

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Implicações da variante da cadeia CD11b (rs1143679) do CR3 para a
liberação da mieloperoxidase de neutrófilos humanos

João Rodrigues Lima Júnior

RIBEIRÃO PRETO
2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Implicações da variante da cadeia CD11b (rs1143679) do CR3 para a
liberação da mieloperoxidase de neutrófilos humanos

Dissertação de Mestrado apresentada
ao Programa de Pós-Graduação em
Biociências Aplicadas à Farmácia
para obtenção do Título de Mestre em
Ciências.

Área de Concentração: Biociências
Aplicadas à Farmácia.

Orientado: João Rodrigues Lima
Júnior

Orientadora: Profa. Dra. Cleni Mara
Marzocchi Machado

Versão corrigida da Dissertação de mestrado apresentada ao programa de Pós Graduação
em Biociências Aplicadas à Farmácia em 13/03/2015. A versão original encontra-se
disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP

RIBEIRÃO PRETO
2015

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Lima Júnior, João Rodrigues

Implicações da variante da cadeia CD11b (rs1143679) do CR3 para a liberação da mieloperoxidase de neutrófilos humanos

93 p.: il.; 30cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientador: Marzocchi-Machado, Cleni Mara.

1. Neutrófilos. 2. Mieloperoxidase. 3. Receptor do complemento tipo 3. 4. Polimorfismo.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do Aluno: João Rodrigues Lima Júnior

Título do trabalho: Implicações da variante da cadeia CD11b (rs1143679) do CR3 para a liberação da mieloperoxidase de neutrófilos humanos

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientadora: Profa. Dra. Cleni Mara Marzocchi Machado.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

**Dedico este trabalho a
minha mãe e minhas
irmãs, as mulheres da
minha vida, pelo apoio
ao longo de toda minha
caminhada.**

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a **Deus**, por toda força, sabedoria e paciência para enfrentar todos os percalços ao longo da minha vida pessoal e acadêmica;

a minha amada **Mãe, Arlete Maria de Souza**, meu maior exemplo de vida, minha mentora e grande incentivadora. Devo a ela tudo que sou, e que conquistei;

a Profa. Dra. **Cleni Mara Marzocchi Machado**, pela oportunidade e pelos ensinamentos que me foram passados, sempre com bastante paciência, atenção e respeito;

as minhas **irmãs, Débora e Danielle**, as quais tiveram participação ativa e crucial na minha educação;

aos meus **amigos** de longa data, **Luciano Costa** e **Lourimar Martins**, pelo apoio, bom humor, e pelos conselhos em diversos momentos;

ao meu cunhado, **Osneilton Guedes**, pela amizade e, principalmente, pelo respeito e suporte dado a minha mãe neste período em que me encontro longe de casa;

aos **voluntários da pesquisa**, pela disponibilidade e boa vontade em colaborar com a projeto;

a farmacêutica-bioquímica **Analuiza Souza Costa**, do Laboratório de Análises Clínicas da FCFRP-USP, pela amizade e pelo apoio essencial no início da minha caminhada em Ribeirão Preto;

ao farmacêutico-bioquímico **José Luiz Morato**, do Laboratório de Análises Clínicas da FCFRP-USP, pela amizade e, sobretudo, pelos conselhos que me foram dados;

aos pós-graduandos **Andréa Figueiredo, Isabel Vigato, Juliana Toller e Micássio Fernandes**, pelo auxílio e apoio na padronização e realização dos ensaios;

ao farmacêutico-bioquímico **José Eduardo Cavalcanti Del Lama**, pelo apoio durante a realização deste trabalho;

a Profa. Dra. **Elisa Maria de Sousa Russo**, pelo auxílio, e por dividir conosco o mesmo laboratório;

ao Prof. Dr. **Sérgio Akira Uyemura**, do Depto de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas da FCFRP-USP, por disponibilizar a infraestrutura de seu laboratório para o uso do fotodocumentador;

a farmacêutica-bioquímica **Ana Elisa Caleiro Seixas Azzolini**, Depto.de Física e Química da FCFRP-USP, pela disponibilidade em colaborar com este trabalho;

a biomédica **Fabiana Rossetto de Moraes**, FCFRP-USP, pela atenção em realizar as leituras no citômetro de fluxo;

ao estatístico, Prof. Dr. **Edson Zangiacomi Martinez**, do Depto de Medicina Social da FMRP-USP, pela contribuição com a análise estatística dos resultados;

aos demais amigos que estiveram comigo, e que, de alguma maneira, contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho, **Eliza Vieira Davi, Fillipe Luiz, Lucas Coelho, Nathalia Indolfo, Leandro Sobrinho Ávila, Gisele Lelis da Silva**, e, em especial, **Claudinéia Costa**, pelo carinho e companheirismo;

aos **professores** do Programa de Biociências Aplicadas à Farmácia da FCFRP-USP por contribuírem para o meu aprendizado e crescimento acadêmico;

aos **coordenadores** e **funcionários** do Programa de Biociências Aplicadas à Farmácia da FCFRP-USP pela disposição em ajudar;

à **Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP**, pela oportunidade de realização do curso de Mestrado;

à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (**Capes**) pela concessão da bolsa de mestrado;

*"O único lugar onde o sucesso
vem antes do trabalho é no dicionário."*

(Autor Desconhecido)

RESUMO

Lima-Júnior JR. **Implicações da variante da cadeia CD11b (rs1143679) do CR3 para a liberação da mieloperoxidase de neutrófilos humanos.** 2014. 93f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

O neutrófilo é a célula predominante no sangue circulante e medeia as primeiras respostas da imunidade inata contra infecções, graças a sua capacidade de fagocitar e destruir patógenos. A mieloperoxidase (MPO) é a proteína mais abundante do neutrófilo e a sua potente atividade microbicida está relacionada à sua participação na geração de moléculas oxidantes capazes de degradar uma ampla variedade de estruturas biológicas. Contudo, a MPO também tem sido atribuído um papel deletério nos processos inflamatórios por mediar danos ao endotélio e amplificar a inflamação. A liberação da MPO do neutrófilo diretamente sobre o endotélio depende da interação célula-célula mediada pela integrina CD11b/CD18 (também conhecida como receptor do complemento tipo 3, CR3) expressa nos neutrófilos e pela molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1) no endotélio, sugerindo um papel importante para o CR3 em mediar o dano tecidual em condições inflamatórias crônicas. A cadeia CD11b (α M) do CR3 é codificada pelo gene *ITGAM* (*Integrin Alpha M*) e um polimorfismo devido à troca de um único nucleotídeo, G328A, resulta na substituição de uma arginina por uma histidina na posição 77 no domínio extracelular da molécula CD11b, levando à existência de duas variantes polimórficas (R77 e 77H). Este polimorfismo recebe o número de referência rs1143679. A variante 77H está associada à suscetibilidade ao lúpus eritematoso sistêmico (LES), mas o comprometimento funcional desta variante ainda não é compreendido. Neste contexto, o objetivo deste estudo foi avaliar se o polimorfismo da cadeia CD11b influencia o *burst* oxidativo dependente de MPO em neutrófilos humanos de indivíduos saudáveis. Os genótipos foram determinados por reação em cadeia da polimerase para identificação das variantes alélicas; os neutrófilos foram estimulados com zimosan opsonizado com soro humano normal; a expressão do CR3 foi avaliada por citometria de fluxo com anticorpo monoclonal específico; a avaliação da atividade da enzima MPO foi realizada através da quantificação indireta de seu produto, o ácido hipocloroso, pelo método da taurina-cloramina; o *burst* oxidativo foi medido por quimioluminescência (QL) dependente de luminol e de lucigenina. Não houve diferença estatística na atividade da MPO entre os grupos, contudo a presença da variante 77H nos neutrófilos mostrou uma menor liberação de MPO quando comparada aquela de neutrófilos com a variante R77. Esta diminuição da liberação da MPO não foi relacionada à diferença de expressão do CR3, uma vez que a análise da expressão do CR3 nos neutrófilos não mostrou diferenças entre os grupos. Nenhuma diferença foi observada na medida de QL. Levando-se em consideração as funções imunomodulatórias da MPO, dependentes e independentes da sua atividade catalítica, nas interações entre neutrófilo e endotélio mediadas pelo CR3, nosso resultado mostra a necessidade de investigar se pequenas diferenças entre a liberação de MPO por neutrófilos, expressando a variante 77H da cadeia CD11b, pode explicar a associação deste polimorfismo com a suscetibilidade ao LES e/ou outras doenças.

Palavras-chave: Neutrófilos, Mieloperoxidase, Receptor do complemento tipo 3, Polimorfismo.

ABSTRACT

Lima-Júnior JR. **Implications of the CD11b chain variant (rs1143679) of CR3 for the release of myeloperoxidase in human neutrophils.** 2014. 93f. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto –Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

The neutrophils are the predominant cells in the circulating blood and mediate the first responses of innate immunity against infections, thanks to their ability to phagocytose and destroy pathogens. The myeloperoxidase (MPO) is the most abundant protein in the neutrophils and its potent microbicidal activity is related to its participation in the generation of oxidant molecules capable of degrading a wide variety of biological structures. However, the MPO has also been attributed a deleterious role in mediating inflammatory processes at endothelial damage and amplifying inflammation. The release of MPO from neutrophils depends directly on the endothelial cell-cell interaction mediated by the integrin CD11b / CD18 (also known as the complement receptor type 3, CR3) expressed in neutrophils and the intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in the endothelium, suggesting an important role for CR3 in mediating tissue damage in chronic inflammatory conditions. The CD11b chain (α M) of CR3 is encoded by the gene ITGAM (Integrin Alpha M) and a polymorphism due to the exchange of a single nucleotide, G328A, results in the substitution of an arginine by a histidine at position 77 in the extracellular domain of the CD11b molecule, leading to the existence of two polymorphic variants (R77 and 77H). This polymorphism receives the reference numeral rs1143679. The 77H variant is associated with susceptibility to systemic lupus erythematosus (SLE), but the functional impairment of this variant is not yet understood. In this context, the aim of this study was to evaluate the polymorphism of the CD11b chain influences the oxidative burst dependent MPO in human neutrophils from healthy individuals. The genotypes were determined by polymerase chain reaction to identify the allelic variants; neutrophils were stimulated with opsonized zymosan with normal human serum; of CR3 expression was assessed by flow cytometry with specific monoclonal antibody; evaluating the MPO enzyme activity was performed by indirect measurement of hypochlorous acid, the method of taurine-chloramine; The oxidative burst was measured by chemiluminescence (Q) dependent luminol and lucigenin. There was no statistical difference in MPO activity between the groups, but the presence of the 77H variant in neutrophils showed a lower release of MPO compared that of neutrophils with the R77 variant. This reduction of MPO release was not related to the difference CR3 expression, since the analysis of CR3 expression on neutrophils showed no differences between groups. No difference was observed in the extent of QL. Taking into account the immunomodulatory functions of MPO-dependent and independent of its catalytic activity, interactions between neutrophils and the endothelium mediated CR3, our result shows the need to investigate whether small differences between the MPO release by neutrophils, expressing the variant 77H of the CD11b chain, may explain the association of this polymorphism with susceptibility to SLE and / or other diseases.

Keywords: Neutrophils, Myeloperoxidase, complement receptor 3, Polymorphism.

RESUMEN

Lima-Júnior JR. **Implicaciones de la variante de la cadena CD11b (rs1143679) del CR3 para la liberación de mieloperoxidasa de neutrófilos humanos.** 2014. 93f. Dissertación (Maestría). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

Los neutrófilos son las células predominantes en la sangre circulante y las responsables de mandar las primeras respuestas de la inmunidad innata contra las infecciones, gracias a su capacidad de fagocitar y destruir patógenos. La mieloperoxidasa (MPO) es la proteína más abundante en los neutrófilos y su actividad microbicida potente, está relacionada con su participación en la generación de moléculas oxidantes capaces de degradar una amplia variedad de estructuras biológicas. A la MPO también se le atribuye un papel mortífero en la mediación de procesos inflamatorios en el daño endotelial y la amplificación de la inflamación. La liberación de MPO de neutrófilos depende directamente de la interacción célula-célula endotelial mediada por el CD11b/CD18 integrina (también conocido como el receptor del complemento tipo 3, CR3) expresado en neutrófilos y la molécula de adhesión intercelular-1 (ICAM-1) en el endotelio. Esto sugiere un papel importante del CR3 en la mediación de daño tisular en enfermedades inflamatorias crónicas. La cadena de CD11b (α M) de CR3 es codificada por el gen ITGAM (integrina alfa M) y un polimorfismo debido al intercambio de un solo nucleótido; G328A; sustituyendo una arginina por una histidina en la posición 77 en el dominio extracelular de la molécula CD11b, que conduce a la existencia de dos variantes polimórficas (R77 y 77H). El polimorfismo recibe el número de referencia rs1143679. La variante 77H está asociada a la susceptibilidad de lupus eritematoso sistémico (LES), pero el deterioro funcional de esta variante todavía no se entiende. En este contexto, el objetivo de este estudio fue evaluar si el polimorfismo de la cadena de CD11b influye el burst oxidativo dependiente de MPO en neutrófilos humanos de individuos sanos. Los genotipos se determinaron por reacción en cadena de la polimerasa para identificar las variantes alélicas; los neutrófilos fueron estimulados con zimosano opsonizado con suero humano normal; la expresión de CR3 se evaluó por citometría de flujo con un anticuerpo monoclonal específico; la evaluación de la actividad de la enzima MPO se realizó mediante la medición indirecta de su producto, ácido hipocloroso, mediante el método de la taurina-cloramina; el burst oxidativo se midió por quimioluminiscencia (Q) dependiente de luminol y lucigenina. No hubo diferencia estadística en la actividad MPO entre los grupos, pero la presencia de la variante 77H en los neutrófilos mostró una menor liberación de MPO de neutrófilos comparado con la variante de R77. Esta reducción de la liberación de MPO no fue relacionada con la diferencia de la expresión de CR3, ya que el análisis de la expresión de CR3 en los neutrófilos no mostró diferencias entre los grupos. No se observó ninguna diferencia en la extensión de QL. Teniendo en cuenta las funciones inmunomoduladoras de MPO, dependiente e independiente de su actividad catalítica, en las interacciones entre los neutrófilos y el endotelio mediada por CR3, nuestro resultado muestra la necesidad de investigar si las pequeñas diferencias entre la liberación de MPO por neutrófilos, expresando la variante 77H de la cadena CD11b, puede explicar la asociación de este polimorfismo con la susceptibilidad a SLE y / o otras enfermedades.

Palabras clave: Neutrófilos, Mieloperoxidasa, Receptor del complemento 3, Polimorfismo.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Sequência esquemática da migração dos neutrófilos	25
Figura 2. Fagocitose e atividade microbicida do neutrófilo	27
Figura 3. Conteúdo dos grânulos dos neutrófilos, estágio de formação e propensão à desgranulação	28
Figura 4. Reação Catalisada pela MPO dentro do fagossomo	32
Figura 5. Estrutura do receptor do complemento tipo 3 (CR3)	33
Figura 6. Representação da posição 77 da cadeia CD11c da integrina $\alpha X\beta 2$	36
Figura 8. Representação dos produtos de PCR de indivíduos homocigoto para o alelo H (77H), homocigoto para o alelo R (R77), e heterocigoto R77H para o polimorfismo da cadeia CD11b do CR3	56
Figura 9. Padronização da concentração de estímulo. Medida da atividade clorinante da MPO	57
Figura 10. Atividade da MPO medida pela cloração da taurina pelo HOCl.	58
Figura 11. Medida da produção de ERO por neutrófilos de indivíduos com diferentes genótipos para a variante da cadeia CD11b do CR3	59
Figura 12. Avaliação do efeito da Taurina sobre a produção de ERO dependente de NADPH oxidase (Lucigenina) e dependente da MPO (Luminol)	60
Figura 13. Representação dos histogramas de fluorescência do CR3 marcado na superfície de neutrófilos	61
Figura 14. Expressão do CR3 na superfície de neutrófilos de indivíduos classificados de acordo com o polimorfismo R77H	62
Fluxograma 1. Representação das atividades desenvolvidas	44

LISTA DE TABELA

Tabela 1. Principais componentes dos grânulos dos neutrófilos.....	29
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

μL	Microlitro
μM	Micromolar
ADCC	Citotoxicidade celular dependente de anticorpos
ADMIDAS	Sítio de adesão dependente de íon metálico Adjacente
Arg	Arginina
Br⁻	Brometo
BSA	Albumina de soro bovino
CD	<i>Cluster</i> de diferenciação
CFD	Diluyente para fixação do complemento
Cl	<i>Cloreto</i>
CR	Receptor para complemento
CR1, CR3	Receptores para complemento tipo 1 e tipo 3, respectivamente
DC	Células dendríticas (<i>Dendritic Cells</i>)
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP	Dinucleotídeo trifosfato
EDTA	Ácido etileno diamino tetracético
ERO	Espécie(s) reativa(s) de oxigênio
ESL-1	Ligante da E-selectina-1 (E-selectin-ligand)
Fc	Fragmento cristalizável da molécula de anticorpo; porção Fc do anticorpo
FcR	Receptor para a porção Fc
Fc_γR	Receptor para a porção Fc gama; receptor para a IgG
Fc_γRIIa, Fc_γRIIIb	Isoformas do receptor Fc _γ
Fe	Ferro
fMLP	Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanine
GCSF	Fator de estimulação de colônia de granulócitos (<i>Granulocyte-colony stimulating factor</i>)
H₂O₂	Peróxido de hidrogênio

HGH	Hormônio do crescimento humano (<i>Human Growth Hormone</i>)
His (H)	Histidina
HNA	Antígeno de neutrófilo humano
HO[•]	Radical hidroxila
HOBr	Ácido hipobromoso
HOCl	Ácido hipocloroso
IC	Imunocomplexo(s)
ICAM	Molécula de adesão intercelular
IgG	Imunoglobulina G
IL	Interleucina
ITAM	Sequência de ativação de imuno-receptor baseada em tirosina
ITGAM	Integrina alfa M (integrin alpha M)
ITIM	Sequência de inibição de imuno-receptor baseada em tirosina
KI	Iodeto de potássio
LES	Lúpus Eritematoso Sistêmico
LFA-1	Antígeno associado a função de linfócitos-1 (<i>lymphocyte function associated antigen-1</i>)
Mac-1	Antígeno macrofágico-1 (<i>Macrophage antigen-1</i>)
MgCl₂	Cloreto de magnésio
MIDAS	Sítio de adesão dependente de íon metálico (Metal ion dependent adhesion site)
MPO	Mieloperoxidase
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida
NET	Armadilha extracelular de neutrófilos (<i>neutrophil extracellular trap</i>)
NH₄Cl	Cloreto de amônio
NK	<i>Natural Killer</i>
°C	Graus Célsius
PAMP	Padrões moleculares associadas a patógenos
PB	Pares de bases
PBS	Salina tamponada com fosfato

PCR	Reação em cadeia da polimerase
PE	Ficoeritrina
PKC	Proteína quinase C
pH	Potencial de hidrogênio
PHOX	Oxidase de fagócitos (<i>Phagocyte Oxidase</i>)
PMA	Forbol-12-miristato-13-acetato
PMN	Polimorfonuclear
PRR	Receptor de reconhecimento padrão (<i>Pattern recognition receptors</i>)
PSGL-1	Glicoproteína ligante de selectina-1 (<i>protein ligand-1</i>)
QL	Quimioluminescência
rs	<i>Reference SNP</i>
SBF	Soro bovino fetal
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SHI	Soro humano inativado
SHN	Soro humano normal
SNP	Polimorfismo de um único nucleotídeo (<i>single nucleotide polymorphism</i>)
TAU-CI	Taurina-Cloramina
TBE	Tris- borato-EDTA
TMB	3,3',5,5'-tetrametilbenzidina
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa (<i>tumor necrosis factor alpha</i>)
Tris	Tris-(hidroximetil) aminometano
ZI/SHN	Zimosan opsonizado com soro humano normal
ZI/SHI	Zimosan tratado com soro humano inativado

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	ii
RESUMEM	iii
LISTA DE FIGURAS	iv
LISTA DE TABELAS	v
LISTA DE ABREVIATURAS	vi

Conteúdo

1. INTRODUÇÃO	11
1.1 Neutrófilos.....	21
1.2 Inflamação	22
1.3 Fagocitose	25
1.4 Desgranulação.....	27
1.5 Produção de ERO (<i>burst</i> oxidativo).....	29
1.6 Mieloperoxidase.....	30
1.7 CR3, a integrina CD11b/CD18 (CR3)	32
1.8 Variante ITGAM (rs1143679)	35
2. JUSTIFICATIVA	38
3. OBJETIVOS	40
3.1 Geral	41
3.2 Específicos.....	41
4. CASUÍSTICA E MÉTODOS	42
4.1 Casuística e Metodologia.....	43
4.2 Principais reagentes utilizados.....	44
4.3 Extração de DNA	44
4.4 Reação em cadeia de polimerase (PCR).....	45
4.5 Corrida do gel	45
4.6 Purificação de neutrófilos.....	45
4.7 Atividade da MPO	46
4.8 <i>Burst</i> Oxidativo.....	46
4.9 Expressão de receptores	46

4.10 Equipamentos utilizados	47
4.11 Extração e caracterização do DNA genômico.....	48
4.11.1 <i>Extração por método de salting out</i>	48
4.11.2 <i>Análise dos genótipos</i>	49
4.11.3 <i>CR3 (CD11b/CD18)</i>	49
4.11.4 <i>Eletroforese dos produtos da PCR</i>	49
4.12 Colheita de sangue e purificação de neutrófilos humanos.....	50
4.13 Colheita de sangue para obtenção de soro com fonte de complemento	51
4.14 Preparo do estímulo: zimosan e zimosan opsonizado	51
4.15 Avaliação da atividade da enzima mieloperoxidase.....	52
4.16 Medida do <i>burst</i> oxidativo de neutrófilos por quimioluminescência	53
4.17 Análise da expressão dos receptores por citometria de fluxo	53
4.18 Análises Estatísticas	54
5. RESULTADOS	55
5.1 Genotipagem do polimorfismo da cadeia CD11b do CR3.....	56
5.2 Ativação do <i>burst</i> oxidativo de neutrófilo dependente de MPO.....	56
5.2.1 <i>Padronização da concentração de zimosan</i>	56
5.2.2 <i>Atividade da MPO medida pela cloração da taurina pelo HOCl</i>	57
5.2.3 <i>Quimioluminescência dependente de lucigenina e luminol</i>	58
5.2.4 <i>Análise da expressão do CR3 nos neutrófilos</i>	61
6. DISCUSSÃO	63
7. CONCLUSÕES	72
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74
ANEXOS	86
9.1 Anexo I: Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa.	87
9.2 Anexo II: Protocolos para o preparo das principais soluções utilizadas. ...	88

1. INTRODUÇÃO

1.1 Neutrófilos

Os neutrófilos foram descobertos por Paul Ehrlich em 1880, através de uma série de experimentos que utilizavam técnicas de coloração recém-desenvolvidas, que permitiram uma nova apreciação a respeito da morfologia e do conteúdo intracelular dos leucócitos. Ehrlich observou que estas células apresentavam núcleo lobular e grânulos em seu citoplasma (Amulic *et al.*, 2012). Mas coube a seu contemporâneo, Elie Metchnikoff, elucidar as funções efetoras do neutrófilo. Metchnikoff observou que ao perfurar embriões de estrela do mar com espinhos de roseira, ocorria o recrutamento de células fagocíticas para o local da lesão a fim promover a digestão daquele corpo estranho (Metchnikoff, 1893; Kumar e Sharma, 2010).

Os neutrófilos são células que desempenham um papel central na inflamação e proteção do hospedeiro contra microrganismos invasores. Além dos neutrófilos, outras células participam deste mecanismo de defesa inato, são elas: os monócitos, macrófagos, mastócitos, células *natural killer* e células dendríticas. Moléculas solúveis, incluindo citocinas e sistema complemento, também são essenciais nesse processo (Jang e Rabb, 2009; Petersen e Smith, 2013).

Particularmente, os neutrófilos originam-se de células precursoras mieloides na medula óssea, e sua produção é induzida pelo fator de estimulação de colônia de granulócitos (G-CSF, do inglês, *Granulocyte-colony stimulating factor*) (Lieschke *et al.*, 1994). Os neutrófilos, em humanos, correspondem a aproximadamente 50-60% do total de leucócitos no sangue (25×10^9), são células de aproximadamente 12 à 15 μm , com núcleo segmentado (3 a 5 lóbulos), daí o termo leucócito polimorfonuclear, e possuem quatro tipos diferentes de grânulos em seu citoplasma: grânulos azurófilos ou primários, grânulos específicos ou secundários, grânulos terciários ou de gelatinase, e vesículas secretoras (Zago *et al.*, 2001; Sadik, Kim e Luster, 2011). Os neutrófilos são células de meia-vida curta, permanecendo viáveis no sangue periférico por aproximadamente 6-8 horas. Em um adulto saudável, estima-se que a produção diária de neutrófilos é de aproximadamente $5-10 \times 10^{10}$, e pode aumentar consideravelmente durante processos infecciosos e algumas doenças (Summers *et al.*, 2010). A homeostase dos neutrófilos é regulada principalmente pela taxa de proliferação e diferenciação dos precursores mieloides na medula óssea, liberação

dos neutrófilos maduros para a circulação e a remoção destas células realizada pelo sistema reticuloendotelial (Rankin, 2010).

1.2 Inflamação

A inflamação é uma resposta fisiológica a infecção ou danos teciduais (Soehnlein e Lindbom, 2010). Este processo é caracterizado pela dilatação vascular, aumento da permeabilidade dos capilares, diminuição do fluxo sanguíneo próximo ao sítio inflamatório, e recrutamento de leucócitos. Os neutrófilos estão entre os primeiros leucócitos a chegarem ao sítio inflamatório e são cruciais como primeira linha de defesa da resposta imune inata, devido às suas funções fagocíticas e microbidas. Após realizarem a sua atividade microbicida, os neutrófilos entram em processo de apoptose, e são removidos do sítio inflamatório a fim de reestabelecer a homeostase do tecido (Freire e Van Dyke, 2013).

O processo de migração do neutrófilo da corrente sanguínea para o tecido inflamado, conhecido como diapedese, requer regulação temporal e espacial de vias de sinalização intracelular, que permitem aos neutrófilos detectar substâncias quimioatraentes e migrarem em direção a estes estímulos (quimiotaxia). Tais substâncias podem ser produzidas pelo hospedeiro ou pelo patógeno invasor. Além disso, este processo envolve uma complexa interação entre o neutrófilo e o endotélio vascular adjacente (Amulic *et al.*, 2012; Dimasi, Sun e Bonder, 2013).

Nos primeiros momentos da resposta inflamatória, células residentes localizadas no sítio inflamatório, incluindo as células dendríticas, macrófagos e mastócitos, reconhecem os patógenos e secretam uma série de citocinas, tais como, interleucina-1 β , (IL-1 β), IL-6, fator de necrose tumoral α (TNF- α , do inglês *tumor necrosis factor alpha*) e uma variedade de diferentes quimiocinas (Mcdonald *et al.*, 2010; Takeuchi e Akira, 2010). Em resposta à liberação destes mediadores inflamatórios, o endotélio vascular adjacente é ativado e inicia a secreção de citocinas, tais como, quimiocinas e fatores de crescimento para hematopoiese, e, além disso, aumenta a expressão de moléculas de adesão em sua superfície. Estas mudanças promovem a mobilização e o recrutamento de neutrófilos para o sítio inflamatório, um mecanismo conhecido como cascata de recrutamento de neutrófilos, que inclui a captura, rolamento, adesão firme, arraste, e, por fim, a migração transendotelial do neutrófilo (Krishnaswamy *et al.*, 1999).

O fluxo de neutrófilos próximo às paredes das vênulas revestidas por endotélio aumenta nos locais de inflamação, em consequência da vasodilatação e lentificação do fluxo sanguíneo, facilitando os primeiros passos da cascata de recrutamento, que correspondem à captura e o rolamento dos neutrófilos sobre o endotélio. Uma série de moléculas de adesão está envolvida neste processo, entre elas, as P-selectinas e E-selectinas que são expressas no endotélio, bem como os seus respectivos ligantes, a glicoproteína ligante da selectina P (PSGL-1, do inglês, *P-selectin glycoprotein ligand-1*) e o ligante de E-selectina-1 (ESL-1, do inglês, *E-selectin ligand*) presentes nos neutrófilos. A interação entre as selectinas e seus ligantes medeia à captura e o rolamento dos neutrófilos sobre o endotélio inflamado. Como estas interações são de baixa afinidade, elas são rompidas facilmente pela força de cisalhamento do fluxo sanguíneo, assim, os neutrófilos se ligam e se desprendem repetidamente e, conseqüentemente, rolam ao longo da superfície endotelial (Zarbock *et al.*, 2011).

Após o rolamento mediado pelas selectinas, os neutrófilos se aderem firmemente ao endotélio, num processo mediado por outro grupo de moléculas de adesão, denominadas integrinas. Em resposta aos estímulos inflamatórios, as integrinas aumentam sua afinidade pelos seus ligantes e se agrupam na membrana da célula. Essas alterações resultam em uma adesão mais firme do neutrófilo ao endotélio e na reorganização do citoesqueleto, possibilitando o arraste do neutrófilo sobre o endotélio. O arraste é um passo fundamental para que ocorra a transmigração, pois, é dessa maneira que os neutrófilos alcançam as junções intercelulares do endotélio. As principais integrinas envolvidas neste processo são as β_2 integrinas CR3 (do inglês, *complement receptor 3*; CD11b/CD18, Mac-1) e LFA-1 (do inglês, *leukocyte function-associated antigen-1*; CD11a/CD18) presentes na membrana dos neutrófilos, que, por sua vez, interagem com seus ligantes membros da superfamília das imunoglobulinas, ICAM-1 (do inglês, *intracellular adhesion molecule-1*) e ICAM-2, respectivamente, presentes nas células endoteliais (Bunting *et al.*, 2002).

Para deixar a vasculatura os neutrófilos devem primeiro atravessar o endotélio, o que leva de 2 a 5 minutos, e, em seguida, atravessar a membrana basal, o que demanda um pouco mais de tempo, entre 5 e 15 minutos. A passagem dos neutrófilos através da camada de células endoteliais pode acontecer de maneira paracelular (entre as células endoteliais) ou transcelular (através de uma célula

endotelial). A transmigração paracelular talvez seja o melhor caminho utilizado pelo neutrófilo para alcançar o tecido. Por outro lado, a transmigração transcelular ocorre seletivamente em sítios vasculares específicos como, por exemplo, cérebro, medula óssea e pâncreas, onde o arraste do neutrófilo é impedido ou dificultado (Phillipson *et al.*, 2006).

A decisão tomada pelos neutrófilos e células endoteliais quanto ao tipo de transmigração, entre ou através das células endoteliais, ainda não é bem compreendida. Acredita-se que um fator importante para esta decisão é o padrão de exibição de moléculas específicas na superfície das células endoteliais, que servirão como indicadores do percurso mais eficiente para a transmigração sob as condições prevalentes (Nourshargh, Krombach e Dejana, 2006; Woodfin *et al.*, 2007).

Na passagem paracelular, as integrinas ICAM-1, ICAM-2, e VCAM-1 (do inglês, *vascular cell adhesion protein-1*), e outras proteínas de junção, entre elas CD31, CD99 e CD144, se acumulam nas junções célula-célula, afrouxando-as e mediando a passagem dos neutrófilos entre as junções via CR3 e LFA-1 (Ley *et al.*, 2007). No que diz respeito a passagem transcelular, acredita-se que apenas 20% dos neutrófilos utilizam essa rota. Durante este processo as células endoteliais formam microvilosidades (projeções citoplasmáticas originadas na superfície celular), que recebem o nome de corpos transmigratórios, e englobam os neutrófilos, servindo como porta de entrada para o tecido, através do corpo da célula endotelial. As β_2 integrinas e seus ligantes possuem um papel importante na estabilidade deste processo (Dvorak e Feng, 2001).

Após atravessar o revestimento endotelial, os neutrófilos devem fazer seu caminho através da membrana basal rica em colágeno. Para isso, os neutrófilos são altamente equipados com proteases capazes de clivar colágeno. Por conseguinte, ao alcançar o local da inflamação, os neutrófilos conseguem combater um largo espectro de microrganismos, pois, são equipados com diversos sistemas antimicrobianos. Eles podem fagocitar o microrganismo e rapidamente matá-lo utilizando enzimas proteolíticas armazenadas em seus grânulos, enzimas presentes no citosol, e espécies reativas de oxigênio (ERO). No entanto, se os neutrófilos não conseguirem eliminar o microrganismo por fagocitose, eles podem ser submetidos a uma sequência de eventos programados que resultam na formação das armadilhas extracelulares de neutrófilos, conhecidas como NETs (do inglês, *neutrophil extracellular traps*), um processo distinto de morte celular em que ocorre liberação de

toda sua cromatina nuclear associada a histonas, proteínas granulares e citosólicas no espaço extracelular, limitando a propagação do microrganismo (Brinkmann *et al.*, 2004). A Figura 1 ilustra o mecanismo de migração dos neutrófilos.

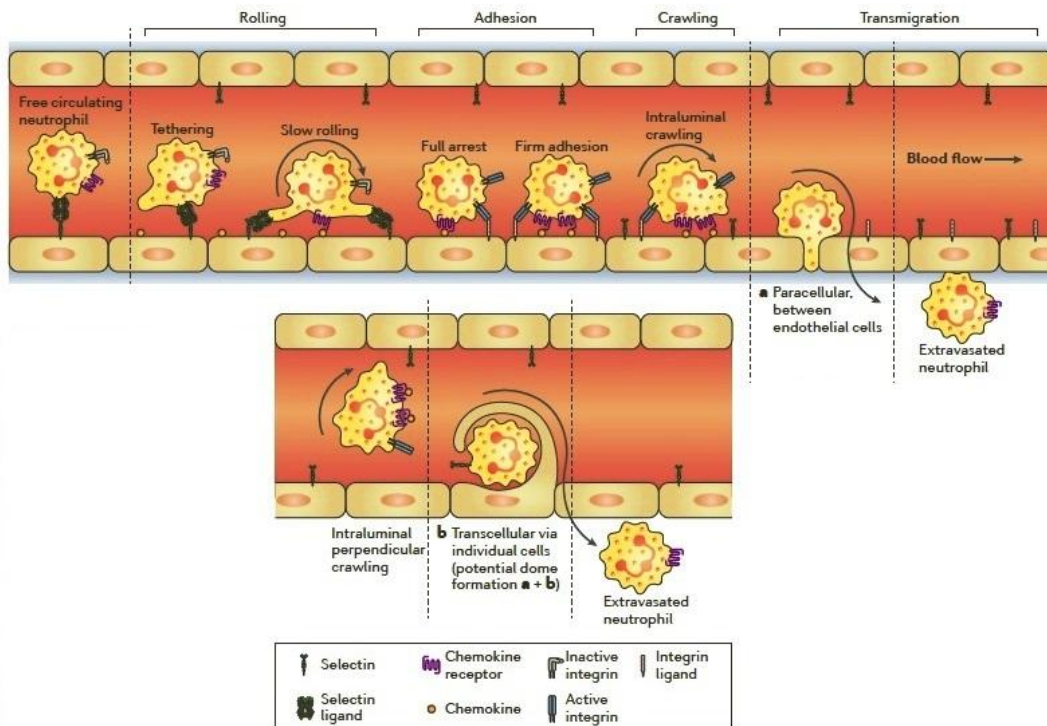


Figura 1. Sequência esquemática da migração dos neutrófilos. Fonte: Kolaczowska e Kubes, 2013 (modificado).

1.3 Fagocitose

A fagocitose é um mecanismo de transporte ativo mediado por receptores, que consiste no reconhecimento e ingestão de partículas maiores do que $5\mu\text{m}$, em vacúolos ligados à membrana, conhecidos como fagossomas. É um processo crítico para a imunidade e homeostase dos tecidos, pois, permite a remoção de patógenos e debris celulares nos mais diversos sítios anatômicos. A fagocitose é realizada principalmente por fagócitos profissionais, incluindo macrófagos, neutrófilos e células dendríticas (Freeman e Grinstein, 2014).

Assim como acontece em outros fagócitos, o mecanismo de internalização realizado pelos neutrófilos depende do tipo de interação entre a célula e o microrganismo. A interação pode ser direta, através de receptores de reconhecimento padrão (PRR, do inglês, *Pattern recognition receptor*), que reconhecem padrões moleculares associados a patógenos (PAMP, do inglês,

Pathogen-associated molecular patterns), ou por receptores que reconhecem opsoninas. Este último inclui dois exemplos bem caracterizados: a fagocitose mediada por receptores para a porção Fc (fragmento cristalizável) das imunoglobulinas G (Fc γ R, *Fc gamma receptors*), que se baseiam na formação de pseudópodes para o englobamento das partículas opsonizadas por IgG, e a fagocitose mediada por receptores do complemento (CR, do inglês, *complement receptors*), onde não ocorre a formação de pseudópodes, e a partícula opsonizada parece “afundar” para dentro do fagócito (Underhill e Ozinsky, 2002; Nordenfelt e Tapper, 2011).

Após a internalização das partículas opsonizadas ocorre a formação do fagossomo. O fagossomo nascente é um vacúolo membranoso derivado da invaginação da membrana plasmática, e não tem capacidade microbicida. Para que ocorra a eliminação dos patógenos, o fagossomo precisa passar por um processo de maturação que culmina na fusão dos grânulos citoplasmáticos, com a membrana do fagossomo, para formar o fagolisossomo. Em seguida, ocorre a desgranulação, mecanismo que consiste na liberação do conteúdo dos grânulos no interior do fagolisossomo. Concomitantemente, ocorre a montagem e ativação da enzima nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) oxidase na membrana do fagolisossomo, aumento do consumo de oxigênio, produção de ERO, caracterizando o *burst* (metabolismo) oxidativo do neutrófilo (Borregaard, Sørensen e Theilgaard-Mönch, 2007). A Figura 2 ilustra o mecanismo fagocítico e microbicida do neutrófilo.

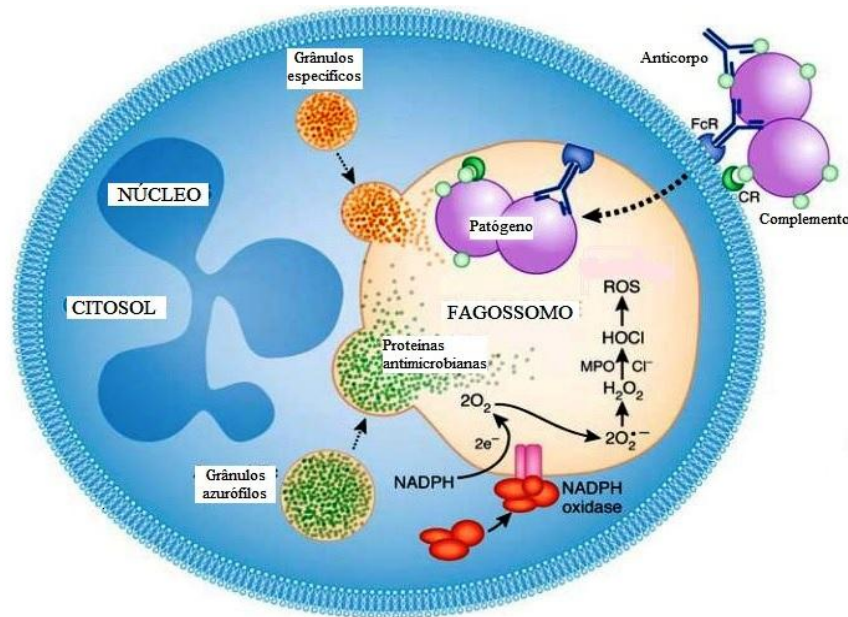


Figura 2. Fagocitose e atividade microbicida do neutrófilo. Após a fagocitose, ocorre a produção de ERO e liberação do conteúdo dos grânulos dentro do fagolisossomo, culminando na destruição do patógeno. ROS, do inglês, *reactive oxygen species*. Fonte: Kennedy e DeLeo, 2009 (modificado).

1.4 Desgranulação

Os grânulos dos neutrófilos transportam com segurança uma série de substâncias nocivas através da corrente sanguínea e as liberam corretamente no momento e local apropriado. Muito mais do que apenas organelas de armazenamento, eles são participantes ativos e indispensáveis em quase todas as atividades dos neutrófilos durante a inflamação (Amulic *et al.*, 2012). Eles são formados sequencialmente durante a granulopoiese na medula óssea, como visto na Figura 3. Existem três tipos fundamentais: 1) os azurófilos (também denominados primários ou peroxidase positivos); 2) os grânulos específicos (secundários), e 3) os grânulos terciários (de gelatinase). Estes dois últimos são peroxidase negativos. Além destes, um quarto conjunto de estruturas também é considerado como parte da família dos grânulos, são as vesículas secretoras, que são formadas por endocitose nos estágios finais da maturação do neutrófilo (Bjerregaard *et al.*, 2003; Amulic *et al.*, 2012). A mobilização destes grânulos ocorre de maneira sequencial, sendo as vesículas secretoras as primeiras a serem mobilizadas, seguidas pelos grânulos terciários, específicos e azurófilos (Wright *et al.*, 2010).

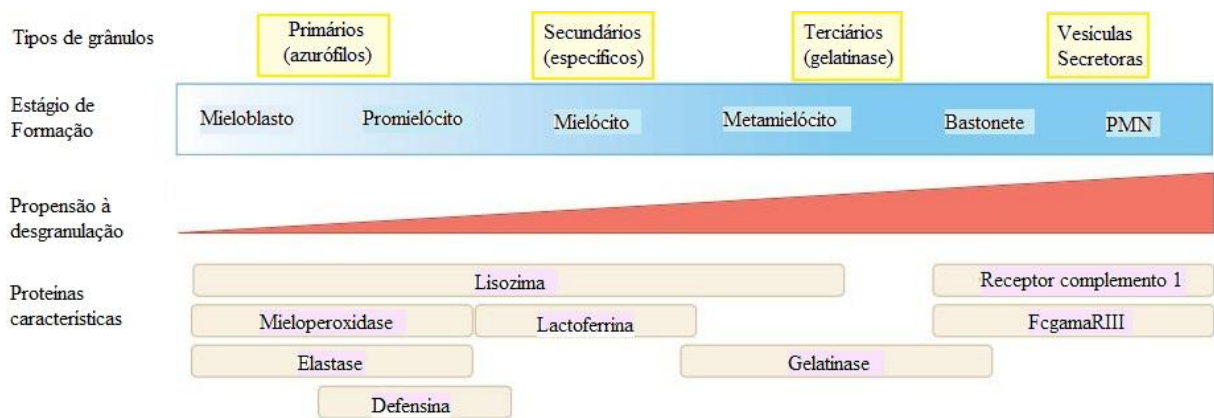


Figura 3. Conteúdo dos grânulos dos neutrófilos, estágio de formação e propensão à desgranulação. Fonte: Amulic, 2012 (modificado).

A heterogeneidade dos grânulos dos neutrófilos reside nos componentes da membrana e da matriz de cada tipo de grânulo. Os grânulos específicos, os grânulos de gelatinase e as vesículas secretoras, possuem em suas membranas uma variedade de receptores e moléculas funcionalmente importantes para as primeiras etapas de adesão e migração dos neutrófilos em direção ao foco inflamatório, e interação com o patógeno. Dentre estas moléculas, encontram-se componentes do complexo NADPH oxidase, $\beta 2$ integrinas, como exemplo, a cadeia α CD11b do CR3, e receptores para peptídeos bacterianos N-formilados (*f-Met-Leu-Phen receptor*; fMLP-R) (Nordenfelt e Tapper, 2011). No sítio inflamatório, ocorre a completa ativação do neutrófilo, o que leva ao início do metabolismo oxidativo com a produção de ERO, e a mobilização dos grânulos azurófilos e dos grânulos específicos. Nos grânulos azurófilos encontram-se as proteínas com ação antimicrobiana direta, as defensinas, catepsinas, elastase e mieloperoxidase. Assim, a fusão das membranas dos grânulos com o fagossomo contribui para a criação de um meio microbicida e hostil para patógenos invasores, que fica limitado ao interior do neutrófilo. Contudo, em algumas circunstâncias, tais grânulos podem também extravasar e causar dano tecidual (Borregaard, Sørensen e Theilgaard-Mönch, 2007; Amulic *et al.*, 2012).

As proteínas dos grânulos não somente sinergizam com oxidantes para a ação microbicida, elas também interagem com as ERO de diferentes formas. Por exemplo, as ERO inativam inibidores de protease para assegurar a atividade das proteases dos grânulos, enquanto os conteúdos dos grânulos podem regular a

atividade da NADPH oxidase (Uriarte *et al.*, 2011). A Tabela 1 lista os principais componentes dos grânulos dos neutrófilos.

Tabela 1. Principais componentes dos grânulos dos neutrófilos

Grânulos Primários	Grânulos Secundário	Grânulos Terciários	Vesículas Secretoras
Mieloperoxidase	Lisozima	Receptor para fMLP	Receptor para fMLP
Defensinas	Lactoferrina	CD11b	CD11a
Catepsina G	Receptor para fMLP	CD18	CD11b
Elastase	CD11b	Citocromo B	CD18
Proteinase 3	CD18	B2-microglobulina	CR1
Azurocidina	Citocromo B	Gelatinase	Citocromo B
Lisozima	Gelatinase	Diamina oxidase	Leucolisina
Fosfatase alcalina	Colagenase	ATPase	Fosfatase alcalina
Hidrolases	Histaminase	Lisozima	
Fosfolipase A2	Heparinase	Acetiltransferase	
Fosfolipase 3	Sialidase		
Fosfolipase D			

Fonte: Wright *et al.* 2010; Borregaard, 2010 (modificado).

1.5 Produção de ERO (*burst oxidativo*)

O complexo enzimático NADPH oxidase é essencial para o *burst oxidativo* que resulta na produção de ERO, as quais incluem ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radicais hidroxilas (HO^{\cdot}), e oxigênio singlete (1O_2) (El-Benna, Dang e Périanin, 2010). A produção de ERO representa um dos mecanismos de defesa mais poderosos do hospedeiro contra os patógenos, devido seu efeito oxidante sobre constituintes celulares importantes, como por exemplo, DNA, proteínas e lipídeos (Aguirre *et al.*, 2005; Valko *et al.*, 2007). A NADPH oxidase é composta por cinco subunidades e uma GTPase, separadas em compartimentos distintos no neutrófilo. Nas células em repouso, as subunidades p22^{phox} e gp91^{phox} (PHOX do inglês *Phagocyte Oxidase*) formam o componente citocromo b₅₅₈, que corresponde ao núcleo catalítico do complexo e fica localizado predominantemente na membrana dos grânulos secundários (cerca de 85%) e nas vesículas secretoras. As demais subunidades, p47^{phox}, p67^{phox}, p40^{phox}, e Rac2 encontram-se no citosol (Nauseef, 2007).

A ativação da célula em resposta a estímulos apropriados como, partículas opsonizadas e acetato de miristoilforbol (PMA, do inglês, *phorbol 12-myristate 13-acetate*), faz com que as subunidades citosólicas migrem para a membrana plasmática e associem-se ao citocromo b_{558} , formando o complexo enzimático ativo. Após a montagem, a NADPH oxidase catalisa a produção de ânion superóxido, pela transferência de elétrons do NADPH, para o oxigênio molecular, de acordo com a seguinte reação, $2O_2 + NADPH \rightarrow 2O_2^{\cdot-} + NADP^+ + H^+$ (Babior, 2004; Bylund *et al.*, 2010). Além da transferência de elétrons, a NADPH oxidase é responsável pelo transporte de H^+ e outros cátions, especialmente K^+ , para o interior do fagolisossomo (Reeves *et al.*, 2002).

Uma vez produzido, o ânion superóxido é imediatamente transformado em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) por dismutação espontânea no fagolisossomo, ou através da enzima superóxido dismutase no citosol. O peróxido de hidrogênio, por sua vez, pode reagir com íons metálicos e com o próprio ânion superóxido e dar origem a radicais hidroxila, ou servir de substrato para a enzima mieloperoxidase (MPO) para formar ácido hipocloroso, uma substância potencialmente bactericida (El-Benna, Dang e Périanin, 2010).

A produção excessiva de ERO, associada a um desequilíbrio do sistema antioxidante, pode resultar em um estresse oxidativo e, conseqüentemente, mediar danos a estruturas celulares do hospedeiro (Valko *et al.*, 2007).

1.6 Mieloperoxidase

A MPO é membro da família das hemeperoxidases (enzimas que utilizam íon ferro em suas reações de peroxidação), produto de um único gene, localizado no braço longo do cromossomo 17, e funciona como um componente fundamental na maquinaria efetora dos neutrófilos durante a inflamação. Esta enzima representa cerca de 5% do peso seco de neutrófilos, sendo a maior constituinte dos grânulos primários, podendo também ser encontrada em menores quantidades em monócitos e macrófagos (Klebanoff, 1967). Inicialmente a MPO corresponde a um produto enzimaticamente inativo, denominado apoproMPO. Após a inserção do grupamento heme (Ferro Protoporfirina IX), a apoproMPO é convertida a uma enzima ativa, a proMPO que, por sua vez, passa por modificações proteolíticas dando origem a MPO madura (Klebanoff, 2005).

Os neutrófilos, na presença de haletos como, cloreto (Cl^-), brometo (Br^-) e iodeto (I^-), utilizam o H_2O_2 como substrato da MPO para produzir potentes agentes oxidantes, o ácido hipocloroso (HOCl), o ácido hipobromoso (HOBr) e o ácido hipoiodoso (HOI), respectivamente (Weiss *et al.*, 1982). O cloreto normalmente está presente em concentrações muito maiores do que os outros haletos, o que justifica a maior produção de HOCl pelos neutrófilos (Prokopowicz *et al.*, 2012).

A ação catalítica da MPO gera pelo menos três intermediários redox como mostra a Figura 4. A princípio o grupamento heme da MPO encontra-se em seu estado nativo, ou seja, com o ferro em sua forma férrica (Fe^{3+}), este, ao reagir com o peróxido de hidrogênio, forma o composto I (Fe^{4+}). O composto I tem a capacidade de reagir com os haletos em um processo que envolve a transferência de dois elétrons, formando o respectivo ácido hipoalogenoso, e reduzindo a MPO ao seu estado nativo (Fe^{3+}) novamente. Esta etapa é denominada ciclo de halogenação (Nussbaum *et al.*, 2013). Além dos haletos, o composto I também pode reagir com diversos substratos orgânicos e formar o composto II, um intermediário que não possui a capacidade de formar ácido hipoalogenoso. Em seguida, o composto II é reduzido a sua forma ativa e adquire a capacidade de oxidar íons haleto (Van Der Veen, De Winther e Heeringa, 2009). A MPO, em sua forma nativa, também pode reagir com o superóxido e formar o composto III, que, por sua vez, sofre redução pelo próprio superóxido, gerando oxigênio e peróxido de hidrogênio, funcionando como uma superóxido dismutase (Kettle *et al.*, 2007). A concentração relativa de oxigênio, superóxido e peróxido de hidrogênio, modifica a capacidade catalítica da MPO e determina a quantidade de intermediários reativos produzidos (Nussbaum *et al.*, 2013).

À MPO também tem sido atribuído um efeito deletério durante a inflamação, principalmente em funções cardiovasculares, dentre elas, a oxidação de lipoproteínas (Bergt *et al.*, 2004) e aterosclerose acelerada (Mcmillen, Heinecke e Leboeuf, 2005). Adicionalmente, a MPO também atrai (Klinke *et al.*, 2011) e ativa (Lau *et al.*, 2005) neutrófilos, acelerando e amplificando o processo inflamatório. A deposição da MPO no endotélio requer o contato íntimo neutrófilo-endotélio e é dependente de CR3 (Jerke *et al.*, 2013), sugerindo um papel importante para o CR3 em mediar o dano tecidual em condições inflamatórias crônicas, como a vasculite que acomete pacientes com lúpus eritematoso sistêmico (LES).

Curiosamente, a MPO liberada no sítio inflamatório também pode exercer um papel autócrino no neutrófilo por associar-se ao CR3, alterando vias de sinalização intercelular. Estas alterações podem levar ao aumento da produção de ERO e uma maior expressão de CD11b na superfície do neutrófilo. Estas evidências revelam funções alternativas desta enzima que são independentes de sua atividade bactericida (Lau e Baldus, 2006).

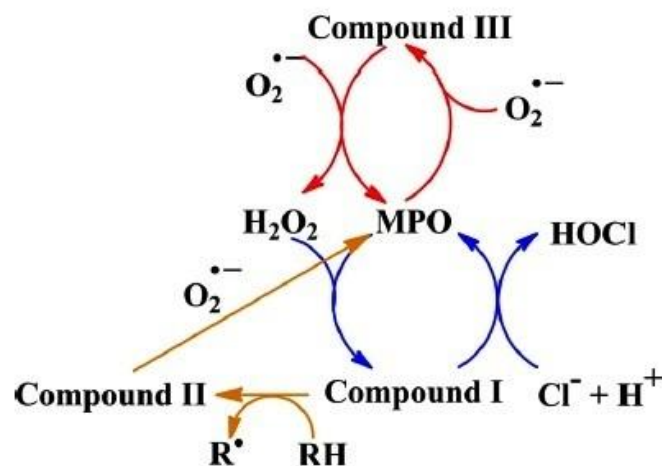


Figura 4. Reação Catalisada pela MPO dentro do fagossomo. A atividade catalítica da MPO inclui a produção de HOCl e dismutação do ânion superóxido. O ânion superóxido também é capaz de reciclar o composto II, formando composto I reduzido, de maneira a manter a atividade da enzima. Fonte: Klebanoff, 2012 (modificado).

1.7 CR3, a integrina CD11b/CD18

O CR3 é uma glicoproteína de adesão celular, que medeia interações célula-célula, célula-matriz e célula-patógeno, tendo um papel essencial em vários processos do sistema imune. Este receptor pertence à família das β_2 -integrinas, sendo constituído por uma cadeia α (CD11b) ligada não covalentemente a uma cadeia β (β_2 ou CD18) (Faridi *et al.*, 2010). Cada uma das subunidades, α e β , possui um domínio extracelular amplo, um domínio transmembrana e um domínio intracelular curto, como mostra a Figura 5 (Hu *et al.*, 2010; Chua *et al.*, 2011; Rougerie, Miskolci e Cox, 2013).

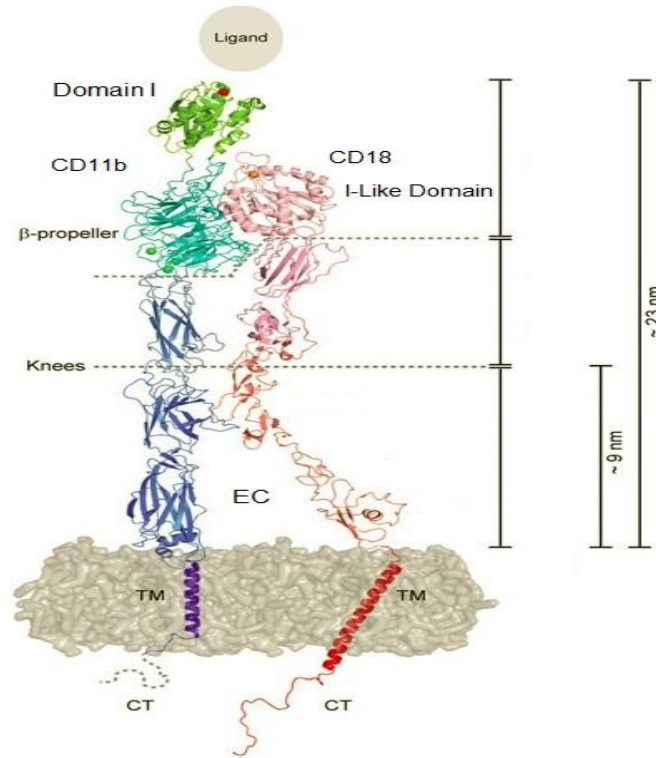


Figura 5. Estrutura do receptor do complemento tipo 3 (CR3). EC, domínio extracelular; TM, domínio transmembrana; CT, domínio citoplasmático. Fonte: Suet-Mien, 2012 (modificado).

No domínio extracelular da subunidade α está localizada uma região altamente conservada, de aproximadamente 200 aminoácidos (aa), conhecida como domínio I. O domínio I medeia a ligação da integrina a seus ligantes, e existe em duas diferentes conformações: aberto (com afinidade alta ou intermediária) ou fechado (baixa afinidade). Normalmente, quando os leucócitos estão na circulação, as β_2 -integrinas exibem uma baixa afinidade pelos seus ligantes devido à conformação dobrada e compactada do domínio extracelular, o que impede a exposição do domínio I. No entanto, a ativação da célula por intermédio de outros receptores, ou por moléculas citoplasmáticas, desencadeia uma transmissão de sinais de dentro para fora da célula (*inside-out*) através das integrinas, como consequência do recrutamento de uma série de proteínas quinase e moléculas adaptadoras presentes no citoplasma, para o domínio intracelular. O resultado final desta sinalização é uma mudança conformacional dos domínios citoplasmáticos e transmembranares da integrina, que é retransmitido para o domínio extracelular, com subsequente exposição do domínio I, alterando sua capacidade de se ligar aos ligantes. Conseqüentemente, esta ligação da integrina ao seu respectivo ligante leva a uma transdução de sinais de fora para dentro da célula (*outside-in*), podendo levar a mudanças no citoesqueleto de actina, migração, fagocitose e alterações na

expressão gênica. Estes eventos de sinalização, apesar desta divisão em duas vias distintas, ocorrem simultaneamente e reforçam-se mutuamente (Evans *et al.*, 2009; Gahmberg *et al.*, 2009).

Entretanto, embora o domínio I seja o principal sítio de ligação das integrinas, outras estruturas também influenciam no reconhecimento dos ligantes. A subunidade α do CR3 possui um domínio *lectina-like* localizado próximo a membrana plasmática, que está envolvido no reconhecimento de ligantes não-proteicos, incluindo, β -glucanos (ex.: zimosan, Zi) e resíduos de manose. Este reconhecimento pode, inclusive, modular a função do domínio I (Forsyth, Plow e Zhang, 1998; Plow *et al.*, 2000). Adicionalmente, a importância de cátions como, magnésio (Mg^{2+}) e manganês (Mn^{2+}), neste processo de ligação da integrina ao ligante, também é reconhecida. Estes cátions podem se ligar a diferentes locais na porção extracelular da integrina, incluindo o sítio de ligação MIDAS (do inglês, *metal ion dependent adhesion site*), localizado no domínio I da cadeia α , e no domínio *I-like* adjacente (ADMIDAS), presente na cadeia β . O domínio MIDAS auxilia na mudança conformacional do receptor e aumenta sua afinidade pelos ligantes (Lomakina *et al.*, 2009).

As cadeias α e β do CR3 são codificadas por genes distintos. O gene ITGAM (do inglês, *integrin alpha M*), localizado no braço curto do cromossomo 16, na região 11.2 (16p11.2), codifica a subunidade α (CD11b) (Lee e Bae, 2014). Já a subunidade CD18 é produto do gene ITGB2 (do inglês, *integrin beta 2*), que fica localizado no braço longo do cromossomo 21, na região 22.3 (21q22.3) (Etzioni, 2009).

O CR3 é abundantemente expresso em neutrófilos, macrófagos e monócitos, e liga-se a um amplo número de ligantes, incluindo proteínas da matriz extracelular, fibrinogênio, zimosan, ICAM-1, e ao fragmento C3bi do complemento (Zarbock e Ley, 2009; Huang *et al.*, 2011; Fagerholm *et al.*, 2013). O CR3 atua em sinergismo com os receptores para imunoglobulinas Fc γ RIIIb e Fc γ RIIa nos neutrófilos, para mediar o *clearance* de imunocomplexo, a fagocitose, a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), a desgranulação e apoptose dos neutrófilos. Zhou e Brown (1994) sugeriram que a cooperação do CR3 com Fc γ RIIIb ocorre por uma interação física direta entre eles. Acredita-se que resíduos de carboidratos presentes no Fc γ RIIIb interagem com o domínio *lectina-like* do CR3. Esta interação, por sua

vez, induz a fosforilação do domínio citoplasmático do Fc γ R1a e, subsequente, transdução de sinais. Em adição, a ligação do CR3 do neutrófilo com o ICAM-1 nas células endoteliais, medeia as interações neutrófilos-endotélio responsáveis pela migração celular (Ley *et al.*, 2007). Diante disso, pode-se afirmar que o CR3 apresenta um papel fundamental no controle da inflamação.

Em neutrófilos não estimulados, as subunidades CD11b e CD18 estão localizadas na membrana dos grânulos específicos e terciários, nas vesículas secretoras, e uma pequena parte na membrana plasmática. Numa série de experimentos, Sengeløv e colaboradores (1993) demonstraram que quando os neutrófilos são estimulados por fMLP (do inglês, *N-formyl-methionyl-leucyl-phenyl-alanine*), PMA ou zimosan opsonizado com soro humano normal Zi/SHN, ocorre a translocação do CD11b e do CD18 para a membrana plasmática, com um aumento na quantidade deste receptor na superfície da célula (6 a 25 vezes mais) em resposta a tais estímulos.

1.8 Variante ITGAM (rs1143679)

Em 1996, Simsek e colaboradores descreveram um polimorfismo de um único nucleotídeo (SNP, do inglês *single nucleotide polymorphism*) no gene *ITGAM*. Esta mutação pontual (*ITGAM* - G328A, rs1143679) em que ocorre a troca de uma guanina (G) por uma adenina (A), resulta na mudança de uma arginina (Arg) por uma histidina (His) na posição 77 do domínio extracelular do receptor na cadeia CD11b, acarretando em modificações nas estruturas terciária e quaternária da proteína. A presença da arginina na posição 77 (R77) da cadeia CD11b foi denominada de antígeno de MART. Esta variante é responsável pela aloimunização de indivíduos Mart-negativos, que são aqueles cuja cadeia CD11b apresenta uma histidina na posição 77 (77H). Atualmente este aloantígeno é designado como aloantígeno do neutrófilo humano (HNA, do inglês, *human neutrophil alloantigen*) – 4a. Este aloantígeno está associado à incidência de neutropenia neonatal (Sachs *et al.*, 2004) e a variante polimórfica HNA-4a-positivo é encontrada em mais de 90% da população brasileira (Cardone *et al.*, 2006). O resíduo de Arg-77 encontra-se próximo ao domínio I, como mostrado na Figura 6. Portanto, esta variante pode influenciar a interação da integrina com os ligantes e outras funções celulares (Nath *et al.*, 2008; Anaya *et al.*, 2012; Zhou *et al.*, 2013).

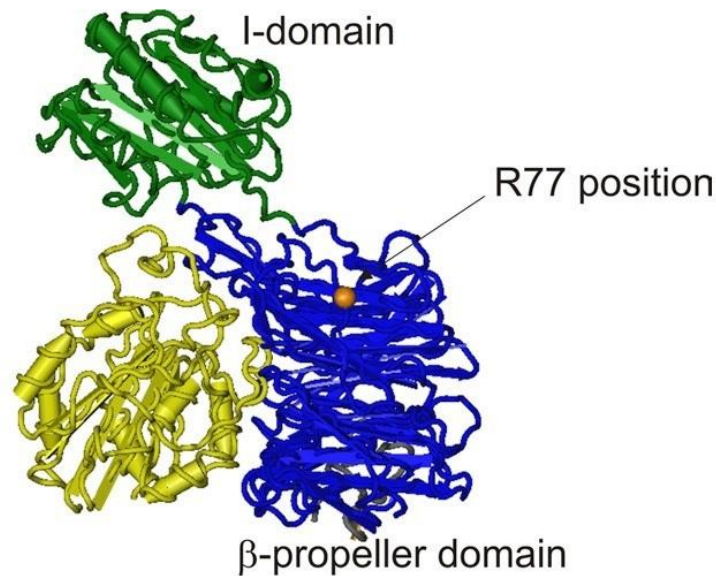


Figura 6. Representação da posição 77 da cadeia CD11c da integrina $\alpha X\beta 2$, que apresenta 66% de identidade e 77% de homologia com o CR3. Fonte: Macpherson, 2011 (modificado).

Fagerholm e colaboradores (2013) demonstraram que o alelo 77H não influencia a expressão da integrina na superfície de células transfectadas, nem a heterodimerização com o CD18. Foi visto também que não mudou a habilidade da integrina em promover mudanças conformacionais associadas à ativação da integrina, e pouco afetou a ligação a ligantes solúveis. Estes resultados sugerem que a sinalização *inside-out* é relativamente normal. Entretanto, indivíduos com a variante 77H sofrem influências drásticas na habilidade da integrina de mediar a ligação da célula a ligantes, como ICAM-1 e ICAM-2, em condições estáticas ou de fluxo de cisalhamento, sugerindo que a sinalização *outside-in*, que normalmente leva ao fortalecimento da ligação, é afetada em células de indivíduos com o alelo mutado.

Também foi demonstrado por nosso grupo de pesquisa que a variante 77H está associada à suscetibilidade ao LES e com a ocorrência de nefrite (Toller-Kawahisa *et al.*, 2014), corroborando com outros grupos (Yang *et al.*, 2009; Sanchez *et al.*, 2011), bem como uma associação da presença da variante 77H com o aumento da produção de ERO por neutrófilos de pacientes com LES (Toller-Kawahisa *et al.*, 2013). As associações da variante 77H com o risco ao LES e à nefrite lúpica têm implicações para o dano tecidual nos processos inflamatórios por deposição de imunocomplexos (IC) em órgãos e endotélio. Entretanto, há poucos estudos funcionais com esta variante, sendo a maioria em células transfectadas (Macpherson *et al.*, 2011; Fosatti-Jimack *et al.*, 2013).

O estudo da influência de polimorfismos de receptores nas funções efetoras dos neutrófilos é importante para a compreensão dos mecanismos que envolve as defesas do hospedeiro e a interação neutrófilo-endotélio, na patogênese dos processos inflamatórios.

2. JUSTIFICATIVA

As implicações da variante da cadeia do CD11b (rs1143679) do CR3 para o *burst* oxidativo dependente de MPO em neutrófilos humanos ainda não são conhecidas.

O nosso grupo de pesquisa tem estudado a biologia dos receptores para IgG e de complemento no LES (Marzocchi-Machado *et al.*, 2002; 2005; Alves *et al.*, 2003; 2008), tendo descrito alterações de expressão e de funções mediadas por estes receptores, bem como a influência dos polimorfismos genéticos destes receptores nas funções efetoras dos neutrófilos e na suscetibilidade ao LES (Toller-Kawahisa *et al.*, 2013; 2014; Vigato-Ferreira *et al.*, 2014). Nesta linha de investigação, o grupo vem trabalhando para buscar o entendimento de como estas alterações observadas podem de fato ter implicações para as interações neutrófilo-endotélio e resultar em dano tecidual.

Espera-se contribuir para elucidar se o polimorfismo da cadeia CD11b tem implicações fisiológicas para os neutrófilos estimulados via CR3 e, posteriormente, somar e aplicar o conhecimento para a compreensão da associação deste polimorfismo com a fisiopatologia e suscetibilidade ao LES.

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar as implicações da variante da cadeia CD11b (rs1143679) do CR3 no *burst* oxidativo dependente de MPO em neutrófilos humanos.

3.2 Específicos

- a) Avaliar a liberação de MPO dos neutrófilos de indivíduos saudáveis, utilizando-se como estímulo para o CR3 o zimosan opsonizado pelo complemento;
- b) Determinar os genótipos para o polimorfismo da cadeia CD11b do CR3;
- c) Analisar a expressão do CR3 nos neutrófilos.

4. CASUÍSTICA E MÉTODOS

4.1 Casuística e Metodologia

O presente protocolo de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP-USP) para o seu desenvolvimento. O delineamento deste projeto foi feito de acordo com a resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde (CNS, Brasil, 2012). Anexo I.

Os participantes voluntários da pesquisa, indivíduos saudáveis, homens e mulheres, com idade entre 18 e 50 anos, foram recrutados na comunidade do Campus da USP de Ribeirão Preto. O critério de exclusão utilizado foi o tabagismo, uso de medicamento controlado, antibiótico, imunossupressor, gravidez e uso de anti-inflamatórios há menos de sete dias. Todos os participantes receberam informações a respeito da natureza e objetivos da pesquisa, e assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido.

Estes participantes foram agrupados em dois grupos, A e B:

Grupo A: os participantes (n=44), sendo 18 homens e 26 mulheres, doaram amostras de sangue periférico para ao estudo da função dos neutrófilos e para a genotipagem do polimorfismo da cadeia CD11b do CR3.

Em seguida, foram redistribuídos em dois subgrupos, de acordo com a presença dos alelos R77 e H77 em homozigose e heterozigose, a saber:

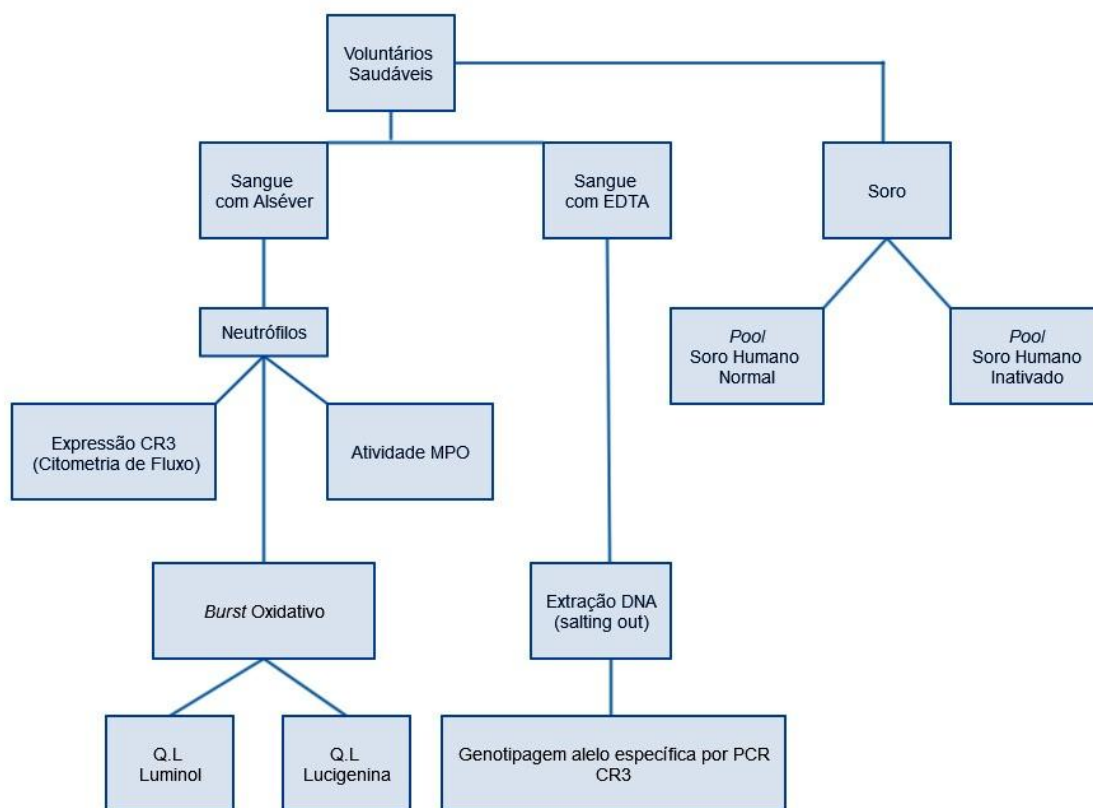
1) Homozigotos para o alelo R77 (n=24). Compreendendo 9 homens e 15 mulheres.

2) Homozigotos para o alelo H77 (n=4) + heterozigotos R77H (n=16) Compreendendo 9 homens e 11 mulheres.

A frequência da homozigose 77H na nossa população é 3% (Toller-Kawahisa *et al.*, 2014) e frente esta baixa frequência, a influência da presença do alelo H (para a proteína variante) foi representada pelo segundo grupo descrito acima, o qual reuniu os indivíduos que apresentam homozigose 77H e heterozigose R77H.

Grupo B: os participantes (n=20), sendo 10 homens e 10 mulheres, com idade entre 18 e 35 anos, doaram amostras de sangue periférico para a obtenção de soro humano normal (SHN), as quais foram reunidas para formar um *pool* de SHN, utilizado como fonte de proteínas do sistema complemento, conforme descrito abaixo no item 4.13. Para este grupo, além dos critérios de exclusão descritos acima, considerou-se também o uso de contraceptivos hormonais (pílula, injetável, adesivo na pele e intra-uterino).

O Fluxograma 1 apresenta a organização das atividades desenvolvidas no projeto, a partir das amostras de sangue obtidas dos voluntários.



Fluxograma 1. Representação das atividades desenvolvidas. EDTA, ácido etileno diamino tetracético; Q.L, quimioluminescência; PCR, reação em cadeia da polimerase; CR3, receptor do complemento tipo 3; MPO, mieloperoxidase.

4.2 Principais reagentes utilizados

Os protocolos seguidos para o preparo das principais soluções utilizadas estão descritos no Anexo II.

4.3 Extração de DNA

*SDS - Dodecil Sulfato de Sódio 10% – Mallinckrodt Baker, Ink. Phillipsburguer, USA.

*MgCl₂ 1M.

*Tris HCl 1M pH 8,0.

*Perclorato de Sódio 5M.

*NaCl 6M saturado.

*EDTA.

*Tampão de lise de eritrócitos.

*Tampão de lise II.

*Isopropanol absoluto - Mallinckrodt Baker, S.A. de C.V., México.

*Etanol 70% - Mallinckrodt Baker, S.A. de C.V., México.

4.4 Reação em cadeia de polimerase (PCR)

*Deoxinucleotídeos (dNTP) Set, Molecular Biology Grade – Fermentas, Foster City, California, USA.

*Taq DNA Polymerase (recombinant) – Fermentas.

*MgCl₂ 25mM – Fermentas.

*Taq tampão com KCl – Fermentas.

*Oligonucleotídeos – Invitrogen, Brasil.

HGH Sense: 5' GCC TTC CCA ACC ATT CCC TTA 3'

HGH Anti-sense: 5' CTC ACG GAT TTC TGT GTT TC 3'

HNA-4a Sense: 5' CTC CCC ACA GGG TGG TG 3'

HNA-4a Negativo Anti-sense: 5' AGT GAC TCA CCC TGC ATG T 3'

HNA-4a Positivo Anti-sense: 5' AGT GAC TCA CCC TGC ATG C 3'

4.5 Corrida do gel

*Tampão Tris-Borato-EDTA (TBE) pH 8,3.

*Solução de agarose, Uniscience, 2% em TBE, São Paulo, Brasil.

*Tampão de amostra: azul de bromofenol 0,25% e sacarose 40%.

*GelRed – Uniscience.

*Marcador de pares de base (pb): 50pb DNA Ladder – Fermentas.

4.6 Purificação de neutrófilos

*Solução de Hanks pH 7,2 (PAUL, 1970).

*Solução de Alsever (tampão citrato com azida sódica pH 6,1).

*Líquido de Turk (violeta de genciana 1% em solução de ácido acético 1%).

*CFD/gel 0,1% – Tampão de Fixação de Complemento com 0,1% de gelatina (pH 7,2).

*Solução fisiológica (NaCl 0,15 mol/L).

*Solução de NH₄Cl 0,83% pH 7,2.

*Solução de gelatina (Difco) 2,5% em NaCl 0,15 mol/L.

4.7 Atividade da MPO

- *Solução de Hanks pH 7,2 (PAUL, 1970).
- *Solução de gelatina (Difco) 2,5% em NaCl 0,15 mol/L.
- *Solução fisiológica (NaCl 0,15 mol/L)
- *Solução KI
- *PBS (salina tamponada com fosfato) pH 7,4
- *TMB (3,3',5,5'- tetrametilbenzidina) (Sigma T-2885)
- *Catalase (Sigma C-10)
- *DMF (dimetilformamida) (Sigma)
- *Taurina (Sigma)
- *Zimosan (Sigma Z4250)

4.8 *Burst* Oxidativo

- *Luminol (5-amino-2,3-diidro-1,4-ftalazinodiona) – Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO, USA, A8511.
- *Lucigenina (N,N' – Dimetil – 9,9'- Biacridinium dinitrate) – Sigma Aldrich Co., M8010.
- *Dimetilsulfóxido (DMSO) – Merck, USA.
- *PBS – salina tamponada com fosfato pH 7,4.
- *EDTA –ácido etileno diamino tetracético

4.9 Expressão de receptores

- *BD FACS Solução de lise – BD Biosciences, USA, 349202.
- *PBS/SBF (Soro Bovino Fetal) 2% azida <0,1% pH 7,2.
- *Formaldeído PA – Quimis, Indaiatuba, São Paulo.
- *Anticorpos anti-receptor específico:
- *Controle isotípico IgG1 kappa de camundongo, marcado com ficoeritrina (PE), clone MOPC-21, código 555749 – PHARMINGEN, San Diego, CA – USA.
- *Anti-CD11b/Mac-1 humano, marcado com PE, clone ICRF44, IgG1 de camundongo, código 555388 – PHARMINGEN.

4.10 Equipamentos utilizados

- *Centrífuga Refrigerada Eppendorf modelo 5810R (Eppendorf Instruments Inc., Hamburg, Germany).
- *Centrífuga Refrigerada Eppendorf modelo 5415R (Eppendorf Instruments Inc., Hamburg, Germany).
- *Citômetro de fluxo modelo FACSCalibur™ (Fluorescent Activated Cell Sorter), “software Cell Quest Pro™” (Becton Dickinson).
- *Freezer -80°C (Forma Scientific).
- *Microscópio Óptico Olympus BX51 (Almada, Setúbal, Portugal).
- *Fonte de eletroforese Termo EC 3000 XL Power Supply (Dubuque, Iowa, USA).
- *Luminômetro EG&G Berthold, modelo AutoLumat Plus LB 953 (Bad Wildbad, Germany).
- *Termociclador Eppendorf – Mastercycler Gradient (Hamburgue, Germany).
- *Vortex-Genie 2, Model G560 (Bohemia, NY, USA).
- *Banho-maria - 5 Liter Water Bath – Polysciences (Niles, IL, USA).
- *Balança Analítica – Adventurer AR2140, marca Ohaus (Pine Brook, NJ, USA).
- *Autoclave Tuttnauer Semiautomatic Laboratory Table-Top Steam Sterilizers Modelo 2540 ML (Beit Shemesh, Israel).
- *Cubas para gel de agarose – Termo Scientific – Owl Easycast™ horizontal minigel 12cm X 14cm B2 e Owl Easycast™ horizontal minigel 9cm X 11cm B1 (Portsmouth, NH, USA).
- *Fotodocumentador Bio-Rad – Modelo Universal HoodII - Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, USA).
- *Leitor de ELISA EIA Multi-well Reader II, Sigma Dieagnostics (St.Louis, MO, USA).
- *Agitador com temperatura – Environmental Shaker Incubator ES-20 – Biosan (Riga, LV, EU).
- *Capela de Fluxo laminar vertical – OptiMair™ Vertical – Esco Technologies, Inc. (Hatboro, PA, USA).
- *pHmetro microprocessador de bancada – PG 1800 – Gehaka (São Paulo, SP, BRA)

4.11 Extração e caracterização do DNA genômico

4.11.1 Extração por método de *salting out*

O DNA genômico foi extraído de leucócitos do sangue periférico por técnica de *salting out* descrita anteriormente por Miller e colaboradores (1988), esta técnica baseia-se na precipitação de proteínas com NaCl 6M, e foi realizada com algumas modificações.

Para extração, foram colhidos 10mL de sangue total em presença do anticoagulante EDTA-K₂ (sal dipotássico do ácido etilenodiaminotetracético). O sangue total foi então transferido para um tubo de polipropileno (tipo *falcon*) de 50mL, onde foi acrescido aproximadamente 35mL de tampão de lise de eritrócitos. A mistura foi homogeneizada cuidadosamente e submetida à centrifugação a 1157xg por 6 minutos, sob temperatura de 20°C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi desprezado e as células foram ressuspensas em uma mistura contendo 1,1mL de perclorato de sódio 5M, 125µL de dodecil sulfato de sódio (SDS) 10% e 4,5mL de tampão de lise II, para lise dos leucócitos.

A mistura foi homogeneizada em vórtex por 10s e acrescida de 2mL de NaCl saturado 6M, sendo novamente homogeneizada em vórtex por 15s e centrifugada a 1301xg por 8 minutos, a uma temperatura de 23°C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi transferido para outro tubo tipo *falcon* estéril, onde foi adicionado 5mL de isopropanol. A solução foi homogeneizada vagarosamente por inversão do tubo por aproximadamente 1 minuto, para que houvesse a precipitação do DNA.

Posteriormente, o sobrenadante foi desprezado e o DNA precipitado foi colocado em um microtubo, onde foi acrescido 1mL de etanol a 70%, e submetido à centrifugação a 2300xg por 5 minutos sob 4°C.

Ao término da centrifugação, o sobrenadante foi retirado e o tubo foi mantido invertido sobre um papel de filtro absorvente durante 24 horas até a secagem completa. Após a secagem, foi acrescido ao DNA de 200µL de água destilada pura estéril e, então, a amostra foi armazenada sob temperatura de -20°C até o momento do uso.

4.11.2 Análise dos genótipos

Os genótipos foram analisados por PCR com oligonucleotídeo específico para o alelo (SSP-PCR; do inglês, *Single Specific Primer-Polymerase Chain Reaction*). As amostras de DNA com genótipos previamente conhecidos e confirmados por sequenciamento em nosso laboratório foram utilizadas como padrões. O controle positivo interno das reações consistiu de oligonucleotídeos específicos para o gene do hormônio do crescimento humano (HGH), conforme descrito anteriormente por Bux e colaboradores (1995). Todas as reações foram acompanhadas de um controle negativo contendo todos os reagentes utilizados na reação, exceto o DNA.

4.11.3 CR3 (CD11b/CD18)

A análise por PCR do polimorfismo da cadeia CD11b do CR3 foi realizada utilizando-se oligonucleotídeos *sense* comum para os 2 alelos e *anti-sense* específicos para cada um dos alelos R77 e 77H, como descrito previamente por Clague e colaboradores (2003), com algumas modificações (Toller *et al.*, 2014).

Foram preparados dois tubos de *mix*, um correspondente ao R77 e outro ao 77H. A mistura da reação foi composta por: 20 μ M de oligonucleotídeos *sense* e 20 μ M de *anti-sense* alelo-específico; 10 μ M de oligonucleotídeos do HGH; 2 unidades (U) da enzima Taq polimerase; 10mM de dNTP; 5 μ L de tampão para PCR (10 vezes concentrado); 1,5 mM de cloreto de magnésio; e água deionizada estéril para completar o volume de reação, que foi de 50 μ L. A cada tubo, exceto no controle sem DNA, foi adicionada cerca de 400ng de DNA genômico.

As reações foram realizadas em um termociclador automático de temperatura (Mastercycler, Eppendorf) no seguinte protocolo: 15 minutos a 95°C para desnaturação inicial; 30 ciclos de amplificação de 30 segundos a 95°C para desnaturação, 1 minuto a 58°C para anelamento e 30 segundos a 72°C para extensão; e 10 minutos a 72°C de extensão final, segundo protocolo descrito por Clague e colaboradores (2003). O tamanho dos fragmentos obtidos após a amplificação foi de 124 pares de base (pb).

4.11.4 Eletroforese dos produtos da PCR

Os fragmentos de DNA amplificados por PCR, para as variantes polimórficas da cadeia CD11b do CR3 foram separados por eletroforese em gel de agarose 2%

em tampão Tris-Borato-EDTA (TBE) pH 8,3. Uma amostra de 25µL do produto de cada PCR foi misturada a 5µL de tampão de amostra contendo sacarose, azul de bromofenol e GelRed®. Em seguida as amostras foram aplicadas nos poços do gel com auxílio de pipeta. Amostras padrões de marcadores de número de pares de base, DNA *ladder* 50pb, também foram aplicadas nos géis (0,5µg/poço).

Para o preparo dos géis foi feita uma mistura de 100mL de TBE e 2g de agarose (Uniscience), e colocada na cuba de eletroforese. A corrida eletroforética foi feita em 250V, 40mA, 100W por 1 hora e 20 minutos. Após a migração, o gel foi fotografado em fotodocumentador (Bio-Rad, Universal HoodII). As bandas apareceram fluorescentes. Após a leitura, o gel foi descartado e as imagens digitalizadas foram arquivadas.

4.12 Colheita de sangue e purificação de neutrófilos humanos

As amostras de sangue periférico foram colhidas por punção venosa, utilizando sistema a vácuo e estéril, e transferidas para tubos tipo *falcon* com anticoagulante Alséver pH 6,1 (v/v) na proporção 1:2. E para a purificação dos neutrófilos utilizou-se o método de Henson (1971), modificado por Lucisano e Mantovani (1984), conforme descrito a seguir.

O sangue foi centrifugado a 1250xg por 10 minutos a 20°C e a camada superior de células foi removida com o plasma. As células sedimentadas foram suspensas em solução de gelatina 2,5% em NaCl 0,15 mol/L, e depois incubadas por 15 minutos a 37°C. Em seguida, o sobrenadante foi coletado e diluído em NaCl 0,15 mol/L e centrifugado a 974xg por 10 minutos a 25°C. Ao término da centrifugação, o sedimento foi suspenso em cloreto de amônio (NH₄Cl) 0,83%, pH 7,2, e incubado por 5 minutos a 37°C. Após a incubação, foi realizada uma nova centrifugação (974xg, 10 minutos, 25°C). Em seguida, as células foram suspensas em NaCl 0,15 mol/L e novamente submetidas à centrifugação (974xg, 10 minutos, 25°C). Os neutrófilos purificados foram suspensos em solução balanceada de Hanks pH 7,2 com 0,1% de gelatina suplementado com taurina 5 mM, e mantidos em banho de gelo até o momento da contagem. Essa metodologia assegura uma preparação contendo 80-90% de neutrófilos e viabilidade maior que 95%. Posteriormente, uma alíquota de 10µL foi diluída em líquido de Turk na proporção 1:100 (v/v), para contagem em Câmara de Neubauer. Após contagem, a

concentração da suspensão celular foi ajustada pela adição de solução de Hanks, pH 7,2 com 0,1% de gelatina e taurina e reservada para uso.

4.13 Colheita de sangue para obtenção de soro com fonte de complemento

Quarenta mL de sangue venoso periférico foram colhidos dos voluntários, utilizando sistema de coleta a vácuo e estéril, sem anticoagulante. Inicialmente o sangue colhido foi deixado em repouso sob temperatura de 4°C por 1 hora, para que ocorresse a formação do coágulo e, posteriormente, foi submetido à centrifugação a 1250xg, por 10 minutos a 4°C. Após a centrifugação, as amostras de soro foram coletadas e reunidas para formação de um *pool* de SHN. Parte deste *pool* foi submetido ao tratamento pelo calor a 56°C por 30 minutos, para inativação das proteínas do sistema complemento (soro humano inativado, SHI). Tanto o SHN quanto o SHI foram aliquotados e armazenados numa temperatura de 80°C negativo. O *pool* de soro funciona como fonte de complemento para a opsonização do zimosan.

4.14 Preparo do estímulo: zimosan e zimosan opsonizado

Zimosan é um polissacarídeo do fungo *Saccharomyces cerevisiae*, insolúvel em meio aquoso, e capaz de ativar o sistema complemento presente no soro humano. Uma vez ativado o complemento, as partículas do polissacarídeo tornam-se revestidas pelos fragmentos C3b e C3bi (Coates, N. J. 2001). Estas partículas opsonizadas (zimosan opsonizado) são reconhecidas por receptores de complemento na membrana dos neutrófilos e promovem o processo de fagocitose e desgranulação.

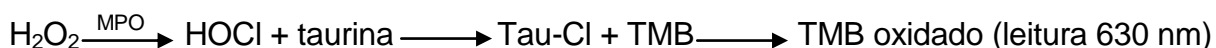
Primeiramente, o zimosan foi ressuspendido em solução de NaCl 0,15M, fervido durante 30 minutos e, logo após, centrifugado a 270xg por 5 minutos a 20°C. Em seguida, o zimosan foi ressuspendido em uma solução contendo SHN ou SHI, diluente de fixação de complemento (CFD)/gelatina 0,1% e taurina 5 mM, na proporção de 0,1mL de soro diluído 1:2 em diluente CFD/gelatina 0,1%, pH 7,2 para cada 1mg de zimosan.

As misturas Zi/SHN e Zi/SHI foram mantidas a 37°C por 30 min para opsonização. Após o período de incubação, a suspensão foi centrifugada (270xg por 5 minutos a 20°C) e, em seguida, lavada duas vezes em PBS 1x nas mesmas

condições. Ao final da lavagem, a concentração da solução estoque foi ajustada para 10mg de zimosan/mL de Hanks/gelatina 0,1% e taurina.

4.15 Avaliação da atividade da enzima mieloperoxidase

A avaliação da atividade da enzima mieloperoxidase foi realizada através da quantificação indireta de seu produto, o ácido hipocloroso, descrita por Dypbukt e colaboradores (2005). Após a interação do ácido hipocloroso com a taurina em excesso presente no meio, ocorre a formação de taurina-cloramina (Tau-Cl), que, na presença de iodeto, oxida a 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB), originando um cromóforo azul que é estável por 30 minutos, permitindo sua análise espectrofotométrica.



Um ensaio preliminar foi realizado para determinar a concentração de zimosan a ser utilizada que não saturasse o CR3. Para isso os neutrófilos foram incubados com as seguintes concentrações de zimosan, (0,5/ 1,0/ 1,5/ 2,0/ 3,0/ 3,5mg/mL). Uma vez padronizada a condição, 200µL de neutrófilos (2×10^6 células/mL) foram adicionados em tubos tipo *ependorf* contendo 100µL de zimosan (2mg/mL), opsonizado com SHN ou tratado com SHI, e 200 µL da solução Hanks/gelatina 0,1% suplementado com taurina, totalizando um volume final de reação de 500µL. Para a observação da atividade espontânea do neutrófilo, foram adicionados em um tubo tipo *ependorf* 200µL de neutrófilos e 300µL da solução Hanks/gelatina 0,1% suplementada com taurina.

Posteriormente, estes tubos foram incubados por 30 minutos a 37°C, ao abrigo da luz. Ao término da incubação, os tubos foram transferidos para o banho de gelo e a reação foi interrompida pela adição de catalase 10µL (2mg/mL). Em seguida, os tubos foram centrifugados (10620xg, 5 min, 4°C) e os sobrenadantes foram mantidos em banho de gelo. O acúmulo de taurina-Cl foi mensurado ao abrigo da luz, em microplaca de 96 poços, onde foram adicionados 200µL do sobrenadante e 50µL de uma solução reveladora contendo TMB dissolvido em dimetilformamida (DMF) e solução KI (iodeto de potássio). Após 5 minutos foi realizada a leitura da absorvância em 630 nm. As amostras do controle negativo não foram incubadas a 37°C, ficando acondicionadas no banho gelo durante toda a reação, até a leitura.

A oxidação do TMB é diretamente proporcional à concentração de taurina-Cl. Ou seja, quanto maior a concentração de ácido hipocloroso, maior a quantidade de taurina-Cl formada e, conseqüentemente, maior o valor da absorbância (Dyrbukt *et al.*, 2005).

4.16 Medida do *burst* oxidativo de neutrófilos por quimioluminescência

Os ensaios de quimioluminescência (QL) foram realizados segundo Alves e colaboradores (2003). Os neutrófilos foram estimulados com Zi/SHN ou Zi/SHI. Para execução deste método foi utilizada uma suspensão de neutrófilos (2×10^6 células/mL) em uma solução contendo Hanks/gelatina 0,1% pH 7,2, com e sem taurina, na presença ou ausência de lucigenina 10^{-4} M ou de luminol 10^{-4} M, em um volume total de reação de 500 μ L. As amostras foram incubadas com 2mg/mL de Zi/SHN ou Zi/SHI, durante 20 min a 37°C. Para a medida de QL espontânea, os neutrófilos foram incubados nas mesmas condições citadas anteriormente, porém, na ausência de estímulos. A produção de QL foi acompanhada em luminômetro e registrada em contagem de fótons por minuto (cpm). Posteriormente, os resultados foram expressos como a área integrada sob o perfil de QL registrado.

4.17 Análise da expressão dos receptores por citometria de fluxo

A expressão do receptor CR3 nos neutrófilos foi realizada de acordo com Marzocchi-Machado e colaboradores (2002).

Inicialmente, 200 μ L de uma suspensão de neutrófilos (2×10^6 células/mL) foram adicionados a 300 μ L da solução contendo Hanks/gelatina 0,1% suplementado com taurina, e incubados por 30 minutos a 37°C. Após a incubação, foram adicionados 500 μ L de PBS e as amostras foram submetidas à centrifugação (755xg/ 4°C por 10 min). Em seguida, desprezou-se o sobrenadante e as células foram ressuspensas em 200 μ L da solução Hanks/gelatina 0,1% suplementada com taurina. A essa mistura foram adicionados 5 μ L do anticorpo anti-CR3 ou do anticorpo isotipo controle. Posteriormente, as amostras foram incubadas por 20 minutos ao abrigo da luz a 8°C. O isotipo controle foi utilizado para descontar a fluorescência causada pela ligação inespecífica do anticorpo ao neutrófilo. Um tubo contendo somente células, sem marcação com anticorpos, foi analisado para descontar a autofluorescência celular.

Ao término da incubação, as amostras foram centrifugadas (755xg/ 4°C por 10 min) e, em seguida, ressuspensas com 2000 μ L de PBS/soro fetal bovino

2%/azida \leq 0,1%, pH 7,2, gelado para lavagem, e então centrifugadas na mesma condição anterior. Após a lavagem, desprezou-se o sobrenadante e as células foram ressuspensas com 500 μ L de PBS/paraformaldeído 1%.

As análises foram realizadas por citometria de fluxo. Os resultados obtidos nos histogramas foram expressos em mediana da fluorescência/célula em escala logarítmica.

4.18 Análises Estatísticas

Considerando que as observações da variável com o estímulo Zi/SHN foram obtidas em duplicadas, as suas médias entre os grupos de genótipos R77 e R77H+77H foram comparadas por um modelo linear de efeitos mistos, que inclui um efeito aleatório que correlaciona as medidas de um mesmo indivíduo. O pressuposto de normalidade dos resíduos deste modelo foi verificado. As médias dos dados de fluorescência foram comparadas entre os grupos de genótipos R77 e R77H+77H por testes t de Student para amostras independentes. As comparações para análises dos ensaios de quimioluminescência, com e sem taurina, foram realizadas por teste t pareado. Para estas análises estatísticas, utilizou-se o programa SAS versão 9.2, fixando-se um nível de significância de 0,05.

5. RESULTADOS

5.1 Genotipagem do polimorfismo da cadeia CD11b do CR3

O polimorfismo da cadeia CD11b do CR3 foi avaliada pela análise dos produtos da PCR em gel de agarose e pode ser visualizada na Figura 7. Os produtos de amplificação da região para o polimorfismo G328A (rs1143679) da cadeia CD11b do gene ITGAM apresentam tamanho de 124pb. O gene para o HGH foi utilizado como controle interno positivo da reação de amplificação e apresenta o tamanho de 428pb.

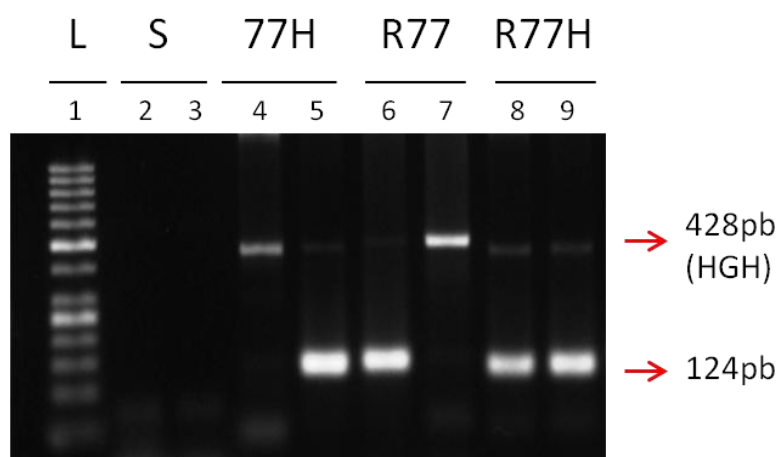


Figura 7. Identificação dos produtos de PCR, gel de agarose 2% em tampão TBE pH 8,3, coloração com GelRed, para a genotipagem R77H. **L**, *Ladder* (marcador de pares de base); **S**, reação sem DNA; **77H**, DNA de indivíduo homocigoto 77H; **R77**, DNA de indivíduo homocigoto R77; **R77H**, DNA de indivíduo heterocigoto R77H. Canaletas: 1, marcador de 50 pares de base (pb); 2, 4, 6 e 8, reação com oligonucleotídeos para o alelo R77; 3, 5, 7 e 9, reação com oligonucleotídeos para o alelo 77H. HGH, hormônio do crescimento humano, controle interno da reação (428pb). Os produtos dos genes R77 e 77H apresentam 124pb. Foto de Lima Júnior, J. R., arquivo do laboratório do autor.

5.2 Ativação do *burst* oxidativo de neutrófilo dependente de MPO

5.2.1 Padronização da concentração de zimosan

A padronização da concentração de zimosan como estímulo para os neutrófilos foi realizada com o ensaio da cloração da taurina pelo HOCl que resulta na oxidação do TMB. A Figura 8 mostra os resultados da padronização, onde neutrófilos foram incubados com diferentes concentrações de Zi/SHN e Zi/SHI, para escolher uma concentração em que não houvesse saturação do CR3. De acordo com os resultados, a condição de reação ficou assim determinada: Zi/SHN ou Zi/SHI (2mg/mL) para 2×10^6 neutrófilos em um volume final de reação de 500 μ L. Neutrófilos sem estímulos foram utilizados como controle de estimulação espontânea e o Zi/SHI como controle negativo da ativação do sistema complemento. As condições

estabelecidas a partir desta padronização foram aplicadas aos demais ensaios de estimulação dos neutrófilos.

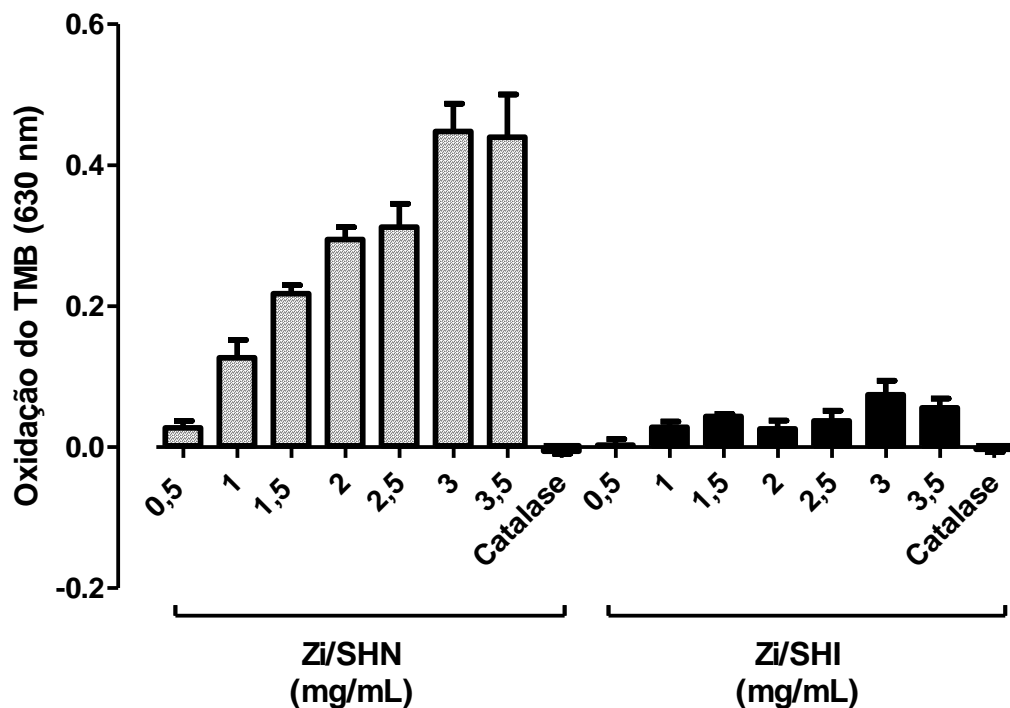


Figura 8. Padronização da concentração de estímulo. Medida da atividade clorinante da MPO em neutrófilos (2×10^6) estimulados com diferentes concentrações de Zi/SHN e Zi/SHI. A formação da taurina-cloramina foi quantificada pela reação com TMB. Os resultados foram realizados em triplicatas e os valores representam a média e o desvio padrão de 5 experimentos.

5.2.2 Atividade da MPO medida pela cloração da taurina pelo HOCl

A Figura 9 apresenta os resultados dos ensaios de estimulação do *burst* oxidativo de neutrófilos avaliados pela medida indireta da atividade da MPO pela cloração da taurina pelo HOCl. Neutrófilos de indivíduos com diferentes genótipos para o polimorfismo R77H (rs1143679) foram estimulados com Zi/SHN. Os resultados mostram que não houve diferença na atividade da MPO entre os grupos.

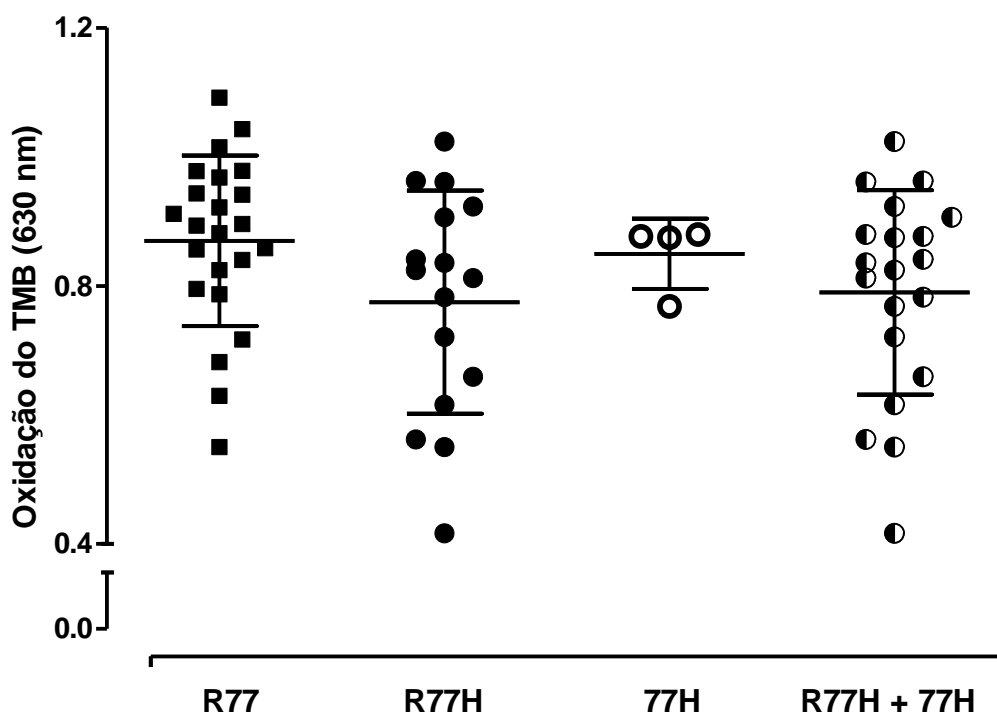


Figura 9. Atividade da MPO medida pela cloração da taurina pelo HOCl. Neutrófilos (2×10^6) foram estimulados com Zi/SHN e a atividade da MPO foi monitorada pela formação de taurina-cloramina. As barras representam a média para cada grupo descontados os valores de controle negativo para o complemento (neutrófilos e Zi/SHI). As análises foram realizadas em triplicata. TMB, 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina. Não houve diferença entre os grupos ($p = 0,24$).

5.2.3 Quimioluminescência dependente de lucigenina e luminol

Figura 10 apresenta a produção de ERO por neutrófilos de indivíduos classificados de acordo com o polimorfismo R77H. Não houve diferença na produção de ERO dependente de NADPH oxidase (Lucigenina) e na produção dependente da MPO (Luminol).

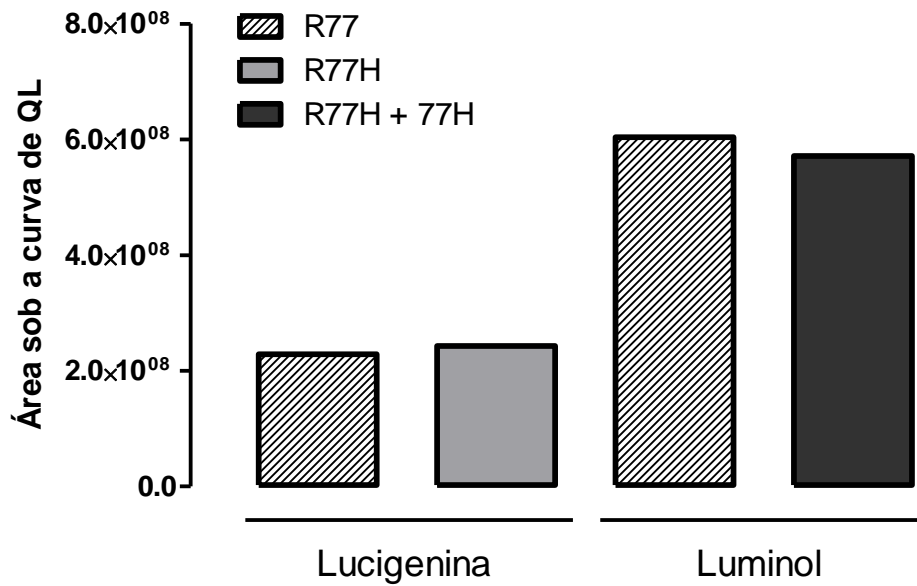


Figura 10. Medida da produção de ERO por neutrófilos de indivíduos com diferentes genótipos para a variante da cadeia CD11b do CR3. Neutrófilos (2×10^6) foram estimulados com Zi/SHN e a produção de ERO foi avaliada por quimioluminescência com a sonda lucigenina e com a sonda luminol. As barras representam a média para cada grupo descontados os valores de controle negativo para o complemento (neutrófilos e Zi/SHI). As análises foram realizadas em triplicata. QL, quimioluminescência. Não houve diferença entre os grupos ($p = 0,23$).

Para determinar o efeito da Taurina sobre a produção de ERO dependente de NADPH oxidase (Lucigenina) e dependente da MPO (Luminol), foi realizado um experimento com neutrófilos estimulados com Zi/SHN (Figura 11).

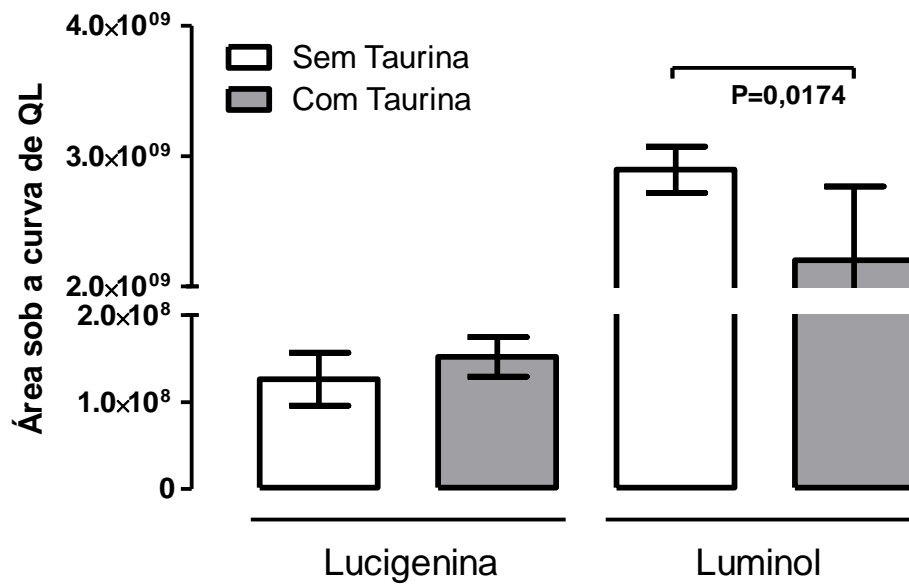


Figura 11. Avaliação do efeito da Taurina sobre a produção de ERO dependente de NADPH oxidase (Lucigenina) e dependente da MPO (Luminol). Neutrófilos foram estimulados com Zi/SHN e a produção de ERO foi avaliada por quimioluminescência com a sonda lucigenina e com a sonda luminol, na ausência ou presença de Taurina. As barras representam a média e o desvio padrão para cada grupo descontados os valores de quimioluminescência espontânea (somente neutrófilos e sondas luminescentes). As análises foram realizadas em triplicata. Diferença estatística sem Taurina x com Taurina $p=0,0174$ (teste t pareado). QL, quimioluminescência.

Na presença de Taurina, não houve diferença na produção de ERO dependente de NADPH oxidase (Lucigenina), mas houve uma diminuição significativa na produção de ERO dependente de MPO (Figura 11).

5.2.4 Análise da expressão do CR3 nos neutrófilos

A Figura 12 apresenta os histogramas de fluorescência para o CR3 marcado em neutrófilos. Além dos tubos contendo o anticorpo anti-receptor específico, foi feito um tubo contendo anticorpo não específico isotipo controle (Figura 12A) para descontar a fluorescência devido à ligação não específica do anticorpo a célula e um tubo sem anticorpos para descontar a autofluorescência celular.

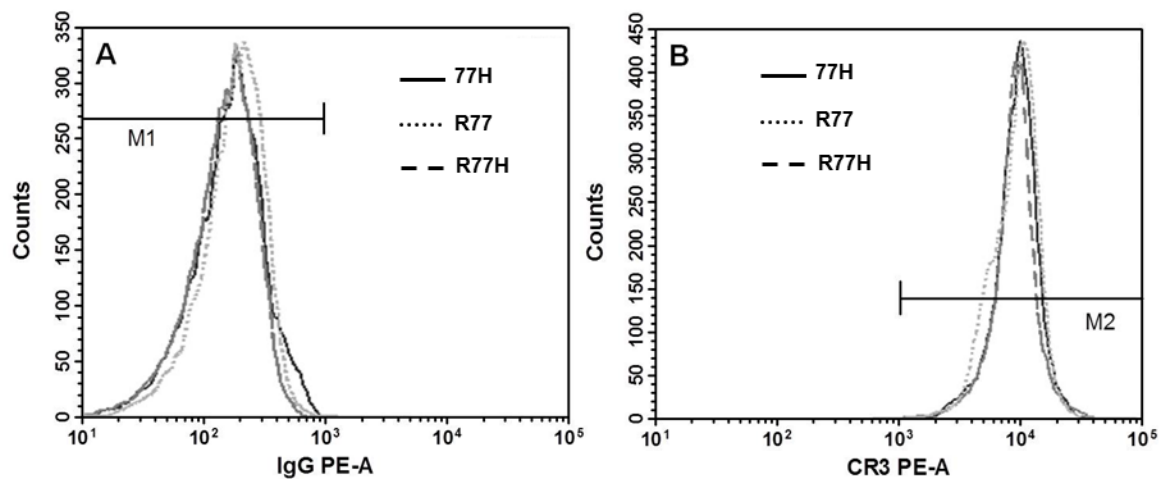


Figura 12. Representação dos histogramas de fluorescência do CR3 marcado na superfície de neutrófilos. Os resultados obtidos foram divididos de acordo com o polimorfismo de R77H: 77H, R77 e R77H. A, anticorpo isotipo controle, não-específico, marcado com ficoeritrina (PE); B, anticorpo anti-CR3 marcado com PE.

A mediana de intensidade de fluorescência para a ligação do anticorpo específico ao seu receptor está apresentada na Figura 13. Não foram encontradas diferenças entre os grupos analisados.

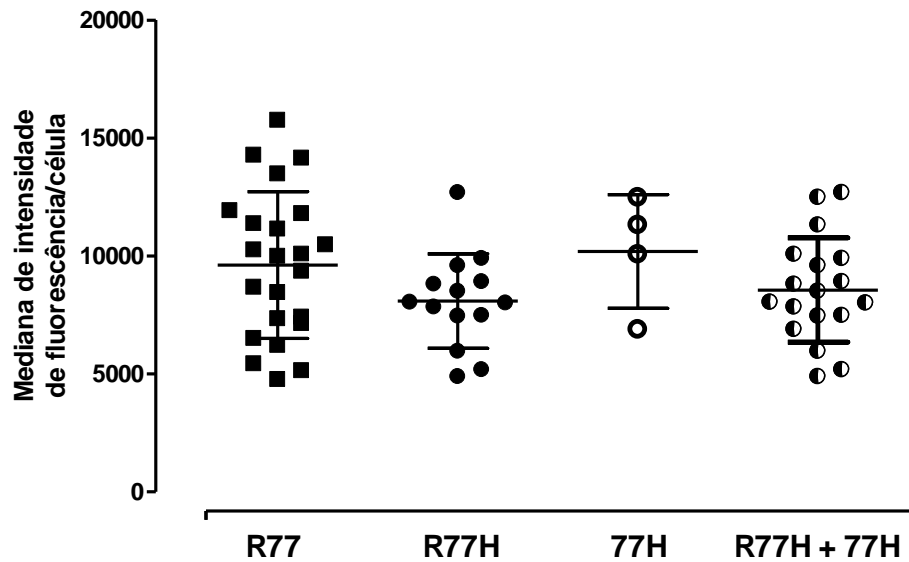


Figura 13. Expressão do CR3 na superfície de neutrófilos de indivíduos classificados de acordo com o polimorfismo R77H. Os valores da mediana de intensidade de fluorescência por célula de cada população de neutrófilos (cada voluntário) está apresentada. As barras representam os valores da média e o desvio padrão para cada grupo.

6. DISCUSSÃO

O CR3 é um receptor predominantemente expresso em neutrófilos e desempenha um importante papel na ativação destas células e na eliminação de antígenos, por desencadear a ativação celular, a quimiotaxia, a citotoxicidade e a fagocitose celular (Mikrou *et al.*, 2009). A ativação do complemento resulta na clivagem do componente C3 em C3b. O processamento proteolítico do C3b pelo fator I leva à formação dos fragmentos C3bi e C3dg, sendo o C3bi o ligante primário para o CR3 (Ross e Lambris, 1982; Bajic *et al.*, 2013).

Assim como o C3b, C3bi também atua como uma opsonina, covalentemente ligada à superfície ativadora do complemento. A interação entre o CR3 e o C3bi leva à uma transdução de sinais *outside-in* através da membrana da célula, promovendo a fagocitose, liberação da MPO e de outras proteínas presentes nos grânulos citoplasmáticos, e alteração na produção de citocinas pelos neutrófilos (Bajic *et al.*, 2013; Holers, 2014). O CR3 também é capaz de reconhecer o microrganismo diretamente através da interação do seu domínio *lectina-like* presente na cadeia CD11b com polissacarídeos presentes na superfície, por exemplo, zimosan (Forsyth, Plow e Zhang, 1998). Além disso, o CR3 participa ativamente do processo de adesão do neutrófilo ao endotélio vascular (Bunting *et al.*, 2002).

O nosso grupo de pesquisa tem estudado a biologia dos receptores para IgG e de complemento no LES (Marzocchi-Machado *et al.*, 2002; Alves *et al.*, 2003; Marzocchi-Machado *et al.*, 2005; Alves *et al.*, 2008), tendo descrito alterações de expressão e de funções mediadas por estes receptores, bem como a influência dos polimorfismos genéticos destes receptores nas funções efetoras dos neutrófilos e na suscetibilidade ao LES (Toller-Kawahisa *et al.*, 2014; Vigato-Ferreira *et al.*, 2014). Nesta linha de investigação, o grupo vem trabalhando para buscar o entendimento de como estas alterações observadas podem de fato ter implicações para as interações neutrófilos-endotélio e resultar em dano tecidual, em particular, nas doenças por depósitos de imunocomplexos.

O polimorfismo da cadeia CD11b do CR3 tem sido fortemente associado à suscetibilidade ao LES (Harley *et al.*, 2008; Nath *et al.*, 2008). Para explicar a relação entre este polimorfismo e a fisiopatologia do LES, vários trabalhos têm estudado as possíveis implicações deste polimorfismo com a atividade funcional do CR3 (revisado por Crispín, Hedrich e Tsokos, 2013). Contudo, devido à variabilidade

de modelos experimentais (espécies, estímulos, células) a relação da variante 77H com o LES ainda não é compreendida.

Considerando-se a importância das funções biológicas mediadas pelo CR3, o polimorfismo rs1143679 pode gerar alterações que comprometam o bom funcionamento dos mecanismos microbicidas, nos quais o CR3 tem papel fundamental. Uma vez que entre pacientes com LES há maior prevalência deste polimorfismo e sabendo-se que nesses pacientes as funções dos neutrófilos estão alteradas, fica clara a importância de determinar se a ocorrência do polimorfismo está relacionada com as alterações dos processos mediados por neutrófilos, como por exemplo, o *burst* oxidativo e produção de mediadores inflamatórios.

Neste trabalho, nós investigamos as implicações da variante da cadeia do CD11b (rs1143679) do CR3 para o *burst* oxidativo de neutrófilos humanos dependente de MPO. Por ora, nós analisamos apenas neutrófilos de indivíduos aparentemente saudáveis. Quando a atividade da MPO foi avaliada pelo método da oxidação do TMB pela taurina-cloramina, os resultados mostraram que houve uma pequena diferença, porém, estatisticamente não significativa, entre os grupos analisados, que compreenderam indivíduos saudáveis. A resposta dos neutrófilos de indivíduos com genótipos carregando a variante 77H (R77H e 77H) foi menor do que aquela observada para neutrófilos de indivíduos homocigotos para R77. No entanto, se esta pequena diferença pode ter significado biológico ainda não está claro, uma vez que variações funcionais podem ter influência na patogênese de algumas doenças, em particular o LES.

A presença da variante 77H, em heterocigose ou homocigose nos neutrófilos, sugere uma menor liberação de MPO, configurando uma diferença na atividade do receptor. Porém, o mecanismo molecular envolvido e as vias de sinalização afetadas pela mutação não foram ainda elucidadas.

Entretanto, vários trabalhos têm buscado investigar a influência do polimorfismo da cadeia CD11b nas funções efetoras dos neutrófilos mediadas por CR3, a fim de explicar a suscetibilidade ao LES. Fossati-Jimack e colaboradores (2013) observaram que a fagocitose mediada por CR3 em células mielóides humanas é afetada pelo polimorfismo da cadeia CD11b. Contudo, estes autores estudaram um modelo de células transfectadas com a variante CD11b e não

incluíram células de pacientes com LES nos ensaios. Adicionalmente, Zhou e colaboradores (2013) observaram uma diminuição significativa na fagocitose de Zi/SHN em cultura de neutrófilos de indivíduos aparentemente saudáveis e homocigotos para a variante 77H primados com fMLP. No entanto, estes pacientes também apresentavam homocigose para os polimorfismos, rs1143678, caracterizado pela troca de uma lisina por uma serina na posição 1143 do domínio citoplasmático do receptor, e rs1143683, caracterizado pela troca de uma alanina por uma valina na posição 851 do domínio extracelular. Estes resultados sugerem que quaisquer efeitos funcionais atribuídos ao SNP rs1143679 podem ter relação com o SNP 1143683, que, no estudo em questão, apresentou um forte desequilíbrio de ligação com o SNP 1143679. Contudo, nós não avaliamos as variantes rs1143678 e rs1143683.

O nosso grupo observou que a presença da variante 77H da cadeia CD11b prejudica a cooperação do CR3 com os receptores para a porção Fc da IgG (Fc γ R) para mediar o *burst* oxidativo de neutrófilos de pacientes com LES, quando estimulados por IC (Toller-Kawahisa *et al.*, 2013), bem como que a variante 77H está associada à nefrite lúpica (Toller-Kawahisa *et al.*, 2014), típica lesão por depósito de IC. A nefrite lúpica, *rash* malar e artrite também têm sido associadas a variante 77H (Anaya *et al.*, 2012).

Sabe-se que o CR3 atua em sinergismo com o receptor para a porção Fc da IgG (Fc γ R), fazendo com que, quando estimulados concomitantemente, a sinalização intracelular seja amplificada e haja maior ativação da NADPH oxidase para produção de ERO, maior mobilidade para o processo de fagocitose e maior liberação de enzimas lisossomais (Zhou e Brown, 1994). Assim, alterações estruturais e/ou funcionais nos Fc γ R e CR, tanto de caráter hereditário quanto adquirido, podem influenciar as interações entre neutrófilos e IC. Tais alterações podem levar à suscetibilidade e contribuir para a patogênese de doenças inflamatórias crônicas, nas quais a produção de ERO pelos neutrófilos medeia o dano tecidual (Gessner *et al.*, 1998).

Além de participar no reconhecimento de fragmentos iC3b, o CR3 liga-se ao ICAM-1 expresso pelas células endoteliais, tendo papel importante no recrutamento celular ao sítio inflamatório (Philips *et al.*, 1988). Então, este polimorfismo pode

alterar a conformação da cadeia CD11b do CR3, interferindo na sua interação com seus ligantes. Portanto, as interações com o endotélio, fagocitose e *clearance* de IC podem ficar prejudicadas e, como consequência, a variante polimórfica pode predispor o indivíduo a doenças (Nath *et al.*, 2008; Anaya *et al.*, 2012).

A MPO é a enzima mais abundante dos neutrófilos e é liberada durante a desgranulação como um importante sistema oxidante microbicida. Apesar desta ação benéfica, a MPO dos neutrófilos tem sido associada à patogênese de várias desordens, incluindo a agressão ao endotélio nos processos inflamatórios (Nauseef, 2001; Villanueva *et al.*, 2011). E em muitas das condições já descritas, o papel da MPO na patogênese pode estar direta ou indiretamente relacionado à sua ação enzimática ou, ainda, ser independente das suas propriedades catalíticas (Lau *et al.*, 2005; Klinke *et al.*, 2011). A deposição da MPO no endotélio pode levar à geração de oxidantes no local, atrair e ativar mais neutrófilos, acelerando e amplificando o processo inflamatório. A deposição da MPO no endotélio requer o contato íntimo entre neutrófilo e endotélio e é dependente da integrina CR3 (Jerke *et al.*, 2013), expressa nos neutrófilos, e da molécula ICAM-1, expressa no endotélio, sugerindo um papel importante para o CR3 em mediar o dano tecidual em condições inflamatórias crônicas. Um dos efeitos deletérios da MPO sobre o endotélio está relacionado à diminuição da disponibilidade do óxido nítrico, um mediador importante para o controle do relaxamento dos vasos, o que prejudica a plasticidade e contribui para a fisiopatologia da inflamação e lesão vascular (Nussbaum *et al.*, 2013).

Johansson e colaboradores (1997) através de um experimento, que consistia em adicionar neutrófilos a uma microplaca revestida de MPO, observaram que os neutrófilos eram capazes de se ligarem a MPO via CR3 e não por outras integrinas, pois a interação neutrófilo-MPO só era inibida quando as subunidades CD11b e CD18 eram bloqueadas por anticorpos específicos. Dadas essas premissas, Lau e colaboradores (2004) levantaram a hipótese da MPO induzir alterações de vias de sinalização intracelular ao se aderir ao CR3. Eles observaram que ao expor neutrófilos em repouso a MPO ocorria um aumento da fosforilação de várias proteínas intracelulares, incluindo a p38 MAPK (do inglês, *Mitogen-activated protein Kinases*). No entanto, a pré-incubação dos neutrófilos com anti-CD11b prevenia este aumento da fosforilação, sugerindo um papel da cadeia CD11b e da MPO na

ativação de proteínas quinase nos neutrófilos. A ativação da p38 MAPK induz ativação da NADPH oxidase e a transcrição de genes envolvidos nas respostas inflamatórias agudas por aumentar a translocação do NF- κ B (do inglês, *Nuclear Factor κ B*) para o núcleo que, por sua vez, induz a produção de citocinas como IL-8 e TNF- α (Rezzonico *et al.*, 2000). Curiosamente, no estudo promovido por Lau e colaboradores (2004), neutrófilos estimulados apenas com Zi/SHN não aumentaram esta translocação, sugerindo novamente o papel da MPO neste processo. Adicionalmente, o grupo observou que, ao expor neutrófilos não ativados à superfície contendo fibronectina ou fibronectina mais MPO a desgranulação dos neutrófilos era muito maior na superfície contendo MPO. E a desgranulação aumentou ainda mais em neutrófilos estimulados com Zi/SHN, sugerindo que a MPO não só ativa como também *prima* o neutrófilo.

Crescentes evidências vêm demonstrando o papel regulador do CR3 e da MPO na apoptose de neutrófilos. El Kebir e colaboradores (2008) investigaram como a MPO pode influenciar na sobrevivência e apoptose de neutrófilos *in vitro* e, conseqüentemente, a resposta inflamatória *in vivo*. Eles demonstraram que a MPO se liga ao CD11b e induz a fosforilação da proteína quinase B (PKB, do inglês, *protein kinase B*), também conhecida como Akt e/ou ERK1/2 (do inglês, *extracellular-signal-regulated kinases*), prevenindo a disfunção mitocondrial e ativação da caspase-3, atrasando o processo de apoptose de maneira dependente da concentração e do tempo de exposição do neutrófilo a MPO, apresentando um efeito pró-inflamatório. Análises eletroforéticas confirmaram a capacidade da MPO de atenuar a fragmentação de DNA.

Outra observação importante diz respeito à capacidade dos anticorpos anti-CR3 impedirem a supressão da apoptose por bloquear a ligação da MPO ao CR3. Adicionalmente, o grupo observou que níveis aumentados de MPO no plasma de murinos suprimiam a apoptose dos neutrófilos e prolongavam a inflamação. Este aumento nos níveis de MPO no plasma também é observado em pacientes com LES (Telles *et al.*, 2010) e artrite reumatoide ativa (Wang *et al.*, 2014). Dadas estas considerações, pode-se especular que a MPO liberada pelo neutrófilo possa agir de maneira autócrina e parácrina, sinalizando para a supressão da apoptose nos indivíduos com genótipo R77 de maneira mais efetiva em comparação aos

indivíduos com genótipos 77H e R77H, aumentando a sobrevivência dos neutrófilos dos indivíduos sem a mutação, prolongando a liberação de MPO no meio de reação.

Outra hipótese seria a dependência do estímulo utilizado. O zimosan quando não opsonizado com SHN é capaz de se ligar a receptores toll-2 (TLR-2, do inglês *toll-like receptor 2*) e ao domínio *lectina-like* presente na cadeia CD11b do CR3. Esta ligação é capaz de *primar* o receptor e modular a atividade dos domínios de ligação ao C3bi e, conseqüentemente, a atividade citotóxica do neutrófilo (Vetvicka, Thornton e Ross, 1996). Talvez esta diferença entre os grupos esteja relacionada com uma modificação na transdução de sinais nos indivíduos com a mutação.

Adicionalmente, a estimulação dos TLR ativa uma molécula adaptadora denominada MyD88 (do inglês, *myeloid differentiation factor 88*), que desencadeia uma cascata de sinalização que culmina na produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α e IL8. A IL-8 pode aumentar a expressão de CD11b na membrana do neutrófilo e regular o estado de ativação da célula (Chin *et al.*, 2009; Lundahl, Jacobson e Paulsson, 2012). Além disso, Forsberg e colaboradores (2001) demonstraram que o TNF- α é capaz de potencializar o *burst* oxidativo dos neutrófilos. Eles observaram que ao primar neutrófilos com TNF- α ocorria uma alteração na cinética de produção de ERO após estímulo do CR3, e o tempo para alcançar o valor máximo da produção de ERO foi reduzido pela metade em neutrófilos primados em comparação aos não-primados.

Deste modo, Reed e colaboradores (2013) levantaram a hipótese de que a ativação do CR3, influenciada pelo genótipo da cadeia CD11b, influenciava negativamente a função de TLR7/8 em macrófagos. Eles observaram que a ativação do CD11b em macrófagos via pré-tratamento com um composto denominado leucaderina-1, atenuava significativamente a secreção TNF- α dependente de TLR7/8 por macrófagos isolados de indivíduos homocigotos para a mutação rs1143679 do ITGAM (77H), quando comparados com indivíduos heterocigotos (R77H). Esta inibição era acompanhada por uma profunda degradação da proteína adaptadora MyD88, um efeito não observado quando ocorria uma inibição direta do TLR. Estes dados demonstram que o polimorfismo do CR3 pode influenciar a resposta de célula mediada por outros receptores, algo que nos permite levantar a possibilidade do CR3 ter influenciado negativamente a resposta nos indivíduos 77H e R77H.

O domínio I presente na cadeia CD11b do CR3 está bem estabelecido como sítio de ligação primário para o fragmento C3bi (Diamond *et al.*, 1993; Ueda *et al.*, 1994). No entanto, essa ligação também é influenciada por outras estruturas do receptor, tais como a estrutura beta-pregueada na cadeia CD11b, e o domínio conhecido como *I-Like* presente na região extracelular da cadeia CD18 (Yalamanchili *et al.*, 2000). Em um estudo realizado por Li e Zhang (2003), utilizando células humanas transfectadas que expressavam CR3, observou-se uma inibição de aproximadamente 90% da ligação do CR3 ao fragmento C3bi, por anticorpos policlonais que reconhecem sequências de aminoácidos na estrutura beta-pregueada. Levando em consideração estas informações, e o fato da posição 77 em que ocorre a troca de uma arginina por uma histidina na proteína estar localizada na região beta-pregueada, o polimorfismo pode de alguma maneira afetar a ligação do Domínio I ao C3bi e, conseqüentemente, o *burst* oxidativo dos neutrófilos.

Para avaliar se a capacidade antioxidante da Taurina estaria reduzindo a disponibilidade de ERO para a via dependente da MPO, a produção de QL foi avaliada utilizando-se diferentes sondas luminescentes. O luminol é exclusivamente oxidado pelo peróxido de hidrogênio e/ou pelas ERO derivadas dele, enquanto a lucigenina é preferencialmente oxidada pelo ânion superóxido, que se forma pela atividade da NADPH oxidase sobre o oxigênio molecular no início da produção do *burst* oxidativo (Ingraham *et al.*, 1982; Gasbarrini *et al.*, 1998). Este ânion superóxido é reduzido a peróxido de hidrogênio e a MPO catalisa a reação do peróxido de hidrogênio, em presença de íons haletos, para formar ácido hipocloroso. O ácido hipocloroso pode reagir com aminoácidos para formar cloraminas. Na presença de Taurina, o ácido hipocloroso reage com a Taurina para formar Taurina-Cloramina. Se a Taurina estivesse reagindo com o ânion superóxido ou com o peróxido de hidrogênio poderia estar interferindo na disponibilidade destes para a atividade da MPO. Isto não aconteceu, porque a produção de ERO medida pela QL dependente de lucigenina não foi alterada pela presença da Taurina. Contudo, a medida da QL dependente de luminol foi significativamente reduzida na presença da Taurina, o que demonstra que a Taurina está reagindo somente com produtos derivados do peróxido de hidrogênio, os quais dependem da atividade da MPO. Com este resultado, pôde-se validar o resultado da avaliação da atividade da MPO. Uma vez que não houve diferença significativa na medida da atividade da MPO dependente

de Taurina-Cloramina entre os neutrófilos de indivíduos com diferentes genótipos para a variante da cadeia CD11b do CR3, esta é uma característica dos neutrófilos e não um falso negativo por interferência da ação antioxidante da taurina.

Nós também apresentamos uma análise da expressão da cadeia CD11b na superfície dos neutrófilos. Nossos resultados demonstraram que a expressão total de CD11b não foi diferente entre os grupos. Estes dados corroboram com resultados obtidos por outros autores, tanto em modelos utilizando células transfectadas (Macpherson *et al.*, 2011), quanto em modelos utilizando neutrófilos humanos (Zhou *et al.*, 2013). Tais resultados nos permitem sugerir que o polimorfismo não interfere na expressão do receptor.

Os estudos dos mecanismos imunológicos e moleculares do CR3 e o entendimento de como variantes polimórficas podem afetar a expressão e/ou a função deste receptor, são essenciais para a compreensão de uma série de doenças autoimunes. Tais estudos podem auxiliar no desenvolvimento de novas terapias para estas doenças. Levando-se em consideração as funções imunomodulatórias da MPO, dependentes e independentes da sua atividade catalítica, nas interações entre neutrófilo e endotélio mediadas pelo CR3, em síntese, nosso resultado mostra que é necessário investigar se pequenas diferenças entre a liberação de MPO por neutrófilos, expressando a variante 77H do CD11b, pode explicar a associação deste polimorfismo com a suscetibilidade ao LES e/ou outras doenças.

7.CONCLUSÕES

- O polimorfismo rs1143679 da cadeia CD11b do CR3 não afetou a atividade de MPO em neutrófilos humanos. Contudo, a atividade da MPO de neutrófilos em resposta à estimulação com Zi/SHN, via CR3, foi menor, embora não significativa, em neutrófilos de indivíduos com a variante 77H (R77H e 77H) para a cadeia CD11b do CR3, quando comparados aos neutrófilos de indivíduos homocigotos R77.
- Esse resultado mostra a necessidade de investigar se pequenas diferenças entre a liberação de MPO por neutrófilos, expressando a variante 77H da cadeia CD11b, pode explicar a associação do polimorfismo rs1143679 com a suscetibilidade ao LES e/ou outras doenças.
- O *burst* oxidativo dos neutrófilos, medido pela QL dependente de lucigenina e luminol, não apresentou diferença entre os grupos, sugerindo que a variante 77H da cadeia CD11b do CR3 não afeta a produção de ERO dependente da atividade da NADPH oxidase e da MPO, respectivamente, neste modelo com Zi/SHN.
- Não houve diferença na expressão do CR3 nos diferentes grupos. Isto sugere que a variante 77H da cadeia CD11b do CR3 não interfere na expressão deste receptor.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIRRE, J. *et al.* Reactive oxygen species and development in microbial eukaryotes. **Trends Microbiol**, v. 13, n. 3, p. 111-8, Mar 2005. ISSN 0966-842X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15737729> >.

ALVES, C. M. *et al.* Application of the chemiluminescence systems to evaluate the role of Fcγ and complement receptors in stimulating the oxidative *burst* in neutrophils. **Talanta**, v. 60, n. 2-3, p. 601-8, Jun 2003. ISSN 1873-3573. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18969082> >.

_____. Superoxide anion production by neutrophils is associated with prevalent clinical manifestations in systemic lupus erythematosus. **Clin Rheumatol**, v. 27, n. 6, p. 701-8, Jun 2008. ISSN 0770-3198. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17955277> >.

AMULIC, B. *et al.* Neutrophil function: from mechanisms to disease. **Annu Rev Immunol**, v. 30, p. 459-89, 2012. ISSN 1545-3278. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22224774> >.

ANAYA, J. M. *et al.* Evaluation of genetic association between an ITGAM non-synonymous SNP (rs1143679) and multiple autoimmune diseases. **Autoimmun Rev**, v. 11, n. 4, p. 276-80, Feb 2012. ISSN 1873-0183. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21840425> >.

BABIOR, B. M. NADPH oxidase. **Curr Opin Immunol**, v. 16, n. 1, p. 42-7, Feb 2004. ISSN 0952-7915. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14734109> >.

BAJIC, G. *et al.* Structural insight on the recognition of surface-bound opsonins by the integrin I domain of complement receptor 3. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 110, n. 41, p. 16426-31, Oct 2013. ISSN 1091-6490. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24065820> >.

BERGT, C. *et al.* The myeloperoxidase product hypochlorous acid oxidizes HDL in the human artery wall and impairs ABCA1-dependent cholesterol transport. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 101, n. 35, p. 13032-7, Aug 2004. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15326314> >.

BJERREGAARD, M. D. *et al.* The in vivo profile of transcription factors during neutrophil differentiation in human bone marrow. **Blood**, v. 101, n. 11, p. 4322-32, Jun 2003. ISSN 0006-4971. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12560239> >.

BORREGAARD, N.; SØRENSEN, O. E.; THEILGAARD-MÖNCH, K. Neutrophil granules: a library of innate immunity proteins. **Trends Immunol**, v. 28, n. 8, p. 340-5, Aug 2007. ISSN 1471-4906. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17627888> >.

BRINKMANN, V. *et al.* Neutrophil extracellular traps kill bacteria. **Science**, v. 303, n. 5663, p. 1532-5, Mar 2004. ISSN 1095-9203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15001782> >.

BUNTING, M. *et al.* Leukocyte adhesion deficiency syndromes: adhesion and tethering defects involving beta 2 integrins and selectin ligands. **Curr Opin Hematol**, v. 9, n. 1, p. 30-5, Jan 2002. ISSN 1065-6251. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11753075> >.

BUX, J. *et al.* NA gene frequencies in the German population, determined by polymerase chain reaction with sequence-specific primers. **Transfusion**, v. 35, n. 1, p. 54-7, Jan 1995. ISSN 0041-1132. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7998071> >.

BYLUND, J. *et al.* Intracellular generation of superoxide by the phagocyte NADPH oxidase: how, where, and what for? **Free Radic Biol Med**, v. 49, n. 12, p. 1834-45, Dec 2010. ISSN 1873-4596. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20870019> >.

CARDONE, J. D. *et al.* Gene frequencies of the HNA-4a and -5a neutrophil antigens in Brazilian persons and a new polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism method for HNA-5a genotyping. **Transfusion**, v. 46, n. 9, p. 1515-20, Sep 2006. ISSN 0041-1132. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16965578> >.

CHIN, A. C. *et al.* CD47 and TLR-2 cross-talk regulates neutrophil transmigration. **J Immunol**, v. 183, n. 9, p. 5957-63, Nov 2009. ISSN 1550-6606. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19812191> >.

CHUA, G. L. *et al.* Structures and interaction analyses of integrin α M β 2 cytoplasmic tails. **J Biol Chem**, v. 286, n. 51, p. 43842-54, Dec 2011. ISSN 1083-351X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22052909> >.

CRISPÍN, J. C.; HEDRICH, C. M.; TSOKOS, G. C. Gene-function studies in systemic lupus erythematosus. **Nat Rev Rheumatol**, v. 9, n. 8, p. 476-84, Aug 2013. ISSN 1759-4804. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23732569> >.

DIAMOND, M. S. *et al.* The I domain is a major recognition site on the leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD18) for four distinct adhesion ligands. **J Cell Biol**, v. 120, n. 4, p. 1031-43, Feb 1993. ISSN 0021-9525. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7679388> >.

DIMASI, D.; SUN, W. Y.; BONDER, C. S. Neutrophil interactions with the vascular endothelium. **Int Immunopharmacol**, v. 17, n. 4, p. 1167-75, Dec 2013. ISSN 1878-1705. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23863858> >.

DVORAK, A. M.; FENG, D. The vesiculo-vacuolar organelle (VVO). A new endothelial cell permeability organelle. **J Histochem Cytochem**, v. 49, n. 4, p. 419-32, Apr 2001. ISSN 0022-1554. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11259444> >.

EL KEBIR, D. *et al.* Myeloperoxidase delays neutrophil apoptosis through CD11b/CD18 integrins and prolongs inflammation. **Circ Res**, v. 103, n. 4, p. 352-9, Aug 2008. ISSN 1524-4571. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18617697> >.

EL-BENNA, J.; DANG, P. M.; PÉRIANIN, A. Peptide-based inhibitors of the phagocyte NADPH oxidase. **Biochem Pharmacol**, v. 80, n. 6, p. 778-85, Sep 2010. ISSN 1873-2968. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20510204> >.

ETZIONI, A. Genetic etiologies of leukocyte adhesion defects. **Curr Opin Immunol**, v. 21, n. 5, p. 481-6, Oct 2009. ISSN 1879-0372. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19647987> >.

EVANS, R. *et al.* Integrins in immunity. **J Cell Sci**, v. 122, n. Pt 2, p. 215-25, Jan 2009. ISSN 0021-9533. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19118214> >.

FAGERHOLM, S. C. *et al.* The CD11b-integrin (ITGAM) and systemic lupus erythematosus. **Lupus**, v. 22, n. 7, p. 657-63, Jun 2013. ISSN 1477-0962. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23753600> >.

FARIDI, M. H. *et al.* High-throughput screening based identification of small molecule antagonists of integrin CD11b/CD18 ligand binding. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 394, n. 1, p. 194-9, Mar 2010. ISSN 1090-2104. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20188705> >.

FORSBERG, M. *et al.* Tumour necrosis factor-alpha potentiates CR3-induced respiratory burst by activating p38 MAP kinase in human neutrophils. **Immunology**, v. 103, n. 4, p. 465-72, Aug 2001. ISSN 0019-2805. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11529937> >.

FORSYTH, C. B.; PLOW, E. F.; ZHANG, L. Interaction of the fungal pathogen *Candida albicans* with integrin CD11b/CD18: recognition by the I domain is modulated by the lectin-like domain and the CD18 subunit. **J Immunol**, v. 161, n. 11, p. 6198-205, Dec 1998. ISSN 0022-1767. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9834106> >.

FOSSATI-JIMACK, L. *et al.* Phagocytosis is the main CR3-mediated function affected by the lupus-associated variant of CD11b in human myeloid cells. **PLoS One**, v. 8, n. 2, p. e57082, 2013. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23451151> >.

FREEMAN, S. A.; GRINSTEIN, S. Phagocytosis: receptors, signal integration, and the cytoskeleton. **Immunol Rev**, v. 262, n. 1, p. 193-215, Nov 2014. ISSN 1600-065X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25319336> >.

FREIRE, M. O.; VAN DYKE, T. E. Natural resolution of inflammation. **Periodontol 2000**, v. 63, n. 1, p. 149-64, Oct 2013. ISSN 1600-0757. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23931059> >.

GAHMBERG, C. G. *et al.* Regulation of integrin activity and signalling. **Biochim Biophys Acta**, v. 1790, n. 6, p. 431-44, Jun 2009. ISSN 0006-3002. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19289150> >.

GASBARRINI, A. *et al.* Chemiluminescent real time imaging of post-ischemic oxygen free radicals formation in livers isolated from young and old rats. **Free Radic Biol Med**, v. 24, n. 2, p. 211-6, Jan 1998. ISSN 0891-5849. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9433894> >.

GESSNER, J. E. *et al.* The IgG Fc receptor family. **Ann Hematol**, v. 76, n. 6, p. 231-48, Jun 1998. ISSN 0939-5555. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9692811> >.

HARLEY, J. B. *et al.* Genome-wide association scan in women with systemic lupus erythematosus identifies susceptibility variants in ITGAM, PTK, KIAA1542 and other loci. **Nat Genet**, v. 40, n. 2, p. 204-10, Feb 2008. ISSN 1546-1718. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18204446> >.

HENSON, P. M. The immunologic release of constituents from neutrophil leukocytes. I. The role of antibody and complement on nonphagocytosable surfaces or phagocytosable particles. **J Immunol**, v. 107, n. 6, p. 1535-46, Dec 1971. ISSN 0022-1767. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5120396> >.

HOLERS, V. M. Complement and its receptors: new insights into human disease. **Annu Rev Immunol**, v. 32, p. 433-59, 2014. ISSN 1545-3278. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24499275> >.

HU, X. *et al.* beta2-integrins in demyelinating disease: not adhering to the paradigm. **J Leukoc Biol**, v. 87, n. 3, p. 397-403, Mar 2010. ISSN 1938-3673. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20007244> >.

HUANG, Z. Y. *et al.* Interaction of two phagocytic host defense systems: Fc γ receptors and complement receptor 3. **J Biol Chem**, v. 286, n. 1, p. 160-8, Jan 2011. ISSN 1083-351X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21044955> >.

INGRAHAM, L. M. *et al.* Metabolic, membrane, and functional responses of human polymorphonuclear leukocytes to platelet-activating factor. **Blood**, v. 59, n. 6, p. 1259-66, Jun 1982. ISSN 0006-4971. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6282362> >.

JANG, H. R.; RABB, H. The innate immune response in ischemic acute kidney injury. **Clin Immunol**, v. 130, n. 1, p. 41-50, Jan 2009. ISSN 1521-7035. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18922742> >.

JERKE, U. *et al.* β 2 integrin-mediated cell-cell contact transfers active myeloperoxidase from neutrophils to endothelial cells. **J Biol Chem**, v. 288, n. 18, p. 12910-9, May 2013. ISSN 1083-351X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23532856> >.

JOHANSSON, M. W. *et al.* Myeloperoxidase mediates cell adhesion via the alpha M beta 2 integrin (Mac-1, CD11b/CD18). **J Cell Sci**, v. 110 (Pt 9), p. 1133-9, May 1997. ISSN 0021-9533. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9175709> >.

KENNEDY, A. D.; DELEO, F. R. Neutrophil apoptosis and the resolution of infection. **Immunol Res**, v. 43, n. 1-3, p. 25-61, 2009. ISSN 0257-277X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19066741> >.

KETTLE, A. J. *et al.* Reactions of superoxide with myeloperoxidase. **Biochemistry**, v. 46, n. 16, p. 4888-97, Apr 2007. ISSN 0006-2960. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17381162> >.

KLEBANOFF, S. J. Iodination of bacteria: a bactericidal mechanism. **J Exp Med**, v. 126, n. 6, p. 1063-78, Dec 1967. ISSN 0022-1007. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4964565> >.

_____. Myeloperoxidase: friend and foe. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 77, n. 5, p. 598-625, May 2005. ISSN 0741-5400. Disponível em: <Go to

_____. Myeloperoxidase: a front-line defender against phagocytosed microorganisms. **J Leukoc Biol**, v. 93, n. 2, p. 185-98, Feb 2013. ISSN 1938-3673. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23066164> >.

ISI>://WOS:000228875500002 >.

KLINKE, A. *et al.* Myeloperoxidase attracts neutrophils by physical forces. **Blood**, v. 117, n. 4, p. 1350-8, Jan 2011. ISSN 1528-0020. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20980678> >.

KOLACZKOWSKA, E.; KUBES, P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. **Nat Rev Immunol**, v. 13, n. 3, p. 159-75, Mar 2013. ISSN 1474-1741. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23435331> >.

KRISHNASWAMY, G. *et al.* Human endothelium as a source of multifunctional cytokines: molecular regulation and possible role in human disease. **J Interferon Cytokine Res**, v. 19, n. 2, p. 91-104, Feb 1999. ISSN 1079-9907. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10090394> >.

KUMAR, V.; SHARMA, A. Neutrophils: Cinderella of innate immune system. **Int Immunopharmacol**, v. 10, n. 11, p. 1325-34, Nov 2010. ISSN 1878-1705. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20828640> >.

LAU, D.; BALDUS, S. Myeloperoxidase and its contributory role in inflammatory vascular disease. **Pharmacol Ther**, v. 111, n. 1, p. 16-26, Jul 2006. ISSN 0163-7258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16476484> >.

LAU, D. *et al.* Myeloperoxidase mediates neutrophil activation by association with CD11b/CD18 integrins. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 102, n. 2, p. 431-6, Jan 2005. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15625114> >.

LEE, Y. H.; BAE, S. C. Association between the functional ITGAM rs1143679 G/A polymorphism and systemic lupus erythematosus/lupus nephritis or rheumatoid arthritis: an update meta-analysis. **Rheumatol Int**, Oct 2014. ISSN 1437-160X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25315704> >.

LEY, K. *et al.* Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. **Nat Rev Immunol**, v. 7, n. 9, p. 678-89, Sep 2007. ISSN 1474-1741. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17717539> >.

LI, Y.; ZHANG, L. The fourth blade within the beta-propeller is involved specifically in C3bi recognition by integrin alpha M beta 2. **J Biol Chem**, v. 278, n. 36, p. 34395-402, Sep 2003. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12816955> >.

LIESCHKE, G. J. *et al.* Mice lacking both macrophage- and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor have macrophages and coexistent osteopetrosis and severe lung disease. **Blood**, v. 84, n. 1, p. 27-35, Jul 1994. ISSN 0006-4971. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8018921> >.

LOMAKINA, E. *et al.* Activation of human neutrophil Mac-1 by anion substitution. **Blood Cells Mol Dis**, v. 42, n. 3, p. 177-84, 2009 May-Jun 2009. ISSN 1096-0961. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19246218> >.

LUNDAHL, J.; JACOBSON, S. H.; PAULSSON, J. M. IL-8 from local subcutaneous wounds regulates CD11b activation. **Scand J Immunol**, v. 75, n. 4, p. 419-25, Apr 2012. ISSN 1365-3083. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22229891> >.

LUCISANO, Y. M.; MANTOVANI, B. Lysosomal enzyme release from polymorphonuclear leukocytes induced by immune complexes of IgM and of IgG. **J Immunol**, v. 132, n. 4, p. 2015-20, Apr 1984. ISSN 0022-1767. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6699405> >.

MACPHERSON, M. *et al.* A systemic lupus erythematosus-associated R77H substitution in the CD11b chain of the Mac-1 integrin compromises leukocyte adhesion and phagocytosis. **J Biol Chem**, v. 286, n. 19, p. 17303-10, May 2011. ISSN 1083-351X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21454473> >.

MARZOCCHI-MACHADO, C. M. *et al.* Fcγ3 and complement receptors: expression, role and co-operation in mediating the oxidative burst and degranulation of neutrophils of Brazilian systemic lupus erythematosus patients. **Lupus**, v. 11, n. 4, p. 240-8, 2002. ISSN 0961-2033. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12043888> >.

_____. CR1 on erythrocytes of Brazilian systemic lupus erythematosus patients: the influence of disease activity on expression and ability of this receptor to bind immune complexes opsonized with complement from normal human serum. **J Autoimmun**, v. 25, n.

4, p. 289-97, Dec 2005. ISSN 0896-8411. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16289666> >.

Metchnikoff E. Lesson on the comparative pathology of inflammation. **Ann. Inst. Pasteur** 1893;7:348–57. French.

MCDONALD, B. *et al.* Intravascular danger signals guide neutrophils to sites of sterile inflammation. **Science**, v. 330, n. 6002, p. 362-6, Oct 2010. ISSN 1095-9203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20947763> >.

MCMILLEN, T. S.; HEINECKE, J. W.; LEBOEUF, R. C. Expression of human myeloperoxidase by macrophages promotes atherosclerosis in mice. **Circulation**, v. 111, n. 21, p. 2798-804, May 2005. ISSN 1524-4539. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15911707> >.

MIKROU, A. *et al.* CR3 complement receptor: cloning and characterization in rainbow trout. **Fish Shellfish Immunol**, v. 26, n. 1, p. 19-28, Jan 2009. ISSN 1095-9947. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18992821> >.

MILLER, S. A.; DYKES, D. D.; POLESKY, H. F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. **Nucleic Acids Res**, v. 16, n. 3, p. 1215, Feb 1988. ISSN 0305-1048. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3344216> >.

NATH, S. K. *et al.* A nonsynonymous functional variant in integrin-alpha(M) (encoded by ITGAM) is associated with systemic lupus erythematosus. **Nat Genet**, v. 40, n. 2, p. 152-4, Feb 2008. ISSN 1546-1718. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18204448> >.

NAUSEEF, W. M. Contributions of myeloperoxidase to proinflammatory events: more than an antimicrobial system. **Int J Hematol**, v. 74, n. 2, p. 125-33, Aug 2001. ISSN 0925-5710. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11594511> >.

_____. How human neutrophils kill and degrade microbes: an integrated view. **Immunol Rev**, v. 219, p. 88-102, Oct 2007. ISSN 0105-2896. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17850484> >.

NORDENFELT, P.; TAPPER, H. Phagosome dynamics during phagocytosis by neutrophils. **J Leukoc Biol**, v. 90, n. 2, p. 271-84, Aug 2011. ISSN 1938-3673. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21504950> >.

NOURSHARGH, S.; KROMBACH, F.; DEJANA, E. The role of JAM-A and PECAM-1 in modulating leukocyte infiltration in inflamed and ischemic tissues. **J Leukoc Biol**, v. 80, n. 4, p. 714-8, Oct 2006. ISSN 0741-5400. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16857733> >.

NUSSBAUM, C. *et al.* Myeloperoxidase: a leukocyte-derived protagonist of inflammation and cardiovascular disease. **Antioxid Redox Signal**, v. 18, n. 6, p. 692-713, Feb 2013. ISSN 1557-7716. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22823200> >.

PETERSEN, H. J.; SMITH, A. M. The role of the innate immune system in granulomatous disorders. **Front Immunol**, v. 4, p. 120, 2013. ISSN 1664-3224. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23745122> >.

PHILIPS, M. R. *et al.* Up-regulation of the iC3b receptor (CR3) is neither necessary nor sufficient to promote neutrophil aggregation. **J Clin Invest**, v. 82, n. 2, p. 495-501, Aug 1988. ISSN 0021-9738. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2841354> >.

PHILLIPSON, M. *et al.* Intraluminal crawling of neutrophils to emigration sites: a molecularly distinct process from adhesion in the recruitment cascade. **J Exp Med**, v. 203, n. 12, p. 2569-75, Nov 2006. ISSN 0022-1007. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17116736> >.

PLOW, E. F. *et al.* Ligand binding to integrins. **J Biol Chem**, v. 275, n. 29, p. 21785-8, Jul 2000. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10801897> >.

PROKOPOWICZ, Z. *et al.* Neutrophil myeloperoxidase: soldier and statesman. **Arch Immunol Ther Exp (Warsz)**, v. 60, n. 1, p. 43-54, Feb 2012. ISSN 1661-4917. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22143159> >.

RANKIN, S. M. The bone marrow: a site of neutrophil clearance. **J Leukoc Biol**, v. 88, n. 2, p. 241-51, Aug 2010. ISSN 1938-3673. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20483920> >.

REED, J. H. *et al.* Complement receptor 3 influences toll-like receptor 7/8-dependent inflammation: implications for autoimmune diseases characterized by antibody reactivity to ribonucleoproteins. **J Biol Chem**, v. 288, n. 13, p. 9077-83, Mar 2013. ISSN 1083-351X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23386618> >.

REEVES, E. P. *et al.* Killing activity of neutrophils is mediated through activation of proteases by K⁺ flux. **Nature**, v. 416, n. 6878, p. 291-7, Mar 2002. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11907569> >.

REZZONICO, R. *et al.* Engagement of CD11b and CD11c beta2 integrin by antibodies or soluble CD23 induces IL-1beta production on primary human monocytes through mitogen-activated protein kinase-dependent pathways. **Blood**, v. 95, n. 12, p. 3868-77, Jun 2000. ISSN 0006-4971. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10845922> >.

ROSS, G. D.; LAMBRIS, J. D. Identification of a C3bi-specific membrane complement receptor that is expressed on lymphocytes, monocytes, neutrophils, and erythrocytes. **J Exp Med**, v. 155, n. 1, p. 96-110, Jan 1982. ISSN 0022-1007. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6915077> >.

ROUGERIE, P.; MISKOLCI, V.; COX, D. Generation of membrane structures during phagocytosis and chemotaxis of macrophages: role and regulation of the actin cytoskeleton. **Immunol Rev**, v. 256, n. 1, p. 222-39, Nov 2013. ISSN 1600-065X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24117824> >.

SACHS, U. J. *et al.* Human alloantibody anti-Mart interferes with Mac-1-dependent leukocyte adhesion. **Blood**, v. 104, n. 3, p. 727-34, Aug 2004. ISSN 0006-4971. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15073035> >.

SADIK, C. D.; KIM, N. D.; LUSTER, A. D. Neutrophils cascading their way to inflammation. **Trends Immunol**, v. 32, n. 10, p. 452-60, Oct 2011. ISSN 1471-4981. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21839682> >.

SANCHEZ, E. *et al.* Phenotypic associations of genetic susceptibility loci in systemic lupus erythematosus. **Ann Rheum Dis**, v. 70, n. 10, p. 1752-7, Oct 2011. ISSN 1468-2060. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21719445> >.

SENGELØV, H. *et al.* Subcellular localization and dynamics of Mac-1 (alpha m beta 2) in human neutrophils. **J Clin Invest**, v. 92, n. 3, p. 1467-76, Sep 1993. ISSN 0021-9738. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8376598> >.

SIMSEK, S. *et al.* Molecular characterization of antigenic polymorphisms (Ond(a) and Mart(a)) of the beta 2 family recognized by human leukocyte alloantisera. **Blood**, v. 88, n. 4, p. 1350-8, Aug 1996. ISSN 0006-4971. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8695853> >.

SOEHNLEIN, O.; LINDBOM, L. Phagocyte partnership during the onset and resolution of inflammation. **Nat Rev Immunol**, v. 10, n. 6, p. 427-39, Jun 2010. ISSN 1474-1741. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20498669> >.

SUMMERS, C. *et al.* Neutrophil kinetics in health and disease. **Trends Immunol**, v. 31, n. 8, p. 318-24, Aug 2010. ISSN 1471-4981. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20620114> >.

TAKEUCHI, O.; AKIRA, S. Pattern recognition receptors and inflammation. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 805-20, Mar 2010. ISSN 1097-4172. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20303872> >.

TELLES, R. W. *et al.* Increased plasma myeloperoxidase levels in systemic lupus erythematosus. **Rheumatol Int**, v. 30, n. 6, p. 779-84, Apr 2010. ISSN 1437-160X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19639322> >.

TOLLER-KAWAHISA, J. E. *et al.* The variant of CD11b, rs1143679, in CR3 is associated with lupus nephritis and impaired FcγR/CR cooperation in mediating the oxidative burst of

neutrophils. **Mol Immunol**, v. 56, n. 3, p. 282, Dec 2013. ISSN 0161-5890. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0161589013002897> >.

TOLLER-KAWAHISA, J. E. *et al.* The variant of CD11b, rs1143679 within ITGAM, is associated with systemic lupus erythematosus and clinical manifestations in Brazilian patients. **Hum Immunol**, v. 75, n. 2, p. 119-23, Feb 2014. ISSN 1879-1166. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24269694> >.

UEDA, T. *et al.* Identification of the complement iC3b binding site in the beta 2 integrin CR3 (CD11b/CD18). **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 91, n. 22, p. 10680-4, Oct 1994. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7524101> >.

UNDERHILL, D. M.; OZINSKY, A. Phagocytosis of microbes: complexity in action. **Annu Rev Immunol**, v. 20, p. 825-52, 2002. ISSN 0732-0582. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11861619> >.

URIARTE, S. M. *et al.* Granule exocytosis contributes to priming and activation of the human neutrophil respiratory *burst*. **J Immunol**, v. 187, n. 1, p. 391-400, Jul 2011. ISSN 1550-6606. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21642540> >.

VALKO, M. *et al.* Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 39, n. 1, p. 44-84, 2007. ISSN 1357-2725. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16978905> >.

VAN DER VEEN, B. S.; DE WINTHER, M. P.; HEERINGA, P. Myeloperoxidase: molecular mechanisms of action and their relevance to human health and disease. **Antioxid Redox Signal**, v. 11, n. 11, p. 2899-937, Nov 2009. ISSN 1557-7716. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19622015> >.

VETVICKA, V.; THORNTON, B. P.; ROSS, G. D. Soluble beta-glucan polysaccharide binding to the lectin site of neutrophil or natural killer cell complement receptor type 3 (CD11b/CD18) generates a primed state of the receptor capable of mediating cytotoxicity of iC3b-opsonized target cells. **J Clin Invest**, v. 98, n. 1, p. 50-61, Jul 1996. ISSN 0021-9738. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8690804> >.

VIGATO-FERREIRA, I. C. *et al.* Fc γ R11a and Fc γ R111b polymorphisms and associations with clinical manifestations in systemic lupus erythematosus patients. **Autoimmunity**, v. 47, n. 7, p. 451-8, Nov 2014. ISSN 1607-842X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24896836> >.

VILLANUEVA, E. *et al.* Netting neutrophils induce endothelial damage, infiltrate tissues, and expose immunostimulatory molecules in systemic lupus erythematosus. **J Immunol**, v. 187, n. 1, p. 538-52, Jul 2011. ISSN 1550-6606. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21613614> >.

WANG, W. *et al.* Increased levels of serum myeloperoxidase in patients with active rheumatoid arthritis. **Life Sci**, Sep 2014. ISSN 1879-0631. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25261597> >.

WEISS, S. J. *et al.* Chlorination of taurine by human neutrophils. Evidence for hypochlorous acid generation. **J Clin Invest**, v. 70, n. 3, p. 598-607, Sep 1982. ISSN 0021-9738. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6286728> >.

WOODFIN, A. *et al.* JAM-A mediates neutrophil transmigration in a stimulus-specific manner in vivo: evidence for sequential roles for JAM-A and PECAM-1 in neutrophil transmigration. **Blood**, v. 110, n. 6, p. 1848-56, Sep 2007. ISSN 0006-4971. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17505016> >.

WRIGHT, H. L. *et al.* Neutrophil function in inflammation and inflammatory diseases. **Rheumatology (Oxford)**, v. 49, n. 9, p. 1618-31, Sep 2010. ISSN 1462-0332. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20338884> >.

YALAMANCHILI, P. *et al.* Folding and function of I domain-deleted Mac-1 and lymphocyte function-associated antigen-1. **J Biol Chem**, v. 275, n. 29, p. 21877-82, Jul 2000. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10764808> >.

YANG, W. *et al.* ITGAM is associated with disease susceptibility and renal nephritis of systemic lupus erythematosus in Hong Kong Chinese and Thai. **Hum Mol Genet**, v. 18, n. 11, p. 2063-70, Jun 2009. ISSN 1460-2083. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19286673> >.

ZARBOCK, A.; LEY, K. Neutrophil adhesion and activation under flow. **Microcirculation**, v. 16, n. 1, p. 31-42, Jan 2009. ISSN 1549-8719. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19037827> >.

ZARBOCK, A. *et al.* Leukocyte ligands for endothelial selectins: specialized glycoconjugates that mediate rolling and signaling under flow. **Blood**, v. 118, n. 26, p. 6743-51, Dec 2011. ISSN 1528-0020. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22021370> >.

ZAGO, M.A.; FALCÃO, R.P.; PASQUINI, R. Hematologia: fundamentos e prática. São Paulo, Editora Atheneu, 2004.

ZHOU, M. J.; BROWN, E. J. CR3 (Mac-1, alpha M beta 2, CD11b/CD18) and Fc gamma RIII cooperate in generation of a neutrophil respiratory *burst*: requirement for Fc gamma RIII and tyrosine phosphorylation. **J Cell Biol**, v. 125, n. 6, p. 1407-16, Jun 1994. ISSN 0021-9525. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7515890> >.

ZHOU, Y. *et al.* Multiple lupus-associated ITGAM variants alter Mac-1 functions on neutrophils. **Arthritis Rheum**, v. 65, n. 11, p. 2907-16, Nov 2013. ISSN 1529-0131. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23918739> >.

ANEXOS

9. Anexos

9.1 **Anexo I:** Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto
Comitê de Ética em Pesquisa



Of. CEP/FCFRP n.º. 034/2014
kms

Ribeirão Preto, 3 de julho de 2014.

Ao pós-graduando
João Rodrigues Lima Júnior
Orientadora: Profa. Dra. Cleni Mara Marzocchi Machado
FCFRP/USP


Prezado Pós-graduando,

Informamos que o projeto de pesquisa intitulado “**IMPLICAÇÕES DA VARIANTE DA CADEIA DO CD11b (RS1143679) DO CR3 PARA A LIBERAÇÃO DA MIELOPEROXIDASE DE NEUTRÓFILOS HUMANOS**”, apresentado por Vossa Senhoria a este Comitê, Protocolo **CEP/FCFRP n.º. 349**, foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FCFRP em sua 132ª Reunião Ordinária realizada em 02/07/2014.

Lembramos que, de acordo com a Resolução 466/2012, item IV.5, letra d, o TCLE deverá “ser elaborado em duas vias, rubricadas em todas as suas páginas e assinadas, ao seu término, pelo convidado a participar da pesquisa, ou por seu representante legal, assim como pelo pesquisador responsável, ou pela(s) pessoa(s) por ele delegada(s), devendo as páginas de assinaturas estar na mesma folha. Em ambas as vias deverão constar o endereço e contato telefônico ou outro, dos responsáveis pela pesquisa e do CEP local”.

Informamos que deverá ser encaminhado ao CEP/FCFRP o relatório final da pesquisa em formulário próprio deste Comitê, bem como comunicada qualquer alteração, intercorrência ou interrupção do mesmo, tais como eventos adversos e eventuais modificações no protocolo ou nos membros da equipe, através da interposição de **emenda** na Plataforma Brasil.

Atenciosamente,


Prof.ª. Dr.ª. Elisa Maria de Sousa Russo
Vice-Coordenadora do CEP/FCFRP

9.2 Anexo II: Protocolos para o preparo das principais soluções utilizadas.

SOLUÇÃO BALANCEADA DE HANKS	
NaCl	8g
KCl	0,4g
CaCl ₂ Anidro	0,139g
MgCl ₂ .6H ₂ O	0,1g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,1g
Na ₂ HPO ₄	0,048g
KH ₂ HPO ₄	0,06g
Glicose	1,0g
NaHCO ₃	0,35g
Água deionizada qsp	1000mL
Ajustar o pH final para 7,2 a 25°C com NaOH. Filtrar.	

SOLUÇÃO DE GELATINA 2,5% EM CLORETO DE SÓDIO 0,15M	
Gelatina	2,5g
Sol. De NaCl 0,15M qsp	100mL
Aquecer.	

CLORETO DE AMÔNIO 0,83%		
Cloreto de amônio (NH ₄ Cl) [PM = 53,49; M = 0,16M]	4,28g	8,56g
Água deionizada estéril qsp	500mL	1000mL
Ajustar pH para 7,2 e Filtrar		

<u>SOLUÇÃO DE ALSÉVER</u>	
Citrato trissódico. 2H ₂ O	8g
Cloreto de sódio (NaCl)	4,2g
Glicose	20,5g
Água deionizada qsp	1000mL
Ajustar pH final para 6,1 com ácido cítrico 10%. Filtrar.	

<u>CLORETO DE SÓDIO 0,15M (0,9%)</u>	
NaCl [PM = 58,44]	8,76g
Água deionizada qsp	1000mL
Autoclavar.	

<u>PBS (SALINA TAMPONADA COM FOSFATO) PH 7,4 (10 X)</u>	
NaCl	80,0g
KCl	2,0g
Na ₂ HPO ₄	11,5g
KH ₂ PO ₄	2,0g
Água deionizada estéril qsp	1000mL
Ajusta pH final para 7,4 a 25°C com HCl.	

<u>TAMPÃO DE AMOSTRA PARA DNA (6X)</u>	
40% sacarose	4g
0,25% azul de bromofenol	0,025mL do 1%
Água deionizada estéril qsp	10mL
Alíquotas de 1mL e armazenar em -20°C.	

<u>LÍQUIDO DE TURK</u>	
Violeta Genciana 1%	1mL
Ácido Acético Glacial	1mL
Água deionizada estéril qsp	100mL

<u>TAMPÃO TRIS-BORATO-EDTA (TBE) 10X CONCENTRADO</u>	
Tris Base	121,1g (1M)
Ácido Bórico Anidro	55,6g (0,9M)
EDTA.Na ₂ .2H ₂ O	3,7g (10mM)
Água deionizada estéril qsp	1000mL

<u>EDTA (0,1M) - FAGOCITOSE</u>	
EDTA	37,2g
NaCl 0,15M qsp.	100mL
Acertar o pH para 4,4.	

<u>TAMPÃO FOSFATO - K_2HPO_4 (0,1M)</u>	
K_2HPO_4	1,74g
H ₂ O estéril qsp.	100mL
Acertar o pH para 7,0 com HCl.	

<u>TAMPÃO DE LISE DE ERITRÓCITOS</u>	
Tris-HCl	1,57g
Água estéril qsp.	1000mL
Acertar o pH para 7,5.	
Sacarose	102,69g
MgCl ₂	0,048g
Solubilizar no Tris-HCl preparado preciamente.	
Triton X-100	10mL
Água estéril qsp.	1000mL
Estocar sob refrigeração (4°C) e protegido da luz.	

<u>TAMPÃO DE LISE DE GLÓBULOS BRANCOS</u>	
NaCl	4,35g
EDTA	8,92g
Água estéril qsp.	1000mL
Acertar o pH para 8,0. Estocar à temperatura ambiente.	

<u>CLORETO DE SÓDIO 6,0M</u>	
NaCl	34,8g
Água estéril qsp.	100mL
Estocar a solução saturada à temperatura ambiente.	