovidos pelas VATPases e outros cátions como o potássio. Ao mesmo tempo ocorre o equilíbrio do lúmen, pela produção de ânion superóxido por bombeamento de elétrons da NADPH oxidase para dentro do fagossomo. Os elétrons são utilizados para a formação de anion superóxido, enquanto que os prótons são utilizados para a formação de peróxido de hidrogênio, água e oxigênio por uma reação dependente de SOD (Ross, 2003; Kuijpers, 2001; Lee, 2003, Flannagan, 2009).

FIGURA 10. Homeostase do fagossomo. Controle do pH dentro do fagossomo pelo transporte de potássio compensando a ação da VATPase (modificado a partir de Lee, 2003).



Por outro lado neutrófilos que reagem normalmente a um microorganismo, convertem 75% da sua produção de peróxido de hidrogênio em N-cloraminas e ácido hipocloroso (por combinação com o cloreto e ativação da enzima mieloperoxidase) criando um ambiente altamente tóxico no interior dos fagossomos e ao redor das células (Roos, 2003).

### 1.8. *fMLP*

Em meados de 1968 Ward e colaboradores confirmaram que várias bactérias Gram positivas, apresentavam uma atividade quimiotática de leucócitos polimorfonucleares nos tecidos infiltrados. Contudo, descobriu-se que não só bactérias, mas mitocôndrias em células de mamíferos também sintetizam proteínas com N-formil metionina (Prossnitz, 1997; Le, 2002). Eric e Richard explicaram que durante a resposta inflamatória, células do sistema imune produzem substâncias tóxicas para os tecidos, causando a morte de muitas células no local da infecção levando à exposição de peptídeos mitocondriais que, por sua vez, sensibilizam os neutrófilos se ligando a receptores do tipo FPR.

O protótipo de quimioatraente clássico que representa os peptídeos formilados é o fMLF (*formyl - Methionyl - Leucyl - Phenylalanine*), usualmente denominado fMLP, um tripeptídeo observado por Ross em 1987, em fluido de culturas de *Staphylococcus aureus* com capacidade quimiotática em neutrófilos (Christophe, 2001; Prossnitz, 1997).

Na tentativa de reproduzir um peptídeo quimiotático sintético potente, que represente uma infecção por bactérias Gram positivas, foram estabelecidos requisitos para a construção ideal de um protótipo que deve apresentar um grupo formil N-terminal, assim como metionina, leucina e fenilalanina como partes ligantes com o receptor de peptídeo formilado (FPR). Essa construção tem como base as descobertas dos FPRs e das sequências de ligações específicas para cada ligante, que serão vistas mais adiante. Hoje, o fMLP é o menor peptídeo que possui uma ação quimiotática potente capaz de induzir funções primordiais nos neutrófilos, além da quimiotaxia, como desgranulação e produção de espécies reativas de oxigênio (Prossnitz, 1997).

#### 1.8.1. Receptores de peptídeos formilados:

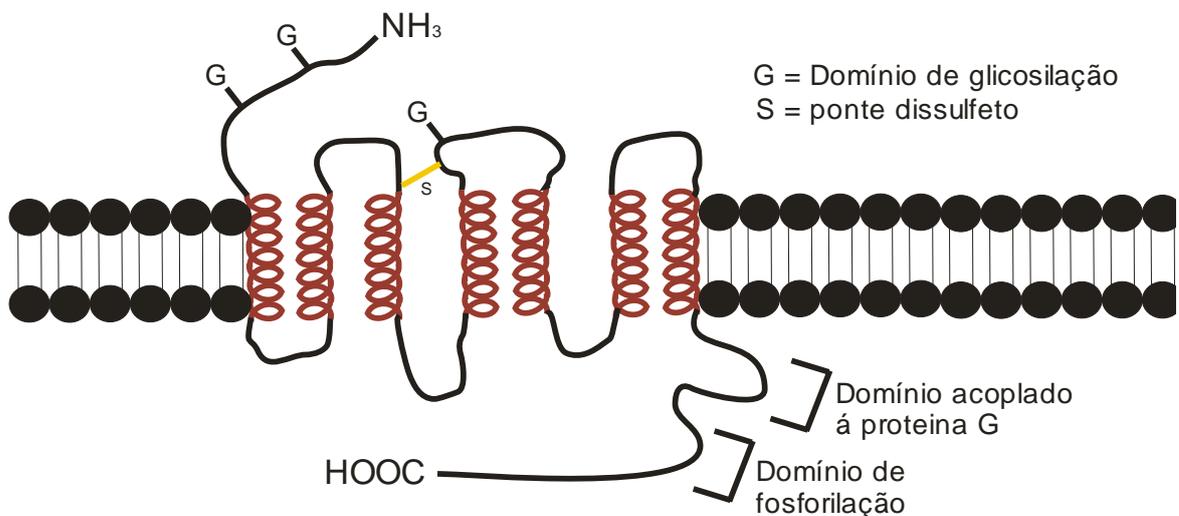
Mais tarde, em 1976, abordou-se a primeira definição bioquímica de FPR humano, caracterizando a alta afinidade dos sítios de ligação nos neutrófilos por protótipos de fMLP. Com o passar dos anos, a ciência foi evoluindo e os equipamentos sendo aprimorados, promovendo o surgimento de novas técnicas. Os primeiros relatos de clonagem e expressão funcional de receptores de peptídeos formilados, publicados no início dos anos 90. Nos últimos anos, tem-se relatado a descoberta de genes que representam a formação desses receptores FPR em humanos, como FPRL que codifica FPR *like-1* e FPRL2 que codifica FPR *like-2*, ambos pertencentes ao cromossomo 19q 13.3 com regiões idênticas em 69% dentre seus 350-370 aminoácidos (Prossnitz, 1997; Selvatici, 2006).

Yingying Le (Le, 2002) relata que os receptores do tipo FPRL2 estão presentes em monócitos e ausentes em neutrófilos. Os receptores encontrados em neutrófilos são representados pelo FPR, FPRL1 e mFPR1, responsáveis pela liberação e dessensibilização de outros receptores quimiotáticos, mobilização de cálcio e migração, sendo o último responsável também pela quimiotaxia e ativação do complexo NADPH oxidase. Segundo Mikkel Faurschou e colaboradores, os receptores para fMLP são encontrados mais especificadamente nos grânulos gelatinase, específicos e nas vesículas secretórias dos neutrófilos.

Os FPRs pertencem à superfamília dos Receptores Acoplados à Proteína G (GPCRs) que fazem parte dos receptores sensíveis a Toxina Pertussis (PTX), assim como outros receptores de mediadores da inflamação como LTB<sub>4</sub>, C5a e PAF. A proteína G é formada por três subunidades, sendo elas  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ , com sítios de ligação para GDP e atividade GTPase, e domínios que interagem com várias proteínas efetoras. Em condições basais, esse complexo  $G\alpha\beta\gamma$  possui afinidade por guanosina difosfato (GDP) e quando ocorre a fosforilação formando GTP, durante a interação ligante/receptor/proteína G, a subunidade hidrofílica  $\alpha$  se dissocia das subunidades hidrofóbicas  $\beta\gamma$  e passam a interagir com outras proteínas efetoras para gerar segundos mensageiros. Essa sensibilidade à toxina se dá pelo impedimento da dissociação dessas subunidades da proteína G, interrompendo o processo funcional dos neutrófilos na desgranulação, produção de superóxidos e liberação do ácido aracídico (Devlin, 2007; Ferretti, 2001; Audi, 1996).

Estruturalmente os FPRs ou receptores do tipo serpentina são constituídos de sete segmentos transmembrânicos em  $\alpha$  hélice com características hidrofóbicas, que se ligam a grupos hidrofílicos no interior da célula, tais como a proteína G. É organizado de forma a comportar início N-terminal e três alças extracelulares, e três alças intracelulares juntamente com a região C-terminal (Prossnitz, 1997; Gao, 1999; Devlin, 2007).

FIGURA 11. Receptor FPR. Representação das sete  $\alpha$  hélices transmembrânicas juntamente com os domínios de glicosilação, domínio para interação com a proteína G e domínio de fosforilação (modificado a partir de Prossnitz, 1997).



A região N terminal é formada por uma sequência pequena, 26 aminoácidos, seguido por duas regiões que comportam domínios de glicosilações, assim como na segunda alça extracelular (representado por G na figura). Ainda na porção extracelular são observadas regiões conservadas de cisteínas entre os loops 1 e 2, formando uma interação estabilizada por pontes dissulfeto. Já na parte intracelular, os loops 1 e 3 são relativamente pequenos quando comparados a porção C terminal com 47 aminoácidos, sendo formados por 5 e 16 aminoácidos, respectivamente. Na porção carboxi terminal, encontramos um total de 11 resíduos de serina e treonina formando domínios para fosforilação por quinases. A representação de receptores de peptídeos formilados é mostrado na figura 11.

Gao realizou um ensaio cujo resultado demonstrou que a afinidade do sítio de ligação a peptídeos formilados depende da regulação intracelular do FPR, onde se tem uma regulação negativa proporcionando baixa afinidade do receptor pelo ligante quando níveis de GTP aumentam (Gao, 1999; Prossnitz, 1997).

O posicionamento tridimensional do receptor na membrana permite que os domínios extracelulares juntamente com os domínios transmembrana adjacentes formem um “bolso” para ligação do ligante específico, como o fMLP. Essa ligação na região N-terminal promove uma mudança conformacional no receptor, que é refletida em modificações intracelulares na região C-terminal. Eric Prossnitz sugere um modelo de fosforilação de FPR, no qual a quinase reorganiza resíduos ácidos na região C-terminal e fosforila resíduos de serina e treonina de forma sequencial. Essa fosforilação da serina e treonina na região N-terminal é essencial para a fosforilação subsequente de resíduos na região C-terminal.

A ligação do protótipo de fMLP ao seu receptor FRP (FRP1 ou FRP2) em neutrófilos, ativa uma série de cascatas de transdução de sinais que envolvem inúmeras enzimas efetoras resultando na formação de segundo mensageiro. Essas vias são cruciais para a ação efetora dos neutrófilos como quimiotaxia, aderência, fagocitose, geração de ROS e secreção de enzimas lisossomais, que representam as respostas fisiológicas a infecções bacterianas (Selvatici, 2006).

### 1.8.2. Cascata

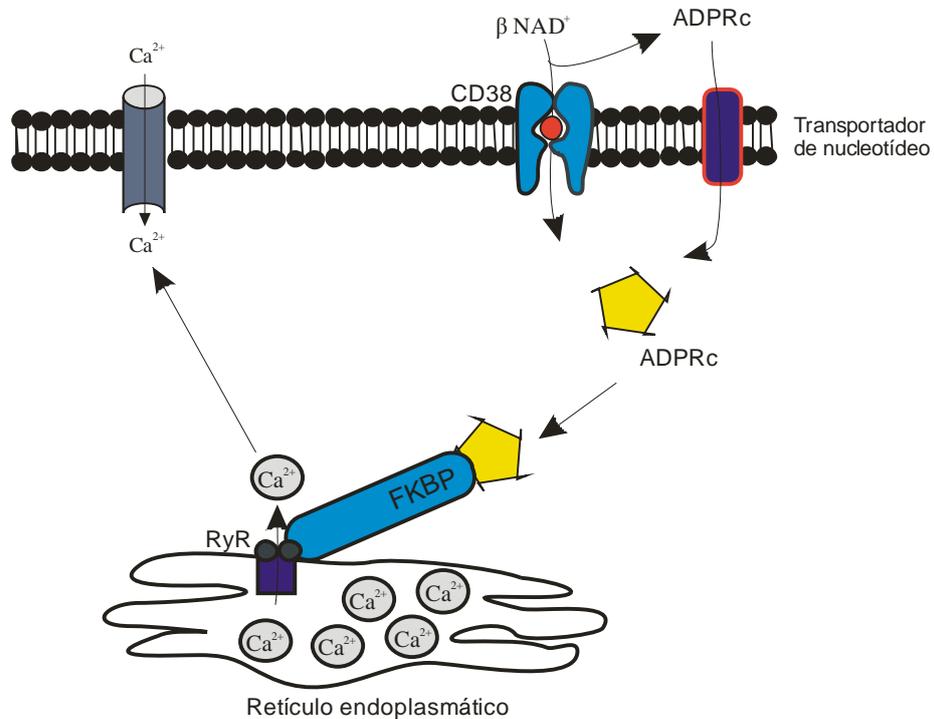
Os receptores de peptídeos formilados (FPR) iniciam um processo de transdução de sinal, por meio da interação extracelular com o ligante (fMLP) que irá causar modificações

conformacionais no receptor vindo a refletir na dissociação das subunidades da proteína G, constituindo a forma efetora da subunidade  $\alpha$  ( $G\alpha GTP$ ) (Devlin, 2007).

Ke Zen e Yuan Liu publicou em 2007, que a fosfolipase  $C\beta$  ( $PLC\beta$ ) pode ser ativada tanto pela subunidade  $G\alpha GTP$  como pela  $G\beta\gamma$ . Sendo ativada vai hidrolizar o  $PIP_2$  em  $DAG$  e  $IP_3$ , onde  $DAG$  ativa Proteína Quinase C ( $PKC$ ) promovendo a produção de superóxido e ativação de outras quinases. Por outro lado o dímero dissociado  $G\beta\gamma$  também terá sua ação na Fosfatidilinositol 3 Quinase ( $PI3K$ ), que atuará no direcionamento e migração durante a quimiotaxia. Já Yingying Le e colaboradores sustentam a hipótese de que a subunidade  $\alpha$  G estar relacionada à ativação da  $PI3K$  enquanto que as subunidades  $\beta\gamma$  ativam a  $PLC\beta$ .

Yingying Le também relata a produção de  $LTB_4$  e prostaglandinas pela ativação da fosfolipase A. Já a ação da  $PLC$  na formação de um segundo mensageiro citossólico leva à liberação de cálcio por meio dos receptores de  $IP_3$  no retículo endoplasmático. Esse aumento de cálcio pode ser intensificado por uma glicoproteína transmembrana que catalisa a produção de  $ADPR$  no meio extracelular a partir da  $\beta$   $NAD^+$ , que posteriormente será transportado para o interior das células pelos transportadores de nucleotídeos ( $NTs$ ) (figura 12). Os  $ADPRs$  intracelulares atuarão em receptores específicos chamados Receptores de Rianodina ( $RyR$ ) no retículo endoplasmático, até então descoberto somente em células cardíacas e musculares, para a liberação de cálcio intracelular. Acredita-se que durante esse transporte intracelular de  $ADPRs$  até o retículo endoplasmático, uma proteína esteja vinculada a ela chamada  $FKBPs$ . O aumento de cálcio citossólico resulta em um processo chamado liberação de cálcio induzida por cálcio, onde o mesmo influenciará nos canais aumentando o influxo pela membrana. Um estudo publicado em 2008 por Miriam Giambelluca evidencia que níveis de peróxido de hidrogênio extracelulares poderiam agir como um segundo mensageiro durante a ativação celular e ao mesmo tempo promoveria o aumento de cálcio dentro da célula funcionando como um sistema de feedback positivo entre  $ROS$  endógeno e ativação celular por  $fMLP$  (Lee HC, 2002; Yingying Le, 2002; Devlin, 2007; Morita, 2008; Giambelluca, 2008).

Figura 12. Movimentação de cálcio por CD 38. Produção de ADPRc no meio extracelular a partir da  $\beta$  NAD<sup>+</sup>, sendo transportado para o meio citoplasmático por NT onde se ligará a RyR para a liberação de cálcio pelo RE e resultando no aumento do influxo por meio dos canais de cálcio na membrana plasmática (modificado a partir de Le, 2002)

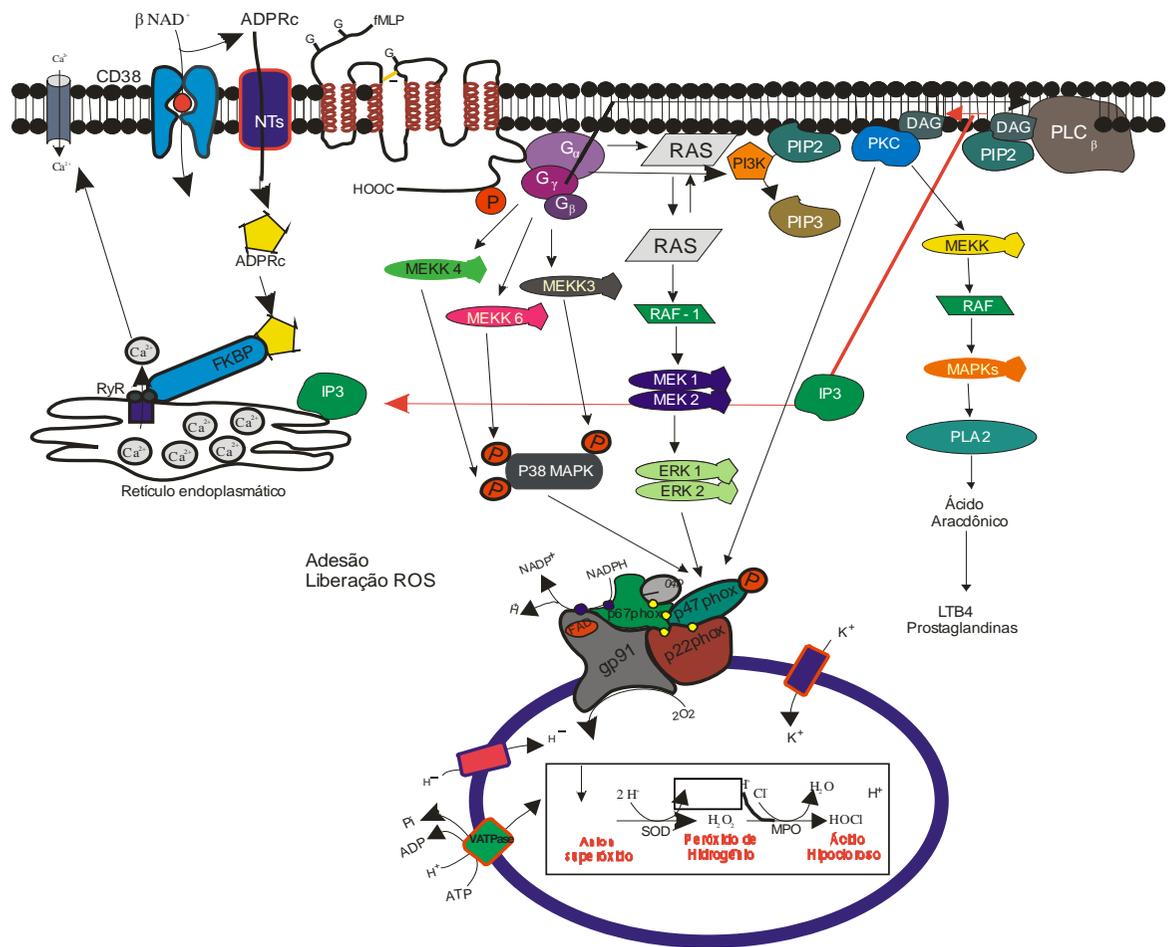


Além do cálcio como segundo mensageiro livre no citosol, Ferretti apresentou a AMPc como um dos principais comunicadores internos sendo produzido em condições aumentadas de influxo de cálcio, sugerindo que a produção de AMPc não está envolvida com a Adenilato Ciclase mas sim com diferentes mecanismos ainda não conhecidos. Foi relatado também que o complexo cálcio calmodulina desempenha papel importante no desencadeamento de pequenas proteínas GTPases como Ras, Rac e p21, assim como de seus efetores PAKs, NADPH oxidase e ERK, nos diversos processos intracelulares durante a ativação celular dos neutrófilos. Um exemplo citado por Jian P.Lian é a ligação da p21 no domínio de PAK que levou à interação com Rac na forma ativada ligada a GTP, processo esse que não está esclarecido. Observou-se também que após a estimulação com fMLP, as primeiras proteínas Ras e ERK 1/2 exibiam uma rápida ativação, assim como PI3K e MEK-2 como a isoforma predominante durante esse tipo de estímulo. MKK 3, MKK4 e MKK6 possuem a capacidade de fosforilar p38MAPK, onde Ric Krump cogita a possibilidade dessa fosforilação envolver Rac e/ou Cdc42 seguido de PAK tendo em vista que dois tipos de PAKs

foram identificadas em neutrófilos humanos estimulados com fMLP. O envolvimento dessas proteínas na ativação da p47 phox, do complexo NADPH oxidase, é notório. (Ferretti, 2001; Lian, 2001).

A fosforilação da p47 phox foi evidenciada por muitos autores, onde ainda se tenta descobrir quais as possíveis enzimas envolvidas na fosforilação dessa subunidade do complexo NADPH oxidase. Cedric Dewas (Dewas, 2000) sugere que embora ERK1/2 e p38 MAPK estejam envolvidas na produção de superóxidos, apenas a ERK1/2 participa da fosforilação da p47 phox. Como foi citado anteriormente, o fato da p47 phox possuir vários sítios de fosforilações abre margem para inúmeras possibilidades de ativação, entre elas a fosforilação específica realizada por ERK 1/2 nos resíduos 345 e 348 podendo induzir a uma mudança conformacional em outros locais mais acessíveis a proteína quinase. Outro ponto a ser destacado é a atuação da MEK 1/2, que fosforila os resíduos 303, 304, 315, 345 e 348 na proteína p47 phox.

FIGURA 13. Cascata de sinalização induzida por fMLP. A ligação do fMLP ao receptor FPR promove a dissociação da proteína G ativando RAS, PLCβ, PI3K, MEKK3, MEKK6 e MEKK4. A ativação da proteína p47phox pode ser realizada pela PLβ por meio da ativação da PKC, pela ativação da ERK1/2 por meio da ativação de RAS e pela p38MAPK ativada pela MEKK3, MEKK 4 e MEKK 6. A liberação de IP3 pela ativação da PLCβ, promove a liberação de cálcio pelo RE, assim como o processo de ADPRc, aumentando o influxo de cálcio pela membrana (modificado a partir de Lee, 2003; Quinn, 2004; Prossnitz, 1997 e Le, 2002).



A interação dos peptídeos formilados, como o fMLP, com receptores FPRs promovem uma série de eventos, envolvendo inúmeras proteínas que resulta desde a quimiotaxia até a apoptose dos neutrófilos. Muitas pesquisas vêm sendo desenvolvidas com o objetivo de conhecer melhor esses mecanismos de ação proteica que envolve bactérias Gram positivas e neutrófilos com resposta exacerbada, afim de controlar doenças causadas por esses mecanismos.

### 1.8.3. Importância Clínica

O processo inflamatório é um mecanismo complexo onde estão envolvidos inúmeros mediadores pró-inflamatórios liberados inicialmente em resposta a processos de injúria tecidual como trauma (envolvendo a ativação dos neutrófilos por mediadores inflamatórios endógenos como PAF, GM-CSF, G-CSF, LTB<sub>4</sub>, TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-8) ou invasão por patógenos (mediadores inflamatórios exógenos como LPS e fMLP), afim de eliminar resíduos celulares e microrganismos invasores. Ao mesmo tempo o organismo tenta compensar essa ação devastadora das células do sistema imune, produzindo mediadores antiinflamatórios (citocinas, quimiocinas e expressão de proteínas pró-apoptótica que interferem no tempo de vida dos neutrófilos promovendo a apoptose) na tentativa de manter a homeostase imunológica (Steven, 2004; Akgul, 2001).

Nos últimos anos, vários estudos têm sido realizados na tentativa de descobrir os mecanismos que envolvem uma das maiores causas de morte em pacientes nas unidades de terapia intensiva, a sepse. Paulo Martins (Martins, 2008) especula que no início da doença a produção acentuada de ROS pode ser importante para a contenção dos microrganismos infectantes, contudo, se o processo persistir em níveis elevados, pode ser prejudicial. Seus estudos comprovaram que as taxas de ROS em indivíduos com sepse, sepse grave e choque séptico, acometidos por inúmeros patógenos como *Staphylococcus aureus*, *S. coagulase positiva*, *Escherichia coli* e *Acinetobacter*, mantiveram-se elevados quando comparados ao grupo controle (pacientes sadios).

Por outro lado muitas doenças imunes estão sendo descobertas, causadas por hereditariedade, agente infeccioso ou até mesmo por resposta auto-imune. Dentre elas destacamos a Doença Granulomatosa Crônica (DGC), de origem hereditária que possui o sistema NADPH oxidase defeituoso, em específico a proteína gp91 phox. A produção deficiente da gp 91 promove um acúmulo de neutrófilos no local da infecção refletido por um

sistema anti microbiano falho, onde o paciente é facilmente acometido por infecções bacterianas e fúngicas, (Nathan, 2002).

Quando essa resposta imune reflete uma infecção bacteriana de forma exacerbada, seja ela por fMLP e/ou LPS, o organismo perde o controle da homeostase, onde os neutrófilos ficam cada vez mais ativados e tomam proporções sistêmicas caracterizando a Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica (SRIS), que posteriormente acometerá principalmente os pulmões resultando na Síndrome da Angústia Respiratória Aguda (SARA). Lea Kialkow relata em suas pesquisas que a apoptose de neutrófilos (fato que sucede a alta liberação de ROS em neutrófilos ativados) está diminuída na SRIS (Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica), SARA (Síndrome da Angústia Respiratória Aguda) e septicemia. Essa diminuição é observada pelos danos causados de forma sistêmica com a exposição prolongada dos neutrófilos ativados. O mecanismo responsável por essa diminuição da apoptose em neutrófilos na sepse, SARA e SRIS ainda não estão totalmente compreendidos (Kialkow, 2006).

Anticorpos citoplasmáticos anti neutrófilos (ANCAS) têm sido descritos em várias doenças incluindo doenças auto-imunes, vasculites sistêmicas idiopáticas, doenças do tecido conjuntivo e algumas infecções (Malenica, 2004).

A compreensão dessas doenças causadas por fagócitos ativados tem sido alvo de muitas pesquisas, a fim de descobrir não só a origem mas a fisiopatologia e o mecanismo internos que levam a tal ativação. A descoberta do mecanismo protéico que envolve uma série de eventos de transdução de sinal quando exposto a bactérias Gram-positivas se torna um fator essencial para o tratamento ou prevenção destas situações devastadoras.

#### 1.8.4. fMLP e outros ativadores

Na tentativa de reproduzir a ação dos neutrófilos em diversas situações de ativação *in vivo*, seja ela por patógeno ou não, tornou-se imprescindível a produção de mediadores inflamatórios que retrate tais processos. Entre eles destacamos os protótipos fMLP (fenil-Met-Leu-Phe) e LPS (Lipopolissacarídeo) que representam infecções bacterianas Gram-positivas e Gram-negativas, respectivamente. Temos os mediadores biológicos que são produzidos pelo próprio organismo em condições quimiotáticas, como o PAF (Fator de Agregação Plaquetária) com relatos de produção em diversos tipos celulares (células do endotélio vascular, neutrófilos, monócitos, macrófagos, nasófilos, mastócitos, linfócitos e plaquetas),

IL-8, IL-1, TNF- $\alpha$ , LTB4 e outros. Outro ativador bastante utilizado como controle positivo é o PMA (13- acetato de forbol éster 12-miristato), produto natural isolado de *Croton tiglium* e de outras plantas da família Euphorbiaceae, com ação análoga ao DAG (diacilglicerol). Além do estímulo por esses mediadores, nos últimos anos vários autores pesquisam as reações inflamatórias, com ativação significativa dos neutrófilos, em pacientes que foram submetidos a implantes de titânio, utilizando partículas em experimentos *in vitro* (Kuijpers, 2001; Santos, 2007; Aquino, 2008).

### 1.9. Métodos de avaliação da ativação celular

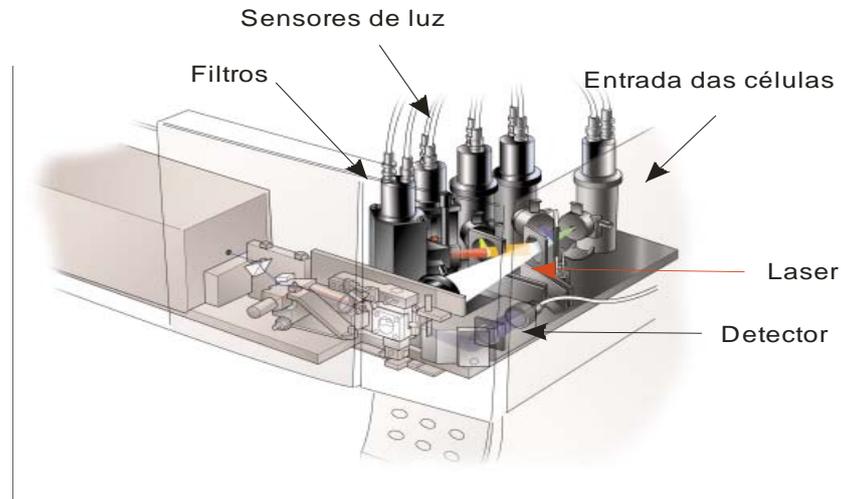
Existem vários métodos para a confirmação da ativação dos neutrófilos pelo fMLP, onde podemos destacar a Citometria de Fluxo e o Teste do *Nitroblue Tetrazolium* (NBT).

#### 1.9.1. Citometria de fluxo

A citometria de fluxo é uma técnica que surgiu em meados da década de 30, com os primeiros indícios de análise de mudança de luz recebida pela passagem das células no microscópio óptico acoplado a um detector. O modelo exposto foi aprimorado e surgiu a primeira patente em 1941 por Kielland. Os anos foram passando e o modelo foi sendo aperfeiçoado, de forma que hoje a citometria de fluxo é considerada um procedimento essencial em vários campos da pesquisa, se destacando principalmente na área médica com a descoberta de novas doenças, assim como seu monitoramento.

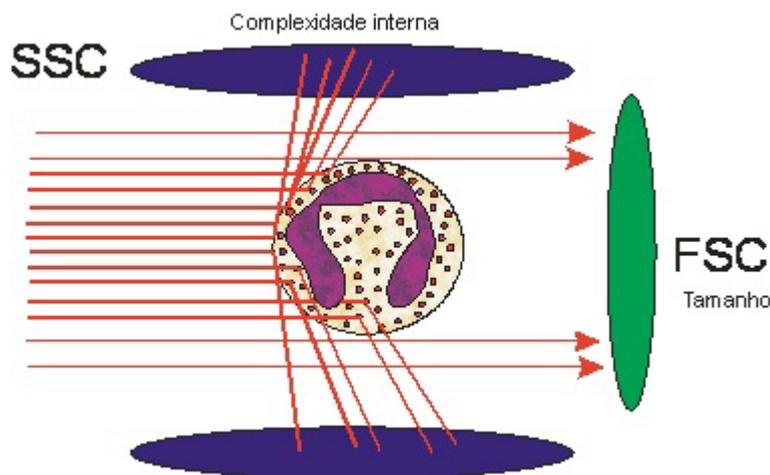
O citômetro de fluxo é composto por 5 componentes : fonte de radiação ( lâmpada de mercúrio ou laser), uma câmara de fluxo, unidades de filtros ópticos para seleção de um intervalo de comprimento de onda, fotomultiplicadores e uma unidade que processa os dados (figura 14).

FIGURA 14. Componentes do citômetro de fluxo. Localização da entrada das células, laser, detector, sensores de luz e filtros, ([www.bd.com](http://www.bd.com), acessado em 15 de janeiro de 2010)



O princípio básico da citometria é aspirar células ou partículas de uma suspensão previamente tratada, de forma que passem por uma câmara chamada *Flow Cell* em um fluxo contínuo de células (meio aquoso em que estão inseridas as células, chamado de *Sheath Cell*) até atingirem o local onde serão interceptados pelos lasers (o mais utilizado é o íon argônio com 10-15 mW e comprimento de onda de 488 nm). Esse fluxo contínuo é regulado pelo aparelho de tal forma, que as células são captadas pelos lasers uma por vez, aumentando assim a especificidade do método. Uma vez interceptadas, detectores captam os sinais emitindo dois tipos de dados. O primeiro envolve dois tipos de detectores, onde um atua captando a luz desviada lateralmente e outra capta a incidência de luz na parte frontal, sendo caracterizados como padrões SSC (*Side Scatter Cell*) para características morfológicas e estruturais como granularidade e FSC (*Forward Scatter Cell*) para tamanho celular, respectivamente (figura 15). O segundo capta a luz emitida pelo fluorocromo que foi excitado pelo laser, de forma que se obtenham dados relacionados a aspectos bioquímicos, biofísicos e moleculares da célula pelos canais de fluorescência FL1 (verde), FL2 (amarela), FL3 (laranja), FL4 (vermelha) e FL5 (roxa), dependendo dos tipos de lasers que o citômetro possui (Bertho).

FIGURA 15. Avaliação das características físicas dos neutrófilos. Representação da incidência de luz no neutrófilo, desvio e detecção caracterizando granularidade (SSC) e tamanho celular (FSC) (modificada a partir de Darzynkiewicz, 2001)

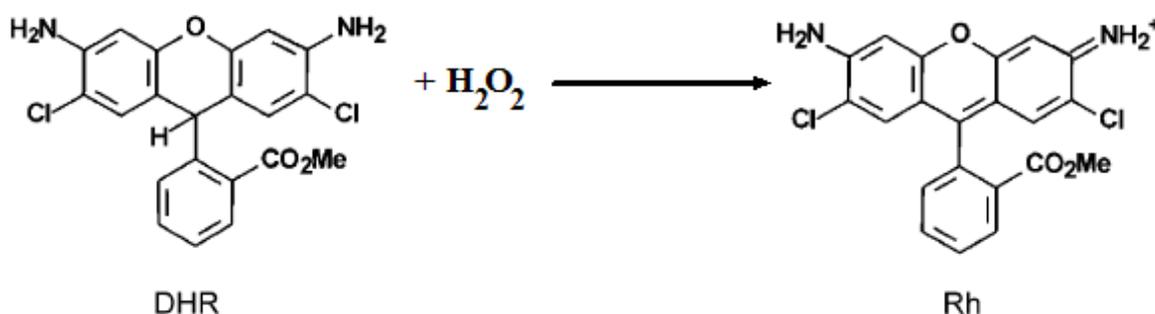


Bertho explica que uma série de lentes são posicionadas próximo da zona de interceptação, no qual coletam os sinais luminosos, dispersos de acordo com a célula, e enviam-na para os tubos fotomultiplicadores (PMTs) que por sua vez, convertem sinais luminosos em pulsos elétricos. A seleção e captação específica desses sinais luminosos são realizadas pelos chamados filtros ópticos, que atuam bloqueando determinados comprimentos de onda deixando passar somente o comprimento de onda desejado. E por fim, esses sinais elétricos são amplificados, convertidos para a forma digital e enviados para o computador.

O método que analisa os aspectos bioquímicos, biofísicos e moleculares das células, utiliza substâncias fluorescentes chamadas fluorocromos. Alguns fluorocromos têm sido usados para avaliar a capacidade funcional dos neutrófilos quando ativados por fMLP e PMA tais como, mobilização de cálcio, aderência, agregação, desgranulação, fagocitose e produção de ROS. A detecção dessas funções pode ser obtida com a utilização de marcadores fluorescentes, entre eles a 1,2,3 Dihidrorodamina (DHR 1,2,3) , que emite fluorescência quando oxidada pelo peróxido de (Bertho; Li, 2003; Kuijpers, 2001).

O DHR é um marcador intracelular que quando oxidado pelo peróxido de hidrogênio, transforma-se em 1,2,3-rodamina, cuja fluorescência é detectada pelo canal FL1 (500 nm a 560 nm) do citômetro de fluxo (figura 16) (Li, 2003).

FIGURA 16. Transformação do DHR em Rodamina. A 1,2,3 dihidrorodamina é oxidada pelo peróxido de hidrogênio formando a 1,2,3 rodamina (modificado a partir de Wrona, Patel et al, 2005).



### 1.9.2. *Nitroblue Tetrazolium* (NBT)

O princípio do teste de NBT baseia-se na interação do superóxido, produzido pelo neutrófilo ativado, reduzir o tetrazólio (incolor) em formazan (azul escuro). As células redutoras apresentam formazan intracitoplasmático, cuja intensidade do azul escuro varia de acordo com o estímulo que a célula recebeu. Essa coloração azulada pode ser vista em microscopia óptica (Rinaldi, 2007; Peixoto, 2002; Park, 1970).

### 1.10. *Proteômica*

Com a descoberta completa do genoma humano em 2003 pelo Projeto Genoma Humano, abriram-se portas para uma nova abordagem experimental em biologia que estuda as proteínas expressas a partir do genoma, conhecida como proteômica. Esse estudo desde então, ganhou enormes proporções resultando no desenvolvimento, integração e automatização de uma variedade de técnicas e equipamentos que visam separar, identificar, quantificar e caracterizar as proteínas.

O genoma proporcionou a sequência de nucleotídeos de um organismo caracterizando os respectivos genes, enquanto que o estudo da proteômica tem início com as proteínas modificadas funcionalmente e trabalha retroativamente para identificar o gene responsável pela sua produção. Juntas, as tecnologias genômica e proteômica se completam

perfeitamente e proporcionam uma potente arma para investigações de qualquer sistema biológico. Um exemplo dessa interação foi à contribuição que o projeto genoma forneceu ao identificar um grande número de genes, e a proteômica por meio de suas várias técnicas tais como, espectrometria de massa e HPLC, contribui com a identificação de proteínas candidatas à potenciais alvos para drogas (Palma,; Santos, 2007).

Assim como o genoma, o projeto proteoma também tem sido aplicado como ferramenta de pesquisas, onde podemos destacar os seguintes segmentos: proteínas secretadas, proteínas de membrana, estudos que mostram o modo de ação das drogas e fármaco-proteômica. Dentro desses segmentos, a proteômica é capaz de identificar as diferenças das proteínas entre amostras, tais como: célula de tecido normal e célula de tecido estimulado por drogas, tecido acometido por determinada patologia e sadio, bactérias patogênicas e não patogênicas, distinções entre diferentes comportamentos celulares das mesmas células submetidas a duas condições fisiológicas diferentes (como por exemplo, neutrófilos quiescentes e tratados com PMA, PAF, fMLP e LPS).

Diante de inúmeros estudos com neutrófilos, Gregory Luerman et al estabeleceram que a capacidade de definição do proteoma dos neutrófilos está relacionada, em termos gerais, com a formação de três categorias: funcional, estrutural e expressão, isto é, eles criaram três categorias objetivando os tipos de proteínas identificadas de acordo com a função dentro da abordagem proteômica.

Enquanto a categoria funcional aborda as modificações pós-traducionais que regulam a ativação de proteínas e as interações moleculares, a categoria estrutural abrange a determinação da composição dos complexos protéicos e define interações proteína-proteína. Já a expressão proteômica é caracterizada por definir e quantificar todas as proteínas dentro de uma célula ou organela em condições normais, de doença ou em condições de tratamento.

Em termos gerais, a proteômica possibilita a observação dos processos celulares com detalhes não obtidos anteriormente, em nível de moléculas individuais, especificando expressão diferencial de proteínas em vários tipos celulares sob diferentes condições ambientais (Palma,; Santos, 2007).

Diversas abordagens experimentais podem ser utilizadas em proteômica, sendo a mais comum a que envolve eletroforese bidimensional seguida por análise de imagens para determinação de expressão diferencial e espectrometria de massa para identificação de proteínas.

### 1.10.1. Eletroforese Bidimensional

A eletroforese bidimensional é o método de escolha que permite uma alta resolução das várias espécies de proteínas presentes em uma amostra biológica de forma reprodutível. Além disso permite separar as várias formas protéicas que tenham sofrido modificações pós-traducionais tais como glicosilações, fosforilações e acetilações, e que eventualmente modificaram o seu pI e massa molecular.

Esse método envolve a separação de proteínas na primeira dimensão de acordo com o ponto isoelétrico e, na segunda dimensão por massa molecular. Ou seja, a eletroforese 2D resulta da combinação de 2 técnicas: focalização isoelétrica seguida de uma separação por gel desnaturante (SDS-PAGE). Isto resulta no aparecimento de pontos de proteínas bioquimicamente com elevado grau de pureza, que facilita as análises posteriores para a identificação e sequenciamento por meio da espectrometria de massa (Palma; Gregory, 2009).

### 1.10.2. Análise de Imagens

A bioinformática atua de forma conjunta com a proteômica com o objetivo de produzir softwares cada vez melhores, que sejam capazes de transformar os dados experimentais em dados passíveis a análise estatística. Para que isso ocorra os géis produzidos na eletroforese bidimensional, são digitalizados e submetidos à detecção automática dos spots no software *Image Master 5*. Como a detecção realizada pelo programa não é 100% precisa, servindo somente como parâmetros iniciais, é necessário que essa detecção passe por uma revisão manual (Biron D.G, 2006; Healthcare, 2004).

Para a obtenção de dados estatísticos confiáveis é adotada uma série de procedimentos de padronização dos experimentos, obtendo uma reprodutibilidade maior na eletroforese 2D e o uso de triplicatas experimentais e biológicas dos indivíduos de forma a permitir uma análise que minimize a interferência dos erros experimentais.

### 1.10.3. Espectrometria de Massa

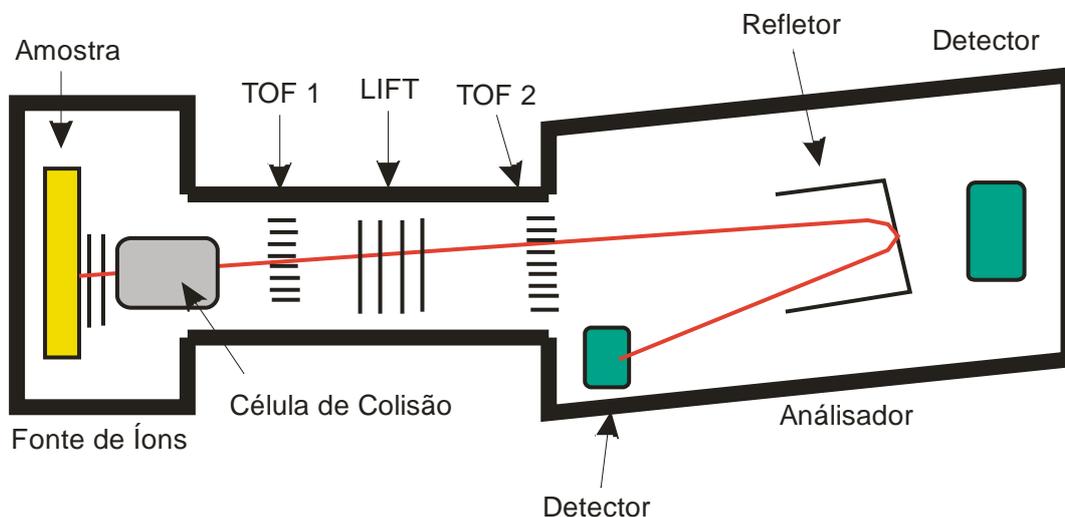
Hoje o mercado oferece vários tipos de espectrômetro de massa, incluindo íon Trap LC/MS/MS, MALDI-TOF, MALDI-TOF/TOF, ESI-TOF e ESI-MS/MS que auxiliam na identificação, quantificação e caracterização das proteínas. A estratégia mais usada para

caracterização de níveis de expressão e identificação de proteínas a partir de gel de eletroforese bidimensional é a espectrometria de massa com ionização por laser e análise de tempo de voo (MALDI-TOF) complementada por informações de sequência obtidas a partir da fragmentação dos peptídeos ionizados (MALDI-TOF/TOF).

O espectrômetro de massa é caracterizado por converter componentes de uma amostra em íons gasosos, sendo capaz de medir as respectivas massas moleculares protéicas, isto é, os íons são separados de acordo com sua relação massa/carga ( $m/z$ ), cuja unidade é representada por unidade de massa atômica (u) ou Daltons (Da).

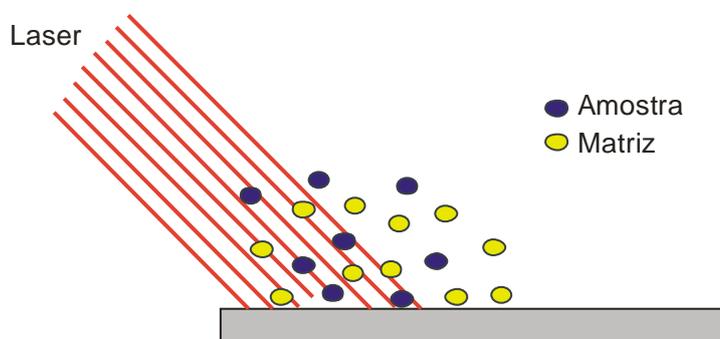
O espectrômetro de massa é constituído de cinco componentes principais, sendo eles: um sistema que insere a amostra, fonte de íons, analisador, detector e um processador de sinais (figura 17).

FIGURA 17. Componentes do espectrômetro de massa. Desenho representativo do espectrômetro de massa do tipo MALDI TOF TOF mostrando a localização da entrada da amostra, da câmara de colisão e fonte de íons, dos analisadores TOF 1 e 2, sistema Lift, refletor e detector. (modificado a partir de Suckau, 2003).



A fonte de íons do tipo MALDI (*Matrix Assisted Laser Desorption*) é o método que promove a vaporização e ionização de macromoléculas biológicas da fase sólida para a fase gasosa. Para que isso ocorra a amostra é cristalizada junto com uma matriz de baixa massa molecular que promoverá, além da proteção contra degradação da amostra, a transferência de parte da energia emitida pelo laser às macromoléculas resultando em leve ionização e permitindo a detecção numa forma intacta (figura 18).

FIGURA 18. Ionização da amostra do tipo MALDI. Ionização da amostra por meio da matriz (modificada a partir de Palma).



Ainda na fonte de íons, os mesmos são submetidos a um campo elétrico, o que promove o deslocamento desses. O analisador TOF (*Time of Flight*) permite a separação dos íons, anteriormente gerados e acelerados, durante seu percurso por uma região livre de campo e alto vácuo, chegando a um detector em diferentes intervalos de tempo de acordo com a razão  $m/z$  de cada íon. Ao colidir com o detector os íons vão ser convertidos em sinais elétricos e permitir a geração de dados compatíveis com um processador de dados, isto é, os íons vão ser transformados em sinais elétricos de forma que o *software* capture e processe essas informações expondo-os em forma de espectros baseado na razão  $m/z$  por tempo de voo (eixo x) e na intensidade de peptídeos ionizados (eixo y).

O método *Lift* associado ao MALDI TOF/TOF (MALDI LIFT-TOF/TOF) é um sistema que proporciona aumento da sensibilidade da identificação por PMF (*Peptide Mass Fingerprints*), onde íons fragmentados por CID (*Collision Induced Dissociation*) no modo refletor são analisados, permitindo a obtenção de sequências de aminoácidos. Em certos casos o PMF fornece informações suficientes para a identificação da proteína. Caso haja incerteza, pode-se usar a identificação por MS/MS que analisa fragmentos de íons de peptídeos selecionados podendo ser usado para melhorar a identificação da proteína (Suckau, 2003; Palma).

## 2. OBJETIVOS E JUSTIFICATIVA

### 2.1. *Objetivo Geral*

O objetivo geral do presente trabalho é comparar os resultados do mapa proteômico dos neutrófilos quiescentes com mapa dos ativados por fMLP e identificar as proteínas que apresentarem expressão diferencial significativa.

### 2.2. *Objetivos Específico*

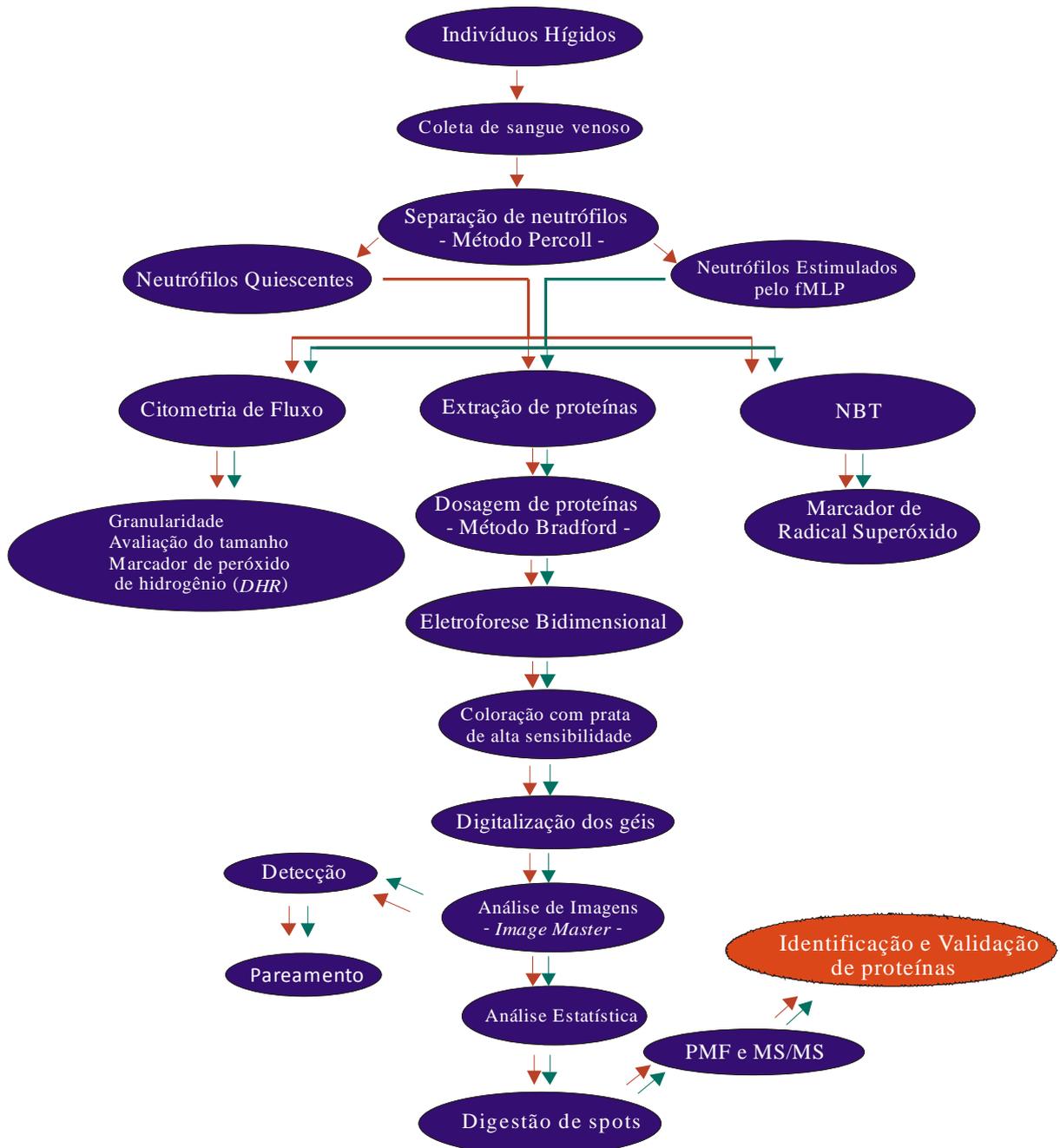
- Comparar os neutrófilos ativados por fMLP com o auxílio da citometria de fluxo, avaliando a influência de parâmetros como concentração de fMLP e duração do estímulo na ativação das células. Serão usados como parâmetros: tamanho da célula (FSC), granularidade (SSC) e produção de espécies reativas de oxigênio, avaliada por emissão de fluorescência.
- Obtenção de mapas proteômicos em pH ácido (4-7) de neutrófilos ativados por fMLP.
- Localização de proteínas com expressão diferencial estatisticamente significativa nos mapas proteômicos obtidos.
- Fornecer dados para estudos de via de sinalização dos neutrófilos ativados por fMLP.

O fato dos neutrófilos serem células que atuam na primeira linha de defesa contra microrganismos os tornam peças centrais para estudos imunológicos principalmente por infecções fúngicas e bacterianas. Para que o funcionamento neutrofílico seja eficiente e ao mesmo tempo esteja sob controle, o sistema imune e células endoteliais liberam substâncias que ativam, estimulam e inibem várias ações dessa célula. O fMLP é um protótipo protéico que simula o contato por bactérias Gram-positivas, responsáveis pelo efeito ativador nos neutrófilos, entretanto diversos pontos das vias que levam a tal ativação ainda não foram completamente esclarecidos na literatura, como por exemplo o comportamento dos receptores de sobrevivência, a fosforilação de proteínas do sistema NADPH oxidase e o envolvimento das proteínas no tráfego intracelular principalmente durante a exocitose e desgranulação. A identificação de marcadores moleculares diferencialmente expressos entre células em repouso e células ativadas por fMLP fornecerá subsídios para uma elucidação mais detalhada dos mecanismos moleculares que levam à ativação.

É importante ressaltar também o potencial biotecnológico de tais marcadores, uma vez que as proteínas a serem identificadas podem vir a constituir alvos em potencial para novos anti-inflamatórios e marcadores moleculares diagnósticos, com aplicação em uma ampla gama de condições clínicas, como a resposta inflamatória sistêmica pós-trauma, enterites, hepatites, dermatoses, e diversas patologias autoimunes.

### 3. METODOLOGIA

#### 3.1. Delineamento experimental



### 3.2. Coleta de sangue

O critério desenvolvido na escolha dos três indivíduos voluntários se caracteriza com o preenchimento e assinatura do TCLE aprovado pelo comitê de ética e de uma ficha controle que conste a ausência de histórico de doenças crônicas, alérgicas, inflamatórias e infecto contagiosas e que não estejam fazendo uso de medicamentos.

Para a obtenção dos neutrófilos, foram coletados 3 mL de sangue venoso periférico utilizando seringa plástica heparinizada na concentração de 5 UI/mL. Em seguida todo o volume coletado é colocado delicadamente sobre os gradientes de percoll descritos a seguir. Todo esse processo é realizado com o máximo de cuidado possível a fim de evitar a ativação dos neutrófilos por choques mecânicos ou térmicos e pelo contato com superfícies de vidro. Tal processo é explicado com mais detalhes adiante (Santos, 2007).

Segundo Rachel Brown (Brown, 2003), a heparina pode se ligar à membrana mostrando uma competitividade antagonista com o receptor que irá gerar o segundo mensageiro intracelular IP<sub>3</sub>. Estudos preliminares mostraram que o IP<sub>3</sub> é essencial durante os processos envolvidos na ativação (PMA e fMLP) dos neutrófilos, que estão indiretamente relacionados com processos primordiais como liberação de cálcio, ativação da NADPH oxidase, desgranulação e fagocitose. Foi verificado por citometria de fluxo que a concentração de heparina utilizada não alterou a resposta dos neutrófilos estimulados por fMLP, tendo como base o controle negativo com neutrófilos quiescentes (Santos, 2007).

### 3.3. Separação de neutrófilos

Para separar os neutrófilos, foram utilizados dois gradientes de percoll (*Amersham Biosciences*) com HBSS em concentrações próximas de 60% e 70%. No preparo desses dois gradientes foi utilizado HBSS 10x (0,2g Cloreto de Potássio; 0,03g Fosfato de Potássio monobásico; 4g NaCl; 0,024g Fosfato de Sódio dibásico; 0,5g D-glicose; 0,0055g vermelho de fenol; 0,175g Bicarbonato de sódio; 50 mL água milli-Q; pH entre 7.2 e 7.4) e HBSS 1x, como mostrado na tabela abaixo (Santos, 2007).

**TABELA 4.** Tipos e quantidades de reagentes no preparo dos gradientes.

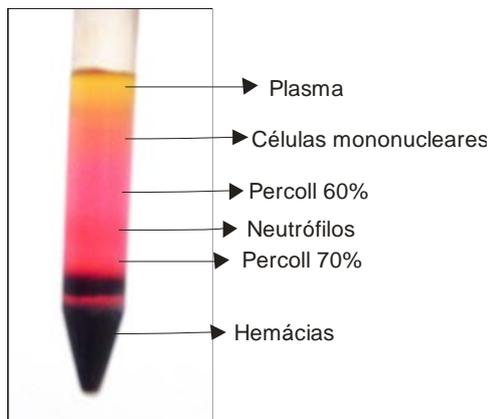
<b>Reagentes</b>	<b>60% (3mL)</b>	<b>70%(3mL)</b>
Percoll 100%	1800 $\mu$ L	2100 $\mu$ L
HBSS 1X	990 $\mu$ L	645 $\mu$ L
HBSS 10X	210 $\mu$ L	255 $\mu$ L

### 3.3.1. Montagem do gradiente

Depois que os dois gradientes foram preparados, 3 mL da solução de Percoll 60% (também chamada de gradiente de 60%) foram colocados em um tubo Falcon de 15 mL, em seguida os 3 mL do gradiente de 70% foram acrescentados abaixo do gradiente de 60%, utilizando uma seringa acoplada a uma agulha spinal de 10 cm da BD que vai até o final do tubo. Aos poucos e delicadamente, o gradiente de 70% é colocado em um fluxo regular e contínuo com o objetivo de não misturar os dois gradientes. Por último, 3 mL de sangue total são acrescentados cuidadosamente sobre o gradiente de 60% e o conjunto é levado à centrífuga HIMAC CR 20B2 – HITACHI com a seguinte programação: temperatura de 22 °C, força gravitacional de 400 g, rotor 37, altura da amostra no tubo falcon (aproximadamente 9cm), aceleração/desaceleração 2, 35 min em 35 min totais (Santos, 2007).

Após essa primeira centrifugação, são observados uma seqüência de separações que se inicia com o plasma (amarelo), um halo de células mononucleares, gradiente de 60%, um halo de neutrófilos, gradiente de 70% e hemácias no fundo do tubo, como mostrado na figura abaixo (Santos, 2007).

FIGURA 19. Tubo Falcon com as células separadas pelos gradientes



Em um primeiro momento o plasma é retirado, seguido do halo de mononucleares e o primeiro gradiente de percoll, a fim de minimizar ao máximo contaminações com demais células. Já o halo de neutrófilos é retirado em um volume de aproximadamente 2 mL, juntamente com o percoll que circunda o halo. Para obtermos células passíveis de análise, sem interferências dos polímeros de Percoll foram realizadas duas lavagens com 5 mL de HBSS 1X cada, seguidas por centrifugação a 0,19g durante 12 min, com aceleração/desaceleração 5 min, sendo que a temperatura e o rotor se mantêm os mesmos da primeira centrifugação (Santos, 2007).

Quando é observada a contaminação com hemácias, faz-se uma etapa de hemólise de no máximo 20 s, dependendo da quantidade de hemácias, acrescentando 3 mL de água milli-Q e restauramos a osmolaridade com 9 mL de NaCl 1,2%. Depois dessas etapas o experimento é avaliado quanto ao rendimento, viabilidade e pureza (Santos, 2007).

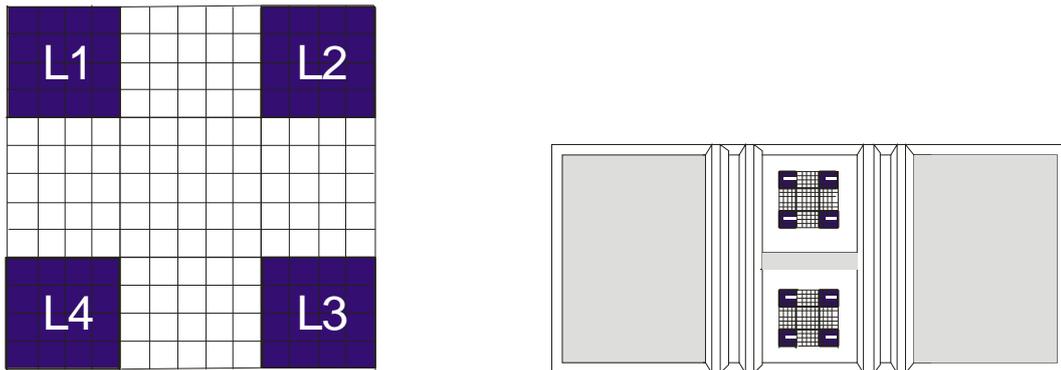
### 3.3.2. Métodos de avaliação da amostra

#### 3.3.2.a) *Contagem de células*

Para saber o rendimento da separação, 50  $\mu$ L de líquido de Turck (2 mL ácido acético glacial, 1 mL de azul de metileno 1 % e 93 mL de água destilada, sendo filtrada) e 10  $\mu$ L de neutrófilos em suspensão são colocados em um eppendorf. A análise é feita por microscopia em câmara de Neubauer, acrescentando aproximadamente 10  $\mu$ L bem homogeneizados da amostra. Para visualizar os neutrófilos no microscópio, a focalização é

iniciada com o aumento de 40x seguindo para o aumento de 100x na contagem das quatro regiões L, conforme a figura abaixo:

FIGURA20. Câmara de Neubauer



A área de cada quadrado L é de  $1 \text{ mm}^2$  cuja profundidade é de 0,1 mm. Logo ao contar quatro áreas L, na verdade estão sendo contadas um número de células em  $0,4 \text{ mm}^3$ , que corresponde ao número de células em  $0,4 \text{ }\mu\text{L}$ . Então a contagem total é multiplicada por 2,5 para saber o número de células por  $\mu\text{L}$ , além de multiplicar pelo fator de diluição 6 vezes. O cálculo feito é:

$$2,5 \times 6 \times (L1+L2+L3+L4) = \text{número de células} / \mu\text{L}$$

### 3.3.2.b) Viabilidade celular

A porcentagem de células vivas e mortas são verificadas, adicionando 5 µL de suspensão de células em um eppendorf seguida de 20 µL de solução de nigrosina 0,05% em PBS pH 7,2. A amostra foi adequadamente homogeneizada ao ser pipetada da câmara de Neubauer. Foi realizada a contagem em três regiões diferentes, adotando os critérios de análise como vivas as células com núcleo transparente e como mortas aquelas que apresentam o núcleo corado de preto, até se atingir a contagem de 100 células. Foi verificada a porcentagem de células mortas e vivas, sendo aceitas amostras apresentando mais de 98% de células vivas (Santos, 2007).

### 3.3.2.c) Pureza da amostra

Após a retirada da alíquota de células para contagem e viabilidade, o eppendorf contendo o restante das células foi centrifugado a 0,37g por 1 min. O pellet foi ressuspensão em 3500 µL de HBSS 1X com cálcio e magnésio (aproximadamente 500 µL de HBSS 1X para  $1 \times 10^6$  células), tendo sido retirada uma alíquota de 10 µL, à qual foram adicionados 20 µL de albumina bovina em temperatura ambiente. A partir dessas células com albumina bovina foi preparado um esfregaço, corado pelo método de *Wright*, de acordo com o protocolo seguinte: após a secagem, a lâmina é coberta com corante (3g de Eosina Azul de metileno, 1L de metanol e 20 mL de glicerina) durante 1 min, sendo adicionadas 12 gotas de água destilada e após cinco minutos a lâmina é enxaguada com água mili-Q para tirar o excesso de corante (Santos, 2007).

Foram contadas 100 células analisando as características morfológicas, visualizadas com aumento de 1600x em óleo de imersão, onde espera-se obter uma pureza acima de 98% de neutrófilos.

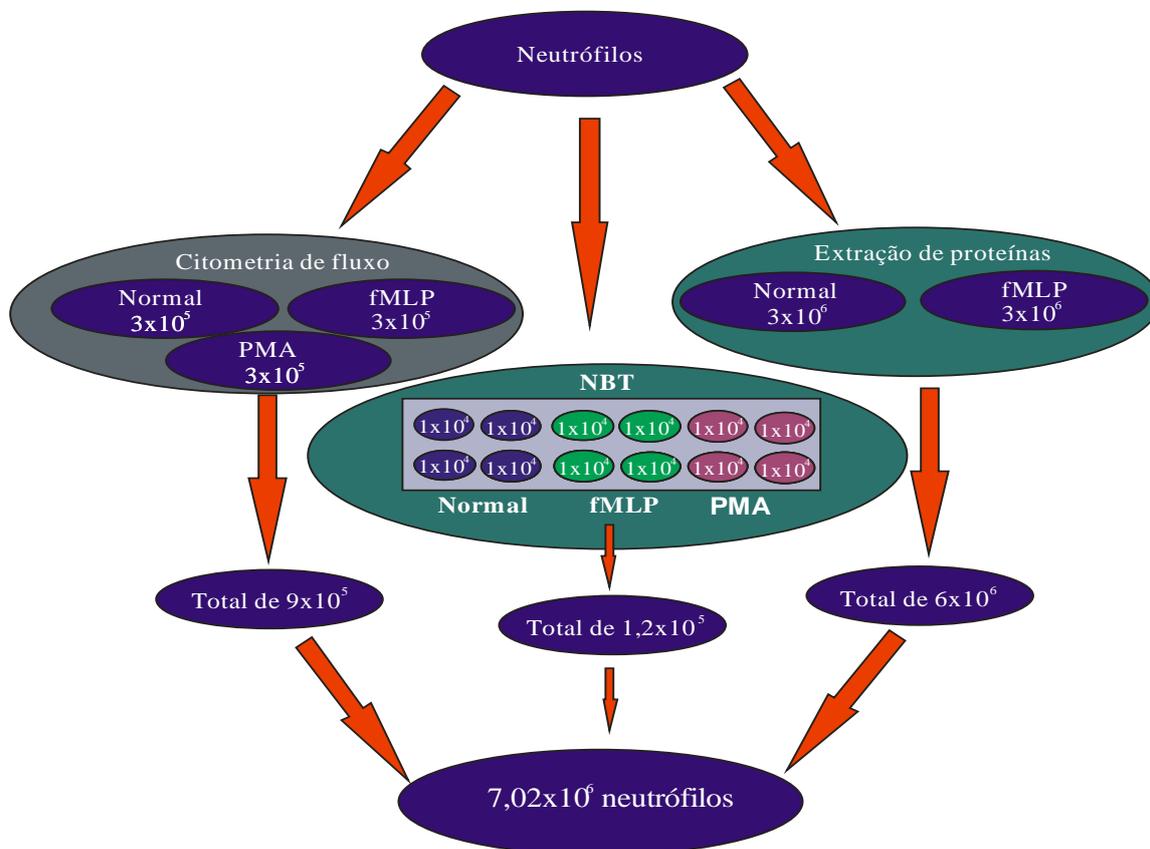
Um ponto a ser evidenciado é que os eosinófilos (granulação mais grosseira e mais avermelhada) não podem ser separados dos neutrófilos devido à sua semelhança de densidade. Por esse motivo a importância de se fazer uma seleção de indivíduos que não apresentem reações alérgicas com frequência, nem portadores de parasitoses intestinais.

### 3.4. Ativação celular

Com os neutrófilos devidamente separados, com viabilidade e pureza acima de 98%, foram feitas 3 alíquotas das quais uma foi para análise no citômetro de fluxo, uma para o método de redução com *Nitroblue Tetrazolium* (NBT) e outra para o processo de extração de proteínas, tendo em cada processo o controle sem ativação (quiescente – controle negativo), ativado com PMA (controle positivo) e o estimulado com fMLP.

Para a alíquota destinada à citometria de fluxo são utilizadas  $3 \times 10^5$  células para o preparo de cada situação, com leituras de 10.000 eventos. Já na extração de proteínas, utilizam-se  $3 \times 10^6$  células para produção da triplicata dos géis de cada situação. Já o método qualitativo que utiliza redução com NBT, são necessários  $4 \times 10^4$  de células para uma quadruplicata. Nos testes para avaliação de ativação como citometria e NBT é utilizado como controle positivo o PMA 100 ng/mL. O esquema abaixo mostra o destino final das alíquotas de neutrófilos com suas respectivas concentrações (Bertho; Heathcare, 2004; Pinto, 2006)

FIGURA 21. Destino das alíquotas e as concentrações de cada método utilizado.



Sabendo dos valores mínimos de rendimento pra se obter cada experimento (extração de proteínas, redução do NBT e citometria) é necessário se obter o mínimo de  $7,02 \times 10^6$  células em uma separação.

As condições de estimulação dos neutrófilos com fMLP foram baseadas em várias publicações, onde destacamos a concentração final de 100 nmol/L como a mais frequentemente utilizada (Wittmann, 2002; Krump, 1996; Le, 2002; Dewas, 2000; Zen, 2007). A confirmação dessa ativação foi realizada utilizando os métodos de redução do *Nitroblue Tetrazolium* (NBT) e citometria de fluxo (Pinto, 2006).

No preparo inicial do fMLP (Sigma F3506), baseado na concentração final de 100 nmol/L, foram feitos dois estoques. No primeiro estoque foram pesados 0,005 g de fMLP solubilizados com 1,143 mL de DMSO, ficando na concentração de 10 mmol/L. O estoque 2 foi preparado a partir de 1  $\mu$ L do estoque 1, com volume final de 1 mL na concentração de 10  $\mu$ mol/L. Esse 1 mL do estoque 2 foi dividido em 20 alíquotas de 50  $\mu$ L na concentração de 10  $\mu$ mol/L (Wittmann, 2002; Krump, 1996).

O estoque 2 é considerado a solução de trabalho utilizada na estimulação com fMLP, com o objetivo de se manter uma concentração final de 100nmol/L. A estimulação é calculada para um volume final de 500  $\mu$ L, obtido a partir de um pelet de neutrófilos 465  $\mu$ L de HBSS com cálcio e magnésio, acrescido de 30  $\mu$ L de DHR 15  $\mu$ mol/L no escuro e 5 $\mu$ L de fMLP. No momento em que se adiciona o fMLP o tempo de estimulação começa a ser cronometrado, pois as leituras dos níveis de espécies reativas de oxigênio serão feitas no tempo de 40 min (Wittmann, 2002; Krump, 1996; Wrona Patel et al, 2005).

### 3.5. Citometria de fluxo

A citometria de fluxo (FACSCalibur, BD biosciences) foi utilizada para obter a confirmação da ativação, pureza e viabilidade dos neutrófilos. Os parâmetros utilizados foram contagem final de 10.000 eventos em um fluxo baixo de aspiração utilizando lasers de 488 nm para medir tamanho celular (FSC) e granularidade (SSC), assim como para leituras de DHR com laser a 530 nm para medir a fluorescência pelo canal FL1 (Wrona Patel et al, 2005; Bertho;Li, 2003).

Após a separação bem sucedida dos neutrófilos, a alíquota destinada para a citometria de fluxo de  $9 \times 10^6$  células foi utilizadas para análise das condições quiescente

como controle negativo, ativado com PMA para controle positivo e ativado com fMLP. A análise dos gráficos obtidos na citometria são: valor da media geométrica que indica a intensidade de fluorescência e porcentagem de células ativadas.

### 3.6. Redução com Nitroblue Tetrazolium (NBT)

O teste de confirmação por meio da redução do NBT, faz com que o superóxido converta o tetrazólio incolor e solúvel em uma solução insolúvel azulada, chamada formazan, aderida na membrana e núcleo dos neutrófilos (Pinto, 2006; Peixoto, 2002).

O método utiliza lâmina, onde em cada escavação comportou uma concentração de  $1 \times 10^4$  de neutrófilos. Essa lâmina contendo neutrófilos, passou por um processo inicial de incubadas por 30 min a 37 °C com HBSS, seguido de lavagem com HBSS. Uma segunda incubação foi realizada, onde utilizou-se ativadores (fMLP e PMA) e o NBT, nas seguintes proporções: 20 µL de NBT seguido de 2,5 µL dos ativadores. Uma terceira incubação aconteceu por 20 min a 37 °C. Após essa última incubação com os ativadores, a lâmina foi lavada com HBSS e seca com ar quente seguida de fixação com metanol por 1 min. A lâmina foi seca novamente e corada com safranina por 5 min. Depois de seca estava pronta para leitura em microscópio óptico (Pinto, 2006; Peixoto, 2002).

O teste foi feito em quadruplicata de cada condição devido a disponibilidade da quantidade de escavações por lâmina, onde tivemos 4 escavações com neutrófilos quiescentes para controle negativo, 4 com neutrófilos ativados com PMA para controle positivo e 4 estimulados com fMLP. Para que ocorra esse processo é necessário um total de  $1,2 \times 10^5$  células.

### 3.7. Extração e dosagem de proteínas

As alíquotas destinadas à confecção de géis passaram por um processo de extração de proteínas que envolve tampão de lise celular com inibidor de protease 1%, nuclease 1%, DTT 1% e EDTA 1 mmol/L (Santos, 2007).

A dosagem de proteínas é feita em triplicata pelo Método de *Bradford* modificado segundo Ramagli em 1985, onde foram utilizadas concentrações diferentes de albumina bovina para obtenção de uma curva de calibração no mesmo tampão de lise. A leitura de mudança de cor é feita por meio de um espectrofotômetro com absorvância de

595 nm, e a validação do processo é feita por meio do coeficiente R acima de 0,99 (Ramagli, 1985).

Após confirmação da quantidade de proteínas contida na amostra foi calculada a diluição necessária para se obter 50 µg no volume final de 350 µL, a serem aplicados em um gel que será usado para a primeira dimensão. A estocagem das proteínas solubilizadas, quando necessária, é feita no freezer -70 °C, para evitar a degradação das proteínas a temperatura maiores (Santos, 2007).

### 3.8. Focalização Isoelétrica (primeira dimensão ou IEF)

Nessa etapa a amostra passa por um processo de separação de acordo com o ponto isoelétrico de cada proteína em um aparelho chamado *IPGphor II* (GE Healthcare). O método é iniciado com a utilização de um *IPG strip holder*, onde 350 µL da amostra previamente preparada são acrescentados no sarcófago (objeto de cerâmica do *IPGphor* moldado para o formato do *strip*), seguido com o *Dry Strip Gel* de 18cm de comprimento e faixa de pH de 4-7 (Immobiline Dry Strip, GE Healthcare; UK). A amostra passa por um processo de hidratação inicial dentro do *IPG phor* por 40 min em temperatura de 20 °C com o objetivo que o *strip* absorva uma quantidade maior da amostra antes de entrar em contato com o óleo mineral. Passado esse tempo, foram acrescentados 400 µL de óleo mineral para evitar o ressecamento do gel durante a focalização. Esse *strip* passará por reidratação total de 12 h, seguido por variações crescentes de voltagem de 500 vh, 3500 vh, 8000 vh e 40000 vh quando terminará a corrida (Healthcare, 2004). A amperagem de 75 uA é mantida como limite superior para as etapas em que se aplica voltagem e a temperatura de 20 °C é mantida constante durante todo o processo.

### 3.9. Etapa de Equilíbrio

Com o término da focalização, as proteínas contidas no *strip* vão ser reduzidas e alquiladas para que as pontes dissulfeto sejam rompidas quimicamente. Essa redução é feita primeiramente com 5 mL de DTT 1%, onde passados 15 min é retirado e acrescentados 5 mL de iodoacetamida 135 mM por mais 15 min, para a alquilação. Essa etapa tem que ser realizada no escuro, pois a iodoacetamida é um composto fotossensível, isto é, perde sua ação quando exposta a luz. (Gorg, Obermaier et al., 2000).

### 3.10. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE ou segunda dimensão)

O sistema mais utilizado para separar proteínas contidas em *strips* de gel de poliacrilamida de acordo com a massa molecular, que já passaram pela primeira etapa de focalização isoelétrica, é o *Protean II da Bio Rad Hercules*. Esse sistema foi utilizado para produzir os 18 géis referentes à triplicata dos três indivíduos em cada situação, normal e estimulado com fMLP.

Foi padronizada a confecção dos géis de poliacrilamida 12 % por ser uma malha que forneça uma boa resolução dos padrões de separação protéica esperada para neutrófilos. Cada gel possui uma dimensão de 18 cm x 20 cm x 1 mm, sendo composto pelo gel concentrador (concentrará as proteínas de forma que possibilite uma corrida alinhada) e gel separador (onde as proteínas serão de fato separadas).

#### 3.10.1. Confecção do gel e aplicação da amostra

O gel separador é composto por 16 mL de ABA (12%); 10 mL de Tris 1M em pH 8,8; 13,27 mL de água milli-Q; 400 µL de SDS 10% e PSA 10% e 17 µL de TEMED totalizando volume final de 40 mL. Já no gel concentrador temos um total de 5 mL onde temos 0,85 mL de ABA; 1,25 mL de Tris 0,5 M em pH 6,8; 2,825 mL de água milli-Q; 50 µL de SDS 10%; 25 µL de PSA 10% e 5 µL de TEMED (protocolo modificado a partir de Heathcare, 2004).

O gel foi produzido em um sistema da Bio Rad, previamente montado, entre duas placas de vidro. Primeiramente é acrescentado 40 mL de gel separador, onde ficará até que a solução polimerize. Em seguida é acrescentado aproximadamente 4 mL do gel concentrador juntamente com o pente, para que sejam formados os poços necessários para colocar o marcador molecular (mistura de proteínas com massas moleculares conhecidas) e o *strip*.

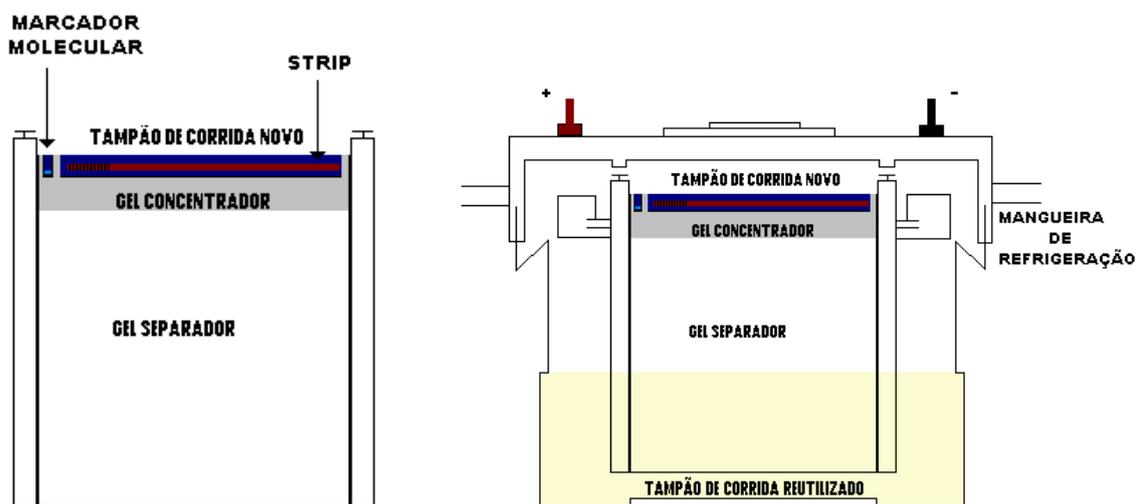
Assim que o gel concentrador estiver polimerizado, o primeiro passo é retirar o pente e aplicar 3 µL do marcador molecular no canto esquerdo do gel. Se faz necessária a vedação do poço com gel de agarose (0,17 g de agarose e azul de bromofenol para 50 mL de tampão corrida 1X) para evitar a contaminação do poço referente ao *strip*. Para colocar o *strip* no gel, foi pipetado aproximadamente 2 mL de gel de agarose no poço e com cuidado mergulhou-se o *strip* antes da polimerização da agarose. É importante que os poços estejam bem vedados com o gel de agarose, para que se mantenha o *strip* fixado e

próximo ao gel concentrador e um ambiente adequado para que ocorra a transferência das proteínas no início da corrida eletroforética.

Em seguida o sistema que contém o gel, é colocado na cuba de eletroforese contendo 2 L de tampão corrida 1X. Na parte superior das placas de vidro são acrescentados 500 mL de tampão corrida 1X novo, sendo importante a verificação desse sistema de forma que não haja vazamento do tampão corrida novo 1X e conseqüente parada da corrida.

O gel ficará overnight com a fonte programada em 500 v e amperagem de 8 mA por gel em corrente constante. Pela manhã essa amperagem pode ser alterada até no máximo 25 mA por gel, até que a corrida termine. A temperatura constante de 19 °C até o final da corrida é mantida pelo sistema de refrigeração *Multitemp II Cooling Bath da GE Healthcare*. A corrida geralmente tem duração de 12 h, sendo acompanhada pela frente de corrida indicada pelo azul de bromofenol presente do gel de agarose. A figura abaixo mostra a esquematização da montagem do gel, aplicação da amostra e o sistema da cuba eletroforética.

FIGURA 22. Esquema do Sistema *Protean II*.



### 3.10.2. Coloração do gel

Ao final da corrida eletroforética o gel é retirado do sistema *Protean II* e passa por um processo de coloração. O método escolhido foi a coloração por prata em meio

alcalino, com alta sensibilidade pois permite a visualização dos *spots* com sensibilidade de 0,1 ng de proteína(Castro, 2006).

A coloração por prata passa por 8 etapas, sendo elas: Fixador I por 1 h (95 mL de água milli-Q; 125 mL de metanol e 30 mL de TCA 100%), Fixador II por 1 h ( 104 mL de água milli-Q; 133,5 mL de etanol 93,8% e 12,5 mL de ácido acético), lavagem com 500 mL de água milli-Q por 5 min, *Stain* por 20 min ( 0,24g de NaOH 5M; 296,85 mL; 2,7g de AgNO<sub>3</sub> 20% e 3,6 mL de NH<sub>3</sub>), lavagem com 500 mL de água milli-Q por 5min, *Develop* ( 250 mL de água milli-Q; 0,0437g de ácido cítrico e 0,59 mL de formaldeído), *Stop* por 20 min (146,25 mL de água milli-Q; 80 mL de etanol 93,8%; 17,5 mL de ácido acético e 6,25 mL de glicerol) e *Wash* por 1h ( 163,75 mL de água milli-Q; 80 mL de etanol e 6,25 mL de glicerol) (Aquino, 2008).

### 3.11. Digitalização e secagem dos géis

Após a coloração, alguns critérios foram adotados para validação do gel que nos possibilite a identificação e caracterização dos *spots* que irão para a espectrometria de massa, com como por exemplo: complexidade da amostra, faixas de pH do *Dry Strip Gel* e método para visualização da separação 2-D. Outra característica importante a ser observada é a formação física da malha do gel seguindo características de *spots* como focalização e localidade, pois ela pode ser alterada pela mudança de pH das soluções (Healthcare, 2004).

Em seguida o gel é digitalizado no *scanner* modelo 53 Image Scan UMAX (GE Healthcare), padronizando a captura da imagem em 300 dpi, colorida, com alta nitidez e tamanho aproximado de 7x7 polegadas. As imagens foram gravadas em três formatos (TIFF, JPG e PSD) possibilitando utilizá-las em outros programas.

A secagem do gel é feita por meio de uma placa de vidro revestida com papel celofane e previamente identificada. O gel foi vedado entre duas folhas de papel celofane contendo solução *wash*, de forma que não forme bolhas entre o gel e o papel celofane. Após a secagem, o excesso de papel celofane é retirado delimitando o perímetro do gel e depois guardado.

### 3.12. Análise Computacional das imagens

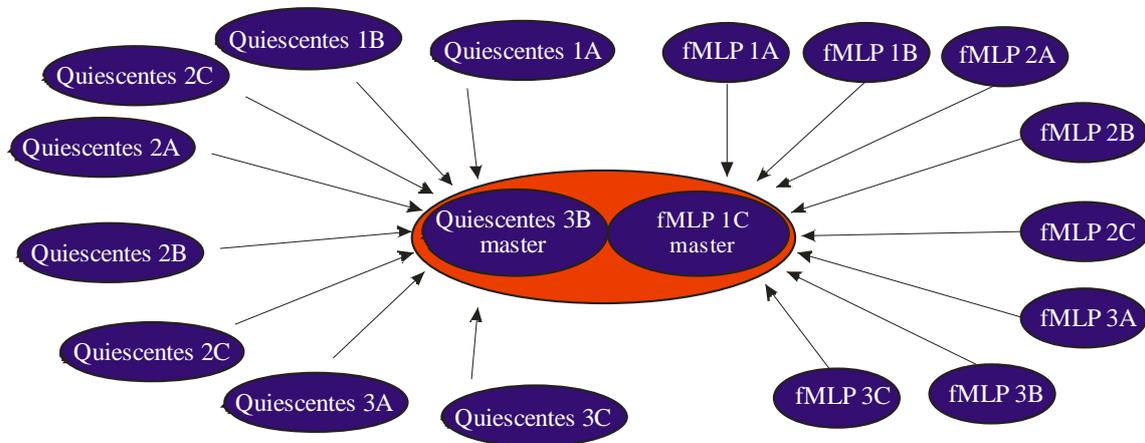
Para análise computacional das imagens digitalizadas, foi utilizado os *software Image Master Platinum versão 5 e versão 6* (GE Heathcare). Esses programas abrem as imagens no formato TIFF e são convertidas ao formato MEL, para que possamos iniciar a análise no *Image Master versão 5* (Heathcare, 2004).

Para uma posterior análise estatística confiável, as imagens foram trabalhadas em duas etapas: na primeira utilizou-se a versão 5 para detecção automática (delimitação dos *spots* de acordo com o programa) seguida de um refinamento manual. Esse refinamento manual se faz necessário para corrigir possíveis erros de detecção automática utilizando ferramentas do *software*, como por exemplo: visualização em 3D individual dos *spots* que facilita a separação ou união de mais de 1 *spot* que o programa tenha detectado erroneamente.

Na segunda etapa foi utilizado a versão 6, para fazer os pareamentos e obter parte dos dados estatísticos. Dois tipos de pareamento foram realizados: intra-classe e inter-classe, sendo as classes correspondentes às condições quiescente e ativado com fMLP, cuja análise visa detectar a variação da porcentagem do volume de cada *spot* (análise de expressão diferencial).

Inicialmente foi escolhido um gel referência, também chamado de gel master, da condição quiescente (3B) e da condição ativado com fMLP (1C) adotando dois critérios: gel com maior quantidade de proteínas e que possui uma melhor resolução dos *spots*. De início escolheu-se um gel referência ou master da condição quiescente (3B) e ativado com fMLP (1C), de acordo com a quantidade de proteínas e a resolução de gel. Depois de escolhido, o pareamento do gel referência com os demais géis dentro de uma mesma classe foi realizado, isto é, o gel referência 3B foi pareado com 1A, 1B, 1C, 2A, 2B, 2C, 3A e 3C. O segundo pareamento foi entre os géis master normal 3B e fMLP 1C, mostrado em vermelho (figura 23).

FIGURA 23. Estratégia de Pareamento



### 3.13. Análise Estatística

O programa *Image Master* 6 forneceu dados, por meio de tabelas, da porcentagem de volume de cada *spot*, de todos os géis. Esses dados foram transformados em tabelas compatíveis com o programa SPSS 13.0, sendo possível a realização dos cálculos estatísticos para avaliação da presença de proteínas em quantidades significativamente diferentes entre as duas classes.

Considerando a porcentagem de volume dos *spots* dos géis produzidos (9 géis de neutrófilos estimulados com fMLP e 9 géis de neutrófilos quiescentes) foi feito o teste de Kolmogorov-Smirnov que verificou a distribuição gaussiana. Para a realização desse teste levou-se em consideração os critérios ( $p \geq 0,05$ ) das médias dos *spots*, simetria da curva de Gauss e proporção da altura X largura da curva (Spss, 2004).

Nos casos em que a distribuição é caracterizada como normal, utilizou-se o teste t-pareado. A partir dele foi possível comprar duas variáveis, calculando primeiramente a diferença dos valores das médias entre dois casos (normal e fMLP), seguido do cálculo das médias das diferenças e do desvio padrão. Só depois foi possível obter a significância de cada cálculo realizado (Spss, 2004).

Já o Teste de Wilcoxon comparou a distribuição das duas variáveis para dados não paramétricos (quando se observou uma distribuição diferente da normal), onde o teste se baseou na posição de cada valor (denominado pelo programa como *Ranking*). Depois foi

processada a soma das posições para as condições normal e fMLP e comparados os valores obtidos (Spss, 2004)

Tanto o teste t-pareado quanto o teste Wilcoxon têm como objetivo avaliar a influência do fMLP na expressão diferencial de proteínas, sendo adotado como critério de significância  $p \leq 0,05$  (Spss, 2004).

Dois outros critérios foram adotados para consideração de expressão diferencial dos *spots*, como: a variação das médias da porcentagem do volume só foi considerada quando os valores tiveram variações de 2 vezes ou de  $\frac{1}{2}$  entre as condições e pela verificação dos *spots* presentes em pelo menos 5 géis de cada condição (Aquino, 2008; Biron, 2006).

### 3.14. Digestão de spot

A identificação das proteínas retiradas do gel 2D foi feita em dois momentos distintos. Algumas proteínas de gel de neutrófilos não ativados, gel concentrado com 300 $\mu$ g, foram identificadas em colaboração com o *Protein Research Group - Southern Denmark University*, na Dinamarca. A segunda etapa de identificação foi realizada no Laboratório de Bioquímica e Química de Proteínas da Unb, a partir de géis com 50  $\mu$ g de proteínas nas condições estimuladas com fMLP e quiescentes. Os procedimentos de confecção dos géis e digestão de *spots* foram realizados com o máximo cuidado para evitar as contaminações experimentais, tais como queratina em excesso, que possam vir a interferir durante o processo de identificação de proteínas.

Após a confecção dos géis, análise de imagens e estatística, os *spots* foram recortados e submetidos ao processo de digestão. Esse processo tem início com a exposição dos *spots* a três ciclos alternados de lavagem com água milli-Q e acetonitrila 50 % com vortex entre as trocas. A água foi retirada e acrescentou-se solução descorante composta de ferricianeto de potássio 15 mM (agente oxidante para remoção da prata) e tiosulfato de sódio 50 mM (dissolve haletos de prata) solubilizados em 1 mL de água milli-Q por aproximadamente 10 min, tempo suficiente para que o *spot* fique transparente amarelado. Depois de expostos a solução descorante, os *spots* foram lavados com 200  $\mu$ L água em vortex, até o gel ficar transparente límpido. Em seguida foram realizados três ciclos alternados de embebição com 50  $\mu$ L de bicarbonato de amônia 50 mmol/L (composto volátil com pH 8 ótimo para atuação da tripsina, retira o SDS) e 50  $\mu$ L de acetonitrila 100 % (desidrata o *spot*, retira resíduos de SDS). O *spot* foi macerado na

última lavagem com 60  $\mu\text{L}$  de acetonitrila, composto esse que facilita o processo pelo aumento da área de superfície do spot. Depois de macerado, o *ependorf* contendo o *spot*, foi para a centrífuga a vácuo por aproximadamente 20 min (*SpeedVac*), para que a amostra fique totalmente seca (Castro, M.S, et al 2006).

Passados os 20 min, o gel foi então hidratado com 10  $\mu\text{L}$  de solução gelada de tripsina (para um volume final de 50  $\mu\text{L}$  são utilizados: 25  $\mu\text{L}$  de bicarbonato de amônia 25 mM, 1,25  $\mu\text{L}$  de cloreto de cálcio 5 mM, 3,125  $\mu\text{L}$  de tripsina 0,2  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  e 20,625  $\mu\text{L}$  de água milli-Q) durante 45 min no gelo. Após esse tempo, foram adicionados aproximadamente 10  $\mu\text{L}$  do tampão de digestão (para volume final de 50  $\mu\text{L}$  são necessários: 25  $\mu\text{L}$  de bicarbonato de amônia 50 mM, 1,25  $\mu\text{L}$  de cloreto de cálcio 200 mM e 23,75  $\mu\text{L}$  de água milli-Q) , quantidade suficiente que possa cobrir o gel, sendo incubado a 37 °C (temperatura ideal para atuação da tripsina) *overnight* entre 12 e 18 h (Castro, M.S, et al, 2006).

### 3.15. Extração de peptídeos

A extração de peptídeos é um processo contínuo que segue a digestão de *spots*. O processo foi iniciado com o preparo da solução estoque e solução matriz, ambas preparadas somente na hora de usá-las. A solução estoque compreende duas matrizes utilizadas para aumentar a sensibilidade do processo de ancoramento dos peptídeos hidrofílicos (DHB) e hidrofóbicos (HCCA) na placa de *AnchorChip*. Para DHB (2,5 Dihydroxybenzoic acid – Fluka Analytical) foram pesados 20 mg/mL e misturados em 90 % de acetonitrila e 10 % de ácido trifluoroacético 0,1 %, enquanto que o HCCA (ácido alfa-ciano-4-hidroxicinâmico – Bruker Daltonics) também foi pesado 20 mg/mL e misturado em 90 % de acetonitrila e 10 % de ácido trifluoroacético 5 %. A solução matriz foi feita a partir dessa solução estoque na proporção de 5 partes de DHB do estoque para 15 partes de 90 % de acetonitrila e 10 % de ácido trifluoroacético 0,1 %. A mesma proporção foi feita para a matriz HCCA, onde se tem 90 % de acetonitrila e 10 % de ácido trifluoroacético 5 %. As duas matrizes foram unidas na proporção de 1:1 com concentração final de 5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  (Laugesen, 2003; Zhang, 2007).

Feita as matrizes, o próximo passo foi preparar as ponteiras *Gel Loader* e a microcoluna cromatográfica com fase estacionária poros R2 da *Applied Biosystems*. As ponteiras tiveram suas pontas amassadas o suficiente para que 10  $\mu\text{L}$  de água milli-Q passem em

forma de gotejamento lento. Após esse processo foram colocados 10  $\mu\text{L}$  de acetonitrila 100 % na ponteira, seguido de 1  $\mu\text{L}$  da solução com resina R2 (5 mg da resina R2 em 500  $\mu\text{L}$  de isopropanol 100 % ou acetonitrila 100 %). Foi acoplada à ponteira, até então com a resina e TFA100 %, uma seringa que injetou rapidamente a resina ao longo da ponteira de tal forma que se formou uma coluna de aproximadamente 2 cm. Um ponto muito importante durante esse processo é que a resina compactada na ponta da ponteira sempre tem que estar imersa em alguma solução para que não ocorra o ressecamento da mesma (Thingholm, et al, 2006).

Preparadas as matrizes e a ponteira *Gel Loader* com R2, a amostra que ficou overnight foi retirada da incubação a 37 °C e centrifugada por 1 minuto á 30g. Foi acrescentado 1  $\mu\text{L}$  de TFA 1% e novamente centrifugado. No momento em que a amostra for colocada na placa de *AnchorChip*, antes é preciso passar 10  $\mu\text{L}$  de TFA 1 % pela coluna poros R2 seguindo de 20  $\mu\text{L}$  de TFA0,1 %, pra só depois acrescentar toda a amostra. A amostra passou pela resina lentamente, seguida de 20  $\mu\text{L}$  de TFA0,1 %. A mistura de matrizes (2  $\mu\text{L}$ ) irá retirar a amostra aderida na resina, formando uma pequena gota, que ao ser encostada na superfície da placa, a amostra adere ao pocinho. Depois de seca ficou passível para obtenção dos espectros (Zhang, et al, 2007).

O protocolo utilizado na Dinamarca é diferente em alguns pontos do original aplicado no Brasil como: redução (DTT) e alquilação ( iodoacetamida) dos *spots*, extração dos peptídeos seguido de liofilização e ressuspensa em 20 $\mu\text{L}$  de TFA 0,1%, concentrad as e desalinizadas (lavadas com cerca de 30  $\mu\text{L}$  de TFA 0,1%) por meio da microcoluna Poros R2 ou Poros R3 (Thingholm, Jorgensen *et al.*, 2006). A amostra foi eluída da microcoluna para a placa do MALDI com cerca de 1  $\mu\text{L}$  de matriz HCCAácido -ciano-4-hidroxicinâmico em 0,1 % TFA e 70 % de acetonitrila) na concentração de 5 mg/mL (Elaine, 2008).

### 3.16. *Espectrometria de massa*

Para a obtenção dos espectros referentes aos peptídeos extraídos de neutrófilos, foi utilizado o espectrômetro de massa do tipo MALDI-TOF-TOF, modelo *Autoflex II* (Bruker Daltonics, Bremen, Germany). O *software* utilizado para obter os espectros é chamado de *Flex Control*, sendo os parâmetros ajustados para modo positivo e refletor com fonte de íons de 20 kV e faixa de massa de 800 a 3500 (m/z). O mesmo exige

calibração externa que é realizada com uma mistura padrão de peptídeos conhecidos chamada de *Pepmix* cujos calibrantes são: Angiotensina II (1046,54 Da), Angiotensina I (1296,68 Da), Substância-P (1347,73 Da), Bombesina (1619,82 Da), ACTH-CLIP (2093,08 Da), ACTH-CLIP (2465,19 Da) e Somatostatina (3147,47 Da). Após adquirir os espectros, utilizamos outro *software* para analisar os dados chamado de *Flex Analysis*. Esse *software* permite uma calibração interna automática com peptídeos conhecidos oriundos do processo de digestão de *spots*, tais como Tripsina com massas de 842,50 Da e 2211,104 Da e Queratina com massas 1179,60 Da, 1716,85 Da, 1993,97 Da, 1165,58 Da e 1707,77 Da.

Para os espectros de MS/MS foram selecionados pelo menos três peptídeos que compõem a proteína identificada por PMF e com intensidade a cima de 2000. Os peptídeos foram fragmentados pelo método *lift*, sem CID, com intensidade de *laser* na faixa de 30 a 40. Os espectros foram somados até atingir a intensidade de  $1 \times 10^4$  e uma distribuição homogênea ao longo da faixa de massa até atingir o valor do peptídeo original. Para fazer a busca da massa/carga dos espectros obtidos (*Flex Control*) e analisados (*Flex Analysis*), foi utilizado o programa *Mascot* ([www.matrixscience.com](http://www.matrixscience.com)) para realizar a busca no banco de dados NCBI (*National Center for Biotechnology*). Foram adotados parâmetros na busca das seqüências peptídicas para PMF (tolerância de desvio de massa molecular entre 50 e 100 ppm, taxonomia *Homo sapiens*, máximo de uma clivagem tríptica perdida, carbamidometilação como modificação fixa de cisteínas, oxidação de metionina e acetilação da região N-terminal como modificações variáveis) e MS/MS (tolerância de desvio de massa molecular entre 30 e 100 ppm para o peptídeo original, tolerância de massa de fragmentos entre 0,2 a 0,5 Da, taxonomia *Homo sapiens*, máximo de uma clivagem perdida, carbamidometilação como modificação constante de cisteína, oxidação de metionina e acetilação no N-terminal da proteína como modificação variável). (Elaine, 2006).

A identificação das proteínas na Dinamarca foi realizada por meio do MALDI – TOF –TOF modelo ABI4700 da Applied Biosystem. Dois métodos foram utilizados, onde o primeiro tipo MS caracterizado em modo positivo e refletor com fonte de íons 1-20 kV e faixa de massa de 700 a 4000 (m/z). A média de tiros acumulados foi de 1875 por espectro cuja intensidade do laser variou entre 2500 a 3500. O outro tipo MS/MS -1K modo positivo e refletor com fonte de íons 1-8 kV e 2-15 kV, sendo os tiros acumulados entre 2175 a 6525 com intensidade de laser variável entre 3500 a 4500. Foram escolhidos

espectros com picos intensos como critério para fragmentação do tipo CID por colisão utilizando gás argônio.

O *software Data Explore* versão 4.6 da *Applied Biosystems* possibilitou a busca das massas dos espectros e teve como banco de dados *SwissProt* versão 54.4. O programa *Mascot* foi utilizado adotando os seguintes parâmetros: significância do *score*  $p < 0,05\%$ ; taxonomia *Homo sapiens*, Carbamidometil (C) para modificação fixa; Oxidação (M) como modificação variável; número de clivagem perdida igual a 1; tolerância de massa peptídica variável entre 20 a 100 ppm ou 20 a 150 mmu.; tolerância de massa de fragmentação variável entre 25 mmu a 90 mmu. Para validar e reduzir a redundância do método foi utilizado o *software* GPMW versão 7.1. Esse programa simulou a partir das sequências protéicas de banco de dados, os possíveis pontos de clivagens trípticas e de mudanças como as pós-traducionais de forma a comparar com os dados experimentais (Elaine,2008).

### 3.16.1. Critérios de validação do PMF (*Peptide Mass Fingerprints*)

Os espectros obtidos de acordo com os parâmetros de busca selecionados para proteínas de neutrófilos, foram validados pelos seguintes critérios:

1. Similaridade da massa e pI teórica e experimental:

Ao comparar massa (vermelho) e pI (verde) do resultado obtidos a partir do pareamento das massas provenientes da digestão tríptica e a obtida no gel bidimensional, observamos uma proximidade dos valores, provavelmente pelas variações do gel bidimensional (Figura 24).

FIGURA 24. Massa e pI teórico e experimental da PML (*Promyelocytic Leukemia Protein*):

**Mascot Search Results**

**Protein View**

Match to: [gi|631331](#) Score: 69 Expect: 0.027  
PML protein, splice form 1 - human

Nominal mass ( $M_r$ ): 96645; Calculated pI value: 5.88

NCBI BLAST search of [gi|631331](#) against nr  
Unformatted [sequence string](#) for pasting into other applications

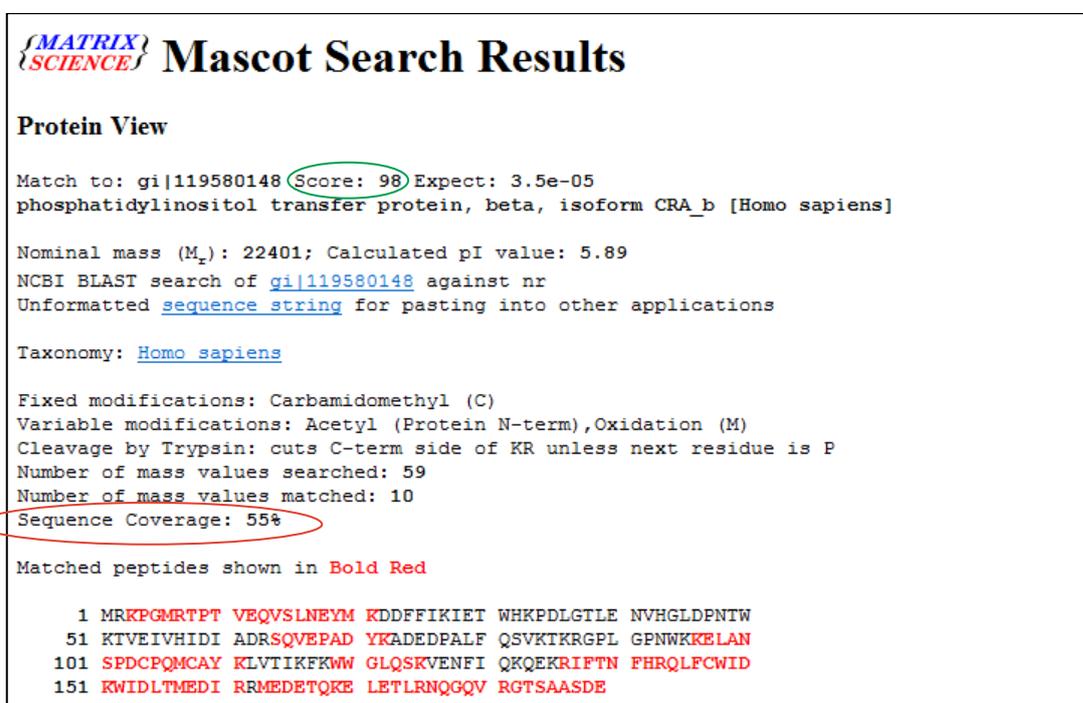
Massa molecular experimental: 96690Da; pI: 5,34



## 2. Porcentagem de cobertura da sequência da proteína:

Está relacionado com a quantidade de peptídeos experimentais pareados em relação a uma proteína teórica, configurado pela porcentagem cobertura da proteína, calculado pelo programa *Mascot*. Na figura 26 podemos visualizar a porcentagem evidenciado de vermelho.

FIGURA 26. Proteína teórica da PITPβ (mostrando a cobertura de 55%).



**Mascot Search Results**

**Protein View**

Match to: gi|119580148 (Score: 98) Expect: 3.5e-05  
phosphatidylinositol transfer protein, beta, isoform CRA\_b [Homo sapiens]

Nominal mass ( $M_r$ ): 22401; Calculated pI value: 5.89  
NCBI BLAST search of gi|119580148 against nr  
Unformatted [sequence string](#) for pasting into other applications

Taxonomy: [Homo sapiens](#)

Fixed modifications: Carbamidomethyl (C)  
Variable modifications: Acetyl (Protein N-term), Oxidation (M)  
Cleavage by Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P  
Number of mass values searched: 59  
Number of mass values matched: 10  
Sequence Coverage: 55%

Matched peptides shown in **Bold Red**

```
1 MRKPGMRTPT VEQVSLNEYM KDDFFIKIET WHKPDLGTL E NVHGLDPNTW
51 KTVEIVHIDI ADRSQVEPAD YKADEDPALF QSVKTKRGPL GPNWKKELAN
101 SPDCPQMCA Y KLVTIKFKWW GLQSKVENFI QKQEKRIPTN FHRQLFCWID
151 KWIDLTME DI RRMEDETQKE LETLRNQGQV RGTSAASDE
```

## 3. Score – PMF

O *software Mascot* realiza uma primeira pesquisa que compara as massas dos peptídeos calculados para cada entrada no banco de dados com um conjunto de dados experimentais, chamado *Mowse*. Cada valor calculado que cai dentro de uma tolerância determinada de massa e um valor experimental é considerado como um *match* (Pappin, 1993).

Depois que essa pesquisa dos valores da massa experimental contra a massa de peptídeos de um banco de dados é calculada, obtém-se a probabilidade baseada no *score mowse* (figura 30).

Para se obter um *score* no limiar da significância padrão ( $p < 0,05$ ) o valor da expectativa também é de 0,05. Sendo assim quanto maior o *score* calculado, maior será a probabilidade da proteína proposta, e menor a significância padrão. Podemos observar na figura 26, o *score* da proteína PITP $\beta$  evidenciado de verde.

#### 4. Número de clivagens perdidas

Esse tipo de avaliação é feita de forma manual, observando os dados fornecidos pelo *Mascot*, como:

##### 4.1. Perda de clivagem coerente:

A tripsina atua clivando no C-terminal dos resíduos de lisina (K) ou arginina (R). Clivagens perdidas são observadas em regiões que contenham resíduos de prolina (P), (cor verde), resíduos de aminoácidos ácidos como ácido glutâmico (E) e ácido aspártico (D) adjacentes aos sítios de clivagens e repetições de K ou R consecutivas. A presença do resíduo de prolina impede a clivagem triptica, porém ainda não se sabe qual a característica dessa aminoácido que justifica a inibição da tripsina. A presença desses aminoácidos ácidos dificulta a clivagem por tripsina, por acidificar a região, pois o sítio catalítico da tripsina depende da característica básica do substrato para ligação (Rodriguez, 2007). A figura 25 mostra a proteína *Vimentin* e as regiões que tiveram perda de clivagens próximas de Prolina (sublinhado em preto) e próximas de ácido aspártico ou glutâmico (cor amarela).

FIGURA 27. Análise dos peptídeos identificados de *Vimentin*.

Start - End	Observed	Mr (expt)	Mr (calc)	ppm	Miss	Sequence
29 - 36	914.4354	913.4281	913.4505	-24	0	R.SYVTTSTR.T
37 - 50	1495.7976	1494.7903	1494.7790	8	0	R.TYSLGSAIRPSTR.S
51 - 64	1428.7555	1427.7482	1427.7045	31	0	R.SLYASSPGGVYATR.S
79 - 97	2126.0711	2125.0638	2125.0579	3	0	R.LLQDSVDFSLADAINTEFK.N
105 - 113	1115.4916	1114.4843	1114.5618	-70	0	K.VELQELNDR.F
114 - 120	870.4908	869.4836	869.4283	64	0	R.FANYIDK.V
114 - 122	1125.5145	1124.5072	1124.5978	-81	1	R.FANYIDKVR.F
144 - 155	1497.8325	1496.8252	1496.6929	88	1	K.SRLGDLVEEEMR.E
146 - 155	1270.6472	1269.6399	1269.5547	67	0	R.LGDLYEEEMR.E Oxidation (M)
160 - 168	1060.4702	1059.4630	1059.5197	-54	0	R.QVDQLTNDK.A
176 - 184	1076.5616	1075.5543	1075.4968	54	0	R.DNLAEIDMR.L
176 - 186	1345.6211	1344.6138	1344.6819	-51	1	R.DNLAEIDMLR.E
187 - 196	1319.6687	1318.6615	1318.6551	5	1	R.EKLQEMLQR.E Oxidation (M)
189 - 207	2366.9823	2365.9750	2366.1172	-60	1	K.LQEEMLQREEAENTLQSFRR.Q Oxidation (M)
208 - 217	1088.5921	1087.5849	1087.5258	54	0	R.QVDNALSAR.L
271 - 282	1393.8063	1392.7990	1392.6997	71	1	R.DVRQQYESVAAK.N
293 - 304	1308.6824	1307.6751	1307.6469	22	1	K.SKPADLSEAANR.N
295 - 304	1093.5368	1092.5295	1092.5200	9	0	K.PADLSEAANR.N
305 - 313	1029.5984	1028.5911	1028.5363	53	1	R.NNDALRQAK.Q
335 - 342	905.4096	904.4024	904.4250	-25	0	K.GTNESLER.Q
335 - 345	1320.6259	1319.6186	1319.6252	-5	1	K.GTNESLERQMR.E
391 - 401	1311.6571	1310.6498	1310.6540	-3	0	K.MALDIEIATYR.K Oxidation (M)
403 - 410	932.4165	931.4092	931.4610	-56	0	K.LLEGEESR.I
411 - 424	1570.8916	1569.8843	1569.8878	-2	0	R.ISLPLPNFSSLNLR.E
451 - 466	1836.8209	1835.8136	1835.7922	12	0	R.DGQVINETSQHDDLE.-

#### 4.2. Confirmação de clivagens perdidas:

Além da confirmação por clivagens coerentes, também confirmamos a clivagem perdida pela presença da mesma sequência com a clivagem correta (mostrado na figura 27, em azul). Dessa forma, a presença de clivagens perdidas coerentes associadas à presença das formas clivada e não clivada validam a identificação por PMF.

#### 5. Confirmação da oxidação e acetilação

Com base nos peptídeos identificados de CLIC-1 (figura 28), podemos observar uma sequência oxidada e acetilada (preto), mostrada pelo *Mascot* e confirmadas com o aparecimento da mesma sequência sem a oxidação (amarelo) e outra sem acetilação (azul).

Sendo assim, a presença de ambas as formas (modificada e não modificada) para os casos citados acima valida a identificação.

FIGURA 28. Peptídeos identificados de CLIC 1 (oxidação e acetilação).

Start - End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	ppm	Miss	Sequence
1 - 13	1605.8049	1604.7976	1604.7756	14	0	-M <del>A</del> E <del>E</del> Q <del>P</del> Q <del>V</del> E <del>L</del> F <del>V</del> K <del>.</del> A Acetyl (Protein N-term); Oxidation (M)
1 - 20	2150.0597	2149.0524	2149.0361	8	1	-M <del>A</del> E <del>E</del> Q <del>P</del> Q <del>V</del> E <del>L</del> F <del>V</del> K <del>A</del> G <del>S</del> D <del>G</del> A <del>K</del> .I Oxidation (M)
2 - 13	1458.6963	1457.6890	1457.7402	-35	0	M <del>A</del> E <del>E</del> Q <del>P</del> Q <del>V</del> E <del>L</del> F <del>V</del> K <del>.</del> A Acetyl (Protein N-term)
38 - 50	1437.7348	1436.7275	1436.7624	-24	1	K.GVTENVTVDTKR.R
139 - 166	3048.7009	3047.6936	3047.4571	78	1	K.VLDNYLTSPLPEGVDETS <del>A</del> E <del>D</del> E <del>G</del> V <del>S</del> Q <del>R</del> K.F
184 - 192	1095.5657	1094.5584	1094.6270	-63	0	K.LHIVQV <del>C</del> K.K
196 - 204	1037.5206	1036.5133	1036.5342	-20	0	R.GFTIPEAF <del>R</del> .G

### 3.16.2. Critérios de validação por MS/MS

Proteínas cuja identificação por PMF deixa dúvidas em relação à validação podem ser confirmadas pela identificação de trechos de sequência de alguns de seus peptídeos.

O pico mais intenso do espectro de PMF dos peptídeos experimentais são os candidatos mais comuns para a fragmentação. Critérios são adotados para a escolha desses picos, como: resolução do pico monoisotópico e distância mínima de aproximadamente 20Da entre picos intensos.

Depois que o pico mais significativo foi escolhido, fragmentado e realizado a busca, o banco de dados forneceu uma série de proteínas candidatas (figura 29) e um gráfico de identificação (figura 30). Um exemplo de busca que representa a fragmentação foi da escolha do peptídeo 1570 Da da proteína já identificada pelo PMF da *Vimentin*.

FIGURA 29. Proteínas candidatas.

```

1. gi|340219 Mass: 53738 Score: 71 Queries matched: 1
   vimentin [Homo sapiens]
 Check to include this hit in error tolerant search

Query   Observed   Mr(expt)   Mr(calc)   ppm   Miss   Score   Expect   Rank   Peptide
  1    1570.8916  1569.8843  1569.8878  -2.24  0      71      1.2e-07  1      R.ISLPLPNFSSLNLR.E

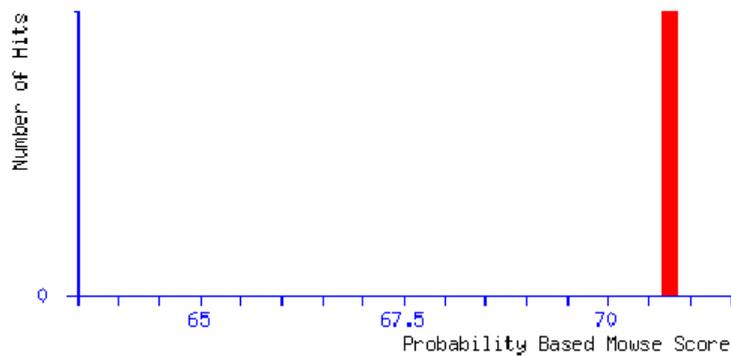
Proteins matching the same set of peptides:
gi|340234 Mass: 35089 Score: 71 Queries matched: 1
vimentin [Homo sapiens]
gi|5030431 Mass: 41651 Score: 71 Queries matched: 1
vimentin [Homo sapiens]
gi|16552261 Mass: 47516 Score: 71 Queries matched: 1
unnamed protein product [Homo sapiens]
gi|21757045 Mass: 52463 Score: 71 Queries matched: 1
unnamed protein product [Homo sapiens]
gi|47115317 Mass: 53604 Score: 71 Queries matched: 1
VIM [Homo sapiens]
gi|62414289 Mass: 53676 Score: 71 Queries matched: 1
vimentin [Homo sapiens]
gi|62896523 Mass: 53708 Score: 71 Queries matched: 1
vimentin variant [Homo sapiens]
gi|167887751 Mass: 49680 Score: 71 Queries matched: 1
vimentin variant 3 [Homo sapiens]

```

FIGURA 30. Histograma de identificação. Probabilidade baseada no score calculado a partir do *Mowse*.

### Probability Based Mowse Score

Ions score is  $-10 \cdot \log(P)$ , where P is the probability that the observed match is a random event. Individual ions scores  $> 14$  indicate identity or extensive homology ( $p < 0.05$ ). Protein scores are derived from ions scores as a non-probabilistic basis for ranking protein hits.



De acordo com essa fragmentação, foram obtidas as séries Y e B. Essas séries são formadas a partir da quebra da ligação peptídica, deixando expostas a região C-terminal (série Y) e N-terminal (série B). As massas encontradas nas duas séries confirmam a sequência (figura 32).

FIGURA 31. Espectro de massa após a fragmentação.

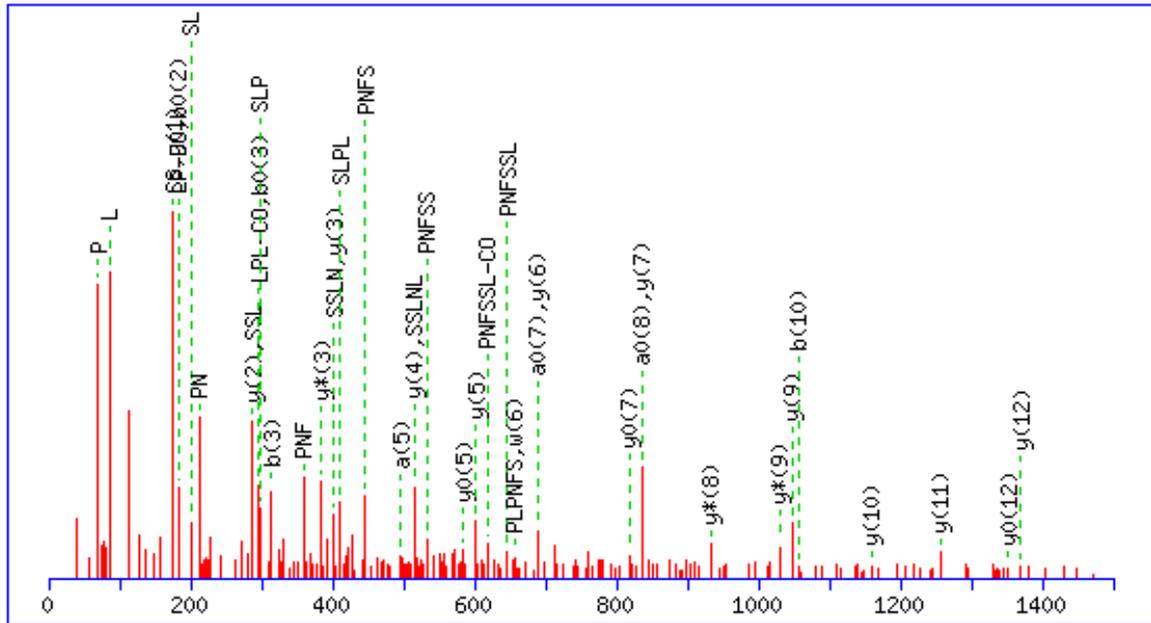


FIGURA 32. Séries Y e B

#	Immon.	a	a*	a <sup>0</sup>	b	b*	b <sup>0</sup>	Seq.	v	w	y	y*	y <sup>0</sup>	#
1	86.0964	86.0964			114.0913			I						14
2	60.0444	173.1285		155.1179	201.1234		183.1128	S	1425.7849	1424.7896	1457.8111	1440.7845	1439.8005	13
3	86.0964	286.2125		268.2020	314.2074		296.1969	L	1312.7008	1311.7056	1370.7791	1353.7525	1352.7685	12
4	70.0651	383.2653		365.2547	411.2602		393.2496	P	1215.6480	1214.6528	1257.6950	1240.6684	1239.6844	11
5	86.0964	496.3493		478.3388	524.3443		506.3337	L	1102.5640	1101.5687	1160.6422	1143.6157	1142.6317	10
6	70.0651	593.4021		575.3915	621.3970		603.3865	P	1005.5112	1004.5160	1047.5582	1030.5316	1029.5476	9
7	87.0553	707.4450	690.4185	689.4345	735.4400	718.4134	717.4294	N	891.4683	890.4730	950.5054	933.4789	932.4948	8
8	120.0808	854.5135	837.4869	836.5029	882.5084	865.4818	864.4978	F	744.3999		836.4625	819.4359	818.4519	7
9	60.0444	941.5455	924.5189	923.5349	969.5404	952.5138	951.5298	S	657.3678	656.3726	689.3941	672.3675	671.3835	6
10	60.0444	1028.5775	1011.5510	1010.5669	1056.5724	1039.5459	1038.5619	S	570.3358	569.3406	602.3620	585.3355	584.3515	5
11	86.0964	1141.6616	1124.6350	1123.6510	1169.6565	1152.6299	1151.6459	L	457.2518	456.2565	515.3300	498.3035		4
12	87.0553	1255.7045	1238.6779	1237.6939	1283.6994	1266.6729	1265.6888	N	343.2088	342.2136	402.2459	385.2194		3
13	86.0964	1368.7886	1351.7620	1350.7780	1396.7835	1379.7569	1378.7729	L	230.1248	229.1295	288.2030	271.1765		2
14	129.1135							R	74.0237	73.0284	175.1190	158.0924		1

A figura 32 é a representação das séries Y (azul), B (amarelo) e a presença de imônios (verde). Os parâmetros de fragmentação visam obter quebra da sequência na ligação peptídica apresentando massas das séries y e b, facilitando a identificação do peptídeo. Nessa figura a maioria dos aminoácidos são encontrados na série Y, sendo confirmadas por algumas na série B (sequências em vermelho). Já a presença de imônios, vem a confirmar a presença de determinados aminoácidos.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. *Separação de neutrófilos*

Ao final do processo de separação foram obtidos neutrófilos viáveis com viabilidade e pureza acima de 98% e rendimento de  $7,02 \times 10^6$ , neutrófilos suficientes para realizar os experimentos referente a um indivíduo (extração de proteínas, citometria e NBT). Durante o processo de separação é importante evidenciar que o HBSS utilizado durante a separação de neutrófilos não pode conter cálcio, pois os neutrófilos ficam mais sensíveis à ativação. As etapas de avaliações quantitativas e qualitativas após a separação são fundamentais para a continuidade do teste (Santos, 2007; Lee, 2002).

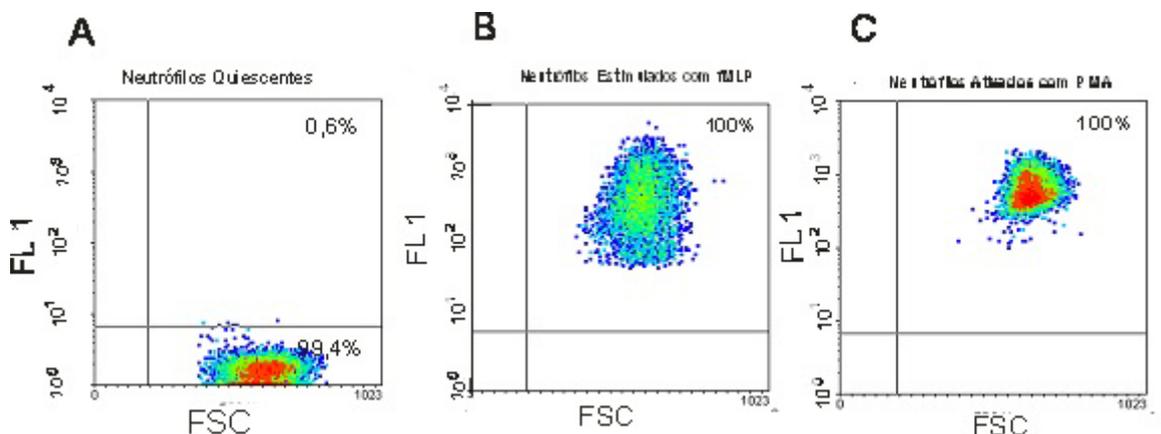
A seleção dos indivíduos é essencial para se obter neutrófilos viáveis para análise proteômica, tendo em vista que a integridade e estado de ativação *in vivo* depende de alguns aspectos como sexo, condições fisiológicas e patológicas (doenças crônicas, alérgicas e infectocontagiosa). Por isso um dos critérios mais rigorosos é a seleção de pessoas que não passaram por doenças alérgicas e nem sejam acometidas por verminose, pois os níveis de eosinófilos são altos nesses casos, o que vem a interferir na pureza da amostra tendo em vista que a densidade dessas células estejam muito próximas a densidade dos neutrófilos (Kjellen et al, 1978).

### 4.2. Ativação dos neutrófilos com fMLP

Depois da separação, três alíquotas foram separadas onde uma foi destinada a extração de proteínas e duas para testes de avaliação da ativação dos neutrófilos, confirmando o sucesso na ativação. Foram utilizados para controle positivo PMA 100 ng/mL e para controle negativo neutrófilos quiescentes, assim como o fMLP 100 nmol/L para presente estudo (Krump, 1996).

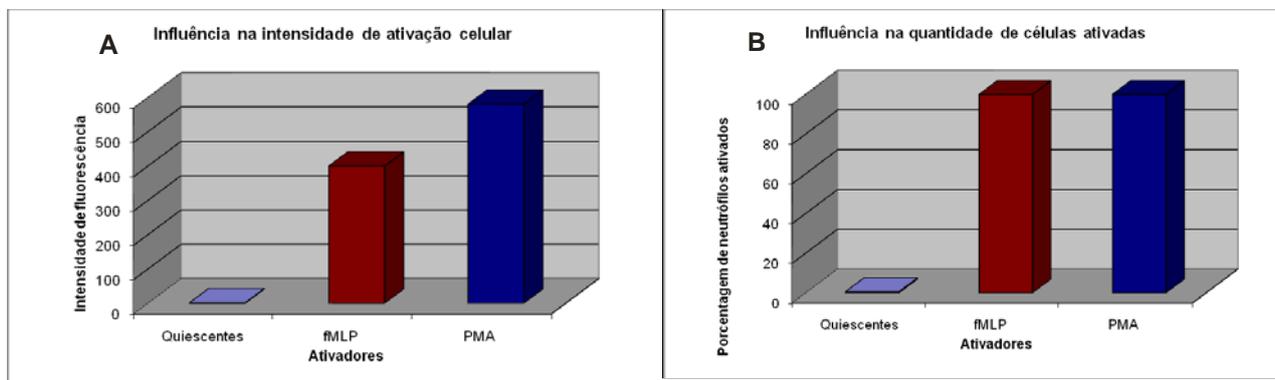
A ativação dos neutrófilos foi avaliada por citometria de fluxo, onde foram analisadas  $9 \times 10^5$  células, comparando-se as situações quiescente (controle negativo), PMA (controle positivo) e fMLP (condição a ser testada). A análise de SSC e FSC revelou o aumento de tamanho celular e da quantidade de grânulos enquanto a análise de FL1 revelou o aumento na detecção de 1,2,3 rodamina (produto da oxidação do 1,2,3 DHR na presença de peróxido de hidrogênio intracelular).

FIGURA 33. Gráfico dos testes de citometria de fluxo. Detecção de 1,2,3 rodamina pelos canais FL1. Neutrófilos quiescentes (A); Neutrófilos ativados com fMLP (B). Neutrófilos ativados com PMA (C).



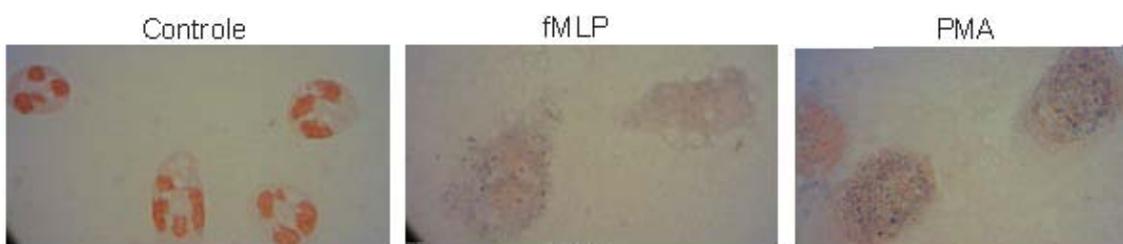
A figura 33 mostra a concentração de peróxido de hidrogênio em neutrófilos quiescentes, ativados com fMLP e PMA na presença de cálcio. Segundo Wrona e colaboradores os níveis de detecção da 1,2,3 rodamina são proporcionais a quantidade de peróxido de hidrogênio produzido pelos neutrófilos ativados. De acordo com o gráfico, no estado não ativado (quiescente) a produção é basicamente nula sendo representado por 99,4 %, enquanto que ativados com PMA uma super produção de peróxido de hidrogênio atingiu 100 % dos neutrófilos alcançando um patamar ativado próximo de  $10^4$  de intensidade de 1,2,3 rodamina captada. Já a utilização de fMLP 100 nmol/L confere características de estimulação dos neutrófilos onde 100% das células estão ativadas, porém a intensidade de produção de peróxido de hidrogênio é menor, alcançando um patamar próximo de  $10^3$ . Essa diferença de estimulação e ativação pode ser observada na tabela 4, onde todos os neutrófilos foram ativados (fMLP e PMA), porém tiveram respostas diferentes quanto a intensidade de 1,2,3 rodamina captada. Muitos autores denominaram esse estado de estimulação como *priming* (Cassatella, 2003).

TABELA 34. Influência do estímulo por fMLP na intensidade de ativação celular (A) e na quantidade de células ativadas (B).



A ativação celular também foi confirmada utilizando-se um método qualitativo chamado NBT (é necessário cerca de  $1,2 \times 10^5$  neutrófilos). Esse teste tem como princípio a redução do tetrazoluim (solúvel em água e incolor) em formazan (insolúvel em água e azul), na presença de superóxido produzido por neutrófilos ativados. A característica principal é a presença de formazan citoplasmático.

FIGURA 35. Fotos de lâminas de neutrófilos pelo método NBT. Neutrófilos quiescentes como controle negativo (ausência de pigmentos azuis), neutrófilos ativados por fMLP (pouco pigmentos azuis intracitoplasmáticos) e neutrófilos ativados com PMA (grande quantidade de pigmentos azuis intracitoplasmáticos).



A quantidade de pigmentos azuis espalhados pelo citoplasma caracteriza a presença de superóxido, que de acordo com a intensidade do estímulo podem estar em menor ou maior quantidade. A figura 35 mostra o controle, onde se observam neutrófilos íntegros e ausência de formazan. A ativação com PMA foi utilizada como controle positivo nos dois testes, onde foi observada a super produção de superóxidos com a detecção de 1,2,3 rodamina na citometria e a presença de grande quantidade de

formazan insolúvel no citoplasma do neutrófilo no teste do NBT. A detecção de pigmentos insolúveis de formazan depois da ativação com 100 nmol/mL de fMLP, foi menor que em neutrófilos ativados com PMA, levando a especulação que essa concentração de fMLP promove a estimulação dos neutrófilos (Pinto, 2006; Peixoto, 2002, Wittmann, 2002).

A maior alíquota foi para a extração de proteínas (próximo de  $6 \times 10^6$  neutrófilos), onde foi utilizado tampão de lise e enzimas com nuclease e inibidor de proteases. Depois desse processo foi feita a quantificação das proteínas pelo método de Bradford modificado, onde a partir dessa quantificação as proteínas foram destinadas a confecção de géis em triplicata biológica.

#### *4.3. Produção dos Géis Bidimensionais*

A produção dos géis foi baseada no livro *Electrophoresis Principles and Methods* (Healthcare, 2004) e adaptado para proteínas de neutrófilos, de forma que se obteve mapas proteômicos reprodutíveis que facilitaram a posterior análise das imagens. Foram preparados dois tipos de géis, como mostrado nas figuras 36 e 37, um a partir de 50 µg de proteínas e outro de 300 µg de proteínas.

FIGURA 36. Gel de proteínas de neutrófilos ativados com fMLP (50 $\mu$ g).

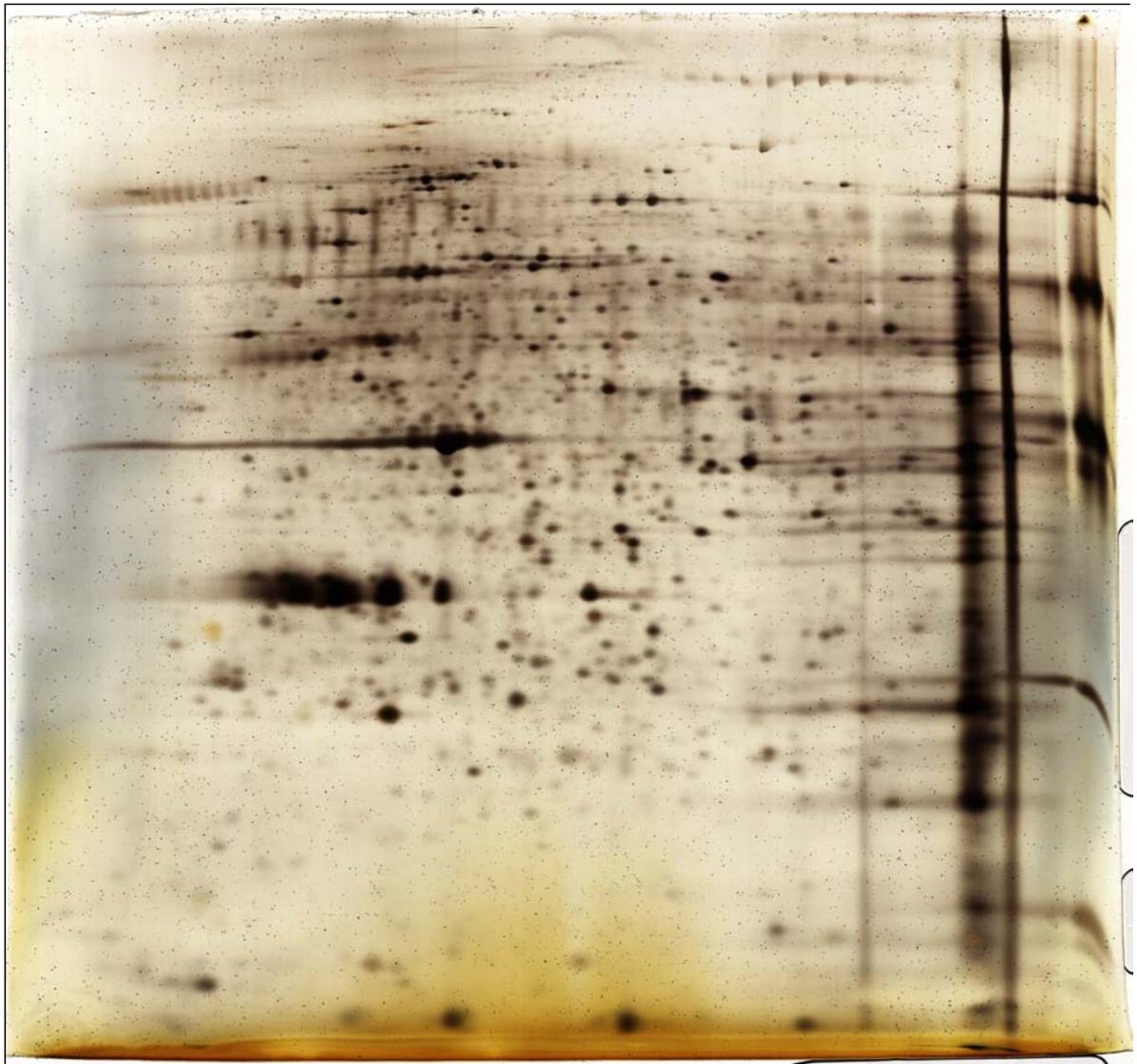
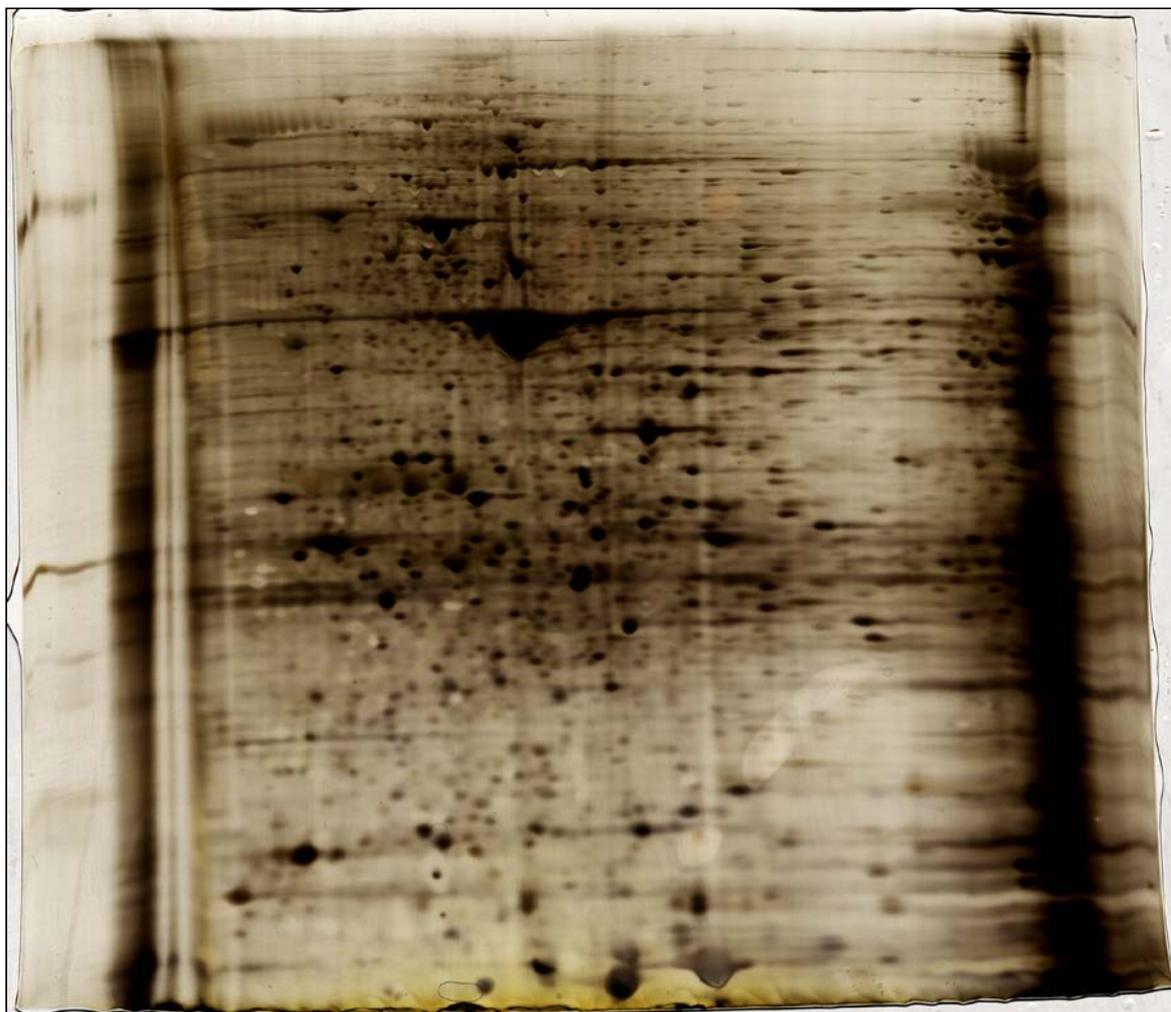


FIGURA 37. Gel de proteínas de neutrófilos quiescentes (300 $\mu$ g).



A quantidade estipulada de 50  $\mu$ g de proteínas foi padronizada para todos os géis produzidos em outros projetos da linha de pesquisas sobre proteômica de neutrófilo, pelo fato de apresentarem uma boa quantidade de *spots* detectáveis (cerca de 1500) de forma que esses não se agrupem e se consiga uma boa resolução para que a maioria dos *spots* contenha uma única proteína detectável tanto na análise de imagens quanto por espectrometria de massa. As seis triplicatas (3 triplicatas da condição quiescente e 3 triplicatas da condição ativada com fMLP) foram feitas com 50  $\mu$ g de proteínas. Já o gel contendo 300  $\mu$ g foi utilizado para aumentar a quantidade de cópias de uma mesma proteína com o objetivo de aumentar a possibilidade de se identificar a proteína em questão por espectrometria de massa. Por outro lado, seria inviável pelo fato de diminuir a resolução, aumentando a probabilidade de ocorrer mistura de proteínas em um mesmo *spot* e dificultando o pareamento com o gel de 50  $\mu$ g de

proteínas. Com o gel de 300 µg foi possível a identificação de 65 proteínas em colaboração com a *Protein Research Group Southern Denmark University*, na Dinamarca. No Laboratório de Bioquímica, o grupo de pesquisas conseguiu adaptar um protocolo viável para identificações de proteínas de neutrófilos usando gel com 50 µg, sendo algumas delas mostradas no presente trabalho.

#### 4.4. Análise dos géis

Através do programa *Image Master 5 e 6* foi possível detectar e parear todos os 18 géis referente às triplicatas biológicas (3 indivíduos diferentes) e triplicatas experimentais (3 géis por indivíduo) nas duas condições (normal e fMLP), assim como fazer a média do volume normalizado ( $v$ ) de cada *spot*. A tabela contendo os dados das médias foi transferida para o programa estatístico SPSS® 13.0 para a aplicação dos testes de Kolmogorov-Smirnov (distribuição gaussiana), Wilcoxon (dados não-paramétricos) e teste t-pareado (distribuição normal).

Depois que os dados de cada *spot* passaram pelo programa estatístico, foram adotados mais alguns critérios como: nível de significância estatística de  $p \leq 0,05$ , razão das médias por volume normalizado de cada *spot* com variações  $v \geq 2$  ou  $v \leq 0,5$  entre as condições e presença do *spot* em mais de cinco géis de cada condição (Biron, 2006).

Segundo Biron (Biron, 2006) o *spot* deve ser considerado exclusivo quando aparecer em mais de 5 géis em uma condição, porém não pode aparecer em nenhum gel da outra condição. Por exemplo: para um *spot* ser considerado exclusivo de quiescente é preciso aparecer no mínimo em 5 géis dos 9 produzidos e não aparecer em nenhum dos 9 géis da condição fMLP (Tabela 6). O mesmo acontece com os *spots* exclusivos da condição fMLP (Tabela 5).

TABELA 5. *Spots* exclusivos de fMLP (*spots* identificados em vermelho). Os números representam a numeração dos *spots* feita pelo *Image Master*.

<i>Spots</i> presentes em cinco géis				
162	418	679	1395	1597
228	419	777	1400	1634
279	522	910	1423	1646
281	524	942	1519	1660
290	562	1279	1532	1806
350	627	1371	1540	1857
386	665	1391	1541	

<b>Spots presentes em seis géis</b>				
193	404	951	1560	1766
218	441	1019	1567	1861
250	452	1262	1571	1878
266	453	1284	1693	1880
278	561	1313	1630	
288	746	1314	1677	
<b>Spots presentes em mais de sete géis</b>				
443 (8)	633 (7)	696 (8)	1581 (7)	
413 (7)	666 (7)	981 (7)	1587 (8)	
609 (7)	669 (8)	1300 (7)	1595 (8)	
622 (7)	685 (8)	1372 (8)	1765 (7)	

TABELA 6. *Spots* exclusivos de quiescente. Os números representam a numeração dos *spots* feita pelo *Image Master*.

102	572	777	981	1088	1242	1302	1338	1406	1457	1517
163	607	800	987	1090	1246	1306	1344	1407	1458	1520
200	610	807	991	1101	1254	1308	1348	1408	1459	1531
210	663	816	994	1118	1255	1310	1358	1409	1470	1536
223	704	822	996	1131	1256	1311	1360	1423	1476	1537
323	709	840	997	1138	1260	1315	1368	1430	1486	1541
368	723	878	1012	1140	1283	1317	1374	1435	1488	1551
373	743	883	1016	1178	1286	1319	1385	1436	1489	1552
426	751	891	1013	1183	1289	1322	1386	1438	1490	1563
459	763	892	1038	1188	1271	1323	1390	1443	1496	1568
492	764	906	1967	1219	1273	1331	1396	1446	1505	1574
495	770	932	1068	1220	1281	1332	1398	1447	1512	1579
509	774	939	1069	1231	1290	1334	1400	1450	1513	1680
523	776	968	1074	1233	1330	1337	1405	1452	1514	1702

Conforme esse critério de Biron os *spots* exclusivos foram obtidos através da comparação interclasses dos géis de neutrófilos quiescentes e ativados com fMLP, onde foram observados 157 *spots* exclusivos para condição quiescente sendo 3 identificados (1360, 1398 e 1574) e 77 *spots* exclusivos para a condição fMLP sendo 7 identificados (443, 452, 942, 1371, 1372, 1634 e 1660) cujas identificações podem ser vistas nas tabelas 5 e 6 evidenciadas em vermelho.

Já a caracterização dos *spots* com expressão diferencial foi validada por três critérios: 1) presença do *spot* em mais de 5 géis em cada condição (Quiescentes/fMLP); 2) significância estatística com  $p \leq 0,05$ ; 3) razão das médias de volume normalizado com variações  $\geq 2$  com expressão diminuída para fMLP e  $v \leq 0,5$  com expressão

aumentada para fMLP. Foram considerados presentes em quantidades diferentes nas duas situações os *spots* que passaram por todos os critérios citados, sendo representados nas tabelas 7 (expressão diminuída para fMLP) e 8 (expressão aumentada para fMLP).

TABELA 7. *Spots* com expressão diminuída para fMLP ( $v \geq 2$ ) que passaram em todos os testes estatísticos. Os *spots* que estão evidenciados em verde foram identificados por espectrometria de massa. N<sup>o</sup>Match é o número do *spot* do gel *Master* que parecia com outros géis.

Match ID	Razão das médias $v \geq 2$	Significância Estatística $P \leq 0,05$	Presença em géis Quiescentes/fMLP
125	5,78	0,017	8/5
126	3,70	0,050	7/5
139	3,16	0,036	6/5
152	3,90	0,045	7/5
165	2,05	0,051	7/6
216	2,43	0,007	6/9
266	2,02	0,036	8/8
325	7,49	0,049	5/9
434	2,06	0,050	7/5
579	2,48	0,005	9/9
582	7,22	0,008	9/5
617	2,97	0,046	7/5
631	2,76	0,002	9/8
675	2,23	0,040	9/7
711	2,19	0,029	5/8
747	11,57	0,036	8/6
752	4,09	0,023	9/6
927	4,20	0,028	8/5
970	3,04	0,050	8/5
1066	2,09	0,002	8/6
1161	2,52	0,021	9/5
1174	2,32	0,015	8/5
1179	3,78	0,002	9/7
1207	1,96	0,001	9/6
1285	2,18	0,025	9/7
1327	2,12	0,032	8/5
1620	3,00	0,041	8/6
1676	2,12	0,028	7/5

TABELA 8. *Spots* com expressão aumentada para fMLP ( $v \leq 0,5$ ) que passaram em todos os testes estatísticos.

Match ID	Razão das médias $v \leq 0,5$	Significância Estatística $P \leq 0,05$	Presença em géis Quiescentes/fMLP
303	0,23	0,015	5/7
476	0,48	0,013	6/8
<b>521</b>	<b>0,50</b>	<b>0,005</b>	<b>9/9</b>
598	0,30	0,050	5/7
657	0,17	0,050	5/6
710	0,33	0,008	6/9
716	0,42	0,043	5/7
719	0,40	0,003	8/9
720	0,34	0,003	6/8
<b>741</b>	<b>0,38</b>	<b>0,042</b>	<b>6/8</b>
775	0,42	0,003	7/9
814	0,13	0,011	7/9
855	0,49	0,035	7/9
895	0,37	0,036	7/9
961	0,43	0,040	8/9
<b>982</b>	<b>0,39</b>	<b>0,032</b>	<b>6/7</b>
993	0,47	0,038	6/9
1030	0,13	0,001	7/8
1032	0,50	0,028	9/9
1054	0,26	0,002	8/9
1124	0,39	0,049	7/9
1237	0,25	0,008	5/9
1335	0,14	0,003	5/9
1527	0,45	0,038	5/8
1698	0,33	0,038	5/9
1707	0,14	0,000	5/9

O resultado da verificação desses critérios citados anteriormente mostrou que 28 *spots* tiveram expressão diminuída para condição fMLP, onde dois (216 e 582) foram identificados (*spots* em verde na tabela 7) e 26 *spots* tiveram expressão aumentada para fMLP resultando na identificação de três *spots* (521, 741 e 982) (*spots* em azul na tabela 8).

Outros *spots* passaram pelo teste de significância estatística com  $p \leq 0,005$ , razão das médias por volume normalizado com variações  $v \geq 2$  com expressão diminuída para fMLP e  $v \leq 0,5$  com expressão aumentada para fMLP, porém não estavam presentes em mais de 5 géis de cada condição. Esses *spots* estão sendo mostrados nas tabelas 9

(spots com expressão diminuída) e 10 (spots com expressão aumentada), com as respectivas características estatísticas.

TABELA 9. Spots com expressão diminuída para fMLP que não passaram pelo teste de quantidade de spot por gel.

Match ID	Razão das médias $P \geq 2$	Significância Estatística $P \leq 0,05$	Presença em géis Quiescentes/fMLP
189	6,53	0,025	6/3
192	5,79	0,038	6/4
238	5,43	0,043	8/3
249	10,25	0,012	8/2
330	4,79	0,036	7/3
433	7,52	0,028	6/2
487	3,21	0,028	6/4
544	9,94	0,036	7/3
569	13,70	0,028	6/2
680	2,16	0,038	9/4
1001	13,04	0,008	9/2
1073	4,98	0,028	7/4
1136	6,40	0,011	9/3
1307	11,64	0,008	9/3
1326	2,32	0,050	8/4
1501	2,66	0,043	7/4

TABELA 10. *Spots* com expressão aumentada para fMLP que não passaram pelo teste de quantidade de *spot* por gel.

Match ID	Razão das médias $P \leq 0,5$	Significância Estatística $P \leq 0,05$	Quiescentes/fMLP
447	0,21	0,015	3/8
467	0,31	0,012	4/8
561	0,15	0,011	4/8
714	0,22	0,028	4/9
762	0,07	0,008	2/9
782	0,19	0,050	2/8
783	0,06	0,012	3/8
792	0,11	0,017	3/7
799	0,19	0,015	4/8
931	0,12	0,018	4/7
983	0,26	0,036	4/7
1300	0,15	0,036	3/8
1482	0,06	0,017	1/8
1656	0,14	0,017	3/7
1678	0,11	0,043	1/5
1697	0,16	0,025	2/7

Dentre os 16 *spots* que não passaram pelo teste de quantidade de *spot* por gel, evidenciamos dois, que ficaram próximos da média e apareceram com expressão imperceptível em outros géis não sendo detectados pelo programa *Image Master*. O *spot* 680 está presente em 9 géis quiescente e 4 géis de fMLP, enquanto que o *spot* 1501 está presente em 7 géis quiescentes e 4 géis de fMLP. O interesse em se identificar esses dois *spots* surgiu porque os mesmos apresentaram expressão diferencial em neutrófilos ativadas com PMA e PAF, respectivamente.

A estratégia utilizada com produção de 18 géis (variação biológica e experimental representados em duas condições) e com os critérios estatísticos adotados são pontos fundamentais para se desenvolver um estudo confiável com eliminação de *spots* falso-positivos, principalmente pelo fato que os géis bidimensionais são de difícil reprodutibilidade.

Com a conclusão da análise estatística de todos os *spots*, foi possível a marcação dos mesmos no gel *Master* da condição quiescente representado pela figura 38 e no gel *Master* da condição fMLP representado pela figura 39.

FIGURA 38. Gel Master da condição quiescente. (*spots* amarelos representam expressão aumentada para quiescente; *spots* vermelho são os exclusivos de quiescente; *spots* numerados foram identificados).

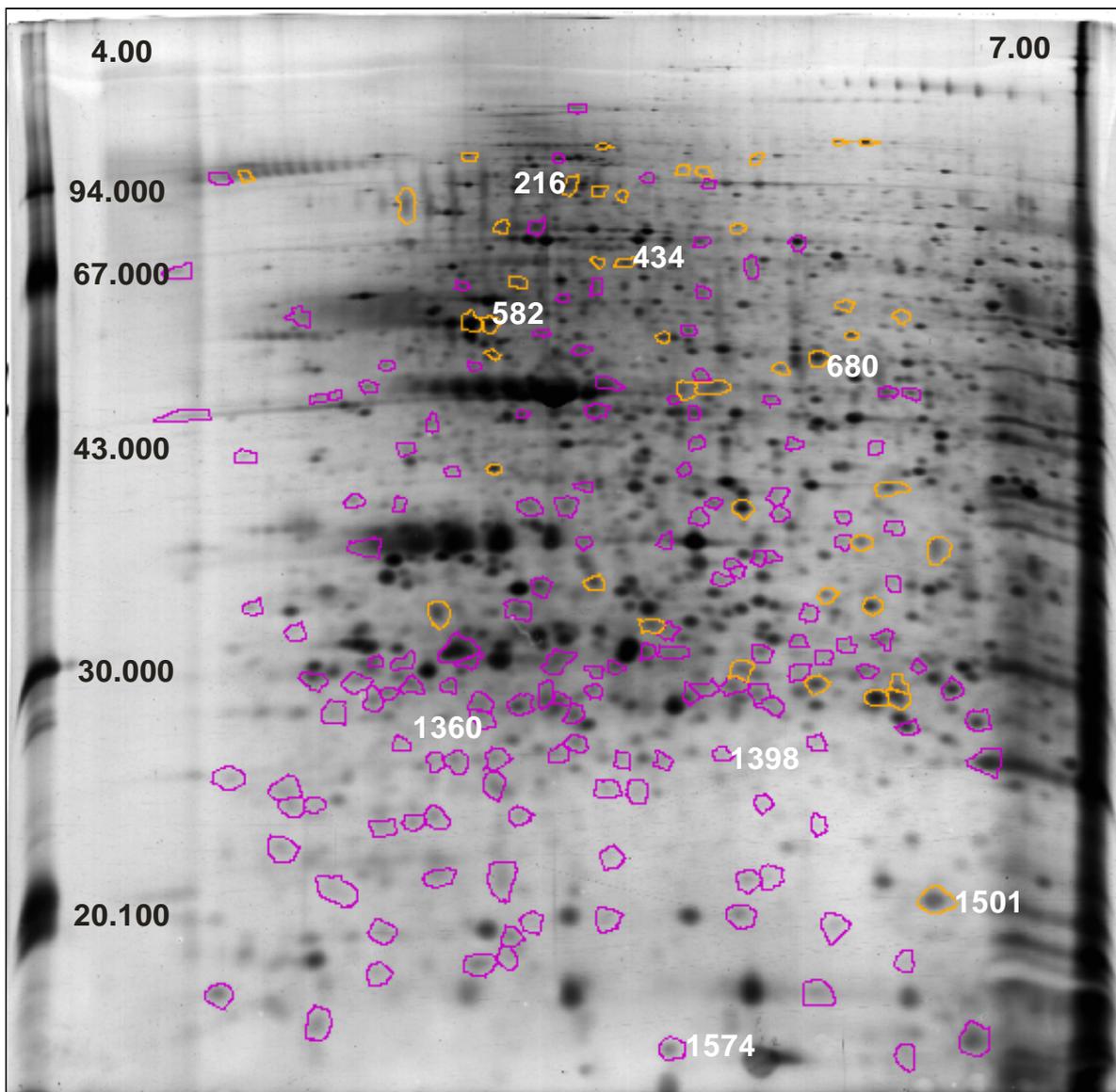
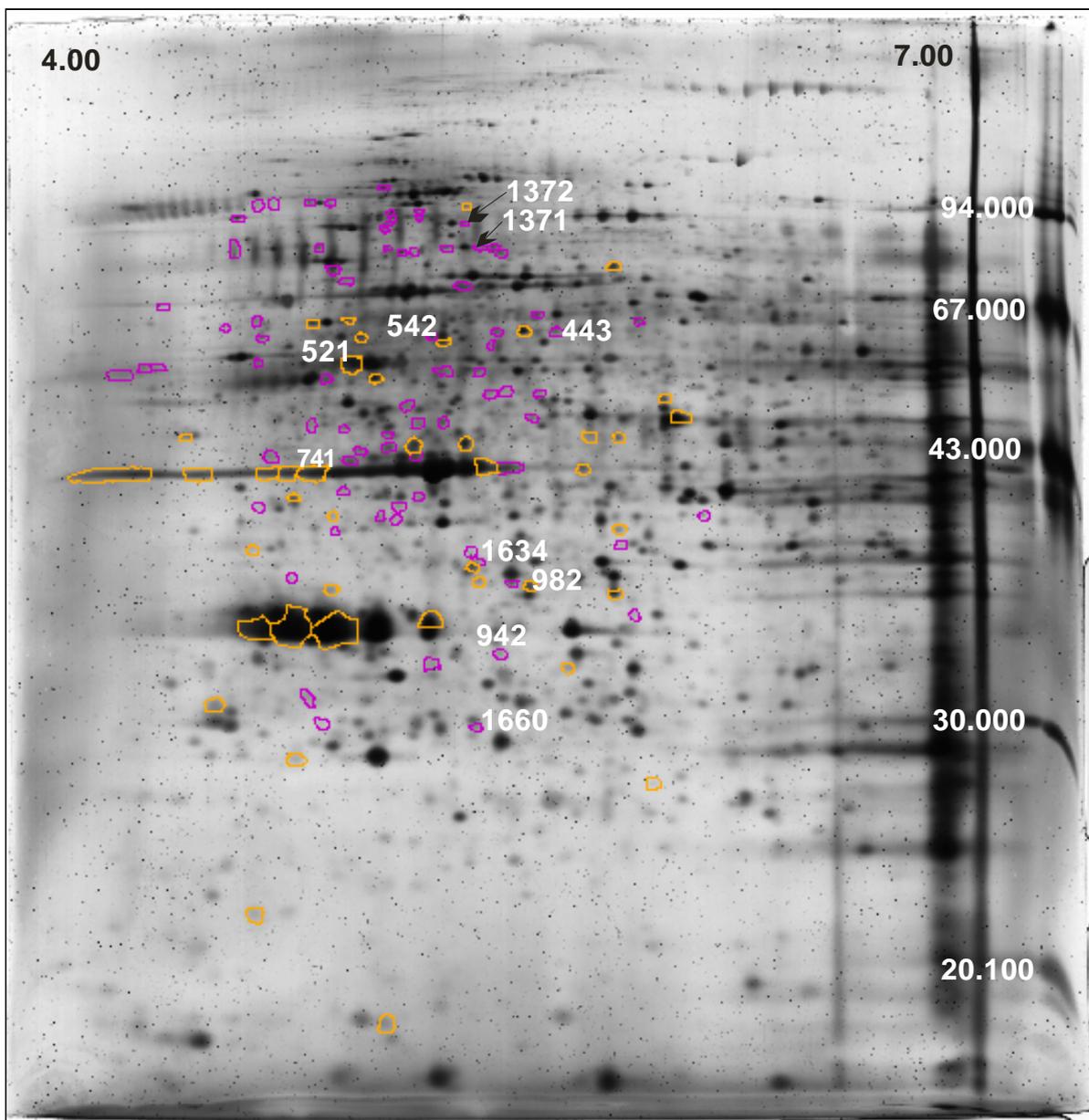


FIGURA 39. Gel Master da condição fMLP (*spots* amarelos com expressão aumentada para fMLP e *spots* vermelho exclusivos de fMLP)

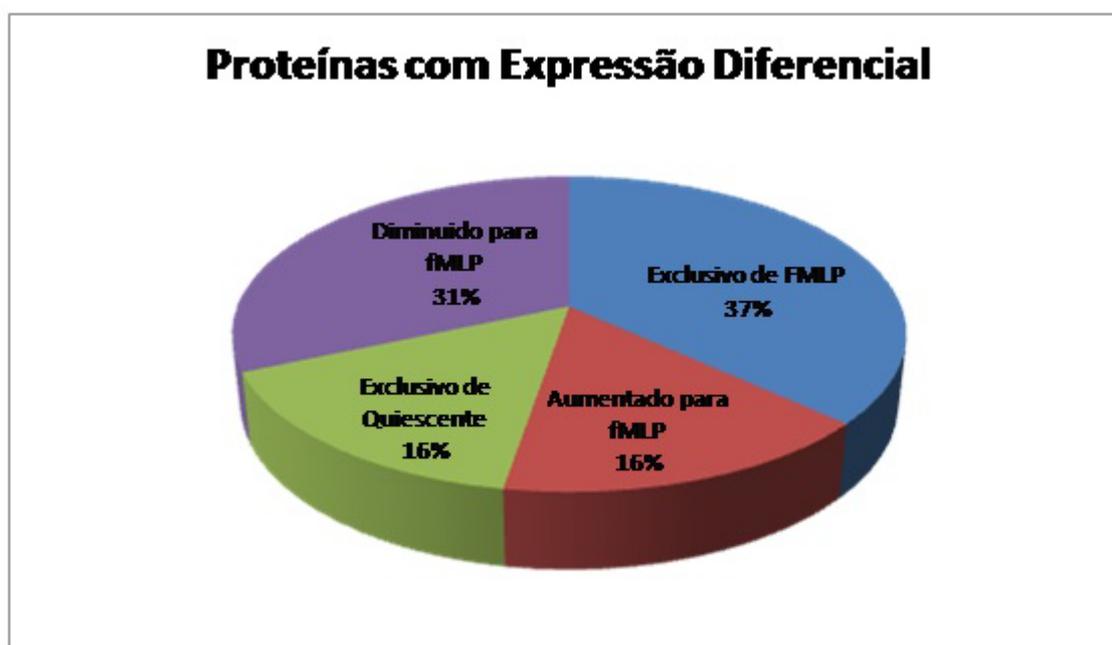


A imagem dos *spots* com expressão diferencial, assim como os exclusivos do quiescente e fMLP tiveram uma distribuição homogênea nos dois géis *Masters*.

#### 4.5. Identificação das proteínas

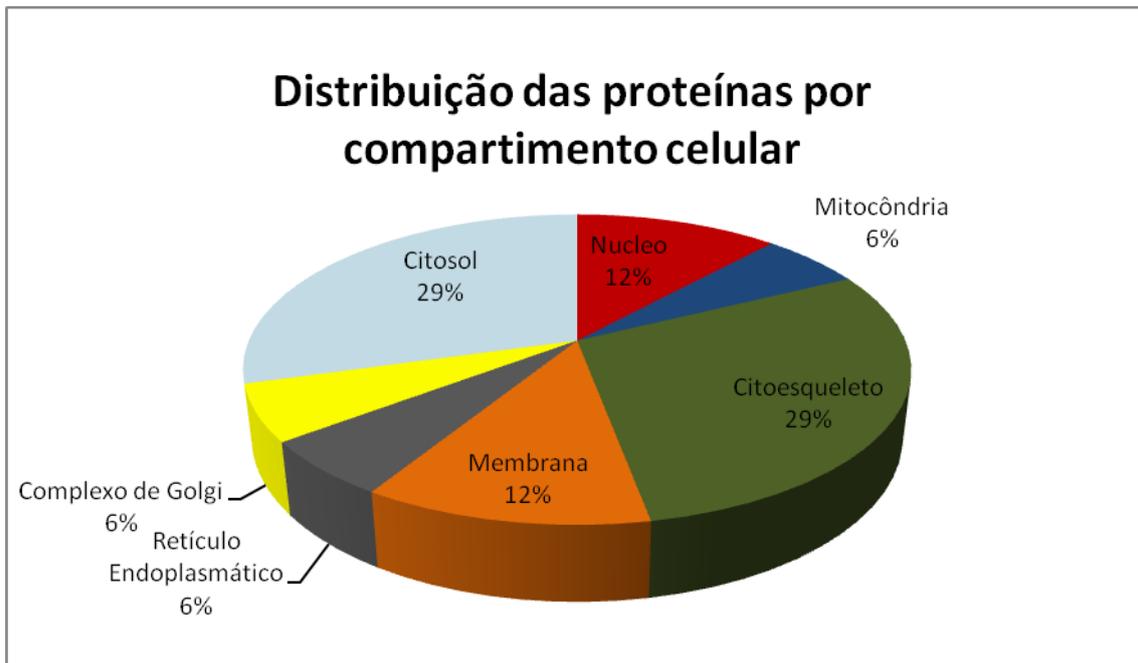
Foram identificadas um total de 16 proteínas, sendo elas com expressão aumentada para fMLP (vermelho) e expressão diminuída para fMLP (roxo), assim como as proteínas exclusivas de neutrófilos quiescentes (verde) e exclusivas de neutrófilos ativados com fMLP (azul). A porcentagem da quantidade de proteínas identificadas pode ser visualizada no gráfico abaixo.

Figura 40. Quantidade de proteínas identificadas em neutrófilos quiescentes e ativados com fMLP.



Foi observado que a maioria das proteínas identificadas se localizavam no citoesqueleto e no citosol (29%), seguido da membrana e núcleo (12%), e por fim na mitocôndria, complexo de Golgi e Retículo Endoplasmático (6%). Essa distribuição das proteínas identificadas por localização celular pode ser visualizada no gráfico abaixo.

Figura 41. Gráfico da porcentagem de proteínas identificadas por compartimento celular.



#### 4.5.1. Proteínas Exclusivas da condição Quiescente

Dentre os 157 *spots* exclusivos da condição quiescente, três foram identificadas, sendo elas: *Postmeiotic Segregation Increased 2 like 3*, *Pyrophosphatase e Coactosin like Protein*.

**TABELA 11.** Proteínas identificadas exclusivas da condição quiescente. Dados da proteína: *Match ID* (identificação do número do *spot* do gel Master), *Database ID* (identificação da proteína no banco de dados), *MW Database/ Gel* (massa molecular oriunda do banco de dados/massa molecular oriunda do gel experimental), *pI* (*pI* oriunda do banco de dados/ *pI* oriunda do banco de dados) e dados dos critérios de validação: *Score PMF* ( cálculo baseado no Mowse), *PMF C%* (porcentagem da cobertura da proteína pelo PMF), *Peptídeos PMF* (quantidade de peptídeos identificados), *Número clivagem perdida/confirm.* (número de clivagens que a tripsina não quebrou), *Clivagem Coerente* (número de clivagens trípticas), *Acetilação/Confirm.* (quantidade de aminoácidos acetilados/ confirmação da acetilação), *Oxidação/Confirm.* (quantidade de aminoácidos oxidados/ confirmação da oxidação).

Match ID	Database ID	MW Database / Gel	pI Database / Gel	Score PMF	PMF C%	Peptídeos PMF	Número clivagem perdida/ confirm.	Clivagem Coerente	Acetilação/ confirm.	Oxidação/ confirm.
1398	Pyrophosphatase <a href="#">gi119626587</a>	16095/ 24548	6,82/ 6,03	70	50%	8	7/3	5	0/0	1/1
1574	Coactosin <a href="#">gi119592171</a>	16049/ 16330	5,54/ 5,66	61	44%	5	1/1	1	0/0	0/0
1360	Postmeiotic Segregation Increased 2 Like 3 <a href="#">gi119592171</a>	18875/ 27251	4,52/ 5,13	67	25%	5	0/0	0	1/1	1/1

#### 4.5.1a) *Pyrophosphatase* (spot 1398)

As *pyrophosphatases* são enzimas responsáveis pela clivagem de pirofosfato em duas moléculas de fosfato inorgânico tendo como co-fator cátions bivalentes, tais como  $\text{Ca}^{++}$  e  $\text{Mg}^{++}$ . Essa enzima é essencial em processos celulares fundamentais para o metabolismo energético, por exemplo, durante a formação de glicogênio (hidrólise de Pirofosfato inorgânico em duas moléculas de fosfato) e na regulação do excesso de pirofosfato na célula (Devlin, 2007; Lange, 2008).

Raja K.B relatou a localização subcelular da *pyrophosphatase inorganic* em neutrófilos humanos em 1981, onde destacou-se uma dupla localização aparecendo tanto no citosol como na mitocôndria. Com esse estudo, nenhuma atividade foi atribuída ao retículo endoplasmático ou grânulo contendo fosfatase alcalina. Para saber se tratava-

se da mesma proteína, Raja (Raja, 1981) utilizou inibidores, onde pode observar que a *pyrophosphatase* citosólica e mitocondrial eram enzimas distintas.

Figura 42. Identificação de peptídeos por PMF da proteína *Pyrophosphatase*.

Start - End	Observed	Mr (expt)	Mr (calc)	ppm	Miss	Sequence
1 - 9	1149.6173	1148.6100	1148.5284	71	0	-.MALYHTEER.G
1 - 18	2240.0100	2239.0028	2238.9898	6	1	-.MALYHTEERGQPCSQNYR.L
1 - 18	2255.9922	2254.9849	2254.9848	0	1	-.MALYHTEERGQPCSQNYR.L Oxidation (M)
10 - 18	1109.3942	1108.3869	1108.4720	-77	0	R.GQPCSQNYR.L
29 - 42	1741.7865	1740.7792	1740.8988	-69	0	K.FKPGYLEATLNWFR.L
63 - 72	1132.6561	1131.6489	1131.6652	-14	1	K.NKAFLEVIK.S
85 - 104	2224.1150	2223.1078	2222.9797	58	0	K.NCNGGAINCTNVQISDSPFR.C
85 - 111	3098.5447	3097.5374	3097.3400	64	1	K.NCNGGAINCTNVQISDPFRCTQEER.S

A *pyrophosphatase* foi identificada por PMF onde o pI não modificou muito, porém obteve-se uma diferença de 8453 Da em relação a massa molecular da proteína catalogada no banco de dados. Sugere-se que o aumento da massa esteja relacionada a perda de sequências peptídicas na região C-terminal, tendo em vista que a maior parte das identificações foi na região N-terminal.

A confirmação dessa proteína foi possível pela descoberta de nove sequências peptídicas, com cobertura de 50% principalmente na região N-terminal e *score* de 90. Tivemos também a confirmação por análise da sequência da proteína, onde foi observada sete clivagens perdidas com confirmação de três. Dentre essas sete clivagens perdidas cinco tiveram clivagens coerentes com o método de digestão por tripsina. Observou-se também uma oxidação e uma acetilação, ambas confirmadas pelo aparecimento de dois peptídeos com a mesma sequência, porém uma com mudança pós traducional e outra não.

#### 4.5.1.b) *Coactosin-Like Protein ou CLP (spot 1574)*

A proteína *coactosin like*, conhecida como CLP é uma F-actina que se liga a 5-lipoxigenase regulando e modelando sua ação, durante a síntese de leucotrienos. Em 2004, Li e colaboradores comentaram que a CLP atua como um fator de despolarização da F-actina resultando na formação de F-actina globular, que por sua vez, ativará um série de processos como motilidade, fagocitose, produção e liberação de leucotrienos. Já em 2006 Marija Rakonjac e colaboradores evidenciaram a ação da CLP na regulação da ativação da enzima 5 lipoxigenase (5LO), assim como o aumento da produção de HPETE culminando para a formação de leucotrienos em neutrófilos estimulados com

cálcio. Essa mesma pesquisa mostrou a localização da CLP e da enzima 5LO associada ao núcleo durante a estimulação com cálcio, enquanto que em neutrófilos quiescentes as mesmas se localizaram no citosol. O produto dessa enzima 5LO, que pode sofrer influência da CLP, atua na liberação de enzimas lisossômicas e proporciona a adesão dos neutrófilos (Eduarda, 2009).

Figura 43. Identificação dos peptídeos por PMF da proteína *Coactosin Like Protein*

Start - End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	mmu	Miss Sequence
19 - 30	1337.6925	1336.6852	1336.6663	19	0 R.DDGSAVIIVWTFK.Y
31 - 57	3113.3650	3112.3577	3112.3833	-26	0 K.YDGSTIVPGEQGAQAEYQHFIQQCTDDVR.L
58 - 63	752.4509	751.4436	751.4381	6	0 R.LFAFVR.F
74 - 91	2019.1151	2018.1078	2018.0949	13	1 R.SKFALITWIGENVSLQR.A
76 - 91	1803.9908	1802.9835	1802.9679	16	0 K.FALITWIGENVSLQR.A

A identificação dessa proteína foi possível pelo reconhecimento de cinco peptídeos da proteína experimental em relação a proteína catalogada no banco de dados, principalmente nas regiões N-terminal e no meio da proteína, atingindo uma cobertura de 44% e *score* de 61. A observação dos critérios adotados para a diferença de massa molecular e pI revelou pouca alteração, com diferenças de 1,7% e 2,12% respectivamente. Foi observado uma clivagem perdida, porém confirmada por dois critérios: aparecimento do peptídeo não clivado e clivado; clivagem coerente (sítios de clivagem próximos).

#### 4.5.1.c) *Posmeiotic segregation Increased 2-like 3 (spot 1360)*

Conhecida também como PMS2L3, essa proteína está localizada no cromossomo 7q 11.23, com uma sequência final de 168 aminoácidos que apresentam dois domínios principais. O primeiro domínio está localizado entre os resíduos 8-46 chamada *Kruppel associated box* (HRAB) possivelmente sítio de ligação para os domínios KRAB (presente em aproximadamente 200 proteínas humanas incluindo *zinc finger*) que atua na inibição de fatores de transcrição. O segundo domínio está entre os resíduos 108-158 apresentando funções de ATPases.

A busca por informações a respeito dessa proteína nos levou a encontrar proteínas similares como a PMS2 utilizada como marcadora de reparo celular em pesquisas de carcinoma no colon sigmóide em humanos (Wen, 2008). O banco de dados NCBI juntamente com *UniGene* fez um alinhamento das sequências das proteínas similares de algumas espécies, como a *S. cerevisiae* e *E. coli* propondo uma possível

função de um gene. Nessas duas espécies a proteína atua necessitando de ATP para fazer a reparação durante os processos de meiose e mitose, funcionando como um heterodímero com Mlh 1p, se ligando tanto a fita simples como fita dupla do DNA através do seu domínio N-terminal.

Figura 44. Identificação de peptídeos por PMF da proteína *Posmeiotic Segregation Increased 2 Like 3*.

Start - End	Observed	Mr (expt)	Mr (calc)	ppm	Miss	Sequence	
1 - 11	1263.6831	1262.6758	1262.6329	34	0	-.MNTLQGPVSEFK.D	Acetyl (Protein N-term)
2 - 11	1090.5752	1089.5679	1089.5819	-13	0	M.NTLQGPVSEFK.D	
31 - 55	2872.6276	2871.6203	2871.3538	93	0	K.IAYGDVMLENYSHLVSVGYDYHQAK.H	
31 - 55	2888.6923	2887.6851	2887.3487	116	0	K.IAYGDVMLENYSHLVSVGYDYHQAK.H	Oxidation (M)
89 - 95	812.4796	811.4723	811.4916	-24	0	K.AIKPIDR.K	

A proteína *posmeiotic segregation increased 2 like 3* foi identificada a partir do reconhecimento de cinco peptídeos, dentre um total de 168 aminoácidos referente a proteína catalogada no banco de dados e com uma pequena alteração no pI. A cobertura da proteína atingiu 25% sendo a maioria na região N-terminal e score de 67. A presença e confirmação de regiões contendo uma oxidação e outra acetilação levou à identificação da proteína.

#### 4.5.2. Proteínas Exclusivas da condição fMLP

Dos 77 *spots* identificados como exclusivos do fMLP, sete proteínas foram identificadas por PMF, sendo elas: *CCT-3*, *Rabaptin RabGTPase-2*, *PITP*, *Scinderin*, *Dimethylglycine Dehidrogenase*, *CLIC-1* e *Rab 14-human*.

**TABELA 12.** Proteínas identificadas exclusivas da condição ativada com fMLP. Tabela com os dados da proteína: *Match ID* (identificação do número do *spot* do gel Master), *Database ID* (identificação da proteína no banco de dados), *MW Database/ Gel* (massa molecular oriunda do banco de dados/massa molecular oriunda do gel experimental), *pI* (pI oriunda do banco de dados/ pI oriunda do banco de dados) e dados dos critérios de validação: *Score PMF* ( cálculo baseado no Mowse), *PMF C%* (porcentagem da cobertura da proteína pelo PMF), *Peptídeos PMF* (quantidade de peptídeos identificados), *Número clivagem perdida/confirm.* (número de clivagens que a tripsina não quebrou), *Clivagem Coerente* (número de clivagens trípticas), *Acetilação/Confirm.* (quantidade de aminoácidos acetilados/ confirmação da acetilação), *Oxidação/Confirm.* (quantidade de aminoácidos oxidados/ confirmação da oxidação).

Match ID	Database ID	MW Database/ Gel	pI Database/ Gel	Score PMF	PMF C%	Peptídeos PMF	Número clivagem perdida/ confirm.	Clivagem Coerente	Acetilação/ confirm.	Oxidação/ confirm.
443	CCT 3 <a href="#">gi46411195</a>	61110/ 63362	5,98/ 5,67	154	43%	21	15/11	12	1/1	7/2
452	Rabaptin Rab GTPase <a href="#">gi117956403</a>	63960/ 62581	4,76/ 5,24	95	23%	14	9/7	8	0/0	3/0
942	PITP BETA <a href="#">gi119580148</a>	22401/ 25258	5,89/ 5,48	98	55%	10	5/1	4	0/0	1/0
1371	Scinderin <a href="#">gi119614052</a>	80895/ 83967	5,50/ 5,41	72	18%	10	0/0	0/0	0/0	2/0
1372	Dimethylglycine Dehydrogenase <a href="#">gi11133608</a>	97145/ 91107	57,31/ 5,35	72	18%	13	9/3	6	0/0	3/3
1634	CLIC 1 <a href="#">gi17943341</a>	27177/ 32636	5,09/ 5,35	69	32%	7	3/1	2	2/2	2/2
1660	Rab14 Human <a href="#">gi73536235</a>	29510/ 20754	5,94/ 5,39	79	36%	8	4/3	3	0/0	1/1

#### 4.5.2.a) *Chaperonin containing TCP 1 – subunit 3 ou CCT-3 (spot 443)*

A chaperonina presente no citosol TCP-1, também conhecido como complexo TCP-1 (TRIC) foi inicialmente descoberta pelo estudo das proteínas que eram responsáveis pela característica tridimensional das proteínas do citoesqueleto, actina e tubulina. Foi descoberto posteriormente que as CCTs não atuam somente no enovelamento da actina e tubulina, mas sim em todas as proteínas celulares. TRIC é uma chaperonina hetero-oligomérica que hidrolisa o ATP durante o dobramento polipeptídico, facilitando o enovelamento de outras proteínas. No entanto a natureza das

proteínas e os caminhos celulares dependentes da função de CCT ainda não são conhecidos (Tam, 2009; Dekker, 2008).

Carien Dekker (Dekker, 2008) evidenciou uma rede de interações de CCT com mais de 136 proteínas e genes que fazem uma intercomunicação com poros do núcleo, remodelação da cromatina e degradação de proteínas. Esse estudo, realizado em *S.cerevisiae*, identificou um sistema de citoesqueleto envolvido nos processos de citocinese conectado com CCT, chamada *septin ring complex*. Os autores sugeriram que um dos papéis da CCT esteja relacionado a modulação da função da septina, proteína essa que possui expressão aumentada durante a fagocitose caracterizada estruturalmente por possuir um domínio GTPase e outro domínio para ligação com fosfoinosítídeos (2ºmensageiro) interagindo com actina. Outro trabalho realizado evidenciou a ação das chaperoninas em humanos, como importantes moduladoras de agregação e toxicidade da cauda poli-Q, observadas na doença de *Huntington* em que ocorre ação proteolítica com reconhecimento de agregados da poli-Q fragmentando o exon Htt. As chaperoninas parecem proteger esse sistema de agregação durante o enovelamento de muitas proteínas através do reconhecimento de regiões hidrofóbicas de proteínas inativas (Tam, 2009).

Figura 45. Identificação de peptídeos por PMF da proteína CCT 3.

Start - End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	ppm	Miss Sequence
1 - 15	1710.7879	1709.7806	1709.9069	-74	0 -.MMGHRPVLVLSQNTK.R
1 - 16	1908.8815	1907.8743	1908.0186	-76	1 -.MMGHRPVLVLSQNTKR.E Acetyl (Protein N-term)
2 - 15	1621.8589	1620.8516	1620.8770	-16	0 M.MGHRPVLVLSQNTK.R Acetyl (Protein N-term)
32 - 44	1457.7498	1456.7425	1456.8072	-44	1 K.TIADIIRTCLGPK.S
45 - 68	2689.4381	2688.4308	2688.2049	84	1 K.SMKRMLLDPMGQNVMTNDGNAILR.E 5 Oxidation (M)
49 - 78	3265.4442	3264.4369	3264.6053	-52	1 K.MLLDFMGQNVMTNDGNAILREIQVHPAAK.S 2 Oxidation (M)
129 - 138	1106.5188	1105.5115	1105.5689	-52	0 K.ALDDMISTLK.K
129 - 139	1234.6656	1233.6583	1233.6638	-4	1 K.ALDDMISTLKK.I
182 - 190	1109.4472	1108.4399	1108.4971	-52	0 K.MVQFEENGR.K
182 - 191	1237.6326	1236.6253	1236.5921	27	1 K.MVQFEENGRK.E
295 - 306	1403.6178	1402.6106	1402.7027	-66	0 K.GISDLAQHYLMR.A
307 - 314	914.5172	913.5099	913.5457	-39	1 R.ANITAIRR.V
326 - 339	1613.8173	1612.8100	1612.8467	-23	1 R.ACGARIVSRPEELR.E
331 - 353	2510.1793	2509.1720	2509.3387	-66	1 R.IVSRPEELREDDIGTGAGLLEIK.K
368 - 377	1186.6834	1185.6761	1185.6540	19	1 K.DPKACTILLR.G
371 - 381	1189.6641	1188.6568	1188.6649	-7	1 K.ACTILLRGASK.E
378 - 389	1317.5736	1316.5663	1316.6936	-97	1 R.GASKEILSEVER.N
400 - 427	2832.2639	2831.2566	2831.4851	-81	1 R.NVLLDPQLVPGGASEMAVAHALTEKSK.A
468 - 491	2705.1899	2704.1827	2704.2221	-15	1 R.AKHTQENCETWGVNGETGTLVDMK.E
492 - 502	1254.6885	1253.6812	1253.7019	-17	0 K.ELGIWEPLAVK.L
508 - 527	2150.0518	2149.0445	2149.2107	-77	1 K.TAVETAVLLLRIDDIVSGHK.K

A proteína CCT 3 foi identificada com um aumento de massa de 3,5% em relação a proteína catalogada no banco de dados, com pI pouco alterado apresentando uma média de 5,8. O reconhecimento de 21 peptídeos, de um total de 545 aminoácidos da proteína catalogada no banco de dados, atingiu uma cobertura de 43% da proteína, principalmente na região N-terminal, e com *score* de 154. Foram identificadas 15 clivagens perdidas, onde 12 foram confirmadas como clivagens coerentes. Para concluir

os critérios de identificações foi confirmada 2 oxidações de sete presentes, assim com a confirmação das acetilações.

#### 4.5.2.b) *Rabaptin- Rab 2 GTPase (spot 452)*

A *Rabaptin* é uma proteína efetora de Rab que faz parte da família das RabGTPases, constituindo a família de pequenas GTPases, que funcionam como interruptores moleculares que alteram entre os estados conformacionais ligado (GTP) e desligado (GDP). A conversão da forma inativada RabGDP em RabGTP ativada envolve grandes mudanças conformacionais no qual participam a ligação de efetoras de Rab, tais como a família das Rabaptins (Junutula, 2004; Lominadze, 2005).

Até no presente momento não existem relatos da ação da *Rabaptin Rab 2* em neutrófilos humanos. Como a maior parte das Rabs estão envolvidas em muitas funções relacionadas as vesículas, tais como controle de carga, brotação e motilidade de vesículas endocíticas, é possível especular que a função da *Rabaptin Rab 2* esteja relacionada ao transporte de grânulos do retículo endoplasmático para o complexo de Golgi durante a movimentação de grânulos específicos e gelatinase. Especulação essa baseada na função da Rab 2 relatada por Harold Stenmark em 2009.

Figura 46. Identificação de peptídeos por PMF da proteína *Rabaptin GTPase Rab 2*

Start - End	Observed	Mr (expt)	Mr (calc)	ppm	Miss Sequence
2 - 14	1271.5937	1270.5865	1270.5789	6	0 M.AAAPVAADDDER.R
2 - 15	1427.7837	1426.7764	1426.6800	68	1 M.AAAPVAADDDERR.R
16 - 26	1227.6344	1226.6271	1226.6479	-17	1 R.RRPGAALDSR.S
17 - 26	1071.5963	1070.5890	1070.5468	39	0 R.RPGAALDSR.S
45 - 58	1496.7412	1495.7339	1495.6898	29	0 R.AELAGALAEMETMK.A 2 Oxidation (M)
109 - 118	1320.5925	1319.5852	1319.5412	33	0 R.QQQQDCEEK.E
109 - 120	1605.7732	1604.7659	1604.6849	50	1 R.QQQQDCEEKER.E
154 - 167	1699.8100	1698.8028	1698.9113	-64	1 R.EIVLPMEKEIEELK.A
301 - 311	1302.6349	1301.6276	1301.6939	-51	1 R.QLQKLESVSR.E
305 - 313	1090.5569	1089.5496	1089.5414	8	1 K.DLESVSRER.D
330 - 358	3312.5902	3311.5830	3311.7256	-43	1 K.QMQVLLAQVQNSEQLLRLTQGTVSQAQER.V Oxidation (M)
430 - 441	1365.6363	1364.6291	1364.6909	-45	1 R.ARLQAQEHGAER.L
432 - 443	1407.6780	1406.6708	1406.7378	-48	1 R.LQAQEHGAERLR.I
553 - 564	1346.7513	1345.7440	1345.6548	66	0 R.SIMDEAPLTDVLR.D

A identificação dessa proteína experimental com diferença de massa molecular próxima da massa molecular da proteína catalogada (1.373 Da), assim como do pI (diferença de 0,48), teve a cobertura de 23% da proteína através do reconhecimento de 14 peptídeos e *score* de 95. Nove clivagens perdidas foram identificadas, onde sete foram confirmadas pela identificação de peptídeos iguais porém clivados, oito confirmadas por clivagem coerente e três oxidações.

#### 4.5.2.c) *Phosphatidylinositol Transfer Protein-β* (spot 942)

Após a sensibilização dos neutrófilos com ativadores, ocorre uma série de eventos envolvendo uma cascata de sinalização, onde se faz necessária a participação de proteínas responsáveis pelo mecanismo de transferência de lipídeos pela membrana que geralmente atuam como segundo mensageiros e interferem na ativação de outras proteínas, como por exemplo a ativação da PKC por DAG.

Destacamos a atuação das PITPs (*Phosphatidylinositol Transfer Protein*) que são responsáveis pelo transporte de fosfatidilcolina (PC) e fosfatidilinositol (PI) sem que haja gasto de energia. Estudos revelaram que nos neutrófilos humanos tem-se a participação das isoformas  $\alpha$ , presentes no citosol e núcleo, e  $\beta$ , presentes no citosol e complexo de Golgi. Essa duas isoformas possuem 77% de similaridade, sendo encontradas no cromossomo 22q12. O estudo da estrutura bioquímica e biofísica da proteína revelou três regiões principais, sendo elas a região N-terminal onde se tem mais resíduos conservados caracterizados pela ligação com lipídeos circulantes, a região C-terminal com o domínio PITP com variações na sequência mostrando desempenhar papel importante na ligação da membrana e a região do loop que contém a fosforilação da Ser 166 que se tem sugerido desempenhar a interação proteína-proteína (Kuijpers, 2001; Segui et al, 2002; Hsuan, 2001).

Figura 47. Identificação de peptídeos por PMF da proteína *PITP -β*

Start - End	Observed	Mr (expt)	Mr (calc)	ppm	Miss	Sequence
3 - 21	2208.1798	2207.1725	2207.1078	29	1	R.KPGMRTPTVEQVSLNEYMK.D
8 - 21	1638.8356	1637.8283	1637.7971	19	0	R.TPTVEQVSLNEYMK.D
64 - 72	1036.5723	1035.5651	1035.4873	75	0	R.SQVEPADYK.A
96 - 111	1911.9585	1910.9512	1910.8325	62	1	K.KELANSPDCPQMCAVK.L
119 - 125	904.5002	903.4929	903.4603	36	0	K.WWGLQSK.V
136 - 143	1090.5857	1089.5784	1089.5832	-4	1	K.RIFTNPHR.Q
144 - 151	1109.5354	1108.5281	1108.5376	-8	0	R.QLFCWIDK.W
152 - 161	1307.6638	1306.6566	1306.6227	26	0	K.WIDLTMEDIR.R Oxidation (M)
163 - 175	1621.8810	1620.8738	1620.7665	66	1	R.MEDETQKELETLR.N
176 - 189	1419.7765	1418.7692	1418.6386	92	1	R.NQQQVRGTSAAASDE.-

A *PITP-β* foi identificada com *score* de 98 e cobertura de 55% abrangendo tanto regiões N-terminal como C-terminal, através do reconhecimento de 10 peptídeos. A massa molecular da proteína experimental diferiu em relação a massa molecular da proteína catalogada no banco de dados em 2.875 Da a mais. Foram encontrados 5 clivagens perdidas sendo uma confirmada pelo aparecimento de outro peptídeo igual clivado e quatro confirmações pela análise de clivagem coerente. A sequência

apresentou uma oxidação ao longo dos 189 aminoácidos totais que representa a proteína teórica

#### 4.5.2. d) *Scinderin* (spot 1371)

Os neutrófilos possuem uma rede intracelular formada por microfilamentos (actina), filamentos intermediários (vimentina) e microtúbulos (tubulina). Todas estão envolvidas nos processos primordiais dos neutrófilos como migração, adesão, emissão de pseudópodes, fagocitose e desgranulação. Os microfilamentos são polímeros de actina que unidos a outras proteínas constituem o citoesqueleto de actina. Durante o processo de desgranulação, a actina sofre fragmentação por proteínas associadas a ela, tais como *Gelsolin*, *fragmin* e *scinderin*, onde posteriormente ocorrerá a liberação de vesículas secretoras e grânulos para o meio extracelular. Acredita-se que esse processo de fragmentação da actina ocorra de forma a direcionar a localização da desgranulação. (Anja Schmidt, 1998) .

*Gelsolin*, *fragmin* e *scinderin* fazem parte de uma família de proteínas estruturais que são responsáveis pelo controle da montagem (liga, dobra e une os filamentos da actina) e desmontagem (fragmenta) dos microfilamentos. A atividade dessas proteínas é geralmente modulada pela presença de segundos mensageiros como cálcio e IP3 (Mark, 1997; Anja Schmidt, 1998).

Segundo L.Zhang (Zhang, 2007), as scinderinas provavelmente estejam ligadas a fosfolipídeos de membrana plasmática e sejam redistribuídas durante a estimulação celular, juntamente com a desmontagem da F-actina cortical por meio de um processo dependente de cálcio, antes da exocitose.

Figura 48. Identificação de peptídeos por PMF da proteína *Scinderin*

Start - End	Observed	Mr (expt)	Mr (calc)	ppm	Miss	Sequence
4 - 12	1193.5343	1192.5270	1192.5513	-20	0	R.ELYHEEFAR.A
57 - 68	1505.8225	1504.8153	1504.7616	36	0	R.GFTYHLHFWLGGK.E
150 - 162	1493.7284	1492.7211	1492.7198	1	0	R.ATEVPLSWDSFNK.G
251 - 262	1316.4963	1315.4891	1315.5900	-77	0	K.LYMVSDASGSMR.V
251 - 262	1332.5946	1331.5873	1331.5850	2	0	K.LYMVSDASGSMR.V Oxidation (M)
263 - 291	3224.3222	3223.3149	3223.5239	-65	0	R.VTVVAEENPFSMALLSEECFILDHGAAK.Q Oxidation (M)
338 - 345	905.4198	904.4125	904.4654	-58	0	K.QIPFDASK.L
533 - 542	1036.5039	1035.4966	1035.5600	-61	0	K.GAEYVASVLK.C
548 - 564	1948.8600	1947.8527	1947.8850	-17	0	R.IQEGEEPEEFWNSLGGK.K
566 - 583	2097.1343	2096.1270	2095.9810	70	0	K.DYQTSPLLETQAEDHPPR.L

A *scinderin* foi identificada pelo reconhecimento de 10 peptídeos atingindo a cobertura de 18% da proteína, onde a maior parte foi localizada na região N-terminal. Foi observado uma mudança de pI e uma diferença de 3,6% da massa molecular em relação a proteína catalogada no banco de dados, assim como o aparecimento de duas oxidações, sendo uma confirmada pelo aparecimento de outra forma não oxidada.

#### 4.5.2.e) *Dimethylglycine Dehydrogenase (spot 1372)*

É uma flavoproteína responsável pela desmetilação da N-dimetilglicina para formar sarcosina e formaldeído, na presença de água e FAD que atua como acceptor de elétrons, na membrana da matriz mitocondrial. A reação enzimática tende a formar sarcosina, porém na ausência do co-fator 5,10-metilenotetra-hidrofolato, aminas intermediárias são formadas passando a se concentrarem. Essas aminas são convertidas a uma carbinolamina intermediária, que por sua vez é convertida em sarcosina liberando um composto altamente tóxico, o formaldeído. Frente a esse composto tóxico, a *dimethylglycine dehydrogenase* (DMGO) pode influenciar no controle da formação dessas aminas intermediárias no sentido de evitar a formação de formaldeído. (Mc Andrew, 2008; Dale, 1961).

Segundo Tewes Tralan e colaboradores (Tralan, 2009) a enzima DMGO (dimetilglicina oxidoreductase ou dimetilglicina dehidrogenase) além de possuir um mecanismo alostérico, canaliza os substratos do sítio ativo para um segundo sítio, uma espécie de túnel, de forma que os intermediários fiquem protegidos o que evita a formação do formaldeído.

Essa é uma proteína importante para o fornecimento de elétrons e para a formação de alguns aminoácidos como glicina e serina. Recentemente Barbara Binzak (Binzak, 2001) publicou um artigo propondo um novo erro inato do metabolismo

enfocando a deficiência da *Dimethylglycine Dehydrogenase*, onde foi observado o acúmulo de dimetilglicina no soro e na urina de um paciente africano.

Figura 49. Identificação de peptídeos por PMF da proteína *Dimethylglycine Dehydrogenase*

Start - End	Observed	Mr (expt)	Mr (calc)	ppm	Miss Sequence
1 - 10	1154.5863	1153.5790	1153.6754	-84	0 -.MLRPGAQLLR.G
50 - 74	2502.3050	2501.2977	2501.3134	-6	1 R.AETVIIGGGCVGVSLAYHLAKAGMK.D
144 - 153	1316.5908	1315.5835	1315.6231	-30	1 R.VDEFKYQMTR.T
144 - 153	1332.5318	1331.5245	1331.6180	-70	1 R.VDEFKYQMTR.T Oxidation (M)
224 - 240	1908.8168	1907.8095	1907.8432	-18	1 K.ARSDGTWDVETPQGSMD.A Oxidation (M)
226 - 240	1665.6996	1664.6923	1664.7101	-11	0 R.SDGTWDVETPQGSMD.A
305 - 319	1741.7610	1740.7538	1740.8392	-49	1 R.DGLLFGPYESQEKMK.V
361 - 389	3100.4516	3099.4444	3099.6539	-68	1 K.KADIINVVNGPITYSPDILPMVGP HQGVR.N
447 - 459	1487.6731	1486.6658	1486.7092	-29	0 R.ESYGFNNIVGYPK.E
463 - 477	1735.8252	1734.8180	1734.9278	-63	1 R.FAGRPTQRVSGLYQR.L
529 - 543	1621.7828	1620.7755	1620.8876	-69	1 R.VGVTDLSPFGKFNK.G
562 - 574	1460.7126	1459.7053	1459.7493	-30	0 K.VGFTNISHMLTPK.G Oxidation (M)
562 - 576	1657.7320	1656.7247	1656.8770	-92	1 K.VGFTNISHMLTPKGR.V

A proteína identificada apresentou uma diferença significativa de aproximadamente 6000 Da com modificação do pI passando a se apresentar de forma básica. Essas diferenças podem ser justificadas pelo fato da proteína catalogada no banco de dados está relacionada a uma forma precursora. A precursora possui um total de 866 aminoácidos, cujas sequências possibilitaram a identificação de 13 peptídeos da proteína experimental, com cobertura de 18% e *score* de 72. Para a confirmação da proteína foram observados alguns critérios, já citados como: nove clivagens perdidas com confirmação de três, seis clivagens coerentes e três oxidações com confirmações como modificações pós traducionais. Sugere-se que a identificação da proteína madura, justifique a diminuição da massa molecular e do aumento do pI.

#### 4.5.2.f) *CLIC-1* (spot 1634)

A família CLIC é formada de sete proteínas, onde CLIC 1, CLIC 4 e CLIC 5 possuem atividades relacionadas a canais de cloro. CLIC 1 foi identificada primeiramente no núcleo de monócitos em 1997 por Valenzuela e colaboradores (Valenzuela, 1997), e posteriormente progrediu para a identificações das demais proteínas dessa família. Descobriu-se que apesar da CLIC 1 ter sido identificada como uma proteína de canal de cloreto nuclear, ela foi encontrada também em outros locais subcelulares. Hoje se sabe que esses canais de cloro são encontrados em vários compartimentos celulares, além da membrana plasmática e nuclear, como organelas intracelulares tais como complexo de Golgi e na membrana de fagossomo. Uma hipótese é que os canais de cloro, assim como de potássio, são importantes para se

manter o pH ideal dentro dos fagossomos, na tentativa de compensar a acidificação gerada por bombeamento de prótons pelas ATPases. Rosemary e colaboradores pesquisaram em 2008 (Milton, 2008) a influência dos canais de cloro do tipo CLIC 1, em microglia expostas a  $\beta$ -amilóide na qual observou-se a secreção de uma variedade de moléculas pró-inflamatórias incluindo citocinas e ROS (Berryman, 2000).

Figura 50. Identificação de peptídeos por PMF da proteína CLIC 1.

Start - End	Observed	Mr (expt)	Mr (calc)	ppm	Miss	Sequence
1 - 13	1605.8049	1604.7976	1604.7756	14	0	-.MAEEQPQVELFVK.A Acetyl (Protein N-term); Oxidation
1 - 20	2150.0597	2149.0524	2149.0361	8	1	-.MAEEQPQVELFVKAGSDGAK.I Oxidation (M)
2 - 13	1458.6963	1457.6890	1457.7402	-35	0	M.AEEQPQVELFVK.A Acetyl (Protein N-term)
38 - 50	1437.7348	1436.7275	1436.7624	-24	1	K.GVTFNVTVDTKR.R
139 - 166	3048.7009	3047.6936	3047.4571	78	1	K.VLDNYLTSPLPEGVDETSAEDEGVSRK.F
184 - 192	1095.5657	1094.5584	1094.6270	-63	0	K.LHIVQVVK.K
196 - 204	1037.5206	1036.5133	1036.5342	-20	0	R.GFTIPEAFR.G

Encontrada catalogada no banco de dados como “*Chain A, crystal structure of a soluble form of CLIC 1-An intracellular chloride in channel*”, essa proteína apresentou um pI similar ao da proteína encontrada no banco de dados e a massa molecular aumentada em aproximadamente 17%. A cobertura atingiu 32% abrangendo principalmente a região N-terminal, *score* de 69 e identificação de 7 peptídeos. A identificação foi confirmada analisando parâmetros como número de clivagens perdidas confirmadas pela clivagem coerente, presença de dois resíduos oxidados e dois acetilados com confirmação em ambos os casos.

#### 4.5.2.g) Rab 14-Human (spot 1660)

Durante a ativação dos neutrófilos são observados a mobilização de vários processos intracelulares responsáveis por alterações fenotípicas levando à formação dos neutrófilos efetores, tais como incorporação de proteínas de membrana dos grânulos à membrana plasmática e liberação dos componentes da matriz dos grânulos por meio da exocitose. Esses processos expõem uma série de receptores de membranas associados a funções primordiais como adesão dos neutrófilos a células endoteliais vasculares no local da injúria, quimiotaxia, fagocitose e produção de ROS. Segundo Silva Uriarte (Uriarte, 2008), uma série de proteínas estão envolvidas nesses processos, se destacando a grande família das GTPases. A maioria das GTPases foram identificadas em vesículas secretórias revelando uma série de proteínas conhecidas como Rab para regular o sistema de tráfego de membrana. Esse estudo mostrou as funções de algumas Rabs evidenciando a Rab 11 e Rab 5a, assim como duas proteínas SNARES responsáveis

pela união das membranas durante a exocitose dos grânulos (Uriarte, 2008; Borregaard, 2007).

Já em 2004, Jagath Junutula e colaboradores especificaram com mais detalhes a função dessas Rabs, associando o tráfego de membrana com proteínas do citoesqueleto e na segmentação de vesículas através da interação com fatores de ancoragem. Algumas proteínas efetoras de Rab foram identificadas como partes importantes da função das mesmas, tais como Rabaptin 4, Rabaptin 5, Rabip 4, Rabinosyn, EEA1, PI3K para Rab 5 e membros da família FIP para Rab 11. Esse estudo fez o alinhamento entre as Rabs e descobriu que a Rab2 e Rab 4 são homólogas, com similaridades de sequência de 58%-67% e 57%-68% em relação à Rab 14. O estudo original que identificou Rab 14 foi realizado em cérebro de ratos, onde a sequência é muito similar à Rab14 humana, diferindo somente em um aminoácido. Como as funções de Rab 2 e Rab 5 estão relacionadas às funções GTPases no retículo endoplasmático e compartimento lisossomal, sugerimos que a Rab 14 esteja relacionada com o tráfego de membrana nesses dois compartimentos.

Figura 51. Identificação de peptídeos por PMF da proteína *Rab 14 Human*

Start - End	Observed	Mr (expt)	Mr (calc)	ppm	Miss	Sequence	
1 - 13	1584.6713	1583.6640	1583.7330	-44	0	-.MATAPYNYSYIFK.Y	Oxidation (M)
2 - 13	1437.7831	1436.7758	1436.6976	54	0	M.ATAPYNYSYIFK.Y	
2 - 24	2584.1734	2583.1661	2583.3083	-55	1	M.ATAPYNYSYIFRYIIIGDMGVGK.S	
25 - 35	1390.6897	1389.6824	1389.7075	-18	1	K.SCLLHQFTEKK.F	
35 - 51	1966.0208	1965.0135	1964.9237	46	1	K.KFMADCPHTIGVEFGTR.I	
36 - 51	1837.9704	1836.9631	1836.8288	73	0	K.FMADCPHTIGVEFGTR.I	
157 - 170	1493.7352	1492.7279	1492.7045	16	0	K.TGENVEDAFLEAAK.K	
157 - 171	1621.8417	1620.8344	1620.7995	22	1	K.TGENVEDAFLEAAK.I	

A proteína Rab 14 Humana foi identificada pela similaridade entre a massa molecular da proteína experimental e da proteína catalogada no banco de dados. Em relação ao pI, não teve alteração significativa, onde ambos ficaram em média de 5,6. Dentre os 181 aminoácidos catalogados no banco de dados, oito peptídeos foram identificados cobrindo tanto as regiões N-terminal quanto a C-terminal chegando a 36% de cobertura e com *score* de 79. Critérios para verificações foram observados, onde foram obtidos quatro clivagens perdidas sendo três confirmadas por clivagens coerentes e confirmação da única oxidação entre os aminoácidos 1 e 13.

#### 4.5.3. Proteínas com expressão diminuída para fMLP.

Dentre 28 *spots* que passaram em todos os critérios estatísticos, foram identificadas 10 proteínas: *PML*, *Tubulin alpha 1B*, *Tubulin alpha 4A*, *Tubulin alpha 1A*, *Zinc Finger - FYVE domain* e *MRI* (Tabela 13).

**TABELA 13.** Proteínas identificadas com expressão diminuída para fMLP. Tabela com os dados da proteína: *Match ID* (identificação do número do *spot* do gel Master), *Database ID* (identificação da proteína no banco de dados), *MW Database/ Gel* (massa molecular oriunda do banco de dados/massa molecular oriunda do gel experimental), *pI* (*pI* oriunda do banco de dados/ *pI* oriunda do banco de dados) e dados dos critérios de validação: *Score PMF* ( cálculo baseado no Mowse), *PMF C%* (porcentagem da cobertura da proteína pelo PMF), *Peptídeos PMF* (quantidade de peptídeos identificados), *Número clivagem perdida/confirm.* (número de clivagens que a tripsina não quebrou), *Clivagem Coerente* (número de clivagens trípticas), *Acetilação/Confirm.* (quantidade de aminoácidos acetilados/ confirmação da acetilação), *Oxidação/Confirm.* (quantidade de aminoácidos oxidados/ confirmação da oxidação).

Match ID	Database ID	MW Database / Gel	pI Database / Gel	Score PMF	PMF C%	Peptídeos PMF	Número clivagem perdida/confirm.	Clivagem Coerente	Acetilação/confirm.	Oxidação/confirm.
216	<b>PML</b> <a href="#">gi31331</a>	96645/ 96690	5,88/ 5,34	69	17%	14	3/0	3	0/0	2/1
582	Tubulina alpha 1B chain <a href="#">gi55977474</a>	50804/ 16330	4,94/ 5,66	190	58%	24	6/5	5	0/0	4/4
	Tubulina alpha 4A chain <a href="#">gi55577476</a>	50634/ 16330	4,95/ 5,66	177	56%	23	5/4	4	0/0	4/4
	Tubulina alpha 1A chain <a href="#">gi55977864</a>	50788/ 16330	4,94/ 5,66	164	54%	22	5/4	4	0/0	4/4
680	<b>Zinc Finger</b> <a href="#">gi 119612854</a>	47807/ 53108	5,21/ 6,13	109	27%	11	8/5	5	0/0	1/0
1501	<b>MRI</b> <a href="#">gi2080227703</a>	17046/ 20050	5,16/ 6,50	90	49%	9	7/3	5	1/1	3/1

##### 4.5.3.a) *Promyelocytic Leukemia Protein* (*spot* 216)

Essa proteína foi encontrada em estudos relacionados à Leucemia Promielocítica aguda (APL) ou Leucemia Progranulocítica Aguda, sendo caracterizada pelo acúmulo anormal de promielócios (neutrófilos imaturos). Segundo Erin L.Reineke

(Reineke, 2009), a APL surge devido a translocação entre o gene do receptor de ácido retinóico  $\alpha$  (RAR $\alpha$ ) presente no cromossomo 17 e o gene da leucemia promielocítica (PML) presente no cromossomo 15. Esse é um tipo de Leucemia Mielóide Aguda (LMA) que responde a terapia ácido All-trans retinóico.

O receptor RAR $\alpha$  é acoplado a uma proteína adaptadora intracelular chamada PRAM-1, que está presente somente em granulócitos em fase final de maturação. Segundo Regina Clemens (Clemens, 2004), o PRAM-1 parece exercer uma ação antagonista à ação da integrina em neutrófilos maduros impedindo a adesão e transmigração dos mesmos para os locais da inflamação.

A proteína leucêmica promielocítica (PML) está envolvida em processos do ciclo celular, reparo do DNA, regulação da transcrição e apoptose. É representada por estruturas subnucleares conhecidas como corpos nucleares PML (NBs-PML), onde mais de 50 tipos foram conhecidos no tráfego nuclear. A regulação dessa ação coordenada, pode ocorrer quando se tem altas concentrações de PML ou por modificações pós-traducionais da PML, que são importantes para a formação dos NBs e interação com outras proteínas. Yuki Shi (Shi, 2004) realizou experimentos relacionando com a ação dos NBs-PML e o desenvolvimento da apoptose se baseando em um estudo fenotípico anteriormente realizado por Z.Wang que demonstrou a atividade moduladora da PML, porém sem especificar de que forma. Yuki Shi sugere que a PML inibe a transcrição de Daxx ou ativa a transcrição da p53, processos esses relacionados com a ativação da apoptose.

Figura 52. Identificação de peptídeos por PMF da *Promyelocytic Leukemia Protein*.

Start - End	Observed	Mr (expt)	Mr (calc)	ppm	Miss	Sequence
12 - 22	1182.6085	1181.6012	1181.5677	28	0	R.QPSPSPSPTER.A
129 - 138	1365.6274	1364.6202	1364.6336	-10	0	K.CFEAHQWFLK.H
161 - 173	1601.7686	1600.7614	1600.7528	5	1	R.KTNNIFCSNPNR.T
174 - 183	1211.5972	1210.5899	1210.6016	-10	0	R.TPTLTSIYCR.G
274 - 282	1015.5491	1014.5418	1014.5345	7	0	R.ELLEAVDAR.Y
286 - 293	1000.5011	999.4938	999.3967	97	0	R.DYEEMASR.L
306 - 315	1090.5474	1089.5401	1089.5965	-52	1	R.TGSALVQRMK.C
479 - 493	1640.8834	1639.8761	1639.8642	7	1	R.LARSSPEQPRPSTSK.A
534 - 551	1867.6868	1866.6795	1866.8443	-88	0	R.VVVISSESDSDAENSSSR.E
657 - 667	1303.6324	1302.6252	1302.6873	-48	0	K.LWGPGLPNFFR.A
668 - 674	830.3599	829.3526	829.4294	-93	0	R.ALEDINR.L
720 - 729	1020.5194	1019.5121	1019.5256	-13	0	R.SAMAAVLAMR.D
720 - 729	1036.5335	1035.5262	1035.5205	6	0	R.SAMAAVLAMR.D Oxidation (M)
775 - 791	1967.0286	1966.0213	1966.0458	-12	0	R.LLALHNVSPMELLSAHR.R Oxidation (M)

A proteína encontrada no banco de dados forneceu dados (massa molecular 96645 e pI 5,88) comparativos com a proteína experimental (massa molecular 96690 Da e pI 5,34), evidenciando 14 sequências de peptídeos iguais, com *score* de 69 e cobertura de 17% principalmente nas regiões N-terminais. Foram achados dois locais de

oxidações com confirmação de uma e três clivagens coerentes vindo a confirmar as clivagens perdidas

#### 4.5.3.b) Zinc Finger, FYVE domain containing 19 (*spot 680*)

A proteína identificada *Zinc Finger* são pequenas proteínas estruturais que apresentam domínio FYVE (responsável pela interação com fosfoinosítídeos) e domínio para interação com outras proteínas como por exemplo RabGTPase (sítio de regulação) e PI3K (Kutateladze,2006).

O motivo *Zinc finger* consiste de uma  $\alpha$ -hélice e uma folha  $\beta$ -pregueada antiparalela, apresentando ligação com o íon zinco por meio de dois resíduos de histidina e dois de cisteína. Essas ligações com o íon zinco confere mais estabilidade para a proteína.

Segundo Rameh (Rameh, 1999) a proteína conhecida como *FYVE Finger Domain*, interage especificamente com fosfoinosítídeo 3 fosfato (PIP3). Esse domínio foi caracterizado por dois sítios de ligação com zinco e um trecho altamente conservado de resíduos de peptídeos básicos que ficam em torno da interação entre zinco e cisteína.

Quando neutrófilos quiescentes são ativados com fMLP, transitoriamente passam a acumular um pequeno subconjunto de lipídeos altamente polar, como por exemplo fosfoinosítídeos. L.R.Stephens (Stephens, 1991) propôs que a elevação de PIP2 em neutrófilos ativados com fMLP é causada pela desfosforilação de PIP3. Já Rameh (Rameh, 1999) cogitou uma possível função para PIP3, que interagindo com *FYVE Finger Domain*, possa estar promovendo a fusão das vesículas. Porém ainda não se sabe de fato qual a verdadeira função de PIP3, dentre as várias hipóteses em estudo.

Figura 53. Identificação de peptídeos por PMF da proteína *Zinc Finger, FYVE domain containing 19*

Start - End	Observed	Mr (expt)	Mr (calc)	ppm	Miss	Sequence
30 - 48	1796.8698	1795.8626	1795.9078	-25	1	R.GGTVPVGVGGAGQGREGR.S
63 - 79	1719.9356	1718.9283	1718.8145	66	0	R.DLSSADPAVLGATMESR.C
80 - 86	857.4340	856.4267	856.3571	81	0	R.CYGCAVK.F
80 - 91	1493.7482	1492.7409	1492.7207	14	1	R.CYGCAVKFTLFK.K
93 - 102	1020.5547	1019.5475	1019.4995	47	1	K.EARSSANASK.W
96 - 110	1664.8568	1663.8495	1663.7954	33	1	R.SSANASKWSPQNYK.K
133 - 143	1346.7131	1345.7059	1345.6772	21	1	R.QDQMIAERLAR.L Oxidation (M)
283 - 291	1041.5746	1040.5674	1040.6342	-64	1	R.QERILALAK.R
304 - 310	894.5081	893.5008	893.4607	45	0	R.VTLQDYR.L
407 - 426	2299.1747	2298.1674	2298.0665	44	1	R.EGHDAFELKEHQTSAYSPPR.A
416 - 431	1794.8018	1793.7945	1793.8081	-8	1	K.EHQTSAYSPPRAGQEH.-

Essa proteína foi identificada com o reconhecimento de 11 peptídeos ao longo de 110 aminoácidos apresentados pela proteína catalogada no banco de dados. A cobertura atingiu 27% da proteína, principalmente na região C-terminal e com *score* de 109. Houve uma modificação da proteína experimental em relação a proteína catalogada no banco de dados, tendo um aumento de 5301 Da e pI ligeiramente mais básico. Foi observado a presença de 8 clivagens perdidas sendo cinco confirmadas por clivagens coerentes, além da presença de uma oxidação.

#### 4.5.3.c) Modulator of retrovirus infection (*spot 1501*)

Vários estudos foram realizados com o objetivo de descobrir como a infecção por retrovírus ocorre no homem, quais os processos que ele utiliza para sua instalação e como consegue driblar o sistema imune do hospedeiro, sendo a maioria dos estudos realizada a partir das células de pacientes imunocomprometidos.

O gene do *Modulator of retrovirus infection* (MRI) está localizada no cromossomo 7, onde a proteína apresenta uma sequência de 157 aminoácidos. O fato dessa proteína não possuir domínios, fica difícil especular uma função. Até hoje não se sabe qual a sua função, porém uma hipótese surgiu a partir dos testes realizados com células infectadas com o vírus da leucemia murina, vírus da imunodeficiência humana tipo 1 e vírus da imunodeficiência felina, e transfectadas com MRI modificado (mas similar a proteína produzida pela célula do hospedeiro). O objetivo desses testes foi estudar a influência do vírus em processos de degradação de proteínas virais (envolvimento de proteassomas). Segundo Sumit Agarwal (Agarwal, 2006) células normais de humanos expressam baixas quantidades de MRI conseguindo combater a maioria das infecções (incluindo testes com HIV-1), enquanto que em células

transformadas (como o câncer) a expressão de MRI aumentou consideravelmente resultando no aumento da infecção.

Essa proteína (MRI) foi encontrada em pacientes com carcinoma renal e em fibroblastos de pulmão em fase inicial de câncer, com expressão aumentada. Cogita-se a possibilidade que o MRI atue, quando em altas concentrações, inibindo a ação do proteossoma durante a degradação de proteínas mutantes, facilitando assim o desenvolvimento da doença. Subentende-se que a expressão aumentada dessas proteínas estariam modulando de forma a inibir a ação do proteossoma, evitando a degradação das proteínas virais.

Figura 54. Identificação de peptídeos por PMF da proteína *Modulator of Retrovirus Infection*

Start - End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	ppm	Miss	Sequence
1 - 9	1066.4898	1065.4825	1065.5012	-18	0	-.METLQSETK.T
1 - 9	1082.5304	1081.5231	1081.4961	25	0	-.METLQSETK.T Oxidation (M)
1 - 11	1323.6293	1322.6220	1322.6500	-21	1	-.METLQSETKTR.V
1 - 11	1365.6509	1364.6436	1364.6606	-12	1	-.METLQSETKTR.V Acetyl (Protein N-term)
2 - 11	1234.6779	1233.6706	1233.6201	41	1	M.ETLQSETKTR.V Acetyl (Protein N-term)
12 - 30	2054.0835	2053.0762	2053.1394	-31	1	R.VLPSWLTAQVATKRVAPMK.A
35 - 46	1259.7062	1258.6989	1258.6638	28	1	R.MRMAAVPVAAR.L Oxidation (M)
47 - 73	3049.3499	3048.3427	3048.5624	-72	1	R.LPATRTVYCMNEAIVDVALGILIESR.K Oxidation (M)
150 - 157	1060.5545	1059.5472	1059.5389	8	1	K.YVREIFFS.-

A proteína foi identificada pelo reconhecimento de nove peptídeos, cobertura de 49% da proteína, abrangendo tanto a região N-terminal quanto C-terminal. Foi observado uma diferença da massa molecular da proteína experimental em relação a massa molecular da proteína catalogada no banco de dados em torno de 3000 Da. Houve uma pequena diferença de pI, onde na proteína experimental se observou o pI mais básico. Foram encontrados sete clivagens perdidas com confirmação de três pelo aparecimento de peptídeos iguais porém clivados, assim como pela confirmação de cinco pelo critério de clivagem coerente. Observamos também 3 oxidações (1 confirmada) e duas acetilações (as duas confirmadas).

#### 4.5.3.d) *Tubulin*

No *spot* 582 foi identificada três proteínas, sendo elas: *Tubulin alpha 1B chain\_Human (TBA1B)*, *Tubulin alpha 4A chain (TBA4A)* e *Tubulin alpha 1A chain (TBA1A)*, cuja massa experimental foi de 57972Da e pI de 5,03.

Essas três proteínas identificadas apresentam poucas variações entre suas sequências, pelo fato de serem da mesma família, onde foi observado variação mínima de massa molecular, pI, *score*, porcentagem de cobertura e o número de peptídeos

encontrados (tabela 14), assim como nenhuma modificação nos sítios de oxidação (nas três a quantidade de oxidações se manteve nos mesmos peptídeos) (figura 46).

**TABELA 14.** Diferenças entre as tubulinas identificadas no *spot* 582. *MW-Database* (massa molecular catalogada no banco de dados); *pI-Database* (pI catalogada no banco de dados); *score* (probabilidade de ser a proteína); %PMF (cobertura da proteína):

	TBA1B_Human	TBA4A_Human	TBA1A_Human
<i>MW - Database</i>	50804Da	50634Da	50788Da
<i>PI - Database</i>	4,94	4,95	4,94
<i>Score</i>	183	170	157
<i>% PMF</i>	58%	56%	54%

Figura 55. Identificação de peptídeos por PMF da proteína *Tubulin Alpha 1B chain*.

Start - End	Observed	Mr (expt)	Mr (calc)	mmu	Miss	Sequence
41 - 60	2007.9142	2006.9069	2006.8858	21	0	K.TIGGDDSFNTFFSETGAGK.H
65 - 79	1701.9652	1700.9579	1700.8985	59	0	R.AVFVDLEPTVIDEVR.T
85 - 96	1410.8396	1409.8323	1409.7667	66	0	R.QLFHPEQLITGK.E
85 - 105	2415.1034	2414.0961	2414.1978	-102	1	R.QLFHPEQLITGKEDAANNYAR.G
106 - 121	1842.0593	1841.0520	1841.0047	47	1	R.GHYTIGREIIDLVLDR.I
113 - 121	1085.6340	1084.6267	1084.6128	14	0	K.EIIDLVLDLDR.I
113 - 123	1354.8648	1353.8575	1353.7980	60	1	K.EIIDLVLDLRIR.K
216 - 229	1718.9478	1717.9405	1717.8747	66	0	R.NLDIERPTYTNLNR.L
230 - 243	1487.9362	1486.9289	1486.8719	57	0	R.LISQIVSSITASLR.F
244 - 264	2409.1109	2408.1036	2408.2012	-98	0	R.FDGALNVDLTFEQTNLVPYPR.I
265 - 280	1757.0166	1756.0093	1755.9559	53	0	R.IHFPLATYAPVISAEK.A
281 - 304	2750.1630	2749.1557	2749.2840	-128	0	K.AYHEQLSVAEITNACFEPANQMVK.C
281 - 304	2766.1751	2765.1678	2765.2789	-111	0	K.AYHEQLSVAEITNACFEPANQMVK.C Oxidation (M)
312 - 320	1249.5928	1248.5855	1248.5453	40	0	K.YMACLLYR.G
327 - 336	1015.5660	1014.5587	1014.5709	-12	0	K.DVNAAIATIK.T
339 - 352	1740.9202	1739.9129	1739.8454	68	1	K.RSIQFVDCPTGFK.V
340 - 352	1584.8133	1583.8060	1583.7443	62	0	R.SIQFVDCPTGFK.V
353 - 370	1825.0313	1824.0240	1823.9782	46	0	K.VGINYPPTVVGDDLAK.V
374 - 390	1864.9494	1863.9421	1863.8971	45	0	R.AVCMLSNTTAIAEAWAR.L
374 - 390	1880.9410	1879.9337	1879.8920	42	0	R.AVCMLSNTTAIAEAWAR.L Oxidation (M)
391 - 401	1380.7566	1379.7493	1379.6907	59	1	R.LDHKFDLMYAK.R
391 - 401	1396.7592	1395.7519	1395.6857	66	1	R.LDHKFDLMYAK.R Oxidation (M)
403 - 422	2329.9545	2328.9472	2329.0110	-64	0	R.AFVHWYVGEEMEGEFSEAR.E
403 - 422	2345.9340	2344.9267	2345.0059	-79	0	R.AFVHWYVGEEMEGEFSEAR.E Oxidation (M)

Figura 56. Alinhamento das proteínas TBA1B, TBA4A e TBA1A. Os aminoácidos que estão circulado em azul nas sequências das proteínas TBA4A e TBA1A são diferentes quando comparados com TBA1B. Os aminoácidos circulos em verde (TBA1A) estão diferentes em relação a TBA4A.

TBA1B\_HUMAN

```

1 MRECISIHVG QAGVQIGNAC WELYCLEHGI QPDGQMPSDK TIGGGDDSFN
51 TFFSETGAGK HVPRAVFVDL EPTVIDEVRT GTYRQLFHPE QLITGKEDAA
101 NNYARGHYTI GKEIIDLVLD RIRKLDQCT GLQGFLVFHS FGGGTGSGFT
151 SLLMERLSVD YGKSKLEFS IYPAPQVSTA VVEPYNSILT THITTLEHSDC
201 AFMVDNEAIY DICRRNLDIE RPTYTNLNL ISQIVSSITA SLRFDGALNV
251 DLTEFQTNLV PYPRIHFPLA TYAPVISA EK AYHEQLSVAE ITNACFEPAN
301 QMVKCDPRHG KYMACCLLYR GDVVPKDVNA AIATIKTKRS IQFVDWCPTG
351 FKVGINYQPP TVVPGGDLAK VQRAVCMLSN TTAIAEAWAR LDHKFDLMYA
401 KRAFVHWYVG EGMEEGEFSE AREDMAALEK DYEEVGVDSV EGE GEEGEE
451 Y

```

TBA4A\_HUMAN

```

1 MRECISVHVG QAGVQIGNAC WELYCLEHGI QPDGQMPSDK TIGGGDDSEF
51 TFFCETGAGK HVPRAVFVDL EPTVIDEVRT GTYRQLFHPE QLITGKEDAA
101 NNYARGHYTI GKEIIDLVLD RIRKLDQCT GLQGFLVFHS FGGGTGSGFT
151 SLLMERLSVD YGKSKLEFS IYPAPQVSTA VVEPYNSILT THITTLEHSDC
201 AFMVDNEAIY DICRRNLDIE RPTYTNLNL ISQIVSSITA SLRFDGALNV
251 DLTEFQTNLV PYPRIHFPLA TYAPVISA EK AYHEQLSVAE ITNACFEPAN
301 QMVKCDPRHG KYMACCLLYR GDVVPKDVNA AIATIKTKRS IQFVDWCPTG
351 FKVGINYQPP TVVPGGDLAK VQRAVCMLSN TTAIAEAWAR LDHKFDLMYA
401 KRAFVHWYVG EGMEEGEFSE AREDMAALEK DYEEVGVDSV EGE GEEGEE

```

TBA1A\_HUMAN

```

1 MRECISIHVG QAGVQIGNAC WELYCLEHGI QPDGQMPSDK TIGGGDDSEF
51 TFFSETGAGK HVPRAVFVDL EPTVIDEVRT GTYRQLFHPE QLITGKEDAA
101 NNYARGHYTI GKEIIDLVLD RIRKLDQCT GLQGFLVFHS FGGGTGSGFT
151 SLLMERLSVD YGKSKLEFS IYPAPQVSTA VVEPYNSILT THITTLEHSDC
201 AFMVDNEAIY DICRRNLDIE RPTYTNLNL ISQIVSSITA SLRFDGALNV
251 DLTEFQTNLV PYPRIHFPLA TYAPVISA EK AYHEQLSVAE ITNACFEPAN
301 QMVKCDPRHG KYMACCLLYR GDVVPKDVNA AIATIKTKRS IQFVDWCPTG
351 FKVGINYQPP TVVPGGDLAK VQRAVCMLSN TTAIAEAWAR LDHKFDLMYA
401 KRAFVHWYVG EGMEEGEFSE AREDMAALEK DYEEVGVDSV EGE GEEGEE
451 Y

```

O citoesqueleto dos neutrófilos é formado por um conjunto de proteínas estruturais, já citadas anteriormente, responsáveis por processos essenciais como quimiotaxia, adesão, fagocitose, exocitose e desgranulação. Os microtúbulos são constituídos por polímeros de tubulinas  $\alpha$  e  $\beta$  que se dissociam no sentido cauda-cabeça e também lateralmente formando tubos ocos. Segundo Verhey (Verhey, 2007), os níveis elevados de GMPc estimula a movimentação dos microtúbulos no sentido de conduzirem os grânulos para a membrana promovendo o processo de desgranulação em neutrófilos ativados.

Estudos com microtúbulos foram realizados em neutrófilos para avaliar a funcionalidade dos mesmos no processo de produção de espécies reativas de oxigênio.

Jifi Vrba e colaboradores (Vrba, 2004), relataram que neutrófilos ativados com fMLP e posteriormente tratados com a substância colchicina (promove o rompimento dos microtúbulos) não apresentaram alterações na produção de ROS, isto é, a colchicina não afetou o funcionamento normal da NADPH oxidase.

A movimentação dos microtúbulos dentro dos neutrófilos gera controvérsias. Ao mesmo tempo que alguns autores (Rothwell, 1989) relatam que os microtúbulos não influenciam no processo de desgranulação, estudos mais recentes (Verhey, 2007) apontam que durante a ativação de neutrófilos com fMLP, os microtúbulos aumentam tanto em número como em comprimento promovendo a secreção dos grânulos, sendo comprovado por microscopia eletrônica. Esse mesmo ensaio mostrou que os microtúbulos possuem configuração radial no sentido centro celular-membrana plasmática.

Outro trabalho evidenciou a função conjunta entre microtúbulos e filamentos intermediários. Durante a fragmentação dos filamentos intermediários, os resíduos fragmentados se posicionam ao redor do núcleo de forma que posteriormente possam ser reconstituídos. Esse processo de movimentação dos fragmentos de filamentos intermediários e sua reconstituição são orientados pelos microtúbulos (Martys, 1999).

Para o *spot 582 (Tubulin)* a resolução do gel de 50 µg de proteínas não foi suficiente para que as proteínas fossem separadas pelo gel bidimensional. Apesar de conseguir identificar as proteínas separadamente por PMF, não foi possível especificar a qual delas se atribui a expressão diferencial durante a ativação com fMLP, tendo em vista que as proteínas apresentam massa moleculares muito próximas sendo difícil separá-las dentro dos critérios de corrida eletroforética adotado nesse trabalho.

#### 4.5.4. Proteínas com expressão aumentada para fMLP

**TABELA 15.** Proteínas Identificadas com Expressão aumentada para fMLP. Tabela com os dados da proteína: *Match ID* (identificação do número do *spot* do gel Master), *Database ID* (identificação da proteína no banco de dados), *MW Database/ Gel* (massa molecular oriunda do banco de dados/massa molecular oriunda do gel experimental), *pI* (*pI* oriunda do banco de dados/ *pI* oriunda do banco de dados) e dados dos critérios de validação: *Score PMF* ( cálculo baseado no Mowse), *PMF C%* (porcentagem da cobertura da proteína pelo PMF), *Peptídeos PMF* (quantidade de peptídeos identificados), *Número clivagem perdida/confirm.* (número de clivagens que a tripsina não quebrou), *Clivagem Coerente* (número de clivagens trípticas), *Acetilação/Confirm.* (quantidade de aminoácidos acetilados/ confirmação da acetilação), *Oxidação/Confirm.* (quantidade de aminoácidos oxidados/ confirmação da oxidação).

Match ID	Database ID	MW Database / Gel	pI Database / Gel	Score PMF	PMF C%	Peptídeos PMF	Número clivagem perdida/ confirm.	Clivagem Coerente	Acetilação/ confirm.	Oxidação/ confirm.
521	Vimentin <a href="#">gi62414289</a>	53676/ 61623	5,06/ 5,03	201	49%	25	9/7	8	0/0	4/3
741	Septin 11 <a href="#">gi119626208</a>	51543/ 49851	6,40/ 4,92	92	20%	13	10/4	10	1/1	1/0
982	CLIC 4 <a href="#">gi7330335</a>	28962/ 38093	5,45/ 5,60	76	41%	9	6/3	5	0/0	1/1

##### 4.5.4.a) Vimentin (*spot* 521)

A *Vimentin* foi identificada por PMF com identificação de 25 peptídeos e pelo sequenciamento de um deles (R.ISLPLPNFSSLNLR.E). A probabilidade de confirmação dessa proteína foi de 49%, com cobertura principalmente na região C-terminal e *score* de 201. A análise da sequencia da proteína mostrou um total de nove clivagens perdidas com confirmação de sete pelo método de repetição de peptídeo clivado e confirmação de oito com clivagem coerente. Foram observados quatro sítios de oxidações, onde 3 tiveram confirmação pelo aparecimento de peptídeo igual sem oxidação. Foi escolhido o pico com maior intensidade para a fragmentação, onde se obteve resíduos de 14 aminoácidos com *score* de 71. De acordo com os critérios de avaliações do método MS/MS foram observados, em um total de 14 resíduos de aminoácidos, a identificação de 11 na série Y e quatro na série B (Tabela 16).

Figura 57. Peptídeos identificados por PMF da proteína *Vimentin*.

Start - End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	ppm	Miss	Sequence
29 - 36	914.4354	913.4281	913.4505	-24	0	R.SVVTSTR.T
37 - 50	1495.7976	1494.7903	1494.7790	8	0	R.TYSLGSRPSTSR.S
51 - 64	1428.7555	1427.7482	1427.7045	31	0	R.SLYASSPGGVYATR.S
79 - 97	2126.0711	2125.0638	2125.0579	3	0	R.LLQDSVDFSLADAINTEFK.N
105 - 113	1115.4916	1114.4843	1114.5618	-70	0	K.VELQELNDR.F
114 - 120	870.4908	869.4836	869.4283	64	0	R.FANYIDK.V
114 - 122	1125.5145	1124.5072	1124.5978	-81	1	R.FANYIDKVR.F
144 - 155	1497.8325	1496.8252	1496.6929	88	1	K.SRLGDLYEEMR.E
146 - 155	1270.6472	1269.6399	1269.5547	67	0	R.LGDLYEEMR.E Oxidation (M)
160 - 168	1060.4702	1059.4630	1059.5197	-54	0	R.QVDQLTNDK.A
176 - 184	1076.5616	1075.5543	1075.4968	54	0	R.DNLAEDIMR.L
176 - 186	1345.6211	1344.6138	1344.6819	-51	1	R.DNLAEDIMRLR.E
187 - 196	1319.6687	1318.6615	1318.6551	5	1	R.EKLQEMLQR.E Oxidation (M)
189 - 207	2366.9823	2365.9750	2366.1172	-60	1	K.LQEEMLQREEAENTLQSFRR.Q Oxidation (M)
208 - 217	1088.5921	1087.5849	1087.5258	54	0	R.QVDNASLAR.L
271 - 282	1393.8063	1392.7990	1392.6997	71	1	R.DVRQQYESVAAK.N
293 - 304	1308.6824	1307.6751	1307.6469	22	1	K.SKFADLSEAAANR.N
295 - 304	1093.5368	1092.5295	1092.5200	9	0	K.FADLSEAAANR.N
305 - 313	1029.5984	1028.5911	1028.5363	53	1	R.NNDALRQAK.Q
335 - 342	905.4096	904.4024	904.4250	-25	0	K.GTNESLER.Q
335 - 345	1320.6259	1319.6186	1319.6252	-5	1	K.GTNESLERQMR.E
391 - 401	1311.6571	1310.6498	1310.6540	-3	0	K.MALDIEIATYR.K Oxidation (M)
403 - 410	932.4165	931.4092	931.4610	-56	0	K.LLEGEESR.I
411 - 424	1570.8916	1569.8843	1569.8878	-2	0	R.ISLPLPNFSSLNLR.E
451 - 466	1836.8209	1835.8136	1835.7922	12	0	R.DGQVINETSQHDDLE.-

**Tabela16.** Sequenciamento do peptídeo R.ISLPLPNFSSLNLR.E. Identificação de 11 aminoácidos na série Y(em roxo) e 4 aminoácidos na série B (em alaranjado).

#	Immon.	a	a*	a <sup>0</sup>	b	b*	b <sup>0</sup>	Seq.	v	w	y	y*	y <sup>0</sup>	#
1	86.0964	86.0964			114.0913			I						14
2	60.0444	173.1285		155.1179	201.1234		183.1128	S	1425.7849	1424.7896	1457.8111	1440.7845	1439.8005	13
3	86.0964	286.2125		268.2020	314.2074		296.1969	L	1312.7008	1311.7056	1370.7791	1353.7525	1352.7685	12
4	70.0651	383.2653		365.2547	411.2602		393.2496	P	1215.6480	1214.6528	1257.6950	1240.6684	1239.6844	11
5	86.0964	496.3493		478.3388	524.3443		506.3337	L	1102.5640	1101.5687	1160.6422	1143.6157	1142.6317	10
6	70.0651	593.4021		575.3915	621.3970		603.3865	P	1005.5112	1004.5160	1047.5582	1030.5316	1029.5476	9
7	87.0553	707.4450	690.4185	689.4345	735.4400	718.4134	717.4294	N	891.4683	890.4730	950.5054	933.4789	932.4948	8
8	120.0808	854.5135	837.4869	836.5029	882.5084	865.4818	864.4978	F	744.3999		836.4625	819.4359	818.4519	7
9	60.0444	941.5455	924.5189	923.5349	969.5404	952.5138	951.5298	S	657.3678	656.3726	689.3941	672.3675	671.3835	6
10	60.0444	1028.5775	1011.5510	1010.5669	1056.5724	1039.5459	1038.5619	S	570.3358	569.3406	602.3620	585.3355	584.3515	5
11	86.0964	1141.6616	1124.6350	1123.6510	1169.6565	1152.6299	1151.6459	L	457.2518	456.2565	515.3300	498.3035		4
12	87.0553	1255.7045	1238.6779	1237.6939	1283.6994	1266.6729	1265.6888	N	343.2088	342.2136	402.2459	385.2194		3
13	86.0964	1368.7886	1351.7620	1350.7780	1396.7835	1379.7569	1378.7729	L	230.1248	229.1295	288.2030	271.1765		2
14	129.1135							R	74.0237	73.0284	175.1190	158.0924		1

Os neutrófilos possuem um citoesqueleto formado por três componentes principais: microfilamentos, microtúbulos e filamentos intermediários, compostos por actina, tubulina e vimentina, respectivamente, dentre outras moléculas. Todos os componentes estão associados a inúmeras proteínas, que em resposta a estímulos externos agem coordenadamente promovendo a migração, adesão, fagocitose, movimentação de vesículas e desgranulação.

A *Vimentin* é um filamento intermediário que compõe o citoesqueleto de neutrófilos e pode ser ativada pelo processo de fosforilação pela proteína quinase G (possui um domínio que catalisa a transferência de fosfato do ATP para o grupo

hidroxila de uma cadeia lateral de serina/treonina da proteína alvo. Sua função ainda não está completamente esclarecida, porém Todd A. Wyatt (Wyatt, 1991) observaram que após a fosforilação da vimentina, a mesma é fragmentada e montada transitoriamente ao redor do núcleo. A redistribuição da vimentina após ativação dos neutrófilos com fMLP, proporciona os eventos relacionados principalmente com a exocitose do conteúdo granular.

#### 4.5.4.b) *Septin 11 (spot 741)*

As septinas são membros das proteínas filamentosas que possui uma região polibásica conservada adjacente ao domínio GTPase que parece ser responsável pela interação com fosfatidilinositídeos, tais como PIP2. A presença desses dois domínios, mostra a capacidade reguladora dessa família de proteínas. Yi-Wei Huang observou em 2008, que durante a fagocitose (utilizando esferas de látex revestidas por IgG) mediada por FcγR ocorreria o acúmulo de *septin 2* e *11* em fagócitos, incluindo neutrófilos prematuros e macrófagos. O tempo de acúmulo estaria intimamente relacionada com o aumento de PIP2 e actina, onde observou-se uma diminuição acentuada (50% a 70%) da fagocitose pela depleção de *septin 2* ou *11* por RNA de interferência.

Em 2004, Constantino Martinez e Jerry Ware (Martinez, 2004) relataram que as septinas de mamíferos estariam formando, *in vitro*, complexos hetero-oligoméricos montados a partir de diferentes membros da família septina onde observou-se que a *septin 5* humana se ligava a *septin 8* com alta especificidade. Porém pouco se sabe sobre como essas proteínas agem para formar tais complexos ou como podem ser reguladas.

Estudos recentes com cérebro de ratos sugerem que a *septin 11* contribui para a arquitetura do citoesqueleto onde a co-localização da *septin 11* com microtúbulos e actina, modulam a dinâmica dos microtúbulos e a organização da actina (Li, 2009). Yi-Wei Huang sugere que as septinas atuam na reorganização das actinas por meio de proteínas adaptadoras durante o recrutamento inicial dos fagossomos, porém a sua interação com microtúbulos parece não está relacionada com a movimentação dos fagossomos maduros mas sim em outros processos que envolvem a dinâmica dos microtúbulos como no tráfego de vesículas.

A identificação da proteína mostrou uma pequena diferença de 1692 Da entre a proteína experimental e teórica (obtida no banco de dados), sem diferença significativa

do pI (1,48). Essa diferença em ambos os casos aumenta a possibilidade de confirmação da proteína, onde a probabilidade de confirmação pela identificação de 13 peptídeos em um total de 742 aminoácidos, foi de 20% com *score* de 92. Foram observadas 13 clivagens perdidas sendo confirmadas pelo método de clivagem coerente, uma oxidação e outra acetilação.

Figura 58. Identificação de peptídeos por PMF da proteína *Septin 11*.

Start - End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	ppm	Miss	Sequence
1 - 11	1365.6472	1364.6399	1364.7347	-69	1	-.MEERKPAHVLR.S
1 - 11	1407.7199	1406.7126	1406.7452	-23	1	-.MEERKPAHVLR.S Acetyl (Protein N-term)
2 - 11	1234.6543	1233.6471	1233.6942	-38	1	M.EERKPAHVLR.S
12 - 24	1605.7931	1604.7858	1604.7657	13	1	R.SFKYAAFMNEELR.N
76 - 91	1796.8036	1795.7963	1795.8853	-50	1	K.FESDPATHNEPGVRLK.A
147 - 156	1308.6870	1307.6797	1307.6371	33	1	K.RSLFNYHDTR.I
290 - 296	876.3425	875.3352	875.4171	-93	0	R.VNMEDLR.E
303 - 308	880.4603	879.4530	879.4239	33	0	R.HYELYR.R
303 - 309	1036.4820	1035.4748	1035.5250	-48	1	R.HYELYRR.C
312 - 318	853.3663	852.3590	852.4051	-54	0	K.LEEMGFK.D
347 - 352	837.3525	836.3452	836.3698	-29	1	K.KEEEMR.Q Oxidation (M)
361 - 367	846.3771	845.3698	845.4494	-94	1	K.EKEAELK.E
382 - 388	927.4665	926.4592	926.4570	2	1	K.RTHQEELK.K

#### 4.5.4.c) CLIC 4 (*spot* 982)

Assim como os canais do tipo CLIC 1, citados anteriormente, o tipo CLIC4 pertence a uma classificação de canais de cloreto presente em uma quantidade grande de células, incluindo neutrófilos humanos. Segundo H.Singh (Singh, 2007) a função de CLIC 4 parece contribuir na compensação de canal iônico para facilitar a fusão de vesículas intracelulares e ao mesmo tempo influenciar no comportamento de outros canais iônicos por meio da interação com proteínas do citoesqueleto. A pesquisa em cérebros de ratos evidenciou a interação de CLIC 4 com actina de um complexo multiproteico, assim como a pesquisa em placenta humana relatando a interação de CLIC 5 com um complexo rico em actina presente em microvilosidades placentárias. Outra pesquisa realizada levantou a questão que os canais de ânion bloqueados têm a capacidade de inibir a secreção de enzimas lisossomais de neutrófilos humanos ativados por imunocomplexos (Busetto et al, 2007).

Figura 59. Identificação de peptídeos por PMF da proteína CLIC 4.

Start - End	Observed	Mr (expt)	Mr (calc)	ppm	Miss	Sequence
2 - 11	1043.6384	1042.6311	1042.5845	45	0	M.ALSMPLNGLK.E
2 - 15	1560.7637	1559.7564	1559.7865	-19	1	M.ALSMPLNGLKEEDK.E Oxidation (M)
41 - 60	2309.1682	2308.1609	2308.3269	-72	1	R.LFMILWLKGVVFSVTTVDLKR.R
49 - 61	1420.7252	1419.7179	1419.8086	-64	1	K.GVVFVSTTVDLKR.K
131 - 146	1796.8786	1795.8713	1795.9540	-46	1	K.NSRPEANEALERGLLK.T
147 - 172	3049.6545	3048.6472	3048.4485	65	1	K.TLQKLDYLNPLPDEIDENSMDIK.F
213 - 219	892.4907	891.4834	891.4273	63	0	K.EMTGIWR.Y
220 - 227	987.4476	986.4403	986.4821	-42	0	R.YLTNAYS.R.D
239 - 250	1379.6404	1378.6331	1378.7092	-55	1	K.EVEIAYSQVAKR.L

A proteína experimental teve um aumento da massa molecular de 9111Da quando comparada a massa molecular da proteína catalogada no banco de dados. Porém não houve diferença significativa do pI (0,15). Foram identificados 9 peptídeos em 543 resíduos de aminoácidos da proteína catalogada, cuja cobertura chegou a 41% e *score* de 76. Os peptídeos encontrados estão presentes tanto na região N-terminal como na C-terminal. Dentre as seis clivagens perdidas, três foram confirmadas por coerência da ação enzimática, como mostrado nos critérios de validação. Na sequência teórica foi observada uma oxidação, sendo confirmada pelo aparecimento de outro peptídeo com a mesma sequência, porém sem oxidação.

#### 4.6. Correlação entre proteínas identificadas e a cascata de sinalização de neutrófilos ativadas com fMLP

Os neutrófilos são ativados por várias substâncias, entre elas o fMLP que se apresenta em tecidos humanos em caso de lesão ou infecção por bactérias Gram-positivas. O primeiro contato com os receptores de peptídeos formilados (FPR) de neutrófilos desencadeia uma série de cascatas de sinalização resultando na adesão e transmigração provocada pela reorganização do citoesqueleto, produção de espécies reativas de oxigênio e substâncias quimiotáticas, desgranulação, exocitose e, por fim, apoptose.

Segundo alguns autores essa sinalização ocorre principalmente por meio da proteína G acoplada ao receptor do tipo serpentina ou FPR. A proteína dissociada G $\alpha$ GTP atua na ativação da Fosfatidilinositol 3 Quinase (PI3K) que irá transformar PIP2 em PIP3, resultando no direcionamento e migração durante a quimiotaxia influenciando na polimerização e despolimerização da actina. O PIP3 produzido irá interagir com proteínas efetoras chamadas *Zinc Finger* por meio dos domínios *FYVE* e promover a fusão das vesículas com a membrana plasmática durante a desgranulação. A expressão diminuída dessa proteína *Zinc Finger* (figura 60. 1) para fMLP em relação ao

quiescente, sugere o envolvimento de outras proteínas da cascata do fMLP na ativação dos neutrófilos como por exemplo a ativação de ERK1/ERK2 e p38MAPK. Ambas ativam p47phox, porém somente a ativação de ERK1/ERK2 (via ativação de RAS) está relacionada a ativação da subunidade  $\alpha$  da proteína G. Contudo pouco se sabe sobre o envolvimento da proteína *Zinc Finger* na ativação de neutrófilos ativados com fMLP.

Já a porção efetora  $\beta\gamma$  da proteína G é responsável tanto pela ativação da PLC $\beta$  para a formação de segundos mensageiros como DAG e IP3, como pela ativação de MEKK 3, MEKK4 e MEKK6. Essas três enzimas da família MEKK estão relacionadas com a fosforilação da p38 MAPK, que por sua vez fosforila a p47phox (início da montagem da NADPH oxidase).

Ambos os grupos de subunidade da proteína G (efetora  $\beta\gamma$ ) são envolvidas indiretamente no processo de fosforilação do componente citoplasmático p47phox, resultando na ativação do complexo NADPH oxidase e na produção de espécies reativas de oxigênio.

Após a ativação com fMLP identificamos uma proteína chamada PITP- $\beta$  (*Phosphatidylinositol Transfer Protein- $\beta$* ) (figura 60. 2) responsável pelo transporte de segundos mensageiros com alta especificidade para fosfatidilcolina e fosfatidilinositol. Encontramos essa isoforma somente em neutrófilos ativados com fMLP, fazendo o transporte tanto no Complexo de Golgi quanto no meio citoplasmático. Pode-se sugerir uma ação funcional em relação a essa movimentação de fosfatidilcolina para a membrana plasmática no intuito de manter os níveis de DAG, pois segundo Bruno Segui (Segui, 2002) uma outra enzima chamada esfingomielin sintase transfere a fosfocolina da fosfatidilcolina para a ceramida gerando DAG. Talvez seja uma maneira que neutrófilos infectados por bactérias Gram-positivas, utilizem para continuar ativados.

Durante o processo inicial de ativação, os neutrófilos aumentam a expressão de receptores de firme adesão pela mobilização intracelular das vesículas secretoras, seguido pelo aumento da permeabilidade vascular e a transmigração. Esses processos de desgranulação e transmigração requerem a reorganização do citoesqueleto, que envolvem muitas proteínas efetoras. Destacamos inicialmente o processo de reorganização do citoesqueleto na mobilização das vesículas secretoras, envolvendo a participação concomitante de organelas celulares, onde o Reticulo Endoplasmático, compartimento lisossomal e o Complexo de Golgi trabalham em uma rede íntima, utilizando sinalizadores durante o tráfico intracelular como proteínas da família

RabGTPases. A ativação com fMLP mostrou duas proteínas exclusivas para tal sinalização ainda não descritas em neutrófilos, sendo elas a *Rab 14 Human* (figura 60. 3) que até então foi achada em cérebro de rato atuando no tráfego de grânulos entre Retículo Endoplasmático e compartimento lisossomal e *Rabaptin GTPase Rab-2* (figura 60. 4) que pode atuar no transporte de grânulos do Retículo Endoplasmático para o Complexo de Golgi, tendo como base a ação da Rab2.

A reorganização do citoesqueleto envolve também a mobilidade dos neutrófilos, desde a transmigração até diapedese para locais de injúria. Neutrófilos ativados modificam estruturas formadas por microtúbulos, microfilamentos e filamentos intermediários assim como seus efetores. Foram identificadas como exclusivas de neutrófilos ativados por fMLP a proteína *scinderin* (figura 60. 5), que atua na fragmentação da actina durante a exocitose de grânulos e vesículas e a Chaperonina contendo TCP-1-subunidade 3 (CCT 3) (figura 60. 6) que atua no enovelamento de várias proteínas entre elas as actinas, tubulinas e septinas. Além de estar envolvida no enovelamento da septina, cogita-se a possibilidade de CCT3 estar relacionada com a modulação da mesma. A *septin 11* (figura 60. 7) foi identificada com expressão aumentada em neutrófilos ativados com fMLP, até então encontrada em estudos envolvendo sinalização neuronal em ratos, cogitando a possibilidade da sua atuação na modulação da dinâmica de microtúbulos e na reorganização da actina durante a intensa desgranulação. Ainda nesse grupo de expressão aumentada evidenciamos um filamento intermediário chamado *Vimentin* (figura 60. 8), que atua de forma similar à actina, sendo fragmentadas durante o processo de exocitose dos grânulos e vesículas. Esse processo de exocitose envolve tanto a fragmentação de actinas quanto de vimentina em locais pontuais, porém nem todas são de fato fragmentadas em sua totalidade, sendo justificada a identificação da proteína íntegra. Outros componentes do citoesqueleto chamados tubulinas  $\alpha$  e  $\beta$  (figura 60. 9), interagem com filamentos intermediários e promovem a desgranulação por meio da fragmentação dos filamentos intermediários anteriormente mencionados.

Em neutrófilos quiescentes a produção de leucotrienos em baixas concentrações é comum, tendo em vista que os mesmos podem influenciar no aumento do tempo de vida dos neutrófilos ativados. A identificação de uma F-actina chamada *Coactosin-Like Protein* (atua indiretamente na ativação da enzima 5-Lipoxigenase responsável pela conversão de ácido araquidônico em LTB<sub>4</sub>) (figura 60. 10) exclusiva em neutrófilos quiescentes em relação a neutrófilos ativados com fMLP, veio a levantar

uma hipótese:esses níveis baixos de leucotrienos e seus intermediários estariam envolvidos no tempo de vida normal dos neutrófilos, mantendo-os tempo suficiente na circulação, tendo em vista que essa proteína pode ser encontrada em outro tipo de estímulo. A expressão exclusiva em neutrófilos quiescentes da *Coactosin-Like protein* não interfere no mecanismo de produção de leucotrienos em neutrófilos ativados por fMLP, pois a enzima responsável pela formação de leucotrienos não está sujeita somente a regulação por coactosina.

Podemos citar a participação da proteína pirofosfatase, exclusiva de neutrófilo quiescente, durante os processos envolvidos na obtenção de compostos energéticos (hidrólise de PPi em Pi) para o funcionamento normal dos neutrófilos (figura 60. 11) não aparecendo em neutrófilos ativados com fMLP.

Foram encontradas também outras duas proteínas da mesma família (inseridas na membrana) com expressão aumentada em neutrófilos ativados com fMLP (CLIC-4) (figura 60. 12) e proteínas exclusivas da ativação com fMLP (CLIC-1) (figura 60. 13). Esses canais de cloreto estão presentes na membrana plasmática, nuclear e nas membranas lisossomais dos neutrófilos, mantendo um equilíbrio eletroquímico intracelular, principalmente dentro dos compartimentos lisossomais em resposta ao bombeamento de prótons pelas ATPases. Alguns autores relatam a ação de CLIC-4 durante a fusão de vesículas intracelulares e na interação com proteínas do citoesqueleto.

Duas proteínas foram identificadas, provavelmente atuando nos processos cancerígenos. Uma chamada Proteína Leucêmica Prómielocítica (PML) (figura 60. 14) que foi descoberta em oncogênese de leucemia promielocítica aguda (identificada neste trabalho com expressão diminuída em neutrófilos ativados com fMLP) e a outra chamada *Postmeiotic Segregation Increased 2-Like 3* (PMS2L3) (figura 60.15) utilizada como marcador de reparo celular em células cancerígenas (aqui identificada como exclusiva em neutrófilos quiescentes).

Trabalhos recentes relataram o envolvimento da PMS2L3 em processo de reparo celular durante a meiose e mitose em *E.coli* e *S.cerevisiae*. É a primeira vez que se relata a ação dessa proteína em neutrófilos quiescentes (exclusiva) em relação aos neutrófilos ativados com fMLP. Propõe-se, com base nos dados fornecidos pela sua estrutura, que essa proteína esteja envolvida nos processos de reparo celular com ação direta na dupla fita de DNA, interferindo de forma a suprimir os fatores de transcrição por meio do seu domínio KRAB. Para cogita alguma possível função em neutrófilos

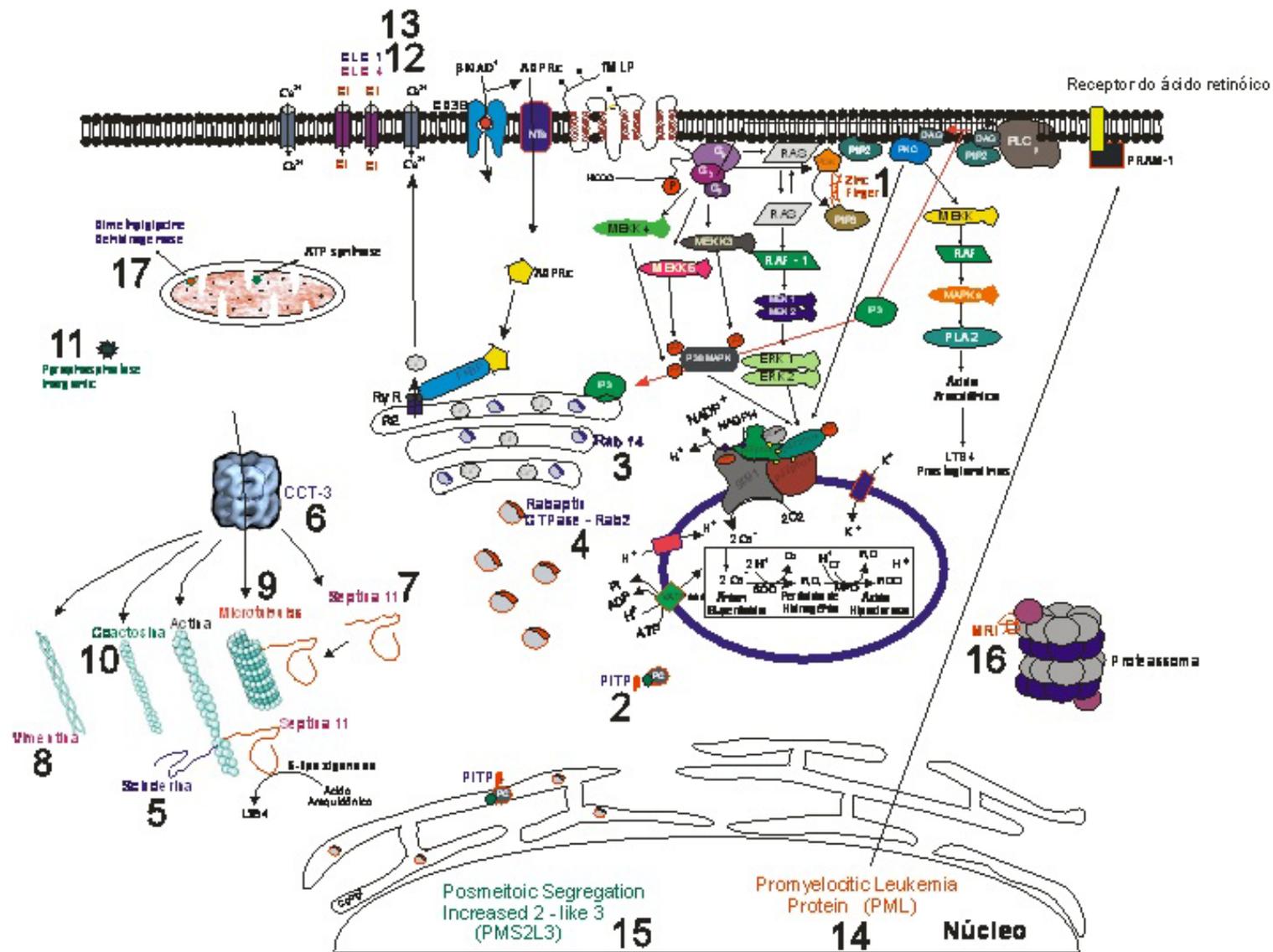
quiescentes é preciso realizar mais experimentos específicos para essa proteína, afim de descobrir não só sua função em neutrófilos mas pelo menos definir de fato sua ação de um modo geral.

Já a PML até então descoberta em leucemia promielocítica aguda, foi identificada com expressão diminuída em neutrófilos humanos ativados *in vitro* com fMLP em relação aos neutrófilos quiescentes. A presença dessa proteína nos neutrófilos parece está envolvida nos processos de amadurecimento e sobrevivência dos mesmos, assim como a Mcl-1. Expressão diminuída em neutrófilos ativados com fMLP é indício do envolvimento dessa proteína na sobrevivência dos neutrófilos, onde em um estágio inicial não ativado (neutrófilos maduros, porém mais jovens) se tem níveis maiores de expressão enquanto que em neutrófilos já ativados tem-se níveis diminuídos (neutrófilos no final da vida, porém ainda antes de entrar em apoptose).

A interação entre neutrófilos e vírus é cada vez mais evidente. A identificação de uma proteína chamada *Modulator of Retrovirus Infection (MRI)* (figura 60. 16) levanta fortes especulações em relação à defesa dos neutrófilos frente a uma infecção viral. A expressão diminuída em neutrófilos ativados com fMLP sugere que após um primeiro contato com peptídeos pertencentes a bactérias Gram-positivas, pode ter desencadeado um processo de sinalização intracelular diminuindo os níveis de expressão de MRI e conseqüentemente promovendo a função bactericida e microbicida dos neutrófilos. Caso a expressão dessa proteína estivesse alta, ocorreria interferência no funcionamento da maquinaria neutrofílica (proteassoma), onde podemos destacar exemplos com a instalação da infecção em pacientes acometidos por vírus. Essa é uma proteína recentemente descoberta e pouco se sabe em relação à sua ação.

A maquinaria mitocondrial é fundamental para o funcionamento normal da célula, desde a produção de ATP até a movimentação de inúmeras substâncias envolvidas em processos essenciais como por exemplo o catabolismo e anabolismo de aminoácidos. A enzima Dimetilglicina Desidrogenase (figura 60. 17) foi identificada em neutrófilos ativados com fMLP (exclusivamente), sendo referida na literatura como presente na matriz mitocondrial. Essa é uma proteína importante para o fornecimento de elétrons e para a formação de alguns aminoácidos como glicina e serina, além de atuarem inibindo a formação de compostos tóxicos para os neutrófilos com formaldeído. A identificação dessa proteína sugere que sua função na ativação por fMLP estaria voltada para a manutenção da integridade mitocondrial deixando os neutrófilos agindo por mais tempo na tentativa de eliminar bactérias Gram-positivas.

FIGURA 60. Cascata de sinalização do fMLP e proteínas identificadas. Proteínas escritas em vermelho - expressão diminuída para fMLP (*Zinc Finger, Microtúbulos, MRI, PML*); proteínas escritas em roxo – expressão aumentada para fMLP (*Septin 11, Vimentin, CLIC 4*); proteínas escritas em azul – exclusivas de fMLP (*PITP-β, Rab14, RabaptinGTPase Rab2, Scinderin, CCT3, CLIC 1*); proteínas escritas em verde – exclusivas de quiescente (*Coactosin-Like Protein, PMS2L3, Pirophosphatase*)



## 5. CONCLUSÕES

A conclusão desse estudo nos possibilitou a identificação de diversas proteínas de neutrófilos ativados com fMLP em comparação com proteínas de neutrófilos não ativados, nos levando à ampliação do conhecimento do sistema que envolve a ativação de neutrófilos frente a uma infecção bacteriana Gram-positiva.

O primeiro método utilizado foi a separação de neutrófilos, um ponto inicial crucial para se obter somente a população separada das demais células sanguíneas. A padronização anteriormente realizada pelo grupo precisou passar por uma longa fase de adaptação do método frente a modificações de densidade da resina (Percoll). Porém mostrou-se um método adequado para a separação fiel dos neutrófilos, vindo a confirmar a obtenção de população pura e viável de neutrófilos, testada por métodos quantitativos e qualitativos.

A análise por citometria de fluxo possibilitou o monitoramento da população de neutrófilos pela suas características morfológicas (tamanho e granulação) imprescindível para avaliar o comportamento desse tipo celular, assim como a análise da captação da 1,2,3 rodamina pelo canal FL1, mostrando a capacidade de produção de peróxido de hidrogênio de células ativadas por fMP, tendo como base neutrófilos ativados com PMA e neutrófilos quiescentes. Outro teste aplicado para a confirmação do processo de separação e ativação é o método qualitativo de redução do NBT que veio a confirmar paralelamente, junto com a citometria, a produção de superóxidos. Ambos os testes foram de fundamental importância para a confirmação que os métodos de separação e ativação funcionaram perfeitamente.

Já a eletroforese nos possibilitou a obtenção de mapas proteômicos passíveis de comparações entre diversas condições obtidas em momentos diferentes. Diferentemente de outras abordagens proteômicas, os dados colhidos no presente trabalho poderão ser comparados a outros estudos já realizados e a realizar, o que permitirá a obtenção de um panorama completo do comportamento de tais proteínas. A resolução bem definida do mapa nas concentrações de 50 µg de proteínas nos possibilitou uma análise mais confiável durante a realização das detecções e pareamentos. Com a ajuda do programa SPSS® 13.0 os dados oriundos do *Image Master* foram analisados estatisticamente de forma confiável, resultando na confirmação dos processos de pareamentos anteriormente realizados.

Por último a análise por espectrometria de massa, assim como a padronização dos métodos de validação por PMF, nos possibilitou a identificação de muitas proteínas até então nunca obtidas destacando-se a proteína *Posmeiotic Segregation Increased 2 Like 3 (PMS2L3)*

e *Rabaptin GTPase Rab 2*. Já as proteínas *Septin 11*, *Chaperonin containing TCP-1\_subunit 3 (CCT-3)* e *Modulator of Retrovirus Infection (MRI)* são descritas pela primeira vez em neutrófilos humanos, de acordo com a bibliografia consultada. As proteínas *Scinderin*; *Promyelocytic Leukemia Protein (PML)*, *Rab 14 Human* e *Zinc Finger-FYVE domain* são destacadas, cuja função ainda não foi diretamente correlacionada à ativação por fMLP. Algumas já anteriormente identificadas em parceria com o *Protein Research Group Southern Denmark University* (Dinamarca) vieram a confirmar o método de padronização realizado pelo Laboratório de Bioquímica e Química de Proteínas da Universidade de Brasília.

Todos esses métodos aplicados foram essenciais para a identificação confiável das proteínas por espectrometria de massa, vindo a contribuir para o esclarecimento das vias de ativação do fMLP auxiliando no entendimento dos neutrófilos em processos inflamatórios.

## 6. PERSPECTIVAS

Com a conclusão deste estudo, podemos traçar metas para o futuro dando continuidade ao presente trabalho, como:

1. Terminar as identificações por PMF das proteínas diferencialmente expressas entre as condições estudadas;
2. Fazer a confirmação com fragmentação para proteínas cuja validação ainda apresente alguma dúvida;
3. Fazer o mapa proteômico de proteínas básicas, assim como identificação e confirmação de proteínas por espectrometria de massa;
4. Fazer a análise por gel bidimensional de proteínas do exocitado e comparar com os mapas proteômicos de neutrófilos íntegros ativado com fMLP;
5. Avaliar as proteínas que poderão ser alvos para futuros marcadores moleculares, com uma análise mais detalhada da variação populacional dessas proteínas.
6. Fazer o estudo comparativo das proteínas de neutrófilos ativado com fMLP e de proteínas de neutrófilos ativado e tratado com anti-inflamatório;
7. Comparar a ativação por fMLP à ativação por outros agentes, como PAF e PMA, cujos mapas bidimensionais já foram desenvolvidos em nosso grupo;
8. Comparar o estímulo *in vitro* a situações *in vivo* que apresentem neutrófilos estimulados. Como é o caso de indivíduos politraumatizados, estudo em andamento no grupo de pesquisas.

## 7. REFERÊNCIAS

Abas, Abul & Lichtman, Andrew. Imunologia Celular e Molecular. Elsevier. Rio de Janeiro.2005.

Agarwal, S., et al. Isolation , characterization ans genetic complementation of a cellular mutant resistant to retroviral infection. PNAS. 2006.

Allen, Lee & Ann H. Mechanisms of Pathogenesis. Elsevier. 2003

Almeida, Roque Pacheco de. **Azurexidina, proteína de neutrófilo com função antibiótica**. Universidade Federal da Bahia. Faculdade de medicina para obtenção do grau de doutor. Salvador, 1997.

Akgul, C., D.A, et al. Molecular Control of Neutrophil apoptosis. FEBS Letters, v.487, n.3, Jan 5, p.318-22. 2001.

AQUINO, E.N. Análise Proteômica Comparativa entre Neutrófilos Quiescentes e Estimulados com Fator de Agregação Plaquetária. Dissertação de Mestrado. Universidade de Brasília, 2008.

Audi, N., et al. Activation of MEKK by fMLP in human neutrophils. The Journal of Biological Chemistry.1996.

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

BERRYMAN, M. & BRETSCHER,A. Identification of a novel member of the chloride intracellular channel gene family (CLIC-5) that associates with actin cytoskeleton of placental microvilli. Molecular Biology of the Cell, v.11, p.1509-1521.2000.

Biron, D., B. C, et al. The pitfalls of proteomics experiments without the correct use of bioinformatics tools. Proteomics, v.6, n.20, p.5577-5596. 2006.

Binzak, B., Wevers. R, et al. Cloning of Dimethylglycine Dehydrogenase and a new human inborn error of metabolism, dimethylglycine dehydrogenase deficiency. The American journal of Human Genetics, p.839-847. 2001.

Borregaard, Niels & Cowland, Jack B. Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. Blood Journal. 2007.

Brown, R., Lever. R, et al. Effects od heparin and related molecules upon neutrophil aggregation and elastase release in vitro. British Journal of Pharmacology, v.139, p.845-853. 2003.

Busetto, S., et al. Chloride movements in human neutrophils during phagocytosis: characterization and relationship to granule release. The Journal of Immunology. 2007.

Cassatella, M.A. The neutrophil-An emerging regulator of inflammatory and immune response. Karger. 2003.

Carvalho, A.T. Estudo da interação entre monócitos humanos e vírus dengue sorotipo 2: vias de ativação e mecanismos de apoptose. Dissertação de Mestrado. Instituto Oswaldo Cruz. 2008.

Castillo, D., Vitale. A, et al.  $Ca^{2+}$  and pH determine the interaction of chromaffin cell scinderin with phosphatidylserine 4,5 biphosphate and its cellular distribution during nicotinic receptor stimulation and protein kinase C activation. J. Cell Biology, p. 797-810. 1992.

Castro, M., et al. Proteome Analysis of Resting Human Neutrophils. Protein and Peptide Letters. Brasil, 2006.

Chao, D., Korsmeyer. S, et al. Bcl-2 Family: regulators of cell death. Review of Immunology, p.395-419. 1998.

Chabannes, B., Hosni. R, et al. Leukotriene B4 levels from stimulated neutrophils from healthy and allergic subjects: effects of platelets and exogenous arachidonic acid. Elsevier, p.47-54. 2008.

Christophe, T., Karlsson. A, et al. The synthetic peptide Trp-lys-tyr-met-val-met-NH<sub>2</sub> specifically activates neutrophils through FPRL1/Lipoxin A4 receptors and is an agonist for the orphan monocyte-expressed chemoattractant receptor FPRL2. The Journal of Biological Chemistry, p.21585-21593. 2001.

Chistoph, R., et al . Gelatinase mediate neutrophil recruitment in vivo:evidence for stimulus specificity and a critical role in collagen IV remodeling. Journal of Leukocyte Biology, v.83. 2008.

Clemens, R., et al. PRAM-1 is required for optimal integrin dependent neutrophil function. Molecular and Cellular Biology. 2004.

Dahlgren, C., et al. Respiratory burst in human neutrophils. Journal of Immunological Methods. Elsevier. 1999.

Dalpiaz, A., et al. Phe-D-Leu-Phe-D-Leu-Phe derivatives as formylpeptide receptor antagonists in human neutrophils: cellular and conformational aspects. Elsevier, p 27-39. 1999.

Damiani, D. Mecanismos da Apoptose. Manual de Patologia e Citopatologia Oncológica. 2004.

Darzynkiewicz, Z., H.A, et al. *Methods in Cell Biology*, Academic Press 3, v. 63. 2001.

Devlin, Thomas. Manual de bioquímica com correlações clínicas. Editora Blücher. Brasil, 2007.

- Dewas, C., et al. The mitogen activated protein kinase extracellular signal – regulated kinase 1/2 (ERK1/2) pathways is involved in formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine – induced p47 phox phosphorylation in human neutrophils. The American association of Immunologists. 2000.
- Diacovich, Lautaro & Gorvel, Pierre. Bacterial manipulation of innate immunity to promote infection. Elsevier, v.8. 2010.
- Dinubile, M & Huang, Sherry. High concentrations of phosphatidylinositol 4,5 biphosphate may promote actin filaments growth by three potential mechanisms: inhibiting capping by neutrophil lysates, sequestering actin filaments and removing capping protein  $\beta$ 2 from barbed ends. Elsevier, p.261-278. 1997.
- Eduarda, M. Biotransformação de ácidos gordos: formação de prostaglandinas, trombofanos e leucotrienos. Química dos Produtos Naturais. PQB. 2009.
- Edwards, S.W, et al. Regulation of neutrophil apoptosis by Mcl-1. Biochemical Society. 2004
- Faurschou, M, & Borregaard, N. Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. Elsevier, p.1317-27. 2003.
- Flannagan, S., et al. Antimicrobial mechanisms of phagocytes and bacterial evasion strategies. Nature Reviews Microbiology, v. 7. 2009.
- Ferretti, M., et al. Modulation of neutrophil phospholipase C activity and cyclic AMP levels by fMLP analogues. Cell signal. 2001.
- Gabrilovich, D. The neutrophils-New outlook for old cells. Imperial College Press. 2005.
- Gao, Ji-Lian., et al. Impaired antibacterial host defense in mice lacking the n-formyl peptide receptor. The journal of experimental Medicine, v.189. 1999.
- Haugland, R. Handbook of fluorescent probes. Molecular Probes Inc. 1996.
- Palma, M., et al. Fundamentos em Análise Proteômica. Laboratório de Biologia Estrutural e Zooquímica. Rio Claro.
- Healthcare, GE. 2-D electrophoresis.Principle and Methods. Handbooks from GE.Heathcare. Germany, 2004.
- Hobayashi, S., Voyich, J, et al. Regulation of the neutrophil – mediated inflammatory response to infection. Elsevier Microbes and Infection (5):1337-1344. 2003.
- Hsuan, Justin & Cockcroft, Shamshad. The PITP family of phosphatidylinositol transfer proteins. Genome Biology, v.2:(9). 2001.
- Jethwaney, D., et al. Proteomic Analysis of plasma membrane and secretory vesicles. Proteome Science. 2007.

Junutula, J., et al. Rab 14 is involved in membrane trafficking between the Golgi Complex and Endosomes. Molecular biology of the Cell, v.15,p.2218-2229,May2004.

Laugesen, S., Roepsteorf. P, et al. Combination of two matrices results in improved performance of MALDI MS for peptide mass mapping and protein analysis. Journal American Society for Mass Spectrometry. 2003.

Lee, H., et al. Cyclic ADP ribose and NADP; structures, metabolism and functions. Kluwer Academic Publishers. 2002.

Lee,W., L.H, et al. Phagocytosis by neutrophils. Elsevier Microbes and Infection, p.1299-1306. 2003.

Le, Y., et al. Formyl peptide receptor revisited. Trends in Immunology, v.23. 2002.

Lian, J., et al. Antagonists of calcium fluxes and calmodulin block activation of the p21- activated protein kinases in neutrophils. The journal of Immunology. 2001.

Li, X., et al. Septin 11 is present in GABAergic synapses and plays a functional role in the cytoarchitectures of nervous and GABAergic synaptic connectivity. The Journal of Biology Chemistry. 2009.

Li, W., et al. Flow cytometric evaluation of leucocyte function in rat whole blood. In vitro Cell.Dev.Biology. 2003.

Lominadze, G., et al. Proteomic analysis of human neutrophil granules. Molecular e Cellular Proteomics. 2005.

Luerman, G., et al. Application of Proteomics to Neutrophil Biology-Review. Journal of Proteomics. 2009.

Kialkow, L., et al. Neutrophil apoptosis a marker of disease severity in sepsis and sepsis – induced ARDS. Critical Care. 2006.

Krump, E., et al. Chemotactic peptide N-fMLP activation of p38 MAPK and MAPK activated protein kinase-2 in human neutrophils. The Journal of Biological Chemistry. 1996.

Kuijpers,T. W. Neutrophils. ENCYCLOPEDIA OF LIFE SCIENCES/Natuure Publishing Goup.2001.

MAYADAS, R. & Cullere, X. Neutrophil  $\beta$ 2 integrins: moderators of life or death decisions. Elsevier, v.26.2005.

Malenica, B., M. Rudolf, et al. *Antineutrophil cytoplasmic antibodies(ANCA): diagnostic utility and potential role in the pathogenesis of vasculitis*. Acta Dermatovenerol Croat, p. 294-313. 2004.

- Martinez, Constantino & Ware, Jerry. Mammalian septin function in hemostasis and beyond. Nature, p.1111-1119. 2004.
- Martins, P., et al. Expression of cell surface receptors and oxidative metabolism modulation in the clinical continuum of sepsis. Critical Care. 2008.
- Milton, R.H, et al. CLIC 1 Function is required for  $\beta$ -Amyloid induced generation of Reactive Oxygen Species by Microglia. The Journal of Neuroscience, p.11488-11499.2008.
- Morita, K., et al. Cyclic ADP-ribose mediated formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (fMLP) – induced intracellular  $Ca^{2+}$  rise and migration of human neutrophils. Journal of Pharmacological Sciences. 2008.
- Nathan, C., et al. Points of control in inflammation. Nature-Insight review articles. 2002.
- Nicolete, L.D.F. Papel dos microDNAs humanos na infecção pelo HTLV-1. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Ciências Farmacológicas de Ribeirão Preto. 2009.
- Park, B., Good, R., et al. NBT test stimulated. Lancet, v.2, p.616. 1970.
- Peixoto, A.P.C. Hemograma e metabolismo oxidativo dos neutrófilos de bovinos da raça Holandesa preta e branca- Influência dos fatores etários. Revista Brasileira Saúde Produção, p.16. Brasil, 2002.
- Pinto, O.M. Influência, in vitro, da vancomicina, da anfotericina-B desoxicolato e de ambas sobre a função fagocitária, produção de radicais de oxigênio e fator de necrose tumoral  $\alpha$  por fagócitos do sangue periférico de indivíduos normais . Dissertação de Mestrado. Universidade de Brasília. 2006.
- Pires, A.C.. Papel dos ácidos graxos na função e morte de neutrófilos de humanos.Utilização do exercício intenso como modelo. Tese de doutorado. Universidade de São Paulo. 2008.
- Prossnitz, Eric R. & D.Ye, Richard. The N-formyl peptide receptor: A model for the study of chemoattractant receptor structure and function. **Elsevier**. Usa, 1997.
- Prestwich, G., et al. Phosphoinositide Signaling: from affinity Probes to Pharmaceutical targets. Chemistry and Biology,v.11, p.619-637. 2004.
- Pryzwansky, K. B. & E. P. Merricks. Chemotactic peptide-induced changes of intermediate filament organization in neutrophils during granule secretion: role of cyclic guanosine monophosphate. Mol Biol Cell, v.9, n.10, Oct, p.2933-47. 1998.
- Quinn, Mark & Gauss, Katherine. Structure and regulation of the neutrophil respiratory burst oxidase comparison with nonphagocyte oxidase. Journal Leukocyte Biology, p.760-781. 2004.

- Ramagli, L.S & Rodriguez, L.V. Quantitation of Microgram amounts of protein in two-dimensional polyacrilamide gel electrophoresis Sample Buffer. Eletrophoresis, p.559-563.1985.
- Rameth, L & Cantley.L. The role of Phosphoinositide 3 kinase lipid products in cell function. The Journal of Biological Chemistry, p.8347-8350. 1999.
- Reineke, Erin & Kao, Hung-Ying. Targeting Promyelocytic Leukemia Protein: A means to regulation PML nuclear bodies. International Journal of biological Sciences, p. 366-376. 2009
- Rinaldi, M., et al. Evaluation of assays for the measurement of bovine neutrophil reactive oxygen species. Elsevier, p.107-125. 2007.
- Ross, D., et al. Oxidative killing of microbes by neutrophils. Elsevier Microbes and Infection. 2003.
- Rot, A., Henderson. L, et al. A series of six ligands for the human formyl peptide receptor: tetrapeptides with high chemotactic potency and efficacy. Proc. Natl. Acad. (84): 7967-7971.1987.
- Rothwell, S. W., J. Nath, *et al.* Interactions of cytoplasmic granules with microtubules in human neutrophils. J Cell Biol, v.108, n.6, Jun, p.2313-26. 1989.
- Santos, K.C. Análise Proteômica Comparativa entre Neutrófilos não ativados e neutrófilos ativados com PMA, um análogo do Diacilglicerol. Dissertação de Mestrado. Universidade de Brasília.2007.
- Santos, P., et al. Análise Proteômica Quantitativa na Revelação de Mecanismos de Resposta a Stress Químico em microrganismos. Métodos em Biotecnologia-Proteomica Quantitativa. Lisboa.
- Scheel-Toellner, D., Wang. K, et al. Early events in spontaneous neutrophils apoptosis. Apoptosis in Myeloid Cells. 2004
- Scaffidi, C., et al. Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. Embo.J,v.17, p.1675-1687.1998.
- Schmidt, A & Hdll, Michael. Signaling to the actin cytoskeleton. Rev.Cell.Dev.Biol, p. 305-338. 1998.
- Segui, B., et al. Phosphatidylinositol transfer protein  $\beta$  displays minimal sphingomyelin transfer activity and is not required for biosynthesis and trafficking of sphingomyelin. Biochemistry Journal, p.23-34. 2002.
- Selvatici, R., et al. Signal transduction pathways triggered by selective formylpeptide analogues in human neutrophils. Elsevier. 2006.

Shi, Yuki. PML nuclear bodies and apoptosis. Nature. 2004.

Singh, H., Cousin, M.A, et al. Functional reconstitution of mammalian chloride intracellular channel's CLIC1, CLIC4 and CLIC5 reveals differential regulation by cytoskeletal actin. The FEBS Journal, p.6306-6316. 2007.

Slee, E., et al. Ordering the cytochrome c – initiated caspase cascade: Hierarchical activation of caspases 2,3,6,7,8 and 10 in a caspase 9 dependent manner. J.Cell Biol, p.144.1999.

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

Stenmark, Harold. Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. OSLOD. 2009.

Stephens, L.R., Hunches. K.T, et al. Pathway of phosphatidylinositol (3,4,5) triphosphatase synthesis in activated neutrophils. Nature, p.33-39. 1991.

Suckau, D., et al. A novel MALDI LIFT-TOF/TOF mass spectrometer for proteomics. Anal B.Chemistry. 2003.

Tralan. T, et al. An internal Reaction Chamber in Dimethylglycine Oxidase Provides Efficient Protection from exposure to toxic formaldehyde. The Journal of Biological Chemistry, v.284, p.17826-17834.2009.

Teladze, T.,et al. Phosphatidylinositol 3 phosphate recognition and membrane pocking by the FYVE domain. Elsevier, p.868-877. 2006.

Theilgaard-Mönch, K., Porse. T, et al. Systems biology of neutrophil differentiation and immune response. Elsevier, p. 54-60. 2006.

Theilgaard Mönch, K., et al. The transcriptional program of terminal granulocytic differentiation. Phagocytes. 2005.

Thingholm, T., T.J, et al. Highly selective enrichment of phosphosrylated peptides using titanium dioxide. Nat Protoc, v.1, p. 1929-1935. 2006.

Uriarte, S., et al. Comparison of protein expressed on secretory vesicle membrane and plasms membranes of human neutrophils. The journal of Immunology, p.5575-5581. 2008.

Valenzuela, S.M, et al. Molecular cloning and expression of a chloride ion channel of cell nuclei. Journal Biology Chemistry, p.12575-12582.1997.

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

Vrba, J. N-fMLP induced oxidative burst in DMSO differentiated HL-60 cells requires active HSP90, but not intact microtubules. Biomed Papers. 2004.

Za, Odjel., Urologiju, et al. Molecular aspects of apoptosis. Acta medica, p. 249-256.2008.

Zen, K., Liu. Y, et al. Role of different protein tirosina kinases in fMLP – induced neutrophil transmigration. Elsevier. 2007.

Zhang, X., et al. Na improved method of sample preparation on AnchorChip targets for MALDI-MS and MS/MS aand its application in the liver proteomic Project. Proteomics. 2007.

Wang, Z., Delva, L., et al. PML is essential for multiple apoptotic pathways. Science, p. 1547-1551.1998

Wen, P., et al. Invasive Micropapillary Carcinoma of the sigmoid Colon: distinct morphology and Aggressive Behavior. Journal Clin. Exp.Pathology. 2008.

Weirich, C., et al. The septin family of GTPases.Asrchitecture and Dynamics. Nature, v.9. 2008.

Wittmann, S., et al. Characterization of the human fMLP receptor in neutrophils and in *Xenopus* oocytes. British Journal of Pharmacology. 2002.

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

[www.bodd.cf.ac.uk/BotDermFolder/BotDermE/EUPH-4.html](http://www.bodd.cf.ac.uk/BotDermFolder/BotDermE/EUPH-4.html), *Botanical Dermatology Database*. [cited.

<http://pathmicro.med.sc.edu/Portuguese/immuno-port-chapter1.htm>, *Microbiologia e Imunologia On-line*.

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